

3

METODELE MICROBIOLOGICE DE DIAGNOSTIC

3.1. RECOLTAREA, CONSERVAREA ȘI TRANSPORTUL MATERIALULUI EXAMINAT

Clinicianul cere depistarea unor microorganisme în prelevate patologice de la bolnav, pentru a stabili etiologia unei boli infecțioase și, prin aceasta, tratamentul antimicrobian corect. *Epidemiologul* urmărește prezența unui microorganism în prelevate patologice de la bolnavi, în probe recoltate de la persoane sănătoase și în probe de mediu (aer, apă, alimente etc.) pentru a stabili filiația cazurilor unei boli transmisibile, precum și căile de transmitere. *Igienistul* folosește microorganisme depistate în probe de mediu ca indicatori sanitari pentru calitatea ambianței noastre comunale, din școli, din spitale etc.

În acest capitol sunt prezentate metodele de recoltare, conservare și transportul prelevatelor patologice de la bolnavi sau purtători sănătoși. Aceleași probleme legate de prelevarea probelor de mediu le veți urmări în capitolele de Microbiologie sanitară.

3.1.1. Alegerea prelevatelor patologice

Microbul infectant, eventual antigenii ai săi, este căutat la poarta de intrare a infecției, în căile de răspândire în organism, în organele țintă și la nivelul căilor de eliminare, apreciate pe baza examenului și raționamentului clinic și în măsura în care acestea sunt accesibile prelevării prin tampon, prin puncție și aspirație, biopsie sau ca excreții. De exemplu la un pacient cu sindrom de febră enterică se vor preleva și examina: materiile fecale (intestinul — poartă de intrare, organ țintă și cale de eliminare a bacililor tifici), sângele (calea de răspândire a infecției în organism), măduva osoasă sau exsudatul maculelor cutanate (țesuturi țintă), urina (calea de eliminare). Pentru depistarea portajului de bacili tifici se examinează bila și urina.

Stadiul bolii influențează șansa izolării microbului. Continuând examenul de mai sus, șansele izolării bacilului tific în hemocultură scad de la 80—90% în prima săptămână de boală la numai 10% în săptămâna a 4-a; în schimb, în același interval, procentul izolărilor în coprocultură crește de la 10—15 la 75.

Prelevatele examinate trebuie să reprezinte realul produs patologic, adică material din leziuni care vehiculează microbul infectant sau antigenii săi. În sânge, în lichidul cefalorahidian sau în urină microbii antrenaji din leziuni sunt repartizați uniform. Distribuția lor în probleme de spută, materii fecale, exsudate de pe suprafața mucoaselor, din plăgi ș.a. nu este în mod necesar uniformă. Dacă în loc de spută se trimite spre examinare salivă, în loc de exsudat amigdalian un tampon îmbibat cu salivă, un răspuns util din partea laboratorului este imposibil.

3.1.2. Norme de bază pentru prelevarea probelor destinate examenului microbiologic

1. Prelevările se fac *înaintea instituirii tratamentului antimicrobian*. Depistarea microbului infectant devine adesea imposibilă încă în primele ore de antibioticoterapie, chiar ineficientă.

2. Prelevatele patologice trebuie să fie în *cantitate suficientă* pentru efectuarea corectă a examenelor microbiologice.

3. Prelevările se fac *aseptic* cu instrumentar și în recipiente sterile. Trebuie:

- *Prevenită contaminarea probelor cu microbi din mediul extern.*

- *Prevenită sau redusă contaminarea probelor cu microbiota indigenă.* Orice contaminare a prelevatelor din zone normal sterile este critică (rezultate fals pozitive). Pentru prelevatele care traversează zone normal colonizate sau provin din asemenea zone ne limităm la reducerea cât mai eficientă a microbiotei de colonizare prin spălare. Când metoda nu dă rezultate, se poate recurge la prelevări care șuntează căile naturale de eliminare și contaminare (aspirația transtraheală, aspirația suprapubiană etc.). Acestea sunt însă tehnici agresive acceptate numai când relația risc — beneficiu înclină în favoarea beneficiului.

- *Prevenită infectarea pacientului în timpul prelevării*, infectarea personalului și contaminarea mediului extern cu microbi patogeni. Periculoasă este contaminarea suprafeței externe a recipientelor, spargerea lor. Sângele și alte umori sunt periculoase chiar când provin de la persoane aparent normale (pericolul virusului hepatitei B sau al imunodificienței umane).

4. Prelevatele supuse analizei trebuie să fie însoțite de *date informative suficiente*. Acestea sunt cuprinse în cererea de analiză, parte componentă a buletinului de analiză, sau, în cazul anchetelor epidemiologice, în tabele nominale. Semnificația datelor informative se grupează astfel:

- date necesare identificării probei: numele, prenumele, vârsta pacientului, data recoltei, spitalul, secția, salonul;

- date necesare alegerii celor mai adecvate tehnici de prelucrare a probei: diagnosticul prezumtiv, natura probei, examenul solicitat (în termeni cât mai preciși), precizarea dacă este în cauză un bolnav (inclusiv data debutului bolii), convalescent sau purtător, precizări asupra terapiei antimicrobiene eventuale;

- date privind responsabilitatea recoltării și transportului: ora recoltării, data și ora primirii în laborator, medicul care a recomandat analiza și persoana care a făcut recoltarea și a asigurat transportul.

Importanță pentru evitarea unor erori este etichetarea probelor. Cea mai sigură este eticheta autoadezivă. În lipsă se poate recurge la eticheta din leucoplast. Pe etichete se notează cu creion negru sau pix cu bilă: numărul cererii de analiză, numele și prenumele pacientului, prelevatul și data.

3.1.3. Recipiente și instrumente

Pentru prelevări se folosesc, după caz, cutii Petri, eprubete, borcane de 200 ml din sticlă, prevăzute cu capac. Recipientele și instrumentarul destinate prelevării probelor pentru examenul microbiologic se sterilizează exclusiv prin agenți fizici după ce au fost foarte bine spălate pentru îndepărtarea oricăror urme de eventuale substanțe antimicrobiene.



Fig. 3.1. Tamponul de vată pentru prelevarea exsudatelor

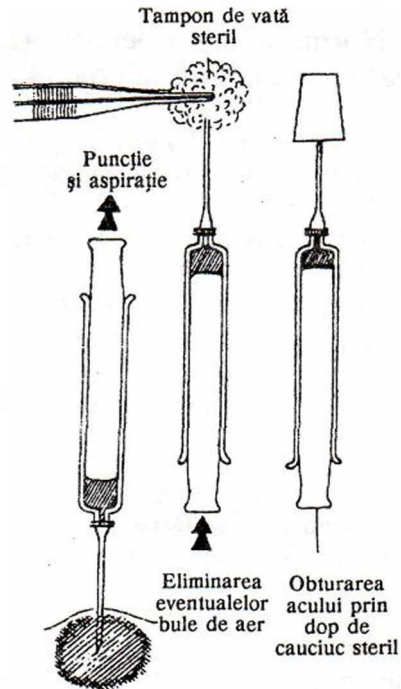


Fig. 3.2. Prelevarea și transportul în seringă a probelor de puroi destinate izolării bacteriilor anaerobe

Un instrument des utilizat pentru prelevate și transport de probe este tamponul de vată (figura 3.1), care trebuie să fie lipsit de inhibitori microbieni (ca acizi grași din vată, ioni metalici sau substanțe distilate din porttampon în cursul sterilizării). De aceea:

- se preferă porttamponul din lemn (nu de rășinoase, care conține substanțe nocive pentru unele microorganisme);

- tamponul se face din vată hidrofila cu fibra lungă

Dopul trebuie să fie dens, pentru a preveni contaminarea sau desicarea probei. În vederea utilizării, tamponanele sunt sterilizate la autoclav ambalate câte 5—10 în hârtie.

Tamponul din vată este indicat pentru prelevarea și transportul exsudatelor de pe suprafața mucoaselor și a țesuturilor denudate. Are însă și dezavantaje, care trebuie cunoscute pentru o utilizare corectă:

- Se prelevă maximum 0,1 ml produs.

- Recuperarea bacteriilor de pe tampon este sub 10%; cel puțin 10^6 organisme trebuie prelevate pe tampon, pentru a le putea depista pe frotiul Gram extemporaneu. De aceea se va evita utilizarea tamponului ori de câte ori sunt posibile prelevări în cantități mai mari prin aspirația exsudatelor fluide, produse de chiuretaj sau biopsii. Se vor preleva mai multe tamponane, dacă examenul presupune efectuarea de frotiuri și însămânțări pe mai multe medii de cultură.

- Leucocitele polimorfonucleare se adsorb în scurt timp pe fibra de vată, alt motiv pentru efectuarea extemporanee a frotiului prin proba prelevată pe tampon.

- Prelevarea pe tampon este contraindicată pentru izolarea bacteriilor anaerobe.

Probele destinate izolării anaerobilor stricți sunt introduse sub atmosferă de azot în flacoane ermetic închise. În lipsa acestora, o modalitate simplă și eficientă este transportul direct în seringă de recoltare după ce a fost îndepărtată orice bulă de aer, iar acul obturat printr-un dop de cauciuc (figura 3.2).

3.1.4. Transportul și conservarea probelor

Moartea microbilor infecțioși din probele destinate examenului microbiologic este o sursă de erori. Poate fi cauzată de: razele solare directe; deshidratare; modificări de pH; autoliză; oxigenul atmosferic în cazul anaerobilor stricți. De aceea, odată recoltate, probele trebuie examinate în cel mai scurt timp posibil sau conservate prin refrigerare și medii de transport adecvate.

Refrigerarea. La 0°C (container izoterm cu gheață umedă) sau la 4°C (frigider) majoritatea microbilor patogeni supraviețuiesc cele câteva ore necesare transportului, iar multiplicarea contaminanților este oprită. De exemplu, semivivața majorității virusurilor (intervalul în care infecțiozitatea suspensiei virale scade cu 50%) se măsoară în ore la temperatura camerei, în zile la 4°C și în luni la -70°C. Puține bacterii nu rezistă la refrigerare: meningococul, gonococul, *Haemophilus influenzae*.

Mediile de transport asigură supraviețuirea microorganismelor prevenind desicarea, variațiile de pH, oxidarea și autoliza. Un indicator, cum este roșu fenol, permite monitorizarea vizuală a pH-ului când această condiție este critică pentru supraviețuirea unor microbi (e.g. virusuri).

Microbii care sunt izolați pe culturi de celule sau embrioni de găină (ca virusurile și chlamidiile) se transportă în medii cu antibiotice (penicilină, streptomycină, nistatină). Când însă în același prelevat se urmăresc atât virusuri, cât și bacterii, proba se suspensionează în mediul de transport fără antibiotice, urmând ca acestea să fie adăugate diferențiat la prelucrarea probei în laborator.

3.1.5. Tehnici și prelevare (în ordine alfabetică)

1. Exsudatele bucale se prelevă de la pacienți cu stomatită ulceronecrotică Vincent, mângăritărele sau alte infecții ale gurii. După imobilizarea limbii cu apăsător steril, se șterge cu tamponul suprafața oricărei ulcerării, arii inflamate sau acoperită cu pseudomembrană. Dacă se solicită examen microscopic, tamponul se stoarce imediat pe o lamă de microscop și se etalează frotiul prin rularea tamponului. Frotiul fixat prin căldură (vezi 5.2.5.1) se expediază la laborator împreună cu al doilea tampon destinat cultivării.

2. Exsudatul cervical uterin se prelevă de la paciente cu leziuni la acest nivel sau pentru depistarea portajului de gonococ. Pacienta este plasată în poziție ginecologică. După examenul vulvei, speculul vaginal steril, umezit cu apă caldă (fără alt lubrifiant) este inserat blând pentru examenul colului uterin. Exocolul este șters de 2—3 ori succesiv cu comprese de tifon sterile pentru îndepărtarea secrețiilor stagnante, inclusiv cele de la nivelul orificiului. Dacă se observă leziuni, acestea sunt șterse cu tamponul de vată steril. Un tampon de vată steril este inserat în orificiul colului, rotit de câteva ori pentru a-l încălca cu exsudat și se retrage cu precauția de a evita contaminarea cu conținut vaginal.

Pentru microscopie, frotiul se face extemporaneu cu un tampon separat.

3. Exsudatul conjunctival. Uzual este suficient un tampon cu care s-a șters exsudatul din unghiul intern al ochiului. Alte prelevări de la nivelul ochiului (raclat conjunctival, cornean) sunt exclusiv de competența specialistului oftalmolog.

4. Exsudatul faringian este prelevat pentru diagnosticul etiologic al anginelor și faringitelor sau pentru depistarea portajului de streptococi piogeni ori de bacili difterici. Prelevarea se face cu tamponul înainte sau la 3—4 ore după toaleta gurii ori ingestie de alimente. Pacientul așezat, cu gâtul în ușoară extensie, faringele bine expus prin iluminare

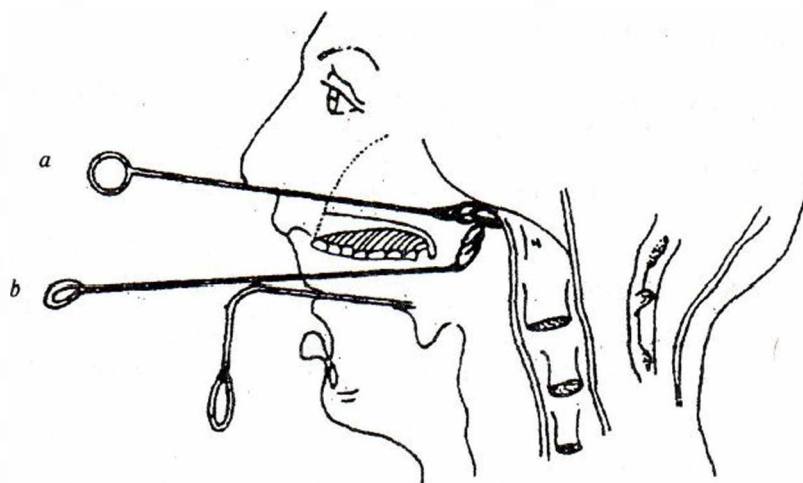


Fig.3.3. Prelevarea exsudatului nazofaringian pe cale nazală (a) și pe cale bucală (b)

și deprimarea bazei limbii cu apăsător steril, pronunță tare vocala A. Cu tamponul introdus în faringe, fără a atinge limba sau palatul, se șterge orice zonă inflamată, ulcerată sau cu depozite purulente. Când există, falsa membrană este ușor desprinsă și tamponată mucoasa subiacentă. Tamponul scos cu precauție se introduce în tubul protector. Pentru că prelevarea faringiană declanșează reflex de tuse, este indicat ca persoana care face prelevarea să se protejeze cu mască de tifon.

5. Exsudatul nazofaringian se prelevă pentru diagnosticul tusei convulsive, a unor pneumonii interstițiale și a portajului de microbi patogeni cum sunt meningococii, streptococii piogeni, bacilii difterici ș.a.

Mai ușoară este prelevarea nazală. Se utilizează tampon confecționat pe tijă din sârmă de crom-nichel cu lungime de 20 cm și grosime de 1 mm. Una din extremități este îndoită, înmuiată în colodiu și înfășurată strâns cu vată. Extremitatea liberă este îndoită în buclă pentru a facilita manipularea. Aceste tamponi se pot obține din secția de O.R.L.

Capul pacientului este imobilizat și tamponul introdus blând în lungul planșei nazale până atinge peretele posterior al nazofaringelui. Este lăsat câteva secunde pe loc, apoi rotit ușor, pentru a-l încălzi cu exsudat, și retras. Cantitatea de prelevat crește când tamponul se retrage și se reinserează în aceeași poziție, prima tamponare stimulând secreția de mucus nazofaringian (figura 3.3).

Prelevarea pe cale bucală se face când abordarea nazală nu este posibilă. Se utilizează un tampon obișnuit cu tijă de sârmă. Extremitatea care poartă tamponul este îndoită în unghi drept în momentul scoaterii din tub. Tamponul, introdus prin gură în faringe, este trecut cu atenție în spatele palatului moale, pentru a șterge peretele posterior al nazofaringelui (figura 3.3). La introducerea și la scoatere se va evita contaminarea tamponului cu secreții faringiene și bucale.

6. Exsudate din plăgi și arsuri. Suprafața denudată, lipsită de țesut necrotic, se spală cu soluție salină izotonă sterilă pentru îndepărtarea exsudatului stagnant hipercontaminat. Tamponul, umezit cu soluție salină izotonă și stors pe peretele interior al recipientului, este rulat peste suprafața tisulară suficient de ferm, pentru a determina o ușoară sângerare din țesutul subiacent. Aceasta dă garanția prelevării microbului infectant din țesutul viabil. Tamponul imersat în 1 ml mediu de transport este imediat expediat la laborator pentru examinare.

7. Exsudatul vaginal. Pacienta este în poziție ginecologică. Se examinează vulva. Dacă pe labii sunt leziuni, exsudatul acestora se prelevă prin ștergere cu tamponul. Se inserează speculul vaginal (revedi punctul 2). Se examinează mucoasa vaginală. Dacă există leziuni, acestea se șterg cu tamponul steril. Când există numai congestie difuză, prelevarea se face din fundul de sac vaginal posterior. Se prelevă trei tamponane: unul este etalat prin rotire pe două lame de microscop curate, al doilea este descărcat imediat în cca 1 ml soluție salină izotonă sterilă, încălzită la 37°C, temperatură cu care trebuie să ajungă imediat la laborator, pentru examenul între lamă și lamelă, al treilea este destinat cultivării.

8. Fecalele se prelevă pentru depistarea agenților bolii diareice, a febrelor tifoidă și paratifoide, a purtătorilor sănătoși ai patogenilor respectivi și pentru depistarea ouălor de viermi intestinali. Uzual se examinează probe de scaun emis spontan. Se pot folosi, la pacienți cu sindrom dizenteriform, și prelevări pe tampon rectal.

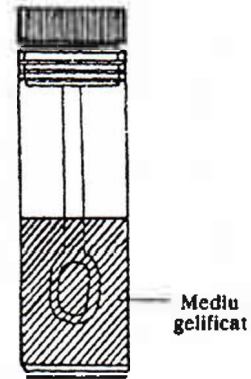


Fig. 3.4. Coprocultorul

■ *Probe de scaun emis spontan*, metoda de elecție. Pacientul mai întâi micșionează, pentru a evita contaminarea probei cu urină. În spital defecă în bazinet sterilizat prin autoclavare sau dezinfectat prin fierbere. La domiciliu se folosește o oală de noapte dezinfectată prin opărire repetată cu apă clocotită. Imediat după defecare se prelevă cu o spatulă sterilă de lemn sau cu lingurița coprocultorului fragmente mucopurulente, flacoane riziforme, când acestea există, sau porțiuni din diferite puncte ale unui scaun omogen. Proba, cât un bob de mazăre, este suspensionată în mediul de transport din coprocultor (figura 3.4). Mediul de transport nu este necesar pentru depistarea ouălor de viermi intestinali sau protozoarelor.

De la sugari se prelevă porțiuni din scaunul de pe pelincă.

■ *Probe de scaun provocat prin purgare* sunt indicate pentru depistarea portajului de enterobacterii patogene sau la pacienți cu diaree cronică. Pentru aceasta un adult ingerează 15 g sulfat de magneziu solvit în 250 ml apă. Doza la copii se adaptează în raport cu vârsta.

■ *Prelevarea pe tampon rectal*. Tamponul de vată steril, montat pe o tijă de lemn, se trece prin orificiul anal, se șterge cu grijă mucoasa rectală, se retrage și imediat este imersat în mediul de transport. Tija este retezată și se adaptează capacul coprocultorului.

■ *Prelevarea direct din colonul sigmoid*. O sondă Nélaton, dezinfectată prin fierbere, este introdusă prin orificiul anal și rect, cca 15–20 cm la adult și 10–12 cm la copil, până în colonul sigmoid, al cărui conținut este aspirat cu o seringă de 10 ml, adaptată la capătul sondei. Proba este imediat descărcată și omogenizată în mediul de transport.

✓ 9. Hemocultura. *Material necesar*. Hemoculturile sunt cel mai frecvent urgențe medicale. De aceea în serviciile unde se internază pacienți cu septicemii sau cu condiții bacteriemice (pneumonii lobale acute, arsuri întinse infectate, avorturi septice, endocardite etc.) trebuie să existe, pregătite în permanență, truse pentru hemoculturi, care cuprind:

■ Soluții decontaminante pentru tegument: săpun lichid, alcool iodat 2%, eter.

■ Tamponane sterile din tifon de 5 × 5 cm, la nevoie pot fi înlocuite cu tamponane sterile din vată.

■ Bucată de mușama de 40 × 40 cm.

■ Seringă sterilă de 20 ml (corespunzător mai mică pentru copii), de preferat tip Luer din sticlă pentru a fi sterilizată gata montată. La nevoie pot fi folosite seringi de unică folosință cu volumul indicat.

■ Ac de rezervă.

■ Pensă pentru demontarea acului de puncție și montarea celui de rezervă.

- Garou.
- Lampă de spirt.
- Flacoane cu bulion nutritiv preîncălzite la 37°C în termostatul din laboratorul secției.

Zone de puncție. Electiv: venele de la plica cotului. Alternativ: venele antebrațului inferior sau dorsale ale mâinii. La sugar se puncționează vena jugulară.

Momentul prelevării. O singură hemocultură, chiar la un pacient cu septicemie, poate rămâne negativă. De aceea, la fiecare pacient cu indicație pentru hemocultură se efectuează trei hemoculturi. Când terapia antimicrobiană se impune urgent, aceste hemoculturi pot fi practicate la intervale de 30 minute—1 oră înainte de administrarea oricărui chimioterapic. Când terapia antimicrobiană nu este urgentă, hemoculturile se pot face și la intervale de 12—24 ore. Dacă pacienții au frisoane, este indicată efectuarea hemoculturii imediat ce pacientul semnalează apariția lor.

Procedura: Se lucrează la adăpost de curenți de aer. Cel care efectuează hemocultura trebuie să lucreze cu mâinile bine spălate, antiseptizate și uscate. Maska nu este obligatorie.

a) Pacientul în decubit dorsal. Sub braț în zona de puncție se așază bucata de mușama, pentru a preveni pătarea lenjeriei de pat cu soluții decontaminante.

b) Se aplică garoul la cca 10 cm proximal zonei de puncție și se strânge, pentru a putea aprecia prin palpate dimensiunea și elasticitatea venei de puncționat. Simpla inspecție vizuală frecvent nu depistează venele profunde excelente pentru puncție. La nevoie, venele sunt evidențiate mai bine dacă pacientul strânge și relaxează de câteva ori pumnul. Nu se masează și nu se fragelează brațul.

c) Se dă drumul la garou.

d) Se decontaminează larg, concentric, zona de puncție mai întâi prin spălare cu apă și săpun lichid, apoi prin badijonare cu alcool iodat de 2%. În final zona este badijonată cu eter, pentru a îndepărta iodul și a lăsa tegumentul perfect uscat. Puncția și aspirarea sângelui prin tegument umed expune proba contaminării cu bacteriile rezidente în porozitățile epidermei.

e) Se reaplică garoul.

f) Se fixează tegumentul deasupra punctului de puncție prin tensionare pe braț cu degetele mâinii libere.

g) Cu seringă poziționată în axul venei, pentru a forma un unghi de cca 30° cu tegumentul, acul fiind cu bizoul în sus, se puncționează pielea și vena subiacentă cu o mișcare moderat de bruscă. O cedare ușoară este uzual resimțită la pătrunderea acului în venă. Se pătrunde cu acul distanța estimată, pentru a plasa în venă bizoul cu o parte din lumenul acului.

h) Se exercită o ușoară presiune negativă prin retragerea pistonului. Sângele trebuie să pătrundă liber în seringă. Când scurgerca este neregulată, se rotește ușor seringă, pentru a re poziționa bizoul în venă. Sângele nu se mai scurge în seringă, când vârful acului perforază vena și intră în țesuturi. Este suficient să se retragă puțin acul, pentru a obține sânge din nou.

i) Când sângele începe să se scurgă în seringă, se dă drumul la garou, pentru a preveni formarea unui hematom la locul puncției. La adult se extrag 15—20 ml sânge, iar la sugar 1—3 ml.

j) Proba odată recoltată, se retrage acul din venă și imediat se presează punctul de puncție cu un tampon steril. Pacientul continuă compresia prin tampon, până ce hemostaza este completă. În final, peste zona puncției se aplică un tampon antiseptic autoadeziv.

k) Imediat se schimbă acul de puncție cu acul de rezervă și se însămânțează aseptice câte 5 ml sânge (cca 1/3 din volumul prelevat) în două flacoane cu 50 ml bulion nutritiv

și un tub de 25/250 mm cu 50 ml bulion special pentru izolarea bacteriilor anaerobe în prealabil fiert 20 minute în baie de apă și răcit brusc la curent de apă. Imediat după însămânțare, flacoanele și tubul sunt agitate cu atenție pentru omogenizarea conținutului.

Atenție! Înainte de a aprinde lampa cu spirt pentru însămânțarea aseptică a probei de sânge, flaconul cu eter trebuie pus în siguranță la distanță de patul bolnavului.

1) Toate flacoanele însămânțate se transportă la laborator pentru incubare imediată.

NOTĂ. Contaminarea cu o singură bacterie din epidermă sau din ser compromise hemocultura (rezultat fals pozitiv).

10. Lichidul cefalorahidian. Prelevarea probei este de competența clinicianului infecționist și, dată fiind gravitatea contaminării meningelui, impune măsuri drastice de antisepsie și asepsie. Proba prelevată în 2 tuburi sterile (cca 2 ml/tub) este transportată imediat la laborator, fără refrigerare.

11. Părul. Pentru diagnosticul pilomicozelor, se prelevă cu pensa bonturile firelor de păr rupte și firele de păr cu aspect modificat (fără luciu, cenușii, prăfoase). De mare ajutor este examinarea părului la lampa Wood: în radiația ultravioletă firele de păr infectate au fluorescență verde strălucitoare sau gri-albă.

12. Puroiul din colecții se aspiră cu seringă prevăzută cu un ac gros și se expediază la laborator într-un tub steril. Când se suspectează o infecție cu bacterii anaerobe proba va fi expediată la laborator direct în seringă (revedi figura 3.2).

13. Spălătura gastrică se prelevă pentru depistarea bacililor tuberculozei la pacienți care nu expectorează (unii copii, femei). Pacientului, pe nemâncate, i se introduce o sondă Einhorn până în stomac. Prin sondă se injectează cca 10 ml soluție salină izotonă sterilă și se aspiră. Se neutralizează imediat prelevatul cu o soluție 10% bicarbonat de sodiu în prezența unui indicator de pH.

14. Sputa. Pacientul trebuie făcut să înțeleagă diferența dintre a «expectora» (eliminarea prin orofaringe a exsudatului mobilizat din căile respiratorii inferioare prin tuse profundă) și a «scuipa». Periajul simplu al dinților (fără pastă) și clătirea energică a gurii cu apă sunt de dorit înaintea prelevării. Se verifică dacă în probă există material mucopurulent (realul produs patologic). Dacă pacientul numai a scuipat, se insistă pentru prelevarea unei noi probe corespunzătoare. La pacienții cu tuberculoză sputa matinală este cea mai bogată în bacili.

15. Exsudate din șancre. Cu mâinile protejate în mănuși de cauciuc, se îndepărtează exsudatul stagnant de pe suprafața șancreului prin spălare cu soluție salină izotonă sterilă și un tampon din tifon. Se absoarbe cu tamponul de tifon excesul de lichid. În final se comprimă între degete baza șancreului până la apariția pe suprafața leziunii a unei picături de exsudat, care se prelevă cu pipeta Pasteur, prin capilaritate, pentru microscopia pe fond negru și frotiul Gram.

16. Tamponul nazal se prelevă pentru depistarea portajului de stafilococ auriu sau streptococi piogeni. Se șterge, pe rând, vestibulul foscelor nazale cu un tampon umectat cu soluție salină izotonă sterilă.

17. Tegumentul. Din leziunile piodermitelor se prelevă puroiul sau exsudatul pe tampon. Pentru diagnosticul dermatofitiilor se raclează cu un bisturiu epiderma de la nivelul leziunilor. În alte infecții poate fi necesară prelevarea de cruste etc.

18. Urina.

A. Proba curată prinsă în zbor din jetul mijlociu de urină. Indicații: Pentru diagnosticul infecției căilor urinare determinată de *Escherichia coli* sau de alte bacterii condiționat patogene rezidente în colon ori uretra distală.

Principiu: Organismele condiționat patogene care infectează căile urinare se multiplică în urină în intervalul dintre micțiuni și realizează concentrații semnificativ mai mari (bacteriurie semnificativă) decât organismele acclorași specii care contaminatează urina în

cursul micțiunii. Bacteriuria semnificativă este identificată corect dacă se reduce concentrația organismelor de contaminare prin spălarea suprafețelor de pe care provin (vulvă, pliul balanoprepușial, uretra distală).

Momentul prelevării: prima urină matinală sau după cel puțin 3 ore de la micțiunea anterioară.

Volumul necesar: aproximativ 10 ml.

Prelevarea la femei. Necesari: cameră pentru recoltare prevăzută cu masă ginecologică, bideu, chiuvetă cu apă curentă și săpun, boiler, hârtie igienică, irigator, recipient cu săpun lichid, seturi de tampoane din tifon, recipient cu pungă pentru colectarea tampoanelor utilizate, recipiente pentru colectarea urinei.

Instrucțiunile de mai jos trebuie afișate pe perețele camerei pentru recoltă, repetate verbal și controlată respectarea. Sora asistă pacienta pentru etapele mai dificile ale prelevării.

- a) Se scoate lenjeria intimă.
- b) Măinile se spală cu apă și săpun și se usucă cu hârtie igienică.
- c) Se încăleacă bideul cu fața spre spatele acestuia.
- d) Cu o mână, pacienta își îndepărtează labiile mici și le menține ca atare pe toată durata procedurii.
- e) Cu cealaltă mână șterge ferm vulva, în sens unic, din față spre spate, de 3 ori cu câte un tampon steril de tifon înmuiat în săpun lichid.
- f) Cu ajutorul irigatorului, regiunea decontaminată este clătită abundant cu apă caldă sterilă (apă de robinet fiartă și răcită) pentru a îndepărta urmele de săpun.
- g) Se usucă zona vulvară decontaminată cu 2 tampoane de tifon sterile cu utilizare unică procedând din față spre spate. Dacă se omite uscarea, prin pelicula de lichid microorganisme din zonele nedecontaminate pot fi antrenate spre jetul de urină.
- h) Pacienta urinează cca 100 ml în timp ce degetele mențin în continuare labiile depărtate.
- i) Fără a întrerupe jetul de urină, se prinde în borcan volumul necesar de urină (jetul mijlociu), cu precauții pentru a nu atinge gura borcanului de tegument sau lenjerie.
- j) Se retrage borcanul din jet cât timp labiile sunt încă depărtate și micțiunea continuă. Întreruperea jetului în cursul procedurii (înainte sau imediat după prinderea probei în borcan) poate contamina proba prin picăturile de urină care se preling peste zonele nedecontaminate ale vulvei.

La pacientele cu scurgeri vaginale trebuie să intervină sora, care pregătește în aceeași manieră regiunea vulvară, iar în final introduce în vagin un tampon steril de vată. Procedura impune utilizarea mesei ginecologice. O probă de 10 ml cu urină normală contaminată cu numai 0,1 ml scurgere vaginală dă în urocultura cantitativă un rezultat fals pozitiv.

Prelevarea la bărbați. Necesari: a se vedea prelevarea la femei. În locul bideului este indicat un urinoar, irigatorul poate fi înlocuit cu o simplă cană, iar masa ginecologică nu este necesară.

- a) Se spală mâinile (vezi prelevarea la femei).
- b) Se retractă prepușul, pentru a decalota complet glandul.
- c) Se șterge glandul ferm, în sens unic, dinspre meatul uretral spre șanțul balanoprepușial peste fren, de 3 ori cu câte un tampon steril de tifon înmuiat în săpun lichid.
- d) Se clătește glandul abundant cu apă caldă sterilă pentru a îndepărta urmele de săpun.
- e) Se usucă glandul (vezi procedura la femei).
- f) Pacientul, menținând în continuare glandul decalotat, urinează cca 100 ml.

g) Fără a întrerupe jetul, se prinde în borcanul steril cca 10 ml urină, după care se retrace borcanul în timp ce micțiunea continuă.

Prelevarea de la copilul necooperant (nou-născut, sugar) este dificilă. Se decontaminează și se usucă organele genitale externe și perineul. În jurul penisului sau vulvei se fixează orificiul unei pungi sterile din material plastic. În lipsa acestui dispozitiv trebuie pândit momentul micțiunii, pentru a prinde proba într-un flacon cu gura largă.

B. Proba prinsă în zbor din jetul mijlociu de urină fără decontaminarea specială a organelor genitale. Indicații:

- depistarea în urină a unor patogeni care nu sunt rezidenți ai colonului sau uretrei distale (bacilii tuberculozei, bacili tifici, leptospire);

- supravegherea epidemiologică a infecției căilor urinare cu organisme condiționat patogene (consult prenatal al gravidelor, al colectivităților școlare, de femei etc.).

Principiu: simpla prezență în urină a organismelor patogene nerezidente ale uretrei are semnificație clinică. Bacteriuria semnificativă cu organisme condiționat patogene depistată în asemenea probe trebuie confirmată prin reexaminarea unei probe curate (vezi mai sus).

Volumul necesar: cca 50 ml pentru depistarea microorganismelor patogene; cca 10 ml pentru depistarea celor condiționat patogene.

Procedura se poate efectua într-un simplu cabinet de toaletă cu facilități minime pentru prinderea jetului mijlociu: chiuvetă cu apă și săpun, hârtie igienică, bideu, urinoar.

Transportul la laborator al probelor de urină se face imediat, pentru ca examenul bacteriologic să înceapă maximum la o oră după prelevare. Dacă aceasta nu este posibil, probele trebuie refrigerate la 4°C imediat după prelevare. Bacteriile de contaminare se pot multiplica la temperatura camerei în probele de urină determinând bacteriurii fals pozitive.

Practici greșite: recoltarea urinei în vas mare (borcan, oală de noapte etc.) și transvazarea probei în eprubetă pentru expedierea la laborator; recoltarea probelor la domiciliu.

3.2. TEHNICI PENTRU DEPISTAREA ȘI IDENTIFICAREA MICROORGANISMELOR

Microorganismele pot fi depistate prin:

- Microscopie.
- Cultivare pe medii de cultură artificiale.
- Izolare pe gazde vii (animale de experiență, embrioni de găină, culturi de celule).
- Tehnici imunologice de identificare a antigenilor microbieni.
- Tehnici de biologie moleculară pentru identificarea fragmentelor de ADN microbial (sau și ARN viral) prin sonde de acizi nucleici marcate sau reacția de amplificare genică (*Polymerase Chain Reaction*, abreviat PCR) (a se vedea cursul de genetică microbială).

Algoritmul investigației microbiologice este schematizat în figura 3.5.

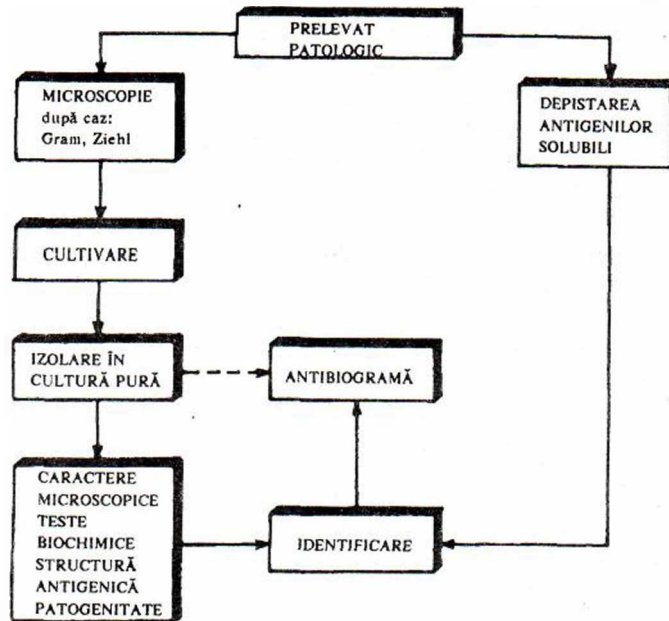


Fig. 3.5. Algoritmul investigației microbiologice

3.2.1. Examenul macroscopic

Examenul macroscopic:

1. Previne prelevarea și examinarea unor probe necorespunzătoare (e.g. salivă în loc de spută).
2. Reperează realul produs patologic sub forma porțiunilor fibrinopurulente în expectorații, mucosangvinolente în fecale, a granulelor de sulf în puroi.
3. Poate influența decizia clinică imediată (e.g. un lichid cefalorahidian purulent indică o meningită cu bacterii piogene, care impune tratament antimicrobian urgent).

3.2.2. Microscopia

Microscopia optică, metodă uzuală, permite rapid (30—60 minute):

1. Depistarea și identificarea rapidă a *protozoarelor*.
2. Depistarea și identificarea preliminară a *bacteriilor și fungilor*. Bacterioscopia depistează de la 10^{4-5} bacterii/ml în sus. Prezența în medie a 1—2 bacterii/câmp microscopic examinat cu mărire de 1000X corespunde la circa 10^5 bacterii/ml probă, iar a peste 10 bacterii/câmp la mai mult de 10^6 bacterii/ml probă.
3. Studiul *micoplasmelor* izolate în culturi.
4. Depistarea și identificarea preliminară a incluziunilor *chlamidiale* sau *virale*.
5. Obiectivarea calității unor prelevate (e.g. sputa) prin observarea raportului dintre

celulele inflamatorii (aduse de către realul produs patologic, care vehiculează microorganismele căutate) și celulele epiteliale scuamoase (aduse de secrețiile contaminante).

6. Alegerea anumitor medii de cultură și metode de izolare.

Tehnica microscopiei este detaliată în **capitolul 4**.

3.2.3. Izolarea

Izolarea microorganismelor în culturi pure este o metodă de investigație:

- mult mai sensibilă decât microscopia, dar necesită intervale mai mari de timp;
- indispensabilă identificării corecte a microorganismelor investigate.

Izolarea *protozoarelor* este rar necesară. Aceste organisme sunt suficient de mari și au suficiente caractere morfologice pentru a putea fi depistate și identificate prin microscopia directă a probelor.

Cele mai multe *bacterii* și *fungi* sunt organisme care pot fi și trebuie izolate pe medii de cultură artificiale. Unele cresc rapid (1—7 zile), altele cresc lent (4—8 săptămâni). Multe bacterii au exigențe nutritive deosebite și necesită medii de cultură îmbogățite. Unora nici nu le putem satisface aceste exigențe și nu le putem izola pe medii artificiale, ci numai pe gazde vii.

Virusurile, *rickettsiile* și *chlamidiile* sunt izolate prin inoculare în culturi de celule, în oul embrionat sau la animale de laborator receptive.

Amănunte tehnice privitoare la izolarea și studiul microorganismelor cultivate pe medii artificiale pot fi urmărite în **capitolul 5**, iar izolarea și studiul microorganismelor prin inoculări la animale de experiență sunt prezentate în **capitolul 9**.

3.2.4. Identificarea

Foarte pe scurt, identificarea unui microorganism impune:

- izolarea sa în cultură pură;
- studiul caracterelor microscopice;
- studiul etapizat al caracterelor sale fiziologice (caractere de cultură, activități biochimice);
- compararea acestor caractere cu cele ale unităților deja constituite și numite.

3.2.4.1. Cultura pură

Microbiologul nu poate manipula microorganismele ca indivizi, ci ca mulțimi de indivizi numite populații. *Populația* este o mulțime de indivizi care aparțin aceleiași specii (unitatea de bază în clasificarea lumii vii) și habitează același mediu.

Cultura pură este constituită din indivizi foarte asemănători unii cu alții. Ideal, cultura pură este o *clonă*, adică o populație constituită din descendenții unui singur individ prin înmulțire vegetativă.

Tulpina este o populație microbială constituită din descendenții unei singure izolări în cultură pură, pe care o manipulăm pentru studiu. Până la momentul identificării, tulpinile microbiene noi le numim simplu «izolate» și le individualizăm numai printr-un număr (numărul de înregistrare al prelevatului din care au fost izolate), eventual urmat de inițialele pacientului de la care provine proba (e. g. tulpina 273 M.I.).

3.2.4.2. Studiul și numirea izolatelor

Studiul caracterelor constante ale izolatelor se efectuează în etape succesive:

- *Studiul caracterelor microscopice*: forma, așezarea, reacțiile de culoare, particularități structurale (pentru amănunte a se vedea capitolul 4).

- *Studiul caracterelor de cultură*: exigențele nutritive și de incubare a culturii, intervalul necesar apariției culturii, aspectul coloniilor (pentru amănunte a se vedea capitolul 5).

- *Studiul spectrului activității biochimice*.

Asemenea caractere constante utile pentru identificare sunt numite *caractere cheie* și se compară cu caracterele speciilor tip înscrise în determinatoare. Pentru o comparare facilă, microbiologul are la dispoziție chei dihotomice de identificare. Asemenea chei sunt instrumente de analiză antitetică: pun întrebări la care se răspunde prin DA sau NU (tabelul 3.1). Caracterele cheie pozitive devin caractere de diagnostic.

Tabelul 3.1. Exemplu de utilizare a cheii dihotomice la identificarea unei bacterii gramnegative

| Caracterele cheie | Genuri mai importante cu interes medical |
|---------------------------------|---|
| 1. Parazit obligat intracelular | <i>Rickettsia, Rochalimaea, Coxiella</i> |
| 2. Diferit de 1 | <i>Spirillum, Campylobacter</i> |
| a. Spirili | |
| a.a Diferit de a. | |
| b. Bacili | |
| c. Aerobi | <i>Pseudomonas</i> |
| c.c. Facultativ anaerobi | <i>Escherichia, Klebsiella, Enterobacter, Serratia, Shigella</i> etc. |
| | <i>Vibrio</i> |
| | <i>Haemophilus</i> |
| | <i>Pasteurella</i> |
| c.c.c. Anaerobi | <i>Bacteroides, Fusobacterium</i> |
| b.b. Coci sau cocobacili | <i>Neisseria, Moraxella, Brucella, Bordetella,</i> |
| c. Aerobi | <i>Francisella</i> |
| c.c. Anaerobi | <i>Veillonella</i> |

Progresiv, izolatele sunt încadrate în unitățile taxonomice cu care au cele mai multe caractere în comun și capătă denumirea acestor unități: de familie, apoi de gen și în final de specie. De exemplu izolatul 273 M.I. este o *Enterobacteriaceae* (familia), din genul *Escherichia*, specia *Escherichia coli*. Este deci tulpina 273 M.I. de *Escherichia coli*.

3.2.4.3. Markeri de tulpină infraspecifici

Clinicianul este interesat să cunoască anumite caractere ale tulpinilor infectante cum sunt *patogenitatea* (e. g. toxigenza, capacitatea enteroinvazivă) sau *antibiograma* (spectrul de sensibilitate la antibiotice).

Epidemiologul trebuie să cunoască o serie de caractere infraspecifice ale tulpinilor prin care poate stabili filiația cazurilor unei boli transmisibile. Asemenea caractere infraspecifice sunt numite *markeri epidemiologici*. Dintre markerii epidemiologici frecvent utilizați a se reține:

- *serovarul* (o anumită structură antigenică a tulpinii, identificată prin reacții antigen-anticorp cu seruri imune de referință, vezi capitolele 10 și 13);
- *lizovarul* (un anumit spectru de sensibilitate la bacteriofagi, vezi capitolul 8);
- *biovarul* (activități biochimice particulare).