

Diagnosticul de laborator al infecțiilor fungice din sfera orală

Fungii sunt organisme eucariote, microscopice, uni sau pluricelulare. În micologia medicală cel mai utilizat criteriu de clasificare a fungilor este cel morfologic. Din acest punct de vedere avem:

- Fungi filamentozii sunt microorganisme pluricelulare care prezintă filamente tubulare septate sau neseptate denumite hife. Ansamblul de hife este denumit miceliu care este vizibil macroscopic sub forma unor colonii.
- Levuri care sunt microorganisme unicelulare, cu formă ovalară sau rotundă, ce se multiplică în principal prin blastospor (blastoconidie), care se poate desprinde de celula mamă printr-un proces de fuziune, fie rămâne atașat de acesta și generează succesiv noi indivizi, sub forma unor agregate liniare denumite pseudohife
- Fungi dimorfici, care prezintă o dualitate morfologică în funcție de condițiile de dezvoltare. Ei pot să fie levuri în așesurile organismelor parazitare sau la 37°C in vitro pe mediile speciale și sub formă de filamente când sunt cultivați la temperatura camerei sau la 30°C, pe mediile uzuale.

Diagnosticul de laborator parcurge următoarele etape: de la prelevarea și transportul probelor, examen microscopic direct sau în funcție de caz examen histopatologic, cultivarea în vederea izolării agentului etiologic, identificarea până la nivel de specie și în final testarea sensibilității la substanțele antifungice.

Recoltarea să fie realizată de către personalul medical instruit în acest scop. Cantitatea de prelevat trebuie să fie suficient de mare pentru a permite efectuarea examenului microscopic direct, cultivarea și eventual examenul histopatologic pe biopsie. Prelucrarea probelor va începe cât mai curând posibil după recoltare, fără a depăși timpul maxim de așteptare (2 ore la temperatura camerei).

Produsele patologice de la nivelul mucoasei orale se recoltează cu un tampon steril, prin trecerea repetată a acestuia de cel puțin 10 ori, peste zonele cu leziuni. În cazul leziunilor ulcerate sau pseudo-membranoase, se poate recurge la raclarea ușoară a acestora cu ajutorul unei chiurete sterile sau a unei lame de sticlă pentru microscopie. În cazul aparatelor protetice, prelevarea probelor se realizează de pe fața mucozală a acestora, zonă predilectă a acestora pentru apariția biofilmelor levurice. Din pungile parodontale, prelevarea probelor se

realizează cu sonda parodontală, în zonele vestibulară, orală, vestibule-distală, vestibule-mezială, oro-distală și oro-mezială. În endodontiteprelevarea probelor se realizează cu ajutorul conurilor de hârtie sterile, de dimensiuni diferite în funcție de dimensiunea canalelor radiculare.

Conurile de hârtie și produsul pathologic din pungile parodontale să se trimită în laborator, pentru evitarea desicării pe medii de transport.

Examenul microscopic direct orientează uneori diagnosticul către o infecție levurică și uneori poate oferi indicii privind etiologia acesteia.

Produsele patologice pentru care există suspiciunea că ar conține levuri se pot examina microscopic prin :

- Frotiu colorat cu o substanță fluorescentă (Calcofluor, Blankophor). Este metoda optimă de detecție a fungilor în prelevate datorită sensibilității și specificității excelente, doar că necesită microscopie în lumină ultravioletă;
- Frotiu colorat Gram pe care se evidențiază cu ușurință filamentele, pseudohifele, blastosporii însă este inadecvată pentru evidențierea celulelor levurice de dimensiuni mici (ex. *Candida glabrata*);;
- Frotiu colorat May-Grünwald-Giemsa este colorația de rutină pentru evidențierea levurilor intracelulare (ex. *Histoplasma*) dar și pentru microscopie directă.

Pe parcursul examenului microscopic se urmărește cu atenție prezența, forma și dimensiunile formațiunilor caracteristice levurilor: blastospor, pseudohife, hife (filamente).

Însămânțarea se face prin epuizare pe medii solide fie în plăci Petri fie în tuburi. Se asigură astfel separarea fungilor cu semnificație clinic de cei contaminanți și se inhibă prin diluare eventualele substanțe antimicrobiene cu rol antifungic.

Mediul utilizat este Agar Sabouraud aditivat cu cloramfenicol. Acest mediu permite o bună dezvoltare a și supresează multiplicarea eventualelor bacteria contaminante. Dezavantajul acestui mediu este că nu nreșește discriminarea culturilor mixte. De aceea, ideal ar fi ca însămânțarea produselor patologice săse facă pe un mediu cromogen, care pe lângă discriminarea între speciile levurice, poate aduce informații esențiale în identificareaagentului etiologic. Astfel într-o singură etapă se poate face atât izolarea cât și identificarea levurilor incriminate.

Numărul speciilor identificabile prin cultivarea pe medii cromogene este variabil în funcție de compoziția mediului.

După izolarea tulpinilor fungice și precizarea semnificației clinice (peste 50 colonii/tampon și prezența reacției inflamatorii), se trece la identificarea speciei folosind teste de rutină. Se vor utiliza doar tulpini purificate, oricare contaminare bacteriană sau fungică anulând rezultatul identificării.

Într-o primă fază se preferă efectuarea testului de filamentare în ser sanguin sau mediu sintetic (germtub test, test de blastoză) pentru diferențierea speciilor *Candida albicans* și *Candida dubliniensis* (care produc tubi germinativi), de celelalte specii (care nu produc astfel de formațiuni).

Teste biochimice pentru identificarea levurilor de interes medical, în laboratorul clinic. Aceste teste nu reușesc să elucideze de fiecare dată apartenența taxonomică a unei tulpini și sunt necesare teste suplimentare, în principal de biologie moleculară, pentru identificarea acestora.

Deoarece testele de biologie moleculară bazată pe analiza AND-ului sunt accesibile doar unor laboratoare, utilizarea testelor biochimice și a caracterelor morfologice este soluția acceptabilă pentru laboratoarele clinice.

Aceste teste pot identifica un număr diferit de specii, cum ar fi:

- O singură specie: *Candida albicans* Screen (Remel), RTT Glabrata (Fumouze);
- Câteva specii: CandiSelect (Bio-Rad), CHROMagar *Candida* (BD Sciences), *Candida* ID2 (bioMérieux), Chromogenic *Candida* Agar (OXOID);
- Specii multiple: ID 32C (bioMérieux), RapID Yeast Plus Panel (Remel)

Diferențierea speciilor de *Candida albicans* și *Candida dubliniensis* exclusive pe baza caracterelor fenotipice este discutabilă.

Se recurge la testul de cultivare la 45°C, temperatură la care crește doar *Candida albicans*. Pentru identificarea *Candida dubliniensis* este preferabilă o tehnică de biologie moleculară care presupune folosirea a două perechi de primeri: una de amorse specific unui intron al genei codante pentru actină (DUBF/DUBR) și alta de amorse universal pentru AND-ul ribozomal (ITS1/ITS4). Dintre cele două

specii doar *Candida dubliniensis* generează în urma amplificării două benzi-una de 228 de perechi de baze cu setul (DUBF/DUBR) și una cu amorsele universale