

GHEORGHE DIMACHE
Medic primar, doctor în științe medicale

• **DAN PANAITESCU**
Profesor doctor docent

MICROBIOLOGIE ȘI PARAZITOLOGIE MEDICALA

 **Editura URANUS**

București, 1994

Lucrarea a fost elaborată pe baza programei școlare aprobate de Ministerul Învățământului cu nr.36553/1993 și de Ministerul Sănătății cu nr.44762/1993.

Consultant științific: Dr.Iuliana Ungur

© Editura URANUS
CP 7-62 București

ISBN 973-9021-18-2

PREFAȚĂ

Se admite, pe bună dreptate, că garanția valorii unui tratat sau cărți tehnice de specialitate constă în calitatea profesională a celui care o redactează.

În cazul de față autorul, dr. G.Dimache, cercetător științific principal gr.I, Șef de laborator în Institutul Cantacuzino și unul din specialiștii de bază ai Institutului, se bucură de o recunoaștere unanımă din partea colegilor din domeniu, având o triplă consacrare datorată unei îndelungate activități științifice, de cercetare, precum și de învățământ.

Așa cum se poate ușor constata din cele ce urmează, realizarea prezentului Manual de Microbiologie Medicală întrunește pe deplin așteptările noastre, autorul beneficiind și de redactări similare în trecutul său profesional de sârguitor în prepararea și controlul vaccinurilor și sêrurilor de uz uman (profilactice, terapeutice sau de diagnostic) ca și în întocmirea caietelor de îndrumări metodologice în direcțiile acoperite de programele respective, cât și prin efectuarea instructajelor și cursurilor de specializare-perfecționare celor care asigurau în acest fel standardele de calitate în activitatea laboratoarelor din teren.

În ce privește pe cei care urmează să-și dezvolte cunoștințele asupra activităților poate neașteptat de complexe ale acestor viețuitoare atât de mici (bios-viață; micro-mici; de unde microbiologie) de care ne ocupăm, Manualul ce vi se înfățișează prezintă de manieră sistematic progresivă, în primul rând proprietățile lor generale, formele pe care le îmbracă, mecanismele pe baza cărora se dezvoltă, se înmulțesc și rezistă – prin diverse forme de adaptare – la factorii nocivi din mediu sau, în special pentru germenii patogeni (producători deci de infecții locale sau generalizate, cu caracter agresiv) la mijloacele de reacție ale gazdelor animale pe care le invadează. Aceste ultime forme de apărare constituie conținutul științei numite imunologie (imunus = ferit), care a cunoscut o amploare foarte mare mai ales de dată relativ recentă, și a cărei stimulare, la om și animal, reprezintă unul din scopurile principale ale microbiologiei medicale, prin

punerea la punct a vaccinurilor împotriva principalelor infecții umane, cum ar fi febra tifoidă, difteria, tuberculoza etc.

Ca un corolar, diagnosticul de laborator pentru precizarea cauzelor microbiene, specifice ale acestor îmbolnăviri, precum și supravegherea și controlul lor specific, au luat un mare avânt și constituie una din condițiile esențiale ale posibilităților diverse de menținerea nivelului indispensabil de sănătate în comunitățile umane civilizate, mai ales la densitatea deseori extrem de înaltă la care s-a ajuns în marile orașe ale lumii.

În fine, așa cum se va vedea în cursul orelor de pregătire, pe lângă bacteriologie – studiul microbilor, ale căror dimensiuni se măsoară în microni și dotați cu caractere biologice de nutriție și genetice mai complexe –, în josul scării microbiologice există microorganisme aproape schematice, cu dimensiuni și mai reduse, cum ar fi de pildă rickettsiile (aparținând tot bacteriilor); iar la capătul ei inferior cele mai înfime particule, practic structuri moleculare, lipsite de echipamente enzimatic proprii și de orice alte constituențe subcelulare, reduse cel mai adesea la o moleculă gigantă de acid nucleic cuprinsă într-un înveliș proteic – capsida, virusurile, de mare plasticitate genetică și cu implicații patologice multiple, infecțioase, autoimune sau creatoare de imunodeficiențe grave.

Deși a fost vorba până acum doar de microbi, bacterii sau virusuri cu semnificație medicală, nu trebuie pierdut din vedere că marea majoritate a microbilor – ființe practic ubiquitare – sunt saprofiți, nepatogeni deci, și că inițial, înainte de apariția organismelor mai complicate pluricelulare, lumea întreagă le-a aparținut doar lor. Rolul acestora, deși ne-medical la prima vedere, constă în colonizarea organismelor animale virtual în totalitate, începând cu pielea, mucoasele și până la cavitățile naturale, faringele și aparatul digestiv și chiar – parțial și de obicei doar tranzitoriu – arborele respirator, sistemul circulator, aparatul excretor, urinar etc. Trebuie arătat că prezența lor, prin substanțele antimicrobiene pe care le produc, asigură până la un punct înaintat rezistența organismului gazdă la infecția cu germeni patogeni, care găsesc astfel ocupată nișa ecologică respectivă, căreia sunt tentați să se adreseze.

Nu trebuie uitat că saprofiții, mai ales cei intestinali, prepară o serie de factori vitaminiți (de ex. B, K etc.) indispensabili bunei funcționări a gazdei, contribuind între altele și la facilitatea digestiei alimentelor.

Dar și în afara organismului sunt folosiți pe o scară largă în industria casnică pentru obținerea de fermentații naturale (a vinului, laptelui etc.) în producerea antibioticelor etc.

Și, în fine, saprofiții aceștia participă în mod esențial la asigurarea circulației materiei în natură, prin procese de putrefacție, fermentație, demineralizare etc. în ciclul carbonului, azotului etc., contribuind la întreținerea refolosirii elementelor chimice de ființele vii. Din această pricină, marii și adevărații microbiologi au fost totdeauna și biologi de seamă, de largă cultură, și este suficient să cităm, între alții, pe Pasteur, Waksman sau pe marele nostru Ioan Cantacuzino.

În acest spirit, atotcuprinzător deci, trebuie înțeleasă microbiologia în întregul său, "lumea microbilor" fiind practic un comensal prețios în cadrul vieții noastre cea de toate zilele.

Pentru a întregi domeniul microbiologiei, manualul de față cuprinde și câteva capitole privind noțiuni de parazitologie – atât trăsăturile generale ale infestărilor cu paraziți, cât și o prezentare, în sectoare bine determinate, a elementelor de Protozoologie, de helmintologie și entomologie medicală (mai ales ca vectori de boli transmisibile), noțiuni a căror însemnătate este evidentă și de mare utilitate practică.

Acest sector este acoperit științific și tehnic de dl. Profesor dr. docent Dan Panaitescu, membru titular al Academiei de Științe Medicale, ale cărui titluri și competență în domeniul Parazitologiei Medicale sunt de prim ordin, cum se reflectă de altfel și în textele prezentate pentru publicare.

Suntem convinși că apariția acestui manual de Microbiologie și Parazitologie Medicală va contribui la îmbogățirea literaturii didactice de specialitate și va fi de un real folos pentru cei care s-au decis să abordeze un domeniu medical atât de dificil.

Doctor Mihai Zamfirescu
Profesor Universitar

MICROBIOLOGIE GENERALĂ

Cap.I. INTRODUCERE ÎN STUDIUL MICROBIOLOGIEI

1. OBIECTUL MICROBIOLOGIEI

Microbiologia este acea parte a biologiei care studiază caracterele generale ale microbilor, forma, structura, activitatea fiziologică și biologia acestora. În cadrul acestei științe *microbiologia medicală* umană sau veterinară se ocupă cu studiul microorganismelor patogene pentru om sau animal și cu descifrarea mecanismelor de apărare pe care macroorganismul le opune acestor agenți agresori.

Microbii sunt organisme foarte mici, dimensiunea lor fiind exprimată în microni (a mia parte dintr-un mm) sau milimicroni (a milioana parte dintr-un mm) astfel încât ei nu pot fi văzuți decât cu aparate care măresc de sute sau mii de ori. Microbii sunt de două feluri: *patogeni* și *nepatogeni*. Germenii patogeni produc îmbolnăviri, pe când cei nepatogeni, denumiți și saprofiti nu produc decât ocazional boala.

Este cunoscut că unele microorganisme, prezente în cavitățile naturale ale omului nu numai că nu sunt patogene dar ele au un rol biologic pozitiv. Flora microbiană normală din intestin sintetizează unele vitamine din grupul B necesare organismului uman dar pe care acesta nu are capacitatea de a le fabrica. În alte situații, unele microorganisme contribuie la menținerea stării de sănătate prin activitatea antagonică pe care acestea o manifestă față de germenii patogeni.

Existența unui număr impresionant de mare de specii microbiene a făcut necesară gruparea acestora după unele caractere generale comune și desprinderea unor ramuri importante din cadrul general al microbiologiei: *virusologia* (inframicrobiologia) – se ocupă cu studiul *virusurilor* (inframicrobilor), *bacteriologia* – studiază *bacteriile*, *micologia* – studiază *ciupercile microscopice parazite* și *protozoologia* medicală care studiază *paraziții* microscopici. Bolile provocate de virusuri poartă denumirea generală de *viroze*, cele provocate de bacterii, *bacterioze*, cele produse de ciupercile patogene, *micoze*, iar cele provocate de paraziți, *parazitoze*.

2. SCURT ISTORIC AL MICROBIOLOGIEI

Microbiologia este o știință relativ tânără. După cum vom vedea, ea a apărut și s-a dezvoltat în strânsă legătură cu dezvoltarea științelor naturii, a fizicii și a chimiei. La rândul ei, microbiologia a contribuit la dezvoltarea biologiei în general, a biochimiei,

a fiziologiei și mai ales a geneticii, căreia i-a oferit și îi oferă în continuare modele experimentale fundamentale fără de care progresele extraordinare realizate astăzi în domeniul cunoașterii eredității și variabilității materiei vii nu ar fi fost posibile.

De asemenea trebuie remarcată contribuția excepțională a microbiologiei la fundamentarea științifică a diagnosticului de laborator în domeniul bolilor infecțioase precum și la descoperirea mijloacelor moderne de prevenire și combatere a acestor boli. Este suficient să amintim doar de vaccinuri și antibiotice care au dus în cele din urmă nu numai la diminuarea considerabilă a unor epidemii (ciumă, holeră, febră tifoidă etc.) care au decimat milenii de-a rândul omenirea dar și la posibilitatea dispariției acestora de pe planeta noastră pentru totdeauna (ex. variola).

Se poate spune pe drept cuvânt că istoria microbiologiei reprezintă însăși istoria medicinei moderne.

Începuturile microbiologiei sunt legate de inventarea microscopului de către olandezul *Antonie Van Leeuwenhoek* (1632-1723). Cu ajutorul acestui instrument rudimentar care mărea de 300 ori, Leeuwenhoek a putut vedea numeroase organisme vii, invizibile cu ochiul liber, pe care le-a denumit "animalcule". Acestea aveau forme sferice, de bastonașe sau spirale corespunzând principalelor varietăți morfologice ale bacteriilor pe care le cunoaștem astăzi. Aceste descoperiri au relansat cercetările și discuțiile asupra originii vieții și a teoriei generației spontanee.

Adevăratul întemeietor al microbiologiei trebuie considerat chimistul francez



Fig.1. Louis Pasteur (1822-1895).

Louis Pasteur (1822-1895) care a început prin a demonstra rolul unor microorganisme în fermentația alcoolică și lactică, ajungând la descoperirea fenomenelor de aerobioză și anaerobioză. În anul 1864 a făcut o experiență ingenioasă în care a utilizat un bulion steril introdus într-un flacon steril prevăzut cu un tub de sticlă de forma unui gât de lebădă astfel încât în mediu să nu poată pătrunde din afară germenii vii. Mediul de cultură a rămas steril în mod indefinit demonstrând prin aceasta falsitatea teoriei generației spontane. Pasteur a făcut de asemenea numeroase alte descoperiri dintre care cităm: principiul imunizării prin vaccinare și introducerea în practică a vaccinului antirabic și anticărbunos, descoperirea a numeroase bacterii patogene cu demonstrarea rolului lor în anumite boli, punerea la punct a tehnicii de sterilizare prin pasteurizare etc.

Joseph Lister (1827-1912), chirurg englez, a pus bazele asepticii în intervențiile chirurgicale prin introducerea de vapori de formol în sălile de operație și acoperirea plăgilor chirurgicale cu pansamente îmbibate în soluție de fenol. Aceste măsuri au condus la scăderea spectaculoasă a complicațiilor infecțioase și a mortalității postoperatorie.

Robert Koch (1843-1910), medic german, a descoperit agenții etiologici ai unor afecțiuni bacteriene grave cum sunt tuberculoza, antraxul și holera. El a realizat și utilizat pentru prima dată mediile de cultură bacteriologice solide care au permis izolarea și ulterior obținerea unor culturi bacteriene pure. Prin stabilirea unor criterii științifice riguroase (Postulatele lui Koch) a permis identificarea și diferențierea unei bacterii patogene de un germe saprofit neimplicat în etiologia unei boli.

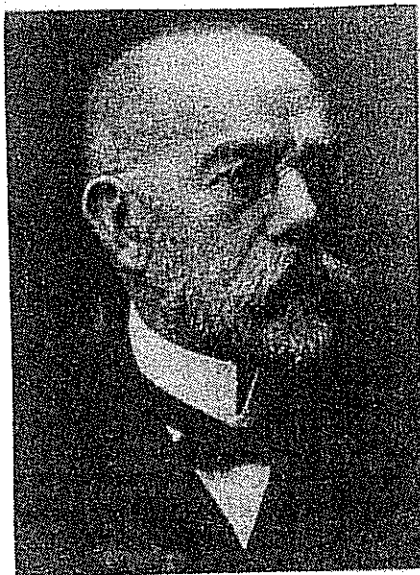


Fig.2. Robert Koch (1843-1910).

Iliia Mecinikov (1845-1916), microbiolog rus, descendent din familia spătarului Nicolae Milescu, poate fi considerat părintele imunologiei. Pornind de la experiențe pe animale inferioare de origine marină, el a demonstrat existența la om și animale a anumitor celule, numite fagocite, care înglobează și digeră diverse particule, printre care și microbii pătrunși în organism. Acest fenomen reprezintă unul din cele mai importante mijloace de apărare ale organismelor împotriva bacteriilor patogene (fagocitoza).

Dimitri Ivanivski (1864-1920), botanist rus, a descoperit, în anul 1892, pentru prima dată, un virus, microorganism de dimensiuni atât de mici încât nu se poate vedea la microscopul optic și trece prin ultrafiltrele care rețin bacteriile. Descoperirea acestui virus sau inframicrob a marcat începutul unei noi științe – virusologia sau inframicrobiologia.

În prima jumătate a secolului nostru, descoperirea chimioterapicelor (Ehrlich), a sulfamidelor (Domagk) și a antibioticelor (Fleming) a dus la cele mai spectaculoase rezultate terapeutice ale bolilor infecțioase.

În țara noastră, doi savanți de renume mondial, **Victor Babeș** și **Ioan Cantacuzino**, au contribuit în mod substanțial la fondarea microbiologiei și a imunologiei moderne.

Victor Babeș (1854-1926) a lucrat în laboratorul lui Pasteur la Paris, iar mai târziu, în laboratorul lui Koch. Este creatorul Institutului "V.Babeș" din București. Împreună cu A.V.Cornil, a scris primul tratat de bacteriologie din lume. A adus contribuții

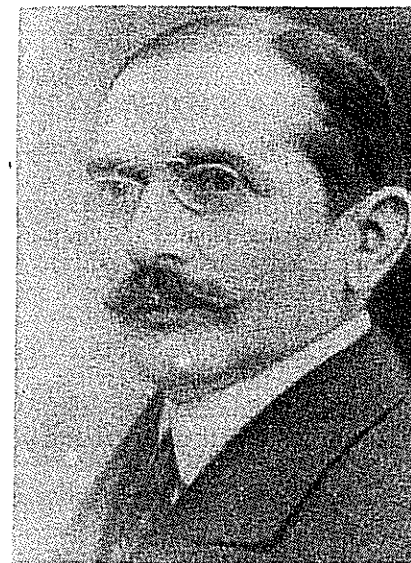


Fig.3. Victor Babeș (1854-1926).



Fig.4. Ioan Cantacuzino (1863-1934).

importante la studiul turbării, al leprei, al tuberculozei, al holerei, al difteriei etc. A descoperit peste 50 de microbi, a pus în evidență corpusculii Babeș-Negri în celulele nervoase ale indivizilor morți de turbare, corpusculii Babeș-Ernst în bacilii difterici, iar în cercetările sale asupra antagonismului bacterian a anticipat descoperirea antibioticelor.

Ioan Cantacuzino (1863-1934), creatorul școlii românești de microbiologie și de medicină experimentală, a fondat, în anul 1921, Institutul de microbiologie care îi poartă numele. Prin realizările sale, această instituție sanitară de prim ordin a contribuit și contribuie în mod hotărâtor la prevenirea și la supravegherea epidemiologică a bolilor infecțioase cu extindere în masă. Opera științifică a profesorului Ioan Cantacuzino este vastă și cuprinde cercetări asupra imunității, studii asupra holerei, a scarlatinei, a tifosului exantematic etc. Profesorul Ioan Cantacuzino este acela care a elaborat prima lege sanitară în țara noastră.

Opera acestor doi mari savanți români în domeniul microbiologiei a fost continuată și amplificată de Constantin Levaditi, Dimitrie Combiescu, Constantin Ionescu-Mihăiești, Ștefan S.Nicolau, Mihai Ciucă, Lidia Mesrobeanu și alții. Astăzi, această activitate se desfășoară în continuare în special în cele două mari institute de profil din țara noastră: Institutul de Microbiologie "Cantacuzino" și Institutul de Inframicrobiologie "Ștefan S.Nicolau", activitate orientată în permanență spre satisfacerea necesităților de ocrotire a sănătății oamenilor, prin pregătirea de cadre

specializate, îndrumare tehnică și mai ales prin prepararea unor produse biologice utilizate în diagnosticul, profilaxia și tratamentul bolilor infecto-contagioase.

3. MĂSURI DE PROTECȚIA MUNCII ÎN LABORATORUL DE MICROBIOLOGIE

În laboratoarele de microbiologie sunt manipulate și vehiculate în permanență *materiale infecte* (produse patologice, culturi, animale de experiență etc.), care conțin agenții cauzali ai celor mai felurite boli infecțioase sau parazitare. De asemenea sunt utilizate o serie de *substanțe chimice* care pot fi dăunătoare sănătății sau care, prin natura lor, pot da naștere la accidente grave (intoxicații, arsuri, explozii, incendii etc.).

Manevrarea incorectă a aparaturii, ca și deficiențele de organizare a muncii pot pune în pericol viața și sănătatea celor care activează în aceste laboratoare.

Pentru prevenirea accidentelor de muncă și a îmbolnăvirilor profesionale este necesar să se respecte cu strictețe o serie de măsuri de protecție.

Laboratorul va avea pereții, tavanul și podeaua fără fisuri sau crăpături, pentru a nu reține în mod accidental material contaminat și pentru a putea fi spălate cu soluții dezinfectante.

Se va asigura protecția absolută contra insectelor, rozătoarelor sau a altor animale care pot răspândi agenții patogeni în afara laboratorului.

În fața ușii laboratoarelor cu infecțiozitate mare se va afla un ștergător de picioare îmbibat cu soluție dezinfectantă.

Personalul laboratoarelor în care se lucrează cu germeni cu infecțiozitate mare va purta, după caz, *ochelari de protecție, bonetă, mască, mănuși de cauciuc* acoperite cu mănuși de pânză, *pantofi sterilizabili, halate chirurgicale* cu mânecile legate, *pantaloni* de pânză etc.

Echipamentul de protecție folosit se va păstra separat de îmbrăcămintea de stradă.

Sterilizarea echipamentului de protecție în laboratoarele cu infecțiozitate mare se va face în laboratorul respectiv imediat după terminarea lucrului.

În cazul contaminării accidentale a echipamentului de protecție, acesta se va dezinfecta sau steriliza imediat. Dacă o regiune a corpului ajunge în contact cu materialul infectat, se va face imediat dezinfecția suprafețelor atinse.

În timpul lucrului este *cu desăvârșire interzis* fumatul, consumarea de alimente și, în general, ducerea mâinilor la gură sau la față. Se vor respecta toate instrucțiunile tehnice de lucru, pentru a se preveni înțeparea tegumentelor cu acul de seringă, cu pipeta Pasteur sau cu sticlă spartă și pentru a evita contactul cu părțile contaminate ale instrumentelor sau cu produse infectate.

Manipularea aparatelor care pot prezenta pericol de accidente (autoclave, pupinele, centrifuge, aparate de liofilizare etc.) se va face respectându-se instrucțiunile de funcționare afișate la loc vizibil.

Pe mesele de lucru, dulapuri etc. nu se vor depozita și nici nu se vor păstra materiale (vase, sticle, substanțe) neutilizabile la lucrarea în curs.

Se interzice accesul persoanelor străine de laborator. Accesul în interes de serviciu se permite numai cu echipament de protecție și cu respectarea măsurilor indicate în asemenea condiții.

Toate laboratoarele vor fi dotate cu *trusă de prim-ajutor*.

Personalul care lucrează cu germeni pentru care există vaccin eficient va fi vaccinat *obligatoriu* la angajare și revaccinat după specific.

Decontaminarea locului de muncă este *obligatorie* la terminarea lucrului sau ori de câte ori este nevoie. În fiecare cameră a laboratorului va exista un recipient cu soluție dezinfectantă pentru dezinfecția locului de muncă sau a mâinilor.

Ansa de platină se va steriliza prin flambare imediat după fiecare utilizare.

Pipetele Pasteur, pipetele gradate și lamele de sticlă se vor cufunda după utilizare în soluție dezinfectantă. Cutiile Petri, eprubetele, cupele centrifugă, balonașele sau alte recipiente care conțin material infectat vor fi introduse în găleți de infecte prevăzute cu capac etanș, în care vor fi transportate la autoclavă pentru sterilizare 30 min., la 120° C.

Instrumentele metalice vor fi sterilizate prin fierbere 30 min. În cazul contaminării cu spori, instrumentele vor fi sterilizate 30 min. la 120° C.

Materialele care, prin natura lor, nu pot fi dezinfectate sau sterilizate ca mai sus, vor fi supuse unor metode speciale de dezinfecție (radiații ionizante, gaze etc.).

Spălarea materialelor și a instrumentelor de laborator se va face numai după sterilizarea prealabilă.

Orice aparat sau obiect susceptibil de contaminare (cuști de animale, centrifuge, seringi etc.) va fi sterilizat înainte de a fi predat atelierului de reparații.

Iradieră cu ultraviolete a suprafeței de lucru și a aerului din cameră se va face cu o intensitate și pe durată corespunzătoare normelor de randament optim al lămpii de dezinfecție întrebuințată pentru distanța respectivă. Iradierea se aplică numai după îndepărtarea prafului și spălarea cu apă și degresante (săpun, detergenți, sodă) a suprafeței sau a încăperii ce urmează a fi dezinfectată cu ultraviolete.

Este interzisă staționarea personalului în încăperea în care sunt aprinse lămpi de ultraviolete. În timpul lucrului la hotă cu lampa de ultraviolete aprinsă, personalul va purta *obligatoriu* ochelari de protecție adecvați. Se va asigura protecția corespunzătoare a pielii prin umbrire: paravan, mănuși, mâneci, cozoroc etc.

Pentru prevenirea îmbolnăvirilor profesionale, o deosebită atenție se va da sterilizării ansei de platină, pipetării, aglutinării pe lamă, centrifugării, mojarării și omogenizării produselor care conțin germeni vii, paraziți sau fragmente de paraziți și maipulării fiolelor care conțin produse infectante liofilizate. În cursul operațiilor care prezintă risc mare de răspândire a materialului infecțios se va așeza pe masa de lucru o hârtie de filtru îmbibată cu soluție dezinfectantă, de mărime corespunzătoare zonei de lucru.

La începerea lucrului, prima persoană care intră în laborator se va convinge că atmosfera nu este încărcată cu gaze inflamabile sau toxice, înainte de a folosi surse de scânteie electrică sau de foc. După terminarea lucrului, ultima persoană care părăsește

laboratorul este obligată să verifice dacă sunt stinse becurile de gaz, de lumină electrică, aparatele electrice, cu foc, abur, robinetele de apă, conductele de gaze și dacă este asigurată ventilația.

Dacă se observă în laborator scurgeri de gaze sau substanțe toxice, se vor lua următoarele măsuri:

- nu se va acționa nici un dispozitiv producător de scântee electrică sau de foc;
- se va asigura ventilația naturală prin deschiderea ferestrelor și a ușilor;
- se vor lua măsuri urgente de reparare sau de înlăturare a sursei generatoare de atmosferă periculoasă.

Cap.II. MORFOLOGIA BACTERIILOR

Bacteriile sunt microorganisme unicelulare. Din punct de vedere al organizării interne, ele sunt celule procariote, protiste inferioare, care au un nucleu primitiv, fără membrană proprie, constituit dintr-o singură moleculă de acid dezoxiribonucleic (ADN) fiind lipsite de aparat mitotic. Pe lângă acestea, celula bacteriană în comparație cu celula eucariotă, nu are mitocondrii, reticul endoplasmic și aparat Golgi.

Cele mai multe bacterii posedă un perete propriu, rigid, constituit din peptidoglican, un material specific celulei bacteriene.

Deoarece microorganismele suferă modificări apreciabile în funcție de vârstă și de condițiile de mediu, caracteristicile unei bacterii, inclusiv cele morfologice, sunt tipice numai atunci când acestea sunt tinere, în general 16-18 ore, cultivate pe medii adecvate în condiții optime de temperatură, pH, în prezența sau absența oxigenului etc.

I. MIJLOACE DE STUDIU A MORFOLOGIEI BACTERIENE

Pentru examinarea microorganismelor sunt necesare aparate de mărit. În acest scop, pentru studiul obișnuit al bacteriilor se utilizează *microscopul fonic* (cu lumină transmisă). Pentru cercetarea mai aprofundată a unor detalii morfologice sau pentru examinarea virusurilor se folosește *microscopul electronic* cu transmisie sau cu baleiaj, care utilizează electronii în mișcare, în vid, cu viteză mare, și care având o lungime de undă foarte mică în comparație cu cea a fotonilor, permite o amplificare considerabilă a imaginii.

1.1. MICROSCOPUL FOTONIC

În principiu, microscopul fonic este un instrument optic format din două sisteme de lentile, care, folosind lumina, permite observarea și studierea obiectelor mici, invizibile cu ochiul liber.

Acest microscop este format dintr-o parte optică și o parte mecanică. *Partea optică* este reprezentată de sistemul de iluminare și două sisteme de lentile numite *obiectiv* – amplasat la capătul inferior la tubului care se plasează pe obiectul de examinat și respectiv *ocular* – plasat la capătul superior al tubului prin care privește ochiul observatorului. *Partea mecanică* cuprinde piciorul pe care se sprijină microscopul, coloana, revolverul în care se înșurubează obiectivele, platina sau masa portobiect pe care se plasează lama cu produsul de examinat ce se fixează pe acesta cu ajutorul a doi călăreți și tubul microscopului pe care se fixează ocularul – la partea superioară și obiectivul – la partea inferioară.

Microscopul fonic de construcție românească se utilizează în mod curent în laboratoarele noastre.

Pentru a obține o imagine corectă la microscop este necesar să se facă reglarea elementelor procedându-se în felul următor:

Se conectează la rețeaua de alimentare dispozitivul de iluminat 6 prin intermediul unui transformator de tensiune 17.

Se așază pe masa portobiect a microscopului 4 un preparat și se vizează cu obiectivul de 10x elementele din preparat, acționând butonul dispozitivului mișcării rapide 12.

Se preferă o zonă din preparat mai puțin densă, eventual cu elemente rare. Se închide la jumătate de cursă diafragma de câmp 10 și se acționează butonul dispozitivului mișcării condensatorului 14 mișcând condensatorul 5 pe verticală până apare în câmpul microscopului imaginea diafragmei de câmp. Cu ajutorul butoanelor 9, diafragma de câmp este adusă în centru câmpului microscopului, după care diafragma de câmp se deschide la limita câmpului observat prin microscop. Deschiderea peste această limită introduce lumină parazită în microscop.

După aceste operații se trece la centrarea filamentului lămpii, scoțând din sistemul optic geamul mat. Prin mișcarea lămpii în lungul axului se pune la punct imaginea filamentului în planul diafragmei de apertură 15.

Se slăbește prin deșurubare capacul 16 și, mișcând butonul 11, se centrează imaginea filamentului lămpii observând proiecția ei în planul diafragmei de apertură, după care se strânge capacul 16.

Dispozitivul mișcării fine se acționează din butonul 13, lucrându-se pe cât posibil la mijlocul cursei marcate cu indici de stativ.

Pentru fiecare obiectiv este necesar să se regleze diafragma de apertură 15 la o deschidere potrivită, care se constată observând în timpul reglării un preparat cunoscut.

Se recomandă să se scoată ocularul și să se privească prin tubul microscopului pupila de ieșire a obiectivului.

Se manevrează diafragma de apertură așa încât diametrul imaginii ei să fie $1/2-1/3$ din diametrul pupilei de ieșire a obiectivului. Reglajul către limita maximă a diafragmei de apertură face să crească puterea separatoare, scăzând în același timp

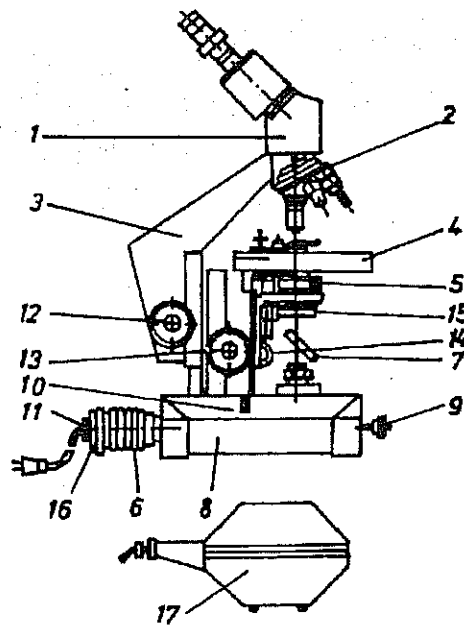


Fig.5. Microscop de laborator.

contrastul imaginii, iar o reglare către limita inferioară face să scadă puterea separatoare crescând contrastul imaginii.

O altă posibilitate de iluminare cu surse naturale și artificiale se obține prin montarea oglinzii de iluminat 7 în locașul corespunzător al microscopului și anume:

- cu fața plană, în cazul în care condensatorul rămâne montat la microscop;
- cu fața concavă, în cazul folosirii obiectivelor de apertură mică (6x cu AB 0,10), atunci când se scoate condensatorul.

Celelalte elemente din descrierea microscopului prezentat în figura alăturată reprezintă următoarele: 1=tubul microscopului, 2=revolverul obiectivelor, 3=coloana, 8=picioarul.

Întreținerea microscopului:

După folosire, microscopul trebuie șters și acoperit cu husa de polietilenă.

Ștergerea elementelor optice se face cu vată sau cu batista de finet a microscopului înmuiată în xilol sau toluol.

Se va evita pe cât posibil atingerea cu mâna a suprafețelor optice. Fețele frontale ale obiectivelor și condensatorului, precum și ștergerea uleiului de cedru se va face cu batista înmuiată în xilen sau benzen. Această operație nu se va face în nici un caz cu alcool.

Microscopul fonic permite examinarea bacteriilor din preparatele native, între lamă și lamelă și obținerea unor informații privind forma, mărimea și unele detalii aproximative asupra structurii germinilor precum și asupra eventualei lor mobilități. Fixarea și colorarea preparatelor permit o apreciere mai bună asupra morfologiei bacteriene. Există numeroase metode de colorație, dar cea mai utilizată în bacteriologie este colorația Gram care permite diferențierea bacteriilor după structura peretelui, în bacterii Gram pozitive și bacterii Gram negative.

Microscopul cu fond întunecat

Pentru examenul microscopic al unui preparat pe fond întunecat se utilizează un microscop fonic la care condensatorul Abbé este înlocuit cu un condensator special, cardioid sau paraboloid. Condensatorul special, spre deosebire de condensatorul obișnuit, prezintă la partea inferioară un disc opac care are rolul de a împiedica razele luminoase să pătrundă direct în obiectivul microscopului. Lumina intră în condensator numai la margine, fiind reflectată oblic în sus de o suprafață concavă cardioidă sau paraboloidă în funcție de tipul de condensator. În acest mod razele reflectate iluminează lateral (fenomenul Tyndall) și particulele din suspensie apar luminoase, clar conturate pe un fond întunecat.

Este necesar ca lamele utilizate să fie subțiri pentru a permite razelor oblice să treacă prin suspensia de particule plasate între lamă și lamele. Pentru examinare se pune o picătură de ulei de cedru între condensator și lama preparatului și o picătură de ulei între lamelă și fața anterioară a obiectivului microscopului.

Microscopul cu contrast de fază

Microscopul cu contrast de fază permite examinarea preparatelor native necolorate prin transformarea diferențelor de fază ale luminii care a traversat preparatul în diferențe de intensitate.

Obiectivele microscopului cu contrast de fază sunt prevăzute în interior cu o plăcuță de fază, parțial defazantă și absorbantă iar diafragma inelar al condensatorului este focalizat și centrat pe planul plăcuței de fază. Aria inelară a plăcuței de fază se numește arie conjugată iar restul plăcuței se numește arie complementară. Dacă în preparat există componente cu densitate variabilă, razele care le traversează suferă o deviație prin refracție și o defazare după care razele defazate sau nedefazate sunt colectate formând imaginea obiectivului studiat.

Microscopul cu fluorescență

Pentru examinarea unui preparat fluorescent, este necesară o aparatură optică specială compusă dintr-o sursă de lumină adecvată, filtru de lumină și un microscop.

Sursa de lumină trebuie să emită radiații a căror lungime de undă trebuie să se situeze în domeniul ultraviolet și vizibil cu punctul maxim între 360-370nm, pentru a fi capabile să producă variații ale nivelelor de energie din structurile periferice ale atomilor substanțelor fluorescente. În acest scop se utilizează în mod curent lămpi din sticlă de cuarț cu vapori de mercur de tip HBO, a căror intensitate variază între 50 și 25 wați. Pentru selectarea radiațiilor necesare producerii fluorescenței se folosesc filtrele de lumină confecționate din sticlă specială denumite și filtre de excitație.

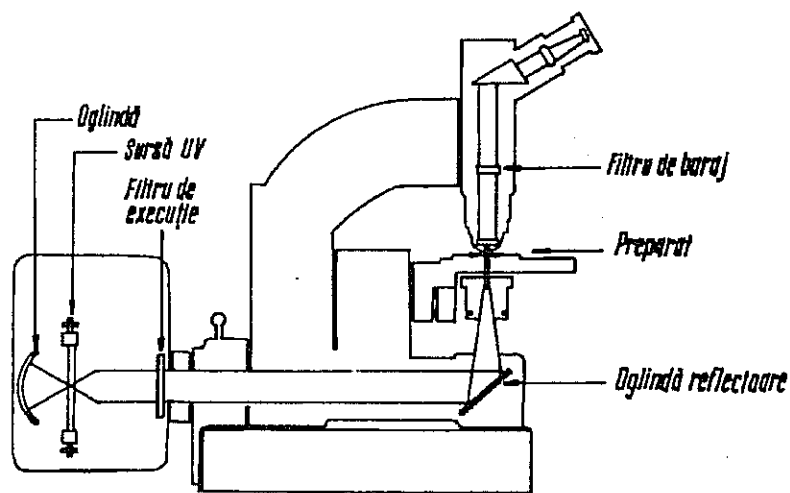


Fig.6. Microscopie în lumină fluorescentă.

Pentru realizarea unor imagini microscopice mai bune, ca și pentru protejarea ochiului examinatorului se utilizează un al doilea sistem de filtre "de protecție"

Pentru examinarea preparatelor fluorescente se folosesc microscopie speciale, dar pot fi utilizate și microscopie obișnuite la care condensatorul Abbé este înlocuit cu un condensator cardioid pentru fondul întunecat. Preparatele trebuie etalate pe lame subțiri cu grosimea de cel mult 1 mm iar examinarea se face într-o cameră obscură. Este necesar ca obiectivele utilizate să fie prevăzute cu iris pentru a se reduce luminozitatea difuză a fondului, iar ca lichid de imersie se folosește glicerina neutră tamponată, sau oleuri nefluorescente, atât pentru spațiul dintre condensatorul cardioid și lama cu frotiul cât și pentru spațiul dintre preparat și obiectivul utilizat.

Microscopia cu fluorescență se utilizează în depistarea și identificarea rapidă a unor microorganisme sau antigene în produse patologice (spută, fecale etc.) și țesuturi, identificarea celulelor T și B din sânge etc.

1.2. MICROSCOPUL ELECTRONIC CU TRANSMISIE

Perfecționările aduse microscopului fonic și introducerea unor procedee noi de examinare nu au dat totuși posibilitatea de a se trece peste o anumită limită de mărire (practic de 1350 ori prin procedeele obișnuite și de 2000 ori prin utilizarea radiațiilor ultraviolete), din cauza lungimii de undă a radiațiilor folosite.

Pentru a se putea pune în evidență particule cu dimensiuni mai mici de 100 mμ, în această categorie intrând și majoritatea virusurilor, trebuiau căutate radiații cu o lungime de undă cât mai mică. Astfel s-a ajuns la folosirea razelor electronice, cu o lungime de undă (0,055Å) de 100 000 ori mai mică decât aceea a luminii. În acest scop a fost conceput microscopul electronic.

Schematic, microscopul electronic prezintă unele asemănări cu microscopul fonic. Aparatul este alcătuit dintr-un tub metalic, în care se face vid pentru a se evita dispersia electronilor generați de un catod (filament de tungsten incandescent) plasat la capătul superior al tubului. În traiectoria fluxului de electroni se plasează obiectul de examinat, montat pe o peliculă monomoleculară de colodiu sau din material plastic. Locul lentilelor de la microscopul fonic este luat, aici, de trei câmpuri electromagnetice cu rol de condensator, obiectiv și ocular, iar

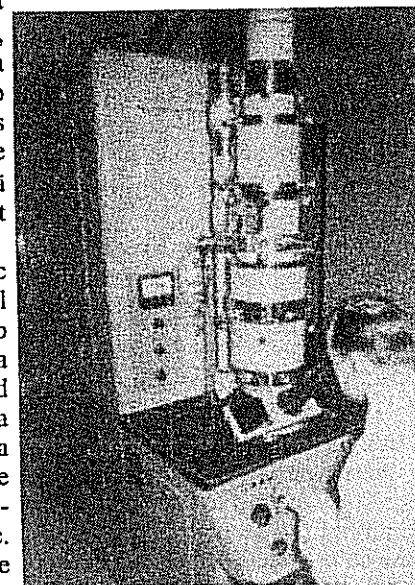


Fig.7. Microscopul electronic.

imaginea este înregistrată pe o peliculă fotografică sau pe un ecran fluorescent. Pentru a mări contrastul imaginii și pentru a pune în evidență înălțimea, grosimea și unele detalii de formă a particulelor studiate, s-a imaginat procedeul "metalizării" acestora prin proiectarea asupra lor, sub un anumit unghi, a unor atomi de aur, crom, platină, paladiu etc.

Microscopul electronic, prin marea sa putere de mărire, a făcut posibilă punerea în evidență a virusurilor foarte mici, cu dimensiuni de 10-20 mμ, și a permis efectuarea unor studii aprofundate asupra unor structuri celulare.

Microscopul electronic cu baleiaj (scanning)

Acest tip de microscop electronic permite explorarea suprafeței unui obiect cu ajutorul unui fascicul de electroni generat de un filament de tungsten încălzit, supus unor mișcări de baleiaj sub influența unui câmp magnetic urmat de vizualizarea semnalului amplificat pe ecranul unui tub cinescop.

Microscopul electronic cu baleiaj permite examinarea preparatelor groase, netransparente pentru electroni, cu suprafață mare și obținerea unei imagini cu aspect de relief și cu adâncime focală mare, dar limita sa de rezoluție este mult inferioară microscopului electronic cu transmisie și nu oferă informații asupra structurii interne a preparatelor examinate.

2. FORMA, DIMENSIUNILE ȘI MODUL DE GRUPARE AL BACTERIILOR

Celula bacteriană este o entitate morfologică și fiziologică de sine stătătoare.

În funcție de specie, bacteriile pot îmbrăca forme diverse, se pot grupa în mod caracteristic, așezarea lor în spațiu fiind legată de existența unor planuri de clivaj în cursul diviziunii și – având o anumită compoziție chimică – pot avea afinități particulare pentru anumiți coloranți.

Formele cele mai frecvent întâlnite la bacteriile de interes medical sunt:

- forma sferică (coc). Diametrul acestora variază între 0,5μ și 2μ;
- forma cilindrică, de bastonaș (bacil), având o lungime care variază între 5μ și 10μ și o grosime de 0,3μ - 1μ;
- forma încurbată, de virgulă (vibron), cu o lungime de 3μ-5μ și o grosime de circa 0,5μ;
- forma spiralată (spirili și spirochete), cu o grosime de 0,3μ-0,4μ și o lungime variabilă de 5μ-20μ.

Cocii, pe lângă forma sferică, cea mai frecvent întâlnită (de exemplu, stafilococul), pot fi ovali (de exemplu, enterococul), lanceolați (de exemplu, pneumococul), reniformi (de exemplu, gonococul) etc. Cocii sunt mai rar izolați. De obicei, sunt grupați în perechi (diplococi), de exemplu, meningococul, în lanțuri (streptococul), în grămezi (stafilococi), câte patru (tetrade) sau pachete mai mari (sarcina).

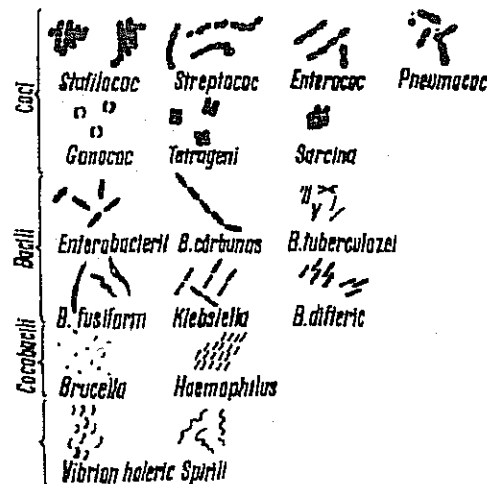


Fig.8. Forma și modul de grupare a bacteriilor.

Baciliile nu sunt în toate cazurile perfect cilindrici. Unii au formă de suveică (bacilul fusiform), alții de măciucă sau de pișcot (de exemplu, bacilul difteric). Chiar și baciliile cilindrici pot fi de mai multe feluri, după forma capetelor. Cei mai mulți bacili au capetele rotunjite (de exemplu, bacilul tific), dar există și bacili cu capete tăiate drept (de exemplu, bacilul cărbunos) sau ascuțite.

De asemenea, există bacili foarte scurți, cocobaciliile (de exemplu, brucelele), care se diferențiază destul de greu de bacili sau de coci.

Baciliile sunt, în general, izolați, dar ei pot fi grupați câte doi (diplobacili), în lanțuri (streptobacili), dispuși ca scândurile unui gard (palisadă), în rozetă etc.

Formele spiralate sunt reprezentate de spirili și spirochete. Spiriliile sunt filamente ondulate cu spirale rigide, iar spirochetele (*Trepomena pallidum*) au formă elicoidală, cu spire flexibile.

În funcție de afinitatea pentru anumiți coloranți, bacteriile se pot grupa în bacterii Gram+ (de exemplu, stafilococul, bacilul cărbunos) sau Gram- (de exemplu, meningococul, colibacilul), bacili acidoalcoolorezistenți (bacilul Koch) iar în funcție de respirație, aerobe (bacilul piocianic) și anaerobe (bacilul tetanic) etc.

3. STRUCTURA CELULEI BACTERIENE

Celula bacteriană are o structură destul de complexă care îi permite să-și realizeze în mod independent principalele funcții vitale.

Microscopia optică simplă furnizează informații prețioase asupra morfologiei bacteriene, dar pentru punerea în evidență a detaliilor de structură sunt necesare în plus unele tehnici speciale ca: examinarea în contrast de fază, analize citochimice,

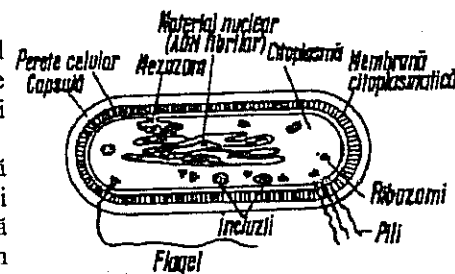


Fig.9. Structura celulei bacteriene.

microdisecția și, mai ales, microscopia electronică.

Principalele formațiuni structurale ale celulei bacteriene sunt: *aparatur nuclear, citoplasma, membrana citoplasmică, peretele celular*, formațiunile *extra-parietale* (capsule, cili sau flageli și pili sau fimbrii) și la unele specii, *sporii*.

Aparatur nuclear bacterian, este denumit astfel deoarece nu are o membrană proprie, specifică unui nucleu celular. În structură sa intră ADN, ARN și proteine. Cromozomul bacterian este un filament unic, circular, de aproximativ 1000 ori mai lung decât bacteria. Aparatur nuclear determină caracterele ereditare ale bacteriei. La unele bacterii, în citoplasmă se întâlnesc fragmente de material genetic cunoscute sub numele de plasmide (ex. factorul "R" de rezistență la antibiotice, care se poate transfera de la o bacterie la alta).

Citoplasma celulei bacteriene este un sistem coloidal alcătuit din proteine, nucleoproteine, glucide, lipide, apă și săruri minerale. Citoplasma conține numeroși robozomi al căror rol esențial în sinteza proteinelor este bine cunoscut și diverse granulații citoplasmice care înmagazinează materiale nutritive de rezervă.

Membrana citoplasmică este o membrană biologică situată sub peretele bacterian. Este alcătuită din proteine dispersate în interiorul unui dublu strat de fosfolipide. Este o membrană semipermeabilă care permite difuziunea selectivă, printr-un proces activ, a elementelor nutritive din mediul exterior spre citoplasmă și eliminarea în afară a produselor de metabolism. Membrana citoplasmică este sediul a numeroase enzime iar plierea sa dă naștere la mezozomi cu rol în diviziunea celulară.

Peretele celulei bacteriene este un înveliș rigid care asigură protecție și determină forma bacteriană. Cu excepția micoplasmelor toate bacteriile au un perete.

Structura peretelui bacterian diferă după cum bacteria este Gram pozitivă sau Gram negativă. Dar, în ambele eventualități există un polimer comun, peptidoglicanul, cunoscut și sub numele de mucopeptid sau mureină.

Peptidoglicanul este o macromoleculă, un heteropolimer compus din lanțuri polizaharidice legate între ele prin peptide. Peptidoglicanul are numeroase proprietăți de interes medical. El este sensibil la lizozim, la enzimele bacteriofagului, la unele antibiotice și dezinfectanți (fenol). Este antigenic și constituie un loc de acțiune al imunității nespecifice.

Peretele bacteriilor Gram pozitive este relativ gros și pe el se fixează acizi teichoici și polizaharidele responsabile de specificitatea antigenică a bacteriilor. În pereți se găsește de asemenea acidul lipoteichoic, un polimer de glicerol-fosfat, fixat de membrana citoplasmică printr-un lipid. Aceste componente menționate sunt imunogene, permițând un diagnostic de laborator direct sau indirect, iar acidul lipoteichoic joacă un rol și în aderența bacteriană.

Peretele bacteriilor Gram negative este mai complex decât peretele bacteriilor Gram pozitive. Deasupra unui strat subțire de peptidoglican microscopul electronic pune în evidență o pătură suplimentară cu aspect trilamelar, membrana externă care este separată de corpul bacterian prin spațiul periplasmic. Membrana externă este formată dintr-un strat intern de fosfolipide și un strat extern lipopolizaharidic (LPS).

La rândul său, acest LPS este format din lipide (Lipidul A) legat de glucozamină și din fosfor, pe care se fixează un polizaharid complex situat la exteriorul peretelui bacterian. El este antigenic (ex. antigenul O Salmonella).

Structura particulară a membranei externe permite peretelui bacterian o permeabilitate selectivă. Această membrană externă prezintă o deosebită importanță medicală deoarece conține endotoxine (LPS), este imunogenă (antigenul O) și antigenică (polizaharizii terminali ai LPS), este sensibilă la unele antibiotice și antiseptice, este locul de acțiune al imunității nespecifice și al unor bacteriofagi.

Alterarea sau absența peptidoglicanului duce la pierderea rigidității peretelui bacterian și implicit la liza bacteriei.

O bacterie complet lipsită de perete poartă numele de *protoplast* și este incapabilă de a se divide.

În colorația diferențială Gram, într-o primă fază se produce colorarea în violet a citoplasmei tuturor bacteriilor. În cel de-al doilea timp (decolorarea selectivă), bacteriile Gram negative sunt decolorate de alcoolul care pătrunde prin peretele acestora în timp ce bacteriile Gram pozitive rămân colorate în violet, nu se decolorează, deoarece peretele lor nu permite pătrunderea alcoolului în bacterie.

Formațiunile extraparietale ale celulei bacteriene

Capsula și stratul mucos. Unele specii bacteriene prezintă la exterior un înveliș gelatinos, care, la microscop, apare sub forma unui halou clar, cunoscut sub numele de capsulă. La alte bacterii învelișul extern este mai puțin organizat, fiind format dintr-un strat mucos ce se spală ușor cu apă. Aceste formațiuni sunt, în general, de natură polizaharidică. Prezența sau absența lor este condiționată de anumiți factori de mediu. Îndepărtarea capsulei sau a stratului mucos nu afectează viabilitatea celulei. Capsula potejează celula bacteriană față de uscăciune și mărește virulența bacteriilor patogene prin împiedicarea fagocitozei. Substanțele chimice din capsulă sunt antigenice și provoacă formarea de anticorpi. Serurile imune reacționează specific cu antigenele capsulare, producând "in vitro" o mărire apreciabilă de volum a capsulei. Acest fenomen de "umflare a capsulei" este folosit în bacteriologie pentru identificarea speciei și tipului unor germeni capsulați (ex. pneumococul).

Cilii și flagelii. Bacteriile mobile au filamente fine, lungi, de natură proteică, denumite *cili* sau *flageli*. Cilii își au originea în corpusculii bazali situați în citoplasmă, de unde străbat membrana citoplasmică și peretele celular. Pentru a fi puși în evidență sunt necesare colorații speciale.

Bacteriile aciliate se mai numesc și bacterii atriche.

Bacteriile ciliate se pot împărți în: bacterii monotriche cu un singur cil, bacterii amfitriche cu câte un cil la fiecare capăt, bacterii lofotriche cu un smoc de cili la unul sau la ambele capete, bacterii peritriche cu cili situați pe toată suprafața bacteriei. Cilii reprezintă antigenul flagelar (antigenul "H" al bacteriilor). Existența acestui antigen permite recunoașterea rapidă a bacteriei cu ajutorul serurilor specifice.

Pilii sau *fimbriile* sunt formațiuni filamentoase dispuse pe suprafața unor bacterii. Spre deosebire de cili, pilii sunt mai scurți și mai groși, sunt rigizi și nu participă la mobilitatea bacteriei. Pilii au rol în fixarea germenilor pe suporturi solide. De asemenea, se pare că anumiți pili intervin în transportul unor metaboliți sau că ar avea rol în transferul materialului genetic în procesul de conjugare.

Sporul bacterian. În mod normal, bacteriile se găsesc în forma *vegetativă*. Unele specii bacteriene dezvoltă, în anumite condiții, forme de rezistență numite spori, datorită cărora pot supraviețui ani de zile. Rezistența sporilor se datorește cantității reduse de apă liberă, stării de inactivitate a enzimelor, cantităților crescute de lipide și calciu care scad permeabilitatea etc.

Sporul are un *înveliș sporal* pluristratificat sub care se găsește un alt înveliș numit *cortex*, în interiorul căruia se află *sporoplasma* (materialul citoplasmatic) și *nucleoplasma* (materialul nuclear). Restul celulei vegetative poartă numele de *exosporium*.

Procesul de sporulare sau de *sporogeneză* se desfășoară în mai multe etape: stadiul *preparator* în care apar condensări de citoplasmă, stadiul de *prespor*, caracterizat prin apariția unei membrane în jurul citoplasmei condensate, stadiul de *formare a învelișurilor sporale* și stadiul de *maturare*, în care sporul capătă forma și dimensiunile normale iar forma vegetativă începe să se dezintegreze.

Trecerea bacteriei din forma de spor în forma vegetativă se realizează în trei faze: faza de *activare*, în care apar primele modificări structurale, faza de *germinare*, în care sporul se umflă și își pierde refringenta și faza de *creștere*, în care se rup învelișurile sporale și se formează celula vegetativă.

Sporii sunt sferici sau ovalari. Diametrul sporului poate depăși grosimea bacteriei, producând o deformare a acesteia. În celula vegetativă, sporul poate fi situat central, subterminal sau terminal.

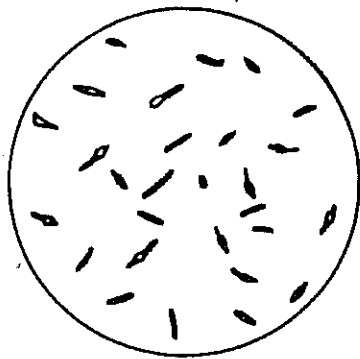


Fig. 10. Bacterie cu spori.

Cap. III. FIZIOLOGIA BACTERIILOR

Pentru o cunoaștere mai completă a bacteriilor au fost necesare studii minuțioase asupra proceselor fizico-chimice care au loc în celula bacteriană, precum și a aceluia care sunt determinate de microorganismele în cursul dezvoltării lor în mediul înconjurător. Aceste studii au fost precedate, în mod necesar, de cunoașterea constituenților chimici ai celulei bacteriene.

1. COMPOZIȚIA CHIMICĂ A BACTERIILOR

Bacteriile, ca și organismele superioare, sunt, în linii generale, constituite din substanțe organice, săruri minerale și apă.

Apa reprezintă, în medie, 75-85% din greutatea masei bacteriene. În celula bacteriană apa se găsește fie liberă, fie legată de diverse structuri celulare. Apa menține în soluție substanțele hidrosolubile, facilitează activitatea enzimelor și desfășurarea reacțiilor metabolice și asigură circulația diversilor produși de metabolism în celula bacteriană.

Sărurile minerale reprezintă 2-30% din greutatea masei bacteriene uscate și sunt formate, mai ales, din P, K, Na, Ca, S, Cl, Fe. Aceste elemente se combină formând compuși anorganici sau intră în structura unor molecule organice. Sărurile minerale participă la schimbul de substanțe dintre celula bacteriană și mediul înconjurător, au un rol important în reglarea presiunii osmotice și a pH-ului, intră în compoziția unor enzime sau a altor constituenți celulari și intervin direct în activitatea unor sisteme enzimactice.

Substanțele organice sunt reprezentate de proteine, glucide și lipide.

Proteinele reprezintă peste 50% din masa uscată a bacteriilor. În celula bacteriană, alături de proteinele simple, se întâlnesc și numeroase proteine combinate, cum sunt complexele glucidoproteice, lipidoproteice, glucidolipidoproteice etc. O mențiune specială trebuie făcută pentru acizii nucleici (ADN și ARN), cu extraordinara lor importanță biologică în conservarea și transmiterea caracterelor ereditare, precum și pentru *enzimele* bacteriene, fără de care realizarea metabolismului și existența celulei bacteriene nu ar fi posibile.

Glucidele pot ajunge până la 25% din greutatea celulelor bacteriene uscate; se prezintă sub formă de monozaharide, dizaharide și polizaharide. Au rol plastic (intră în constituția unor structuri bacteriene) și energetic.

Lipidele reprezintă 1-20% din greutatea bacteriei uscate. Iau parte la formarea membranei citoplasmatică, a peretelui celular și a unor granulații din citoplasmă.

2. METABOLISMUL BACTERIAN

Bacteriile desfășoară o activitate metabolică neîntreruptă în cursul căreia cresc, se multiplică, își schimbă structura și compoziția chimică etc.

Metabolismul bacterian, a cărui intensitate este cu mult mai mare în comparație cu cel al organismelor superioare, cuprinde totalitatea reacțiilor biochimice care au loc în celulă. Prin intermediul acestor reacții substanțele nutritive din mediile de cultură sunt încorporate și transformate în energie (reacții catalitice sau procese de dezasinilație) sau în constituenți celulari (reacții anabolice sau procese de asimilare).

Nutriția bacteriilor. Prin nutriția bacteriană se înțelege totalitatea proceselor metabolice care participă la producerea de substanțe energetice sau de materiale cu rol plastic, necesare sintezei constituenților celulari. Bacteriile își realizează activitatea metabolică prin numeroase mecanisme, folosind surse nutritive extrem de diverse, de la azot molecular, dioxid de carbon, sulf, până la substanțele organice cele mai complexe. În acest fel se explică posibilitatea unor bacterii de a produce unele vitamine pe care metabolismul uman nu este capabil să le sintetizeze.

În funcție de tipul de nutriție, microorganismele pot fi împărțite în: *autotrofe* (utilizează azotul și carbonul din compuși anorganici) și *heterotrofe* (utilizează azot și carbon din substanțe organice).

În raport cu sursa de energie utilizată, microorganismele autotrofe pot fi: *fototrofe*, care utilizează energia radiantă (luminoasă) și *chimiotrofe*, care utilizează energia ce rezultă din reacțiile biochimice de oxidoreducere.

Bacteriile patogene sunt heterotrofe; datorită parazitismului ele și-au pierdut capacitatea de a-și sintetiza singure toate elementele de care au nevoie. Pentru cultivarea lor pe medii artificiale este necesară introducerea în aceste medii a unor *factori de creștere*, cum sunt unele vitamine (B₁, B₂, B₆, PP etc.), aminoacizi etc.

Concentrația ionilor de hidrogen (pH) în mediile de cultură reprezintă un factor important pentru microorganismele. Deși unele bacterii suportă limite largi de aciditate și alcalinitate, marea majoritate a bacteriilor patogene pentru om se dezvoltă într-o zonă îngustă de pH, în general în jurul neutralității.

Presiunea osmotică. Bacteriile sunt, în general, destul de tolerante la variații ale concentrațiilor ionice. Unele specii patogene au chiar o afinitate pentru salinitate crescută, care împiedică dezvoltarea majorității bacteriilor, fapt ce a permis crearea și utilizarea de medii de cultură selective (mediul hiperclorurat pentru stafilococ).

Temperatura joacă un rol decisiv în creșterea și multiplicarea bacteriilor. În general, bacteriile patogene se dezvoltă între 20°C și 37°C, dar temperatura optimă este apropiată de temperatura normală a omului (37°C). În această zonă termică enzimele desfășoară o activitate intensă, iar metabolismul bacterian atinge limite maxime.

Metabolismul energetic bacterian. Respirația și fermentația

Respirația bacteriană reprezintă totalitatea proceselor biochimice aerobe și anaerobe prin care celula eliberează energia necesară activității vitale. Aceste reacții biochimice au la bază mecanismul oxidoreducerii.

Prin oxidoreducere biologică se înțelege pierderea atomilor de hidrogen – a electronilor – de către o substanță chimică, numită donator, și transferul acestora pe

molecula unei alte substanțe chimice, numită acceptor. Substanța donatoare se oxidează și, concomitent, substanța acceptoare se reduce. Aceste reacții sunt reversibile, iar efectuarea lor necesită prezența unor enzime.

După natura acceptorului final de hidrogen, au fost descrise trei tipuri de procese metabolice:

1) **respirația aerobă** (oxibiotică), în care acceptorul de hidrogen este oxigenul molecular, iar produsul rezultat este apa;

2) **respirația anaerobă** (anoxibiotică), în care acceptorul de hidrogen poate fi orice substanță anorganică, cu excepția oxigenului;

3) **fermentația**, în care acceptorul de electroni este un compus organic.

În funcție de comportarea față de oxigenul molecular, bacteriile pot fi grupate în patru tipuri respiratorii:

- **bacterii strict aerobe** (b. tuberculozei, b. cărbunos etc.), care folosesc oxigenul molecular ca acceptor final de hidrogen și, prin urmare, au obligatoriu nevoie de prezența oxigenului atmosferic;

- **bacterii strict anaerobe** (b. tetanic, b. botulinic etc.), care se dezvoltă numai în absența oxigenului;

- **bacterii aerobe facultativ anaerobe** (stafilococul, b.coli, etc.), care au posibilitatea să-și adapteze metabolismul în funcție de prezența sau absența oxigenului;

- **bacterii microaerofile** (spirochetele etc.), care tolerează cantități mici de oxigen.

Cunoașterea fiziologiei bacteriilor ne dă posibilitatea să creăm acestora condiții optime de cultivare și să aplicăm unele teste biochimice pentru identificarea lor.

3. ÎNMULȚIREA BACTERIILOR

Înmulțirea bacteriilor se face în mod obișnuit prin diviziune directă. La bacili, diviziunea este, de obicei, transversală, iar la coci aceasta se face după unul sau mai multe planuri perpendiculare, succesive, ceea ce duce la gruparea caracteristică în perechi, lanțuri sau grămezi. Bacteriile au o viteză de multiplicare extraordinară de mare. În general, intervalul de timp dintre două diviziuni este de 20-30 min. Există, însă, specii la care generațiile noi apar numai după 9 min., sau specii, cum este bacilul tuberculos, la care o nouă diviziune apare după 18 h.

În mediile de cultură, dinamica multiplicării populației bacteriene evoluează astfel:

1) faza de **latență**, în care nu se înregistrează o creștere a numărului de bacterii. Aceasta este o etapă de adaptare a populației bacteriene la noile condiții de mediu și durează circa 2h în funcție de specie și calitatea mediului de cultură;

2) faza de **creștere logaritmică**, în care numărul bacteriilor crește în proporție geometrică timp de aproximativ 0,5-2h;

3) faza **staționară**. După atingerea unui nivel maxim de multiplicare, numărul celulelor vii rămâne neschimbat câteva ore;

4) faza de *declin*, în care celulele bacteriene îmbătrânesc și viabilitatea lor scade progresiv.

Creșterea bacteriilor pe mediile de cultură prezintă aspecte macroscopice caracteristice pentru anumite specii.

În mediile *lichide*, bacteriile se pot dispersa uniform sau pot forma depozite la fundul tubului; cele aerofile formează un val la suprafața mediului sau un inel aderent la pereții eprubetei.

Pe mediile *solide*, bacteriile formează colonii care pot îmbrăca aspecte particulare (mărime, formă, pigmentare, transparentă, consistență, aderență la mediu, margini regulate sau crenelate, suprafețe netede sau rugoase etc.) care ușurează identificarea lor.

Este important de știut că, în general, bacteriile pot fi de forma "S" ("smooth") și de forma "R" ("rough"). Pe mediile solide tipul "S" formează colonii netede, lucioase, cu marginile regulate, iar în mediile lichide dau naștere la culturi care tulbură uniform mediile respective. Tipul "R" formează colonii cu suprafața rugoasă și marginile crenelate, iar în mediile lichide, culturile sedimentează.

Marea majoritate a bacteriilor patogene (cu unele excepții ca, de exemplu, bacilul tuberculos, bacilul difteric sau bacilul cărbunos) sunt sub formă "S". Formele "R", cu excepția celor menționate, degradate antigenic, reprezintă variante nevirulente ale speciei respective.

Cap. IV. ACȚIUNEA AGENȚILOR FIZICI, CHIMICI ȘI BIOLOGICI ASUPRA MICROBILOR

Viabilitatea și dezvoltarea microorganismelor sunt în permanență influențate de complexul de factori fizico-chimici și biologici care alcătuiesc mediul ambiant. Orice modificare apărută în acest mediu ambiant se poate răsfrânge negativ asupra microbilor și ca urmare pot apărea trei situații: moartea (efectul bactericid, virulicid, fungicid), încetinirea și oprirea în mod reversibil a multiplicării (efectul bacteriostatic) sau apariția unor modificări ale microbilor care permit fie selectarea unor forme mai rezistente fie trecerea bacteriilor din forma vegetativă în aceea de spor.

Studiul efectelor letale ale agenților fizici sau chimici asupra microorganismelor, în special a germenilor patogeni, a permis punerea la punct și aplicarea corectă a tehnicilor de sterilizare, efectuată în principal cu ajutorul agenților fizici (radiații) și de dezinfectie și aseptis realizate în general cu ajutorul unor agenți chimici (substanțe dezinfectante și substanțe antiseptice).

Sterilizarea și dezinfectia sunt tratate pe larg într-un capitol următor.

Pentru practică, un interes aparte îl prezintă cunoașterea activității agenților chimici și mai ales biologici asupra organismelor (chimio- și antibio-terapie).

Chimioterapicele sunt substanțe de sinteză cu toxicitate selectivă pentru bacterii, dar netoxice pentru om. Ca exemplu putem aminti compușii de arsen (salvarsanul și neosalvarsanul descoperite de Paul Ehrlich la începutul acestui secol), bismutul a cărei acțiune treponemicidă a fost descoperită de Constantin Levaditi, sulfamidele descoperite de Domagk în 1935, nitrofuranii, trimetoprimul, PAS, HIN, Etambutolul etc.

Antibioticele sunt agenți antimicrobieni de origine biologică elaborați de microorganisme (ciuperci, bacterii). Ulterior unele antibiotice au fost sintetizate în laborator. Există și antibiotice semi-sintetice preparate prin modificarea chimică a produselor de bază naturale. De asemenea, există substanțe chimice de sinteză al căror mecanism de acțiune nu se deosebește cu nimic de cel al unor antibiotice naturale.

Spre deosebire de substanțele antiseptice care acționează nediferențiat, antibioticele au un anumit spectru de activitate mai restrâns sau mai larg. Din această cauză, pentru o administrare corectă, *trebuie* cunoscut acest spectru, adesea fiind necesar să se facă o testare a antibioticului "in vitro" (antibiogramă) în prezența agentului patogen respectiv.

Antibioticele trebuie să aibă o activitate specifică cât mai înaltă asupra agentului patogen și să aibă efecte toxice cât mai reduse sau nule asupra macroorganismului.

Clasificarea lor poate fi făcută după numeroase criterii. În funcție de mecanismul de acțiune ele pot fi grupate astfel:

- antibiotice care inhibă sinteza peretelui bacterian (penicilinele, cefalosporinele);
- antibiotice active asupra membranelor bacteriilor (polimixinele);

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

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

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

Tehnica prin diluții este folosită numai în cazuri speciale.

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

Metoda antibiogramelor 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 inactice (bacterie rezistentă).

Cap.V. CULTIVAREA BACTERIILOR

I. MEDIILE DE CULTURĂ

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

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

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

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

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

- medii de izolare, care permit izolarea bacteriei dintr-un produs patologic;
- medii de transport, care permit supraviețuirea anumitor bacterii ce nu pot fi însămânțate imediat după recoltare (de exemplu, mediul Stuart pentru Neisserii, Carry-Blair pentru vibriionul holeric etc.);
- medii de îmbogățire, destinate cultivării unor bacterii cu necesități nutritive particulare și care sunt stimulate să crească în mod special, deoarece numărul lor este redus în produsul patologic în momentul recoltării (de exemplu, bulion cu selenit și mediul Müller-Kauffmann pentru salmonele);
- medii selective, care conțin elemente ce permit creșterea numai a anumitor bacterii dintr-un produs (de exemplu, mediul Wilson-Blair pentru bacilul tifoid);
- medii diferențiale, care conțin substanțe ce pun în evidență unele proprietăți biochimice ale bacteriilor studiate. La rândul lor, mediile diferențiale pot fi simple (de exemplu, mediul AABTL care pune în evidență fermentarea lactozei) sau politrope (de exemplu, mediul TSI care pune în evidență mai multe caractere biochimice).

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

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

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

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

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

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

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

Bulionul simplu se prepară astfel: la 1 000 ml macerat se adaugă 10 g peptonă, 5 g sare și se încălzește până la fierbere. Se ajustează pH-ul la 8, folosind o soluție de hidroxid de sodiu 10%, după care se sterilizează 30 min. la 120°C pentru precipitarea sărurilor alcalinoteroase. Pentru îndepărtarea precipitatului, mediul se filtrează la cald prin hârtie de filtru și se repartizează bulionul obținut în recipiente adecvate întrebuințării (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*. Geloza sau agarul se extrage dintr-o algă, este lipsită de substanțe nutritive și servește numai la solidificarea mediului. Rămâne solid la 37°C, permițând obținerea de colonii microbiene izolate. Se topește la 80°C, rămâne în stare lichidă până la 45°C și se solidifică la 40°C.

La 1 000 ml macerat de carne se adaugă 10 g peptonă, 5 g sare, se dizolvă la cald și se adaugă apoi 20 g geloză spălată. Pentru spălare, geloză fibre împăturită într-un 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 inițial cu apă distilată, se ajustează pH-ul la 8, se sterilizează 30 min. la 120°C, după care se filtrează la cald prin hârtie de filtru. Se repartizează în recipiente adecvate și în 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 germeilor 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 autoclavează la 120°C timp de 30 min. pentru precipitare. Se filtrează prin hârtie de filtru, se repartizează în tuburi sau baloane, după necesități și se sterilizează la 115°C timp de 20 min. – pH final 7,2-7,4.

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

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

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

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

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

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

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

În scop orientativ se poate utiliza metoda rapidă a hârtiei indicator care, 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. ÎNSĂMÂNȚAREA MEDIILOR DE CULTURĂ

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

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

Însămânțarea produselor patologice se execută în camere de laborator (boxe) cu materiale sterile (medii, plăci, tuburi, anse, pipete Pasteur sau gradate, tampoane etc.) în spațiile sterile din jurul flăcării becului de gaz, și cu recipiente cu substanțe dezinfectante (ex. amestec sulfo-cromic) și găleți de infecte la îndemână. În situații speciale când se bănuiește prezența în produsul patologic a unor agenți microbieni 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 accidente 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 înroșit 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 bucla ansei din prelevat este introdus în mediul 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 flacără atât capătul cât și toată 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 răcită se introduce în recipientul cu produsul prelevat și se aspiră de la câteva picături până la 1 sau mai mulți ml, în raport cu materialul de însămânțat și cantitatea de mediu de cultură. Pipeta trebuie manipulată cu grijă pentru a nu uda dopul de vată. Materialul aspirat în pipetă se însămânțează într-un recipient cu mediu nutritiv cu aceleași precauțiuni de flambare a gâtului recipientelor și a dopurilor respective.

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

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

Însămânțări pe medii solide

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

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

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

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

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

Tehnici de însămânțare cu izolarea agentului microbial 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 asociație se realizează prin diferite metode care pot acționa fie direct asupra florei de asociație, inhibând-o în dezvoltarea ei, fie indirect, acționând asupra germenului pe care dorim să-l izolăm, favorizându-i acestuia, în mod cu totul preferențial, dezvoltarea.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Cap.VI. STERILIZAREA ȘI DEZINFECȚIA

1. STERILIZAREA

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

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

1.1. STERILIZAREA PRIN CĂLDURĂ

Căldura folosită pentru sterilizare poate fi uscată sau umedă.

Sterilizarea prin căldură uscată

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

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

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

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

Sterilizarea prin căldură umedă

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

Fierberea în apă este utilizată mai ales pentru sterilizarea seringilor, a instrumentelor metalice și a tuburilor de cauciuc. Pentru aceasta se folosește un fierbător metalic. Obiectele supuse sterilizării se introduc în apă distilată, care este încălzită electric sau cu flacăra până la punctul de fierbere și menținută astfel timp de 30 min.

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

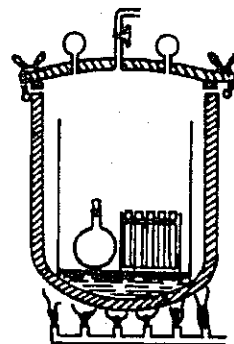


Fig.11. Secțiune prin autoclav.

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

Autoclava funcționează astfel: se pune apă în cazanul aparatului până aproape de suportul pe care se așază coșulețele cu materiale, se introduc în cazan materialele de sterilizat (baloane cu medii de cultură, apă distilată, soluție salină fiziologică, dopuri și tuburi de cauciuc, pânii, aparate de sângerat, filtre, casolette, găleți cu materiale infecte etc.) și se acoperă cu o coală de hârtie pentru a se

evita umezirea lor cu apă rezultată din condensarea vaporilor. Se închide capacul și se fixează buloanele, două câte două, în diagonală; se deschide robinetul de vapori; se aprind becurile de gaz și, când vaporii ies în jet continuu, se închide robinetul de vapori. Din acest moment, manometrul începe să înregistreze ridicarea presiunii și, prin urmare, și creșterea temperaturii (la 1/2 at corespunde o temperatură de 115°C, la 1 at corespund 120°C, iar la 2 at, 134°C). Când s-a atins presiunea corespunzătoare temperaturii dorite se reglează flacăra, pentru a se asigura menținerea acestei temperaturi un anumit timp (de exemplu, 20-30 min. la 120°C).

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

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 (benzofenolul se topește la 110°C, sulful la 115°C, acidul benzoic la 121°C).

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

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

Pasteurizarea este o metodă de sterilizare parțială; prin ea se distrug numai formele vegetative, deoarece utilizează temperaturi puțin ridicate și de scurtă durată: 65°C timp de 30 min, 80-90°C timp de 1-2 min. sau 91-95°C timp de câteva secunde. Scăderea temperaturii se face brusc. Acest procedeu se folosește la sterilizarea laptelui și a unor medii de cultură, când se urmărește distrugerea formelor vegetative ale germeilor 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 produse biologice care nu suportă temperaturi mai ridicate.

1.2. STERILIZAREA PRIN FILTRARE

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

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

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

Filtrele de sticlă (Schott) au diferite porozități: G₁-G₅. Filtrul G₅ reține bacteriile. Pentru a fi utilizate, ele se montează la baloane Kitasato. După fiecare utilizare este necesar ca filtrele de sticlă să fie fierte în apă distilată și spălate abundant, prin trecerea unei mari cantități de apă distilată prin ele.

1.3. STERILIZAREA CU RAZE ULTRAVIOLETE

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

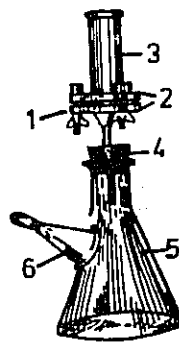


Fig.12. Filtrul Seitz.

2. DEZINFECȚIA

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

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

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

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

Un dezinfectant bun trebuie să îndeplinească următoarele condiții:

- să acționeze asupra unui număr cât mai mare de agenți patogeni;
- să producă inactivarea ireversibilă a germeilor într-un timp cât mai scurt și să acționeze cât mai independent de condițiile mediului în care se desfășoară activitatea sa;

- să fie cât mai puțin toxic pentru om și pentru animale, să nu aibă miros neplăcut și să nu degradeze țesuturile, pielea, metalele, lemnul și alte materiale supuse dezinfecției;

- să fie cât mai stabil și să-și păstreze calitățile cât mai mult timp în condiții obișnuite;

- să fie ușor de manevrat și cât mai ieftin și să nu fie inflamabil sau explozibil.

În laboratoarele de microbiologie sunt folosite mai multe substanțe dezinfectante.

Mertiolatul de sodiu are o toxicitate redusă pentru om și pentru animale. În soluție de 1/2000 este utilizat pentru dezinfecția mâinilor, a instrumentelor contaminate, a obiectelor de piele și de cauciuc.

Formolul este soluția de aldehydă 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 vapori, cât și sub formă lichidă; sub formă de aerosoli se folosește la dezinfecția camerelor. În mod obișnuit, pentru 1 m³ sunt necesari 6-10 ml formol comercial 40%. Când dezinfecția privește distrugerea unor germeni mai rezistenți, cantitatea de formol trebuie crescută. În cazul b.Koch sunt necesari 200 ml formol la 1 m³.

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

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

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

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

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

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

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

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

Fenolul (acidul fenic, acidul carbohic cristalizat, 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 dezinfectantă a unor substanțe chimice se exprimă în comparație cu cea a fenolului, stabilindu-se "indicele fenolic".

Crezoli (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. Amestecat cu apă în proporție de 5-10% dă o emulsie cu efect bactericid apreciabil, dar cu miros neplăcut.

Amestecul sulfocromic este nelipsit de pe orice masă de laborator, fiind utilizat pentru sterilizarea pipetelor și a lamelor contaminate. Acesta se prepară astfel: se pun 100 g bicromat de potasiu la 400 ml apă distilată, care se încălzește fără a se fierbe, până la completa dizolvare a bicromatului. După răcire se adaugă 1600 ml apă distilată și, treptat, 1000 g acid sulfuric tehnic. Acest amestec se păstrează pe masa de laborator, în pahare conice de 1000 ml sau 2000 ml și în 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 mâinilor și a obiectelor de piele.

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

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

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

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

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

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

Permanganatul de potasiu (KMnO₄) se prezintă sub formă de cristale mari, de culoare violetă-închis. Pentru dezinfectarea mâinilor se folosește o soluție de 1‰, pentru mucoasa bucală soluția de 1/5000, iar pentru cea oculară 1/10 000.

Apa oxigenată (H₂O₂) sau peroxidul de hidrogen are o puternică acțiune bactericidă prin eliberarea oxigenului. Se utilizează în concentrație de 3%.

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

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

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

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

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

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

Pentru dezinfectia 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 îndepărtarea mecanică a murdăriei și, implicit, a germeilor.

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

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

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

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

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

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

1. RECOLTAREA ȘI TRANSPORTUL PRODUSELOR PATOLOGICE

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

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

- materialele (flacoanele, eprubetele, acele, seringile, pensele, spatulele etc.) necesare recoltării trebuie în prealabil sterilizate prin agenți fizici. Substanțele chimice trebuie evitate deoarece urme de substanțe antibacteriene pot împiedica dezvoltarea ulterioară a microorganismelor și falsifica astfel rezultatele;

- când se urmărește izolarea unui agent microbial este indicat ca, pe cât posibil, recoltarea produselor să se facă înainte de administrarea unui tratament local sau general ca antiseptice, antibiotice sau chimioterapice;

- recoltarea trebuie executată de medic sau sub directă îndrumare și controlul acestuia, astfel încât pe lângă corectitudinea execuției să se preleveze o cantitate optimă din produsele patologice cele mai caracteristice și cu maximum de semnificație etiologică;

- prelevarea produsului patologic trebuie să se facă în momentul optim, în funcție de evoluția clinică a bolii astfel încât produsul respectiv să conțină o cantitate maximă din agentul patogen;

- operațiunea de recoltare se va face, în condiții riguroase de asepsie, pentru a se evita contaminarea produsului cu agenți microbieni fără semnificație clinică;

- o atenție deosebită trebuie acordată etichetării (identitatea produsului) recipientelor cu produse recoltate și atașării unei fișe complete care trebuie să cuprindă pe lângă datele personale ale bolnavului (nume, prenume, vârstă, ocupație etc.) inclusiv adresă, și următoarele: Instituția (care a efectuat recoltarea), data recoltării (ziua și ora), produsul recoltat, diagnosticul clinic, examenul solicitat, tratamentul cu antibiotice, chimioterapice, alte informații (antecedente vaccinale etc.), semnătura 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 însămânțări 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 sângelui pentru examene microbiologice

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

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

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

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

Examenul microscopic al sângelui proaspăt sau al plasmii pe fond întunecat este posibil în prima săptămână de boală în febră recurentă, 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 sângelui. Această metodă constă din însămânțarea sângelui pe medii de cultură artificiale, în vederea izolării și identificării agentului cauzal.

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

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

În unele boli infecțioase cu bacteriemie obligatorie (febră tifoidă, bruceloză), șansele 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 sângelui se va face înainte

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

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

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

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

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

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

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

Recoltarea secrețiilor purulente

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

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

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

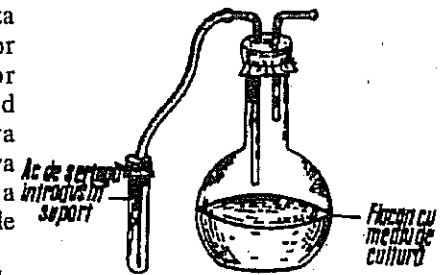


Fig.13. Set de transfer pentru hemoculturi.

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

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

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

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

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

Caracterele macroscopice ale puroiului recoltat permit orientarea către un anumit germen deoarece:

- stafilococul produce un puroi cremos, vâcos;
- streptococul, un puroi serofibrinos, clar, mai puțin vâcos;
- meningococul, un puroi vâcos, cu reflexe verzi;
- 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 anterioară unde se pot găsi specii bacteriene saprofite, nu conține floră microbiană. Apariția unei secreții uretrale trebuie considerată proces patologic infecțios.

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

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

În mod normal *secreția vaginală* este un transudat al mucoasei vaginale care conține celule epiteliale de descumare și unii germeni saprofiți variabili în funcție de vârstă și starea fiziologică a femeii. De la pubertate și până la menopauză cavitatea vaginală a femeii sănătoase este populată cu bacili 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 uretră, cu ajutorul unei anse sterilizate prin flambare și răcită, sau cu tampoane

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

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

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

Recoltarea exsudatului nazo-faringian și amigdalian

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

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

Recoltarea se face dimineața, pe nemâncate sau la cel puțin 3-4 ore după masă.

De regulă se utilizează cel puțin două tampoane: unul pentru exsudatul amigdalo-faringian și altul pentru exsudatul nazal.

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

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

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

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

Recoltarea sputei

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

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

În cazuri speciale, secreția bronșică se va recolta prin aspirare în cursul bronhoscopiei iar la copiii 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 lichidului cefalorahidian

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

Recoltarea urinei

Recoltarea urinei se face înainte de administrarea de antibiotice sau chimioterapice.

La bărbați, se recomandă ca bolnavul să-și facă toaleta glandului cu apă caldă și săpun. Primele jeturi de urină, fiind contaminate cu floră microbiană saprofită, sunt îndepărtate; în continuare, se recoltează 20-30 ml urină în recipiente cu dop sterile (flacoane cu gât larg, borcane etc.).

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

Explorarea fiecărui rinichi în parte este posibilă prin recoltarea separată a urinei 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 toaletă locală urmată de tamponarea meatului urinar cu ser fiziologic steril. Recoltarea se face într-un flacon de sticlă cu gâtul larg, steril.

Recoltarea sterilă cu sonda se face numai în spitale și numai în cazuri excepționale.

Pentru cercetarea 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 temperatura laboratorului mai mult de 2 ore de la recoltare nu mai poate fi utilizată pentru examene bacteriologice corecte.

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

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

Recoltarea materiilor fecale pentru coproculturi

Flora microbiană prezentă în materiile fecale este foarte complexă. Ea variază mult în funcție de vârstă și alimentație. Speciile bacteriene patogene pentru aparatul digestiv sunt, de asemenea, numeroase. În plus, chiar și unii germeni care populează intestinul omului sănătos, cum sunt *B. proteus*, *B. piocianic*, *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 germeni. Materiile fecale sunt recoltate în recipiente speciale numite *coprocultoare* (Fig.14).

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

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

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

Tehnici speciale de recoltare:

Pentru dizenteria bacilară, prelevarea se face cu ajutorul sondei Nelaton nr.16-18, în toate cazurile de dizenterie acută, sau cronică, pentru depistarea purtătorilor etc.

Sonda, sterilizată prin fierbere, se umezește cu soluție fiziologică sterilă, înainte de introducerea în rect. La adult se introduce 15-20 cm, la copii 10-12 cm, în 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.

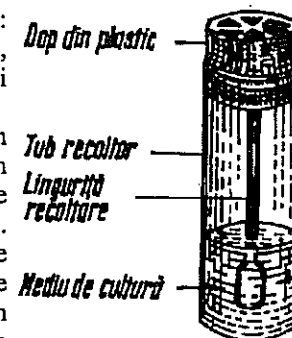


Fig.14. Coprocultor.

Pentru febra tifoidă și holeră, când examinarea nu se poate face imediat, materiile fecale se introduc într-un lichid conservant.

Pentru virusuri, depistarea excretorilor de virus se face prin prelevarea fecalelor cu tamponi de vată (identice celor nazofaringiene) care se pregătesc în laborator, sterile, în tuburi cu 2 ml soluție Hanks cu 5% clorură de magneziu și antibiotice (500 U Penicilină + 500 micrograme Streptomycină/ml).

Pentru *paraziți intestinali*, cu excepția recoltelor pentru diagnosticul infecțiilor cu *E. histolytica*, proba de fecale se recoltează în general din scaun emis spontan fără utilizare de laxative sau purgative.

Din fecalele emise într-un vas curat se recoltează cu ajutorul linguriței care însoțește recoltorul, din diferite locuri o cantitate de aproximativ 50 gr., prelevând în special mucozitățile și zonele de sânge ale scaunului.

Macroelementele suspecte că reprezintă paraziți sau fragmente parazitare sunt recoltate separat în vase de sticlă, corespunzătoare (borcane închise ermetic sau cristalizatoare cu capac șlefuit) în soluție 10% formol în părți egale cu cantitatea de fecale.

Pentru oxiuri, prelevarea se face cu ajutorul unei baghete de sticlă, care are una din extremități introdusă într-un dop de cauciuc, iar la cealaltă extremitate are un pătrat de celofan cu laturile de 2 cm, fixat pe benzi elastice. Produsul este prelevat plimbând acest tampon prin pliurile regiunii perianale (raclaj perianal).

Recoltarea bilei

Tehnica recoltării (tubajul duodenal). Recoltarea se face dimineața, pe nemâncate după ce bolnavul își clătește gura cu soluție cloruro-sodică sterilă. Se introduce sonda Einhorn până la diviziunea 45. Apoi se culcă bolnavul pe partea dreaptă și, foarte încet, se introduce sonda până la diviziunea 65. În acest moment se face controlul radiologic pentru a se verifica poziția intraduodenală a sondei. Dacă sonda are o poziție corectă se adaptează seringă și se introduce o soluție coleretic-colagogă de sulfat de magneziu sau sulfat de sodiu 15 gr dizolvate în 30 ml apă.

Se așteaptă câteva minute și se aspiră cu seringă până ce apare bila B (galbenă) din care se recoltează aproximativ 10-20 ml.

Scuamele cutanate (fire de păr, vezicule, unghii)

Tehnica prelevării. Scuamele se prelevează de la periferia leziunii prin raclare cu chiureta, sau cu marginea unei lame de sticlă sau vârful unui bisturiu și se adună pe o lamă.

Din vezicule, bule, se prelevează, după înțepare cu acul de disociere, lichid cu pipeta Pasteur și două-trei fragmente de perete vezicular, tăiat cu forfecuța de la marginea leziunii, care sunt introduse într-un tub, sau așezat între lame.

Din unghii, se taie mici porțiuni din locul leziunii, cu forfecuța, iar cu lanțeta și acul de disociere se recoltează fața profundă a unghiei. Probele se pun între lame sau în tuburi mici.

2. RECOLTAREA APEI PENTRU EXAMENUL BACTERIOLOGIC ȘI FIZICO-CHIMIC

Aprovizionarea cu apă de bună calitate are o importanță deosebită pentru păstrarea și promovarea sănătății populației. Este cunoscut că o serie de boli infecțioase cu poarta de intrare digestivă, de origine bacteriană (febrele tifo-paratifoide, holera, dizenteria etc.) sau virală (hepatita A, poliomielita) au, în principal, drept cauză consumul de apă necorespunzătoare.

Este cunoscut faptul că prima și cea mai importantă condiție bacteriologică de potabilitate este lipsa oricărui germen patogen în apa de băut.

Recoltarea probelor de apă pentru examenul microbiologic trebuie executată în condiții de aseptie iar materialele utilizate trebuie să fie sterile.

Controlul sanitar de laborator cuprinde recoltarea și analiza probelor de apă de la *sursă*, din *instalațiile de tratare a apei*, din *rezervoarele de înmagazinare* sau din *rețeaua de canalizare*. Acest control se face în mod permanent (controlul curent) și periodic (controlul complex) în anumite situații critice.

Controlul sursei de apă este diferit după cum este vorba de apă de suprafață sau apă de profunzime. La instalațiile de tratare a apei se fac zilnic prelevări de apă pentru controale fizico-chimice, bacteriologice și eventual biologice.

În rețeaua de distribuție, la punctul de intrare a apei în rețea, recoltarea și examinarea probelor se face cel puțin odată pe zi când apa este tratată și ocazional, la diferite intervale de timp, în funcție de numărul de persoane deservite, când apa nu este tratată. De asemenea, ori de câte ori se consideră necesar, se fac prelevări de probe din toate punctele reprezentative ale rețelei de distribuție (capete de rețea, zone în care se produc întreruperi repetate ale apei, intersecții cu rețele de canalizare sau depozite de gunoarie, rețea cu grad avansat de uzură și pierderi de apă etc.). În cazul rețelelor de apă cu distribuție intermitentă, recoltarea apei se face în doi timpi. În prima parte, se recoltează apa în momentul începerii distribuirii apei și aceasta spre deosebire de metoda obișnuită care cere ca apa să curgă 10 min. înainte de recoltare. După o anumită perioadă de timp se recoltează și cea de a doua probă de apă.

Pentru recoltarea probelor de apă necesare examenului de laborator sunt necesare următoarele *materiale*: sticle de 100-500 ml cu dop de sticlă, sterilizate, pentru examenul bacteriologic; sticle de 1000 ml, incolore, curate, pentru examenul fizico-chimic și biologic; aparate pentru recoltat apa din profunzime; un ghem de sfoară subțire, foarfeci drepte; lampă de benzină; ladă izotermă; termometru de maximă-minimă.

Pregătirea materialului pentru recoltarea apei

Flacoanele se astupă cu un dop de vată hidrofobă.

Dopul de sticlă se învelește separat în hârtie și se leagă apoi de gâtul sticlei.

Pentru recoltarea apelor din profunzime se montează flaconul în aparatul respectiv și apoi se împachetează întreg dispozitivul în hârtie. În lipsa aparatelor speciale, flacoanele de sticlă se îmbracă în manșoane de plumb fixate cu sfoară. Materialele

astfel pregătite se sterilizează la 160-180°C, căldură uscată timp de 1 oră sau la 120°C căldură umedă, timp de 20 min. Flacoanele cu dop de cauciuc se vor steriliza numai la căldură umedă.

Luarea probelor pentru examenul bacteriologic

De la rețeaua de distribuție se alege un robinet bransat la o conductă principală. După curățirea și flambarea robinetului, acesta se deschide și se lasă să curgă apa 3-10 min., după care se micșorează debitul apei și se umplu flacoanele până la 2-3 cm sub dop. Se va evita contaminarea, din afară, a gâtului sticlei și a dopului.

Din cursuri de apă, rezervoare, lacuri, fântâni sau izvoare, apa se va recolta cu ajutorul aparatelor sau dispozitivelor amintite, recoltarea făcându-se la nivelul punctului de captare.

Luarea probelor pentru examenul biologic și fizico-chimic se va face în recipiente de 1000 ml bine curățite, după ce acestea au fost clătite cu apă din sursa ce urmează a fi cercetată.

Din rețeaua de distribuție se recoltează după ce obiectul a fost curățit și apa a fost lăsată să curgă 10 min.

Din fântâni cu pompe, după pompare timp de 20 min.

Din fântâni cu găleată se recoltează de la 10-30 cm sub nivelul apei.

Din izvoare se va recolta punctul de scurgere liberă.

Din rezervoare se va recolta proba la punctul de ieșire.

Transportul apei la laborator se va face în lăzi izoterme cu gheață, în decurs de 6 ore pentru apele impure și de 10 ore pentru apele pure, probele fiind menținute la o temperatură de 6-10°C.

Recoltarea probelor de gheață. Cu o secure sterilizată prin flambare se sparge gheața cât mai departe de mal și se recoltează în bloc de 50/50 cm, care se introduce într-o cutie din de metal sterilă. În laborator se vor recolta bucăți de gheață din interiorul blocului, utilizând instrumente sterile. Bucățile de gheață se introduc în pahare sterilizate și se lasă să se topească. Din apa de topire a gheței se efectuează apoi examenul bacteriologic și chimic.

Notarea probelor. Probele de apă pentru analiză vor fi însoțite de o fișă în care se menționează: numele și calitatea persoanei care a recoltat proba; localitatea și denumirea sursei de apă; utilizarea apei; data și ora când s-a recoltat proba; temperatura apei în momentul recoltării probei; scopul analizei.

Se va face o descriere a sursei, a instalațiilor de captare sau extragere și a condițiilor igienico-sanitare ale sursei respective.

3. RECOLTAREA ALIMENTELOR PENTRU CONTROLUL SANITAR

Controlul sanitar al alimentelor se face în scopul de a preveni îmbolnăvirea oamenilor, prin consumarea unor alimente alterate, toxice sau contaminate cu germeni patogeni. Totodată, prin control, se urmărește și calitatea produselor alimentare.

Controlul alimentar se face în cadrul circuitului tehnologic la locurile de depozitare, în localurile de consumație și în timpul transportului.

Odată cu alimentele se vor controla și instalațiile, utilajele și vesela care se utilizează la prepararea alimentelor, precum și ambalajele și mijloacele de transport.

O atenție deosebită se acordă controlului prin examene de laborator al persoanelor care manipulează alimente.

Controlul alimentar prezintă două aspecte:

- controlul *preventiv*, care se efectuează periodic, în toate fazele circuitului produsului respectiv și se execută conform indicațiilor din standarde, normelor interne de fabricație sau normelor stabilite de Ministerul Sănătății;

- controlul *curent*, care interesează produsul alimentar finit, destinat consumului. Acest control se efectuează cercetându-se aspectele de alterare sau falsificare a produsului.

În general, la **recoltarea și expedierea probelor alimentare** în vederea examenului bacteriologic și chimic se va ține seama de următoarele recomandări:

- probele recoltate trebuie să fie reprezentative. Pentru aceasta se vor recolta probe din diferite ambalaje, apoi se vor amesteca. Din acest amestec se vor lua apoi probele pentru analiza de laborator;

- se vor lua două probe identice: una pentru analiza de control, care se va trimite la laborator, și alta pentru contra-expertiză, care se va lăsa la depozitul respectiv;

- pentru controlul alimentelor care se alterează ușor se va recolta o singură probă;

- probele se vor ambala în borcane curate de sticlă sau în pungi, apoi se vor sigila și eticheta. Pe etichetă se va specifica unitatea de la care s-a ridicat proba, felul produsului, data recoltării, numărul procesului verbal de recoltare și semnătura persoanei care a ridicat proba;

- se va întocmi un proces verbal de recoltare, după normele existente și un exemplar se va expedia împreună cu proba la laborator;

- expedierea se va face preferabil prin curier, după ce probele au fost ambalate în cutii de lemn.

Exemple: **La recoltarea probelor de carne în vederea examenului bacteriologic** se vor respecta următoarele indicații:

- se recoltează ganglioni, organe interne sau țesut muscular, în raport cu boala bănuită;

- probele se recoltează cu instrumente sterilizate, fără a face secțiuni în interiorul fragmentelor recoltate;

- probele se introduc în borcane de sticlă, tăvi sau cutii metalice nichelate sau cositorite, sterilizate;

- probele se pot împacheta și în hârtie de pergament, pe care se notează felul probei și regiunea din care s-a făcut recoltarea;

- toate probele recoltate de la același animal se introduc într-o cutie de metal bine închisă, luându-se măsuri să nu se răspândească în cursul transportului germenii infecțioși;

- probele vor fi trimise la laborator prin curier și vor fi însoțite de un proces verbal de recoltare, în care se vor menționa: unitatea care face trimiterea, data și ora recoltării probelor, specia animalului de la care s-a luat proba, ziua și ora tăierii animalului, informații asupra antecedentelor animalului și ale leziunilor constatate, numărul și felul probelor trimise, diagnosticul prezumtiv și examenul cerut și denumirea organului care a recoltat probele.

Recoltarea probelor de lapte și produse lactate pentru examenul bacteriologic. Pentru recoltarea probelor se vor utiliza recipiente sterilizate. Pentru produsele lichide se vor folosi butelii cu dop șlefuit. Pentru produsele solide se vor utiliza recipiente cilindrice cu deschidere largă. Produsele lichide se vor omogeniza înainte de recoltare cu o lingură sterilizată. După omogenizare se recoltează, cu o lingură sterilizată, 100 ml produs în recipiente sterile. Aceste recipiente se închid imediat și se răcesc sub 5°C. Analiza bacteriologică se va face în cel mult 4 ore de la recoltarea probei.

Laptele concentrat se va recolta, flambându-se întâi cutia de metal, care se va deschide cu un perforator steril. După deschidere se recoltează steril aproximativ 25 gr produs, din care se cântăresc exact 10 gr care se diluează în 10 ml soluție citrat de sodiu 1,25% sterilă.

Laptele praf se recoltează cu o sondă sterilă, luându-se din diferite puncte ale ambalajului aproximativ 50 gr produs. Din această probă medie se cântăresc 10 gr care se dizolvă apoi în 90 ml soluție citrat de sodiu 3,5% sterilizată și încălzită în prealabil la 45°C.

Untul se recoltează cu o sondă sterilizată, din 2-3 puncte ale blocului. Astfel se realizează o probă medie, care se topește pe baia de apă la 45°C.

Brânzeturile se recoltează cu ajutorul unui cuțit steril sau al unei sonde sterile. Se recomandă să se recolteze bucăți întregi din care să se facă însămânțările în laborator.

Cap.VIII. EXAMENUL MICROBILOR

Din cauza dimensiunilor foarte reduse, microorganismele nu pot fi văzute decât cu ajutorul unor instrumente și aparate optice.

Caracterele morfologice ale coloniilor bacteriene se studiază în detaliu cu ajutorul lupei dar forma și structura microorganismelor nu pot fi cercetate decât cu ajutorul microscopului optic și al celui electronic.

Cu ajutorul microscopului optic bacteriile pot fi examinate fie în stare nativă, fie după ce sunt fixate și colorate.

1. EXAMENUL PREPARATELOR NATIVE

Preparatele native (umede, necolorate) se pot face dintr-o cultură microbiană sau direct din produs. Ele sunt examinate, de regulă, între lamă și lamelă. Se ia cu ansa sau cu o pipetă Pasteur o picătură din cultura lichidă sau din cultura suspensionată în soluție salină fiziologică și se depune pe o lamă curată și degresată, peste care se pune o lamelă curată.

Pentru examinare se plasează preparatul nativ pe platina microscopului, se centrează lumina, se închide mult diafragma, se coboară condensatorul și se aduce în dreptul preparatului un obiectiv uscat. Se apropie mult de preparat lentila frontală a obiectivului cu ajutorul macrovizei, după care se ridică treptat obiectivul până la apariția imaginii, care este pusă la punct cu ajutorul vizei micrometrice.

Pe preparatele native sunt evidențiate existența, forma și mobilitatea microorganismelor (care nu trebuie confundată, însă, cu mișcările browniene).

După examinare, preparatele care conțin germeni vii trebuie puse într-un cristalizator cu amestec sulfocromic.

Preparatele native pot fi examinate și pe fond întunecat, precum și prin procedul contrastului de fază.

2. EXAMENUL PREPARATELOR COLORATE

Preparatele colorate prezintă avantajul că sunt sterilizate prin fixare, sunt ușor de manipulat și de examinat și pot fi păstrate mult timp. Aceste preparate permit diferențierea bacteriilor după afinitatea lor pentru anumiți coloranți și pot evidenția unele elemente structurale (cili, capsulă, spori, granulații etc.) prin colorații speciale.

Examinarea preparatelor colorate se face astfel: se centrează lumina, se ridică condensatorul, se lasă diafragma deschisă și se pune o picătură de ulei de cedru pe frotiu.

Cu ajutorul macrovizei se coboară tubul optic și se introduce lentila frontală a imersiei în ulei de cedru până în imediata apropiere a frotiului. Punerea la punct se face cu ajutorul vizei micrometrice, iar deplasarea lamei pentru schimbarea câmpurilor microscopice se obține cu ajutorul carului mobil.

După examinare se ridică obiectivul, se șterge uleiul de cedru de pe imersie și se scoate lama de pe platina microscopului.

3. COLORANȚI ȘI COLORAȚII

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

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

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

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

Colorarea germenilor omorâți este cea mai utilizată în microbiologie.

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

Operații pregătitoare în vederea colorării

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

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

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

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 aceștia, contribuind astfel la obținerea unei colorații mai intense și de o calitate mai bună. Pentru coloranții bazici se folosesc mordanți acizi (acid tanic, acid picric etc.) iar pentru coloranții acizi se folosesc mordanți bazici (sulfat de fier, 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 hârtie 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 substanța colorantă astfel: 1 gr de colorant (cristale) este mojarat și dizolvat în 10 ml alcool. Se adaugă apoi 2 ml fenol și o parte din apa distilată. După ce se amestecă bine, se trec într-un flacon de sticlă în care se adaugă și restul de apă distilată până la 100 ml. Soluția astfel preparată se menține 24 h la termostat, la 37°C, apoi se filtrează prin hârtie de filtru și se transvazează într-o sticlă picătoare, fiind bună de folosit. Soluțiile apoase de colorant nu pot fi păstrate un timp prea îndelungat, deoarece se degradează.

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

Colorațiile pot fi simple, diferențiale și speciale.

Colorațiile simple

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

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

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

Colorațiile diferențiale

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

Tehnica colorației este următoarea:

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

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

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

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

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

Tehnica folosită pentru colorație:

- frotiul uscat se fixează la flacără;

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Metoda Zettnow. Colorația după această metodă se desfășoară astfel:

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

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

- se pune lamela în apă distilată timp de 3 min., după care se introduce într-o soluție de 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 clătește bine în apă distilată;

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

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

Metode de colorare a sporilor

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

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

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

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

Sporii apar colorați în verde-albăstrui, 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 *leptospirelor*.

Tehnica este următoarea:

- frotiul uscat nu se fixează la flacără;

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

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

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

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

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

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

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

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, hematozoarul se colorează în albastru-violet etc.

Cap.IX. PATOGENITATEA MICROORGANISMELOR ȘI PROCESUL INFECȚIOS

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

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

Relația de *comensalism* presupune că germenii comensali nu pot trăi decât în contact sau în imediata apropiere a celulelor umane sau animale. Aceștia se dezvoltă pe 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 asociație și atunci este vorba de *simbioză*. Se cunoaște faptul că unele bacterii ale tubului digestiv sintetizează vitamina K sau unele vitamine din grupul B indispensabile omului, dar pe care acesta nu le poate produce. De asemenea, prezența florei intestinale normale, și implicit a unor antigene microbiene după naștere, solicită sistemul imunitar și formarea de imunoglobuline. Simbioza se mai poate manifesta și prin efectul antagonizant, de barieră, pe care îl are flora normală față de unele bacterii sau ciuperci microscopice patogene.

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

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

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

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

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

produce perturbări în funcționarea normală a organismului. Virulența poate varia foarte mult de la o specie bacteriană la alta, iar în cadrul aceleiași specii, de la o tulpină la alta. Mai mult, la aceeași tulpină bacteriană virulența poate crește prin treceri repetate dintr-un organism în altul sau poate diminua prin menținerea îndelungată pe medii de cultură artificiale.

Acest atribut al patogenității unei bacterii poate fi măsurat în laborator prin inocularea sa în cantități gradate, pe anumite căi (subcutan, intraperitoneal, intracerebral etc.) la animale susceptibile (ex. cobai pentru B.Koch, șoarece pentru B.antrax sau pneumococ). În continuare se urmărește mortalitatea și se determină DCL (*doza certă letală*), care reprezintă numărul minim de microorganisme ce produce moartea sigură a unui animal sau/și mai corect DL₅₀ (*doza letală 50%*), care reprezintă numărul de germeni (calculat statistic) ce produce moartea a 50% din animale. Este de la sine înțeles că o tulpină este cu atât mai virulentă cu cât DCL sau DL₅₀ este mai mică.

Doza letală minimă(DLM) a unei toxine este cantitatea minimă capabilă să omoare un animal sensibil, într-un anumit interval de timp.

În general, tulpinile bacteriene capsulate sunt mai virulente deoarece sunt mai rezistente la fagocitoză.

Toxigenza este proprietatea anumitor germeni patogeni de a produce anumite substanțe toxice pentru organism. Acestea sunt de trei feluri: exotoxine, endotoxine și metaboliți toxici.

Exotoxinele sunt substanțe proteice secretate de unele bacterii cum sunt: b.tetanic, b.difteric, b.botulinic, b.dizenteric etc. Ele au câteva proprietăți comune:

- sunt de natură proteică, fiind distruse prin încălzire;
- sunt foarte antigenice; introduse în organism produc titruri înalte de anticorpi, antitoxine (antitetanică, antidifterică etc.);
- acționează în cantități foarte mici, fiind foarte toxice; produc leziuni specifice (pe sistemul nervos, cord, glandele suprarenale etc.);
- prin încălzire la temperaturi moderate sau prin tratarea cu formol în anumite concentrații, exotoxinele își pierd toxicitatea, dar își păstrează capacitatea antigenică, adică proprietatea de a induce antitoxine. Prin aceste procedee se prepară vaccinurile antitoxice (tetanic, difteric), care mai sunt cunoscute și sub numele de *anatoxine* sau *toxicoizi*.

Toxinele pot fi tratate atât "in vitro" (de exemplu, reacția de floclulare), cât și "in vivo" (reacția de sero-neutralizare toxină-antitoxină).

Endotoxinele sunt substanțe complexe (fosfo-lipo-polizaharide) care compun peretele celular al bacteriilor Gram-negative(salmonelle, b.dizenteric, b.coli etc.) și care nu pot fi puși în libertate decât prin dezagregarea germenului respectiv. Datorită compoziției lor chimice, endotoxinele sunt destul de rezistente la căldură. Ele sunt mai slab antigenice decât exotoxinele, iar activitatea lor patogenă este lipsită în mare măsură de specificitate; în anumite concentrații toate endotoxinele produc febră, stare de șoc, necroză locală.

Metaboliții toxici sunt enzime extracelulare cu capacitate nocivă pe care germenii patogeni le eliberează în țesuturile infectate. Dintre acestea menționăm câteva mai importante și modul lor de acțiune: *hemolizina* produce dezintegrarea hematiilor; *leucocidina* distruge leucocitele și diminuează fagocitoza; *hialuronidaza* produce hidroliza acidului hialuronic – component de bază al cimentului intracelular – și prin aceasta favorizează diseminarea infecției; *coagulaza* produce coagularea plasmei, care are drept consecință împiedicarea pătrunderii fagocitelor în focarul infect; *fibrinolizina* lizează fibrina și favorizează răspândirea agentului patogen în organism; *lecitinaza* produce hidroliza lecitinei din țesuturi.

Contactul și pătrunderea germenilor în organism

Locul pe unde germenii pătrund în organism se numește *poarta de intrare*. Ținând cont de căile de pătrundere a agentului patogen, infecțiile se împart în:

- infecții aerogene sau prin inhalare - cu poarta de intrare nazofaringele;
- infecții digestive sau prin ingestie - cu poarta de intrare tubul digestiv;
- infecții prin inoculare - pe calea tegumentelor și mucoaselor care au suferit înțepături, zgârieturi, mușcături, intervenții și manevre medicale diverse (ace de seringă, catetere, sonde etc.).

Evoluția infecției și multiplicarea microbilor

Odată pătrunși în organism, germenii toxigeni fără posibilitate de invazie rămân cantonați la poarta de intrare, unde, după adaptare, încep să se multiplice și, apoi, să se elibereze toxinele care sunt răspândite în organism pe diverse căi; pe cale sanguină cea difterică, pe cale nervoasă cea tetanică. Germenii respectivi produc infecții de tip toxic.

Alți germeni se răspândesc, de la poarta de intrare, din aproape în aproape, în suprafață sau în profunzime și, prin porii vaselor limfatice - de dimensiuni mai mari decât cei ai capilarelor - pot ajunge la nivelul ganglionilor regiunii respective, realizând o infecție localizată. Cei dotați cu o virulență deosebită și o invazivitate mare, ajung pe calea limfatică în circulația sanguină, producând infecții generalizate grave, septicemii. Când germenii sunt decelați în sânge în mod pasager și fără manifestări clinice, avem de-a face cu *bacteriemia*.

Septicemia este o situație caracterizată printr-un tablou clinic deosebit de grav și în care bacteriemia este obligatorie. Pentru realizarea acestei stări este necesar ca între focarul primitiv și torrentul sanguin să existe o cale de legătură, iar germenii, aflați continuu sau intermitent în circulație, să realizeze focare secundare în diverse organe, care, apoi, devin focare noi ce infectează sângele. Bacteriile deversate în sânge se pot localiza și multiplica în viscere sub formă de abcese metastatice multiple producând starea extrem de gravă cunoscută sub numele de *septicopioemie*.

Eliminarea germenilor. Din organism, germenii se elimină pe diferite căi, în funcție de localizarea procesului infecțios:

- în cele aerogene, prin secrețiile nasofaringiene și spută;

- în cele intestinale, prin fecale și bilă;
- în cele generalizate, prin urină;
- în cele localizate, prin exsudatul respectiv.

Aceste căi trebuie cunoscute atât de clinician cât și de omul de laborator, pentru că reprezintă locul unde se fac investigații pentru depistarea germeilor.

Perioadele unei boli infecțioase. O boală infecțioasă se desfășoară într-o serie de perioade ce se succed și care trebuie cunoscute, fiecare având o importanță deosebită.

- **Perioada de incubație** începe odată cu pătrunderea germenului în organism și durează până la apariția primelor tulburări. Este perioada în care microbul se adaptează și se multiplică. De cele mai multe ori, durata ei este caracteristică fiecărei boli. Are o deosebită importanță din punct de vedere epidemiologic, deoarece fixează timpul cât un contact cun un bolnav trebuie ținut în carantină.

- **Perioada de invazie sau de debut.** Începutul bolii poate fi insidios sau brusc, cu manifestări necaracteristice, aceleași pentru mai toate bolile: indispoziție generală, inapetență, dureri musculare, cefalee, astenie, febră.

- **Perioada de stare.** Este perioada al cărei început este marcat de apariția semnelor clinice caracteristice bolii infecțioase. Durata ei și intensitatea fenomenelor sunt în funcție de agresivitatea germenului și de rezistența organismului. În timpul acestei perioade pot apărea complicații, ce agravează evoluția bolii și care nu au legătură cu semnele care se întâlnesc în mod normal în evoluția sa.

- **Perioada finală.** Este perioada în care se poate produce *decesul* sau poate apare o *perioadă de convalescență*, când începe revenirea la normal a febrei și stării clinice. Uneori convalescența este întreruptă de o redeşeptare a procesului infecțios, de o *recădere*.

Vindecarea se poate face fără urmări sau cu urmări nedorite și atunci vorbim de *sechele* care, cel mai adesea sunt definitive.

Vindecarea poate fi totală, clinic și bacteriologic, sau numai clinic, bolnavul rămânând timp mai scurt sau mai îndelungat *purtător de germeni*. Această stare de purtător are importanță, întrucât germenii fostului bolnav pot fi transmiși pe diferite căi indivizilor din jurul lui.

Forme evolutive ale infecțiilor. Infecțiile se pot prezenta sub următoarele forme:

- **infecții inaparente.** Sunt infecții care nu au nici o simptomatologie și numai examenul de laborator pun în evidență germenul. Această lipsă a manifestărilor clinice se datorește fie unei rezistențe deosebite a organismului, fie unei virulențe extrem de scăzute a microbului invadator. Dacă pentru individ acest gen de infecție nu prezintă o problemă, pentru colectivitatea din jurul lui prezintă una de care trebuie ținut seama. Nefiind obligat să stea la pat, bolnavul se mobilizează și constituie sursă necunoscută de noi focare de infecție;

- **infecții subclinice.** Sunt forme ușoare, cu o simptomatologie ștearsă;

- **infecții abortive.** Forme cu simptomatologie săracă și de cele mai multe ori atipică;

- **infecții clinice aparente.** Sunt formele cele mai frecvent întâlnite și pe care intensitatea fenomenelor le împarte în: ușoare, medii și grave.

În raport cu *sursa de infecție*, se deosebesc:

- **infecții exogene** – cu germeni din afară;

- **infecții endogene** – cu germeni existenți în organism și care își exaltă virulența.

Infecțiile pot fi *simple*, cu un singur germene, sau *mixte*, cu mai multe specii microbiene, ca în cazul gangrenei gazoase.

De asemenea, în funcție de caracterele de patogenitate ale agentului microbial, infecțiile pot fi:

- infecții datorate multiplicării germenilor netoxigeni (infecțiile pneumococice);

- infecții datorate germenilor toxigeni (toxiinfecția tetanică și difterică, gangrena gazoasă);

- infecții datorate bacteriilor cu putere invazivă și capacitate toxigenă, combinate (infecțiile stafilococice, infecții cu bacterii Gram-negative).

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

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

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

1. REZISTENȚA NATURALĂ (IMUNITATEA NATURALĂ)

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

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

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

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

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

Bariera de protecție de profunzime este constituită dintr-o *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 produșii de metabolism ai microorganismelor antrenează o serie de substanțe chimice (histamină etc.) care produc o acțiune celulară ce se exprimă prin inflamație.

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

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

Fenomenul de fagocitoză se derulează în mai multe etape:

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

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

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

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

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

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

2. IMUNITATEA SPECIFICĂ DOBÂNDITĂ

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2.1. ANTIGENELE

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

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

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

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 derivați ai aminoacizilor.

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

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

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

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

Anticorprii sunt proteine plasmatiche specializate (imunoglobuline) care reacționează specific cu antigenele care au stimulat producerea lor. Ei sunt efectorii moleculelor principali ai sistemului imun umoral.

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

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

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

Anticorprii se găsesc în fracțiunea gama a globulinelor. Această fracțiune se dividează 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 (γ = gama, α = alfa, μ = miu, δ = delta și ϵ = epsilon) care se deosebesc între ele prin secvența aminoacizilor care le conferă proprietăți antigenice distincte.

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

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

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

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

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

Clasa IgE, este constituită din anticorpi "reaginici". În momentul în care pătrunde în organism un alergen, anticorprii IgE fixați citofil îl recunosc specific ca antigen și astfel se transmit semnale la celulă care eliberează prompt, în cantități mari, amine vasoactive de tipul histamină, serotonină. Acestea provoacă contracția mușchilor netezi și permeabilizarea vaselor sanguine, generând simptomatologia clinică a hipersensibilității de tip imediat.

2.3. IMUNITATEA UMORALĂ

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

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

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

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

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

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

La un stimul primar plasmocitele răspund prin sinteză de anticorpi care apar în sânge după 8-10 zile. Într-o primă fază, acești anticorpi aparțin clasei IgM. Anticorprii 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 neutralizanți antitetanici, antidifterici, antistafilolizine, 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.

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

În general răspunsul umoral este dominat de opsonizare și este 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 MEDIATĂ CELULAR

Răspunsurile imune mediate de celule și cele mediate de anticorpi nu pot fi strict separate, deoarece nici un răspuns mediat celular nu are loc în absența totală a anticorpilor iar în inițierea răspunsului în anticorpi sunt implicate diferite tipuri de celule. Totuși, în unele situații rolul principal de apărare revine imunității celulare (eliminarea celulelor 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-citotoxice* (supresoare) după modul lor de acțiune, iar celulele T-efectoare constau la rândul lor din două subpopulații, *celule T-secretoare* de factori biologici activi (limfokine) și *celule citotoxice* (ucigașe) care determină moartea celulei țintă prin contact direct cu antigenele de pe membrana acesteia și inducerea unui efect biochimic citotoxic.

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

2.5. APLICAȚII PRACTICE ALE IMUNOLOGIEI ÎN PATOLOGIA INFECȚIOASĂ

Înșușirea noțiunilor de bază ale imunologiei generale permite înțelegerea și aprecierea mai corectă a importanței pe care o prezintă pentru practica medicală folosirea unor biopreparate (vaccinuri, antigene de diagnostic, seruri imune terapeutice și de diagnostic etc.) în profilaxia și tratamentul unor boli infecto-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 câțiva ani.

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

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

Vaccinurile constituie una din cele mai valoroase metode în profilaxia bolilor infectioase. Prin vaccinare s-a obținut scăderea spectaculoasă a incidenței unor afecțiuni 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 loturile vaccinate.

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

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

În funcție de criteriile avute în vedere, vaccinurile pot fi *clasificate* în vaccinuri bacteriene și vaccinuri virale, vaccinuri inactivate și vaccinuri vii, vaccinuri totale și extracte microbiene, vaccinuri corpusculare și anatoxine bacteriene etc.

În prezent, în țara noastră există vaccinări profilactice obligatorii și vaccinări preventive ocazionale, facultative. În prima categorie intră vaccinurile poliomielitice, rujeolos, BCG, pertussis, tetanic și difteric. Ultimele trei se administrează de obicei asociate DiTePe, dar ele se pot administra, în funcție de necesități, și asociate DiTe sau fiecare, separat.

Din grupa vaccinurilor administrate în funcție de situația endemo-epidemiologică fac parte vaccinurile tifoidic, holeric, dizenteric, gripal.

Vaccinul tetanic se poate administra și în scop curativ iar vaccinurile rabic, stafilococice și streptococice se administrează numai în scop terapeutic.

Vaccinurile preparate din agentul patogen (stafilococ, streptococ, E.coli etc.) izolat de la pacient se numesc *autovaccinuri* și ele nu se administrează decât cu indicația medicului și numai pacientului respectiv.

Fiecare lot de vaccin are un număr de control de stat și un termen de valabilitate, inserate pe ambalaj și fiolă. Calitățile vaccinului sunt garantate în termenul de valabilitate, numai dacă acesta este conservat în condițiile prescrise de instrucțiuni (produsul trebuie păstrat la o anumită temperatură, ferit de lumină etc.). De asemenea, înainte de administrare, pe lângă termenul de eficacitate se controlează fiola cu vaccin care nu trebuie să prezinte fisuri și trebuie să fie marcată corect iar conținutul ei trebuie să corespundă caracteristicilor prevăzute de instrucțiunile de utilizare (clar, necolorat, suspensie uniformă etc.). În caz contrar, fiola sau seria respectivă de vaccin nu trebuie utilizată.

2.5.2. Imunitatea pasivă

Este imunitatea dobândită prin transfer de anticorpi sau de celule limfoide sensibilizate provenind de la un alt individ imunizat cu antigenul corespunzător. În această categorie intră administrarea de ser de convalescent, de ser antitoxic sau de imunoglobuline specifice, transferul transplacentar de anticorpi de la mamă la făt, de anticorpi de tip IgA din colostru sau lapte de la mamă la sugar. Imunitatea pasivă se instalează imediat dar durează numai 10-15 zile.

Serurile imune se pot clasifica după *antigenul utilizat* la imunizare în seruri *antitoxice* (serul antitetanic, antidifteric etc.), seruri *antimicrobiene* (serul antimeningococic) și seruri *mixte* (serul antidizenteric, antitoxic și antimicrobian) sau după *conținut* ele se clasifică în seruri *native*, seruri *concentrate și purificate* (care conțin o cantitate mai mare de anticorpi și au avantajul de a fi mai puțin reactogene) și *gammaglobuline specifice* (conțin aproape numai anticorpi).

Protecția pasivă este eficace mai ales pentru prevenirea unei infecții și poartă numele de *seroprofilaxie*.

După ce boala s-a declanșat, el este mai puțin eficace și atunci poartă numele de *seroterapie*.

Imunoglobulinele "standard" sunt eficace la indivizii cu deficit în producerea de anticorpi. Administrarea de imunoglobuline specifice asigură titruri mai ridicate în anticorpi specifici.

Este cunoscut faptul că serurile imune profilactice sau terapeutice preparate pe animale (în special cai) pot produce accidente grave (șoc anafilactic, boala serului) și din această cauză sunt din ce în ce mai puțin utilizate. Este preferabil să se utilizeze ser recoltat de la oameni imunizați sau, și mai bine, fracțiunea gammaglobulinică din aceste seruri.

Trebuie de asemenea atrasă atenția asupra faptului că, așa cum se procedează în cazul vaccinurilor, și în cazul serurilor imune trebuie avute în vedere modul corect de conservare și respectarea termenului de eficacitate a lotului respectiv.

Cap. XI. REACȚII ANTIGEN-ANTICORP UTILIZATE ÎN DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL BOLILOR INFECȚIOASE

Reacțiile dintre antigen și anticorp sunt reacții serologice. Aceste reacții rezultă ca urmare a punerii în contact a grupărilor determinante (epitop) ale antigenului cu situsul de combinare (paratop) al anticorpului. Interacțiunea primară dintre antigen și anticorp se manifestă "in vitro" prin interacțiuni secundare care conduc la precipitarea, aglutinarea sau liza antigenului. Liza antigenului se produce cu participarea complementului. Anticorpul care intervine în aceste reacții poartă numele de precipitină, aglutinină, lizine.

Reacțiile serologice, datorită specificității celor doi reactanți, servesc la identificarea antigenelor sau anticorpilor dacă unul din cei doi reactivi este cunoscut. Astfel nivelul sau titrul anticorpilor dintr-un ser imun de om sau animal poate fi determinat cu ajutorul antigenelor cunoscute (sero-diagnostic). Diluția cea mai mare de ser la care reacția este vizibilă, constituie *titrul* serului. La fel, cu ajutorul unor anticorpi cunoscuți pot fi identificate diferite antigene microbiene sau de altă natură. În acest fel pot fi identificate diverse microorganisme izolate de la un pacient bolnav (sero-tipaj).

Se cunosc numeroase reacții antigen-anticorp utilizate în microbiologie și de obicei ele sunt denumite după natura antigenului și manifestarea vizibilă a reacției.

I. REACȚIA DE PRECIPITARE

În reacțiile de precipitare antigenul se prezintă sub formă solubilă (macromoleculară). Prin punerea în contact a antigenului macromolecular cu anticorpul corespunzător, se formează complexe antigen-anticorp. Reacția de precipitare este foarte specifică și foarte sensibilă.

Există diferite variante ale reacției de precipitare în funcție de mediul în care se produce reacția (lichid sau gelificat).

Aceste variante au o largă aplicabilitate practică atât în studierea unor antigene de proveniență bacteriană (toxine, extracte bacteriene de natură proteinică sau polizaharidică) sau virală (antigen Hbs) cât și în evidențierea unor proteine patologice prezente în serul bolnavilor cu procese inflamatorii, necrotice (proteina C reactivă), neoplazice (alfafetoproteina).

Reacții de precipitare în mediu lichid

a) Reacții de floculare

- *Metoda Ramon* în care se pun în contact cantități constante de antigen cu cantități variabile de ser imun care conține anticorpul specific.

Metoda se aplică în scopul stabilirii puterii antigenice a unei toxine sau anatoxine (ex. toxina difterică sau tetanică).

- *Metoda Dean și Webb* în care se pun în contact cantități constante de anticorp cu cantități variabile de antigen, în scopul stabilirii titrului unui ser hiperimun (ex. titrarea unui ser antidifteric preparat pe cai, față de o toxină difterică cu titrul cunoscut).

Metoda se folosește și la determinarea titrului de anticorpi antitoxici din serul unor persoane vaccinate cu anatoxină difterică sau tetanică precum și la stabilirea titrului serurilor hiperimune antitoxice terapeutice.

b) Reacția de precipitare în inel

În această reacție antigenul și anticorpul se pun în contact astfel încât să nu se amestece, creându-se o zonă de proporție optimă a concentrațiilor de antigen și anticorp. La interfața dintre cele două lichide apare un inel de precipitare.

- Reacția Uhlenhuth

Reacția se folosește pentru recunoașterea naturii unor proteine, în medicina legală. Se poate preciza dacă o pată de sânge de pe rufărie este de proveniență umană sau nu. În acest scop se pune în contact, în tub, antigenul de cercetat (pata de sânge suspensionată în soluție salină și filtrată) cu un ser imun precipitat anti-proteină umană. Rezultatul pozitiv este dat de apariția unui inel de precipitare, la locul de întâlnire dintre cele două elemente puse în contact.

- Reacția Ascoli

Se utilizează în diagnosticul retrospectiv al antraxului (cărbune). Din organele animalului suspectat de a fi decedat prin infecția cărbunoasă se prepară antigenul. Corpul bacilului cărbunos conține o fracțiune antigenică termostabilă care rezistă timp îndelungat în organele sau în pielea animalului.

Se pune în contact, într-un tub, ser anticărbunos și antigen preparat din organele animalului și, în cazul unei reacții pozitive, apare un inel de precipitare.

- Determinarea grupului streptococic

Din cultura de streptococ se prepară un extract polizaharidic după metoda Lancefield. Antigenul astfel preparat se pune în contact în tuburi cu lumen foarte îngust cu diverse seruri anti- de grup (A, B, C D, E, ... etc.) preparate pe iepuri. Tubul în care va apare inelul de precipitare indică apartenența de grup a streptococului.

c) Reacția de precipitare în tuburi capilare

Reacția se execută punând în contact antigenul cu anticorpul în tuburi capilare (vârfuri de pipete Pasteur).

- Determinarea tipului M streptococic

Extractul proteinic M preparat din sedimentul culturii de streptococ se pune în contact în tuburi capilare (prin absorbție) cu cantități egale de seruri antistreptococice de tip M preparate pe iepuri. Apariția unui precipitat abundent la baza unuia din tuburi indică apartenența de tip.

- Determinarea prezenței proteinei C reactive în serul bolnavilor

Proteina C reactivă se pune în evidență punând în contact în tuburi capilare cantități

egale de ser de bolnav și ser antiproteină C reactivă. Prezența unui precipitat indică o reacție pozitivă.

d) *Reacția de precipitare pe lamă*

În serul bolnavilor cu sindrom de coagulare intravasculară diseminată, apar produși de degradare ai fibrinogenului. Aceștia pot fi puși în evidență amestecând pe o lamă de sticlă câte o picătură din diluții de ser de cercetat cu ser antifibrinogen. Astfel se stabilește titrul produșilor de degradare ai fibrinogenului.

Reacții de precipitare în mediul gelifiat

Reacțiile de precipitare în acest caz se produc într-un mediu sub formă de gel obținut din agar sau agaroză într-o soluție de tampon veronal. Moleculele de antigen și anticorp pot migra prin polii gelului care are un conținut mare de apă.

Întâlnirea antigenului cu anticorpul în anumite concentrații duce la apariția unei linii de precipitare vizibilă.

a) *Difuzia simplă* (metoda Mancini)

Metoda este utilizată pentru determinarea cantitativă din serul de bolnav a unor fracțiuni proteice cum ar fi imunoglobulinele IgA, IgG, IgM (imunograma) sau a complementului. În cutii de polistiren cu diametrul de cca 5 cm se toarnă gelul de agar în care s-a înglobat într-o concentrație optimă un antiser: respectiv anti IgA, anti IgM, anti IgG sau anticomplement. În gel se introduc diverși coloranți pentru a deosebi plăcuțele între ele. Se creează godeuri cu un tub metalic cu diametru de 2 mm dispuse sub formă de rozetă cu o distanță corespunzătoare între ele. În godeuri se introduc cu ajutorul unor micropipete 5 μl din fiecare ser de cercetat iar în godeul central 5 μl dintr-un ser standard livrat de Institutul Cantacuzino cu o concentrație cunoscută de imunoglobuline sau complement. După termostatare, din godeuri vor migra antigenele proteice care vor întâlni antiserurile înglobate în gel și vor determina în jurul godeurilor cercuri de precipitat cu diametre variabile. Măsurând diametrul zonelor de precipitare, comparativ cu diametrul dat de serul standard cu concentrație cunoscută din diversele proteine, putem stabili cantitatea de imunoglobuline sau complement conținută de serurile de cercetat.

b) *Difuzia dublă*

- *Difuzia dublă radială* (metoda Ouchterlony)

În această metodă gelul de agaroză se toarnă pe lame de sticlă degresate. Se stantează godeuri în care se pun față în față antigenul și anticorpul care vor migra radial până la realizarea unei linii de precipitare. Această metodă se aplică în bacteriologie la determinarea tipului M streptococic.

- *Difuzia dublă* (metoda Elek)

Metoda se aplică în bacteriologie pentru determinarea toxigenității bacililor difterici izolați din exsudatele nazo-faringiene.

La mijlocul plăcii Petri cu geloză se practică un șanț de aproximativ 1,5 cm. Se scoate geloză din șanțul respectiv, se toarnă un strat subțire de geloză pe fund, iar după ce s-a întărit, în șanț se pune ser antidifteric (antitoxic).

Pe placă se însămânțează tulpinile de bacili difterici de studiat în striuri perpendiculare pe direcția șanțului cu ser anti. Se însămânțează și o tulpină martor sigur toxigenă. Se incubează la termostat.

Tulpinile patogene de bacil difteric elaborează toxină care va difuza în gel. Din șanțul practicat în centrul plăcii vor difuza perpendicular anticorpii antidifterici din serul antitoxic. La locul de întâlnire a antigenului cu anticorpul va apare o linie de precipitare vizibilă.

c) *Difuzia în gel combinată cu migrarea în câmp electric*

- *Imunoelectroforeza*

Pe o lamă de sticlă bine degresată se toarnă gel de agar. După întărire se șantează un șanț central, fără a se îndepărta geloză. De o parte și de alta a șanțului se șantează 2 godeuri. Se umple un godeu cu ser de cercetat, iar celălalt godeu cu un ser uman normal. Lama se așază într-o cuvă de electroforeză. Proteinele din ser vor migra sub acțiunea câmpului electric în funcție de greutatea moleculară, încărcătura electrică și de compoziția gelului.

După migrare, se scoate gelul din șanțul central în care se pune ser antiproteină umană standard.

Lamele se așază în continuare în cameră umedă și după migrarea în câmp electric a proteinelor serice în lungimea lamei, perpendicular, va migra serul antiproteină umană din șanțul paralel cu lungimea lamei.

Întâlnirea dintre proteinele serice (antigene) și serul antiproteină umană (anticorpi) va determina apariția unor arce de precipitare specifice.

- *Contraimmunoelectroforeza*

Metoda este folosită pentru decelarea în serul bolnavilor a unor proteine patologice care au tendința de a migra la anod în câmpul electric (de ex. antigenul Hbs, alfa fetoproteina).

Pe lama cu agaroză se practică godeuri în perechi, față în față. Se așază lamele în cuvele de electroforeză iar serurile de cercetat se așază în godeurile plasate către catod, în timp ce către anod se așază serul antiproteină umană specific. După migrare, în funcție de apariția liniei de precipitare la serul martor pozitiv se interpretează și celelalte probe.

2. REACȚIA DE AGLUTINARE

Reacția de aglutinare face parte din reacțiile antigen-anticorp în care antigenele

sunt de natură corpusculară, elemente figurate (celule bacteriene, hematii) sau sunt fixate pe suprafața unor particule corpusculare (celulare sau anorganice).

Aglutinarea poate fi directă, indirectă, pasivă, aglutinare mixtă, hemaglutinare.

Reacția de aglutinare, care se poate efectua în tub sau pe lamă, are numeroase aplicații practice atât în scop diagnostic cât și în cercetările de imunologie.

1. Identificarea și titrarea *anticorpilor aglutinanți specifici necunoscuți*, în prezența unor antigene cunoscute (ex. serodiagnosticul febrei tifo-paratifoide).

- Reacția de aglutinare pe lamă

Se folosește ca metodă orientativă pentru diverse depistări în colectivități, fiind rapidă și mai ușor de executat. În cazul rezultatelor pozitive, reacția de aglutinare calitativă pe lamă este urmată de reacția cantitativă în tuburi.

- Reacția de aglutinare în tuburi

Se pun în contact în tuburi diluții de ser de cercetat cu cantități fixe de suspensie de antigen. După termostatare se face citirea reacției. Cea mai mare diluție la care se mai observă apariția aglutinării indică titrul anticorpilor existenți în serul de cercetat.

2. Identificarea *antigenelor specifice (corpi bacterieni) necunoscute* în prezența unor anticorpi (seruri aglutinante) cunoscuți.

Identificarea serologică a microorganismelor patogene se poate realiza de asemenea prin două metode:

- Metoda aglutinării pe lamă

Este un test calitativ, folosit frecvent în cazurile de urgentare a diagnosticului bacteriologic. Se utilizează curent pentru identificarea serologică a enterobacteriilor.

Pe o lamă curată și degresată se pune o picătură de ser aglutinant în care se suspendă cultura ce trebuie identificată. În cazul unei reacții pozitive, în suspensia cu ser aglutinant apar grunji, cu clarificarea lichidului.

- Metoda aglutinării în tuburi

Această metodă se folosește pentru confirmarea unei aglutinări pozitive pe lamă sau când aglutinarea pe lamă a fost incertă.

Tehnica de lucru și principiul reacției sunt asemănătoare metodei folosită pentru diagnosticul serologic, cu deosebirea că aici componenta necunoscută este reprezentată de antigen (cultura microbiană) și nu de anticorpi (serul aglutinant).

3. REACȚIA DE IMUNOFLOURESCENȚĂ

Prin cuplarea stabilă a anticorpilor cu fluorocromi, anticorpilor devin fluorescenți și pot fi utilizați pentru punerea rapidă în evidență a antigenelor corespunzătoare (antigene tisulare, bacteriene, virale) pe care se fixează specific, colorându-le.

Complexele antigen-anticorp pot fi ușor și rapid observate în lumina ultravioletă cu ajutorul microscopului cu fluorescență.

Există două metode de imunofluorescență: metoda directă și metoda indirectă.

În metoda directă se pune în contact un antigen necunoscut care urmează a fi identificat, cu un ser cunoscut fluorocromat.

În metoda indirectă, anticorpul nefluorescent dintr-un ser uman se leagă de antigenul corespunzător. Pentru evidențierea anticorpilor se aplică un al doilea ser (anti-om) fluorescent. Astfel, în acest test, serul neconjugat reacționează ca anticorp în prima parte a reacției și ca antigen în a 2-a parte a reacției.

4. REACȚIA DE LIZĂ

Când antigenul alcătuit din celule lizabile (hematii, celule bacteriene) este pus în prezența complementului (alexina) în contact cu un ser imun ce conține anticorpi specifici (hemolizine, bacteriolizine) se produce liza celulară (hemoliză, bacterioliză).

5. REACȚIA DE FIXARE A COMPLEMENTULUI (R.F.C.)

R.F.C. este un test de diagnostic serologic care permite evidențierea realizării reacției antigen-anticorp și se bazează pe proprietatea complementului de a se fixa numai pe anticorpii sensibilizați din imunocomplexele antigen-anticorp, fără însă a se putea combina separat cu unul dintre cele două elemente (antigen sau anticorp) care s-ar găsi singur în tubul în care se efectuează reacția.

R.F.C. constă în următoarele operații care evidențiază și principiul metodei: un ser suspect, în care se bănuiește prezența unor anticorpi, se inactivează 30 min. la 56°C, pentru înlăturarea complementului, propriu serului de cercetat.

Serul de cercetat inactivat se pune în contact cu o suspensie care conține antigenul corespunzător anticorpilor bănuți.

În cazul în care în ser există anticorpii căutați (deci provine de la un bolnav real) se vor forma imunocomplexe. Pentru evidențierea acestora se adaugă o anumită cantitate de complement. În cazul în care în ser există anticorpi, imunocomplexele formate vor fixa complementul adăugat.

În cazul serurilor negative, în lipsa imunocomplexelor, complementul va rămâne liber, activ. Fixarea complementului va fi demonstrată prin adăugarea unui al doilea sistem antigen-anticorp martor reprezentat de un amestec de hematii de oaie și ser hemolitic anti-oaie (sistem hemolitic).

În cazul în care serul de cercetat a fost negativ, complementul rămâne liber și se va fixa pe imunocomplexele hematice-anticorpi antihematice, determinând liza hematiilor (deci hemoliza indică un rezultat negativ).

În cazul serurilor pozitive, complementul se va fixa pe imunocomplexele formate în primul timp al reacției, astfel încât hematiile din sistemul hemolitic nu vor mai fi hemolizate (deci absența hemolizei indică un rezultat pozitiv).

6. REACȚIA DE SERONEUTRALIZARE

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

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

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

Cap.XII. EPIDEMIOLOGIA BOLILOR TRANSMISIBILE

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

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 infectocontagioase, și cu alte manifestări morbide, de masă, neinfecțioase, cum sunt bolile cardiovasculare, bolile degenerative, tumorile genetice, tulburări psihice, malformații congenitale etc.

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

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

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

1. IZVORUL DE INFECȚIE

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

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

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

2. CĂILE ȘI MECANISMELE DE TRANSMITERE ALE AGENȚILOR INFECȚIOȘI

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

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

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

Transmiterea indirectă a bolilor se face prin intermediul aerului (difteria, gripa, scarlatina, tuberculoza etc.), apei (febrele tifo-paratifoide, dizenteria, holera, hepatita A, poliomielita etc.), solului (tetanos, poliomielită, salmoneloze, tuberculoză, parazitoze etc.), alimente (trichineloză, tuberculoza, antraxul, bruceloza, 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 recurentă etc.).

3. STAREA DE RECEPTIVITATE A POPULAȚIEI

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

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

4. FORME DE MANIFESTARE A PROCESULUI EPIDEMIOLOGIC

Manifestările procesului epidemiologic sunt în mod obișnuit evaluate după incidența și prevalența îmbolnăvirilor într-o colectivitate. Bolile 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 dispersate care periodic pot crește ca frecvență (hepatita virală, dizenteria bacilară etc.).

Prin luarea unor măsuri eficiente, o morbiditate endemică se poate transforma într-o morbiditate sporadică sau chiar poate fi eradicată pe 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 BOLILOR 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 germeni. 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 întreruperii lanțului epidemiologic, bolnavii sunt izolați în spitalele de boli contagioase sau, în anumite situații și în anumite condiții, la domiciliu. Transportul bolnavilor la spital se face cu autosalvarea iar eliberarea din spital se face după vindecare și stabilirea unei eventuale stări de purtător (excretor de germeni).

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

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

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

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

Măsuri privind calea de transmitere se realizează prin dezinfecție, dezinfecție 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 ambiant, alimentație rațională, evitarea surmenajului etc.

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

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

MICROBIOLOGIA SPECIALĂ

Cap.XIII. COCII GRAM-POZITIVI

Clasificarea sistematică a germenilor a fost adoptată prima oară în 1930 cu ocazia primului Congres Internațional de Microbiologie ținut 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-pozitivi mai importanți se încadrează în: genul **Staphylococcus**, genul **Streptococcus** și genul **Diplococcus**.

1. STAFILOCOCUL (STAPHYLLOCOCCUS 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 cavitățile naturale ale oamenilor și animalelor, făcând parte din flora normală a acestora. În afara celor saprofiți, se găsesc și stafilococi potențial patogeni în rinofaringele și intestinul oamenilor sănătoși, într-un procentaj de 50%. Aceștia, eliminați prin tuse, strănut sau prin dejecte, pot provoca, atunci când întâlnesc organisme sensibile, îmbolnăviri variate.

Caractere morfotinctoriale. Stafilococii sunt germenii sferici, cu diametrul de 0,8 μ , dispuși în grămezi neregulate, amintind ciorchinele de strugure, de unde și numele dat (în grecește, stafilos = strugure). Dispoziția aceasta caracteristică se întâlnește pe frotiul făcut din cultura pe medii solide. Sunt imobili, necapsulați, nesporulați. Se colorează Gram-pozitiv. În culturile vechi sau sub influența antibioticelor pot apărea Gram-negativ.

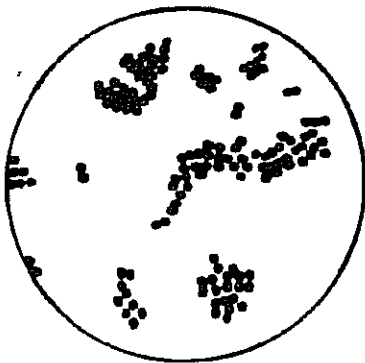


Fig.15. Stafilococ.

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

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

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

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

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

În cadrul virulenței trebuie citate unele enzime secretate de stafilococi, printre care:

- coagulaza, enzimă cu ajutorul căreia germeul, prin coagularea plasmei în organism, își creează un înveliș de fibrină, punându-se astfel la adăpostul acțiunii fagocitare. Ea este prezentă la 98% din stafilococii patogeni;

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

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

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

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

Boala la om. Afecțiunile provocate de stafilococii patogeni sunt foarte variate. Pe primul plan se situează leziuni 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, sinuzite și otite și este cel mai frecvent germene de suprainfecție a plăgilor și tuturor leziunilor deschise. Tulpinile care elaborează enterotoxină provoacă toxiiinfecții alimentare. În urma administrării de antibiotice poate apare enterita stafilococică.

Tratamentul. În afara antibioticelor și a chimioterapicelor, se întrebuințează 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 toată grija pentru a evita contaminările cu tulpini saprofite de pe piele sau din mediul înconjurător.

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

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

- examenul microscopic, care va arăta un puroi gros, cremos;
- examenul microscopic, care va începe cu efectuarea unui frotiu care va fi colorat Gram. Acesta, examinat cu imersie, va arăta polinucleare neutrofile mai mult sau mai puțin alterate și coci Gram-pozitivi, izolați, în diplo, în lanțuri sau grămezi mici. Această dispoziție nefiind caracteristică stafilococului, întrucât și alți coci Gram-pozitivi pot avea această prezentare, se va trece obligatoriu la etapa următoare, însămânțând produsul pe medii solide și lichide, medii ce vor fi termostatate la 37°C.

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

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

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

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

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

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

Aceste teste sunt:

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

- **Cercetarea coagulazei.** Într-o eprubetă de hemoliză se adaugă peste 0,3 ml plasmă oxalată, 0,2 ml din cultura în 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 părți de geloză topită și răcită la 50°C se adaugă o parte plasmă oxalată; se amestecă, se încălzește 5 min la 56°C și apoi se toarnă în plăci. Mediul este opac datorită rețelei de fibrină. Se însămânțează izolat tulpinile de cercetat. În jurul coloniilor fibrinolizo-pozitive se constată apariția unei zone clare, prin lizarea fibrinei din mediu.

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

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

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

În cazul hemoculturii, sângele va fi recoltat cu mare atenție, de preferat cu dispozitiv în circuit închis, în 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 toxiinfecție alimentară, va trebui ca investigațiile să privească atât alimentele incriminate, cât și vărsăturile și fecalele bolnavului.

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

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

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

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

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

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

În serviciile de chirurgie, intervențiile mari pot fi compromise prin infectarea pacientului cu stafilococi rezistenți, din mediul înconjurător. În aceleași 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 această secție este evident. De asemenea, problema toxiiinfecțiilor alimentare cu stafilococ trebuie să rețină atenția din punct de vedere epidemiologic, prin ușurința cu care pot fi provocate și, în special, prin rolul pe care îl are purtătorul, de cele mai multe ori sănătos, fără manifestări clinice aparente.

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

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

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

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

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

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

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

Structura antigenică. Pe baza unei fracțiuni specifice – un polizaharid – streptococii se împart în 17 grupe, notate de la A la S (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 toxigeneză. 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 hematiilor. Streptolizina O este antigenică, antistreptolizinele O putând fi puse în evidență în diferite afecțiuni streptococice.

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

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

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

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

- **Diagnosticul bacteriologic.** Acest examen vizează izolarea și identificarea germeului. Recoltarea se va face în condiții de sterilitate și, de dorit, înaintea începerii tratamentului. Cunoscând sensibilitatea deosebită a streptococului beta-hemolitic la acțiunea penicilinei, 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 frotiul efectuat din produsul patologic nu este concludent, obligatoriu acest produs va fi însămânțat pe medii de cultură îmbogățite. Mediul cel mai folosit este geloză-sânge. El se prepară din geloză 3%, la care se adaugă, atunci când, răcindu-se, a ajuns la 50°C, sânge defibrinat de berbec în proporție de 5-10%, în condiții de sterilitate. Întrucât în foarte multe produse patologice – din leziuni și cavități – streptococul este însoțit de stafilococ, mediului i se va adăuga cristal violet 1/500.000 pentru inhibarea sa selectivă. Atunci când este streptococ hemolitic, raportul dintre hemoliză și colonie este în favoarea hemolizei.

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

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

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

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

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

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

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

Fenomenul de stingere Schultz-Charlton. Această probă este extrem de utilă, ea permițând 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 antiscarlatinos diluat 1/10, în plină zonă de erupție. Dacă erupția este scarlatinoasă, după 6-12 h se observă o pălire a zonei în jurul inoculării, aceasta pentru că toxina scarlatinoasă este neutralizată de antitoxina din serul 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 incubație. Nu trebuie neglijați convalescenții cu complicații: rinite, otite, adenite supurate, care prin numărul mare de streptococi, eliminați aproape în cultură pură, reprezintă importante surse de infecție;

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

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

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

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

Explicația este următoarea: se știe că există o imunitate antimicrobiană și una antitoxică. Indivizii care au o imunitate antimicrobiană, indiferent dacă este însoțită sau nu de cea antitoxică, atunci când vin în contact cu un streptococ hemolitic sau îl elimină imediat, sau acesta rămâne în rinofaringe pentru o perioadă oarecare, fără să provoace nici o modificare a organismului. Este cazul purtătorului 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 antitoxice), numai amigdalită-faringită.

Întrucât sunt unii cercetători care socotesc că nu streptococul este singurul

responsabil de producerea scarlatinei, el fiind socotit numai un germene de acompaniament, se vor 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 pozitive, prin badijonarea faringelui cu streptococi izolați de la scarlatinoși;

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

Caractere morfologice și tinctoriale. În produsele patologice și în culturile proaspăt izolate din infecții, pneumococii au o formă caracteristică de coci ovalari, lanceolați (în formă de flacără de lumânare), de 0,5-1,25 μ diametru și sunt dispuși caracteristic în diplo- sau în lanțuri scurte, privindu-se prin capetele mai bombate. Sunt Gram-pozitivi, nesporulați, iar variantele virulente posedă capsulă. Formele "R" (rough) de pneumococi sunt degradate, nu posedă capsulă, sunt avirulente, frecvent întâlnite pe mucoasele respiratorii și, uneori, pierd proprietatea de a reține violetul de gențiană, apărând colorați în roșu-violaceu. 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 rotunjiți, cu tendința de așezare în lanțuri (relativ scurte), iar capsula mai puțin evidentă.

Caractere de cultură. Pe medii simple, pneumococii se dezvoltă foarte greu sau deloc. Dat fiind că au cerințe nutritive complexe cultivarea se obține pe medii bogate care conțin anumiți aminoacizi, factori de creștere și glucoză ca sursă principală de energie. Pneumococii cresc bine pe medii îmbogățite cu 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 medii lichide de tipul bulionului TIEM glucozat 2% sau al bulionului I.C. (preparat de Institutul Cantacuzino) glucozat 2%, pneumococii cresc abundent și tulbură uniform mediul cu formare de depozit. Trebuie menționat însă că,

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

Deoarece păstrarea tulpinilor de colecție este foarte dificilă, liofilizarea rămâne practic, metoda optimă care conservă intacte viabilitatea și proprietățile biologice ale pneumococilor pe o durată lungă (1-2 ani). Pe geloză-sânge 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, înconjurată de un halou verzui (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-sânge, 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 citocrom, catalază sau peroxidază. Pneumococii mai fermentează numeroase alte zaharuri, dintre care inulina este descompusă caracteristic. Autoliza pneumococilor este cauzată de enzimele proteolitice și lipolitice, de producerea de H_2O_2 , acidifierea a mediilor de cultură. Bila sau sărurile biliare determină clarificarea culturilor de pneumococi în mediul lichid (biloliza descrisă de Neufeld). Biloliza este caracteristică pneumococilor și îi diferențiază net de *Streptococcus viridans*. Pneumococii, ca și streptococii viridans, elaborează o enzimă cu acțiune hemolitică de tip α (viridans).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- Expectorație mucopulentă în traheobronșită, bronșită acută și cronică, bronhopneumonie, abces pulmonar și sputa ruginie caracteristică din pneumonia francă lobară (conține particule purulente verzui, mucus, hematii și leucocite).

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

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

- Exsudatul purulent peritoneal din peritonita pneumococică.

- Exsudatul purulent pericardic din pericardita pneumococică.

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

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

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

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

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

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

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

pe cale respiratorie. Boala este endemică și ea se declanșează când rezistența naturală a individului scade și apar condiții favorizante pentru dezvoltarea pneumococului. Factorii favorizanți sunt constituiți de bolile infecțioase provocate de alți agenți patogeni, în special de virusuri, inhalarea unor gaze iritante care lezează mucoasa respiratorie, intoxicația alcoolică care diminuează fagocitoza și reflexul de tuse, congestia pulmonară de stază în bolile cardiace, malnutriția și debilitatea generală.

Populația receptivă poate fi protejată prin imunizare cu un vaccin preparat din polizaharidele specifice, dar valoarea practică a vaccinării este redusă. Prevenirea bolii se poate face mai degrabă prin combaterea și evitarea factorilor predispozanți, mai ales pentru copii și bătrâni.

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

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

1. MENINGOCOCUL (*NEISSEERIA MENINGITIDIS*)

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

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

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

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

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

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

extrem de sensibili la variații de temperatură și de pH. Lumina solară, frigul și uscăciunea îi omoară rapid. Culturile lăsate la temperatura laboratorului mor repede, în mare măsură datorită antilizinelor secretate de germen. Sunt foarte sensibili la acțiunea antisepticelor, sublimatul 1‰ omorându-i instantaneu; de asemenea, sunt sensibili la acțiunea sulfonamidelor și antibioticelor, penicilina fiind antibioticul de elecție în tratamentul infecțiilor meningococice.

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

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

Infecția meningococică se poate disemina pe cale limfatică sau sanguină, producând meningita sau alte localizări la distanță pe seroase (articulare, pleurale, endocardice, pericardice), constând din reacții congestive serofibrinoase 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 epidemiilor 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; șoarecele inoculat intraperitoneal cu tulpini recent izolate de meningococ moare prin intoxicație cu endotoxină.

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

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

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

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

Diagnosticul de laborator constă din:

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

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

Recoltarea se face dimineața pe nemâncate sau la 4-5 h de la ultima masă, fără badijonaje locale sau gargară de orice fel și înaintea administrării de antibiotice. De la bolnavii cu septicemie și erupție 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 efilată, lichidul hemoragic din leziunile cutanate, pensând pielea în jurul leziunii. De la cadavru se prelevă aseptice, în primele 6-8 h de la deces, L.C.R., din ventriculii laterali și de la baza creierului, puroi de pe meninge și de la nivelul coamelor medulare posterioare, eventual fragmente de organe (splină, ficat, cord, exsudate seroase articulare, pleurale, peritoneale, sânge recoltat prin puncție cardiacă). De la purtătorii de meningococ se recoltează secrețiile nazofaringiene, în aceleași condiții ca la bolnavii cu MCSM.

Examenul microscopic din produsele patologice. În MCSM, L.C.R. poate fi tulbure, opalescent sau limpede. Lichidul cefalorahidian din una dintre eprubete va servi la însămânțări și la efectuarea a trei frotiuri; la fel și sedimentul L.C.R. (din a doua eprubetă) centrifugat în condiții de sterilitate 10 min la 1000 turații/min. Fixarea lamelor se face prin trecerea rapidă prin flacără sau preferabil cu alcool metilic timp de 5 min. Frotiurile sunt colorate prin metoda Gram, Giemsa și cu albastru de metilen.

În cazurile pozitive tipice (L.C.R. purulent), pe frotiul Gram se observă numeroase polimorfonucleare și diplococi tipici (boabe de cafea) Gram-negativi intra- și extracelulari. Frotiul colorat Giemsa servește la diferențierea meningitelor bacteriene de cele virale, în care se observă o reacție leucocitară abacteriană cu limfomonocitoză. În supernatantul clar de L.C.R. centrifugat se testează prezența antigenului specific antimeningococic (relația inelului de precipitare) și se dozează albumina și clorurile.

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

Însămânțarea și izolarea. Produsele patologice recoltate la distanță folosite pentru însămânțări în vederea izolării germenului cauzal vor fi transportate imediat la laborator, în cutii izoterme (la 37°C). Se recomandă ca atât frotiurile, cât și însămânțările să se facă pe loc, la patul bolnavului, deoarece meningococii, fiind ușor autolizabili, dispar rapid prin păstrarea mai îndelungată a produselor. Se fac însămânțări simultane pe: mediul Mueller-Hinton înclinat (M-H) sau pe tuburi cu geloză-ser, geloză-ascită 25%, pe geloză înclinată, geloză-șocolat și pe o placă de geloză-sânge (G-S), toate încălzite la 37°C. Însămânțarea pe geloză diferențiază meningococii de neisseriile saprofite (*Neisseria catarrhalis*, *N. perflava*, *N. flava* și *N. subflava* etc.) care pot fi, uneori, implicate în etiologia meningitelor. Spre deosebire de meningococ, neisseriile saprofite cresc și pe geloză simplă, chiar și la temperatura laboratorului. Pe geloză-șocolat cresc și meningococii și sușele de *Haemophilus influenzae* (care pot produce meningite), iar pe G-S se dezvoltă marea majoritate 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 cadavru sunt însămânțate pe M-H, G-S, geloză-ser, geloză-ascită. Din bulionul de hemocultură se fac subculturi pe aceleași medii, 3 zile consecutiv. Izolarea meningococului de la purtători se face prin însămânțarea și dispersia secrețiilor nazofaringiene pe plăci cu mediul selectiv LCN (lincomicină, colimicină și nistatină) care sunt incubate la 37°C, obligatoriu în atmosferă de CO₂ (exsicator cu lumânare aprinsă). Toate mediile însămânțate sunt incubate la 37°C și a doua zi se fac citirile urmărindu-se apariția culturii de meningococ (colonii mici, cu diametrul de aproximativ 1 mm, rotunde, translucide).

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

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

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

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

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

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

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

2. GONOCOCUL (*NEISSERIA GONORRHOEAE*)

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

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

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

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

Caractere de cultură. Gonocoțul este un germene aerob, facultativ anaerob, foarte "exigent" care nu se cultivă pe medii simple. Pentru dezvoltare necesită medii îmbogățite cu ser, plasmă, lichid de ascită, sânge defibrinat, hemoglobină sau extract globular, glucoză, autolizat de drojdie de bere. Izolarea din produsele patologice și cultivarea gonococului nu se pot obține decât prin incubare în aerobioză cu o atmosferă de 5-10% CO_2 ; creșterea optimă are loc la pH 7,4 și la temperatura de 36-37°C. Coloniile 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 fermentează glucoza, dar nu fermentează alte zaharuri și sintetizează citocromoxidaza, aceste reacții fiind folosite ca teste de diagnostic. Testarea fermentării unor zaharuri constituie principala probă biochimică ce permite diferențierea gonococului de meningococ sau de alte neisserii.

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

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

Caractere de patogenitate. Patogenitatea gonococului se manifestă prin

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

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

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

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

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

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

Recoltarea produselor patologice. Secrețiile mucopurulente uretrale, endocervicale, vaginale, conjunctivale sunt recoltate, de obicei, cu o ansă bacteriologică sterilizată prin flambare și bine răcită. Recoltarea din colul uterin se face în cursul examenului ginecologic cu ajutorul valvelor. Recoltarea se poate face și pe tampoane 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 băuturi alcoolice, vaccin tifoidic, instilații cu nitrat de argint; de la bărbat cu infecție cronică și secreție redusă se recoltează "picătura matinală", înainte ca bolnavul să fi urinat, de preferință după un masaj prealabil de prostată.

Exsudatul articular este recoltat prin puncție aseptică cu seringă și acul.

Din produsele recoltate se fac frotiuri care se colorează prin metoda Gram (se

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

Produsele sunt însămânțate pe plăci cu mediu selectiv și neselectiv, preferabil imediat după recoltare. Dacă acest lucru nu este posibil, recoltarea se face pe tamponane, 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 dispersii cu ansa pentru obținerea de colonii izolate; incubarea se face obligatoriu în exsicator cu atmosferă de CO₂ 5-10%, realizată prin procedeul lumânării, timp de 24-48 h. Se urmărește apariția coloniilor mici, translucide de gonococ, care sunt repicate pe mediul neselectiv; se efectuează, concomitent, controlul microscopic pe frotiuri colorate Gram și reacția oxidazei care este pozitivă, după care se execută antibiograma.

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

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

Cap.XV. BACILII GRAM-NEGATIVI

1. FAMILIA ENTEROBACTERIACEAE

Generalități. Este o familie bacteriană alcătuită din numeroase specii de bacili Gram-negativi, nesporulați, mobili – cu cili peritrichi – sau imobili, care se cultivă ușor pe medii de cultură simple, fermentează glucoza, cu sau fără producere de gaz și reduc nitrații în nitriți. Sediul obișnuit al acestor germeni 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	Eschericheae	1. Escherichia 2. Shigella
II	Edwardsielleae	1. Edwardsiella
III	Salmonelleae	1. Salmonella 2. Arizona 3. Citrobacter
IV	Klebsielleae	1. Klebsiella 2. Enterobacter 3. Serratia 4. Hafnia
V	Proteae	1. Proteus 2. Providencia 3. Morganella
VI	<u>Yersinieae</u>	<u>1. Yersinia</u>
VII	Erwinieae	1. Erwinia 2. Pectobacterium

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

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

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

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

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

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

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

Virulența este invers proporțională cu numărul de germeni vii care produc moartea animalelor inoculate. Se stabilește D.C.L. (doza certă letală) sau D.L₅₀ (doza letală 50%), aceasta din urmă exprimând mai exact valoarea acestui atribut al patogenității.

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

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

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

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

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

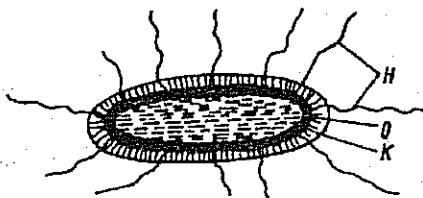


Fig.16. Structura antigenică la *Enterobacteriaceae*.

bacilul *Proteus* etc. *Enterobacteriaceae* cel mai frecvent întâlnite în patologia umană sunt: colibacilii, salmonellele și bacilii dizenterici.

1.1. BACILUL COLI (*ESCHERICHIA COLI*)

Colibacilii se găsesc peste tot în natură, în aer, în apă, pe pământ etc. În caz de boală pot fi puși în evidență în sânge, urină, puroi etc.

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

Caractere de cultură. Nu sunt germeni pretențioși. Cresc abundent pe mediile de cultură obișnuite: bulion, apă peptonată, geloză nutritivă etc. Formele S tulbură 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.

Caracterele biochimice. Colibacilii sunt bacterii aerobe, dar se pot dezvolta și în condiții de anaerobioză. Ei posedă un bogat echipament enzimatic; fermentează lactoza, produc indol, (nu) descompun ureea, (nu) lichiefiază gelatina și pot avea o activitate hemolitică și dermonecrotică.

Rezistența la agenții fizici, chimici și biologici. Bacilii coli 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 dezinfectante*: cloramină, fenol, formol, sublimat etc. De asemenea, sunt *sensibili la acțiunea streptomycinei, 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 microbial.

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

Patogenitate. Cei mai mulți colibacili nu sunt patogeni. Virulența și toxicitatea bacteriilor patogene sunt legate de prezența antigenului K și a unor toxine (enterotoxină, neurotoxină etc.), precum și de producerea hemolizei și a dermonecrozei.

Boala la om. În anumite condiții, unele tulpini de bacili coli dau naștere la diferite *afecțiuni locale sau generale*: boli ale aparatului genitourinar, infecții intestinale, endocardite, meningite, septicemii etc. Unele tipuri serologice pot provoca îmbolnăviri grave la copiii mici ce pot îmbrăca aspectul unor epidemii severe.

Infecțiile urinare. Bacilul coli este agentul patogen cel mai frecvent întâlnit în infecțiile urinare spontane sau care apar după utilizarea de sonde sau a unor instrumente de explorare a aparatului urinar. Anumiți factori de "uropatogenitate" facilitează, atunci când sunt prezenți, colonizarea mucoasei aparatului urinar. Dintre

aceștia menționăm adevăratele ale căror receptori sunt diseminați pe celulele arborelui urinar până la nivelul rinichiului.

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

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

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

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

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

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

Diagnosticul de laborator al infecțiilor colibacilare. În infecțiile cu bacilul coli diagnosticul de laborator constă în izolarea și în identificarea 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 lactozată turnesolată (mediul Drigalski); bacilul coli fermentează lactoza și virează mediul în roșu;

- geloză lactozată cu eozină și albastru de metilen (mediul Levine). Coloniile de bacili coli au o culoare negricioasă cu luciu metalic, spre deosebire de alte enterobacteriaceae care dau colonii roz-palid;

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

De pe mediile diferențiale se iau, cu ansa, coloniile suspecte și se trec pe 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 urinei, 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. Coloniile 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 copiii mici. Sursa de infecție a acestor boli intraspitalicești este reprezentată de bolnavi și purtători de colibacili patogeni. Pătrunderea germenilor în organism se face pe cale digestivă, răspândirea acestora fiind favorizată de nerespectarea unor reguli elementare de igienă personală. La apariția unor astfel 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 pentru copii și în general în spitale, este necesar să se interzică sondajele uretrale inoportune și să se ia măsuri foarte riguroase care să împiedice introducerea și răspândirea infecțiilor colibacilare în aceste unități sanitare.

1.2. GENUL SALMONELLA

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

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

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

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

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

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

"S" și forme "R". Formele "S" tulbură uniform mediile lichide și formează colonii netede, rotunde, lucioase pe mediile solide. Formele "R" sedimentează în mediile lichide și dau naștere la colonii zbârcite, cu marginile neregulate, pe medii solide.

Caractere biochimice. Salmonelele se dezvoltă în condiții optime la 37°C pe medii cu un pH 7,2-7,4. Cu ajutorul reacțiilor biochimice, salmonellele pot fi diferențiate de ceilalți germeni din familia *Enterobacteriaceae*.

Rezistența la agenții fizici, chimici și biologici. Salmonellele pot trăi câteva luni în mediul extern (pământ, apă, gheață, alimente etc.). Ele sunt distruse prin încălzire la 56-60°C în decurs de o oră. Sunt sensibile la acțiunea substanțelor dezinfectante (acid fenic 5%, sublimat 1% etc.), care le omoară în 20-30 min. Salmonellele sunt, în general, sensibile la antibiotice (cloramfenicol, aureomicină, streptomycină etc.) și la unele sulfamide. De asemenea, sunt lizate de anumiți bacteriofagi în mod selectiv.

Structura antigenică a salmonellelor. La germenii din genul *Salmonella* se întâlnesc antigene somatice "O", flagelare "H" și de înveliș "Vi". Cunoașterea lor prezintă o importanță deosebită în identificarea serotipurilor.

Pe baza structurii antigenice, s-a stabilit o schemă antigenică de diagnostic a germenilor din grupul *Salmonella*. Din cele peste 2000 serotipuri cunoscute până în prezent, în tabelul alăturat este redată structura antigenică a câtorva salmonelle mai frecvent întâlnite în țara noastră.

Schemă antigenică de diagnostic

Specii		Antigene somatice	Antigene flagelare	
			Faza 1	Faza 2
S. paratyphi A	Grupa A	1, 2, 12	a	—
S. paratyphi B	Grupa B	1, 4, 5, 12	b	1, 2
S. typhirium		1, 4, 5, 12	i	1, 2
S. heidelberg		1, 4, 5, 12	r	1, 2
S. paratyphi C	Grupa C	6, 5, Vi	c	1, 5
S. cholerae-suis		6, 7	c	1, 5
S. bovis-morbificans		6, 8	r	1, 5
S. typhi	Grupa D	9, 12, Vi	d	—
S. enteritidis		1, 9, 12	g, m	—

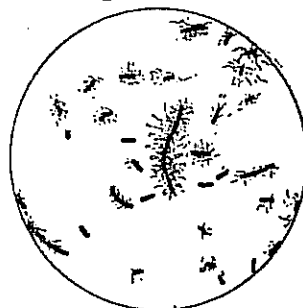


Fig. 17. Bacilul tific. Colorație pentru cili.

Caractere de patogenitate. Toate salmonellele sunt patogene. Formele de boală provocate de salmonelle sunt legate de virulența speciei respective. Aspectul toxic al îmbolnăvirilor este dat de endotoxina ce se eliberează prin dezintegrarea bacteriilor.

La om, salmonelozele se prezintă sub două forme principale:

1) **boli septicemice**, cu evoluție gravă și mortalitate apreciabilă, cum sunt febra tifoidă (produsă de bacilul tific) și febrele paratifoide A, B și C (produse de bacilii paratifici A, B sau C);

2) **boli localizate**, mai ales la nivelul tubului digestiv (toxiinfecțiile alimentare), cu o durată mai scurtă și de o gravitate mai redusă decât primele.

Tratamentul cu antibiotice în formele septicemice de boală este obligatoriu. Acesta va fi instituit sub control prin antibiogramă, deoarece în ultimii ani au apărut numeroase tulpini de *Salmonella* rezistente la antibioticele uzuale: cloramfenicol, streptomycină, tetracilină etc.

Imunitatea. Foștii bolnavi de febre tifoparatifoide dobândesc o imunitate destul de solidă, care poate dura toată viața. Imunitatea în toxiinfecțiile alimentare este slabă, deoarece aceste îmbolnăviri au o durată scurtă. Imunitatea antitifoparatifoidică se poate dobândi și în mod artificial, prin vaccinare T.A.B.

1.2.1. Infecțiile tifoparatifoidice

Diagnosticul de laborator. Pentru stabilirea diagnosticului de laborator în infecțiile tifoparatifoidice se folosesc pe de o parte metode care urmăresc izolarea germenilor din produsele patologice, iar pe de altă parte metode care să pună în evidență prezența anticorpilor specifici în ser. Fără îndoială că diagnosticul bacteriologic constituie diagnosticul de certitudine.

Produsele patologice care se examinează în vederea acestui diagnostic sunt: sângele, măduva oaselor, materiile fecale, urina, bila, exsudatele din petele lenticulare, iar în cazuri letale: sângele din inimă, fragmente din organe (ficat, splină, ganglioni mezenterici), măduva oaselor, conținutul veziculei biliare și urinare.

Alegerea metodelor de diagnostic care trebuie folosite și a produselor de examinat se face în raport cu cazul studiat (bolnav sau purtător sănătos) și în raport cu perioada de evoluție a bolii.

Astfel, în prima săptămână de boală, germenii pot fi găsiți mai ales în sânge și în măduva oaselor, proporția hemoculturilor pozitive depășind în această perioadă 90%.

Tot în prima săptămână de boală, germenii pot fi găsiți la aproximativ 60% din cazuri în materii fecale.

În săptămâna a doua germenii pot fi depistați și în urină, în aproximativ 30% din cazuri.

În săptămâna a treia și a patra, proporția hemoculturilor pozitive scade la 40%, în timp ce aceea a coproculturilor crește la 80% sau mai mult.

La bolnavii în perioada de convalescență sau la purtători, produsele de cercetat sunt materiile fecale, bila și urina.

Spre deosebire de rezultatele diagnosticului bacteriologic, prezența anticorpilor specifici, aglutinați, fixatori etc. urmează o curbă inversă, titrul lor fiind scăzut la începutul bolii și atingând un maximum la sfârșitul perioadei de stare și în convalescență.

Diagnosticul bacteriologic. Coprocultura. Recoltarea materiilor fecale de la bolnavi se face de către personalul sanitar al spitalului, într-un vas smălțuit, spălat bine și opărit cu apă fiartă înainte de utilizare.

Aproximativ 4-5 g materii fecale sunt introduse cu spatula într-un recoltor steril. Dacă scaunul este lichid (diareic), se recoltează în această stare; dacă este mai consistent, se omogenizează cu puțin ser fiziologic; dacă bolnavul este constipat, produsul se recoltează după o clismă cu apă fiartă și răcită.

Foștilor bolnavi de febră tifoidă și contactaților li se administrează o doză unică de sulfat de sodiu și sulfat de magneziu, în părți egale (câte 15 g) dizolvate în 200-250 ml apă, după care se procedează la recoltarea materiilor fecale, trei zile consecutiv.

După efectuarea recoltării, vasele folosite sunt umplute cu soluție de clorură de var 10%, pentru dezinfectare.

Examenul bacteriologic al materiilor fecale pentru salmonele trebuie făcut cât mai aproape de momentul recoltării, preferabil înainte de 6 h. În cazul când însămânțarea nu se poate face în acest interval de timp, este necesar ca recoltarea și transportul probelor să se facă într-un lichid conservant (de exemplu, soluție sterilă de glicerină, soluție de tetrathionat sau soluție de acid boric 0,5%). Lichidul conservant se repartizează, în mod steril, câte 3-5 ml în recoltoare sterile. În lichidul de conservare se introduc, cu spatula sau cu o ansă metalică, circa 2-3 g materii fecale, care se omogenizează bine pe perețele colectorului.

Dacă transportul materiilor fecale se poate efectua la temperatură joasă (în timpul iernii, pe timp friguros sau în ladă izotermă cu gheață), utilizarea lichidului conservant nu mai este necesară, cu condiția să nu depășească intervalul de 24 h de la prelevarea probei până la însămânțare.

Transportul probelor de la centrul sau punctul de recoltare la laborator se face numai de către personalul sanitar, luându-se toate măsurile de prevedere ca produsul infectat să nu se răspândească în mod accidental. În acest scop, recoltoarele închise ermetic vor fi transportate în caselete sau în pungi de material plastic închise prin surdură sau prin legare după o dublă pliere. Recoltoarele purtând numere de ordine vor fi însoțite de un tabel care, în dreptul numărului de ordine respectiv, va avea însemnat în mod obligatoriu proveniența produsului, și anume:

- numele și prenumele pacientului;
- vârsta;
- domiciliul sau colectivitatea;
- motivul coproculturii (bolnav, contact, fost bolnav, purtător, control angajare sau periodic);
- locul și data (inclusiv ora) recoltării.

Fiecare probă de materii fecale se însămânțează direct pe o placă cu mediu

Wilson-Blair și în mediul de îmbogățire cu selenit de sodiu sau, în lipsa lui, în mediul Müller-Kauffmann.

Paralel cu însămânțarea directă pe mediul Wilson-Blair, se însămânțează 0,5-1 ml din aceeași suspensie de materii fecale în 8-9 ml mediu de îmbogățire. După incubare la termostat, de 18-24 h pe mediu selenit acid de sodiu sau 10-12 h pe mediu Müller-Kauffmann, se face trecerea pe mediile selective. Din mediul cu selenit se recomandă a se face trecerea pe mediul Leifson (sau mediul A.D.C.L. preparat de Institutul Cantacuzino) sau, în lipsa acestuia, pe mediul cu bilă Istrati-Meiert.

Pe mediul Müller-Kauffmann trecerea se face, în mod obligatoriu, pe mediul Wilson-Blair.

Pe mediul Leifson (sau A.D.C.L.), după incubare timp de 24 h la 37°C, coloniile de *Salmonella* apar transparente, de culoare roz-gălbui, ca și alte bacterii lactozonegative.

În cazul folosirii mediului cu bilă, salmonele dezvoltă colonii verzui-albăstrui ce pot fi ușor deosebite de coloniile de *Escherichia coli*, care sunt de culoare galbenă.

În continuare, se vor cerceta caracterele morfologice pe frotiuri colorate după metoda Gram, comportamentul biochimic și structura antigenică.

Identificarea serologică se efectuează prin reacții de aglutinare. Institutul Cantacuzino prepară și pune la dispoziția laboratoarelor din teren următoarele seruri aglutinante:

- ser polivalent "O" antisalmonella;
- seruri de grup "O": - grup A (1, 2, 12),
- grup B (4, 5, 12),
- grup C (6, 7, 8),
- grup D (9, 12),
- grup E (3, 10, 15),
- ser anti-"Vi";
- ser anti-"H" de fază specifică: "a", "b", "c", "d", "gm", "i", "r";
- ser anti-"H" de fază specifică: 1, 2, 5.

Pentru o primă orientare se cercetează aglutinabilitatea tulpinii de examinat față de serul polivalent "O", care cuprinde anticorpi corespunzători principalelor fracțiuni antigenice "O", ce se întâlnesc la germenii aparținând genului *Salmonella*. Pentru aceasta se utilizează testul de aglutinare pe lamă, care se practică cu serul diluat la titrul recomandat și cu o cultură de pe mediu solid (geloză înclinată sau geloză lactozată cu albastru de bromtimol; nu se va folosi direct cultura de pe mediu Wilson-Blair, deoarece acest mediu modifică aglutinogenele germenilor).

Absența aglutinării culturii nu exclude existența unei specii de *Salmonella*, putând fi vorba de specii al căror antigen "O" este mascat de antigenul "Vi" situat la suprafața corpului microbial.

Pentru acest motiv, când o tulpină nu aglutinează cu serul polivalent "O", ea trebuie cercetată față de serul anti-"Vi", iar în caz de aglutinare negativă și față de acest ser se poate afirma că tulpina cercetată nu aparține genului *Salmonella*.

Când tulpina aparține genului *Salmonella* se continuă identificarea, căutând să se vadă cărei grupe antigenice "O" din schema de diagnostic aparține. Pentru aceasta, se cercetează tulpina față de serul "O" al diferitelor grupe, prin aglutinări pe lamă.

După stabilirea grupei se procedează la identificarea serotipului prin aglutinări cu seruri monovalente "H" de fază specifică și seruri "H" de fază nespecifică.

Urocultura. Analiza se practică la bolnavii în convalescență (a 7-a, a 12-a și a 17-a zi) și la purtători. Se recomandă ca proba de urină destinată uroculturii să provină din mai multe emisii, de preferință din ultimile 24 h, recoltarea făcându-se într-un urinar sau vas curat, opărit cu apă fiartă.

Din urina omogenizată, în prealabil, se însămânțează circa 2 ml în 6-8 ml mediu de îmbogățire cu selenit acid de sodiu sau, în lipsa lui, în mediul de îmbogățire Müller-Kauffmann.

Se poate proceda și prin însămânțarea sedimentului urinar în mediul de îmbogățire sau direct pe un mediu selectiv: Leifson (A.D.C.L.), Wilson-Blair sau Istrati-Meiert. Din mediul de îmbogățire cu selenit, trecerea se face pe mediul Leifson (A.D.C.L.) sau mediul cu bilă uscată, iar din mediul Müller-Kauffmann trecerea este obligatorie pe mediul Wilson-Blair.

Conduita ulterioară este aceeași ca la coprocultură.

Bilicultura. Examenul bacteriologic al bilei este recomandat în depistarea stării de purtător în cazurile în care coprocultura și urocultura sunt în mod repetat negative, dar la care există suspiciuni clinice sau epidemiologice sau se observă prezența și persistența îndelungată a aglutininelor "Vi" în ser.

Recoltarea bilei se face pe nemâncate, prin tubaj duodenal. După centrifugarea bilei recoltate, sedimentul se însămânțează într-un mediu de îmbogățire direct pe Wilson-Blair, restul examenului fiind identic cu tehnica folosită pentru coprocultură.

Hemocultura. Sângele trebuie recoltat cu toate precauțiile de sterilitate, folosindu-se o seringă de 10-20 ml (preferabil de sticlă), care a fost sterilizată la autoclav (la 120°C, 30 min), cu acul și pistonul montate într-un tub postseringă.

La nevoie, se poate steriliza și prin fierbere timp de 30 min.

Recoltarea sângelui se face prin punționarea unei vene de la plica cotului, după aseptizarea tegumentelor prin badionare cu tinctură de iod și alcool.

Imediat după recoltare sângele este însămânțat în bulion simplu sau bulion și bilă sterilă de bou, în părți egale.

Cantitatea de sânge însămânțat trebuie să reprezinte numai 10% față de aceea a mediului de cultură, pentru a reduce cât mai mult posibil acțiunea bactericidă a sângelui.

Hemocultura poate fi practică și prin însămânțarea cheagului rămas după decantarea serului. Cheagul este fragmentat în prealabil într-un mojar steril sau direct în tub, cu ajutorul unei spatule de metal. După incubare, timp de 24 h la 37°C, din bulionul însămânțat se efectuează o trecere pe geloză oblică.

Atât mediul lichid, cât și cel solid, recent însămânțate, sunt incubate, apoi, la 37°C.

După intervalul de 24 h, dacă mediile au rămas sterile, se practică o nouă trecere din bulion pe mediul gelozat.

Numai în cazul că, după un interval de minimum 7 zile, mediile au rămas constant sterile, se conchide că hemocultura este negativă.

Culturile obținute pe geloză sunt, apoi, identificate pe baza caracterelor morfologice, biochimice și serologice.

În eventualitatea că recoltarea sângelui nu s-a putut efectua cu toate precauțiile de asepsie, se recoltează însămânțarea cheagului în mediul de îmbogățire, cu treceri ulterioare pe medii selective și diferențiale, după tehnica similară unei coproculturi.

Medulocultura. Recoltarea măduvei oaselor se face prin puncție, de preferință la nivelul sternului, în porțiunea de unire a celor două treimi superioare cu treimea inferioară.

După aseptizarea tegumentelor cu tinctură de iod, se anesteziază regiunea cu 10 ml novocaină soluție 1-2%, dintre care 8 ml servesc pentru infiltrația subcutanată și 2 ml pentru infiltrația subperiosteală. După circa 10 min se introduce trocarul, ținându-se mânerul în pumn, perpendicular pe stern până la rezistența osoasă. Se fixează cursorul trocarului la 0,5 cm de la suprafața pielii. Prin mișcarea de apăsare și rotație se introduce trocarul până la cursor. Se scoate mandrenul, se adaptează o seringă sterilă și se aspiră brusc. Se scot 3 ml măduvă osoasă, dintre care 2 ml sunt însămânțați în mediul de cultură, iar celălalt servește la efectuarea de frotiuri, numărători, medulograme etc. Însămânțarea mediilor de cultură, cât și conduita examenului sunt similare hemoculturii.

Examenul probelor recoltate de la cadavru. Pentru recoltarea probelor de la cadavru se recomandă folosirea de instrumente sterile, foarfece și pensă pentru fiecare organ în parte, ca și aseptizarea tegumentelor înainte de deschiderea cadavruului. Din fiecare organ se recoltează fragmente care se închid într-o cutie Petri ce se transportă la laborator.

Dintr-o serie de fragmente se prepară frotiuri, prin impresiuni pe lame de microscopie, din altă serie se efectuează însămânțări pe medii de cultură (după trimiterea fragmentelor de organe în mojar cu ser fiziologic), iar alte fragmente de organe sunt introduse în lichide fixatoare în vederea examenelor anatomopatologice.

Dintr-un fragment de ansă intestinală, legată la extremități, se prelevează, cu pipeta Pasteur, conținutul intestinal, care se suspensionează în ser fiziologic. Suspensia este, apoi, însămânțată în medii de îmbogățire și selective, urmând tehnica obișnuită de izolare și identificare utilizată pentru coprocultură.

Determinarea tipului bacteriofag. Tulpinile de *S.typhi* și *S.paratyphi* se trimit cât mai curând după izolare la centrul național de lizotipie din Institutul Cantacuzino sau la unul din subcentrele regionale pentru a li se determina tipul bacteriofag.

Diagnosticul serologic. În febrele tifoparatifoide se recomandă efectuarea *analizei serice calitative* (seroreacția Widal), care permite decelarea, în mod separat, a aglutininelor "O" și "H".

Pentru efectuarea acestei reacții se folosesc suspensii alcoolice (antigene "O") și

formolate (antigene "H") deosebite pentru *S.typhi*, *S.paratyphi A* și *S.paratyphi B*. Acestea sunt puse în contact cu diluții ale serului de cercetat. Apariția aglutininelor "H" și "O" în serul bolnavilor are loc încă din prima săptămână de boală, dar la un titru nesemnificativ. Titrul aglutininelor crește ulterior, ajungând la maximum între a 16-a și a 29-a zi de boală. Titrul rămâne ridicat în convalescență și chiar după vindecarea clinică. În genere, aglutininele "H" ating titrul mai mare (1/1000 - 1/5000) față de titrul "O" (1/250 - 1/1000).

Reacția de aglutinare "Vi". Deoarece aglutininele "Vi" apar tardiv în timpul bolii, seroreacția "Vi" oferă indicații minore în diagnosticul serologic al febrei tifoide, ea fiind utilă mai ales în diagnosticul purtătorilor de germeni de lungă durată, ca metodă serologică de orientare.

În infecții localizate, cum sunt toxiinfecțiile alimentare, pe lângă coprocultură se efectuează examene bacteriologice și din alte produse ca: lichide de vărsături, resturile de alimente etc. Etapele de izolare și identificare a salmonelelor în aceste produse sunt, în general, similare acelor parcurs în efectuarea coproculturii.

În aceste afecțiuni de scurtă durată nu se formează anticorpi la un titru semnificativ, astfel că cercetarea lor în serul bolnavilor nu este indicată.

Epidemiologie. Salmonelozele sunt boli digestive acute ale omului sau animalelor și sunt răspândite pe tot globul. Salmonelele pot produce într-un timp scurt îmbolnăvirea unui mare număr de persoane prin contaminarea alimentelor sau a apei de băut.

Izvorul de infecție al salmonelozelor este constituit în primul rând de animalele domestice și în al doilea rând de omul bolnav sau purtător de salmonele. Trebuie menționat însă că, pentru febra tifoidă, omul este singura sursă de infecție; în natură nu au fost întâlnite animale bolnave sau purtătoare de bacili tifici. Prin dejectele lor, animalele și omul bolnav sau purtător de germeni contaminatează în special alimentele și apa.

Dintre animale, porcul este cel mai frecvent izvor de infecție pentru salmonelozele umane. Urmează bovinele, ovinele, caprinele, păsările, rozătoarele (șoarecii și sobolanii).

Eliminarea germenilor se face în principal prin fecale și, în unele cazuri, și prin urină. Pentru epidemiologia febrilor tifoparatifoide o atenție deosebită trebuie acordată purtătorilor umani.

Transmiterea salmonelelor de la sursă la omul respectiv se face, în primul rând, prin alimente infectate (carne, ouă, lapte sau produse derivate din acestea).

Apa de băut contaminată are, de asemenea, un rol deosebit de important mai ales în transmiterea febrilor tifoparatifoide. Transmiterea se poate face, de asemenea, prin intermediul unor obiecte folosite și contaminate de bolnav sau purtător, precum și cu ajutorul insectelor, în special al muștelor.

Receptivitatea populației la infectarea cu germeni din genul *Salmonella* este generală, dar apariția bolii este în funcție, pe de o parte, de tipul de salmonelă și de doză infectantă, iar pe de altă parte, de capacitatea de rezistență a organismului uman.

Profilaxia și combaterea salmonelozelor se face prin adoptarea unor măsuri complexe ce se adresează izvoarelor de infecție, căilor și mecanismelor de transmitere a agenților patogeni, creșterii rezistenței specifice a masei receptive, supravegherii epidemiologice a teritoriului, îmbunătățirii condițiilor social-economice și educației sanitare a populației.

Purtătorii de germeni trebuie luați în evidență, controlați periodic prin examene bacteriologice și instruiți temeinic pentru a evita să genereze noi cazuri de boală.

1.3. BACILUL PROTEUS

Bacteriile aparținând acestui gen sunt larg răspândite în natură și reprezintă unul dintre principalele microorganisme ale putrefacției, fiind înzestrate cu un bogat echipament enzimatic.

Clasificare. Genul *Proteus* a fost împărțit pe baza caracterelor biochimice în patru subgrupuri: *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*, *Proteus morganii* și *Proteus rettgeri*. La acestea, în ultimul timp, au mai fost adăugate bacteriile din grupul *Providencia* și *Morganella*.

Habitat. Aceste bacterii sunt, în general, germeni saprofiti pe care-i întâlnim, aproape în mod constant, în materiile organice în descompunere, în alimentele alterate, în apele poluate, în flora intestinală normală a oamenilor și a animalelor etc. Pot fi, de asemenea, izolați din unele produse patologice (materii fecale, urină etc.) în caz de boală.

Caractere morfologice și tinctoriale. Sunt bacili Gram-negativi, cei mai mulți dintre ei extrem de mobili, având o lungime variabilă (bacili foarte scurți de 1-2 μ alături de forme filamentoase, lungi de câțiva zeci de μ).

Caractere de cultură. Cresc ușor pe medii de cultură simple. Sunt germeni aerobi, dar pot fi și facultativ anaerobi și se dezvoltă în condiții optime la 34...37°C. Tulbură uniform bulionul, formând un văl la suprafață și invadează rapid toate mediile solide care nu conțin substanțe inhibante. Culturile de *Proteus* au un miros puternic de putrefacție. Fenomenul de invazie este folosit în laborator la izolarea și identificarea bacililor din genul *Proteus*.

Caractere biochimice și de metabolism. Germenii din genul *Proteus* posedă un echipament enzimatic complex. Menționăm, în primul rând, prezența unei ureaze foarte active și a unor dezaminaze care pot fi puse în evidență prin cercetarea transformării fenilalaninei în acid fenil-piruvic și a triptofanului în acid indol acetic. De asemenea, lichefiază gelatina, formează hidrogen sulfurat, fermentează glucoza cu formare slabă de gaz. Nu fermentează lactoza și manita. Unele tulpini pot produce o hemoliză nedifuzibilă.

Rezistența la agenți fizici, chimici și biologici. În mediul exterior, bacili din genul *Proteus* pot trăi în condiții favorabile luni de zile. Culturile încălzite la 60°C sunt omorâte într-o oră. Fenolul 1% îi distruge într-o jumătate de oră. Sunt sensibili

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

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

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

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

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

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

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

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

Frotiuri efectuate direct din produs au numai o valoare orientativă.

În general, bacilul *Proteus* este ușor de izolat, dacă produsul patologic este înșămânțat în lichidul de condensare al unor tuburi cu geloză nutritivă înclinată. Datorită mării lor mobilități, bacilii *Proteus* vor invada întreaga suprafață a mediului (fenomenul de cățărare) și vor fi obținuți în cultura pusă la partea superioară a pantei.

Izolarea bacilului *Proteus* poate fi obținută și prin dispersie pe mediile selective folosite pentru alte *Enterobacteriaceae*. Aceste medii inhibă, prin sărurile biliare pe care le conțin, expansiunea bacililor *Proteus* și permit obținerea unor colonii izolate, caracteristice (colonii cu centrul opac, verde-închis și periferia mai deschisă pe mediul *Istrati-Meiert* sau colonii cu centrul opac, brun și periferia decolorată pe mediul SS).

În continuare, după efectuarea unor frotiuri colorate Gram (bacili gram-negativi, polimorfi), se cercetează caracterele biochimice ale culturii și, în primul rând, punerea în evidență a ureazei, a transformării fenil-alaninei în acid fenil-piruvic și a triptofanului în acid-indol-acetic.

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

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

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

Combaterea și profilaxia acestor infecții se bazează pe asigurarea condițiilor igiene 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 menționate.

Klebsiella rhinoscleromatis este întâlnită în rinosclerom, iar *Klebsiella ozenae* este prezentă la bolnavii de ozenă.

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

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

Caractere de cultură. *Klebsiellele* cresc abundent pe medii obișnuite. În mediile lichide formează la suprafață un inel sau chiar un 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; fermentează glucoza și numeroase alte zaharuri cu producere de gaz; nu formează indol și H₂S și nu lichefiază gelatina; reacția la roșu de metil și testul la fenilalanină sunt negative; formează acetil-metil-carbinol (reacția Voges-Proskauer pozitivă), descompun ureea și cresc în prezența malonatului de sodiu și a KCN. Caracterele biochimice sunt folosite pentru identificarea și clasificarea *klebsiellelor*.

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

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

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

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

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

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

Studiul caracterelor biochimice este absolut necesar pentru precizarea apartenenței germeului cercetat la grupul *Klebsiella*, ca și încadrarea sa într-una 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 germeului izolat la antibiotice și chimioterapice se face totdeauna pentru aplicarea unui tratament corect.

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

1.5. BACILUL DIZENTERIC (SHIGELLA SP.)

Germeii 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, fermentează glucoza dar nu fermentează lactoza, nu lichefiază gelatina, nu formează hidrogen sulfurat. În general, bacilii dizenterici sunt puțin rezistenți în mediul extern. În materiile fecale sunt distruși prin concurență de alți germeni și, de aceea, 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 distruși destul de rapid de substanțele antiseptice obișnuite (fenol, sublimat etc.). Sunt sensibili la acțiunea unor sulfamide, la streptomycină și, mai ales, 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 germeilor. Este legată de prezența unei endotoxine, iar la unii dintre aceștia și de elaborarea unei exotoxine puternice. Aceste toxine acționează asupra tubului digestiv și a sistemului nervos.

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

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

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

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

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

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

Recoltarea materiilor fecale se face astfel: la bolnavii cu forme acute se recoltează cât mai la începutul bolii materiile fecale emise spontan. În mucus, puroi și fragmente de mucoasă se găsesc numeroși bacili dizenterici. Deoarece antibioticele și sulfamidele împiedică dezvoltarea germeilor 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 ținute la gheață sau trebuie să se adauge un lichid conservant.

Însământarea produselor patologice se face pe medii de cultură ca:

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

- Mediul cu bilă uscată (Istrati-Meiert). Pe acest mediu, care înainte de însământare 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 frotiuri colorate. În cazul prezenței bacililor dizenterici vor fi puși în evidență bacili Gram-negativi, imobili.

Caracterele biochimice ale germenilor izolați sunt studiate după tehnicile 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 lamă cu seruri aglutinante antidizenterice. Aglutinarea pe lamă dă o primă orientare. Când este pozitivă, ea trebuie urmată de o aglutinare în tub.

Epidemiologic. Dizenteria 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 germeni.

Transmiterea bolii se poate face prin contact direct cu produsul patologic care provine de la bolnavi sau purtători, dar cel mai adesea această transmitere se face indirect prin obiecte, apă și alimente contaminate sau prin intermediul muștelor. În colectivitățile de copii și în mediul familial, mâinile murdare reprezintă principalul factor de transmitere a dizenteriei. Apa contaminată poate, de asemenea, provoca epidemii întinse de dizenterie bacilară. Alimentele în special laptele și produsele lactate 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 boală se instalează o imunitate de scurtă durată și numai față de tipul de bacil dizenteric care a produs îmbolnăvirea.

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

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

sectorul alimentară 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 sanitară, pentru căpătarea unor deprinderi igienice, cum ar fi spălarea mâinilor înainte de masă, consumul fructelor și al zarzavaturilor numai după spălarea insistentă a acestora la jet de apă etc.

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

2. VIBRIONUL HOLERIC (VIBRIO COMMMA)

Genul *Vibrio* este alcătuit din bacterii Gram-negativă, foarte mobile, care au formă de bastonaș ușor curbat. Majoritatea speciilor aparținând acestui gen sunt saprofite, nu sunt holerigene. Altele produc îmbolnăviri ușoare. Vibriionul holeric, descoperit de Robert Koch spre sfârșitul secolului trecut într-o epidemie de holeră în Egipt, este cel mai important reprezentant al genului *Vibrio* și este holerigen.

Vibriionii holerigeni sunt de două feluri:

- a) vibriionii hemolitici: - tipul I: *V. Inaba*;
- tipul II: *V. Ogawa*;
- tipul intermediar: *V. Hykojima*

- b) vibriioni nehemolitici: *El Tor* și tulpinile *Celebes*

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

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

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

Caractere biochimice și de metabolism. Vibriionul holeric este un germen aerob, fermentează manoză și zaharoza, nu fermentează arabinoza; lichefiază gelatina, produce H₂S și indol, reduce nitrații în nitriți, iar testul oxidazei este pozitiv. Unii vibriioni sunt hemolitici.

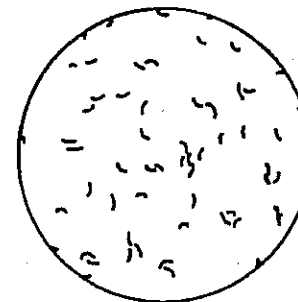


Fig. 18. Vibriionul holeric.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

La bolnavi se recoltează vomismele și scaunele emise spontan, iar la purtătorii sănătoși și convalescenți (după cel puțin 2-3 zile de la vindecare) materiile fecale sunt recoltate după administrarea unui purgativ salin. Cu ajutorul linguriței recoltorului se ia 1 g de materie fecală sau 1-2 ml din scaunul lichid și se introduc în mediul de transport și conservare Carry-Blair din coprorecoltor.

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

Examenul microscopic direct este posibil când în produs există un număr mare de vibrioni și el se poate face cu imersia pe frotiuri colorate după metoda Gram, cu fucsina diluată 1/10, când se constată prezența vibriunilor colorați în roșu sau prin examinarea pe fond întunecat a unui preparat proaspăt (o picătură din scaun diareic sau vâl de la suprafața mediului de îmbogățire) între lamă și lamelă. În acest din urmă caz se pun în evidență mișcările foarte vii ale vibriunilor 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 serul aglutinat bivalent anti-Inaba și anti-Ogawa; 2) o picătură din materialul de testat + o picătură din serul aglutinant absorbit anti-Inaba; 3) o picătură din materialul de testat + o picătură de ser fiziologic (martor). Serurile nu trebuie să conțină substanțe prezervante.

Imobilizarea germenilor pe primul preparat și pe unul din următoarele două, cu păstrarea mobilității pe preparatul-martor, presupune existența vibriunilor holerici în materialul de cercetat.

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

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

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

Totodată, se fac treceri pe un tub cu apă peptonată alcalină pentru o nouă îmbogățire și dispersii pe plăci Petri cu medii solide: geloză nutritivă și medii selective, ca mediul B.S.A. (agar cu săruri biliare) și mediul T.C.B.S. (tiosulfat, citrat, bilă, 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 vibriunii holerici 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 acidifierea (îngălbenirea) fără gaz a mediului solidificat în poziție dreaptă și alcanizarea (înroșirea) mediului solidificat în poziție înclinată. Aglutinarea pe lamă se face cu ser antiholeric bivalent (Inaba și Ogawa) subgrup O1, în paralel cu un martor cu ser fiziologic tamponat și, în continuare, cu seruri aglutinate monovalente absorbite Inaba și Ogawa.

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

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

Vibriunul holerice produce indol, dă reacții pozitive la roșu de metil și produce H₂S. Reacția Voges-Proskauer este pozitivă într-un procentaj foarte mare la tulpinile El Tor. De asemenea, fermentează glucoza fără formare de gaz, manoza, zaharoza și manita, dar nu fermentează lactoza, arabinoza și inozita. Produce lizin-decarboxilază și ornitin-decarboxilază, dar nu produce arginin-dehidrolază. Posedă gelatinază, collagenază, lecitinază 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. Epidemiile 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 vibriunului holerice de la om la om se poate face și prin contact direct, prin mâinile murdare, dar în mod obișnuit transmiterea se face indirect prin apă, alimente, muște și obiecte contaminate.

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

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

Cap.XVI. TOXIINFECȚIILE ALIMENTARE

Toxiinfecțiile alimentare sunt afecțiuni de tip acut sau subacut, care apar fie sub formă de cazuri izolate, fie, cel mai adesea, sub forma unor îmbolnăviri ce cuprind un mare număr de persoane care au consumat același aliment contaminat cu același germene sau cu toxinele sale.

Debutul bolii este brusc și se caracterizează prin tulburări gastrointestinale și fenomene de toxiinfecție generală.

Epidemiile izbucnesc, de obicei, în sezonul cald, apariția lor fiind favorizată de nerespectarea regulilor de igienă alimentară. Depistarea și scoaterea din consum a alimentelor contaminate au ca urmare încetarea epidemiei. Din acest motiv, diagnosticul de laborator al toxiinfecțiilor alimentare comportă o urgență maximă.

Din punct de vedere clinic, toxiinfecțiile alimentare pot îmbrăca două forme, în funcție de predominanța caracterului infecțios sau a celui toxic: **forma infecțioasă** se datorește multiplicării germenilor din alimentele consumate și se caracterizează printr-o perioadă de incubație mai lungă, cu evoluție febrilă, dureri de cap, greață, vărsături, diaree, dureri abdominale și poate duce la moarte. Acest tip de boală este provocat, mai ales, de germenii din familia *Enterobacteriaceae*. Durata bolii este de 3-5 zile, după care urmează dispariția simptomelor; **forma toxică** este cauzată de toxinele elaborate de germeni (stafilococ, b.botulinic etc.) în alimentele contaminate și se caracterizează printr-o perioadă de incubație foarte scurtă, cu vărsături, diaree, stare de intoxicație și febră moderată sau chiar absentă. Durata bolii este scurtă, de 24 h sau mai puțin, cu excepția botulismului, în care boala se prelungește foarte mult.

Datorită evoluției scurte a bolii și a variabilității germenilor incriminați, în toxiinfecțiile alimentare nu se semnalează o imunitate solidă față de agenții patogeni respectivi.

Germenii care pot provoca toxiinfecțiile alimentare sunt: enterobacteriaceele (*Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia* și *Proteus*); cocii patogeni enterotoxici (stafilococii și streptococii enterotoxici); bacilii aerobi formatori de spori (*B.subtilis*, *B.cereus* și *B.anthraxis*); bacilii anaerobi formatori de spori (*Clostridium perfringens* și *Clostridium botulinum*); bacteriile care degradează alimentele până la formarea unor substanțe toxice.

Toxiinfecțiile alimentare produse de salmonele

Germenii din genul *Salmonella* dețin primul loc în toate țările, atât în frecvență, cât și ca importanță epidemiologică în producerea toxiinfecțiilor alimentare.

Salmonele dau o boală de tip infecțios care se manifestă după 8-24 h de la consumarea alimentului contaminat. Această perioadă de incubație este necesară pentru multiplicarea germenilor și invadarea organismului infectat. Debutul bolii este brusc, cu stare generală alterată, ridicarea temperaturii la 38-40°C, dureri de cap, greață, vărsături și scaune diareice, frecvente, apoase sau mucoase, uneori cu aspect

dizenteriform. După 2-4 zile, în mod obișnuit aceste simptome dispar, iar scaunele se normalizează. Au fost semnalate și cazuri în care boala se poate agrava, căpătând un aspect septicemic, cu evoluție gravă, care poate merge până la moartea bolnavului. Ca tratament, la regimul dietetic se pot asocia unele antibiotice de profil, cum sunt cloramfenicolul, streptomycină etc., care pot scurta evoluția bolii.

Diagnosticul de laborator se bazează pe depistarea salmonelei care a produs boala în produsele patologice și în alimentele contaminate și, de aceea, trebuie cercetate:

- produsele patologice recoltate de la bolnav: materii fecale, vărsături, urină și, eventual, sânge;
- alimentele sau apa, suspecte de a fi contaminate;
- produsele (materii fecale și urină) recoltate de la suspecți contacti, foști bolnavi, personalul care a mânuit sau a prelucrat alimentele;
- fragmentele de organe recoltate de la cadavru: splină, ganglioni mezenterici, intestin etc., precum și sânge prelevat direct din inimă.

Izolarea și identificarea agentului etiologic se fac prin tehnicile utilizate în mod curent în diagnosticul salmonelelor (coprocultură, urocultură, hemoculturi, organoculturi, controlul alimentelor și al apei potabile etc.). Pentru depistarea sursei de infecție, salmonelele izolate sunt supuse tipajului fagig.

Toxiinfecțiile alimentare cauzate de shigele

Bacilii dizenterici pot da naștere la izbucniri de toxiinfecții alimentare cu o evoluție relativ scurtă, care se manifestă prin greață, vărsături, dureri abdominale și scaune frecvente, mucosanguinolente, însoțite de tenesme. Boala este însoțită de ridicarea moderată a temperaturii (38°C), dureri de cap etc. Ca tratament se prescriu, în general, pe lângă un regim igienico-dietetic, și unele antibiotice la care shigelele sunt sensibile: cloramfenicol, aureomicină, streptomycină.

Diagnosticul de laborator urmărește punerea în evidență a shigelelor în materiile fecale recoltate de la bolnav și de purtătorii de germeni care au manipulat alimentele, precum și în alimentele contaminate.

Izolarea și identificarea germenilor se fac prin tehnicile curente aplicate în diagnosticul bacteriologic al dizenteriei bacilare prin coprocultură.

Toxiinfecțiile alimentare produse de bacilul coli

Toxiinfecțiile produse de germenii care aparțin genului *Escherichia* se manifestă, în mod obișnuit, prin tulburări digestive: greață, vărsături, dureri abdominale și scaune diareice. Tulburările generale sunt mai ușoare, iar febra este moderată.

Diagnosticul de laborator se bazează pe izolarea germenului din diverse produse patologice (vărsături, materii fecale etc.) și din alimentele bănuite a fi produs îmbolnăvirea, urmată de identificarea biochimică și serologică.

În caz de urgență, tulpinile patogene de *E.coli* pot fi identificate direct din produsele patologice, prin aplicarea tehnicii de imunofluorescență.

Toxiinfecțiile alimentare produse de *Proteus*

Toxiinfecțiile alimentare produse de germeni din genul *Proteus* au o perioadă de incubație relativ scurtă. Boala se manifestă prin tulburări gastrointestinale (greață, vărsături și scaune diareice), dar, de obicei, fără febră și fără alterarea prea pronunțată a stării generale. Vindecarea survine după 1-2 zile.

Diagnosticul de laborator se bazează pe izolarea și identificarea germenului din produsele patologice (materii fecale, urină, vărsături și, mai rar, sânge) și alimente (carne, lapte, brânzeturi, ouă etc.).

Toxiinfecțiile alimentare produse de stafilococi

Stafilococii enterotoxici produc toxiinfecții alimentare de tip toxic. Boala are o perioadă de incubație scurtă (1-6 h) și debutează cu salivatie, greață, vărsături, crampe abdominale și scaune diareice. Temperatura este, de obicei, normală. După 12-48 h fenomenele de boală dispar și survine vindecarea. Boala se datorește unei exotoxine elaborate de stafilococ (enterotoxina stafilococică). Sursa de infecție este constituită de animalele bolnave (carnea și laptele lor), de la omul bolnav care prezintă infecții stafilococice ale pielii, furuncule etc. și de purtătorii sănătoși de germeni (nazali, nazofaringieni, fecali etc.) care mănuiesc alimentele și le contaminatează printr-o igienă defectuoasă. Alimentele bogate în proteine și glucide contaminate cu stafilococi oferă, la temperaturi convenabile (optimum 37°C) și după o durată de timp corespunzătoare, condiții bune de cultivare și de elaborare a enterotoxinei.

Diagnosticul de laborator se bazează pe izolarea și identificarea stafilococilor din alimente incriminate și din produsele patologice recoltate de la bolnav.

Pentru identificarea stafilococilor enterotoxici se vor face investigații suplimentare (producere de enterotoxină, testarea biologică pe pisei a produselor sau germenilor etc.).

În scopul depistării sursei de infecție și a legăturilor dintre cazurile de îmbolnăviri se recomandă testarea sensibilității la bacteriofagi a tulpinilor de stafilococ izolate.

Toxiinfecțiile alimentare produse de streptococi

Se caracterizează prin incubație scurtă (4-12 h) și fenomene digestive (grefuri, vărsături, scaune diareice) ușoare. Speciile de streptococi cel mai des întâlnite în producerea toxiinfecțiilor alimentare sunt enterococii, streptococii viridans și streptococii beta-hemolitici. În acest din urmă caz, bolnavii pot prezenta angină și chiar scarlatină.

Diagnosticul de laborator constă în punerea în evidență a streptococilor enterotoxici în alimentele incriminate și în produsele patologice recoltate de la bolnav (materii fecale, vărsături, exsudat faringian etc.). Izolarea și identificarea sunt efectuate după tehnicile folosite în diagnosticul bacteriologic al infecțiilor streptococice.

Toxiinfecțiile alimentare produse de germeni aerobi formatori de spori

Din această grupă de germeni au fost identificate trei specii care produc toxiinfecțiile alimentare: *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* și *Bacillus anthracis*.

Bacillus subtilis poate fi ușor izolat din produsele patologice recoltate de la bolnavi sau din alimentele care au produs îmbolnăvirea, prin însămânțarea acestora în bulion. Germeul poate fi identificat pe baza prezenței sporilor și a cercetării caracterelor biochimice.

Bacillus cereus poate provoca o toxiinfecție alimentară cu fenomene digestive (greață, vărsături și dureri abdominale, fără febră) care dispar complet după câteva ore.

Produsele patologice (materii fecale, vărsături etc.) recoltate de la bolnavi, precum și alimentele incriminate sunt însămânțate în bulion și pe geloză nutritivă 2%. Din culturile obținute se fac frotiuri care se colorează prin metoda Gram și prin colorații speciale pentru spori. De asemenea, se cercetează caracterele biochimice și de patogenitate.

Bacillus anthracis produce gastroenterita carbunoasă, boală gravă ce apare la persoanele care au consumat carne de la un animal bolnav de cărbune, insuficient prelucrată termic.

Diagnosticul de laborator este pus cu destulă dificultate. Germeul nu poate fi izolat, de obicei, din sânge și materii fecale, dar poate fi pus în evidență la autopsie pe impresiunile de organe (splină, ganglioni etc.).

Toxiinfecțiile alimentare produse de germeni anaerobi formatori de spori

Dintre anaerobii sporulați, *Bacillus perfringens* și *Clostridium botulinum* sunt speciile care produc toxiinfecțiile alimentare.

Bacillus perfringens produce o toxiinfecție care se manifestă prin greață, dureri abdominale și scaune diareice, fără febră. Uneori, pot apărea și cazuri cu evoluție gravă.

Diagnosticul de laborator. Se recoltează fecale și produse de vărsătură de la bolnavi, fragmente de organe (în special intestin subțire) de la cadavre și probe din alimente consumate de bolnavi (carne, lapte etc.).

Din fragmentele de organe se fac frotiuri prin impresiune, iar produsele patologice și alimentele sunt însămânțate pe medii anaerobe pentru cultivarea și izolarea *B. perfringens*, după ce în prealabil au fost mojarate și încălzite 30 min., la 80°C, în scopul distrugerii altor germeni prezenți în proba examinată.

Clostridium botulinum. Botulismul este o toxiinfecție alimentară produsă de consumul conservelor de legume sau de carne contaminată cu bacilul botulinic și cu toxina produsă de acesta. Boala se datorește unei intoxicații puternice, care se manifestă prin oboseală accentuată, dureri de cap, amețeli, limitarea mișcărilor globilor oculari (vedere dublă), dificultăți la înghițit și stingerea vocii. În unele cazuri paralizia se generalizează și omul bolnav moare prin asfixie.

Diagnostic de laborator. Se recoltează de la bolnavi produse patologice și probe

din alimentele consumate, urmărindu-se izolarea și identificarea germenului și a toxinei botulinice. Alimentele recoltate, fragmentele de organe, materiile fecale și produsele de vărsătură sunt mojarate cu multă precauție, după care sunt centrifugate, sedimentul obținut fiind folosit pentru izolarea bacilului botulinic, iar supernatantul pentru punerea în evidență a toxinei botulinice, prin inoculări la animalul de laborator.

Toxiinfecțiile alimentare cauzate de bacterii care degradează alimentele până la formarea unor substanțe toxice

În această grupă se încadrează unele îmbolnăviri acute cauzate de consumul alimentelor alterate de activitatea enzimatică a unor bacterii. Boala se manifestă printr-o stare generală proastă, erupție urticariană, dureri de cap, senzație de căldură etc. Aceste fenomene de tip alergic sunt produse de histamina rezultată din degradarea alimentelor.

Dintre bacteriile care produc aceste transformări menționăm germeni de putrefacție, *Proteus* etc.

Epidemiologia toxiinfecțiilor alimentare

Sursa de infecție în toxiinfecțiile alimentare este constituită de animale și om, purtători ai microbilor respectivi. Animalele incriminate mai frecvent sunt păsările (în special carnea și ouăle de rață), porcii, rozătoarele (șobolanii și șoarecii), bovinele, ovinele și, mai rar, câinele, pisica sau alte animale. Sursa de infecție umană este reprezentată de omul bolnav și purtătorii de germeni. Eliminarea germenilor se face prin materii fecale, urină, vărsături, secreții nazo-faringiene, puroi etc.

Căile de transmitere și modul de contaminare. Toxiinfecțiile alimentare se transmit prin intermediul alimentelor. Acestea pot fi contaminate direct ca atare (laptele sau carnea care provin de la animale bolnave, ouă de rață etc.) sau pot fi contaminate ulterior, prin contactul cu dejecții de la animalele bolnave sau purtătoare de germeni, prin utilaje sau ambalaje contaminate, prin insecte sau rozătoare sau prin intermediul personalului (bolnav sau purtător de germeni) care manipulează alimentele).

Alimentele contaminate produc îmbolnăviri când conțin un număr mare de germeni sau cantități de toxină capabile să declanșeze boala.

Acestea sunt posibile în următoarele situații:

- alimentul contaminat este un mediu favorabil dezvoltării germenului respectiv;
- temperatura la care este păstrat alimentul permite o cultivare a germenului și elaborarea de toxină;
- timpul de păstrare a alimentului în aceste condiții favorabile este suficient de mare pentru dezvoltarea numărului de germeni și a cantității de toxină care să producă îmbolnăvirea;
- realizarea condițiilor de anaerobioză pentru bacteriile anaerobe (alimente conservate în recipiente închise ermetic sau sub strat de ulei);

- prelucrarea termică insuficientă pentru distrugerea microorganismelor respective.

Ancheta epidemiologică este obligatorie în toate cazurile de apariție a toxiinfecțiilor alimentare în familii sau colectivități. Această anchetă oferă indicații prețioase pentru precizarea cauzei care a declanșat îmbolnăvirile și dă posibilitatea de a se lua măsuri imediate pentru limitarea cazurilor și de a se aplica un tratament adecvat, chiar înainte de obținerea rezultatelor de laborator.

Profilaxia toxiinfecțiilor alimentare. Pe lângă măsurile de igienă generală este necesar să se aplice și unele măsuri speciale referitoare la alimente și la personalul din sectorul alimentar.

Pentru evitarea apariției cazurilor de toxiinfecții alimentare, se va avea în vedere ca alimentele să nu provină de la animale bolnave.

De asemenea, manipularea, modul de preparare, de conservare, de transport și de desfacere a alimentelor trebuie să fie astfel făcute încât să excludă posibilitatea de a se contamina cu germeni ce pot provoca toxiinfecțiile alimentare.

Măsurile sanitare de protecția alimentelor privesc:

- salubritatea localului destinat blocului alimentar;
- asigurarea apei potabile necesare preparării alimentelor și pentru întreținerea curățeniei și unei igiene personale corespunzătoare;
- îndepărtarea corectă a reziduurilor;
- aplicarea măsurilor de prevenire și combatere a muștelor, a altor insecte și a rozătoarelor;
- asigurarea unui circuit tehnologic corect, care să evite alterarea și contaminarea alimentelor supuse prelucrării termice;
- respectarea unui regim permanent de curățenie perfectă a localului, a utilajelor și vaselor;
- păstrarea alimentelor la frigider până la folosire;
- prelucrarea termică a alimentelor, care trebuie să fie astfel efectuată încât să asigure distrugerea agenților patogeni.

În ceea ce privește personalul care manipulează alimentele, acesta trebuie să respecte câteva reguli de igienă obligatorii:

- spălarea mâinilor cu apă și săpun și uscarea lor, preferabil la aer cald, înainte de a manipula un aliment;
- alimentele să nu fie atinse cu mâna decât în cazurile în care acest lucru este strict necesar;
- să folosească în mod corect materialul de protecție.

Controlul medical periodic al personalului din sectorul alimentar este obligatoriu.

Purtătorii de germeni și persoanele bolnave pot contamina alimentele și de aceea trebuie îndepărtate din sectorul alimentar până la încetarea stării de purtător sau până la completa lor vindecare.

Cap. XVII. BACILUL DIFTERIC (CORYNEBACTERIUM DIPHTERIAE)

Bacilul difteric este agentul patogen care determină difteria la om. Din genul *Corynebacterium* mai fac parte și unele specii saprofite (pseudodifterice), cum sunt: *C.xerose*, *C.hoffmanni*, *C.cutis commune*, precum și specii patogene pentru animale ca, de exemplu, *C.ulcerans*, care poate provoca la om angine ulcerative și chiar intoxicații de tip difteric.

Habitat. Bacilul difteric se localizează în mod obișnuit pe mucoasa rinofaringiană a purtătorilor de germeni. La omul bolnav este întâlnit în număr mare în falsele membrane.

Caractere morfologice și tinctoriale. Forma tipică a bacililor difterici este de bastonaș, cu extremități mai proeminente, aspect cuneiform sau de halteră, având lungimea de 2-6 μ și grosimea de 0,5 μ sunt Gram-pozitivi la limită (devin ușor Gram-negativi dacă se prelungește decolorarea cu alcool-acetonă), sunt imobili, nesporulați, necapsulați. Se pot prezenta și sub formă de bacili polimorfi cu dimensiuni variabile. Gruparea lor este caracteristică, având aspect de litere cuneiforme sau de bețe de chibrituri aruncate pe masă. *C.diphtheriae* posedă corpusculi metacromatici Babeș-Ernst, rotunzi, caracteristici.

Caractere de cultură. Bacilul difteric este un germene aerob și facultativ anaerob care se dezvoltă optim la 36-37°C și la pH 7,4-7,6; crește bine pe mediul Löffler (ser coagulat de bou, glucozat 1%). Izolarea din produsul patologic se face prin însămânțări pe medii selective (Tinsdale modificat și Gundel-Tietz) și pe geloză sânge. Pe mediul Tinsdale, *C.diphtheriae* produce, după 24-48 h de incubare, la 37°C, colonii mici, negre-cenușii, înconjurate de un halou brun, caracteristic. Pseudodiftericii cresc sub formă de colonii negre, fără halou brun, cu excepția *C.ulcerans*, care produce un halou foarte intens. Pe mediul Gundel-Tietz, în funcție de aspectul coloniilor, pot fi diferențiate cele trei tipuri biochimice (biotipuri) de *C.diphtheriae*: *gravis*, *mitis* și *intermedius*, toate având proprietatea de a reduce teluritul de potasiu în telur metalic de culoare neagră. După 48 h de incubare la 37°C și încă 2-3 zile pe masa laboratorului, tipul *gravis* produce colonii negre, mari, cu suprafață granulatată și aspect de margaretă (margini crênelate, centru ridicat și striuri radiare); tipul *mitis* produce colonii mai mici, negre, convexe, lucioase, cu margini regulate, iar tipul *intermedius*, colonii negre

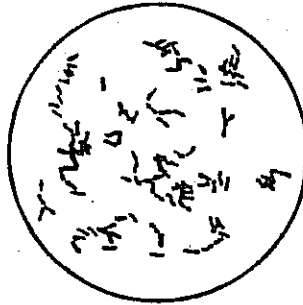


Fig.19. Bacilul difteric.

cu aspecte intermediare între primele două (talie ceva mai mare, suprafața granulară, centrul roșu mamelonat, margini regulate, transparente).

Pe geloză-sânge bacilii difterici produc colonii rotunde, friabile cu suprafața ușor granulară, de culoare albă, cu o tentă gri ca perla. Pe mediul Loeffler bacilii difterici produc colonii albe, care seamănă cu picăturile de spermanțet.

Caractere biochimice și de metabolism. *C.diphtheriae* este un microb cu exigențe nutritive în factori de creștere (vitamine, aminoacizi), care se găsesc în sângele sau serul inclus în mediile de cultivare. Tulpinile toxigene elaborează o toxină difuzibilă, specifică, de natură proteică, responsabilă de simptomele de toxiinfecție difterică. Bacilul difteric produce cistinaza, care descompune cistina cu formare de hidrogen sulfurat (proba cistinazei este pozitivă), dar nu hidrolizează ureea cu producerea de amoniac (este ureazo-negativ). În diagnosticul de laborator mai sunt utilizate proprietățile fermentative asupra unor zaharuri: glucoză, zaharoză, manită, maltoză, levuloză, dextrină, amidon, glicogen. Bacilul difteric, indiferent de biotip, fermentează constant glucoza, maltoza și levuloza și nu fermentează zaharoza și manita. Tipul *gravis* fermentează cei trei polizaharizi (dextrină, amidon, glicogen), tipul *mitis* nu fermentează nici un polizaharid, iar tipul *intermedius* fermentează (uneori, tardiv) numai dextrina.

Rezistența la agenți fizici, chimici și biologici. În exsudate și în false membrane, *C.diphtheriae* posedă o rezistență marcată la uscăciune. Antisepticele uzuale îl distrug în câteva minute. Este sensibil la eritromicină, penicilină, cloramfenicol, tetraciclina și la bacteriofagi specifici.

Structura antigenică. La bacilul difteric au fost descrise diverse antigene legate de corpul bacterian. Până în prezent însă nu s-a reușit alcătuirea unei scheme antigenice de diagnostic cu aplicații practice. Exotoxina difterică este puternic antigenică și este comună tuturor tulpinilor de *C.diphtheriae*.

Caractere de patogenitate. În funcție de localizarea microbului, la om se cunosc mai multe forme de difterie: cea mai frecventă este angina sau amigdalita difterică, urmată de rinita difterică și crupul sau laringita difterică. Mult mai rar întâlnite sunt: difteria cutanată a plăgilor, conjunctivita difterică și vulvita difterică la fetețe. Bacilul difteric rămâne cantonat la poarta de intrare în organism, unde se multiplică și elaborează toxina responsabilă de leziunile locale (miocardice, nervoase, în capsulele suprarenale etc.) și de simptomele generale ale bolii.

lepurele și cobaiul sunt animalele de laborator cele mai sensibile la acțiunea toxinei difterice. Cobaiul inoculat pe cale subcutanată cu o cultură în bulion de bacil difteric toxigen moare în 1-3 zile, cu o simptomatologie specifică de intoxicație difterică: edem gelatinos hemoragic la locul de inoculare, transsudat serosanguinolent în seroase (pleură, peritoneu, pericard), congestie puternică în organele interne, hipertrofie, congestie și chiar hemoragii în capsulele suprarenale. Boala la cobai constituie un model experimental, prin care se testează "in vivo" toxigenitatea bacililor difterici.

Imunitatea. Starea de imunitate în difterie este preponderent antitoxică și se obține după trecerea prin boală sau după vaccinarea profilactică cu anatoxină difterică (toxina detoxifiată cu formol).

Tratamentul. Difteria este o toxiinfecție care beneficiază de un tratament specific cu ser antitoxic antidifteric preparat pe cai administrat cât mai precoce posibil, și urmat de vaccinarea specifică cu anatoxină difterică. Tratamentul nespecific al difteriei constă din administrarea de antibiotice (eritromicină, penicilină, cloramfenicol, tetracilină), care sunt folosite și pentru sterilizarea purtătorilor nazofaringieni de bacili difterici.

Diagnosticul de laborator. Atât la bolnav, cât și la purtătorii de *C.diphtheriae*, diagnosticul de laborator urmărește izolarea și identificarea germenului, precum și stabilirea caracterului toxicogen al tulpinii respective.

Recoltarea exsudatelor se face pe tampoane sterile, dimineța pe nemâncate sau la cel puțin 2-3 h după masă, înainte de a se face gargară cu antiseptice sau tratamente cu antibiotice.

De la bolnavi sau suspecți de angină difterică se recoltează trei tampoane din secreția faringoamigdaliană și un tampon din secreția nazală (complementar).

De la cazurile suspecte de difterie cu alte localizări (plăgi chirurgicale, arsuri difterizate, secreții oculare, vulvovaginale), se recoltează trei tampoane: un tampon cu exsudat la nivelul leziunii, un tampon cu secreție faringoamigdaliană și un tampon cu secreție nazală.

De la contactii din focare de difterie sau de la purtătorii sănătoși se recoltează un tampon cu exsudat nazal și un tampon cu secreție nazală.

De la contactii din focare de difterie sau de la purtătorii sănătoși se recoltează un tampon cu exsudat nazal și un tampon cu exsudat faringoamigdalian.

Diagnosticul bacteriologic al difteriei la bolnavi. Tamponul nr.1 (din cele trei tampoane cu exsudat din leziune) servește la efectuarea a două frotiuri de orientare: unul colorat prin metoda Gram, care permite diferențierea anginei difterice de anginele fuzospirilare, și celălalt colorat prin metoda Del Vecchio, pentru evidențierea corpusculilor metacromatici. Tamponul nr.2 se descarcă, produsul fiind dispersat cu ansa pe mediile solide de izolare: Tinsdale, Gundel-Tietz, geloză-sânge, Löffler. Tamponul nr.3 este incubat 12-14 h la 37°C în mediul de îmbogățire OCST și se fac treceri tot prin dispersii pe mediile solide, crescând astfel șansele de izolare din produsele care conțin un număr mic de bacili difterici. Tampoanele complementare (nazale, faringoamigdalieni) sunt însământate în OCST, cu descărcări ulterioare pe medii solide ca și tamponul nr.3 și permit depistarea modului de localizare a agentului patogen pe mucoasele căilor respiratorii. După 24-48 h de incubare la 37°C se cercetează aspectul macroscopic al coloniilor suspecte apărute pe mediile solide și se fac repicări, una-două colonii pe un tub cu Löffler sau în sectoare pe plăci cu geloză-sânge, cu frotiuri concomitente din aceleași colonii, colorate Gram și Del Vecchio, pentru stabilirea caracterelor morfologice microscopice. După alte 24 h, din

culturile rezultate se fac frotiuri pentru controlul de puritate și, apoi, însământări pentru cercetarea caracterelor enzimaticice (fermentarea zaharurilor în mediul Hiss cu indicator Andrade, proba cistinazei - H₂S -, proba ureazei în mediul Blake-Christensen folosit și la identificarea toxigenezei "in vitro" prin testul de precipitare în gel E.O.F. (Elek, Ouchterlony, Frobisher) sau "in vivo" prin inoculare la cobai. De asemenea, în scop epidemiologic se poate face și tipajul bacteriofagic.

Diagnosticul bacteriologic la purtători. Cele două tampoane cu exsudat nazal și faringoamigdalian sunt incubate 12-14 h în mediul OCST și, apoi, descărcate fiecare pe câte o jumătate de placă (φ 12 cm) cu mediul Tinsdale, efectuând cu ansa dispersii largi pentru obținerea de colonii izolate înconjurate de haloul brun caracteristic (după o incubare de 24-48 h la 37°C). Coloniile tipice sunt repicate pe mediul Löffler și culturile obținute sunt folosite pentru cercetarea caracterelor morfologice, a caracterelor enzimaticice și a toxigenezei "in vitro" (testul E.O.F.).

Epidemiologie. Difteria este o boală infecțioasă aerogenă, specifică omului, frecvent răspândită în regiunile cu climă temperată și rece. Sursa de infecție este reprezentată de bolnavul de difterie și de purtătorii de germeni. Boala se transmite de obicei direct prin germenii din secrețiile nazofaringiene ce sunt răspândite în atmosferă sub formă de picături în timpul vorbirii, tusei sau strănutului. Transmiterea infecției se poate face și indirect prin intermediul unor obiecte (veselă, lenjerie, jucării, cărți) contaminate cu produse patologice.

Receptivitatea la boală este maximă în copilărie, în special între 2 și 5 ani. Punerea în evidență a acestei receptivități se face prin I.D.R. Schick. În acest scop se inoculează intradermic, pe fața anterioară a antebrățului, cantități mici de toxină difterică. La persoanele receptive toxina inoculată nu este neutralizată, deoarece acestea nu au anticorpi antitoxici antidifterici în ser, astfel că la 24-28 h de la inoculare apare o zonă de eritem care dispare treptat în zilele următoare.

Cea mai importantă măsură profilactică contra difteriei este constituită de imunizarea activă cu anatoxină difterică ce se poate administra singură sau asociată cu anatoxina tetanică (bivaccin DT) sau și cu vaccin antipertussis (trivaccin DTP).

În țara noastră, aplicarea unui program riguros și sistematic de depistare a copiilor receptivi și vaccinarea în masă a populației a condus la scăderea remarcabilă a cazurilor de difterie.

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

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

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

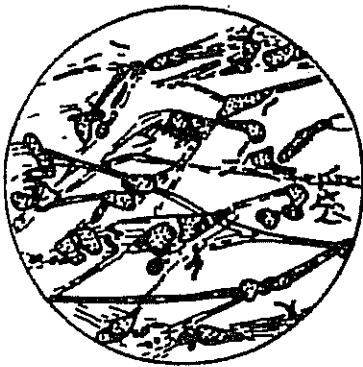


Fig.20. Bacilul tuberculos
(frotiu din spută)

Caractere morfologice 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 compoziții chimice particulare, în care predomină lipidele, se colorează foarte greu și, ulterior, rezistă la decolorarea cu alcool și acizi minerali diluați. Din acest motiv, micobacteriile sunt denumite "bacili acid-alcoolo-rezistenți". Pentru a fi puse în evidență, se folosește colorația Ziehl-Nielsen. Pe frotiurile 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 saporofite, care se dezvoltă ușor și rapid chiar pe mediile 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 mediile lichide micobacteriile formează la suprafață un vâl subțire care se îngroașă treptat. Pe măsură ce se îngroașă, vâlul se cutează, se fragmentează și cade la fundul recipientului, iar la suprafață începe să se formeze un nou vâl. Bacilii tuberculoși de tip uman fac un vâl mai gros decât cel bovin și alcalinizează la început

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Tratamentul. Descoperirea unor antibiotice și chimioterapice active asupra bacilului tuberculos a modificat radical prognosticul grav al afecțiunilor tuberculoase. Dintre acestea, cele mai importante sunt: hidrazida acidului izonicotinic (H.I.N.), streptomycină, 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 închide ermetic. În tuberculoza pulmonară, dacă bolnavul expectorează, se recoltează sputa. La bolnavul care nu expectorează, se recoltează lichidul de spălătură laringotraheală, iar la copii, deoarece își înghit sputa, se recoltează lichidul de spălătură gastrică și materiile fecale.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Stratul cremos este aspirat într-o pipetă Pasteur prevăzută cu o pară de cauciuc. Pe 2-3 lame degresate, care sunt așezate pe o platină încălzită sau pe un geam deasupra 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-rodamină B și examinare la microscopul cu fluorescență 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 absorbție).

Însămânțarea produselor pe medii de cultură. Produsele suprainfectate sunt tratate prin omogenizare și decontaminare. Se recomandă însămânțarea "cu picătura". Într-o eprubetă 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 bromtimol) și 10 picături de NaOH 4%. Se agită bine și se lasă 30 min la 37°C.

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

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

Centrifugarea se face la o turație 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 frotiu colorat după metoda Ziehl-Nielsen.

O atenție deosebită trebuie acordată diferențierii bacililor tuberculoși "tipici" de micobacteriile "atipice" și cele saprofite, care este posibilă prin examenul microscopic al culturilor, examenul macroscopic al coloniilor, momentul apariției primelor culturi, rezistența la HIN, testul catalazei etc.

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

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

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

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

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

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

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

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

Testarea sensibilității la tuberculostatice a bacilului tuberculos se face la toți bolnavii la care s-a reușit izolarea și cultivarea germenilor, atât la începutul bolii, cât și periodic în cursul tratamentului. Pentru efectuarea antibiogrammei substanțele antibiotice sau chimioterapice pot fi sau incorporate în cantități exact măsurate în mediile de cultură sau aplicate sub forma 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 tehnica 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 tuberculină este utilizată în diagnosticul biologic al infecției tuberculoase.

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

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

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

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

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

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

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

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

Cap.XIX. BACILUL LEPREI (MYCOBACTERIUM LEPRAE)

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



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

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

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

Diagnosticul de laborator se bazează pe punerea în evidență a bacilului leproso prin efectuarea unor frotiuri din produsele patologice și colorarea acestora prin metoda Ziehl-Nielsen. La examinarea frotiurilor se constată numeroși bacili acido-alcoolorezistenți, așezați "ca țigările în pachet", extracelulari și, mai ales, intracelulari.

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

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

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

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

Cap.XX. BACILUL CĂRBUNOS (BACILLUS ANTHRACIS)

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

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

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

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

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

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

clorura de var 5%, formolul 1-2%, distrug rapid formele vegetative. Sporii sunt distruși după un contact prelungit cu antisepticele, sublimatul 2‰ fiind printre cele mai 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 virulența germenului și este de natură polipeptidică. Polipeptidul glutamic capsular este puternic imunogen și responsabil de inducerea anticorpilor protectori din serul anticărbunos terapeutic preparat pe cal. Din corpii 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 *dalac*. Prezența capsulei are o acțiune antifagocitară, favorizând virulența 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; toxina ca și antigenul capsular joacă un rol în imunitate. Cauza morții prin cărbune se datorește septicemiei care provoacă blocarea capilarelor sanguine, dar și toxinei care produce starea de șoc; sângele este roșu-închis sau brun-negricios, fapt pentru care boala a luat denumirea de cărbune.

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

Imunitatea anticărbunoasă dobândită prin îmbolnăvire 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 administrează 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, sângele în formele septicemice de antrax, secreții sau exsudate fibrinoase faringoamigdalene din cărbunele 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, splină, ficat, păr, vase), de la cadavrele oamenilor sau ale animalelor moarte de cărbune.

În sânge și L.C.R., germele patogen se află în cultură pură; hemocultura se face prin însămânțarea a 10-15 ml sânge recoltat aseptice din venele 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 puncție lombară aseptice, este însămânțat ca atare într-un tub cu bulion și, prin dispersii, pe plăci Pétri cu geloză 2% și geloză-sânge (5 ml-8 ml %).

Recoltarea serozității sau a lichidului de edem se face în mod aseptice, cu o pipetă Pasteur fin efilată, cu care se puncționează veziculele pustuloase; se fac froțiuni colorate Gram, Giemsa și cu albastru Loeffler. În paralel se fac dispersii pe geloză 20% și dispersie pe geloză-sânge, iar din veziculele nerupte se face o însămânțare pe bulion. Când este posibil, se fac și inoculări subcutanate sau intraperitoneale la șoarece. Pe froțiurile colorate Gram se observă bacili Gram-pozitivi capsulați, cu capetele tăiate drept și rare leucocite polimorfonucleare. Pe froțiurile colorate cu Giemsa se văd clar leucocitele; atât pe froțiurile Giemsa, cât și pe cele colorate cu albastru Loeffler, 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-sânge** bacilul cărbunos dă aceleași colonii tipice care sunt nehemolitice, ceea ce îl diferențiază de bacilii saprofiți. În bulion germele formează peliculă la suprafață, iar preparatul proaspăt între lamă și lamelă arată lipsa de mobilitate, pozitivă la bacilii saprofiți, aerobi, Gram-pozitivi. Froțiurile din culturi pe medii solide sau în bulion arată bacili cu caracterele menționate mai sus.

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

În același mod se va proceda și cu sputa.

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

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

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

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

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

Peste câteva grame de țesut sau organe tăiate mărunt se adaugă un volum de 5 ori mai mare de soluție salină fiziologică. Se fierb 2-10 min în funcție de cantitatea de organ. Prin fierbere se precipită proteinele și se extrage polizaharidul specific somatic, termostabil, care este filtrat prin hârtie de filtru. Cu pipeta Pasteur se introduce 0,5-1 ml extract într-un tub de precipitare peste care se adaugă cu atenție, tot cu pipeta Pasteur, ser precipitant anticărbunos care, fiind mai greu, este lăsat să curgă încet, la fundul tubului. Reacția este pozitivă când la limita de separație dintre cele două lichide, în 3-5 min, apare un inel alb de precipitare.

Epidemiologie. Antraxul este o zoonoză pe care o întâlnim și la om în mod accidental. Izvorul de infecție pentru om este reprezentat de animalele bolnave și cadavrele lor. Omul se infectează în cursul îngrijirii animalului bolnav, a sacrificării acestuia, sau, mai rar, prin consumul de carne infectată. Muncitorii care prelucrează blănurile pot contracta antrax pulmonar prin inhalarea de pulberi contaminate. Receptivitatea populației la boală 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 blănurilor, 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 infectării.

Cap.XXI. BACTERII ANAEROBE

1. CARACTERE GENERALE

Bacteriile anaerobe sunt germeni care se dezvoltă numai în absența sau în prezența unei cantități foarte mici de oxigen. Dintre numeroasele specii de acest gen, numai câteva prezintă importanță pentru patologia umană. Ele pot fi grupate astfel:

- Specii care se găsesc în mod obișnuit în *cavitățile naturale ale omului și ale animalelor* (streptococi și stafilococi anaerobi etc.) și care *nu formează spori, nu produc toxine*, dar pot genera *îmbolnăviri grave*.

- Specii care se întâlnesc, în general, în *pământ*, formează spori și elaborează *toxine foarte puternice*. Dintre acestea se menționează bacilul tetanic, bacilul botulinic și germenii gangrenei gazoase.

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

Metode fizice:

- înlăturarea oxigenului din mediu prin fierbere și răcire bruscă;
- introducerea recipientelor cu medii într-un exsicator din care se scoate aerul cu o pompă de vid. În locul aerului scos se poate introduce azot sau alt gaz inert, fără oxigen.

Metode chimice:

- introducerea în 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 mediile de cultură.

Metode biologice:

- cultivarea germeilor anaerobi în prezența unor germeni puternic aerobi care consumă oxigenul;
- adăugarea la mediile de cultură a unor fragmente de organe animale sau de țesuturi vegetale care absorb oxigenul.

Menținerea anaerobiozei se realizează fie prin adăugarea la suprafața mediilor de cultură a unui strat de ulei de parafină steril, fie prin folosirea unor tuburi subțiri cu o coloană înaltă de mediu ce limitează foarte mult suprafața de contact cu aerul, fie prin alte metode.

Cele mai importante boli produse de germenii anaerobi sunt tetanosul și gangrena gazoasă care, în general, sunt complicații ale plăgilor, precum și botulismul, care este o toxiinfecție alimentară.

2. BACILUL TETANIC (CLOSTRIDIUM TETANI)

Produce **toxiinfecția tetanică**. Bacilul tetanic se prezintă sub forma unui bastonaș, este *Gram-pozitiv* și, atunci când este sporulat, are la unul din capetele sale un *spor rotund* ce depășește grosimea bacteriei. Crește numai în medii anaerobe, degajând un miros caracteristic de corn ars. În cursul infecției *rămâne cantonat la poarta de intrare* – în plagă – și elaborează toxina care trece în organism, intoxică sistemul nervos și produce boala. Tetanosul dă o mortalitate mare.

Diagnosticul bacteriologic. Izolarea și identificarea bacilului tetanic sunt dificile. Se recoltează *țesuturi* sau *puroi* din plăgi, porțiuni din *cordonul ombilical* la nou-născuți, *pansamente* etc.

Însămânțarea se face în *bulion, geloză moale* etc., iar incubarea în *anaerobioză*. Identificarea bacilului tetanic izolat poate fi obținută prin *inoculare* subcutanată la *șoarece* a culturii în bulion. Animalul va prezenta semne de intoxicație nervoasă: paralizii și contracturi locale care se generalizează, ducând la moarte.

Din toxina tetanică, prin detoxifiere, se prepară *anatoxina tetanică*. Acesta este, de fapt, vaccinul antitetanic, larg utilizat în profilaxia bolii. Vaccinarea antitetanică are ca efect scăderea foarte accentuată a cazurilor de tetanos. În caz de îmbolnăvire se administrează ca tratament specific *ser antitetanic*, care contribuie la detoxifierea rapidă a organismului și, prin aceasta, la salvarea bolnavului. Serul antitetanic se administrează și profilactic, concomitent cu vaccinarea antitetanică, la persoanele neimunizate anterior, care prezintă plăgi deschise 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 eliminați prin fecale în mediul extern. Ei sunt răspândiți peste tot în sol, mai ales în terenurile îngrășate cu băligar. 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 multiplica și a produce exotoxina tetanică ce produce boala.

Tetanosul se produce prin implantarea și dezvoltarea sporilor în plăgi traumatice, chirurgicale, plăgi uterine după avort sau după naștere, plăgi ombilicale la noul-născut.

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 traumatice, asistență medicală calificată la naștere etc. Profilaxia specifică se face prin vaccinare cu anatoxina tetanică, iar tratamentul bolii include, pe lângă asanarea chirurgicală a plăgilor tetanice, și tratament medicamentos, inclusiv antibiotice și administrarea de ser antitetanic sau, de preferat, imunoglobulină tetanică umană.

3. BACILII GANGRENEI GAZOASE

Gangrena gazoasă este o toxiinfecție gravă produsă de o *asociație de germeni*

aerobi și anaerobi, care se concretizează prin distrugere rapidă a țesuturilor, edem gazos și intoxicații generale.

Diagnosticul de laborator este laborios și, de obicei, nu reușește să satisfacă la timp necesitățile clinice, dar identificarea agenților patogeni este necesară pentru aplicarea unui tratament cu seruri antitoxice specifice.

Produsele patologice care se recoltează în mod obișnuit sunt: *exsudate din plagă, fragmente de țesuturi și organe, sânge* etc.

Se face un examen microscopic direct pe produs nativ și pe frotiuri colorate Gram. Produsele sunt însămânțate în condiții aerobe și anaerobe, pentru a pune în evidență și flora microbială de asociație.

Identificarea germenilor se face pe baza caracterelor morfologice, biochimice și de patogenitate.

Pentru grăbirea diagnosticului se recomandă ca, odată cu însămânțarea produselor, să se inoculeze o parte din acestea direct la șoarece și la cobai. Identificarea germenilor poate fi realizată și prin testul de neutralizare specifică a toxinelor cu seruri antitoxice corespunzătoare care se practică pe șoarece.

Având în vedere gravitatea mare a bolii, se recomandă administrarea profilactică a *serului antigangrenos* la orice rănit cu plăgi unice sau multiple.

Epidemiologie. Din cauza răspândirii întinse mai ales în sol a sporilor bacteriilor care produc gangrena gazoasă, măsurile de prevenire a acestei boli se adresează în primul rând tratamentului corect prin curățire, spălare, aseptizare și administrare de antibiotice (în special penicilină) și, la nevoie, de ser polivalent antigangrenos, în plăgile suspecte de a prezenta o contaminare cu acest grup de germeni.

4. BACILUL BOTULINIC (CLOSTRIDIUM BOTULINUM)

Botulismul este boala ce apare în urma consumului unor alimente (conserve de legume, cârnați, șuncă, pește conservat etc.) *contaminate cu bacilul botulinic și în care acesta a găsit condiții de înmulțire și de producere a toxinei botulinice.* Boala se datorește toxinei botulinice, care este cea mai puternică otrăvă cunoscută până astăzi. Simptomele bolii sunt caracteristice: tulburări ale stării generale (oboseală accentuată, amețeli, dureri de cap), tulburări de vedere (căderea pleoapelor, limitarea mișcărilor globilor oculari, vedere dublă), greutate la înghițit și la vorbire și, în cazuri grave, o paralizie musculară generală, urmată de moarte.

Diagnosticul de laborator are în vedere izolarea și identificarea germenului și, mai ales, *depistarea toxinei botulinice* în produsele patologice izolate de la bolnavi și în probe din alimentul consumat de aceștia.

Probele de *alimente* recoltate sunt triturate în mojar cu nisip steril și ser fiziologic. Această operație se va efectua cu multă precauție, deoarece picătura toxică ajunsă pe conjunctiva unui om sănătos, se resoarbe rapid și poate avea consecințe grave pentru acesta. Urmează o centrifugare a produsului triturat, după care sedimentul este folosit

pentru *însămânțări în vederea izolării bacilului botulinic*, iar supernatantul pentru *inoculări la animale*, în scopul punerii în evidență a toxinei botulinice.

La fel se procedează și cu *fragmentele de organe, materiile fecale și produsele de vărsătură.*

Toxina poate fi pusă în evidență și în *sânge* și în *urină*, recoltate steril.

Cultivarea și izolarea bacilului botulinic se efectuează prin însămânțarea sedimentelor obținute prin centrifugare, pe medii de îmbogățire (cu infuzie de inimă de bou) și pe plăci cu geloză-sânge care, în cursul incubării la 37°C, sunt ținute în condiții de anaerobioză. Pentru a ușura izolarea bacilului botulinic, sedimentele respective sunt încălzite 30 min la 80°C, înainte de a fi însămânțate.

Frotiurile colorate prin metoda Gram și metodele speciale pentru spori pun în evidență *bacili Gram-pozitivi cu spori ovali, situați subterminal.*

Pentru identificare se cercetează caracterele biochimice ale germenilor, după care se fac culturi pe medii speciale, de exemplu bulion V.F. (carne-ficat), pentru obținerea toxinei. Filtratele de cultură (de 3-5 zile) sunt foarte toxice. Inoculate la șoareci, cobai și la alte animale de laborator provoacă semne caracteristice de intoxicație și moartea acestora. Pentru identificare, se fac amestecuri din toxina de cercetat cu seruri antitoxice monovalente. Aceste amestecuri sunt inoculate fiecare la câte o grupă de șoareci. Grupa de animale protejate (toxina a fost inactivată de anatoxina corespunzătoare) indică subspecia căreia îi aparține germele în cauză (testul de seroneutralizare).

Epidemiologie. Sporii bacilului botulinic sunt larg răspândiți în sol. Ei contaminatează adesea zarzavaturile, fructele și alte alimente. Boala apare prin consumul de conserve, mai ales în cele preparate în casă, care nu au fost corect sterilizate prin fierbere și în care, ulterior, s-au multiplicat și au produs toxină.

Prevenirea bolii se face prin evitarea consumului de alimente conservate în mod necorespunzător sau care nu au fost supuse controlului.

Cap.XXII. SPIROCHETELE (FAMILIA SPIROCHETACEAE)

Din această familie fac parte trei germeni cu importanță medicală: genul *Treponema*, genul *Leptospira* și genul *Borrelia*.

1. GENUL TREPONEMA

Specia reprezentativă a acestui gen este *Treponema pallidum*, agentul etiologic al sifilisului. Germenul se găsește, la omul bolnav, în șancrul primar, gomele sifilitice, ganglionii limfatici, pereții vaselor cerebrale, aortei etc. De asemenea, se întâlnește în placenta mamei sifilitice sau în organele fătului sifilitic, mai ales în ficat.

Caractere morfologice și tinctoriale. Treponemele sunt germeni spiralați, care prezintă mișcări de rotație, de flexiune și de translație.

Pentru a le pune în evidență sunt necesare tehnici de examinare sau colorații speciale. Astfel, pentru examinarea preparatelor proaspete se folosește procedeul de examinare pe fond întunecat, iar frotiurile 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 antiseptice, la **soluțiile arsenicale și mercuriale**, precum și la unele **antibiotice**, dintre care penicilina trebuie menționată în primul rând.

Boala la om. Transmiterea bolii se face aproape exclusiv prin contactul sexual (boală venerică).

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

Imunitate. Omul vindecat de sifilis capătă o rezistență destul de marcată față de *Treponema pallidum*, dar nu definitivă. În serul bolnavilor de sifilis pot fi puși în evidență anticorpi.

Tratamentul sifilisului se poate face cu ajutorul unor substanțe chimice complexe care cuprind: arsen, bismut, mercur etc. În prezent, s-a renunțat, în parte, la aceste medicamente care pot da naștere la accidente și se utilizează pe scară largă și cu mult succes penicilina. *Treponema pallidum* este, de asemenea, sensibilă la aureomicină și cloramfenicol.

Diagnosticul de laborator al sifilisului comportă punerea în evidență a *Treponemei pallidum* în **produsele patologice** recoltate de la bolnav (diagnosticul bacteriologic) sau a modificărilor produse de acest agent patogen în **serul bolnavului** respectiv (diagnosticul serologic).

Diagnosticul bacteriologic. *Treponema pallidum* poate fi pusă în evidență în leziunile sifilitice.

- **Examenul preparatelor proaspete** pe fond întunecat se practică în cazul existenței șancrului, a afecțiunilor din perioada secundară, a leziunilor cutanate și mucoase etc. Trebuie să se aibă în vedere că la suprafața tegumentelor pot exista spirochete saprofite care trebuie evitate. În caz de șancru se șterge cu mare atenție leziunea cu vată sterilă îmbibată în ser fiziologic sau în apă fiartă, după care se recoltează, cu ajutorul unei pipete Pasteur, serozitatea roz care iese la presiune, la marginea leziunii.

În cadul leziunilor secundare, se șterge energic leziunea și se recoltează secreția seroasă care se formează.

Serozitatea recoltată din șancru, leziuni secundare etc. este examinată direct la microscop pe fond întunecat sau pe frotiuri colorate.

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

- **Examinarea treponemelor pe frotiuri colorate:** colorație prin impregnare argentică (metoda Fontana-Tribondeau); prin această metodă, treponemele apar colorate în negru-brun, iar restul frotiului în galben.

Diagnosticul serologic al sifilisului se bazează pe o serie de reacții, dintre care cele mai cunoscute sunt reacția de 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. salină tamponată stock (x10). Se diluează de 10 ori în apă distilată pentru folosire.

Trusa nedesfăcută se păstrează la întuneric și temperatura camerei (18° - 25 °C).

Tehnica microreacției

1. Materiale

- placă cu godeuri cu diametru de 15 mm.
- seringă de 1-2 ml.
- ac de seringă special calibrat (1 pic = 1/60 ml).
- pipete de 1 și 5 ml.

- flacoane de 25 ml, cu dop de sticlă rodat.
- sticle de ceas cu diametrul de 8 mm.
- lupă puternică (preferabil binoculară de masă, sau microscop 80 x - 100 x)
- agitator rotativ (facultativ)

2. Prepararea antigenului

Temperatura tamponului salin atunci când se prepară antigenul, va trebui să fie de 23-29°C.

1. Se iau 0,4 ml tampon într-un flacon cu dop de sticlă rodat, având o capacitate de 25 ml.

2. Se adaugă 0,5 ml antigen cu o pipetă perfect curată și uscată. Antigenul se adaugă direct în tampon în timp ce se rotează sticla (continuu dar ușor) pe o suprafață netedă. Antigenul se adaugă rapid picătură cu picătură, durata operației trebuie să fie aproximativ de 6 secunde.

3. Se suflă ultima picătură de antigen din pipetă fără a se ajunge cu pipeta la tampon.

4. Se continuă rotirea sticlei timp de 10 secunde.

5. Se adaugă 4,1 ml tampon. Se astupă sticla și se amestecă suspensia antigenică, întorcând sticla în sus și în jos aproximativ de 30 ori, timp de 10 secunde.

6. Suspensia de antigen este gata și se poate folosi în tot cursul zilei.

7. Ori de câte ori este folosit antigenul, se amestecă ușor prin rotire și nu cu ajutorul seringii prin aspirare și respingere pentru a se evita o scădere a reactivității.

Pregătirea serurilor. Se centrifughează pentru clarificare; inactivare 30 min la 56°C. Dacă au trecut 4 ore de la inactivare se reîncălesc 10 min la 56°C înainte de lucru.

Tehnica propriu-zisă

Se recomandă ca temperatura de lucru a camerei să fie de 23-29°C deoarece variațiile de temperatură, sub sau peste aceste limite, influențează în mod evident reactivitatea.

1. Se pun 0,05 ml ser inactivat în godeul plăcii.

2. Se adaugă o picătură de antigen (1/60 ml) peste fiecare ser. Se recomandă ca să se pună suspensia antigenică pentru lucru într-o sticlă de ceas pentru a o manipula mai ușor.

3. Se rotează placa timp de 4 minute (de preferat la un agitator rotativ cu 180 rotații pe minut). În cazul că această rotire se execută manual, diametrul de rotație va fi de 4-5 cm, cu același număr de rotiri pe minut, efectuate pe o suprafață plană; placa va fi protejată de zgărieturi, 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 30 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.** Sângele de berbec defibrinat este "spălat" cu o soluție fiziologică 0,85%, de trei ori prin centrifugare, câte 10 minute, la 2500 rotații/min.

Pentru prepararea a 100 ml sistem hemolitic se folosesc 1,5 ml depozit de hematii, ser hemolitic într-o concentrație de 4 ori mai mare decât cea stabilită prin titrare și ser fiziologic până la volumul total de 100 ml.

În practică, serul fiziologic se împarte mai întâi în două părți aproximativ egale, la una dintre acestea adăugându-se hematiile, iar la cealaltă serul hemolitic.

Sensibilizarea se face prin amestecarea bruscă a celor două soluții urmată de transvazări repetate rapid, dintr-un recipient în altul. După aceasta, balonul conținând sistemul hemolitic se va păstra 30 minute la 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	1	ml

Rezultatul se citește după o incubare de 10 minute la baia de 37°C. În reacție se va întrebuița jumătate (deoarece reacția de bază se execută cu jumătăți de cantități) din cantitatea imediat superioară celei care a produs hemoliza completă.

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

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

Diluarea se face turnându-se încet antigenul, picătură cu picătură, în soluție salină și agitându-se energic. După 10 minute de repaus pe masă, soluția este utilizabilă.

4. *Serul de bolnav*, ca și serurile de control sunt inactivate în dimineața zilei în care se practică reacția.

Reacția de bază poate fi efectuată calitativ (numai cu ser de cercetat nediluat) sau cantitativ (cu diluții de ser).

Metoda calitativă se execută după următoarea schemă:

Tub nr.	Ser de cercetat	Ser fiziologic	Antigen cardiolipinic diluat 1/20	10' la temp. camerei	Complement conf. titrării în 0,20 ml	Agitare 45' la baie 37°C	Sist. hemol.	Agitare, apoi 15' la baie 37°C
1.	0,10	0,20	0,25	"	0,20	"	0,50	"
2.	0,15	0,40	—	"	0,20	"	0,50	"
3.	—	0,30	0,25	"	0,20	"	0,50	"
4.	—	0,55	—	"	0,20	"	0,50	"
5.	—	0,75	—	"	—	"	0,50	"

La fiecare serie de seruri de cercetat se folosesc controale pozitive și negative. Examenul lichidului cefalorahidian (LCR) se execută după o schemă similară:

Tub nr.	LCR în 0,5 ml	Ser fiziologic	Antigen cardiolipinic diluat 1/20	10' la temp. camerei	Complement 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 diluții de L.C.R. până la 1,32. Nu este necesar ca lichidul să fie inactivat, în afară

de cazul că este amestecat cu sânge. În acest caz, de asemenea, este necesar să se îndepărteze hematiile.

Interpretarea rezultatelor:

- hemoliză totală = negativ (-)

- hemoliză incompletă = dubios (±)

- lipsă hemoliză = de la slab pozitiv (+) la intens pozitiv (++++)

Epidemiologie. Sifilisul este o boală venerică, având ca izvor de infecție omul bolnav. Transmiterea se face, de regulă, prin *raport sexual* și numai cu totul excepțional prin lenjerie, veselă utilizată în comun etc. Contagiozitatea maximă este în perioada primară și secundară. Treponemele se pot elimina și prin lapte, urină, spermă, dar în număr foarte redus.

Profilaxia. Depistarea cât mai precoce a bolnavilor de sifilis este una din măsurile de bază în prevenirea și combaterea acestei boli.

Dintre metodele de depistare activă, cele mai utilizate sunt *examenul serologic*. Acestea sunt *obligatorii* și se efectuează la controlul periodic 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 prenuptial etc.

Ancheta epidemiologică este însă cea mai importantă metodă de depistare activă. Ea permite descoperirea bolnavilor neînregistrați și netratați, care contribuie cel mai mult la răspândirea bolii.

2. GENUL LEPTOSPIRA

Leptospirele sunt *microorganisme spiralate*, patogene pentru om și pentru animal.

Datorită unei structuri antigenice stabile și diferențiate, leptospirele sunt clasificate pe această bază și identificate, mai ales prin metode imunologice.

Bolile provocate de leptospire poartă numele de *leptospiroze*.

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

Caractere morfologice și tinctoriale. În preparatele proaspete, leptospirele 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.

Leptospirele colorate Giemsa se prezintă sub forma unor filamente fine, ondulate, colorate în violet, cu capetele curbate în C sau S.

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

Caractere de cultură. Leptospirele patogene necesită un factor de creștere care se găsește în serul sanguin și care trebuie adăugat la mediile lichide uzuale.

Rezistența la agenții fizici, chimici și biologici. Leptospirele patogene sunt rapid distruse de uscăciune, lumină solară, ultraviolete, substanțe acide, bilă, suc gastric etc. De asemenea, sunt sensibile la penicilină, streptomycină și tetracilină, dar insensibile la sulfamide și la cloramfenicol. Totuși, leptospirele pot trăi câteva ore până la câteva zile sau săptămâni în apă, în unele alimente sau în organele unor animale infectate, și câteva luni până la câțiva ani în medii de cultură adecvate.

Boala la om. Împărțirea leptospirozelor în boli icterice, grave, și boli anicterice, ușoare, se bazează mai mult pe semnele clinice. Unele leptospire provoacă o boală gravă cu febră, icter, hemoragii și leziuni renale; hepatice etc., în timp ce alte leptospire dau boli mai ușoare, cu febră și semne de iritație meningeală.

Imunitate. Un bolnav de leptospiroză icterohemoragică capătă după vindecare o imunitate destul de solidă și durabilă.

În serul sanguin al bolnavilor apare o serie de anticorpi care sunt puși în evidență prin diferite tehnici, ajutând astfel la precizarea diagnosticului bolii.

Tratamentul specific. Arseniul și bismutul sunt medicamente eficiente în tratamentul leptospirozelor, dar, în prezent, se utilizează antibiotice ca penicilina și tetraciclina.

Diagnosticul de laborator al leptospirozelor poate fi făcut atât prin izolarea și identificarea germenului în produsele patologice, cât și prin punerea în evidență în serul sanguin a unor anticorpi specifici.

Diagnosticul bacteriologic. În primele 7-8 zile de la debutul bolii se va încerca punerea în evidență a leptospirelor în sânge, lichid cefalorahidian și eventual, în organe.

În săptămâna a doua încep să apară anticorpii, iar leptospirele dispar din circulație, localizându-se în organe și, în primul rând, în rinichi, de unde încep să fie eliminate prin urină.

Urina proaspăt recoltată este centrifugată, iar sedimentul este cercetat între lamă și lamelă, pe fond întunecat.

Din plasma și sedimentul de urină se pot face frotiuri care vor fi colorate Giemsa sau prin impregnare argentică după metoda Fontana-Tribondeau și examinate la microscopul obișnuit cu imersie.

Cultivarea leptospirelor în vederea izolării și identificării lor se face prin:

- însămânțări pe medii de cultură;
- inocularea animalelor de laborator. Produsele patologice sunt inoculate pe cale intraperitoneală la iepure, la cobai sau la șoarece.

La cobai, după câteva zile se constată o creștere a temperaturii, icter, și cobaiul moare la 24-48 h de la apariția icterului. Pentru evidențierea leptospirelor se fac însămânțări din organe (rinichi, ficat), sânge și urină.

Pentru a se evita contaminarea persoanelor din laborator, se recomandă ca manipularea animalelor să se facă numai cu mănuși de cauciuc iar în timpul autopsiei

se vor folosi ochelari de protecție. Tăvile de lucru, mesele etc. se șterg cu soluții acide 1%, acid clorhidric 1%, etc.), iar borcanele în care au stat animalele vor fi, de asemenea, dezinfectate cu acid clorhidric 5%. După autopsie, animalele vor fi arse la crematoriu.

Diagnosticul serologic. Apariția anticorpilor în serul bolnavilor din săptămâna a doua de boală face posibil diagnosticul serologic al leptospirozelor (reacția de aglutinare-liză, R.F.C., ELISA etc.).

Epidemiologie. Leptospirozele sunt boli care au ca punct de plecare animalele sălbatice (în special rozătoare), dar care au o extindere mare și printre animalele domestice. Acestea rămân purtătoare de germeni o perioadă de timp și constituie principalul izvor de infecție pentru om.

Transmiterea bolii la om poate fi directă, prin contactul cu animalele bolnave ori purtătoare, sau indirectă, prin intermediul apei sau al alimentelor infectate.

Profilaxia leptospirozelor va avea în vedere, mai ales, muncitorii din sectorul agricol, măcelarii și copiii care fac baie vara în apele infectate cu urina animalelor bolnave sau purtătoare de germeni.

Se vor recomanda: îmbrăcăminte de protecție, ferirea pielii rănite de contactul cu apa poluată sau cu unele dejecte ale animalelor, evitarea scăldatului în apele bănuite a fi infectate și, mai ales, respectarea regulilor de igienă generală.

Se va duce o campanie susținută pentru distrugerea șoarecilor și șobolanilor.

Adăposturile animalelor vor fi dezinfectate periodic, iar urina și bălegarul nu vor fi aruncate în apele naturale.

Recent, s-a preparat și un vaccin specific pentru persoanele care prin profesia lor sunt mai expuse infecției cu leptospire (personal veterinar, îngrijitori de animale, muncitori agricoli etc.).

3. GENUL BORRELIA

În acest gen sunt cuprinse spirochete cu spire largi și cu extremitățile efilate.

Clasificarea boreliilor se face în prezent după gazda parazitată. Cele care parazitează omul pot fi grupate astfel:

- borelii transmise prin păduche (ex. *B. recurrentis*);
- borelii transmise prin căpușe (ex. *B. hispanica*);
- borelii ce se localizează pe mucoasele bucale sau genitale (ex. *B. buccalis*, *B. vincenti*).

Habitat. Sunt bacterii parazite ale organismelor insectelor vectoare (păduche, căpușe) sau ale omului și animalelor bolnave.

Caractere morfologice și tinctoriale. Germenii din genul *Borrelia* sunt reprezentați de bacterii filamentoase, spiralate, cu spire largi, foarte mobile. Se colorează ușor prin colorația Gram (boreliile sunt Gram negative) dar colorația de elecție este Giemsa.

Caractere de cultură. Cresc greu pe medii de cultură. Pot fi cultivate prin inoculare în păduche, pe care nu-l omoară, pe ouă embrionate sau șoricei nou născuți.

Structura antigenică este foarte variabilă și nu prezintă interes practic pentru diagnosticul curent de laborator.

Patogenitatea la om. Speciile de *Borrelia* sunt agenții febrei recurente europene (*B.reccurentia*) transmisă prin păduche, și ai febrei recurente din alte zone geografice transmise prin căpușe.

Imunitatea după boală este de scurtă durată.

Tratamentul febrei recurente efectuat până la descoperirea antibioticelor cu compuși arsenici, astăzi se face cu tetraciclină (0,5 g la 6 ore timp de 5 zile) sau o doză unică de doxyciclină (100 mg).

Diagnosticul de laborator al febrei recurente are în vedere în primul rând punerea în evidență a spirochetelor în sângele periferic recoltat în puseele febrile și, în al doilea rând, decelarea anticorpilor specifici aglutinanți și fixatori de complement în serul convalescenților.

Plasma sanguină, proaspătă poate fi examinată direct între lamă și lamelă la microscopul fonic pe câmb întunecat. **Frotiurile de sânge** colorate Giemsa sunt examinate la microscopul fonic.

Ca **reații serologice** se utilizează fie reacția de **aglutinare-liză** (R.A.L.) în care se pun în contact timp de 30 min la 37°C culturi de *Borrelia* cu ser inactivat (30 min la 56°C) de bolnav, fie reacția de **fixare a complementului** (RFC).

În cadrul **proceselor ulcero-necrotice** ale mucoaselor bucofaringiene (angina Plant-Vincent) sau genitală care sunt provocate de asociația dintre o spirochetă, cel mai adesea *Borrelia Vincenti* și un bacil Gram negativ, fusiform (genul *Fusobacterium*), diagnosticul se face prin prelevarea cu ajutorul unui tampon de vată a secreției existente pe fundul ulcerăției care are culoare cenușie și marginile tăiate drept. Se confecționează frotiuri ce se colorează Gram și care la microscopul fonic dau imaginea caracteristică de asociație fuzospirilară.

Profilaxia febrei recurente se obține prin dezinfecție cu distrugerea vectorilor, păduchele și căpușe.

Prevenirea apariției proceselor ulcero-necrotice ale mucoaselor se obține printr-o igienă riguroasă a mucoaselor bucale (periaj dentar, gargară cu soluții antiseptice) și genitală (apă, săpun și soluții antiseptice adecvate).

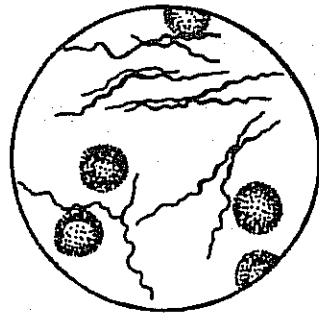


Fig.22. *Borrelia recurrentis*.

Cap.XXIII. RICKETTSIILE

GENERALITĂȚI

Rickettsiile sunt microorganisme care se situează la granița dintre bacterii și virusuri. Ele se aseamănă cu bacteriile prin dimensiuni, morfologie, compoziție chimică, organizare celulară internă și multiplicare prin diviziune directă, dar nu cresc pe mediile de cultură. Rickettsiile se multiplică numai în țesuturi vii, ca și virusurile.

Unele rickettsii sunt patogene pentru om, provocând boli febrile numite rickettsioze. Aceste boli se recunosc, de obicei, datorită unor erupții peteșiale caracteristice pe pielea bolnavilor.

Rickettsiozele, cu excepția tifosului exantematic, sunt boli care se transmit de la animale la om. **Rezervorul infecției** este constituit de omul bolnav, rozătoare, mamifere domestice și sălbatice, căpușe etc. Transmiterea agentului patogen se face prin intermediul unor vectori: tifosul exantematic este transmis de păduche, febra butonoasă este transmisă de căpușă etc. În transmiterea febrei Q nu este necesară intervenția unui vector, contaminarea făcându-se direct.

Rickettsiozele cele mai frecvent întâlnite sunt:

- tifosul exantematic epidemic de păduche;
- tifosul exantematic endemic sau murin;
- febra butonoasă mediteraneană sau tifosul de căpușă;
- febra Q, care este o rickettsioză pulmonară;
- febra de Wolhynia sau febra de tranșee etc.

Caractere morfologice. Forma și structura rickettsiilor se aseamănă foarte mult cu aceea a bacteriilor. Morfologia acestor germeni este destul de polimorfă, putând îmbrăca forma unor coci sau mai adesea a unor cocobacili de dimensiuni foarte mici. Sunt germeni **imobili, nesporulați, Gram-negativi**.

Metode de cultivare a rickettsiilor. Rickettsiile au un echipament enzimatic destul de bogat care le permite să-și întrețină un metabolism complex, dar insuficient pentru a se dezvolta independent într-un mediu de cultură artificial, acelular. Se pare că existența rickettsiilor în afara țesuturilor vii nu este posibilă și din cauza unei permeabilități exagerate a peretelui celular care expune acești germeni la influențele nefavorabile ale mediului extern.

Culturile de rickettsii pot fi obținute în laborator numai pe celulele vii. Ele pot fi cultivate pe:

- *fragmente de țesuturi;*
- *culturi de celule;*
- *ou de găină embrionat.* Majoritatea rickettsiilor patogene pentru om se înmulțesc în sacul vitelin al embrionului de găină, astfel că acesta va fi locul de elecție pentru cultivarea rickettsiilor;

- *animale de laborator*. Pentru izolarea rickettsiilor se inoculează la cobai sau la șoarece sânge total recoltat de la bolnavi cu stare febrilă. Temperatura cobaiului infectat crește și urmează o curbă caracteristică, după care animalele se vindecă. Concomitent, apar și alte semne de boală: zbârlirea părului, scăderea în greutate, tumefierea scrotului etc.

Șoarecii sunt inoculați intraperitoneal. Rickettsiile pot fi puse în evidență prin amprente făcute din splină și din ficat, iar în ser se pot pune în evidență anticorpi.

Rezistență. Uscarea favorizează menținerea îndelungată, pe mai mulți ani, a rickettsiilor în stare viabilă și virulentă.

Căldura are o acțiune nefavorabilă asupra rickettsiilor: fierberea distruge acești germeni, iar încălzirea la 50°C le inactivează în decurs de 30 min.

Temperatura scăzută sub 0°C nu conservă rickettsiile decât câteva zile. *Glicerina, fenolul, albastrul de metilen și bila* au un efect de distrugere a rickettsiilor.

Structura antigenică a rickettsiilor. Au fost puse în evidență două componente antigenice mai importante: antigenele corpusculare care sunt utilizate în reacțiile serologice și antigenele solubile care au proprietăți imunogene.

Rickettsiile au o activitate toxică și hemolitică.

Imunitatea în rickettsioze. După boală se instalează, de obicei, o rezistență solidă față de infectările ulterioare. În unele cazuri, germenii rămân în stare latentă în organismul infectat și pot produce recăderi după mai mulți ani.

În serul persoanelor care au trecut prin boală sau al animalelor infectate apar anticorpi ce sunt utilizați în diagnosticul de laborator al rickettsiozelor.

Tratamentul. În prezent, în tratamentul rickettsiilor se utilizează cu succes *antibiotice* cu spectru larg de acțiune.

Diagnosticul de laborator. Izolarea rickettsiilor se face numai în *laboratoare bine amenajate*. Germenii sunt căutați în *sângele* bolnavilor în perioada febrilă, în cheagul sanguin, în fragmente de placentă, urină etc., precum și în *insectele vectoare* (păduchi, căpușe), care sunt, în prealabil, dezinfectate cu eter, triturate în mojar și suspensionate în soluție salină fiziologică.

Inocularea la animale. Deoarece rickettsiile nu cresc pe mediile de cultură uzuale, produsele vor fi *inoculate la animale de laborator* (cobai, șoarece) sau în sacul vitelin al *oului embrionat*.

Pentru punerea în evidență a germenilor se folosesc colorații speciale (de exemplu, colorația Giemsa).

Reacțiile serologice folosite în diagnosticul de laborator al rickettsiozelor. În diagnosticul de laborator al rickettsiozelor se folosesc reacții serologice, în care serul bolnavului este pus în contact cu un antigen rickettsian (*reacția de fixare a complementului*) sau cu suspensii de bacil Proteus OX (*reacția Weil-Felix*).

Epidemiologie. Epidemiologia rickettsiozelor este strâns legată de artropodele care transmit agenții infectanți. *Păduchele* de corp și de cap se infectează sugând sânge de la omul bolnav. După un interval de timp de 4-8 zile, păduchii pot transmite boala la omul sănătos prin înțepare sau prin depunerea materiilor fecale bogate în rickettsii,

pe pielea lezată prin scărpinare. Alte rickettsioze pot fi transmise și prin intermediul *puricelui* (tifosul murin), al *căpușelor* (febra butonoasă) etc.

Profilaxia. Principala cale de întrerupere a întregului mecanism de transmitere a unei rickettsioze este *distrugerea insectelor*: păduchi, purici, căpușe. De la apariția primului caz de îmbolnăvire de tifos, care trebuie în mod obligatoriu să fie declarat și internat în spital, trebuie luate cele mai urgente măsuri de despăduchere a bolnavilor, contactilor și a întregii colectivități din care face parte. Descoperirea *insecticidelor* a produs o adevărată revoluție în tehnica dezinsectizării. Aceste substanțe, ușor de manevrat, nefiind toxice pentru om în concentrațiile obișnuite, pătrund prin învelișul chitinos al insectei și o distrug.

Deoarece atât în dejectele uscate, cât și în corpul păduchilor zdrobiți, rickettsiile pot trăi câteva luni și pot contamina, în stare de praf, omul sănătos prin mucoasa nazală sau conjunctivală, pe lângă dezinsecție este necesară și o dezinfecție totală. Sterilizarea prin aer cald sau vapori reprezintă o metodă eficientă care permite distrugerea păduchilor, a lindinilor, precum și a rickettsiilor.

În lupta pentru dispariția rickettsiilor, un loc important îl au, desigur, și ridicarea nivelului material, cultural și igienic al populației.

Cap. XXIV. NOȚIUNI DE GENETICĂ BACTERIANĂ

1. NOȚIUNI GENERALE

Genetica bacteriană are ca obiect studiul eredității bacteriilor. Prin ereditate se înțelege capacitatea organismelor vii de a transmite descendenților caracterele lor distinctive. Tehnicile de genetică bacteriană sunt utilizate în identificarea și clasificarea germinilor (taxonomie), în înțelegerea unor fenomene de fiziopatogenie a infecțiilor bacteriene (virulența), în studiul mecanismelor de rezistență la antibiotice și în epidemiologia bolilor infecțioase.

Totalitatea informației genetice pe care o posedă un anumit organism constituie *genotipul* aceluia organism și acesta determină totalitatea caracterelor potențiale ale organismului respectiv. Totalitatea caracterelor pe care organismul le manifestă la un moment dat constituie *fenotipul* său.

Totalitatea determinantilor genetici ai unui organism constituie *genomul* aceluia organism. În celula bacteriană genomul cuprinde *cromozomul bacterian* alcătuit dintr-o singură macromoleculă de A.D.N. La unele tulpini bacteriene genomul poate cuprinde și elemente extracromozomale cunoscute sub numele de *plasmide*. Acestea pot exista în stare autonomă sau se pot integra în mod transitoriu în cromozom.

Celulele bacteriene sunt celule *haploide* și prin urmare au un singur set de determinanți genetici spre deosebire de celulele somatice ale organismelor superioare care sunt *diploide*, și care posedă două seturi distincte de determinanți.

Transmiterea informației genetice la descendenți se face prin duplicarea materialului genetic în cursul procesului de replicare ADN și distribuirea celor două copii rezultate la cele două celule fiice care apar după diviziune. Diviziunea plasmidelor se face independent, după modelul procesului de replicare al A.D.N.

2. VARIABILITATEA MICROBIANĂ

Există două tipuri de variații bacteriene: *variații fenotipice* și *variații genotipice*.

Variația *fenotipică* este reversibilă și nu se transmite la descendenți. Este o adaptare de ansamblu a unei populații bacteriene de același genotip, la diverse condiții ale mediului înconjurător. Un exemplu este inducerea sintezei unei enzime, beta-galactozidaza, care degradează lactoza după adăugare de lactoză în mediul de cultură.

Variația *genotipică* sau *mutația* este o modificare în genomul bacterian, spontană, stabilă, care afectează numai câțiva indivizi dintr-o populație și este transmisă la descendenți independent de condițiile de mediu. Organismul care a suferit o mutație poartă numele de *mutant*. Un organism izolat din natură care nu prezintă modificări de genotip este considerat de *tip sălbatic*.

Baza moleculară a mutației cromozomice constă în modificări ale secvenței bazelor azotate ale ADN-ului bacterian și ele pot fi de mai multe feluri:

- *substituții* sunt modificările care constau din înlocuirea unei baze azotate cu alta. Când baza înlocuită și cea nouă introdusă sunt de același tip, purină sau pirimidină, procesul este numit *tranzizie* iar când înlocuirea se face cu o bază de celălalt tip, acesta se numește *transversie*;

- *inserție* este modificarea care are în vedere adăugarea uneia sau a mai multor perechi de baze azotate la o anumită poziție a secvenței originale;

- *deleție*, constă din îndepărtarea uneia sau a mai multor baze azotate din secvența originală;

- *inversie* este modificarea orientării unui segment ADN în raport cu secvențele înconjurătoare.

Modificările care afectează o singură pereche de baze poartă numele de *mutații punctiforme*. Mutațiile care modifică secvența nucleotidică pe o întindere mai mare poartă numele de *mutații extinse*. Majoritatea mutațiilor duc la alterarea fenotipului original al tulpinii bacteriene. În cazul mutațiilor punctiforme, există uneori posibilitatea revenirii fenotipului la cel original prin *mutații secundare*. Unele dintre acestea restabilesc, prin *reversii*, secvența nucleotidică originală. Altele, în cadrul unor mutații *supresoare* permit exprimarea funcției originale chiar și în condițiile menținerii modificării mutaționale a secvenței nucleotidice.

Mutațiile pot apărea *spontan* în condiții normale de creștere sau pot fi *induse* prin utilizarea de agenți mutageni fizici (radiații X sau U.V.) sau chimici (acid nitros, hidroxilamina, nitrozoguanidina etc.).

Mutații apărute spontan sau induși pot fi afectați din punct de vedere morfologic, biochimic, antigenic, al virulenței etc.

3. TRANSFERUL DE MATERIAL GENETIC LA BACTERII

Deoarece bacteriile sunt organisme haploide, reasortarea materialului genetic prin recombinare nu se poate realiza în cadrul aceleiași celule fiind necesar un transfer de material genetic de la o tulpină-donator la o tulpină-receptor.

La bacterii au fost puse în evidență trei mecanisme distincte de transfer genetic: *transformare*, *transducție* și *conjugare*. Spre deosebire de ceea ce se întâmplă în sexualitatea organismelor eucariote, la bacterii, indiferent de mecanismul de transfer genetic, numai o parte din cromozomul bacterian al tulpinii donator este transferat în tulpina receptor. Informația transferată este stabilă și ea va fi transmisă în mod ereditar în cursul diviziunii celulare la bacteriile fiice.

În fine, în absența oricărei recombinări, există și alte mecanisme de achiziție a unor gene; este vorba *conversie*, de *transfer de plasmide* și de fenomenul de *transpoziție*.

3.1. TRANSFORMAREA

Prin aceasta se înțelege transferul unei molecule de ADN de la o tulpină donator

la o tulpină receptor. ADN-ul transferat este eliberat fie în mod spontan prin liză fie prin extracții chimice. Acest fenomen a fost pus în evidență încă din anul 1928 de Griffith care a observat că pneumococul viu de tip capsular S₃, inoculat subcutanat la șoarece provoacă o septicemie mortală. Dacă cultura vie de pneumococ de tip S₃ este omorâtă, șoarecii supraviețuiesc. De asemenea, a observat că un mutant acapsulat viu în formă R, provenind dintr-un pneumococ de tip S₁ nu omoară șoarecele. Dacă însă se face un amestec de culturi vii de pneumococ acapsulat (R), care nu este avirulent cu o cultură de pneumococi capsulați (S) omorâtă prin căldură și se inoculează subcutanat la șoarece, se produce septicemia mortală iar din sângele animalelor se izolează pneumococi virulenți capsulați de tip S₃. Explicația științifică a acestui fenomen a putut fi dată numai câteva zeci de ani mai târziu. Fragmente de ADN din pneumococul de tip capsulat S₃ eliberate prin liza acestora provocată de moartea lor prin căldură, au pătruns în pneumococul viu de tip R (mutant al tulpinii S₁). Recombinarea dintre genele omoloage au condus la transformarea pneumococului acapsulat de tip R în tipul S₃ capsulat și virulent. Astfel a fost descoperit rolul ADN ca suport chimic al eredității.

Transformarea se derulează în câteva etape de o mare complexitate:

- apariția stării de competență (stare fiziologică care face posibilă fixarea și pătrunderea ADN) la suprafața celulei receptor, a ADN-ului bacteriei donator;
- pătrunderea ADN-ului bacteriei donator;
- integrarea ADN-ului prin recombinare (excizie și integrare prin substituție).

3.2. TRANSDUCȚIA

În acest caz transferul unui fragment de ADN de la o bacterie donator către o bacterie receptor se face prin intermediul unui bacteriofag. În transducție unele particule fagice acționează ca vectori ai unor porțiuni limitate din genomul bacteriilor în care s-a multiplicat fagul respectiv. Transferul materialului genetic se realizează în cursul infectării ulterioare a unei noi gazde de către fagul respectiv. Există două tipuri de transducție: transducția *specializată* în care nu pot fi transduși decât markerii situați pe cromozomul bacterian în imediata vecinătate a locului de integrare a profagului și transducția *generalizată* în care fagul poate transduce oricare din markerii tulpinii donator.

Conversia lizogenică este câștigarea de către o bacterie a unui caracter particular somatic determinat de genomul unui profag specific. Acest caracter este legat de starea de lizogenie și dispare odată cu pierderea acestei stări.

3.3. CONJUGAREA

Este cel de al treilea mecanism de transfer genetic. Spre deosebire de transformare și transducție, în cursul conjugării care este un proces sexual este necesar contactul direct dintre celula donator și celula receptor. Transferul este dependent de factorul F (de sexualitate). Acesta permite sinteza de pili sexuali la bacteria donator sau

masculină (F⁺) și prin aceasta transferul de ADN cromozomic în celula receptor sau femelă (F⁻).

Plasmidele care sunt molecule de ADN citoplasmic (extracromozomal) au capacitatea de a se replica în mod autonom.

Procesul de conjugare se desfășoară în mai multe etape:

- *formarea perechilor specifice.*

Acest proces depinde de prezența pililor la suprafața celulelor donator și are loc foarte rapid, în câteva minute;

- *formarea perechilor eficiente.* În această fază în care se pare că sunt implicați pili donator se formează punți de legătură între celulele donator și celulele receptor, care servesc la realizarea transferului de material genetic;

- *mobilizarea materialului genetic donator.* Aceasta se pare că are loc în urma unui stimul specific asigurat de contactul strâns cu celula receptor.

Catena desfăcută urmează a fi transferată în timp ce catena rămasă servește ca matrice pentru sinteza unei catene complementare;

- *transferul materialului genetic.* Capătul catenei desfăcute pătrunde prin puntea de legătură în celula receptor. Prin urmare transferul implică o singură catenă de ADN, iar caracterul dublu catenar al ADN-ului din donator este restabilit prin replicare.

Genetica bacteriană a contribuit la elucidarea unor aspecte practice importante ale bacteriologiei medicale cum sunt rezistența la antibiotice a bacteriilor patogene, tipajul fagic, variația de fază la Salmonella.

De asemenea aplicarea unor concepte de genetică bacteriană a condus la crearea biotehnologiei care a făcut posibilă obținerea unor rezultate practice excepționale (fabricarea artificială a insulinei umane și a interferonului, crearea de vaccinuri noi etc.).



Fig.23. Conjugare la bacterii.

VIRUSOLOGIE

Cap.XXV. VIRUSOLOGIE GENERALĂ

1. DEFINIȚIE

Virusologia sau **inframicrobiologia** este știința care se ocupă cu studiul **virusurilor** sau al **inframicrobilor** și cu afecțiunile provocate de aceștia.

În urmă cu 100 ani, în anul 1892, Ivanovski a descoperit primul virus, agentul cauzal al mozaicului tutunului. În următoarele decenii au fost descoperite numeroase alte virusuri care provoacă importante îmbolnăviri la om cum sunt: variola, rabia, poliomielita, hepatita virală, gripa etc. În ultimii ani a fost descoperit un nou agent viral care produce SIDA.

Virusurile constituie un regn aparte, **VIRA**, microorganisme lipsite de organiz. celulară și care se deosebesc fundamental de organismele eucariote sau procariote.

2. CARACTERELE GENERALE ALE VIRUSURILOR

Virusurile sau **inframicrobii** sunt germeni extrem de mici, foarte puțin evoluți, situați pe primele trepte ale vieții. Aceste forme primitive de viață au o organizare rudimentară, incompletă, astfel că nu-și pot realiza un metabolism propriu, multiplicarea lor fiind legată de **parazitarea obligatorie a celulelor vii**.

Virusurile au următoarele particularități:

- Sunt particule de dimensiuni foarte mici (10 - 300 mμ). Pentru acest motiv, în marea lor majoritate, nu pot fi puse în evidență decât cu ajutorul microscopului electronic.

- Posedă un singur tip de acid nucleic (ADN sau ARN).

- Sunt filtrabile și ultrafiltrabile. Pe baza acestui caracter virusurile pot fi separate de bacterii.

- Sunt paraziți intracelulari obligatorii. Virusurile nu pot fi cultivate pe mediile de cultură folosite în mod obișnuit în bacteriologie.

- Înmulțirea virusurilor se face prin replicare.

- Sunt specifice; fiecare virus provoacă o anumită boală.

- Produc incluzii în celulele parazitare. Prezența acestor incluzii nucleare, citoplasmice, sau concomitent în nucleu și citoplasmă, în anumite țesuturi, ușurează diagnosticul de laborator al unor viroze deoarece sunt caracteristice.

- Fiecare virus prezintă o structură antigenică specifică. Omul și animalele infectate

cu un anumit virus produc anticorpi specifici iar imunitatea dobândită este solidă și de lungă durată. Tehnicile de serologie utilizate în diagnosticul de laborator al virozelor detectează acești anticorpi.

- Virusurile sunt, în general, insensibile la antibioticele uzuale și la unele substanțe chimice care distrug bacteriile.

3. CLASIFICAREA VIRUSURILOR ȘI A VIROZELOR

Pentru definirea principalelor familii, genuri și specii de virusuri trebuie să se țină seama de mai multe criterii: acidul nucleic din genomul viral (ADN sau ARN), mărimea particulei virale, prezența sau absența învelișului viral, numărul de capsomere, comportamentul față de anumiți agenți chimici și în primul rând față de eter, afinitatea pentru o anumită gazdă, organ sau aparat anatomic, aspectul clinic al bolii etc.

În interiorul fiecărui grup (gen) subclasificarea speciilor se bazează pe diferențe antigenice care permit identificarea a numeroase tipuri.

În funcție de **gazda parazitată** virusurile pot fi patogene pentru anumite animale vertebrate sau nevertebrate, virusuri patogene pentru plante sau virusuri patogene pentru bacterii (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 compoziția genomului menționăm câteva care produc viroze umane:

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

- **virusuri ARN**: Picornavirus (poliomielita, enterovirozele etc.), Togavirus (arbovirozele), Arenavirus (choriomeningita limfocitară, febrele hemoragice sudamericane etc.), Coronavirus (infecții respiratorii), Orthomixovirusuri (gripa), Retrovirusuri (SIDA) etc.

După aspectul clinic al bolii, virozele se pot încadra în două mari categorii:

Infecții virotice generalizate. În cursul acestor îmbolnăviri, virusul se răspândește pe cale sanguină în tot organismul și poate determina erupții caracteristice pe piele și mucoase. În acest grup sunt cuprinse: variola, rujeola, rubeola, varicela.

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

- infecții ale sistemului nervos central: poliomielita, turbarea;

- infecții ale aparatului respirator: gripa, guturaiul;

- infecții localizate pe piele și mucoase: herpesul, negii, zona zoster;

- infecții ale ficatului: hepatita epidemică;

- infecții ale glandelor salivare: parotidita epidemică;

- infecții ale ganglionilor limfatici: limfogranulomatoza veneriană.

4. MORFOLOGIA, STRUCTURA ȘI COMPOZIȚIA CHIMICĂ A VIRUSURILOR

Virionii reprezintă unitatea virulentă, agentul cauzal al unei viroze, tot așa cum o bacterie reprezintă agentul cauzal al unei boli bacteriene.

Forma virusurilor este variată. Ea a fost determinată cu ajutorul microscopului electronic. În general, corpusculii elementari sau virionii se pot prezenta sub următoarele forme:

- formă sferică sau sferoidală: virusul poliomielitit, virusul gripal;
- formă prismatic-patruilaterală: virusul vaccinal, variolic etc.
- formă de spermatozoid: bacteriofagi;
- formă filamentoasă sau de bastonaș: virusurile plantelor (de exemplu, virusul mozaicului tutunului).

Structura internă a corpusculului elementar viral

La o particulă virală se distinge, în general, o porțiune centrală mai densă, mai opacă la fluxul electronic, care a fost denumită **nucleoid**, și o porțiune externă mai puțin densă, sub forma unei capsule denumită **capsidă**. Nucleoidul este format dintr-un acid nucleic (acid ribonucleic sau acid dezoxiribonucleic), iar capsida este de natură proteică. În structura capsidei moleculele de proteină se grupează în **capsomere**.

Aceasta este schema structurii virusurilor simple, cum sunt: virusul poliomielitit, virusul febrei aftoase etc. Virusurile mai complexe au, în plus, o membrană de natură lipoproteică sau glucidolipidoproteică. Atât acidul nucleic, cât și moleculele de proteină din structura capsomerelor, se prezintă într-un aranjament strict specific fiecărui virus în parte.

Bacteriofagii, deși păstrează în linii generale structura virusurilor, au totuși o formă caracteristică. În general, un fag are un cap și o coadă. Capul de formă sferică, alungită sau de prismă hexagonală prezintă o porțiune centrală mai densă, alcătuită din acid dezoxiribonucleic și capsida formată din capsomere. Coada este formată dintr-un cilindru axial rigid învelit într-un manșon contractil și o placă terminală prin care bacteriofagii se fixează pe celula-gazdă (bacteria).

Compoziția chimică a virusurilor

În compoziția chimică a virusurilor se întâlnesc elemente de bază care sunt aproape nelipsite în oricare celulă vie: proteine, acizi nucleici, lipide, hidrați de carbon.

Virusurile cele mai simple sunt constituite numai din proteină și un acid nucleic. Astfel, virusul poliomielitit este constituit din proteină și acid ribonucleic, iar bacteriofagii, din proteină și acid dezoxiribonucleic.

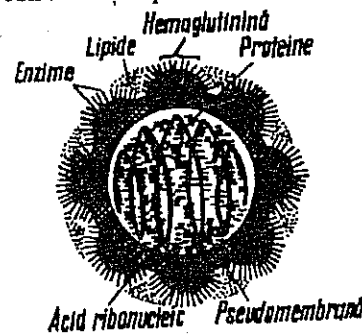


Fig.24. Structura chimică a unui virus complex (virusul gripal).

Virusurile mai complexe, cum sunt virusul gripal, vaccinul și altele, au genomul viral protejat de un înveliș constituit dintr-o pătură internă proteică și o pătură externă lipoproteică.

Proteinele virale fac parte din structura capsidei dar există și proteine cu rol enzimatic.

5. CULTIVAREA ȘI MODUL DE MULTIPLICARE A VIRUSURILOR

Pentru stabilirea diagnosticului unei viroze sunt necesare **izolarea și identificarea agentului patogen** în produsele patologice recoltate de la bolnav sau de la cadavru. Cultivarea lor este posibilă dacă sunt inoculate într-o gazdă receptivă reprezentată de:

- animale de laborator;
- ouă embrionate;
- culturi de celule.

Multiplcarea virusurilor

Virusurile se multiplică într-un mod cu totul diferit față de bacterii. Aceste microorganisme se autoreproduc folosind mecanismele celulare din interiorul celulei vii, de unde iau hrana, enzimele și energia necesară multiplicării.

Multiplcarea virusurilor se desfășoară în mai multe etape:

Adsorbția este faza de adeviere și fixare a particulei virale la celula-gazdă. Această etapă este obligatorie pentru a se produce infecția în condiții naturale. Orice factor care împiedică adsorbția împiedică în realitate și infecția.

Pătrunderea virusului în interiorul celulei-gazdă. În celulă poate pătrunde virusul în întregime sau numai acidul nucleic cuplat cu o mică parte din capsulă.

Faza de eclipsă este denumită astfel, deoarece virusul pătruns în celulă se dezintegrează în acid nucleic și proteină și nu poate fi pus în evidență.

Faza de multiplicare activă este aceea în care acidul nucleic și, separat, capsida și alte componente ale virusului adult se multiplică pentru ca, în cele din urmă, aceste elemente să se cupleze și să formeze particule virale complete.

Faza de eliberare. Virusul astfel format poate **părăsi celula treptat**, pe măsura formării sale sau se acumulează și produce explozia celulei-gazdă, eliberându-se și infectând alte celule.

Metode de cultivare a virusurilor

Obținerea unor rezultate optime în diagnosticul de laborator al unei viroze depinde într-o mare măsură de corectitudinea recoltării produselor patologice incriminate.

Tehnicile de recoltare sunt, în general, similare celor utilizate în diagnosticul bacteriozelor, dar metodele de cultivare a virusurilor sunt complet diferite.

5.1. CULTIVAREA VIRUSURILOR PE ANIMALE DE LABORATOR

Animalele de laborator utilizate în mod curent în diagnosticul de laborator

virusologic sunt: șoarecele alb, șobolanul, cobaiul, iepurele, hamsterul, cocoșul și maimuța.

Pregătirea animalelor pentru inoculare

Pentru efectuarea unei experiențe se aleg numai animale perfect sănătoase. Ele sunt grupa după rasă, vârstă, sex și greutate. Se recomandă ca animalele să aparțină, pe cât posibil, aceleiași linii genetice.

Pentru identificarea animalelor care sunt introduse într-o experiență este necesară marcarea lor. Această marcă se face la animalele mici cu blana albă (șoareci, șobolani) prin vopsire cu diferite culori de anilină, iar la animalele mai mari (iepurii, cobaii) prin mărci metalice prinse de pavilionul urechii.

Pe borcanele de sticlă sau pe etichetele cuștilor cu animale se scriu datele cu privire la experiența care se efectuează: numărul experienței, datele inoculărilor, ale prelevărilor de sânge, ale sacrificării animalelor etc.

Când se fac inoculări intradermice sau scarificări ale pielii, este necesară îndepărtarea părului de pe regiunea respectivă, prin tunderea lui cu mașina. Epilarea completă se obține prin aplicarea unei paste care se poate prepara cu ușurință în orice laborator din 30 g monosulfat de sodiu dizolvat în 70 ml apă. După preparare, pasta se întinde pe suprafața pielii și se lasă câteva minute; prin îndepărtarea pastei cu apă se îndepărtează și firele de păr. Când epilarea nu este completă, această operație se poate repeta. Regiunea epilată se spală cu apă caldă, după care se tamponează cu vată pentru a se usca și, apoi, se unge cu vaselină. Este recomandabil ca animalul să fie lăsat în repaus până a doua zi, pentru ca pielea să recapete aspectul său normal.

Conținutul animalelor de laborator

Pentru a putea executa corect și fără riscuri inocularea sau recoltarea unor produse, este necesar ca animalele respective să fie imobilizate, în prealabil, într-o poziție adecvată manoperei respective și care să evite zgârieturile, mușcăturile sau unele accidente legate de administrarea unor preparate infectate sau toxice.

Imobilizarea animalelor se poate face fie cu mâna, fie cu ajutorul unor aparate construite special pentru aceste scopuri.

Șoarecele este prins de coadă cu mâna dreaptă, după care se imobilizează complet cu degetul mare și arătătorul mâinii stângi.

Atunci când lucrează o singură persoană, pentru a-și elibera mâna dreaptă, în scopul de a efectua inocularea intraperitoneală, coada șoarecelui este fixată între degetul mic și inelarul mâinii stângi.

Imobilizarea șobolanului se face prin prinderea pielii ceafei cu o pensă.

Cobaiul este ușor imobilizat prin prinderea cu mâna a toracelui și a labelor posterioare.

Iepurele trebuie imobilizat cu multă atenție și suficientă energie, pentru a nu-i permite să facă mișcări bruște prin care să scape din mâini, să muște sau să zgârie și, mai ales, să împrăști materialul infectat cu care se face experimentarea. Asemenea

mișcări bruște sau manipularea lor brutală pot duce destul de frecvent la fracturarea coloanei vertebrale, care are drept urmare paralizia labelor posterioare și moartea animalului. El este imobilizat prin prinderea de urechi, de spate sau ceafă și fixarea sa pe o masă în poziția de lucru cea mai convenabilă.

Când se fac operații mai complicate, atunci imobilizarea manuală nu mai este suficientă și se recurge la aparate speciale care imobilizează animalul pe o planșetă de metal sau de lemn, prevăzută cu dispozitiv de fixarea capului și a labelor animalului. Dintre acestea, cele mai utilizate sunt: tava de metal, grilajul metalic, aparatul de contenție al lui Giroud, aparatul de contenție al lui Malassez, aparatul de contenție sau masa Latapie etc.

Anestezierea animalelor de laborator

În anumite operații mai dificile, pentru a se lucra corect și comod, este necesar ca animalul să fie anesteziat.

Prin anestezie se suprimă în mod temporar sensibilitatea organismului sau a unei părți din acesta. Anestezierea se face cu eter, cloroform, soluții de clorhidrat etc. Trebuie să se țină seama că administrarea substanțelor anestezice nu este lipsită de pericol pentru animale. Ca și la om, anestezia poate provoca accidente mortale, mai ales atunci când aceasta nu este efectuată corect.

Animalele mai mici se anesteziază mai rapid ca cele mari, dar și revenirea la starea normală are loc mai repede.

Șoarecii și șobolanii sunt anesteziați cu un tampon de vată îmbibat în eter. Acesta este introdus sub un cristalizator împreună cu animalele respective. Dacă doza de anestezie este bună, animalele, după o perioadă scurtă de agitare, se liniștesc și adorm.

Iepurele, cobaiul, câinele etc. sunt, în prealabil, imobilizați cu ajutorul unui aparat de contenție. Substanțele anestezice se administrează picătură cu picătură pe un tampon de vată introdus într-un cornet de hârtie, care are rol de mască și care este ținut pe botul animalului. La început animalul se agită, dă semne de sufocare, dar după aceea se liniștește și respirația sa devine regulată. Din acest moment se poate începe operația. În cursul anesteziei este necesar ca animalul să fie supravegheat în permanență, deoarece o doză prea mare îl intoxică, respirația și bătăile inimii încetează și animalul moare, iar o doză prea mică îl trezește și devine agresiv.

Inocularea animalelor de laborator

Diferite substanțe, culturi microbiene, toxine etc. pot fi administrate animalelor de laborator pe următoarele căi: cutanată, subcutanată, intramusculară, intravenoasă, intraperitoneală, intracerebrală, oculară, în căile respiratorii, digestive etc.

Administrarea cutanată se poate face în două moduri: prin aplicare pe epidermă sau prin inoculare intradermică.

- Aplicarea epidermică se face prin întinderea produsului pe pielea în prealabil depilată, cu ajutorul unui tampon, fără a se freca. După uscarea pielii, animalul este introdus în cușcă și ținut sub observație.

- Inocularea intradermică se face pe epiderma epilată care este lezată prin zgârieturi paralele, superficiale, efectuate cu ajutorul unui vârf de bisturiu sau al vaccinostilului. După aceasta, se badijonează pielea cu un tampon de vată sterilă îmbibată cu produsul de cercetat. Frencționarea ușoară favorizează pătrunderea produsului în derma animalului. Inocularea mucoaselor se face în același mod, după o prealabilă scarificare superficială.

Când se administrează o cantitate exactă de produs, atunci inocularea intradermică se face cu ajutorul unei seringi speciale prevăzute cu un ac foarte fin. După epilare se introduce acul în dermă, paralel cu suprafața pielii. La locul inoculării apare o mică bulă cu suprafața asemănătoare cojii de portocală.

Inocularea subcutanată se efectuează cu acul și seringă, după o prealabilă aseptizare cu tinctură de iod sau cu alcool.

Locul de inoculare și cantitatea de lichid care poate fi inoculată variază în funcție de animal.

Inocularea intramusculară se face în musculatura coapsei cu un ac ceva mai lung decât cel folosit pentru inoculările subcutanate. Pe această cale, produsele inoculate se absorb mai rapid.

Inocularea intravenoasă. La șoarece și la șobolan, inocularea se face cu un ac fin în venele cozii. Pentru ca acestea să devină evidente, se introduce coada animalului în apă caldă. Dacă în timpul inoculării se întâmpină o rezistență și la vârful acului se formează o bulă, înseamnă că nu s-a pătruns în venă, ci în țesuturile din jurul ei.

La cobai, venele sunt situate profund și greu de abordat. Totuși, se pot face inoculări în vena coapsei, în vena marginală a urechii sau, la nevoie, în vena jugulară care poate fi pusă în evidență prin operație.

La iepure, inocularea se execută în vena marginală externă a urechii, după depilarea locului respectiv. Pentru ca o venă să devină mai evidentă, se poate face o ușoară compresiune a bazei urechii între degetul mare și arătător, sau se șterge ușor regiunea cu un tampon înmuiat în toluol, xilol ori apă caldă.

Inocularea intraperitoneală se face în același mod la șoarece, șobolan, cobai și iepure. Un ajutor imobilizează capul și membrele animalului, iar persoana care execută inocularea apucă peretele abdominal cu degetul mare și arătătorul mâinii stângi. În felul acesta se formează un pli la baza căruia se introduce acul în cavitatea peritoneală, având grijă să nu se perforizeze intestinele sau alte organe interne ale animalului.

Inocularea intracerebrală. Pe această cale se introduc în sistemul nervos central al animalului produse infectate recoltate de la cadavre sau de la bolnavi. Apariția unor semne caracteristice de boală ajută la precizarea diagnosticului unor boli ca poliomielita, turbarea etc.

Inocularea oculară se face prin aplicarea produsului infectat pe corneea scarificată sau pe conjunctivă. Se pot efectua, de asemenea, inoculări în camera anterioară a ochiului.

Inocularea prin căile aeriene respiratorii. Aceste inoculări se pot face prin inhalarea produsului pulverizat, prin instilații nazale sau intratraheale.

Instilațiile nazale se fac după ce, în prealabil, animalele au fost anesteziate cu eter. Produsul virulent este lăsat să curgă, picătură cu picătură, în fiecare narină, dintr-o seringă sau o pipetă gradată. Lichidul va fi aspirat de animal în cursul inspirației și va pătrunde în aparatul său respirator.

Inocularea pe cale digestivă. Administrarea unui produs pe această cale se poate face fie prin simpla incorporare a acestuia în alimentele obișnuite ale animalului, fie prin introducerea produsului respectiv direct în stomac, cu ajutorul unei sonde. În primul caz dozarea nu se poate face întotdeauna cu exactitate, deoarece animalul poate mânca numai parțial hrana care i se dă, sau utilizează o parte din alimente după trecerea mai multor ore, astfel că, în acest interval de timp, survin modificări mari în numărul agenților patogeni introduși în alimentul respectiv.

Indiferent de modul de administrare, animalul trebuie ținut mai întâi nemâncat 24h.

Recoltarea sângelui de la animale

Sângele și componentele sale constituie produse biologice de mare importanță pentru laborator. De asemenea, în cele mai multe experiențe pe animale este necesară urmărirea modificărilor care apar în sângele acestora. Sângerările (recoltările de sânge) pot fi parțiale, (atunci când sunt necesare cantități mai mici de sânge și când animalul trebuie menținut în viață pentru continuarea experienței) sau totale ("la alb"), când experiența s-a terminat.

Cantitățile mici de sânge se obțin prin simpla secționare a vârfului cozii sau a urechii la animalele mici și prin puncția unei vene superficiale la animalele mai mari.

Cantitățile mai mari de sânge se obțin prin puncție venoasă, cardiacă sau arterială.

Puncția venoasă. La șoarece și șobolan, sângele venos se poate recolta prin puncția plexului venos retroorbital, cu ajutorul unei pipete Pasteur efilate, al cărei capăt ascuțit este introdus lateral între globul ocular și peretele osos al orbitei, animalul fiind imobilizat cu capul pe un plan tare. Sângele urcă dacă pipeta este înclinată la 45°.

La cobai, sângele venos se recoltează din plexul venos retroorbital, dar se mai poate recolta și din vena posterioară a coapsei, după punerea unui garou la baza coapsei sau din vena jugulară externă, după incizia pielii și punerea în evidență a unei venei respective.

La iepure, maimuțe și alte animale mari, recoltarea de sânge venos este foarte ușoară, deoarece venele sunt mari și ușor abordabile.

Puncția cardiacă. Șoarecele este fixat pe spate pe o planșetă de plută. Se depilează regiunea stângă a toracelui și se reperează locul în care pulsează inima. După aseptizare, cu alcool sau tinctură de iod, acul montat la seringă este înfipt perpendicular, la 0,5 cm, deasupra acestui loc, pe marginea sternului. În acest mod se poate pătrunde în ventriculul drept, de unde se aspiră 0,5 ml sânge cu seringă.

Șobolanul este imobilizat în aceeași poziție. Se depilează regiunea stângă a toracelui și se stabilește locul exact al băților inimii. Acul montat la seringă se introduce perpendicular în cușca toracică, la 1-2 mm de marginea stângă a sternului și la 1 cm deasupra locului în care pulsează inima, după o prealabilă dezinfectie. Se recoltează, astfel, din ventriculul drept 6-8 ml sânge.

La cobaiul imobilizat se depilează regiunea anterioară stângă a toracelui, se aseptizează și se puncționează în al doilea spațiu intercostal stâng, lângă marginea sternului. Se pot recolta 10-12 ml sânge de la un cobai care cântărește 400 g. Recoltarea se poate repeta o dată pe săptămână.

Iepurele este, de asemenea, fixat cu ajutorul unui aparat de contenție. Se depilează regiunea precordială și se dezinfectează cu alcool sau tinctură de iod.

Puncția se face în al treilea spațiu intercostal stâng, la 3 mm de marginea stângă a sternului și se pot extrage 15-20 ml sânge de la un iepure de 2 kg.

Puncția arterială. Se practică mai ales la iepure și cobai, când se face o sângerare totală. De obicei, sângerarea se face din artera carotidă, care este pusă în evidență în regiunea cervicală anterioară, printr-o operație chirurgicală.

Sângerarea se face în același mod la iepure și la cobai.

Animalul este imobilizat pe masa Latapie. Se tunde părul din regiunea anterioară a gâtului, se dezinfectează această suprafață și se face cu un foarfece steril o tăietură longitudinală, de 5-7 cm, în pielea gâtului, după care se taie aponevroza și, cu ajutorul unei sonde canelate, se disociază cu atenție pachetul de vase și nervi format din vena jugulară, nervul pneumogastric, nervul simpatic și artera carotidă care este cea mai centrală.

Artera carotidă este individualizată cu ajutorul sondei, după care se trec trei fire de ață pe sub ea: cu primul fir se face un nod strâns în partea superioară și astfel se întrerupe circulația arterială spre cap; cu al doilea fir se face un nod slab, în partea inferioară și care nu se va strânge decât în cazul când, la introducerea acului în arteră, aceasta se rupe, iar cu al treilea fir, pus la mijloc, se face un nod care se strânge pe acul introdus în arteră cu vârful spre cord.

Recoltarea sângelui se face într-un aparat de sângerat.

În unele cazuri, sângerarea nu este totală. După obținerea unei anumite cantități de sânge se strânge și se leagă nodul de la firul de ață situat în partea inferioară, spre cord, după care se suturează la loc pielea și celelalte țesuturi tăiate, urmând ca sângerarea următoare să fie efectuată din cealaltă arteră carotidă.

Toate aparatele și instrumentele utilizate în cursul operației trebuie să fie, în prealabil, sterilizate.

Autopsierea animalelor de laborator

Pentru a preciza cauza morții unui animal, prin punerea în evidență a unui anumit agent patogen sau pentru a cerceta modificările anatomopatologice în organele sale, este necesar să se examineze cadavrul acestuia cât mai curând după deces, deoarece

germenii obișnuiți ai organismului său (bacilul coli, bacilul proteus etc.) îl pot invada, producând unele modificări și îngreunând stabilirea diagnosticului bolii.

Persoanele care efectuează autopsia trebuie să fie echipate cu materiale de protecție: halat, bonetă, șorț, mănuși, ochelari și mască.

Cadavrul animalului este depus pe o tavă de autopsie cu marginile mai ridicate, pentru a împiedica răspândirea lichidelor infectate și este fixat pe spate, cu etichete îndepărtate. Se examinează părțile exterioare ale animalului, după care se udă toracele și abdomenul cu o soluție slabă de sublimat. Se taie pielea de la stern până la pubis, se prelungește această incizie până la rădăcina fiecărui membru, după care se desprinde pielea de pe torace și de pe abdomen. Abdomenul se deschide prin secționarea peritoneului, în lungime, cu un foarfece. Se recoltează lichid peritoneal, fragmente de splină, ficat, rinichi, intestin etc. În continuare, se deschide cușca toracică prin secționarea coastelor cât mai aproape de coloana vertebrală. Se examinează cavitatea toracică, pleura, plămânii, pericardul și miocardul, după care, dacă este necesar, se recoltează fragmente de organe. Cu ajutorul unei pipete Pasteur efilate se puncționează peretele anterior al ventriculului drept, și astfel se recoltează sânge direct din cord.

Când se recoltează materialul nervos, este necesar să se deschidă cutia craniană. Pentru aceasta, sunt necesare câteva instrumente: fierăstrău, clește, foarfece, daltă, ciocan, pense, bisturiu. Animalul este plasat cu ceafa în sus și cu etichete fixate lateral. Când capul animalului este detașat de corp, acesta trebuie fixat cu ajutorul unui dispozitiv metalic sau cu un clește special.

Pentru a îndepărta pielea capului, aceasta este secționată pe linia mediană sau de-a lungul liniei care unește marginile posterioare ale celor două orbite. În continuare, la animalele mici, oasele craniului se secționează cu un foarfece, ridicându-se întreaga calotă craniană. La animalele mari, îndepărtarea oaselor craniene se face după efectuarea a două secțiuni transversale paralele, dintre care una între cele două orbite, iar cealaltă prin osul occipital și una sau două secțiuni longitudinale. După îndepărtarea învelișului creierului, acesta este eliberat prin secționare de legăturile sale cu măduva spinării și nervii cranieni și recoltat într-un recipient steril.

După terminarea autopsiei, cadavrul animalului este ars în crematoriu, iar instrumentele utilizate cu această ocazie sunt sterilizate.

5.2. CULTIVAREA VIRUSURILOR PE OUĂ EMBRIONATE

Țesuturile și lichidele embrionare constituie medii de cultivare excelente pentru microorganismele. Embrionul de găină este utilizat cel mai frecvent în acest scop.

Se folosesc ouă fecundate, proaspete, cu coaja albă. Pentru dezvoltarea embrionilor,

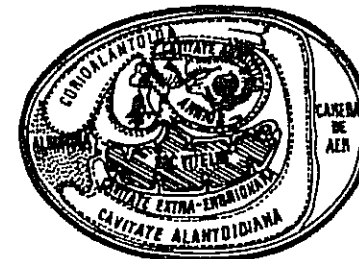


Fig.25. Oul embrionat (schemă).

ouăle sunt plasate în incubatoare speciale cu temperatură reglabilă. Examinarea embrionilor se face la întuneric, prin transiluminare cu ajutorul ovoscopului.

Toate operațiile ce se execută pentru inocularea și recoltarea unor produse – crearea de orificii sau de ferestre în cochilie, inocularea, închiderea orificiilor, recoltarea etc. – sunt efectuate în condiții de perfectă sterilitate.

Înainte de inoculare ouăle sunt examinate ovoscopic pentru controlul viabilității și al poziției embrionului, după care se marchează cu un creion limitele camerei de aer și punctele de inoculare.

Există mai multe modalități de inoculare a produselor în oul embrionat.

Inocularea în cavitatea alantoidiană se poate face prin camera de aer, la 0,5 cm deasupra marcajului camerei de aer sau direct în cameră, prin partea laterală a oului.

Inocularea în cavitatea amniotică se face în camera obscură, pe ovoscop, contactul vârfului acului de la seringă cu embrionul fiind semnalat de mișcarea bruscă a acestuia.

Inocularea în sacul vitelin se face prin partea laterală a oului, opusă embrionului, pe ouă cu embrioni tineri de 5-7 zile, deoarece rezervele nutritive sunt încă importante și, prin urmare, sacul vitelin este destul de mare.

Căile de inoculare intravenoasă și intracerebrală sunt mai dificil de executat, dar și utilizate mai rar.

Recoltarea diferiților componenți ai oului embrionat. După un interval de timp de la inoculare, când germenii inoculați au ajuns la o dezvoltare optimă, lichidele, membranele și embrionul sunt recoltate separat, în mod steril.

Lichidul alantoidian și, respectiv, lichidul amniotic sunt recoltate cu pipeta Pasteur și transferate în eprubete sterile.

Pentru recoltarea sacului vitelin și a conținutului său, embrionul împreună cu anexele sale este scos din coajă într-o placă Pétri. Sacul vitelin este prins cu o pensă la nivelul pediculului, după care conținutul său se scurge într-un pahar conic.

Membrana coriolantoidiană se recoltează după scoaterea embrionului din coajă și după secționarea pediculului care o leagă de acesta. Pentru examinarea leziunilor produse de microbul inoculat, membranele se prind cu o pensă și se spală în ser fiziologic steril, după care sunt depuse în cutii Pétri.

Embrionul este scos într-o cutie Pétri și examinat pentru depistarea unor eventuale modificări patologice ale organelor și ale țesuturilor.

5.3. CULTIVAREA VIRUSURILOR PE CULTURI DE CELULE

Această metodă se bazează pe faptul că unele celule sau țesuturi desprinse dintr-un organism pot supraviețui și se pot multiplica dacă sunt menținute în medii de cultură convenabile.

Celulele cultivate în serie pot deveni tulpini celulare (linii celulare) cu caractere particulare bine precizate și care se pot păstra nealterate în pasaje periodice timp de ani de zile.

În general culturile de celule pot fi de origine umană sau animală provenind din țesuturi normale (embrionare sau adulte) sau neoplazice.

Pe o perioadă de câteva zile sau săptămâni pot fi obținute și utilizate culturi de organ care își mențin structura originală.

Tehnica culturilor de țesuturi ca de altfel întreaga activitate a unor astfel de unități necesită o dotare specială a laboratorului de virusologie cu aparatură (balanță analitică, agitatoare magnetice, aparat de tripsinizare, centrifugi etc.), reactivi (apă distilată și bidistilată, medii de cultură speciale, tripsină etc.) și sticlărie neutră (flacoane, tuburi, plăci, lame, pipete, cilindri gradați etc.)

Sticlăria utilizată în prepararea și păstrarea culturilor celulare trebuie să fie *neutră, termorezistentă, perfect transparentă, cu grosimea uniformă, fără zgârieturi* etc. În mod obișnuit se folosește sticlăria de tip Pyrex sa Jena.

Curățirea, pregătirea și sterilizarea trebuie executate cu toată atenția. De felul cum se fac aceste operații depinde întreaga activitate a laboratorului.

Spălarea sticlăriei laboratorului de culturi se va face separat de sticlăria utilizată în alte laboratoare. După îndepărtarea prafului, sticlăria nouă va fi fiartă 20 min într-o soluție NaOH 2% după care se lasă la apa de robinet 24 ore. Se fierbe apoi într-o soluție de HCl 4% și se lasă din nou 24 ore la apa de robinet. Se clătește și apoi se fierbe o oră în apă distilată. Se clătește din noi în apă distilată și se lasă să se usuce.

Când sticlăria a mai fost utilizată, se curăță cu praf de curățat sau se spală cu fulgi de săpun la 60°C. Se clătește cu apă de robinet apoi cu apă distilată și se lasă să se usuce.

Înainte de sterilizare toate recipientele sunt astupate cu dop de vată sau capișon de hârtie. Dopurile de sticlă sunt împachetate separat în hârtie și legate de gâtul recipientului respectiv.

Sterilizarea sticlăriei se face 30 min la 120°C la autoclavă, deoarece sterilizarea uscată produce substanțe toxice rezultate din arderea substanțelor organice, cu acțiune nocivă asupra culturilor de celule.

- Dopurile de cauciuc vor fi confecționate din cauciuc natural alb, cele colorate fiind toxice. Înainte de utilizare, dopurile de cauciuc noi trebuie fierte 1-2 ore în soluție de NaOH n/20 și apoi spălate cu apă de robinet. În continuare dopurile sunt fierte 10 min într-o soluție de HCl 4% apoi spălate cu apă de robinet și ulterior cu apă distilată. Dopurile care au mai fost utilizate sunt fierte de fiecare dată în apă distilată și apoi spălate abundant cu apă distilată.

Sterilizarea dopurilor grupate în prealabil în cutii Pétri, se face la autoclavă.

- **Lamele** pentru culturi se fierb 5 min într-un pahar Berzelius într-o soluție de NaOH n/2 (0,5 n). Se varsă această soluție și lamele sunt clătite apoi 5 min la apa de robinet după care sunt fierte din nou 5 min în apă distilată acidulată (1-2 picături de HCl la 100 ml apă). Lamele sunt clătite de 6-7 ori în apă distilată și introduse apoi în alcool de 96° unde sunt păstrate până la folosire.

- Filtrele de sticlă noi se spală prin filtrare cu 1-2 l de apă distilată. Filtrele folosite trebuie spălate cu apă distilată, imediat după utilizare. Se trece apoi prin filtru

200-300 ml apă distilată. Când s-a filtrat o soluție minerală este suficientă trecerea prin filtru a unei cantități de apă distilată de 4-5 ori și mai mare decât soluția filtrată. Dacă filtrarea decurge normal, se clătește filtrul în apă tridistilată, și se usucă.

Când au fost filtrate lichidele organice (ser, tripsină etc.) filtrul este spălat imediat cu multă apă și tratat cu acid azotic p.a. concentrat sau acid sulfuric p.a. concentrat. Unul din acești acizi va fi turnat treptat în filtru până ce lichidul filtrat devine limpede. Ulterior se va spăla filtrul cu apă distilată până când reacția apei filtrate nu mai este acidă. Se va evita folosirea amestecului sulfo-cromic deoarece absorbția sărurilor de crom pe filtru îl face inutilizabil.

Controlul sterilității filtratului este obligatoriu la fiecare filtrare.

Spălarea filtrelor Seitz este mai simplă deoarece placa filtrantă se schimbă după fiecare filtrare.

- Instrumentele, seringile și alte ustensile de laborator folosite se sterilizează și apoi vor fi bine spălate după fiecare întrebuințare cu apă și săpun sau cu detergenti.

- Barele folosite la agitatorul magnetic după spălare sunt ținute în alcool de 70° până la o nouă utilizare.

Sterilizarea boxelor și a hotelor cu raze ultraviolete înainte de începerea lucrului este foarte utilă. Dacă lămpile ultraviolete trebuie să funcționeze și în cursul lucrului, personalul supus radiațiilor va purta obligatoriu ochelari de protecție sau mască protectoare. Chiar și în aceste condiții se va lucra numai la flacără, în condițiile unei sterilizări cât mai perfecte.

Dintre soluțiile utilizate în mod curent menționăm soluția Hanks și soluția salină tamponată (P.B.S.) iar dintre medii de cultură, mediul Enders de creștere și mediul Enders de întreținere, mediul 199 etc.

Obținerea elementelor celulare necesare cultivării virusurilor se face prin dispersarea celulelor cu mijloace mecanice sau chimice. Procedeele mecanice nu desfac bine celulele și nu duc la obținerea unor straturi monocelulare uniforme.

Dintre procedeele chimice se menționează tripsinizarea, metoda cea mai frecvent folosită.

Tripsinizarea constă în supunerea unor țesuturi sau organe la acțiunea tripsinei. Sub acțiunea tripsinei și a agitării mecanice, celulele se desfac și trec în suspensie. Suspensia de celule este centrifugată și spălată în soluție Hanks pentru a se îndepărta orice urmă de tripsină. Celulele astfel dispersate sunt numărate și repartizate în recipiente, tuburi, plăci sau flacoane, pentru cultivare. Ele aderă de perete, se multiplică și formează un strat monocelular. În acest moment pot fi inoculate cu diverse produse infecte.

Cu ajutorul tehnicii culturilor de celule se poate obține izolarea virusurilor din produsele patologice și identificarea acestora cu ajutorul serurilor de referință, determinarea anticorpilor serici din sângele bolnavilor sau a purtătorilor, prepararea unor antigene virale necesare preparării unor vaccinuri, a antigenelor de diagnostic etc.

Tehnica inoculării culturilor celulare

Pentru a putea fi inoculat, orice produs patologic va fi mai întâi debarasat de microbi și, pe cât este posibil, de substanțele toxice existente în aceste produse. În acest scop materiile fecale ca de altfel și alte produse patologice (puroi, organe triturate, urină, spălătură nazo-faringiană etc.) vor fi tratate astfel: se mojarază o cantitate de materii fecale cât un bob de mazăre în 5-6 ml soluție Hanks. Se centrifughează o oră la 3000 - 5000 rot/min. Se recoltează supernatantul și se neutralizează cu o soluție de bicarbonat de sodiu. Se adaugă 200 u. penicilină și 200 gama streptomycină la fiecare mililitru de supernatant. Se repartizează în tuburi și se pune peste noapte la congelator de -20°C. După dezghețare lichidul se stratifică. Se recoltează cu o pipetă stratal superior, limpede, care va fi folosit pentru inoculare.

Inocularea se practică astfel: se îndepărtează mediul nutritiv din tuburile cu culturi de celule. Se introduce apoi în fiecare tub 0,2 ml din produsul de cercetat și, după o oră, 1,8 ml mediu de întreținere. După ce se însămânțează 2-3 tuburi din fiecare probă, tuburile sunt introduse în termostat la 37°C. Concomitent se incubează și 2-3 tuburi neinoculate, constituind martorul pentru cultura de celule.

Multiplicarea virusurilor în culturile de celule este apreciată prin apariția între 2 și 7 zile, a unor fenomene care pot fi ușor observate:

a) *Apariția efectului citopatic*. Celulele infectate încep să degenereze; se rotunjesc, devin mai refringente, nucleul dispăre, se desprind de pe pereții tubului și cad în mediul nutritiv. Prin colorare se pun în evidență și alte detalii morfologice ale celulelor infectate cum sunt incluziile. Când produsele patologice sunt constituite din materii fecale, poate apare un efect citotoxic din cauza substanțelor toxice din acest produs și care poate simula efectul citopatic datorat virusurilor. Pentru a se evita această confuzie se recomandă ca după 30 min de contact între suspensia virulentă și cultura celulară să se îndepărteze suspensia și să se introducă mediu de întreținere proaspăt. După 24-48 de ore de incubare la 37°C se ia 1 ml din lichidul nutritiv și se trece într-un nou tub de culturi celulare.

După o oră se adaugă și în acest tub mediul de întreținere. Dacă efectul citopatic se datorește unui virus el se va repeta și în tubul de trecere. Efectul citopatic este ușor de constatat prin examinarea directă la microscop a culturii de celule.

b) *Hemadsorbția*. Adsorbția hematiilor pe celulele infectate cu virusuri hemadsorbante cum sunt virusurile gripale și paragripale. Acest fenomen este mai precoce decât efectul citopatic și uneori este singurul indicator al multiplicării virusurilor în celulă.

c) *Apariția hemaglutininelor sau a antigenului fixator de complement* în lichidul nutritiv în cazul virusurilor gripale, adenovirusuri etc.

d) *Inhibiția metabolismului celular* este pusă în evidență prin diminuarea sau absența acidifierii mediului de cultură ca în cazul virusului poliomielitice sau prin intensificarea formării de acid cum se întâmplă în infectarea cu adenovirusuri etc.

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

Interferonii constituie o clasă specială de proteine antivirale, netoxice, acido-stabile (pH 2,0), sensibile la tripsină, nedializabile, termorezistente (50° - 70°C) și care nu sedimentează la numărul de rotații al ultracentrifugii la care se depun particulele virale.

Există două tipuri de interferoni, diferiți din punct de vedere fiziologic și imunologic: interferon *standard* de tip I, citokină, sintetizat de celule altele decât leucocitele și interferon *leucocitar*, de tip II, limfokină, sintetizat de limfocitele T imune.

8. METODE DE CERCETARE A VIRUSURILOR

Ținând cont de particularitățile fizico-chimice și biologice ale virusurilor, în diagnosticul de laborator al virozelor se folosesc metode proprii specifice, adesea complet diferite de cele utilizate în diagnosticul bacteriozelor.

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

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

Pentru izolarea particulelor virale din matricea (membrană, nucleu celular etc.) în care acestea sunt incluse se utilizează procedee de solubilizare a acestora cu ajutorul unor detergenți și solvenți organici, sonicare, digestie cu nucleaze sau enzime proteolitice (papaină, tripsină) sau tratate cu diverse săruri simple sau complexe (TRIS).

Extractul astfel obținut sau prin alte procedee este supus în continuare unor metode de separare și purificare a virusurilor prin:

- *precipitare fracționată* cu sulfat de amoniu sau alți agenți precipitanți (etanol, metanol) sau prin purificarea cu solvenți organici (di-etil-eter, clorofom 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 (radioimunodozarea) și RIP (radioimmunoprecipitarea);

- *hemadsorbția-eluția*, utilizată la concentrarea virusurilor hemaglutinante (Myxovirusurile). Virusurile se atașează, prin intermediul hemaglutininei de receptorii hematiei, iar agregatele formate, sedimentează ușor. Ulterior, virusul este eliberat de pe membrana hematiei prin metode adecvate.

- *centrifugarea și ultracentrifugarea*.

Metode de identificare a virusurilor

În scopul identificării unui virus se continuă examenul de laborator pentru determinarea caracterelor fizico-chimice și biologice ale acestuia: *dimensiunea, forma și greutatea moleculară* (ce se stabilesc cu ajutorul microscopului electronic și al ultracentrifugării), *structura moleculară* (cu radiații X și microscopie electronică), *caractere antigenice* (prin imunoprecipitare, imunoelectroforeză, fixare de complement), *infectivitate* (numărătoarea unităților infectante, formatoare de plaje).

Dintre metodele serologice mai frecvent utilizate în virologie menționăm:

- **Reacția de sero-neutralizare**. Este folosită fie pentru a titra anticorpul neutralizant 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 serul conține anticorpi, aceștia neutralizează virusul și acesta nu se va mai dezvolta, 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-alantoidă, moartea embrionului sau a animalului etc.)

- **Reacția de fixare a complementului (RFC)**. Tehnicile folosite pentru reacția de fixare a complementului sunt cele clasice similare reacției Bordet-Wassermann, din sifilis sau microtestările în godeuri pe plăci de material plastic. Dificultatea constă numai în prepararea unui antigen viral corespunzător debarasat complet de resturile proteice provenind din țesuturile gazdei.

- **Reacția de inhibare a hemaglutinării (RHAI)**. Este o tehnică folosită în mod curent atunci când există virusuri hemaglutinante (gripă, parotidită epidemică etc.). La baza reacției stă următorul principiu: virusul aglutinează hematiile (om, găină etc.). Serul specific inhibă această aglutinare la un titru cu atât mai ridicat cu cât conține o cantitate mai mare de anticorpi.

Reacția se poate efectua în tuburi sau în godeuri și va fi executată cel puțin de două ori în cursul bolii pentru a se putea aprecia dinamica titrului anticorpilor.

Cap.XXVI. VIRUSOLOGIE SPECIALĂ

I. VIRUSURILE GRIPALE

Gripa este o boală infecțioasă acută caracterizată clinic prin manifestări severe ale aparatului respirator și ale organismului în general și epidemiologic printr-o contagiozitate mare cu producerea de valuri epidemice care periodic, la intervale de 20-40 ani, se extind pe întreg globul sub formă de pandemii.

Gripa este produsă de *virusul gripal* (*Myxovirus influenzae*) cu genomul constituit din ARN, făcând parte din *genul Influenza-virus, familia Orthomyoviridae*.

Virionul **gripal** are o formă sferică, uneori filamentoasă, cu diametrul de aprox. 100m μ . La suprafața sa se găsesc mici proeminențele filamentoase alcătuite din glicoproteine care constituiesc *hemaglutinina* și respectiv *neuraminidaza*, ambele având un rol important în activitatea biologică a virusului (infectivitate, efecte toxice). Acestea sunt implantate într-un înveliș lipidic al particulei virale care la rândul său este plasat pe o matrice proteică. În interiorul acesteia se află *nucleocapsida* constituită din *nucleoproteina* conectată la 8 fragmente de *ARN*. Antigenul nucleocapsidic conferă virusului gripal specificitate de tip (A, B, C).

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

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

Astăzi sunt cunoscute 3 tipuri de virul gripal – A, B și C – care diferă între ele prin structura nucleoproteinei interne și a antigenelor proteice de suprafață. În tipul de **virus gripal A** se pot întâlni 3 subtipuri de hemaglutinina (H₁, H₂, H₃) și două subtipuri de neuraminidază (N₁, N₂), în diverse combinații.

Această complexitate a structurii antigenice poate explica apariția unor variații antigenice majore la virusul gripal de tip A (recombinări genetice, mutații etc.), care, surprinzând populația fără o imunitate corespunzătoare, a provocat marile pandemii cunoscute.

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

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

Fiecare tulpină de virus gripal este *codificată astfel*:

- tipul antigenic de ribonucleoproteină (A,B,C);

- țara sau localitatea în care a fost izolată;

- numărul de ordine al tulpinii, anul în care a fost izolată pentru prima dată și, în paranteză, simbolurile structurii antigenice ale subtipului de hemaglutinina și ale subtipului de neuraminidază. De exemplu, marea pandemie de gripă asiatică din 1957-1958 care a afectat 1/3 din populația globului a fost provocată de tulpina de virus gripal A₁/Singapore/1/57 (H₂N₂).

Virusul gripal poate fi conservat timp de câteva săptămâni la 0 - +4°C. Puterea sa infecțioasă este distrusă prin încălzire timp de câteva minute la 56°C, prin radiații cu U.V. sau tratament cu eter, formol, fenol. Hemaglutinina și antigenele fixatoare de complement sunt mai rezistente la agenții fizici și chimici decât particula virală.

Patogenie. Virusul gripal pătrunde în organism prin intermediul aerosolilor și afectează mucoasa căilor respiratorii. Neuraminidaza scade vâscozitatea straturii mucoase expunând astfel receptorii de la suprafața celulelor la pătrunderea virusului gripal care produce leziuni distructive urmate de descumarea celulelor ciliate, infiltrate cu celule mononucleare și edem submucos. Când procesul afectează și parenchimul pulmonar, apar leziuni de tip interstițial. Starea toxică generală (febră, astenie, dureri musculare) însoțește de regulă sindromul gripal dar viremia apare în cazul când organismul este complet lipsit de apărare. Decesele și cazurile grave se întâlnesc în special la copiii mici și la bătrânii cu afecțiuni pulmonare sau cardiovasculare cronice.

Unele animale de laborator (dihor, șoarece) sunt sensibile la infecția gripală dar, în practică, cultivarea virusului se face pe oul de găină embrionat prin inoculare în cavitatea amniotică.

Diagnostic de laborator

Diagnosticul clinic de gripă nu poate fi realizat în afara perioadelor epidemice, deoarece numeroase alte infecții acute respiratorii se manifestă în mod asemănător.

Certitudinea unui diagnostic corect este dată de laborator prin izolarea și identificarea virusului gripal din spălătură nazală, secreții nazale sau faringiene, spută. Titrurile de virus în aceste produse patologice sunt cu atât mai înalte cu cât sunt recoltate mai aproape de debutul bolii (1-3 zile). Când este necesar să se utilizeze un mediu de transport, acesta trebuie să conțină proteine iar conservarea trebuie făcută la rece: la frigider (+4°C) când examenul se face în câteva zile și la congelator (-70°C) când examenul se face după o perioadă mai mare de timp.

Cultivarea și izolarea virusului se poate obține prin inoculare în sacul alantoidian sau amniotic al unor ouă de găină cu embrioni de 10 zile sau prin inoculare în culturi de țesuturi speciale. Trebuie știut că virusul nu produce decât efecte citopatice puține

și nespecifice și de aceea detectarea sa se face prin testele de hemaglutinare, hemadsorbție sau imunofluorescență.

Identitatea specifică a virusului gripal poate fi determinată cu antiseruri specifice prin testul de hemaglutinoinhibare.

Diagnosticul *rapid* al infecției gripale se poate face prin detectarea virusului cu ajutorul testului de imunofluorescență în celulele epiteliale ale tractului respirator sau prin detectarea acestuia în secreții prin testul ELISA sau prin determinarea fluorometrică a neuraminidazei în aceste secreții.

Diagnosticul serologic al infecției gripale este de o importanță primordială pentru investigațiile epidemiologice sau pentru confirmarea etiologică a unui diagnostic clinic prezumptiv. 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 greu și scump. Mai ieftin și mai simplu este testul de hemaglutinoinhibare care are o sensibilitate aproape egală cu testul de neutralizare, mai ales dacă serurile sunt în prealabil tratate pentru îndepărtarea inhibitorilor nespecifici ai hemaglutinării virusurilor.

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

Diagnosticul serologic al gripei prin reacția de hemaglutinoinhibare

Tehnica reacției. Reacția de hemaglutinoinhibare (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 tulpină obținute din lichidele alantoice și/sau amniotice ale ouălor de găină embrionate inoculate cu virusuri gripale aparținând 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 izotonică (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 serul imun de pasăre sunt tratate cu RDE pentru îndepărtarea inhibitorilor nespecifici.

Reacția de inhibare a hemaglutinării (HAI). Din serul de cercetat și din serul 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

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

	Diluție	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024
Ser de cercetat	volum (ml)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
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									

Titul serului de cercetat sau al serului 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 tulpini de virus gripal tip C sau temperatura laboratorului depășește +22°C citirile se fac după păstrare 90 minute la frigider (+6°C ± 2°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 secreții infectante. Contagiozitatea este mare, transmiterea agentului patogen făcându-se rapid, mai ales în colectivități. În numai câteva săptămâni gripa se poate propaga în numeroase țări 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-neuraminidază.

Rezistența față de boală este dată, în principal de anticorpii față de hemaglutinină 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 (hemaglutinină, neuraminidază), sau cu vaccinuri cu virus viu atenuat. Ținând 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:

- izolarea bolnavilor la domiciliu sau în spital pe durata bolii acute;
- limitarea circulației persoanelor expuse;
- educație sanitară etc.

De asemenea orice apariție epidemică a bolii se anunță și pe plan internațional la OMS iar tulpinile izolate se trimit la Centrele naționale și internaționale; se instituie supravegherea mersului epidemiei prin examene serologice de masă.

2. VIRUSUL RABIC

Rabia sau turbarea este encefalomielită acută comună omului și unor specii de animale. Boala este provocată de virusul rabic care este transmis de la animalul bolnav la om aproape exclusiv prin 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 m μ și un diametru de 60-80 m μ . Acidul nucleic, ARN, este inclus într-o nucleocapsidă înconjurată de o membrană în constituția căreia se află și lipide. Virusul este sensibil la eter, cloroform și acetona precum și la radiații U.V. dar este destul de rezistent în mediul ambiant. Poate supraviețui timp de câteva săptămâni la temperaturi mai scăzute și poate fi conservat în glicerină sau prin liofilizare.

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

Virusul "*de 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 infiltrații cu mononucleare, perivasculare și perineuronale însoțite de fenomene de degenerescență. În neuroni apar incluzii intracitoplasmice acidofile sferice sau alungite, caracteristice encefalitei rabice denumite "*corpusul Babeș-Negri*". De asemenea apar leziuni degenerative în măduva spinării, glandele salivare și lacrimale și în pancreas.

Incubația bolii este variabilă, de la 7-8 zile la câteva luni sau chiar ani. În faza de debut apar cefalee, indispoziție și alte fenomene neuropsihice. Boala poate îmbrăca forma *furioasă* cu hidrofobie, agitație, halucinații, crize spasmodice sau forma

paralitică cu parestezii, somnolență și paralizii. Moartea survine de regulă după câteva zile, cel mult 10 zile de la debutul bolii, cu insuficiență respiratorie și circulatorie.

Tratament. Turbarea la om, odată apărută, este totdeauna fatală și, de aceea, tratamentul se adresează persoanelor suspecte de a fi infectate cu virus rabic și are drept scop blocarea și neutralizarea agentului patogen la poarta de intrare pentru a împiedica declanșarea bolii.

Tratamentul *local* trebuie instituit imediat și el constă din toaleta plăgii, spălare abundentă a locului mușcăturii cu apă și săpun, aplicarea unor antiseptice locale și infiltrații locale cu ser 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 mai puțin de 24 ore capul este trimis ambalat cu grijă într-o ladă izotermă. Când distanța este mare și durata depășește 24 ore se pot recolta fragmente din zonele de elecție ale sistemului nervos (Cornul lui Amon, scoartă și trunchi cerebral, cerebel) și glande submandibulare și se introduc într-un recipient de sticlă cu glicerină 50% în soluție fiziologică tamponată.

Este bine ca în timpul autopsierii 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.

Examenul *macroscopic* evidențiază leziuni de meningoencefalită.

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

Diagnosticul rapid prin metoda Sellers

Amprente proaspete, umede, preferabil pe secțiuni din Cornul lui Amon, se introduc într-un amestec în părți egale de albastru de metilen 1% în alcool metilic absolut și fucsină bazică 1% de asemenea în alcool metilic absolut. După colorare se spală frotiul cu apă de robinet, se lasă să se usuce și se examinează cu obiectivul cu imersie sau se montează în balsam de Canada. În caz de turbare apar incluzii rabice, rotunde sau ovale de cel mult 27 μ , de culoare roșie cu 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 incluziilor este patognomonică pentru diagnosticul de rabie.

Absența incluziilor rabice nu exclude diagnosticul de turbare și necesită continuarea precizării diagnosticului prin alte probe de laborator.

Diagnosticul histopatologic

În acest caz înainte de colorare este nevoie de o fixare a preparatelor histologice. Pentru o fixare rapidă se poate utiliza formolul. Cea mai bună metodă de fixare pentru punerea în evidență a incluziilor rabice este metoda Bouin-Dubosque-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 Mann*. În acest din urmă caz secțiunile de material nervos, în prealabil deparafinate și deshidratate (3 băi de toluen a câte 10 minute, urmate de 3 băi de alcool etilic absolut a câte 10 minute și rehidratate 10 minute) sunt introduse într-un amestec de soluții apoase de albastru de metil și eozină (sol. de albastru de metil 1% 18 ml, sol. de eozină 1% 23 ml și apă distilată 49 ml) în care se mențin 24 ore la temperatura camerei. În continuare preparatele se spală cu apă de robinet, se scurg și se introduc într-o soluție de alcool sodat (NaOH 1,5% în etanol, 1 ml și etanol absolut 30 ml) pentru diferențiere. După 10 minute, preparatele devin roz, se scot și se spală abundent cu apă de robinet. În continuare, preparatele se trec prin apă distilată acidă (40 ml apă distilată + 2 picături de acid acetic) timp de 1-2 minute, sunt deshidratate cu alcool absolut și apoi toluen după care sunt montate în balsam de Canada. Examinarea la microscop cu obiectivul 40 sau cu imersia pune în evidență corpusculii rabici de culoare roșie situați intracitoplasmatic cu un halou clar în jur și având o structură internă constituită din puncte bazofile, colorate în albastru închis. Citoplasma 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 fluorescenți

Este metoda de bază în diagnosticul turbării fiind precisă și rapidă.

Principiul metodei constă în cuplarea anticorpilor specifici cu fluorocrom, apoi punerea în contact a anticorpilor cuplați cu antigene specifice și evidențierea în spectrul ultraviolet, la microscop, a complexului antigen-anticorp fluorescent.

Diagnosticul rabiei prin metoda anticorpilor fluorescenți

Din materialul nervos de examinat (Cornul lui Amon, trunchiul cerebral și scoartă) se fac câte două amprente pe o lamă, etichetată. După uscarea amprentelor la temperatura camerei, acestea sunt sterilizate prin expunere la ultraviolete timp de 10 min, apoi lamele sunt introduse pentru fixare în acetonă răcită la -20°C, timp de cel puțin 20 min. După fixare se aplică o picătură de ser fluorescent activ obținut prin

cuplarea anticorpilor rabici cu izotiocianat de fluoresceină, pe amprenta de lângă etichetă iar pe amprenta din partea opusă se aplică o picătură de ser fluorescent martor.

Preparatele se introduc pentru 30 min la termostat la +37°C, după care se țin într-o baie de tampon fosfat salin la pH = 7,2 timp de 10 min, cu limpezire de 2 min în apă distilată. După uscare se montează lamele pentru amprente, cu glicerina tamponată și se examinează în spectru ultraviolet.

În cazurile de diagnostic negativ, fluorescența specifică este absentă în ambele amprente.

Diagnosticul prin imunofluorescență este indicat în toate cazurile în care produsul de examinat este proaspăt, nealterat. Procesele de putrefacție denaturează exactitatea diagnosticului.

Când prin utilizarea probelor menționate nu s-a putut preciza diagnosticul se recurge la proba biologică, care asigură un diagnostic de certitudine.

Proba biologică constă din inocularea intracerebrală a materialului nervos la animale sensibile (șoareci albi nou-născuți sau adulți și iepuri). În acest scop, 1-2 g de material nervos este mojarat, suspensionat 10% în soluție salină fiziologică și centrifugat. Este preferabil ca la materialul ce urmează a fi inoculat să se adauge 10% ser normal, penicilină (500-1000 UI/ml) și streptomycină (1-3 mg/ml) cu cel puțin 30 min înainte de inoculare.

La șoarecii nou-născuți se inoculează intracerebral 0,01 ml iar la șoarecii adulți 0,03 ml din suspensia de probă.

După inocularea șoarecii sunt observați zilnic. Începând din ziua a 4-a, se sacrifică în fiecare zi câte un șoarece și din creierul lui se fac amprente care sunt controlate prin imunofluorescență.

Când materialul inoculat provine de la un animal turbat, controlul prin imunofluorescență pune în evidență în creierul șoarecilor inoculați, antigenul rabic, cu 2-3 zile înaintea apariției semnelor clinice. În general la șoarece, semnele de turbare apar la 7-10 zile de la inoculare. Semnele clinice constau din apariția agitației și a unor contracții clonice, animalul ținând membrele anterioare și capul în extensie. În faza finală apar paralizii și în final moartea. În momentul apariției paraliziei animalul este sacrificat, se recoltează creierul în mod steril și se fac amprente care se examinează după colorația Sellers și în primul rând prin imunofluorescență.

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

Proba de seroneutralizare constă, pe scurt, așa cum este executată în Institutul Cantacuzino, din amestecarea suspensiei de cercetat, în părți egale, o parte cu ser antirabic, o parte cu ser normal și o parte cu ser fiziologic. După o incubare de o oră la temperatura de 37°C se inoculează la șoarece. În caz de turbare supraviețuiesc șoarecii inoculați cu suspensie amestecată cu ser antirabic și fac turbare șoarecii din celelalte două loturi de animale inoculate.

Epidemiologie. Rezervorul de virus este constituit din speciile de animale cu

sânge cald care, fără excepție, sunt susceptibile de a se îmbolnăvi de turbare și de a transmite virusul existent în salivă în special prin mușcătură.

Deoarece în țara noastră rabia este transmisă la om în primul rând prin mușcătura de câine, se recomandă vaccinarea sistematică și ținerea 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, însoțite sau nu de icter. Ele sunt provocate din câte 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 mμ), sferic și face parte din familia *Picornaviridae*, genul *Enterovirus*. Principalul său antigen este Ag HA iar anticorpii corespunzători sunt anti-HA, IgG și IgM. Hepatita virală A este în general o boală ușoară, fără manifestări extrahepatice și adeseori anicterică și asimptomatică. Rezervorul de virus A este constituit din bolnavi cu icter sau asimptomatici. Agentul patogen este excretat prin fecale iar transmiterea se face aproape exclusiv pe cale fecal-orală, prin contact direct sau indirect prin intermediul alimentelor sau a apei contaminate. Receptivitatea la boală este generală, iar imunitatea specifică este solidă și durabilă. Profilaxia bolii se face prin izolarea bolnavilor și controlul contactilor, educație sanitară, protecția apei și alimentelor, controlul igienico-sanitar al colectivităților și localităților.

Profilaxia specifică se poate face, pe cazuri individuale, cu gammaglobulină normală.

Virusul hepatitic B (VHB) este un virus ADN de formă sferică, cu diametrul de 42 mμ și face parte din familia *Hepadnaviridae*, genul *Hepadnavirus*. Principalele sale antigene sunt: AgHBs (antigenul de suprafață al VHB), AgHBc (antigenul central al VHB) și Ag HBe (antigen legat de antigenul central).

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

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

Anticorpii anti-Ag HBc sunt anticorpi specifici IgM și prezența lor indică o infecție sigură. Ei dispar odată cu vindecarea bolii.

Antigenul HBe este un polipeptid solubil care apare în sângele bolnavilor de

timpuriu, odată cu Ag HBs. Când evoluția bolii este favorabilă, după o lună de la apariția icterului, apar și 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 derivate de sânge. Anticorpii corespunzători anti AgHC apar în convalescență sau în hepatita cronică.

Virusul hepatitic Delta (VHD) - agentul etiologic al hepatitei virale delta, apare ca o suprainfecție la bolnavii cu hepatită virală B, agravând mersul bolii. Existența acestui tip de infecție condiționată se explică prin faptul că virusul delta este un virus defectiv care nu se poate replica decât în prezența virusului B. Anticorpii anti-Delta sunt anticorpi IgM și IgG și pot fi depistați ca de altfel și antigenul prin teste serologice specifice.

Virusul hepatitic E (VHE) este virusul hepatitic non A, non B, transmis pe cale enterală. Apariția 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 glutamicpiruvică, TGO - transaminaza glutamicoxalacetică, fosfataza alcalină, testele de disproteinemie, etc.).

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

Epidemiologie. Principalul rezervor de virus este omul bolnav și purtătorii cronici și asimptomatici care, în unele regiuni, reprezintă între 10-20% din populație.

Principalele căi de transmitere a agentului patogen sunt calea orală (VHA și VHE), în special prin intermediul alimentelor și a apei contaminate, și calea parenterală (VHB, VHC și VHD), prin transfuzii de sânge sau derivate de sânge contaminat, utilizarea unor seringi nesterilizate sau incorect sterilizate, folosirea instrumentarului stomatologic sau chirurgical la mai mulți pacienți fără sterilizare etc. Receptivitatea la boală este generală iar imunitatea dobândită față de un anumit tip de virus hepatitic este solidă și durabilă.

Profilaxie. Depistarea precoce a bolnavilor și izolarea lor precum și o evidență corectă a contactilor și a purtătorilor de virus cu aplicarea unor măsuri adecvate constituie obiective importante în combaterea hepatitei virale.

Prevenirea transmiterii virusurilor hepatitice prin inoculare se face prin controlul

corect al sângelui destinat transfuziilor, folosirea unor seringi de unică întrebuințare și a instrumentarului stomatologic de investigație 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 sanitară 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 hepatitic ADN recombinant preparat din Ag HBs produs de celule de drojdie de bere în care a fost inserată prin inginerie genetică gena subtipului a d w al VHB. De asemenea, în prezent sunt pe cale de realizare și alte vaccinuri împotriva celorlalte tipuri de virus, în special contra VHA. Un anumit grad de protecție poate fi obținut și cu gammaglobulină normală, care însă trebuie aplicată selectiv.

4. VIRUSURILE POLIOMIELITEI

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

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

Virusul poliomieltic are 3 tipuri: 1, 2 și 3. Acestea sunt antigenic distincte și nu dau imunitate încrucișată. Virusul poliomieltic este patogen pentru om și maimuțe. Tipul 2 este patogen și pentru șoarecele nou-născut. Toate cele 3 tipuri de virus poliomieltic pot fi cultivate pe culturi celulare (rinichi de maimuță, HeLa, etc.) producând efecte citopatice caracteristice ce pot fi neutralizate cu seruri imune specifice de tip.

Patogenic. Virusul pătrunde în organism pe cale orală prin mucoasa orofaringiană și a tractului respirator superior. Aici, probabil în celulele sistemului reticuloendotelial, se produce prima multiplicare după care prin intermediul secrețiilor orale pătrunde în tubul digestiv. Din stomac, trece nealterat, nefiind afectat de aciditatea gastrică, în intestinul subțire unde urmează o nouă fază de multiplicare. Majoritatea cazurilor se opresc în această fază clinic inaparentă. Când însă bariera intestinală este depășită se produce stadiul de viremie. În acest stadiu virusul poliomieltic poate fi neutralizat de anticorpii specifici circulanți și evoluția bolii este jugulată sau dimpotrivă virusul poate invada sistemul nervos central și apare boala clinică. Virusul poliomieltic traversează bariera hematomeningeală sau trece prin sinapsa mioneurală și prin cilindraxoni și măduvă ajunge la creier. În sistem nervos

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

Diagnosticul de laborator. Diagnosticul de certitudine se bazează pe izolarea și tipajul virusului poliomieltic la care se adaugă testele serologice.

Pentru izolarea virusului poliomieltic se iau probe din spălături nazofaringiene, din materii fecale, L.C.R. sau țesut nervos (porțiuni de măduva spinării 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 țesut nervos pot fi examinate și din punct de vedere histopatologic. Înainte de a fi inoculate pe culturi de celule, probele trebuie decontaminate de bacterii prin tratare cu antibiotice (penicilină + streptomycină).

Virusul poliomieltic produce efecte citopatice caracteristice. Pentru ca virusul poliomieltic să fie identificat și tipizat se practică neutralizarea specifică a acestor efecte citopatice cu seruri antipoliomieltice monospecifice de tip 1, 2 și 3.

Reacția de seroneutralizare pe culturi de țesut

Proba de virus pe care se efectuează **reacția de neutralizare** pentru identificarea poliovirusurilor este reprezentată de 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 atunci când se folosesc pentru identificare amestecuri de câte 2 seruri, diluția inițială trebuie să fie de 4 ori mai mică decât cea finală recomandată.

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

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

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

Amestecurile se lasă 2 ore la 37°C și peste noapte la +4°C. A doua zi, din martorul de virus și din tuburile cu amestec virus ser, se inoculează câte 2 tuburi cu cultură celulară monostrat (celule renale simiene sau linii celulare susceptibile la enterovirusuri).

La 2 și 6 zile culturile se examinează la microscop, notându-se prezența sau absența

efectului citopatic. Absența efectului citopatic în tuburile inoculate cu unul din amestecurile virus + 2 seruri și în cele inoculate cu amestecurile de virus + 3 seruri, permite identificarea tipului de poliovirus.

Schemă de lucru

Nr. tub	1	2	3	4	5
- ser 1 + 2	0,3ml				
- ser 1 + 3		0,3ml			
- ser 2 + 3			0,3ml		
- ser 1 + 2 + 3				0,3ml	
- diluent					0,3ml
- virus dil. 1/1000	0,3ml	0,3ml	0,3ml	0,3ml	0,3ml

- Inocularea 0,2 ml din fiecare amestec pe câte 2 culturi celulare în tuburi 16/160mm.
- Adăugare 1,8 ml mediu de întreținere în fiecare tub.
- Incubare la 37°C staționar sau în tamburi rotați.
- Examinare la microscop după 2 și 6 zile.

Interpretarea rezultatelor

Amestec ser antipolio tip:				Virus identificat (tip)
1+2+3	2+3	1+3	1+2	
-	+	-	-	polio 1
-	-	+	-	polio 2
-	-	-	+	polio 3
-	-	+	+	polio 2+3
-	+	-	+	polio 1+3
-	+	+	-	polio 1+2
-	+	+	+	polio 1+2+3
+	+	+	+	virus nepoliomielitic

- + : aspect citopatic prezent
- : aspect citopatic absent

Ca teste serologice se folosesc *R.F.C.* și testul de neutralizare. Pentru aceste teste se recoltează seruri-perechi, la începutul bolii și după 2-3 săptămâni.

Diagnosticul se consideră pozitiv când titrul anticorpilor neutralizați sau fixatori de complement cresc de cel puțin 4 ori de la o probă la alta.

Epidemiologie. Poliomielite este răspândită pe întreg globul. Rezervorul de virus este omul bolnav sau purtătorii sănătoși de virus. Agentul patogen se transmite pe cale focal-orală sau pe cale aerogenă, prin contact direct interuman sau indirect prin intermediul alimentelor, apei și obiectelor contaminate, a muștelor etc.

Imunitatea dobândită este solidă și de lungă durată.

Profilaxia bolii se face prin mijloace *nespecifice* ce se impun în cazul bolilor cu poartă de intrare digestivă sau aeriană prezentate în capitele anterioare, precum și prin mijloace *specifice* – **vaccinul poliomieltic trivalent** inactivat prin formol, administrabil parenteral sau **vaccin cu virus viu atenuat** administrabil pe cale orală.

5. VIRUSUL VARIOLIC

Variola, boală infecțioasă extrem de contagioasă al cărui agent etiologic este virusul variolic, a provocat timp de milenii epidemii care au decimat omenirea. Acest flagel este acum de domeniul trecutului, ultimul caz de variolă fiind înregistrat în 1977 în Somalia. În anul 1980 Organizația Mondială a Sănătății a declarat eradicarea definitivă a variolei de pe glob.

Virusul variolic face parte din familia *Poxviridae*, genul *Orthopoxvirus*. Este un virus ADN, mare de 250-300 mμ. Poate fi cultivat pe membrana chorioalantoidiană a oului embrionat pe care formează colonii albe-cenușii. În celulele infectate cu virus apar incluzii intracitoplasmice caracteristice cunoscute sub numele de *corpuculi Guarnieri*. Virusul este patogen numai pentru om și maimuță.

În prezent virusul variolic nu se mai găsește decât în colecțiile microbiene ale SUA și Rusia.

Până la dispariția bolii prevenirea ei s-a făcut cu mare eficacitate prin **vaccinare antivariolică**. Această vaccinare a fost primul procedeu de imunizare activă cunoscut și utilizat încă din antichitate de chinezi.

Imunitatea împotriva virusului variolic se face cu **virus Vaccinia** care are o patogenitate redusă pentru om și o structură antigenică înrudită cu aceea a virusului variolic. Protecția împotriva variolei se explică prin faptul că cele două virusuri dau reacții imunologice încrucișate.

6. VIRUSUL RUJEOLEI

Rujeola este o boală acută infecțioasă, extrem de contagioasă provocată de virusul rujeolic. Din punct de vedere clinic boala se caracterizează prin manifestări catarale respiratorii, un enantem bucal și o erupție maculo-papuloasă particulară.

Virusul rujeolic face parte din familia *Paramixoviridae* genul *Morbillivirus*. Este

un virus cu diametru de 140 mμ. Este format dintr-o nucleocapsidă cu ARN și un înveliș constituit din lipide, glicoproteine și polipeptide. Antigenul care participă la RFC este prezent în nucleocapsidă iar infectivitatea, capacitatea de hemaglutinare și hemoliză țin de stratul extern. Există un singur tip antigenic.

Virusul rujeolic este inactivat prin căldură (o oră la 56°C), radiații U.V., formol.

Patogenie. Virusul pătrunde în organism pe cale respiratorie prin mucoasa nazofaringiană și conjunctivală. Se multiplică în țesuturile limfoide după care se răspândește pe cale sanguină în tot organismul. În formele severe de boală apar fenomene de imunosupresie cu scăderea numărului de limfocite T și B. Imunitatea dobândită după boală sau vaccinare durează practic toată viața.

Diagnosticul de laborator. Diagnosticul rujeolei se pune destul de ușor dacă avem date epidemiologice (sezon rece, mediu epidemic) și o simptomatologie clinică caracteristică (catar ocular și al căilor aeriene superioare, enantem, erupție maculopapuloasă).

Izolarea virusului din sânge sau exsudat nazofaringian se poate face pe culturi de țesuturi pe care apar plaje caracteristice, dar tehnica nu este de uz curent.

Reacțiile serologice care permit de asemenea un diagnostic de laborator sigur sunt: reacția de hemaglutinoinhibare, RFC, reacția de neutralizare, ELISA și imunofluorescența.

Creșterea rapidă și progresivă a titrului specific al anticorpilor, care începe odată cu apariția erupției, în probele recoltate la debut și după 7 și 14 zile, se înregistrează în toate cazurile de rujeolă.

Epidemiologie. Rujeola este o boală endemo-epidemică care apare în valuri epidemice la intervale de 2-3 ani.

Sursa de infecție este constituită exclusiv de omul bolnav.

Transmiterea bolii se face în general direct, pe cale aerogenă prin picăturile din secreția nazofaringiană și numai rareori indirect prin intermediul unor obiecte recent contaminate de bolnav.

Receptivitatea la boală este generală dar, după îmbolnăvire, imunitatea este puternică și durează toată viața.

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

Pentru protecție, în cazuri speciale se pot utiliza și imunoglobuline umane specifice anti-rujeolă.

7. VIRUSUL IMUNODEFICIENȚEI UMANE (HIV)

SIDA (AIDS = Acquired Immune Deficiency Syndrom) constituie cel de-al patrulea stadiu, și ultimul, al evoluției infecției cu virusul imunodeficienței umane HIV = Human Immunodeficiency Virus), ce se caracterizează prin depresie imună

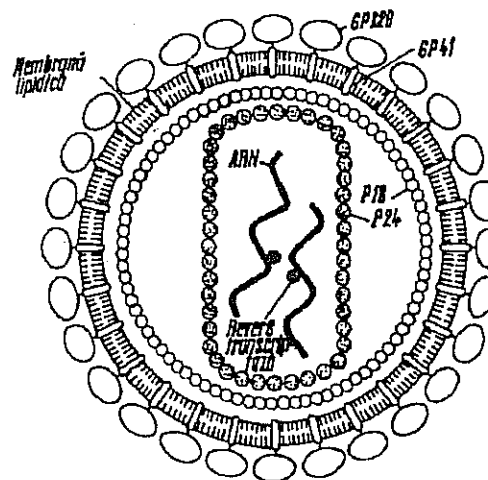


Fig.26 Virusul imunodeficienței umane (schematic).

ARN viral și reverstranscriptaza.

Tulburările răspunsului imun în infecția cu HIV derivă din distrugerea selectivă a limfocitelor T4, care joacă un rol principal în reglarea imunității.

Diagnosticul etiologic al SIDA necesită detectarea anticorpilor față de virus sau structurile sale antigenice și/sau detectarea virusului sau a antigenelor virale.

În acest scop se utilizează o serie de teste de laborator care:

- detectează anticorpii anti-HIV și anticorpii neutralizanți;
- detectează antigenele virale, ARN-ul viral;
- permit izolarea virusului.

În practică, **testul serologic ELISA** (Enzyme-Linked Immunoabsorbant Assay) este cel mai frecvent utilizat. El folosește ca antigen lizatul viral total și pune în evidență anticorpii specifici din serul de cercetat. Acest test nu este suficient de specific, putând da rezultate fals pozitive sau fals negative, deoarece antigenul brut menționat conține și fracțiuni antigenice ale 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 sângelui și al preparatelor de sânge, precum și pentru controlul grupelor de risc. Confirmarea, însă, a cazurilor individuale de infecție detectate prin testul ELISA este acceptată numai după obținerea unui nou rezultat pozitiv cu o altă trusă ELISA, de concepție diferită și efectuarea unui test de confirmare: Western Blot, imunofluorescență sau imunoprecipitare. Dintre acestea din urmă, cel mai utilizat este testul Western Blot. Acest test se bazează pe punerea în contact a serului de cercetat cu antigene HIV purificate, separate prin electroforeză, transferate pe hârtie de

majoră, acutizarea infecțiilor virale, bacteriene, parazitare, fungice și a tumorilor cu evoluție invariabilă spre deces în cel mult 2 ani la adulți și mai puțin de 1 an la copii.

Etiologia bolii a fost stabilită de francezul Luc Montagnier (1983) și americanul Robert Gallo (1984).

Virusul imunodeficienței umane (HIV) face parte din clasa retrovirusurilor, a căror denumire decurge din faptul că aceste virusuri ARN posedă o enzimă (reverstranscriptaza) capabilă să transforme ARN-ul în ADN. Există două tipuri: HIV-1 și HIV-2.

Virusul are un diametru de 100mμ. La suprafață prezintă un înveliș glicoproteic lipidic. Partea centrală este alcătuită din proteine,

nitroceluloză, și incubate. Anticorpii care se fixează pe polipeptidele virale separate prin electroforeză sunt puși în evidență printr-o nouă incubare cu anticorpi antigammaglobulină umană, conjugați cu o enzimă marker, care va acționa pe un substrat enzimatic.

Serurile în care au fost detectați anticorpi specifici pentru componentele virale cunoscute (centrale sau de înveliș) sunt considerate pozitive. De menționat că serurile cu anticorpi nespecifici dau reacții negative.

În general, rezultatele explorărilor de laborator pot confirma sau infirma diagnosticul de SIDA, dar în unele situații pot fi neconcludente. Sunt neconcludente rezultatele testelor de laborator atunci când s-au obținut rezultate pozitive în mod repetat cu un test ELISA, dar acestea sunt negative sau neconcludente prin testul Western Blot, imunofluorescență, culturi sau detectare de antigene.

De asemenea, sunt neconcludente rezultatele în situația în care serul unui copil mai mic de 15 luni născut dintr-o mamă seropozitivă este în mod repetat pozitiv la testul ELISA și chiar prin testul Western Blot, dar nu prezintă tulburări imunitare sau are un rezultat negativ pentru antigene sau culturi.

Epidemiologia infecției cu virusul imunodeficienței umane

Pe baza ultimelor date cunoscute de O.M.S., răspândirea infecției cu HIV se accelerează în mod dramatic, astfel că, spre sfârșitul anului 1991, numărul persoanelor infectate se ridică la circa 10 milioane de oameni. La sfârșitul acestui mileniu se prelină 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 femeilor și copiilor, dacă măsurile de prevenție și cele terapeutice nu vor înregistra salturi spectaculoase.

În țara noastră, la sfârșitul lunii decembrie 1992, erau înregistrate 2235 cazuri de SIDA, din care 1300 la sexul masculin. În grupa de vârstă până la un an au fost înregistrate 471 de cazuri, respectiv 21,1%. S-a constatat că la adulți calea de transmitere este predominant heterosexuale, o statistică arătând că, în 50% din cazuri, îmbolnăvirea se datorează contactelor cu parteneri multipli, iar în 22% contactelor cu partener pozitiv.

Sursa de infecție este reprezentată de omul infectat, boala evoluând cronic și invariabil către deces.

Principalele **căi de transmitere a infecției** sunt:

a) **inoculare de sânge** prin:

- transfuzii de sânge sau preparate de sânge;
- înțepături cu acul, plăgi deschise, expunerea mucoaselor la contactul cu sânge;
- injecții cu ace și/sau seringi nesterilizate.

b) **sexuală**:

- homosexuală;
- heterosexuale.

c) **de la mama infectată la făt.**

Transmiterea infecției prin înțepături de insecte, salivă, utilizarea în comun a unor tacâmuri sau veselă nu a fost demonstrată.

Receptivitatea la infecție nu este suficient de bine cunoscută.

Tratamentul. SIDA nu beneficiază până în prezent de o medicație eficace.

Prevenirea și combaterea infecției cu HIV

Ținând 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 încadrate într-un sistem organizat de supraveghere epidemiologică grupele cu risc crescut de infectare și de transmitere a infecției. Din această categorie fac parte:

- contactii sexuali ai cazurilor de SIDA și ai celor HIV pozitivi asimptomatici, identificați prin anchetă epidemiologică;
- persoanele cu comportament sexual modificat (homosexuali, prostituate);
- persoanele cu boli transmisibile sexual, aflate în evidența secțiilor dermato-venereice;
- persoanele care vin din țări străine cu risc de infecție crescut.

Se vor efectua anchete epidemiologice sistematice.

Se va face testarea clinico-epidemiologică și serologică a donatorilor de sânge, gravidelor și tinerilor înainte de căsătorie.

De asemenea, vor fi inițiate acțiuni de educație sanitară în special în licee și alte instituții de tineret.

Măsuri de protecție a personalului de laborator

- Personalul care manipulează produse patologice și materiale cu potențial infecțios va purta în mod obligatoriu 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 dezinfectate.

- 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. NOȚIUNI GENERALE DE PARAZITOLOGIE

1. PARAZITISM ȘI RELAȚIILE PARAZIT GAZDĂ

În secolele trecute, paraziții erau priviți ca o grupă de viețuitoare cu totul izolată și se atribuia apariției lor un sens misterios, socotindu-i ca "generații spontane". Odată cu includerea paraziților în sistemul general al lumii animale, a apărut necesitatea de a se defini paraziții și știința care se ocupă cu studiul lor.

Parazitologia este știința care se ocupă cu studiul morfologiei și biologiei paraziților, precizând relațiile care se stabilesc între paraziți și gazdele lor. Prin obiectul său, parazitologia este o ramură a biologiei generale.

Ca și multe alte viețuitoare, și organismul uman poate găzdui numeroși paraziți. Studiul acestor paraziți, al tulburărilor produse de ei în organismul uman parazitat, epidemiologia, terapia și combaterea lor constituie, în ansamblu, **parazitologia medicală**.

Pentru a putea înțelege ce reprezintă parazitologia, trebuie precizat, în primul rând, ce reprezintă un *parazit* și ce se înțelege prin *parazitism*:

– *parazitul* este o ființă de natură vegetală sau animală care trăiește temporar sau definitiv pe seama altei ființe vegetale sau animale, 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 asociație biologică particulară între doi factori, în care unul oferă locuință și hrană și reprezintă organismul-gazdă, iar celălalt este cel care folosește organismul-gazdă pentru a trăi, și reprezintă parazitul.

– *gazda* este, deci, ființa pe seama căreia trăiește parazitul, iar *parazitul*, ființa care trăiește pe seama gazdei. Viețuitoarele astăzi parazite nu au fost însă dintotdeauna parazite. Ele descind filogenetic din ființe ce duceau în trecut o viață liberă și care, ajunse accidental în organismele astăzi gazdă, s-au adaptat la noi condiții de viață. Astfel, parazitismul, la început accidental, s-a 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:

– *Saprotitismul* reprezintă primul pas spre viața parazitară. Saprofitele se împart în *saprotite propriu-zise* (bacterii, ciuperci ș.a.) și *saprozoice* – organisme care se dezvoltă pe substanțe de descompunere (larvele diferitelor specii de muște).

– *Comensalismul* reprezintă un mod de viață a două ființe în care una trage foloase (prisos de hrană, protecție, locuință) de pe urma celei de-a doua (gazda), care nu este cu nimic vătămată.

– *Mutualismul* reprezintă o asociație biologică mai strânsă între două ființe, deoarece în acest caz ambii indivizi își aduc servicii reciproce.

– *Simbioza* reprezintă raportul biologic cel mai strâns dintre doi indivizi, care în acest caz vor alcătui o adevărată unitate biologică.

– *Parazitismul adevărat* este caracterizat prin faptul că gazda suferă din cauza parazitului, care se hrănește și se dezvoltă pe seama sa. Acesta "atacă" lent, dar continuu, gazda, sfârșind deseori prin a o distruge.

Pe lângă paraziții obișnuiți, care trăiesc pe seama unui organism-gazdă, există cazuri în care paraziții bine hrăniți și bogați în substanțe nutritive de rezervă devin, la rândul lor, surse pentru obținerea hranei pentru alți paraziți mai mici. Acești paraziți ai paraziților se numesc *hiperparaziți*.

Relațiile care se stabilesc între o gazdă și un parazit pot fi, în general de trei feluri:

– acțiunea parazitului asupra gazdei poate depăși puterea de apărare a gazdei, care se îmbolnăvește și poate muri;

– acțiunea parazitului asupra gazdei este mai redusă în raport cu capacitatea de apărare a acesteia, care rămâne sănătoasă, rezistând agresivității parazitare;

– acțiunea parazitului asupra gazdei este slabă și, treptat, organismul-gazdă elimină parazitul.

2. CĂILE DE CIRCULAȚIE A PARAZIȚILOR ÎN NATURĂ. RĂSPÂNDIREA GEOGRAFICĂ A PARAZIȚILOR.

2.1. CĂILE DE CIRCULAȚIE A PARAZIȚILOR ÎN NATURĂ

Perpetuarea speciei la un parazit este asigurată în natură prin căile de circulație de la o gazdă la alta, iar întreruperea acestora împiedică desăvârșirea ciclului biologic. Circulația paraziților nu este asemănătoare, ea prezentând diferențe importante de la un grup de paraziți la altul sau chiar de la o specie la alta.

Relativ simplă la unii paraziți, la care transmiterea se face direct de la organismul-gazdă infectat la organismul-gazdă sănătos receptiv, ea devine din ce în ce mai complicată la paraziții al căror ciclu evolutiv reclamă un stagiul în sol, sau extrem de complicată la paraziții care își desăvârșesc ciclul biologic în una-două gazde intermediare.

Sistematizând căile de circulație a paraziților în natură, se pot deosebi:

Parazitozele transmisibile direct (contagioase) la care ouăle, larvele, formele chistice 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 alta sau prin intermediul variațiilor factori de mediu, care au simplul rol de a le vehicula.

Parazitozele transmisibile indirect:

– *prin sol și apă* se transmit parazitozele în care ouăle sau larvele parazitului,

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

Circulația paraziților în natură nu se limitează însă numai la om și animale domestice. Pe lângă această circulație, care este cunoscută sub numele de *focar peridomestic* sau *sinantrop*, mai există și circuite biologice ale paraziților cu mai multe gazde definitive și cu gazde intermediare reprezentate de animale sălbatice (*focare naturale*).

2.2. RĂSPÂNDIREA GEOGRAFICĂ A PARAZIȚILOR

Circulația paraziților în natură depinde de **prezența parazitului, de prezența gazdelor intermediare și de prezența condițiilor de mediu fizic extern**, care asigură realizarea legăturii între paraziți și gazdele lor. Există, în felul acesta, parazitoze de importanță mondială, care sunt răspândite pe aproape întreaga suprafață a globului unde se găsesc întrunite condițiile de răspândire (*ascaridoza, hidatidoza, oxiuroza*), după cum există parazitoze de importanță strict locală, în care existența în anumite teritorii a gazdelor intermediare sau a vectorilor limitează răspândirea parazitozelor ca, de exemplu, *botriocefaloza* în deltele unor fluvii, *malaria* între 60° latitudine nordică și 40° latitudine sudică sau *anchilostomiaza*, a cărei răspândire în zonele temperate este condiționată de prezența unor condiții speciale, care se întâlnesc numai în unele mine de cărbuni. În mod asemănător, condițiile de mediu fizic extern, obiceiurile populației, grupele de vârste și altele pot limita răspândirea unor parazitoze. Astfel, absența *ascaridozei* în zonele polare este datorată imposibilității dezvoltării în sol a elementelor infectante, din cauza frigului.

Stabilirea ariilor geografice de răspândire a parazitozelor și cunoașterea căilor de transmitere sunt extrem de importante, ele stând la baza organizării măsurilor de prevenire și combatere a tuturor bolilor parazitare.

Cap.XXVIII. PROTOZOLOGIE

1. CARACTERE GENERALE, CLASIFICARE

Încręgătura 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, prevenire și combatere a lor.

Așa cum s-a arătat, protozoarele sunt ființe al căror organism este constituit dintr-o singură celulă, având toate funcțiile necesare existenței și perpetuării speciei. Această celulă, care reprezintă protozoarul, este formată dintr-o masă protoplasmatică, un nucleu, o membrană de înveliș și, uneori, atunci când mișcarea sa nu este amoeboidă, 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 îmbracă așa-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 (uscăciune, temperatură scăzută etc.), forma vegetativă își protejează corpul cu o membrană mai rezistentă de înveliș, se transformă în *formă chistică*. În interior, își adună rezerve nutritive și duc o viață latentă până în momentul în care se întâlnesc din nou condiții prielnice de viață. Atunci își reiau forma de *viață vegetativă*.

Din protozoarele libere, în decursul timpului, unele s-au adaptat parțial sau total la una din mai multe gazde animale, devenind 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 intermediară pentru a trece din organismul-gazdă infectat într-un alt organism sănătos. Acestea nu se mai închistează, însă deseori gazda intermediară reprezintă o etapă obligatorie în ciclul evolutiv al protozoarului.

Protozoarele importante din punct de vedere medical sunt separate în patru mari clase (fig.27).

Clasa rhizopode cuprinde protozoare fără membrană de înveliș, cu un contur în continuă schimbare. Ele se mișcă și se hrănesc cu ajutorul pseudopodelor, care se formează în diverse părți ale corpului. Exemplu: *Entamoeba dysenteriae*.

Clasa flagelatelor se caracterizează printr-o formă definită a corpului și prin modul de locomoție și de aducere a particulelor nutritive, cu ajutorul flagelilor. Exemplu: *Lambliia intestinalis*.

Clasa sporozoarelor se caracterizează prin modul particular de înmulțire sexuată, urmată de elaborare de spori și prin faptul că sunt cel puțin o parte din viața lor parazite intracelular. Exemplu de sporozoar este *hematozoarul palustru*.

Clasa ciliatelor (sau a infuzorilor) include indivizi care au o membrană de înveliș bine dezvoltată, acoperită în parte sau în totalitate cu cili vibratili. Exemplu: *Balantidium coli*.

2. CLASA RHIZOPODE

Clasa rhizopodelor reunește acele protozoare cu corp lipsit de membrană celulară, care emit pseudopode cu ajutorul cărora se deplasează și se înglobează particulele alimentare. Rhizopodele parazite ale organismului uman fac parte din ordinul amibelor și pot îmbrăca atât forma vegetativă, cât și forma chistică. Se

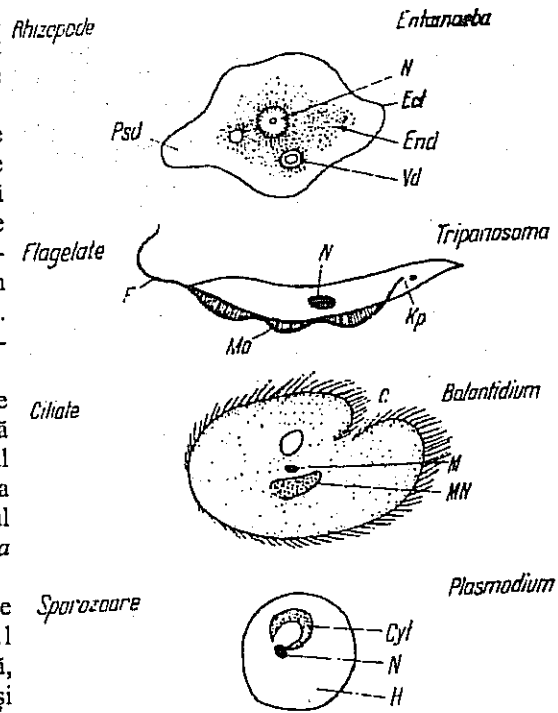


Fig. 27. Tipuri de protozoare:
N - nucleu; Ect - ectoplasmă; End - endoplasmă;
C - citostom; Cyl - citoplasmă; Psd - pseudopod;
Vd - vacuolă; Kp - kinetoplast; Mo - membrană
ondulată; F - flagel; M - micronucleu; MN -
macronucleu; H - hematie.

înmulțesc prin diviziune directă binară în viața vegetativă și prin diviziune multiplă în formele chistice.

2.1. AMIBELE

Amibele care parazitează organismul uman fac parte din patru genuri, cele mai importante în parazitologia medicală fiind amibele din genul *Entamoeba*, cu specia *Entamoeba histolytica*, care produce dizenteria amibiană.

Amiba este o ființă microscopică cu corpul format dintr-o singură celulă (fig. 28). Forma corpului este neconținut modificată prin producerea de pseudopode (false picioare) (1), reprezentate de prelungiri temporare ale protoplasmei cu ajutorul cărora animalul se mișcă și se hrănește.

Acest parazit unicelular are corpul format din nucleu (9) și protoplasmă.

Protoplasma, la o amibă, este de două feluri; o pătură de protoplasmă externă, hialină, numită și *ectoplasmă* (7) (*ecto* = în afară) și un strat de protoplasmă centrală, granulat, numit *endoplasmă* (*endo* = înăuntru) (4).

Nucleul se găsește în endoplasmă, fără însă a avea o poziție stabilă, din cauza neconținutului mișcării de formă ale corpului amibei în cursul deplasării. Nucleul unei amibe este format dintr-o membrană nucleară, cu mici grămezi de cromatină dispuse pe fața sa internă și dintr-o masă de cromatină centrală.

- **Hrănirea** unei amibe se face tot prin pseudopode: un pseudopod venind în contact cu o particulă alimentară o înconjoară din toate părțile și se închide în spatele ei, incluzând-o în masa protoplasmei. Se constituie, astfel, o vacuolă denumită "vacuolă digestivă" (8), în care secrețiile elaborate de protoplasmă (endoplasmă) se adună, digerând particula de hrană înglobată, asimilând în citoplasmă substanțele nutritive și lăsând în vacuolă resturile nedigerabile. Vacuola digestivă devine,

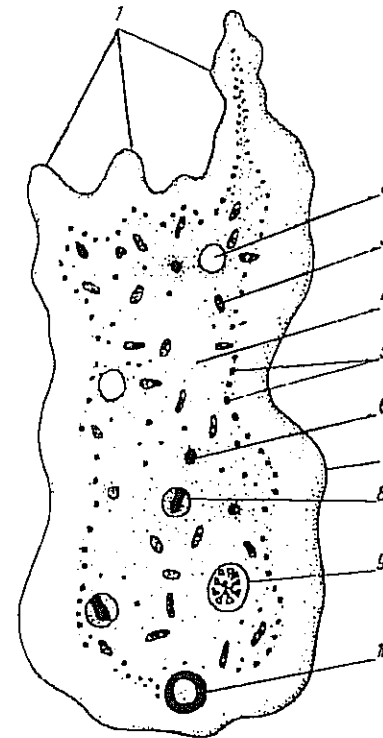


Fig. 28. Amiba
1 - pseudopode; 2 - vacuole cu gaze; 3 - vezicule
de excepție; 4 - endoplasmă; 5 - granulații ele-
mentare; 6 - globule grăsoase; 7 - ectoplasmă;
8 - vacuole digestive; 9 - nucleu; 10 - vacuolă
pulsatilă.

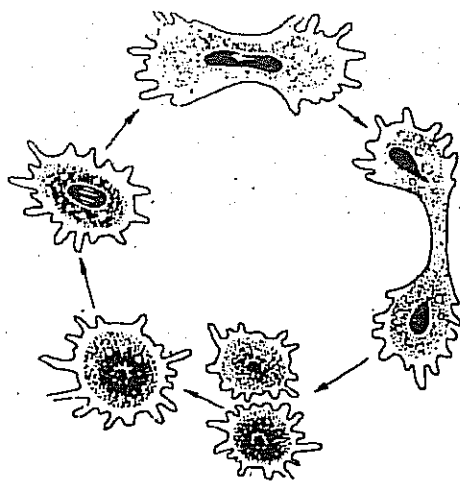


Fig. 29. Reproducerea unei amibe.

astfel, o vacuolă excretoare (3), din care resturile nedigerate sunt eliminate la exterior.

- **Respirația** amibe se face pe toată suprafața corpului, iar apa necesară vieții este absorbită din mediul înconjurător.

- **Înmulțirea** se face prin diviziune directă (fig. 29), iar în condiții nefavorabile (uscăciune) amibe se închistează, formându-și un înveliș care le izolează de mediul înconjurător (fig. 30).

În interiorul chistului parazitul trăiește o viață latentă în așteptarea condițiilor favorabile pentru viața în forma vegetativă. Tot în interiorul chistului nucleul se divide de două ori, rezultând 4 sau 8 nuclee, iar când chistul va ajunge în tubul digestiv al unei noi gazde se va rupe și din el vor ieși un număr corespunzător de amibe mici care vor relua ciclul biologic.

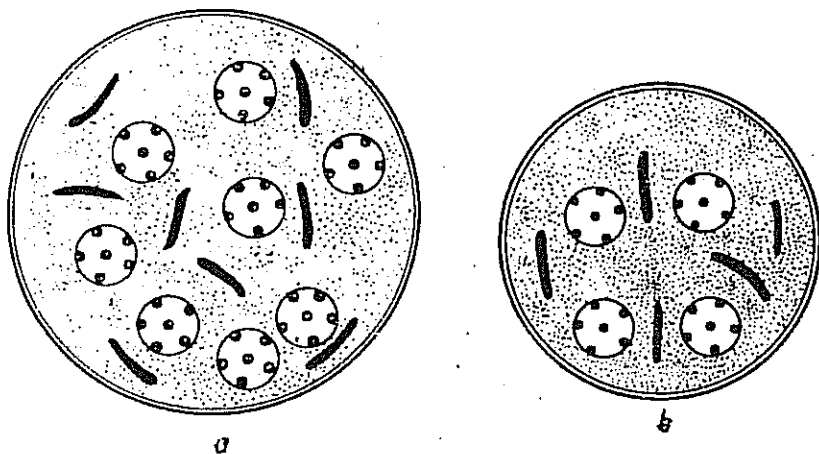


Fig. 30. Chist de:
a - *Entamoeba coli*; b - *Entamoeba histolytica*.

2.2. DIZENTERIA AMIBIANĂ

Entamoeba histolytica este un parazit al intestinului gros al omului, care produce boala denumită dizenterie amibiană.

Caracterele morfologice ale parazitului. Forma vegetativă a acestei amibe măsoară, în medie, 30-40 μ și are o ectoplasmă refingentă, net delimitată de o endoplasmă abundentă. Ectoplasma elaborează pseudopodele care conferă amibei o mobilitate accentuată, asigurând deplasarea parazitului, de regulă într-o singură direcție.

În intestin, forma vegetativă de *Entamoeba histolytica* se poate găsi în două stadii: forma *minuta*, nepatogenă și forma *magna* patogenă.

Forma chistică. Chisturile se produc numai din forma minuta. Chistul format este rotund, învelit cu o membrană dublă. În interior conține 4 nuclee.

Ciclul biologic al parazitului este simplu: purtătorul elimină o dată cu fecalele chisturi care, ajunse, de exemplu, în apă, vor putea fi ingerate de om, care se va îmbolnăvi.

Răspândirea geografică. Boala este răspândită cu precădere în zonele tropicale, însă în ultimii ani încep să fie semnalate din ce în ce mai numeroase cazuri și în zone cu climat temperat.

Patogenia. Ambele atacă peretele intestinal pe care îl distrug, pătrund în submucoasă, unde se înmulțesc masiv, formând o pungă cu puroi în profunzimea peretelui intestinal. Prin activarea amibeilor care distrug mereu țesuturile din peretele abcesului, punga se mărește formând o ulceratie întinsă în suprafață și profundă, care se întinde continuu, putând produce multiple perforații intestinale.

Aspectul clinic este al unei diaree mucosanguinolente de 5-6 scaune pe zi, însoțite de dureri la defecație, tenesme, febră. Bolnavul prezintă o stare de intoxicație și deshidratare din ce în ce mai gravă. Pot surveni complicații ca: perforații intestinale, abcese la distanță - de cele mai deseori în ficat sau chiar în plămân, care agravează evoluția bolii și deseori pun în pericol viața bolnavului.

Epidemiologie. Omul poate fi considerat drept cel mai important rezervor de parazit, dar în transmiterea bolii mai pot fi incriminate și unele animale, câinele și pisica, și unele insecte: musca sau gândacul de bucătărie, ultimele având numai rol de vector mecanic.

Transmisivitatea bolii se realizează indirect prin apă sau alimentele poluate, iar calea de pătrundere a parazitului este digestivă.

Incubația variază între 2 săptămâni și 3 luni, amibiaza afectând în mod egal toate grupele de vârstă.

Boala este răspândită cu precădere în zonele tropicale, însă în ultimii ani sunt semnalate din ce în ce mai multe cazuri indigene în regiuni cu climat temperat.

Diagnosticul de laborator se bazează pe:

- *evidențierea formelor vegetative* din scaune diareice proaspete, examinate imediat după emisie la 37°C;

– evidențierea formei chistice caracteristică în fecalele purtătorilor sănătoși prin examen coproparazitologic;

– coproculturi pe mediul Simici.

Tratamentul se face cu Emetină sau cu medicamente de tip Metronidazol.

Profilaxia bolii cuprinde măsuri pentru depistarea tuturor purtătorilor, care vor fi izolați și tratați până la sterilizare, deoarece aceștia, în special purtătorii sănătoși, reprezintă cea mai importantă sursă de împrăștiere a bolii. Paralel se iau măsuri pentru dezinfecția permanentă a closetelor, a surselor de apă, consumarea de apă fiartă în zonele epidemice, spălarea atentă a legumelor și fructelor, igiena personală, în special a mâinilor și dezmuștizarea, muștele vehiculând chisturile de la latrină în casă.

3. CLASA FLAGELATE

Flagelatele grupează protozoare care folosesc pentru deplasare unul sau mai mulți flageli în diferite zone ale corpului, care se reproduc asexuat, au corpul orientat astfel încât deosebim o zonă anterioară și una posterioară și doi nuciei, un nucleu mare pentru funcții vegetative și un nucleu mai mic așezat, de regulă, în zona anterioară, cu funcții de mișcare.

În general, corpul unui flagelat este alungit în formă de pară, cu extremitatea anterioară mai umflată și cu extremitatea posterioară mai efilită. La exterior, fără a avea o membrană celulară, corpul parazitului este învelit de o îngroșare a protoplasmului numită *periplast*. Protoplasma, care la amibe era împărțită în ecto- și endoplasmă, este unică, cu o structură fin granulată. În masa protoplasmatică se găsesc vacuole digestive și o serie de organe. Nucleul parazitului situat, de regulă, în centrul corpului, este format din masă cromatiniană, dispusă în centrul nucleului. Pe lângă acest nucleu mare cu funcții de dirijare a vieții vegetative (asimilare, dezasimilare, reproducere), parazitul mai posedă un al doilea nucleu: *chinetonucleu* sau *chinetoplast*, care este locul de inserție a flagelului. Modul de hrană la flagelate diferă considerabil de modul de hrană al rhizopodelor. La flagelate particulele alimentare sunt aduse, de regulă, prin curenții creați de flageli la nivelul unui *orificiu citostomial*, așezat în zona anterioară a corpului parazitului, pe unde hrana este introdusă în masa citoplasmatică spre a fi digerată.

Reproducerea la acești paraziți se face prin diviziune directă binară longitudinală și cu mult mai rar prin diviziune multiplă.

Dintre flagelatele patogene pentru om, cele care parazitează tubul digestiv sau aparatul urogenital folosesc o singură gazdă (paraziți monoxeni) în ciclul lor evolutiv. Cu excepția trichomonadinelor, prezintă forme chistice de rezistență la condițiile nefavorabile de mediu.

Alte flagelate patogene pentru om prezintă un grad de parazitism mai accentuat, evoluând în sângele sau țesuturile organismului uman care le găzduiește. Ele nu pot părași aceste țesuturi și transmiterea lor este asigurată prin intermediul unei a doua

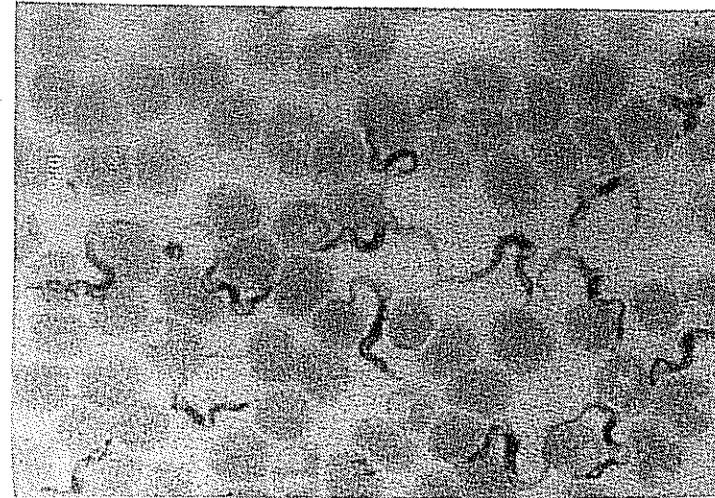


Fig. 31. Frotiu din sânge periferic la un bolnav infectat cu *Trypanosoma cruzi*.

gazde nevertebrate, care ia paraziții de la omul bolnav și îi inoculează omului sănătos. Acești paraziți sunt numiți "digenetici".

Flagelatele studiate în parazitologia medicală fac parte din două mari ordine: ordinul *Protomonadidae* și ordinul *Diplomonadidae*.

Ordinul *Protomonadidae* cuprinde flagelatele asimetrice, cu un singur nucleu și flageli puțini. Dintre acestea, *Familia Trypanosomidae* (fig. 31) cuprinde flagelate cu un singur flagel, paraziți ai sângelui și țesuturilor, iar *Familia Trichomonidae* cuprinde flagelate monogenetice, care parazitează cavitățile naturale ale organismului, de unde și numele de flagelate cavitare.

Ordinul *Diplomonadidae* cuprinde flagelate cavitare cu doi nuciei și simetrie bilaterală. Dintre acestea, *Familia Octomitidae* (cu 8 flageli) cuprinde o specie cu rol important în medicină – *Lamblia* sau *Giardia intestinalis*.

3.1. FAMILIA TRICHOMONIDAE

Această familie cuprinde flagelate, în general, cu corp asimetric, foarte mobil, prelungit cu 3-5 flageli, din care unul este recurent, constituind o membrană ondulantă. Au un axostil care depășește extremitatea posterioară a corpului, o coastă de întărire și 2 nuciei (vegetativ și chinetoplast). La aceste flagelate nu se cunosc încă formele chistice care să faciliteze transmiterea.

Trei specii ale acestei familii sunt paraziți ai organismului uman: *Trichomonas elongata* sau *buccalis*, parazit al cavității bucale, *Trichomonas intestinalis*, parazit ai

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 carii dentare, cripte amigdalare la aproape 20% din populație. Parazitul este mai răspândit la copii și la persoane cu afecțiuni dentare. Transmiterea se realizează prin contact direct, picături de salivă, pahar etc.

Trichomonas intestinalis este un flagelat de formă asemănătoare cu primul, dar puțin mai mare (10 - 20 μ lungime) (fig. 32, b). Parazitul este localizat la om în zona ileocecală, de unde invadează intestinul gros și subțire, producând enterocolita trichomonazică. Bolnavii au 3-4 scaune pe zi, cu caracter de putrefacție, însoțite de dureri abdominale și tenesme.

Boala este destul de frecventă și, după cercetările din țara noastră, ea poate fi întâlnită mai rar la adulți și mai frecvent la 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 parazitii.

Diagnosticul bolii se face evidențiind parazitul prin examenul microscopic al materiilor fecale proaspăt emise sau prin coproculturi, pe mediul Simici. Tratamentul se face cu Metronidazol.

Trichomonas vaginalis este cel mai patogen dintre cele trei specii care parazitează organismul uman. Parazitul este ovalar sau piriform, lung de 10-30 μ, prezentând 3 până la 5 flageli liberi și o membrană ondulată care depășește extremitatea posterioară a corpului parazitului (fig. 32 c, d). Are un nucleu oval, așezat mai mult spre polul anterior, un chinetoplast, loc de inserție al flagelilor, un axostil și o coastă de întărire a corpului. Ca și celelalte două specii parazite ale organismului uman, nici *Trichomonas vaginalis* nu posedă sau, mai exact, nu i s-au descris încă forme chistice, transmiterea realizându-se direct prin forme vegetative de la omul bolnav la omul sănătos, prin raport sexual.

Trichomonaza

Parazitul se localizează, de regulă, la femei în cavitatea vaginală, de unde poate invada secundar aparatul urinar. Considerată în zilele noastre ca o boală venerică, trichomonaza vaginală se transmite de la femei la bărbați, unde parazitul se cantonează în prostată și de unde va fi eliminat odată cu lichidul prostatic, reînfectând femeia.

Rolul patogen al parazitului constă în iritația puternică a mucoaselor, deoarece atacă celulele epitelului vaginal pentru a utiliza glicogenul ce îl conțin. Leziunile produse sunt la început superficiale, apoi profunde, realizând ulceratii și zone echimotice mai frecvente în fundul de sac posterior al cavității vaginale, dar care pot cuprinde uneori întreaga mucoasă vaginală, colul uterin, apoi vezica urinară. Femeia bolnavă prezintă o secreție vaginală albă, spumoasă, destul de abundentă, cu prurit și arsuri vaginale, iar în cazul invadării uretrei, arsuri și tulburări de micțiune.

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

Epidemiologie. Omul este singurul transmitător al bolii. Transmisiunea se realizează direct pe cale veneriană (prin contact sexual) și mai rar indirect prin intermediul obiectelor contaminate.

Incubația bolii este scurtă, de 3-7 zile, iar boala este răspândită pe întregul glob, cu o frecvență mai ridicată la grupa de vârstă 18-35 de ani, pentru ambele sexe.

Diagnosticul bolii, de suspiciune prin manifestările clinice, este precizat de laborator prin evidențierea parazitului în secreția bolnavului.

Metodele de diagnostic atât pentru femeie, cât și pentru bărbat, sunt:

- *examenul direct* între lamă și lamelă a secreției emulsionate cu ser fiziologic cald (37°C), efectuat imediat după recoltare, în care se evidențiază parazitii cu ușurință, prin mișcărilor lor caracteristice;

- *examenul secreției colorate* după metoda May-Grünwald-Giemsa;

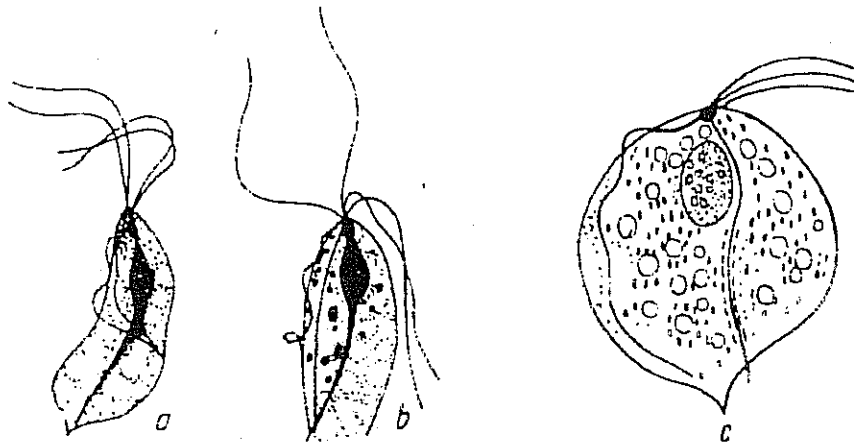


Fig. 32. *Trichomonas*:
a - *T. buccalis*; b - *T. intestinalis*; c și
d - *T. vaginalis* (imagine la microscop).

- examenul prin culturi pe medii artificiale care permite, cu cel mai ridicat coeficient de certitudine, precizarea diagnosticului.

Tratamentul bolii constă în administrarea concomitentă de medicamente, atât soțului, cât și soției, sub control medical, completat cu controale de laborator după cei mult două cicluri menstruale la femeie și la o lună la bărbat. Dintre medicamentele cu cea mai mare eficiență fac parte produsele de tip Metronidazol sau Tinidazol.

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

3.2. FAMILIA OCTIMIDAE

Familia Octimidae cuprinde flagelate cu simetrie bilaterală a corpului: 2 nucie: și 8 flageli.

Din genul *Giardia*, în parazitologia 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 de chist.

Forma vegetativă (trofozoit) este piriformă, cu o lungime de 10-12 μ și o lățime

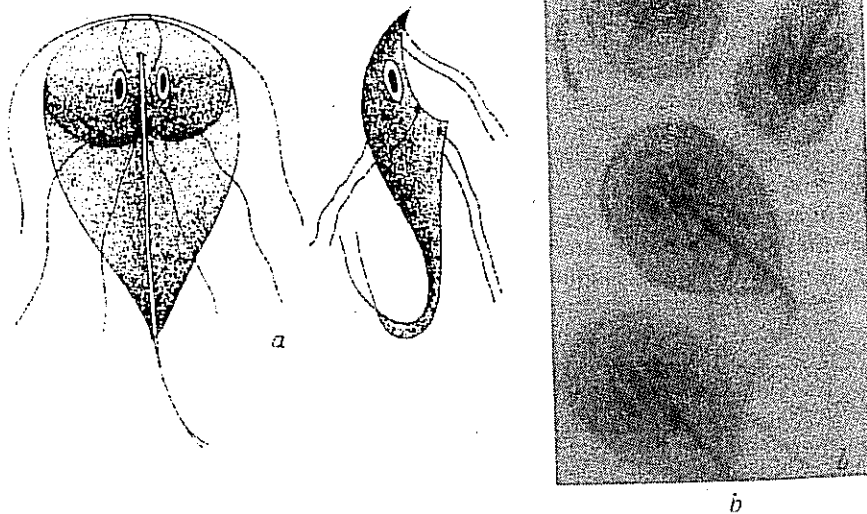


Fig. 33. *Lamblia intestinalis*:
a - reprezentare schematică; b - imagine foto.

de 8-10 μ . Această formă vegetativă a parazitului prezintă 2 nuclee mari așezați în partea anterioară a corpului și 8 blefaroplaști dispuși în 4 perechi din care pornesc aceiași număr de flageli (fig. 33 a și b). Mobilitatea parazitului este asigurată prin mișcările neconținute ale celor 4 perechi de flageli. Înmulțirea se realizează prin diviziune binară, longitudinală, atât în stadiul vegetativ, cât și după închistare, iar hrana se face prin osmoză pe întreaga suprafață a corpului parazitului.

Formele chistice, ovoidale, măsoară 10-13 μ în lungime și 7-8 μ în lățime, sunt învelite cu o membrană fină, dublă, prin transparența căreia se observă conținutul: 4 nuclee și un mănunchi de flageli care formează o dungă oblică în interiorul chistului, element caracteristic pentru identificare la examenul microscopic.

Girardioza (lambliaza)

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

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

Patogenie. Odată pătruns în tubul digestiv al omului parazitul se multiplică rapid, ajungând la proporții de 1 milion de paraziți pe cm² de mucoasă intestinală. Împiedică buna funcționare și în special procesul obișnuit de resorbție a substanțelor nutritive. Acești paraziți pătrund și în profunzimea peretelui intestinal, provocând importante tulburări, asociind infecției cu *Lamblia* și diverse infecții microbiene. Pe lângă intestinul subțire, paraziții mai invadează 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, însoțită de dureri abdominale difuze, care alternează în timp cu perioade de constipație.

Epidemiologie. Omul este cel mai important transmitător al bolii. Transmiterea se realizează atât direct prin contact cu omul bolnav, cât și indirect prin intermediul apei, al legumelor și fructelor 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 directe, se mai recomandă ca la depistarea unui caz de boală să se controleze întreaga colectivitate sau familia în care a fost un caz de lambliaza.

Tratamentul lambliazei se face cu preparate de tip Metronidazol și Tinidazol.

4. CLASA SPOROZOARE

Clasa Sporozoare cuprinde protozoarele caracterizate prin:

- faptul că cel puțin o parte din viața lor sunt paraziți intracelulari;
- modul particular de înmulțire, care cuprinde generații asexuate (schizogonice) și sexuate (sporogonice).

Ciclul asexuat sau *schizogonia* constă în fragmentarea elementului parazită primitiv în elemente parazitare secundare mai mici care vor parazita noi celule ale organismului aceleiași gazde, iar **ciclul sexuat**, denumit și *sporogonie*, cuprinde formarea elementelor parazitare cu sexe separate (masculi și femele), din fuziunea cărora rezultă un ou sau spor, de unde și numele de sporozoare, adică de ființe care se înmulțesc prin spori. În felul acesta, ciclul asexuat reprezintă un element de multiplicare a parazitului la aceeași gazdă, în timp ce ciclul sexuat, dând naștere la spori cu sporoziti în interior, va asigura posibilitățile de transmitere a parazitului de la o gazdă la alta, de regulă prin intermediul unui vector.

Clasificarea sporozoarelor nu este încă definitiv stabilită, însă pentru parazitologia medicală două genuri prezintă o importanță deosebită: *genul Plasmodium* și *genul Toxoplasma*.

4.1. GENUL PLASMODIUM

Din acest gen face parte hematozoarul palustru, parazit ce produce malarie - "frigurile de baltă" sau paludismul. Următoarele patru specii din *genul Plasmodium* sunt importante în parazitologia medicală.

- *Plasmodium vivax*, care este agentul cauzal al malariei în forma terței benigne.
- *Plasmodium falciparum* - agentul cauzal al malariei terțe maligne sau tropicale.
- *Plasmodium malariae* - agentul cauzal al malariei cuarte.
- *Plasmodium ovale*, care se găsește în Africa, Asia, America de Sud.

Plasmodium, cu toate cele patru specii care interesează omul, prezintă în general același dublu mod de înmulțire: o înmulțire ciclică, asexuată, schizogonică în organismul uman și o înmulțire sexuată sporogonică, la țânțarii din *genul Anopheles* (fig. 34).

La rândul său, ciclul schizogonic (asexuat) cuprinde, în raport cu evoluția parazitului, două faze:

- faza exoeritocitară, în care parazitul se multiplică asexuat în țesutul hepatic al omului;
- faza eritocitară, în care parazitul se multiplică activ în globulele roșii din sânge, ajungând la formele sexuate, care vor evolua mai departe în femelele țânțarilor *genului Anopheles*.

Evoluția paraziților malariei, respectând aceste faze, se face astfel (fig. 34):

Ciclul asexuat (schizogonic) - faza exoeritocitară. Parazitul malariei introdus de țânțarul anofel prin înțepătura infectantă în sângele omului se retrage în celulele ficatului.

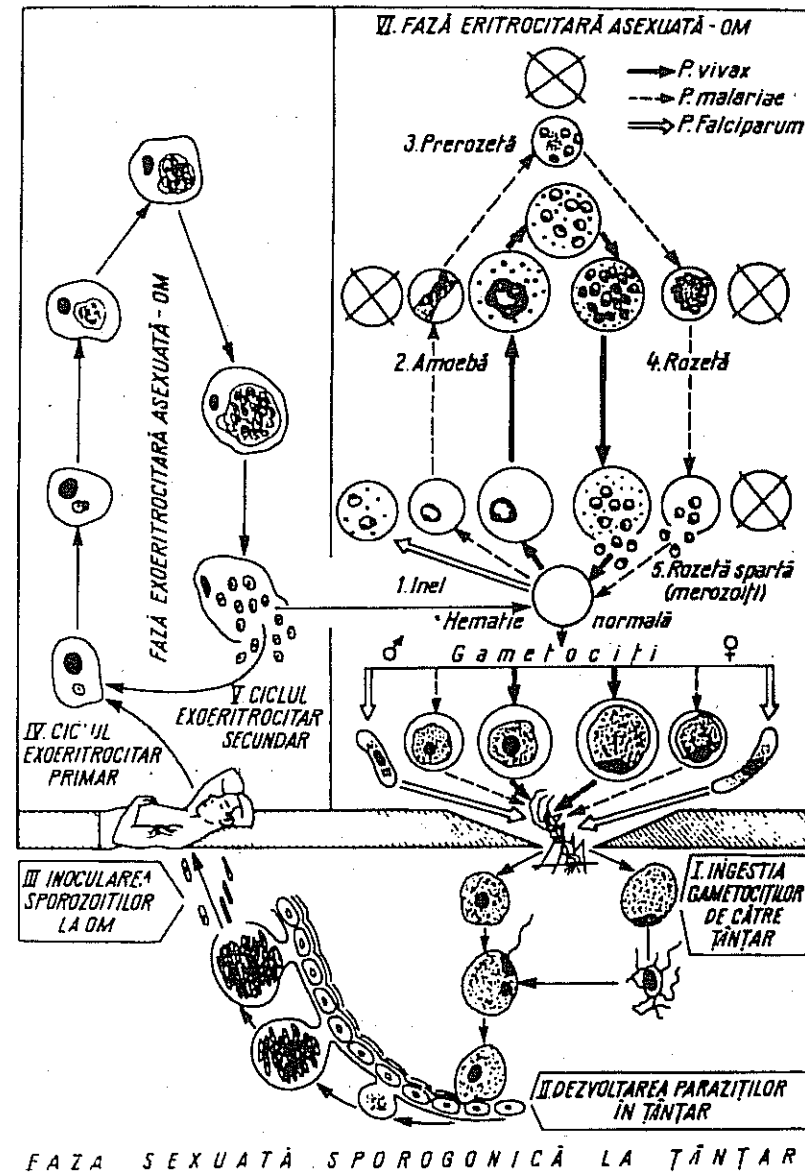


Fig. 34. Ciclul biologic la plasmodii.

În ficat parazitul crește, își multiplică nucleii care se vor înconjura de zone mici în protoplasmă, formând niște mase sferice numite "forme plasmoidale" care, ajunse la dezvoltare completă, se rup dând naștere la elemente noi, numite "merozoiți", ce vor invada globulele roșii - eritrocitele.

Ciclu asexuat (schizogonic) - faza eritrocitară - cuprinde, în general, patru stadii evolutive ale parazitului.

Primul stadiu evolutiv este reprezentat de forma de "inel cu pecete" pe care o ia parazitul atunci când pătrunde în globula roșie. Forma de inel corespunde unui arc de protoplasmă colorată în albastru cu un nucleu în roșu care închide arcul (colorație May-Grünwald-Giemsa).

Cel de-al doilea stadiu evolutiv al parazitului este stadiul de amibă. Stadiul de inel al parazitului se dezvoltă rapid în interiorul hematiei parazitare, prin îngroșarea neconținută a arcului de protoplasmă, formând pseudopode protoplasmatică care invadează hematia. La aceeași colorație (May-Grünwald-Giemsa), hematia-gazdă devine din ce în ce mai palidă, iar parazitul are o masă protoplasmatică neregulată colorată în albastru și un nucleu colorat în roșu. La *Plasmodium vivax* toxinele parazitului apar în hematia parazitată sub forma unor granulații fin pulverulente, numite "granulațiile lui Schüffner".

Faza de prerozetă-rozetă. După ce stadiul de amibă a ajuns la dezvoltare completă, nucleul parazitului începe să se dividă într-un număr variabil de nucleii secundari, care se dispun la periferia parazitului, înconjurându-se de o masă de protoplasmă și păstrează în centru mase de pigment de fier. Stadiul de diviziune este numit *prerozetă*, iar când diviziunea nucleului în numărul caracteristic speciei și înconjurarea nucleilor secundari cu protoplasmă este terminată, stadiul evolutiv este numit *rozetă*. Hematia se rupe și fiecare element parazită nou - *merozoit* - va invada o nouă hematie în care va reîncepe ciclul evolutiv.

Stadiul de gametociți (sexuat). După un număr variabil de cicluri evolutive în hematiile-gazdă, unele forme amiboide - schizontii - ajunse la maturitate nu își mai segmentează nucleii, ci se vor diferenția în forme sexuate - gametociți masculi și femeli. Aceste forme, odată apărute în sângele bolnavului, îl fac infectant pentru țânțar, deoarece femela de anofel, înțepând pielea bolnavului, sugă odată cu hematiile necesare pentru hrană (1-3 mg sânge pentru un prânz) și un număr variabil de hematii cu paraziți.

Ciclu sexuat sau sporogonic (la anofel). Formele sexuate - gametociții - rezistă în stomacul țânțarilor, se maturizează și se transformă în gamete. Gametocitul mascul se segmentează în 4-8 gamete masculi (microgamete). Gametele masculi se desprind de gametocitul din care au luat naștere și se deplasează activ în conținutul stomacului țânțarului, căutând gametele femel.

Gametocitul femel, la rândul său, se dezvoltă, își reduce cromatina nucleară și se transformă într-un gamet femel (macrogamet). În acest stadiu este fecundat de microgametul mascul, iar *oul* (zigotul) care rezultă este mobil și migrează în grosimea peretelui stomacal al țânțarului. Acolo se fixează și se dezvoltă la început cu o

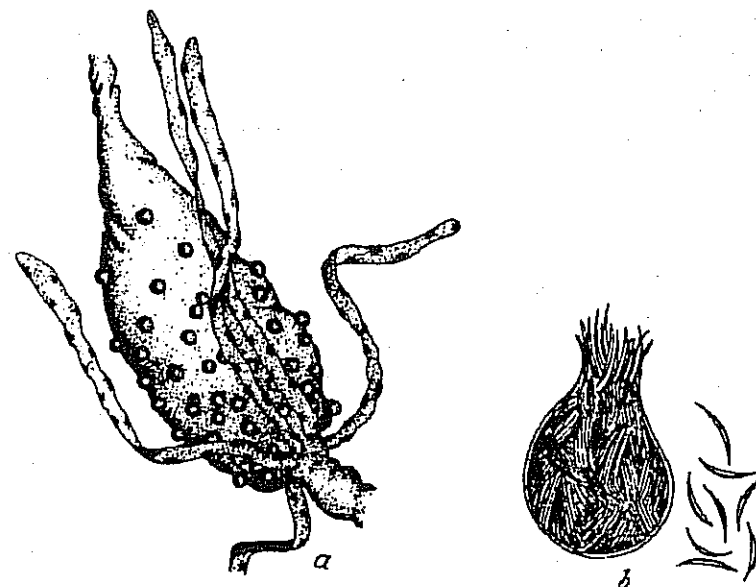


Fig. 35. Stomac de țânțar:
a - oocisti; b - oocist cu sporozoiți.

multiplicare a nucleului, urmată de individualizarea în jurul nucleului a unei mici mase protoplasmatică. Elementele care apar în interiorul oului sunt formate dintr-o masă protoplasmatică fusiformă, au un nucleu central și se numesc *sporozoiți*. Oul care a crescut ca volum proeminând pe suprafața externă a stomacului spre cavitatea generală a insectei se va numi *oocist* și, ajuns la maximum de dezvoltare, se rupe eliberând sporozoiții formați în interiorul său (fig. 35, a și b). Acești sporozoiți se vor răspândi în hemolimfa insectei, cantonându-se cu predilecție în glandele salivare.

Când țânțarul anofel (femela) va înțepa pentru a sugă sânge de la un om sănătos, îi va inocula, odată cu saliva, și un număr de sporozoiți. Parazitul ajuns din nou în sângele omului astfel infectat își va reîncepe ciclul de viață asexuat - faza exoeritocitară și apoi eritrocitară, integrând ciclul său biologic în cele două gazde: *om - ciclu asexuat; anofel - ciclu sexuat.*

Malaria

Este o boală infecțioasă cu caracter epidemic, determinată de pătrunderea în organismul uman, prin înțepătura infectantă a țânțarului *Anofel*, a unui protozoar din *genul Plasmodium*.

Boala este caracterizată clinic prin accese febrile intermitente, splenomegalie și anemie secundară.

Malaria este o boală epidemică răspândită pe o foarte mare suprafață a globului, fiind endemică în zilele noastre, în special în zonele tropicale și unele zone subtropicale, unde apar încă numeroase cazuri de o gravitate deosebită. Astfel, statisticile Organizației Mondiale a Sănătății arată că în India și Africa se mai înregistrează încă anual cele mai multe cazuri de paludism, cu o mortalitate destul de ridicată.

În țara noastră, în strânsă colaborare cu celelalte țări europene cu endemie palustră, s-au desfășurat etapele unui program sistematic de combatere și eradicare, fapt care a făcut ca în prezent, la noi, malaria să fie complet eradicată. Succesul combaterii și lichidării acestei boli epidemice, prin munca neobosită a cadrelor medico-sanitare, se datorește atât bunei organizări sanitare, cât și cercetărilor științifice.

Evoluția malariei prezintă următoarele stadii:

- *Perioada de invazie.* Paludismul începe printr-o primă perioadă febrilă - cu febră continuă - care durează câteva zile (perioada de invazie), la care se adaugă starea generală de rău, dureri de cap, uneori diaree, vărsături.

După câteva zile încep să apară frisoane (bolnavul simte un frig puternic). După câțva timp senzația de frig încetează, fiind înlocuită cu un val de căldură; temperatura corpului crește rapid, atingând valori de 39-40°C. După un număr de ore această fază febrilă cedează, bolnavul transpiră abundent și starea generală se îmbunătățește. În felul acesta, evoluția accesului, care durează câteva ore, este împărțită în trei perioade clasice: *frison, febră, transpirație abundentă.*

- *Perioada de stare.* Accesul febril se produce totdeauna în momentul ruperii hematiei de către rozetă și invadarea noilor hematii de către merozoizii liberați în sânge.

Cum ruperea rozetelor se produce la 3 zile pentru *Plasmodium vivax* și *Plasmodium falciparum* sau la 4 zile pentru *Plasmodium malariae*, accesele febrile vor apărea la aceleași intervale, realizând *malaria terță* (la 3 zile) sau *cuartă* (la 4 zile).

După un număr variabil de 10-15 accese, intervalele dintre stările febrile devin din ce în ce mai lungi, apare apoi o perioadă de liniște aparentă de 2-3 săptămâni, după care urmează:

- *perioada recăderilor precoce*, când reapar accese febrile pe o perioadă de 2 luni, cu pauze mai lungi între ele, și apoi:

- *perioada recăderilor tardive*, la 7-8 luni de la atacul primar, de regulă, în primăvara anului următor. Prin intermediul recăderilor tardive, noile generații de anofeli din anul respectiv au posibilitatea de a se infecta, asigurând astfel perpetuarea malariei de la un an la celălalt.

Durata totală a unei infecții paludice este limitată în timp, dar variabilă în raport cu speciile de hematozoar. Astfel, durata medie a infecției pentru *Plasmodium falciparum* este de 12 luni, pentru *Plasmodium vivax* 2 ani și pentru *Plasmodium malariae* 3-5 până la 20-30 de ani.

Formele clinice. Paludismul poate evolua în mai multe forme clinice, deosebind forme cerebrale, forme hemoglobinurice și forme pernicioase.

Epidemiologie. Omul este rezervorul de parazit, dar transmisiunea bolii nu se realizează decât prin intermediul anofelului vector. Perioada de incubație a bolii variază între 11 și 21 de zile, în raport cu specia de *Plasmodium*, iar răspândirea bolii este, în prezent mai mare în zonele tropicale și subtropicale. În zonele cu climă temperată se înregistrează mai frecvent cazuri de malarie "de import" din zonele endemice.

Diagnosticul bolii se face pe baza simptomatologiei clinice completată cu examenul sângelui - frotiu întins și în picătură groasă, recoltat în acces și colorat prin metoda May-Grünwald-Giemsa.

Tratamentul malariei se face în prezent cu medicamente din grupul diamino-pirimidinelor - *Primethamin*, din grupul amino-4-chiloneinelor - *Chloroquina* și din grupul amino-8-chinoleinelor - *Primaquina*, diferențiindu-se un tratament schizontocid și un tratament gametocid. Semnalarea în ultimii ani a rezistenței paraziților malariei la amino-4-chinoleină (*Chlorochin*) - principalul schizontocid larg utilizat în diferite zone ale globului - a impus organizarea de cercetări pe plan mondial, pentru a se găsi noi medicamente cu acțiune schizontocidă.

Se mai folosește și tratamentul profilactic aplicat persoanelor sănătoase care se deplasează în zone endemice de malarie.

Profilaxia și combaterea bolii. În țara noastră, malaria a fost complet lichidată din anul 1963. Pentru a preîntâmpina însă reintroducerea bolii prin bolnavi care vin din țările endemice, se iau în prezent măsuri de control și depistare activă a tuturor bolnavilor suspecti, malaria fiind introdusă între bolile cu declarare obligatorie.

4.2. GENUL TOXOPLASMA

Genul *Toxoplasma* cuprinde mai multe specii de paraziți, din care specia *Toxoplasma gondii* prezintă importanță deosebită în parazitologia medicală.

Toxoplasma gondii este un protozoar din clasa sporozoarelor, unicelular, cu o formă a corpului ușor alungită, unul din capete fiind rotunjit, iar celălalt mai ascuțit (fig. 36). Parazitul măsoară 6-8 μ în lungime, prezintă un nucleu mai mare, mai apropiat de polul rotunjit și masă protoplasmatică. Parazitul se înmulțește prin diviziune binară, dar este cunoscută și înmulțirea prin schizogonie.

Ciclu evolutiv. Omul, ca și aproape toate animalele cu sânge cald, reprezintă organisme-gază pentru toxoplasme, însă manifestările clinice și evoluția bolii diferă de la o specie la alta.

Modul de transmitere se cunoaște precis din anul 1970, data când s-a demonstrat rolul pisicii în transmiterea bolii. Animalele infectate realizează în intestinul lor un ciclu schizogonic, din care rezultă forme chistice ce se elimină prin fecale.

Toxoplasmoza

Patogenie. Pătrunderea toxoplasmelor în ganglioni și în diferite țesuturi ale organismului-gazdă umană produce reacții inflamatorii în aproape toate organele, dar localizarea de predilecție a parazitului este în encefal, unde leziunile sunt mai frecvente în cortex, în nucleii subcorticali sau în retină.

Forme clinice. Boala produsă de parazit se numește toxoplasmoză. Din punct de vedere clinic, deosebim două forme: toxoplasmoza dobândită și toxoplasmoza congenitală.

- *Toxoplasmoza dobândită* poate îmbrăca o formă acută cu miocardită, encefalită, hepatită, pneumonie interstițială și o formă subacută cu hidrocefalie, convulsii, tulburări oculare (corioretină, retinită), în care fenomenele clinice sunt, în general, date de localizările cerebrale.

- *Toxoplasmoza congenitală*, prin gravitatea sa, constituie forma esențială de boală, în care infecția este transmisă de la mamă la făt prin trecerea parazitului transplacentar.

Epidemiologie. Toxoplasmoza este o zoonoză (boală care se transmite de la animal la om) în care pisica este principalul transmitător. Formele chistice ale parazitului eliminate odată cu fecalele de acest animal sunt infectante pentru om și alte animale. Boala se mai poate transmite și direct de la mamă la făt pe cale transplacentară (toxoplasmoza congenitală) și indirect prin consumul de carne de animal infectat și insuficient prelucrată termic.

Perioada de incubație a bolii este foarte lungă, iar răspândirea sa este pe întregul glob la toate grupele de vârstă.

Diagnostic. Numai laboratorul poate stabili un diagnostic de certitudine prin evidențierea parazitului din ganglioni, lichid cefalorahidian, sau inoculând aceste produse la animale receptive: șoarece, hamster auriu, cobai. Testele imunologice ca intradermo-reacția, reacția de imunofluorescență și, recent, testul imunoenzimatic (ELISA) cu antigene specifice sunt folosite tot mai mult în precizarea diagnosticului.

Tratamentul se face cu un produs antipaludic, pirimetamină și sulfamide sau cu antibiotice de tip Spiramicin.

Profilaxia. Se recomandă evitarea contactului cu animale domestice, în special cu pisici, respectarea normelor de igienă în crescătoriile de animale, precum și evitarea consumării cărnii insuficient prelucrată termic.

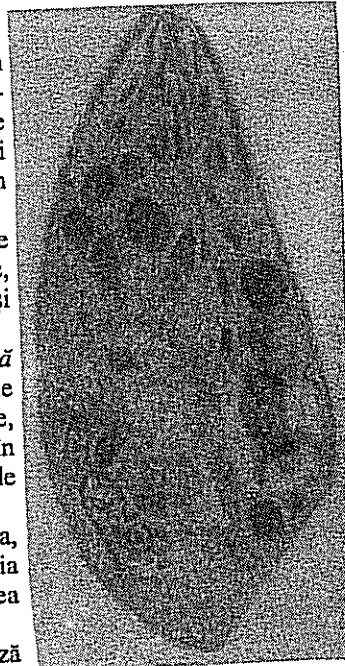


Fig. 36. *Toxoplasma gondii*

(văzută la microscopul electronic).

5. CLASA INFUZORI (CILIAE)

Această clasă grupează protozoarele mari și superior organizate, care în stadiul vegetativ au corpul în parte sau în totalitate acoperit cu cili vibratili, un nucleu mare, numit "macronucleu" și un nucleu mic cu rol reproducător, numit "micronucleu".

Reproducerea la infuzori se face printr-un orificiu - citostom, iar excreția printr-un orificiu posterior numit citoproct.

Chisturile se formează la acești paraziți în momentul în care formele vegetative ajung în condiții nefavorabile, iar criteriul de clasificare al ciliatelor este reprezentat de așezarea cililor vibratili pe suprafața formei vegetative.

În parazitologia medicală, o singură specie prezintă importanță deosebită: *Balantidium coli*, care produce dizenteria balantidiană.

Morfologia. Parazitul *Balantidium coli* (fig. 37) este un infuzor cu corpul în forma unui bob de fasole, lung de 60-200 μ.

Forma corpului este ușor ovoidă, fiind mai ascuțit la extremitatea anterioară. Pe fața ventrală, începând de la polul anterior și până aproape la mijlocul corpului, se vede o depresiune, un fel de șanț, larg, puțin oblic, care reprezintă regiunea bucală,

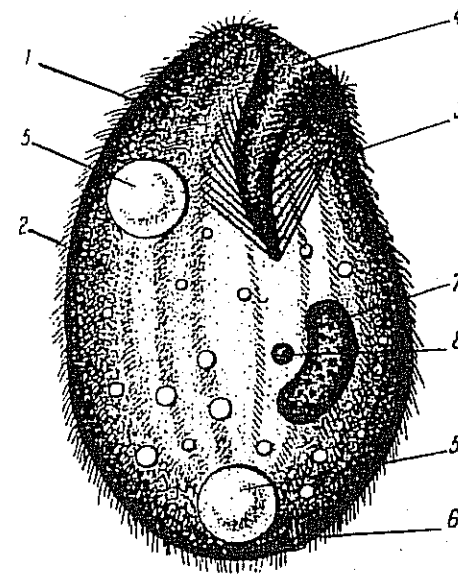


Fig. 37. *Balantidium coli*:

- 1 - citoplasmă; 2 - cili vibratili; 3 - cili;
- 4 - peristom; 5 - vacuole; 6 - citoproct;
- 7 - macronucleu; 8 - micronucleu.

numită "peristom" 4. În fundul acestui șanț, la capătul său posterior, se găsește orificiul bucal propriu-zis, numit "citostom". Întreaga suprafață a corpului parazită este acoperită cu șiruri longitudinale de cili vibratili 2, care în jurul regiunii peristomului sunt mai mari, creând prin mișcările lor curenți în lichidul în care trăiește parazitul și aducând la orificiul citostomului particulele alimentare.

Corpul parazitului, învelit cu o membrană fină, este format din două tipuri de citoplasmă - ectoplasmă și endoplasmă - precum și doi nuclei. Din acești doi nuclei unul, voluminos, numit "macronucleu" 7, este recurbat în formă de potcoavă și are rol vegetativ. Cel de-al doilea nucleu, mult mai mic, este numit "micronucleu" 8 și este așezat, în general, în concavitatea macronucleului. Acest nucleu are rol în reproducere. Endoplasmă conține, ca și la celelalte protozoare, vacuole digestive 5, excretoare și o vacuolă mare pulsatilă.

Mișcarea parazitului este realizată cu ajutorul cililor de pe suprafața corpului.

Reproducerea acestui parazit se face prin diviziune directă, iar pentru a se regenera după mai multe diviziuni, în viața parazitului intervine și înmulțirea prin conjugare.

Formele chistice mari (50-80 μ) au o formă de pară, sunt deosebit de rezistente la condițiile nefavorabile pe care le întâlnesc în mediul înconjurător și asigură transmiterea de la o gazdă la alta.

Balantidioza

Patogenie. *Balantidium coli* trăiește, de regulă, în intestinul gros al omului, ca și al porcului, hrănindu-se cu flora microbiană variată pe care o găsește. În unele împrejurări devine agresiv, invadând peretele intestinal și producând ulcerații și chiar perforații intestinale.

Tulburările clinice sunt asemănătoare cu ale unei colite, în sensul că în scurt timp după infecție apare o diaree cu caracter progresiv, care în 5-6 săptămâni ajunge la 8-9 scaune pe zi. Scaunele sunt păstoase, cu vădit caracter de putrefacție și striuri de sânge. Ele sunt însoțite de tenesme, dureri abdominale, alterarea stării generale și eozinofilie în sângele periferic.

Complicațiile bolii constau în perforații intestinale, reacții peritoneale sau chiar abcese hepatice.

Epidemiologie Balantidioza este o zoonoză în care transmisiunea bolii se face direct de la porc la om. Boala este mai frecvent întâlnită la îngrijitorii din crescătoriile de porcine, ca și la muncitorii care prelucrează intestine de porc.

Transmiterea bolii se face:

- direct, prin intermediul mâinilor nespălate, pe care au ajuns formele chistice;
- indirect, prin alimentele contaminate cu forme chistice.

Rolul muștelor este, de asemenea, important în transmiterea indirectă, aceste insecte având rolul de a transporta formele chistice.

Calea de pătrundere este digestivă, iar localizarea - în intestinul gros.

Diagnosticul bolii se face prin examen coproparazitologic, care evidențiază formele chistice ale parazitului și mai rar formele vegetative.

Prognosticul bolii este în raport direct cu masivitatea infecției. În străinătate s-au menționat uneori procente ridicate de mortalitate, care ajung până la 14-15% din cazurile de infecție.

Tratamentul bolii este dificil și nu dispunem încă de un medicament specific. Sunt utilizate în prezent: derivatele arsenicale Difetarson (Bemarsal), iar dintre antibiotice paromomicina asociată cu metronidazol.

Profilaxia bolii cuprinde depistarea purtătorilor umani și lichidarea rezervoarelor de parazit la animale, completată cu evitarea poluării solului cu dejecte, evitarea contactului cu animale infectate, măsuri de igienă personală, igienă alimentară și combaterea muștelor, care pot transporta formele chistice.

Cap.XXIX. HELMINTOLOGIE

Dintre viermi, viermii plăți (plathelminți) și viermii cilindrici (nemathelminți) interesează parazitologia medicală.

1. SUBÎNCRENGĂTURA PLATHELMINȚI

Viermii din această subîncercătură se caracterizează prin:

- turtire dorsoventrală;
- simetrie bilaterală;
- lipsa cavității generale;
- lipsa, în general, a tubului digestiv;
- sexe neseperate - hermafrodiți.

1.1. CLASA TREMATODA

Clasa Trematoda cuprinde viermi plathelminți cu corpul nesegmentat, turtit dorsoventral, cu forma caracteristică de frunză plată.

Trematodele prezintă:

- ca organ de fixare ventuze cu o musculatură puternică, dintre care o ventuză situată perioral;
- organele genitale dezvoltate; cei mai mulți viermi din această clasă sunt hermafrodiți;
- oul prezintă un căpăcel numit opercul.

Sunt paraziți permanenți, dezvoltarea făcându-se prin gazde intermediare.

Infecțiile produse de viermii aparținând clasei *Trematoda* sunt relativ rar întâlnite la om, observându-se mai frecvent la animale.

Trematodul cu interes pentru țara noastră este *Fasciola hepatica (Distomum hepaticum)*.

Fascioloza este o boală parazitară gravă, relativ rară la om, frecventă la animale cornute; este provocată de *Distomum hepaticum* care, localizat în căile biliare, determină tulburări hepatice grave.

Morfologia parazitului. Parazitul adult are forma unei frunze cu o lungime de 1,5-3 cm și o lățime de 1-1,5 cm (fig. 38, a). Prezintă două ventuze: una dispusă anterior, ventuza bucoanală 1, a doua dispusă ventral, în treimea anterioară 6. Ca să poată încăpea în canalele biliare, parazitul se întoarce în cornet, în așa fel ca fața dorsală pe care se găsește ventuza cu care se fixează în canale să fie în afară. Cu ajutorul celor două ventuze se fixează în canale hepatice.

Tubul digestiv este incomplet, prevăzut cu o singură deschidere - orificiul bucoanal. El prezintă numeroase ramificații laterale înfundate 5.

Aparatul reproducător. *Fasciola hepatica* este un vierme hermafrodit, având aparatul reproducător mascul compus din doi testiculi tubulari foarte ramificați și cel femel compus dintr-o glandă germigenă (ovar) ramificată și două glande vitelogene.

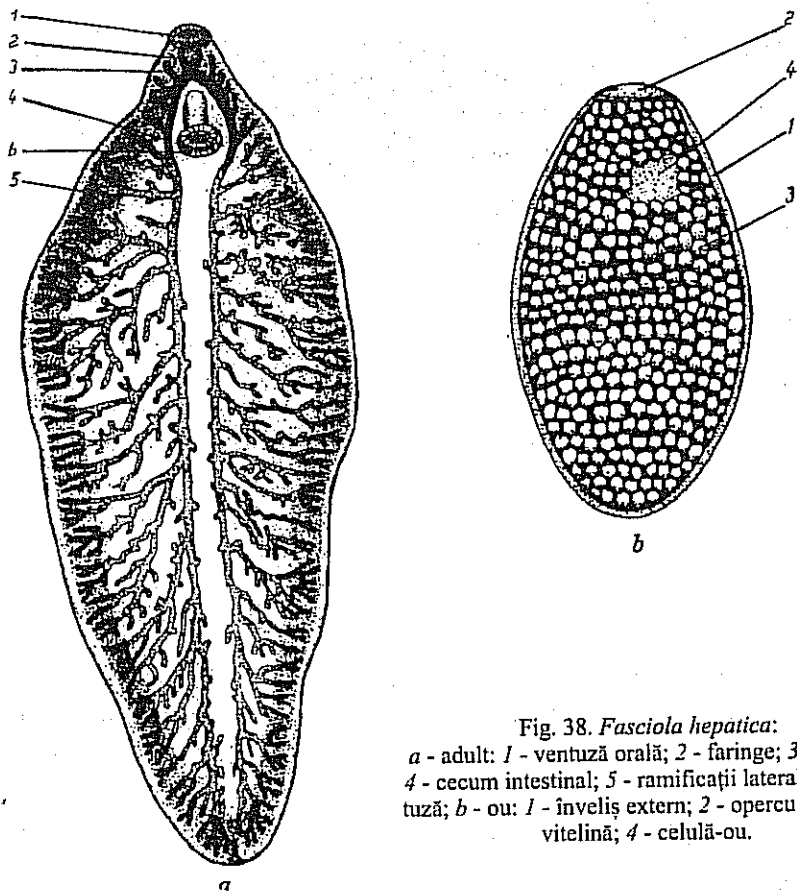


Fig. 38. *Fasciola hepatica*:
 a - adult: 1 - ventuză orală; 2 - faringe; 3 - esofag;
 4 - cecum intestinal; 5 - ramificații laterale; 6 - ventuză;
 b - ou: 1 - înveliș extern; 2 - opercul; 3 - masă vitelină; 4 - celulă-ou.

Ouăle de *Fasciola hepatica* sunt mari, $140/80 \mu$, de formă ovală. Coaja lor este subțire și prezintă la unul din capete un mic căpăcel (fig. 38). Ouăle nu sunt embrionate în momentul eliminării, în interiorul lor găsim o masă vitelină 3, care înconjoară celula-ou și pe seama căreia se va dezvolta embrionul.

Ciclu biologic. Ouăle eliminate de viermi în canalele biliare ajung în intestin și, de aici, o dată cu fecalele, în mediul extern. Pentru embrionarea lor este obligatoriu ca ele să ajungă în mediu acvatic. Temperatura optimă de dezvoltare este de $20-25^{\circ}\text{C}$.

În ou se dezvoltă o larvă alungită, prevăzută cu numeroși cili, numită *miracidium*. Miracidium, înotând liber și întâlnind gazda intermediară, care este un melc de apă din genul *Lymnea*, pătrunde prin orificiul respirator (pneumostom) al moluștei și ajunge în camera pulmonară, unde miracidul evoluează și se transformă într-o

formațiune de forma unui sac, plin cu celule embrionare, numit *sporocist*. În sporocist se vor dezvolta ulterior *rediiile*, care reprezintă al doilea stadiu larvar. Rediile sunt alungite, au un tub digestiv rudimentar și anterior un orificiu pe unde se vor elibera viitoarele forme larvare. Rediile conțin în interior și numeroase celule germinative din care vor rezulta redii-fiice sau *cercari*, dacă condițiile de temperatură o permit. Cercarul, de dimensiuni până la 1 mm, are o formă asemănătoare unui mormoloc de broască; corpul este format dintr-o porțiune discoidală pe care se observă o ventuză bucală, un tub digestiv rudimentar și o ventuză ventrală. Porțiunea posterioară alungită are rol în locomoție. Cercarii părăsesc gazda-moluscă, înoată liber și se fixează pe vegetațiile din apă, închistându-se. Evoluția parazitului de la ou la cercar durează în total 2-3 luni.

Epidemiologie. Fascioza este o zoonoză. Omul se poate infecta bând apă din surse necontrolate, care conțin cercari liberi, sau prin consumarea de legume din grădinile de pe marginea bălților poluate cu forme închistate.

În intestin, cercarii sunt eliberați de membrana lor chistică și își fac drum către canalele biliare ale ficatului. Aici se vor dezvolta și, odată ajunși la maturitate, vor elimina ouă, care trec în intestin și de aici, prin fecale, ajung în mediul extern.

Boala se întâlnește la om în regiunile în care este răspândită la ovine și bovine. Este o boală gravă, manifestată prin tulburări ale funcției hepatice, mergând deseori la *ciroză hepatică*.

Diagnosticul de laborator. Diagnosticul de certitudine îl dă punerea în evidență a ouălor de paraziți în fecale și în bilă, prin *metoda de concentrare Telemann*.

Profilaxia. Profilaxia fasciozei umane este legată de profilaxia fasciozei animale. Se vor căuta să se depisteze și trateze animale bolnave și se va evita poluarea apelor cu dejecțiile acestora. Se vor lua măsuri de protecție individuală ale populației, prin evitarea consumării apei din bălți, a zarzavaturilor crude udate cu apă din bălțile infestate.

Tratamentul fasciozei se face în spital, cu medicamente de tip 2-dihidroemetină, continuat cu Entobex, hexaclorparaxilol, utilizat în fosta URSS, și mai recent tratamentul cu paraziquantel (Biltricid). Bolnavul trebuie urmărit timp de 2 ani după aplicarea tratamentului, pentru a se depista din timp recăderile bolii.

1.2. CLASA CESTODA

Cuprinde viermi plathelminți, cu corpul alcătuit dintr-un număr mai mare sau mai mic de segmente, dispuse cap la cap. Fiecare segment își are organizarea genitală hermafrodită completă și poate da naștere la ouă. Ca organe de fixare prezintă ventuze sau una sau mai multe coroane de cârlige. Hrănirea se realizează prin osmoză pe toată suprafața corpului. În ciclul lor de dezvoltare se întâlnește o gazdă intermediară.

Din clasa *Cestodelor* prezintă interes ca paraziți umani:

Familia Taeniidae – cu *genurile Taenia* și *Echinococcus*.

Familia Diphyllotrichidae – cu *genul Diphyllotrium*

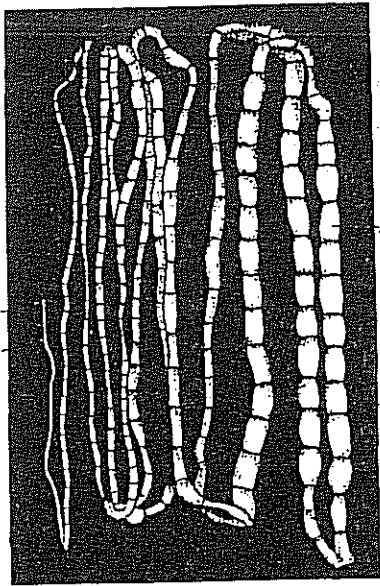


Fig. 39. Tenie:
1 - scolex; 2 - gât; 3 - proglot.

Taenia saginata

Morfologia parazitului. Este un cestod lung de 6-8 m, de culoare albicioasă. Corpul este format din segmente. Anterior, corpul este subțire, aproape filiform, se lățește treptat către extremitatea posterioară, ajungând, la segmentele bătrâne, la lățimea de 1 cm.

Corpul este alcătuit din trei porțiuni: capul sau scolexul, gâtul, strobila sau totalitatea proglotelor.

Scolexul sau capul are o mărime de 1-2 mm, este alungit, prevăzut lateral cu patru ventuze ovalare, iar la centrul scolexului se află o depresiune pigmentată, simulând a cincea ventuză radiară.

Gâtul se găsește în continuarea scolexului de care este diferențiat. Are o lungime de 2-4 cm și este uniform, nesegmentat.

Posterior prezintă striații transversale, care reprezintă limitele viitoarelor segmente.

Familia Hymenolepidae – cu genul *Hymenolepis*.

Morfologie. Corpul este alungit sub formă de panglică, subțire la extremitatea sa anterioară, lărgindu-se progresiv către extremitatea posterioară (fig. 39).

Un cestod se compune din trei părți:
– un **scolex** 1, care după specie poartă ventuze sau cârlige;
– un **gât** foarte subțire 2, nesegmentat, unind scolexul cu restul corpului – **strobila**;
– corpul sau **strobila** 3, constituit dintr-un lanț de segmente unite, numite **proglote**.

1.2.1. Familia Taeniidae

Din genul *Taenia* se vor studia două specii parazite la om: *Taenia solium* și *Taenia saginata*. *Taenia solium*, datorită faptului că posedă la extremitatea anterioară a scolexului său o coroană dublă de cârlige, se numește și tenia armată, iar *Taenia saginata*, fiind lipsită de coroane de cârlige, se numește și "tenia nearmată" (*Taenia inermis*).

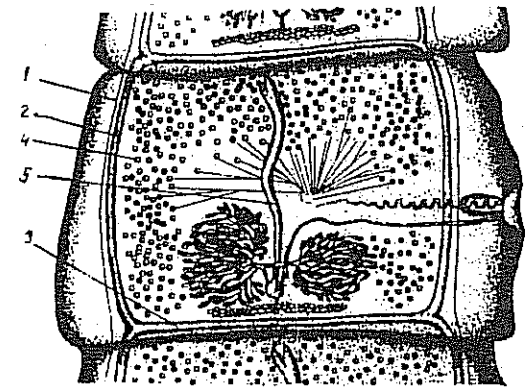
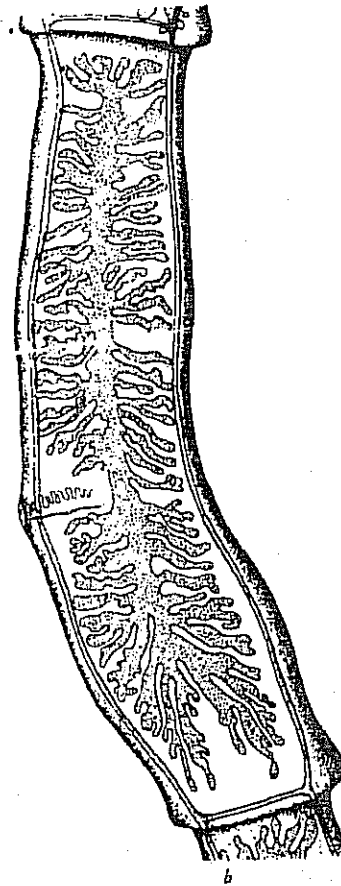


Fig. 40. Proglote de tenie:

a - proglotă adultă: 1 - cordon nervos; 2-3 - canale excretore; 4-5 - organe genitale;
b și c - proglote bătrâne.

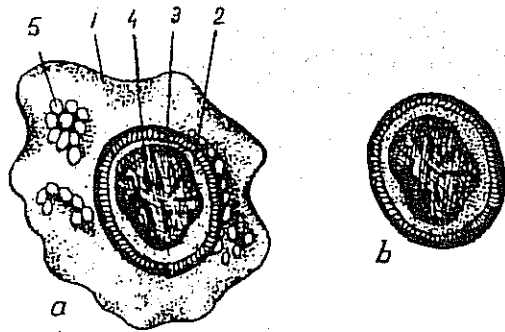


Fig. 41. Oul de *Taenia saginata*:
 a: 1 - înveliș extern; 2 - înveliș embrionar; 3 - înveliș radiar; 4 - embrion hexacant; 5 - resturi viteline. b: ou fără înveliș extern.

Strobila este lanțul de segmente (proglote) în număr de 1 000 - 1 500 de segmente. Proglotele se formează în lungimea gâtului. Vârsta lor este, deci, în funcție de poziția pe care o au în strobilă.

Proglotele tinere au organele reproducătoare încă nedezvoltate. Proglotele mai depărtate de gât, adulte (fig. 40, a) sunt dreptunghiulare sau pătrate și au organele reproducătoare dezvoltate. Ultimele proglote sunt bătrâne (fig. 40, b, c). Acestea sunt de 4-5 ori mai lungi decât late, au organele reproducătoare atrofiate, rămânând doar uterul hipertrofiat plin cu ouă.

Oul are forma ovalară, cu contur neregulat. El este alcătuit dintr-o masă vitelină care înconjură un embrion sferic (fig. 41), oval, cu o talie de 35-50/20-30 μ, o coajă groasă, caracteristică, striată, 2, iar în interior un embrion cu 6 cărlige - embrion hexacant 4.

Cisticercul este larva de tenie dezvoltată din embrionul hexacant în mușchii gazdei intermediare (fig. 42). În raport cu spațiul ocupat între fibrele musculare, el are o formă generală ovoidă, este albicios și are dimensiunea sub 1 cm.

Taenia solium

Taenia solium este asemănătoare cu *Taenia saginata*, cu unele caractere morfologice specifice care o deosebesc relativ ușor de cealaltă.

Taenia solium este mai scurtă, și anume, are 3-5 m, față de 6-8 m la *Taenia sanginată*. Scolexul este mic, de 1 mm, și prezintă 4 ventuze, un rostru apical cu o dublă coroană de cărlige de fixare.

Strobila este fină, transparentă. Proglotele bătrâne sunt de 2-3 ori mai lungi decât late (mai puțin alungite decât la prima tenie, la care sunt de 4-5 ori mai lungi decât late). Uterul prezintă 8-10 ramificații laterale față de 20 câte există la *Taenia sanginată*. Embrionul este rotund, de 30-40 μ diametru, și prezintă o învelișoară groasă striată.

Ciclul biologic. Tenia nu depune ouă. Uterul neavând comunicare cu exteriorul,

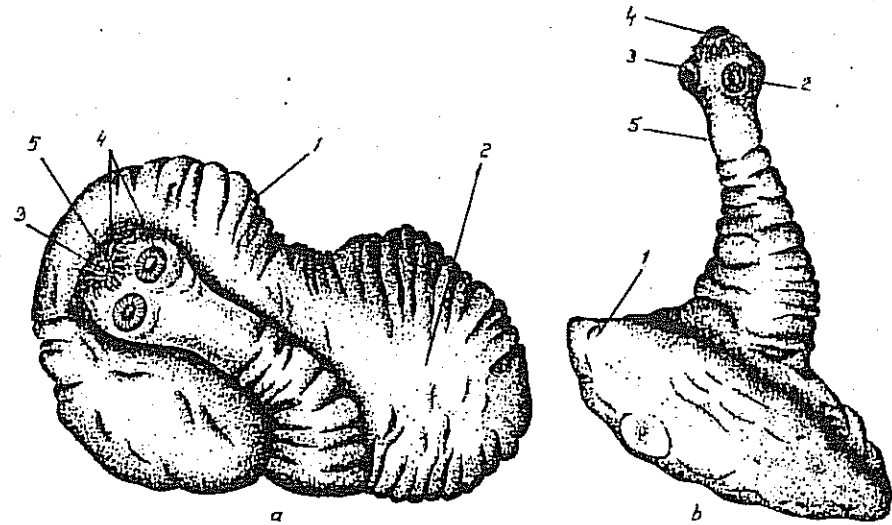


Fig. 42. Cisticerc:

a - invaginat: 1 - cuticula; 2 - vezicula cisticercului; 3 - scolex invaginat; 4 - ventuze; 5 - coroane de cărlige; b - cisticerc dezinvaginat: 1 - veziculă; 2 - scolex; 3 - ventuze; 4 - rostru; 5 - gât.

analizele coprologice, la un purtător de tenie, pot ieși negative. Numai când proglotele bătrâne desprinse se degradează în regiunea rectală, ouăle pot fi găsite în fecale. Proglotele bătrâne pline cu ouă desprinse de strobilă se elimină; cele de *Taenia saginata* se elimină odată cu materiile fecale sau între scaune, deoarece, având o musculatură puternică, forțează sfincterul anal (eliminarea activă).

Proglotele de *Taenia solium* se desprind în grup de 3-4 odată, iar porțiunea de strobilă desprinsă este eliminată numai împreună cu materiile fecale (eliminarea pasivă).

Embrioforii de tenie, odată ajunși pe sol, pot fi ingerați de taurine cu iarba în cazul *Taenia sanginată*, sau de porcine pentru *Taenia solium*. În intestinul gazdei intermediare coaja striată este digerată de sucurile gastrice intestinale, iar embrioforii hexacanti, puși în libertate, traversează peretele intestinal, trec în circulația generală și se opresc în mușchi, unde se transformă în larve veziculare - cisticerci. Aceștia poartă numele după gazda naturală, *Cisticercus bovis* pentru *Taenia saginata* și *Cisticercus cellulosae* pentru *Taenia solium*. Localizarea preferențială pentru *Taenia sanginată* sunt mușchii masticatori și pericardul, iar pentru *Taenia solium*, mușchii gâtului, ai pieptului și mușchii limbii.

Rolul patogen. Formele larvare ale teniilor - cisticercii - sunt ingerați prin consumare de carne de vită sau de porc parazitată, insuficient tratată termic. În intestin,

scolecşii eliberaţi se fixează pe mucoasa intestinală şi în 2-3 luni se dezvoltă viermele adult. Boala este cunoscută sub numele de *teniază* şi se manifestă printr-o simptomatologie digestivă, nervoasă şi semne generale, necaracteristice.

Tulburările digestive apar sub formă de dureri abdominale, greaţă, vărsături, tulburări ale poftei de mâncare, constipaţie sau diaree, scădere în greutate. Prin faptul că parazitul absoarbe o parte din hrana organismului, această acţiune spoliatoare este resimţită în funcţie de rezistenţa organismului-gazdă.

Taenia solium poate parazita omul şi în formă larvară, provocând așa-numita cisticercoză. În acest caz se poate produce o autoinfecare endogenă de la tenia adultă proprie, prin pătrunderea proglotelor în stomac, ca urmare a mişcărilor antiperistaltice intestinale. Localizarea cisticercilor la om este de obicei în ochi sau în creier, cu prognostic foarte rezervat pentru bolnav.

Epidemiologia. Izvorul de infestare a teniazei este omul purtător de tenie, care poate răspândi în mediul extern proglote cu ouă. Infectarea gazdelor intermediare cu embriofori din mediul extern se face astfel: vitele cornute mari se infectează cu *Taenia sanguinata* prin iarbă sau prin apa poluată cu ouă de tenie; porcinele se infectează cu *Taenia solium* prin îngărarea de proglote, datorită impurificării solului cu fecale depuse în afara latrinelor.

Infectarea omului, gazda definitivă, se face prin consumarea cărnii de cornute sau porcine, insuficient prelucrată termic, care conţine forme larvare (cisticercii) ale acestor tenii. Incubaţia bolii: 1-3 luni.

Diagnosticul de laborator se face prin examenul macroscopic şi microscopic al materiilor fecale. Examenul macroscopic pune în evidenţă fragmente din strobilă sau proglote izolate.

Examenul microscopic poate pune în evidenţă embrioforii (embriionul hexacant şi structura cojii) prin metoda de concentrare Telemann.

Diagnosticul de laborator al cisticercozei se adresează examenului unor materiale recoltate prin biopsie musculară. Se observă scolexul cu cele patru ventuze, iar la *Taenia solium* se văd, în plus, cele două coroane de cârlige.

Profilaxia. În profilaxia teniazei se va evita consumarea de carne necontrolată de serviciul veterinar. Carnea se va consuma bine fiartă sau friptă.

Folosirea corectă a latrinelor, dezmuştizarea, dezinfecţia latrinelor, vor avea ca obiect evitarea poluării mediului inconjurător cu embrioforii parazitului.

Taenia echinococcus

Hidatidoza sau *chistul hidatic* este o boală provocată de dezvoltarea în organismul uman a formei larvare a *Taeniei echinococcus*.

Gazdele obişnuite ale *Taeniei echinococcus* în stadiul adult sunt: câinele, pisica, lupul, vulpea. Stadiul larvar sau chistul hidatic se întâlneşte în mod accidental în circuit, infectarea dând chisturile hidatice cu diverse localizări, mai frecvente în plămâni şi ficat.

Morfologia parazitului. *Taenia echinococcus* este un cestod foarte mic, având

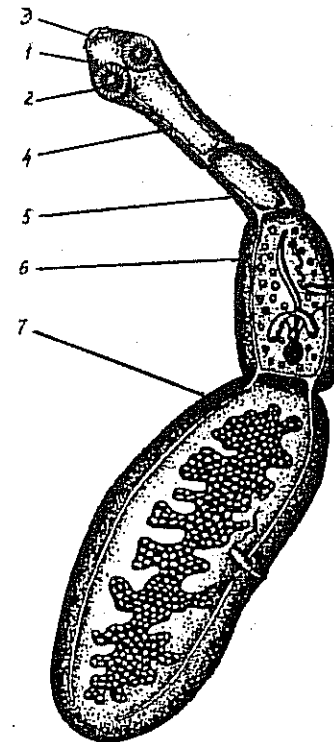


Fig. 43. *Taenia echinococcus*:
1 - scolex; 2 - ventuză; 3 - rostru cu cârlige; 4 - gât; 5 - proglotă tânără; 6 - proglotă adultă; 7 - proglotă bătrână (uter plin cu ouă).

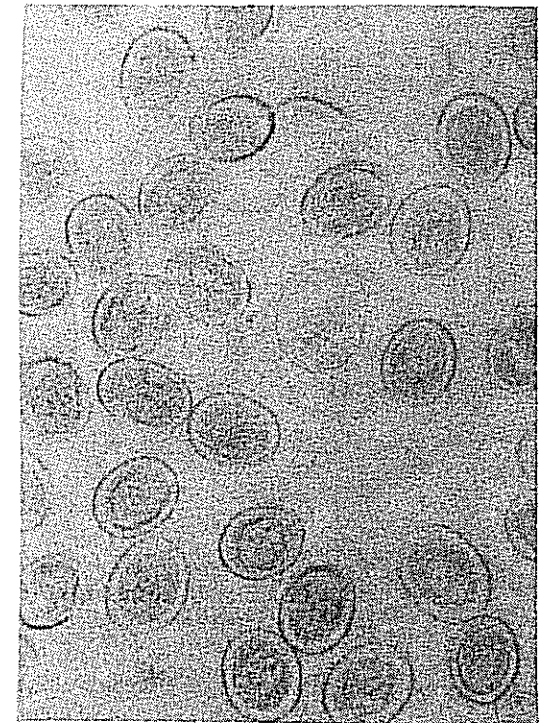


Fig. 44. Ouă cu embriofori de *T. echinococcus* (imagine microscopică).

3-6 mm (fig. 43). Scolexul prezintă patru ventuze şi o coroană dublă de cârlige (1, 2, 3). Gâtul este foarte scurt 4. Strobila este formată din 3-4 proglote ovalare 5, 6. Ultimul proglot este bătrân şi are uterul plin cu ouă 7. Acest segment se va desprinde şi se va elimina cu materiile fecale.

Ouăle sau embrioforii au o talie de 25-30 µ, formă ovalară şi prezintă în interior un embriion hexacant, care are un înveliş gros, striat (fig. 44).

Forma larvară - *chistul hidatic* sau *hidatida*. Odată oul ingerat de gazda intermediară sau de om, se pune în libertate embriionul hexacant, care traversează peretele intestinal şi, prin circulaţia generală, poate ajunge în diferite organe, îndeosebi în ficat şi plămâni.

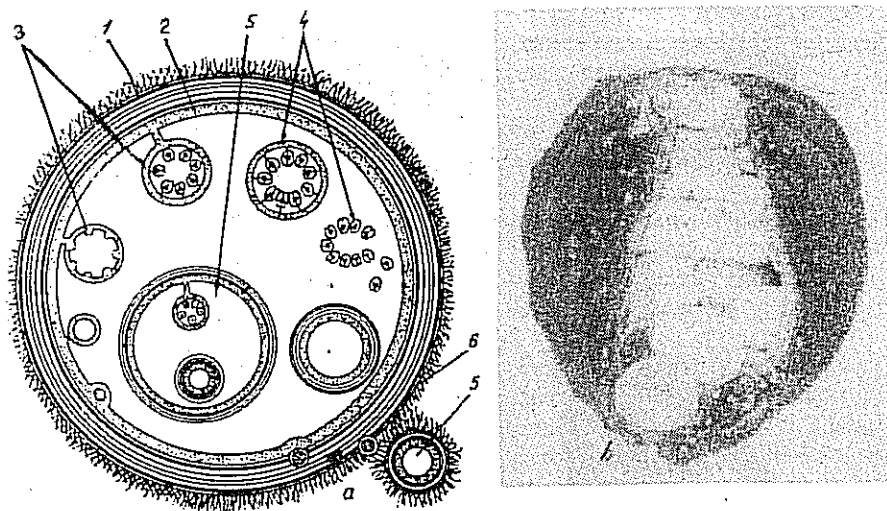


Fig. 45. Chist hidatic:

1 - membrană cuticulară; 2 - membrană proligeră; 3 - veziculă proligeră; 4 - veziculă cu scolecși; 5 - veziculă-fiică; 6 - membrană adventivă; a - reprezentare schematică; b - imagine foto - chist hidatic secționat, cu vezicule fine.

Aici embrionul se veziculează și se dezvoltă, putând ajunge în 1-3 ani de mărimea unui cap de copil. Această formă larvară se numește **chist hidatic** (fig. 45, a, b).

Chistul hidatic este alcătuit dintr-o membrană cuticulară 1, o membrană proligeră sau germinativă 2 și un lichid hidatic, care conține nisip hidatic 3, 4.

Chistul formează și **vezicule-fiice**, cu o structură asemănătoare cu cea a hidatidei-mamă 5. Veziculele-fiice se formează în interiorul chistului sau în exterior. Veziculele-fiice și scolecșii veziculați sunt răspunzători de hidatidoza secundară, care apare ca urmare a ruperii unui chist hidatic primitiv.

Ciclul biologic. Câinele și pisica sunt gazdele obișnuite ale teniei adulte la care, însă, boala trece neobservată. Animalele parazitare elimină proglotele cu ouă, care sunt ingerate de o gazdă intermediară (ovine, taurine). În intestin se pune în libertate embrionul (fig. 46), care ajunge pe cale sanguină în ficat sau în plămâni, unde se vor dezvolta larvele sub formă de chisturi hidatice. Acestea, consumate de pisică sau de câine, odată cu organele respective, vor infecta cu protoscolecși, care se vor dezvolta, devenind tenii adulte.

Mecanismul de infectare. Omul se infectează cu ouă de *Taenia echinococcus* din contactul cu câinele bolnav, care elimină proglotele bătrâne de tenie, cu ouă sau prin consumare de alimente infectate cu ouă.

Boala produsă de prezența larvei de *Taenia echinococcus* în organismul omului



Fig. 46. Embrion de *Taenia echinococcus*.

se numește **hidatidoză** și, de cele mai multe ori, se localizează în ficat și în plămâni. Chistul hidatic se poate rupe spontan, mai rar, sau mai frecvent în urma unui traumatism și conținutul său revărsat în cavitatea peritoneală sau pleurală formează hidatide noi, realizând o formă gravă de boală - "hidatidoza secundară".

Epidemiologia. Hidatidoza este o zoonoză. Omul se poate infecta direct de la animalele purtătoare de tenie (canide) sau, indirect, prin lâna oilor murdărită cu fecale de câine, precum și prin alimente sau apa contaminate.

Boala este frecventă în regiunile de creștere a animalelor, în rândurile crescătorilor de animale.

Profilaxia. Se vor depista și trata câinii purtători de tenie. Se extermină câinii vagabonzi. Viscerele de cornute care conțin chisturi hidatice nu vor fi date ca hrană câinilor.

Diagnosticul de laborator al hidatidozei umane se bazează pe examenul imunobiologic, punerea în evidență a anticorpilor specifici în serul bolnavului (organismului parazitat) cu ajutorul testelor cutanate (intradermoreacția Casoni), reacția de imunofluorescență și, recent, prin testul imunoenzimatic (ELISA) cu antigene specifice.

Tratamentul este reprezentat de extirparea chistului hidatic pe cale chirurgicală. În prezent se încearcă tratamente medicale cu mebendazol (Vermox), alături de alte medicamente.

1.2.2. Familia Diphylobothridae

Diphyllobothrium latum (botriocefalul)

Botriocefaloza este o boală parazitată datorată prezenței în tubul digestiv al omului a **botriocefalului** adult.

Morfologia parazitului. Este cel mai mare cestod al omului, măsurând în medie, 5-10 m, putând ajunge uneori la 15 m.

Scolexul este ovalar, de 2-3 mm mărime, lipsit de rostru, de ventuze și de cârlige. Prezintă două șanțuri longitudinale numite **botridii**, cu ajutorul cărora botriocefalul se

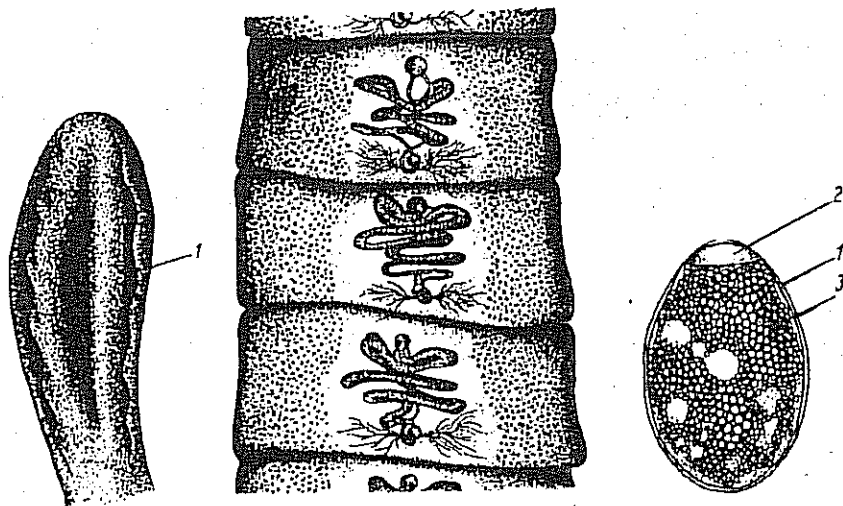


Fig.47. *Diphylobothrium latum*: 1 - scolex. Fig.48. *Diphylobothrium latum* - proglote Fig. 49. Oul de botriocercal: 1 - înveliș extern; 2 - opercul; 3 - bule de vitelus.

va prinde de mucoasa intestinală (fig. 47, 1). Gâtul lung și subțire, este urmat de strobilă.

Strobila este formată dintr-un număr foarte mare de proglote (3 000 - 4 000). Proglotele de botriocercal sunt mult mai late decât lungi (fig. 48). Pe linia mediană se află uterul plin cu ouă. Uterul prezintă un orificiu care comunică cu lumenul intestinal al gazdei și prin care sunt eliminate în mod continuu ouăle, pe măsură ce acestea se formează. Din acest motiv, proglotele bătrâne de botriocercal nu sunt pline cu ouă, ca ale *Taeniei sanguinata* sau *Taeniei solium*.

Oul este mare, 74x45 μ, și prezintă la unul din poli un mic căpăcel numit opercul (fig. 49, 2). Spre deosebire de ouăle celorlalte cestode studiate, nu sunt embrionate în momentul eliminării lor. În ou se observă o masă vitelină (nutritivă) granulară 3.

Ciclul biologic. Pentru ca embrionarea ouălor să aibă loc, acestea trebuie să ajungă în mediul acvatic. Embrionarea lor are loc în interval de 3-5 săptămâni, în funcție de temperatura apei. Odată format, embrionul părăsește oul împingând operculul și ajunge liber în apă. Această primă formă larvară, care este un embrion hexacant numit *coracidium* sau *oncosferă ciliată*, prezintă la exterior o membrană ciliată cu ajutorul căreia poate înota liber în apă. Înghițită de un crustaceu mic - *Cyclops strenuus* sau *Diaptomus gracilis* - își pierde cili, străbate peretele tubului digestiv al crustaceului, ajunge în cavitatea lui generală și începe să crească. Se transformă în două-trei săptămâni într-o larvă procercoică.

Dacă crustaceul este înghițit de un pește răpitor: știucă, biban sau mihalț, procercoicul traversează peretele tubului digestiv al peștelui și se fixează în musculatură sau în organe, în special în ovare (icre), unde se transformă în larvă plerocercoidă de 1-2 cm lungime. Această larvă are un aspect vermiform, la care se schițează botridiile. Larva plerocercoidă este ingerată de om sau de animale, odată cu carnea sau icrele de pește. Larva plerocercoidă se fixează pe peretele intestinal și se transformă în botriocercal adult, închizându-se în felul acesta ciclul de evoluție al viermelui.

Rolul patogen. Ca și la teniaze, simptomatologia botriocercalozei poate îmbrăca aspecte multiple, ca de exemplu:

- tulburări digestive cu modificări ale apetitului, tulburări dispeptice, ca greață, vărsături, dureri abdominale;
- tulburări nervoase, ca cefalee, amețeli, iritabilitate, scăderea puterii de muncă.

Epidemiologie. Izvorul de infecție îl constituie omul și animalele domestice (câinele, pisica, porcul) sau sălbatice (vulpea, ursul). Focarele de botriocercaloză sunt răspândite în jurul bazinelor mari de apă, unde populația este o mare consumatoare de pește. Omul se infectează prin ingerarea peștelui, care nu a fost bine prelucrat termic, sau prin icre insuficient prelucrate (plerocercoidii mor în soluții foarte sărate sau acide).

Diagnosticul de laborator este ușor de stabilit prin evidențierea ouălor în fecale, deoarece parazitul elimină ouăle direct în intestin.

Tratamentul teniazelor și al botriocercalozei se face cu Niclosamid sau Praziquantel, numai sub supraveghere medicală.

1.2.3. Familia Hymenolepidae

Plathelminții din această familie prezintă următoarele caracteristici:

- proglotele au o formă trapezoidală, fiind mai mult late decât lungi, spre deosebire de tenii de la care segmentele se alungesc progresiv, ultimele segmente fiind mai lungi decât late;

- porul genital se găsește totdeauna situat pe aceeași parte a strobilei, în timp ce la familia teniide porul genital alternează pe ambele părți ale segmentelor.

Ca reprezentanți ai acestei familii sunt cunoscute două specii: **Hymenolepis nana** și **Hymenolepis diminuta**.

Hymenolepis nana

Himenolepidoza este o boală parazitară destul de frecventă mai ales la copii, datorită prezenței în tubul digestiv al omului a helmintului *Hymenolepis nana*.

Morfologia parazitului. *Hymenolepis nana* este cel mai mic cestod al omului, având talia de 2-4 cm, fiind cunoscut sub numele de tenia mică.

Are un scolex (fig. 50, a) prevăzut cu patru ventuze 1, iar în regiunea apicală se află o infundătură în care se găsește invaginat un rostru scurt, gros, retractil, cu un

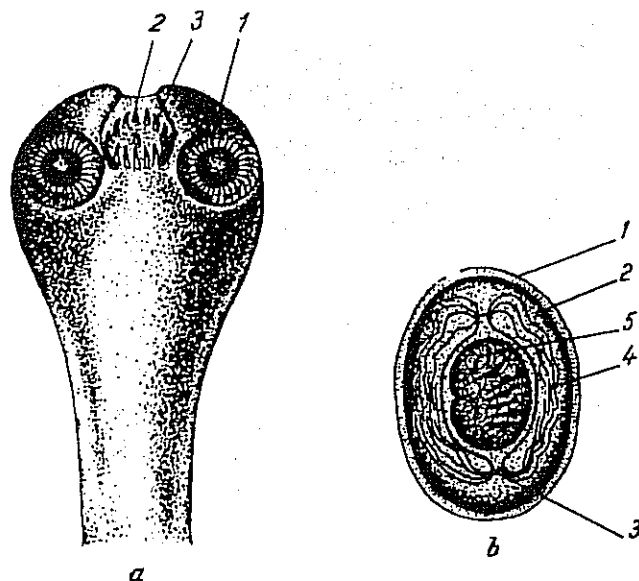


Fig. 50. *Hymenolepis nana*:

a - scolex; 1 - ventoză; 2 - rostru; 3 - coroană cu cârlige; b - ou; 1 - înveliș extern; 2 - înveliș intern; 3 - mamelon polar; 4 - prelungiri flagelare; 5 - embrion.

rând de cârlige 2. Gâtul scurt este urmat de un număr mare de proglote mai mult late decât lungi. Proglotele bătrâne prezintă organele reproducătoare atrofiate, rămânând doar uterul dezvoltat plin cu ouă. Aceste segmente îmbătrânite se distrug chiar în intestin, iar ouăle eliberate se vor găsi în număr mare în fecalele celor parazitați.

Oul este oval, de talie mare (50-60 μ), prezintă un dublu înveliș (fig. 50, b). Cel extern este foarte subțire și transparent 1. Înăuntrul lui se găsește un al doilea înveliș, tot oval, având la cei doi poli două proeminente, semănând astfel cu o lămâie 3. Din proeminente se desprind 4-6 flageli, care ocupă spațiul dintre cele două învelișuri 4.

În interiorul acestui înveliș se găsește embrionul cu șase cârlige (embrion hexacant) 5.

Ciclu biologic. Ouăle puse în libertate în intestin sunt eliminate în exterior odată cu fecalele. *Hymenolepis nana* este un cestod monoxen, adică, spre deosebire de alți viermi studiați, nu are nevoie de o gazdă intermediară pentru dezvoltarea lui, atât în formă larvară, cât și ca adult. Ouăle sunt introduse în tubul digestiv al omului unde embrionii eliberați (oncosferele) pătrund într-o vilozitate intestinală și se transformă, în două până la patru zile, într-o larvă numită *cistercoïd*. După trei zile, cistercoïdul crește destul de mare pentru a rupe vilozitățile intestinale în care s-a dezvoltat și revine

în intestin, unde se prinde cu scolexul de peretele intestinal, cu ajutorul ventuzelor și cârligelor lui și în 10-12 zile parazitul ajunge adult.

Efectul patogen este reprezentat de:

- tulburări digestive, dureri abdominale, tranzit intestinal modificat, diminuarea poftei de mâncare;
- tulburări nervoase datorită toxinelor parazitului; bolnavii fac tulburări auditive și mai ales vizuale;
- modificări în starea generală a bolnavului: bolnavii se plâng de dureri de cap și de amețeli; unii copii învață greu, au o atenție difuză, rețin greu lecțiile, sunt apatici și fără putere.

Epidemiologia. Datorită faptului că purtătorii de *Hymenolepis nana* răspândesc ouă gata embrionate, există posibilitatea infectării celor din jur prin transmisiune directă. Boala este răspândită pe întregul glob, cu frecvența mai ridicată în colectivitățile de copii.

Diagnosticul de laborator se face prin punerea în evidență a ouălor de *Hymenolepis nana*, prin examen coprologic direct sau prin metoda de concentrare Willys.

Tratamentul teniazelor se face cu Niclosamid (Yomesan, Fenasal ș.a.) în serii repetate, sub control de laborator.

2. ÎNGRENGĂTURA NEMATHELMINȚI

2.1. CLASA NEMATODE

Paraziții din această clasă se caracterizează prin:

- formă cilindrică alungită, ascuțită la cele două extremități;
- simetrie bilaterală;
- corp nesegmentat;
- tub digestiv, în majoritatea cazurilor complet, alcătuit din esofag, intestin și rect; esofagul poate fi de tip strongiloid, atunci când prezintă o singură umflătură, sau de tip rabditoïd, când prezintă două umflături despărțite printr-o gâtuitură;
- sexe separate;
- corp acoperit cu o cuticulă formată din chitină.

2.1.1. Familia Trichinellidae

Trichinella spiralis

Trichinella spiralis este un nematod mic. Femela, de 3-4 mm, are culoarea albă și o formă cilindroconică, cu extremitatea anterioară mai subțire, iar cea posterioară mai îngroșată și terminată în unghi obtuz. Masculul este mai mic, lung de 1,5-2 mm și prezintă partea posterioară lătită.

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

Femelele sunt vivipare. Ele pătrund în grosimea peretelui intestinal unde vor depune larvele, lungi de 90-100 μ și groase de 6 μ . Aceste larve, urmând calea sanguină, se răspândesc în organism, sfârșind prin a se localiza, de obicei, în mușchii intercostali, masticatori, ai limbii, în mușchii globilor oculari, în regiunea din apropierea tendoanelor. În acești mușchi, larva pătrunde în interiorul fibrelor musculare pe care le lezează. Rezultă o formație ovoidă, de 500 x 1250 μ , cu axul mare în lungul fibrelor, cu peretele stratificat, care se numește *chist de trichină* (fig. 51).

În interiorul acestui chist se găsește o larvă cilindrică, ascuțită la extremități. Aceasta fiind lungă de 1 mm, se răsucesc în spirală în interiorul chistului, de unde și numele.

Ingerarea de carne infectată de către o nouă gazdă va duce la eliberarea larvelor, care ajungând în intestin vor începe un nou ciclu biologic.

Se remarcă faptul că parazitul nu are o evoluție liberă în afara organismului, că 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 parazitologiei intestinale și se caracterizează printr-un catar intestinal provocat de iritațiile mecanice ale parazitilor sau de toxinele ce se eliberează din larvele închistate. Temperatura începe să crească, pentru ca la sfârșitul primei săptămâni să ajungă la 40°C. În această perioadă intervin dureri abdominale, grețuri, vărsături, diaree.

– Perioada a II-a, de răspândire a larvelor în organism, se caracterizează prin febră în platou, dureri reumatoide, edem facial și în special palpebral foarte accentuat. Bolnavii acuză, datorită localizărilor musculare ale larvelor, jenă la respirație,

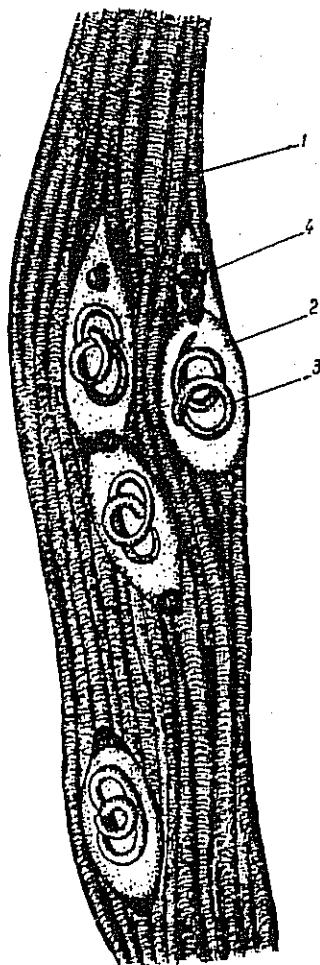


Fig. 51. Mușchi cu larve de *Trichinella spiralis*:
1 - fibră musculară; 2 - chist;
3 - larvă spiralată.

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

– Perioada a III-a, de închistare a larvelor în mușchi, se caracterizează printr-o intoxicație din ce în ce mai marcată ce poate duce la moartea bolnavului. Dacă, însă, bolnavul rezistă până la a 7-a săptămână de boală, perioadă la care îngroșarea 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 zoonoză. Rolul principal de rezervor de *Trichinella* în natură îl au șobolanii care, devorându-se între ei, permanentizează acest rezervor. Cadavrele rozătoarelor parazitare, frecvent întâlnite lângă crescătoriile de porci, sunt mâncate de aceștia. Ajunse în intestinul porcului larvele se dechistează și urmează ciclul evolutiv cunoscut, pentru ca, în final, să se ajungă la larvele închistate în mușchii acestuia.

Omul se îmbolnăvește consumând carne de porc infectată cu *Trichinella*, carne necontrolată prin examenul trichinoscopic obligatoriu în cazul sacrificărilor de animale la abatoare sau la domiciliu și efectuat de organele sanitar-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 faza intestinală se utilizează Piperazina și, recent, Mebendazolul sau Fluobendazolul. În perioada de diseminare se folosesc cu bune rezultate tratamentul cu corticosteroizi sub protecție de antibiotice, vitamino- și calciterapie cu Thiabendazol, ca medicament specific.

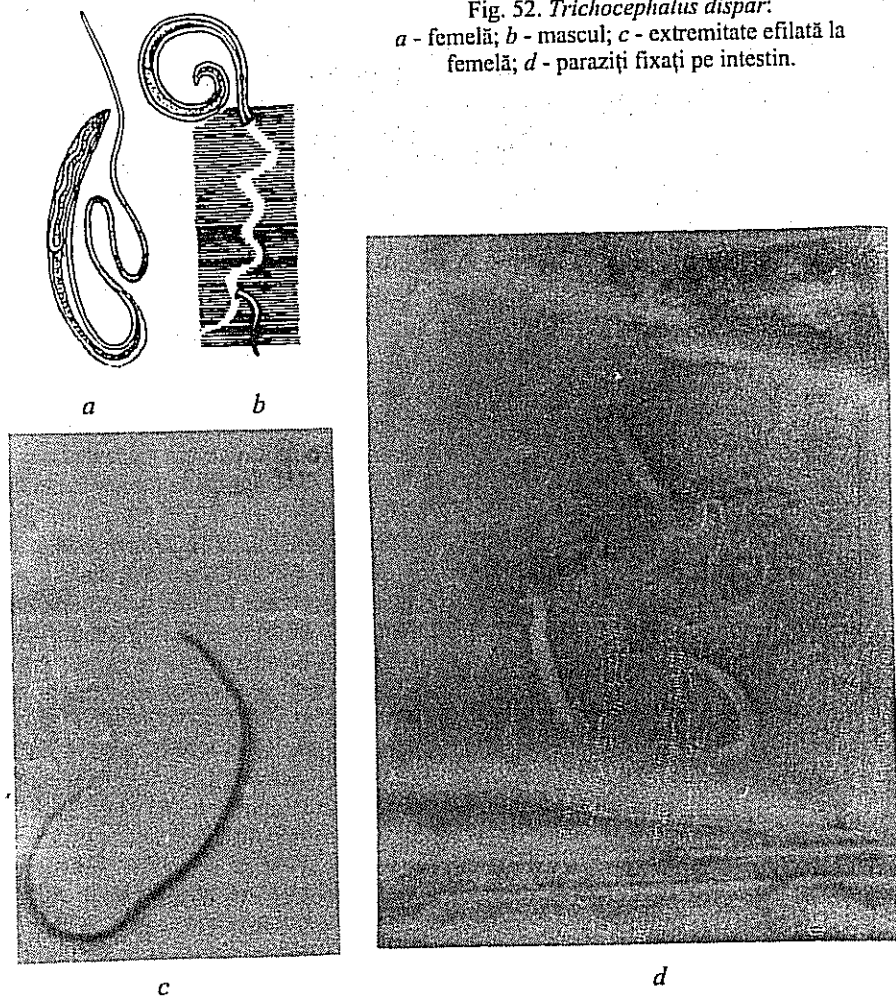
Profilaxie. În primul rând se vor lua măsurile necesare care să ducă la prevenirea infectării porcilor. În acest sens se va duce o luptă continuă contra șobolanilor din preajma crescătoriilor de porci, prin deratizări sistematice, cu strângerea și incinerarea tuturor cadavrelor.

Va fi interzisă consumarea cărnii de porc provenită din tăieri clandestine. Orice tăiere, chiar în afara abatorului, va fi obligatoriu controlată de organele sanitar-veterinare prin examen trichinoscopic. Carnea consumată va fi bine fiartă.

Trichocephalus dispar

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

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



Masculul măsoară 3-4 cm lungime. Posterior, este recurbat în formă de cârjă. Raportul dintre partea anterioară și cea posterioară este de 3/2.

Femela, de 4-5 cm lungime, are același aspect ca al masculul, însă cu extremitatea posterioară 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.

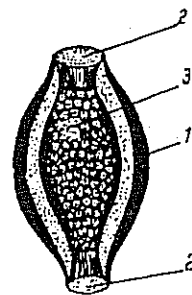


Fig. 53. Oul de
Trichocephalus dispar:
 1 - înveliș extern; 2 - dop
 albuminos; 3 - celulă-ou
 cu resturi viteline.

Trichocephalus se înfige cu partea anterioară în grosimea peretelui intestinal, între vilozitățile acestuia, pe care-l "însăilează" (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.

Ciclu evolutiv. În regiunea cecală, locul de elecție pe care-l parazitează, adulții se acuplează.

Femela depune în lumenul intestinal, unul câte unul, ouăle care, odată cu materiile fecale, ajung în mediul exterior.

Ouăle au o formă asemănătoare unei lămâi, datorită celor două proeminențe de la cei doi poli (fig. 53, 2). Sunt mari de

50x20 μ, au un înveliș neted și culoarea în general brună. În mediul extern, după o perioadă de timp, condiționată de umiditate și temperatură, ouăle embrionează. Ouăle embrionate, 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 reiau ciclul.

Rolul patogen. Este unul din paraziții frecvent întâlniți la noi.

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

Epidemiologie. Rezervorul *trichocefalozei* umane este omul. Mediul extern, 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 irigare, când acestea conțin și ape menajere provenite din conducta de canalizare a orașelor, sau prin întrebuințarea reziduurilor fecaloide la îngrășatul terenurilor de cultură. De pe sol, prin intermediul zarzavaturilor, al fructelor, mâinilor murdare etc., ouăle parazitului pot ajunge în tubul intestinal al omului (transmisiune 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 geohelminț. 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 sanitară, în special acolo unde se constată deficiențe pe linia dreptinderilor igienice. Măinile vor fi spălate cât mai des și, mai

ales, după mișcările ce duc la contact cu solul. Fructele și zarzavaturile nu vor fi consumate decât după spălare la un curent de apă și înmuiere în apă fiartă.

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

2.1.2. Familia Ascarididae

Ascaris lumbricoides

Ascaridul este un nematod de culoare albă-gălbuie, uneori roz, cu capetele ascuțite. Este cel mai lung vierme cilindric al omului.

Masculul măsoară 15-20 cm lungime, iar femela 20-25 cm. La extremitatea anterioară prezintă orificiul bucal înconjurat de trei buze proeminente și dințate. Extremitatea posterioară a parazitului este dreaptă la femelă și recurbată în formă de cârjă la mascul.

Are un tub digestiv complet, reprezentat de un esofag de tip strongiloid, care se deschide într-un intestin ce se desfășoară pe axul corpului spre extremitatea posterioară, unde dilatându-se formează rectul. Acesta se deschide prin orificiul anal, care este situat subterminal, la mascul în concavitatea cârjei (fig. 54).

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

Aceste ouă nu sunt embrionate în momentul eliminării (fig. 55, a).

În mediul extern ouăle fecundate (fig. 55, b) se vor embriona, în funcție de temperatură și umiditate, într-o perioadă de 10-40 de zile.

În interiorul oului embrionat ia naștere o larvă cu aspect vermiform, de 250 μ , mobilă. Larva năpârlește în interiorul oului, și din acest moment oul devine infectant pentru om.

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

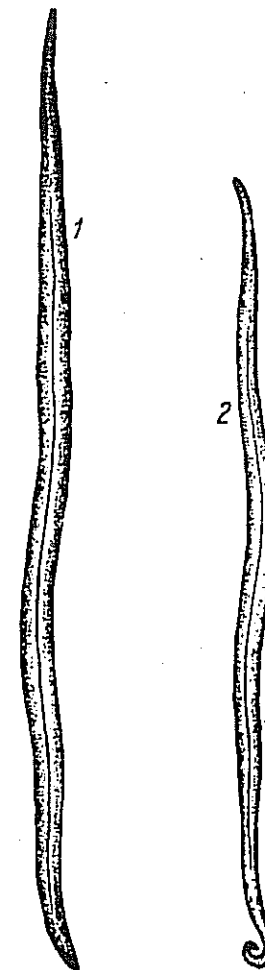
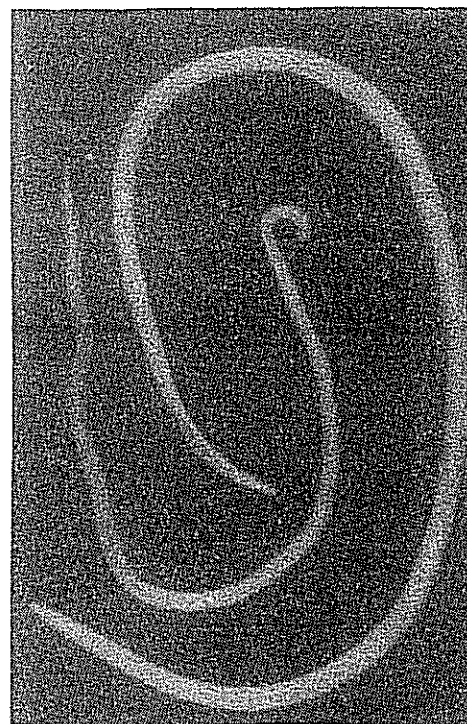
Larva, nefiind adaptată condițiilor pe care i le oferă cavitatea intestinală, străbate peretele intestinal și, pe calea venei porte, ajunge la ficat, unde, rămânând timp de aproximativ 4 zile, și crește până la 400 μ (fig. 56, b).

Prin venele suprahepatice larva trece în vena cavă și apoi prin mica circulație ajunge la nivelul capilarelor alveolelor pulmonare unde face un alt popas de 5-7 zile. Aici continuă să crească, ajungând la 1.000 μ .

Larva perforază peretele alveolei și ajunge în lumenul ei. Cu ajutorul cililor vibrațiali ai celulelor epiteliale ce tapetează arborele respirator, larvele ajung în cavitatea bucală. Unele din ele sunt eliminate cu sputa, iar altele, înghițite, ajung din nou în intestin.

Drumul acesta este cunoscut sub numele de *ciclu perienteric*.

Fig. 54. *Ascaris lumbricoides*:
a - imagine foto a ascaridului femel și mascul;
b - reprezentarea schematică: 1 - ascarid femel;
2 - ascarid mascul.



În intestinul subțire, larvele devenite adulte se vor acupla. După 2-3 luni, femelele vor începe să depună ouă.

Rolul patogen. Boala, numită *ascaridoză*, se face cunoscută printr-o serie de tulburări clinice caracteristice cele două faze: larvară și adultă.

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

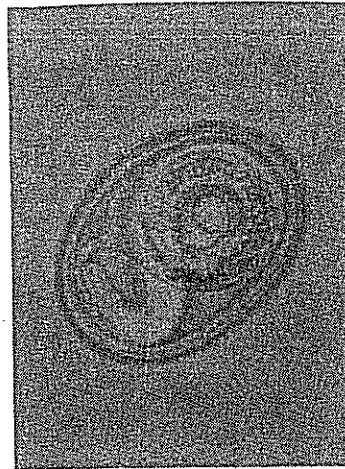
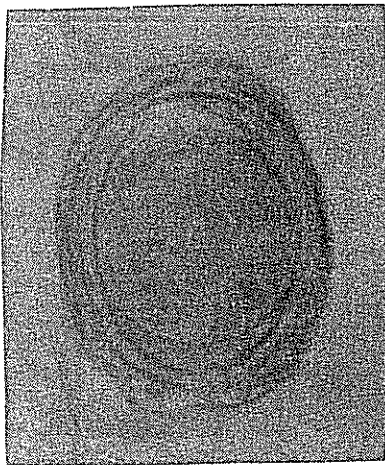


Fig. 55. Ouă de *Ascaris lumbricoides*:
a - ou fecundat, dar neembrionat; b - ou fecundat embrionat - infectant.

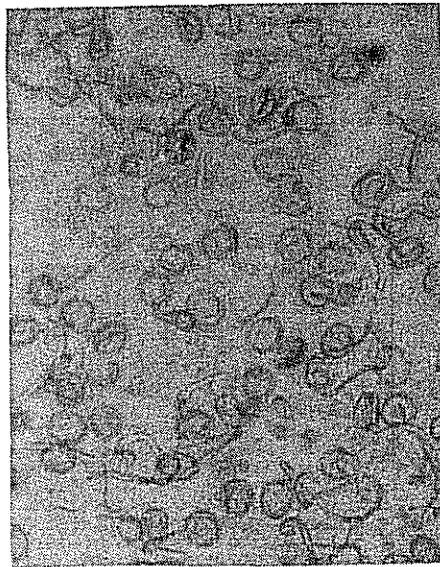


Fig. 56. Larve de *Ascaris lumbricoides*:
a - eclozate la nivelul intestinului; b - în ficat de om.

În faza a doua, intestinală, sunt caracteristice durerile abdominale, însoțite de greață, sialoree, balonări, modificări de apetit, tulburări de tranzit, cefalee, amețeli, prurit nazal și anal, anemie.

Epidemiologie. Omul purtător de ascarizi este singurul rezervor al ascaridozei umane.

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

Contagiunea directă nu este posibilă, numai cea mediată prin sol.

Boala are frecvență ridicată în zonele tropicale, subtropicale și cu climă temperată. Incidența este mai ridicată la copii.

Tratament. Piperazina este medicamentul cel mai 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 îngrășarea terenurilor după compostare cu gunoi menajer.

Se va duce o intensă activitate de educație sanitară pentru a arăta modul de infectare, necesitatea spălării mâinilor murdare, necesitatea spălării cu apă curentă și apoi clocotită, înainte de consum, a fructelor și zarzavaturilor care se consumă crude și în special a celor care au fost cultivate pe terenuri irigate sau îngrășate 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 cârjă (fig. 57, b, 2).

Ciclul evolutiv. Oxiurul trăiește ca adult în cecum. El este singurul vierme cilindric la care femela nu depune ouăle pe măsură ce acestea se formează, ci le reține pe toate în uter, care se dilată considerabil. O femelă conține în jur de 10 000 de ouă.

Ouăle au formă ovală, asimetrică, cu o față plană și una convexă, având dimensiuni cuprinse între 50-55x20-25 μ . Culoarea este albă, ușor cenușie, transparentă.

Ouăle embrionează în uter. Embrionul, cu o porțiune ovoidă mare și o codiță recurbată, seamănă cu un mormoloc de broască și, de aceea, se numește *embrion giriniform*.

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. Embrionul giriniform se transformă într-un interval de câteva ore într-o larvă vermiformă, lungă de 140 μ , care se îndoaie în interiorul oului. Din acest moment oul devine infectant.

Introdusă din nou în tubul intestinal, prin intermediul mâinilor nespălate, larva va fi eliberată sub acțiunea sucurilor gastrice și, continuându-și drumul, se va dezvolta în prima parte a intestinului subțire, unde adulții se acuplează și trec apoi în colon, reluând astfel ciclul.

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

Trebuie semnalat în mod deosebit rolul acestui parazit în provocarea apendicitei.

Epidemiologie. Sursa de infecție este reprezentată de omul bolnav.

Ouăle, depuse în regiunea perianală și care în câteva ore devin infectante, sunt luate în timpul gratajului pe mâini și în special sub unghii și apoi introduse în gură, sau pe alimente, de copiii care își sug degetele sau nu se spală pe mâini înainte de a mânca (transmisie directă).

Boala este răspândită pe întregul glob, cu frecvență mai ridicată în colectivitățile de copii.

Diagnosticul de laborator. De cele mai multe ori, bolnavul recoltează parazitul de pe suprafața bolului fecal și atunci identificarea este făcută macro- și în special microscopic.

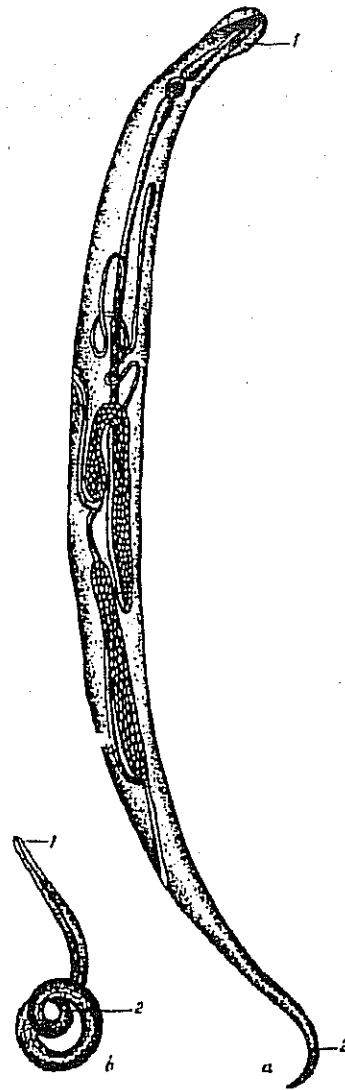


Fig. 57. *Oxiur*:
a - femelă; b - mascul;
1 - extremitatea anterioară;
2 - extremitatea posterioară.

Examenle 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 - pliurilor perianale.

Ouăle vor fi recoltate din acest loc cu o baghetă de sticlă al cărui capăt se învelește fie într-o foiță de celofan, fie cu o peliculă de colodiu.

În laborator foița 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. Oxiuroza se poate trata cu derivați de piperazină (Nematocton), cu pamoat de pirvinium (Vermigal), cu pamoat de pyrantel (Combatrin) sau cu Mebendazol (Vermox), asociate cu tratament local al regiunii perianale.

Profilaxie. Lupta va fi încununată de succes dacă, ținând seama de marea contagiozitate, odată cu tratarea bolnavului vor fi tratați toți membrii familiei.

Bolnavul va fi instruit să respecte regulile de igienă personală, pentru a împiedica atât răspândirea, cât și autoinfestarea.

2.1.4. Familia Ankylostomidae

Ankylostoma duodenale

Ankylostoma duodenale este un nematod mic, care prezintă la partea anterioară o formațiune ovală, chitinoasă, *capsula bucală*, cu care parazitul se prinde de mucoasa intestinală.

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

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

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 femelă poate depune în 24 h până la 10 000 de ouă. Acestea sunt eliminate în intestin, pe rând, și de aici în mediul extern odată cu materiile fecale. Au o formă ovalară, un înveliș simplu și subțire, culoare albă-transparentă și măsoară 60x40 μ .

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

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

Numai mediul extern poate oferi oului condițiile necesare dezvoltării: temperatură

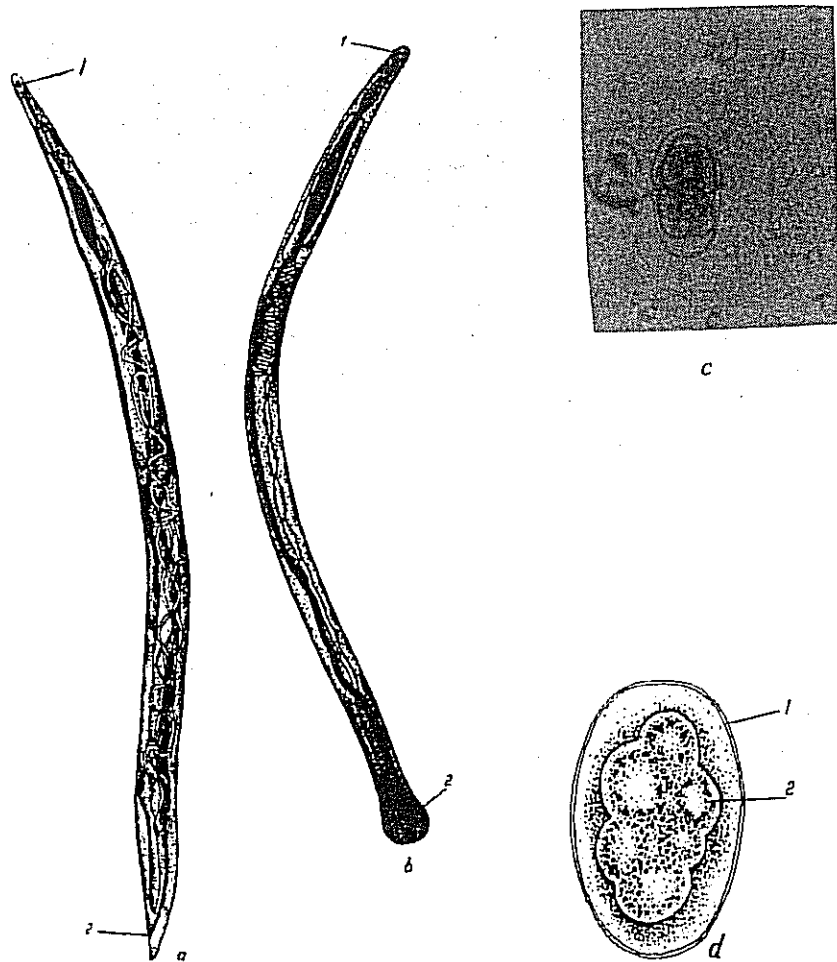


Fig. 58. *Ankylostoma duodenale* (adult):
a - femelă; *b* - mascul; 1 - capsulă bucală; 2 - extremitatea posterioară; *c* - ou de *Ankylostoma duodenale* văzut la microscop; *d* - ou de *Ankylostoma duodenale* (desen schematic); 1 - înveliș extern; 2 - blastomere.

între 14 și 37°C, umiditate, oxigen și obscuritate. În aceste condiții, segmentarea continuă cu o rapiditate care-i permite ca în 24 h să formeze embrionul.

Acest embrion perforază coaja subțire a oului. Este primul stadiu larvar care are

esofagul rabditoid. Larvele pot să aibă esofagul de tip strongiloid, atunci când prezintă o singură umflătură, sau de tip rabditoid, când prezintă două umflături despărțite printr-o gâtuitură.

După 3 zile năpârlește din nou, rezultând al doilea stadiu larvar, cu esofagul de tip strongiloid. Acesta va năpârli din nou după alte 2 zile, dar păstrează cămașa de năpârlire, fapt pentru care se numește larvă strongiloidă închistată sau larvă de stadiul III. În acest stadiu măsoară 500 μ și este infectantă. Rezistența ei este deosebită, putând trăi câteva luni fără să se hrănească.

Prezintă o serie de tropisme:

– geotropism negativ: larvele au tendința de a se ridica pe suporturi, depărtându-se de pământ;

– higrotropism pozitiv: larvele se îndreaptă spre locuri umede;

– termotropism pozitiv: larvele se întrepră spre locurile calde;

– histotropism pozitiv: larvele au tendința de a pătrunde în țesuturi.

Datorită acestuia din urmă, pătrunde în organismul cu care vine în contact prin piele. Această pătrundere se face foarte repede, în 3-4 min.

Prin circulație, sau direct prin țesutul conjunctiv, ajung la plămâni, de unde, pe calea ascendentă a arborelui respirator și apoi descendent, pe calea digestivă, se localizează în intestin unde, dezvoltându-și capsula bucală, se fixează și se transformă în adult.

Ciclul perienteric durează aproximativ 10 zile.

Rolul patogen. Boala provocată de acest parazit se numește *ankylostomiază*. Manifestările clinice sunt în raport cu intensitatea parazitării.

Se realizează, în primul rând, o anemie hipocromă progresivă datorită consumului de sânge, adultul fiind hematofag, și sângerărilor ulterioare ale plăgilor datorită unor substanțe eliberate de parazit.

Bolnavii acuză dureri abdominale, greață, tulburări de tranzit. În scaun se pune întotdeauna în evidență sânge digerat.

Epidemiologie. Rezervorul este reprezentat de omul infectat. Ouăle încep să fie eliminate la 45 de zile de la infectare. Fecalele bolnavului răspândite pe sol vor polua și contribui la întreținere infectărilor.

Condițiile favorabile ca: umezeala, oxigenul și temperatura între 14 și 37°C permit evoluția oului într-un timp destul de scurt, ajungându-se la stadiul de larvă infectantă, proprietate pe care o poate păstra până la 120 de zile.

Larvele pătrund în organism prin pielea mâinilor, picioarelor sau a trunchiului.

Boala este endemică în zone tropicale și subtropicale. În trecut prezența bolii a fost semnalată și la noi, în unele regiuni miniere, dar printr-un complex de măsuri aplicate de Ministerul Sănătății boala este în prezent complet eradicată.

Diagnosticul de laborator. Examenul coproparazitologic direct sau după concentrare pune cu ușurință în evidență ouăle de *Ankylostoma*, a căror identificare, în general, nu comportă dificultăți.

Tratament. Se administrează un derivat de bethovenium, cunoscut sub denumirea de Alcopar sau Naftamon, Levamisol asociat cu Mintezol sau pamoat de pyrantel, alături de tratamentul anemiei pe care o produce parazitul cu preparate ce conțin fier.

Profilaxie. Având în vedere gravitatea ankylostomiazii, se cer o serie de măsuri profilactice ce trebuie aplicate cu competență și seriozitate și orientate pe trei direcții:

1) *Împotriva rezervorului.* Prin examene coproparazitologice sistematice făcute, vor trebui depistați și tratați bolnavii și purtătorii inaparenți.

2) *Împotriva răspândirii bolii.* Se vor utiliza closete igienice.

3) *Protecția masei receptive.* Se va lucra numai cu îmbrăcăminte de protecție în zone endemice (cizme, salopetă etc.).

2.1.5. Familia Rhabditidae

Strongyloides stercoralis

Strongyloides stercoralis este un nematod foarte mic, care prezintă generații ce parazitează porțiunile superioare ale intestinului subțire, în grosimea căruia stau adâncite; alte generații duc o viață liberă, în mediul extern, la suprafața solului.

Aceste două forme (intestinală și în afara gazdei) se deosebesc atât de mult ca mod de organizare și mărime, încât s-a crezut că sunt doi paraziți distincți (fig. 59).

Femela, alungită, filiformă, cu extremitatea anterioară subțire, are un orificiu cu trei buze nedistincte. Esofagul este strongiloid.

Cele două utere conțin câte 4-5 ouă.

Forma liberă este mai mică, având numai 1,5 mm și are esofagul de tip rabditoid.

Uterele prezintă 30-40 de ouă.

Masculul, care nu se deosebește în cele două forme, are numai 0,7 mm și prezintă extremitatea posterioară ascuțită terminal și îndoită în formă de cârjă.

Ciclul evolutiv. În intestin, femela depune ouă ovoide, de 50-60x30-35 μ , cu un înveliș subțire și transparent, care permite ca în interior să se vadă o larvă rabditoidă, bine dezvoltată.

Această larvă, de 200-300 μ , se eliberează din ou și trece în cavitatea intestinală, de unde, odată cu materiile fecale, ajunge în mediul extern unde poate evolua pe două căi: directă sau indirectă.



Fig. 59. *Strongyloides stercoralis*
a - femelă intestinală;
b - femelă formă liberă.

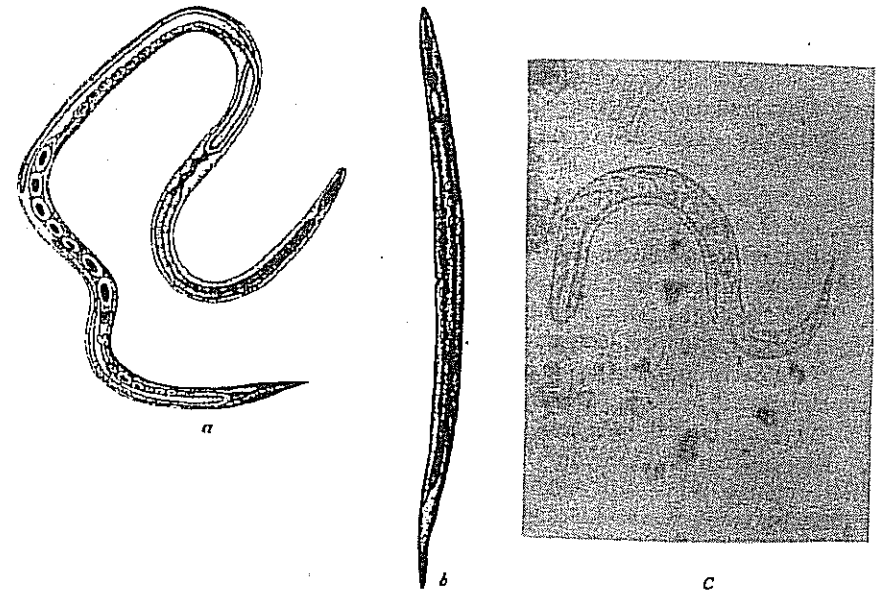


Fig. 60. Larvă de *Strongyloides stercoralis*:
a - larvă rabditoidă; b - larvă strongiloidă; c - imagine la microscop.

Pe cale indirectă, larvele pe suprafața solului se hrănesc, se dezvoltă și se transformă în adulți. Aceștia se vor acupla și apoi femelele vor depune ouăle ce măsoară 70-75 μ , din care uneori vor ieși larve chiar în uter. Sunt larve rabditoide ce ulterior vor deveni o nouă generație adultă.

Situația se repetă indefinit în condițiile unui mediu favorabil. În condiții nefavorabile, larvele se vor transforma în larve strongiloide sau filariforme, foarte fine, alungite, care sunt infectante pentru om. Sunt destul de rezistente și pe pământul umed pot supraviețui mai multe săptămâni (fig. 60, a, b, c).

În momentul în care vin în contact cu tegumentele unei gazde, pătrund și pe calea vaselor sanguine sau, străbătând țesutul conjunctiv, ajung în alveolele pulmonare, de unde, pe calea ascendentă a căilor respiratorii și descendentă digestivă, ajung până la nivelul intestinului. Aici femela fecundată se îngroapă în peretele intestinal, depune ouă și ciclul se repetă.

Pe calea indirectă are loc o evoluție mai simplă: larva rabditoidă, eliminată în exterior cu materiile fecale, năpârlește și se transformă în larvă infestantă strongiloidă, liberă pe sol, care apoi va pătrunde pe cale bucală sau cutanată în organismul gazdei, unde se transformă în adult.

Nu se cunosc cauzele care fac ca evoluția să se desfășoare pe calea directă sau indirectă.

Timpu scurs din momentul infectării până la eliminarea larvelor rabditoide este de 3-4 săptămâni.

Rolul patogen. Atunci când infectarea este masivă, apar tulburări evidente ce pot fi sistematizate astfel:

– **cutanate:** consecința toxinelor și inculărilor bacteriene, elemente papulare, urticariene, dermatite;

– **gastrointestinale** (în faza a treia a bolii): fenomene de enterită ulceroasă, dureri abdominale, în special în hipocondrul drept, grețuri, vărsături.

Epidemiologie. Sursa de infectare este reprezentată de omul bolnav în ale cărui fecale se găsesc larve infectante.

Pătrunderea în organism se poate face atât pe cale cutanată, cât și bucală, cu apa sau alimentele, în special prin fructele și zarzavaturile infestate.

În general, răspândirea bolii este legată de poluarea solului cu dejectele omului.

Diagnosticul de laborator. Diagnosticul parazitologic poate fi pus prin examenul bilei obținute prin tubaj duodenal, ca și al materiilor fecale făcute imediat după eliminare, sau prin metoda coproculturii pe cărbune în care se identifică larvele rabditoide.

Tratamentul este reprezentat de utilizarea derivațiilor de Thiabendazol, Mebendazol sau pamoat de pirvinium.

Profilaxia se asigură prin tratamentul celor parazițați și inactivarea dejectelor acestora.

Se vor respecta regulile de igienă pentru a preveni autoinfectarea, evitarea mersului cu picioarele goale pe terenurile pe care se pot găsi larve infectante.

Cap. XXX. ENTOMOLOGIE

Entomologia (*entomon* = insectă, *logos* = descriere) este știința care se ocupă cu studiul insectelor. Entomologia medicală studiază artropodele – vectori ai bolilor parazitare sau producători de boli.

Artropodele sunt ființe nevertebrate care posedă picioare articulate (*artron* = articulație, *podos* = picior), au simetrie bilaterală, corpul este compus din articule (segmente) și acoperit cu chitină care nu are aceeași duritate pe toată suprafața.

La limita dintre segmente chitina este moale, asigurând mobilitatea animalului. Datorită acestui înveliș chitinos, dezvoltarea artropodului se face prin năpârliri sau metamorfoză.

Din încrângătura artropodelor **subîncrângătura Traheata** interesează entomologia medicală.

Traheatele sunt artropode cu respirație aeriană, care se realizează printr-un sistem de ramificații arborescente, denumite trahee, care pătrund până în intimitatea tuturor țesuturilor.

Din această subîncrângătură interesează parazitologia următoarele clase:

Clasa Arachnidae, care cuprinde ființe cu corpul format din două segmente: cefalotorace și abdomen sau, la alte exemplare, dintr-un singur segment, rezultat din sudarea tuturor părților corpului. Sunt lipsite de antene și au patru perechi de picioare.

Clasa Insecta, ai căror reprezentanți au corpul format din trei porțiuni: cap, torace, abdomen, și din trei perechi de picioare.

I. CLASA ARACHNIDE

Arachnidele sunt artropode terestre care au respirație traheală sau cutanată.

Acarienii (*ordinul acarieni*) se caracterizează printr-un corp format dintr-un singur segment (cefalotoracele este sudat cu abdomenul), cu metamorfoză completă, în stadiul larvar au 3 perechi de picioare, iar în stadiul de nimfă și adult, 4 perechi. Picioarele pot prezenta epimerite (îngroșări chitinoase) care servesc la inserția mușchilor.

Acarienii se divid astfel:

- cu respirație traheală – **familia Ixodidae** (paraziți temporari);
- cu respirație cutanată – **familia Demodecidae** și (paraziți permanenți) **familia Sarcoptidae**

I.1. FAMILIA IXODIDAE

Acești acarieni sunt "giganticii" ordinului: ei au o mărime cuprinsă între 2 și 20mm. Prezintă interes pentru:

- medicina umană, deoarece transmit mai multe boli, ca: febre recurente, febre exantematice, encefalite de căpușă, febra galbenă;

– medicina veterinară, fiind vectori ai unor protozoare care transmit animalelor domestice boli foarte grave.

Ixodele sunt hematofage în toate stadiile lor evolutive. Fiecare specie prezintă un tactism deosebit pentru o anumită gazdă, dar, în lipsa acesteia, se pot hrăni și pe gazdele accidentale.

Ixodes ricinus

Caractere morfologice. Adultul este *căpușa vitelor sau a oilor* și prezintă un rostru lung, situat în prelungirea corpului, deci terminal. Rostrul este alcătuit dintr-un hipostom, înconjurat de numeroși spini recurenți cu ajutorul căruia căpușa pătrunde în tegument și se fixează puternic, neputând fi scoasă decât cu greutate. De o parte și de alta a hipostomului se găsesc doi palpi maxilari și două chelicere (mandibule), care sunt terminate cu un fel de "dinți". Aceștia se mișcă în lungul hipostomului dinainte-înapoi, tăind astfel tegumentul. Masculul posedă o placă chitinoasă, care acoperă în întregime fața dorsală, iar pe fața centrală alte plăci chitinoase mai mici. Femela nu posedă decât o singură placă chitinoasă, situată pe fața dorsală. Au 4 perechi de picioare terminate cu două gheare și o ventuză (ambulacru). Respirația se face printr-o pereche de orificii respiratorii (stigmat) dispuse lateral după a 4-a pereche de picioare.

Evoluție. Femela se fixează periodic pe animale-gazdă și se hrănește cu sânge. Restul timpului stă pe sub frunzișul arborilor, ducând o viață liberă. Masculii sug numai rareori sânge, sunt foarte vioi și aleargă pe pielea gazdei în căutarea femelelor. Ei mor imediat după fecundare. Mărimea lor variază după felul cum sunt hrăniți. De la 3-4 mm înainte de supt, ajung la 10-11 mm după un prânz hematofag, respectiv cât un bob de ricin cu care se aseamănă și la culoare, de unde vine și numele speciei.

Femelele depun primăvara, pe sol, printre ierburi, un număr foarte mare de ouă, circa 3 000, învelite într-o masă gelatinoasă.

După depunerea ouălor, femela moare. Din ouă ies larve hexapode (cu 6 picioare), care pentru a evolua au nevoie să se hrănească cu sânge. Ele stau pe frunzele arborilor din pădure, așteptând trecerea unui animal (bou, oaie, capră) sau om. Își dau drumul pe corpul gazdei, se fixează cu rostrul și încep să se hrănească câteva zile. Dacă nu întâlnesc gazda respectivă, larvele pot rezista la inaniție până la 1 an. După ce au supt suficient sânge, se desprind de pe gazdă și se retrag pe sol sau pe frunzele arborilor, unde duc o viață liberă de circa o lună. După aceasta năpăresc, transformându-se în nimfe octopode (cu 8 picioare) care se aseamănă cu adulții, dar nu au organele de reproducere dezvoltate. După un nou prânz hematofag și o nouă viață liberă de circa două luni, se transformă în adulți masculi și femele. Adulții atacă din nou o gazdă, care reprezintă a treia gazdă în ciclul evolutiv. În acest timp se vor împerechea.

Evoluția durează 5-9 luni, în funcție de temperatură. În țara noastră acest acarian are o singură generație pe an. Foarte important este faptul că este deosebit de rezistent la inaniție.

Gazdele pe care le parazitează *ixodele* sunt: bou, oaia, capra și, uneori, omul.

Înțepătura este dureroasă însoțită de un proces inflamator datorită secreției salivare, precum și datorită ruperii rostrului în tegument.

Modul de transmitere. Venind în contact cu frunzișul pădurilor, cu ierburile pe care se află larve, nimfe sau adulți de ixode, acestea vor trece pe pielea omului sau a animalului.

Rolul patogen. Pătrunderea sub piele a secreției salivare provoacă o iritație locală, însoțită de prurit foarte supărător, leziuni de grataj care se pot infecta.

Ixodele pot transmite diferite boli ca: febra purpurică a munților stâncoși, febra butunoasă, tifosul endemic, encefalite virotice etc., iar la noi – encefalita și tularemia.

Se mai poate cita căpușa câinelui (*Rhipicephalus sanguineus*), care are importanță prin faptul că poate transmite omului febra butunoasă și febra Q.

1.2. FAMILIA DEMODECIDAE

Această familie cuprinde acarieni cu corpul alungit, vermiform.

Demodex folliculorum

Morfologie. Adultul are o formă alungită, cu aspect vermiform: femela este mai mare decât masculul (330 μ față de 300 μ). Rostrul cu cefalotoracele ocupă 1/3 din lungimea totală. Prezintă patru perechi de picioare foarte scurte, formate din trei articole, care se sprijină pe epimerite transversale. Posterior, corpul prezintă strițiuni transversale. Pe partea ventrală se găsesc orificiul genital (femel sau mascul) și orificiul anal (fig. 61). Ouăle sunt fusiforme cu dimensiuni de 60x40 μ .

Evoluție. Din ouă ies larve apode, care devin hexapode. Acestea se transformă în nimfe octopode, care după năpărliri devin adulți. Numai în acest stadiu este infestat omul.

Modul de transmitere: prin contact direct.

Gazde: omul, câinele, pisica.

Localizare: în foliculii piloși, la rădăcina firului de păr din regiunea bărbii, unde se hrănesc cu produsele glandelor sebacee.

Diagnosticul de laborator. Se examinează la microscop cu obiectivul 3 și 7, substanța albă extrasă prin presiunea glandelor sebacee sau produsele de raclaj al scuamelor epidermice. Se observă diferite forme larvare și adulte ale parazitului.

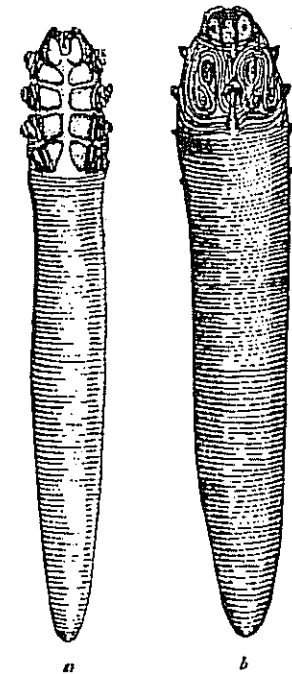


Fig. 61. *Demodex folliculorum*:
a - fața ventrală, femelă;
b - mascul.

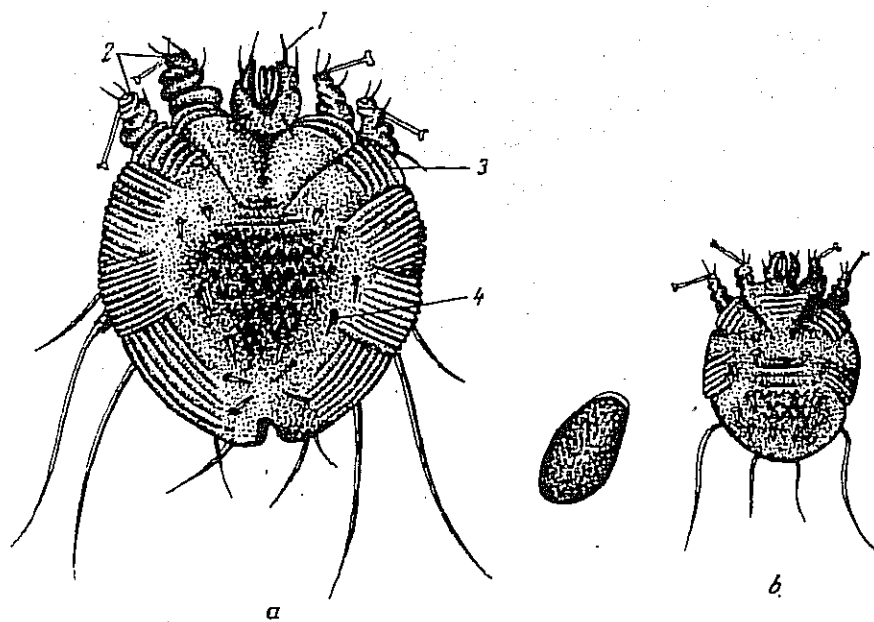


Fig. 62. *Sarcoptes scabiae*:
 a - adult; b - ou (stânga) și larvă hexapodă (dreapta);
 1 - aparat bucal; 2 - picioare; 3 - solzi; 4 - spini recurenți.

1.3. FAMILIA SARCOPTIDAE

Sarcoptes scabiae (varietatea hominis)

Sarcoptul scabiei se localizează pe tegument, unde sapă galerii; femela pătrunde în fundul galeriei pe care o sapă, iar masculul trăiește la suprafața tegumentului, în șanțurile care se formează prin prăbușirea galeriilor.

Morfologie. Forma adultă are corpul globulos, format dintr-o singură piesă, cu tegumentul cutat, de culoare cenușie-deschis. Anterior se găsește aparatul bucal, format din mai multe piese (fig. 62).

Femela măsoară 300 μ , este ovipară, are 4 perechi de picioare. Dorsal, parazitul prezintă o serie de solzi și spini recurenți. Spinii împiedică femela, când este angajată într-o galerie, să se întoarcă înapoi.

Masculul este mai mic, având o lungime de 200 μ .

Evoluția. Femela depune în galeriile pe care le sapă 10-20 de ouă, după care moare. Ouăle sunt ovoidale, de 150x100 μ și cu atât mai evoluate, cu cât sunt mai aproape de începutul galeriei, deci mai îndepărtate de femelă, care înaintează continuu. Din ouă ies după 7 zile de la depunerea lor, larve hexapode. Larvele iau naștere în galerii pe care le părăsesc imediat, pentru a-și continua viața pe pielea sănătoasă. Aici cresc și suferă mai multe năpărliri. După ultima năpărlire se transformă în nimfe. Nimfele trăiesc pe suprafața tegumentului și se hrănesc cu scuame de tegument. După 28 de zile, în urma unei noi năpărliri, nimfele dau naștere la adulți masculi și femele care se vor acupla. Femela fecundată (puberă) continuă să crească, rămâne la suprafața tegumentului și, după un interval de o săptămână, devine capabilă să sape galerii în care își va depune ouăle.

Localizarea formei infestante. Femelele își sapă galeriile în anumite locuri de elecție, acolo unde tegumentul este mai subțire, și anume: în spațiile interdigitale, la plica cotului, în axilă, pe sâni, preombilical, pe fese, în regiunea organelor genitale, pe fața internă a coapselor. Parazitul nu se localizează niciodată în regiunea capului, pe gât, pe față sau pe spate.

Modul de transmitere. Deoarece sarcoptul scabiei este foarte activ în timpul nopții, contagiunea se face în special noaptea, prin coabitare cu un bolnav, sau prin folosirea lenjeriei de pat în care a dormit un om parazitat.

Rolul patogen. Scabia (râia) apare cam în a zecea zi de la contagiune.

Primul simptom este pruritul, mai intens noaptea. Pe pielea parazitată se observă leziuni de grataj, datorită scărpinatului.

Caracteristice sunt însă șanțurile și veziculele perlatare care se observă pe piele. Galeriiile apar, macroscopic, sub forma unor dungii lungi până la 2 cm, mai mult sau mai puțin drepte, reliefate, de culoare cenușie, datorită dejecțiilor parazitului femel și prafului de piele pe care femela l-a antrenat.

Complicații. Leziunile de grataj se pot infecta secundar, cu diferiți microbi, dând diverse erupții, eczema scabioasă, limfangite sau chiar flegmoane (abcese).

Diagnosticul de laborator, de certitudine, se bazează pe punerea în evidență a femelei, extrasă din galeria acariană, cu ajutorul unui ac. Se înțeapă vezicula perlatare. Femela se va agăța de vârful acului cu ajutorul ventuzelor de la picioarele anterioare.

Proba recoltată se va examina la microscop într-o picătură de apă glicerinată.

Tratament. Se aplică pe piele pomezi sulfuroase, după ce în prealabil s-a făcut o baie caldă, frecând pielea pentru deschiderea șanțurilor, pentru ca parazitul să vină în contact intim cu pomada parazitocidă. În ultimul timp se folosesc cu succes pomezile cu lindan.

Profilaxie: depistarea și tratarea tuturor cazurilor din focar.

Se tratează toate persoanele care au dormit cu bolnavul, indiferent dacă au apărut sau nu leziuni.

Dezinfecția rufăriei de pat și a îmbrăcăminteii se face prin fierbere, călcare și tratarea cu substanțe insecticide remanente.

2. CLASA INSECTE

Cuprinde artropode având corpul format din trei porțiuni: cap, torace și abdomen.

Au trei perechi de picioare, de unde și denumirea de hexapode; prezintă o pereche de antene.

Insectele se împart în mai multe ordine.

Din ordinul *Diptera*, ordin din care fac parte insecte ce prezintă două aripi membranoase foarte dezvoltate și două rudimentare – numite balantiere –, se vor studia numai reprezentanții a două familii: familia *Culcidae* și familia *Muscidae*.

Dintre insectele fără aripi, se vor studia reprezentanții paraziti din familia *Pulicidae*, familia *Pediculidae* și familia *Cimicidae*.

2.1. FAMILIA CULICIDAE

Insectele din această familie se caracterizează prin prezența unor aripi rotunjite la vârf și acoperite cu solzi și prin antene lungi, filiforme, formate din 14-16 articole.

Insectele din aceste genuri se numesc, popular, țânțari.

Familia cuprinde două genuri importante pentru medicină: *genul Anopheles* și *genul Culex*.

Spre deosebire de masculii, care se hrănesc cu sucuri de plante, femelele, hematofage, se hrănesc cu sânge de om sau animale. Ele înțepă în special seara.

La prima vedere, reprezentanții celor două genuri seamănă. La o examinare atentă se pun însă în evidență o serie de elemente care caracterizează fiecare gen. Aceste elemente trebuie cunoscute, cu atât mai mult cu cât numai țânțarii de *genul Anopheles* transmit malarie.

Vom prezenta, în paralel, caracterele ce ne ajută la identificarea lor.

Când țânțarii stau pe o suprafață plană, cei din *genul Anopheles* au o poziție oblică față de suport, pe când cei din *genul Culex* au o poziție paralelă cu suportul (fig. 63).

Dezvoltarea țânțarilor se face prin metamorfoză completă. Stadiile de dezvoltare sunt

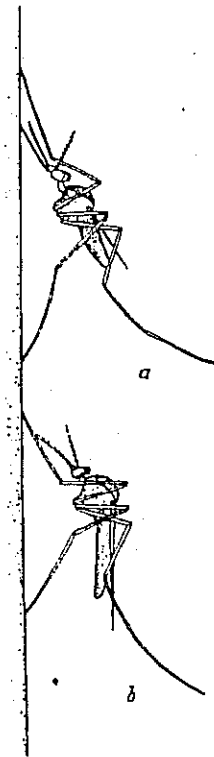


Fig. 63. Țânțari:
a - *Anopheles*; b - *Culex*.

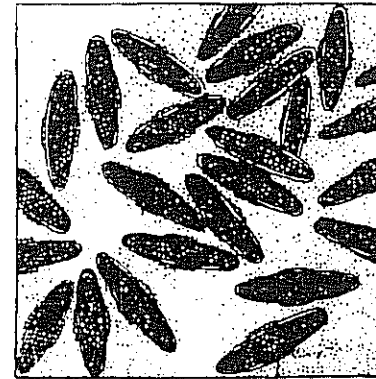


Fig. 64. Ouă de *Anopheles*:
1 - flotor.

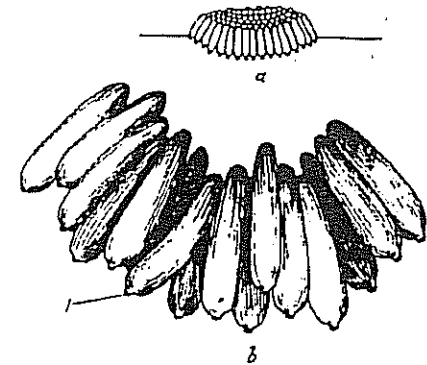


Fig. 65. Ouă de *Culex*:
a - așezarea ouălor "în plută"; b - ouă mult mărite: 1 - flotor.

următoarele: ou → larvă, care după patru zile năpârlește și se transformă în nimfă; după o altă năpârlire, nimfa se transformă în adult.

Ouăle de *Anopheles* au o formă naviculară, ovoidală, cu extremitățile mai ascuțite și prezintă median și lateral două cămăruțe cu aer numite flotori, cu ajutorul cărora plutesc pe suprafața apei. Culoarea lor este de la cenușie-argintie la brună, în funcție de rasa de *Anopheles* (fig. 64).

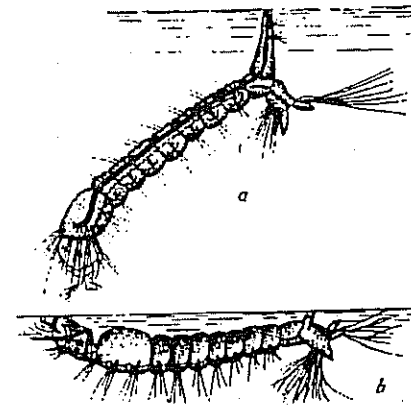


Fig. 66. Larve de *Culex* (a) și de *Anopheles* (b).

O femelă depune între 150-300 de ouă. Ele plutesc orizontal, pe suprafața apei, sunt izolate și realizează diferite figuri geometrice, în funcție de drumul parcurs de femelă în timpul depunerii.

Ouăle de *Culex* au o formă cilindro-conică (aspect de țigară de foi) și o culoare galbenă-brună. Sunt depuse pe suprafața apei în poziție verticală, lipite unele de altele prin marginile lor laterale, în grupe de câte 300-400, cu partea mai groasă în jos (fig. 65).

În stadiul larvar, cele două genuri se diferențiază prin poziția pe care o are larva.

Larvele din *genul Anopheles* stau orizontal la suprafața apei (fig. 66, b), pe

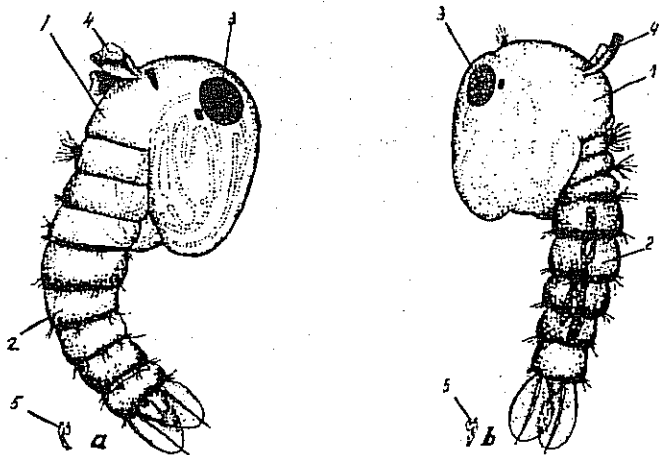


Fig. 67. Nimfă de *Anopheles* (a) și nimfă de *Culex* (b):
1 - cefalotorace; 2 - abdomen; 3 - ochi; 4 - cornet respirator; 5 - nimfă în mărime naturală.

când cele de *Culex* au o poziție oblică, aproape verticală, cu capul în jos (fig. 66, a).

În raport cu temperatura mediului acest stadiu durează între 7 și 21 de zile, timp în care larva năpârlește de trei ori, pentru ca a patra oară să se transforme în nimfă.

Nimfa are forma unei virgule și prezintă la partea anterioară două prelungiri ce prind de suprafața apei. Nimfele au formă conică la *genul Anopheles* (fig. 67, a) și cilindrică la *Culex* (fig. 67, b).

Stadiul de nimfă, în funcție de temperatură, durează între 2 și 6 zile, după care urmează faza adultă.

După cum s-a arătat, țânțarul din *genul Anopheles* reprezintă insecta vectoare a hematozoarului, agentul etiologic al malariei. La noi în țară se întâlnesc următoarele specii vectoare:

- *Anopheles maculipennis atroparvus*.
- *Anopheles maculipennis messac*.
- *Anopheles maculipennis typicus*.

Măsurile ce se iau în cadrul combaterii țânțarilor au în vedere atât forma larvară, cât și forma adultă.

Combaterea antilarvară se poate face prin:

- **metode fizice.** Asanarea terenurilor mlăștinoase, prin umplerea cu pământ a locurilor joase unde stagnează apa, prin înlăturarea apei stagnante, prin desființarea micilor băltoace din jurul fântânilor, prin desființarea bazinelor de apă stătătoare și a butoaielor cu apă de ploaie;

- **metode chimice.** Se pulverizează suprafața apei, în apropierea malurilor, cu insecticide;

- **metode biologice.** Dintre acestea face parte popularea bălților cu pești din *genul Gambusia affinis*, care se hrănesc cu larve de țânțar.

Combaterea țânțarilor adulți se realizează în prezent, aproape în exclusivitate, prin folosirea insecticidelor remanente din grupa H.C.H., Lindan și unor produse mai noi.

2.2. FAMILIA MUSCIDAE

În această familie sunt cuprinse muștele. Unele sunt neînțepătoare, având trompa numai pentru supt, iar altele sunt înțepătoare.

Musca domestică, numită și musca de casă, este o insectă de 6-7 mm lungime, de culoare cenușie, și face parte din prima categorie (fig. 68, a).

Capul prezintă doi ochi mari compuși, care sunt mai apropiați unul de altul la mascul. În partea antero-inferioară se găsește aparatul bucal, reprezentat prin trompa moale și retractilă. Musca întinde trompa spre lichidul sau alimentul cu care vrea să se hrănească. Dacă alimentul este solid, atunci musca varsă din trompă conținut din tubul intestinal și salivă, cu ajutorul cărora dizolvă suprafața solidă, pe care apoi o suge și o ingeră.

Femela este ovipară. Ea depune în mai multe rânduri aproximativ 150 de ouă, pe fecale umane, bălegar sau substanțe organice în descompunere. Ouăle alungite măsoară 1 mm și sunt de culoare albicioasă. În funcție de temperatura mediului înconjurător și a suportului, în 12-48 h ies larvele primare, vermiforme, de culoare ușor gălbuie, care, datorită unor mișcări foarte active prin galeriile ce și le fac, pătrund adânc în interiorul

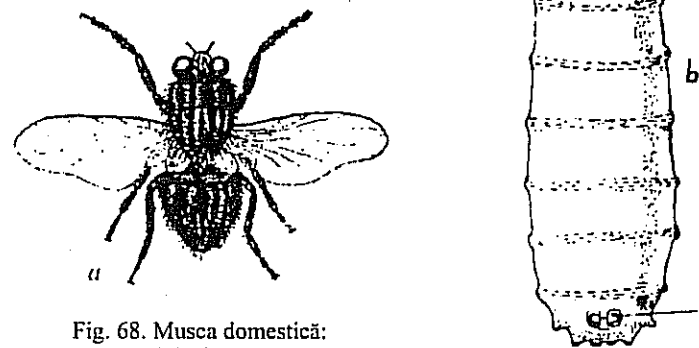


Fig. 68. Musca domestică:
a - adult; b - larvă.

suportului. Aici, într-o săptămână năpârlesc de două ori, ajungând la mărimea de 12 mm (fig. 68, b).

Din larva terțiară va rezulta nimfa, care are o formă cilindrică, mărimea de 8 mm și culoarea inițială galbenă, care apoi se închide până la negru.

După o săptămână, din această nimfă va rezulta musca adultă.

Durata fiecărui stadiu va fi condiționată de mediu și în special de temperatură.

În verile foarte călduroase, numărul generațiilor va fi mai mare decât în cele mai puțin calde.

Rolul patogen al muștei este cunoscut.

Datorită faptului că are preferință deosebită pentru dejecte umane și animale, pentru materiile organice intrate în putrefacție, ea poate transporta pe picioare sau corpul ei tot felul de microbi, ouă de paraziți intestinali, chisturi de protozoare etc. pe care le depune apoi pe alimente descoperite sau pe corpul omului (gură, nas, ochi).

Fiind o foarte bună zburătoare, poate răspândi agenții etiologici ai unor afecțiuni, în special gastrointestinale, la mari distanțe.

În afară de musca domestică, omul mai poate veni în contact și cu alte muște, care pot fi purtătoare de agenți etiologici ai unor boli sau ale căror larve, introduse în organism, pot provoca îmbolnăvirea acestuia.

Dintre acestea, se menționează:

– *Stomoxys calcitrans*, cunoscută și sub numele de musca de grajd. Este o muscă înțepătoare, care atacă vitele, caii, păsările și oamenii.

Seamănă cu cea domestică, însă ține aripile ceva mai în afara corpului și trompa întinsă în timpul zborului.

Înțepătura ei este foarte dureroasă, însă durerea este de scurtă durată.

Această muscă este acuzată de transmiterea, printre alți germeni, a celui de tularemie și al cărbunelui.

– *Sarcophaga carnaria*, sau musca de cadavre, are 13-15 mm lungime. Corpul este acoperit cu peri galbeni, prezentând pe torace trei benzi longitudinale cenușii-închise, iar pe abdomen pete ce realizează imaginea unei table de șah.

– *Calliphora vomitoria*, muscă albastră, mai mare, având lungimea de 13-17 mm, este musca ce zboară bătăind puternic și lovindu-se de geamuri.

– *Fannia canicularis*, muscă mai mică decât *Musca domestica* și mai puțin supărătoare, se întâlnește în interiorul încăperilor, zburând în jurul plafonierelor.

Metode de combatere a muștelor. Se vor lua măsuri riguroase de igienă, în sensul că nimic din ce-ar putea constitui sursă de hrană sau suport de depozitare și dezvoltare a larvelor să nu rămână descoperit.

Toate resturile rezultate din gospodărie, toate gunoaiile, vor fi colectate în recipiente bine închise, care să nu permită muștelor să intre în interior. Se va înlătura în acest fel posibilitatea de reproducere.

Acțiunea propriu-zisă de dezmuștizare se va face cu ajutorul insecticidelor cu care se pulverizează suprafețele.

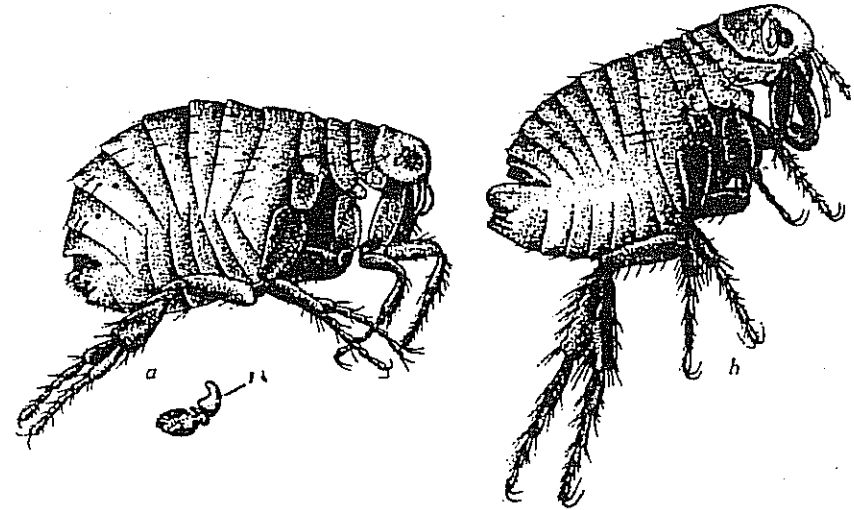


Fig. 69. *Pulex irritans*:
a - femelă; b - masculul.

2.3. FAMILIA PULICIDAE

Cuprinde insecte fără aripi, cu corpul turtit lateral, cu aparatul bucal adaptat pentru înțepat și supt, cu perechea a treia de picioare bine dezvoltate, care le ajută să facă salturi foarte mari.

Pulex irritans, numit popular și puricele omului, poate fi întâlnit și la porc, pisică și câine.

Femela are 3-4 mm și este de culoare galbenă-brună lucioasă. Masculul este ceva mai mic (fig. 69, a, b).

Puricele se hrănește cu sânge. Înțepătura puricelui produce o mâncărime puternică datorită unor toxine aflate în salivă.

Femela depune peste tot ouă de formă ovală, de 0,40-0,65 mm. Ouăle au o culoare albă strălucitoare (fig. 70, a). Acestea ajung în praf și apoi în interspațiile podelelor, unde dau naștere larvelor. Larva măsoară 5 mm. Ea are aspect vermiform (fig. 70, b).

După o pericădă de 10-12 zile, larva se transformă în nimfă imobilă (fig. 70, c).

După alte 10-12 zile, din această nimfă se naște adultul.

Când condițiile de mediu sunt nefavorabile, în special temperatură scăzută, perioada de la ou la adult poate să fie foarte lungă, după unii autori, chiar până la 250 de zile.

Forma infestantă pentru om este reprezentată de adult. El stă pe pielea gazdei

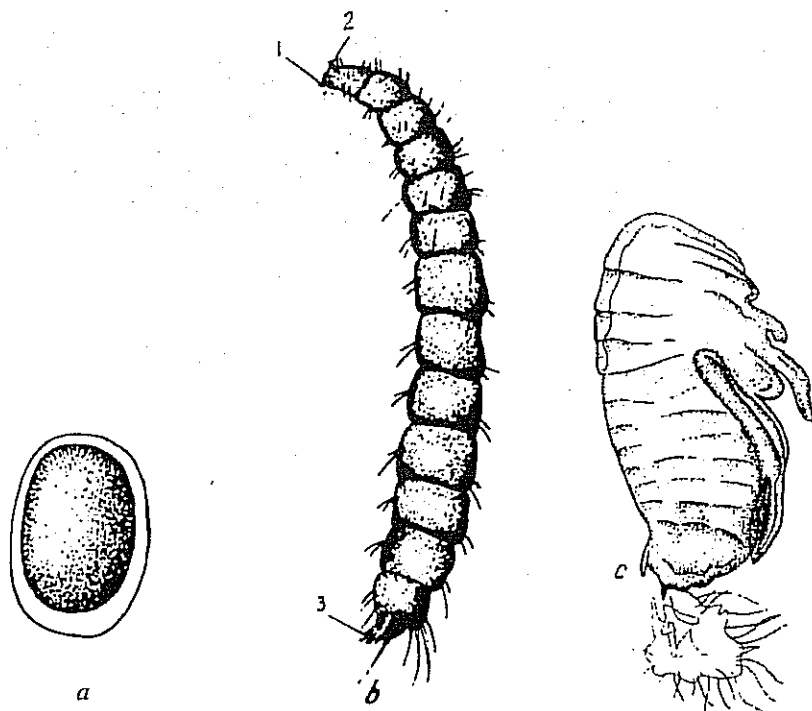


Fig. 70. *Pulex irritans*:
a - ou; b - larvă; c - nimfă.

numai în perioada în care se hrănește. În perioada dintre supt îl găsim pe lenjeria de corp și în special, pe la cutele acesteia sau pe dușumelele încăperilor.

Are un rol patogen deosebit, putând transmite agenții unor boli, ca: tifosul murin, tularemia, pesta.

Ctenocephalus canis sau puricele câinelui. Adultul transmite aceleași boli ca *Pulex irritans*, iar larva este gazda intermediară pentru *Diphyllidium caninum*.

Ceratophyllus fasciatus - puricele întâlnit la șobolani și șoareci.

Xenopsylla cheopsis parazitează șobolani și, accidental, omul. Transmite aceleași boli ca și *Pulex irritans* și în special pesta. Bacilul pestei se multiplică în stomacul puricelui și este transmis prin înțepătura altor animale. Epizootia șobolanilor precede epidemia oamenilor. Se știe că ectoparaziții părăsesc gazda când aceasta moare. Puricii

vor părăsi cadavrele șobolanilor după moartea acestora și, dacă nu găsesc alt șobolan, în urma faptului că aceștia au fost decimați de boală, vor trece la om.

În cadrul măsurilor de combatere a puricilor situăm pe prim plan curățenia încăperilor. Se vor îndepărta în cadrul acestei curățenii orice condiții care ar putea favoriza locurile de înmulțire a puricilor. Spațiile dintre dușumele sau parchet vor fi astupate. Pentru această operație se întrebuițează cu succes un amestec de ceară, terebentină și insecticide.

Având în vedere că puricii parazitează și animalele domestice, acestea trebuie deparazitate cu aceleași insecticide, după ce în prealabil s-au îndepărtat, prin ardere, paiele care au servit animalelor ca așternut.

2.4. FAMILIA PEDICULIDAE

Cuprinde insecte fără aripi, cu aparat bucal pentru înțepat și supt, cu picioarele prevăzute cu gheare puternice pentru agățat.

Din această familie vom studia speciile care interesează medicina umană.

Pediculus hominis capitis, numit și păduchele de cap (fig. 71, a), trăiește la om între perii capului și, mai rar, în alte regiuni păroase. Transmiterea se face direct sau prin intermediul unor obiecte de îmbrăcăminte, cel mai adesea șepci, căciuli.

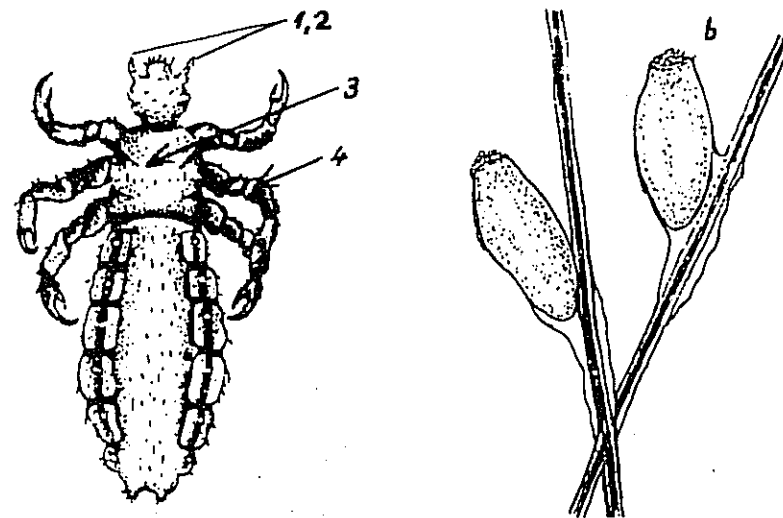


Fig. 71. *Pediculus hominis capitis*:
a - adult: 1-2 - antene; 3 - cefalotorace; 4 - picior; b - ou fixat pe fir de păr.

Prezența pe pielea capului se manifestă printr-un prurit intens, care obligă pe cel parazitat să se scarpine.

Femela are 3-3,5 mm. Culoarea este cenușie, mai închisă pe părțile laterale.

Masculul este mai mic. El se poate deosebi de femelă prin extremitatea posterioară a abdomenului, care la mascul este mai rotunjită.

Evoluția se face prin metamorfoză completă.

Femela depune câte 6-8 ouă pe zi, până la un total de 80-100. Ouăle, numite popular *lindini*, sunt ușor alungite. Ele sunt depuse pe firele de păr de care sunt lipite prin baza lor (fig. 71, b).

Larva are aceeași înfățișare ca a adultului, iese din ou după 6 zile și, după ce năpârlește de trei ori, devine în a 18-a zi adult.

Păduchele transmite tifosul exantematic, "febra de tranșee" și febra recurentă.

Pediculus hominis vestimenti, numit popular păduchele de corp, se întâlnește pe lenjerie, în special la cusăturile acesteia. Pe corp se întâlnește numai când se hrănește.

Morfologia este asemănătoare păduchelui de cap, fiind însă ceva mai mare.

Phthirus pubis, numit popular și păduchele lat, se localizează între perii pubisului. Atunci când parazitarea este intensă, el poate ajunge până la axilă și sprâncene.

Femela, de 1,5 mm, are corpul mult lățit. Culoarea este albicioasă, uneori gălbuie.

Femela depune la rădăcina firelor de păr ale regiunii parazitare un număr de cel mult 40 de ouă, pe care le lipește cu o substanță cleioasă și din care, după 7 zile, ies larve. Acestea devin adulți în a 15-a zi.

Transmiterea se face, de cele mai multe ori, prin contact sexual. Nu trebuie neglijată nici transmiterea indirectă prin lenjeria de corp sau de pat sau chiar prin intermediul scaunelor de la closet.

Provoacă *ftiriază*, boală caracterizată printr-un prurit mai intens noaptea, prurit care prin inocularea de germenii poate duce la eczeme.

Combaterea păduchilor se poate asigura numai printr-o temeinică muncă de educație sanitară. Curățenia corporală și a lenjeriei reprezintă elementul de bază. Acțiunea de autodeparazitare, de îmbăiere, de tundere, radere și pieptănare duce la rezolvarea problemei. Se va acorda o deosebită atenție acestor operații în colectivitățile și punctele aglomerate. În cazul în care au fost puși în evidență păduchii, apa și săpunul vor fi suficiente pentru îndepărtarea celor de corp. În cazul celor de cap și pubieni este, însă, necesară folosirea insecticidelor.

O deosebită grijă va fi acordată manipulării hainelor și rufăriei, pentru a nu răspândi paraziții în jur. Rufăria care poate fi fiartă se deparazitează prin fierbere timp de cel puțin 15 min în apă cu sodă 2%. Cu succes se folosește cuptorul cu aer cald în care rufe se țin 30 min. În lipsa cuptorului, rufăria poate fi călcată cu fierul bine încins.

Hainele, care se pot degrada în urma acestor operații, se vor deparazita cu insecticide.

2.5. FAMILIA CIMICIDAE

Cimex lectularius este insecta numită popular ploșnița de pat sau stelnița.

Caractere morfologice. Forma adultă are corpul oval, foarte turtit dorsoventral când este nehrănită, și bombată după prânzul hematofag. Are culoare roșie-brună și o talie de 4-5x3 mm (fig. 72, a).

Evoluție. Femelele depun ouăle de culoare cenușie mai multe la un loc (fig. 72, b). Din ele ies în a opta zi larvele, care ajung la stadiul adult în 7-11 săptămâni, după ce năpârlesc de cinci ori.

Forma infestantă pentru om sunt adulții în toate stadiile de evoluție.

Gazde. Înțepă omul, alte mamifere, păsările. Nu stă pe gazdă decât atâta timp cât își ia prânzul hematofag. În restul timpului stă ascunsă prin crăpăturile scândurilor, patului, ale mobilelor, ale pereților.

Modul de transmitere se face prin mobile, paturi etc. parazitare. Pot fi luate pe hainele oamenilor dintr-o locuință parazitată și duse în alte locuințe.

Rolul patogen. La locul înțepăturii apar papule înconjurată de o zonă congestivă care provoacă prurit. În mod mecanic, poate transmite febra recurentă.

Identificarea parazitului se face după forma și culoarea caracteristice. Are un miros respingător caracteristic, mai ales când este strivit. Ouăle se recunosc după

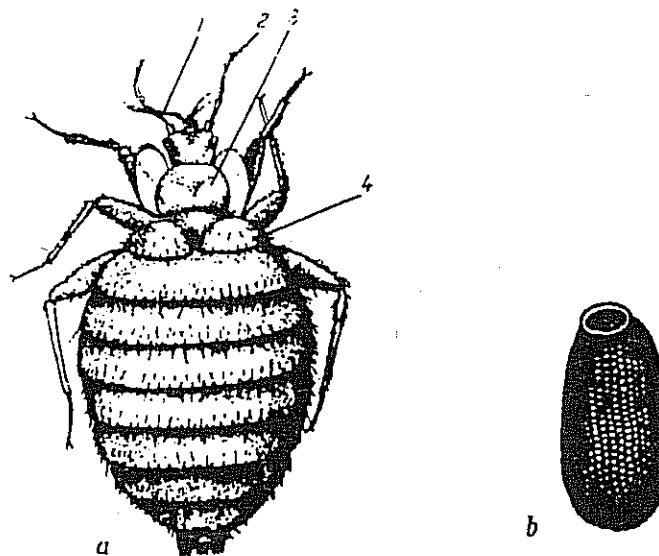


Fig. 72. *Cimex lectularius*:
a - adult; b - ou; 1-2 - antene; 3 - cefalotorace; 4 - picior.

culoarea lor cenușie-perlată, așezate în pachete și care se găsesc pe la crăpăturile scândurilor patului, ale mobilelor, ale pereților, la îndoiturile saltelelor.

3. LUPTA ÎMPOTRIVA ARTROPODELOR MIJLOACE MODERNE DE COMBATERE

Din cele expuse până acum, s-a văzut că există numeroase specii de artropode care pot transmite boli infecțioase.

Măsurile de combatere a artropodelor se împart în: profilactice și distructive.

3.1. MĂSURILE PROFILACTICE

Măsurile profilactice au scopul de a împiedica invadarea sau înmulțirea artropodelor. Dintre metodele întrebuintate, reamintim:

– măsuri sanitare generale, care cuprind: respectarea regulilor și cerințelor igienei personale și a igienei locuințelor, respectarea regulilor de strângere, păstrare și îndepărtare a reziduurilor menajere solide și lichide;

– munca de educație sanitară, pentru popularizarea mijloacelor de luptă împotriva artropodelor și de protecție individuală, adică măsurile mecanice sau chimice prin care se împiedică accesul artropodelor la om.

3.2. MĂSURILE DISTRUCTIVE

Măsurile de combatere urmăresc distrugerea artropodelor. Acestea au în vedere mijloacele mecanice, fizice și chimice și, recent, biologice.

Măsuri mecanice. Astăzi, aceste măsuri au trecut pe planul al doilea, datorită insecticidelor care sunt mult mai eficiente.

Dintre măsurile mecanice, amintim: hârtiile lipicioase pentru prins țânțari, muște etc. Tot între mijloacele mecanice se mai pot socoti și măsurile luate în scopul menținerii curățeniei: măturatul, scuturatul rufăriei de pat și corp, a îmbrăcăminte, lipitul găurilor și crăpăturilor pereților, văruirea lor și asanarea unor bălți.

Mijloacele fizice de distrugere a artropodelor se bazează în principal pe acțiunea căldurii.

– **Căldura umedă** obținută din vapori de apă sub presiune stă la baza modului de deparazitare ce se realizează în etuve. Este eficientă atât pentru formele adulte, larvare, cât și pentru ouă. Timpul necesar pentru deparazitare este scurt, doar 20 min.

– **Apa caldă** la 55°C omoară în timp de 15 min artropodele și ouăle lor. Călcatul umed cu fierul se poate folosi cu succes în combaterea pediculidelor.

– **Căldura uscată.** Aerul cald obținut în cuptoare speciale de deparazitare este mai puțin eficient, ca urmare a faptului că acesta are o capacitate de pătrundere și conductibilitate mai slabă.

Metodele chimice cuprind totalitatea substanțelor chimice numite *insecticide*,

care au proprietatea exercitării unei acțiuni toxice asupra insectelor, în condițiile administrării în doze eficiente.

Pătrunderea toxicului în corpul insectei se poate face pe trei căi: digestivă, respiratorie sau transcutanată. Pentru unele substanțe, calea de intoxicație este multiplă.

Deoarece insecticidele se deosebesc între ele prin gradul de toxicitate, adică prin doza minimă letală, trebuie să cunoaștem cantitatea de toxic necesară pentru tratarea unei anumite unități de măsură (volumul unei camere, suprafața de tratat, cantitatea de îmbrăcăminte etc.).

Insecticidele se pot folosi în soluții, paste, pulberi, suspensii, gaze, aerosoli, sub formă de adaos în materialul de văruit sau ca momeli otrăvitoare.

Insecticidele de contact. Se numesc astfel acele insecticide la care intoxicarea insectelor se face atunci când acestea vin în contact cu substanța toxică sau cu obiectele impregnate cu substanța toxică. Insecticidul pătrunde prin receptorii senzoriali din cuticula de chitină și se răspândește pe căile nervoase. Intoxicația se manifestă prin paralizia întregii musculatură.

Unele insecticide au proprietatea de a conferi suprafeței tratate o acțiune toxică îndelungată, adică *au o acțiune remanentă* sau *reziduală*. Obiectele odată stropite sau prăfuite cu insecticidele respective, își păstrează un timp îndelungat, până la câteva luni, proprietatea insecticidă.

Altele sunt active numai un timp scurt de la tratare, adică au acțiune de șoc.

În funcție de compoziția lor chimică, principalele insecticide se clasifică în insecticide *clorurate* și insecticide *organofosforice*.

Insecticidele organofosforice sunt foarte toxice, atât pentru insectele combătute cât și pentru om și mamifere. De aceea, sunt indicate doar atunci când insectele sunt rezistente la insecticidele clorurate. Se administrează cu asigurarea unei protecții perfecte pentru om, deoarece prezintă adesea riscul mortal în timpul pulverizărilor, atunci când sunt utilizate pentru dezinsecția locuințelor. Se interzice cu desăvârșire folosirea insecticidelor organofosforice la dezinsecția lenjeriei personale sau de pat.

Metode biologice. Apariția rezistenței insectelor la insecticidele de contact a determinat începerea unor cercetări asupra posibilității de combatere biologică, ca: sterilitatea masculilor, utilizarea unor bacterii sau levuri în distrugerea insectelor; aceste încercări au încă un caracter limitat, urmând ca în viitor să se poată preciza valoarea lor în lupta contra insectelor.

Cap.XXXI. MICOLOGIE

1. NOȚIUNI GENERALE

Micozele sunt boli provocate de ciuperci parazite (paraziți criptogamici sau paraziți micotici), iar *micologia* este știința care se ocupă cu studiul acestor ciuperci și cu tulburările pe care le 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 microorganismele 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 protoplasmic variabil și cu o membrană rezistentă care se dezvoltă în toate sensurile;

- o parte de rezistență și reproducere, denumită *spor*, care ia naștere din tal și este reprezentată de elemente de formă dreptunghiulară sau rotunjită, de mărime variabilă (fig. 73).

1.2. ÎNMULȚIREA

Reproducerea și răspândirea la ciuperci se pot face, în general, după două mari tipuri:

- **înmulțirea perfectă** (sexuată) reprezintă tipul de înmulțire în care două elemente sexuate se vor contopi dând naștere la *ou* (zigot) sau *ascospor*;
- **înmulțirea imperfectă** (asexuată) este realizată atunci când sporul se va forma pe un filament micelian direct, fără un proces prealabil de conjugare. Sporangiosporul, conidia, artrosporul și blastosporul reprezintă tipuri de spori realizați prin înmulțire imperfectă.

1.3. NUTRIȚIA

Ciupercile, fiind lipsite de clorofilă, nu pot descompune dioxidul de carbon pentru a extrage carbonul necesar sintetizării substanțelor nutritive. Din acest motiv, ele ori sunt legate de un substrat organic în descompunere pe care se dezvoltă (saprofite), ori trăiesc pe substanțe vii pe seama cărora se hrănesc (parazite).

Deseori, ele produc fermenți ce pătrund în mediul în care se dezvoltă, transformând substanțele din mediu în elemente nutritive pe care le vor absorbi în protoplasma lor. Întrucât, așa cum s-a arătat, ciupercile sunt lipsite de clorofilă, ele nu au nevoie de

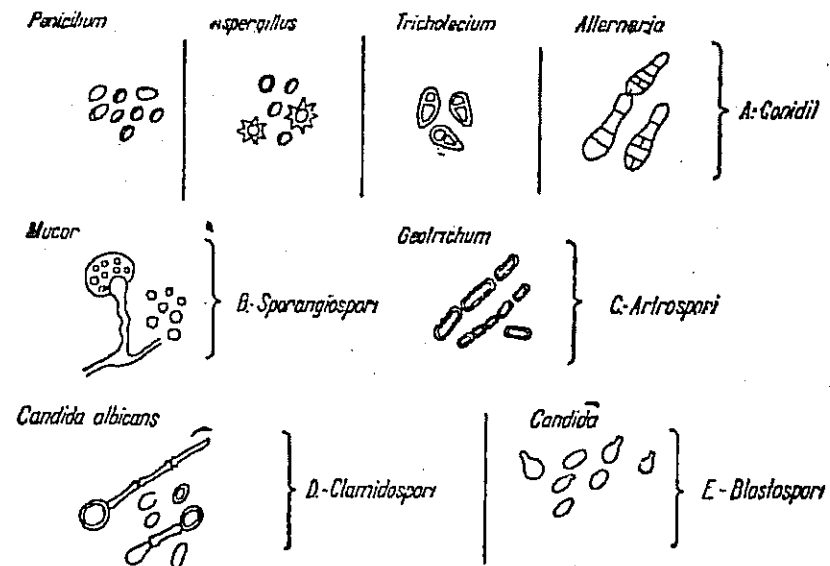


Fig. 73. Diferite tipuri de spori.

lumină pentru a se dezvolta. Acest fapt le ușurează viața parazită, deoarece le permite să trăiască și în profunzimea țesutului gazdei.

1.4. TOXINELE

Ciupercile parazite produc substanțe care sunt, în general, toxice pentru organismul pe seama căruia se dezvoltă. Unele substanțe toxice, numite toxine, difuzează din corpul parazitului în corpul gazdei în timpul vieții parazitului (exotoxine), în timp ce altele rămân localizate în protoplasma ciupercii și sunt puse în libertate numai după distrugerea ei (endotoxine).

Dintre aceste substanțe sunt și unele care pot fi folosite omului. Astfel, unele ciuperci 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 gazde, ciupercile își manifestă acțiunea lor vătămătoare în felurite modalități.

Astfel, de exemplu, o ciupercă din *genul Aspergillus* pătrunsă în căile respiratorii

va acoperi mucoasele bronhiilor cu o rețea fină – miceliul. Se va bloca, astfel, funcțional suprafața destinată schimburilor gazoase, iar prin dezvoltarea sa exagerată parazitul va putea astupa chiar și bronhiiolele. 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 necrotică**, reprezentată de distrugerea țesuturilor prin acțiunea fermenților pe care parazitul îi pune în libertate la locul de dezvoltare.

În raport cu localizarea în corpul omenesc, 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 atribuie și denumirea de **dermatomicoze**.

Micozele profunde sunt acelea care afectează țesutul celular subcutanat, mușchii, oasele și chiar viscerale, dar care din punct de vedere al răspândirii sunt cu mult mai puțin frecvent întâlnite în raport cu primele. Tot în grupa micozelor profunde intră și candidozele – boli provocate de ciuperci din grupul *Candida*.

2. TRICOFIȚIA

Tricofiția este o boală parazitată produsă de ciuperci parazite din familia **trichofitonilor** (*Trichophyton violaceum*, *Trichophyton crateriformis*, *Trichophyton gypsum* ș.a.). Acestea se localizează fie pe pielea capului, dând leziuni uscate numite **tondanta tricofitică**, fie în barba adulților, provocând leziuni izolate de foliculită supurantă, numite **sicosis tricofitic**, **foliculă confluentă** sau **kerionul bărbii**.

Pe restul pielii corpului trichofitonii realizează leziuni cu caracter eritemoscuamos, cunoscute sub numele de **herpesul circinat**, iar la unghii apar leziuni cunoscute sub numele de **onicomicoze tricofitice**.

Dintre toate formele, tricofiția uscată – **tondanta tricofitică** – este afecțiunea cea mai frecventă și cea mai contagioasă. Apare în timpul copilăriei, numai până la vârsta de 15-16 ani, după care, de regulă, se vindecă spontan, nepersistând decât în rare cazuri la adulți. Celelalte forme sunt mai frecvente la adulți și necesită un tratament medical susținut.

Epidemiologie. Sursa de infecție în această boală parazitată este reprezentată de om, ca și de o serie de animale (căine, pisică, cal, vacă, șoarece) de la care omul sănătos se poate îmbolnăvi prin scuame, fragmente de păr sau de unghii, ca și prin secrețiile leziunilor supurative. Unele specii de trichofitoni 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, pălării, bascuri, piepteni, instrumente de frizerie, lenjerie de corp, de pat etc.).



Fig. 74. Tricofiție

Aspectul clinic al bolii deosebește tricofiția uscată de tricofiția inflamatorie.

– **Tricofiția uscată**. În această boală, suprafața pielii este presărată cu leziuni ovale sau rotunde, de 0,5-4 cm diametru, în număr variabil, izolate sau confluențe, acoperite cu scuame uscate sau grase. Perii sunt friabili, majoritatea rupți la 1-2 mm de la emergența lor, iar alții îndoiți. Pe placardul lezional se pot observa și rare fire de păr intacte (fig. 74).

– **Tricofiția inflamatorie**. Boală de origine animală, se localizează pe pielea capului sau a feței în regiunile acoperite cu păr. Se prezintă uneori sub forma unui placard unic, de obicei rotund, ușor proeminent, presărat cu pustule foliculare, cu marginile bine delimitate și oarecum în pantă, cu un diametru de 1-5 cm și numai rareori mai mare.

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

Specia de parazit se determină prin culturi.

Tratamentul diferă în raport cu localizarea.

– În localizările pe pielea capului, tratamentul constă în roentgenepilație, urmată de badijonări cu alcool iodat și salicilat de sodiu până la creșterea părului. Se mai pot utiliza griseofulvina, griseofulvina M și clotrimazolul.

– Localizările pe pielea glabră sunt tratate cu badijonări cu alcool iodat și salicilat de sodiu sau cu coloranți de tipul violetului de gențiană.

Profilaxia și combaterea bolii se bazează pe depistarea și tratamentul imediat al formelor incipiente de boală, controlul copiilor la primirea în colectivitate și controlul lor periodic. Rufăria de pat și corp, hainele, pălăriile, căciulițele, obiectele de toaletă ale bolnavilor vor fi dezinfectate riguros, iar în frizerii se va introduce dezinfecția corectă a instrumentelor și a părului tuns.

3. FAVUSUL

Favusul este o boală parazitată produsă de *Achorion schoenleinii*, care se dezvoltă în profunzimea pielii capului, distrugând firul de păr. Boala netratată persistă foarte

mult timp, lăsând în pielea capului cicatrici cu alopecie (pierderea părului) definitivă, întinse și inestetice. În stratul cornos al epidermului, unde se dezvoltă, parazitul se găsește sub formă de spori și micelii. Parazitul invadează și firul de păr la nivelul ostiumului folicular, unde îl găsim sub formă de rare filamente îndreptate în toate direcțiile. Aceste filamente sunt formate din elemente celulare cu aspect diferit: dreptunghiulare, ovalare, unele mai scurte și mai groase, altele mai lungi și mai subțiri, cu dimensiuni variind între 5 și 15 μ .



Fig. 75. Favus (forme cu godeuri)

Epidemiologie. Transmiterea bolii se face *direct* de la omul bolnav la omul sănătos, mai rar de la unele animale (cal, câine), care pot fi infectate cu același parazit, sau *indirect*, prin intermediul hainelor și al obiectelor de toaletă infectate. Boala se dezvoltă mai mult la copiii subnutriți, care trăiesc în condiții de igienă deficitară, și mai rar la adulți.

În ordinea frecvenței, parazitul se localizează pe pielea capului, pe pielea glabră și la unghii.

Aspectul clinic al bolii îmbracă patru forme obișnuite: forma cu godeuri (fig. 75), forma pitiriazică, forma impetiginosă și forma alopecică, la care se adaugă o formă mai rară: forma papiracee.

Diagnosticul bolii se face după caracteristicile leziunilor și prin examen de laborator care constă în examenul microscopic al părului parazitat prin care se evidențiază prezența parazitului.

Determinarea speciei de Achiorion se face prin culturi pe mediul Sabouraud în care se însămânțează scuame.

Tratamentul bolii și măsurile de prevenire și combatere sunt asemănătoare cu cele aplicate în tricofitție.

4. MICROSPORIA

Microsporia este o altă boală parazită frecventă și contagioasă la copii, localizată pe pielea capului sau pielea glabră, produsă de obicei de *Microsporon audouini* și, uneori, de *Microsporon ferrugineum*.

Boala durează mai mulți ani la copii și se vindecă, ca și tricofitția, la pubertate.

Sursa de infecție pentru omul sănătos este reprezentată de om și unele animale

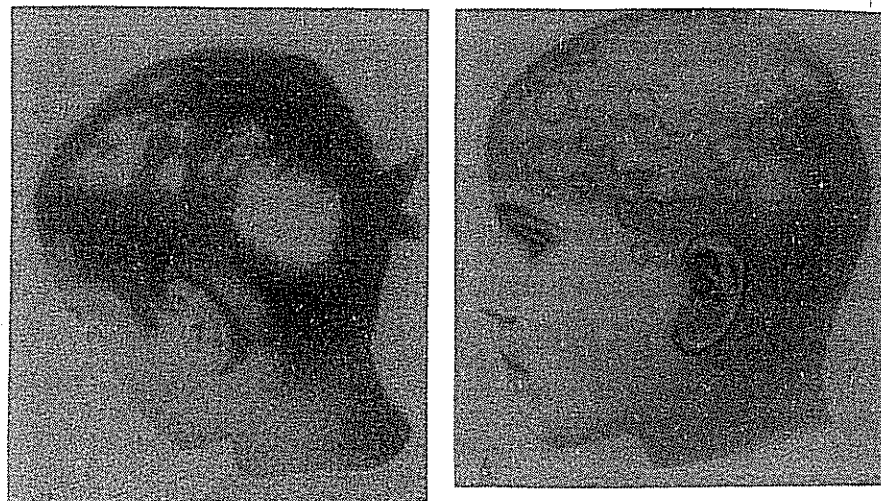


Fig. 76. Microsporia pielii capului:
a - aspect înainte de epilare; b - aspect după epilare.

(cal, pisică, câine) infectate, care elimină paraziți odată cu firele de păr ce cad de la nivelul leziunilor.

Epidemiologie. Transmiterea bolii se face atât direct de la omul sau animalul bolnav, cât și indirect, prin intermediul obiectelor și al rufelor contaminate.

Aspectul clinic. Afecțiunea se prezintă în general sub formă de placarde mai mari ca în tricofitție, dar mai puține la număr, variind ca mărime între 2-5 cm diametru (fig. 76). Aceste placarde sunt acoperite, de regulă, cu scuame mai mult sau mai puțin abundente, de culoare cenușie, cu aspect de tărățe. Pe suprafața placardelor firele de păr sunt rupte la înălțimea de 3-6 mm de la emergența lor, ca și cum ar fi fost tunse cu mașina.

Microsporia părții nepăroase este mai rară; ea apare sub forma plăcilor eritemoscuamoase neregulate, ovale sau rotunde, ușor ridicate pe margini și adâncite în centru.

Diagnosticul se pune pe baza aspectului leziunilor, ca și în laborator, unde, la examenul microscopic al perilor din leziuni, poate fi evidențiat parazitul. Parazitul poate fi cultivat relativ ușor în tuburi pe mediul Sabouraud. Diagnosticul mai poate fi precizat și prin procedeul luminiscentei cu lampa Wood.

Tratamentul este asemănător cu cel menționat pentru tricofitție.

Profilaxia bolii se bazează pe aceleași principii de depistare și izolare a bolnavului, dezinfectia riguroasă a hainelor, părului, obiectelor de toaletă, lenjeriei de corp și pat,

anchete epidemiologice pentru stabilirea sursei de infecție între oameni sau animale (pisici în special) și dezinfecția instrumentarului folosit în frizerii.

5. EPIDERMOFIȚIA

Epidermofitiile constituie un grup de afecțiuni cutanate superficiale, produse de paraziți criptogamici care pătrund în derm. Invadează stratul cornos, fără a ataca însă firul de păr. Din acest grup fac parte: epidermofitiya inghinală, epidermofitiya interdigitală a mâinilor și picioarelor, pitiriazisul versicolor și eritrasma.

5.1. EPIDERMOFIȚIA INGHINALĂ ȘI INTERDIGITALĂ

Este o dermatomicoză superficială contagioasă, întâlnită mai mult la adulți, produsă de un parazit criptogam – *Epidermophyton inguinale*.

Transmiterea bolii se face, de obicei, prin raport sexual, dar poate fi realizată și indirect, prin obiecte contaminate.

Aspectul clinic este reprezentat de leziuni care apar sub plica inghinală, pe fața superioară și internă a coapselor, de obicei pe o singură parte (de obicei stânga la bărbați), de unde se întinde la scrot și penis la bărbați și la vulvă la femei. În regiunea inghinală, leziunea inițială este constituită din pete roșiatice de mărimea unui bob de porumb, ușor scuamoase și pruriginoase. Aceste pete roșiatice se dezvoltă rapid, se unesc dând naștere la placarde mari cu margini circinate, policiclice, ușor reliefate, roșii și scuamoase, care contrastează net cu centrul lor mai palid, uneori brun sau roșu palid. Ele sunt acoperite cu mici cruste (leziuni de grataj), deoarece afecțiunea este însoțită de prurit.

Din regiunea inghinală, indirect sau chiar direct, acest parazit poate ajunge să fie inoculat între degete, infecția întinzându-se treptat la toate spațiile interdigitale (fig. 77).

Diagnosticul se face prin aspectul leziunilor, completat cu examenul microscopic al scuamelor în care se evidențiază parazitul, sau prin culturi.

5.2. ERITRASMA

Eritrasma este o epidermicoză care se întâlnește mai mult la adulți, mai rar la femei și niciodată la copii. Este localizată de cele mai multe ori în regiunea inghinală și produsă de un parazit *Microsporon minutissimum*.

Aspectul clinic. Leziunile în această boală parazitara apar la început sub forma unor pete roșii de mărimea unui bob de linte, în zona



Fig. 77. Epidermofitiya mâinilor.

inghinală. Ele se măresc lent și formează un placard ovalar cu centrul bine precizat și cu un diametru de 4-10 cm. Pe măsură ce se extinde placardul, culoarea leziunii devine brună, apoi cafenie, cu scuame fine pe o suprafață netedă fără vezicule. În caz de transpirație în regiunile inoculate, scuamele se macerează, lăsând sub ele să apară o suprafață roșie eczematizată, care devine în acest caz moderat pruriginoasă. Afecțiunea persistă în acest stadiu timp îndelungat, dar în unele cazuri poate invadea coapsele (fața internă și superioară), regiunea perianală, organele genitale și chiar plica submamara ori zona axilară.

Diagnosticul se face prin examinarea la microscop a scuamelor raclate de la suprafața placardului, evidențiind grupe de spori mici și rotunzi, alături de filamente sinuoase, ramificate.

5.3. PITIRIASIS VERSICOLOR

Această afecțiune este o epidermomicoză destul de frecvent întâlnită în care infecția se limitează la stratul cornos al pielii. Boala are o evoluție cronică, deseori recidivantă, și este produsă de un parazit criptogamic numit *Microsporon furfur*. Are o contagiozitate redusă, remarcându-se cazuri în care soția și soțul nu se infestază unul de la altul. S-ar părea că există o predispoziție a terenului (transpirația), care ar favoriza infecția.

Aspectul clinic. Leziunile sunt constituite din pete mai mici sau mai mari (gămălie de ac, bob de linte) izolate sau confluând în plăci de mărimi variabile, de culoare galbenă-închis până la brună, cu scuame foarte fine, care se detașează când suprafața leziunii este zgâriată. Localizările mai frecvente sunt pe torace, abdomen, brațe și flancuri. Afecțiunea nepruriginoasă este întâlnită în special la adolescenți.

Există mai multe varietăți clinice: forma punctiformă, în plăci sau leziuni întinse. O formă mult discutată este așa-zisa formă "acromiantă", care apare mai frecvent la persoanele supuse radiațiilor solare sau ultraviolete. În aceste cazuri, petele albicioase, care rămân ca o coloratură normală a pielii față de pigmentarea din jur, se explică prin oprirea acțiunii razelor solare de către depozitul scuamos. Aceasta, după ce se descuamează, lasă în urma sa pete albicioase, având forma exactă a plăcilor de *Pitiriasis versicolor*, care le-au precedat.

Diagnosticul constă în evidențierea parazitului prin examenul microscopic al scuamelor.

Tratamentul epidermofitiilor constă în pansamente umede, reci, cu rezorcină 1-2% sau acid boric 2-4% în formele inflamatorii ale epidermofitiiei interdigitale și plantare, pomezi antimicotice în formele uscate și badijonări zilnice cu alcool iodat în *Pitiriasis versicolor*, la care se adaugă griseofulvină M sau Clotrimazol.

În toate epidermofitiile, pentru a se evita recăderile, tratamentul va trebui continuat un oarecare timp și după vindecare, și completat în toate cazurile cu dezinfecția periodică a rufăriei de pat și de corp.

6. CANDIDOZA ȘI ACTINOMICOZA

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

6.1. CANDIDOZA

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

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

La examenul microscopic, această falsă membrană apare formată din filamente cilindrice, simple sau ramificate, de 3-5 μ lățime și 50-600 μ lungime, formate din celule așezate cap la cap. Între aceste filamente miceliene, sau la extremitatea unora dintre ele, se observă celule sferice sau ovoide de 5-7 μ diametru, foarte refringente, care sunt clamidosporii caracteristici genului *Candida*.

Epidemiologie. Transmiterea bolii se face direct de la omul bolnav la omul sănătos, prin intermediul veselei, sau de la unele animale infestate, în special bovine. Boala este răspândită pe întreaga suprafață a globului, apariția ei fiind favorizată de factorul "teren" reprezentat de antibioterapie intensă, atrepsie.

Aspectul clinic este reprezentat de o stomatită la început eritematoasă, pentru ca în următoarele 3-4 zile să se observe prezența unor depozite albicioase, la baza limbii, apoi pe mucoasa obrazului, bolta palatină și gingii, numită și *mărgăritărel* sau *muguet*.

Tratamentele cu antibiotice creează un teren favorabil dezvoltării acestei ciuperci, care poate fi în aceste cazuri generalizată, invadând întregul organism. Localizările cele mai frecvente sunt în tubul digestiv, vagin și aparatul respirator, în mod special în plămâni.

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

Tratamentul bolii se face prin spălături cu substanțe alcaline, ținând seama că ciuperca se dezvoltă în mediu acid, badijonări cu glicerina boraxată, antifungice de tip Micostatin, Nipafungin, Stamicin sau Amphotericin ori 5-Fluorocitozin.

Prevenirea bolii se face evitând contactul cu persoanele infectate și acordând o atenție deosebită în aplicarea tratamentelor prelungite cu antibiotice.

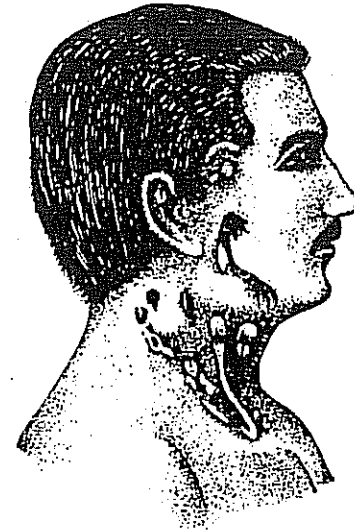


Fig. 78. Actinomicoza cervicală.



Fig. 79. Picioar cu micetom.

6.2. ACTINOMICOZA

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

Parazitul izolat din leziuni se prezintă sub forma unor mici granulații de aspect și culoare variabilă, galbenă-albă, formate central dintr-un miceliu fin și des ce se întretaie în toate direcțiile. La periferie prezintă o coroană 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: grăunțe 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 nodozități cu sediul 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 suprafața vegetantă. Starea generală a bolnavului nu este alterată decât în forme avansate de boală.

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

apariția unor nodozități 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 (zgârieturi), mai ales la picioarele persoanelor care umblă desculțe;

– prin infectarea mucoasei bucale faringiene, în urma mestecării grăunțelor de cereale parazitare;

– 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, evidențiind prezența parazitului în produsele recoltate din zonele ulcerate sau prin biopsia nodulilor.

Tratamentul se face: *general*, prin administrare de iodură de potasiu, preparate arsenobenzenice, 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 bănuită 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:	Trichiuris trichiura	Entorobius vermicularis	
	Ascaris lumbricoides	Strongyloides stecoralis	
		Ankylostoma duodenale	

Atunci când se pune problema identificării unor paraziți întregi, cum este cazul ascaridului sau al fragmentelor de paraziți (cazul teniilor), 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 infectat sau infectat, difuzează în exterior ori se usucă 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 amibelor, 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 toată sticlăria care se întrebuințează: cristalizoare, 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 întrebuințării, sticlăria va fi bine spălată cu apă curentă.

Tehnica de lucru. În primul rând, proba de fecale va fi examinată din punct de vedere macroscopic. Acest examen se face după ce fecalele au fost transvazate într-un

cristalizor sau cutie Pétri mai întinsă, cu ochiul liber, cu lupa pe fond alb sau negru, ajungându-ne de o baghetă.

În felul acesta se pot pune în evidență, în cazul paraziților mari: paraziți întregi sau fragmente, mucozități, striuri sanguine etc.

Fecalele se diluează apoi cu ser fiziologic, se omogenizează, se decantează supernatantul de câteva ori și apoi se examinează sedimentul în care putem identifica paraziții mici.

Se trece apoi la examenul microscopic, care se poate efectua printr-o serie de metode directe și de concentrare.

Metodele directe cuprind următoarele operații:

– Examenul direct între lamă și lamelă a unor mici cantități de fecale, recoltate din diferite puncte, la microscop cu obiectiv 3 și 7. Stratul trebuie să fie foarte subțire. Metoda aceasta este întrebuițată în special în cazul scaunelor mucosanguinolente sau diareice.

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

– Examenul după diluare cu 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. Soluția iodoiodurată face mai refringente, mai ușor vizibile, unele organite ale parazitului, care apar cu această metodă foarte clare, permițându-se diagnosticul diferențial între chistul de *Entamoeba coli* și *E. disenteriae* etc.

Metodele de concentrare se întrebuițează în special când numărul elementelor parazitare este mic și când celelalte tentative de diagnostic au rămas negative.

Metoda Teleman-Langeron. Se procedează astfel:

– o mică cantitate de fecale se omogenizează cu puțin ser fiziologic și se introduce într-o sticlă cu dop șlefuit cu capacitatea de 50 ml;

– se introduc câteva perle de sticlă și 10 ml acid clorhidric 50%;

– se astupă sticla cu dopul și se agită câteva minute, manual sau cu un agitator, pentru omogenizarea și dizolvarea substanțelor proteice, fosfaților, mucinei, diverselor săpunuri etc.;

– se adaugă o cantitate de 10 ml eter sulfuric și se agită din nou 4-5 min, având grijă să astupăm dopul flacoului cu o cârpă sau plastic, întrucât poate sări sub acțiunea vaporilor de eter; eterul va dizolva grăsimile;

– se scoate cu atenție dopul și amestecul este trecut în două tuburi de centrifugă, care, după ce se echilibrează bine, sunt centrifugate 10 min la 500 rot/min.

Prin centrifugare, amestecul se separă în patru straturi. În ultimul, cel de la fund, se găsesc eventualele elemente parazitare. Numai acestea interesează. Se ajunge la acest strat după ce, cu grijă, cu ajutorul unei pipete Pasteur, s-au desprins de pe pereții eprubetei primele trei straturi și s-au îndepărtat printr-o întoarcere bruscă a eprubetei.

Depozitul rămas este pipetat și etalat pe mai multe lame, care acoperite cu lamele vor fi examinate cât mai repede la microscop. Metoda dă rezultate pentru ouăle mai grele ale helminților 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 Borell;

– se toarnă puțină soluție suprasaturată de NaCl sau sulfat de magneziu și se omogenizează bine cu bagheta;

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

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

– după aceasta, cu o pensă, se ridică lamela cu atenție, brusc, și se pune pe o lamă.

Atragem atenția că timpul nu trebuie depășit, întrucât unele ouă se îmbibă și cad la fund, ca cele operculate.

Metoda pune în evidență în special ouăle ușoare. Nu este o metodă ideală, însă, având în vedere faptul că este simplă și ușoară, poate fi întrebuițată cu rezultate bune în examinări repetate și mai ales atunci când este completată cu metoda Teleman-Langeron.

Clarificarea proglotelor de cestode se face în 14-20 h cu glicerină 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 oxiiurozei 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 raclaj al mucoaselor, spută, aspirat bronșic, urină, fecale, puroi sau sânge, care apoi sunt examinate cu precizarea diagnosticului. Pentru fiecare din aceste produse, recoltarea se face direct. Astfel:

Secreția și alte produse patologice din cavitatea bucală sau vaginală, ca false membrane, puroi etc., se recoltează raclând mucoasa cu o spatulă sau valvă vaginală sterilă, sau cu o ansă sterilă. Produsul astfel recoltat se introduce în eprubete sterile cu ser fiziologic steril, pentru a evita uscarea lui.

Sputa se recoltează timp de trei zile consecutiv, de trei ori pe zi, în pahare sterile, după o gargară prealabilă cu ser fiziologic steril. Deschiderea și închiderea paharelor se face cu rapiditate, pentru a preveni infectarea cu fungi din mediul înconjurător.

Aspiratele bronșice sunt cele mai concluyente 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 însămânțărilor pe medii de cultură adecvate.

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

Urina este recoltată de la femei cu sonda "Nélaton" sterilă, iar de la bărbați fără

sondaj, lăsând să se scurgă un prim jet, și recoltând apoi jetul următor în eprubete sterile. Examenul acestor produse trebuie făcut în scurt timp.

Materiile fecale, reprezentând scaunul emis normal, fără purgativ sau laxativ, sunt controlate în prealabil pentru a observa striurile de mucozități, care vor fi recoltate și examinate separat. În cazul în care nu există elemente patologice (mucozități, striuri mucosanguinolente etc.) se ia o porțiune mică de fecale, cu ajutorul unei baghete de sticlă plină - sterilă, și se introduce într-o eprubetă în care în prealabil s-a dizolvat penicilină 5 000 U/ml în ser fiziologic.

Puroiul este recoltat prin puncții, cu ace având diametrul mare, în seringi sterilizate, sau cu ajutorul unei pipete Pasteur sterile din leziuni deschise. Produsul este trimis la laborator, de preferat în seringă cu care a fost recoltat sau într-o eprubetă sterilă și închisă ermetic.

Sângele pentru hemacultură este recoltat prin puncție venoasă și însămânțat pe mediul Sabouraud lichid în proporție de 1/50. Se incubează la 37°C și apoi se efectuează mai multe treceri pe medii Sabouraud solid în care s-au incorporat antibiotice (penicilină, streptomycină sau cloramfenicol).

Pielea capului, regiunea păroasă a feței sau pielea glabră pot fi suspectate de afecțiuni micotice. Pentru precizarea diagnosticului, în zonele afectate se recoltează peri suspecti de a fi parazițați, recoltând perii 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 perii recoltați nu sunt examinați imediat, ei sunt așezați între două lame de sticlă șlefuită, până la examinare (examinare directă sau însămânțări).

Scuamele se vor recolta de la periferia leziunilor prin raclare cu ajutorul unei mici chiurete sau a unui vaccinostil, ori, în lipsă, cu ajutorul unei lame de sticlă șlefuită. Materialul recoltat în cazul în care nu este examinat imediat va fi păstrat între două lame de sticlă.

Unghiile constituie un material biologic în care elementele fungice sunt de cele mai multe ori greu de pus în evidență. Recoltarea trebuie să se facă din partea modificată a unghiei, acolo unde prezintă îngroșări, unde marginile libere sau laterale sunt dezlipite de patul unghiei, având sub el un depozit sfărâmițos. Acest depozit este recoltat cu ajutorul unei chiurete sau al unei lanțete, raclând din profunzime, deoarece straturile superficiale sunt, de regulă, supraînfectate cu germeni saprofiti. În cazul în care examenele sunt negative, se mai poate recomanda și tăierea mai multor porțiuni mici din lama unghiulară, care se fierb 1/2-1 oră în soluție de hidroxid de potasiu 10%, până la macerare, și apoi se examinează la microscop.

Instrumentele cu care se face recoltarea materialului patologic sunt, de regulă, instrumente metalice, pense de 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 clocot timp de 30 min. Pentru a se asigura o bună recoltare, trebuie respectat în toate cazurile locul de recoltă; zona se alege cu grijă, în raport cu tipul de ciupercă și de leziune.

Cercetarea micologică a materialului patologic recoltat se face fie prin **examenul microscopic direct** al produsului patologic recoltat, efectuat extemporaneu, după fixare în soluție de potasă caustică 40%, sau lactofenol, fie prin **metode de cultivare a ciupercilor pe medii de cultură**.

Aceste două categorii de metode de diagnostic sunt completate în unele cazuri cu **reații imunobiologice** (seroreacții, IDR) și cu inoculări de **produse patologice** la 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 lamă și lamelă a produsului patologic disociat în prealabil într-o picătură dintr-o soluție de lactofenol, cloral-lactofenol, soluție Lügol.

Pentru a fi concludent, examenul direct poate fi completat cu examenul preparatelor colorate cu albastru de metilen, colorație Gram sau cu colorații selective.

Diagnosticul prin culturi. Examenul direct al produsului patologic este acela care precizează natura micotică a unei afecțiuni. Precizarea speciei de ciupercă patogenă se face numai prin cultivarea paraziților pe medii selective.

– Mediile de cultură folosite în acest scop, în micologie, pot fi grupate în două mari categorii: **medii de izolare**, pe care ciupercile sunt trecute din viața parazită în viața saprofită, și **medii de probă**, destinate dezvoltării caracterelor morfologice tipice ale ciupercii izolate, precizând astfel specia respectivă.

Dintre mediile uzuale, cităm: mediul Sabouraud, mediul Czapek, Raulin, Gorodkova, iar dintre mediile speciale: mediul mălai-agar, orez-bilă, mediul Nikerson ș.a. Testele de fermentare completează lista mediilor în care, pe baza caracterelor morfofuncționale, se identifică speciile de ciuperci.

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

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

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

TRATAMENTUL BOLILOR PARAZITARE

Boln	Denumirea substanței	Denumirea comercială	Prezentare	Doza (adult)	Durata tratamentului
1.	2.	3.	4.	5.	6.
1. Dizenteria ambiană	Emetina	Emetina	soluție 2% f = 1 ml	0,001 g/kgc/zi	10 zile
	2-Dehidroemetina		tb = 0,010 g	0,001 g/kgc/zi	7-10 zile
	Nitidazol	Ambilhar	tb = 0,5 g	25 mg/kgc/zi	5-10 zile
	Hidroxi-nitro-imidazol	Metronidazol (Rom.) (Flagyl, CLONT) (Franța)	tb = 250 mg	4 tb/zi (500 mg x 3 zi) max	10 zile
	Tinidazol	Fasigyn (SUA)	tb = 150 mg	2 g/zi	3 zile
	Ornidazole	Ornidazole	tb = 500 mg	2 g/zi	doză unică
	Secnidazole	Flagentyl (CIBA)	tb = 150 mg	30 mg/kgc/zi	
	Aminochinoleina	Clorochin (Rom.) Aralen (Winthrope) Nivaquine (Specia) Resochin (Bayer)	tb = 0,200 g	0,005-0,01 g/kgc/zi	10 zile

Boln	Denumirea substanței	Denumirea comercială	Prezentare	Doza (adult)	Durata tratamentului
1.	2.	3.	4.	5.	6.
2. Giardioza	Mepacrina Biclorhidrica	Mepacrin (Atebrin, Quinacrin)	CP = 0,1 g	0,100 g x 3 zi	5-7 zile
	Hidroxi-nitro-imidazol	Flagyl (Franța) Metronidazol (Rom.) (CLONT Bayer)	CP = 0,25 g CP = 0,25 g	1 g/zi total	5-10 zile 10 zile
	Tinidazol	Fasigyn (SUA)	tb = 150 mg tb = 500 mg	2 g/zi total	1 zi
	Nitrofuran	Furazolidon (Furoxon)	CP = 0,10 g CP = 0,025 g picături	0,3 - 0,4 g/zi	6-10 zile
	Giardicid (sirop)	—		2 x 60 pic/zi	10 zile
		Bemersal	CP = 0,5 g	2 g/zi	10 zile
3. Trichomonaza intestinală	Hidroxicinoleina	Intestopan	CP = 240 mg	6 cp/zi	6-7 zile
	Hidroxi-nitro-imidazol	Metronidazol	CP = 0,25 g	1 g/zi	10 zile
4. Trichomonaza urogenitală	Tinidazol	Fasigyn	tb = 150 mg tb = 500 mg	1-2 g/zi	1 zi
	Hidroxi-nitro-imidazol	Metronidazol	CP = 0,250 g; ovule vaginale = 0,5 g	1 g/zi 1-2 ovul/zi	10 zile 10-15 zile
		" " "	CP = 0,250 g	1 g/zi	10 zile
		Tricomicon	CP vaginale	2-3/zi	10-15 zile

Boala	Denumirea substanței	Denumirea comercială	Prezentare	Doza (adult)	Durata tratamentului
1.	2.	3.	4.	5.	6.
4. Trichomonaza urogenitală	Tinidazol	Fasigyn (SUA)	CP = 500 mg	2 g/zi	1 zi
	Nitrimidazina	Nimorazol	1 CP = 250 mg	0,5 g/zi per os 1 CP intravaginal	6 zile 6 zile
5. Leishmanioza viscerală	Stibofenul	Fuadin (Neoanthimosan)		5 ml/zi	5 zile
	Antimoniatal de N-metil-glucamina	Glucantime (Solusurmin) (Rusia)	soluție f = 0,3g/ml	0,10 mg/kgc/zi	10-12 zile
	Pentamidina Isetionat	Lomidine	soluție 4%	1 ml/10 kg 2-4 mg/kgc/zi	9 zile
6. Balantidioza	Chiniofon	Yatren 105	per os pil.0,25 g rectal clisme 0,5%	3-4 pilule/zi	7 zile
	Carbarson	Fenarson (Pentarson Aminarson)	tb = 0,25 g	0,5 g/zi	10 zile
	Diphetarson (DCI)	Bemarsal	CP = 0,50 g	2 g/zi (1+2+1)	2 cure a 10 zile cu 6 săpt. pauză
		Metronidazol	CP = 0,250 g	2 g/zi	10 zile
		Nimoraxol (Naxogin)	tb = 0,25 g	0,5 g/zi/os 1 cp vag./zi	6 zile 6 zile

Boala	Denumirea substanței	Denumirea comercială	Prezentare	Doza (adult)	Durata tratamentului	
1.	2.	3.	4.	5.	6.	
7. Toxoplasmoza	Pyrimetamina	Daraprim (Malocid) (Anglia)	tb = 0,025 g	0,5-1 mg/kgc/zi	21 zile	
	Cotrimoxazol	Biseptol (Polonia)	CP = 480 mg	2 CP/zi	10 zile	
	Spiramicina	(Rovamycine)	CP = 0,5 g	2 g/zi	3 săpt.	
	Dimetilortetraciclina	(Demclociclina Ledermycin Declomycin)	CP = 150 mg	6 CP/zi	3-4 săpt.	
		Izotianat de pentamidină	Lomidine	soluție 1 ml/f	4 mg/kgc/zi	10-14 zile
		Pirimetamină	Daraprim	tb = 0,025 g	0,5-1 mg/kgc/zi	10-15 zile
8. Pneumocistoza	Pirimetamină Sulfadiazină	Fansidar	tb = 0,025 g P tb = 0,5 g S	P. 0,5-1 mg/kgc/zi S. 15-20 mg/kgc/zi	10-15 zile	
		Cotrimoxazol	CP = 480 mg	2 CP/zi	10 zile	
		4-Aminochinolona	Resochin, Aralen, Avloclor	CP = 0,25 g	prima zi 6CP sau 10mg/kgc/zi 2-3a zi/ 2 CP/zi	3 zile
9. Malaria (Paludismul)		Clorochina Delagyl (Rom.) Nivaquine	CP = 0,2 g f = 5 ml = 0,25 g CP = 0,1 g f = 0,3 g	prima zi 6 CP 2 CP/zi x 2 zile	3 zile	

Boala	Denumirea substanței	Denumirea comercială	Prezentare	Doza (adult)	Durata tratamentului
1.	2.	3.	4.	5.	6.
9. Malaria (Paludismul)	Pirimetamina Sulfadoxina	Fansidar	CP = 0,025 g P. CP = 500 mg S f = 2,5 ml	2-3 CP/zi 5-7,5 ml/zi	1 zi
	8-Aminochinolona	Primachina	DJ = 15 mg	15 mg/zi	14 zile
	Pirimetamina	Daraprim (Malocid) Tindurin, Erbaprelin	CP = 0,025 g	2 CP/zi	se repetă la 3 săpt.
	Chinina	Chinina	DJ = 0,25 g DJ = 500 g	1-1,5 g/zi	7 zile
	Quinolycarbinol	Mefloquine (Lariam, Roche)	tb = 0,25 g	Adulți: 15 mg/kgc/zi 3 CP	Doză unică
	Primaquine diphosphate	Primaquine	tb = 15 mg	2 tb/zi	14 zile
	Isopropil-biguanid	Paludrine	CP = 0,1 g	0,30 g/zi	10 zile
	Hidroxilorochin	Hidroxilorochin Plaquenil (Winthrop-Anglia)	DJ = 0,2 g	1,2 g 0,4 g	prima zi la 2 zile
	Mepacrinum	Mepacrin Atebrin-Bayer (Quinacrin, SUA)	CP = 0,1 g	6 CP 3 CP (2 mg/kgc/zi)	prima zi ziua a doua 3 zile

Boala	Denumirea substanței	Denumirea comercială	Prezentare	Doza (adult)	Durata tratamentului
1.	2.	3.	4.	5.	6.
10. Teniaze (T.saginata, T.solium, Diphylobotrium)	Niclosamidum	Niclosamid, Radeverm, Dever- mine, Tredemine, Yomesan	1 CP = 500 mg	2 g/zi	1 zi p.o. à jeun, cu purgativ
	Mepacrinum	Mepacrin, Atebrin, Quinacrin, Metoquin	1 CP = 100 mg	15 mg/kgc/zi	p.o. sau pe sondă duo- denală cu purgativ
	2,2'-Dihidroxi- 5,5'-diclor-difentimetan Cucurbitin	Diclofen, Antifen, Plath-Lyse, Fugitène, Sămânță bostan	1 compr. = 500 mg 4-500 g. miez	50 mg/kgc/zi (max.5 g) Decoct, extract	per os doză unică, à jeun p.o. în timp de 60 min.
	Mebendazolium	Vermox, Nemasole, Vermirax, Vermin, Vermox "500"	1 CP = 100 mg 1 CP = 500 mg	15-50 mg/kgc/zi	p.o., cure repetate de 30 zile cu interval de 30 zile
	Albendazole	Albendazole Zentel (Bayer)	1 CP = 0,2 g 1 CP = 0,4 g	10-15 mg/kgc/zi	30 zile cu pauză 15-25 zile
Hidatioza T.echinococcus	4-Aminochinolona	Resochin, Aralen, Avlocor Nivaquine (Rhône-Poulenc)	1 CP = 0,25 g 1 CP = 0,150 g	5-10 mg/kgc/zi	per os doză unică zilni- că x 30 zile cu pauze de 30 zile

Boala	Denumirea substanței	Denumirea comercială	Prezentare	Doza (adult)	Durata tratamentului
1.	2.	3.	4.	5.	6.
Hymenolepis nana, H. diminuta Dipilidioze	Niclosamidum Mepacrinum Cucurbitin 2,2'-Dihidroxi-5,5'-diclor-difenil-metan	Vezi Teniaze Vezi Teniaze	1 CP = 500 mg 1 CP = 100 mg	1,5 g/zi 15 mg/kgc/zi	Se repetă după 7 zile Se repetă după 30 zile
11. Trematode (Fasciola hepatica, Dicrocoelium lanceotum Opistorchis felineus)	2-Dehidroemetina Fenantrolin chinona Stibofenum Praziquantel	Dehidroemetina Entobex, Fanchinon Fuadin, Ineo-anthimosan Praziquantel	1 f = 1 mg 1 CP = 50 mg 1 f = 5 ml tb = 600 mg	1 mg/kgc/zi 100-300 mg/zi 0,25 ml/kgc/zi sau 3 x 5 ml 20-30 mg/kgc/zi	s.c., 10 zile p.o., 10 zile Se repetă peste 30 zile i.m. la 3 ore int.5-7 zile x 2 zile
12. Nematode ascaridioza	Piperazina adipat Piperazină citrat Piperazină hexahidrat	Nematocton, Helmirazine, Nematocid, Antivermine, Entracyl, Nometan, Piavermit, Vermicompren, Entefuge Eryrel, Pipizan, Santoban, Antelmima, Eraverm Helmizin, Uvilon	1 CP = 300 mg sol.10%, fl = 50 ml fl = 100 ml sol.20%, fl=100 ml	50 mg/kgc/zi fără a depăși 3g adult	p.o., 5-7 zile

Boala	Denumirea substanței	Denumirea comercială	Prezentare	Doza (adult)	Durata tratamentului
1.	2.	3.	4.	5.	6.
12. Nematode ascaridioza	Hidroxi-3-izopropil-4-toluen Levamisolum Mebendazolium Flubendazole Tiabendazolium Pyrantelium Hidroxi-naftoat de bethovenium	<i>Timol</i> Decaris, Rentrax, Levasol, Levoripersol, Solaskil, Tramisol, Levo-tetramisole, Citarin Vermox, Nemasole, Vermirax Fluvermal Mintezol Combantrin, Helmex, Strongid Alcopar, Naftamon	Rp/magistral, cașete DJ = 150 mg 1 CP = 100 mg 1 CP = 100 mg 1 CP = 500 mg 1 CP = 250 mg 1 fl = 15 ml sol. suspens. plic = 5 g	1,0 g/zi 1-3 mg/kgc/zi 200 mg/zi 100 mg/zi 25-30mg/kgc/zi (max.2 g/zi) 10 mg/kgc/zi 5 g/zi	p.o. în 2 prize la 30 interval-7 zile doză unică p.o., 3 zile p.o. doză unică p.o.3 zile, în 2 prize p.o. doză unică p.o. în sirop doză unică
13. Oxiozoza	Piperazina adipat Piperazina citrat	Vezi Ascaridioza Vezi Ascaridioza	1 CP = 300 mg sol.10%- 50 ml.fl. 100 ml.fl.	50 mg/kgc/zi	2 serii de 7 zile cu 10 zile pauză

Boala	Denumirea substanței	Denumirea comercială	Prezentare	Doza (adult)	Durata tratamentului
1.	2.	3.	4.	5.	6.
13. Oxiuroza	Piperazină hexahidrat	<i>Timol</i>	sol.20% - 100ml.fl.	1,0 g/zi	2 serii de 7 zile cu 7 zile pauză
	Hidroxi-3-izopropil-4-toluen		Rp./cașete	1,5 g/zi	3 serii de 5 zile cu 7 zile pauză, asociat în ziua a 3-a și a 5-a cu purgativ
	Methilrozaniilat chloridum	Oxiuran, Violet de gențiană, violet cristalizat, violet, Pyocianum Coeruleum, Badyi, Gentiolen, Meroxyl, Vercit, Viocid	1 CP = 25 mg 1 CP = 10 mg		Doză unică
	Pyrvinit chloridum	Pyrvinit embonate, <i>Vermigal</i> , Helvin, Molevac, Povan, Pyrocon, Vanquin	fl = 25 ml susp.1%	5 mg/kgc/zi	
	Mebendazolium	Vermox, Nemasole, Vermirax	1 CP = 100 mg	100 mg/zi	Doză unică Se repetă la 14 zile
	Thiabendazolium	Mintezol	1 CP = 500 mg	25-50mg/kgc/zi	3 zile
	Pyrantelium pamoat	Combantin, Hermex, Strongil	1 CP = 250 mg 1 fl. = 15 ml susp.	" "	p.o., doză unică p.o., doză unică

Boala	Denumirea substanței	Denumirea comercială	Prezentare	Doza (adult)	Durata tratamentului
1.	2.	3.	4.	5.	6.
13. Oxiuroza	Flubendazole	Fluvermal	1 CP = 100 mg	100 mg	doză unică
	Mebendazolium	Vermox, Nemasole, Vermirax	1 CP = 100 mg	200 mg/zi	p.o., 3 zile
14. Tricocefaloza	Flubendazole	Fluvermal	1 CP = 100 mg	200 mg/zi	p.o., 3 zile
	Diethylcarbaminium	Loxuran, Banocide, Carbilazine, Hetrazan, Notezine	1 CP = 50 mg	6 mg/kgc/zi	p.o., 2 serii de 10 zile, cu pauză de 10 zile
	Hidroxi-3-izopropil-4-toluen	<i>Timol</i>	Rp./magistral cașete (0,2 - 0,5 g)	1,0 g/zi	7 zile
	Dithiazine iodide	Telmiód	1 CP = 100 mg	10 mg/kgc/zi	5 zile, repetă după 14 zile
15. Strongiloi-doza	Pyranthelium pamoat	Combantin, Helmex, Strongid	1 fl = 15 ml susp. 1 CP 250 mg	10 mg/kgc/zi	doză unică
	Tiabendazolium	Mintezol	1 CP = 500 mg	25-50 mg/kgc/zi	3 zile, în 2 reprize zilnice, repetă după 10 zile
	Dithizanine iodide	Telmid	1 CP = 100 mg	300 mg/zi (sau 10 mg/kgc/zi max.)	14-21 zile

Boala	Denumirea substanței	Denumirea comercială	Prezentare	Doza (adult)	Durata tratamentului
1.	2.	3.	4.	5.	6.
15. Strongiloidoza	Pyranthelium pamoat	Combatrin, Helmex, Strongid	1 fl = 15 ml 1 CP = 250 mg	10 mg/kgc/zi (3 tb/zi)	doză unică
	Mebendazolium	Vermox, Nemasole, Vermirax	1 CP = 100 mg	200 mg/zi	p.o., 3 zile
16. Ankylostomiaza	Methylrosanilinat chloridum	Oxurax, Badyl, Gentoletten, Meroxyl, Vercit, Viocid	1 CP = 25 mg 1 CP = 10 mg	1,5 g/zi	3 serii x 5 zile cu pauze de 7 zile
	Pyrvinii chloridum	Vermigal, Helvin, Povan, Pyrcon, Vanguin, Molevac	1 fl = 25 ml susp.1%	5 mg/kgc/zi	doză unică
16. Ankylostomiaza	Levamisolum	Decaris, Solaskil, Tramisol, Levoripercol, Levasole, Citarin, Kentrax, Levotetramisole	1 DJ = 150 mg	2,5 mg/kgc/zi max. 150 mg	1 zi sau de 3 ori cu 7 zile interval
	Hidroxi-3-izopropil-4-toluen	Timol	Rp./magistral casete (0,2 - 0,5 g)	1,0 g/zi	7 zile
16. Ankylostomiaza	Dietilcarbaminium	Loxuran, Banocid, Carbilazine, Hetrazan, Notezine	1 CP = 50 mg	5 mg/kgc/zi	p.o., 2 serii în 10 zile cu 10 zile pauză

Boala	Denumirea substanței	Denumirea comercială	Prezentare	Doza (adult)	Durata tratamentului
1.	2.	3.	4.	5.	6.
16. Ankylostomiaza	Levamisolum	Vezi Strongiloidoza	1 DJ = 100 mg	2,5-5 mg/kgc/zi	3 zile consecutiv sau de 3 ori cu 7 zile interval
	Mebendazolium	Vermox, Nemasole, Vermirax	1 CP = 100 mg	300 mg/zi	p.o., 3 zile
16. Ankylostomiaza	Tiabendazolium	Mintezol	1 CP = 500 mg	25-50mg/kgc/zi max. 2 g/zi	3 zile, în 2 prize zilnic. Repetă după 10 zile
	Pyranthelium pamoat	Combatrin, Helmex, Strongid	1 fl = 15 ml 1 CP = 250 mg	10 mg/kgc/zi	Doză unică
16. Ankylostomiaza	Tetrachloretilena	Didakene	1 CP = 1 mg	0,1 mg/kgc/zi	Doză unică
	Hidroxi-naftoat de Bephenium	Alcopar, Naphitamon	1 plic = 5 g	5 g/zi	Doză unică sirop
16. Ankylostomiaza	Flubendazol	Fluvermal	1 CP = 100 mg	200 mg/zi	p.o., 1 zi
	Para-difeniten-dizocianat	Bytoscanat, Jonit	1 CP = 50 mg	200 mg/zi	p.o., 2 zile, la 12 ore interval
17. Trichineloză	Dietilcarbaminium	Loxuran, Banocid, Carbilazine, Metrazone, Notezine	1 CP = 50 mg	5 mg/kgc/zi	p.o., 2 serii de 10 zile, cu 10 zile interval

Boala	Denumirea substanței	Denumirea comercială	Prezentare	Doza (adult)	Durata tratamentului
1.	2.	3.	4.	5.	6.
17. Trichineloză	Piperazine adipat Piperazine citrat Piperazine hidrat Triabendazolium	Vezi Ascaridioză		50 mg/kgc/zi	2 serii de 7 zile cu 10 zile pauză
	Flubendazole	Mintezol	1 CP = 500 mg	25-50 mg/kgc/zi max. 2g/zi	5 zile, la 12 ore interval. Repetă după 10 zile
	Stibocaptat sodic	Fluvermal	1 CP = 100 mg	200 mg/zi	1 zi, repetă după 10 zile
18. Distomatoza intestinală	Niclosamidum	Astibon, Stiboten, Fuadin	1 CP = 500 mg	0,1 ml/kgc/zi	10 zile
19. Paragonimioza	Bithionol Praziquantel	Vezi Teniaze Bitin Praziquantel	1 CP = 200 mg 1 CP = 0,600 g	1,5-2 g doză totală 15 mg/kgc/zi	p.o., 1 zi p.o., 15 zile p.o., 3 zile
20. Tripanosomiatoza	Suramina	Bayer 205, Antrypol Moranyl	sol. 10% F = 1 g	0,02 g/kgc/zi	se repetă săpt. până la 5-6 g

Boala	Denumirea substanței	Denumirea comercială	Prezentare	Doza (adult)	Durata tratamentului
1.	2.	3.	4.	5.	6.
20. Tripanosomiatoza	Pentamidina Triparanida Melarsoprol	Lomidine Triparsona Mel B, Arsobal	sol. 4% sol. 10-20% inj. f = 5 ml. sol. 3,6%	3 ml/kgc/zi 0,035 g/kgc/zi max. 3,6 mg/kgc/zi	cicluri de 8-10 injecții 1 inj./săpt. 8 - 10 inj. 3-4 zile
21. Clonorchis	Furapromidium Bithionol Praziquantelum	Furapromidium Actamer (Bithin S) Praziquantelum	CP = 0,5 g CP = 0,2 g CP = 0,4 g	3 g/zi 30-50mg/kgc/zi 25-30mg/kgc/zi	5-10-15 zile 10 zile 1 zi
22. Schistosomiatoza	Antimoniu trivalent Stibocaptatul sodic Stibofen Niridazole	Emeticul de sodiu-potasiu Astiban Fuadin Ambilhar	sol. 1% (0,03 g) f = 2 g sol. CP = 100 mg CP = 500 mg	3 ml 0,008 g/kgc/zi 5 ml/zi 25 mg/kgc/zi	se repetă la 2 zile zilnic, sau o dată / săpt. 9-12 zile 5-7 zile
23. Filarioza	Lucantonul Hycantonul Oxamnichina Praziquantel Dietilcarbamazina	Miracil D, Nilodin Etrenol Oxamnichina Praziquantel Hetrazan, Notezine, Banocid, Loxuran	DJ = 0,2 g DJ = 0,25 g f = 200 mg sol. inj. CP = 0,6 g	5 mg/kgc/zi 3 mg/kgc/zi 7,5 mg/kgc/zi 25-30mg/kgc/zi 1-4 mg/kgc/zi	3 zile 1 zi 3 zile 1 zi 10 zile

Boala 1.	Denumirea substanței 2.	Denumirea comercială 3.	Prezentare 4.	Doza (adult) 5.	Durata tratamentului 6.
23. Filarioza	Levamisol	Decaris, Ketrax, Solaskil	CP = 50 mg CP = 150 mg	1 tb/zi	1 zi
	Suramina	Antrypol, Bayer 205 Moranyl	sol. 10%	20 mg/kgc/zi	se repetă săpt. de 5-6 ori
	Niridazol	Ambilhar	CP = 500 mg	30 mg/kgc/zi	10 zile
	Thiabendazol	Mintezol	CP = 0,5 g	25-50mg/kgc/zi	2 zile
	Avermectin	Ivermectin	tb = 6 mg	100-150 μg/kgc/zi	1 zi pe an

CUPRINS

Prefată	3
MICROBIOLOGIE GENERALĂ	7
<i>Cap. I. Introducere în studiul microbiologiei</i>	<i>8</i>
1. Obiectul microbiologiei	8
2. Scurt istoric	8
3. Măsuri de protecția muncii în laboratorul de microbiologie	12
<i>Cap. II. Morfologia bacteriilor</i>	<i>15</i>
1. Mijloace de studiu a morfologiei bacteriene	15
1.1. Microscopul fonic	15
1.2. Microscopul electronic	19
2. Forma, dimensiunile și modul de grupare a bacteriilor	20
3. Structura celulei bacteriene	21
<i>Cap. III. Fiziologia bacteriilor</i>	<i>25</i>
1. Compoziția chimică a bacteriilor	25
2. Metabolismul bacterian	25
3. Înmulțirea bacteriilor	27
<i>Cap. IV. Acțiunea agenților fizici, chimici și biologi asupra microbilor</i>	<i>29</i>
<i>Cap. V. Cultivarea bacteriilor</i>	<i>31</i>
1. Mediile de cultură	31
2. Însămânțarea mediilor de cultură	34
<i>Cap. VI. Sterilizarea și dezinfectia</i>	<i>38</i>
1. Sterilizarea	38
1.1. Sterilizarea prin căldură	38
1.2. Sterilizarea prin filtrare	40
1.3. Sterilizarea cu raze ultraviolete	40
2. Dezinfectia	41
<i>Cap. VII. Recoltarea produselor biologice, a apei și a alimentelor pentru examene de laborator</i>	<i>45</i>
1. Recoltarea și transportul produselor patologice	45
2. Recoltarea apei pentru examenul bacteriologic și fizico-chimic	53
3. Recoltarea alimentelor pentru controlul sanitar	54
<i>Cap. VIII. Examenul microbilor</i>	<i>57</i>
1. Examenul preparatelor native	57
2. Examenul preparatelor colorate	57
3. Coloranți și colorații	58
<i>Cap. IX. Patogenitatea microorganismelor și procesul infecțios</i>	<i>63</i>
<i>Cap. X. Mijloace de apărare ale organismului împotriva agresiunii microbiene ..</i>	<i>68</i>

1. Rezistența naturală.....	68
2. Imunitatea specifică dobândită.....	69
2.1. Antigenele.....	70
2.2. Anticorpii.....	72
2.3. Imunitatea umorală.....	73
2.4. Imunitatea mediată celular.....	74
2.5. Aplicații practice ale imunologiei în patologia infecțioasă.....	75
2.5.1. Imunitatea activă.....	75
2.5.2. Imunitatea pasivă.....	76
Cap.XI. Reacții antigen-anticorp utilizate în diagnosticul de laborator al bolilor infecțioase.....	78
1. Reacția de precipitare.....	78
2. Reacția de aglutinare.....	81
3. Reacția de imunofluorescență.....	82
4. Reacția de liză.....	83
5. Reacția de fixare a complementului (R.F.C.).....	83
6. Reacția de seroneutralizare.....	84
Cap.XII. Epidemiologia bolilor transmisibile.....	85
1. Izvorul de infecție.....	85
2. Căile și mecanismele de transmitere ale agenților infecțioși.....	85
3. Starea de receptivitate a populației.....	86
4. Forme de manifestare a procesului epidemiologic.....	86
5. Profilaxia și combaterea bolilor transmisibile.....	87
MICROBIOLOGIA SPECIALĂ.....	89
Cap.XIII. Cocii Gram-pozitivi.....	90
1. Stafilococul.....	90
2. Streptococul.....	94
3. Pneumococul.....	98
Cap.XIV. Cocii Gram-negativi.....	103
1. Meningococul.....	103
2. Gonococul.....	107
Cap.XV. Bacilii Gram-negativi.....	111
1. Familia Enterobacteriaceae. Generalități.....	111
1.1. Bacilul coli.....	113
1.2. Genul Salmonella.....	115
1.2.1. Infecțiile tifo-paratifoidice.....	117
1.3. Bacilul Proteus.....	123
1.4. Genul Klebsiella.....	125
1.5. Bacilul dizenteric.....	126

2. Vibriionul holeric.....	129
Cap.XVI. Toxiinfecțiile alimentare.....	134
Cap.XVII. Bacilul difteric.....	140
Cap.XVIII. Bacilul tuberculos.....	144
Cap.XIX. Bacilul leprei.....	151
Cap.XX. Bacilul cărbunos.....	152
Cap.XXI. Bacterii anaerobe.....	156
1. Caractere generale.....	156
2. Bacilul tetanic.....	157
3. Bacilii gangrenei gazoase.....	157
4. Bacilul botulinic.....	158
Cap.XXII. Spirochetele.....	160
1. Genul Treponema.....	160
2. Genul Leptospira.....	165
3. Genul Borrelia.....	167
Cap.XXIII. Rickettsiile.....	169
Cap.XXIV. Noțiuni de genetică bacteriană.....	172
1. Noțiuni generale.....	172
2. Variabilitatea microbiană.....	172
3. Transferul de material genetic la bacterii.....	173
3.1. Transformarea.....	173
3.2. Transducția.....	174
3.3. Conjugarea.....	174
VIRUSOLOGIE.....	177
Cap.XXV. Virusologie generală.....	178
1. Definiție.....	178
2. Caracterele generale ale virusurilor.....	178
3. Clasificarea virusurilor și a virozelor.....	179
4. Morfologia, structura și compoziția chimică a virusurilor.....	180
5. Cultivarea și modul de multiplicare a virusurilor.....	181
5.1. Cultivarea virusurilor pe animale de laborator.....	181
5.2. Cultivarea virusurilor pe ouă embrionate.....	187
5.3. Cultivarea virusurilor pe culturi de celule.....	188
6. Acțiunea unor agenți fizici și chimici asupra virusurilor.....	192
7. Interferență. Interferoni.....	193
8. Metode de cercetare a virusurilor.....	194
Cap.XXVI. Virusologie specială.....	196
1. Virusurile gripale.....	196
2. Virusul rabic.....	200

3. Virusurile hepatice.	204
4. Virusurile polimielitei.	206
5. Virusul variolic.	209
6. Virusul rujeolei.	209
7. Virusul imunodeficienței umane (HIV).	210
Cap. XXVII. Noțiuni generale de parazitologie	214
1. Parazitism și relațiile parazit-gazdă.	214
2. Căile de circulație a paraziților în natură. Răspândirea geografică a paraziților.	215
2.1. Căile de circulație a paraziților în natură.	215
2.2. Răspândirea geografică a paraziților.	216
Cap. XXVIII. Protozoologie	217
1. Caractere generale, clasificare.	217
2. Clasa Rhizopode.	218
2.1. Amibe.	219
2.2. Dizenteria amibiană.	221
3. Clasa Flagelate.	222
3.1. Familia Trichomonidae.	223
3.2. Familia Octimidae.	226
4. Clasa Sporozoa.	228
4.1. Genul Plasmodium.	228
4.2. Genul Toxoplasma.	233
5. Clasa Infuzori.	235
Cap. XXIX. Helminnologie	237
1. Îngreșătura Plathelminți.	237
1.1. Clasa Trematoda.	237
1.2. Clasa Cestoda.	239
1.2.1. Familia Taeniidae.	240
1.2.2. Familia Diphylobothridae.	247
1.2.3. Familia Hymenolepidae.	249
2. Îngreșătura Nematelminți.	251
2.1. Clasa Nematode.	251
2.1.1. Familia Trichinellidae.	251
2.1.2. Familia Ascarididae.	256
2.1.3. Familia Oxyuridae.	259
2.1.4. Familia Ankylostomidae.	261
2.1.5. Familia Rhabditidae.	264
Cap. XXX. Entomologie	267
1. Clasa Arachnide.	267
1.1. Familia Ixodidae.	267

1.2. Familia Demodecidae.	269
1.3. Familia Sarcopidae.	270
2. Clasa Insecte.	272
2.1. Familia Culicidae.	272
2.2. Familia Muscidae.	275
2.3. Familia Pulicidae.	277
2.4. Familia Pediculidae.	279
2.5. Familia Cimicidae.	281
3. Lupta împotriva artropodelor. Mijloace moderne de combatere.	282
3.1. Măsurile profilactice.	282
3.2. Măsurile distructive.	282
Cap. XXXI. Micologie	284
1. Noțiuni generale.	284
1.1. Morfologia.	284
1.2. Înmulțirea.	284
1.3. Nutriția.	284
1.4. Toxinele.	285
1.5. Rolul patogen al ciupercilor.	285
2. Tricofitia.	286
3. Favusul.	287
4. Microsporia.	288
5. Epidermofitia.	290
5.1. Epidermofitia inghinală și interdigitală.	290
5.2. Eritrasma.	290
5.3. Pitiriasis versicolor.	291
6. Candidoza și actinomicoza.	292
6.1. Candidoza.	292
6.2. Actinomicoza.	293
Lucrări practice	295
Tratamentul bolilor parazitare	300