

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

*Anbiograma* 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 antibiogramei cu discuri constă în însămânțarea pe geloza 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

### 1. MEDILE 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 **medile 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 săuri minerale, de apă, de vitamine și factori de creștere necesari dezvoltării și reproducării celulelor bacteriene, să satisfacă cerințele de aerobioză sau anaerobioză ale agentului, fiind 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 izolare în cultură pură a germenului respectiv.

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

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

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

- *medii de izolare*, care permit izolare bacteriei dintr-un produs patologic;
  - *medii de transport*, care permit supraviețuirea anumitor bacterii ce nu pot fi însămânțate imediat după recoltare (de exemplu, mediu Stuart pentru Neisserii, Carry-Blair pentru vibrioul holeric etc.);
  - *medii de imbogătire*, 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 mediu Müller-Kauffmann pentru salmonele);
  - *medii selective*, care conțin elemente ce permit creșterea numai a anumitor bacterii dintr-un produs (de exemplu, mediu Wilson-Blair pentru bacilul tific);
  - *medii diferențiale*, care conțin substanțe ce pun în evidență unele proprietăți biochimice ale bacteriilor studiate. La rândul lor, medile diferențiale pot fi *simple* (de exemplu, mediu AABTL care pune în evidență fermentarea lactozei) sau *politrope* (de exemplu, mediu 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 printr-o filtrare corectă;

- substanțele organice care intră în compozitia mediului trebuie să aibă calități nutritive optimă 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. Carnea folosită la prepararea acestuia trebuie să provină de la vite sănătoase. Maceratul de carne se prepară astfel:

- carne proaspăta de viață sau de cal se curăță de tendoane, aponevrose și de grăsimi și se trece prin mașina de tocăt. La 1 000 g tocătura 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 lopătică de lemn. Se filtrează apoi prin tifon. Se completează cu apă distilată la volumul initial.

Maceratul nu se folosește ca alătre, 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 încalzește 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 îndepărțarea precipitatului, mediu se filtrează la cald prin hârtie de filtru și se repartizează bulionul obținut în recipiente adecvate întrebunțării (eprubete 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*. Geloză sau agarul se extrage dintr-o algă, este lipsită de substanțe nutritive și servește numai la solidificarea mediului. Rămâne solid la 37°C, permisând obtinerea 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 împătură într-un tifon este lăsată câteva ore în apă rece curgătoare. Bulionul cu agar se ține pe foc la fierbere, agitându-se până la completa topire a agarului. Se completează la volumul initial 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 germenilor care nu au cerințe nutritive deosebite.

*Apa peptonată simplă*. Se prepară prin dizolvare la cald a 10 g peptonă și 5 g ClNa în 1 000 ml apă distilată. Se ajustează pH-ul la 7,6 cu soluție 10% de NaOH după care se autoclavă la 120°C timp de 30 min. pentru precipitare. Se filtrează prin hârtie de filtru, se repartizează în tuburi sau baloane, după necesitate 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 teste de fermentare ale zaharurilor și alcoolilor, fie pentru teste de producere de indol sau H<sub>2</sub>S.

*Geloză sângel*. Se prepară din geloză nutritivă 2% lichifiata 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 capacitatii de hemoliză a unora dintre aceștia (streptococ, stafilococ).

*Mediu 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 mediu cel mai simplu utilizat pentru izolare germenilor anaerobi. Se însământeză produsul patologic în profunzimea mediului lichefiat prin încălzire urmată de resolidificare prin răcire.

*Mediu 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 autoclavă la 120°C și se filtrează. În alti 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 necesitate și se sterilizează la 110°C timp de 30 min. – pH final 5,8-6,2. Un mediu similar *lichid* se poate prepara din aceleasi ingrediente minus agarul. Aceste medii se utilizează pentru izolare și cultivare ciupercilor microscopici.

*Stabilitatea 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 aparatul necesar se poate utiliza metoda colorimetrică. Aceasta din urmă se bazează pe proprietatea unor substanțe numite indicatori, de-a-si modifică culoarea sau nuanța în funcție de gradul de aciditate sau alcalinitate al soluției în care sunt dizolvate. Prințipiu 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 contin 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 iar în locul 4 se punte 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 potrivesc, 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, umectată 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. INSĂMÂNȚAREA MEDIILOR DE CULTURĂ

Scopul principal al oricărui examen microbiologic este acela de a identifica agentul etiologic al unei afectiuni, 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 microrganismul în cultură pură. Multiplicarea și izolare germenilor respectivi este posibilă prin însămânțare pe mediul de cultură adecvata, sau în special pentru virusuri, dar și pentru unele bacterii, prin inoculare în ţesuturi vii (culturi de celule, ouă embrionare, animale de laborator susceptibile).

Însămânțarea sau inocularea prelevelor 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 agentii 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 materiale sterile (medii, plăci, tuburi, anse, pipete Pasteur sau gradate, tampoane etc.) în spațiile sterile din jurul flăcării bocalului de gaz, și cu recipiente cu substanțe dezinfecțante (ex. amestec sulfo-cromic) și găleți de infecte la îndemâna. În situații speciale când se bănuiește prezența în produsul patologic a unor agenti microbieni deosebit 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 flacără 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 înrosit în flacără se introduce în recipientul ce conține prelevatul, se răcește alipind-o de peretele recipientului, apoi se ia o porțiune din produs. Se scoate dopul recipientului cu mediu și se flambează gura acestuia. Materialul luat pe buclă ansiei din prelevat este introdus în mediu din recipientul deschis sub protecția flăcării. Se descarcă ansa pe peretele 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 flăcără atât capătul cât și totă lungimea ei. Se controlează apoi răcirea ei după flambare.

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

Pipeta flambată și răcitată se introduce în recipientul cu produsul prelevat și se aspiră de la câteva picături până la 1 sau mai multă 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 aceleasi precauții de flambare a gălăului 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.

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

### *Însămânțări pe medi 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 tampoane, cu pipete etc. În cursul însămânțării se iau aceleasi precauții pentru păstrarea sterilității ca și la operațiunile de însămânțare în medii lichide.

Când se însămânțeză medi 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 zgâria 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 înșământării prin incorporare.* Se lichefiază mediul prin încălzire la +80°C, se răcește la +50°C și se introduce produsul de înșămânat cu o pipetă sterilă. Se omogenizează prin ușoara rotație a recipientului. Mediul astfel înșămânat se toarnă, după caz, în plăci Petri sterile, sau se lasă ca atare în recipientul în care s-a făcut înșământarea.

#### *Tehnici de înșământare cu izolare agentului microbian în cultură pură*

Acestea urmăresc 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 asociatie se realizează prin diferite metode care pot acționa fie direct asupra florei de asociatie, inhibând-o în dezvoltarea ei, fie indirect, acționând asupra germenu lui 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 successive în mediu lichide sau de epuijare pe medii solide.

*Tehnica diluțiilor successive în mediu lichide.* În acest scop se utilizează un sir de eprubete cu aceeași cantitate de mediu lichid. Se introduce, cu o pipetă, o picătură din amestecul de germe în primul tub. Se agită conținutul eprubetei. Apoi, schimbându-se pentru fiecare eprubetă pipetele, se trece succesiiv dîntr-o eprubetă în cealaltă căte o picătură.

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

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

*Tehnica epuijării ansei pe medii solide* se realizează prin înșământări cu ansa bacteriologică, încărcată o singură dată cu amestecul de germe, într-un șir de eprubete cu geloză înclinată, fără a steriliza sau a reîncărca ansa bacteriologică pe parcurs. Astfel se epuijează conținutul ansei și, în final, se ajunge să se înșământeze numai câteva celule microbiene într-un tub care prin incubare la termostat 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 diseminației (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 striuri paralele, ansa bacteriologică va fi sterilizată prin încălzire la incandescentă și nu va fi încărcată cu inoculul amestec decât o singură dată la început. În momentul intersectării cu striurile precedente, ansa este reincarcată 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 disseminate pe placă și vor da naștere la colonii microbiene izolate.

*Tehnici speciale de izolare.* Sunt utilizate când urmărim izolare unumitor specii chimice sau biologice. Dintre mijloacele fizice, de izolare, menționăm încălzirea ori oră la 80°C a amestecului de germe, care se practică pentru a izola germele sporulați de formele vegetative de microb. De asemenea, filtrarea printr-un filtru bacteriologic permite izolare unui virus ce străbate porii filtrului, dîntr-un amestec cu bacterii ce sunt reținute de acesta.

Ca metode chimice menționăm: *medile de cultură selective* care conțin un agent inhibitor pentru flora de asociatie (mediul Löwenstein care conține verde malachit substrat nutritiv ce, convenind preferențial speciei pe care dorim să-o izolăm, permite dezvoltarea sa mai rapidă (mediul Löffler, efectiv pentru bacilul diferic) și *medile diferențiale* care permit relevarea unor caractere enzimatice proprii germenilor vizati de a fi izolați din amestec (mediul Istrati-Meillet utilizat în izolare dîntr-o coprocultură a unor enterobacterii lactozo pozitive sau negative).

Ca metode biologice de izolare menționăm *metoda de înșământare pe medii cu agentii biologici selectivi*, deci utilizarea de medii selective pe bază de antibiotice (mediul selectiv LCN pentru izolare meningococului care conține Lincomicina, Colimicina și Nisatin), și *utilizarea unor animale de laborator* pentru izolare unor specii bacteriene dîntr-un amestec – de exemplu, inocularea subcutanată a șoarecelui alb cu o spută în care se găsește un pneumococ. După 1-4 zile de la inoculare, șoarecelul face o infecție septicemică letală cu pneumococ, putându-se izola în cultură pură acest germe din sânge. Un alt exemplu îl constituie inocularea subcutanată la un cobai a unui produs patologic în care se găsește b.Koch. Din viscerale 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 *micromanișipulare* se poate realiza cu ajutorul unui micromanișipulator, 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 DEZINFECTIA

### I. STERILIZAREA

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

Principaliii agentii fizici utilizati pentru realizarea sterilizării sunt: căldura, filtrarea, centrifugarea, radiatiile ultraviolete și, mai rar, ultrasunetele.

#### 1.1. STERILIZAREA PRIN CALDURA

Căldura folosită pentru sterilizare poate fi uscată sau umedă.

##### Sterilizarea prin căldură uscată

*Incidirea la roșu* este folosită mai ales pentru sterilizarea ansei înainte și după întrebuințare și constă din încălzirea firului de platini, până capătă culoarea roșie, la flacără unui bec de gaz sau la flacără unei lămpi cu alcool.

*Flamboarea* constă din trecerea rapidă prin flacără a unui obiect (pipetă, gătul flacoanelor sau al eprubetelor, al baghetelor, lame, spatule etc.), în scopul de a distruge microorganismele existente pe suprafața acestora.

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

Materialele pregătite pentru sterilizare, puse în coșurile metalice, sunt depuse pe răfururile cuporului, fără a fi sprujnite de pereti acestuia. Se inchide usa aparatului, se aprinde sursa de căldură și se urmărește cu atenție termometrul pentru atingerea temperaturii de  $180^{\circ}\text{C}$  și menținerea ei la acest nivel timp de o oră. După acest timp se întrerupe sistemul de încălzire și se așteaptă scăderea temperaturii din cupor fără a deschide ușa, deoarece răcirea bruscă poate provoca spargerea sticării. 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

*Fierberea* în apă este utilizată mai ales pentru sterilizarea seringilor, a fierbător metalic. Obiectele supuse sterilizării se introduc în apă distilată, care este încălzită electric sau cu flacără până la punctul de fierbere și menținută astfel timp de 30 min.

Fierberea distrugă formele vegetative ale bacteriilor, virusurile și unii spori (tetanos, carbune etc.).

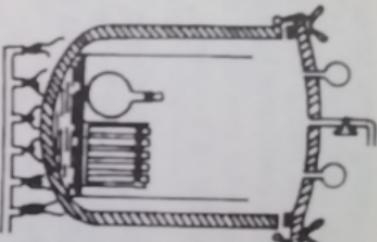


Fig.11. Secțiune prin autoclav.

După terminarea sterilizării se stinge 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. De compresiunea brusă 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 (benzoatafolul se topesc la  $110^{\circ}\text{C}$ , sulful la  $115^{\circ}\text{C}$ , acidul benzoic la  $121^{\circ}\text{C}$ ).

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

*Sterilizarea cu vaporii la  $100^{\circ}\text{C}$*  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  $100^{\circ}\text{C}$ .

*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  $120^{\circ}\text{C}$ , timp de o jumătate de oră.

Autoclava funcționează astfel: se pună apă în cazonul aparatului până aproape de suportul pe care se așază coșuletele cu materiale, se introduc în cazon materialele de sterilizat (baloane cu medii de cultură, apă distilată, soluție salină fiziologică, dopuri și tuburi de cauciuc, pâlnii, aparate de săngerață, filtre, casolete, găleți cu materiale infectate etc.) și se acoperă cu o coală de hârtie pentru a se evita umezirea lor cu apă rezultată din condensarea vaporilor. Se inchide 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  $115^{\circ}\text{C}$ , la 1 at corespund  $120^{\circ}\text{C}$ , iar la 2 at,  $134^{\circ}\text{C}$ ). Când s-a atins presiunea corespunzătoare temperaturii dorite se regleză flacără, pentru a se asigura menținerea acestei temperaturi un anumit timp (de exemplu, 20-30 min. la  $120^{\circ}\text{C}$ ).

## 2. DEZINFECȚIA

*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 germenilor 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 contin 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). Filtrul EK<sub>1</sub> reține bacteriile și lasă să treacă virusurile, iar filtrul EK<sub>2</sub> 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). Filtrul astfel montat și sterilizat poate fi utilizat. Tubul lateral al balonului (6) este pus în legătură cu o pompă de vid, iar placă de azbest este umezită cu apă distilată sterilă înainte de începerea operațiunii de filtrare. Lichidul filtrat trece în balonul de sticlă, datorită vidului îc s-a creat în acesta.

*Filtrele de sticlă* (Schott) au diferite porozități: G<sub>1</sub>-G<sub>5</sub>. Filtrul G<sub>5</sub> reține bacteriile. Pentru a fi utilizate, ele se montează la baloane Kitasato. După fiecare utilizare este necesar ca filtrele de sticlă să fie fierite în apă distilată și spălate abundant, prin trecerea unei mari cantități de apă distilată prin ele.

### 1.3. STERILIZAREA CU RAZE ULTRAVIOLETE

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

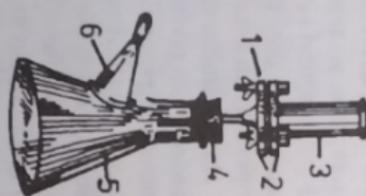


Fig.12. Filtrul Seitz.

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

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

*Substanțele dezinfecțante* 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 dezinfector bun trebuie să îndeplinească următoarele condiții:

- să actioneze asupra unui număr cât mai mare de agenți patogeni;
- să producă inactivarea ireversibilă a germenilor 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 degradze țesuturile, pielea, metalele, lemnul și alte materiale supuse dezinfectorii;

- 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 dezinfecțante.

*Mertiolanul 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 m<sup>3</sup> sunt necesari 6-10 ml formol comercial 40%. Când dezinfecția priveste distrugerea unor germeni mai rezistenți, cantitatea de formol trebuie crescută. În cazul b Koch sunt necesari 200 ml formol la 1 m<sup>3</sup>.

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. Cameretele supuse dezinfectorii 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.

Formoul, sub formă de soluție, este răspândit prin stropire, pulverizare cu vermorel sau prin imbibare. Soluția de lucru se obține amestecând o parte formol comercial (40%) cu 19 părți apă. Pentru dezinfecțarea unor suprafete de ciment, faianță, sticla sunt necesari 30-40 ml soluție pe metru pătrat. Pentru alte materiale, cantitatea de soluție este mai mare.

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

*Alcoolul etilic* (spiritul) este un dezinfector utilizat frecvent în laborator. Alcoolul dublu rafinat (96° alcoolice) are o acțiune dezinfecțantă slabă, deoarece coagulează rapid albuminile 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 măiniilor, 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 dezinfecțantă mai slabă, motive pentru care nu este folosit în mod curent pentru dezinfecție.

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

*Fenolul* (acidul fenic, acidul carboxilic cristalin, hidroxibenzenul) în stare pură este format din cristale incolore, care devin roșiatice în contact cu aerul, din cauza oxidării. Se păstrează în vase de culoare închisă. În concentrație de 3-5% omoară microbii în 30-90 min.

Puterea dezinfecțantă 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. Aceasta 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 tahare conice de 1000 ml sau 2000 ml și în cristaloare. 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% omoară bacteriile în 1-10 min, în soluție 1/500 omoară 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 măiniilor 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 apă și cu alcoolul. Se intrebuințează 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 puținile substanțe dezinfecțante 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 laptelei 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.

*Cloramenele* se prezintă sub formă de pulbere fină, cristalină, de culoare albă sau ușor galbuiu, 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 dezinfector poate fi utilizat și sub formă de pulbere, pentru dezinfecțarea materiilor fecale, 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 dezinfecția măiniilor 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  $40^{\circ}C$  distrug germenii sporulați. Dupădezinfecție, obiectele trebuie spălate bine cu apă și neutralizate cu o soluție de carbonat de sodiu 20%.

*Acidul clorhidric* se folosește pentru dezinfecțarea 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 dezinfecțarea pielii și a mucoaselor.

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

*Vărul 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 lăptele de var 10% sau 20% în apă.

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

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

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

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

*Detergenții anionici* (Perlan, Dero etc.) dău prin disociere anioni organici toxici. Sunt activi mai ales asupra bacteriilor Gram-pozițive. Sunt cei mai buni agenti de spălare, fiind utilizati la spălarea instrumentelor, a aparatelor, a pardoselilor, a mobilierului, a țesăturilor etc.

*Detergenții cationici* au o acțiune antiseptică mai puternică decât cei anionici.

*Bromocetul* este folosit ca dezinfector 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 aseptizarea mâinilor să fie îndepărtat săpunul cu apă și, apoi, cu alcool.

*Detergenții amfolitici* (Tego, Tagonin) sunt utilizati în soluții apoase 1% pentrudezinfecția instrumentelor de laborator, a mobilierului etc. Aceștia au un bun efect de curățire mecanică și o puternică acțiune bactericidă.

## CAP. VII. RECOLTAREA ŞI TRANSPORTUL PRODUSELOR BIOLOGICE, A APEI ŞI A ALIMENTELOR, PENTRU EXAMENE DE LABORATOR

### 1. RECOLTAREA ŞI TRANSPORTUL PRODUSELOR PATHOLOGICE

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, pensete, spatulele etc.) trebuie evitate deoarece urme de substanțe antibacteriene pot împiedica dezvoltarea ulterioară a microorganismelor și falsifică astfel rezultatele;
- când se urmărește izolare 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 directa îndrumare și controlul acestuia, astfel încât pe lângă corectitudinea executiei 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 recolțate și atașării unei fișe complete care trebuie să cuprindă pe lângă datele personale ale bolnavului (nume, prenume, vîrstă, ocupatie etc.) inclusiv adresă, și următoarele: Instituția (care a efectuat recoltarea), data recoltării (ziua și ora), produsul recoltat, diagnosticul clinic, examenul solicitat, tratamentul cu antibiotice, chimioterapice, 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 însămânțare directe pe medii de îmbogățire, de cultivare etc.;
- pentru obținerea unor rezultate cât mai bune, examenul produselor recoltate trebuie să înceapă în cel mai scurt timp de la data recepționării acestora în laborator.

### Tehnica de recoltare a unor produse biologice

#### *Recoltarea săngelui pentru examene microbiologice*

În infecțiile generalizate, bacteriile patogene produc o stare *septicemică*, cu evoluție clinică gravă. În astfel de situații examenul microbiologic al săngelui devine indispensabil. Există și unele situații în care pătrunderea germenilor 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 săngelui se poate face prin examen microscopic direct, prin hemoculturi sau în anumite situații prin inocularea săngelui la animale de laborator.

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

Recoltarea se face din pulpa degetului inelar prin întepătare 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 săngele va fi depus pe o larnă sub formă de *picișoară groasă* sau va fi etalat sub formă de *frotiu*. Lama, numerotată, pentru identificare, este trimisă la laborator pentru colorare și examinare. *Examenul microscopic al săngelui proaspăt sau al plasmei pe fond întunecat* este posibil în prima săptămână de boală în febră recurrentă, leptospiroze, septicemie carbunoasă; oferă informații rapide dar rezultatele pozitive sunt rare.

*Hemocultura* este metoda cea mai importantă și cea mai utilizată în examenul bacteriologic al săngelui. Această metodă constă din însămânțarea săngelui pe medii de cultură artificiale, în vedere izolării și identificării agentului cauzal.

*Recoltarea săngelui pentru hemocultură* se face, de regulă, prin punctie venoasă, dar săngele poate fi obținut și prin punctie arterială sau chiar din măduva osoasă (medulocultura), mai ales când hemocultura din săngele venos rămâne sterilă.

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

În unele boala infecioase cu bacteriemie obligatorie (febră tifoidă, bruceloză), sănsele cele mai mari de obținere a unor rezultate pozitive sunt în primele 7-14 zile de la debut.

De asemenea, hemoculturile trebuie făcute înainte de a se începe tratamentul cu antibiotice sau, dacă acest lucru nu a fost posibil, recoltarea săngelui 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 medile de cultură: acid paraminobenzoic 1/100 000 împotriva sulfamidelor, penicilinază 1/100 împotriva Penicilinelor, cisteină 5-6 mg pentru a neutraliza 100 mg Streptomicina și sulfat de magneziu 100 mg pentru 1 ml de sânge.

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

Inactivarea acțiunii bactericide naturale a săngelui și chiar a medicamentelor antimicrobiene se realizează în general, în mod satisfăcător, prin simplă diluție a săngelui în mediu de cultură, într-o proporție minima de 10%.

Recoltarea săngelui, aproximativ 10-20 ml, se face în mod curent din vena pilică cotului, după o prealabilă antisепtișare a regiunii cu alcool sau cu tintură 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 însămânțarea directă și imediată, care evită contaminarea produsului cu germe nepatogeni din aer sau de pe tegumente.

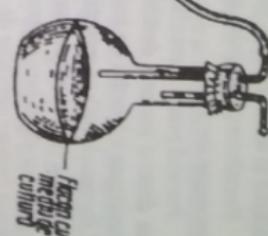
Toate materialele utilizate pentru hemoculturi trebuie să fie perfect sterile, iar tehnica de recoltare și însămânțare a săngelui trebuie executată cu o deosebită grijă, pentru a se evita suprainfecțarea.

*Inocularea săngelui la animale de laborator este necesară în cazuri speciale.* Sângel 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 fibrinare cu perle de sticla sau prin folosirea unor substanțe anticoagulante.

#### *Recoltarea seceriilor purulente*

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

Aspectul puroiului diferează în funcție de natura microbului care a provocat fenomenul și care împreună diferențe caracteristice exteroare, ce vor constitui informații prețioase pentru diagnostic. De cele mai multe ori puroiul este rezultatul unei prezente microbiene – *supurăție septică*. Sună totuși situații în care puroiul este consecința unei iritații provocate de diferite substanțe chimice iritante prin constituția lor – *supurăție aseptică*.



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

Recoltarea puroiului se face prin punctie, aspiratie sau prelevare cu ansa ori cu tamponane sterile.

Puroiul poate fi recoltat dintr-o colectie închisă: pustulă, furuncul, abces, flegmon sau dintr-o leziune deschisa. 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 punctionează 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.

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

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

Caracterele macroscopice ale puroiului recoltat 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 verzu;
- piocianicul, un puroi de culoare albastră;
- bacilul Koch, un puroi fluent și puțin fibrinos;
- germenii anaerobi produc un puroi seros, tulbure, degajând miros putrid.

#### *Recoltarea secrețiilor uretrale și vaginale*

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

Recoltarea secreției uretrale la *bărbat* se face dimineață, înainte de micăjune, din meauul urinar, cu o ansă sterilizată prin flambare sau cu un tampon de vată steril. În infectiile cronice, când secreția este absentă se recurge la masaj de prostata.

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

În mod normal, *secretia vaginală* este un transudat al mucoasei vaginale care conține celulele epiteliale de descuamare și unii germeni saprofici variabili în funcție de vîrstă și starea fiziologicală a femeii. De la pubertate și până la menopauză cavitarea vaginală a femeii sănătoase este populată cu baciili lactici 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 uretra, cu ajutorul unei ansă sterilizate prin flambare și răcită, sau cu tamponane

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

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

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

#### *Recoltarea exsudatului nazo-faringian și amigdalian*

Cavitatele 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 îmbolnăviri grave: bacilul difteric, meningococul, stafilococul, streptococul hemolitic etc. cu prezența unor exsudate specifice (angina diferică 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 dimineață, pe nemâncate sau la cel puțin 3-4 ore după masă. De regulă se utilizează cel puțin două tamponane: unul pentru exsudatul amigdalo-faringian și altul pentru exsudatul nazal.

Bolnavul este așezat pe un scaun cu față 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 execuță 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 tipă subțire, cu aceleași precauții menționate mai sus.

În unele situații, când se presupune o infecție virală, prelevarea secreției nazo-faringiene se face sub formă de spălătură nazo-faringiană. Aceasta se execută cu ajutorul unei seringe de 10 ml la care se adaptează un tub de cauciuc, ambele sterile, prin care se introduce în una din fosetele nazale ale bolnavului cca 10 ml soluție salină fiziologicală (CNa 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 noptii. După o gargară cu ser fizologic steril, bolnavul este invitat să tujească și să expirate într-o placă Petri sau alt recipient curat, preferabil sterilizat prin căldură.

În cazuri speciale, secreția bronșică se va recolta prin aspirare în cursul brohoscopiei iar la copii mici, care nu expectorează, sputa se va recolta prin spălătură 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°C).

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

#### *Recoltarea lichiduluicefalorahidian*

În general, lichidul cefalorahidian se obține prin punctie rahiidiană. Aceasta se execută, cu luarea unor măsuri de asepsie riguroasă, similară acelora 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 mandrelu adaptat, până în spațiul subarahnoidian. Se scoate mandrelul, 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 urinii*

Recoltarea urinii se face înainte de administrarea de antibiotice sau chimioterapice. La bărbati, se recomandă ca bolnavul să-și facă toaleta glandului cu apă caldă și săpun. Prințele jeturi de urină, fiind contaminate cu flora microbiană saprofitară, sunt îndepărtate; în continuare, se recoltează 20-30 ml urină în recipiente cu dop steril (flacoane cu gât larg, borcană etc.).

La bolnavii cu retenție urinară, recoltarea se poate face prin sondaj vezical sau prin punctie suprapubiana.

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

La copiii mici recoltarea se poate face în pungi speciale de plastic. La femei urina se recoltează din mijlocul jetului, după o prealabilă toaleta locală urmată de tamponarea meatusului urinar cu ser fiziologic steril. Recoltarea se face într-un flacon de sticlă cu gâtul larg, steril.

Recoltarea sterila cu sonda se face numai în cazuri excepționale. Pentru cercetarea bacilului Koch se recoltează aproximativ 1 l urină, în flacoane sterile, amestec din urina eliminată în 24 ore. În acest interval probele recoltate se păstrează la +4°C.

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

Urina recoltată este transportată imediat la laborator pentru examinare. Urina lăsată la temperatură 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 urinii prin administrare de bicarbonat de sodiu. Astfel, se schimbă pH-ul obișnuit al urinii care omoară rapid leptospirele.

#### *Recoltarea materiilor fecale pentru coproculturi*

Flora microbiană prezenta în materiile fecale este foarte complexă. Ea variază mult digestiv sunt, de asemenea, numeroase. În plus, chiar și unii germei care populează intestinul omului sănătos, cum sunt *b. proteus*, *b. pioianic*, *stafilococul* 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 germei. Materiile fecale sunt recoltate în recipiente speciale numite *coprocultare* (Fig.14).

Coproculturile sunt obligatorii în diagnosticul: holerei, salmonelozelor, dizenteriei bacilare, *Lop din plastic* — enterocoliteelor provocate de bacilul coli, tuberculozei intestinale etc.

*Pentru examenul bacteriologic*, la bolnavii în *Tub recoltar* — perioada de stare, din scaunul emis spontan, defecat în vase sterile, se recoltează în recipiente de plastic sterile *Lingură* — tip, cu ajutorul unei linguri fixată de obicei la capac.

Se aleg porțiunile din scaun cu mucus și eventual urme de sânge; când acestea lipsesc se recoltează boluri de *Ketul de către* — 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 fostați bolnavi, purtători, nospitalizați, scaunul este provocat prin purgativ salin (amestec de sulfat de Na și Mg căte 15 gr. pentru adult, dizolvate în 250 ml apă). Pentru controlul bacilului tific 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 umedește cu soluție fiziologică sterilă, înainte de introducerea în rect. La adult se introduce 15-20 cm, la copii 10-12 cm, în colonul 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.

### 3. COLORANȚI ȘI COLORAȚII

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

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

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

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

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 germenii să formeze un strat subțire, uniform. Etalarea culturii sau a produsului se realizează cu ajutorul unei anse de platiniă sau al unei pipete Pasteur. Se ia o picătură din cultura lichida 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 confectionat este lăsat să se usucre la temperatură 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 flacără 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.

*Mordansarea* 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 acestia, 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, alaun 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 harti de filtru, soluțiile se păstrează la loc întunecos în flacoane de sticlă de culoare închisă cu dop rodat. 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 substanță 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 apă 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 harti 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 potasu și 300 ml apă distilată) și soluția de *alcool-acetonă* (3 părți alcool de 96° și o parte acetonă).

#### *Colorațiile simple*

*Colorația cu albastru de metilen.* Frotiul uscat și fixat apoi la flacără 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 usucre 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 fucsină fericată 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 împarte bacteriile în două mari categorii: bacterii Gram-pozițive 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 mordanțul (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 fucsină 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 microscope cu obiectivul cu imersie.

Bacteriile Gram-pozițive 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 folosită pentru colorație:

- frotiul uscat se fixează la flacără;

- se acoperă lama cu fucsină fenicată Ziehl și timp de 10 min. se încălzește intermitent, cu ajutorul unei lămpă de alcool sau cu flacără unui bęc Bunsen până la emiterea de vaporii, 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 decolorizează 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 decolorizează frotiul cu alcool de 96%;

- se spală frotiul cu apă de robinet, după care se recolorizează 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 microscope cu obiectivul de imersie.

Bacilul tuberculozei și al leprei, care rezistă la decolorarea 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 lămă perfect curată se pun o picătură din suspensia de bacterii capsulate și o picătură de tufă de China. După ce se omogenizează, se face un frotiu prin etalarea amestecului cu o altă lămă.

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

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

*Colorația pentru cilii bacteriene*. Ciliile nu pot fi văzute la microscopele optic pe preparatele nătive sau pe frotiurile cu colorații obișnuite. Pentru a fi puși în evidență, se folosesc metode speciale de colorație.

*Metoda Zetnow*. 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

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

- se punte lamela în apă distilată timp de 3 min., după care se introduce într-o soluție de tanin și de tartrat dublu de stibiu și potasiu, încălzită la 60-70°C, timp de 10 min.;

- se scoate lamela cu o pensă și se clătesc 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 lamelei cu frotiul în jos pe o lămă foarte curată, după care poate fi examinată la microscope.

##### *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 vaporii. 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 fucsină 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 microscope cu obiectivul cu imersie.

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

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

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 vaporii;

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

- se spală cu apă distilată, se lasă să se usuce și se examinează la microscope 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 preparatorilor de sânge, în care se cercetează prezența unor microorganisme, ca: spirochete, hematozoarul palustru, toxoplasma etc.

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

metilic 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 spirochetele sunt colorate în violet, hematotozoarul se colorează în albastru-violet etc.

## CAP.IX. PATOGENITATEA MICROORGANISMELOR SI PROCESUL INFECTIOS

Microorganismele care prezintă un interes medical nu reprezintă decât un număr naștere, omul intră în contact cu microbii stabilind cu acestia relații ce pot îmbrăca diverse aspecte: saprofizism, comensalism, patogenitate.

În cazul *saprofizismului*, 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 germeni comensali nu pot trăi decât în contact sau în imediata apropiere a celulelor umane sau animale. Aceștia se dezvoltă pe seama 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, nazo-faringiană, intestinală sau vaginală constituind flora comensală normală locală. În unele situații, fie microorganismul comensal sau gazda, fie ambele pot avea un beneficiu din această asociere 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 năstere, solicită sistemul imunitat și formarea de imunoglobuline. Simbioza se mai poate manifesta și prin efectul antagonizant, de barieră, pe care îl are flora normală față de unele bacterii sau ciuperci microscopic patogene.

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

Bolile infecțioase sunt de fapt rezultatul unui conflict între agentul patogen și gazda sau terenul receptiv în care germenul trebuie să invadze țesuturile în timp ce organismul reacționează pentru a elmina sau distrugă agentul respectiv.

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

*Virulența* este capacitatea unui microorganism patogen de a pătrunde în organism și de a se multiplică în tessuturile și țesuturile 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. MIJOACE 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 antogenele 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. Aceasta rezistență comportă un număr important de 4 mecanisme specifice complexe care se declanșează și se adaptează situației provocate de agentul agresor. Mecanismele declansate 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 cheratinizează și se descurcă superficial în permanență, facilitând astfel și îndepărțarea germenilor și, pe de altă parte, din mucoasele care, fiind formate dintr-un singur strat de celule, sunt mai expuse agresiunii. Totuși mucoasa respiratorie acoperă de căi vibratii și mucus antrenăază și elimină în exterior corpulculii microbieni. De asemenea, peristaltismul intestinal și fluxul urinar antrenăază în permanență către exterior eventualii agenți patogeni.

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

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

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

Toxinele și produsii de metabolism ai microorganismelor antrenăază 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: dilatare arteriolare și capilare, cu o creștere a permeabilității și exudarea unor factori plasmatici (complement, fibrinogen etc.) stază sanguină cu creșterea adeziunii celulare de endotelului vascular urmată de marginalizarea leucocitelor și diapedeza lor în direcția focarului de infecție. Clinic apare o roșeață locală.

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

Fenomenul de fagocitoză se derulează în mai multe etape:

- aderarea 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);

- formarea unei vacuole de fagocitoză. La suprafață 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 gamma, etc.) produsi de macrofagele activate.

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

Fagocitoza poate fi compromisă de factori care lucrează 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 intracellular.

În ce privește factorii care compromit fagocitoza din cauza gazdei, acestia lucrează de carente de vitamine (A, C), concentrație de săruri minerale ( $Zn^{++}$ ,  $Ca^{++}$ ,  $Fe^{++}$ ), factori toxică (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 antigen și organism în ansamblu sau dintre antigen 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 declansate 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 ţesuturi 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, ţesuturi) străin, în raport cu sistemul imunologic al organismului considerat. Calitatea de non-self este prima condiție pe care trebuie să-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 mediata celulară (*imunitate celulară*).

Răspunsul imun celular, la care participă elemente aparținând sistemului limfoid, protejează organismul față de agresiunea virusurilor, bacteriilor intracelulare, fungilor, paraziților, ţesuturilor străine și celulelor cancerioase, 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 limfoci: T și B.

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

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

În afara limfocitelor T și B, sistemul imunitar mai posede și alte tipuri de celule, accesori, cu rolul de captare a substanțelor străine, prelucrare și prezentarea lor limfocitelor (*monocyte, macrofage*), eliminarea particulelor străine atestate de sistemul imun (*polimorfonucleare*) și medierea unor schimburi fiziole care însotesc reacțiile imunitare (*bazofile, mastocite*).

## 2.1. ANTIGENELE

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

ață capacitatea de a reacționa specific cu anticorpul sau receptorul 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 anticorpul, numită *grupare determinantă*, *determinant antigenic* sau *epitop*, responsabilă de imunogenicitate și specificitate, și o a doua parte, care poartă gruparea determinanta denumită *purtător*.

După originea lor antigenele 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 derivati ai aminoacicilor.

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 delansa 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 ţin 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 viteză 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 inoculații ulterioare nu va mai reacționa imunologic.

"*Paralizia imunologică*" poate fi observată la adulți dacă se inoculează parenteral 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 (IMUNOGLOBULINE)

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

Moleculele de imunoglobulină este compusă din patru lanțuri polipeptidice, două căte 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 **constantă** (C). Partea moleculei de carboxil-terminală denumită regiune **variabilă** (V) și porțiunea 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: *aglutinante, precipitante, opsonine, antitoxine, lizine, anticorpi blocajeni, anticorpi fixatori de complement*.

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

Anticorpii se găsesc în fracțiunea gama a globulinelor. Această fracțiune se divizează la rândul său prin încărcătură 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 ( $\gamma$  = gama,  $\alpha$  = alfa,  $\mu$  = miu,  $\delta$  = delta și  $\epsilon$  = epsilon) care se deosebesc între ele prin secvența aminoacicilor care le conferă proprietăți antigenice distinctive.

*Clasa IgG* reprezintă 75% din totalul imunoglobulinelor din serumul uman normal. Moleculele de IgG apar după stimulul antigenic secundar și reprezintă principali anticorpi neutralanți, aglutinanți, opsonici, citotoxici, fixatori de complement.

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

Spre deosebire de moleculele de IgA serică cu structură obișnuită, monomeră, moleculele 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 alcătuși 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 serumului, în special de apărare imună mediată celular.

**Clasa IgD** este formată din imunoglobuline cu o semnificație imunoologică mai puțin importantă. Concentrația acestor imunoglobulini în sânge este redusă (sub 1%).

**Clasa IgE**, este constituită din anticorpi "reaginici". În momentul în care pătrunde în organism un alergen, anticorpii IgE fixați citofil îl recunosc specific ca antigen și astfel se transmit semnalul la celula care eliberează prompt, în cantități mari, amine vasoactive de tipul histamina, serotonina. Acestea provoacă contracția mușchilor netezii 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. Aceasta este fagocitat și catabolizat până la structurile care defină "informația antigenică". Antigenul astfel modificat se pare că se leagă de un ARN special.

Urmează fază de predare a informației antigenice-macrofag celulelor imunocompetente "limfocitele T și B". Dupa prelucrarea informației urmează o etapă activă de diferențiere a limfocitelor T și B. Acestea se transformă mai întâi în imunoablate și ulterior prin diviziuni successive în plasmocite mature și respectiv limfocite mici sensibilizate.

În această etapă celeulele imunocompetente devin celule **immunoformatoare sau efectoare**, deoarece atât imunoglobulinile produse de plasmocit (efect umoral) ca și limfocitele specific sensibilizate (efect cellular) intervin direct sau vor media fenomene imunoologice.

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

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

La un stimул primar plasmocitele răspund prin sinteza de anticorpi care apar în sânge după 8-10 zile. Într-o primă fază, acești anticorpi apar în clasa 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 întâlnesc următoarele situații:

- Neutralizarea unui factor de patogenitate al germenului: anticorpi antitoxici neutralanți antitetani, antidiiferici, antistafilozine, antistreptokinază etc.

- Opsonizarea. Prezența unei molecule de IgG la suprafața unei capsule sau a unui perete bacterian rezistent la ingestie, permite adeziunea la fagocit și înglobarea și distrugerea sa.

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

- Citoxicitatea celulelor, mediata de anticorpi. Fixarea microorganismelor pe anticorpii legați de unele celule, antrenează degranularea acestor celule (polinucleare neutrofile, bazofile sau eozinofile și mastocite), astă 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 eficace față de bacteriile invazive cu multiplicare extracelulară, bacterii toxinogene și bacterii neinvazive. Împotriva bacteriilor cu multiplicare intracelulară intervine răspunsul imunitar celular.

#### 2.4. IMUNITATEA MEDIATA CELULAR

Răspunsurile immune 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 devenite 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 specific sensibilizate care au pe suprafața lor sedii de recunoaștere și cuplare specifică cu antigenul.

*Celulele T specific reactive* sunt cuprinse în două clase majore:

- *Celule T-regulatoare* și

- *Celule T-efectoare*.

La rândul lor celulele T-regulatoare cuprind două subpopulații denumite *celule T-helper* (ajutătoare) și *celule T-citotoxic* (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 afară acestor celule T, există și alte tipuri de celule care intervin în citoxicitatea mediată celular și anume *celula K* (ucigașă), *celula NK* (nativ ucigașă) și *macrophagul activat*. Dintre acestea macrofagul activat are un rol esențial în imunitatea mediată celular, el fiind implicat în inițierea răspunsului imun prin prelucrarea și prezentarea antigenului, intervenția în reglarea răspunsului imun și participarea în fază efectoare a acestui răspuns în inflamație și distrugerea microbilor și celulelor tumorale.

#### 2.5. APLICAȚII PRACTICE ALE IMUNOLOGIEI ÎN PATOLOGIA INFECȚIOASĂ

Însușirea noțiunilor de bază ale imunologiei generale permită 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 germenul patogen 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 câteva 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 incidentelor unor infecții grave (difteria, poliomielita, tetanosul etc.) iar în ultimii ani vaccinarea 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 loțurile 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 altele, atât în scop profilactic cât și terapeutic (vaccinarea tetanică).

Primele vaccinuri au fost preparate din culturi de germeni vii, dar ulterior germenii au fost omorâți prin metode fizice (căldură) sau chimice (formol, fenol etc.) deoarece s-a observat că, dacă metodele de inactivare utilizate menajeză antigenele vaccinate, capacitatea de imunizare rămâne intactă în timp ce pericolul patogen este înălțurat. 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 peretelui bacterian.

- Citoxicitatea celulelor, mediata de anticorpi. Fixarea microorganismelor pe anticorpii legați de unele celule, antrenează degranularea acestor celule (polinucleare neutrofile, bazofile sau eozinofile și mastocite), astă 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 eficace față de bacteriile invazive cu multiplicare extracelulară, bacterii toxinogene și bacterii neinvazive. Împotriva bacteriilor cu multiplicare intracelulară intervine răspunsul imunitar celular.

#### 2.4. IMUNITATEA MEDIATA CELULAR

Răspunsurile immune 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 devenite 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 specific sensibilizate care au pe suprafața lor sedii de recunoaștere și cuplare specifică cu antigenul.

*Celulele T specific reactive* sunt cuprinse în două clase majore:

- Celule T-regulatoare și

- Celule T-efectoare.

La rândul lor celulele T-regulatoare cuprind două subpopulații denumite *celule T-helper* (ajutătoare) și *celule T-citotoxic* (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 citoxic.

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

#### 2.5. APLICAȚII PRACTICE ALE IMUNOLOGIEI ÎN PATOLOGIA INFECȚIOASĂ

Însușirea noțiunilor de bază ale imunologiei generale permită 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 germenul patogen 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 câteva 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 incidentelor unor infecții grave (difteria, poliomielita, tetanosul etc.) iar în ultimii ani vaccinarea 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 loțurile 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 altele, atât în scop profilactic cât și terapeutic (vaccinarea tetanică).

Primele vaccinuri au fost preparate din culturi de germeni vii, dar ulterior germenii au fost omorâți prin metode fizice (căldură) sau chimice (formol, fenol etc.) deoarece s-a observat că, dacă metodele de inactivare utilizate menajeză antigenele vaccinate, capacitatea de imunizare rămâne intactă în timp ce pericolul patogen este înălțurat. 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 anticorpul corespunzător, conducând la neutralizarea (bloarea) proprietăților biologice agresive, metabolice, de multiplicare etc. ale diferențelor antigenelor.

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

În situația corespondentei 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 anticorpi neutralizați specifici din serum imun, deci gazda sensibilă rezistă inoculației. 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 medicinii. Pe scurt ea poate fi definită ca știința care se ocupă cu studiul preveniri și combaterii bolilor cu extindere în masă.

Aceste 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 infecto-contagioase, și cu alte manifestări morbide, de masă, neinfecțioase, cum sunt bolile cardio-vasculare, bolile degenerative, tumorile genetice, tulburările psihice, malformări 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 (stingerea propagării).

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

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

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

### 1. IZVORUL DE INFECȚIE

Izvorul epidemigen sau sursa de infecție constituie sursa care generează și elibera în mediul înconjurător diversi agenți patogeni. Izvorul de infecție poate fi reprezentat de oameni sau animale *boalăvi sau purtători de germe*.

Cel mai periculos izvor de infecție este constituit de sursele de infecție necunoscute (purtători sănătoși de germe patogeni, infecții inaparente, boli atipice, nediagnosticate, boala în perioada de incubație etc.). De asemenea este important de cunoscut căile de eliminare ale agenților patogeni (respiratorie, digestivă, mucoase și tegumentare, sânge etc.) pentru a se putea lua cele mai eficiente măsuri de impiedicare 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 INFECȚIOSI

Contaminarea și infecțarea unui organism receptor se poate realiza prin mecanisme directe sau indirecte.

În cazul *transmiterii directe* infecțarea organismului receptor se poate realiza prin

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

**Transmiterea indirectă** a bolilor se face prin intermediul aerului (difteria, gripe, scarlatina, tuberculoza etc.), apei (febrele tifo-paratifoide; dizenteria, holera, hepatita A, poliomielita etc.), solului (tetanos, poliomielită, salmoneloze, tuberculoză, parazitoze etc.), alimente (trichinelzoza, tuberculoza, antraxul, brucelzoza, salmoneloze etc.), diverse obiecte (salmoneloze, tuberculoză, hepatita A, parazitoze), mâini murdare (febră tifoidă, dizenterie, hepatită A, stafilococii, tuberculoză etc.) sau vectori (păduche – tifos exantematic, țânțar – malarie, căpușă – febra recurrentă etc.).

### 3. STAREA DE RECEPȚIVITATE 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 vîrstă, alimentație, profesie etc., dar mai ales, și acesta este decisiv pentru unele boli infecto-contagioase (difterie, tetanos, poliomielită, rujeola, 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 transmisibile 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 transmisibile se întâlnesc în mod constant în anumite grupe de populații, din unele zone geografice, sub formă de cazuri disperse care periodic pot crește ca frecvența (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 teritoriul 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 COMBATEREA BOILILOR TRANSMISIBILE

Principalele aspecte ale sistemului de măsuri profilactice și de combatere a bolilor transmisibile 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 receptive.

**Măsurile privind sursa sau izvorul de infecție** se adresează bolnavilor, contactilor și mai ales purtătorilor de germezi. Depistarea bolnavilor cu forme clinice tipice sau atipice se face fie în mod activ, prin deplasarea medicului și a altor cadre sanitare în focarele de boli transmisibile, în mod organizat, fie în mod pasiv, prin prezentarea bolnavului la medic. În vederea intreruperii 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 germezi).

În funcție de gravitatea și potentialul 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.

Contactul 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 supravegheata clinic (inclusiv termometrizare) și prin probe de laborator pe întreaga perioadă de incubație a bolii respective pentru depistarea unor evenuale noi cazuri de îmbolnăvire.

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

Stabilirea stării de purtător de germezi se face prin probe microbiologice specifice de laborator. În scopul de a-i face inofensivi pentru colectivitatea în care trăiesc și munesc se iau măsuri adecvate mergând până la schimbarea obligatorie a locului de munca.

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

**Măsurile privind creșterea rezistenței masei receptive** 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 ambient, alimentație rațională, evitarea surmenajului etc.

Principală metoda 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 contactilor, diagnosticul prezumтив, culegerea de date privind sursa infectantă, data și locul contactului infectant, raportarea cazului și instituirea măsurilor sanitato-antiepidemice de urgență: izolare bolnavului, dezinfecția 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 germenilor a fost adoptată prima oară în 1930 cu ocazia primului Congres Internațional de Microbiologie tînut la Paris și ea a fost mereu îmbunătățită cu ocazia congreselor care au urmat.

În clasificarea germenilor s-a ținut seamă de asemănarea pe baza unor caractere comune, care le înrudesc.

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

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

### 1. STAFILOCOCUL (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 tegumente și în cavitatele naturale ale oamenilor și animalelor, făcând parte din flora normală a acestora. În afară celor saprofici, se găsesc și stafilococi potențial patogeni în rinofaringele și în intestinul oamenilor sănătoși, într-un procentaj de 50%.

Aceștia, eliminati prin tuse, strănut sau prin dejecte, pot provoca, atunci când întâlnesc organisme sensibile, îmbolnăviri variate.

**Caractere morfotintetoriale.** Stafilococi sunt germeni sferici, cu diametrul de 0,8 μ, dispuși în grâmezi neregulate, amintind ciorchinile de strugure, de unde și numele dat (în grecește, *stafilos* = strugură).

Dispozitia aceasta caracteristică se întâlnește pe frotiul făcut din cultura pe mediu solide. Sunt imobili, necapsulați, nesporulați. Se colorează Gram-poziitiv. În culturile vechi sau sub influența antibioticelor pot să apară Gram-negativi.

**Caractere de cultură.** Crește pe medii uzuale. Pe geloză coloniile sunt rotunde, cu diametrul de 1-2 mm, cu marginile regulate. În coloare la început, se colorează apoi, datorită unui pigment, distingându-se trei variante: stafilococul *alb*, *citrin* și *auriu*. Pigmentul rămâne cantonat 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 geloza cu adăos de 10% lăptiș, ca și de lumană și oxigen. În laborator, ultimele două deziderate se realizează lăsând culturile 1-2 zile la temperatură laboratorului. Pe medii lichide tulbură uniform builionul.

**Caractere biochimice și de metabolism.** Aerob și facultativ anaerob, se dezvoltă la 37°C. Prezența CO<sub>2</sub> în proporție de 20% favorizează producerea de pigment și de toxină. Fermentează unele zaharuri, fermentarea manitei fiind socotită un test de patogenitate. Se poate dezvolta pe mediu cu o cantitate mare de sare (7,5%), proprietate ce permite izolare stafilococilor dintr-o asociere microbiană.

**Rezistență la agenții fizici, chimici și biologici.** Stafilococul este un germen rezistent. Rezistă 60 min. la 60°C. În produsele uscate rezistă câteva luni. Sublimatul 1% il omoră 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 germenilor asociați.

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

În cadrul virulentei trebuie citate unele enzime secrete de stafilococi, printre care: - coagulaza, enzimă cu ajutorul căreia germenul, 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 desfacearea 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, prezenta ei fiind societă indice de patogenitate. Produce liza totală a hematilor 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 antigenicitate. Administrată per os la voluntari umani, provoacă simptomele intoxicației alimentare cu stafilococ: vărsături, crampe abdominale, grievă, amelie, prostratie. Tratată cu formol 4% și tănită la termostat își pierde după 10-14 zile proprietatele toxice, păstrând însă neatinse proprietățile antigenice. Se transformă în anatoxină.

**Boala la om.** Afecțiunile provocate de stafilococi patogeni sunt foarte variate. Pe primul plan se situează lezuni cutanate, al căror tip reprezentativ este furunculul, dar și foliculite superficiale și infecții ale glandelor sudoripare din axilă. Poate trece în sânge și determină septicemii și septicopiemii cu localizări viscerale. Asociat cu alți germeni, stafilococul poate juca un rol în bronhopneumonii, sinusite și otite și este cel mai frecvent germen de suprainfecție a plăgilor și tuturor lezumilor deschise. Tulpinile care elaborează enterotoxină provoacă toxicinfectii alimentare. În urma administrării de antibiotice poate apărea 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 principal 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 totă grijă pentru a evita contaminările cu tulpieni saprofite de pe piele sau din mediu înconjurător.

În cazul colecțiilor închise recoltarea se va face prin puncte, după aseptizarea tegumentelor. Dintre-o lezune deschisă recoltarea se va face cu tamponul, ansa sau pipeta Pasteur, iar în afecțiunile nasofaringiene, cu tamponul. Probele vor fi trimise căt 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 inversie, va arăta polinucleare neutrofile mai mult sau mai puțin alterate și cocci Gram-pozițiivi, izolați, în diplo, în lanțuri sau grămezi mici. Această dispoziție nefind caracteristică stafilococului, întrucât și alți cocci Gram-pozițiivi pot avea aceasta prezentare, se va trece obligatoriu la etapa următoare, înșământând produsul pe medii solide și lichide, medii ce vor fi termostatați la 37°C.

Intrucât de cele mai multe ori, după 24 de ore, culturile sunt bine dezvoltate, acestea vor fi examineate, notând informațiile furnizate.

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

**Examenul puroiului provenind din lezuni 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 susținut într-o cantitate cunoscută de apă distilată, care, apoi, va fi înșământată într-o cantitate egală de mediu hipertolerant lichid. Mediul care, inițial, are o concentrație de 15 g% NaCl ajunge, prin injumătăiere cu apă distilată, la concentrația de 7,5%, într-un astfel de mediu se dezvoltă numai stafilococi, toți ceilalți germeni asociati fiind în imposibilitate de a supraviețui. Mediul înșământat va fi termosstatat 36 h la 37°C, după care se fac treceri pe mediu hiperclorurat solid, urmărindu-se obținerea de colonii izolate prin metoda epiuzării. Mediul este cunoscut sub numele de mediu Chapman. Este o geloză care conține 7,5 g% NaCl, manita și roșu fenol ca indicator. Mediul înșământat este termosstatat 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 mediu și, în consecință, acesta își schimbă culoarea – manitopozitivi.

Stafilococii izolați în cazul colecțiilor închise, sau stafilococii manitopozitivi, în cazul lezunilor deschise, sunt supuși unor teste pentru a stabili caracterele de patogenitate.

Acstei teste sunt:

- **Producerea de pigment.** Germenul înșământat pe mediu cu ser coagulat este lăsat după termostatare 48 h pe masă la temperatură camerei. În acest interval de timp vor apărea coloniile pigmentate.

- **Cercetarea coagulazei.** Într-o eprubetă de hemoliză se adaugă peste 0,3 ml plasmă oxalată, 0,2 ml din cultura în bulion 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 parti de geloză topită și răcita la 50°C se adaugă o parte plasmă oxalată; se amestecă, se incalzește 5 min la 56°C și apoi se toarnă în placă. Mediul este opac datorită rețelei de fibrină. Se înșământează pe o placă cu geloză cercetat. În jurul coloniilor fibrinolizo-poziitive se constată apariția unei zone clare, prin lizarea fibrinei din mediu.

- **Cercetarea hemolizinei.** Tulipina de cercetat se înșământează pe o placă cu geloză săngie. 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).

- **Fermențarea manitei.** În afara posibilității oferite de mediu Chapman, tulipina de cercetat mai poate fi înșământată și într-un tub cu apă peptonată manitată 1% cu albastru de bromtimpol ca indicator. Stafilococul manitopozitiv virează mediu în galben.

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

În cazul hemoculturii, săngele va fi recoltat cu mare atenție, de preferat cu dispozitiv în circuit închis, în bulion, în proporție de 10%. Este de dorit 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 vărsările și fecalele bolnavului.

S-a crezut inițial că numai stafilococi cu teste de patogenitate pozitive sunt răspunzători de producerea toxinfecțiilor alimentare. Cercetările efectuate au arătat că nu este nici o legătură între aceste caractere și enterotoxină, 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 lezuni 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 alarmeză, intrucât 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 inconjurător. În aceleasi servicii, 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 aceasta secție este evident. De asemenea, problema toxininfecțiilor alimentare cu stafilococ trebuie să rețină atenția din punct de vedere epidemiologic, prin usurința 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. STREPTOCOCUL (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 morfolinctoriale.** Germenii sunt sferici sau ușor ovalari, cu diametrul în jur de 1 μ. Sunt dispuși uneori în diplo-, însă frecvent în lanțuri a căror lungime este în funcție de specie. Sunt nesporulati, imobili, Gram-poziți. În condiții défavorabile de mediu și în culturile vechi își pot pierde afinitatea pentru Gram.

**Caractere de cultura.** Sunt germeni care se dezvoltă greu pe medii uzuale. Pe geloză-sânghe 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 verzui;

- streptococii alfa-prim-hemolitici, care produc o zonă de hemoliză incompletă, unele hemati rămânând intace;
- streptococii gamma, care sunt nefhemolitici și, de cele mai multe ori, de origine animală.

**Caractere biochimice și de metabolism.** Streptococii sunt în general aerobi, însă sunt și tupini strict anaerobe. Nu sunt sensibili la acțiunea bilei și a sărurilor bilare. Fermentază o serie de zaharuri cu producere de acid, fără însă a produce gaz. Creșterea și multiplicarea lor necesită prezența unor factori indispensabili, printre care: glutamină, acidul pantoteric, vitamina B<sub>6</sub>, riboflavina etc. Acești factori de creștere sunt aduși în mediul prin introducerea de lichide organice: sânge, ser, ascită.

**Rezistență.** Indiferent de specie, streptococii sunt distrusi 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 omoară streptococii destul de repeze. Sună rezistenți la coloranții de trifenilmetan. Toate speciile, cu excepția enterococului, sunt sensibile la sulfamide. Streptococul beta-hemolitic este foarte sensibil la penicilina.

**Structura antigenică.** Pe baza unei fractiuni specifice – un polizaharid – streptococii se împart în 17 grupe, notate de la A la S (lipsesc 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 toxicogenă. Streptococii elaborează mulți factori toxici. În acest cadru trebuie amintită toxina eritrogenă, numită și toxina scarlatinoasă 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 hematizilor. Streptolizina O este antigenică, antistreptolizinele O putând fi puse în evidență în diferite afectiuni streptococice.

**Boala la om.** Streptococii determină numeroase și foarte variate afectiuni: impetigo, erizipel, adenite, angine (de exemplu cea scarlatinoasă), faringe, sinusite, pleurezii, bronhopneumonii, peritonite, pericardite, endocardite, artrite, febra puerperală, abcese, flegmoane, flebite, infecții urinare, septicemii.

**Tratamentul.** În afară de antibiotice și chimioterapice, 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 repeatate infecții streptococice. Imunitatea antitoxică este durabilă, fapt demonstrat de observația că 95% dintre scarlatinosi nu fac boala decât o dată. Această imunitate se poate căpăta și natural, prin contacte repetitive cu cantități mici de germe, 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 vizează izolarea și identificarea germeneului. Recoltarea se va face în condiții de sterilitate și, de dorit, înaintea începerii tratamentului. Cunoscând sensibilitatea desobșită a streptococului beta-hemolitic la acțiunea penicilinelui, este explicabil de ce în laborator frecvența cu care acest germen 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 frotul efectuat din produsul patologic nu este concludent, obligatoriu acest produs va fi înșămânat pe mediu de cultură imbogățit. Medul cel mai folosit este geloză-sângue. 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 lezuni și cavități – streptococul este insotit de stafilococ, mediu-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.

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

Identificarea streptococilor progeni – grupa A – se poate face în afara reacției de precipitare cu serumul de grupa A și printr-o metodă simplă, accesibilă oricărui laborator, "metoda cu bacitracină". Pe o placă cu geloză-sângue se înșământeză în pânză streptococul de identificat și în mijlocul ariei se punte o rondelă imbibată 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 rondeliei cu antibiotic.

Identificarea enterococului se face prin înșământare 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 anticipri anti-streptococici. Prima este cunoscută sub numele de ASLO și urmărește prezența și cantitatea anti-streptoliziinei O în serum bolnavului. Cercetările întreprinse în țara noastră de Baldovin și colaboratorii au arătat că titrurile normale de anti-streptoliziină O ating valori până la 200 unități pe ml ser. Titurile crescute indică existența unei recente afecțiuni streptococice grupa A, dar și purtători amigdalieni de streptococi hemolitici. A doua reacție este titrarea anti-streptokinazei – ASK – și se practică atunci când ASLO este neconcluziv. 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 contină o unitate cutanată. Se inoculează pe față anteroară a antebrăului drept 0,2 ml toxină activă, iar ca mărtor, la celălalt antebră, aceeași cantitate de toxină inactivată 3 h la 100°C. Citirea se face la 24 h.

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

**Epidemiologie.** Epidemiologia infecțiilor cu streptococi vizează în primul rând scarlatina și angina streptococică, boli frecvent întâlnite în regiunile temperate ale globului, unde afectează în special copiii. Cu toate că ambele afecțiuni sunt întâlnite 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 neglijati convalescenții cu complicații: rinite, otite, adenite supurante, care prin numărul mare de streptococi, eliminați aproape în cultură pură, reprezintă importante surse de infecție;

- bolnavii cu amigdalite și faringeite streptococice al căror număr în mediu epidemice 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%.

Epidemile de scarlatină apar în valuri, la intervale cam de 7 ani, interval explicit de creștere în această perioadă a numărului de copii receptivi.

Întrabarea firească care se punte 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. Individii care au o imunitate antimicrobiană, indiferent dacă este insotită 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 sănătos. 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 antitoxicice), numai amigdalita-faringită.

Întrucât sunt unii cercetători care socoteșc că nu streptococul este singurul

responsabil de producerea scarlatinei, el fiind socotit numai un germene de acompaniament, se vor cita câteva 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 positive, prin badijanarea faringelui cu streptococi izolați de la scarlatinoză;
- se poate obține imunizarea contra scarlatinei prin injectarea de anatoxină streptococică;
- antitoxina streptococică, introdusă intradermic, face să dispară erupția scarlatinoasă.

### 3. PNEUMOCOCUL (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 germenul are un tropism deosebit. El face parte din flora saprofitară normală a mucoasei tractusului respirator superior, 20% până la 70% dintre persoanele normale putând fi purtători nazofaringieni temporari sau permanenti de pneumococ. În anumite condiții prielnice el și poate exalta virulenta, 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: câini, pisicile, caii, viței, cobaii, şobolanii și mainutele.

**Caractere morfológice și tinctoriale.** În produsele patologice și în culturile proaspăt izolate din infectii, pneumococii au o formă caracteristică de cocci ovalari, lanceolați (în formă de flacără de lumânare), de 0,5-1,25  $\mu$  diametru și sunt dispuși caracteristic în diplo- sau în lanțuri scurte, privindu-se prin capetele mai bombate. Sunt Gram-pozițivi, nesporulatori, iar variantele virulente posedă capsulă. Formele "R" (rough) de pneumococi sunt degradate, nu posedă capsulă, sunt avirulente, frecvent întâlnite pe mucoasele respiratorii și, uneori, pierd proprietatea de a reține violetul de gentiană, apărând colorații în roșu-violetace. Capsula nu se colorează prin colorațiile obișnuite și se prezintă ca un halou alb refringent în jurul cocilor colorați. În culturile de laborator, forma pneumococilor este mai puțin tipică, de coci mai rotunji, cu tendința de asezare 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 anumite aminoacizi, factori de creștere și glucoză ca sursă principală de energie. Pneumococii cresc bine pe medii îmbogățite cu sânge 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 mediu lichid de tipul bulionului TIEM glucozat 2% sau al bulionului I.C. (preparat de Institutul Cantacuzino) glucozat 2%, pneumococii cresc abundant și tulbură uniform mediu 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 ( $H_2O_2$ ). Sângelile avantagează conservarea culturilor prin cataliza din hematii care descompune  $H_2O_2$ . Prezența CO<sub>2</sub> favorizează creșterea, de aceea, pentru izolare germenului din produsele patologice, se recomandă incubarea mediilor în paralel, în aerobioză și în exicator cu atmosferă de aproximativ 5-10% CO<sub>2</sub> (procedeu lumânării).

Deoarece păstrarea tulpinilor de colecție este foarte dificilă, liofilizarea rămâne practic, metoda optimă care conservă intacte viaabilitatea și proprietățile biologice ale pneumococilor pe o durată lungă (1-2 ani). Pe geloză-sângue 4-6%, pneumococii capsulați cresc bine, producând colonii de tip "S" (smooth), mici de aprox. 1-5 mm diametru, plate, transparente, cu aspect de picătură de rouă, înconjurate de un halou verzu (α - hemoliză), ca și coloniile de *Streptococcus viridans*, de care se diferențiază net prin faptul că numai pneumococul capsulat produce septicemie mortală la șoarece. Pe geloză-sângue, la adăpost de lumină, pneumococii rămân 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 citozom, catalază sau peroxidază. Pneumococii mai fermentă numeroase alte zaharuri, dintre care inulina este descompusă caracteristic. Autoliza pneumococilor este cauzată de enzimele proteolitice și lipolitice, de producerea de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, acidificarea mediilor în urma fermentării zaharurilor și de creșterea potențialului de oxidoreducere a mediilor de cultură. Bila sau sănurile biliare determină clarificarea culturilor de pneumococi în mediul lichid (biloliza descrisă de Neufeld). Biloliza este caracteristica pneumococilor și îi diferențiază net de *Streptococcus viridans*. Pneumococii, ca și streptococii viridans, elaborează o enzimă cu acțiune hemolitică de tip α (viridans), la acțiunea luminii, a uscăciunii și a frigului. Germenii mor în 10 min la 52°C. Sunt foarte sensibili la toate antisепticile. Optochinul este bactericid în concentrație de 1/500.000. Pneumococii sunt sensibili la acțiunea sulfamidelor, a penicilinelor 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 anti-pneumococice specifice de tip, germenii sunt identificați prin reacții de aglutinare și mai ales prin reacția de umflare a capsulei (fenomenul Neufeld). **Caractere de patogenitate.** Pneumococii sunt bacte ri tipic virulente prin prezența capsulei care inhibă fagocitoza; germenii 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 infectii pneumococice fiind mai mare la copii și bătrâni. Pneumococii participă frecvent ca bactérii asociate în infecții respiratorii mixte acute și cronice, ca: traheobronșitele cronice, bronhopneumonile, abcesele pulmonare. Infecțiile pneumococice apar, de obicei, după afecțiuni care scad rezistența normală a mucoaselor căilor respiratorii, după boli anergizante, ca: virozile respiratorii, gripe, rujeola, tuberculoza etc. Pneumococul este principalul agent etiologic al pneumoniei acute care afectează, mai ales, adulții. El mai poate produce bronhopneumonii, otite, mastoidite, sinuzite, pleurezii, meningeite 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-pozițiivi capsulați, prezenti pe froturiile din sânge și din organe (splină, ficat), fapt care servește ca test biologic în diagnosticul de laborator.

**Imunitatea.** În pneumococii, fie prin vaccinare este numai specifică de tip și se datează anticorpilor anti-SSS; imunitatea se traduce prin prezența în sânge a precipitinelor, a aglutininelor specifice care favorizează fagocitoza germenilor.

**Tratamentul.** Pneumococii sunt sensibili la majoritatea sulfamidelor și la antibioticele. 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 penicilina. 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 germenilor se face pe cale aerogenă (tuse, strânsut etc.). La copiii mici din colectivitățile închise (creșe, casa copilului etc.) se poate recomanda aplicarea preventivă în luniile 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 macroscopic și microscopic din produsul patologic;
- izolare germenului prin însămânțări pe medii adecvate și inoculare la șoarece;
- identificarea pneumococului prin reacții biochimice și serologice;
- antibiogramă.

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

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

- Expectoratii mucopurulentă în traheobronșie, bronșie acută și cronică, brohopneumonie, abces pulmonar și sputa ruginită caracteristică din pneumonia francă lobară (conține particule purulente verzu, mucus, hematii și leucocite).

- Exsudatul pleural purulent (cremos, fibrinos, cu reflexe verzu din pleurezia pneumococică).

- Lichidul cefalorahidian purulent (cremos, fibrinos) din menigita și meningoencefalita pneumococică.

- Exsudatul purulent peritoneal din peritonita pneumococică.

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

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

Din produsele patologice proaspăt recolțate se fac froturi, se colorează prin metoda Gram și cu albastru de metilen. Se pun, astfel, în evidență diplococi Gram-pozițiivi, lanceolati, capsulați. Concomitent, produsele sunt înșămantate pe geloză-sângie și sunt inoculate la șoarece. Când pneumococii sunt în culturi pure (lichid cefalorahidian, secretii purulente pleurale, peritoneale, articulare, pericardice) se poate face reacția de umflare a capsulei direct în produs.

După înșămantare prin dispersie, plăcile cu geloză-sângie (cal, berbec) sunt incubate 24 h, la 37°C. Pneumococii cresc sub forma unor colonii ca piepturile de rouă, cu o zonă de hemoliză verzuie în jur. Aceste colonii sunt replicate în bulion I.C. glucozat 2% și incubate maximum 16 h, la 37°C, după care urmează identificarea tulpișii: frotiu colorat Gram, testul bilolizi, fermentarea inulinăi, 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-sângie după metoda obișnuită difuziometrică 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 susținut în ser fiziological). Produsele în care pneumococii sunt în culturi pure (L.C.R., sânge, exsudat pleural, peritoneal, articular, pericardic) pot fi inoculate intraperitoneal. După 1-3 zile se declanșează o septicemie mortală. Șoareci morți sunt autopsiați. Se fac hemoculturi în bulion I.C. glucozat 2% și, după o incubare de 14 h, se face reacția de umflare a capsulei și froturi ce se colorează 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 10% de albastru de metilen 30 ml, apă distilată 100 ml, soluție apăsă 1% de KOH 1 ml.

**Epidemiologie.** Pneumonile 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 germenilor 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 favorizați sunt constituui de bolile infecțioase provocate de alți agenți patogeni, în special de virusuri, inhalarea unor gaze iritante care lezază 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. COCHI 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.

### I. MENINGOCOCUL (NEISSERIA MENINGITIDIS)

**Meningococul** este una din speciile patogene pentru om ale genului *Neisseria* 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.** Meningococii sunt coci Gram-negativi, cu diametrul de 0,6-1  $\mu$ , sférici, ovalari, imobili, nesporulați care, în special în produsele patologice, se prezintă sub formă caracteristică de diplococi cu aspect de boabe de cafea care se privesc prin fețele lor turrite.

**Caractere de cultură.** Meningococii se autolizează rapid atât în produsele patologice, cât și în culturile de laborator. Meningococul nu crește pe mediu nutritive simple (bulion, geloză); pentru a se dezvolta are nevoie de lichide organice cu conținut bogat în proteine native, ca: săngele, serul, lichidul de ascita. În mediu lichide îmbogățite crește puțin. Pe geloză-sâng, 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 mediu Müller-Hinton gelozat, care conține infuzie dublu concentrată de inimi de viață și aminoacizi extrasă din caseină prin hidroliză acidă. De la purtătorii sănătoși de meningococ se izolează și colonii de tip "R" (rough). Culturile de laborator sunt păstrate pe mediu Mueller-Hinton, drept, sub strat protector de 1-2 ml ulei de parafină steril și numai la 37°C, trebuie 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 maltosa și nu fermentea 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 alcătuiesc mediile de cultură; de aceea, se recomandă cultivarea în atmosferă de CO<sub>2</sub>, care favorizează creșterea și combatere alcalinizarea.

**Rezistență la agenți fizici, chimici și biologici.** Meningococii sunt germeni

extrem de sensibili la variatii de temperatură și de pH. Lumina solară, frigul și uscăciunea îl omoară rapid. Culturile lăsatе la temperatură laboratorului mor repede, în mare măsură datorită antilizinelor secrete de germen. Sunt foarte sensibili la acțiunea antisепticelor, sublimatul 1% omorându-i instantaneu: de asemenea, sunt sensibili la acțiunea sulfonamidelor și antibioticelor, penicilina fiind antibioticul de electie în tratamentul infecțiilor meningococice.

**Structura antigenică.** Numeroasele studii imunochemical 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, germenul populează mucoasa rinofaringiană, fără a produce lezuni locale sau complicații. Dintre infecțiile cauzate de meningococ, meningita cerebrospinală epidemnică (MCSE) este boala cea mai importantă. În conceputul epidemiologic actual, MCSM este considerată ca o complicatie accidentală a meningococilor în general; acestea sunt boli infecțioase strict umane, transmise pe cale respiratorie, a căror expresie clinică obisnuită 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), constând din reacții congestive serofibroase sau purulente. La nivelul tegumentelor, meningococii pot produce erupții eritematoase, peteșiale (hemoragice) sau pustuloase. Patogenitatea pare să fie legată de tipul serologic de meningococ. Serotipul A se izolează în timpul epidemiei majore de MCSM; 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; řoarecele inoculat intraperitoneal cu tulpi recent izolate de meningococ moare prin intoxicație cu endotoxină.

**Imunitatea antimeningococică** este de tip umoral și se datorează 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 eficace care contin 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 meningocemile grave,

serul este injectat intramuscular și chiar intravenos. În MCSM, serul se administrează intrarachidian.

**Diagnosticul de laborator.** Se adresează bolnavilor cu infecții meningococice, produselor de la cadavr (sângue, 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) insărmățari pe medii adecvate pentru izolare agentului patogen;
- 4) identificarea serologică și biochimică a tulipinii izolate;
- 5) testarea sensibilității la sulfamide și antibioticice.

**Recoltarea.** În MCSM se prelevă, prin punctie lombară aseptică, lichidcefalorahidian (L.C.R.) în două eprubete sterile, pe când posibil mai aproape de debutul bolii și înaintea începerii tratamentului. De la bolnav se mai recoltează în prima însărmățare pe loc întă-un balon cu bulion glucozat 2% imbogățit cu ser steril de boiu sau cal ori cu lichid de ascită 25%; mediu este, în prealabil, încălzit la 37°C. De la bolnavii cu MCSM se mai recoltează pe tampoane de vătă sterilizate la autoclav secretiile nazofaringiene de pe amigdale și văul palatin înapoia lucei, având grijă să evităm inimuirea în salivă.

Recoltarea se face dimineața pe nemâncate sau la 4-5 h de la ultima masă, fără badionajele locale sau gargară de orice fel și înaintea administrării de antibioticice. De la bolnavii cu septicemie și eruptie peteșială, în afară de sângele pentru hemocultură, se mai recoltează cu o seringă sterilă, prevăzută cu un ac fin sau cu o pipetă Pasteur fin eflată, lichidul hemoragic din leziunile cutanate, pensând pielea în jurul lezunii. De la cadavru se prelevă aseptic, în primele 6-8 h de la deces, L.C.R., din ventriculii lateral și de la baza creierului, puori de pe meninge și de la nivelul coarnelor medulare posterioare, eventual fragmente de organe (splina, ficat, cord, exsudate seroase articulare, pleurale, peritoneale, sânge recoltat prin punctie cardiacă). De la purtătorii de meningococ se recoltează secretiile nazofaringiene, în același condiții ca la bolnavii cu MCSM.

**Examensul microscopic din produsele patologice.** În MCSM, L.C.R. poate fi tulbure, opalescent sau limpide. Lichidul cefalorahidian din una dintre eprubete va servi la însărmățari și la efectuarea a trei froturi; la fel și sedimentul L.C.R. (din a două eprubetă) centrifugat în condiții de sterilitate 10 min la 1000 turări/min. Fixarea lamelor se face prin trecerea rapidă prin flacără sau preferabil cu alcool metilic timp de 5 min. Froturile sunt colorate prin metoda Gram, Giemsa și cu albastru de metilen. În cazurile pozitive tipice (L.C.R. purulent), pe frotul Gram se observă numeroase polimorfonucleare și diplococi tipici (boabe de cafea) Gram-negativi intra- și extracelulari. Frotul 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 cloruri.

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

**Însămânțarea și izolare.** Produsele patologice recoltate la distanță folosite pentru însămânțari în vedere izolării germenului cauzal vor fi transportate imediat la laborator, în cutii izoterme (la 37°C). Se recomandă ca atât froturile, 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: mediu Mueller-Hinton înclinat (M-H) sau pe tuburi cu geloză-ser, geloză-ascită 25%, pe geloză înclinață, geloză-socolat și pe o placă de geloză-sâng (G-S), toate încălzite la 37°C. Însămânțarea pe geloză diferențiază meningococii de neisseriile saprofite (*Neisseria catarrhalis*, *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 temperatură laboratorului. Pe geloză-șocolat cresc și sușele de *Haemophilus influenzae* (care pot produce meningite), iar pe G-S se dezvoltă mereu majoritatea a germenilor, 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 cadavr sunt însămânțate pe LCN (limocomicină, colomicină și mistatină) care sunt incubate la 37°C, obligatoriu în atmosferă de CO<sub>2</sub> (exsicator cu lumanare aprinsă). Toate mediile însămânțate sunt incubate la 37°C și una două zi se fac ciurile urmăindu-se apariția culturii de meningococ (colonii mici, cu diametru de aproximativ 1 mm, rotunde, translucide).

**Identificarea culturii izolate.** Din culturile suspecte se fac froturi care se colorează Gram. Neisseriile apar la microscop ca diplococi Gram-negativi caracteristici. Se efectuează, de asemenea, aglutinări pe lama cu ser polivalent antimeningococic și cu seruri specifice de tip, și însămânțări în mediu zaharat-espaciele (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 căruia îi aparține tulipina respectivă. Tulpinile de meningococ, atât cele aglutinabile, cât și cele atipice neaglutinabile, fermenteză specific glucoza și maltoza și nu fermenteză levuloza, zaharoză 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 (dimețil-dietil- sau tetrametil parafenildiamonium diclorid) în apa distilată. Reacția este pozitivă când cultura se colorează la început în roz, care vinează 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 încarcă 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 microcomprimate standardizate de sulfonamide și antibiotice. Incubarea plăcilor la 37°C se face numai în atmosferă de CO<sub>2</sub>.

**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: ambarații maritime, intermate, școli, case de copii. Rezervorul de infecție îl reprezintă purtătorii nazofaringieni de meningococ, iar factorul aglomerare favorizează transmiterea și exacerbarea virulentei agentului patogen pe circuitul receptivilor, fiind afectate cu precădere anumite grupe de vârstă: copii mici între 0 și 5 ani, adolescenți și battani. Sezonul rece, obosalea fizică, virulenta intrinsecă a microbului invadator, capacitatea imunogenă slabă a gazdei infectate, precum și o situație economică și igienico-sanitară precare sunt factori favorizați pentru apariția imbolnăvirilor.

Epidemile 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 favorizați, în primul rând aglomerării.

## 2. GONOCOCUL (NEISSERIA GONORRHOEAE)

**Neisseria gonorrhoeae** sau gonococul este agentul patogen al gonoreei sau al blenoragiei, cea de-a doua boala venerică 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 insuflent tratați, germenii se cantonează în glandele anexe ale aparatului urogenital, unde pot persista timp îndelungat.

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

0,6-1 μ, reniformi, nesporulati, așezăți 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 (puroiul) din suprafațile 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 necesita medii îmbogățite cu ser, plasma, lichid de ascită, sânge defibrinat, hemoglobină sau extract globular, glucoză, autolizat de drojdie de bere. Izolare din produsele patologice și cultivarea gonococului nu se pot obține decât prin incubare în aerobioză cu o atmosferă de 5-10% CO<sub>2</sub>; creșterea optimă are loc la pH 7,4 și la temperatură 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 temperatură ambientă, gonococii sunt puțin rezistenți la uscăciune și lumină, nu supraviețuiesc decât 2-3 ore, atât în secreții cât și în culturi. Nu rezistă la +4°C, de aceea culturile sunt păstrate vîî circa 30-40 de zile la temostat sub strat protector de ulei de parafină care împiedică acidiferea. Căldura și antisепtele îi omoră rapid. Gonococii sunt, în general, sensibili la penicilina și antibioticele cu spectru larg. În etapa actuală au redevenit sensibili la sulfonamide. Trebuie menționat că, în funcție de tulpimile circulante, se constată astăzi grade variate de sensibilitate la penicilina și rezistență la unele antibiotice (streptomycină, kanamycină), 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 fluorescenti 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 temperatură de 100°C și stă la baza preparării antigenelor preconizate în serodiagnosticul gonoreei cronice în vederea decelării anticorpilor serici specifici prin reacții de microfocalare, hemoaglutinare 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 are rol în invazia celulară.

**Caractere de patogenitate.** Patogenitatea gonococului se manifestă prin

virulență, care ține de prezența antigenului capsular I. La bărbat, gonorea se manifestă, la început, ca o uretrită acută anterioră cu eliminare de puroi prin uretră și, nefiltrată, infecția se extinde la uretra posteroară și, apoi, la organele anexe ale tractusului urogenital. La femeie se produce, mai întâi, inflamația colului uterin (endocervicită), însăși de eliminare unei secreții mucopurulente prin vagin, iar apoi infecția se poate extinde din aproape în aproape, producând inflamația mucoasei uterine (endometrită), a trompelor (salpingita) și a mucoasei rectale (rectita). Foarte frecvent, infecția gonococică la femeie se cronicizează, datorită neutrării sau umui tratament insufficient.

Ocazional, microbul poate infecta mucoasa conjunctivală a nou-născutului, generând oftalmia gonococică și poate provoca vulvovaginită acută gonococică la fetițe. 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, orhiepididita și prostata la bărbat, endometrită și salpingita la femeie.

Recent, a fost reprobusă 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 vaccinuri 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 administrația de antibiotice și sulfonamide în doze adecvate și trebuie să fie individualizat în funcție de antibiogramă. Vaccinul antigenococic 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 froturi din produsul patologic (posibilă, mai ales, în infecțiile acute); însămânțarea produselor pe mediu adecvate de izolare; identificarea biochimică prin reacția oxidazei și însămânțare pe mediu zaharat (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 tamponare de vată subțiri montate pe tije 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 bături alcoolice, vaccin tifoidic, instilații cu nitrat de argint; de la bărbat cu infecție cronica și secreție redusă se recoltează "picătura matinală", înainte ca bolnavul să fi urinat, de preferință după un masaj prealabil de prostată.

Din produsele recoltate se fac froturi 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 înșământate pe plăci cu mediu selectiv și neselectiv, preferabil imediat după recoltare. Dacă acest lucru nu este posibil, recoltarea se face pe tampoane, care sunt trecute în mediul Stuart de transport și trimise la laborator pentru prelucrare.

Însămânțarea se face pe plăci cu mediu selectiv și neselectiv, prin disperși cu ansa pentru obținerea de colonii izolate; incubarea se face obligatoriu în exicator cu atmosferă de CO<sub>2</sub> 5-10%, realizată prin procedeul lumanării, timp de 24-48 h. Se urmărește apariția coloniilor mici, translucide de gonococ, care sunt replicate pe mediul neselectiv; se efectuează, concomitent, controlul microscopic pe froturi colorate

Gram și reacția oxidazei care este pozitivă, după care se execută antibiograma.

**Epidemiologie.** Blenoragia este o boală transmisă pe cale veneiană. Sursa de infecție este reprezentată de omul bolnav și, în primul rând, de femeia cu gonoree cronică asimptomatică. Principalele mijloace de preventie a îmbolnăvirilor constau în depistarea activă a blenoragiei, prin controale periodice bacteriologice, mai ales la femei și execuțarea unui examen de laborator complet în toate cazurile în care există suspiciunea unei infectii gonocoice, inclusiv aplicarea unui tratament corect în funcție de datele furnizate de antibiogramă, pentru a impiedica cronicizarea bolii. De asemenea, trebuie făcută prin toate mijloacele o educație sănătoasă susținută pentru un tratament corect și o vindecare completă.

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

## Cap.XV. BACILII GRAM-NEGATIVI

### I. FAMILIA ENTEROBACTERIACEAE

**Generalități.** Este o familie bacteriană alcătuită din numeroase specii de bacili Gram-negativi, nesporulați, mobili – cu cili peritrichi – sau inobili, care se cultivă ușor pe mediul de cultură simple, fermentază glucoza, cu sau fără producere de gaz și reduc nitrații în nitrți. Sediu obișnuit al acestor germe este intestinul uman și al animalelor.

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

#### Clasificarea bacteriilor aparținând familiei *Enterobacteriaceae*

(Brenner, 1981)

	Triburi	Genuri
I	Escherichiae	1. Escherichia 2. Shigella
II	Edwardsielleae	1. Edwardsiella
III	Salmonelleae	1. Salmonella 2. Arizona 3. Citrobacter 1. Klebsiella 2. Enterobacter 3. Serratia 4. Hafnia
IV	Klebsielleae	1. Proteus 2. Providencia 3. Morganella 1. Yersinia 1. Erwina 2. Pectobacterium
V	Proteae	
VI	Yersiniaeae	
VII	Erwiniæae	

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 testeile biochimice mai frecvent utilizate, menționăm: fermentarea unor zaharuri și alcoololi, producerea de indol, H<sub>2</sub>S, ureaza, fenilalanindezaminază, utilizarea citratului ca unică sursă de carbon, testul la roșu de metil (RM), Voges-Proskauer (V-P), lichidierarea gelatinei, transformarea nitrătorilor în nitrăi etc.

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

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

**Antigenul "K"** este un antigen de înveliș, fiind situat la suprafața bacteriilor. Este de natură glucido-lipido-polipeptică, 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 anticorpul "O" din ser, astfel că fenomenul de aglutinare nu mai apare (tulpini "O" – maglulinabile). Acest fapt creează dificultăți în diagnosticul serologic al unor astfel de tulpi.

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

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

**Virulenta** este invers proporțională cu numărul de germei vii care produc moartea animalelor inoculate. Se stabilește D.C.L. (doza certă letală) sau D.L<sub>50</sub> (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 germei omorâți prin căldură. Cu cât este mai mic numărul de germei morți care omoră animalele inoculate, cu atât tulipa bacteriană respectivă este mai toxică și, prin urmare, mai patogenă. Trebuie tîrniț cont de faptul că rezultatele obținute pe animal nu corespund todeaua cu cele observate la om.

La unele *Enterobacteriaceae* se mai pot studia și acțiunile hemolitică, dermonecrotică etc.

**Cercetarea sensibilității la bacteriofag.** Stabilirea lizotipului unei culturi bacteriene are numeroase aplicări 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 profundarea diagnosticului de laborator, iar în cursul epidemiei ajută la depistarea sursei de infecție, legătura dintre cauzurile de boală etc.

În unele cazuri, preparatele făcute sunt utilizate în tratamentul unor afecțiuni produse de germenii din familia *Enterobacteriaceae*: colbaciloze, infectii urinare cu

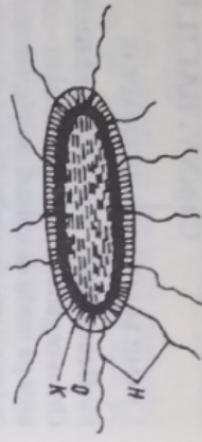


Fig. 16. Structura antigenică la Enterobacteriaceae.

bacilul *Proteus* etc. Enterobacteriaceele cel mai frecvent întâlnite în patologia umană sunt: colibacili, salmonelele și bacilii dizenterici.

#### 1.1. BACILUL COLI (ESCHERICHIA COLI)

Colibacili se găsesc peste tot în natură, în aer, în apă, pe pământ etc. În caz de boală pot fi pusă în evidență în sânge, urină, puoi etc.

**Caractere morfologice și tinctoriale.** Sunt bacili Gram-negativi, lungi de 2-3 $\mu$  și groși de 0,5 $\mu$ , ciliati, ceea ce face ca în marea lor majoritate să fie **mobili**; ei nu formează spori.

**Caractere de cultură.** Nu sunt germei pretențioși. Cresc abundent pe *medialle de cultura obisnuite*: bulion, apă peptonată, geloză nutritivă etc. Formele S tubură uniform bulionul și dau naștere la colonii netede, bombate, cu marginile regulate, cu diametrul de 2-3mm. Formele R cresc în bulion, dar se depun la fundul eprubetei și dau colonii rugoase cu marginile neregulate pe mediile solide.

**Caractere biochimice.** Colibacili sunt bacterii aerobe, dar se pot dezvolta și în condiții de anaerobioză. Ei poseda un bogat echipament enzimatic; fermentează *lactoza*, produc *indol*, nu descompun ureea, nu lichefiază gelatină și pot avea o activitate hemolitică și dermonecrotică.

**Rezistența la agentii fizici, chimici și biologici.** Bacili colo rezistă timp îndelungat în mediul exterior. Ei sunt omorâți prin încălzire la 60°C, în timp de 40-60 min. Sunt **sensibili la acțiunea substanțelor dezinfecțante**: clorammina, fenol, formol, sublimat etc. De asemenea, sunt **sensibili la acțiunea streptomicei**, *cloramfenicolului*, **la unele sulfamide etc.**, dar nu sunt afectați de penicilină. Unii colibacili sintetizează substanțe care distrug alte specii bacteriene, dând naștere la fenomene de antagonism microbian.

**Structura antigenică.** Bacili colo au o structură antigenică complexă, legată de prezența celor trei antogene principale: O, H și K. Pe baza acestor antogene s-a stabilit schema de identificare a diferitelor tipuri.

**Patogenitate.** Cei mai mulți colibacili nu sunt patogeni. Virulenta și toxicitatea bacteriorilor patogeni sunt legate de prezența antigenului K și a unor toxine (enterotoxină, neurotoxina etc.), precum și de producerea hemolizei și a dermonecrozei.

**Boala la om.** În anumite condiții, unele tulpi de bacili colo dau naștere la diferenții *afecțiuni locale* sau *generale*: boli ale aparatului genitorian, infecții intestinale, endocardite, meninge, septicemii etc. Unele tipuri serologice pot provoca îmbolnăviri grave la copiii mici ce pot îmbăraca aspectul unor epidemii severe.

**Infectiile urinare.** Bacilul coli este agentul patogen cel mai frecvent întâlnit în infectiile urinare spontane sau care apar după utilizarea de sondă sau a unor instrumente de explorare a aparatului urinar. Anumiți factori de "utropatogenitate" facilitează, atunci când sunt prezenti, colonizarea mucoasei aparatului urinar. Dintre

aceștia menționăm adezinele ale căror receptori sunt diseminați pe celulele arborelui urinar până la nivelul rinichiuului.

**Infectiile intestinale** sunt provocate de *B.coli* zis "enteropatogen" care produce gastroenterita nouă 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 multiplică și de a produce reacții inflamatoare și ulcerării localizate.

*Bacilul coli* "enterotoxigen" produce diareea copiilor și a turistilor care vorajează prin sările 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 subtire, aderare urmată de multiplicare și pe de altă parte de producerea de toxine termolabile și termostabile care deregulează 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 antibiogramei), se poate administra ser anticolibacilar sau se prepară un autovaccin din tulipina izolată de la bolnav.

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

**Diagnosticul de laborator al infectiilor colibaciliare.** În infectiile cu *bacilul coli* diagnosticul de laborator constă în izolare și în identificarea germenilor 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 termostat la 37°C. După 24h se face o trecere pe sub un tub de geloză. Dacă s-a reușit cultivarea germenului 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:

- geloză factorizată turnesată (mediul Drigalski); *bacilul coli* fermentază lactoza și vinează mediu în roșu;

- geloză lactozata cu eozină și albastru de metilen (mediul Levine). Colonile de *bacilii coli* au o culoare negricioasă cu luciu metalic, spre deosebire de alte enterobacteriacee care dau colonii roz-palid;

- geloză lactozată cu albastru de bromotinol. Pe acest mediu *bacilul coli* formează colonii de culoare galbenă.

De pe mediile diferențiale se iau, cu ansa, coloniile suspecte și se trec pe geloză nutritivă 2%, după care urmează identificarea germenilor 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 îmbolnăvirii.

**Urocultura.** După o recoltare corectă a urinii, în condiții de igienă riguroasă, se face o însămânțare direct din urină sau din sedimentul obținut prin centrifugare, în 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. Patrunderea germenilor în organism se face pe cale digestivă, răspândirea acestora fiind favorizată de îmbolnăviri 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 serviciile medicale inopportună și să se ia măsuri foarte riguroase care să se interzic sondajele uretrale răspândirea infectiilor colibaciliare 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抗igene somatiche comune – fiecare grupă fiind formată din *specii* ce se diferențiază prin抗igene flagelare specifice.

În cadrul unei specii, diferențierea poate merge mai departe: unele tulpini de *Salmonella* au caracter biochimic diferențiat (*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, pasări și reptile. Pot fi, de asemenea, întâlniți în mediul extern în ape și pe sol, în alimente etc.

**Caractere morfologice și tinctoriale.** Salmonelele se prezintă sub forma unor bastonase lungi de 2-3 $\mu$  și groase de 0,6 $\mu$ . Sunt bacili mobili (cu foarte rare excepții), cu cili peritrichi bine dezvoltăți; nu formează spori, nu au capsule și sunt Gram-negativi.

**Caractere de cultură.** Sunt germeni aerobi și facultativ anaerobi. Cresc pe mediile cultură simple (bulion, apă peptonată, geloză nutritivă etc.). Se pot dissocia 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 (OX<sub>19</sub>, OX<sub>2</sub> și OX<sub>k</sub>) au抗原e comune cu rickettsiile, motiv pentru care sunt utilizate în diagnosticul serologic al tifosului exantematic (reacția Weil-Felix).

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

Inoculați la animale de laborator (iepare, 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 administrații de vaccinuri preparate din tulpina proprie a bolnavului (autovaccin) și de bacteriofagi specifici.

**Diagnosticul de laborator.** Constată în izolare și identificarea germenilor din produsele patologice cu stabilitatea 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.

Froturi efectuate direct din produs au numai o valoare orientativă.

În general, bacilul *Proteus* este ușor de izolat, dacă produsul patologic este însăși întâlnit în lichidul de condensare al unor tuburi cu geloză nutritivă înclinată. Datorită marii lor mobilități, bacili *Proteus* vor invada întreaga suprafață a mediului (fenomenul de cățărare) și vor fi obținuți în cultura pusă la partea superioară a prantei. Izolare bacilului *Proteus* poate fi obținută și prin disperție pe medii selecțive folosite pentru alte *Enterobacteriaceae*. Aceste medii inhibă, prin sătururile biliare pe care le contin, expansiunea bacililor *Proteus* și permit obținerea unor colonii izolate, caracteristice (colonii cu centrul opac, verde-închis și periferia mai deschisă pe *mediul Istrati-Meier* sau colonii cu centrul opac, brun și periferia decolorată pe *mediul SS*).

În continuare, după efectuarea bacililor *Proteus* și permis obținerea unor colonii izolate, 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.** Afectiunile produse de germeni din genul *Proteus* au devenit o problemă importantă în cadrul infecțiilor intraspitalicești, datorită selecționării unor tulpini polirezistente la antibiotice și având o capacitate de infectiozitate sporită. Combaterea 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, saprofiți 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 mentionate. *Klebsiella rhinoscleromatis* este întâlnită în rinosclerom, iar *Klebsiella ozanae* este prezenta la bolnavii de ozena.

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

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

**Caracterele de cultură.** *Klebsielle* cresc abundant pe mediul obișnuit. În mediile lichide formează la suprafață un inel sau chiar un vâl 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; fermentază glucoza și numeroase alte zaharuri cu producere de gaz; nu formează indol și H<sub>2</sub>S și nu lichefiază gelatină; reacția la roșu de metil și testul la fenilalanină sunt negative; formează acetyl-metil-carbinol (reacția Voges-Proskauer pozitivă), descompun ureea și cresc în prezența malonatului de sodiu și a KCN. Caracterele biochimice sunt folosite pentru identificarea și clasificarea klebsiellorelor. Rezistența la agenți fizici, chimici și biologici. *Klebsielle* sunt omorăte 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 antigeni: "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 termostabil și impiedică 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, pleurezi, infecții urinare, otite, meninge etc. Uneori, acești germei pot produce infecții intraspitalicești.

Șoarecele 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 izolare și identificarea germenilor se recoltează diferite produse patologice ca: secrețiile purulente, sputa, urina, L.C.R., bilă etc. Însămânțarea acestora se face pe mediu simple, obișnuite. După o incubare de 18-24 h la termostat ( $37^{\circ}\text{C}$ ), *Klebsiella* formează o peliculă la suprafața mediului lichide și colonii mucoase, mari, pe mediu solide. Pe froturile colorate Gram, germeii apar sub formă unor bacili gram-negativi, de mărime egală. Colorații speciale pun ușor în evidență capsula bacteriană existentă, mai ales la germenii din produsele patologice.

Folosirea tehnicii de aglutinare pe lama sau a testului de umflare a capsulei în prezența serurilor immune 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 germenului cercetat la grupul *Klebsiella*, ca și încadrarea sa într-o din speciile acestui gen.

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

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

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

### 1.5. BACILLUL 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 mediile de

cultură simple. Sunt aerobi și facultativ anaerobi, fermenteză lactoză, nu lichefiază gelatină, nu formează hidrogen sulfat. În general, bacilii dizenterici sunt puțin rezistenți în mediu extern. În materiile fecale sunt distruiți prin concurență de alți germei și, de aceea, însămânțarea 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 distrusi destul de rapid de substanțele antisepice obișnuite (fenol, sublimat cloramfenicol, dar sunt insensibili la penicilină).

Germeii din acest grup sunt imobili: ei nu posedă antigen H. De aceea, diferențierea dintre tipurile serologice se face pe baza antigenului O. **Patogenitatea germenilor.** Este legată de prezența unei endotoxine, iar la unii 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 sanguinozente. Epidemiiile cele mai grave, cu cea mai ridicată mortalitate, sunt produse de bacili dizenterici care produc exotoxina.

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

**Imunitate.** Există o rezistență diferită a oamenilor față de infecție. Vaccinarea cu germei omorâți nu dă rezultate satisfăcătoare. Vaccinarea cu germei vii, nepatogeni, poate promova.

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

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

**Diagnosticul de laborator al dizenteriei baciliare.** Diagnosticul bacteriologic al dizenteriei baciliare se bazează pe izolare și identificarea germenilor în materiile fecale ale bolnavilor sau ale purtătorilor de germei, 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 mucoză, pufoi și fragmente de mucoasă se găsesc numeroși bacili dizenterici. Deoarece antibioticele și sulfamidele împiedică dezvoltarea germenilor pe mediile 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 însămânțarea să se facă cât mai curând după recoltare. Când

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

#### Înșămânarea

produselor patologice se face pe medii de cultură ca:

- Mediu Leifson (D.C.A. = dezoxicolat-citrat-agar). Pe acest mediu, coloniile de bacili dizenterici sunt transparente;

- Mediu cu bilă uscată (Istrati-Meiter). Pe acest mediu, care înainte de înșămânare are culoare verde-închis, coloniile de bacili dizenterici sunt verzi sau verzi-albastre.

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

**Caracterele morfologice și tinctoriale** sunt cercetate pe preparate proaspete și pe froturi colorate. În cazul prezenței bacililor dizenterici vor fi puși în evidență bacili Gram-negativi, imobili.

Caracterele biochimice ale germenilor izolați sunt studiate după tehniciile generale utilizate pentru *Enterobacteriaceae*.

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

**Epidemiologie.** Dizerenteria este o boală digestivă în care germenii 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 germe.

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 colectivitatele de copii și în mediul familial, măiniile murdare reprezintă principalul factor de transmitere a dizenteriei. Apa contaminată poate, de asemenea, provoca epidemii întinse de dizenterie bacilară. Alimentele în special lăptele și produsele lactate incorect 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 boala 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 diagnosticati cât mai curând de la declanșarea bolii, iar purtătorii vor fi depistați și luati 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 receptive se face printr-o muncă susținută de educație sanitată, 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 antidizerenterică 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-negative, foarte mobile, care au formă de bastonaș ușor curbat. Majoritatea speciilor aparținând acestui gen sunt saprofite, nu sunt holergene. Altele produc îmbolnăviri usoare. Vibrio holeric, descoperit de Robert Koch spre sfârșitul secolului trecut într-o epidemie de holera în Egipt, este cel mai important reprezentant al genului **Vibrio** și este holerigen.

Vibrioni holerigeni sunt de două feluri:

a) vibrioni hemolitici: - tipul I: *V.Inaba*;

- tipul II: *V.Ogawa*;

- tipul intermediar: *V.Hykofjima*

b) vibrioni nefhemolitici: *Ei Tor* și tulipinile *Celebes*

**Habitat.** Vibrioni holerici pot fi izolați de la omul bolnav sau purtător, din apele poluate, de pe pământul sau obiectele contaminate.

**Caractere morfologice și tinctoriale.** Vibrio holeric are formă de bastonaș ușor curbat, lung de 2-3  $\mu$  și gros de 0,5  $\mu$ , 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.** Vibrio holeric se dezvoltă rapid pe mediiile de cultură simple cu un pH alcalin 8-9. În apă peptonată formează, după câteva ore de incubație la 37°C, o cultură vizibilă și un val la suprafața mediului. Pe mediile solide formează colonii caracteristice: cenusii, translucide, cu suprafața netedă și cu centru mai proeminent și mai dens.

**Caractere biochimice și de metabolism.** Vibrio holeric este un germen aerob, fermentază manzoa și zaharoză, nu fermentază arabinoza; lichefiază gelatina, produce H<sub>2</sub>S și indol, reduce nitrații în nitriti, iar testul oxidazei este pozitiv. Unii vibrioni sunt hemolitici.

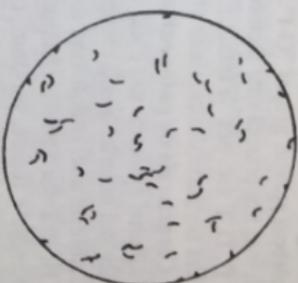


Fig.18. Vibrio holeric.

**Rezistență la agenți fizici, chimici și biologici.** Vibronii holerici sunt distruiți în câteva ore de radiatiile solare, în 30-40 min de radiațiile ultraviolete, într-o oră prin încălzire la 50°C și foarte rapid prin fierbere. El rezistă, totuși, un timp destul de îndelungat în apă și aliniente.

Vibronii holerici sunt foarte sensibili la substanțele antișeptice obișnuite: sublimat, formol, fenol, cloramină etc. Ei sunt sensibili la tetraciclină, streptomicina, dar rezistenți la penicilina. Sunt, de asemenea, sensibili la bacteriofagii specifici.

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

**Caracterele de patogenitate.** Vibronii holerici au o virulență foarte variabilă. În cursul unei epidemii sau chiar la același bolnav pot fi izolați vibroni foarte virulenti și vibroni holerici lipsiți complet de virulenta. Acțiunea toxică a vibronilor holerici se datorează unei endotoxine 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 deosebită ridicată. Scaunele bolnavilor, în număr foarte mare, conțin fragmente de mucoasă intestinală și un număr mare de vibroni holerici.

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

**Tratament.** Pe lângă aplicarea unui regim igienico-dietetice, cu rehidratarea masivă, administrarea de antibiotice (în primul rând tetraciclină) 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 impiedica orice posibilitate de răspândire a germenului în afara ariei de lucru. Aceleasi măsuri drastice se iau și la recoltarea și transportul produselor patologice.

Diagnosticul de laborator se bazează pe izolare și identificarea vibronului holeric la bolnavi, contacti și purtători, iar în caz de epidemie, de la cadavre, din apă și din alimentele contaminate.

**Recoltarea** produselor patologice (materii fecale, vomismente, continutul 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 și 48 h după terminarea administrației medicației antibacteriene.

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

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 apă peptonată 1% alcalină (pH=9).

Examenul microscopic direct este posibil când în produs există un număr mare de vibroni și el se poate face cu imersia pe froturi colorate după metoda Gram, cu fuesină diluată 1/10, când se constată prezența vibronilor colorați în roșu sau prin examinarea pe fond întunecat a unui preparat proaspăt (o picătură din scaun diareic sau văl de la suprafața mediului de îmbogățire) între lama și lamela. În acest din urmă caz se pun în evidență mișcările foarte vîî ale vibronilor holerici. 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 serum aglutinat bivalent anti-Inaba și anti-Ogawa; 2) o picătură din materialul de testat + o picătură din serum aglutinant absorbit anti-Inaba; 3) o picătură din materialul de testat + o picătură de ser fiziologic (mărtor). Serurile trebuie să conțină substanțe prezervative. Imobilizarea germenilor pe primul preparat și pe unul din următoarele două, cu păstrarea mobilității pe preparatul-mărtor, presupune existența vibronului holeric în materialul de cercetat.

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

Pentru cultivarea vibronului holeric, produsele patologice ca atare sau din mediul Carrie-Blair sunt însămânțate cu ansa sau direct cu lingurita 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 vălul format sau, în lipsa acestuia, cultura de la suprafață, la microscopul cu fond întunecat, inclusiv aplicarea testului de imobilitate, pentru decelarea vibriomilor holeric.

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

Pe plăcile cu geloză sau cu mediul B.S.A., primele colonii apar după 10-12 h de incubare la termostat; 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 termostat. Coloniile formate de vibrioni holeric 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 politrop T.S.I. În acest din urmă caz sunt reținute numai tuburile care prezintă acidificarea (îngălbăirea) fără gaz a mediului solidificat în poziție dreaptă și alcănuțarea (înroșirea) mediului solidificat în poziție înclinată. Aglutinarea pe lămă se face cu ser antiholeric bivalent (Inaba și Ogawa) subgroup OI, în paralel cu un martor cu ser fiziologic tamponat și, în continuare, cu seruri aglutinate monovalente absorbite Inaba și Ogawa.

Testul oxidazei, care la vibrioni holeric 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 H<sub>2</sub>S, reacțiile roșu de metil și Voges-Proskauer, fermentarea zaharurilor și prezența unor enzime.

Vibrio holeric produce indol, dă reacții pozitive la roșu de metil și produce H<sub>2</sub>S. Reacția Voges-Proskauer este pozitivă într-un procentaj foarte mare la tulipinile El Tor. De asemenea, fermentea glucoza fără formare de gaz, manzoa, zaharoza și manita, dar nu fermentea lactoza, arabinosa și inozita. Produce lizin-decarboxilază și ornitin-decarboxilază, dar nu produce arginin-dehidrolază. Posedă gelatinază, collagenază, lecitinază, elastinază și mucinază.

**Diagnosticul serologic** prin care se cercetează nivelul anticorpilor aglutinați 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 endemoepidemică, specifică omului. Epidemile de holeră 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 vibrioului holeric 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 fecaloïd-menajere și educația sanitată a populației.

Profilaxia holerei se bazează în special pe aprovizionarea cu apă potabilă controlată, evacuarea corectă a reziduurilor fecaloïd-menajere și educația sanitată 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 variația *hominis* și *bovis*, care produce tuberculoza, și *Mycobacterium leprae*, care produce lepra.

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



Fig.20. Bacilul tuberculos  
(fotiu din spută)

**Caractere morfoloșice și tinctoriale.** Sunt bacili subțiri, uneori cu ramificații, drepti sau ușor curbați, cu granulații ce sunt puse în evidență prin colorații speciale, imobili, nesporulați, necapsulați. Spre deosebire de alți germeni, micobacteriile, datorită unei compozuții 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-resistenți". Pentru a fi puse în evidență, se folosește colorația Ziehl-Neelsen. Pe froturiile colorate după această metodă, bacilul tuberculos apare colorat în roșu aprins, datorită fucsinei, în timp ce restul de germeni, celule sau alte elemente, sunt decolorate de acizi și alcool, fiind ulterior recolorate cu albastru de metilen.

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

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

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

Pe medii solide, primele colonii de bacil tuberculos tip uman apar după 10-15 zile de la înșirinare, sub formă unor puncte albe care, cu timpul, se mareș și tuberculosi de tip bovin formează primele colonii vizibile după 20-60 de zile. Bacilii tuberculosi dau naștere la colonii vizibile după 48-72 h.

În general, din bacilii tuberculosi nu putem obține suspensiile omogene. Bacilii tuberculosi 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.

**Rezistență la agenții fizici, chimici și biologici.** Sunt germini 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. Radiatiile ultraviolete au o acțiune bactericidă marcată asupra bacilului tuberculos.

Rezistența la agentii chimici este foarte variabilă: acidul sulfuric 10% și hidratul de sodiu 4% nu influențează viabilitatea bacililor tuberculosi după un contact de jumătate de oră. Dintre substanțele antisepice, cele mai active sunt fenolul 5%, tricrezolul 2% și lizolul 2%, care omoară o cultură de bacili tuberculosi în câteva minute.

*Mycobacterium tuberculosis* manifestă o rezistență totală față de majoritatea antibioticelor, este sensibil la streptomicina, hidrazida acidului izonicotinic (H.I.N.), cicloserina 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 formarea de anticorpi (aglutinanti, precipitanti, 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), utilizati în vaccinare produc o protecție evidentă împotriva infecției cu bacilul tuberculos uman.

**Caractere de patogenitate.** Virulenta micobacteriilor pare să fie legată de existența unei substanțe lipide, 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 (praf, tuse, strânat etc.) sau digestivă (produse lactate), iar tuberculoza poate imbrăca forme diverse: pulmonară, intestinală, urogenitală, osoasă, ganglionară, oculară, meningeală etc.

În general, toate manifeștele 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 față internă a coapsei posterioare, o cantitate mică de cultură. După 1-2 săptămâni se constată o împastare la locul de inoculare, iar animalul devine abătut și măncă din ce în ce mai puțin. În continuare, împastarea evoluează spre fluctuență și se ulcerizează 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 acceleră, iar temperatura crește. După 6-8 săptămâni, animalul moare. La examenele bacteriologice și anatomo-patologice 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 (reinfecție), el va reacționa cu totul deosebit în comparație cu prima infecție. La locul de reinfecție, foarte curând, după 12-24 h, se constată apariția unui edem cu aspect hemodinamic, cu evoluție rapidă spre necroza, ulcerare și vindecare, fără afectarea ganglionilor sateliți ("fenomenul lui Koch").

Prin urmare, în cursul primoinfecției, organismul devine hipersensibil și rezistent la reinfecție. Starea de hipersensibilizare, denumită și *atergie*, poate fi pusă în evidență numai prin inocularea unor produși de metabolism (difuzibili în mediul de cultură) ai baciului tuberculos, cum este *tuberculina*. Inocularea, în general intradermică, a unei cantități foarte mici de tuberculina 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 necroza la locul de inoculare, însotite, uneori, și de fenomene generale, intradermoreacția (I.D.R.) fiind socotită pozitivă.

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

**Imunitatea.** Rezistența specifică făță de infecția tuberculoasă nu poate fi obținută decât cu germeni vii atenuati. Prin vaccinare, în special a copiilor, cu B.C.G. (Baciul Calmette-Guérin), se obține o seadere importantă a cazurilor noi de tuberculoză. Acest vaccin conține bacili tuberculoși bovin care, prin treceri repetitive timp de 13 ani pe mediu cu cartof biliat și glicerinat, și-au pierdut virulenta, dar și-au păstrat constituția chimică, proprietățile antigenice și capacitatea de a produce tuberculoză.

**Tratamentul.** Descoperirea unor antibiotice și chimioterapice active asupra baciului tuberculos a modificat radical prognosticul grav al afectiunilor tuberculoase. Dintre acestea, cele mai importante sunt: hidrazida acidului izonicotinic (H.I.N.), streptomicina, acidul paraaminosalicilic (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 include ermetic. În tuberculoza pulmonară, dacă bolnavul expectorează, se recoltează sputa. La bolnavul care nu expectorează, se recoltează lichidul de spălătură laringotracheală, iar la copii, deoarece își înghit sputa, se recoltează lichidul de spălătură gastrică și materialele fecale.

În *tuberculoza urogenitală* se recoltează urină, spermă, slăge menstrual și concentrată, se recomandă ca, în ziua care precede recoltarea, bolnavul să consume cât mai puține lichide.

În *tuberculoza seroselor* (pleurezie, peritonită, hidratroză, hidrocel) se recoltează exsudatele respective prin punție.

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

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

În fază disseminarii hematogene, baciul tuberculos poate fi cultivat și în sânge. Diagnosticul 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 froturi colorate după metoda Ziehl-Nielsen. Examinarea cu obiectivul cu imersie poate pune în evidență baciili colorați în roșu străucitor pe un fond albăstru.

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

**Omogenizarea** se face într-un balon de 250 ml, cu fund plat. Peste spută se adaugă o cantitate egală sau de 2-3 ori mai mare, dacă produsul este văscos, 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 jumătatea balonului și 2 ml neofalina sau xitol. Se agită energetic 10 min, se adaugă apă distilată până la jumătatea gătului balonului, se lasă în repaus 30 min, timp în care se formează un inel cremos în care au fost concentrări 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 plată încălzită sau pe un geam deasupra băii, se depun, 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 auramină-rodamina B și examinare la microscopicul cu fluorescentă poate da rezultate satisfăcătoare dacă se evită fluorescența nespecifică, dar pentru efectuarea acestei tehnici sunt necesare instalații speciale (sursă de raze ultraviolete, trusă de filtre de absorbtie).

**Însămânțarea produselor pe medii de cultură.** Produsele suprinfecțate sunt tratate prin omogenizare și decontaminare. Se recomandă însămânțarea "cu picătura".

Într-o erpubetă se pun cu o pipetă Pasteur 2-3 picături purulente din spută sau din sedimentul unor produse (spălătură bronholaringiană, urină etc.) centrifugate. Se adaugă o picătură de indicator (de exemplu, albastru de bromotimol) 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-verzui. Se adaugă o picătură de penicilină din soluția de 8000 u.i./ml. Se însămânțează cel puțin 3-5 tuburi cu mediu 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 i mojarate cu nisip de sticlă. După ce se adaugă apă distilată, se însămânțează ca atare, dacă produsul nu este contaminat cu alți germei, 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 ţine, 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 bromotimol virzează în galben-verzui. Centrifugarea se face la o turată 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 apărute sunt controlate prin frotu 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 macroscopic al coloanilor, 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, exudat pleural, peritoneal etc.) sunt inoculate ca atare sau după o prealabilă centrifugare. Produsele pluricontaminate sunt, în prealabil, debarasate de germeii asociați prin tehniciile 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 eliminati cei care prezintă alergie la tuberculina.

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

inoculare și a hipertrrofiei 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 tuberculina prin inoculare cu 0,1 ml tuberculina brută, diluată 1/10 sau 1000 unități PPD. Reacția pozitivă se manifestă prin apariția unei infiltrări 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 sacrificiate.

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

Din organe și, în primul rând, din spini se fac froturi care, după colorația Ziehl-Nielsen, sunt examineate pentru bacilii acidooaloorezistenți.

Când aceste examene nu sunt concluzante, din organe se fac însămânțări pe mediile de cultură și examine histopatologice.

**Testarea sensibilității la tuberculosatice a bacilului tuberculos** se face la toți bolnavii la care s-a reușit izolare și cultivarea germei, atât la începutul bolii, cât și periodic în cursul tratamentului. Pentru efectuarea antibiogramei substanțele antibiotice sau chimioterapice pot fi sau incorporate în cantități exact măsurate în mediile de cultură sau aplicate sub formă unor microcomprimate, pe tuburile cu mediile 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 tehnică utilizată. O tulpină 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 tuberculina** 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 a II-a (= 10 UT) din PPD (tuberculina purificată) în treimea mijlocie a feței anterioare a antebraului, dezinfecțată, în prealabil, cu alcool.

Reacția se citește după 72 h și se consideră a fi pozitivă, dacă la locul injectării se constată o infiltratie 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 indicare 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. Laptile de vacă provenind de la animale bolnave este, de asemenea, o surse frecventă de infecție.

În tubeculoza pulmonară, bolnavul elimină prin spută un mare număr de germei.

Contactul intum cu bolnavul al membrilor de familie, al îngrăitorilor sau al personalului medical curant facilitează transmiterea aeriană a bolii prin pulberi sau

picturi 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 microradiofotografic 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.

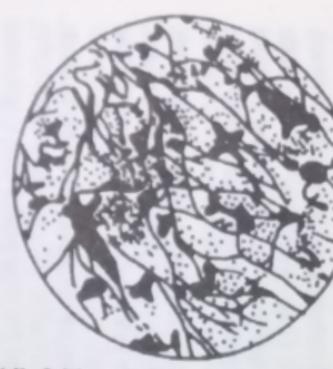
De asemenea, se vor lua toate măsurile pentru izolare și vindecarea prin tratamente complexe a tuturor cazurilor de boală existente, iar prevenirea bolii la contact se va face prin chimioterapie în focar.

## Cap.XIX. BACILUL LEPREI (*MYCOBACTERIUM LEPRAE*)

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

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

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



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

La examinarea froturilor se constată numeroși bacili acido-alcoolrezistenți, așezati "ca tigăriile în paște", extracelulari și, mai ales, intracelulari.

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 suscepțibilă la infecție și că perioada de incubație a bolii este foarte lungă, putând dura ani de zile.

În cadrul măsurilor profilactice se practică izolare și tratarea bolnavilor în leprozorii. Copiii născuți în familiile de leproși sunt separați de timpuriu de aceste famili și dispensați. Vaccinarea B.C.G. poate confi un anumit grad de rezistență la infectarea cu bacilul leprei.

## Cap.XX. BACILUL CĂRBUNOS (BACILLUS ANTHRACIS)

Cărbunel sau antraxul este o antropozoonoză (boala comună omului și animalelor) provocată de **Bacillus anthracis**.

**Caractere morfologice și tinctoriale.** Bacilul cărbunos este un microb în formă de bastonă în diametru de  $2\text{ }\mu$  și lungime de  $10\text{ }\mu$ . Gram-pozitiv, cu capetele tăiate drept, imobil, sporular, sporul fiind central și nu mai mare decât grosimea corpului bacterian. În corpul omului sau al animalelor bolnave, microbul apare izolat sau în lanjuri scurte și posede, todeauna, capsulă.

**Habitat.** În natură, spori constituie forma de rezistență, provenind din bacili eliminării 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 germen aerob, facultativ anaerob, care crește pe medii nutritive uzuale, geloză 2%, sau bulion la temperatura de  $35\text{-}37^{\circ}\text{C}$ ; pH-ul mediilor de cultură este de  $7,2\text{-}7,4$ . Pe geloză 2% și pe geloză-sânghe, germenul se dezvoltă sub formă de colonii albe-cenușii mari, cu diametru de 2-3 mm, uscate, de tip "R" (rough), cu suprafață rugoasă, granulară și margini neregulate cu prelungiri laterale, sugerând aspectul unor bucle de păr sau "cap de meduză". Colonile rough ("R") sunt virulente, germenii posedând capacitatea de a forma capsula. Caracterul aerob al germenului este exprimat bine prin aspectul culturii în mediu lichide, unde formează la suprafață o pelicula care se fragmentează și se depune la fundul tubului, formând un depozit flocoнос și tulburând mediu putin sau deloc. Pe geloză-sânghe, 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 mediile de cultivare, prin imbatrâinire, culturile sporulează.

**Caractere biochimice și metabolice.** Însământat în tuburi cu gelatină dreaptă, germenul crește și în 3-4 zile lichefază gelatină în formă caracteristică de brad inversat. Bacilul cărbunos coagulează lăptele, peptonifică cheagul (activitate proteolitică) și fermenteaază, fără formare de gaz, numeroase zaharuri.

**Rezistență la agenți fizici, chimici și biologici.** Formele vegetative de bacil cărbunos sunt omorate în 30 min la  $55^{\circ}\text{C}$ . Spori sunt distruiți la fiecare în apă timp de 10 min și prin autoclavare la  $120^{\circ}\text{C}$ . Caldura uscată testează mult mai puțin eficace; la  $140^{\circ}\text{C}$ , spori sunt distruiți în 3 h. Uscăciunea și temperaturile joase ( $-5^{\circ}\text{C}$ ,  $-10^{\circ}\text{C}$ ) conservă timp îndelungat (10 ani și chiar mai mult) viabilitatea și patogenitatea sporilor. Exponerea directă la razele solare distrug spori în 12 h. Antisepticile, ca: substanța corosivă soluție 1%, fenolul 5%, clorammina 5%, hidratul de sodiu 5%,

clorura de var 5%, formolul 1-2%, distrug rapid formele vegetative. Sporii sunt distruiți după un contact prelungit cu antisepticile, substanța 2% fiind printre cele mai eficace. 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 virulenta germenului și este de natură polipeptidică. Polipeptidul glutamic capsular este puternic imunogen și responsabil de inducerea anticorpilor protectori din serum anticărbunos terapeutic preparat pe cal. Din corpuri bacterieni s-a extras și un antigen somatic polizaharidic specific care nu joacă nici un rol în virulența germenului 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 *dacă*. Prezența capsulei are o acțiune antifagocitară, favorizând virulenta germenului. 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; toxină ca și antigenul capsular joacă un rol în imunitate. Cauza morții prin cărbune se datorează septicemiei care provoacă blocarea capilarelor sanguini, dar și toxinei care produce starea de soc; săngele este roșu-negru 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, intracutană, 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, priningerarea sporilor care provin din fecale, urină sau cadavrele animalelor bolnave. Omul face forme clinice variate 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 cărbunel cutanat (pustula malignă), urmată de formele de cărbune pulmonar și digestiv, ultimile două localizări fiind extrem de grave, cu letalitate foarte ridicată. Cărbunele pulmonar poate apărea la muncitorii care prelucrăza perii, lână, piei, prin inhalarea sporilor prezenti în aceste produse. Microbul se elimină prin sputa care este purulent-sanguinolentă. Cărbunele intestinal, care survine mult mai rar, apare sub formă unei enterite serosanguinoante cu prognostic grav; din materiile fecale, bacilul cărbunos este rar pus în evidență direct la microscop și este greu de izolat pe mediile de cultură.

**Imunitatea anticărbunoasă** dobândită prin imbolnăvire este durabilă. Starea de imunitate poate fi dobândită și prin vaccinarea cu vaccinuri vii atenuate.

**Tratamentul** infecției cărbunoase se face cu antibiotice, sulfamide, ser anticărbunos, iar în cazurile grave acestea se administreză asociat. **Diagnosticul de laborator.** Produsele patologice ce trebuie prelevate în vederea diagnosticului de laborator al antraxului sunt: serozitatea sau secreția

purulent-sanguinolentă din veziculele pustulei maligne sau din lichidul de edem al țesutului celular subcutanat, săngele în formele septice micer de antrax, secretii sau exsudate fibrinoase faringoamigdalene din cărbunetele faringian care simulează adesea falsele membrane din difterie, lichidul cefalorahidian cu aspect caracteristic hemoragic de la cazurile de meningoencefalită cărbunoasă, sputa, de asemenea, cu caracter hemoragic de la bolnavii cu cărbune pulmonar, fecalele în formele de cărbune intestinal, fragmente de țesuturi și organe (piele, spinișă, ficat, păr, vase), de la cadavrele oamenilor sau ale animalelor moarte de cărbune.

În sânge și L.C.R., germenul patogen se află în cultură pură, hemocultura se face prin înșământarea a 10-15 ml sânge recoltat aseptic din venile plicii cotului în 150-200 ml bulion, din care după 24 h de incubare la termostat se fac treceri pe geloză.

L.C.R., scos prin punctie lombară aseptică, este înșămânat ca atare într-un tub cu bulion și, prin dispersii, pe plăci Pétri cu geloză 2% și geloză-sângue (5 ml-8 ml%).

#### **Recoltarea serozității sau a lichidului de edem**

Se face în mod aseptic, cu o pipetă Pasteur fin efilată, cu care se punționează veziculele pustuloase; se fac froturi colorate Gram, Giemsa și cu albastru Löeffler. În paralel se fac dispersii pe geloză 20% și dispersii pe geloză-sângue, iar din veziculele necrute se face o înșământare pe bulion. Când este posibil, se fac și inoculări subcutanate sau intraperitoneale la șoarece. Pe froturile colorate Gram se observă bacili Gram-poziți capacetele tăiate drept și rare leucocite polimorfonucleare. Pe froturile colorate cu Giemsa se văd clar leucocitele; atât pe froturile Giemsa, cât și pe cele colorate cu albastru Löeffler, capsula este bine pusă în evidență, fiind colorată în roz. Pe plăcile cu geloză apar colonii 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-sângue bacilul cărbunos dă aceleși colonii tipice care sunt nefemolitice, ceea ce îl diferențiază de bacili saprofici. În bulion germenul formează peliculă la suprafață, iar preparatul proaspăt între lamă și lamelă arată lipsa de mobilitate, pozitivă la bacili saprofici, aerobi, Gram-poziți. Froturile din culturi pe medii solide sau în bulion arată bacili cu caracterele menționate mai sus.

**Secretiile din furuncul antracoid abcedat** sau din cărbunetele faringian sunt recoltate pe tamponare. Înșământarea se face numai pe medii solide. Din coloniile caracteristice se fac froturi Gram și treceri în bulion pentru studiu mobilității. Nu se va omite inocularea s.c. la șoarece.

În același mod se va proceda și cu sputa.

**Fecalele au aspect hemoragic;** germenul poate fi, uneori, observat pe frotiu direct.

În mod obisnuit se fac înșământări pe medii de cultură și se prepară emulsiile de fecale care se inoculează s.c. la șoarece.

Producările cu floră bogată de asociatie, în special fecalele și chiar sputa, secrețiile faringoamigdale, cele din antraxul cutanat supurat, dar mai ales fragmente de ficat, spinișă, piele, recoltate de la cadavrul sunt supuse testului de termorezistență a sporilor

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

Trebute accentuat că toate felurile de produse de la om sau animal sunt inoculare 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 preleveză aseptic fragmente de spinișă și ficat care sunt înșământate în bulion și cu care se fac amprente. Acestea se colorează 10 min cu albastru Löeffler. Pe frotiu se observă celulele parenchimului splenic sau de capsulă colorată în roz-ciclam, ceea ce face ca singur acest frotiu să constituie un diagnostic de certitudine. De la șoarece, prin punctie cardiacă aseptică, se mai poate face hemocultura 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 țesut sau organe tăiate mărunți se adaugă un volum de 5 ori mai mare de soluție salină fiziolitică. Se fierb 2-10 min în funcție de cantitatea de organ. Prin fierbere se precipită proteinele și se extrage polizahariul specific somatic, termostabil, care este filtrat prin hărție de filtru. Cu pipeta Pasteur se introduce 0,5-1 ml extract într-un tub de precipitat pestie care se adaugă cu atenție, tot cu pipeta Pasteur, sărăcăpitan anticărbunosi 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 precipitare.

**Epidemiologie.** Antraxul este o zoonoză pe care o întâşim și la om în mod accidental. Izvorul de infecție pentru om este reprezentat de animalele bolnave și cadavrele lor. Omul se infecteză în cursul îngrijirii animalului bolnav, a sacrificării acestuia, sau, mai rar, prin consumul de carne infectată. Muncitorii care prelucră blâncurile pot contracta antrax pulmonar prin inhalarea de pulperi contaminante. Receptivitatea populației la boala este generală, iar boala dă o imunitate durabilă.

Pentru prevenirea bolii trebuie interzis consumul de carne necontrolată 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 blâncurilor, pieilor, 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

### 2. BACILUL TETANIC (CLOSTRIDIUM TETANI)

#### 1. CARACTERE GENERALE

Bacterile anaerobe sunt germeni care se dezvoltă numai în absență 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 *cavitatele naturale ale omului și ale animalelor* (streptococi și stafilococi anaerobi etc.) și care *nu formează spori, nu produc toxine*, dar pot genera *imbolnăviri 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 germenii gangrenei gazoase.

Pentru izolare și cultivarea microorganismelor anaerobe sunt necesare metode și tehnici speciale care să permită înălțarea oxigenului din mediile de cultură și menținerea anaerobiozei pe durata examenului. Îndepărarea oxigenului din mediile de cultură poate fi realizată prin metode fizice, chimice și biologice.

- **Metode fizice:**
  - introducerea recipientelor cu medii într-un exsicator din care se scoate aerul cu o pompă de vid. În locul aerului secos se poate introduce azot sau alt gaz inert, fără oxigen.
- introducerea în exsicatorul în care sunt păstrate mediile de cultură, a unui amestec reducător (de exemplu, pirogalol + NaOH);
- incorporarea unor substanțe reducătoare (glucoză, cistină, acid ascorbic etc.) netoxice, în medii de cultură.

**Metode biologice:**

- cultivarea germenilor anaerobi în prezența unor germeni puternic aerobi care consumă oxigenul;
- adăugarea la mediile de cultură a unor fragmente de organe animale sau de ţesuturi 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 germenii anaerobi sunt tetanosul și gangrena gazoasă care, în general, sunt complicații ale plăgilor, precum și botulismul, care este o toxininfectie alimentară.

Producătoarea toxinfecția tetanică. Bacilul tetanic se prezintă sub formă unui bastonăș, *rotund* ce depășește grosimea bacteriei. Crescă numai în mediile anaerobe, degajând un miros caracteristic de corn ars. În cursul infecției rămâne cantonat la poarta de intrare în plagă – și elaborează toxină care trece în organism, intoxica sistemul nervos și produce boala. Tetanosul dă o mortalitate mare.

**Diagnosticul bacteriologic.** Izolare și identificarea bacilului tetanic sunt dificile. Se recoltează *țesuturi* sau *puroi* din plăgi, porțiuni din *cordoul umbilical* la nou-născuți, *pansamente* etc. Însămânțarea se face în *bulion, geloză mode* etc., iar incubarea în *anaerobioză*. Identificarea bacilului tetanic izolat poate fi obținută prin *inoculare* subcutanată la *soarece* a culturii în bulion. Animalul va prezenta semne de intoxicație nervoasă: paralizi și contracturi locale care se generalizează, ducând la moarte.

Din toxină tetanică, prin detoxifiere, se prepară *anatoxina tetanică*. Aceasta 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 salverarea bolnavului. Serul antitetanic se administrează și profilactic, concomitent cu vaccinarea antitetanică, la persoanele neinunțiate anterior, care prezintă plăgi deschise murdărite 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 eliminate prin fecale în mediu extern. Ei sunt răspândiți peste tot în sol, mai ales în terenurile îngrășate cu baligă. Cu toate acestea, boala este rară atât la om, cât și la animale, deoarece chiar atunci când pătrund în plagă sporii bacilului tetanic au nevoie de condiții speciale de anaerobioză pentru a trece în forma vegetativă, pentru a se multiplifica și a produce exotoxina tetanică ce produce boala.

Tetanosul se produce prin implantarea și dezvoltarea sporilor în plăgi traumatici, chirurgicale, plăgi uterine după avort sau după naștere, plăgi umbilicale la nou-născuți. Receptivitatea 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 traumatici, asistență medicală calificată la naștere etc. Profilaxia specifică se face prin vaccinare cu anatoxină 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, imunglobulina tetanică umană.

#### 3. BACILI GANGRENEI GAZOASE

Gangrena gazoasă este o toxininfectie 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 sâncrelul primar, gomele sifilitice, ganglionii limfatici, pereții vaselor cerebrale, aortei etc. De asemenea, se întâlnescă în placenta mamei sifilitice sau în organele fătului sifilitic, mai ales în ficat.

**Caractere morfologice și tinctoriale.** Treponemele sunt germeni spiralati, care prezintă mișcări de rotație, de flexiune și de translatăie.

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 intunecat, iar froturiile trebuie colorate după metoda impregnației argentice 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 antisепtice, la *solutiile 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 venerică).

După infectare, la 10-40 de zile (în medie 3 săptămâni), apare *sâncrel de inoculare* (olezune inflamatorie ulcerată), urmat de prinderea ganglionilor sateliți și răspândirea infecției în tot organismul. Uneori, acest săncru poate lipsi. Sâncrel de inoculare se vindecă și fără tratament, dar infecția își continuă cursul – trecând în fază secundară, caracterizată prin apariția unor *leziuni cutanate* (rozeole sifilitice) și ale *mucoselor*. Si aceste leziuni dispar fără tratament, dar, după câteva luni, apar *gomele sifilitice* (sifilisul terțiar) și, ulterior, după ani de zile, apar sernele *sifilisului nervos*.

**Imunitate.** Omul vindecat de sifilis capătă o rezistență destul de marcată fătă de *Treponema pallidum*, dar nu definitivă. În serum bolnavilor de sifilis pot fi pusi 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 bacteriologic.** *Treponema pallidum* poate fi pusă în evidență în leziunile sifilitice.

- *Examenul preparatelor proaspete* pe fond intunecat se practică în cazul existenței săncrului, a afecțiunilor din perioada secundară, a leziunilor cutanate și spirochete saprofite care trebuie evitate. În caz de săncru se șterge cu mare atenție leziunea cu vată sterilă imbăbată în ser fizologic sau în apă fierătă, după care se recoltează, cu ajutorul unei pipete Pasteur, serozitatea roz careiese la presiune, la marginea leziunii.

În cazul leziunilor secundare, se șterge energetic leziunea și se recoltează secreția seroasă care se formează.

Serozitatea recoltată din săncru, leziuni secundare etc. este examinată direct la microscop pe fond intunecat sau pe froturi colorate.

Examenul microscopic pe fond intunecat se execută la un microscop obisnuit, echipat cu surse de lumină puternică și cu un condensator special cardioïd sau paraboloid; acesta realizează fondul negru. O parte din razele luminoase, care vin din partea laterală sunt reflectate de către microorganisme, astfel că ele apar clar conturate pe fondul intunecat al câmpului microscopic. Treponemele prezintă mișcări de rotație axială însotite de mișcări ondulatorii.

- *Examinarea treponemelor pe froturi colorate:* colorație prin impregnare argentică (metoda Fontana-Tribondeau); prin aceasta 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 floculare V.D.R.L. și reacția de fixare a complementului Bordet-Wassermann*.

### Reacția V.D.R.L. (Venereal Disease Research Laboratory)

Antigenul cardiolipinic 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. salina tamponată stock (x10). Se diluează de 10 ori în apă distilată pentru folosire.
- Trusa nedesfăcută se păstrează la întuneric și temperatura camerei ( $18^{\circ}$  -  $25^{\circ}$ C).

### Tehnica micronecrației

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 centrifughează pentru clarificare; inactivare 30 min la 56°C. Dacă au trecut 4 ore de la inactivare se reinclăzesc 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 placă 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 rotiri pe minut, efectuate pe o suprafață plană; placă va fi protejată de zgârieteri, fixându-se pe fondul ei o hârtie, în timpul rotirii.

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 80 x - 100 x).

După trecerea a câteva minute, în toate serurile apare un precipitat care împiedică diferențierea rezultatelor pozitive de cele negative. Pentru a se evita această eventualitate 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 anticorpi) 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*. Sângelul de berbec defibrinat este "spălat" cu o soluție fiziologică 0,85%, de trei ori prin centrifugare, câte 10 minute, la 2500 turări/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, serumul fiziologic se împarte mai întâi în două părți aproximativ egale, la una dintre acestea adăugându-se hematii, iar la cealaltă serum hemolitic. Sensibilizarea se face prin amestecarea bruscă a celor două soluții urmată de transvazări repetitive rapid, dintr-un recipient în altul. După aceasta, balonul conținând sistemul hemolitic se va păstra 30 minute la termostat.

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 - ml
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 ml

Rezultatul se citește după o incubare de 10 minute la baie de 37°C. În reacție se va întrebunița jumătate (deoarece reacția de bază se execută cu jumătate de cantitate) din cîtitatea imediat superioră celei care a produs hemoliza completă.

3. *Antigenul cardiolipinic* este o soluție alcoolică de cardiolipină, lecitina și colesterol.

Emulsia antigenică se prepară din antigenul cardiolipinic diluat în soluție fiziologică 1/120.

Diluarea se face turnându-se încet antigenul, picătura cu picătura, în soluție salină și agitându-se energetic. 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 diluți de ser).

Metoda calitativă se execută după următoarea schemă:

Tub nr.	Ser de cercetat	Ser fiziologic	Antigen cardiolipinic diluat 1/20	10' la temp. camerei	Complemențament conf. titrării în 0,20 ml	Agitare 45' la baie 37°C	Sist. hemol.	Agitare, apoi 15' la baie 37°C	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	Ser fiziologic	Antigen cardiolipinic diluat 1/20	10' la temp. camerei	Complemențament conf. titrării 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 diluți 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 hematite.

#### Interpretarea rezultatelor:

- hemoliză totală = negativ (-)
- hemoliză incompletă = dubios (+)
- lipsă hemoliză = de la slab pozitiv (+) la intens pozitiv (+++).

**Epidemiologie.** Sifilisul este o boala venerică, având ca izvor de infecție omul bolnav. Transmiterea se face, de regulă, prin *raport sexual* și numai cu totul exceptional 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 călătoare 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 *examenele serologice*.

Acestea sunt *obligatorii* și se efectuează la controlul periodic antivenerian al personalului din sectorul alimentar și alte servicii publice (hoteluri, băi, frizerii), la angajarea în serviciu, la intrarea în școli și facultăți, la gravide, la eliberarea certificatului prenupcial etc.

Anchetă epidemiologică este însă cea mai importantă metodă de depistare activă. Ea permite descoperirea bolnavilor neînregistrati și ne tratați, care contribuie cel mai mult la răspândirea boli.

## 2. GENUL LEPTOSPIRA

Leptospirile sunt *microorganisme spirale*, patogene pentru om și pentru animal. Datorită unei structuri antigenice stabile și diferențiate, leptospirile sunt clasificate pe această bază și identificate, mai ales prin metode imunologice.

Bolile provocate de leptospire poartă numele de *leptospiroze*.

Leptospirile sunt întâlnite în natură mai ales în apele râurilor, în piscine, lacuri etc. Ele pot fi, de asemenea, găsite la rozătoarele sălbaticice și animalele domestice. Leptospirile se localizează, mai ales, în rinichi, de unde se elimină prin urină în mediu exterior și infectează apa și unele alimente prin intermediul cărora pot imbolnăvi omul.

**Caractere morfologice și tinctoriale.** În preparatele proaspete, leptospirile nu pot fi văzute decât la microscopul pe fond întunecat. Ele pot fi însă ușor de examinat la microscopul obișnuit, dacă sunt supuse unor colorații speciale.

Leptospirile colorătoare Giemsa se prezintă sub formă unor filamente fine, ondulate, colorate în violet, cu capetele curbatе în C sau S.

Impregnarea argentică a leptospirilor prin metoda Fontana-Tribondeau este procedeul cel mai frecvent utilizat. În urma acestei colorații, leptospirile apar negre, ondulate, îngroșate din cauza impregnației argentică și la care spirele nu mai sunt evidente.

## Cap.XXV. VIRUSOLOGIE GENERALĂ

### I. DEFINIȚIE

**Virusologia sau inframicrobiologia** este știința care se ocupă cu studiul virusurilor sau al **inframicrobiorilor** 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, rabia, poliomielita, hepatita virală, gripe 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 procarioote.

### 2. CARACTERELE GENERALE ALE VIRUSURILOR

Virusurile sau **inframicrobii** sunt germeni extrem de mici, foarte puțin evoluati, situati pe primele trepte ale vieții. Aceste forme primitive de viață au o organizare ușormentară, 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 ( $10 - 300 \text{ nm}$ ). Pentru acest motiv, în mareala 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 obligatori. Virusurile nu pot fi cultivate pe mediiile de cultură folosite în mod obișnuit în bacteriologie.
- Înmulțirea virusurilor se face prin replicare.
- Sunt specifice; fiecare virus provoacă o anumită boală.
- Produc inclusiv în celulele parazitare. Prezența acestor inclusiv nucleare, citoplasmatic, sau concomitent în nucleu și citoplasmă, în anumite țesuturi, șurează 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 ţină în vedere criterii: acidul nucleic din genomul viral (ADN sau ARN), capsomere, comportamentul față de anumiti 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 parazitară* virusurile pot fi patogene pentru anumite animale vertebrate sau nevertebrate, virusuri patogene pentru plante sau virusuri patogene pentru bacterii (bacteriofagii).

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 compozitia genomului menționăm câteva care produc viroze umane:

- **virusuri ADN:** Papovavirus (negră), Adenovirus (adenoviroze), Herpesvirus (herpesul și zona zoster), Poxvirus (variola și vaccinia).

- **virusuri ARN:** Picornavirus (poliomielita, enteroviroze etc.), Togavirus (arbovirozele), Arenavirus (choriomeningita limfocitară, febrele hemoragice sudamericanane etc.), Coronavirus (infectii respiratorii), Orthomyxovirusuri (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 căle sanguină în tot organismul și poate determina erupții caracteristice pe piele și mucoase. În acest grup sunt cuprinse: variola, rujeola, rubeola, varicela.

**Infecții cu localizare primară în anumite organe** pentru care virusul respectiv are afinitate. Răspândirea virusurilor se face pe căle sanguină, pe căle nervilor periferici sau pe amândouă căile. Din acest grup fac parte:

- infecții ale sistemului nervos central: poliomielita, turbarea;
- infecții ale aparatului respirator: gripa, guturau;
- 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.

Acese modificări de pH sunt ușor constatate datorită indicatorului din mediul de cultivare.

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.

Concomitent, alte tuburi cu culturi celulare sunt inoculate numai cu virus constituind mărtorul.

Ulterior toate tuburile sunt examineate zilnic la microscop. Absenta efectului citopatic la tuburile inoculate cu virus + ser de referință, conjugată cu prezența acestui efect la mărtor, 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 tulpi de virus de referință. Inocularea ulterioară a anestecului în culturi celulare și examinarea zilnică a acestor culturi indică, în cazul neutralizării, prezența în aer a anticorpilor neutralizați corespunzător 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 inactive în câteva ore.

**Variatiile de temperatură.** Căldura are o acțiune nefavorabilă asupra virusurilor. Marea lor majoritate sunt inactivate la  $60^{\circ}\text{C}$  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 transmisarea bolii de la omul bolnav sau purtător la alți indivizi.

Temperatura scăzută are o acțiune de conservare asupra virusurilor: congelarea la  $-20^{\circ}\text{C}$  și mai ales la  $-70^{\circ}\text{C}$  conservă aceste microorganisme luni și chiar ani de zile.

Virusurile nu posedă forme de rezistență similară sporilor de la bacterii. *Uscarea* rapidă poate conserva virulența virusurilor. Când uscarea se face lent se produce de obicei o atenuare a patogenității acestora.

**Radiatiile ultraviolete** au o acțiune nocivă asupra virusurilor. Prin acest procedeu se practică sterilizarea boxelor în care se lucraza cu inframicrobi. Când expunerea virusurilor la radiatiile ultraviolete este de scurtă durată, se poate produce o atenuare a virulenței acestora, putându-se obține vaccinuri cu o bună imunogenitate.

Radiatiile infraroșii nu par să aibă vreo acțiune asupra virusurilor.

**Utrasunetele** inactivă unele virusuri cum sunt: virusul vaccineal al turbării, poliomielitic etc.

**Variatiile 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 depășesc aceste limite inactivăză și altereză corpuseculii viralii.

**Glicerina** are o acțiune de distrugere a bacteriorilor și a unor virusuri (psitacoza, ornitoză). Totuși majoritatea virusurilor (poliomielitic, rabic, vaccineal 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** inactivăză și distrugе virusurile care au în constituția lor lipide (gripal, herpetic etc.) pe care le dizolvă. Alte virusuri (poliomielitic, Coxsakie etc.) sunt însă rezistențe.

**Cloroformul, dezoxicolatul de sodiu** inactivăză virusul gripal dar nu are acțiune asupra enterovirusurilor.

**Bila și saponina** inactivăză unele virusuri (herpetic, vaccineal, gripal) dar nu acționează asupra altora (virusul poliomielitic).

**Săpunul obișnuit și detergenții** au în general o acțiune puternică de inactivare și distrugere a virusurilor.

**Ionii metalelor grele** (de exemplu  $\text{Ag}^{++}$ ) inactivăză virusul rabic, poliomielitic etc. fără a le altera capacitatea imunogenă. S-a încercat astfel să se obțină vaccin antirabic cu o întărire putere imunogenă.

Coloranții vitali (albastru de toluidină, roșu neutru etc.) inactivăză 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 substantelor 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, psitacoza, limfogranulomatoză veneiană) care sunt sensibile la tetraciclină.

## 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 împiedică poartă numele de *virus exclus* în timp ce virusul infectant existent se numește *virus interferent*.

În fenomenul de interferență virusul initial modifică receptorii celulei gazdă sau căile metabolice care devin astfel inaccesibile virusului următor. De asemenea primul

virus stimulează celula infectată să sintetizeze *interferon* care împiedică replicarea celui de-al doilea virus.

*Interferonii* constituie o clasă specială de proteine antivirale, netoxice, acid-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 fiziochimic și imunologic: interferon *standard* de tip I, citokina, sintetizat de celulele altele decât leucocitele și interferon *leucocitar*, de tip II, limfokină, sintetizat de limfocitele T imune.

## 8. METODE DE CERCETARE A VIRUSURILOR

Tinând 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 corpusculii viralii se găsesc în celule, țesuturi și organe. Prin izolare și identificarea lor sau a unor componente virale (acid nucleic, proteine capsidale, hemaglutinină, neuraminidază, diverse polimeraze etc.) sunt necesare tehnici perfecționate biofizice, biochimice și imunochimice.

### Metode de izolare și purificare a virusurilor sau a unor componente virale

Pentru izolare particelelor virale din matricea (membrană, nucleu celular etc.) în care acestea sunt incluse se utilizează procedee de solubilizare a acestora cu ajutorul unor detergenți și solventi 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 fractionată* cu sulfat de amoniu sau alti agenți precipitanți (etanol, metanol) sau prin purificarea cu solventi organici (di-eti-eter, cloroform etc.) urmat de ultracentrifugare și dializă.

- *cromatografia de adsorbție* care separă compușii 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, polistiren, 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 (radioimunoabsorție) și RIP (radioimmunoprecipitare);

- *hemadsorbția-cluția*, utilizată la concentrația virusurilor hemaglutinante (Myxovirusurile). Virusurile se atașează, prin intermediul hemaglutinintei de receptorii hematice, iar agregatele formate, sedimentează ușor. Ulterior, virusul este eliberat de pe membrana hematicei 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*, *formă și greutatea moleculară* (ce se stabilesc cu ajutorul microscopului electronic și al ultracentrifugării), *structura moleculară* (cu radiatii X și microscopie electronică), *caracterul antigenic* (prin imunoprecipitare, imunoelctroforeză, fixare de complement), *infectivitate* (numărătoarea unităților infectante, formatoare de plaje).

Dintre metodele serologice mai frecvent utilizate în virusologie 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 cunoscută, 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 serumul conține anticorpi, acestia neutralizează virusul și acesta nu se va mai dezvoltă, iar în caz contrar virusul nefind neutralizat se va dezvolta și efectele sale vor fi puse în evidență (efect citopatogen pe culturi de celule, leziuni pe membrana chorio-alantoïdă, 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 (RHAD).** Este o tehnică folosită în mod curent atunci când există virusuri hemaglutinante (gripă, parotidă epidemică etc.). La baza reacției stă următorul principiu: virusul aglutinează hematite (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.

variatiile antigenice minore fără implicații epidemiologice importante, iar virusul gripal tip C nu prezintă variatii antigenice.

Fiecare tulipină de virus gripal este codificată astfel:

- tipul antigenic de ribonucleoproteină (A,B,C);
- ţara sau localitatea în care a fost izolată;
- numărul de ordine al tulpinii, anul în care a fost izolată pentru prima dată și, în subtipului de neuraminiidază. De exemplu, mareea pandemie de gripă asiatică din 1957-1958 care a afectat 1/3 din populația globului a fost provocată de tulipina de virus gripal A/Singapore/1/57 (H<sub>2</sub>N<sub>2</sub>).

Gripa este o boala 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 genotipul constituit din ARN, făcând parte din *genul Influenza-virus, familia Orthomyoviridae*.

Virionul **gripal** are o formă sferică, uneori filamentoasă, cu diametrul de aprox. 100m. La suprafața sa se găsesc mici proeminențe filamentoase alcătuite din glicoproteine care constituiesc *hemaglutinina* și respectiv *neuraminiidaza*, 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 *nucleoproteină* conectată la 8 fragmente de ARN. Antigenul nucleocapsidic conferă virusului gripal specificitate de tip (A, B, C).

**Hemaglutinina** asigură absorbția virusului pe hemati și pe celulele ciliare ale aparatului respirator. Aglutinarea se produce prin interacțiunea dintre hemaglutinina și receptorii specifici de pe hemati. Fenomenul este împiedcat de anticorpii specifici (principiul reacției de inhibare a hemaglutinării).

**Neuraminiidaza** este o enzimă care permite eliberarea particulelor virale din celule, jucând astfel un rol important în gradul de infecțiozitate al tulpinii respective. Hemaglutinina și neuraminiidaza sunt glicoproteine cu specificitate antigenică, ele conferind virusurilor gripale specificitate de subtip și de variantă.

Astăzi sunt cunoscute 3 tipuri de virus gripal – A, B și C – care diferă între ele prin structura nucleoproteină interne și a antigenelor proteice de suprafață. În tipul de **virus gripal A** se pot întâlni 3 subtipuri de hemaglutinina (H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub>) și două subtipuri de neuraminiidază (N<sub>1</sub>, N<sub>2</sub>), 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 provoca marile pandemii cunoscute.

**Virusul gripal de tip B** are o structură mai unitară și la aceasta nu apar decât

## Cap.XXVI. VIRUSOLOGIE SPECIALĂ

### 1. VIRUSURILE GRIPALE

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 radiuții cu U.V. sau tratament cu eter, formol, fenol. Hemaglutinina și antigenele fixatoare de complement sunt mai rezistente la agentii fizici și chimici decât particula virală.

**Patogenie.** Virusul gripal pătrunde în organism prin intermediul aerosolilor și afectează mucoasa căilor respiratorii. Neuraminiidaza scade văsozitărea stratului mucos expunând astfel receptorii de la suprafața celulelor la pătrunderea virusului gripal care produce lezuni destructive urmate de descuamarea celulelor ciliare, infiltrate cu celule mononucleare și edem submucos. Când procesul afectează și parenchimul pulmonar, apar lezuni de tip interstitial. Starea toxică generală (febra, 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 copiii mici și la bătrâni cu afecțiuni pulmonare sau cardiovasculare cronice.

Unele animale de laborator (dior, șoarece) sunt sensibile la infecția gripală dar, în practică, cultivarea virusului se face pe ouă 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 data de laborator prin izolare și identificarea virusului gripal din spălătură nazală, secreții nazale sau faringeiene, spută. Titrurile de virus în aceste produse patologice sunt cu atât mai măte 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 contină 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 izolare virusului se poate obține prin inoculare în sacul alantoidian sau amniotic al unor ouă de găină cu embrioni de 10 zile sau prin inoculare în culturi de țesuturi speciale. Trebuie sătăt că virusul nu produce decât efecte citopatice puține

și nespecifice și de aceea detectarea sa se face prin teste de hemaglutinare, hemadsorbire sau imunofluorescență.

Identitatea specifică a virusului gripal poate fi determinată cu antiseruri specifice prin testul de hemaglutino-inhibare.

Diagnosticul *rapid* al infecției gripele se poate face prin detectarea virusului cu ajutorul testului de imuno-fluorescentă în celulele epiteliale ale tractului respirator sau prin detectarea acestuia în secrețiile prin testul ELISA sau prin determinarea fluorometrică a neuramnidazei în aceste secrete.

**Diagnosticul serologic** al infecției gripele este de o importanță primordială pentru investigațiile epidemiologice sau pentru confirmarea etiologică a unui diagnostic clinic prelungitiv. În aceste situații se observă o creștere semnificativă a anticorpilor antivirali (de cel puțin 4 ori) în probele de ser recoltate la debutul bolii și în convalescență, după 2-4 săptămâni.

În acest scop este utilă cercetarea curbei anticorpilor seroneutralizanți, dar testul este greoi și scump. Mai ieftin și mai simplu este testul de hemaglutino-inhibare care are o sensibilitate aproape egală cu testul de neutralizare, mai ales dacă serurile sunt în prealabil tratate pentru îndepărțarea inhibitorilor nespecifiici ai hemaglutinării virusurilor.

RFC poate detecta atât anticorpii făță de proteinele virusului gripal și care au o viață mai scurtă (3-6 luni) cât și anticorpii făță de glicoproteinele de suprafață ale acestui virus și care persistă o perioadă mai mare de timp.

### Diagnosticul serologic al gripei prin reacția de hemaglutino-inhibare

**Tehnica reacției.** Reacția de hemaglutino-inhibare (HAI) se efectuează în plăci de plastic cu godeuri sau în tuburi de hemoliză.

#### Materiale necesare:

- Antigene gripale hemaglutinante care sunt antigene virale corpusculare specifice de tulipină obținute din lichidele alantoice și/sau amniotice ale ouălor de găină embrionate inoculate cu virusuri gripale apartinând tipurilor A, B sau C;
- plăci de plastic cu godeuri sau tuburi de hemoliză;
- suspensie 0,5% hematii de pasăre sau om grup O;
- soluție clorurată izotonica ( $\text{NaCl}$  0,85%) sau tampon salin (TFS) pH 7,2;
- enzimă distrugătoare de receptor (RDE);
- citrat trisodic soluție 3,8%;
- ser de cercetat;
- ser imun de pasăre antivirus gripal (HI) omolog antigenului folosit.

Serul de cercetat și serum imun de pasăre sunt tratate cu RDE pentru îndepărțarea inhibitorilor nespecifici.

**Reacția de inhibare a hemaglutinării (HAI).** Din serum de cercetat și din serum de pasăre antivirus gripal se fac diluții seriale în volume egale cu cele folosite la titrarea antigenului. Peste fiecare diluție de ser se adaugă un volum egal din diluția de antigen (amantadina).

preparată pentru reacție. După 15-20 minute în fiecare godeu se adaugă suspensie de hematii 0,5% într-un volum reprezentând dublul diluției de antigen.

**Schema reacției de inhibare a hemaglutinării**

Ser de cercetat	Diluție volum (ml)	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024
Antigen gripal 4 UHA	(ml)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
agitare - contact 15-20 minute									
Suspensie hematii 0,5%	(ml)	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
agitare - 60 min la 22°C - citire									

Titru serum de cercetat sau al serumului de pasăre antivirus gripal este cea mai mare diluție de ser care inhibă complet 4 unități hemaglutinante din antigenul folosit în reacție.

În cazul în care în reacția de hemaglutino-inhibare se folosesc antigene preparate cu tulipini de virus gripal tip C sau temperatură laboratorului depășește  $+22^{\circ}\text{C}$  citirile se fac după păstrare 90 minute la frigider ( $+6^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ).

**Epidemiologia gripei.** Transmiterea gripei de la un om la altul se realizează direct prin picături din secreția nazofaringiană și, mai rar, indirect prin intermediul obiectelor proaspăt contaminate cu secretei infectante. Contagiozitatea este mare, transmiterea agentului patogen făcându-se rapid, mai ales în colectivitate. În numai câteva săptămâni gripea se poate propaga în numeroase ţări și continente. Receptivitatea față de gripă este generală putând afecta toate grupele de vârstă.

**Imunitatea** în gripă este specifică pentru tipul de virus gripal care a produs-o. În convalescență apar în sânge anticorpi specifici față de antigenul nucleocapsidic și față de antigenele de înveliș ale virusului, anti-hemaglutină și anti-neuramnidază. Rezistența față de boala este dată, în principal de anticorpii față de hemaglutină care au capacitatea de a neutraliza virusul gripal.

**Profilaxia specifică** se poate realiza prin vaccinarea antigripală cu vaccinuri integrale inactivate (mono sau polivalente) sau preparate numai din subunități ale particulei virale (hemaglutină, neuramnidază), sau cu vaccinuri cu virus viu atenuat. Tinând cont de faptul că vaccinurile gripale sunt reactogene și eficiente în cel mult 80% din cazuri și aceasta numai atunci când ele corespund tipului de virus circulant, pentru prevenirea gripei se pot utiliza și unele chimioterapice cu acțiune antigripală (amantadina).

Ca măsuri generale în caz de epidemie menționăm:

- izolare bolnavilor la domiciliu sau în spital pe durata bolii acute;
- limitarea circulației persoanelor expuse;
- educație sanitată 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 mușcături. 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 μm și un diametru de 60-80 μm. 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 ambient. Poate supraviețui timp de câteva săptămâni la temperaturi mai scăzute și poate fi conservat în glicerina sau prin liofilizare.

Virusul rabic poate fi cultivat prin inoculare intracerebrală la animalele cu sânge cald (șoarece, iepure, cobai, hamster etc.), pe culturi de țesuturi sau pe ouă embrionate. Virusul "*de stradă*" 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.

**Patogenie.** 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 infiltratiu cu mononucleare, perivasculare și perineuronale însotite de fenomene de degenerescență. În neuroni apar inclusii intracitoplasmaticce acidofile stâncoase sau alungite, caracteristice encefalitei rabice denumite "*corpusculii 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 céfalee, indispozitie și alte fenomene neuropsihice. Boala poate îmbrăca forma *furiösă* cu hidrofobie, agitație, halucinații, crize spasmodice sau forma

*paralitică* cu parșezii, somnolentă 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 declansarea bolii.

Tratamentul *local* trebuie instituit imediat și el constă din toaleta plăgii, spălare abundentă a locului mușcăturii cu apă și săpun, aplicarea unor antisепtice locale și infiltrații locale cu ser antirabic. Dacă este necesară o sutură a plăgii, aceasta nu va fi efectuată înainte de 48 de ore.

Tratamentul *specific* cu vaccin antirabic și ser antirabic 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 și mai puțin de 24 ore capul este trimis ambalat cu grijă într-o lăda izotermă. Când distanța este mare și durata depășește 24 ore se pot recolta fragmente din zonele de elecție ale sistemului nervos (Cornul lui Aron, scoarță și trunchi cerebral, cerebel) și glande submandibulare și se introduc într-un recipient de sticlă cu glicerină 50% în soluție fiziolitică tamponată.

Este bine ca în timpul autopstrierii și recoltării materialului nervos, operatorul, imunizat anterior antirabic prin vaccinare, să poarte mănuși și ochelari de protecție, iar recoltarea să se facă în condiții de sterilitate.

Examensul *macroscopic* evidențiază leziuni de meningoencefalită.

Examensul microscopic se execută pe preparate din materialul nervos recoltat din zonele de elecție și expus pe lame sub formă de froturi confectionate prin impresiuni sau etalare sau prin cupe histologice.

### Diagnosticul rapid prin metoda Sellers

Amprentele proaspete, umede, preferabil pe secțiuni din Cornul lui Aron, 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 frotul 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 inclusii rabice, rotunde sau ovale de cel mult 27  $\mu$ , de culoare roșie cu tentă 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 inclusiilor este patognomonică pentru diagnosticul de rabie.

Absența inclusiunilor 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 inclusiunilor rabice este metoda Bouin-Dubosque-Brazil (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 Mami*. În acest din urmă caz secțiunile de material nervos, în prealabil deparafinate și deshidratate (3 băi de toluen a către 10 minute, urmate de 3 băi de alcool etilic absolut a către 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 temperatură camerei. În continuare preparatele se spăla cu apă de robinet, se scurg și se introduc într-o soluție de alcool sodal (NaOH 1,5% în etanol, 1 ml și etanol absolut 30 ml) pentru diferențiere. După 10 minute, preparatele devin roz, se scot și se spălă 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 corpusculi rabici de culoare roșie situati intracitoplasmatic cu un halou clar în jur și având o structură internă constituită din puncte bazofile, colorate în albastru închis. Citozina celulei apare colorată în albastru azur iar cromatina nucleară în albastru închis. Într-o celulă pot fi mai mulți corpusculi rabici. Prezența acestor corpusculi 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 antigeni specifici 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 scoarța) se fac câte două amprente pe o lămă, etichetată. După uscarea amprentelor la temperatură camerei, acestea sunt sterilizate prin expunere la ultraviolete timp de 10 min, apoi lamele sunt introduse pentru fixare în acetona răcita 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 amprentă din partea opusă se aplică o picătură de ser fluorescent mat. Proparatele se introduc pentru 30 min la termostat la +37°C, după care se lăsă într-o băie de tampon fosfat salin la pH = 7,2 timp de 10 min, cu împezire de 2 min în apă distilată. După uscare se montează lamele pentru amprentă, cu glicerina tamponată și se examinază 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 (soareci albi nou-născuți sau adulți și iepuri). În acest scop, 1-2 g de material nervos este mojarat, susținându-se 10% în soluție salină fiziologică și centrifugat. Este preferabil ca la materialul ce urmează să se adauge 10% ser normal, penicilină (500-1.000 UI/ml) și streptomycină (1-3 mg/ml) cu cel puțin 30 min înainte de inoculare.

La soareci nou-născuți se inoculează intracerebral 0,01 ml iar la soareci adulți 0,03 ml din suspensia de probă. După inoculare soareci sunt observați zilnic. Începând din ziua a 4-a, se sacrifică în fiecare zi căte un soarec 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 soarecilor inoculați, antigenul rabic, cu 2-3 zile înaintea apariției semneelor clinice. În general la soarece, semnele de turbare apar la 7-10 zile de la inoculare. Semnele clinice constau din apariția agitației și a unor contractii clonice, animalul ținând membrele anterioare și capul în extensie. În fază finală apar paralizii și în final moartea. În momentul apariției paraliziei animalul este sacrificat, se recoltează creierul în mod steril și se fac amprente care se examinază după colorația Sellers și în primul rând prin imunofluorescență.

Când din diverse motive proba nu este concluzionată, pentru a ne asigura că este cu certitudine vorba de virusul rabic și nu de alt virus encefalitogen se practică proba de seroneutralizare.

**Proba de seroneutralizare** constă, pe scurt, așa cum este executată în Institutul Cantacuzino, din amestecarea suspensiilor de cercetat, în părți egale, o parte cu ser antirabie, o parte cu ser normal și o parte cu ser fiziologic. După o incubație de o oră la temperatură de 37°C se inoculează la soarece. În caz de turbare supraviețuiesc soareci inoculari cu suspensie amestecată cu ser antirabie și fac turbare soareci 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 mușcătura de câine, se recomandă vaccinarea sistematică și înțerea sub supraveghere a acestor animale.

### 3. VIRUSURILE HEPATITICE

Hepatitele virale acute sunt boli specific umane ce se manifestă prin fenomene generale infecțioase digestive și hepatice, însotite sau nu de icter. Ele sunt provocate din căte se cunoaște până în prezent de cel puțin cinci virusuri hepatotrope, patogene pentru om: VHA, VHB, VHC, VHD și VHE.

**Virusul hepatitic A** (VHA) este un virus ARN de dimensiuni mici (27 nm), sferic și face parte din familia *Picornaviridae*, genul *Enterovirus*. Principalul său antigen este Ag HA iar anticorpii corespondanți sunt anti-HA, IgG și IgM. Hepatita virală A este în general o boală ușoară, fără manifestări extrahepatice și adeseori anicterică și asymptomatice. Rezervorul de virus A este constituit din bolnavi cu icter sau aproape exclusiv pe cale fecal-orală, prin contact direct sau indirect prin intermediul alimentelor sau a apei contaminante. Receptivitatea la boală este generală, iar imunitatea specifică este solidă și durabilă. Profilaxia bolii se face prin izolare bolnavilor și controlul contactelor, educație sanitată, protecția apel 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 nm și face parte din familia *Hepadnaviridae*, genul *Hepadnavirus*. Principalele sale抗原e sunt: AgHBs (antigenul de suprafață al VHB), AgHBC (antigenul central al VHB) și Ag HBc (antigenul legat de antigenul central).

Ag HBs constituie învelișul extern al virusului Hepatitei B și are o structură complexă lipoglicoproteică. El conține un determinant antigenic comun a care poate fi cuplat în diverse combinații cu căte o pereche de subdeterminate antigenice 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 prezenta lor semnifică vindecarea bolii.

Componenta centrală (nucleocapsida vironului) este alcătuită din capsidă, ADN-polimerază și genomul viral. Capsida, compusă din 180 capsomere, conține un polipeptid și formează antigenul central al virusului hepatic (AgHBC). El este de celulele hepatice dar este absent în sânge.

Anticorpii anti-Ag HBC sunt anticorpi specifici IgM și prezenta 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 anticorpi anti HBC.

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 derive de sânge. Anticorpii corespondanți anti AgHCC apar în convalescență sau în hepatita cronică.

**Virusul hepatitic Delta** (VHD) - agentul etiologic al hepatitei virale delta, apare ca o suprainfecție la bolnavii cu hepatita virală B, agravând mersul bolii. Existenta 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 hepatic non A, non B, transmis pe cale enterală. Apariția anticorpilor 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 glutamicipiruvică, TGO - transaminaza glutamicoxalacetică, fosfataza alcalină, teste de disproteinemie, etc.).

Diagnosticul de certitudine al acestor afecțiuni nu poate fi obținut decât după efectuarea unor examine de laborator care au ca obiectiv identificarea antigenelor virale specifice și a anticorpilor corespondanți în diverse produse patologice recoltate de la bolnavi (sângere, fecale, bilă, urină etc.). Există mai multe probe de laborator pentru acest scop dar, în prezent, sunt preferate teste RIA (radioimmunologic) și ELISA (enzimologic) pentru specificitate și rapiditate.

**Epidemiologie.** Principalul rezervor de virus este omul bolnav și purtătorii cronici și asymptomatici 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 contaminante, și calea parenterală (VHB, VHC și VHD), prin transfuzii de sânge sau derivate de sânge contaminate, utilizarea unor seringi nesterilizate sau incorrect sterilizate, folosirea instrumentarului stomatologic sau chirurgical la mai mulți pacienți fără sterilizare etc. Receptivitatea boală este generală iar imunitatea dobândită față de un anumit tip de virus hepatic este solidă și durabilă.

**Profilaxie.** Depistarea precoce a bolnavilor și izolare lor precum și o evidență corectă a contactelor 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 săngelui destinat transfuziilor, folosirea unor seringi de unică întrebuitare și a instrumentarului stomatologic de investigare sau chirurgical corect sterilizate. Prevenirea transmiterii virusurilor pe cale orală se face în primul rând prin luarea unor măsuri de ordin igienic pentru protecția alimentelor și a apei potabile dar și măsuri generale de educație sănătă și igienă individuală.

În stadiul actual protejarea 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 hepatic ADN recombinant produs de celule de drojdie de bere în care a fost inserată prin inginerie genetică gena subtipului ad 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 POLIOMIELITEI

Poliomielita este o boală infecțioasă acută și transmisibila provocată de virusul poliomielitic. Numai un procentaj foarte redus, sub 1% din indivizi infectați cu virusul poliomielitic fac boala clinică manifestată prin paralizii provocate de distrugerea unor neuroni motori centrali.

##### Virusul poliomielitic

face parte din familia *Picornaviridae*, genul *Enterovirus*. Este un virus ARN, de dimensiuni foarte mici (28 nm), cu o capsidă formată din 60 capsomere. Deoarece nu are lipide în capsida sa, virusul poliomielitic ca și alte enteroviruși, este rezistent la eter, etanol și diferiți detergenți. Este sensibil la U.V., formol și cloramină.

Virusul poliomielitic are 3 tipuri: 1, 2 și 3. Acestea sunt antigenic distincte și nu dau imunitate întreclipsă. Virusul poliomielitic este patogen pentru om și maimuțe. Tipul 2 este patogen și pentru soarecele nou-născut. Toate cele 3 tipuri de virus poliomielitic pot fi cultivate pe culturi celulare (trinichi de maimuță, HeLa, etc.) producând efecte citopaticice 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 reticuloendoelial, se produce prima multiplicare după care prin intermediul secretiilor 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 poliomielitic poate fi neutralizat de anticorpi specifici circulați și evoluția bolii este jugulata sau dîmpotrivă virusul poate invada sistemul nervos central și apare boala clinică. Virusul poliomielitic traversează bariera hematomeningeală sau trece prin sinapsa mioneurală și prin cilindraxoni și maduvă ajunge la creier. În sistem nervos

central, virusul se multiplică în celulele nervoase, în special în neuronii motori pe care îi distrug. În funcție de numărul neuronilor afectați și de localizarea acestora se produc parazită sau paralizii ce pot fi uneori urmărite și de contracturi spastice.

##### Diagnosticul de laborator.

Diagnosticul de certitudine se bazează pe izolare și tipajul virusului poliomielitic la care se adaugă teste de serologie. Pentru izolare virusului poliomielitic se iau probe din spălături nazofaringiene, din materii fecale, L.C.R. sau ţesut nervos (portioni de măduva spinări și din creier) recoltat la necropsie. În primele două săptămâni de boală virusul este găsit într-o mare proporție în aceste produse patologice. Fragmentele de ţesut 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 poliomielitic produce efecte citopaticice caracteristice. Pentru ca virusul poliomielitic să fie identificat și tipizat se practică neutralizarea specifică a acestor efecte citopaticice cu seruri antipoliomielitice monospecifice de tip 1, 2 și 3.

##### Reacția de seroneutralizare pe culturi de ţesut

Proba de virus pe care se efectuează *reacția de neutralizare* pentru identificarea poliovirusurilor este reprezentată de supernatantul culturilor celulare în care a apărut un efect citopatic 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 apoi când se folosesc pentru identificare amestecuri de căte 2 seruri, diluția inițială trebuie să fie de 4 ori mai mică decât cea finală recomandată.

Se prepară amestecuri de căte 2 seruri pentru identificarea unui tip de poliovirus – cel care nu intră în amestec – și un amestec din toate cele 3 seruri pentru decelarea în produs a unui enterovirus nepoliomielitic.

Pentru fiecare amestec din căte 2 sau 3 seruri se calculează volumul necesar a fi preparat, în funcție de numărul de probe de identificat, în zua respectivă.

Din fiecare amestec de seruri se repartizează în tuburi căte 0,3 ml peste care se adaugă un volum egal din diluția probei de virus de identificat, având grija să nu rămână virus pe peretei tubului. Se agită energetic conținutul imediat după efectuarea fiecărui amestec de neutralizare. Dupa fiecare probă de virus se prepară și un amestec martror (virus + diluent, în loc de ser).

Amestecurile se lasă 2 ore la 37°C și peste noapte la +4°C. A doua zi, din martrorul de virus și din tuburile cu amestec virus ser, se inoculează căte 2 tuburi cu cultură celulară monostrat (celule renale simiente 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 nm. Este format dintr-o nucleocapsidă cu ARN și un RFC este prezent în nucleocapsidă iar infectivitatea, capacitatea de hemaglutinare și hemoliza și de stratul extern. Există un singur tip antigenic.

**Virusul rujeolic** este inactivat prin căldură (o oră la 56°C), radiatiile U.V., formol, 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 dobândita după boala sau vaccinare durează practic totă viața.

**Diagnosticul de laborator.** Diagnosticul rujeolului se pune destul de usor dacă avem date epidemiologice (sezon rece, mediu epidemic) și o simptomologie clinică caracteristică (catar ocular și al căilor aeriene superioare, enanitem, erupție maculopapuloasă).

Izolare 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 hemagglutino inhibare, RFC, reacția de neutralizare, ELISA și imuno-fluorescenta.

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 boala este generală dar, după îmbolnăvire, imunitatea este puternică și durează toată viața.

**Profilaxia** bolii se bazează pe o *immunizare* activă, sistematică a întregii populații infantile. În acest scop se utilizează un vaccin rujeolic viu attenuat care se administrează într-o singură doză pe cale parenterală.

Pentru protecție, în cazuri speciale se pot utiliza și imunglobuline 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 reverstranscripția.

Tulburările răspunsului imun în infecția cu HIV derivă din distrugerea selectivă a limfocitelor T<sub>4</sub>, care joacă un rol principal în reglarea imunității. Structurile sale antigenice și/sau detectarea virusului sau a antigenelor virale.

**Diagnosticul etiologic** al SIDA necesită detectarea anticorpilor fata de virus sau în acest scop se utilizează o serie de teste de laborator care:

- detectează anticorpii anti-HIV și anticorpii neutralizați;
- permit izolare virusului.

În practică, **testul serologic ELISA** (Enzyme-Linked Immunoabsorbant Assay) este cel mai frecvent utilizat. El folosește ca antigen lizatul viral total și punte în evidență anticorpi specifici din serum 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 liniei celulare pe care a fost cultivat virusul. Fiind însă un test rapid și relativ ieftin, testul ELISA este în prezent foarte utilizat în controlul săngelui și al preparatelor de sânge, precum și pentru control 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, imunofluorescentă sau imunoprecipitare. Dintre acestea din urmă, cel mai utilizat este testul Western Blot. Acest test se bazează pe punerea în contact a serumului de cercetă cu antigenele 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 retrovirinilor, a căror denumire decurge din faptul că aceste virusuri ARN posedă o enzimă (reverstranscripția) 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, fiind însă un test rapid și relativ ieftin, 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, imunofluorescentă sau imunoprecipitare. Dintre acestea din urmă, cel mai utilizat este testul Western Blot. Acest test se bazează pe punerea în contact a serumului de cercetă cu antigenele HIV purificate, separate prin electroforeză, transferate pe hârtie de

nitroceluloză, și incubate. Anticorpii care se fixează pe polipeptidele virale separate prin electroforeză sunt puși în evidență printre nouă incubare cu anticorpi antigammaglobulină umană, conjugată 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 neconcluente. Sunt neconcluente rezultatele testelor de laborator atunci când s-au obținut rezultate pozitive în mod repetat cu un test ELISA, dar acestea sunt negative sau neconcluente prin testul Western Blot, imunofluorescentă, culturi sau detectare de antigen.

De asemenea, sunt neconcluente 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 accelerază 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 prelimină că numărul acestora va fi de 15-20 milioane, urmând ca în următorii zece ani să se înregistreze aproximativ 3 milioane de decese în rândul fermeilor și copiilor, dacă măsurile de prevenție și cele terapeutice nu vor înregistra salutri spectaculoase.

În țara noastră, la sfârșitul lunii decembrie 1992, erau înregistrate 2235 cazuri de SIDA, din care 1300 la sexul masculin. În grupa de vîrstă până la un an au fost înregistrate 471 de cazuri, respectiv 21,1%. S-a constatat că la adulții căleș de transmisie este predominant heteroseexuală, o statistică arătând că, în 50% din cazuri, îmbolnăvirea se datoră 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:

- 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.
- sexuală.**
  - homosexuală;
  - heterosexuală.
- de la mama infectată la său.**

Transmisarea 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.

Tinând cont că la ora actuală nu există o terapie antivirală eficace și nu dispunem de un vaccin specific anti-SIDA, atenția cadrelor sanitare se va îndrepta în mod special asupra măsurilor generale de prevenire și combatere a bolii. Astfel:

Vor fi încadrăte 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,
- persoanele cu comportament sexual modificat (homosexuali, prostitute),
- persoanele cu boli transmisibile sexual, aflate în evidență sectoarelor dermatovenerice;
- persoanele care vin din țări străine cu risc de infecție crescut.

Se vor efectua anchete epidemiologice sistematice.  
Se va face testarea clinic-epidemiologică și serologică a donatorilor de sânge, gravidelor și tinerilor înainte de căsătorie.  
De asemenea, vor fi inițiate acțiuni de educație sanitată în special în licee și alte instituții de tinerețe.

#### Măsuri de protecție a personalului de laborator

- Personalul care manipulează produse patologice și materiale cu potențial infecțios va purta în mod obligatoriu mănuși 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 dezinfecțiate.  
- Periodic, 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 energetică 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. NOTIUNI GENERALE DE PARAZITOLOGIE

– *Mutualismul* reprezintă o asociatie 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

### 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 că "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 numerosi 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 altrei ființe vegetale sau animale, deseori 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 associație biologică particulară între doi factori, în care unul oferă locuință și hrana și reprezintă organismul-gazdă, iar celălalt este cel care folosește organismul-gazdă pentru a trăi, și reprezintă paraziul.

– *gazda* este, deci, ființa pe seama căreia trăiește paraziul, iar *parazitul*, ființa care trăiește pe seama gazdei. Viețuitoarele astăzi parazițe nu au fost însă din totdeauna parazițe. 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 adâncit 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:

– *Saprofitismul* reprezintă primul pas spre viață parazitară. Saprofilele se împart în *saprofite propriu-zise* (bacterii, ciuperci și.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 folos (prisos de hrana, protecție, locuință) de pe urma celei de-a doua (gazda), care nu este cu nimic vătămată.

parazitului, care se hrănește și se dezvoltă pe seama sa. Acesta "atacă" lent, dar continuu, gazda, sfârșind deseori prin a o distrugă.

Pe lângă paraziți obișnuiți, care trăiesc pe seama unui organism-gazdă, există cazuri în care paraziți bine hrăniți și bogăți în substanțe nutritive de rezervă devin, la rândul lor, surse pentru obtinerea hranei pentru alti 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 parazițului asupra gazdei poate depăși puterea de apărare a gazdei, care se îmbolnăvește și poate mori;  
– acțiunea parazițului asupra gazdei este mai redusă în raport cu capacitatea de apărare a acesteia, care rămâne sănătoasă, rezistând agresiunii parazitare;  
– acțiunea parazițului asupra gazdei este slabă și, treptat, organismul-gazdă elimină parazițul.

### 2. CĂILE DE CIRCULAȚIE A PARAZITILOR ÎN NATURĂ. RÂSPÂNDIREA GEOGRAFICĂ A PARAZITILOR.

#### 2.1. CĂILE DE CIRCULAȚIE A PARAZITILOR 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 paraziții al căror ciclu evolutiv reclamă un stagiu în sol, sau extrem de complicata la paraziții care își desăvârșesc ciclul biologic în una-două gaze intermediiare.

Sistematizând căile de circulație a paraziților în natură, se pot deosebi:  
**Parazitozele transmisibile direct** (contagioase) la care ouăle, larvele, formele chisticice sau vegetative prezente în fecale sau secrețiile bolnavului sunt eliminate în stadiu infectat. Deci, la acestea, transmiterea se realizează direct de la o persoană la altă sau prin intermediul variuitorilor factori de mediu, care au simplul rol de ale vehicula.

**Parazitozele transmisibile indirecte:**  
– *prin sol și apă* se transmit parazitozele în care ouăle sau larvele parazitului, cu nimic vătămată.

neinfectante în momentul eliminării de către bolnav, ajung în stadiu infectant 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 paraziote. Ouăle sau larvele neinfectante în momentul eliminării de către bolnav ajung în stadiu infectant în carneua unor animale, care este apoi consumată de om.

Circulația paraziștilor în natură nu se limitează însă numai la om și animale domestiice. Pe lângă această circulație, care este cunoscută sub numele de *focar periodomestic* sau *simantrup*, mai există și circuite biologice ale paraziștilor cu mai multe gazde definitive și cu gaze intermedie reprezentate de animale săbatice (*focare naturele*).

## 2.2. RĂSPÂNDIREA GEOGRAFICĂ A PARAZITILOR

Circulația paraziștilor în natură depinde de **prezenta parazitului, de prezenta gazdelor intermedie și de prezenta condițiilor de mediu fizic extern**, care asigură realizarea legăturii între paraziți și gazdelor lor. Există, în felul acesta, paraziote de importanță mondială, care sunt răspândite pe aproape întreaga suprafață a globului unde se găsesc întrunite condiții de răspândire (*ascaridoza, hidatidoza, oxyuroza*), după cum există paraziote de importanță strict locală, în care existența în anumite teritorii a gazdelor intermedie sau a vectorilor limitează răspândirea parazitozelor ca, de exemplu, *borriocefaloza* în deltale unor fluviilor, *malaria* între  $60^{\circ}$  latitudine nordică și  $40^{\circ}$  latitudine sudică sau *anchilostomiază*, 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, obiceurile populației, grupele de vârstă și altele pot limita răspândirea unor paraziote. Astfel, absența *ascaridozei* în zonele polare este datorată imposibilității dezvoltării în sol a elementelor infectante, din cauza frigului.

Stabilirea artilor geografice de răspândire a paraziștelor 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. PROTOZOOLOGIE

### 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 îmbolnăvirile pe care acestea le produc, mijloacele de diagnosticare, preventie 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 organite speciale pentru locomoție – flageli sau cili. Prezența sau absența la unele protozoare a altor numeroase organite 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 îmbrăcă asă-numita *formă vegetativă*, care îndeplinește funcțiile principale vitale: asimilarea, dezasimilarea, înmulțirea. Când din diferite cauze exterioare această formă vegetativă ajunge în condiții de viață nefavorabile (uscare, 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 reiau forma de *viață vegetativă*.

Din protozoarele libere, în decursul timpului, unele s-au adaptat parțial sau total la una din mai multe gaze de animale, devinând protozoare parazite. 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 infestată cu forme chistice se poate îmbolnăvi omul sănătos.

Alte protozoare, care se răspândesc *indirect*, au nevoie de o gazdă intermedieră pentru a trece din organismul-gazdă infectat într-un alt organism sănătos. Acestea nu se mai închisesc, însă deosebi gazda intermedieră reprezintă o etapă obligatorie în ciclul evolutiv al protozoarului.

tubului digestiv și *Trichomonas vaginalis*, parazit al 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 cări denare, cripte amigdaleiene și aproape 20% din populație. Paraziții sunt mai răspândiți la copii și la persoane cu afecțiuni dentare. Transmiterea se realizează prin contact direcțional, picături de salivă, pahar etc.

**Trichomonas intestinalis** este un flagelat de formă asemănătoare cu primul, dar puțin mai mare ( $10 - 20 \mu$  lungime) (fig. 32, b). Paraziții sunt localizați la om în zona ileocecală, de unde invadă intestinul gros și subțire, producând enterocolita trichomonazică. Bolnavii au 3-4 scaune pe zi, cu caracter de putrefacție, insotite 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 copiii mici. Rezervorul de parazit în natură

este constituit de câine și pisică, ce se infectează de la om și care, la rândul lor, pot infecta omul, iar muștele au simplul rol de a vehicula paraziți.

Diagnosticul bolii se face evidențierând paraziții prin examenul microscopic al materiilor fecale proaspăt emise sau prin coproculturi, pe mediu Simici. Tratamentul se face cu Metronidazol.

**Trichomonas vaginalis** este cel mai patogen dintre cele trei specii care parazitează organismul uman. Paraziții sunt ovalari sau piriformi, lung de  $10-30 \mu$ , prezentând 3 până la 5 flageli liberi și o membrană ondulată care depășește extremitatea posterioară a corpului parazițului (fig. 32 c, d). Are un nucleu oval, așezat mai sus spre poziția anterioră, un chinetoplast, loc de inserție al flagelilor, un axostil și o coasă de întărire a corpului. Ca și celelalte două specii parazite ale organismului uman, nici *Trichomonas vaginalis* nu posedă sau, mai exact, nu își au descris încă forme cisticice, transmiterea realizându-se direct prin forme vegetative de la omui boinav la omui sănătos, prin raport sexual.

### Trichomonaza

Parazițul se localizează, de regulă, la femei în cavitatea vaginală, de unde poate invada secundar aparatul urinar. Considerată în zilele noastre ca o boală venerică, în prostata și de unde va fi eliminat odată cu lechidul prostatic, reinfectând femeia.

**Rolul patogen** al parazițului constă în iritația puternică a mucoasei vaginală, deoarece atacă celulele epiteliale vaginali pentru a utiliza glicogenul ce îl conțin. Leziunile produse sunt la început superficiale, apoi profunde, realizând ulcerări și zone echinoice mai frecvente în fundul de sac posterior al cavitații vaginale, dar care pot cuprinde uneori întreaga mucoasă vaginală, colul uterin, apoi vezica urinară. Femeia boală prezintă o secreție vaginală albă, spumoasă, desută de abundență, cu prurit și arsuri vaginale, iar în cazul invadării uretrei, arsuri și tulburări de mictiune.

În raport cu tulburările pe care le produce paraziții în aparatul urogenital femeii, infecția la bărbat este în cele mai multe cazuri fără manifestări clinice.

**Epidemiologie.** Omul este singurul transmisiator al bolii. Transmiterea se realizează direct pe cale venerică (prin contact sexual) și mai rar indirect prin intermediul obiectelor contaminate.

Incubația bolii este scurtă, de 3-7 zile, iar boala este răspândită pe întregi glob, cu o frecvență mai ridicată la grupa de vîrstă 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 atât pentru femeie, cât și pentru bărbat, sunt:

- *examenul direct* între lama și lamela a secreției emulsionate cu ser fizologic cald ( $37^{\circ}\text{C}$ ), efectuat imediat după recoltare, în care se evidențiază paraziții cu usurință, prin mișcările lor caracteristice;
- *examenul secreției* colorate după metoda May-Grunwald-Giemsa;

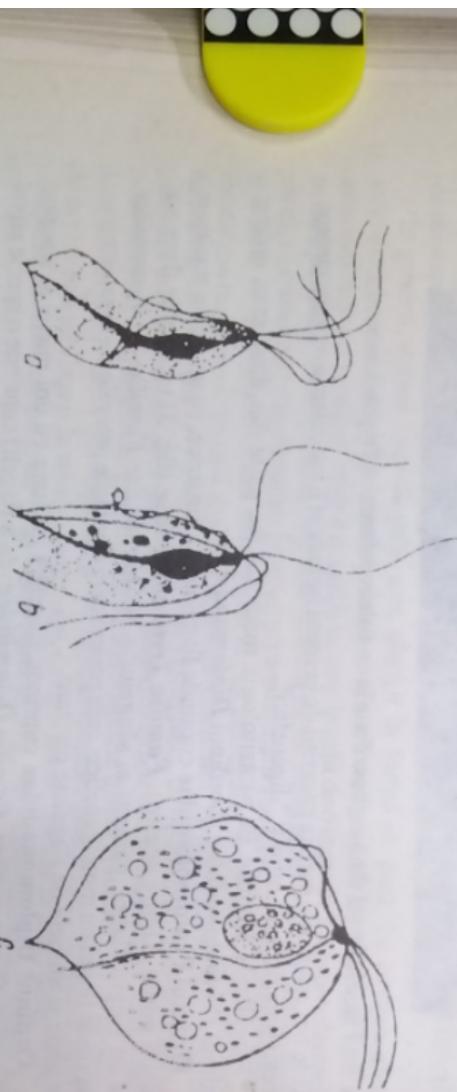


Fig. 32. *Trichomonas*.

a - *T. buccalis*; b - *T. intestinalis*; c și d - *T. vaginalis* (imaginile microscopice).

- *examenul prin cuturi pe medi artificiali* care permite, cu cea mai ridicată coeeficient de certitudine, precizarea diagnosticului.

**Tratamentul** bolii constă în administrarea concomitentă de medicamente, atât soțuii, cât și soției, sub control medical, compriat cu controale de laborator după ceea mai mare eficiență fac parte produsele de tip Metronidazol sau Tinidazoil.

**Profilaxia** bolii, pe lângă aspectele legate de transmiterea veneriană, mai trebuie să cuprindă o bună igienă personală.

### 3.2 FAMILIA OCTIMIDAI

**Familia Octimidae** cuprinde flagelate cu simetrie bilaterala a corpului: 2 nucii și 8 flageli.

Din genul *Giardia*, în paraziologie medicală ne interesează specia *Giardia intestinalis*, cunoscută și sub numele de *Lamblia intestinalis*.

Acest parazit, localizat în intestinul subțire al omului, își desăvârșește ciclul evolutiv în cele două forme cunoscute pentru protozoare – forma vegetativă și forma chistică.

**Forma vegetativă** (trofozoit) este piriformă, cu o lungime de 10-12  $\mu$  și o lățime

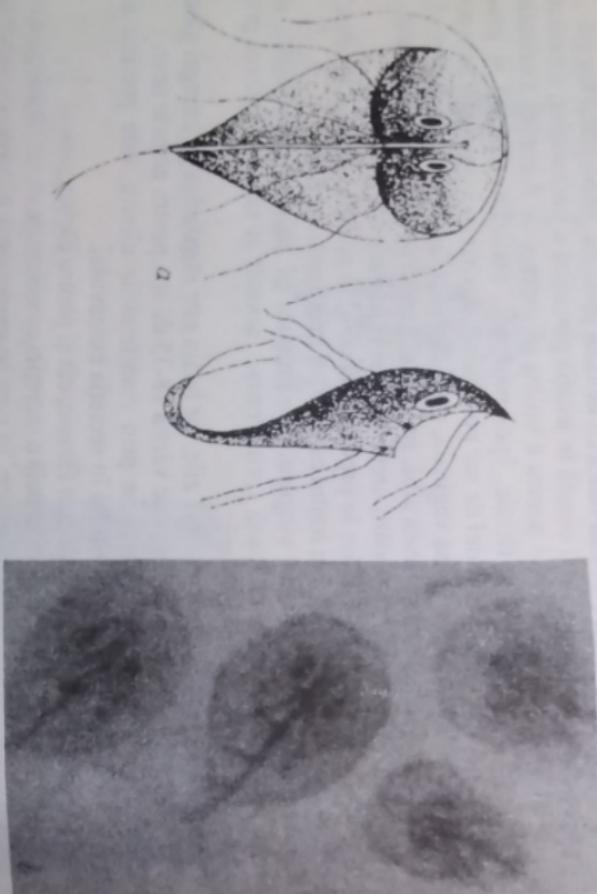


Fig. 33. *Lamblia intestinalis*:  
a - reprezentare schematică; b - imagine foto.

b

de 8-10  $\mu$ . Această formă vegetativă a parazitului prezintă 2 nuclei mari așezati în partea anterioară a corpului și 8 blefaroplasti dispuși în 4 perechi din care poartă același număr de flageli (fig. 33 a și b). Mobilitatea parazitului este asigurată prin mișcările neconvenite ale celor 4 perechi de flageli. Înmulțirea se realizează prin diviziune binară, longitudinală, atât în stadiul vegetativ, cât și după închisare, iar hrana se face prin osmoză pe întreaga suprafață a corpului parazitului.

**Formele chistice**, ovoidale, măsoară 10-13  $\mu$  în lungime și 7-8  $\mu$  în lățime, sunt învelite cu o membrană fină, dublă, prin transparență căreia se observă continutul: 4 nuclei și un mănușchi de flageli care formează o dungă oblică în interiorul chistului, element caracteristic pentru identificare la examenul microscopic.

### Giardioza (lambliază)

**Localizarea** obișnuită a parazitului este duodenul și jejunul în al căror lumen parazitul trăiește în stadiu vegetativ. În zona ileocecală, parazitul se închisează și în această formă este eliminat odătă cu fecalele purtătorului la exterior.

Formele chistice, spre deosebire de formele vegetative care se distrug repede în mediu înconjurător, sunt deosebit de rezistente, rămânând infectante, în medie, 60 de zile, iar dacă rămân constant în umedează supraviețuiesc mai multe luni. Ele sunt distruse în scurt timp la 60°C.

**Patogenie.** Odătă pătruns în tubul digestiv al omului parazitul se multiplică rapid, ajungând la proporții de 1 milion de paraziți pe  $\text{cm}^2$  de mucoasă intestinală. Impiedică buna funcționare și în special procesul obișnuit de resorbție a substantelor nutritive. Acești paraziți pătrund și în profunzimea peretelui intestinal, provocând importante tulburări, asociind infecției cu *Lamblia* și diverse infecții microbiene. Pe lângă intestinul subțire, paraziții mai invadăază deseori și căile biliare.

Boala pe care o produce localizarea acestui flagelat în tubul digestiv al omului se manifestă clinic, prin apariția unei diarei cu caracter cronic, însotită de dureri abdominale difuze, care alternează în timp cu perioade de constipație.

**Epidemiologie.** Omul este cel mai important transmîtător al bolii. Transmisia se realizează atât direct prin contact cu omul bolnav, cât și indirect prin intermediul apelor, al legumelor și fructelor infestate. Incubația 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 direkte, 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.

**Ciclul evolutiv.** Adultul se localizează la nivelul porțiunii terminale a intestinului subțire unde se și acouplează.

Femelele sunt vivipare. Ele pătrund în grosimea peretelui intestinal unde vor depune larvele, lungi de  $90\text{-}100 \mu$  și groase de  $6 \mu$ . 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 tendoanelor. În acești mușchi, larva pătrunde în interiorul fibrelor musculare pe care le lezează. Rezultă o formăție ovoidă, de  $500 \times 1250 \mu$ , cu axul mare în lungul fibrelor, cu peretele stratificat, care se numește **chist**.

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 adulții 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 paraziotei intestinale și se caracterizează printr-un catar intestinal provocat de iritațiile mecanice ale parazitilor sau de toxinele ce se eliberează din larvele închisate. Temperatura începe să crească, pentru ca la sfârșitul primei săptămâni să ajungă la  $40^\circ\text{C}$ . În această perioadă intervin dureri abdominale, grețuri, vârsăuri, diaree.

– Perioada a II-a, de răspândire a larvelor în organism, se caracterizează prin febră în platou, dureri reumatoide, edem facial și în special palpebral foarte accentuat.

Bolnavii acuză, datorită localizărilor musculare ale larvelor, jenă la inspirație,

masticatie, deglutitie. Din cauza acțiunii toxinelor parazitului este prezentă o stare de adinamic ce se accentuează progresiv.

– Perioada a III-a, de închistare a larvelor în mușchi, se caracterizează printre bolnavul rezistă până la 7-a săptămână de boală, perioadă la care îngrosarea peretelui chistic 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 citat 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 zoozonă. Rolul principal de rezervor de *Trichinella* în natură lău șobolanii care, devorându-se între ei, permanentizează acest rezervor. Cadavrele rozătoarelor parazitate, frecvent întâlnite în jangă crescătorilor de porci, sunt mâncate de aceștia. Ajunsă în intestinul porcului larvele se dezvoltă și urmează ciclul evolutiv cunoscut, pentru ca, în final, să se ajungă la larvele închisate în mușchii acestuia.

Omul se îmbolnăvește consumând carne de porc infectată cu *Trichinella*, carne animale la abatoare sau la domiciiliu și efectuat de organele sanită-veterinare, ca și prin carne nesupusă tratamentului termic corect, care să asigure distrugerea larvelor.

**Diagnosticul de laborator.** Confirmarea cazurilor se face prin teste cutanate, prin examen serologic (reacția de precipitare circumlarvară), imunofluorescența și prin testul ELISA cu antigene specifice.

**Tratament.** Până astăzi nu există un tratament specific în această parazitoză. În fază intestinală se utilizează Piperazina și, recent, Mebendazolul sau Fluobendazolul. În perioada de disemnare se folosesc cu bune rezultate tratamentul cu corticosteroizi sub protecție de antibiotice, vitamino- și calciterapie cu Thia bendazol, ca medicament specific.

**Profilaxie.** În primul rând se vor lua măsurile necesare care să ducă la prevenirea infecțării porcilor. În acest sens se va duce o luptă continuă contra șobolanilor din preajma cirescătorilor de porci, prin deraijări 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 sanită-veterinare prin examen trichinoscopic. Carnea consumată va fi bine fiartă.

### Trichocephalus dispar

*Trichocephalus dispar* sau *Trichuris trichiura* este un nematod de mărime medie, cu extremitatea anterioară subțire și cu cea posteroară mai groasă.

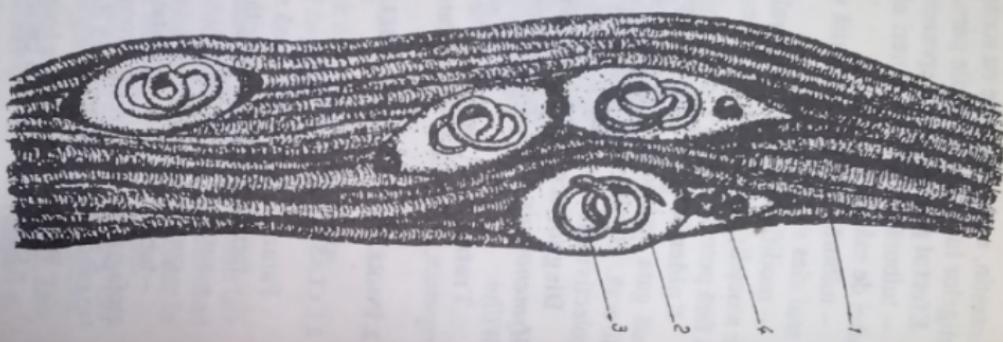
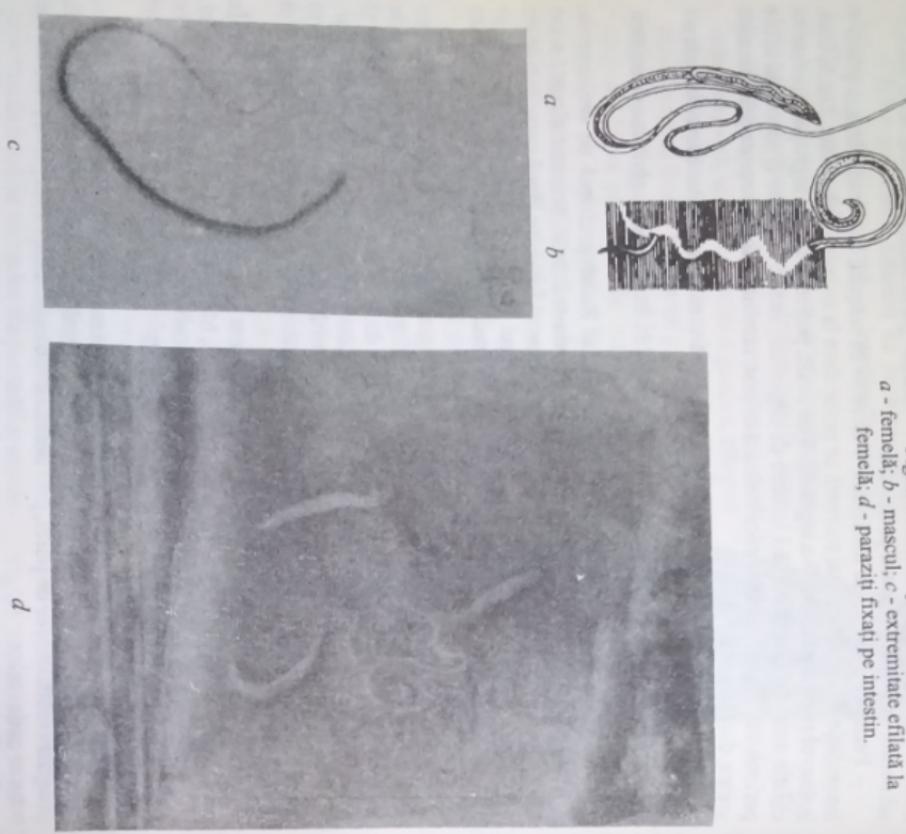


Fig. 51. Mușchi cu larve de *Trichinella spiralis*:  
1 - fibră musculară; 2 - chist;  
3 - larva spiralată.

Fig. 52. *Trichocephalus dispar*:  
a - femelă; b - mascul; c - extremitatea ciliată la  
femelă; d - paraziți fixați pe intestin.



*Trichocephalus* se infișează cu partea anterioară în grosimea peretei intestinal, între vilozitățile acestuia, pe care-l "insălează" (fig. 52, d). Se hrănește cu sânge din vasele de la acest nivel, însă prin reîntoarcerea extremității bucale în lumenul intestinal se poate hrăni și cu produsele de digestie ale gazdei.

**Cicul evolutiv.** În regiunea cecală, locul de elecție pe care-l parazitează, adulții se acupletează.

Femele depun în lumenul intestinal, unul câte unul, ouă care, odată cu materialele fecale, ajung în mediul exterior. Ouăle au o formă asemănătoare unei lânci, datorită celor două proeminențe de la cei doi poli (fig. 53, 2). Sunt mari de 1 - înveliș extern; 2 - dop 50x20  $\mu$ , au un înveliș neted și culoarea în general brună 1, albuminos; 3 - celula-oou în mediul exterior, după o perioadă de timp, condiționată de umiditate și temperatură, ouăle embrionează. Ouăle cu resturi viteline, introduse în tubul intestinal pe cale bucală, eliberează larvele. Aceste larve se introduc în peretele intestinal pentru o perioadă de adaptare care durează trei zile. După adaptare larvele revin în intestin, se îndreaptă spre regiunea cecală, unde se maturizează și reină ciclul.

**Rolul patogen.** Este unul din paraziții frecvență intâlniți la noi.

Boala pe care o provoacă se numește *trichocefaloză*. Simptomatologia este în funcție de intensitatea paraziților. Poate trece neobservată, fiind uneori asymptomatică, sau poate prezenta tulburări gastrointestinale, sanguine și nervoase.

**Epidemiologie.** Rezervorul *trichocefalozei* umane este omul. Mediul exterior, prin condițiile de umiditate și temperatură, favorizează embrionarea ouălor. Limitele de temperatură între care se poate produce embrionarea sunt de la 15 până la 37°C.

Ouăle ajung să fie răspândite pe suprafețe întinse, prin apele de irigație, când acestea conțin și ape menajere provenite din conducta de canalizare a orașelor, sau prin întrebunțarea reziduurilor fecaloide la îngrășatul terenurilor de cultură. De pe sol, prin intermediul zarzavaturilor, al fructelor, mâinilor murdare etc., ouăle parazițului pot ajunge în tubul intestinal al omului (transmisie indirectă mediată prin sol). Boala este răspândită pe o mare parte a globului, fiind mult mai frecventă în zone tropicale, subtropicale și, uneori, în unele zone cu climă temperată. Incidența este mai ridicată la copii.

**Tratament.** Se administrează Mebendazol (Vermox).

**Profilaxie.** *Trichocephalus* este un geohelmin. Transmiterea directă a bolii nu este posibilă, deoarece ouăle eliminate nu sunt infectante decât după embrionare, care are loc pe sol.

Se va pune un deosebit accent pe educația sănătății, în special acolo unde se constată deficiențe pe linia deprinderilor igienice. Mâinile vor fi spălate cât mai des și, mai

Masculul măsoară 3-4 cm lungime. Posterior, este recurbat în formă de cără. Raportul dintre partea anterioară și cea posteroară este de 3/2. Femela, de 4-5 cm lungime, are același aspect ca al masculului, însă cu extremitatea posterioră dreaptă și terminată în unghi obtuz. Raportul dintre cele două părți este de 2/1 (fig. 52, a, b, c).

Orificiul bucal situat la partea anterioară este mic și înconjurat de trei buze subțiri. Esofagul este de tip strongiloid.

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 fierătă.

**Diagnosticul de laborator.** Se va face prin punerea în evidență a ouălor în materiale fecale la examenul direct, sau utilizând metode de concentrare.

## 2.1.2. Familia Ascarididae

### *Ascaris lumbricoides*

Ascaridul este un nematod de culoare albă-gălbuiu, 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 proeminate și dințate.

Extremitatea posterioară a parazitului este dreaptă la femelă și recurbată în formă de cără la mascul.

Are un tub digestiv complet, reprezentat de un esofag de tip strongiloid, care se deschide într-un intestin ce se desfășoară 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 căriei (fig. 54).

**Ciclu evolutiv.** Femela depune zilnic 200 000 de ouă ovale, galbene-brune, de 60-75x40-60  $\mu$ , cu un înveliș dublu, unul extern de natură albuminoasă, mai gros, cu aspect mameilonat, caracteristic, și unul chitinos.

Aceste ouă nu sunt embrionate în momentul eliminării (fig. 55, a). În mediu 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 embrionat ia naștere o larvă cu aspect vermiciform, de 250  $\mu$ , în interiorul oului devine infectant mobilă. Larva năpărilește în interiorul oului, și din acest moment ouă devin infectante pentru om.

Ingerat de om odată cu alimentele, în general cu fructe sau zarzavuri nespălate sau cu apă, ajunge în intestinul acestuia, unde sub influența sucurilor intestinale, și pierde învelișurile și se pune astfel în libertate larva (fig. 56, a).

Larva, nefind adaptată condițiilor pe care îl oferă cavitatea intestinală, străbate peretele intestinal și, pe calea venei porte, ajunge la ficat, unde, rămânând timp de aproximativ 4 zile, și crește până la 400  $\mu$  (fig. 56, b).

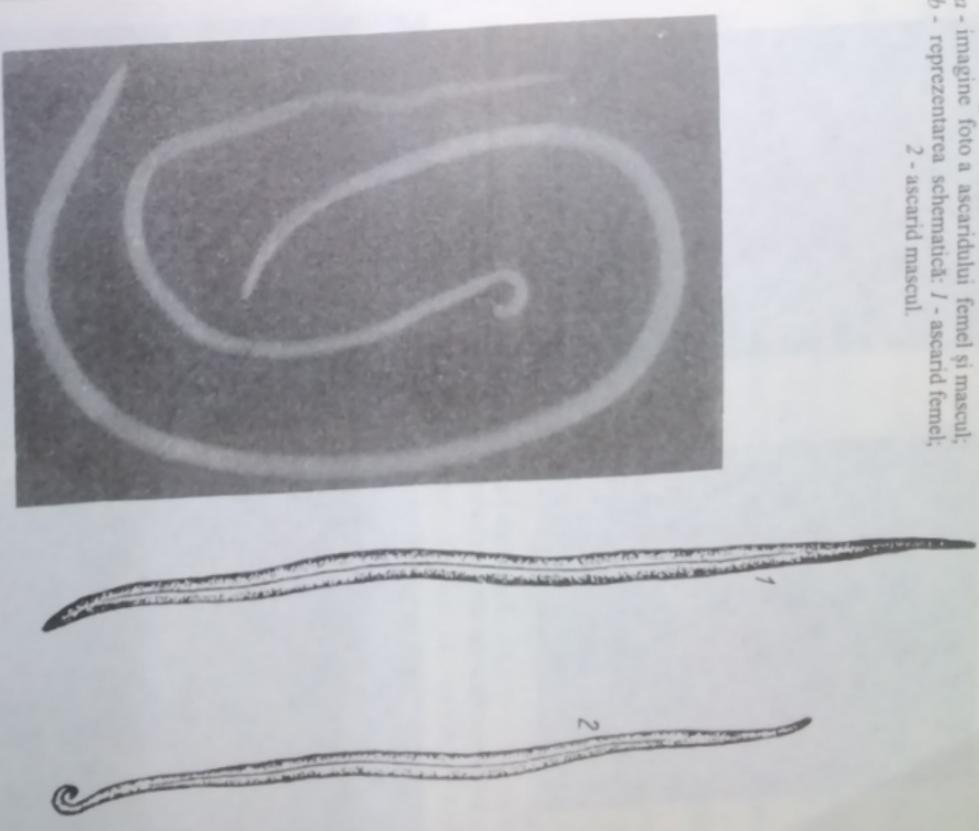
Prin venete suprahepatice larva trece în vena cavă și apoi prin mica circulație ajunge la nivelul capilarilor alveolelor pulmonare unde face un alt popas de 5-7 zile.

Aici continuă să crească, ajungând la 1 000  $\mu$ .

Larva perforă peretele alveolei și ajunge în lumenul ei. Cu ajutorul ciliilor vibratili ai celulelor epiteliale ce tapează arborele respirator, larvele ajung în cavitatea bucală. Unele din ele sunt eliminate cu sputa, iar alele, înghiuite, 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 **ascarioză**, se face cunoscută printr-o serie de tulburări clinice caracteristice cele două faze: larvară și adultă.

În prima fază, când are loc trecerea larvelor prin plămâni, se declanșează o pneumonie "ascaridană" a cărei gravitate este în funcție de numărul paraziilor.

În fază a două, intestinală, sunt caracteristice durerile abdominale, însotite de greață, sialoree, balonări, modificări de apetit, tulburări de tranzit, cefalee, ametele, pruri nazal și anal, anemie.

**Epidemiologie.** Omul purtător de ascarizi este singurul rezervor al ascardozei urmane.

Prin ouăle eliminate cu materiile fecale, parazitoza este răspândită în mediul înconjurător, defecarea pe sol reprezentând cel mai important moment al poluării lui.

Contagiuarea 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 întrebuințat în țara noastră, alături de Levamisol (Decaris) sau Mebendazol (Vermox).

**Profilaxie.** Având în vedere rezistența ouălor de ascarizi în mediul extern și numărul mare al acestora în materiile fecale, se impune ca primă măsură de profilaxie folosirea de closete igienice și inactivarea dejectelor bolnavului cu apă fierbinte. Fecalele vor fi folosite la îngăștarea terenurilor după compostare cu gunoi menajer.

Fecalele vor fi folosite la îngăștarea terenurilor după compostare cu gunoi menajer. Se va duce o intensă activitate de educație sanitată pentru a arăta modul de infecție, necesitatea spălării mâinilor murdare, necesitatea spălării cu apă curentă și apoi cloicotită, înainte de consum, a fructelor și zarzavaturilor care se consumă crude și în special a celor care au fost cultivate pe terenuri irigate sau îngăștate 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 curbată în formă de cără (fig. 57, b, 2).

**Cicul evolutiv.** Oxiurul trăiește ca adult în cecum. El este singurul vierme cilindric la care femela nu depune ouăle pe măsură ce acestea se formează, cile rețin pe toate în uter, care se dilată considerabil. O femelă conține în jur de 10 000 de ouă. Ouăle au formă ovală, asymmetrică, cu o față plană și una convexă, având dimensiuni cuprinse între 50-55x20-25  $\mu$ . Culoarea este albă, ușor cenusie, transparentă.

Ouăle embrioanează în uter. Embrioul, cu o porțiune ovoidă mare și o codiță recurbată, seamănă cu un mormoloc de broască și, de aceea, se numește *embrión giriñiform*.

Fig. 56. Larve de *Ascaris lumbricoides*:

a - eclozate la nivelul intestinului; b - în ficat de om.

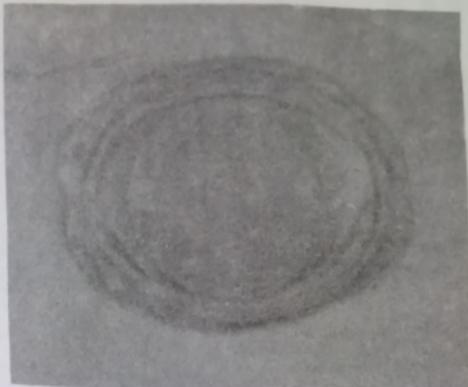
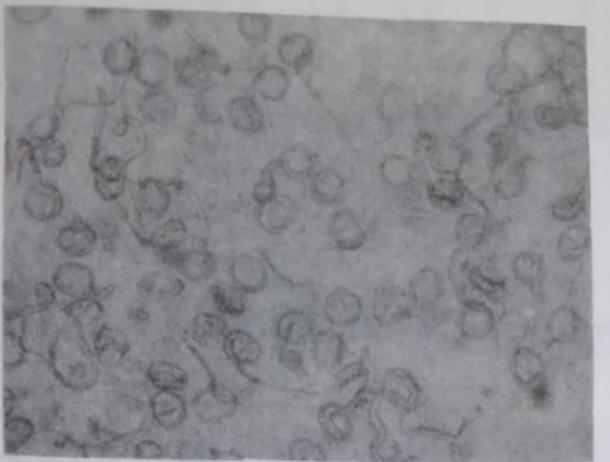


Fig. 55. Ouă de *Ascaris lumbricoides*:

a - ou fecundat, dar neembrionat; b - ou fecundat embrionat - infectant.



În momentul în care toate ouăle au fost embrionate, femela se îndreaptă către orificiul anal și depune în jurul orificiului și în pliurile 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 verminiformă, lungă de 140  $\mu$ , care se întoade în interiorul ouului. 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 subijire, unde adulții se acouplează și trec apoi în colon, reluând astfel ciclul.

**Rolul patogen.** Pe lângă durerile abdominale și tulburările de tranzit caracteristice enterocolitei provocate de iritația locală, înfălărim grețuri și toteauna pruritul anal chimitor, provocat de mobilizarea paraziților în această regiune. Ca o consecință a acestui prurit sunt prezente tulburări nervoase, bolnavii neputându-se odihni.

Trebuite 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 spălă pe mâini înainte de amânca (transmisiune 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 parazitul de pe suprafața bolului fecal și atunci identificarea este făcută macro- și în special microscopic.

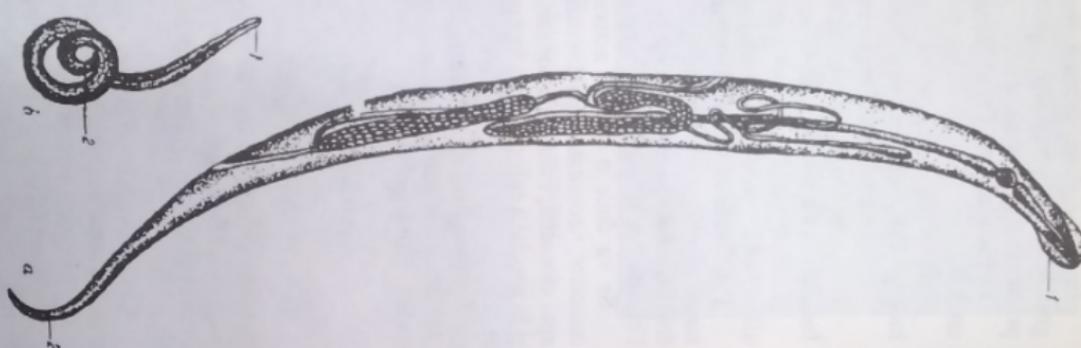


Fig. 57. *Oxiur*.

a - femelă; b - mascul; 1 - extremitatea anterioară; 2 - extremitatea posterioară.

Examenele coprologice, 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 cărui capăt se învelește fie într-o fojă de celofan, fie cu o peliculă de colodiu.

În laborator fojia sau coloidul 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.** Oxuroza se poate trata cu derivatii de piperazină (Nematocton), cu pamot de pirviniu (Vermigal), cu pamot de pyrantel (Combatrin) sau cu Mebendazol (Vermox), asociate cu tratament local al regiunii perianale.

**Profilaxie.** Lupta va fi înconjurată de succes dacă, înăuntrul 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 formă în ușoară ovală, chitinoasă, capsula bucală, cu care parazițul se prinde de mucoasa intestinală.

Măsoară până la 1 cm. Prezintă la partea posterioară punga copulatoare (fig. 58, b, 2).

Femeia, mai lungă, având până la 3 cm, se termină posterior cu un vârf ascuțit (fig. 58, a, 2).

**Ciclul 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 femeilă poate depune în 24 h până la 10 000 de ouă. Acestea sunt eliminate în intestin, pe rând, și de aici în mediul extem odată cu materialele fecale. Au o formă ovalară, un înveliș simplu și subțire, culoare albă-transparentă și măsoară 60x40  $\mu$ .

În interiorul ouului se distinge un început de segmentare sub formă a 2-8 blastomere (fig. 58, c, 2).

În intestinul gazdei, din cauza unor condiții nefavorabile reprezentate de temperatură prea ridicata, lipsa de oxigen și existența unor gaze, segmentarea nu poate continua.

Numai mediul extern poate oferi ouului condițiile necesare dezvoltării: temperatură

## Cap.XXI. MICOLOGIE

### 1. NOTIUNI 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 produc 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 miceliene* sau *hife*, mai mult sau mai puțin lungi, adesea anastomozate între ele, care nu sunt altceva decât celule cu un conținut protoplastic 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, artosporul și blastosporul reprezintă tipuri de spori realizăți 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 trătesc pe substanțe vii pe seama cărora se hrănesc (parazite).

Deseori, ele produc fermentație pătrundînd în mediul în care se dezvoltă, transformînd substanțele din mediu în elemente nutritive pe care le vor absorbi în protoplasma lor. Întrucât, aşa cum s-a arătat, ciupercile sunt lipsite de clorofilă, ele nu au nevoie de

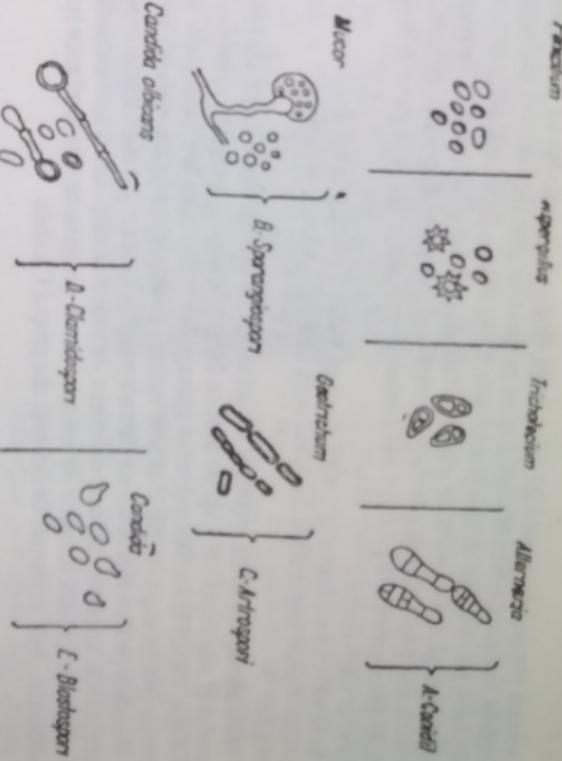


Fig. 73. Diferite tipuri de spori.

lumină pentru a se dezvoltă. 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 orenlui. Astfel, unele ciuperci nepatogene produc în mediul 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 gaze, ciupercile își manifestă acunea lor vătămoare în felurite modalități. Astfel, de exemplu, o ciupercă din *genul Aspergillus* pătrunsa în căile respiratorii

va acoperi mucoasele bronhiilor cu o rețea fină – miceliul. Se va bloca, astfel, funcțional suprafața destinață schimburilor gazoase, iar prin dezvoltarea sa exagerată parazitul va putea astupă chiar și bronhiile. La această *acțiune mecanică* se adaugă *acțiunea toxică*, reprezentată de iritația și inflamația țesuturilor produse de toxinele pe care le eliberează ciuperca în timpul creșterii și o *acțiune necrotoică*, reprezentată de distrugerea țesuturilor prin acțiunea fermentelor pe care parazitul îi pune în libertate la locul de dezvoltare.

În raport cu localizarea în corpul omului, bolile pe care le produc 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 atribue și denumirea de *dermatomicoze*.

**Micozele profunde** sunt acele 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. TRICOFTIA

*Tricosifia* este o boală parazitară produsă de ciuperci parazite din familia *tricositonilor* (*Trichophyton violaceum*, *Trichophyton crateriformis*, *Trichophyton gypseum* și.a.). Acestea se localizează fie pe pielea capului, dând lezuni uscate numite *tondanta tricositică*, fie în barba adulților, provocând lezuni izolate de folicula supurantă, numite *sicozis tricositic*, *foliculă confluentă* sau *kerionul bărbii*.

Pe restul pielii corpului tricositonii realizează lezuni cu caracter eritemoscuamos, cunoscute sub numele de *herpesul circinat*, iar la unghii apar lezuni cunoscute sub numele de *onicomicoze tricositice*.

Dintre toate formele, tricosifia uscată – *tondanta tricositică* – este afectiunea cea mai frecventă și cea mai contagioasă. Apare în timpul copilariei, numai până la vîrstă 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 (câine, 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 tricositonii au o rezistență mare la condițiile de mediu înconjurător, rezistând ani de zile în scuame, peri sau crote, care apoi pot infecta omul sănătos. Din această cauză infecția, pe lângă *transmiterea directă*, se mai poate realiza și *indirect*, prin diverse obiecte contaminate (căciuli, șepci, palării, bascuri, piepteni, instrumente de frizerie, lenjerie de corp, de pat etc.).



Fig. 74. Tricosifie

cm și numai rareori mai mare.

Diagnosticul bolii se face clinic, după simptomatologia arătată și cu ajutorul *laboratorului*, prin examenul periferic sau al scuameelor recoltate din lezuni. Pentru acest din urmă diagnostic, peri și scuamele, recoltate din placardul lezional, cu ajutorul unei spatule sterile, sunt plasate într-o soluție de potasă caustică 40% sau lactofenol și, prin examen la microscop, se evidențiază prezența parazitului.

Specia de parazit se determină prin culturi.

**Tratamentul** difera în raport cu localizarea.

– În localizările pe pielea capului, tratamentul constă în roentgenoterapie, urmată de badionări cu alcool iodat și salicilat de sodiu până la creșterea părului. Se mai pot

utiliza griseofulvina, griseofilvina M și clotrimazolul.

– Localizările pe pielea glabă sunt tratate cu badionări cu alcool iodat și salicilat de sodiu sau cu coloranți de tipul violetului de geniană.

**Profilaxia și combaterea** bolii se bazează pe depistarea și tratamentul imediat al formelor incipiente de boala, controlul copiilor la primirea în colectivitate și controlul utilizator periodic. Rufăria de pat și corp, hainele, palăriile, căciulile, obiectele de toaletă ale bolnavilor vor fi dezinfecțiate 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 tricosifia uscată de tricosifia inflamatoare.

– *Tricosifia uscată* În această boală, suprafața pielii este presărată cu lezuni ovale sau rotunde, de 0,5-4 cm diametru,

în număr variabil, izolate sau confluenți, acoperite cu scuame uscate sau grase.

Perii sunt friabili, majoritatea rupti la 1-2 mm de la emergența lor, iar alii îndoiti.

Pe placardul lezional se pot observa și rare fire de păr intacte (fig. 74).

– *Tricosifia inflamatoare*. 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, usor proeminent, presărat cu pustule

foliculare, cu marginile bine delimitate și oarecum în pantă, cu un diametru de 1-5 cm și numai rareori mai mare.

cm și numai rareori mai mare.

## 6. CANDIDOZA ȘI ACTINOMICOZA

În afara de micozele cutanate superficiale se mai întâlnesc la noi în țară și unele micoze profunde, cu sediu în derm și hipoderm, sau alte micoze ale mucoaselor. Acestea, spre deosebire de micozele superficiale, constituie un grup de afectiuni cu un prognostic mai grav. Dintre aceste micoze, mai frecvent întâlnite sunt *candidoza* și *actinomicoza*.

### 6.1. CANDIDOZA

Aceasta este o boală parazitară produsă prin localizarea unei ciuperci, *Candida albicans*, mai frecvent pe mucoasa bucală sau pe alte mucoase, realizând infecția cunoscută sub numele de "mărgăritarel".

**Parazitul** se prezintă sub formă unui înveliș membranos, alb sau cenușiu, care acoperă treptat mucoasa gurii, a faringelui, a esofagului. Această fașă membrană, groasă de 1-2 mm, nu aderă în profunzimea stratului mucoasei de care se dețează cu ușurință.

La examenul microscopic, această fașă membrană apare formată din filamente cilindrice, simple sau ramificate, de  $3-5 \mu$  lățime și  $50-600 \mu$  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  $5-7 \mu$  diametru, foarte refringente, care sunt clamidosporii caracteristici genului *Candida*.

**Epidemiologie.** Transmiterea bolii se face direct de la omul bolnav la omul sănătos, prin intermediul veseliei, 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 antibioterie intensă, atrensie.

**Aspectul clinic** este reprezentat de o stomată 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 *mărgăritarel* 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 plămânii.

**Diagnosticul** se face în laborator, evidențiind paraziul din falsele mucoase sau zone perlate, prin examen microscopic direct sau prin culturi pe medii specifice.

**Tratamentul bolii** se face prin spălături cu substanțe alcaline, ținând seama că ciupercă se dezvoltă în mediu acid, badionări cu glicerină boraxată, antifungice de tip Micostatin, Nipafungin, Stamycin 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.

### 6.2. ACTINOMICOZA

*Actinomicoza* este o boală parazitară dată de localizarea în pielea regiunii cervicofaciale, a mâinii, a piciorului, a unei ciuperci din genul *Actinomyces*.

**Parazitul izolat** din leziuni se prezintă sub formă unor mici granulații de aspect și culoare variabilă, galbenă-albă, formate central dintr-un miceliu fin și des ce se întretăiește în toate direcțiile. La periferie prezintă o coronă de elemente dilatate, așezate radial, care nu sunt altceva decât o hipertrofie a hifelor miceliene.

Ciuperca trăiește saprofită în pământ, în apă, dar mai ales pe vegetale: grădinițe de 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 nodozitați cu sediu în hipoderm, de mărime variabilă (gămălie 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 suprafață vegetantă. Starea generală a bolnavului nu este alterată decât în forme avansate de boală.

— *Piciorul și mâna de Madura* (micetom – fig. 79) reprezintă o afecțiune rar întâlnită în țara noastră, fiind mai frecventă în țările calde. Este caracterizată prin



Fig. 78. Actinomicoza cervicală.



Fig. 79. Picior cu micetom.

apariția unor nodozitați multiple, care se extind în placarde de aspect tumoral, ulceroase și dureroase la presiune.

#### Epidemiologie. Transmiterea la om se face prin:

- pătrunderea directă în piele a parazitului la nivelul unei mici soluții de continuitate (zărișuri), mai ales la picioarele persoanelor care umblă desculțe;
- prin infectarea mucoasei bucale faringiene, în urma mestecării grăunțelor de cereale parazitate;
- prin introducerea parazitului în tubul digestiv odată cu alimentele infectate, de unde, pornind prin mucoasa intestinală lezată, va determina pe cale sanguină metastaze viscerale, osoase sau cutanate.

**Diagnosticul** este precizat în laborator, evidențierând prezența parazitului în produsele recoltate din zonele ulcerate sau prin biopsia nodulilor.  
**Tratamentul** se face: **general**, prin administrare de iodură de potasiu, preparate arsenobenzene, vaccin antiactinomicotic, antifungice de tip Amphotericin, 5-Fluorocitozin sau Clotrimazol și **local**, prin electroterapie.  
**Prevenirea bolii** constă în evitarea infecției din sol, în special pentru agricultori, evitarea consumării de alimente – fructe insuficient spălate, igienă personală și diagnosticul precoce al elementelor nodulare ale pielii.

## LUCRĂRI PRACTICE

### Examenul parazitologic al materiilor fecale

În diagnosticul celor mai multe parazitoze, analiza materiilor fecale constituie examenul de laborator hotărâtor.

Recoltarea probelor fecale trebuie însă să se facă corect și cu respectarea condițiilor speciale, reclamate de parazitul a cărui prezență este bănuita de medic, întrucât rezultatul analizei depinde în foarte mare măsură de acest moment.  
Paraziții studiați de noi și care pot fi identificați în materiile fecale sunt:

Protozoare:	Entamoeba histolytica	Plathelminți: Fasciola hepatica
	Giardia intestinalis	Taenia saginata
	Trichomonas intestinalis	Taenia solium
	Balantidium coli	Hymenolepis nana
		Diphyllobothrium latum

Nemathelminți: Trichuris trichiura  
Ascaris lumbricoides

Enterobius vermicularis  
Strongyloides stercoralis  
Ankylostoma duodenale

Atunci când se pune problema identificării unor paraziți întregi, cum este cazul ascaridului sau al fragmentelor de paraziți (cazul tenilor), probele vor fi aduse în laborator în vase de sticlă, de dorit borcane largi, conținând apă slab sărată, soluție de formalină sau chiar apă simplă.

Materiile fecale vor fi recoltate în cutii de sticlă, de plastic sau bachelită și în nici un caz (se mai obișnuiește încă) în cutii de carton sau de chibrituri în care materialul, ce poate fi infectios sau infectat, difuzează în exterior ori se usuca și nu mai poate fi examinat.

Proba va fi recoltată din diferite locuri ale scaunului, care nu trebuie să conțină urme de urină.

Pentru cercetarea arnibelor, de multe ori este nevoie ca proba de examinat să fie adusă în laborator în cel mult 4 ore de la recoltare.

Înainte de a trece la prezentarea metodei de lucru propriu-zise, trebuie avut în vedere faptul că totă sticlăria care se întrebunează: cristaloare, tuburi de centrifugă, perle, flacoane, baghete etc., trebuie păstrată în permanență în amestec sulfocromic. Altfel ouăle, care sunt foarte aderente, pot rămâne pe această sticlărie, de la o analiză la alta, ducând astfel la rezultate eronate.

În momentul întrebunțării, sticlăria va fi bine spălată cu apă curentă, 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, ajugându-ne de o baghetă.

În felul acesta se pot pune în evidență, în cazul paraziților mari: paraziți întregi sau

fragmente, mucoziți, struri sanguine etc.

Fecalele se diluează apoi cu ser fiziolitic, se omogenizează, se decantează supernatantul de câteva ori și apoi se examinează sedimentul în care putem identifica paraziți 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:

– Examensul direct între lamă și lameletă 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 mucosanguinovente sau diareice.

– Examensul după diluare cu ser fiziolitic. Prin această metodă izolăm mai mult elementele și facem preparatul mai transparent, și deci mai favorabil examinării.

– Examensul după diluare cu Lügol forte (1 g iod metaloid și 2 g de iodură de potasiu în 100 ml apă distilată) este folosit mai ales dacă este vorba de chisturi de protozoare. Solutia iodoiodurată face mai refringente, mai ușor vizibile, unele organite ale parazitului, care apar cu această metodă foarte clare, permijându-se diagnosticul diferențial între chistul de *Entamoeba coli* și *E. disenteriae* etc.

*Metodele de concentrare* se întrebuintează în special când numărul elementelor parazitate 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 fiziolitic și se introduce într-o stică cu dop șlefuit cu capacitatea de 50 ml;

– se introduc câteva perle de sticla 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, fosfațiilor, mucinei, diverselor săpunuri etc.;

– se adaugă o cantitate de 10 ml eter sulfuric și se agită din nou 4-5 min, având grija să astupăm dopul flacoului cu o cărpă 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 centrifigă, care, după ce se echilibrează bine, sunt centrifugate 10 min la 500 ro/min.

Prin centrifugare, amestecul se separă în patru straturi. În ultimul, cel de la fund, se găsesc eventualele elemente parazitate. Numai acestea interesează. Se ajunge la acest strat după ce, cu grija, cu ajutorul unei pipete Pasteur, său desprins de pe peretii 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 lamele grele ale helmințiilor 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 magnezu și se omogenizează bine cu baghetă;

– se continuă cu adăugarea soluției, agitându-se permanent până ce capacul se umple aproape până sus;

– deasupra lichidului se aplică cu grijă o lameletă, după care se lasă în repaus 30 min;

– după aceasta, cu o pensă, se ridică lameletă cu atenție, brusc, și se punte pe o lamă, la fund, ca cele operculate.

Metoda pune în evidență în special ouăle usoare. Nu este o metodă ideală, însă, 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. Piesa devine complet transparentă.

În cazul oxyurozei este bine să se trimită spre analiză produsul prelevat din pliurile 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 racelaj al mucoaselor, spută, aspirat bronșic, urină, fecale, puroi sau sânge, care apoi sunt examineate 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 racând mucoasa cu o spatuă sau valvă vaginală sterilă, sau cu o ansă sterilă. Produsul astfel recoltat se introduce în eprubete sterile cu ser fiziolitic steril, pentru a evita uscarea lui.

*Sputa* se recoltează timp de trei zile consecutiv, de trei ori pe zi, în pahare sterile, după o gargara prealabilă cu ser fiziolitic steril. Deschiderea și inchiderea paharelor se face cu rapiditate, pentru a preveni infecțarea cu funghi din mediul înconjurător.

*Aspiratele bronșice* sunt cele mai concluziente 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 însământărilor pe mediu de cultură adecvate.

*Lichidele pleurale* se recoltează cu instrumentar steril în pahare sau eprubete sterile, din care se fac apoi însământări și examene directe.

*Urina* este recoltată de la femei cu sonda "Nélaton" sterilă, iar de la bărbăți fără grele ale helmințiilor și pentru cele operculate.

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 controllate în prealabil pentru a observa striurile de mucozități, care vor fi recolțate și examineate separat. În cazul în care nu există elemente patologice (mucozități, striuri mucosanguinolente etc.) se ia o porțiune mică de fecale, cu ajutorul unei baghetă de sticlu plină - sterilă, și se introduce într-o eprubetă în care în prealabil s-a dizolvat penicilină 5 000 U/ml în ser fiziological.

**Puroul** 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.

**Sângelile** pentru hemacultură este recoltat prin punctie venoasă și însământat pe mediul Sabouraud lichid în proporție de 1/50. Se incubază la 37°C și apoi se efectuează mai multe treceri pe medi Sabouraud solid în care s-au incorporat antibiotice (penicilină, streptomycină sau cloramfenicol).

**Pielea capului, regiunea părăsă a feței sau pielea glabră** pot fi suspectate de afecțiuni micotice. Pentru precizarea diagnosticului, în zonele afectate se recoltează peri suspecți de a fi parazitați, 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 aşezați între două lame de sticlă șlefuită, până la examinare (examinare directă sau însămânțari).

**Scuamele** se vor recolta de la periferia leziunilor prin răclare 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.

**Unghiiile** 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 ungheii, având sub el un depozit sfărâmicios. Acest depozit este recoltat cu ajutorul unei chiurete sau al unei lanțete, răclând din profunzime, deoarece straturile superficiale sunt, de regulă, suprainfectate cu germeni saprofili. În cazul în care examenele sunt negative, se mai poate recomanda și tăierea mai multor porțiuni mici din lama unghială, 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 epilat, 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 clopot 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, **cultivare a ciupercilor pe mediu de cultură**. Aceste două categorii de metode de diagnostic sunt completeate în unele cazuri cu animalele receptive.

**Examenul direct al produsului patologic** reprezintă procedeul care ne dă, în majoritatea cazurilor, un diagnostic de orientare imediată. El constă în examinarea între lama și lamela a produsului patologic disociat în prealabil într-o picătură dintr-o soluție de lactofenol, cloral-lactofenol, soluție Lügel.

Pentru a fi concluzient, examenul direct poate fi completat cu examenul preparatorilor 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 viață parazitată în viață saprofitică, și **medii de probă**, destinate dezvoltării caracterelor morfoloșice tipice ale ciupercii izolate, precizând astfel specia respectivă.

Dintre mediiile uzuale, cităm: mediu Sabouraud, mediu Czapek, Raulin, Gorodkova, iar dintr-o medie specială: mediu măla-agar, orez-bilă, mediu Nikerson și.a. Testele de fermentare completează lista mediilor în care, pe baza caracterelor morfofuncionale, se identifică speciile de ciuperci.

**Diagnosticul imunoobiologic** al unor micoze constă în evidențierea anticorpilor specifici din serum bolnavului prin reacții de precipitare, aglutinare, fixare de complement, la care se adaugă tehnică recentă de evidențiere a anticorpilor fluorescenti. Intradermoreacția cu antigen specific este o altă metodă de diagnostic, dar insuficient de precisă.

**Inocularea la animalul de laborator receptor** reprezintă metoda de diagnostic utilizată în aprecierea patogenității unei specii izolate din lezuni micotice. Animalele de electie sunt șoarecele albi sau cobaiul. În diagnosticul infecțiilor cu *Candida albicans*, inoculările se fac pe suprafața pielii în prealabil depilită, cu citire la 5-7 zile la cobai, sau intravenos la șoarece albi. În aceste ultime cazuri, inoculările pozitive produc moartea animalului în 3-5 zile.

**Antifungigrama** reprezintă metoda prin care se încearcă în laborator, pe mediu de cultură favorabile, aprecierea acțiunii fungicidice sau fungistatică a unui antifungic sau chimioterapic pentru stabilirea indicațiilor de tratament. Ea se realizează plasând pe mediul selectiv însămânțat cu ciupercă de cucerit rondele de hârtie de filtru îmbibate în soluții de diferite concentrații din substanțele de cucerit și citind la 1-3 zile puterea antifungică a acestor substanțe, pe baza diametrului ariei de inhibiție a dezvoltării ciupercilor.