

Diagnosticul de laborator al infecțiilor produse de germeni din genurile *Treponema, Mycobacterium*

Treponema pallidum agentul etiologic al sifilisului este descris în 1905 de către profesorul de zoologie Schaudin și medicul dermatolog Hoffman. Treponemele (din limba greacă Trepo=a învârti, Nema=fir) sunt bacteria strict anaerobe sau microaerofile.

- Desi sunt cunoscute gram negative, nu se colorează Gram, ci sunt utilizate colorații speciale.
- Sunt foarte pretențioase nutritiv, treponemele patogene neputând fi cultivate pe medii de cultură.
- Sunt menținute în viață prin inoculare la animale susceptibile.(itratesticular la iepure care va dezvolta orhită sifilitică)
- În acest fel s-a reușit păstrarea în viață a unei tulpini de referință de *T. pallidum*, izolată de la un pacient decedat de neurosifilis în 1912, numită tulpina Nichols.
- Această tulpină este folosită la prepararea antigenelor de *T. pallidum* necesare diagnosticului serologic.

T. pallidum are 3 tipuri de antigene:

- O haptенă lipidică, comună treponemelor nepatogene și țesuturilor animale (cardiolipin). Acest antigen determină în organism formarea de anticorpi antilipoidici (Wassermann).
- Antigenul proteic Reiter, cu specificitate de gen *Treponema*. El determină apariția de anticorpi antiproteici evidențiable prin reacția de fixare a complementului.
- Antigene specifice, numai pentru Treponemele patogene.

Anticorpii ce se formează în organism față de aceste antigene, cum sunt anticorpii antiproteici, antipolizaharidici și imobilizinele se evidențiază prin mai multe reacții serologice, strict specifice pentru *Treponema pallidum*.

Căile de transmitere a agentului etiologic:

- sexuală (șancrul sifilitic genital și anal reprezintă 99% din cazurile de sifilis primar)
- transplacentară de la mamă la făt (transmitere verticală)
- iatrogenă (transfuzii)
- supraviețuirea la 4°C timp de 24 de ore a *Treponemei pallidum* în sânge explică transmiterea posttransfuzională

METODE DE DIAGNOSTIC

Punerea în evidență a *Treponemei pallidum* prin examen direct (diagnostic bacteriologic). În funcție de stadiul evolutiv al bolii se recoltează:

- ▶ în sifilisul primar: exudat din șancru, aspirat ganglionar, biopsii

- ▶ în sifilisul secundar: exudat din leziuni, biopsii
- ▶ în sifilisul terțiar: LCR, piese biotice sau necrotice
- ▶ în sifilisul congenital precoce: prelevate din cordon ombilical, placentă, secreții nazale, leziuni cutanate

Evidențierea microscopică a treponemelor

1. Microscopia pe fond întunecat

- ▶ Avantaje: rapiditate
- ▶ Dezavantaje:
 - Prelucrarea imediată a probelor
 - Diferențierea de spirochetele comensale
 - Experiență
 - Sensibilitate mică (50-80%)

2. Imunofluorescență cu Ig marcate cu fluoresceină

Avantaje:

- Sensibilitate și specificitate mare
- Diferențierea de treponemele comensale

Dezavantaje:

- Echipament special și consumabile scumpe
- Experiență
- Nu diferențiază treponemele vii de cele moarte

Preparare fixate și colorate

- ▶ Cu tuș de India
- ▶ Giemsa
- ▶ Impregnare argentică
 - Fontana Tribondeau (frotiuri)
 - Levaditi (țesuturi)

Diagnosticul serologic constă în evidențierea Ac în sânge și LCR. Se realizează prin teste nespecifice și teste specifice.

TESTE NESPECIFICE :

- RFC
- VDRL
- RPR

VDRL- Test screening ce are la bază o reacție de floculare care utilizează antigenul cardiolipinic.

Avantaje:

- se execută prin tehnici ușor reproductibile,
- mare sensibilitate:

Dezavantaje:

- lipsa de specificitate, dând cel mai mare procent de rezultate biologice false pozitive, la persoane care nu aveau sifilis,

RPR- O reacție de floculare ca și VDRL care utilizează antigen cardiopalinic la care s-au adăugat particule fine de cărbune

Avantaje :

- ▶ Se poate utiliza plasma ca atare sau ser neinactivat
- ▶ Se poate citi cu ochiul liber

Dezavantaje

Nu poate fi folosită pentru LCR

ART (test RPR AUTOMAT) Se practică pe scară largă din 1968

TRUST (test RPR) care utilizează în loc de particule de cărbune, roșu de toluidină.

USR (unheated serum reagin)- Cu același principiu ca și RPR dar citirea se face la microscop

RFC cu antigen Wassermann (1906) care astăzi nu mai este utilizat.

Reacția Bordet- Wassermann

Utilizează ca antigen un extract de ficat de fetus cu sifilis congenital.

Avantaje: specificitate mai mare decât la reacțiile de floculare

Dezavantaje: sensibilitate mai mică, tehnică laborioasă

TESTE SPECIFICE

- ▶ Se utilizează pentru confirmarea testelor standard nespecifice
- ▶ Pentru diagnosticul sifilisului latent și tardiv

Teste cu specificitate de grup treponemic

- ▶ RFC cu extract din tulpina Reiter (*Treponema phagedenis*)
- ▶ Sensibilitate și specificitate mai mică decât a testelor specifice

Teste specifice treponemelor patogene

Teste de imobilizare a treponemelor (NELSON) care utilizează treponeme vii tulpina Nichols.

Cu toate că este cel mai specific test se efectuează rar astăzi, deoarece este nevoie de treponeme vii și de iepuri infectați și tehnica este dificilă.

Dacă se imobilizează peste 50% din treponeme reacția este pozitivă, iar dacă imobilizarea este sub 20% reacția este negativă.

Teste specifice cu treponeme inactive- TP-PA (Treponema pallidum particle agglutination)

Teste de aglutinare corpusculară a *Treponemei pallidum*: reacție de aglutinare pasivă care utilizează suspensie de treponeme inactivate cu formol și puse în contact cu ser de pacient.

Test cu treponeme inactivate FTA-ABS

Test de referință standard, care este o imunofluorescență indirectă. Se folosește tulpina Reiter pentru a fixa anticorpilor nespecfici, comuni, determinați de treponeme atât patogene, cât și comensale.

Pe lame sunt depuse tulpini de *Treponema Nichols/ pallidum*, pe care se fixează anticorpilor specifici, rămași în serul sau plasma de bolnav, după îndepărtarea celor nespecfici, formând complexe antigen- anticorp. Se adaugă conjugat fluorescent anti- Ig umane. La examinarea la microscopul cu fluorescență, treponemele din complexe marcate fluorescent, apar galben- verzui.

Avantaje:

- ▶ Specificitate și sensibilitate foarte mare
- ▶ Valabil și pentru LCR
- ▶ Este primul test serologic care se pozitivează
- ▶ Se aplică și în diagnosticul sifilisului congenital dar utilizează antiimunoglobulină umană de tip IgM

Dezavantaje:

- ▶ Foarte costisitor

Test cu extract treponemic - TPHA are la bază reacția de hemaglutinare care utilizează pentru evidențierea macroscopică a reacției hematiei de berbec îmbrăcate cu extract de *Treponema pallidum* care se pun în contact cu ser de pacient. Aglutinarea reacție pozitivă, iar depunerea în buton reacție negativă.

Avantaje:

- Poate fi aplicată și LCR
- Disponibilitatea kiturilor
- Nu necesită echipament special
- Ușor de efectuat
- La fel de sensibilă ca FTA-ABS în stadiile tardive ale sifilis

Dezavantaje:

Mai puțin sensibil decât FTA-ABS în sifilisul primar

Test cu extract treponemic-EIA

Reacție imunoenzimatică, utilizată ca test screening în laborator cu o dotare corespunzătoare, dar și în determinarea Ac de tip IgG și IgM anti-treponemici în sifilisul congenital

INNO-LIA SYPHILIS

Test relativ nou de confirmare a AC anti-treponemici. Folosește un polipeptid sintetic și recombinat din proteine extrase din *Treponema pallidum* pentru determinarea Ac intratecali. Se utilizează pentru diagnosticul neurosifilis latent

- ▶ Diagnosticul de laborator al sifilisului presupune teste standard cu specificitate mai mică dar sensibilitate mai mare, și care sunt primele necesare atât în diagnosticul cazurilor izolate cât și în screening.(VDRL)
- ▶ Cazurile pozitive pentru testele standard cu specificitate redusă trebuie confirmate cu testul FTA-ABS sau TPHA
- ▶ Pentru diagnosticul neurosifilisului latent se recomandă testul INNO-LIA. Acest test are o specificitate și sensibilitate net superioară celorlalte teste specifice

Algoritmul de diagnostic se va schimba curând testele nespecifice fiind înlocuite cu screening imunoenzimatic de tip EIA și INNO-LIA, fapt ce va scurta timpul de diagnostic și va îmbunătăți calitativ rezultatele.

Mycobacterim tuberculosis (bacilul Koch) este agentul etiologic al tuberculozei, care este o boală infecțioasă. Transmiterea infecției se realizează cel mai frecvent pe cale aeriană, dar și pe cale digestivă, cutanată. Suspiciunea de infecție este clinică și radiologică iar confirmarea este bacteriologică.

Timpul de diagnostic

Test	Limite de timp acceptabile
Examenul microscopic pentru evidențierea BAAR	24 de ore
Cultura în mediul LJ	3-8 săptămâni
Cultura în mediul lichid	1-3 săptămâni (6 săptămâni pentru rezultatele negative)
Identificarea culturii pozitive	Imediat după pozitivare
ABG mediul lichid	14 zile de la data culturii pozitive
ABG linia întâi, mediul solid	30 zile de la data culturii pozitive
ABG linia a doua	4 săptămâni de la data culturii pozitive
Testele de biologie moleculară pentru diagnostic	24-48 ore

Recoltarea produselor patologice

- Sputa se recoltează dimineța, sub supravegherea personalului instruit, 2 eșantioane, la cel puțin 8 ore interval între două eșantioane. Cantitate 3-5 ml.
- Aspirat bronșic: cantitate 10-15 ml
- Aspirat gastric – se recoltează la bolnavi care nu expectorează, copii, adulți >60 ani. Dezavantaj: trebuie prelucrat imediat
- Fluide ale corpului: pleural, peritoneal, pericardic, colecții închise, LCR
Cantitate minim 2 ml → 50 ml. Sunt produse patologice paucibacilare
- Urina se eșantionează multiple (3- 4). Este precedat de urocultură pentru non-Tb. Cantitatea este de 10-50 ml
- Piese de biopsie, puroi din fistulă, sânge se recoltează pe sisteme speciale de colectare, fără conservanți. Pentru puroi nu se acceptă recoltare pe tampon faringian, totuși, acceptat pe mediul Amies
- Materiile fecale necesită prelucrare imediată. Cantitatea recoltată necesară este de 5-10 ml. Limite: erori la microscopie, culturi contaminate

Examenul microscopic

- 1882: Robert Koch descoperă bacilul tuberculozei
- 1883: Ziehl și Neelsen → metoda de colorare cu fuchsina la cald

Conținutul bogat în acizi micolici din structura peretelui micobacteriilor face ca ele să fixeze la cald compușii de anilină (fuchsina), sau substanțe fluorescente - fără încălzire (auramina, auramina-rhodamina) coloranții respectivi rezistând la decolorarea cu alcool acidulat, de aici și denumirea de bacili acido-alcoolorezistenți (BAAR).

Pentru ușurarea examinării este necesară colorarea fondului preparatului (albastru de metilen).

În cazul colorației fluorescente-necesară cuparea fluorescenței preparatului (cu albastru de metilen sau permanganat de potasiu).

Microscopia cu LED UV (light-emitting diodes) a fost recomandată de OMS în 2009. Permite citirea unui număr mai mare de frotiuri (peste 35/zi).

Colorația Ziehl Neelsen

1. Se pun lamele cu frotiurile fixate pe suportul de colorare -să nu se atingă !
2. Se acoperă complet frotiurile cu soluție 0.3% de fuchsină fenicată
3. Se trece pe sub frotiuri flacăra unui bec de gaz până la emiterea de vapori, fără să fiarbă colorantul. Se repetă acțiunea de 3-4 ori în primele 3 minute. Se completează cu fuchsină. Se lasă până la 10 minute.
4. Se spală cu jet slab de apă de robinet și scurge apa.
5. Se acoperă frotiul cu alcool-acidulat 3% și lasă-l pentru decolorare maxim 3 min. Se repetă decolorarea dacă frotiul rămâne roșu.

6. Se spală din nou cu jet slab de apă de robinet și scurge apa.
 7. Se acoperă frotiul cu albastru de metilen 0,3% timp de 30 sec- max 1min
 8. Se spală blând sub jet de apă de robinet și scurge apa.
 9. Se șterge colornatul de pe dosul lamei cu șervet îmbibat în alcool medicinal.
 10. Se usucă frotiurile în poziție înclinată în suport de lame la temperatura camerei. Nu încălzi lamele pentru grăbirea uscării!
- Se examinează la microscop optic: ocular 10x, obiectiv cu imersie 100x (mărire 1000x), după uscare completa.

Cultivarea:

1932: Lowenstein Jensen- mediul solid pe baza de ou

1977: Middlebrook si col: sistem radiometric (BACTEC 460)

- sistem colorimetric (Bact-Alert/MB-BacT)
- sistem fluorimetric (Bactec MGIT 960)
- sistem bazat pe gazometrie (VersaTrek)

Citirea culturilor se face diferit:

- Mediul Lowenstein Jensen (LJ) se face manual la 21, 30, 45, 60 zile. Dacă volumul de lucru permite, se poate citi săptămânal.
- Mediul lichid se face automat, indiferent de sistemul de cultivare, cu raportare pozitiv (la 1-42 zile) sau negativ (la 42 zile).

Rezultatele culturilor pe mediul LJ se exprimă semicantitativ iar cele ale culturilor în mediul lichid, calitativ: pozitiv/negativ.

Identificarea:

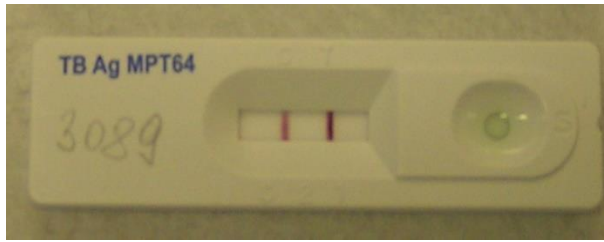
Examen morfologic macroscopic al culturilor pe mediul LJ

- *M.tuberculosis* – colonii R (Rough) colorate crem- galbui
- *M.bovis/M. canetti* – colonii S (Smooth) alb-galbui
- NTM – colonii S sau R, albe, galbui, portocalii, gri, roz.

Examen morfologic macroscopic al culturilor pe mediul lichid Middlebrook

- Grunji resuspendati prin agitare ușoară- MTB, streptococi, uneori fungi
- Tulbure uniform- NTM, coci, bacili, uneori fungi

Frotiurile din culturi se colorează exclusiv ZN (se colorează și microbii de contaminare). Culturile pentru care frotiul indică prezența BAAR se testează obligatoriu pentru confirmarea apartenenței la complexul *M. tuberculosis*. Se folosește test rapid imunocromatografic Ag MPT64. Culturile cu rezultat negativ Ag MPT64 se trimit pentru identificare de specie.



Complexul *M tuberculosis* – pozitiv

NTM- negativ

Antibiograma (ABG) este necesară pentru confirmarea/excluderea rezistenței.

- ABG linia 1 - pentru toate cazurile TB cu > de 10 colonii în cultura primară
- ABG linia 2 - pentru toate cazurile MDR > de 10 colonii în cultura primară

ABG in mediu lichid in sisteme automate este standardul de aur recomandat pentru ABG L 2 în acest moment.

Metode de biologie moleculară:

- LPA : hibridizare liniara- GenoType (HAIN-MTBDRplus, HAIN-MTBDRsl)
- RT-PCR : amplificare AND (PCR, PCR in timp real) – GeneXpert

Aceste teste reduc timpul de confirmare a TB sau/și a TB MDR la 24-48, respectiv 2 ore.