

# 9

## METODA BIOLOGICĂ (EXPERIMENTALĂ) DE DIAGNOSTIC

### 9. 1. ASPECTE GENERALE

Inocularea experimentală la animale de laborator este utilă pentru izolarea unor microorganisme patogene din prelevate patologice sau pentru teste de patogenitate necesare identificării unor izolate.

Speciile curent folosite în aceste scopuri sunt: șoarecele, cobaiul, iepurele. Pentru rezultate concludente se impun:

1. alegerea speciei animale selectiv receptivă la microorganismul suspectat (tabelul 9.1);
2. probarea legăturii dintre simptomele și leziunile observate și microbul sau toxina inoculate. Trebuie eliminate: accidentul individual și accidente de cauză străină experimentului.

*Tabelul 9.1. Exemple de utilizare a animalelor de laborator pentru izolarea sau identificarea unor microorganisme*

Scopul inoculării	Specia indicată și calea de inoculare <sup>1</sup>			
	șoarece adult	șoricei nou-născuți (48 ore)	cobai	ieपुरi
<i>Izolare în cultură pură</i>				
Bacilii tuberculozei			s.c.	
<i>Borrelia</i>		i.p.		
<i>Brucella</i>			s.c./i.p.	
<i>Francisella tularensis</i>	i.p./s.c./p.c.			
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (serotipurile K1, 2, 3)	s.c.			
<i>Leptospira</i>			Animale de 100—200 g i.p./p.c.	Animale până la 500 g i.p.
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	s.c./i.p.			
<i>Coxiella burneti</i>			Masculi i.p.	

Tabelul 9.1 (continuare)

Scopul inoculării	Specia indicată și calea de inoculare <sup>1</sup>			
	șoarece adult	șoricei nou-născuți (48 ore)	cobai	iepure
<i>Rickettsia prowazeki</i>			Masculi i.p.	
<i>R. typhi</i>			Masculi i.p.	
<i>R. rickettsii</i>			Masculi i.p.	
<i>R. conorii</i>			Masculi i.p.	
<i>R. acari</i>	i.p.			
<i>R. tsutsugamushi</i>	i.p.			
Arbovirusuri		i.c./i.p.		
Coxsackie		i.c./i.p.		
Herpes simplex		i.c./i.p.		
Rabic		i.c.		i.c.
<i>Teste de patogenitate</i>				
Virulență: <i>Listeria</i>			i.conj.	i.conj.
<i>Enteroinvazivitate</i>				
<i>E. coli</i> , <i>Shigella</i>			i.conj.	
Enterotoxină termolabilă				i.d. inoculare în ansă ligaturată
Enterotoxină termostabilă		i.g.		
Toxină difterică			s.c./i.d.	i.d.
<i>Depistare-identificare</i>				
Toxină botulinică	i.p.			
<sup>1</sup> i.c. = intracerebral; i. conj. = intraconjunctival; i.d. = intradermic; i.g. = intragastric; i.p. = intraperitoneal; s.c. = subcutanat; p.c. = percutanat.				

■ *Accidentul individual* poate fi controlat dacă se inoculează cu fiecare probă cel puțin două animale.

■ *Accidente de cauză străină experimentului* sunt controlate dacă fiecare lot experimental este însoțit de *animale martor* inoculate cu soluție salină izotonă pe aceleași căi și în aceleași cantități ca și animalele din experiment. *Se vor inocula numai animale noi, sănătoase* (carantinate minimum trei săptămâni), *bine întreținute* (pentru a evita carențe nutritive, infecții intercurrente, fenomene de canibalism), *fără ectoparaziți* (pentru a preveni răspândirea epidemică a unora dintre microbii inoculați). Animalele gravide nu se inoculează, pentru că au o receptivitate diferită la infecție.

Animalele sănătoase sunt vioaie, au blana cu părul neted și lucios, fără ulceratii și cruste, au ochii limpezi fără scurgeri conjunctivale, nazale, otice sau anale, nu pierd din greutate în cursul unei săptămâni, au temperatura normală (tabelul 9.2).

Tabelul 9.2. Principalele constante biologice ale animalelor de laborator uzuale

Constante	Specii		
	șoareci	cobai	iepure
Temperatură, °C	37,4	37,6—38,9	38,7—39,1
Ritmul respirației, per minut		80	55
Ritmul pulsului, per minut	120	150	135
Globule roșii, 10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup>	6,03—8,37	4,82—5,34	4,5—5,5
Leucocite, 10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup>	8,4—15	7,80—10,4	8—12
<i>Formula leucocitară, %</i>			
Limfocite	40—70	39—59	24—40
Polinucleare neutrofile	30—50		
Polinucleare amfofile <sup>1</sup>		40—50	40—55
Polinucleare eozinofile	1—2	1—5	1—2
Polinucleare bazofile	1		
Monocite	1—3	3—6	5—15
Vârsta fecundității, săptămâni	6—8	12—20	24—36
Ciclu oestral, zile	4—5		
Gestație, zile	19—21	59—72	28—31
Fătări, per an	8—12	3	4
Îngrijirea puilor, săptămâni	7—8	3	4
<sup>1</sup> Polinucleare amfofite cu granulații roz în colorația Giemsa			

Aspectele tehnice ale înmulțirii, creșterii și întreținerii animalelor de laborator, diagnosticul, tratamentul, combaterea și profilaxia principalelor boli naturale care le afectează depășesc obiectivele acestei cărți: pot fi găsite în manuale de zootehnie și de medicină veterinară.

Măsurile de protecție antiepidemică a personalului și colectivității în laboratoarele unde se infectează experimental animale de laborator sunt descrise cu amănunte în manualele O.M.S. (O.M.S., 1983) și ale Serviciului de Sănătate Publică al S.U.A. (USPHS, 1984).

În continuare vom descrie numai: conțințiunea, inocularea, marcarea, supravegherea, prelevarea de probe, necropsia animalelor de laborator și distrugeră cadavrelor.

## 9.2. CONTENȚIUNEA ANIMALELOR DE LABORATOR

O bună contențiune a animalelor de laborator este indispensabilă inoculării lor, termometrării și prelevării corecte de probe fără riscul zgârieturilor și mușcăturilor.

**Cobaiul.** Cu mâna dreaptă, ajutorul apucă animalul de centura scapulară, cuprinzând toracele și membrele anterioare. Capul rămâne liber între police și index. Mâna stângă imobilizează una sau ambele labe posterioare și prezintă animalul operatorului pentru inoculare. Animalul trebuie manipulat blând, dar ferm, fără a-l strânge exagerat de torace.

**Șoarecele** trebuie manipulat cu atenție, pentru că mușcă. Cu mâna dreaptă este apucat de vârful cozii și plasat pe un plan rugos (masă, capacul borcanului) de care se prinde cu ghearele. Se prinde pielea laxă a cefei între policele și indexul mâinii stângi. Mâna dreaptă continuă să țină coada și imobilizează labele posterioare. Imobilizarea poate fi făcută și de operator singur.

**Iepurele.** Cu o mână se netezesc urechile pe ceafă și se apucă animalul de pielea laxă a spatelui. Cealaltă mână susține partea posterioară a animalului, pentru a-l ridica ușor din cușcă. Animalul este pus pe masă, iar ajutorul îl imobilizează între piept și antebrațe.

*Aparatele de contențiune* permit contențiunea pentru inoculări mai laborioase sau când operatorul lucrează singur. Așa este aparatul Latapie, care imobilizează capul, toracele și abdomenul cobaiului sau iepurelui. Puncția venei marginale a urechii iepurelui poate fi făcută cu animalul imobilizat într-o cutie cu capac glisant care lasă afară numai capul animalului, iar puncția venelor cozii la șoarece se face cu animalul imobilizat într-o cutie cu capac glisant sau într-un cilindru care lasă afară numai coada.

*Anestezierea* este necesară pentru inoculările sau prelevările mai laborioase. Uzuală este anestezia generală cu eter. Șoarecele sau cobaiul este plasat într-un exsicator din sticlă sub sita căruia se pune un tampon imbibat cu eter. Imediat ce animalul își pierde conștiința, este scos pe masă și poate fi manipulat în această stare 3—4 minute. Pentru operații mai lungi pe botul animalului se aplică o mască, adecvată profilului, care conține un tampon imbibat cu eter. Distanța dintre tampon și nările animalului trebuie să fie suficientă, pentru a evita efectul foarte iritant al eterului lichid asupra mucoasei nazale. Anestezierea iepurelui necesită o cutie ermetic închisă prevăzută cu un tub prin care se introduce amestecul aer—eter și un vizor pentru a urmări starca animalului. Anestezierea pentru 1—2 ore se obține cu 28 mg/kg corp pentobarbitonă sodică (nembutal) injectată intravenos la iepure sau intraperitoneal la cobai.

## 9.3. PUNCTII ȘI INOCULĂRI

Inocularea se face cu seringi și ace de mărimi adecvate, sterile, după prealabilă antiseptizare a tegumentului cu alcool. Se va controla etanșeitățile seringilor, adaptarea corectă a acelor, iar operatorul va purta mănuși de cauciuc și ochelari de protecție, pentru a preveni contaminarea accidentală a pielii și conjunctivei cu materialul inoculat.

Materialul microbial de inoculat poate fi reprezentat de:

- culturi microbiene în bulion nutritiv sau suspensii ale culturilor pe medii agarizate;
- filtratul sau supernatantul culturilor în bulion nutritiv;
- prelevate patologice fluide sau omogenizate în soluție salină izotonică.

### 9.3.1. Injectarea intradermică

Este *calea de elecție* pentru testarea toxinelor dermonecrotice sau edematogene și pentru testarea sensibilizărilor. Se practică la iepuri și cobai de culoare albă.

*Necesar:*

■ seringi de 1 ml gradate în 1/20 ml, cu ace cât mai scurte, cu bizou scurt și diametrul de 0,6 mm;

■ foarfece;

■ amestec depilator:

Sulfură de bariu (Merck)	50 g
Oxid de zinc	35 g
Amidon	60 g

*Procedură:* Animalul este tuns scurt pe flancuri sau/și pielea spatelui, în funcție de numărul punctelor de injectare necesare. Pe pielea tunsă și umezită se aplică o pastă subțire, cu apă, din amestecul depilator precizat mai sus. După 2 minute pasta este îndepărtată blând împreună cu părul folosind o spatulă de lemn. Tegumentul depilat, spălat cu apă și uns cu puțină glicerină este gata de injectare.

Pielea este fixată între police și index, iar acul se infinge tangențial în partea superioară a pliului cutanat până când bizoul, plasat în sus, intră complet în derm. Se inoculează încet 0,1—0,2 ml produs. Injectarea strict intradermică este atestată prin formarea unei bule bine conturate cât un bob de mazăre, pe care pielea decolorată are aspectul cojii de portocală.

### 9.3.2. Inocularea percutană, prin scarificare

În regiunea indicată (vezi mai jos) pielea depilată (vezi 9.3.1) este antiseptizată cu alcool și lăsată să se usuce. Cu vârful unui bisturiu bine ascuțit, steril, se fac zgărieturi paralele în piele, suficient de profunde, pentru apariția limfei, fără a provoca însă sângerare. Metoda este *indicată* pentru:

■ propagarea virusului vaccinal la iepuri: pe flancurile scarificate ale animalului, materialul infecțios este frecat cu latul lamei bisturiului de scarificare;

■ izolarea pe cobai a leptospirelor din apă: animalul, cu pielea abdomenului scarificată, este imersat timp de 2—4 ore în proba de apă la 22—37°C.

### 9.3.3. Injectarea subcutanată

Este *calea de elecție* pentru inocularea prelevatelor patologice cu floră de asociație. Se mai pot inocula suspensii microbiene ori, pentru testarea toxinelor, filtratul sau supernatantul unor culturi bacteriene.

*Necesar:* Seringi de 1—2 ml și ace cu bizou lung de 30/0,8 mm sau 1,0 mm, în raport cu vâscozitatea produsului.

*Procedură:* Depilarea locului de puncție prin smulgerea părului este necesară la iepuri și cobai. După antiseptizarea regiunii cu alcool, între police și index se face un pli cutanat, iar acul se introduce la baza pliului până în țesutul celular subcutanat. La șoareci se puncționează pielea spatelui la rădăcina cozii; se injectează până la 0,5 ml. La cobai se puncționează pielea pe fața internă a coapsei drepte, aproape de pliul inghinal, iar la iepuri pielea abdomenului, flancurilor ori cefei și se injectează până la 2 ml.

#### 9.3.4. Injectarea intramusculară

Este rar utilizată. Se întrebuințează aceleași materiale ca la injectarea subcutanată, dar acul este infipt oblic în masa musculară a coapsei (cobai) sau în mușchii cefei (iepuri).

#### 9.3.5. Injectarea intraperitoneală

Este *indicată* pentru injectarea de prelevate patologice fără floră de asociație, în special la șoareci sau cobai.

*Necesar:* vezi 9.3.3.

Se *procedează*, inițial, ca pentru puncția subcutanată, zona de elecțiune fiind paraombilicală. Acul se introduce subcutanat cca 1 cm; apoi este direcționat perpendicular, se perforează peretele muscular și se penetrează cca 1 cm în cavitatea peritoneală. Se pot injecta cca 1 ml la șoarece și câțiva ml la cobai.

#### 9.3.6. Injectarea intravenoasă

*Necesar:* Seringă de 2—5 ml cu ac de 30/0,6 sau 0,8 mm pentru iepuri sau seringă pentru intradermoreacție cu ac de 10/0,5 mm și bizou perfect ascuțit pentru șoareci.

*Procedură:* Se va elimina din seringă orice bulă de aer, pentru a preveni embolii.

*La iepuri* se puncționează vena marginală a urechii, evidențiată cât mai bine prin frecarea pielii cu un tampon de vată imbibat cu alcool sau xilol și compresia părții proximale a venei. Cu acul paralel cu vena și ușor oblic față de suprafața urechii se puncționează blând, cu grijă bizoul să nu treacă dincolo de venă. Se controlează poziția acului aspirând puțin sânge în seringă, apoi se injectează lent produsul observând zona puncționată. Dacă la nivelul puncției apare o umflătură, se oprește injectarea, pentru că acul nefiind în venă lichidul se infiltrază în piele. La sfârșit se retrage acul și se face hemostaza cu un tampon de vată comprimat pe orificiul de puncție cu o pensă.

*La șoareci* se puncționează una din cele patru vene ale cozii. Șoarecele este plasat în dispozitivul de contențiune. Se antiseptizează cu alcool zona mijlocie a cozii. Operatorul ține cu mâna stângă vârful cozii, iar cu dreapta seringă. Vena aleasă este puncționată ținând acul aproape paralel cu pielea. Dacă se întâmpină rezistență la injectare, acul nu este în venă. Se pot injecta 0,5 ml. Apariția unei mici picături de sânge la retragerea acului atestă injectarea intravenoasă a fluidului.

### 9.3.7. Inoculări oculare

În *sacul conjunctival*, la iepure sau cobai, se pot instila cu pipetă Pasteur 1—2 picături de cultură bacteriană în bulion nutritiv. Instilarea la iepure se face în unghiul posterior al ochiului, pentru a evita a treia pleoapă, care se inserează în unghiul anterior. Alternativ, ansa cu care a fost prelevată o colonie bacteriană este introdusă sub pleoapa ochiului la cobai și se fac mișcări adecvate pentru descărcarea conținutului, cu grijă pentru a nu leza conjunctiva.

*O inoculare intracorneană* se poate face prin scarificare după anestezia iepurelui.

### 9.3.8. Injectarea intracerebrală

*Necesar:* Seringă intradermică prevăzută cu ac de 10/0,5 mm; bisturiu, trepan, material de sutură, soluție de colodiu.

*Procedura:* Pentru injectare animalele sunt anesteziate cu eter. *La șoarece* pielea capului se antiseptizează cu alcool. Craniul este puncționat cu acul la jumătatea distanței dintre unghiul extern al ochiului și inserția pavilionului urechii, 3 mm paramedian. Acul pătrunde 3—6 mm și se injectează până la 0,03 ml fluid.

*La iepure* pielea depilată a capului este antiseptizată cu tinctură de iod, ștearsă apoi cu alcool. Se face o mică incizie la 2 mm lateral de sutura sagitală și 1,5 mm anterior celei lamboide și se trepanează osul. Acul pătrunde prin trepanație 6—8 mm și se inoculează până la 0,45 ml fluid în lobul occipital. După injectare, acul este retras repede, pielea suturată și plaga acoperită cu soluție de colodiu.

### 9.3.9. Injectarea șoricilor sugari

Mamele și cuibul trebuie bine întreținute, iar șoricii manipulați curat și cu grijă, pentru a evita canibalismul matern. Cu o seringă intradermică prevăzută cu ac de 10/0,5 mm se pot injecta 0,05 ml intraperitoneal sau intragastric și 0,03 ml subcutanat sau intracerebral.

## 9.4. MARCAREA

Toate animalele inoculate trebuie marcate pentru identificare ușoară și sigură. Șoarecii și cobaii sunt vopsiți pe cap sau/și pe spate cu albastru sau/și roșu cu soluțiile de albastru de metilen sau fucsina folosite pentru colorarea bacteriilor. Cobaii și iepurii pot fi marcați cu discuri colorate sau numerotate fixate pe pavilionul urechii.

## 9.5. SURPAVEGHEREA ANIMALELOR INOCULATE

Animalele inoculate sunt urmărite zilnic pentru a înregistra: starea generală (poziția, aspectul părului), respirația, temperatura, greutatea, leziuni la locul de inoculare, inclusiv ganglionii limfatici regionali, tulburări nervoase (convulsii, paralizii). Aceste observații se

completează cu examenul unor prelevate *intravital* (e. g. sânge), examene anatomopatologice și microbiologice necroptice.

### 9.5.1. Termometrizarea

Se măsoară și se înregistrează, dimineața și seara, înainte de hrănire, temperatura rectală timp de câteva zile înainte de inocularea animalelor (tabelul 9.2) și pe durata observației. Termometrul este lubrefiat cu ulei de parafină.

La *iepure* se poate folosi un termometru medical inserat 2 cm în rect.

Pentru *cobai* se folosesc termometre speciale cu calibru de 4 mm, lungime de 15 cm cuate în unghi de 135°C la 4 cm de extremitatea cu rezervorul de mercur. Termometrul se inserează pe o profunzime de cca 8 cm cu rezervorul de mercur direcționat în sus și către înapoi pentru a depăși promontoriul.

### 9.5.2. Prelevări de sânge

Sunt necesare pentru detectarea anticorpilor apăruiți în cursul infecției experimentale.

De la *iepure* cantități până la 10 ml de sânge pot fi obținute prin puncție și aspirație din vena marginală a urechii (vezi 9.3.6). Pentru cantități mai mari (cca 50 ml sânge/kg corp) se puncționează cordul. Animalul este imobilizat în decubit dorsal. Tegumentul precordial este depilat (prin smulgere) și antisepțizat. Cu un ac de 0,8 mm montat la o seringă se puncționează perpendicular toracele într-un punct situat în spațiul III intercostal (cca 4 cm mai sus de unghiul condroxifoidian) la 3 mm de marginea stângă a sternului. Se inserează acul pe o profunzime de cca 1,5 cm și se aspiră. Poate fi folosit și un dispozitiv format dintr-o pipetă cu bulă adaptată pentru puncție-aspirație sterilizată la autoclav. Sângele prelevat este imediat transvazat și agitat, pentru defibrinare, într-un balon cu perle de sticlă.

De la *cobai* cantități până la 0,5 ml sânge se obțin prin incizia venei marginale a urechii. Cantități de 12—15 ml de sânge per animal de 400 g se obțin prin puncția cordului procedând ca la iepure cu următoarele repere: puncție în spațiul II intercostal (cca 1,5 cm mai sus de unghiul condroxifoidian) la 1,5 mm în afara marginii stângi a sternului, la profunzimea de 1 cm.

De la *șoarece* se pot obține câteva picături de sânge secționând vârful cozii. O cantitate mai mare se obține, sub anestezie, prin deplasarea globului ocular și puncția plexului venos retroorbital cu o pipetă Pasteur fină, care, după puncționare, se înclină până ce sângele începe să se scurgă prin capilar.

## 9.6. SACRIFICAREA

*Metodele fizice* implică ruperea măduvei spinale în regiunea cervicală prin comprimare puternică și bruscă a gâtului pe o muchie dură. Asigură moartea instantaneu și fără dureri a șoarecilor și cobailor.



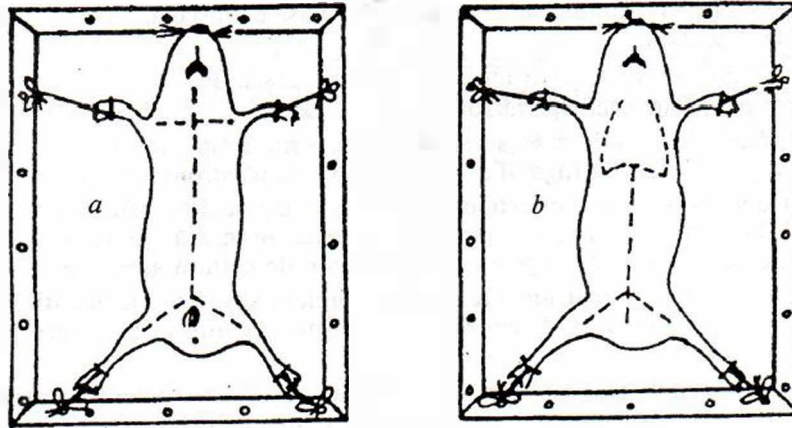


Fig. 9.1 Traectul inciziilor pentru necropsierea animalelor de laborator: a — incizia tegumentului; b — incizia planului musculoaponevrotic abdominal și al toracelui

*Embolizarea venoasă* poate fi utilizată la iepuri: se injectează 20 ml aer în vena marginală a urechii.

*Metode chimice.* Într-un cilindru, dimensionat după talia animalelor și obturat la o extremitate, se introduce un tampon de vată imbibat cu cloroform. Animalele mici se introduc cu totul în acest cilindru, la iepuri numai capul. Cobaii sunt sacrificați ușor prin injectarea subcutanată a 0,5 ml amital sodic.

## 9.7. NECROPSIA

Animalele trebuie necropsiate în maximum o oră după moarte sau sacrificare, pentru a evita invadarea țesuturilor cu flora de putrefacție.

*Necesar:*

- tavă de tablă cu margini perforate pentru fixarea cobailor sau iepurilor; mică planșetă de lemn pentru fixarea șoarecilor;
- instrumente sterile: 3 bisturie, 4 foarfece, 4 pense anatomice; clește mic pentru oasele craniului, dacă se impune accesul la creier;
- pipete Pasteur, cutii Petri și eprubete sterile, lame de microscop;
- plăci și tuburi cu medii de cultură adecvate.

*Procedura:*

1. Se fixează animalul cu fața ventrală în sus, iar pentru accesul la creier cu fața ventrală în jos.
2. Se badijonează insistent toată fața ventrală a animalului cu o soluție 3% de dezinfectant fenolic. Animalele mici pot fi cufundate complet în soluția dezinfectantă. Aceasta nu distruge în totalitate microorganismele de pe suprafața pielii, dar previne răspândirea de pulberi contaminate în aer și pe suprafețele din jur. Se plasează în jurul capului și membrelor posterioare suluri de hârtie igienică imbibată cu dezinfectant.
3. Cu un rând de instrumente sterile se face o incizie tegumentară submentopubiană prelungită spre rădăcina fiecărui membru (fig. 9.1, a) și se decolează pielea până pe flancuri.

4. Se inspectează țesutul celular subcutanat, masele musculare și ganglionii limfatici în regiunea de inoculare.

5. Cu un nou rând de instrumente sterile se deschide cavitatea peritoneală și se reflectă lateral planul musculoaponevrotic.

Cu foarfece sterile adecvate se secționează, prin două incizii laterale, cartilajele costale (fig. 9.1, *b*), apoi diafragma și se îndepărtează plastronul sternal.

6. Pentru hemocultură se puncționează cordul cu o pipetă Pasteur prevăzută cu tetină de cauciuc. Dacă necropsia este îngrijită nu este necesară cauterizarea suprafeței puncționale. Se însămânțează sângele extras în medii de cultură adecvate.

7. Cu un nou rând de instrumente sterile se prelevă și se depune în cutii Petri sterile, pentru examinare, splina, ficatul, rinichii și pulmonii. Atenție la prelevare pentru a nu deschide tubul digestiv.

8. Se examinează macroscopic, se secționează cu instrumente sterile organele prelevate, se însămânțează în medii adecvate mici fragmente de țesut și se efectuează amprente pentru microscopie.

9. Se acoperă carcasa animalului cu o bucată de hârtie igienică îmbibată cu soluție dezinfectantă. Se autoclavează carcasa împreună cu tava, apoi se incinerează carcasa animalului.

10. Se dezinfectează prin fierbere sau chimic instrumentarul în vederea spălării.

NOTĂ: La necropsierea animalelor infectate cu microorganisme înalt patogene sunt utilizate mănuși de cauciuc, ochelari sau vizor.