

## **Testarea sensibilității la antibiotice a germenilor izolați în infecții. Reacții imunologice în diagnosticul de laborator al infecțiilor.**

Chimioterapice antiinfecțioase sunt definite ca un grup de medicamente, cu toxicitate selectivă, capabile să distrugă și să stânjenească multiplicarea unor organisme patogene, implicate etiologic în variate infecții.

Principii de bază ale chimioterapiei antiinfecțioase:

- toxicitatea selectivă prin exploatarea diferențelor de structură și metabolism a agenților patogeni și a celulei gazdă (a omorî microorganismul și nu gazda umană)
- atingerea unei concentrații inhibitorii la sediul infecției
- penetrarea și atașarea de țintă, evitând inactivarea și eliminarea

### **Metode de testare a sensibilității *in vitro***

Cele mai utilizate tehnici sunt:

- **tehnicele calitative:**
- antibiograma difuzimetrică (cu discuri)
- **tehnicele cantitative:**
- metoda diluțiilor în mediu lichid
- metoda diluțiilor în agar
- metoda microdiluțiilor în agar
- testul E
- **metode și sisteme comerciale, automatizate, de testare**

### **Antibiograma difuzimetrică Kirby- Bauer**

Este metoda uzuală pentru laboratoarele care testează un număr relativ mic de tulpini bacteriene cu creștere rapidă și fără diferențe semnificative de la tulpină la tulpină a ratei de creștere.

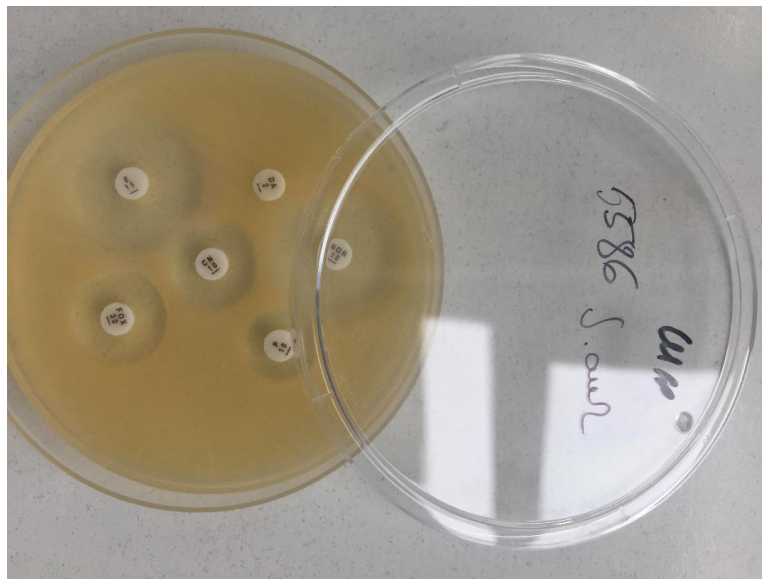
Din punct de vedere tehnic însămânțăm germenul de testat pe mediul solid (agar Mueller-Hinton turnat în plăci Petri în strat uniform de 4mm grosime). Mărimea inoculului în ser fiziologic steril este standardizată la 0,5 Mac Farland (corespunzător unei densități de  $10^8$  germeni/ml). Însămânțarea se poate realiza prin inundarea plăcii urmată de aspirarea, aseptice, a excesului de inocul sau cu ajutorul unui tampon.

După aproximativ 5 minute (timp în care placa Petri se lasă cu capacul întredeschis în vecinătatea becului de gaz aprins, se aplică microcomprimatele în care sunt încorporate antibiotice în concentrație standardizată. Substanțele antimicrobiene se prezintă sub forma unor microcomprimate (discuri), având inscripționate pe ambele fețe simbolul

antibioticului și concentrația. Aplicarea microcomprimatelor se poate face cu ajutorul unei pense, în condiții aseptice sau cu ajutorul unui aplicator automat, la minim 15 mm distanță între ele și 30 mm de marginea plăcii. Microcomprimatele trebuie să vină în contact perfect cu mediul, motiv pentru care, cu ajutorul unei pense le presăm ușor. După incubăm plăcile peste noapte în termostat (16-18 ore), la 37°C sau în funcție de temperatura optimă de multiplicare a microorganismului testat. Antibioticul eliberat din microcomprimat difuzează în mediu, realizând zone de inhibiție în care coloniile microbiene nu se dezvoltă. Cu cât zona de inhibiție este mai largă, cu atât germele va fi considerat mai sensibil. Dacă în interiorul zonei de inhibiție (chiar dacă diametrul înregistrat este foarte mare) se dezvoltă colonii (mutanți rezistenți), germele va fi considerat rezistent.

Se măsoară cu rigla și se exprimă în mm zona de inhibiție completă. Corelația dintre diametrele zonelor de inhibiție și sensibilitatea bacteriei se face prin consultarea tabelelor corespunzătoare din standardele CLSI sau EUCAST. Rezultatele se exprimă în sensibil, rezistent și intermediar sensibil.

De menționat că trusa de microcomprimat diferă la bacteriile gram pozitive de cele gram negative și nonfermentative. Alegerea antibioticelor testate ține cont de rezistența naturală, localizarea infecției, riscul de multirezistență.



Antibiograma difuzimetrică

### **Metoda diluțiilor în mediu lichid**

Metoda diluțiilor permite stabilirea CMI și CMB.

- concentrația minimă inhibitorie (CMI), reprezentată de cantitatea minimă de antibiotic care inhibă complet multiplicarea bacteriilor;
- concentrația minimă bactericidă (CMB), reprezentată de cantitatea minimă de antibiotic capabilă să distrugă  $\geq 99,99\%$  din bacterii.

Deși costul acestei metode este ridicat, ea este indicată în situații de urgență.

Principiu: se realizează diluții crescânde de antibiotic în mediu lichid, care se pun în contact cu cantități fixe din cultura bacteriană, se incubează 18-24 de ore la 37°C și se stabilește concentrația cea mai mică de antibiotic care nu permite creșterea bacteriană. Aceasta va fi CMI.

**Determinarea CMB**

Principiu: după citirea CMI-ului, se transferă o cantitate fixă, din eprubetele în care microorganismul nu a crescut, pe un mediu de cultură solid. Se incubează 18-24 de ore la 37°C, după care se notează cea mai mică concentrație la care bacteriile nu au mai crescut. Aceasta va reprezenta CMB.

### **Metoda diluțiilor în agar**

Este tehnica pentru testări precise și reproductibile.

Principiu. Încorporarea unui agent antimicrobian în mediu cu agar solid sau semisolid, în progresie geometrică a concentrațiilor și aplicarea unui inocul bacterian definit pe suprafața mediului cu agar.

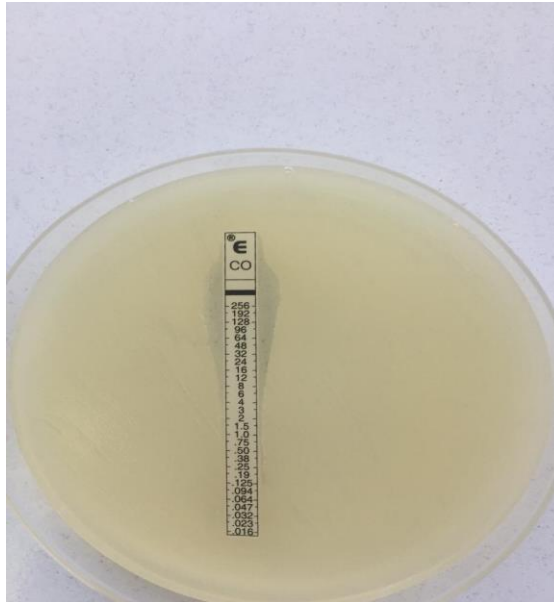
Metoda microdiluțiilor pe sistemul Vitek (BioMerieux, France) Card Vitek 2 Compact

### **Testul E**

Îmbină simplitatea antibiogramei difuzimetrice cu precizia testării cantitative făcând economie de timp.

Pe suprafața unei plăci Petri cu mediu de cultură solid (Muller- Hinton) inoculată cu tulpina de testat se aplică langhetele cu antibiotic ce se dispun radial. Aceste langhete sunt din plastic și au fixate 15 diluții de antibiotic, la un capăt concentrația este minimă, iar la celălalt este maximă. Interpretarea zonei de inhibiție permite aflarea CMI.

CLSI sau EUCAST recomandă ca singură metodă pentru testarea sensibilității la Ceftriaxon a pneumococilor sau testarea sensibilității la antibiotice pentru germenii anaerobi testul E.



Test E

Reacția Ag-Ac este determinată de interacțiunea specifică dintre epitopii antigenului (Ag) și paratopii anticorpilor (Ac). Legătura Ag-Ac este specifică și reversibilă.

Afinitatea unui Ac pentru un Ag specific depinde de complementaritatea sterică dintre paratop și epitop. Un paratop se poate combina cu un singur epitop, numit “specific”. Astfel, dacă este cunoscut unul din elementele reacției - Ag sau Ac, poate fi identificat celălalt.

### Reacția de aglutinare bacteriană

Aglutinarea bacteriană este o reacție antigen-anticorp, în care antigenul este reprezentat de celule bacteriene sau fragmente de celule bacteriene în suspensie. Sub acțiunea anticorpilor specifici, complexe imune antigen-anticorp formează rețele tridimensionale, constituind aggregate vizibile. Reacția de aglutinare se folosește atât în identificarea unor bacterii pe baza proprietăților antigenice, cât și pentru evidențierea anticorpilor aglutinanți din serul de bolnav.

- Aglutinarea pe lamă se folosește preponderent în diagnosticul bacteriologic, pentru identificarea rapidă pe baza proprietăților antigenice a unor tulpini izolate din produsul patologic și mai puțin în diagnosticul serologic.

Principiu: Se amestecă o picătură de ser imun și o picătură de suspensie bacteriană (Ag) din cultură de 18-24 de ore, pe o lamă curată, degresată. Lectura se face la microscop sau cu ochiul liber. În caz de reacție pozitivă apar conglomerate sub forma unor grunji albi, fini, iar lichidul se clarifică; în caz de reacție negativă, lichidul rămâne tulbure.

Aglutinarea se folosește și în diagnosticul serologic. Dacă o astfel de reacție este pozitivă se continuă cu reacția de aglutinare cantitativă, în tuburi.

- Aglutinarea în tuburi se folosește pentru diagnosticul serologic. Se folosesc 6 eprubete în care se realizează diluții successive crescătoare din serul de cercetat în ser fiziologic și apoi se adaugă aceeași cantitate de antigen standard. Titrul reacției este reprezentat de cea mai mare diluție de ser la care se mai observă aglutinarea.

Exemple: Reacția Vidal pentru febra tifoidă și febrile paratifoide, reacția Weil-Felix pentru tifosul exantematic

- Aglutinarea pasivă sau aglutinarea pe suport este utilizată când antigenul este o soluție moleculară. După ce este fixat antigenul devine aglutinabil în prezența unui ser imun. Reacțiile se pot folosi atât pentru identificarea unui antigen cât și pentru detectarea anticorpilor corespunzători folosind un antigen cunoscut. În calitate de suport inert pot servi hematiile, particule de latex, cristale de colesterol. Suspensia de particule sensibilizate cu Ag sau Ac este pusă în contact cu serul imun (respectiv cu Ag), ca și în cazul aglutinării directe. Avantajele reacțiilor indirecte: facilitatea lecturării și sensibilitatea înaltă

### Reacțiile de precipitare

Imunoprecipitarea se manifestă doar atunci când Ag solubil este amestecat cu Ac corespunzător. Ea poate fi observată în mediu lichid, sau solid, fiind sau calitativă, sau cantitativă. Acestea sunt reacții specifice dar puțin sensibile, ce necesită cantități importante de anticorpi. Precipitarea complexelor moleculare rezultate din uniunea Ag-Ac este determinată de formarea unei rețele tridimensionale de Ag reunite prin Ac. Precipitarea maximă corespunde cu zona de echivalență, unde Ac și Ag sunt în raport optimal de concentrație, ce permite precipitarea tuturor moleculelor de Ac cu Ag corespunzător. În exces de Ag sau de Ac precipitatul nu se formează.

Utilizare: în medicina legală (determinarea apartenenței de specie a diferitelor proteine: sânge, spermă), în igiena alimentară (depistarea falsificării alimentelor), în diagnosticul bolilor infecțioase.

- Precipitarea în mediu lichid

#### Reacția de precipitare inelară

Într-un tub se introduce serul imun apo cu o pipetă se prelinge încet soluția de Ag ca să nu se amestece cu serul. Dacă Ac din ser corespunde cu Ag, în zona de separare a celor două lichide se formează un inel alb, ceea ce semnifică precipitarea complexului Ag-Ac. Avantajul metodei – rapiditatea și simplitatea metodei. Exemple: reacția Ascoli pentru depistarea antigenului polizaharidic al antraxului.

### Reacția de floculare

Se efectuează diluții successive din serul imun (Ac) la care se adaugă cantități egale de Ag. Se introduc probele în termostat și periodic se examinează pentru depistarea tubului în care apare precipitatul inițial (zona de echivalență). Exemple: pentru determinarea cantității de toxină, antitoxină sau anatoxină.

- **Precipitarea în mediu solid (în gel)**

În aceste reacții Ag și Ac difuzează unul spre altul prin geloză și în zona de echivalență a acestor doi parteneri de reacție se produce precipitarea sub forma de linii. Dacă există mai multe sisteme Ag-Ac, se vor forma linii de precipitare distincte. Exemple: utilizată în analiza calitativă a unui amestec de Ag într-o soluție.

### Imunodifuzia simplă radială (tehnica Mancini)

Se efectuează pe o placă cu geloză, în care sunt încorporați Ac specifici. Ag este depus în godeurile din stratul de geloză. Ag difuzează radial în geloză pe parcursul a 48 ore. Dacă Ag corespunde Ac, atunci are loc formarea de discuri de precipitare, cu suprafața proporțională concentrației de Ag din godeu. Exemple: identificarea și cuantificarea Ig, hormonilor, enzimelor.

### Imunodifuzie dublă (tehnicile Ouchterlony și Elek)

Se toarnă geloză în placa Petri. În tehnica Ouchterlony Ag și Ac difuzează din godeurile situate la o distanță de 15 mm unul de altul. În tehnica Elek cei 2 reactivi difuzează din benzile de hârtie plasate pe suprafața gelozei. Moleculele difuzează în gel în funcție de greutatea lor și formează linii de precipitare pentru fiecare sistem Ag-Ac ce corespund în zona lor de echivalență. Dacă două Ag sunt identice, liniile lor se unesc, dacă sunt diferite – se intersectează. Exemple: determinarea toxinelor (toxigenză), antitoxinelor, Ag proteice.

### Contraimunoelectroforeza (CIEF)

Este utilă la examinarea amestecurilor antigenice complexe. Citirea este posibilă peste 90 minute. Geloză este turnată pe o placă de sticlă, Ag și Ac sunt dispuși în rezervoare circulare de 2 mm diametru, la o distanță de 10 mm. În timpul electroforezei Ag, încărcat negativ, migrează spre polul pozitiv, întâlnind Ac care migrează spre catod. La interacțiunea Ag și Ac omologi are loc formarea liniei de precipitare. Exemple: examinarea componentelor Ag din lichide biologice: LCR, urina, lichid pleural, ascită.

### Reacții cu participarea complementului

Activarea fracțiilor complementului (C) duce la liza particulei purtătoare de Ag (hematii, bacterii, diverse celule). Activarea complementului se poate realiza pe cale clasică, alternativă sau lectinică.

#### Reacția de fixare a complementului (RFC)

Este o reacție complexă, constituită din 2 sisteme Ag-Ac și cu participarea C. În RFC participă Ig capabile să fixeze C – IgM și IgG. Exemple: în diagnosticul virozelor, infecțiilor bacteriene.

Reacția se efectuează în 2 etape utilizând 2 sisteme. Prima etapă – Ag1 (Ag cunoscut sau Ag necunoscut), Ac1 (serul bolnavului sau serul imun) și complement. Dacă Ac se combină cu Ag omolog va avea loc și fixarea C (efect frecvent invizibil).

II etapă – la sistemul de bază se adaugă sistemul indicator (hemolitic), constituit din hematii de berbec (Ag2) combinate cu Ac specifici – serul hemolitic (Ac2). Evaluarea rezultatelor – dacă complementul a fost fixat de primul sistem Ag-Ac hemoliza nu se observă (rezultat pozitiv). Dacă Ag1 nu corespunde cu Ac1, complementul rămâne disponibil pentru fixare pe sistemul indicator Ag2-Ac2, provocând hemoliza (rezultat negativ)

#### Reacții cu utilizarea Ac marcați

##### Reacția de imunofluorescență (RIF)

Metoda directă utilizată în scop de seroidentificare. Din materialul ce conține Ag (cultura pură, biopsie tisulară) se prepară un frotiu, peste care se aplică serul imun specific cu Ac marcați cu fluorocrom. Peste 20 min de incubare este citit la microscopul pentru imunofluorescență. În caz de reacție pozitivă se observă luminiscenta locală.

Metoda indirectă. Poate fi utilizată pentru seroidentificare și serodiagnostic. Pe frotiul ce conține Ag se aplică Ac corespunzători nemarcați. Se spală preparatul, apoi se adaugă anti-Ig fluorescentă, care se va combina cu Ac din complex.

#### Reacția Imunoenzimatică

Tehnica imunoblot (western blot) permite identificarea Ag sau a Ac dintr-un amestec. I etapă – electroforeza în gel a probei de Ag, II etapă – transferul electric al Ag pe membrana de nitroceluloză, III etapă – pe membrană sunt aplicați succesiv Ac dirijați contra Ag, apoi conjugatul marcat cu enzimă, care permite depistarea Ac fixați. După o spălare se adaugă substratul cromogen. Fiecare complex Ag-Ac formează zone colorate distincte. Exemple: depistarea Ac anti-HIV, caracterizarea Ac monoclonali.

#### Tehnica ELISA

Proteinele sunt separate electroforetic în gel poliacrilamid. Sub acțiunea câmpului electric are loc difuzia proteinelor conform greutatei moleculare, aranjându-se în



zone liniare subțiri diferite: mai aproape de start se aranjează proteinele cu masă moleculară mare (120-150 kDa), la final se aranjează proteinele cu masă moleculară mică (5-10kDa). Apoi lamela de gel este transferată pe o foaie de nitroceluloză amplasată între electrozii unei surse de curent continuu. Sub acțiunea câmpului electric are loc trecerea proteinelor din gel pe nitroceluloză, unde se fixează foarte bine pe hârtie. Proteinele fixate sunt marcate cu o enzimă incoloră. Procedura ulterioară de montare a reacției este similară.

#### Analiza radioimuna (RIA)

Ag se fixează la fundul godeurilor din placa de plastic. Se adaugă Ac testați care se vor combina cu Ag omolog. După spălarea godeurilor, se adaugă un ligand radiomarcant (anti-Ig). După eliminarea excesului de izotopi prin spălare, se măsoară radioactivitatea: ea este proporțională cu concentrația Ac dozați.