



MINISTERUL SĂNĂTĂȚII



Program: Provocări în sănătatea publică la nivel european, finanțat prin Mecanismul Financiar SEE 2014-2021
Operator de Program: Ministerul Sănătății din România
Proiect: "Întărirea capacității instituționale pentru controlul infecțiilor spitalicești și gestionarea consumului de antibiotice în România"
Cod proiect: PDP-8
Promotor de proiect: Institutul Național de Boli Infecțioase „Prof. Dr. Matei Balș” din București

Ghid pentru prevenirea și limitarea fenomenului de rezistență la antimicrobiene (AMR) și a infecțiilor asociate asistenței medicale (IAAM) – Microbiologie

Livrabil pentru Activitatea 6.1 – Revizuirea NAP și a instrumentelor operaționale

Avizat din partea echipei proiectului,
Prof. dr. Ștefan Sorin ARAMĂ
Manager de proiect

Realizat: 31.12.2022

Actualizat: 28.08.2023

Granturile SEE și Norvegiene
Working together for a **green**, **competitive** and **inclusive** Europe



MINISTERUL SĂNĂTĂȚII



Ghid pentru prevenirea și limitarea AMR și IAAM – Microbiologie

Autori:

Conf. univ. Dr. Edit Székely, Medic primar Medicină de laborator și microbiologie medicală, Spitalul Clinic Județean de Urgență Târgu-Mureș, Universitatea de Medicină, Farmacie, Științe și Tehnologie „George Emil Palade” din Târgu Mureș

Ș.I. Dr. Dragoș Florea, Medic primar Medicină de laborator, Institutul Național de Boli Infecțioase „Prof. Dr. Matei Balș”, Universitatea de Medicină și Farmacie „Carol Davila” din București

Dr. Marina Indreaș, Medic primar Laborator clinic și microbiologie, Spitalul Județean de Urgență Bacău

Cu contribuția:

Prof. univ. Dr. Alexandru Rafila, Medic primar Medicină de laborator, Medic primar Sănătate publică și management sanitar, Medic primar Microbiologie medicală, Institutul Național de Boli Infecțioase „Prof. Dr. Matei Balș”, Universitatea de Medicină și Farmacie „Carol Davila” din București

Prof. univ. Dr. Simona Claudia Cambrea, Medic primar Boli infecțioase, Spitalul Clinic de Boli Infecțioase Constanța, Facultatea de Medicină, Universitatea Ovidius Constanța

Prof. univ. Dr. Gabriel Adrian Popescu, Medic primar Boli infecțioase, Institutul Național de Boli Infecțioase „Prof. Dr. Matei Balș”, Universitatea de Medicină și Farmacie „Carol Davila” din București

Conf. univ. Dr. Anca-Cristina Drăgănescu, Medic primar Pediatrie, medic specialist Boli infecțioase, Institutul Național de Boli Infecțioase „Prof. Dr. Matei Balș”, Universitatea de Medicină și Farmacie „Carol Davila” din București

Conf. univ. Dr. Gheorghiță Valeriu, Medic primar Boli infecțioase, Spitalul Clinic de Urgență „Prof. Dr. Agrippa Ionescu”, Universitatea de Medicină și Farmacie „Carol Davila” din București

S.I. Dr. Maria Nica, Medic primar Medicină de laborator, Spitalul Clinic de Boli Infecțioase și Tropicale „Dr. V. Babeș” București, Universitatea de Medicină și Farmacie „Carol Davila” din București

Granturile SEE și Norvegiene

Working together for a **green**, **competitive** and **inclusive** Europe



MINISTERUL SĂNĂTĂȚII



- Ș.I. Dr. Dorina Maria Crăciun**, Medic primar Epidemiolog, Spitalul Clinic de Urgență pentru Copii „Grigore Alexandrescu”, București, Universitatea de Medicină și Farmacie „Carol Davila” din București
- S.I. Dr. Nina-Ioana Bodnar**, Medic specialist Boli infecțioase, Spitalul Clinic Județean Mureș, Universitatea de Medicină, Farmacie, Științe și Tehnologie „G. E. Palade” din Târgu Mureș
- Dr. Roxana-Ioana Șerban**, Medic primar Epidemiolog, Cercetător științific gr. 3, Institutul Național de Sănătate Publică, Centrul Național de Supraveghere și Control al Bolilor Transmisibile
- Dr. Cleo Nicoleta Roșculeț**, Medic primar Boli infecțioase, Institutul Național de Boli Infecțioase "Prof. Dr. Matei Balș"
- Dr. Andreea-Sorina Niculcea**, Medic primar Epidemiolog, Institutul Național de Sănătate Publică, Centrul Național de Supraveghere și Control al Bolilor Transmisibile
- Dr. Laurențiu Mihai Pavel**, Medic specialist Epidemiolog, Direcția de Sănătate Publică Mureș
- Dr. George Angheluță**, Medic primar Epidemiolog, Spitalul Universitar de Urgență Elias, București
- Dr. Hanne-Merete Eriksen-Volle, Dr. Miriam Sare, Dr. Christine Ardal, Horst Bentele, Dr. Oliver Kacelnik și Dr. Ernst Kristian Rødland**, Norwegian Institute of Public Health

Proiectul „Întărirea capacității instituționale pentru controlul infecțiilor spitalicești și gestionarea consumului de antibiotice în România”, cod proiect PDP-8, este coordonat de Ministerul Sănătății, derulat de Institutul Național de Boli Infecțioase „Prof. Dr. Matei Balș” din București, în parteneriat cu Institutul Norvegian de Sănătate Publică, și are sprijinul Organizației Mondiale a Sănătății, de la care s-au achiziționat servicii de expertiză tehnică. Proiectul este finanțat prin Mecanismul Financiar SEE 2014-2021 - Provocări în sănătatea publică la nivel european. Bugetul proiectului este de 1,741,154 euro. Date contact proiect: website: <https://mateibals.ro/proiecte/pdp-8-proiect-amr/>; adresa e-mail: proiect.amr@yahoo.com. Conținutul acestui material nu reprezintă în mod necesar poziția oficială a Granturilor SEE 2014 – 2021. Întreaga răspundere asupra corectitudinii și coerenței informațiilor prezentate revine inițiatorilor. Pentru informații oficiale despre Granturile SEE 2014-2021 accesați www.eeagrants.org, www.eeagrants.ro și www.ro-sanatate.ms.ro.

Granturile SEE și Norvegiene

Working together for a **green**, **competitive** and **inclusive** Europe

GHID DE DIAGNOSTIC MICROBIOLOGIC - GENERALITĂȚI	2
DIAGNOSTICUL MOLECULAR MICROBIOLOGIC	11
TESTAREA SENSIBILITĂȚII LA ANTIBIOTICE	21
GHID DE ASIGURAREA CALITĂȚII REZULTATELOR ÎN LABORATORUL DE MICROBIOLOGIE	74
DIAGNOSTICUL MICROBIOLOGIC AL INFECȚIILOR SISTEMICE - HEMOCULTURA	84
DIAGNOSTICUL MICROBIOLOGIC AL INFECȚIILOR SISTEMULUI NERVOS CENTRAL	103
INVESTIGAREA BACTERIOLOGICĂ A TRACTULUI RESPIRATOR SUPERIOR ȘI A CAVITĂȚILOR CONEXE	114
DIAGNOSTICUL MICROBIOLOGIC AL INFECȚIILOR TRACTULUI RESPIRATOR INFERIOR	132
DIAGNOSTICUL MICROBIOLOGIC AL INFECȚIILOR CUTANATE ȘI ALE PĂRȚILOR MOI	149
DIAGNOSTICUL MICROBIOLOGIC AL INFECȚIILOR DE TRACT URINAR	163
DIAGNOSTICUL MICROBIOLOGIC AL INFECȚIILOR INTRAABDOMINALE	178
DIAGNOSTICUL MICROBIOLOGIC AL INFECȚIILOR OSTEOARTICULARE	182
DIAGNOSTICUL MICROBIOLOGIC AL INFECȚIILOR GASTROINTESTINALE (CU EXCEPȚIA CELOR CAUZATE DE <i>CLOSTRIDIODES DIFFICILE</i>)	194
DIAGNOSTICUL MICROBIOLOGIC AL INFECȚIILOR CU <i>HELICOBACTER PYLORI</i>	201
DIAGNOSTICUL MICROBIOLOGIC AL INFECȚIEI DETERMINATE DE <i>CLOSTRIDIODES DIFFICILE</i>	208
DIAGNOSTICUL MICROBIOLOGIC AL INFECȚIILOR GENITALE	212
DIAGNOSTICUL MICROBIOLOGIC AL INFECȚIILOR OCULARE	229
DEPISTAREA PORTAJULUI DE GERMI MULTI-DROG REZISTENȚI (MDR)	238
CONTROLUL MICROBIOLOGIC AL MEDIULUI DE SPITAL	242

Ghid de diagnostic microbiologic - generalități

I. Scopul ghidului

Acest document reprezintă un ghid de diagnostic microbiologic, standardizare a testării și a interpretării rezistenței la antibiotice, raportare selectivă și secvențială a rezultatelor antibiogramei.

Rolul acestui ghid este de a îmbunătăți cunoștințele și atitudinea personalului medical cu privire la investigațiile microbiologice, cu scopul evitării utilizării de primă intenție a antibioticelor restricționate.

Acest document face parte dintr-un pachet de ghiduri și protocoale, împreună cu ghidurile de utilizare a antibioticelor pentru principalele sindroame infecțioase și pentru implementarea de programe privind utilizarea judicioasă a antibioticelor în spitale.

II. Principiile diagnosticului microbiologic

Indicațiile examenului microbiologic

Examenul microbiologic se efectuează doar în cazul unor indicații bine stabilite, când rezultatul poate influența atitudinea terapeutică.

Gestionarea adecvată a probelor biologice este cheia unui diagnostic precis de laborator, afectează direct îngrijirea și evoluția pacientului, influențează deciziile terapeutice, controlul infecțiilor asociate asistenței medicale, durata de spitalizare și costurile generale de spitalizare. De asemenea are un rol major în influențarea costurilor laboratorului, are un impact direct asupra eforturilor de prescriere judicioasă a antibioticelor și în mod clar influențează eficiența laboratorului. Cele mai bune rezultate pentru pacienți sunt rezultatul unor parteneriate puternice între clinician și specialistul în microbiologie. Acest document ilustrează și promovează acest parteneriat și subliniază importanța adecvării gestionării eșantionului în funcție de relevanța clinică a rezultatelor.

Definirea colonizării, semnificația acesteia

Colonizarea nu reprezintă o infecție. Este un proces nepatogen în care are loc multiplicarea microorganismelor pe suprafețele organismului gazdă – tegumente, mucoase precum nazală, conjunctivală, oro-faringiană și la poarta de intrare a tractului urogenital, respirator, digestiv - fără a determina alterări morfo-funcționale ale țesuturilor, o reacție imună, o simptomatologie clinică evident detectabilă. Suprafețele gazdei sunt colonizate de către microorganisme comensale și mutualiste care nu aduc un prejudiciu definit. Aceste microorganisme de colonizare formează microbiota indigenă și în anumite situații pot produce infecții.

Definirea contaminării

În microbiologie contaminarea reprezintă prezența germenilor pe suprafețe inerte sau ale organismului uman, situație în care reacțiile tisulare locale sau imune sunt absente, bacteria fiind prezentă o durată scurtă de timp.

Contaminarea unui produs biologic se referă la introducerea unor microorganisme în cursul recoltării, care nu erau prezente în produs (de exemplu, contaminarea cu floră tegumentară a hemoculturilor, contaminarea cu flora tractului respirator superior a probelor recoltate din tractul respirator inferior, contaminarea urinei cu bacterii din uretra distală, etc.). Acestea pot cauza rezultate fals pozitive.

În organism se delimitează zone normal sterile (mediul intern, țesuturile, cavitățile seroase), zone normal necolonizate deși contaminate ocazional sau periodic (sinusurile paranazale, urechea medie, etajul infraglotic al căilor respiratorii, căile biliare, căile genitale interne, vezica urinară, stomacul, duodenul), și zone normal colonizate (colonul și ileonul terminal, căile aerodigestive superioare, uretra distală, vaginul, tegumentul).

Agentul etiologic al unei infecții

Semnificația clinică a microorganismelor depistate într-un prelevat se face în funcție de:

- condiția microbiologică a prelevatului,
- patogenitatea și raporturile izolatului cu microbiota indigenă,
- contextul clinic,
- reactivitatea antiinfecțioasă a pacientului.

În cazul prelevatelor *normal sterile* (hemocultură, lichide de puncție): însăși prezența în aceste prelevate conferă microorganismelor depistate semnificație clinică. Excepție fac microorganismele accidental patogene rezidente ale tegumentelor care necesită argumente suplimentare.

În cazul prelevatelor *contaminate pe traiectele de eliminare naturală* (secrețiile din tract respirator inferior în principal sputa, urina din jet mijlociu, plăgi superficiale sau prelevate subcutanate, prelevate cu tamponul din urechea medie): izolarea unor microorganisme patogene sau oportuniste străine microbiotei indigene a traiectelor de eliminare are semnificație clinică (ex: *Mycobacterium tuberculosis* în spută). Semnificația clinică a microorganismelor oportuniste care contaminate uzual aceste prelevate trebuie argumentată prin criterii suplimentare:

- Criteriul izolării cantitative în cultură
- Criteriul asocierii semnificative cu celulele inflamatorii la examenul citobacterioscopic.

În cazul prelevatelor *din zone normal colonizate* (tegumente, mucoase, materii fecale): identificarea integrală a izolatelor din asemenea probe este inutilă. Se urmăresc numai principalele microorganisme care pot cauza un anumit sindrom clinic (ex. *Streptococcus pyogenes* din exsudat faringian, *Streptococcus agalactiae* din secreția vaginală, salmonelle, shigele din materii fecale).

III. Recoltarea și transportul probelor biologice

Selectarea și colectarea probelor de microbiologie sunt responsabilitatea personalului medical, mai puțin a laboratorului, deși specialistul de Microbiologie poate și trebuie să fie apelat pentru consultare. Personalul medical trebuie să consulte laboratorul pentru a se asigura că indicația de recoltare, selecția produsului adecvat, prelevarea, transportul și depozitarea probelor pe care le recoltează sunt gestionate corespunzător.

Manualul de recoltare al laboratorului de microbiologie trebuie să fie disponibil în orice moment, pentru ca întregul personal medical să îl poată consulta.

Acest lucru poate facilita colaborarea dintre laborator, cu specialiștii din microbiologie și personalul care se ocupă de colectarea probelor. Îngrijirea pacientului este un efort de echipă. Dacă managementul probei, de la selectarea celui mai potrivit produs biologic până la transportul corect la laborator nu este efectuat corect, contribuția laboratorului la diagnostic este minimă sau chiar absentă.

Principii generale de recoltare

Selectarea prelevatului reprezentativ

Prelevatele de calitate proastă sau care nu sunt reprezentative pentru sindromul infecțios investigat trebuie respinse de către laborator. Microbiologul trebuie să sune imediat medicul clinician și să clarifice situația respectivă. Rezultatele obținute de laborator din asemenea probe pot fi înșelătoare și pot duce la diagnostice eronate și la tratamente necorespunzătoare. Medicii clinicieni nu trebuie să ceară laboratorului să raporteze „tot ce crește” sau să solicite investigații microbiologice în lipsa semnelor de infecție (de exemplu: urocultură la pacienții cu sondă urinară asimptomatici, vârf de cateter intravascular în lipsa suspiciunii unui sepsis).

În principiu laboratorul are nevoie de produsul respectiv, nu de tamponul din produsul respectiv.

Prelevatele examinate trebuie să conțină *realul produs patologic*. Distribuția microorganismelor în probele de spută, materii fecale, exsudate de pe suprafața mucoaselor sau din plăgi este neuniformă. Trimiterea la laborator a salivei în loc de spută, a tamponului cu salivă în loc de exsudat din fosele amigdalene, a unor porțiuni nerepresentative dintr-un scaun mucosanguinolent duce la un răspuns inutil din partea laboratorului. Sputa nu este cel mai reprezentativ produs biologic pentru diagnosticul pneumoniei bacteriene. Agentul etiologic este mai probabil izolat din hemocultura, lavaj bronhoalveolar sau aspirat transtraheal.

Criterii de respingere a probelor destinate examinării microbiologice:

- Probe neetichetate sau etichetate greșit
- Probe primite în recipient necorespunzător, distrus sau neetanș
- Probe vizibil contaminate (ex. spută cu resturi alimentare)
- Probe care nu au fost păstrate în condițiile recomandate și/sau transportul a fost întârziat (Ex. urină peste 1 oră la temperatura camerei)
- Probe cu solicitări necorespunzătoare

- Probă în cantitate insuficientă pentru solicitările făcute
- Probă necorespunzătoare pentru cererea de analize microbiologice (de ex. probă transportată în sistem aerob cu solicitare de cultură anaerobi)
- Probă identică cu o altă probă primită în aceeași zi, cu solicitări identice, fără să existe o precizare clară a diferenței dintre ele (excepție hemocultura, cu precizarea că flacoanele recoltate de pe cateter trebuie identificate ca atare).

Probe care aduc informații microbiologice discutabile. Sunt 2 categorii:

A. se solicită în schimb recoltare de țesut sau aspirat din leziune:

- Tampon mucoasa orală sau periodontal
- Tampon leziune decubitus
- Tampon ulcer varicos
- Tampon leziune prin arsură
- Tampon leziune gangrenoasă superficială
- Tampon perirectal

B. probe care nu se prelucrează pentru examinări microbiologice:

- Conținut intestinal
- Lichid de vărsătură
- Vârf cateter Foley
- Material de la colostomă
- Lohii
- Aspirat gastric de la nou-născuți.

Momentul recoltării

Alegerea momentului optim al recoltării presupune cunoașterea evoluției și fiziopatologiei procesului infecțios. Ritmul prelevărilor influențează sensibilitatea diagnosticului și relația cost-beneficiu. De exemplu: sputa recoltată dimineața, prima urină de dimineață, 2-3 seturi de hemoculturi în prima zi de internare.

Recoltarea se face înaintea instituirii tratamentului antimicrobian. Probele obținute sub antibioterapie nu pot fi respinse deoarece uneori antibioticul nu realizează concentrații inhibitorii în focarul infecțios și microorganismul poate fi izolat după ce inoculul a fost diluat în mediul de cultură. Se va menționa pe cererea de examen microbiologic antibioticul administrat. Raportul final eliberat de laborator trebuie să conțină informații referitoare la posibile interferențe.

Recoltare în condiții de asepsie

Trebuie prevenită sau redusă contaminarea probelor cu microbiota indigenă din secreții, exsudate, țesuturi sau organe învecinate.

Se poate recurge la prelevări care șuntează căile naturale de eliminare (aspirat transtraheal sau puncție suprapubiană), care însă sunt tehnici agresive.

Cantitatea recoltată

Probele trebuie prelevate în **cantitate suficientă**, astfel încât să se poată efectua toate examinările necesare.

Recipiente pentru recoltare

Recipientele folosite la recoltare trebuie să fie sterile, de unică utilizare, cu închidere etanșă.

Prelevarea pe tampon este contraindicată pentru izolarea bacteriilor anaerobe.

Recoltarea probelor bioptice sau a aspiratelor din colecții este preferată recoltării pe tampon din următoarele motive:

- tamponul prelevă o cantitate foarte mică de produs, astfel că examinările microbiologice sunt reduse în funcție de cantitatea de material disponibilă
- în cursul prelevării cu tamponul acesta se poate contamina cu flora microbiană din vecinătate din cauza firușoarelor mici de vată
- materialul din tampon poate fi toxic pentru unele bacterii
- în cazul în care prelucrarea probelor este întârziată, bacteriile supraviețuiesc mai bine în proba bioptică sau în aspirat decât pe tampon;

Cererea de analize

Scopul cererii de analize este de a oferi laboratorului informații importante necesare pentru prelucrarea probei și pentru interpretarea rezultatului. De fapt, toată activitatea laboratorului depinde de informațiile cuprinse în cererea de analize. Cu cât informațiile sunt mai puține, cu atât este mai dificilă interpretarea rezultatelor.

Cererea de analize trebuie să conțină:

- numele și prenumele pacientului, vârstă, sex
- codul numeric de identificare a pacientului
- adresa, secție, salon
- informații legate de solicitarea clinicianului
- informații legate de locul anatomic de unde a fost recoltată proba
- data și ora recoltării

Alte informații necesare pentru laborator:

- diagnosticul clinic, date clinice relevante, condiția fiziologică a pacientului (de ex. sarcina), existența unei afecțiuni concomitente, statusul imun, risc de infecție cu un microorganism potențial epidemic

- scopul analizei: diagnosticul etiologic al unei infecții, testarea pentru un microorganism anume, screening pentru colonizare, monitorizarea unui tratament, control după tratament
- date relevante din istoricul pacientului (alimentație, stil de viață, călătorii, etc.)
- proceduri speciale folosite pentru obținerea probei
- tratament cu antibiotice cu precizarea moleculelor/claselor de antibiotic, data și ora ultimei administrări
- marcarea probelor care necesită prelucrare urgentă, în funcție de protocoalele instituției
- precizarea posibilei prezențe a unui agent infecțios cu patogenitate deosebită (*Mycobacterium tuberculosis*, etc.) sau suspiciunea unei etiologii rare sau neobișnuite care ar necesita condiții de cultivare diferite de cele utilizate de rutină.

Atunci când nu există date clinice, microbiologul poate decide să refuze prelucrarea unei probe care nu a fost recoltată printr-o procedură invazivă și dacă pacientul nu se află într-o stare critică.

În situația unei urgențe, atunci când sunt solicitate investigații speciale, clinicianul ar trebui să comunice direct cu microbiologul.

Transport

Probele pentru microbiologie conțin microorganisme vii care se multiplică și mor foarte rapid. Dacă ele se multiplică sau mor în timpul recoltării, transportului sau depozitării, proba respectivă nu mai este reprezentativă pentru procesul infecțios investigat.

Toate probele trebuie să fie transportate cât mai repede la laborator, preferabil în 2 ore de la recoltare. Dacă transportul este întârziat, probele pot fi păstrate numai în condiții specifice. În general depozitarea probelor destinate culturilor bacteriene nu se face mai mult de 24 ore. Virusurile pot fi stabile până la 2-3 zile la 4 °C.

Timpul optim de transport diferă în funcție de cantitatea de probă:

- Cantitățile mici se trimit în 15-30 minute
- Probele biotice pot fi ținute la 24 ore la 25 °C într-un sistem de transport anaerob.

NU se refrigerează: lichidul cefalorahidian, secrețiile genitale, secrețiile oculare, aspiratele din urechea internă, alte probe care ar putea conține microorganisme sensibile la temperaturi joase, bacterii strict anaerobe.

Recipientele trebuie să fie etichetate corect.

Rezultatele diagnosticului bazat pe cultivare sunt influențate de tratamentele antibiotice în curs, care afectează viabilitatea bacteriilor. De asemenea condițiile de transport au un rol important în succesul cultivării.

IV. Metode de diagnostic bazate pe cultivare

Probele se vor lucra în condiții de biosiguranță de nivel 2.

Procedurile de laborator generatoare de aerosoli trebuie efectuate în hotă de siguranță microbiologică (cu flux laminar clasa II A), cu excepția cazului în care este implicat un microorganism din grupul de risc 3 (ex. în cazul manipulării culturilor de *Mycobacterium* spp. sau *Salmonella* Typhi sau *Salmonella* Paratyphi A, B și C) situație în care trebuie utilizate echipamente și proceduri adecvate acestui nivel.

Cultivarea bacteriilor în microbiologia clinică are drept scop:

- Izolarea lor din produsele patologice
- Identificarea
- Testarea sensibilității la antibiotice

La primirea probelor în laborator, microbiologul hotărăște:

- mediile de cultură și metodele de izolare
- atmosfera, temperatura și intervalul de timp de incubare necesare pentru izolarea microorganismelor cu semnificație clinică
- semnificația clinică a izolatelor, algoritmul de identificare.

Pentru fiecare categorie de prelevat se utilizează uzual un mediu sau un set de medii care permit izolarea bacteriilor cel mai frecvent implicate în infecțiile zonei respective. În funcție de datele clinico-epidemiologice, aceste medii pot fi suplimentate.

Identificarea bacteriilor se poate face prin metode convenționale (pe baza caracterelor morfotinctoriale și biochimice, a structurii antigenice și prin testele de patogenitate), însă acestea au putere discriminativă limitată. Se recomandă utilizarea unor sisteme de identificare automatizate sau MALDI-TOF care permit o identificare mai exactă și rapidă a izolatelor.

Testarea sensibilității trebuie făcută numai pe izolate semnificative clinic, nu pe toate microorganismele izolate în cultură.

Se recomandă păstrarea culturilor pure ale izolatelor semnificative cel puțin trei zile după eliberarea rezultatului final în vederea posibilității repetării sau extinderii ulterioare a unor analize.

Tulpinile bacteriene neidentificabile trebuie conservate și trimise pentru identificare la laboratoarele cu capacitate diagnostică mai mare. De asemenea se recomandă păstrarea izolatelor cu fenotip neașteptat, cu fenotip MDR/XDR/PDR sau de importanță epidemiologică (de exemplu cele implicate într-un focar) cel puțin un an.

Conservarea tulpinilor se poate face prin însămânțare în medii agarizate păstrate la frigider timp de câteva săptămâni. Germenii nepretențioși pot fi păstrați în bulion nutritiv cu substanțe crioprotectoare (glicerină 15%) la -20°C. Pentru conservare mai sigură și pe termen lung, inclusiv a bacteriilor pretențioase, se recomandă congelare la temperaturi de sub -70°C.

V. Metode de detectare a antigenelor

Metodele ce detectează antigenele sunt larg utilizate în domeniul microbiologiei. Acestea pot fi utilizate pe parcursul diagnosticului bacteriologic în scopul identificării unui patogen din cultură bacteriană sau ca și metodă de diagnostic rapid direct din produsul biologic.

La baza acestor metode stau reacțiile antigen-anticorp, iar în funcție de modul în care se evidențiază formarea complexului imun (=reacție pozitivă, antigen prezent) pot fi clasificate în:

a. Metode în care complexul imun se vizualizează cu ochiul liber:

- reacția de aglutinare pe lamă utilizată pentru stabilirea serogrupului/serotipului bacterian
- reacțiile de aglutinare pe suport, latexaglutinarea - (ex. identificarea *Staphylococcus aureus*, stabilirea grupelor Lancefield la streptococi, determinarea fenotipului MRSA prin evidențierea prezenței PBP2a la *S. aureus*, identificarea unor patogeni implicați în meningite bacteriene, etc.)

b. Metode în care formarea complexului imun se evidențiază:

- cu ajutorul unei reacții enzimatică (metodele imunoenzimatică efectuate în godeu sau pe membrană)
- cu utilizarea unui anticorp marcat cu fluorocrom și evidențierea fluorescenței din complexul imun format (imunofluorescență)
- pe baza unei reacții chimice (chemiluminiscență).

Aceste metode au performanțe bune, însă necesită aparatură specială. Excepție fac **metodele imunoenzimatică** efectuate pe membrană (metode imunocromatografice), care se pot efectua rapid fără necesitatea unei infrastructuri de laborator. Din aceste considerente sunt utile în diagnosticul rapid al infecțiilor, însă trebuie avută în vedere performanța lor foarte variată în funcție de produs. În general, aceste metode au sensibilitate redusă și specificitate acceptabilă. Astfel, un rezultat pozitiv documentează, pe când un rezultat negativ nu exclude infecția.

Metodele imunocromatografice au multiple aplicații în bacteriologie (determinarea antigenelor de *Streptococcus pyogenes* din secreția faringiană, detectarea antigenelor de *Legionella pneumophila* și *Streptococcus pneumoniae* din urină, detectarea antigenelor de *Campylobacter* spp, *Helicobacter pylori*, a toxinelor de *Clostridioides difficile* din materii fecale, etc.) în diagnosticul parazitologic și virusologic.

VI. Metode bazate pe teste moleculare

Sensibilitatea și specificitatea superioare altor metode de diagnostic, precum și timpul scurt necesar pentru obținerea rezultatelor reprezintă argumentele pentru care tehnicile moleculare și în special cele bazate pe amplificarea acizilor nucleici (PCR) sunt în prezent utilizate pe scară largă în laboratoarele de microbiologie la nivel european. Aceste teste se dezvoltă și se adaptează continuu la necesitățile diagnosticului microbiologic, fiind capabile să ofere simultan și rapid (ore) informații privind prezența unor variați agenți microbieni în diverse probe biologice (diagnostic sindromic), eventual și a unor markeri genetici de rezistență la antimicrobiene. Limitele acestor metode sunt în principal cele determinate de costurile echipamentelor și instruirea personalului specializat, resurse necesare inițial care pot fi recuperate printr-o utilizare cost-eficientă a testelor moleculare.

VII. Raportarea rezultatelor

Rezultatele raportate de laboratorul de microbiologie trebuie să fie exacte, semnificative și relevante din punct de vedere clinic.

VIII. Bibliografie

Buiuc D: Logica microbiologiei clinice. In Buiuc D, Neagu M: Tratat de microbiologie clinică. Ediția a III-a, Editura Medicală, 2017: 2-34.

Miller JM, Miller SA: Communicating Laboratory needs. In Miller JM, Miller SA: A guide to specimen management in clinical microbiology. 3rd edition, ASM Press, 2017:8-11.

Pascual A, Peigue-Lafeuille H: The principles of microbiological work and good laboratory practices. In European Manual of Clinical Microbiology, editors Cornaglia G, Courcol R, Hermann JL, Kahlmeter G, Publisher SFM, 2012:21-28.

Roberts L: Specimen collection and processing. In Mahon CR, Lehman DC, Manuselis G: Textbook of diagnostic microbiology. 5th edition, Saunders Elsevier, 2015:111-120.

Diagnosticul molecular microbiologic

I. Introducere

Tehnicile moleculare și în special cele bazate pe amplificarea acizilor nucleici sunt în prezent utilizate pe scară largă în laboratoarele de microbiologie, atât pentru diagnosticarea și monitorizarea pacienților cu boli infecțioase, cât și în investigațiile epidemiologice. Numeroasele progrese din domeniul amplificării acizilor nucleici, precum automatizarea tehnologiei sau posibilitatea de a detecta simultan mai multe ținte (multiplexare), au creat noi oportunități de dezvoltare a laboratoarelor de microbiologie în direcția obținerii de rezultate relevante clinic într-un timp cât mai scurt.

O prezentare extinsă a numeroaselor și variatelor metode moleculare existente ar depăși scopul acestui ghid, de aceea capitolul de față va prezenta succint principalele metode moleculare și unele aplicații ale acestora utilizate în microbiologia clinică; dintre acestea cele bazate pe amplificarea acizilor nucleici prin PCR (*polymerase chain reaction*) au performanțele cele mai bune și sunt cele mai utilizate în practică.

II. Metode bazate pe detecția acizilor nucleici

Metode fără amplificare

Aceste metode de hibridizare utilizează sonde oligonucleotidice, care sunt secvențe ADN sau ARN marcate cu o enzimă sau o moleculă chemiluminiscentă. Sondele se cuplează prin complementaritate (hibridizează) cu secvențe țintă din genomul microorganismelor căutate; nivelul taxonomic la care se realizează identificarea depinde de secvențele țintă alese de producătorul sondelor. Lungimea sondelor și cuplarea prin complementaritate asigură o specificitate bună, dar lipsa amplificării explică sensibilitatea redusă a truselor bazate pe hibridizarea sondelor nucleotidice. De aceea utilizarea acestor truse este limitată în special la identificarea din cultură (de exemplu pentru micobacterii sau fungi dimorfi) și din acele probe biologice în care numărul microorganismelor este mare (ex. angina streptococică). Hibridizarea sondelor se poate realiza în fază lichidă, solidă sau *in situ*. Hibridizarea *in situ* este un tip de hibridizare în fază solidă în care acizii nucleici țintă se găsesc în celule fixate pe o lamă de microscop (ex. țesut fixat în formol și inclus în parafină).

Sondele de tip *peptide nucleic acid* (PNA) au o structură diferită de sondele ADN prin aceea că este înlocuită “coloana vertebrală” electronegativă a ADN, formată din deoxiriboze unite prin legături fosfodiesterice, cu poliamidă (peptide). Deoarece sondele PNA sunt neutre electric ele hibridizează mai rapid și mai intens comparativ cu sondele ADN. Tehnica PNA-FISH (PNA fluorescent *in situ* hybridization), care utilizează sonde PNA ce recunosc secvențe ARNr, permite identificarea din hemocultura pozitivă a anumitor specii (*S. aureus*, stafilococi coagulazo-negativi, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, specii de *Candida*) cu ajutorul unui microscop cu fluorescență.

Metode cu amplificare

Au o sensibilitate analitică mai bună comparativ cu metodele fără amplificare. Metoda de amplificare prin PCR a acizilor nucleici are performanțele cele mai bune și de aceea este cea mai utilizată, dar există și alte categorii de metode, precum amplificarea semnalului sau amplificarea izotermă a acizilor nucleici.

Metode bazate pe amplificarea semnalului

Atașarea pe secvența țintă a unui număr crescut de molecule marcate (deci amplificarea semnalului emis) explică de ce aceste metode au o sensibilitate analitică mai bună comparativ cu metodele fără amplificare. Aceste metode nu realizează amplificarea enzimatică a secvențelor țintă, de aceea sunt mai puțin afectate de prezența unor inhibitori în proba biologică. De asemenea pot detecta direct ARN, fără a fi necesară etapa intermediară de sinteza a ADN-ului complementar.

Metoda cu ADN ramificat (branched DNA, bDNA)

Metoda constă într-o hibridizare în fază solidă de tip sandwich, care include molecule cu rol de amplificare a semnalului. Acestea sunt molecule de ADN ramificat (cu până la 15 ramuri identice) care se cuplează cu sondele oligonucleotidice specifice secvențelor țintă și vor fixa la rândul lor mai multe sonde marcate enzimatic (câte trei pentru fiecare ramură), astfel fiind amplificat semnalul. Există truse comerciale bazate pe metoda bDNA pentru cuantificarea HIV, HBV, HCV.

Hybrid Capture

În această metodă ADN-ul țintă din proba biologică este denaturat, apoi este hibridizat cu sonde ARN specifice. Moleculele hibrid ADN-ARN sunt captate de anticorpi antihibrid fixați pe un suport solid și vor cupla la rândul lor anticorpi antihibrid marcați enzimatic. Deoarece fiecare hibrid poate cupla mai mulți anticorpi marcați are loc amplificarea semnalului. Truse comerciale care se bazează pe această metodă se folosesc pentru detecția HPV, *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis* în probe biologice.

Metode bazate pe amplificarea țintei

Aceste tehnici se bazează pe procese mediate enzimatic prin care se sintetizează un număr foarte mare de copii ale unei anumite regiuni din acidul nucleic țintă. Pentru inițierea sintezei sunt necesari primeri (secvențe oligonucleotidice) care recunosc și se cuplează prin complementaritate cu anumite secvențe de pe fiecare dintre cele două catene ADN. În cursul unui ciclu de sinteză se obțin copii ale regiunii țintă, care pot deveni matrice pentru noi sinteze în următoarele cicluri. După 1-3 ore, timp în care are loc repetarea de zeci de ori a ciclurilor de sinteză, se obțin zeci de milioane până la miliarde de copii ale regiunii țintă. Această amplificare exponențială a țintei explică sensibilitatea crescută a acestor tehnici comparativ cu celelalte metode moleculare, dar și unul dintre principalele riscuri ale acestor tehnici: contaminarea cu produși de amplificare și obținerea de rezultate fals-pozitive. Acest risc potențial de contaminare poate fi redus și trebuie permanent ținut sub control prin măsuri specifice, care încep cu modul de organizare a laboratorului și continuă cu respectarea anumitor circuite și proceduri (vezi 3.1).

Reacția de amplificare PCR (Polymerase chain reaction)

Tehnica PCR este o metodă termo-enzimatică prin care se realizează sinteza repetitivă de copii ale unei regiuni din ADN-ul țintă folosind ADN-polimeraza. În forma sa cea mai simplă această tehnică, realizată cu ajutorul unui aparat PCR, constă în denaturarea inițială a amestecului de reacție, urmată de realizarea unui număr de cicluri PCR (obișnuit 30-40). Un ciclu PCR cuprinde trei etape: denaturarea, hibridizarea primerilor și elongarea. În cursul denaturării amestecul de reacție este încălzit pentru a separa cele două catene ADN, fiecare dintre acestea fiind utilizată ca matriță în etapele următoare. Amestecul este apoi răcit până la temperatura la care se realizează cuplarea primerilor cu secvențe specifice din cele două catene. În a treia etapă amestecul este adus la temperatura optimă pentru activitatea ADN-polimerazei, enzimă care va realiza extensia primerilor și sinteza unei noi catene, complementare catenei inițiale. Atât catenele nou sintetizate cât și ADN-ul inițial pot servi ca matriță pentru sinteză în ciclurile următoare. La sfârșitul fiecărui ciclu PCR se dublează (teoretic) numărul produșilor de amplificare, astfel încât după n cicluri se obține o amplificare de 2^n . Întregul proces este desfășurat într-un aparat PCR, care asigură cu precizie temperatura și durata fiecărui segment din ciclu, precum și numărul de cicluri.

Ideal după 30 cicluri apare o amplificare de 2^{30} , adică de aproximativ 10^9 ori a regiunii țintă. Practic eficiența amplificării poate fi redusă din cauza unor condiții de reacție suboptimale sau prezenței unor substanțe cu efect de inhibare a reacției. Această ultimă situație, care ar putea duce la rezultate fals-negative, trebuie permanent monitorizată și ținută sub control prin respectarea unor proceduri specifice în etapele de extracție și amplificare a acizilor nucleici (vezi 3.2).

Detecția produșilor de amplificare poate avea loc după terminarea PCR (end-point PCR) sau în timpul amplificării (real-time PCR).

Revers-transcriere PCR

Tehnica PCR permite amplificarea unei ținte ADN. Dacă ținta este ARN este nevoie de revers-transcriere PCR (RT-PCR), metoda care are o etapă inițială de revers-transcriere a ARN țintă în ADN complementar (ADNc), urmată de amplificarea prin PCR a acestui ADNc. Aceste etape pot avea loc consecutiv, în același tub de reacție, sau independent (în reacții separate).

Nested PCR

Constă în două runde de PCR și două perechi de primeri. În prima rundă se utilizează o pereche de primeri și 15-30 cicluri de amplificare, iar în a doua rundă a doua pereche de primeri recunoaște o secvență din interiorul produșilor de amplificare obținuți în prima rundă, astfel fiind obținute creșterea sensibilității și specificității PCR.

Multiplex PCR

Se folosește pentru amplificarea simultană a mai multor secvențe țintă în același tub de reacție. Necesită utilizarea unor perechi de primeri atent selecționați, astfel încât aceștia să aibă aceeași temperatură de hibridizare și să nu fie complementari. Numărul de ținte care pot fi identificate prin același test variază (de la 3 la peste 20), în special în funcție de metoda de detecție a produșilor de amplificare. În practică testele bazate pe multiplex PCR se utilizează frecvent în diagnosticul unor sindroame (de exemplu în infecții ale sistemului nervos, respiratorii sau

digestive) deoarece permit identificarea rapidă și simultană a mai multor microorganisme, eventual și a unor factori de patogenitate sau markeri de rezistență la antibiotice direct din probe biologice.

Real-time PCR

În tehnica real-time PCR detecția produșilor de amplificare este realizată în timp real, în fiecare ciclu. Acest fapt este posibil deoarece produșii de amplificare generați se cuplează (direct sau indirect) cu fluorocromi care vor emite o fluorescență specifică. Tehnica necesită echipamente speciale (de real-time PCR) care față de echipamentele PCR au în plus un modul optic (care măsoară cu precizie intensitatea emisiei fluorescente în momente precis definite pentru fiecare reacție), precum și un software care transformă aceste semnale în informații privind cinetica fiecărei reacții. Curba de amplificare este un grafic al intensității fluorescenței în funcție de timp (ciclu), un parametru util fiind ciclul prag (Cycle threshold, Ct), adică acel ciclu la care intensitatea fluorescenței depășește un anumit nivel prag (adică există o creștere semnificativă a fluorescenței). În cazul testelor calitative depășirea acestui prag corespunde detectării țintei (rezultatul se exprimă ca: țintă detectată). În cazul testelor cantitative este necesară compararea valorii Ct pentru probă cu valorile Ct ale unor standarde de concentrații cunoscute, intensitatea fluorescenței emise fiind direct proporțională cu numărul de copii ale regiunii țintă.

În formatul cel mai simplu al real-time PCR produșii de amplificare sunt detectați pe măsură ce se formează datorită cuplării acestora cu un colorant fluorescent (de exemplu SYBR green), cu afinitate pentru ADN dublu catenar (ADN d.c.). Fluorescența emisă de fluorocromul cuplat fiind mult mai mare decât cea a fluorocromului liber, intensitatea fluorescenței este direct proporțională cu numărul produșilor PCR. Deoarece SYBR green are afinitate pentru orice moleculă ADN d.c. (de exemplu produși de amplificare specifici, produși nespecifici, dimeri de primeri) specificitatea acestui format de real-time PCR poate fi afectată; creșterea specificității se poate obține prin analize suplimentare (de exemplu analiza corelației dintre intensitatea fluorescenței și temperatură – melting curve). Acest tip de detecție nu poate fi folosit pentru teste multiplex.

Specificitatea real-time PCR poate fi crescută prin adăugarea în amestecul de reacție a unor sonde oligonucleotidice. Fiecare sondă recunoaște specific o anumită regiune dintr-un produs de amplificare și este marcată cu un anumit fluorocrom, creșterea fluorescenței emise de acel fluorocrom fiind un indicator al generării produsului de amplificare. Detecția simultană a mai multor produși real-time PCR este posibilă dacă se utilizează sonde specifice fiecărui produs și fiecare sondă este marcată cu alt fluorocrom, acest format real-time PCR fiind utilizat de unele teste multiplex. Există mai multe tipuri de sonde, dar descrierea caracteristicilor lor depășește scopul acestui ghid.

Tehnica real-time PCR prezintă numeroase avantaje. Deoarece amplificarea și detecția au loc în același tub închis, nu este nevoie de etape post-PCR, deci timpul este mai redus și se elimină riscul de contaminare cu produși PCR. Real-time PCR are o sensibilitate crescută comparativ cu end-point PCR și permite o cuantificare exactă a concentrației inițiale a țintei, deoarece măsoară produșii în faza exponențială a amplificării. Testele multiplex sunt uneori de tip real-time PCR, dar suprapunerea spectrelor de emisie ale fluorocromilor limitează capacitatea de multiplexare (numărul de ținte) de obicei la patru.

Alte metode bazate pe amplificarea țintei

Metode bazate pe transcriere

Aceste metode au în comun amplificarea izotermă a ARN prin următoarele etape mediate enzimatic: revers-transcrierea ARN, formarea unui hibrid ARN-ADNc, degradarea catenei originale de ARN, generarea de ADN d.c., utilizarea ADNc ca matriță pentru generarea multor copii ARN, produși care la rândul lor pot reintra în ciclul de amplificare. Aceste metode izoterme au avantajul că nu necesită echipamente PCR. Exemple din această categorie de metode sunt NASBA (nucleic acid sequence-based amplification) și TMA (transcription-mediated amplification).

Amplificarea în buclă (loop mediated amplification, LAMP) este o metodă izotermă de amplificare prin care se creează molecule de ADN cu multiple bucle ce conțin repetări ale secvenței țintă. Detecția produșilor de amplificare se poate face în timp real prin măsurarea turbidității în tubul de reacție. Principalul avantaj al acestei metode este acela că nu necesită echipamente complexe, ci poate fi utilizată cu echipamente simple, în condiții de teren. Totuși această metodă are performanțe mai reduse comparativ cu alte metode și de aceea este puțin utilizată în practică.

Detecția și analiza produșilor de amplificare

Detecția și analiza produșilor de amplificare se pot face pe măsură ce produșii se generează (real-time PCR) sau după etapa de amplificare (detecție post-PCR). Există mai multe metode pentru detecția post-PCR a produșilor de amplificare: electroforeză în gel de agaroză, hibridizare cu sonde cu specificitate alelică, secvențiere, hibridizare cu sonde fixate pe microarray (de densitate mică sau moderată).

Electroforeza în gel

Vizualizarea produșilor de amplificare după separare electroforetică și marcarea cu bromură de etidiu a fost prima metodă de detecție și este încă utilizată în unele tehnici. În prezent există și metode automate de evidențiere a produșilor prin electroforeză.

Analiza fragmentelor de restricție (restriction fragment length polymorphism, RFLP) este utilizată în cazul unor investigații epidemiologice și constă în scindarea cu endonucleaze de restricție a produșilor de amplificare, urmată de separarea fragmentelor prin electroforeză și analiza acestora.

Hibridizarea cu sonde cu specificitate alelică

În această tehnică (Line probe assay, LIPA) sonde oligonucleotidice atașate pe stripuri imobilizează produși PCR marcați cu biotină. Deoarece această reacție se desfășoară în condiții stringente, sondele hibridizează doar produșii cu secvență perfect complementară, putând discrimina polimorfisme la nivelul unui singur nucleotid. Etapele ulterioare hibridizării permit vizualizarea produșilor imobilizați și oferă informații despre secvența acestora.

Truse comerciale care utilizează această tehnică se folosesc pentru genotiparea HCV, HPV, HBV, pentru identificarea micobacteriilor și pentru identificarea mutațiilor de rezistență la HBV sau la *Mycobacterium tuberculosis*.

Secvențierea acizilor nucleici

Determinarea unei anumite secvențe ADN dintr-o probă clinică poate fi necesară în scop diagnostic sau epidemiologic și se poate realiza prin PCR și secvențierea produsilor prin metoda Sanger. Această metodă constă în generarea unor fragmente ADN de mărimi diferite, datorită încorporării aleatorii de către ADN-polimerază a unor dideoxinucleotid e (ddNTP) care vor bloca elongarea catenei (dideoxynucleotide chain termination). Aceste fragmente marcate fluorescent sunt apoi separate prin electroforeză capilară, trec printr-un fascicul laser, iar înregistrarea fluorescenței corespunzătoare fiecărui ddNTP și procesarea digitală a acestor semnale oferă informații despre secvența ADN. Secvențierea automată Sanger generează secvențe de calitate pentru regiuni de până la 800 perechi de baze (bp). Pentru secvențierea unei regiuni mai lungi sunt necesare amplificarea separată a mai multor segmente din acea regiune, secvențierea fiecărui segment în parte și asamblarea citirilor.

Secvențierea de nouă generație permite caracterizarea unor regiuni mai largi (până la mărirea întregului genom microbial) și poate fi aplicată în multiple domenii: identificare microbială, identificarea unor variante asociate cu patogenitate crescută sau cu mutații de rezistență, detecția unor mutații rare într-o populație microbială, studierea microbiotei, caracterizarea filogenetică în cursul unor investigații de epidemiologie moleculară și altele. Există mai multe platforme pentru secvențierea de nouă generație (Illumina, Ion Torrent, Nanopore etc.) dar descrierea lor depășește scopul acestui ghid.

III. Cerințe specifice laboratorului de diagnostic molecular

Laboratoarele clinice care vor să utilizeze tehnici de diagnostic molecular trebuie să respecte cerințe specifice acestui tip de diagnostic. Aceste cerințe urmăresc în principal prevenirea și controlul contaminării cu acizi nucleici, risc care decurge din sensibilitatea analitică foarte mare a metodelor de amplificare a țintei. Aceste cerințe specifice se regăsesc în fiecare dintre etapele diagnosticului: preanalitică (recoltare, stocare, procesare primară a probelor), analitică (procoloale de lucru, asigurarea calității) și post analitică (interpretarea rezultatelor, manipularea deșeurilor). O altă cerință specifică laboratorului de diagnostic molecular este prevenirea contactului acizilor nucleici țintă cu enzime care îi pot degrada (DNAze sau RNAze). Aceste cerințe impun măsuri specifice diagnosticului molecular, precum organizarea activității în mai multe etape și zone distincte, respectarea fluxului unidirecțional de activitate, respectarea strictă a unor procoloale de lucru, utilizarea de materiale de unică folosință și de reactivi certificați pentru diagnostic molecular (molecular biology grade), adică reactivi care sunt certificați că nu conțin ADN, ARN, DNAze, RNAze.

Respectarea cerințelor privind recoltarea, transportul, stocarea și procesarea primară a probelor reprezintă o condiție pentru obținerea unor rezultate de calitate. Menținerea integrității acizilor nucleici pe parcursul acestor etape depinde de mai mulți factori, cum ar fi tipul de probă, tipul de țintă, temperatura și durata stocării probei.

În prima etapă analitică se realizează extracția acizilor nucleici. Această etapă se poate realiza automat sau manual și are ca obiective eliberarea acizilor nucleici din microorganism, purificarea acestora și îndepărtarea substanțelor cu efect inhibitor din proba biologică, cu menținerea integrității acizilor nucleici și uneori concentrarea lor. Există numeroase procoloale de extracție, care diferă în funcție de tipul probei, tipul acidului nucleic țintă, performanțele purificării,

echipamentele necesare, costuri. Indiferent de metoda aleasă laboratorul trebuie să monitorizeze prin controale specifice menținerea integrității acizilor nucleici țintă și îndepărtarea inhibitorilor în cursul acestei etape.

Prevenirea și controlul contaminării în laboratorul de diagnostic molecular

Personalul din laboratoarele de microbiologie se preocupă în mod constant de prevenirea contaminării în cursul manipulării probelor și culturilor. Diagnosticul molecular impune un grad considerabil mai ridicat de precauție, deoarece chiar contaminări de nivel jos, care nu vor fi detectate prin metode fenotipice, pot duce la rezultate fals-pozitive prin tehnici moleculare. Contaminarea poate avea loc în oricare dintre etapele diagnosticului molecular și poate fi de mai multe tipuri: contaminarea probei în etapa preanalitică (de exemplu contaminarea cu altă probă sau cu elemente de mediu printr-un mod inadecvat de recoltare și procesare), contaminarea în cursul etapei de extracție (cu altă probă, cu control pozitiv sau cu produși de amplificare) sau, dacă este cazul, a celei post-PCR (cu produși de amplificare).

Prevenirea contaminării cu ADN sau ARN din probe se realizează printr-un set de măsuri care includ: manipularea flacoanelor și tuburilor într-un mod care previne formarea de aerosoli, centrifugarea ușoară înainte de deschiderea unui tub, deschiderea pe rând doar a câte unui singur tub, decontaminarea riguroasă a suprafețelor de lucru, utilizarea de cabinete de siguranță microbiologică, utilizarea vârfurilor cu filtru pentru transferuri lichidiene.

Prevenirea contaminării cu produși de amplificare se realizează prin organizarea etapelor de lucru în arii distincte independente (preamplificare, amplificare, postamplificare), cu respectarea fluxului unidirecțional de activitate, respectarea strictă a unor protocoale de lucru. Uneori la acestea se adaugă inactivarea produșilor de amplificare prin metode fotochimice sau enzimatică (de exemplu cu uracil-N glicozilază, UNG). Aceste precauții sunt deosebit de importante mai ales în laboratoarele care realizează analiză post-PCR (de exemplu electroforeză sau secvențiere).

Monitorizarea contaminării în cursul etapelor de extracție, pregătire a reactivilor PCR, amplificare - detecție este obligatorie și se realizează în principal prin includerea în fiecare rundă de testare a cel puțin unui control negativ.

Asigurarea calității rezultatelor

Asigurarea calității rezultatelor este obligatorie în diagnosticul molecular.

Control/controale negative

Monitorizarea contaminării în cursul etapelor de extracție, pregătire a reactivilor PCR, amplificare - detecție se realizează obligatoriu în fiecare rundă de testare prin includerea a cel puțin unui control negativ, care va fi testat ca o probă obișnuită. Controlul negativ trebuie inclus indiferent dacă extracția și pregătirea reactivilor se fac automat sau manual și indiferent dacă metoda este comercială sau validată de laborator (in-house). Detecția amplificării țintei în controlul negativ invalidează toate rezultatele din acea rundă și impune adoptarea unor măsuri riguroase de prevenire a contaminării. În cazul metodelor manuale este posibilă utilizarea unor controale distincte doar pentru etapa de PCR (no template control, NTC) sau și pentru cea de extracție (control negativ cu matrice similară cu probele dar fără acidul nucleic țintă). În cazul metodelor

de tip point-of-care (POC), care permit testarea unei singure probe clinice, este necesară testarea periodică a unui control negativ.

Control/controale pozitive

Controlul pozitiv atestă că testul poate detecta ținta în condițiile stabilite de producător, deci verifică etapele de extracție, amplificare - detecție. În cazul testelor calitative este obligatorie includerea în fiecare rundă de testare a unui control pozitiv, indiferent dacă extracția și pregătirea reactivilor se fac automat sau manual și indiferent dacă metoda este comercială sau validată de laborator (in-house). Lipsa amplificării controlului pozitiv invalidează toate rezultatele din acea rundă. În cazul testelor cantitative este obligatorie utilizarea a minim două controale pozitive, de concentrații diferite (de nivel jos și de nivel înalt). În cazul metodelor manuale este posibilă utilizarea unor controale distincte doar pentru etapa de PCR (secvența ADN țintă) sau și pentru cea de extracție (control pozitiv cu matrice similară cu probele și cu secvența țintă la o concentrație cunoscută). Un control pozitiv este de obicei inclus în componența majorității truselor comerciale. În caz contrar sunt disponibile materiale de referință și control comerciale corespunzătoare țintei pentru majoritatea microorganismelor de interes medical.

Control intern

Degradarea acizilor nucleici țintă în cursul etapei de extracție poate duce la rezultate fals negative. De asemenea, prezența inhibitorilor în probă la sfârșitul etapei de extracție poate determina inhibarea PCR și obținerea de rezultate fals negative. Există mai multe metode pentru monitorizarea inhibării amplificării, cea mai folosită fiind utilizarea unui control intern în fiecare probă. Acest control intern este de același tip cu ținta (ADN sau ARN) și este introdus în reacție de la începutul etapei de extracție. În unele truse comerciale controlul intern utilizează aceeași pereche de primeri cu ținta dar este detectat diferit, în alte truse controlul intern are o secvență diferită și este recunoscut de primeri diferiți.

Interpretarea și raportarea rezultatelor

Interpretarea rezultatelor testelor moleculare necesită cunoașterea caracteristicilor și limitelor acestor tehnici și diferă de interpretarea testelor convenționale de diagnostic microbiologic.

Interpretarea absenței produșilor de amplificare (rezultat negativ) trebuie să aibă în vedere momentul recoltării, calitatea probei, sensibilitatea testului, eficiența extracției acizilor nucleici și eficiența amplificării țintei. Deficiențe privind oricare dintre acești factori pot să determine rezultate fals negative, de aceea măsuri de monitorizare și control a acestor factori trebuie aplicate constant. Variația secvenței țintă (de exemplu prin mutații, deleții etc.), poate afecta cuplarea primerilor sau probelor, fiind o altă sursă posibilă de rezultate fals-negative.

Interpretarea prezenței produșilor de amplificare (rezultat pozitiv) trebuie să țină cont de specificitatea testului și de riscul contaminării. Specificitatea testului depinde de condițiile de reacție și de primerii și sondele utilizate pentru amplificare, respectiv detecție. Dacă primerii sau sondele pot interacționa cu secvențe ale altor microorganisme este posibilă obținerea unui rezultat fals pozitiv. O altă cauză de rezultat fals pozitiv este contaminarea, care poate să survină în oricare etapă, de la recoltarea probei până la repartizarea eluatului obținut în urma extracției (vezi 3.1. și 3.2). În cazul testelor multiplex interpretarea trebuie să țină cont de numărul de ținte potențial

detectabile dar și de sensibilitatea testului pentru fiecare țintă. Detecția simultană a două sau mai multe microorganisme (codetecția) nu semnifică obligatoriu coinfecție, deoarece prezența anumitor microorganisme în proba clinică poate fi consecința altor factori, ca de exemplu contaminare sau infecție latentă. Testele multiplex care includ între țintele detectabile și unii markeri de rezistență trebuie interpretate având în vedere mai multe aspecte. De exemplu în unele situații mai multe mecanisme pot fi responsabile de rezistența fenotipică, de aceea lipsa detecției unui singur marker nu corespunde obligatoriu cu sensibilitatea fenotipică. După cum nici prezența genelor pentru un mecanism de rezistență nu semnifică neapărat rezistență, ci doar prezența acelui mecanism cu riscurile epidemiologice respective.

Evaluarea performanțelor analitice ale unui test depinde și de performanțele testului de referință. Testele moleculare au de multe ori o sensibilitate superioară testelor bazate pe cultivare, ceea ce determină ca un rezultat pozitiv la un test molecular să fie interpretat în mod discutabil fals pozitiv dacă testul bazat pe cultivare, considerat ca referință, este negativ. În această situație se recomandă ca referința să fie un set extins de criterii care să includă și date clinice, imagistice sau un alt test molecular.

Detecția secvenței țintă nu depinde de viabilitatea microorganismului de la care provine acea secvență. Aceasta reprezintă un avantaj în stabilirea diagnosticului la pacienți pretratați, la care metodele bazate pe cultivare eșuează dar acidul nucleic microbial persistă și în consecință poate fi detectat un anumit timp după începerea tratamentului adecvat. Persistența acidului nucleic microbial provenit de la microorganisme neviabile poate reprezenta un dezavantaj al utilizării testelor moleculare calitative în evaluarea răspunsului la tratament în infecțiile acute. Însă în unele infecții virale cronice (produse de HIV, HBV, HCV, CMV) testele moleculare cantitative reprezintă metoda de referință pentru monitorizarea răspunsului la tratamentul specific.

Raportarea rezultatelor testelor calitative este în general simplă, rezultatul fiind de obicei „ADN (sau după caz, ARN) detectat sau nedetectat”. Alte informații care pot fi raportate sunt genele țintă, metoda utilizată, limita de detecție. Raportarea rezultatelor testelor cantitative este mai complexă și necesită explicarea mai multor parametri. Rezultatele testelor cantitative se pot exprima în unități de măsură (unități internaționale, copii sau ng), raportate la un parametru definit (mililitru plasmă sau sânge, gram de țesut, număr de leucocite). Valorile încărcăturii virale pot fi raportate în numere întregi și/ sau transformate în \log_{10} . Rezultatele exprimate în \log_{10} permit aprecierea mai bună a variațiilor semnificative clinic ale concentrației microorganismelor. Alți parametri care definesc testele cantitative sunt: domeniul de măsurare lineară, limita inferioară de cuantificare, limita superioară de cuantificare, limita de detecție. În cazul unor valori superioare limitei de detecție și mai mici decât limita inferioară de cuantificare rezultatul raportat trebuie să fie „detectat, < limita inferioară de cuantificare”. În raport trebuie de asemenea specificate tipul de probă și metoda de amplificare, deoarece rezultatele obținute prin metode diferite pot să nu fie similare, fiind necesară aplicarea unui factor de corecție.

IV. Metode bazate pe detecția proteinelor

Identificarea și caracterizarea microorganismelor pe baza detecției unor proteine specifice prin spectrometrie de masă (MS) constituie un progres important în dezvoltarea microbiologiei clinice. Spectrometria de masă (MS) este o tehnologie care măsoară două proprietăți ale unui analit: masa moleculară (m) și sarcina electrică (z). Un spectrometru de masă are trei componente:

sursa de ioni (transformă analitul în ioni), analizorul de ioni (separă ionii în funcție de comportamentul lor diferit într-un câmp electric, deci în funcție de raportul m/z) și detectorul de ioni (măsoară numărul ionilor cu același m/z). Se obține un spectru de mase, care se compară digital cu spectrele dintr-o bază de date, astfel fiind realizată identificarea.

Analiza proteinelor (predominant ribozomale) prin MALDI-TOF, adică ionizarea prin MALDI (matrix-assisted laser desorption ionization) și diferențierea prin TOF (time-of-flight), este din ce în ce mai utilizată în laboratoarele de microbiologie, deoarece permite identificarea rapidă a bacteriilor sau fungilor izolați în cultură. Principalele avantaje ale acestei metode sunt durata mult mai redusă (minute) comparativ cu metodele convenționale, posibilitatea identificării din cultura primară, cost/test redus, procedură simplă, existența unor protocoale standardizate și a unor truse disponibile comercial. În afara necesității achiziționării unui echipament MALDI-TOF și a modulelor software necesare pentru interpretare, principalele limite sunt necesitatea testării bacteriilor izolate în cultură pură ($>10^5$ UFC/ml), lipsa unor protocoale standardizate pentru anumite aplicații, dificultatea diferențierii unor genuri înrudite (de exemplu *Escherichia* și *Shigella*). Identificarea se poate face la nivel de familie, gen sau specie, în funcție de scorul calculat, adică de gradul de similitudine dintre spectrul obținut în urma analizei și spectrele din baza de date.

Metode care utilizează MALDI-TOF pentru detecția rezistenței la antibiotice sunt descrise în literatură și progresa rapid, chiar dacă protocoalele de lucru nu sunt încă standardizate. Există trei strategii principale de detecție a rezistenței prin MALDI-TOF: măsurarea modificărilor antibioticului ca rezultat al acțiunii enzimelor bacteriene, detecția proteinelor bacteriene asociate rezistenței și evaluarea semicantitativă a multiplicării bacteriene în prezența antibioticului. Prima strategie este folosită pentru detecția acțiunii β -lactamazelor (inclusiv ESBL sau carbapenemaze), a unor enzime implicate în rezistența enterobacteriilor la fluorochinolone sau în rezistența la aminoglicozide atât la Gram pozitivi cât și la Gram negativi, iar a doua poate fi utilă pentru detecția metilino-rezistenței, a β -lactamazelor, a porinelor. Folosite cu precauție aceste metode bazate pe MALDI-TOF pot să ofere rapid la un cost scăzut informații preliminare utile.

V. Bibliografie

1. Herrmann JL, Poljak M - Molecular methods in microbiology in *European Manual Of Clinical Microbiology*, 1st edition, 2012
2. Nolte F S. Molecular Microbiology - in *Manual of Clinical Microbiology*, 11th Edition, Edited by Jorgensen JH et al., Wiley 2015 <https://doi.org/10.1128/9781555817381.ch6>

Testarea sensibilității la antibiotice

I. Scopul documentului

Acest document descrie metodele de rutină pentru testarea sensibilității la antibiotice a bacteriilor izolate în mod uzual în laboratoarele clinice. Metoda de testare recomandată prin acest ghid național este metoda difuzimetrică EUCAST (EUCAST disk diffusion method).

Pentru metoda diluțiilor, metoda gradient și metoda punctelor de ruptură se vor urma indicațiile din insert-ul testelor comerciale utilizate.

II. Introducere

Testarea sensibilității bacteriilor față de antibiotice reprezintă un obiectiv esențial în diagnosticul microbiologic. Această testare se poate realiza prin metoda difuzimetrică, metode cantitative (metoda microdiluțiilor, teste gradient) și prin metode moleculare.

Metoda difuzimetrică este una dintre cele mai vechi abordări ale testării sensibilității la antibiotice și rămâne una dintre cele mai larg folosite metode pentru testarea de rutină a sensibilității la antibiotice în laboratoarele clinice. Este potrivită pentru testarea majorității patogenilor bacterieni, incluzând cele mai comune bacterii pretențioase, este versatilă din punct de vedere al numărului agenților antimicrobieni ce pot fi testați și nu necesită echipament special.

Punctele de ruptură ale diametrelor zonelor de inhibiție utilizate în cadrul metodei EUCAST sunt calibrate și armonizate cu punctele europene de ruptură ale CMI publicate de EUCAST și sunt disponibile gratuit pe pagina web a EUCAST (https://www.eucast.org/clinical_breakpoints/).

Ca pentru orice metodă standardizată, tehnica descrisă trebuie respectată fără excepții pentru a obține rezultate fiabile.

Metodele cantitative permit determinarea concentrației minime inhibitorii. Pentru unele bacterii sau antibiotice metoda microdiluțiilor reprezintă singura metodă acceptabilă (de ex. testarea sensibilității față de colistin, testarea *Streptococcus pneumoniae* față de penicilină).

Metodele moleculare detectează prezența unor markeri genetici asociați rezistenței și pot fi teste preliminare sau complementare testelor fenotipice.

III. Definirea noțiunilor utilizate în standardul EUCAST

Categoriile de sensibilitate

Sensibil la doze standard: un microorganism este clasificat ca ”sensibil, regim de dozare standard” atunci când există o probabilitate mare de succes terapeutic folosind un regim de dozare standard al antibioticului.

Sensibil, expunere crescută (vechea categorie intermediară): un microorganism este încadrat ”Sensibil, expunere crescută” când există o mare probabilitate de succes terapeutic dacă expunerea la antibiotic este crescută prin ajustarea regimului de dozare sau prin concentrarea antibioticului la locul infecției. Expunerea se referă la felul în care modul de administrare, doza, intervalul de dozare, timpul de perfuzie, precum și distribuția, metabolismul și excreția agentului antimicrobian influențează microorganismul infectant la locul infecției. Pe buletinul de analize se va adăuga comentariul referitor la doze (vezi tabelele VII-XVIII din subcapitolul XII *Comentarii privind fenotipurile de rezistență, dozele de antibiotice recomandate, rezistențele naturale și posibilități de extrapolare a rezultatelor*).

Diferența dintre categoria de ”Sensibil, doză standard” și ”Sensibil, expunere crescută” constă în cantitatea de antibiotic de la locul infecției. În acest scop este important de specificat dozele corespunzătoare categoriei ”Sensibil, expunere crescută”, deoarece în lipsa unei înțelegeri temeinice a schimbării semnificației simbolului ”I” există riscul evitării utilizării antibioticelor care se încadrează în această categorie și astfel restrângerea opțiunilor terapeutice.

Rezistent: un microorganism este încadrat *Rezistent* când există o probabilitate mare de eșec terapeutic chiar și atunci când există o expunere crescută.

Zonele de incertitudine tehnică (area of technical uncertainty - ATU)

Zonele de incertitudine tehnică reprezintă avertizare pentru laborator cu privire la incertitudinea rezultatului. ATU sunt listate în tabelele EUCAST și sunt definite de valoare CMI sau de un diametru.

Laboratorul trebuie să își definească o strategie cu privire la atitudinea față de ATU.

Pot fi luate următoarele măsuri în cazul ATU:

- Se repetă testul - numai dacă se suspectează o eroare tehnică
- Se efectuează un test alternativ (CMI, PCR, test pentru a determina mecanismul de rezistență) – acest lucru este relevant atunci când testul alternativ este concludent (PCR pentru a detecta o genă *vanA* sau *vanB* la enterococi, un test *Bla* la *H. influenzae*)
- Se modifică categoria de susceptibilitate: din S în I, din I în R sau S în R
- Rezultatul se raportează ca „incert” – acest lucru poate fi realizat lăsând interpretarea necompletată + comentariu. Sau aplicarea unui asterix (în loc de un S, I sau R) care se referă la un comentariu care explică incertitudinea
- Se raportează rezultatele „R”. Dacă există mai multe alternative pentru terapie pe antibiogramă, aceasta poate fi cea mai ușoară și mai sigură opțiune.
- Se discută rezultatele cu medicul clinician

IV. Prepararea și depozitarea mediilor

Agarul Mueller-Hinton (MH) se prepară în conformitate cu indicațiile producătorului, cu suplimente pentru microorganismele pretențioase indicate în documentele disponibile pe www.eucast.org. Prepararea și adăugarea suplimentelor sunt descrise în detaliu pe pagina web https://www.eucast.org/ast_of_bacteria/media_preparation/.

Mediul trebuie să aibă o înălțime de $4 \pm 0,5$ mm (aproximativ 25 mL într-o placă circulară cu diametrul de 90 mm, 31 mL într-o placă circulară de 100 mm, 71 mL într-o placă circulară cu

diametrul de a 150 mm, 40 mL într-o placă pătrată cu latura de 100 mm). Volumul trebuie calculat corect în raport cu dimensiunile plăcii Petri utilizate. Dimensiunile plăcii pot varia în funcție de producător.

Pentru plăcile cu agar disponibile comercial sau preparate "in house", depozitate în pungi de plastic sau în containere ermetice, poate fi necesară uscarea plăcilor înainte de utilizare. Această precauție este necesară pentru evitarea umidității excesive, care poate avea ca efect apariția unor zone de inhibiție difuze sau a unui vâl în interiorul zonelor de inhibiție.

Suprafața agarului trebuie să fie uscată înainte de utilizare. Nu trebuie să se observe picături de apă pe suprafață, sau în interior, pe capac. Plăcile se usucă la 20-25°C peste noapte, sau la 35°C, înlăturând capacul timp de 15 minute. Plăcile nu vor fi uscate prea mult.

Plăcile preparate "in house" se depozitează la 4-8°C.

Pentru plăcile preparate "in house", uscarea plăcilor, condițiile de depozitare și păstrare trebuie incluse în programul laboratorului de asigurare a calității.

Plăcile preparate după cerințele comerciale trebuie depozitate după recomandările producătorului și folosite până la termenul de expirare indicat.

V. Tehnica metodei difuzimetrice

Prepararea inoculului

Se folosește metoda suspensionării directe a coloniilor pentru a prepara o suspensie bacteriană în soluție salină fiziologică cu o densitate corespunzătoare ca turbiditate standardului 0,5 McFarland, ceea ce corespunde cu o concentrație de aproximativ $1-2 \times 10^8$ UFC/mL pentru *Escherichia coli*.

Metoda suspensionării directe a coloniilor este potrivită pentru toate microorganismele, inclusiv microorganismele pretențioase.

Se folosește o ansă sterilă sau un tampon steril pentru a repica colonii dintr-o cultură pe un mediu de cultură neselectiv, incubată peste noapte. Se repică câteva colonii cu morfologie asemănătoare (dacă este posibil) pentru evitarea selectării unei variante atipice. Se suspendă coloniile în soluție salină fiziologică și se amestecă până la omogenizare.

Se ajustează densitatea suspensiei corespunzător standardului 0,5 McFarland, adăugând mai mult ser sau mai multe colonii bacteriene. Un inocul mai dens va avea ca efect zone de inhibiție mai mici, iar un inocul cu densitate mai mică va avea un efect opus.

Este recomandată utilizarea unui dispozitiv spectrofotometric pentru ajustarea densității suspensiei. Dispozitivul trebuie calibrat față de un standard 0,5 McFarland în conformitate cu indicațiile producătorului.

Ca alternativă, densitatea suspensiei poate fi comparată vizual cu un standard 0,5 McFarland. Pentru a ușura compararea vizuală, se compară testul pe un fundal alb cu linii negre.

Streptococcus pneumoniae este de preferință suspensionat de pe o placă cu agar- sânge la o densitate corespunzătoare standardului 0,5 McFarland. Când *S. pneumoniae* este suspensionat

de pe o placă cu agar chocolat, inoculul trebuie să aibă densitatea echivalentă cu un standard McFarland de 1,0.

Suspensia trebuie folosită în 15 min până la 60 de minute de la preparare, parte a regulii 15-15-15 minute: însămânțarea inoculului în 15 minute de la preparare, aplicarea discurilor în 15 minute de la însămânțare, incubarea plăcilor la 15 minute de la aplicarea discurilor.

Inocularea plăcilor cu agar

Plăcile cu agar trebuie să atingă temperatura camerei înainte de inoculare.

Se folosește inoculul ajustat într-un interval optim de 15 min de la preparare. Suspensia trebuie întotdeauna folosită în maxim 60 de minute de la preparare.

Se introduce un tampon steril în suspensie.

Pentru a evita supra-inocularea bacteriilor Gram-negative, se șterge excesul de fluid apăsând și rotind tamponul în interiorul tubului.

Pentru bacteriile Gram-pozitive nu se apasă și nu se rotește tamponul în interiorul tubului.

Când sunt inoculate mai multe plăci cu agar din aceeași suspensie, se repetă procedura pentru fiecare placă.

Plăcile pot fi inoculate fie prin însămânțare în trei direcții, fie utilizând un dispozitiv automat. Se dispersează inoculul uniform pe întreaga suprafață a agarului asigurând că nu există spații libere între striuri (în mod deosebit pentru bacteriile Gram-pozitive).

Se aplică discurile în 15 min de la inoculare.

Dacă plăcile inoculate sunt lăsate la temperatura camerei pentru un timp îndelungat înainte ca discurile să fie aplicate, microorganismul poate să înceapă să se dezvolte înainte de aplicarea discurilor, rezultând zone de inhibiție eronate prin reducerea diametrelor de inhibiție.

Aplicarea discurilor cu antibiotic

Cerințele privind conținutul discurilor sunt listate în tabelele cu Punctele de ruptură și Controlul calității pe https://www.eucast.org/clinical_breakpoints/. Metoda este standardizată pentru discuri de hârtie cu diametrul de 6 mm.

Discurile vor fi lăsate să ajungă la temperatura camerei înainte de a desigila cartușele sau containerele utilizate pentru depozitarea discurilor. Această precauție este necesară pentru a preveni apariția condensului ce poate conduce la deteriorarea rapidă a unora dintre agenții antimicrobieni.

Discurile se aplică ferm pe suprafața agarului inoculat în 15 minute de la inoculare. Discurile trebuie să fie în contact strâns și uniform cu suprafața agarului și nu trebuie mutate odată ce au fost aplicate, deoarece difuzia antibioticului începe imediat.

Numărul discurilor de pe o placă trebuie să fie limitat pentru a evita suprapunerea zonelor de inhibiție și interferarea agenților antimicrobieni. Este important ca diametrele zonelor de inhibiție să fie măsurate exact. Numărul maxim de discuri depinde de microorganism și de selectarea discurilor. În mod normal sunt aplicate maximum 6 discuri pe o placă circulară cu diametrul de 90 mm și maximum 12 discuri pe o placă circulară cu diametrul de 150 mm.

Pentru a putea depista rezistența inductibilă la clindamicină a stafilococilor și streptococilor, discurile cu eritromicină și clindamicină trebuie plasate la o distanță de 12-20 mm între margini pentru stafilococi și 12-16 mm între margini pentru streptococi.

Pierderea potenței agenților antimicrobieni per disc are ca rezultat reducerea diametrelor zonelor de inhibiție și este o sursă de eroare comună. Următoarele aspecte sunt esențiale:

Depozitarea discurilor, inclusiv cele din dispenser, se face în containere sigilate care conțin un desicant și ferite de lumină (unii agenți ca metronidazolul, cloramfenicolul, fluorochinolonele sunt inactivate de expunerea îndelungată la lumină.)

Rezervele de discuri se depozitează în conformitate cu indicațiile producătorului. Unii agenți sunt mult mai labili decât alții (ex. amoxicilină-acid clavulanic, cefaclor și carbapenemele) și pot exista indicații specifice ale producătorului.

Discurile de lucru se depozitează conform indicațiilor producătorului. După ce au fost desigilate containerele cu discuri, discurile trebuie utilizate în limitele de timp specificate de producător.

Discurile se aruncă la data de expirare indicată de producător.

Controlul calității se face frecvent, (vezi capitolul Controlul de calitate), pentru materialele de lucru pentru a verifica dacă discurile cu antibiotice nu și-au pierdut potența pe durata depozitării.

Incubarea plăcilor

Plăcile cu agar se întorc cu capacul orientat în jos având grijă ca discurile să nu cadă de pe suprafața agarului. Plăcile se incubează în maxim 15 minute după ce au fost aplicate discurile cu antibiotic. Dacă plăcile sunt lăsate la temperatura camerei după ce discurile au fost aplicate, antibioticele pot difuza în mediu înainte de incubare (predifuzie), rezultând zone de inhibiție mărite în mod eronat.

Stivuirea plăcilor în incubator poate influența rezultatele din cauza încălzirii neuniforme. Eficiența incubatoarelor variază, așadar controlul incubării, incluzând numărul optim de plăci dintr-un teanc, trebuie inclus în programul de asigurare a calității al laboratorului. Pentru cele mai multe incubatoare numărul potrivit de plăci într-un teanc este de maximum 5.

Condițiile de incubare sunt specificate în tabelele cu punctele de ruptură https://www.eucast.org/clinical_breakpoints/

Depășirea limitelor recomandate pentru timpul de incubare trebuie evitată, deoarece poate rezulta creșterea coloniilor în zona de inhibiție și raportarea izolatelor ca rezistente.

Pentru testele de sensibilitate la glicopeptide în cazul *Enterococcus* spp. coloniile rezistente pot să nu fie vizibile decât după ce plăcile au fost incubate timp de 24 h. Totuși, plăcile pot fi examinate după 16-20 h și se poate raporta orice semn de rezistență, dar plăcile cu izolate ce par a fi sensibile trebuie reincubate și recitate la 24h.

Un inocul preparat corect și inocularea corectă a plăcilor trebuie să determine apariția unui strat de creștere confluent.

Dacă se pot observa colonii izolate, inoculul are o densitate prea mică și testul trebuie repetat.

Creșterea trebuie să fie dispusă egal pe toată suprafața agarului pentru ca marginile zonelor de inhibiție obținute să fie uniforme și circulare (nezimțate).

Măsurarea zonelor de inhibiție și interpretarea sensibilității

Se verifică dacă zonele de inhibiție obținute în cazul tulpinilor utilizate pentru controlul calității se încadrează în limitele acceptate

(vezi https://www.eucast.org/ast_of_bacteria/quality_control/)

Pentru toți agenții antimicrobieni (dacă nu există alte specificații), diametrul zonei trebuie citit din punctul unde există inhibiție completă, apreciată cu ochiul liber, ținând plăcuța la 30 cm față de ochi.

Plăcile cu agar nesuplimentat sunt citite dinspre partea posterioară a plăcii, pe un fond închis, în lumină reflectată.

Plăcile cu agar suplimentat se citesc înlăturând capacul, în lumină reflectată.

Nu va fi folosită lumina transmisă (cu placa îndreptată spre lumină), sau lupa, dacă nu este specificat în alt fel.

Se măsoară diametrul zonei de inhibiție până la ultimul mm, folosind o riglă gradată.

Dacă se folosește un cititor automat, acesta trebuie calibrat la citirea manuală.

Diametrele zonelor de inhibiție sunt încadrate în categorii de sensibilitate, în conformitate cu tabelele cu puncte de ruptură de pe pagina web https://www.eucast.org/clinical_breakpoints/

Dacă se folosesc șabloane pentru interpretarea zonelor de inhibiție, plăcuța este plasată peste șablon și zonele sunt interpretate în conformitate cu punctele de ruptură EUCAST marcate pe șablon. Punctele de ruptură folosite trebuie să fie în concordanță cu ultima versiune a tabelelor EUCAST cu puncte de ruptură. Un program pentru realizarea șabloanelor este disponibil gratuit pe pagina de web <http://bsac.org.uk/susceptibility/template-program> .

În Ghidul de citire disponibil pe pagina de web (vezi https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Disk_test_documents/2021_mannuals/Reading_guide_v_8.0_EUCAST_Disk_Test_2021.pdf) există câteva exemple de imagini care explică citirea diametrelor zonelor de inhibiție. Acest document include și instrucțiuni de citire pentru diferite asocieri specifice de agent antimicrobian-microorganism.

Instrucțiuni specifice de citire:

În cazul apariției zonelor duble de inhibiție, sau a coloniilor izolate în zona de inhibiție, se verifică puritatea culturilor și se repetă testul dacă este necesar. Dacă culturile sunt pure, coloniile izolate trebuie luate în considerare atunci când se măsoară diametrul zonei de inhibiție.

Pentru trimetoprim și trimetoprim-sulfametoxazol, poate fi prezentă o creștere slabă până lângă disc, datorită antagoniștilor din mediu, aceasta trebuind ignorată. Măsurarea diametrului zonei de inhibiție trebuie să se facă începând din cea mai evidentă margine a zonei de inhibiție.

Pentru testarea tulpinilor de Enterobacterales la ampicilină, ampicilină-sulbactam și amoxicilină-acid clavulanic se ignoră creșterea bacteriană ce se poate prezenta ca un film subțire, care produce o zonă de inhibiție internă pe unele loturi de agar Mueller-Hinton.

Se ignoră coloniile izolate din aria zonei de inhibiție în cazul testării unei tulpini de *Escherichia coli* la mecilinam.

Pentru *Achromobacter xylosoxidans* și *Burkholderia pseudomallei* cu trimetoprim-sulfametoxazol, un izolat care prezintă orice urmă de zonă de inhibiție mai mare sau egală cu punctul de ruptură pentru categoria Sensibil trebuie să fie raportat ca sensibil. De reținut că poate exista o creștere substanțială în interiorul zonelor de inhibiție. În aceeași situație, tulpinile de *Stenotrophomonas maltophilia* se raportează sensibil la expunere crescută.

Se citește ca absența zonei de inhibiție doar dacă există o creștere până la disc și nu există urme de zonă de inhibiție.

Pentru enterococi și vancomicină, se examinează marginea zonei cu atenție din partea din față a plăcii cu placa ținută la lumină (lumină transmisă). Marginile neclare ale zonei de inhibiție și coloniile din interior indică rezistența la vancomicină și investigația trebuie să fie continuată. Izolatele nu trebuie raportate sensibile înainte de 24 de ore de incubație.

Pentru *Haemophilus influenzae* și agenții beta-lactamici, se citește marginea exterioară a zonelor acolo unde există o zonă de creștere în jurul unei zone de inhibiție altfel clară.

În cazul *Proteus* spp. se ignoră fenomenul de invazie și se măsoară cu exactitate diametrul zonei de inhibiție a creșterii

Pentru testarea sensibilității *Staphylococcus aureus* la benzilpenicilină, se examinează marginea zonei de inhibiție de aproape, cu placa orientată spre lumină (lumină transmisă). Izolatele cu zonele de inhibiție mai mari ca punctul de ruptură pentru sensibilitate, dar cu margini precise ale zonei de inhibiție trebuie considerate rezistente.

Când se folosește testarea la cefoxitin pentru evidențierea rezistenței la meticilină a *S. aureus*, se măsoară zona evidentă și se examinează cu atenție placa, în lumină, pentru a decela dacă există colonii izolate în interiorul zonei de inhibiție. Acestea pot fi fie expresia unei contaminări, fie a rezistenței heterogene la meticilină.

Pentru testarea sensibilității enterococilor la vancomicină, se examinează marginea zonei de inhibiție cu placa orientată către lumină (lumină transmisă). Marginile difuze și coloniile crescute în aria zonei de inhibiție indică rezistență la vancomicină și necesită investigații suplimentare. Izolatele nu trebuie declarate sensibile înainte de scurgerea a 24 de h de la incubare.

Pentru testarea sensibilității la antibiotice pentru tulpini hemolitice de streptococ pe agar Mueller-Hinton suplimentat, se citește diametrului zonei de inhibiție și nu al zonei de hemoliză. Hemoliza de tip β este de obicei independentă de creștere, în timp ce hemoliza de tip α și creșterea bacteriană de obicei coincid. Se înclină placa înainte și înapoi pentru a diferenția mai bine hemoliza de creștere.

În cazul testării tulpinilor de *Escherichia coli* la fosfomicină coloniile izolate din aria zonei de inhibiție se ignoră și se citește începând de la marginea zonei. .

VI. Detectarea mecanismelor de rezistență prin metode fenotipice

https://www.eucast.org/resistance_mechanisms/

Trebuie remarcat faptul că unele mecanisme de rezistență nu conferă întotdeauna rezistență clinică. Acest fapt s-ar putea datora mecanismelor care nu sunt exprimate sau exprimate doar la un nivel scăzut, ceea ce nu va da naștere rezistenței fenotipice. Prin urmare, în timp ce detectarea acestor mecanisme poate fi relevantă pentru controlul infecțiilor și sănătatea publică, este posibil să nu fie necesară în scopuri clinice. În consecință, pentru unele mecanisme, în special β -lactamazele cu spectru extins și carbapenemazele produse de bacili Gram-negativi, detectarea mecanismului nu conduce automat la clasificarea izolatului ca rezistent clinic.

Enterobacteriales producătoare de carbapenemaze

Carbapenemazele sunt β -lactamaze care hidrolizează penicilinele, în cele mai multe cazuri cefalosporine și în diferite grade carbapeneme și monobactame (acestea din urmă nu sunt hidrolizate de metalo- β -lactamaze).

Carbapenemazele sunt o sursă de îngrijorare deoarece pot conferi rezistență practic tuturor β -lactaminelor și sunt ușor transferabile. Mai mult, tulpinile producătoare de carbapenemază posedă frecvent mecanisme de rezistență la o gamă largă de agenți antimicrobieni și infecțiile cu Enterobacteriales producătoare de carbapenemaze sunt asociate cu rate ridicate de mortalitate.

Metode recomandate pentru detectarea carbapenemazelor la Enterobacteriales

Screening pentru producția de carbapenemază

CMI-urile la carbapeneme pentru Enterobacteriales producătoare de carbapenemaze pot fi sub valoarea punctelor de ruptură clinice. Cu toate acestea, pot fi utilizate valorile ECOFF definite de EUCAST pentru a detecta producătorii de carbapenemaze. Meropenem oferă cel mai bun compromis între sensibilitate și specificitate în ceea ce privește detectarea producătorilor de carbapenemază. Ertapenem este cel mai sensibil carbapenem, dar are specificitate redusă, în special la specii precum *Enterobacter* spp., datorită stabilității relativ reduse la β -lactamazele cu spectru extins (ESBL) și β -lactamazele AmpC în combinație cu pierderea porinelor (Tabelul 1).

Tabelul 1. Valorile de alertă pentru detectarea enterobacteriilor producătoare de carbapenemaze

Carbapenem	Cut-off pentru screening CMI (mg/L)	Cut-off pentru screening Diametru (mm) pentru discuri de 10 ug
Meropenem	> 0.125	< 28
Ertapenem	> 0.125	< 25

Metoda de testare a discurilor combinate

Această metodă este disponibilă comercial de la mai mulți producători și a fost primul test fenotipic care a devenit disponibil (MAST, Marea Britanie; Rosco, Danemarca) (18-20). Discurile sau comprimatele conțin meropenem ± diverși inhibitori. Pe scurt, acidul boronic inhibă carbapenemazele din clasa A, acidul dipicolinic și acidul etilendiaminotetraacetic (EDTA) inhibă carbapenemazele din clasa B. Mai mult, OXA-48 este inhibat de avibactam, care până acum nu a fost inclus în testele fenotipice. Cloxacilina, care inhibă β -lactamazele AmpC, a fost adăugată testelor pentru a diferenția între hiperproducția AmpC plus pierderea de porină și producția de carbapenemază.

Testul Hodge

Utilizarea **testului de trifoi modificat (Hodge)** nu este recomandată în prezent, deoarece rezultatele sunt dificil de interpretat, specificitatea este slabă și, în unele cazuri, sensibilitatea este, de asemenea, scăzută.

Teste biochimice – colorimetrice

Testul CarbaNP este un test rapid (<2 ore) pentru detectarea hidrolizei carbapenemului, care dă naștere la o modificare a pH-ului rezultând o schimbare a culorii de la roșu la galben cu soluție roșie de fenol.

Testul Carba NP a fost validat cu colonii bacteriene crescute pe plăci de agar Mueller-Hinton, plăci cu agar din sânge, plăci cu agar tripticază-soia și cele mai multe medii selective utilizate în screeningul producătorilor de carbapenemaze. Testul Carba NP nu trebuie efectuat cu colonii bacteriene cultivate pe plăci de agar Drigalski, CLED sau McConkey. Diferitele etape ale metodei trebuie să fie respectate întocmai pentru a obține rezultate reproductibile.

Un derivat al testului CarbaNP, *testul Blue-Carba (BCT)* este un test biochimic rapid (<2 ore) pentru detectarea producției de carbapenemaze. Se bazează pe hidroliza *in vitro* a imipenemului prin creștere bacteriană (inoculare directă fără liză prealabilă), care este detectată prin modificări ale pH-ului, evidențiate de indicatorul albastru bromtimol (albastru spre verde / galben sau verde spre galben). Într-o evaluare amplă efectuată de Pasteran și colab., dar efectuat într-un singur laborator, testul s-a dovedit a avea o sensibilitate excelentă pentru enzimele de clasă A și B, dar sensibilitate scăzută pentru detectarea enzimelor OXA-48.

Un al treilea test biochimic este *testul β CARBA™*, care poate fi efectuat și în mai puțin de 2h. Testul este realizat prin amestecarea a 1 până la 3 colonii în reactiv. Citirile trebuie făcute după maximum 30 min de incubație. Schimbarea culorii de la galben la portocaliu, roșu sau violet indică o reacție pozitivă. Testul β Carba™ a arătat performanțe excelente pentru a detecta CPE, și mai ales OXA-48. Cu toate acestea, capacitatea de a detecta alte carbapenemaze de clasa A trebuie verificată în continuare și unele rezultate fals pozitive au apărut cu alte β -lactamaze, cum ar fi supraproducția de K1 β -lactamaza în *Klebsiella oxytoca*.

Metoda de inactivare a carbapenemului

Principiul acestei metode este de a detecta hidroliza enzimatică prin incubarea unui carbapenem cu o suspensie bacteriană. Testul utilizează discuri de testare a sensibilității la antibiotice ca substrat. După două ore de incubare a unei anse de cultură bacteriană cu un disc de meropenem, discul este plasat pe un agar inoculat cu *Escherichia coli* ATCC 25922. Inactivarea

enzimatică nu va produce nicio zonă, în timp ce lipsa activității carbapenemazice se va evidenția prin prezența unei zone de inhibiție, semn că meropenemul din disc nu a fost hidrolizat. Testul a avut performanțe variabile în diferite studii, dar rămâne o alternativă posibilă, deși valoarea predictivă negativă a testului nu este încă clară. Un dezavantaj principal al acestei tehnici este că necesită de obicei cel puțin 18 ore pentru a obține rezultatele.

Detectarea hidrolizei carbapenemului cu MALDI-TOF

Principiul este de a detecta într-un dispozitiv de spectrometrie de masă (MALDI-TOF) scăderea sau dispariția anumitor vârfuri specifice de carbapeneme într-un spectru de masă după o incubare cu carbapenem.

Test imunocromatografic

Testul se bazează pe captarea imunologică a epitopilor enzimei carbapenemază, folosind nanoparticule de aur coloidale legate de o membrană de nitroceluloză într-un dispozitiv cu flux lateral. Principiul testului este că anticorpii monoclonal anti-carbapenemază sunt selectați ca reactivi de captare specifici, pentru identificarea directă a enzimei. Testul durează aproximativ patru minute și a fost evaluat atât din culturi bacteriene cât și din flacoane de hemocultură pozitive.

Enterobacterales producătoare de β -lactamază cu spectru extins (ESBL - extended-spectrum β -lactamases)

ESBL sunt enzime care hidrolizează majoritatea penicinelor și cefalosporinelor, inclusiv compușii oximino- β -lactamici (cefuroximă, cefalosporine din a treia și a patra generație și aztreonam), dar nu afectează cefamicinele și carbapenemele. Majoritatea ESBL aparțin clasei Ambler A a β -lactamazelor și sunt inhibate de inhibitori de β -lactamază (acid clavulanic, sulbactam și tazobactam) și de diazabiciclooctanone (avibactam).

Marea majoritate a ESBL sunt enzime dobândite, codificate de gene plasmidice. Cele dobândite sunt exprimate la diferite niveluri și diferă semnificativ în ceea ce privește caracteristicile biochimice, cum ar fi activitate împotriva β -lactaminelor specifice (de exemplu, cefotaximă, ceftazidimă, aztreonam). Nivelul de expresie și proprietățile unei enzime și prezența simultană a altor mecanisme de rezistență (alte β -lactamaze, eflux activ, permeabilitate modificată) duc la o mare varietate de fenotipuri de rezistență observate printre izolatele ESBL-pozitive.

Tabelul 2. Metode de screening ESBL pentru Enterobacterales

Metodă	Antibiotic	Necesită confirmare dacă
Diluții în agar sau în bulion	Cefotaximă/ceftriaxonă ȘI Ceftazidimă	CMI >1 mg/L pentru oricare din ele
	Cefpodoximă	CMI >1 mg/L
Difuzimetrie cu disc	Cefotaximă (5 μ g) SAU Ceftriaxonă (30 μ g) ȘI.....	Zona de inhibiție <21 mm
	Ceftazidimă (10 μ g)	Zona de inhibiție <23 mm
	Ceftazidimă (10 μ g)	Zona de inhibiție <22 mm
	Cefpodoximă (10 μ g)	Zona de inhibiție <21 mm

În multe zone, detectarea și caracterizarea ESBL este necesară pentru controlul infecțiilor. Strategia recomandată pentru detectarea ESBL la Enterobacterales se bazează pe lipsa sensibilității la oxiiimino-cefalosporine indicator, urmată de teste de confirmare fenotipice (și în unele cazuri genotipice) (Tabelul 2, Figura 1).

Metode de confirmare fenotipice

Există patru metode fenotipice bazate pe inhibarea *in vitro* a activității ESBL de către acidul clavulanic recomandate pentru confirmarea ESBL: testul pe disc cu și fără acid clavulanic (CDT), testul de sinergie dublu disc (DDST), testul de gradient ESBL și testul de microdiluție în bulion (tabelele 2 și 3).

Testul pe disc cu și fără acid clavulanic (combination disk test – CDT)

Se utilizează discuri care conțin cefalosporină singură (cefotaximă, ceftazidimă, cefepimă) și în combinație cu acid clavulanic. Zona de inhibare din jurul discului cu cefalosporină combinată cu acid clavulanic este comparată cu zona din jurul discului cu cefalosporină singură. Testul este pozitiv dacă diametrul zonei de inhibiție este ≥ 5 mm cu acid clavulanic decât fără.

Testul de sinergie dublu disc (double-disk synergy test DDST)

Discurile care conțin cefalosporine (cefotaximă, ceftazidimă, cefepimă) sunt aplicate pe plăci lângă disc cu acid clavulanic (amoxicilină-acid clavulanic). Un rezultat pozitiv este indicat atunci când zonele de inhibiție din jurul oricărui disc de cefalosporină sunt mărite sau există o „gaură de cheie” sau ”dop de șampanie” în direcția discului care conține acid clavulanic. Distanța dintre discuri este critică, cea de 20 mm între centrele celor două discuri s-a dovedit a fi optimă pentru discurile cu 30 μ g cefalosporină.

Testul de gradient ESBL

Testele de gradient specifice pentru evidențierea ESBL sunt configurate, citite și interpretate în conformitate cu instrucțiunile producătorului. Testul este pozitiv dacă se observă o reducere de 8 ori în CMI a combinației cefalosporină cu acid clavulanic în comparație cu CMI a cefalosporinei singure sau dacă apare ca o fantomă în zona de inhibiție sau există o deformare a elipsei (a se vedea instrucțiunile producătorului pentru ilustrații).

Rezultatul testului este nedeterminat dacă banda nu poate fi citită din cauza creșterii dincolo de gama de diluții a benzii. În toate celelalte cazuri, rezultatul testului este negativ. Potrivit producătorului, testul gradientului ESBL trebuie utilizat numai pentru confirmarea producției ESBL și nu este fiabil pentru determinarea CMI.

Microdiluții în bulion

Microdiluțiile se realizează cu bulion Mueller-Hinton ajustat pentru cationi care conține diluții seriale duble de cefotaximă, ceftazidimă și cefepimă la concentrații cuprinse între 0,25 și 512 mg/L, cu și fără acid clavulanic la o concentrație fixă de 4 mg/L. Testul este pozitiv dacă se observă o reducere de 8 ori în CMI a oricăreia dintre cefalosporinele combinate cu acid clavulanic comparativ cu CMI a cefalosporinei singure. În caz contrar rezultatul testului este interpretat ca fiind negativ.

Considerații speciale în interpretare

Testele de confirmare ESBL care utilizează cefotaxima ca indicator al cefalosporinei pot fi fals pozitive pentru tulpini de *Klebsiella oxytoca* cu hiperproducție a β -lactamazelor K1 cromozomiale (de tip OXY). Un fenotip similar poate fi întâlnit și la *Proteus vulgaris*, *Proteus penneri*, *Citrobacter koseri* și *Kluyvera* spp. și la unele specii din grupul *C. koseri* precum *C. sedlakii*, *C. farmeri* și *C. amalonaticus*, care au β -lactamaze cromozomiale care sunt inhibitate de acid clavulanic. O altă cauză posibilă a rezultatelor fals pozitive este hiperproducția de β -lactamaze cu spectru larg asemănător cu SHV-1-, TEM-1- sau OXA-1 combinate cu permeabilitate modificată. Probleme similare cu rezultatele testelor fals pozitive pentru *K. oxytoca* care produce K1 sau pentru *E. coli* producător de OXA-1 pot apărea, de asemenea, atunci când se utilizează teste de confirmare bazate numai pe cefepimă.

Detectarea fenotipică a ESBL în prezența altor β -lactamaze care maschează sinergia

Testele neconcludente (metode gradient) și testele fals negative (CDT, DDST, metode gradient și microdiluții în bulion) pot rezulta din expresia la nivel înalt a β -lactamazelor AmpC, care maschează prezența ESBL. Tulpinile cu exprimare la nivel înalt a β -lactamazelor tip AmpC de obicei prezintă o rezistență clară la cefalosporinele de generația a treia. În plus, rezistența la cefamicine, de exemplu CMI la cefoxitină > 8 mg/L, poate indica o exprimare la nivel înalt a β -lactamazelor AmpC, cu rara excepție a β -lactamazelor ACC, care nu conferă rezistență la cefoxitină.

Prezența ESBL poate fi, de asemenea, mascată de carbapenemaze, cum ar fi MBL sau KPC (dar nu enzime OXA-48-like) și/sau defecte severe ale permeabilității. Dacă detectarea ESBL este considerată relevantă, în astfel de cazuri ar trebui utilizate metode moleculare pentru detectarea ESBL.

Confirmare genotipică

Pentru confirmarea genotipică a prezenței genelor ESBL există o serie de posibilități disponibile variind de la PCR și secvențiere, până la secvențierea genomului întreg, urmată de cartografierea în silico a genelor de rezistență. Există, de asemenea, diferite sisteme microarrays disponibile.

Enterobacteriales producătoare de AmpC β -lactamază

Cefalosporinazele de tip AmpC sunt β -lactamaze Ambler clasa C. Hidrolizează penicilinele, cefalosporinele (inclusiv a treia generație, dar în general nu a patra generație) și monobactami. În general, enzimele de tip AmpC sunt slab inhibitate de inhibitori clasici ai ESBL, în special acidul clavulanic.

Numeroase *Enterobacteriales* și alți bacili Gram-negativi produc AmpC naturale, fie constitutiv la un nivel jos (de exemplu, *E. coli*, *Shigella* spp.), fie inductibil (de exemplu, *Enterobacter* spp., *Citrobacter freundii*, *Morganella morganii*, *Pseudomonas aeruginosa*). Depresarea sau hiperproducția AmpC-urilor naturale se datorează diferitelor modificări genetice și conferă rezistență la nivel înalt la cefalosporine și la combinațiile penicilinelor cu inhibitori ai β -lactamazei.

Metode recomandate pentru detectarea AmpC dobândită la *Enterobacteriales*

Un CMI la cefoxitină > 8 mg/L (diametrul zonei <19 mm) combinat cu rezistența fenotipică la ceftazidimă și/sau cefotaximă (așa cum este definită de punctele de ruptură) poate fi utilizată drept criteriu fenotipic pentru investigarea producției de AmpC la *Enterobacteriales* din grupa 1, deși această strategie nu va detecta ACC-1, o AmpC mediată de plasmide care nu hidrolizează cefoxitina. Trebuie remarcat faptul că rezistența la cefoxitină se poate datora și deficitului de porine.

Rezistența bacililor Gram-negativi la polimixina B

Rezistența dobândită la polimixină la *Enterobacteriales* a apărut în ultimii ani în întreaga lume.

Este în special îngrijorătoare apariția rezistenței mediate de plasmide atât la animale, produse alimentare și oameni, deoarece există o tendință accentuată spre diseminare orizontală.

Laboratoarele trebuie să utilizeze întotdeauna metoda microdiluțiilor în bulion pentru testarea susceptibilității la colistin și să utilizeze întotdeauna sulfat de colistină. Mai exact, difuzimetria cu disc și testele de gradient nu trebuie utilizate, deoarece acestea sunt asociate cu un risc ridicat de erori mari și foarte mari ("major error" și "very major error").

Controlul calității trebuie efectuat atât cu o tulpină de control sensibilă (*E. coli* ATCC 25922 sau *P. aeruginosa* ATCC 27853) și *E. coli* rezistent la colistină NCTC 13846 (*mcr-1* pozitiv). Pentru *E. coli* NCTC 13846, valoarea țintă a CMI este de 4 mg/L și doar ocazional poate fi 2 sau 8 mg/L.

***Staphylococcus aureus* rezistent la meticilină (MRSA)**

Definiție – tulpini de *S. aureus* cu o proteină auxiliară de legare a penicilinei (PBP2a/PBP2c codificată de *mecA* sau gene *mecC*) pentru care agenții β -lactamici au afinitate scăzută, cu excepția noii clase de cefalosporine cu activitate anti-MRSA (ceftarolină și ceftobiprol).

Unele izolate exprimă rezistență la nivel scăzut la oxacilină, dar sunt *mecA* și *mecC* negative și nu produc PBP alternative [*S. aureus* sensibile la limită (Borderline oxacillin-resistant *S. aureus* - BORSA)]. Aceste tulpini sunt relativ rare și mecanismul de rezistență este slab caracterizat, dar poate include hiperproducția β -lactamazelor sau alterarea PBP preexistente.

Detectare prin determinarea CMI sau difuzimetrie cu disc

Expresia heterogenă a rezistenței afectează în special CMI la oxacilină, care poate apărea sensibilă. Disc difuzia utilizând oxacilină este descurajată și diametrul zonei interpretative nu este inclus în tabelul punctelor de ruptură EUCAST din cauza corelației slabe cu prezența *mecA* (cu excepția *Staphylococcus pseudointermedius*, *Staphylococcus schleiferi* și *Staphylococcus coagulans*).

Tulpinile de *S. aureus*, *S. lugdunensis* și *S. saprophyticus* la care valoarea CMI la oxacilină este mai mare de 2 mg/L sunt foarte probabil meticilino-rezistente datorită prezenței genei *mecA*

sau *mecC*. Pentru stafilococii coagulazo-negativi, alții decât *S. saprophyticus* și *S. lugdunensis* valoarea CMI la oxacilină pentru izolatele metilino-rezistente este mai mare de 0,25 mg/L.

Cefoxitina este un marker foarte sensibil și specific al *mecA/mecC* inclusiv la tulpinile cu exprimare heterogenă.

Microdiluție în bulion:

Se utilizează metodologia standard (ISO 20776-1) și tulpinile cu CMI la cefoxitină > 4 mg/L sunt raportate ca rezistente la metilina.

Difuzimetrie cu disc

Se utilizează metoda EUCAST. Tulpinile cu diametrul zonei de inhibiție la cefoxitină (disc de 30 µg) <22 mm trebuie raportate ca rezistente la metilina.

Detectarea cu metode genotipice și latex-aglutinare

Detectarea genotipică a genelor *mecA* și *mecC* prin PCR sau detectarea proteinei PBP2a cu kituri de aglutinare din latex este posibilă folosind teste comerciale. PBP2c nu este detectată de majoritatea testelor comerciale.

***Staphylococcus aureus* rezistent la vancomicina**

VRSA: *S. aureus* rezistent la vancomicina: *S. aureus* cu rezistență la nivel înalt la vancomicina (CMI > 8 mg/L).

VISA: *S. aureus* intermediar la vancomicina: *S. aureus* cu rezistență scăzută la vancomicina (CMI 4 - 8 mg/L).

hVISA: *S. aureus* heterogen intermediar la vancomicina: *S. aureus* sensibil la vancomicina (CMI ≤ 2 mg/L), dar cu populații minoritare (1 din 10⁶ celule) cu CMI la vancomicina > 2 mg/L, observat prin analiza profilului populației bacteriene.

Trebuie remarcat faptul că, deși acești termeni se utilizează în continuare, toate categoriile menționate mai sus trebuie considerate rezistente din punct de vedere clinic.

CMI trebuie determinat întotdeauna atunci când se utilizează vancomicina pentru a trata un pacient cu infecție severă cu *S. aureus*. În cazuri selectate, de ex. când este suspectat eșecul terapeutic, în special în infecții sistemice, testarea pentru hVISA poate fi, de asemenea, justificată (prezența hVISA este considerat factor de prognostic pentru o evoluție nefavorabilă). Datorită complexității confirmării hVISA, supravegherea antimicrobiană este axată pe detectarea VISA și VRSA.

Metode recomandate pentru detectarea rezistenței la vancomicina

Difuzimetria cu disc nu poate fi utilizată pentru a detecta hVISA, VISA, sau VRSA.

Determinarea CMI - Metoda microdiluțiilor în bulion recomandată de EUCAST (ISO 20776-1) este standardul de aur.

Trebuie remarcat faptul că rezultatele obținute prin metoda gradientului pot fi cu 0,5-1 diluții duble mai mari decât rezultatele obținute prin microdiluția în bulion. Punctul de ruptură

EUCAST pentru rezistența la vancomicină la *S. aureus* este CMI > 2 mg/L. Izolatele cu CMI confirmat >2 mg/L (conform metodei microdilutiei în bulion) trebuie trimise la un laborator de referință.

Fenotipul hVISA nu poate fi detectat prin determinarea CMI.

***Enterococcus faecium* și *Enterococcus faecalis* rezistent la vancomicină**

Definiție: *Enterococcus faecium* sau *Enterococcus faecalis* cu rezistență la vancomicină (VRE) având CMI la vancomicină > 4 mg/L.

Enterococii, în special *E. faecium*, sunt în general rezistenți la antibioticele disponibile. Prin urmare, tratamentul infecțiilor cauzate de enterococi rezistenți la vancomicină (VRE) este dificil, cu puține opțiuni de tratament.

Tabelul 3. Valorile concentrației minime inhibitorii ale glicopeptidelor la tulpinile de VRE (enterococi vancomicino-rezistenți) în funcție de substratul genetic

Glicopeptide	CMI (mg/L)	
	VanA	VanB
Vancomicină	64 – 1024	4 – 1024
Teicoplanină	8 – 512	0.06 – 1

Alte specii de enterococi (*E. raffinosus*, *E. gallinarum* și *E. casseliflavus*) pot conține *vanA*, *vanB* sau alte gene *van* care codifică enzimele enumerate mai sus, dar aceste tulpini sunt relativ rare. Enzimele *VanC* codificate cromozomial se găsesc la toate izolatele de *E. gallinarum* și *E. casseliflavus*. *VanC* mediază rezistența la vancomicină de nivel scăzut (CMI 4-16 mg/L), dar acest lucru, în general, nu ar trebui să fie considerat important din punct de vedere al controlului infecției.

Rezistența la vancomicină poate fi detectată prin determinarea CMI, difuzimetrie cu disc și metoda punctelor de ruptură în agar. Pentru toate cele trei metode, este esențial ca plăcile să fie incubate timp de 24 de ore. Toate cele trei metode detectează cu ușurință rezistența mediată de *vanA*. Detectarea rezistenței mediată de *vanB* este mai dificilă. Determinarea CMI prin diluții în agar sau în bulion nu este întotdeauna fiabilă pentru *vanB*.

Atunci când se interpretează rezultatele testului CMI sau difuzimetrie cu disc, este importantă verificarea că izolatul nu este *E. gallinarum* sau *E. casseliflavus*, care pot fi identificați în mod eronat ca *E. faecium*.

Determinarea CMI poate fi efectuată prin diluții în agar, microdiluții în bulion sau gradient CMI. Microdiluția în bulion se realizează conform standardului ISO 20776-1, așa cum este recomandat de EUCAST.

Pentru **difuzimetrie cu disc**, metoda specificată de EUCAST trebuie urmată întocmai. Se inspectează zonele pentru margini neclare și/sau microcolonii cu lumină transmisă. Tulpinile la care diametrul este mai mare decât punctul de ruptură și marginile zonei de inhibiție sunt clar delimitate pot fi raportate ca fiind sensibile la vancomicină. Izolatele cu marginile zonei de

inhibiție neclare sau colonii în interiorul zonei sunt rezistente indiferent de dimensiunea zonei și nu se raportează sensibile fără confirmare prin determinarea CMI. Difuzimetria cu disc este efectuată în conformitate cu metodologia EUCAST pentru organismele non-fastidioase. Este nevoie de incubare pentru 24 de ore pentru a detecta rezistența.

Metoda diluțiilor în agar utilizează agar infuzie cord-creier și 6 mg/L vancomicină. Plăcile pot fi obținute de la producători comerciali sau preparate în laborator. Testul se realizează prin aplicarea a 1×10^5 - 1×10^6 UFC (10 μ l dintr-o suspensie de 0,5 McFarland) pe agarul infuzie cord-creier suplimentat cu vancomicină. Este necesară incubarea timp de 24 de ore la $35 \pm 1^\circ\text{C}$ în atmosferă aerobă pentru a detecta rezistența la izolatele cu rezistență inductibilă. Creșterea mai multor colonii este considerată ca test pozitiv.

Testarea genotipică - rezistența la vancomicină poate fi detectată de asemenea prin utilizarea PCR care vizează genele *vanA* și *vanB* folosind metode interne "in house" sau comerciale.

Recomandări de efectuare a testelor fenotipice rapide pentru detectarea mecanismelor de rezistență

1. Determinarea tipurilor de carbapenemază prin teste fenotipice rapide

Se includ: izolatele clinice semnificative, cu rol cert în infecție

- infecții invazive (la hemoculturi atenție la izolatele provenite din recoltări prin catetere în lipsa creșterii din probele de la periferie)
- creștere semnificativă din produse calitativ bune ale tractului respirator inferior
- urocultură - pacient cu ITU (nu în bacteriurii asimptomatice)
- colecții purulente recoltate prin aspirare/biopsie

Se testează în funcție de posibilitățile laboratorului:

- izolatele provenite din screening
- colonizantii
- izolatele obținute din leziuni superficiale, cu rol incert în infecție

Momentul efectuării testului

- Hemocultură:
 - direct din flacon (se utilizează teste specific dezvoltate pentru acest scop, atenție la recomandările producătorului) - după consultare cu clinicianul în cazul în care pacienții au risc crescut pentru infecții cu bacterii MDR:
 - pacient plurispitalizat
 - pozitivarea hemoculturii la pacienți tratați cu antibiotice cu spectru larg
 - secție cu endemicitate crescută cu CPE
 - din cultura bacteriană
 - înainte de antibiogramă
 - când există certitudinea că izolatul este semnificativ clinic
 - pacientul provine de la o secție cu endemicitate mare de CPE

- În cazul prezenței criteriilor de alertă pentru carbapenemază
- alte izolate semnificative
 - Din cultură, în cazul prezenței criteriilor de alertă

2. Determinarea prezenței PBP2a la *Staphylococcus aureus*

a. La toate izolatele obținute din infecții invazive - din cultură, înainte de efectuarea antibiogramei (dacă nu sunt disponibile metode moleculare)

Rezultatul preliminar se comunică telefonic

b. La alte izolate semnificative de *S. aureus*

- În cazul în care există probleme de interpretarea diametrului din jurul discului de cefoxitină
- În caz de urgență (în urma consultării cu clinicianul) înainte efectuării antibiogramei - rezultatul se comunică

VII. Rezistența predictibilă și fenotipuri neobișnuite. Reguli EXPERT.

https://www.eucast.org/expert_rules_and_intrinsic_resistance/

Scopul tabelor ”Rezistențe predictibile și fenotipuri neobișnuite” este de a servi ca instrument pentru validarea identificării speciilor și/sau a rezultatelor testelor de susceptibilitate. Absența rezistenței predictibile sau prezența unui fenotip neobișnuit indică faptul că laboratorul ar trebui să verifice identificarea speciilor, rezultatele testului de sensibilitate sau ambele.

https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Expert_Rules/2023/Expected_Resistant_Phenotypes_v1.2_20230113.pdf

https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Expert_Rules/2022/Expected_Susceptible_Phenotypes_Tables_v1.1_20220325.pdf

„Regulile EXPERT” sunt sfaturi generale privind susceptibilitatea sau rezistența unei specii (sau a unui grup de specii) împotriva unuia sau mai multor agenți, care pot fi deduse de la nivelul de rezistență sau susceptibilitate la unul sau mai mulți agenți sau de la identificarea unui mecanism de rezistență. Cel mai adesea regulile indică când să se evite utilizarea antimicrobienele care pot duce la eșecul tratamentului. În plus, oferă sfaturi cu privire la modul de gestionare a situațiilor care sunt în prezent controversate sau nerezolvate.

VIII. Controlul calității

Se utilizează tulpinile de referință pentru controlul calității indicate în documentele disponibile pe https://www.eucast.org/ast_of_bacteria/quality_control/ pentru a evalua performanțele testului. Principalele tulpini recomandate pentru control sunt sensibile, dar se pot

utiliza și tulpini rezistente pentru a confirma dacă metoda va detecta rezistența prin mecanisme cunoscute.

Pentru a verifica componenta inhibitorie a discurilor cu asocieri β -lactam - inhibitor de β -lactamază se recomandă utilizarea unor tulpini producătoare de β -lactamaze. Acest aspect trebuie să facă parte din controlul de rutină al calității. Compusul activ, antibioticul, este testat utilizând o tulpină sensibilă.

Tulpinile de control se stochează în condiții care să le asigure viabilitatea și păstrarea caracteristicilor. Stocarea pe bile de sticlă la -70°C în bulion cu glicerol, (sau un echivalent comercial) reprezintă o metodă convenabilă. Organismele nepretențioase pot fi păstrate la -20°C . Trebuie păstrate două tuburi cu fiecare tulpină de control, unul pentru utilizare, iar altul de rezervă, pentru înlocuirea celui în uz, la nevoie.

În fiecare săptămână, trebuie subcultivată o bilă din tubul utilizat, pe un mediu neselectiv și verificată puritatea.

Când se face subcultivarea unei tulpini de control, se utilizează mai multe colonii pentru a evita selectarea unei colonii mutante.

Se verifică dacă rezultatele obținute pentru tulpinile de control se încadrează în limitele acceptabile înscrise în tabelele de control EUCAST de pe pagina de web <http://www.eucast.org>.

În tabelele de control al calității EUCAST sunt indicate atât limitele de acceptabilitate cât și valorile țintă. Repetarea testării tulpinilor de control EUCAST trebuie să genereze rezultate aleatorii încadrate în limitele recomandate. Dacă numărul de teste este ≥ 10 , media diametrelor zonelor de inhibiție trebuie să fie apropiată de valoarea țintă (la o diferență de ± 1 mm față de valoarea țintă).

Se folosesc tulpinile de control recomandate pentru a monitoriza performanțele testului.

Testele de control trebuie efectuate și verificate zilnic, sau de cel puțin 4 ori pe săptămână pentru antibioticele ce fac parte din panelul utilizat pentru testarea de rutină.

În fiecare zi în care se efectuează testări, se verifică rezultatele ultimelor 20 de teste consecutive. Examinează rezultatele pentru a observa tendințele și rezultatele care sunt constant sub sau peste valoarea țintă. Dacă două sau mai multe rezultate din 20 de teste sunt în afara limitelor, este necesară investigarea cauzelor.

Dacă două teste consecutive sunt în afara intervalului sau dacă mai multe discuri sunt în afara intervalului într-o zi, se investighează cauzele înainte de a raporta rezultatele testelor de susceptibilitate pentru izolatele de la pacienți. Este posibil să fie necesar ca testele să fie repetate.

Dacă rezistența unei tulpini de control rezistente nu este recunoscută, atunci se suprimă rezultatele testelor de susceptibilitate pentru izolatele clinice, se investighează și se retestează.

Atunci când sunt investigate posibile surse de erori în difuzia discului, se iau în considerare probleme legate de discuri antimicrobiene, medii de cultură, condiții de testare și calitatea tulpinilor de control.

Pe lângă efectuarea controlului calității de rutină, se testează fiecare lot nou de agar Mueller-Hinton pentru a se asigura că toate zonele de inhibiție sunt în interiorul limitelor.

Aminoglicozidele pot indica o variație inacceptabilă a cationilor divalenți în mediu. Tigeciclina poate indica o variație a magneziului, trimetoprim-sulfametoxazol va decela probleme ale concentrației de timină, iar eritromicina un pH inadecvat.

Adâncimea agarului mai mare sau mai mică decât limitele acceptabile vor avea ca rezultat diametre de zonă mai mici sau mai mari, respectiv.

Zone de inhibiție pentru aminoglicozide cu *P. aeruginosa* ATCC 27853 sub sau peste limitele de control al calității pot indica concentrații mari sau scăzute de cationi divalenți (Ca²⁺, Mg²⁺).

Excesul de timină și timidină poate fi indicat de zonele de inhibiție pentru trimetoprim-sulfametoxazol și *E. faecalis* ATCC 29212 sub limitele de control.

IX. Seturile de antibiotice recomandate pentru testare

Tabelul nr. 1 Enterobacterales*

Lista standard	Lista complementară
Ampicilina	Tobramicină (pentru administrare locală)
Amoxicilină / acid clavulanic	Levofloxacină
Piperacilină / tazobactam	Cloramfenicol (pentru administrare locală)
Cefuroximă	Tigeciclina (difuzimetric se testează doar pentru <i>Escherichia coli</i>)
Cefoxitină	Colistin (doar microdiluții)
Cefotaximă sau ceftriaxonă	Azitromicina (<i>Salmonella Typhi</i> , <i>Shigella</i> spp.)
Ceftazidimă	Ceftazidimă/avibactam
Cefepim	Ceftolozan/tazobactam
Imipenem	Aztreonam
Meropenem	Imipenem/relebactam
Ertapenem	
Amikacin	Izolate urinare
Gentamicina	Norfloxacină
Ciprofloxacina	Nitrofurani
Trimetoprim/sulfametoxazol	Fosfomicină
	Infecții cu punct de plecare urinar (<i>E. coli</i> și <i>Klebsiella</i> spp, excepție <i>Klebsiella aerogenes</i>):
	Cefazolina

*pentru situații particulare de testare în funcție de fenotipul de rezistență consultați capitolul X.

Tabelul nr. 2: *Pseudomonas aeruginosa*

Lista standard	Lista complementară
Piperacilină - tazobactam	Aztreonam
Ceftazidimă	Levofloxacină
Cefepim	Colistin**
Imipenem	Fosfomicină
Meropenem	Ceftazidimă-avibactam**
Tobramicină (pentru administrare locală)	Ceftolozan-tazobactam**
Amikacin	Imipenem/relebactam
Ciprofloxacina	
Colistin*	

Ceftazidimă-avibactam* Ceftolozan-tazobactam* *în cazul izolatelor din tractul respirator, hemocultură sau LCR	**în cazul altor izolate decât cele menționate la lista standard
--	--

*pentru situații particulare de testare în funcție de fenotipul de rezistență consultați capitolul X.

Tabelul nr. 3: *Acinetobacter* spp.

Lista standard	Lista complementară
Imipenem Gentamicina Tobramicină Amikacin Ciprofloxacina Levofloxacina Meropenem Trimetoprim/sulfametoxazol Colistin	

*pentru situații particulare de testare în funcție de fenotipul de rezistență consultați capitolul X.

Tabelul nr. 4: *Stenotrophomonas maltophilia*

Lista standard
Trimetoprim/sulfametoxazol

Tabelul nr. 5: *Burkholderia pseudomallei*

Lista standard
Amoxicilină - acid clavulanic Ceftazidime Meropenem Imipenem Tetraciclină Trimetoprim-sulfametoxazol

Tabelul nr. 6: *Staphylococcus* spp.

Lista standard	Lista complementară
Penicilina G Cefoxitină (citire interpretativă, se raportează oxacilină + fenotip) Gentamicină Eritromicină Clindamicină Norfloxacina (screening pentru sensibilitate la fluorochinolone, rezultatul testării pentru norfloxacina nu se raportează) Acid fusidic Trimetoprim/sulfametoxazol Rifampicină	Ceftarolina - doar la MRSA Daptomicina - doar la MRSA și doar prin determinare CMI Vancomicină - algoritm de testare în capitolul X Teicoplanin Kanamicină (pentru administrare locală, determinarea sensibilității față de amikacină) Tobramicină (pentru administrare locală) Tetraciclină Tigeciclina Linezolid Levofloxacina Moxifloxacina Ciprofloxacina Nitrofurantoina (pentru infecții urinare) Mupirocin (pentru administrare locală) Fosfomicină (pentru infecții urinare)

Tabelul nr. 7: *Enterococcus spp.*

Lista standard	Lista complementară
Ampicilina Gentamicina concentrație crescută Vancomicină Teicoplanin	Imipenem Ciprofloxacină (infecții urinare) Nitrofurantoina (infecții urinare) Tigeciclina Linezolid Fosfomicină

Tabelul nr. 8: *Streptococcus pneumoniae*

Lista standard	Lista complementară
Oxacilina (pentru penicilina screening) Eritromicina Clindamicina Tetraciclina Norfloxacină (screening) Vancomicina sau teicoplanina	Penicilina G (CMI) Cefotaximă sau ceftriaxonă (CMI) Ampicilina sau amoxicilina(CMI) Alte beta-lactame Levofloxacină sau moxifloxacină Doxiciclina Cloramfenicol Rifampicină Trimetoprim/sulfametoxazol Gentamicina
Pentru izolatele invazive se determină CMI la penicilina G (CMI), cefotaximă sau ceftriaxonă (CMI)	

Tabelul nr. 9: Streptococi grup A, B, C

Lista standard	Lista complementară
Eritromicină Clindamicină Tetraciclina	Penicilina G (infecții invazive) Norfloxacină (doar screening - nu se raportează) Fluorochinolone (dacă screening-ul cu norfloxacină este pozitiv se testează moxifloxacină și levofloxacină) Vancomicină Teicoplanin Tigeciclina Trimetoprim/sulfametoxazol Cloramfenicol Linezolid Rifampicină Nitrofurantoina (infecții urinare SGB)

Tabelul nr. 10: Alți streptococi

Lista standard	Lista complementară
Penicilina G Ampicilina Cefotaximă sau ceftriaxonă Eritromicina Clindamicina	Alte beta-lactame Moxifloxacină (CMI) Vancomicină Teicoplanin Tigeciclina Trimetoprim/sulfametoxazol Cloramfenicol Linezolid Rifampicină

Tabelul nr. 11 *Listeria monocytogenes*

Lista standard
Penicilina G Ampicilină Meropenem Eritromicina Trimetoprim/sulfametoxazol

Tabelul nr. 12 *Corynebacterii*

Lista standard	Lista complementară
Penicilina G Clindamicina Ciprofloxacina Tetracilină Vancomicina Moxifloxacina Rifampicina Linezolid	

Tabelul nr. 13 *Haemophilus spp.*

Lista standard	Lista complementară
Penicilina G (screening) Ampicilina Amoxicilină - acid clavulanic Tetracilină Trimetoprim/sulfametoxazol Acid nalidixic (screening)	Cefixime (dacă screeningul cu penicilină este pozitiv) Cefotaxime, ceftriaxonă (dacă screeningul cu penicilină este pozitiv) Meropenem (dacă screeningul cu penicilină este pozitiv) Cloramfenicol Rifampicina Moxifloxacina, ciprofloxacina, levofloxacina (dacă screeningul de acid nalidixic este pozitiv) Gentamicina Doxiciclina (numai prin metode cantitative)

Tabelul nr. 14 *Moraxella catarrhalis*

Lista standard	Lista complementară
Amoxicilină - acid clavulanic Eritromicina Tetracilină Trimetoprim/sulfametoxazol Acid nalidixic (screening)	Cefixime Cefotaxime Cloramfenicol Ciprofloxacina

Tabelul nr. 15 *Pasteurella multocida*

Lista standard	Lista complementară
Penicilina G Amoxicilină - acid clavulanic Tetracilină Trimetoprim/sulfametoxazol Acid nalidixic (screening)	Cefotaximă

Tabelul nr. 16 *Helicobacter pylori*

Lista standard	Lista complementară
Amoxicilină Claritromicina	Tetracilină Rifampicina

Levofloxacină Metronidazol	
-------------------------------	--

Tabelul nr. 17 *Campylobacter* spp.

Lista standard
Eritromicină Ciprofloxacina Tetracilină

X. Recomandări de testare a antibioticelor de rezervă în funcție de fenotipul de rezistență și situațiile clinice în care pot fi utilizate

Tabelul 1. Recomandări de testare a antibioticelor "vechi" în funcție de fenotipuri de rezistență

Antibioticele "vechi"	CRAB	BLSE	CRPA non-MBL	CRE - non-CP	CRE KPC	CRE OXA48	CRE MBL	Indicații
Polimixine (colistin)	da	da	da	da	da	da	da	infecții cu Gram-negativi la pacienți cu opțiuni limitate
Aminoglicozide	±	±	±	±	±	±	±	
Fosfomicina i.v.	Nu	da	±	±	±	±	±	infecții cu Gram-negativi la pacienți cu opțiuni limitate (determinare CMI - excepție <i>E. coli</i>)

Aztreonam	nu	nu	±	nu	nu	nu	±	Infecții cu Gram-negativi sensibili la aztreonam
Tigeciclina*	-	da	nu	da	da	da	da	SSTIc , IAI

*testare doar în cazul tulpinilor de *Escherichia coli* și *Citrobacter koseri*

Indicații pentru determinarea CMI la colistin

- a. Enterobacterales CPE
 - i. Izolate semnificative clinic
 - ii. Se exclud izolatele screening și cele care au relevanță clinică îndoielnică
- b. *Pseudomonas aeruginosa*
 - i. Izolate MDR semnificative clinic
 - ii. Toate izolatele provenite din hemoculturi
- c. *Acinetobacter baumannii*
 - i. Izolatele provenite din hemoculturi
 - ii. Alte izolate semnificative, asociate cu infecție

Determinarea CMI la vancomicină în cazul tulpinilor de *Staphylococcus* spp. se impune pentru

- a. Toate izolatele provenite din infecții invazive
 - i. rezultatul se comunică doar în cazul fenotipului meticilino-rezistent sau în urma discuției cu clinicianul, în situații clinice care justifică utilizarea vancomicinei (de ex. alergie la antibiotice beta-lactamice)
- b. Izolate non-invazive cu fenotip meticilino-rezistent semnificative clinic
- c. Izolate non-invazive cu fenotip meticilino-sensibil semnificative clinic în cazul alergiei la beta-lactamine

Testarea antibioticelor și a combinațiilor de antibiotice ”noi” (aprobate recent)

La pacienții cu infecții severe (infecții complicate de tract urinar, infecții intraabdominale complicate, pneumonie nosocomială, pneumonie de ventilație, infecții invazive, infecții complicate ale pielii și țesuturilor moi) de la care se izolează bacterii cu rezistențe extinse se recomandă testarea antibioticelor și combinațiilor de antibiotice noi, recent introduse în tratamente. **Rezultatul testării la acestea se va comunica exclusiv în situațiile în care nu există alte antibiotice cu activitate păstrată.**

Tabelul 2. Spectrul de activitate al antibioticelor ”noi” față de bacteriile Gram-negative rezistente la carbapeneme, în funcție de indicațiile aprobate și activitate *in vitro* documentată

Antibioticele “noi”	CRAB	BLSE	CRPA non MBL	CRE - nonCP	CRE - KPC	CRE – OXA48	CRE - MBL	Indicații
Ceftolozan/ tazobactam	Nu	da	da	nu	nu	nu	nu	ITUc, IAIC, HAP, VAP
Ceftazidimă/ avibactam	nu	da	da	±	da	da	nu	ITUc, IAIC, HAP, VAP, infecții cu Gram-negativi la pacienți cu opțiuni limitate
Meropenem/ vaborbactam	Nu	da	nu	±	da	nu	nu	ITUc, HAP, VAP, infecții cu Gram-negativi la pacienți cu opțiuni limitate
Imipenem/ relebactam	Nu	da	da	±	da	nu	nu	ITUc, IAIC, HAP, VAP, BSI cu origine respiratorie, infecții cu Gram-negativi la pacienți cu opțiuni limitate
Cefiderocol	da	da	da	da	da	da	da	ITUc, HAP, VAP, infecții cu Gram-negativi la pacienți cu opțiuni limitate

Prescurtări: CRAB - *Acinetobacter baumannii* rezistent la carbapeneme, BLSE - beta-lactamaze cu spectru extins, CRPA non MBL - *Pseudomonas aeruginosa* rezistent la carbapeneme neproducător de metalo-beta-lactamaze, CRE - nonCP - enterobacterii rezistente la carbapeneme neproducătoare de carbapenemaze, CRE - KPC - enterobacterii rezistente la carbapeneme producătoare de enzime KPC, CRE – OXA48 - enterobacterii rezistente la carbapeneme producătoare de enzime OXA-48, CRE - MBL - enterobacterii rezistente la carbapeneme producătoare de metalo-beta-lactamaze.

ITUc - infecții complicate de tract urinar, IAIC – infecții intraabdominale complicate, HAP – pneumonie dobândită în spital, VAP pneumonie de ventilatie, BSI – infecții invazive, SSTIC – infecții complicate ale pielii și țesuturilor moi

Opțional pot fi testate și antibioticele noi indisponibile deocamdată în scop terapeutic în România (ex. cefiderocol sau meropenem/vaborbactam), pentru documentarea activității antimicrobiene.

XI. Raportarea antibiogramelor

Principii de raportare selectivă a rezultatelor testării sensibilității

În vederea limitării (descurajării) prescrierii antibioticelor cu spectru larg în cazul izolatelor sălbatice (fără mecanism de rezistență), rezultatele antibiogramelor se raportează selectiv.

În cazul izolatelor ce au mecanisme de rezistență se raportează toate antibioticele semnificative față de care se obține rezistență și la nevoie se extinde lista antibioticelor cu sensibilitate raportate.

În cazul în care sunt izolate mai multe specii bacteriene semnificative dintr-un produs, setul antibioticelor raportate se lărgeste în așa fel, încât să se faciliteze alegerea antibioticelor active pe ambele specii bacteriene.

În funcție de specia bacteriană izolată, în caz de sensibilitate păstrată se vor raporta următoarele antibiotice:

Tabelul 1. Antibiotice raportate selectiv în cazul izolatelor bacteriene fără mecanisme de rezistență

Antibiotice raportate	Observații
Enterobacterii	
Ampicilină	
Cefuroximă	
Gentamicină	
Nitrofurantoin	Se raportează doar pentru <i>E. coli</i> în ITU necomplicat
Fosfomicină	Cu administrare orală, se raportează doar pentru <i>E. coli</i> în ITU necomplicat
Norfloxacin	Se raportează doar în ITU necomplicat
Trimetoprim-sulfametoxazol	Se raportează doar în ITU
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
Ceftazidimă	
Piperacilină/tazobactam	
Amikacină	
Ciprofloxacină	Doar în ITU
<i>Staphylococcus spp:</i>	
Penicilină	
Oxacilină	
Eritromicină	
Clindamicină	
Trimetoprim+sulfametoxazol	
Nitrofurantoină	Se raportează doar în ITU
<i>Enterococcus faecalis</i>	

Ampicilină	
Ciprofloxacină	Se raportează doar în ITU necomplicat
Nitrofurantoină	Se raportează doar în ITU necomplicat
<i>Enterococcus faecium</i>	
Se raportează integral	
Ciprofloxacină	Se raportează doar în ITU necomplicat
<i>Acinetobacter baumannii</i>	
Imipenem	
Meropenem	
Gentamicină	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	
Penicilină	
Eritromicină	
Trimetoprim+sulfametoxazol	
Streptococi de grup viridans	
Penicilină	În endocardită se comunică și valoarea CMI
Ampicilină	
<i>Haemophilus spp.</i>	
Ampicilină	
Trimetoprim+sulfametoxazol	

ITU - infecție de tract urinar; CMI - concentrația minimă inhibitoare

XII. Comentarii privind fenotipurile de rezistență, dozele de antibiotice recomandate, rezistențele naturale și posibilități de extrapolare a rezultatelor

Comentariile privind principalele fenotipuri de rezistență, dozele de antibiotice recomandate de către EUCAST, rezistențele naturale mai importante și posibilitățile de extrapolare a rezultatelor sunt sumarizate în tabelul 2.

Tabelul 1. Comentarii generale

Condiții	Comentariu
Antibiogramă raportată selectiv	Antibiogramă selectivă! La nevoie, vă rugăm să contactați laboratorul pentru mai multe informații legate de antibiogramă.
Tulpina rezistentă la cel puțin un reprezentant din cel puțin 3 clase de antibiotice	Tulpină MDR
Tulpină sensibilă numai la 1- 2 clase de antibiotice	Tulpină XDR
Tulpină la care se constată lipsa sensibilității la toate clasele de antibiotice	Tulpină PDR

Încadrarea bacteriilor în fenotipuri de rezistență MDR, XDR sau PDR se va aplica în cazul bacteriilor din ordinul Enterobacterales (cu excepția *Salmonella*, *Shigella*), *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus* și *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, în funcție de criteriile stabilite în tabelele II-VI.

Tabelul 2. Criterii de încadrare în categoriile MDR, XDR, PDR a tulpinilor de *Staphylococcus aureus*:

Pentru MDR: se aplică un criteriu dintre următoarele:

- MRSA (tulpinile MRSA întotdeauna se vor considera MDR)
- rezistență față de cel puțin un antibiotic din cel puțin 3 clase de antibiotice

Pentru XDR: tulpina este sensibilă la cel mult două clase de antibiotice.

Pentru PDR: tulpina este rezistentă față de toate antibioticele testate. Această categorie poate fi stabilită doar în situația testării tuturor categoriilor de antibiotice din tabel.

Clasă antibiotic	Antibiotic
Aminoglicozide	Gentamicină
Ansamicine	Rifampicina
Beta-lactamine antistafilococice	Oxacilina
Beta-lactamine anti-MRSA	Ceftarolina
Fluoroquinolone	Screening pozitiv cu norfloxacin
Inhibitori ai metabolismului folaților	Trimetoprim/sulfametoxazol
Fucidani	Acid fusidic
Glicopeptide	Vancomicina (determinare CMI)
Glicilciline	Tigeciclina
Lincosamide	Clindamicina
Lipopeptide	Daptomicina (determinare CMI)
Macrolide	Eritromicina
Oxazolidinone	Linezolid
Acizi fosfonici	Fosfomicina (determinare CMI)
Tetraciline	Tetraciclina

Tabelul 3. Criterii de încadrare în categoriile MDR, XDR, PDR a tulpinilor de *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*

Pentru MDR: rezistență față de cel puțin un antibiotic din cel puțin 3 clase de antibiotice (nu se iau în calcul antibioticele față de care specia are rezistență predictibilă)

Pentru XDR: tulpina este sensibilă la cel mult două clase de antibiotice.

Pentru PDR: tulpina este rezistentă față de toate antibioticele testate. Această categorie poate fi stabilită doar în situația testării tuturor categoriilor de antibiotice din tabel.

Clasă antibiotic	Antibiotic	Rezistență predictibilă
Aminoglicozide (excepție: streptomicina)	Gentamicină - rezistență de nivel crescut	
Aminoglicozide (streptomicina)	Streptomicină - rezistență de nivel crescut	
Carbapeneme	Imipenem	<i>E. faecium</i>
Fluorochinolone (raportate doar la izolatele urinare)	Ciprofloxacina Levofloxacina Moxifloxacina	
Glicopeptide	Vancomicina	
Glicilciline	Tigeciclina	
Peniciline	Ampicilina	
Oxazolidinone	Linezolid	

Tabelul 4. Criterii de încadrare în categoriile MDR, XDR, PDR a reprezentanților ordinului *Enterobacterales*:

Pentru MDR: rezistență față de cel puțin un antibiotic din cel puțin 3 clase de antibiotice (nu se iau în calcul antibioticele față de care specia are rezistență predictibilă)

Pentru XDR: tulpina este sensibilă la cel mult două clase de antibiotice.

Pentru PDR: tulpina este rezistentă față de toate antibioticele testate. Această categorie poate fi stabilită doar în situația testării tuturor categoriilor de antibiotice din tabel.

Tulpinile de bacterii care sunt sensibile doar la antibioticele din categoria celor noi +/- colistin se vor încadra obligatoriu la XDR.

Clasă antibiotic	Antibiotic	Rezistență predictibilă
Aminoglicozide	Gentamicină	
	Tobramicina	

	Amikacina	
Carbapeneme	Ertapenem	
	Imipenem	<i>Morganellaceae (Morganella spp. Providencia spp. Proteus spp)</i>
	Meropenem	
Cefalosporine cu spectrul îngust	Cefazolina	<i>Citrobacter freundii, Klebsiella aerogenes, Enterobacter cloacae, Hafnia alvei, Morganella morganii, Proteus penneri, Proteus vulgaris, Providencia rettgeri, Providencia stuartii, Serratia marcescens</i>
	Cefuroxima	<i>M. morganii, P. penneri, P. vulgaris, S. marcescens</i>
Cefalosporine cu spectrul extins	Cefotaxima sau ceftriaxona	
	Ceftazidima	
	Cefepima	
Cefalosporine generația 5	Ceftarolina	
Antibiotice noi, combinații noi (beta-lactamine cu inhibitori de beta-lactamază) Notă: Aceste antibiotice se raportează pe antibiograme doar în cazul tulpinilor XDR	Cefiderocol	indisponibil în România
	Ceftazidimă/avibactam	
	Ceftolozan/tazobactam	
	Meropenem/vaborbactam	indisponibil în România
	Imipenem/relebactam	
Fluorochinolone	Ciprofloxacina	

Glicilcicline (testare doar în cazul tulpinilor de <i>Escherichia coli</i> și <i>Citrobacter koseri</i>)	Tigeciclina	
Inhibitori ai metabolismului folaților	Trimetoprim/ sulfametoxazol	
Monobactami	Aztreonam	indisponibil în România
Peniciline	Ampicilină	<i>Citrobacter koseri</i> , <i>C. freundii</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>Escherichia hermannii</i> , <i>H. alvei</i> , <i>Klebsiella spp.</i> , <i>M. morgani</i> , <i>P. penneri</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>P. rettgeri</i> , <i>P. stuartii</i> , <i>S. marcescens</i>
Peniciline cu inhibitori de beta-lactamază	Amoxicilină/acid clavulanic	<i>C. freundii</i> , <i>K. aerogenes</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>H. alvei</i> , <i>M. morgani</i> , <i>P. rettgeri</i> , <i>P. stuartii</i> , <i>S. marcescens</i>
	Ampicilină/sulbactam	<i>C. freundii</i> , <i>C. koseri</i> , <i>K. aerogenes</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>H. alvei</i> , <i>P. rettgeri</i> , <i>S. marcescens</i>
Peniciline anti- <i>Pseudomonas</i> cu inhibitori de beta-lactamază	Piperacilină/tazobactam	<i>E. hermannii</i>
Acizi fosfonici (determinare CMI)	Fosfomicina	
Polimixine	Colistin	<i>Morganellaceae</i> , <i>Serratia spp.</i>

Tabelul 5. Criterii de încadrare în categoriile MDR, XDR, PDR a tulpinilor de *Pseudomonas aeruginosa*:

Pentru MDR: rezistență față de cel puțin un antibiotic din cel puțin 3 clase de antibiotice (nu se iau în calcul antibioticele față de care specia are rezistență predictibilă)

Pentru XDR: tulpina este sensibilă la cel mult două clase de antibiotice.

Pentru PDR: tulpina este rezistentă față de toate antibioticele testate. Această categorie poate fi stabilită doar în situația testării tuturor categoriilor de antibiotice din tabel.

Tulpinile care sunt sensibile doar la antibioticele din categoria celor noi +/- colistin se vor încadra obligatoriu la XDR.

Clasă antibiotic	Antibiotic
Aminoglicozide	Amikacină
	Tobramicina
Carbapeneme	Meropenem
	Imipenem
Cefalosporine	Ceftazidima
	Cefepima
Combinatii noi de antibiotice, antibiotice noi	(Cefiderocol) - indisponibil în România
	Ceftazidimă/avibactam
	Ceftolozan/tazobactam
	Imipenem/relebactam
	(Meropenem/vaborbactam) - indisponibil în România
Fluorochinolone	Ciprofloxacina
	Levofloxacina
Monobactami	Aztreonam
Peniciline anti- <i>Pseudomonas</i> cu inhibitori de beta-lactamază	Piperacilină/tazobactam
Polimixine	Colistin

Tabelul 6. Criterii de încadrare în categoriile MDR, XDR, PDR a speciilor din complexul *Acinetobacter baumannii*

Pentru MDR: rezistență față de cel puțin un antibiotic din cel puțin 3 clase de antibiotice (nu se iau în calcul antibioticele față de care specia are rezistență predictibilă)

Pentru XDR: tulpina este sensibilă la cel mult două clase de antibiotice.

Pentru PDR: tulpina este rezistentă față de toate antibioticele testate. Această categorie poate fi stabilită doar în situația testării tuturor categoriilor de antibiotice din tabel.

Clasă antibiotic	Antibiotic
Aminoglicozide	Amikacină
	Gentamicină
	Tobramicina
Carbapeneme	Meropenem
	Imipenem
Cefalosporine siderofor	(Cefiderocol) - indisponibil în România
Inhibitori ai metabolismului folaților	Trimetoprim/sulfametoxazol
Fluorochinolone	Ciprofloxacină
	Levofloxacină
Polimixine	Colistin

Comentariile interpretative din tabelele VII-XVIII vor fi adăugate pe buletinul de antibiogramă în funcție de condiția (din coloana 2) întâlnită (dacă se utilizează antibiotice pentru care nu sunt menționate dozele în acest tabel se vor consulta tabelele EUCAST)

Situațiile și dozele menționate pot suferi modificări, de aceea este importantă verificarea acestora în ultima versiune EUCAST

Tabelul 7. Comentarii pentru bacteriile din ordinul Enterobacterales

Antibiotice/specii bacteriene	Condiție	Comentarii
Familia <i>Morganellaceae</i> (<i>Morganella</i> spp., <i>Proteus</i> spp., <i>Providencia</i> spp.)	În toate situațiile	Rezistență naturală față de colistin și tigeciclină
<i>Serratia</i> spp.	În toate situațiile	Rezistență naturală față de colistin
Ampicilină	În toate situațiile	Testarea la ampicilină este valabilă și pentru amoxicilină
Aminoglicozide	Sensibilitate raportată (izolate alte decât cele urinare)	Aminoglicozidele se utilizează doar în asociere cu alte intervenții terapeutice (asociere de antibiotice, intervenții chirurgicale, etc.).
Amikacină	Sensibilitate raportată (izolate alte decât cele urinare)	Sensibilitatea față de amikacină se poate obține numai la doze de antibiotic: 1 x 25-30 mg/kg iv/zi.
Gentamicină	Sensibilitate raportată (izolate alte decât cele urinare)	Sensibilitatea față de gentamicină se poate obține numai la doze de antibiotic: 1 x 6-7 mg/kg iv/zi.
Colistin	Sensibilitate raportată în caz de infecții sistemice	În infecții sistemice este necesară asocierea colistinului cu alte intervenții terapeutice (asociere de agenți antimicrobieni, eliminarea sursei, etc).
Colistin	Sensibilitate raportată în caz de alte infecții decât cele sistemice	Se recomandă administrarea colistinului în combinație cu alți agenți antimicrobieni cu scopul de a potența efectul sau de a lărgi spectrul de activitate.
Cefuroximă – doar la <i>E. coli</i> , <i>Klebsiella</i> spp. (excepție <i>K. aerogenes</i>), <i>Proteus mirabilis</i>	Alte infecții cu excepția ITU necomplicat Sensibil, expunere crescută	Numai cu administrare intravenoasă! Sensibilitatea față de cefuroximă se poate obține numai la doze crescute de antibiotic (de exemplu, 3 x 1,5 g iv/zi sau alte regimuri de dozare care să

		asigure concentrații similare la locul infecției).
Cefuroximă – doar la <i>E. coli</i> , <i>Klebsiella</i> spp. (excepție <i>K. aerogenes</i>), <i>Proteus mirabilis</i>	ITU necomplicat	În ITU necomplicat se poate administra oral. Sensibilitatea față de cefuroximă în ITU necomplicat se poate obține la doze de 2 x 0,25 g po/zi.
Ampicilină	ITU necomplicat	Administrare orală doar în ITU necomplicat
Amoxicilină	ITU necomplicat	3 x 0,5 g po/zi
Amoxicilină+acid clavulanic	ITU necomplicat Atenție: sunt valori de interpretare diferite în caz de ITU față de cele sistemice	3 x (0,5 g amoxicilină + 0,125 g clavulanat) po/zi
Ampicilină, amoxicilină	Alte izolate decât cele din ITU necomplicat	Testarea este valabilă în caz de administrare intravenoasă.
Cefadroxil	ITU necomplicat	2 x 0,5-1 g po/zi
Cefalexină	ITU necomplicat	2-3 x 0,25-1 g po/zi
Cefiximă	ITU necomplicat	2 x 0,2-0,4 g po/zi
Cefuroximă	ITU necomplicat	2 x 0,25 g po/zi
	Izolate, altele decât cele din urină, sensibilitate la expunere crescută	Sensibilitatea față de cefuroximă se poate obține numai la doze crescute de antibiotic (de exemplu, 3 x 1,5 g iv/zi sau alte regimuri de dozare care să

		asigure concentrații similare la locul infecției).
Trimetoprim/sulfametoxazol	ITU	2 x (0,16 g trimetoprim + 0,8 g sulfametoxazol) po/zi
	Sensibilitate la expunere crescută	Sensibilitatea la trimetoprim/sulfametoxazol se poate obține numai la doze crescute de antibiotic - de exemplu, 2 x (0,24 g trimetoprim + 1,2 g sulfametoxazol) po/zi sau alte regimuri de dozare care să asigure concentrații similare la locul infecției.
Norfloxacină	ITU necomplicat	2 x 0,4 g po/zi
Cefotaximă	Izolate, altele decât cele din LCR, sensibilitate la expunere crescută	Sensibilitatea la cefotaximă se poate obține numai la doze crescute de antibiotic (de exemplu, 3 x 2 g iv/zi sau alte regimuri de dozare care să asigure concentrații similare la locul infecției)
Ceftazidimă	Izolate, altele decât cele din LCR, sensibilitate la expunere crescută	Sensibilitatea la ceftazidimă se poate obține numai la doze crescute de antibiotic (de exemplu, 3 x 2 g iv/zi sau 6 x 1 g iv/zi sau alte regimuri de dozare care să asigure concentrații similare la locul infecției) .
Ceftriaxonă	Izolate, altele decât cele din LCR, sensibilitate la expunere crescută	Sensibilitatea la ceftriaxonă se poate obține numai la doze crescute de antibiotic (de exemplu, 2 x 2 g/zi sau 4 x 1 g iv/zi sau alte regimuri de dozare care să asigure concentrații similare la locul infecției): .
Imipenem	Sensibilitate la expunere crescută	Sensibilitatea la imipenem se poate obține numai la doze crescute de antibiotic (de exemplu, 4 x 1 g în perfuzie de 30 minute /zi sau alte regimuri de dozare care să asigure concentrații similare la locul infecției)

Meropenem	Izolate, altele decât cele din LCR, în caz de sensibilitate la expunere crescută	Sensibilitatea la meropenem se poate obține numai la doze crescute de antibiotic (de exemplu, 3 x 2 g în perfuzie de 3 ore /zi sau alte regimuri de dozare care să asigure concentrații similare la locul infecției) .
Levofloxacină	Sensibilitate la expunere crescută	Sensibilitatea la levofloxacină se poate obține numai la doze crescute de antibiotic (de exemplu, 2 x 0,5 g /zi po sau 2 x 0,5 g iv/zi sau alte regimuri de dozare care să asigure concentrații similare la locul infecției) .
Ciprofloxacină	Sensibilitate la expunere crescută	Sensibilitatea la ciprofloxacină se poate obține numai la doze crescute de antibiotic (de exemplu, 2 x 0,75 g iv/zi po sau 3 x 0,4 g iv/zi sau alte regimuri de dozare care să asigure concentrații similare la locul infecției) .
<i>Enterobacter</i> spp., <i>K. aerogenes</i> , <i>Citrobacter freundii</i> complex (<i>C. freundii</i> , <i>C. youngae</i> , <i>C. braakii</i> , <i>C. werkmanii</i> , <i>C. gillanii</i> , <i>C. murlinae</i> and <i>C. pasteurii</i>), <i>Hafnia alvei</i>	Sensibil la cefalosporine de generația III	În cazul monoterapiei cu cefalosporine de generația 3 sau în cazul utilizării combinației acestora cu aminoglicozide există riscul selectării rezistenței.
<i>Serratia</i> spp., <i>Morganella</i> spp., <i>Providencia</i> spp.	Sensibil la cefalosporine de generația III	În cazul monoterapiei cu cefalosporine de generația 3 există riscul selectării rezistenței.

Tabelul 8. Comentarii pentru *Pseudomonas aeruginosa*

Antibiotice/specii bacteriene	Condiție	Comentarii
Aminoglicozide (amikacină, tobramicină)	Sensibilitate raportată (izolate altele decât cele din urină)	Aminoglicozidele se utilizează doar în asocieri cu alte intervenții terapeutice (asocieri de antibiotice, intervenții chirurgicale, etc.).
Amikacină	Sensibilitate raportată (izolate altele decât cele din urină)	Sensibilitatea față de amikacină se poate obține numai la doze de antibiotic: 1 x 25-30 mg/kg iv/zi.
Colistin	Sensibilitate raportată în caz de infecții sistemice	În infecții sistemice este necesară asocierea colistinului cu alte intervenții terapeutice (asocieri de agenți antimicrobieni, eliminarea sursei, etc).
Colistin	Sensibilitate raportată în caz de alte infecții decât cele sistemice	Se recomandă administrarea colistinului în combinație cu alți agenți antimicrobieni cu scopul de a potența efectul sau de a lărgi spectrul de activitate.
Piperacilină/tazobactam	Sensibilitate la expunere crescută raportată	Sensibilitatea față de piperacilină/tazobactam se poate obține numai la doze crescute de antibiotic (de exemplu, 4 x (4 g piperacilină + 0.5 g tazobactam)/zi în perfuzii de câte 3 ore sau alte regimuri de dozare care să asigure concentrații similare la locul infecției) .
Cefepimă	Sensibilitate la expunere crescută raportată	Sensibilitatea la cefepimă se poate obține numai la doze crescute de antibiotic (de exemplu, 3 x 2 g iv/zi sau alte regimuri de dozare care să asigure concentrații similare la locul infecției) .

Ceftazidimă	Sensibilitate la expunere crescută raportată	Sensibilitatea la ceftazidimă se poate obține numai la doze crescute de antibiotic (de exemplu, 3 x 2 g iv/zi sau 6 x 1 g iv/zi sau alte regimuri de dozare care să asigure concentrații similare la locul infecției) .
Ciprofloxacină	Sensibilitate la expunere crescută raportată	Sensibilitatea la ciprofloxacină se poate obține numai la doze crescute de antibiotic (de exemplu, 2 x 0,75 g po/zi sau 3 x 0,4 g iv/zi sau alte regimuri de dozare care să asigure concentrații similare la locul infecției)
Imipenem	Sensibilitate la expunere crescută raportată	Sensibilitatea la imipenem se poate obține numai la doze crescute de antibiotic (de exemplu, 4 x 1 g în perfuzie de 30 minute /zi sau alte regimuri de dozare care să asigure concentrații similare la locul infecției)
Levofloxacină	Sensibilitate la expunere crescută raportată	Sensibilitatea la levofloxacină se poate obține numai la doze crescute de antibiotic (de exemplu, 2 x 0,5 g po/zi sau 2 x 0,5 g iv /zi sau alte regimuri de dozare care să asigure concentrații similare la locul infecției) .
Meropenem	Izolate, altele decât cele din LCR, în caz de sensibilitate la expunere crescută	Sensibilitatea la meropenem se poate obține numai la doze crescute de antibiotic (de exemplu, 3 x 2 g în perfuzie de 3 ore /zi sau alte regimuri de dozare care să asigure concentrații similare la locul infecției) .

Tabelul 9. Comentarii pentru *Acinetobacter baumannii*

Antibiotice/specii bacteriene	Condiție	Comentarii
Meropenem	Izolate, altele decât cele din LCR, în caz de sensibilitate la expunere crescută	Sensibilitatea la meropenem se poate obține numai la doze crescute de antibiotic (de exemplu, 3 x 2 g în perfuzie de 3 ore /zi sau alte regimuri de dozare care să asigure concentrații similare la locul infecției) .
Imipenem	Sensibilitate la expunere crescută raportată	Sensibilitatea la imipenem se poate obține numai la doze crescute de antibiotic (de exemplu, 4 x 1 g în perfuzie de 30 minute /zi sau alte regimuri de dozare care să asigure concentrații similare la locul infecției).
Colistin	Sensibilitate raportată în caz de infecții sistemice	În infecții sistemice este necesară asocierea colistinului cu alte intervenții terapeutice (asocieri de agenți antimicrobieni, eliminarea sursei, etc).
Colistin	Sensibilitate raportată în caz de alte infecții decât cele sistemice	Se recomandă administrarea colistinului în combinație cu alți agenți antimicrobieni cu scopul de a potența efectul sau de a lărgi spectrul de activitate.
Ciprofloxacină	Sensibilitate la expunere crescută raportată	Sensibilitatea la ciprofloxacină se poate obține numai la doze crescute de antibiotic (de exemplu, 2 x 0,75 g po/zi sau 3 x 0,4 g iv/zi sau alte regimuri de dozare care să asigure concentrații similare la locul infecției) .
Levofloxacină	Sensibilitate la expunere crescută raportată	Sensibilitatea la levofloxacină se poate obține numai la doze crescute de antibiotic (de exemplu, 2 x 0,5 g po/zi sau 2 x 0,5 g iv /zi sau alte regimuri de dozare care să asigure concentrații similare la locul infecției) .

Aminoglicozide (amikacină, gentamicină, tobramicină)	Sensibilitate raportată ((izolate altele decât cele din urină)	Aminoglicozidele se utilizează doar în asociere cu alte intervenții terapeutice (asociere de antibiotice, intervenții chirurgicale, etc.).
Amikacină	Sensibilitate raportată (izolate altele decât cele din urină)	Sensibilitatea față de amikacină se poate obține numai la doze de antibiotic: 1 x 25-30 mg/kg iv/zi.
Gentamicină	Sensibilitate raportată (izolate altele decât cele din urină)	Sensibilitatea față de gentamicină se poate obține numai la doze de antibiotic: 1 x 6-7 mg/kg iv/zi.
Trimetoprim/sulfametoxazol	Sensibilitate la expunere crescută	Sensibilitatea la trimetoprim/sulfametoxazol se poate obține numai la doze crescute de antibiotic (de exemplu, 2 x (0,24 g trimetoprim + 1,2 g sulfametoxazol) po/zi sau alte regimuri de dozare care să asigure concentrații similare la locul infecției) .

Tabelul 10. Comentarii pentru *Stenotrophomonas maltophilia*

Antibiotice/specii bacteriene	Condiție	Comentarii
<i>S. maltophilia</i>	În toate situațiile	Trimetoprim/sulfametoxazol este singurul antibiotic eficient <i>in vivo</i> ce se poate testa <i>in vitro</i> . În caz de rezistență la acest antibiotic, conform literaturii de specialitate, în terapie ar mai putea fi utilizate levofloxacina, ceftazidima, ticarcilina/acid clavulanic, tigeciclina.
Trimetoprim/sulfametoxazol	Sensibil la expunere crescută	Sensibilitatea la trimetoprim/sulfametoxazol se poate obține numai la doze crescute de antibiotic (de exemplu, 2 x (0,24 g trimetoprim + 1,2 g sulfametoxazol) po/zi sau alte regimuri de dozare care să asigure concentrații similare la locul infecției) .

Tabelul 11. Comentarii pentru *Staphylococcus aureus* și stafilococi coagulazo-negativi

Antibiotice/specii bacteriene	Condiție	Comentarii
Oxacilină	Screening cefoxitină negativ NU se raportează rezultatul testării la cefoxitin! și Penicilină sensibil	Tulpina cu fenotip meticilino-sensibil neproducătoare de beta-lactamază. Tulpina este sensibilă la betalactaminele utilizate în tratamentul infecțiilor stafilococice inclusiv la penicilină, ampicilină, amoxicilină. A se evita cefotaxima și ceftriaxona, dacă se alege în terapie se indică doar în doză crescută; nu se utilizează: ceftazidimă, cefiximă, ceftibuten și ceftolozan/tazobactam.
Oxacilină	Screening cefoxitină negativ NU se raportează rezultatul testării la cefoxitin! și Penicilină rezistent	Tulpina cu fenotip meticilino-sensibil producător de beta-lactamază, rezistentă la penicilină, amoxicilină, ampicilină. Tulpina este sensibilă la betalactaminele utilizate în tratamentul infecțiilor stafilococice (oxacilină, cefazolina). A se evita cefotaxima și ceftriaxona, dacă se alege în terapie se indică doar în doză crescută; nu se utilizează: ceftazidimă, cefiximă, ceftibuten și ceftolozan/tazobactam.
Oxacilină	Screening cefoxitină pozitiv NU se raportează rezultatul testării la cefoxitin!	MRS - stafilococ meticilino-rezistent - tulpina este rezistentă la toate antibioticele beta lactamice: peniciline, cefalosporine și carbapeneme, inclusiv la cele combinate cu inhibitori de beta-lactamază.

Penicilină	SCN Nu se raportează (Majoritatea tulpinilor sunt rezistente fie prin producere de beta-lactamază, fie prin modificarea PBP. Metodele existente nu detectează în toate situațiile producerea de beta-lactamază).	
Clindamicină	Rezistență inductibilă – izolate din infecții de părți moi de severitate medie sau ușoară Se raportează rezistent*!	*Clindamicina se poate totuși utiliza în terapia de scurtă durată a infecțiilor ușoare și medii ale țesuturilor moi, deoarece dezvoltarea rezistenței constitutive este improbabilă în cazul acestor terapii.
	Rezistență inductibilă – izolate din alte infecții decât cele de părți moi. Se raportează rezistent.	
Oxacilină	Sensibil	În infecții severe sau în cazul concentrării inadecvate a antibioticului la locul infecției se recomandă administrarea oxacilinei în doză crescută: 6 x 1 g iv sau chiar 6 x 2 g iv.
Eritromicină	Screening negativ	Testarea la eritromicină este valabilă și pentru claritromicină și azitromicină.
Tetraciclina	Sensibil	Testarea la tetraciclina este valabilă și pentru doxiciclina și minociclina.

Levofloxacină	Sensibil la expunere crescută	Sensibilitatea la levofloxacină se poate obține numai la doze crescute de antibiotic (de exemplu, 2 x 0,5 g po/zi sau 2 x 0,5g iv/zi sau alte regimuri de dozare care să asigure concentrații similare la locul infecției) .
Ciprofloxacină	Sensibil la expunere crescută	Sensibilitatea la ciprofloxacină se poate obține numai la doze crescute de antibiotic (de exemplu, 2 x 0,75 g iv/zi po sau 3 x 0,4 g iv/zi sau alte regimuri de dozare care să asigure concentrații similare la locul infecției) .
Aminoglicozide	Sensibilitate raportată (izolate altele decât cele din urină)	Aminoglicozidele se utilizează doar în asociere cu alte intervenții terapeutice (asociere de antibiotice, intervenții chirurgicale, etc.)
Kanamycină	Sensibilitatea se raportează la amikacină (izolate sistemice și izolate altele decât cele din urină)	Sensibilitatea față de amikacină se poate obține numai la doze de antibiotic: 1 x 25-30 mg/kg iv/zi.
Gentamicină	Sensibilitate raportată (izolate sistemice și izolate altele decât cele din urină)	Sensibilitatea față de gentamicină se poate obține numai la doze de antibiotic: 1 x 6-7 mg/kg iv/zi.
Trimetoprim/sulfametoxazol	Sensibilitate la expunere crescută	Sensibilitatea la trimetoprim/sulfametoxazol se poate obține numai la doze crescute de antibiotic (de exemplu, 2 x (0,24 g trimetoprim + 1,2 g sulfametoxazol) po/zi sau alte regimuri de dozare care să asigure concentrații similare la locul infecției)

Tabelul 12. Comentarii pentru enterococi

Antibiotice/specii bacteriene	Condiție	Comentarii
<i>Enterococcus</i> spp	În toate situațiile	Enterococii prezintă rezistență naturală față de cefalosporine, clindamicină, trimetoprim/sulfametoxazol și rezistență de nivel redus față de aminoglicozide.
Ampicilină	Sensibil	Testarea la ampicilină este valabilă și pentru amoxicilină și piperacilină/tazobactam.
Gentamicină 30 ug	Test sinergism pozitiv	Tulpină cu rezistență de nivel crescut la aminoglicozide (HLAR - high level aminoglycoside resistance). Aminoglicozidele nu sunt eficiente nici în asociere cu alte antibiotice.
	Test sinergism negativ Nu se raportează sensibil la gentamicină!	Gentamicina poate fi utilizată în terapia infecțiilor grave, însă numai asociată cu beta-lactaminele sau glicopeptidele active față de enterococi (sinergism păstrat).
<i>E. faecalis</i> sau <i>E. faecium</i>	Rezistență la vancomicină	VRE – enterococ vancomicino - rezistent

Tabelul 13. Comentarii pentru streptococi beta-hemolitici

Antibiotice/specii bacteriene	Condiție	Comentarii
Penicilină	Sensibil	Testarea penicilinei este valabilă pentru peniciline, cefalosporine, carbapeneme. Adăugarea unui inhibitor de beta-lactamază nu aduce niciun beneficiu terapeutic.
Eritromicină	Sensibil	Testarea la eritromicina este valabilă și pentru claritromicină și azitromicină.
Clindamicină	Rezistență inductibilă. Clindamicina se raportează rezistent*.	*Clindamicina se poate totuși utiliza în terapia de scurtă durată a infecțiilor ușoare și medii ale țesuturilor moi, deoarece dezvoltarea rezistenței constitutive este improbabilă în cazul acestor terapii.
	Rezistență inductibilă – izolate din alte infecții decât cele de părți moi. Clindamicina se raportează rezistent.	
Tetraciclină	Sensibil	Testarea la tetraciclină este valabilă și pentru doxiciclină și minociclină.
Levofloxacină	Sensibil la expunere crescută	Sensibilitatea la levofloxacină se poate obține numai la doze crescute de antibiotic (de exemplu, 2 x 0,5 g po/zi sau 2 x 0,5g iv/zi sau alte regimuri de dozare care să asigure concentrații similare la locul infecției) .
Trimetoprim/sulfametoxazol	Sensibilitate la expunere crescută	Sensibilitatea la trimetoprim /sulfametoxazol se poate obține numai la doze crescute de antibiotic (de exemplu, 2 x (0,24 g trimetoprim + 1,2 g sulfametoxazol) po/zi sau alte regimuri de dozare care să asigure concentrații similare la locul infecției) .

Tabelul 14. Comentarii pentru *Streptococcus pneumoniae*

Antibiotice/specii bacteriene	Condiție	Comentarii
Oxacilină screening	Screening negativ	În funcție de situația clinică se raportează selectiv sensibil față de penicilină, ampicilină, amoxicilină, amoxicilină cu acid clavulanic, cefuroximă po și iv, ceftriaxonă, cefotaximă, cefepimă, cefpodoximă, carbapeneme (în meningită a se folosi doar meropenem dintre carbapeneme).
Oxacilină screening	Screening pozitiv Vezi algoritmul diagnostic din EUCAST	
Penicilină	Sensibilitate în caz de meningită	Sensibilitatea la penicilină în cazul meningitei se poate obține la doze crescute de antibiotic (de exemplu, 6 x 4 M UI iv/zi sau alte regimuri de dozare care să asigure concentrații similare la locul infecției) .
	Pneumonie, CMI >0,06 și <=0,5 mg/L	Sensibilitatea la penicilină se poate obține la doze crescute de antibiotic (de exemplu, 4 x 2M UI iv/zi sau alte regimuri de dozare care să asigure concentrații similare la locul infecției) .
	Pneumonie, CMI >0,5 și <=1 mg/L	Sensibilitatea la penicilină se poate obține la doze crescute de antibiotic (de exemplu, 4 x 4M UI iv/zi sau 6 x 2M UI iv/zi sau alte regimuri de dozare care să asigure concentrații similare la locul infecției).
	Pneumonie, CMI >1 și <=2 mg/L	Sensibilitatea la penicilină se poate obține la doze crescute de antibiotic (de exemplu, 6 x 4M UI iv/zi sau alte regimuri de dozare care să asigure concentrații similare la locul infecției) .
Ceftriaxonă	Meningită	Sensibilitatea la ceftriaxonă în caz de meningită se poate obține la doze crescute de antibiotic (de exemplu, 2 x

		2 g iv/zi sau 4 x 1 g iv/zi sau alte regimuri de dozare care să asigure concentrații similare la locul infecției) .
Cefotaximă	Meningită	Sensibilitatea la cefotaximă în caz de meningită se poate obține la doze crescute de antibiotic (de exemplu, 4 x 2 g iv/zi sau alte regimuri de dozare care să asigure concentrații similare la locul infecției) .
Eritromicină	Sensibil	Testarea la eritromicină este valabilă și pentru claritromicină și azitromicină.
Clindamicină	Rezistență inductibilă Clindamicina se raportează rezistent.	
Levofloxacină	Sensibil la expunere crescută	Sensibilitatea la levofloxacină se poate obține numai la doze crescute de antibiotic(de exemplu, 2 x 0,5 g po/zi sau 2 x 0,5g iv/zi sau alte regimuri de dozare care să asigure concentrații similare la locul infecției) .
Norfloxacină screening	Screening negativ: se raportează sensibil față de moxifloxacină și sensibil la expunere crescută față de levofloxacină (cu menționarea dozelor adecvate).	Sensibilitatea la levofloxacină se poate obține numai la doze crescute de antibiotic (de exemplu, 2 x 0,5 g po/zi sau 2 x 0,5g iv/zi sau alte regimuri de dozare care să asigure concentrații similare la locul infecției) .
	Screening pozitiv: se raportează rezistență față de moxifloxacină și levofloxacină.	
Tetraciclină	Sensibil	Testarea la tetraciclină este valabilă și pentru doxiciclină și minociclină.

Tabelul 15. Comentarii pentru streptococii din grupul viridans

Antibiotice/specii bacteriene	Condiție	Comentarii
Penicilină	Screening negativ Se raportează selectiv în funcție de situația clinică (localizarea infecției)	Tulpina este sensibilă la penicilină, ampicilină, amoxicilină.
	Screening pozitiv Se testează individual beta-lactaminele pentru care există diametre interpretative și se raportează conform rezultatului testării.	
Moxifloxacină	Endocardită Este necesara testare prin metode cantitative	Nu există criterii interpretative ale sensibilității față de moxifloxacină. Cu toate acestea, moxifloxacina este folosită în tratamentul endocarditei pentru trecerea la terapia po. O valoare de sub 0,5 mg/L a CMI indică un fenotip sălbatic (exclue prezența unui mecanism de rezistență).

Tabelul 16. Comentarii pentru *Haemophilus influenzae*

Antibiotice/specii bacteriene	Condiție	Comentarii
Penicilină	Screening negativ (nu se raportează penicilina!)	Tulpina este sensibilă la ampicilină, amoxicilină.
	Screening pozitiv Vezi algoritmul diagnostic din EUCAST	
Cefuroximă	În toate situațiile	Pentru tratament po se recomandă doză crescută (de exemplu, 2 x 0,5 g po/zi sau alte regimuri de dozare care să asigure concentrații similare la locul infecției) .

	Sensibilitate la expunere crescută	Sensibilitatea la cefuroximă se poate obține numai la doze crescute de antibiotic (de exemplu, 3 x 1,5 g iv/zi sau alte regimuri de dozare care să asigure concentrații similare la locul infecției).
Amoxicilină cu acid clavulanic	În toate situațiile	Pentru tratament po se recomandă doză crescută (de exemplu, 3 x (0.875 g amoxicilina + 0.125 acid clavulanic) po/zi sau alte regimuri de dozare care să asigure concentrații similare la locul infecției) .
Acid nalidixic	Screening negativ: se raportează selectiv (la nevoie): sensibil la moxifloxacină, levofloxacină, ofloxacină.	
	Screening pozitiv: se testează individual fluorochinolonele de interes.	
Trimetoprim/sulfametoxazol	Sensibilitate la expunere crescută	Sensibilitatea la trimetoprim/sulfametoxazol se poate obține numai la doze crescute de antibiotic (de exemplu, 2 x (0,24 g trimetoprim + 1,2 g sulfametoxazol) po/zi sau alte regimuri de dozare care să asigure concentrații similare la locul infecției) .
Tetraciclină	Sensibil	Testarea la tetraciclină este valabilă și pentru doxiciclină și minociclină.
	Sensibil la expunere crescută	Sensibilitatea față de tetraciclină se poate obține numai la doze crescute de antibiotic (de exemplu, 4 x 0,5 g po/zi sau alte regimuri de dozare care să asigure concentrații similare la locul infecției) .

Tabelul 17. Comentarii pentru *Moraxella catarrhalis*

Antibiotice/specii bacteriene	Condiție	Comentarii
Ceftriaxonă	Sensibilitate la expunere crescută	Sensibilitatea la ceftriaxonă se poate obține numai la doze crescute de antibiotic (de exemplu, 2 x 2 g/zi sau 4x1 g iv/zi sau alte regimuri de dozare care să asigure concentrații similare la locul infecției) .
Cefuroximă	În toate situațiile	Pentru tratament po se recomandă doză crescută (de exemplu, 2 x 0,5 g po/zi sau alte regimuri de dozare care să asigure concentrații similare la locul infecției) .
	Sensibilitate la expunere crescută	Sensibilitatea la cefuroximă se poate obține numai la doze crescute de antibiotic (de exemplu, 3 x 1,5 g iv/zi sau alte regimuri de dozare care să asigure concentrații similare la locul infecției).
Acid nalidixic	Screening negativ: se raportează selectiv (la nevoie): sensibil la moxifloxacină, levofloxacină, ofloxacină.	
	Screening pozitiv: Se testează individual fluorochinolonele de interes.	
Trimetoprim/sulfametoxazol	Sensibilitate la expunere crescută	Sensibilitatea la trimetoprim/sulfametoxazol se poate obține numai la doze crescute de antibiotic (de exemplu, 2 x (0,24 g trimetoprim + 1,2 g sulfametoxazol) po/zi sau alte regimuri de dozare care să asigure concentrații similare la locul infecției).

Eritromicină	Sensibil sau rezistent (izolatele rezistente la eritromicină pot fi testate individual la claritromicină sau azitromicină sau pot fi raportate ca rezistente)	Testarea la eritromicină este valabilă și pentru claritromicină și azitromicină.
--------------	---	--

Tabelul 18. Comentarii pentru *Campylobacter jejuni/coli*

Antibiotice/specii bacteriene	Condiție	Comentarii
Ciprofloxacină	Sensibil la expunere crescută	Sensibilitatea la ciprofloxacină se poate obține numai la doze crescute de antibiotic (de exemplu, 2 x 0,75 g iv/zi po sau 3 x 0,4 g iv/zi sau alte regimuri de dozare care să asigure concentrații similare la locul infecției) .

XII. Bibliografie

Documentele EUCAST de pe site-ul: www.eucast.org

Dintre documentele EUCAST au fost traduse:

- *EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance, version 2.0, 2017.*
https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Resistance_mechanisms/EUCAST_detection_of_resistance_mechanisms_170711.pdf
- *Antimicrobial susceptibility testing EUCAST disk diffusion method . version 10.0, 2022.*
https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Disk_test_documents/2022_manuals/Manual_v_10.0_EUCAST_Disk_Test_2022.pdf

"These documents have been produced in part under ECDC service contracts and made available by EUCAST at no cost to the user and can be accessed on the EUCAST website www.eucast.org. EUCAST recommendations are frequently updated and the latest versions are available at www.eucast.org."

Magiorakos AP, Srinivasan A, R. Carey RB, et al: Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect* 2012; 18: 268–281.

Ghid de asigurarea calității rezultatelor în laboratorul de microbiologie

I. Controlul intern de calitate

Controlul intern al calității se referă la toate procedurile întreprinse de un laborator pentru evaluarea continuă a activității sale. Principalul obiectiv este de a asigura coerența rezultatelor de zi cu zi și conformitatea lor cu criteriile definite.

Este necesar un program de verificări periodice pentru a demonstra că variabilitatea (adică diferența între analiști, între echipamente sau reactivi etc.) este sub control. Trebuie să fie acoperite toate testele incluse în lista laboratorului. Programul de control intern al calității poate implica:

- utilizarea materialelor de referință (inclusiv materiale de testare a schemei de testare a competenței);
- testări de repetabilitate, inclusiv numărarea coloniilor de către doi analiști, utilizarea materialelor de control din kit-urile comerciale, conform indicațiilor din insertul trusei.

Opțional, programul de control intern mai poate să conțină:

- utilizarea eșantioanelor cu niveluri variabile de contaminare, inclusiv microorganisme țintă și flora de însoțire;
- utilizarea eșantioanelor contaminate natural din diferite tipuri de matrice.

Programul trebuie să fie adaptat la frecvența efectivă a testelor de laborator efectuate. Este recomandat ca, acolo unde este posibil, testele de rutină să includă controale pentru monitorizarea performanței. De asemenea, este recomandat ca datele rezultate din analiza materialelor de referință și a eșantioanelor să fie analizate pentru a ajuta la evaluarea tendințelor.

În cazuri speciale, pentru teste care sunt solicitate foarte rar, poate fi mai potrivită o schemă de demonstrare a performanței care se realizează în paralel cu testarea probelor de pacienți.

Utilizarea materialelor de referință

Sunt necesare tulpini de referință trasabile pentru stabilirea performanței acceptabile a mediilor de cultură (inclusiv truse de testare), pentru validarea metodelor și pentru evaluarea continuă a performanței. Ca să demonstreze trasabilitatea, laboratoarele trebuie să utilizeze tulpini de referință obținute direct dintr-o colecție națională sau internațională recunoscută, acolo unde acestea există. Dacă nu sunt disponibile tulpini de referință trasabile, pot fi utilizate derivatele comerciale trasabile acestora.

Utilizarea materialului de referință adecvat împreună cu procedura de testare este esențială pentru a se asigura calitatea rezultatelor. Sunt necesare controale adecvate pentru a se asigura că testul funcționează în limite definite. Dacă materialul de referință nu reușește să dea un rezultat pozitiv sau negativ (după caz) pentru testul pentru care este utilizat, atunci validitatea rezultatelor este discutabilă. În acest caz, trebuie să fie investigat motivul pentru care rezultatul controlului intern nu este cel așteptat și, dacă este necesar, testul trebuie să fie repetat. Trebuie realizată și o

verificare a procedurii respective de testare. Utilizarea controalelor este recunoscută ca o bună practică de laborator și este parte a oricărui proces de acreditare.

Este indicată efectuarea pasajelor săptămânale ale tulpinilor de referință, atât pentru a menține caracteristicile microorganismelor, precum și pentru a înregistra toate subculturile pe un formular de evidență. Este important să verificați și să vă asigurați că microorganismele de control dau rezultatele corecte înainte de utilizarea de rutină. Orice rezultat eronat trebuie să fie investigat.

Subcultura repetată a culturii stoc de lucru

Cultura stocului de lucru nu trebuie subcultivată decât dacă acest lucru este definit printr-o metodă standard sau dacă laboratoarele pot furniza dovezi documentate că nu a existat nici o modificare a caracteristicilor biologice relevante. Cu toate acestea, trebuie menționat că stocurile de lucru nu trebuie să fie subcultivate pentru a înlocui stocurile de referință. Derivatele comerciale ale tulpinilor de referință pot fi utilizate numai pentru obținerea culturilor de lucru, din ele nu se pot face subculturi pentru a obține stocuri de referință.

Modul de lucru

- Materialul de referință trebuie rehidratat imediat după primire, în conformitate cu recomandările producătorului (ATCC, NCTC sau echivalent). Laboratoarele trebuie să aibă în vedere că **unele materiale de referință pot avea instrucțiuni specifice producătorului, care trebuie să fie luate în considerare.**
- Materialul de referință trebuie subcultivat pe un mediu de cultură non-selectiv adecvat și incubarea să se facă la temperatura și atmosfera corecte.
- În cazul în care cultura (care este prima generație directă a materialului de referință) trebuie să fie depozitată pentru utilizare ulterioară, acest lucru trebuie făcut în așa fel încât să se asigure un nivel optim de recuperare. Se sugerează utilizarea criotuburilor cu perle de tip Cryovials™ sau similar, care conțin un crioconservant.

Aceste criotuburi trebuie să fie inoculate cu o cultură tânără (de 18-24 de ore) la un standard de aproximativ de 3-4 McFarland.

Flaconul trebuie închis ermetic și răsturnat de 4-5 ori pentru suspensionarea microorganismelor. Nu se vortexează.

- Excesul de lichid crioconservant trebuie aspirat cu o pipetă sterilă prin înclinarea bilelor, astfel încât să se extragă cât mai mult lichid. Închideți din nou flaconul.
- Etichetați flaconul cu numărul de stocare corespunzător, ATCC, NCTC (sau echivalent) numărul, numele și data. Aceste mărgelile constituie stocurile de mărgelile de referință și sunt depozitate la -70 sau -80 °C.
- În condiții aseptice, se deschide criotubul și cu un ac sau o pensă sterilă, se scoate o perlă. Perla poate fi descărcată direct prin rostogolire pe un mediu de cultură adecvat. Plăcile trebuie să fie etichetate clar cu numele microorganismului, data subculturii și numărul ATCC, NCTC (sau echivalent). Culturile pe plăci trebuie preparate săptămânal sau la fiecare două săptămâni după procedura de mai sus.
- În fiecare săptămână subcultivați o bilă din flaconul în uz pe un mediu de cultură neselectiv corespunzător și verificați puritatea.
- Din această cultură pură, pregătiți câte o subkultură pentru fiecare zi a săptămânii.
- **Pentru organismele pretențioase care nu vor supraviețui pe plăci timp de o săptămână, subcultivați tulpina în serie de la o zi la alta.**

- Tulpinile QC pot fi subcultivate pentru maxim șase zile, apoi aruncați plăcile și pregătiți o nouă placă din flaconul congelat.
- Când flaconul în uz este epuizat, subcultați din flaconul de stoc și pregătiți un alt flacon în uz din subkultură.
- **Când subcultați, utilizați mai multe colonii pentru a evita selectarea unui mutant.**
Această placă proaspăt preparată este „cultura stocului de lucru”. Trebuie remarcat faptul că stocurile de lucru nu trebuie subcultivate pentru a înlocui stocurile de referință.

Controlul de calitate al reactivilor și al mediilor de cultură

Trebuie ținută evidența reactivilor utilizați în laborator, cu înregistrarea condițiilor de păstrare, termene de garanție, utilizarea în ordinea termenelor de valabilitate.

Laboratoarele trebuie să se asigure că reactivii utilizați au calitatea necesară pentru testul pentru care sunt utilizați.

Fiecare lot de reactivi trebuie verificat, atât inițial cât și în timpul perioadei sale de valabilitate, pentru reacțiile pozitive și negative, folosind microorganisme de control din colecții recunoscute național sau internațional.

Mediile de cultură preparate în laborator

Performanța adecvată a mediilor de cultură, diluanții și alte lichide utilizate pentru suspensionare preparate in-house trebuie verificate, în legătură cu:

- recuperarea sau menținerea supraviețuirii microorganismelor țintă;
- inhibarea sau suprimarea microorganismelor non-țintă;
- proprietăți biochimice (diferențiale și diagnostice);
- proprietăți fizice (de exemplu, pH, volum și sterilitate).

Materiile prime (medii comerciale deshidratate și constituenți individuali) trebuie să fie depozitate în condiții adecvate, de ex. la rece, ferit de umiditate și întuneric.

Toate recipientele, în special cele pentru medii deshidratate, trebuie să fie etanșe.

Mediile deshidratate care sunt solidificate, recipient crăpat sau prezintă o schimbare de culoare, nu trebuie să fie utilizate. Pentru prepararea mediilor de cultură trebuie utilizate, cu excepția cazului în care metoda de testare specifică altfel, apă distilată, apă deionizată sau produsă prin osmoză inversă, liberă de substanțe bactericide, inhibitori sau substanțe care pot interfera cu testul respectiv.

Medii de cultură gata turnate

Toate mediile de cultură, inclusiv diluanții și alte lichide de suspensie procurate gata de utilizare sau parțial, necesită evaluarea performanței înainte de utilizare la fel ca mediile de cultură preparate in-house.

În cazul în care producătorul este acoperit de un sistem de calitate recunoscut (adică ISO 9000) și prezintă informații relevante (certIFICATE) privind controlul de calitate conform ISO 11133, mediile de cultură și soluțiile trebuie să fie verificate pentru acceptabilitate, dar nu este necesară repetarea controlului de calitate. Procedurile de verificare ale laboratorului utilizator pot include

doar verificări inițiale de acceptabilitate pentru fiecare producător nou și verificări indirecte prin procedurile interne de control al calității (în timpul procedurilor de utilizare a tulpinilor de referință).

Laboratorul trebuie să își stabilească propriile criterii de acceptabilitate care să se bazeze pe informațiile cuprinse în certificatele de calitate:

- numele componentei de bază și lista componentelor, inclusiv orice suplimente;
- termenul de valabilitate și criteriile de acceptabilitate aplicate;
- condiții de depozitare;
- verificarea sterilității;
- verificarea creșterii controlului țintă cu criteriile de acceptabilitate;
- verificări fizice cu criteriile de acceptabilitate.

Utilizatorul trebuie să se asigure că va fi notificat de către producător pentru orice modificare a specificațiilor de calitate.

Tabelul 1. Recomandări privind testarea mediilor de cultură și reactivilor

Reactivul	Condiții urmărite	Frecvența	Observații
Medii de cultură cu aditivi după sterilizare	Sterilitate, pH, proprietăți nutritive, eficiență selectivă, reacții de identificare	Fiecare șarjă	Se vor utiliza tulpini de control, martor pozitiv și martor negativ
Medii de cultură fără aditivi după sterilizare	pH, proprietăți nutritive, eficiență selectivă, reacții de identificare	Fiecare șarjă preparată în laborator, fiecare lot comercial	Se vor utiliza tulpini de control, martor pozitiv și martor negativ
Coloranți și colorații	Diferențierea afinităților tinctoriale	Fiecare lot și colorație	Se vor utiliza tulpini de control, martor pozitiv și martor negativ
Reactivi pentru antibiograme, mediul Mueller Hinton		Fiecare lot	Conform ghidului EUCAST
Microcomprimate cu antibiotice	Diametrul zonelor de inhibiție pentru tulpinile de referință	Fiecare testare	Conform ghidului EUCAST
Reactivi organici, anorganici	Reacția urmărită	Fiecare lot	Martor pozitiv și martor negativ
Truse comerciale	Se vor respecta instrucțiunile din insert referitoare la controlul intern de calitate	Fiecare lot sau la deschiderea fiecărei truse	Conform instrucțiunilor producătorului

Etichetare

Laboratoarele trebuie să se asigure că toți reactivii (inclusiv soluții stoc), medii de cultură, diluanți și alte lichide de suspensionare sunt etichetate în mod corespunzător, pentru a evidenția, după caz, identitatea produsului, concentrația, condițiile de depozitare, data deschiderii, data preparării, data de expirare și/sau timpul de depozitare recomandat. Persoana responsabilă de prepararea reactivului trebuie să fie identificabilă din înregistrări.

Testarea discurilor de antibiotice

La implementare se recomandă o perioadă de 2 luni de instruire și testare.

Pentru o perioadă de cel puțin 1 lună de la implementare se înregistrează toate valorile și se efectuează histogramele care să fie comparate cu diagramele de distribuție disponibile pe site-ul EUCAST.

Principalele tulpini de control recomandate sunt tulpinile tipice sensibile, dar este necesar să fie folosite și tulpini rezistente pentru a confirma că metoda va detecta rezistența mediată de mecanisme de rezistență cunoscute. Pentru a controla componenta inhibitorie a discurilor combinate β -lactame-inhibitor, se recomandă tulpini specifice producătoare de β -lactamaze.

Se utilizează zilnic sau de cel puțin 4 ori pe săptămână pentru antibioticele incluse în seturile de rutină. Se testează identic cu tulpinile izolate de la pacienți. Testele de control trebuie citite și evaluate înainte de raportarea rezultatelor testelor de sensibilitate pentru izolatele clinice.

În fiecare zi în care sunt efectuate testări de control, examinați rezultatele ultimelor 20 consecutive teste. Examinați rezultatele pentru tendințe și zone care se încadrează constant peste sau sub țintă.

Dacă două teste non-consecutive sunt în afara intervalului pe aceeași parte a țintei, rezultatele testelor de susceptibilitate pentru izolate clinice pot fi raportate, dar se impune investigarea cauzei.

Dacă două teste consecutive sunt în afara intervalului sau dacă mai multe discuri sunt în afara intervalului într-o zi, investigați înainte de a raporta rezultatele testelor de sensibilitate pentru clinice izolate. Este posibil să fie necesară repetarea testelor.

Dacă nu este recunoscută rezistența unei tulpini de control rezistente, atunci suprimați rezultatele testelor de sensibilitate pentru izolate clinice, investigați și retestați.

Când investigați posibilele surse de erori, luați în considerare probleme legate de discuri antimicrobiene, medii de cultură, condiții de testare și calitatea tulpinilor de control.

În plus față de testarea de rutină QC, testați fiecare lot nou de agar Mueller-Hinton. Pentru fiecare lot nou de agar, măsurați și adâncimea agarului pentru a vă asigura că se află în limite acceptabile.

Aminoglicozidele pot dezvălui variații inacceptabile ale cationilor divalenți în mediu, tigeciclina poate dezvălui variații ale magneziului, trimetoprim/sulfametoxazolul va dezvălui probleme cu conținutul de timină și timidină, eritromicina poate dezvălui un pH inacceptabil. O adâncime a agarului deasupra sau sub limitele acceptabile vor avea ca rezultat diametre de inhibiție mai mici sau, respectiv, mai mari.

Zone de inhibiție pentru aminoglicozide cu *P. aeruginosa* ATCC 27853 sub sau peste limitele de control al calității pot indica concentrații mari sau scăzute de cationi divalenți (Ca^{2+} , Mg^{2+}).

Excesul de timină și timidină poate fi indicat prin zone de inhibiție pt trimetoprim-sulfametoxazol și *E. faecalis* ATCC 29212 sub limitele de control.

Echipamentele: întreținere, calibrare și verificarea performanței

Întreținerea echipamentelor

Întreținerea echipamentelor esențiale trebuie să fie efectuată la intervale specificate, determinate de factori precum frecvența de utilizare. Trebuie păstrate înregistrări detaliate.

Trebuie să se acorde atenție evitării contaminării încrucișate care se datorează echipamentelor, de exemplu:

- echipamentul de unică folosință trebuie să fie curat și steril atunci când este cazul;
- sticlăria refolosită trebuie curățată corespunzător și sterilizată atunci când este cazul;
- în mod ideal, laboratoarele ar trebui să aibă o autoclavă separată pentru decontaminare; cu toate acestea, o singură autoclavă este acceptabilă cu condiția să fie luate măsuri de precauție pentru separarea ciclurilor de decontaminare și sterilizare și să existe un program de curățare documentat.

În mod uzual următoarele echipamente vor fi întreținute prin curățare și întreținere, verificarea deteriorării, prin verificarea generală și, după caz, sterilizarea:

- echipamente pentru servicii generale – aparate de filtrare, recipiente din sticlă sau plastic (sticle, eprubete), cutii Petri din sticlă sau plastic, instrumente de prelevare, anse (platină, nichel/crom sau plastic de unică folosință);
- băi de apă, incubatoare, hote microbiologice, autoclave, omogenizatoare, frigidere, congelatoare;
- echipamente volumetrice - pipete, dozatoare automate;
- instrumente de măsurare - termometre, temporizatoare, balanțe, pH-metre, numărătoare de colonii.

Calibrare și verificarea performanței

Laboratorul trebuie să își stabilească un program pentru calibrarea și verificarea performanței echipamentelor care au o influență directă asupra rezultatelor testării. Frecvența unei astfel de calibrări și verificarea performanței va fi determinată prin experiență documentată, bazată pe nevoie, tipul și performanța anterioară a echipamentului.

Intervalele între calibrări și verificări trebuie să fie mai scurte decât intervalul de timp observat în care echipamentul iese în afara limitelor acceptabile.

Dispozitive de măsurare a temperaturii

În cazul în care temperatura are un efect direct asupra rezultatului unei analize sau este esențială pentru funcționarea corectă a echipamentului, dispozitivele de măsurare a temperaturii (de exemplu termocupluri și termometre de platină cu rezistență (PRT) utilizate în incubatoare și

autoclave) trebuie să fie de o calitate adecvată pentru a atinge acuratețea necesară. Este de preferat din motive de siguranță să nu fie utilizate în laborator termometrele cu mercur și toluen lichid-în-sticlă.

Calibrarea acestor dispozitive trebuie să fie trasabilă la standardele naționale sau internaționale pentru temperatură. Cu toate acestea, dacă cerințele de precizie permit, pot fi utilizate și dispozitivele de măsurare la care se poate demonstra că se conformează unor cerințe naționale sau internaționale (însoțite de certificate care să ateste acest lucru). Astfel de dispozitive pot, de exemplu, să fie utilizate pentru monitorizarea frigiderelor și congelatoarelor și, de asemenea, pentru termostate și băi de apă acolo unde toleranța acceptabilă în jurul temperaturii țintă permite. Este necesară verificarea performanței acestor dispozitive.

Incubatoare, băi de apă

Stabilitatea temperaturii, uniformitatea distribuției temperaturii și timpul necesar pentru a atinge condiții de echilibru în termostate, băi de apă, camere cu temperatură controlată vor fi stabilite inițial și apoi periodic, la o frecvență documentată. Constanța caracteristicilor înregistrate în timpul validării inițiale a echipamentului se verifică și se înregistrează după fiecare reparare sau modificare semnificativă. Laboratoarele trebuie să monitorizeze zilnic sau în funcție de utilizare, temperatura de funcționare a acestui tip de echipament și să păstreze înregistrări.

Greutăți și balanțe

Greutățile și balanțele trebuie calibrate în mod trasabil la intervale regulate (în conformitate cu scopul pentru care sunt utilizate).

Echipamente volumetrice

Echipamentele volumetrice, cum ar fi dozatoare automate, dozatoare/diluatoare, pipetele manuale sau mecanice și pipetele de unică folosință pot fi utilizate în laboratorul de microbiologie. Laboratoarele trebuie să efectueze verificarea inițială a echipamentului volumetric și apoi se fac verificări periodice pentru a se asigura că echipamentul funcționează în limitele de specificație cerute. Verificarea nu este necesară pentru sticlăria care este însoțită de certificat în care se precizează o toleranță anume.

Echipamentul trebuie să fie verificat pentru precizia volumului obținut față de volumul setat (pentru mai multe setări diferite în cazul instrumentelor cu volum variabil) și trebuie măsurată precizia volumelor măsurate în mod repetat.

Pentru echipamentele volumetrice de unică folosință, laboratoarele ar trebui să se aprovizioneze de la producători care lucrează într-un sistem de calitate. După validarea inițială a adecvării echipamentului, se recomandă efectuarea unor verificări aleatorii asupra preciziei. Dacă furnizorul nu are un sistem de calitate recunoscut, laboratoarele ar trebui să verifice fiecare lot de echipamente pentru adecvare.

Alte echipamente:

Conductometre, oxigenometre, pH-metre și alte instrumente similare trebuie verificate în mod regulat sau înainte de fiecare utilizare. Soluțiile tampon utilizate pentru verificare trebuie stocate în condiții adecvate și trebuie să fie marcate cu o dată de expirare. Acolo unde umiditatea

este importantă pentru rezultatul testului, higrometrele trebuie să fie calibrate, calibrarea fiind trasabilă la standarde naționale sau internaționale.

În cazul în care în procedurile de testare sunt utilizate centrifugi, trebuie făcută o evaluare a influenței forței centrifuge. Acolo unde forța de centrifugare este critică, centrifuga necesită calibrare.

II. Evaluarea externă a calității

Laboratoarele trebuie să participe în mod regulat la testarea competenței (proficiency testing - PT), relevantă pentru domeniul lor de aplicare. Schemele de testare a competenței trebuie să utilizeze matrici adecvate, corespunzătoare cu testele efectuate de rutină în laborator.

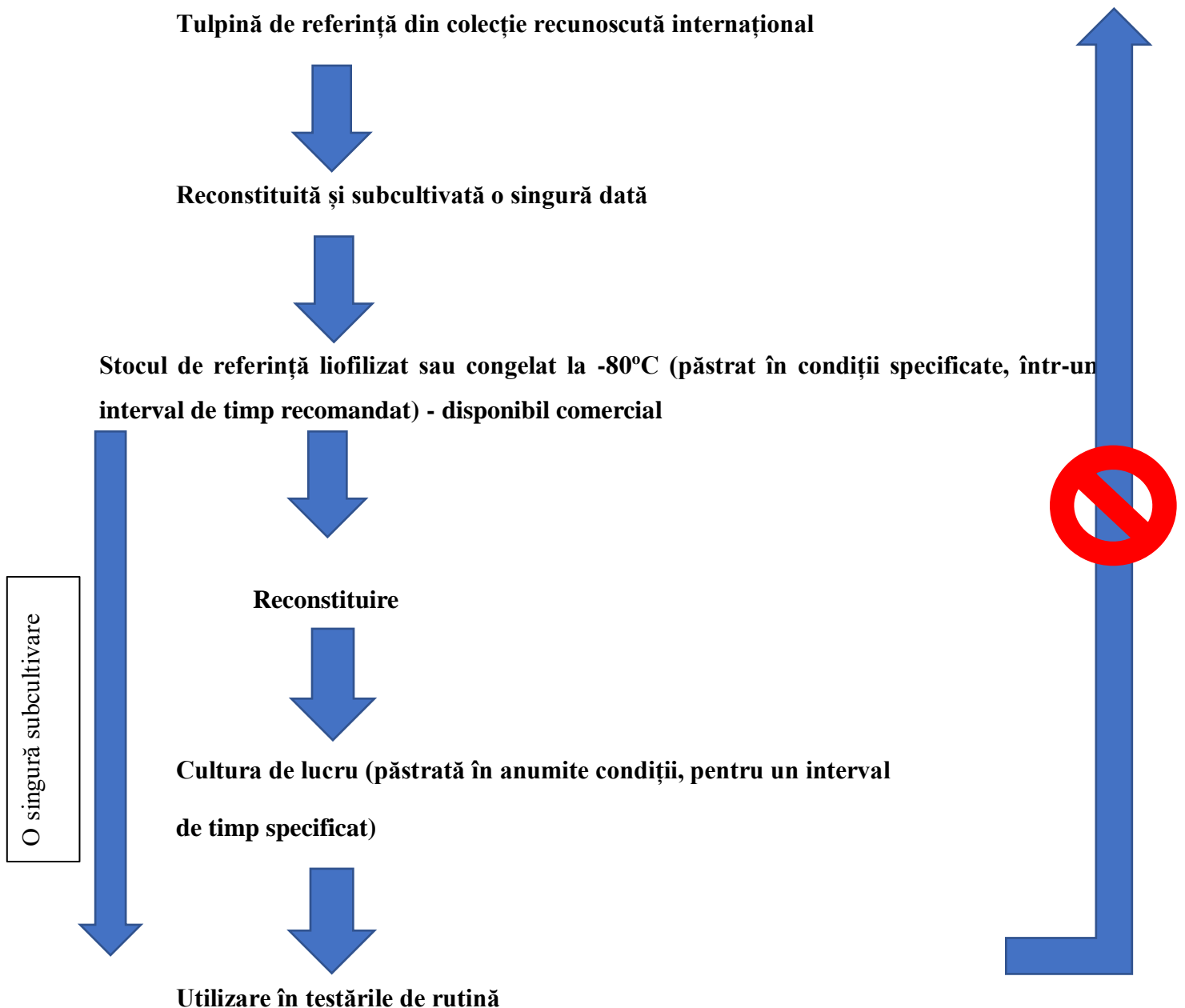
Pentru verificarea competenței privind testarea sensibilității la antibiotice, laboratorul trebuie să participe la scheme care evaluează capacitatea sa de a depista mecanisme de rezistență. În acest scop în schema de testare să fie incluse tulpini bacteriene care prezintă diverse mecanisme de rezistență cu relevanță clinică, de exemplu:

- tulpini de enterobacterii producătoare de ESBL, AmpC,
- tulpini de enterobacterii producătoare de carbapenemaze,
- bacili Gram-negativi rezistenți la colistin,
- enterococi rezistenți la glicopeptide,
- *Streptococcus pneumoniae* cu sensibilitate scăzută față de penicilină,
- *Staphylococcus aureus* rezistent la meticilină.

Frecvența recomandată este de cel puțin o participare pe an pentru fiecare mecanism de rezistență din cele enumerate.

Prelucrarea materialelor de control trebuie să se facă în mod similar cu prelucrarea probelor de pacienți, cu respectarea criteriilor de implicare etiologică și alegerea setului de antibiotice în funcție de matrice și de sindromul infecțios investigat.

Anexa nr. 1. Schemă privind pregătirea și depozitarea tulpinilor de referință



III. Bibliografie

Buiuc D, Negut M: Tratat de microbiologie clinică. Ediția III, Editura Medicală, 2017.

Eleftheriadou M, Tsimillis KC: Eurachem guide, Accreditation for Microbiological Laboratories, Second edition (2013), ISBN: 978-91 -87017-92-6. Available from [ww.eurachem.org](http://www.eurachem.org)

Public Health England. (2019). Example reference strains for UK SMI test procedures. UK Standards for Microbiology Investigations. TP 1 Issue 3. <https://www.gov.uk/uk-standards-for-microbiology-investigations-smi-quality-and-consistency-in-clinical-laboratories>

SR EN ISO 15189:2013 Laboratoare medicale. Cerințe pentru calitate și competență.

Diagnosticul microbiologic al infecțiilor sistemice - hemocultura

I. Introducere

Hemocultura permite identificarea agenților patogeni care determină bacteriemii sau fungemii și testarea sensibilității acestora față de antimicrobiene. Hemocultura se efectuează în regim de urgență și este una dintre cele mai importante analize efectuate în cadrul laboratorului de microbiologie. Indicațiile hemoculturii:

- Sepsis, șoc septic;
- Endocardită infecțioasă
- Infecții care se pot asocia cu bacteriemie (pneumonie, meningită, pielonefrite acute, infecții puerperale, angiocolicite, artrite septice, infecții ale arsurilor și plăgilor);
- Neutropenia febrilă;
- Febră la pacienți imunocompromiși;
- Stări febrile asociate cateterelor intravasculare, protezelor, hemodializei;
- Febră la persoanele care se întorc din călătorii în zone cu risc epidemiologic crescut pentru germeni specifici;
- Sindrom sugestiv pentru infecții cu germeni specifici (febră enterică – *Salmonella* Typhi, *Salmonella* Paratyphi, bruceloză, leptospiroză);
- Investigarea febrei de cauză necunoscută
- În cazul nou-născuților se recomandă hemocultura la cele mai mici semne clinice ale unei infecții.
- La sugarii sub vârsta de 3 luni hemocultura este indicată în toate cazurile de suspiciune de sepsis, meningocemie, febră fără focar cunoscut, investigarea unei stări febrile prelungite, infecție de tract urinar. La vârste între 3-36 de luni hemocultura poate fi luată în considerare în cazul stărilor febrile ($>39^{\circ}\text{C}$) cu sursă necunoscută în lipsa unei imunizări complete antipneumococice.

Cerințe minime în vederea unui diagnostic microbiologic eficient

Se recomandă utilizarea unui aparat de hemocultură de capacitate potrivită mărimii și specificului spitalului.

Intervalul de timp de la recoltarea probei până la eliberarea rezultatului (TAT, turnaround time, în concepție mai largă "time from vein to brain"), trebuie să fie cât mai scurt. Acesta este recomandat a fi între 2-5 zile, dar poate fi depășit în cazul unor specii fungice sau bacteriene cu creștere lentă sau în cazul endocarditelor.

Trebuie asigurate condițiile ca hemoculturile să fie preluate în orice oră a zilei și în orice zi a săptămânii și să fie incubate în cel mult 2 ore de la recoltare. După declanșarea semnalului pozitiv, hemoculturile trebuie descărcate imediat și procesul de prelucrare demarat fără întârziere. Pe parcursul diagnosticului se informează clinicianul despre pozitivarea hemoculturilor, despre caracterele morfotinctoriale ale microorganismului și alte date considerate utile din punct de vedere clinic.

Aparate de hemocultură și flacoane utilizate

Aparatele de hemocultură BactAlert și Bactec depistează creșterea bacteriană prin urmărirea nivelului de CO₂ în flaconul însămânțat.

VersaTREK monitorizează creșterea bacteriană prin detectarea schimbărilor de presiune din flaconul însămânțat.

Aceste sisteme folosesc flacoane de hemocultură speciale, compatibile doar cu aparatul propriu având compoziție specifică a mediului de cultură ce permite o bună recuperare a bacteriilor, inclusiv a celor pretențioase și a unor levuri.

Avantajul lor față de metodele clasice este că evidențiază creșterea în flacoanele însămânțate fără a fi nevoie de deschiderea, manevrarea lor, prevenind astfel contaminarea hemoculturilor în laborator. Pe de altă parte în unele situații scurtează durata diagnosticului, întrucât în prezența unei încărcături bacteriene crescute se pot pozitiva după doar câteva ore de incubare.

Tipurile de flacoane și mediile de cultură folosite variază în funcție de producător: există flacoane aerobe, anaerobe, pentru fungi (Bactec), pentru cultivarea *Mycobacterium tuberculosis*, flacoane pediatrice și flacoane ce conțin inhibitori de antibiotice (rășini).

Între volumul mediului de cultură și a sângelui recoltat trebuie să existe un raport de cca 15:1 pentru a inhiba efectul antimicrobian al sângelui uman. Acest raport poate fi redus la 5:1 sau 10:1 în cazul în care la mediu se adaugă polyanetholsulfonat de sodiu (SPS). În vederea obținerii acestui efect trebuie respectate strict volumele recomandate de producător. Flacoanele au presiune negativă, de aceea trebuie avută grijă să se evite supraîncărcarea flacoanelor, ceea ce poate duce la erori diagnostice.

II. Recoltarea și transportul probelor

Momentul recoltării

Hemocultura are șanse reale de pozitivare doar dacă recoltarea se face la debutul bolii și înainte administrării antibioticelor. Omiterea recoltării la debut (la internare), înainte începerii tratamentului antibiotic are ca și consecință pierderea diagnosticului etiologic. Recoltările ulterioare în cazul evoluției nefavorabile duc la izolarea unor patogeni cu mecanisme de rezistență. Astfel de obiceiuri de recoltare selectivă duc la distorsionarea spectrului de etiologie și a ponderii tulpinilor rezistente implicate în infecții invazive.

Antibioticele administrate influențează rezultatul, chiar și în situația recoltării după administrarea unei singure doze. Dacă acest lucru nu poate fi evitat, recoltarea trebuie făcută înainte dozei următoare de antibiotic, când nivelurile serice sunt cele mai joase și se vor utiliza flacoane de hemocultură care conțin inhibitori de antibiotice.

În prezența febrei, hemoculturile trebuie recoltate cât mai repede. Lipsa febrei nu este o contraindicație pentru recoltarea hemoculturilor.

Tehnica recoltării

Pregătirea personalului responsabil cu recoltarea include: igiena mâinilor cu soluții alcoolice, echiparea cu mănuși nesterile și mască chirurgicală. Ușa salonului să fie închisă.

Recoltarea se face preferabil prin puncție venoasă. Recoltarea prin catetere trebuie evitată din cauza riscului crescut de rezultate fals pozitive. Sângele arterial nu este superior din punctul de vedere al succesului izolării microorganismelor comparativ cu sângele venos și nu se recomandă.

Pregătirea pacientului în vederea recoltării

Antiseptia tegumentelor în zona de puncție se va efectua riguros, fiind de importanță majoră în prevenirea contaminării probelor.

Recomandarea standard este utilizarea unei soluții alcoolice de 70% urmată de tinctură de iod 1-2% sau iod povidon. Alternativ, se recomandă utilizarea unui antiseptic pe bază de clorhexidină gluconat 0,5% în soluție alcoolică.

Iodul povidon are timp de contact lung, 1-2 minute care trebuie respectat în vederea obținerii efectului antimicrobian dorit. Se aplică în cercuri concentrice pornind din punctul de inserție.

Soluțiile pe bază de alcool, tinctura de iod și clorhexidina au timp de contact mai redus (30 de secunde), astfel șansele de respectare a timpilor de contact sunt mai mari. Aceste soluții se aplică prin frecare viguroasă. Atenție la indicațiile producătorului, de exemplu pentru flacoanele Bactec este interzisă utilizarea soluțiilor pe bază de iod.

După antiseptia tegumentelor nu se palpează vena. În cazul în care este neapărată nevoie, se va schimba mânășă.

Recoltarea se face cu ac și seringă, în seringi de volum potrivit (10-20 ml, mai mici pentru flacoanele pediatrice). După îndepărtarea capacului hemoculturii, dopul de cauciuc se dezinfectează. Pentru transferul sângelui se folosește un dispozitiv special. În lipsa acestuia sângele se transferă în flacoane cu un ac schimbat. Cu acesta se inoculează ambele flacoane ale setului. Nu se schimbă acul pentru a reduce riscurile de accidente prin înțepare. Dacă setul conține un flacon anaerob (recomandat), prima dată se inoculează flaconul aerob și după aceea cel anaerob. Este important să se evite aerisirea flaconului anaerob.

Pot fi folosite de asemenea sisteme de recoltare cu circuit închis, utilizând adaptoare speciale pentru flacoanele de hemocultură și trusă de transfer. Această metodă necesită atenție sporită pentru încărcarea flacoanelor cu volumele corecte de sânge. Flacoanele fiind vidate, uneori cauzează colabarea venelor.

După transferul sângelui în flacon, se amestecă cu mediul prin agitare ușoară.

Dacă puncția venei eșuează, acul trebuie schimbat.

Pe flacoane se notează numele pacientului, locul recoltării și se lipește eticheta cu codul de identificare. Specificarea locului anatomic de recoltare (și dacă este prin cateter sau venă) este importantă în interpretarea rezultatului hemoculturii, a stabilirii semnificației izolatului.

Seturile de hemocultură

Setul de hemocultură se definește ca proba recoltată printr-o singură puncție. Aceasta, în cazul adulților, se repartizează într-un flacon aerob și un flacon anaerob. Deși germenii strict anaerobi sunt implicați în mai puțin de 10% din bacteriemii, utilizarea de rutină a flacoanelor pentru anaerobi este recomandată și din cauza faptului că mediul bogat nutritiv al acestora favorizează creșterea bacteriilor facultativ anaerobe, uneori fiind unicul flacon pozitivat al setului de hemocultură. Când ambele flacoane se pozitivează, în cazul enterobacteriilor flaconul anaerob frecvent se pozitivează mai repede. Ocazional este acceptabil ca setul de hemocultură să fie alcătuit

din două flacoane aerobe, *decizie ce se poate stabili de fiecare laborator/spital în parte în funcție de particularitățile locale.*

Într-un episod bacteriemic este nevoie de cel puțin două seturi de hemoculturi (2x2 flacoane), ideal 3 seturi, pentru creșterea șansei izolării germeului, recoltate din punctii diferite. În cazul unor urgențe, când inițierea antibioterapiei trebuie făcută fără întârziere, acestea pot fi recoltate imediat unul după celălalt. Altfel, cele două seturi pot fi recoltate la interval de 30-60 de minute.

Seturile multiple recoltate prin punctii cu localizări diferite permit stabilirea semnificației izolatului bacterian, când acesta este un comensal obișnuit al tegumentelor (de ex. stafilococi coagulază negativi, coryneformi, *Cutibacterium acnes*). izolarea aceleiași tulpini din ambele seturi de hemocultură susține rolul etiologic al acesteia. Izolarea dintr-un singur set a unui comensal tegumentar semnifică de regulă contaminare.

Repetarea recoltării (hemoculturi de monitorizare)

Nu este nevoie de repetarea hemoculturii dacă în episodul bacteriemic inițial s-a recoltat numărul de seturi recomandate. Repetarea recoltării (fără indicații, nejustificate) crește riscul unor rezultate fals pozitive prin contaminare, ceea ce duce la investigații suplimentare și tratamente antibiotice inadecvate. Excepție în cazul endocarditei infecțioase, în care repetarea recoltării poate crește șansa izolării agentului etiologic.

Se indică repetarea hemoculturii la 2-4 zile de la pozitivarea primelor seturi în cazul izolării *Staphylococcus aureus*, deoarece acesta are tendința de a cauza bacteriemii persistente. Reizolarea lui indică eșecul asanării focarului. Negativarea hemoculturilor la 2-4 zile după primul set pozitiv, alături de alte criterii clinice permite administrarea unui tratament antimicrobian mai scurt.

Hemoculturile de monitorizare (de control) se recomandă și în cazul infecțiilor sistemice cauzate de *Candida* spp. În acest caz hemoculturile de monitorizare obiectivează sfârșitul candidemiei, ceea ce permite optimizarea duratei tratamentului.

Poate fi luată în considerare recoltarea repetată în cazul bacteriemiiilor cauzate de Gram-negativi, în special în prezența unor factori de risc microbiologici sau clinici (hemodializă, sepsis asociat cateterelor, în cazul utilizării empirice a unor antibiotice necorespunzătoare agentului etiologic identificat, sepsis cu *Serratia* spp sau *Pseudomonas aeruginosa*). Unele studii arată rată de mortalitate scăzută în situația recoltării hemoculturilor de monitorizare și optimizării tratamentului antimicrobian în cazul bacteriemiiilor cu Gram-negativi.

Volumul de sânge recoltat

Într-un flacon pentru adulți se recoltează 8-10 ml de sânge. În flacoanele pediatrice pot fi introduse 0,5-4 ml de sânge. Depășirea volumelor maxim admise, supraîncărcarea flacoanelor poate duce la rezultate fals negative datorită alterării raportului optim dintre mediul de cultură din flacon și sânge.

Volumul de sânge total recoltat este cel mai important factor de care depinde pozitivarea hemoculturilor. În cursul unei bacteriemii numărul de bacterii circulante este mic ($<10^3$ UFC/L la adulți). Cu cât volumul total recoltat este mai mare, cu atât șansele de diagnostic sunt mai mari.

La adulți se recomandă recoltarea a 20-30 ml sânge per set, în total 40-60 ml.

La copii volumul de sânge necesar depinde de greutatea corporală. Flacoanele pediatrice se utilizează doar la copii cu o greutate de sub 12,8 kg. Inclusiv la copii, de la o greutate de peste 1,1 kg se recoltează seturi multiple, conform tabelului nr. 1.

Tabelul 1. Volumul de sânge recomandat la copii, în funcție de greutatea corporală

Greutate corporala (kg)	Volumul de sânge de recoltat (ml)				Volum total de recoltat pentru cultivare (ml)	% din volumul total sânge circulant
	Recoltare 1		Recoltare 2			
≤1	0,5-2*	-	-	-	0,5-2	4
1,1-2	2*	-	2*	-	4	4
2,1-12,7	4*	-	2*	-	6	3
12,8-36,3	10**	-	10**	-	20	2.5
>36,3	10**	10***	10**	10***	40	1.8

*flacon pediatic

** flacon aerob pentru adulți

*** flacon anaerob pentru adulți

Transportul hemoculturilor

Înainte de a trimite hemoculturile la laborator se va verifica dacă:

- Flacoanele sunt corect înscrispionate și este lipit codul de cerere;
- Este menționat locul recoltării;
- Volumul de sânge recoltat a fost corect. Se va menționa în documentul ce însoțește flaconul la laborator sau în cel electronic dacă s-a recoltat o cantitate mai mică decât cea recomandată.

Hemoculturile trebuie să ajungă cât mai repede la laborator și în cel mult 2 ore de la recoltare trebuie incubate în aparatul de hemocultură. Flacoanele nu se refrigerază. Flacoanele nu se agită pentru a nu produce spumă (Bactec).

În cazul sistemelor de hemocultură colorimetrice (BactAlert), dacă apar întârzieri, se va verifica culoarea indicatorului înainte de introducerea flaconului în aparat. Flacoanele semnalizate de către sistem ca fiind pozitive pentru creștere bacteriană vor fi procesate imediat.

Preluarea hemoculturilor

La preluarea probei se verifică flacoanele, prezența codului de bare și datele despre locul recoltării. Dacă apar probleme de identificare a probei, se anunță imediat medicul curant și se repetă recoltarea.

Flacoanele se verifică pentru integritate și eventuala prezență a sângelui în exterior. Flacoanele se manipulează doar cu mănuși. În cazul în care se observă sânge pe exteriorul flaconului, se dezinfectează înainte de incubare în aparat.

Dacă flacoanele preluate sunt expirate, acest lucru se va menționa ca și posibilă sursă de eroare și se va lua legătura cu secția pentru atenționare (să se descarce flacoanele expirate). Laboratorul trebuie să monitorizeze datele de expirare ale flacoanelor.

Volumele incorecte (prea mari sau prea mici) se notează pe rezultat.

În cazul în care se trimit seturi singulare, se va formula o atenționare la eliberarea rezultatului.

III. Examenul microbiologic

Incubarea flacoanelor de hemocultură

Hemoculturile se incubează la temperatura de 37°C timp de 5 zile. În cazul endocarditei prelungirea la 14-21 de zile nu mai este recomandată, căci microorganismele țintite prin incubarea prelungită cresc adecvat și în 5 zile în mediile actuale.

Prelucrarea hemoculturilor pozitive și comunicarea rezultatelor intermediare

După emiterea semnalului pozitiv flacoanele se scot cât mai repede din aparat și se începe prelucrarea fără întârziere. Monitorizarea continuă a aparatelor de hemocultură este o cerință de bază care trebuie îndeplinită în fiecare laborator.

Pentru deschiderea flacoanelor de hemocultură se recomandă folosirea acelor de ventilație. În lipsa acestora se vor folosi ace de seringă.

Este recomandat ca punșionarea cu ace a flacoanelor să se facă sub hotă, deoarece uneori poate exista presiune pozitivă în flacoane, ceea ce expulzează lichidul în momentul punșionării și astfel se contaminează mediul și/sau persoana.

Se efectuează un frotiu colorat Gram iar rezultatul examenului microscopic se comunică clinicianului de îndată. Este primul feed-back pe care laboratorul îl poate da și este esențial pentru ajustarea tratamentului pacientului.

În funcție de caracterele morfo-tinctoriale ale microorganismului se alege un set de medii pe care cu cea mai mare probabilitate se poate obține o creștere bacteriană. Incubarea se face de asemenea conform necesităților bacteriei suspectate.

Identificare convențională

În lipsa altor metode, identificarea se bazează pe metodele de identificare convenționale, de care dispune laboratorul.

Este important ca laboratorul care efectuează hemoculturi să aibă capacitatea de a identifica majoritatea patogenilor la nivel de gen și specie.

Această etapă poate avea o durată de timp variată, în care informațiile trebuie comunicate clinicianului imediat ce devin disponibile.

Teste rapide, metode de identificare rapidă

Unele truse de aglutinare permit detectarea antigenelor bacteriene din hemocultura pozitivată. Astfel se poate obține o identificare rapidă, înainte de cultivarea propriu-zisă a bacteriei. Există truse de aglutinare pentru detectarea antigenelor de *Streptococcus pneumoniae*, anumite serogrupuri de *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* serotip b. În aceste cazuri trebuie urmărite recomandările producătorului testului.

Există diferite metode de detectare rapidă a principalelor mecanisme de rezistență, bazate pe metode imunocromatografice sau colorimetrice. Acestea pot fi utilizate din cultura bacteriană sau direct din flaconul de hemocultură. Prin aceste metode se poate detecta metilino-rezistența la *Staphylococcus aureus*, producerea de ESBL (beta-lactamaze cu spectru extins) sau carbapenemaze la enterobacterii.

Identificarea utilizând MALDI-TOF permite de asemenea accelerarea diagnosticului prin identificarea direct din flaconul pozitiv sau din subcultura efectuată pe medii solide a microorganismului.

Identificare moleculară

Majoritatea testelor moleculare pot identifica patogenul doar din hemocultura pozitivată. Testele multiplex permit identificarea unui număr de patogeni bacterieni și/sau fungici. Unele truse identifică și prezența unor gene de rezistență importante (diverse gene *bla* care codifică beta-lactamaze, genele *mecA*, *mecC* responsabile de metilino-rezistență și genele *vanA/B* pentru identificarea VRE).

Interpretarea hemoculturilor

Orice creștere microbiană poate să fie semnificativă, însă această semnificație trebuie stabilită pentru fiecare izolat în parte. Mediile de cultură au fost mult îmbunătățite în ultimii ani și permit o creștere mai bună nu doar a patogenilor, ci și a contaminanților.

Contaminarea hemoculturilor

Cea mai mare problemă în interpretarea rezultatului hemoculturii o constituie contaminarea, care poate avea cauze diverse. Cel mai frecvent bacteria contaminantă provine din flora tegumentară, în cazul unei antisepsii defectuoase.

Hemoculturile sunt de asemenea frecvent contaminate în cazul recoltării prin catetere intravasculare, acestea având o rată de contaminare mai mare decât în cazul venopuncțiilor. Riscul cel mai mare pentru rezultate fals pozitive există în cazul recoltării prin catetere intravasculare inserate în artera sau vena femurală. În cazul recoltărilor prin catetere, hemocultura se poate contamina nu doar cu bacterii din flora comensală, ci și cu patogeni obișnuiți (*Staphylococcus aureus*, enterobacterii, *Pseudomonas aeruginosa*, etc.). Aceștia de obicei provin din porturile contaminate ale cateterelor. Raportarea acestora ca și patogeni semnificativi poate avea consecințe nedorite asupra pacientului, a costurilor spitalizării și a datelor de incidență a IAAM.

Eliberarea rezultatului complet cu antibiogramă în cazul unui germen contaminant are impact clinic deosebit, cu aplicarea unor tratamente antibiotice incorecte sau chiar inutile. S-a arătat că în urma raportării stafilococilor coagulazo-negativi contaminanți se prescriu inutil antibiotice, între care și vancomicina pe o durată prelungită.

Bacteriile cu probabilitate mare să fie contaminanți sunt:

- Stafilococi coagulazo-negativi
- Coryneformii
- *Micrococcus* spp.
- *Cutibacterium acnes* (fost *Propionibacterium acnes*)
- *Bacillus* spp. (alte specii, decât *B. anthracis*)

Aceste bacterii vor fi considerate contaminanți cu excepția situațiilor în care aceeași tulpină se izolează din seturi succesive și există criteriile clinice și de laborator, factori favorizanți care să susțină implicarea lor în infecția sistemică.

O serie de alți patogeni pot avea semnificație clinică sau să fie contaminanți, după caz:

- enterococi
- streptococi de grup viridans

Următoarele bacterii se consideră semnificative (sunt foarte rari contaminanți):

- *Staphylococcus aureus*
- *Streptococcus pneumoniae*
- Streptococi beta-hemolitici
- *Listeria monocytogenes*
- *Escherichia coli* și alte specii din Ordinul *Enterobacterales*
- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Acinetobacter baumannii*
- *Neisseria meningitidis*
- *Haemophilus influenzae*
- bacili Gram-negativi anaerobi (*Bacteroides* spp., *Fusobacterium* spp.),
- *Candida* spp.

Hemoculturile polimicrobiene

Infecțiile sistemice real polimicrobiene sunt rare. Sunt posibile în contextul unei translocării bacteriene din intestin, mucoase. În toate cazurile în care se izolează mai multe bacterii, trebuie cântărită posibilitatea implicării acestora în infecție, sau dacă sunt de fapt contaminări.

Când alături de germeni patogeni se izolează specii ale florei comensale se ridică semne de întrebare privind toate izolatele, inclusiv privind patogenii reali și acest dubiu trebuie comunicat clinicianului. Nu se prelucrează extensiv aceste izolate, însă se pot păstra pentru eventualitatea în care vreuna dintre aceste specii se izolează din seturi ulterioare.

Diagnosticul microbiologic în situații clinice particulare

Sepsisul asociat cateterelor

În cazul sepsisului asociat cateterelor sursa este reprezentată de cateterul intravascular. Se suspicionează în cazul unor infecții invazive care se dezvoltă în prezența cateterelor intravasculare, în absența altor surse evidente de infecție. Febra este parametrul clinic cel mai sensibil, însă cu specificitate redusă. Prezența inflamației și a exudatului la locul inserției cateterului are specificitate crescută (94-99%) pentru sepsisul asociat cateterului, însă are sensibilitate redusă.

Pentru susținerea diagnosticului acestei infecții este nevoie de evidențierea agentului etiologic în relație cu cateterul incriminat.

Există două posibilități de abordare a diagnosticului: cu îndepărtarea sau cu păstrarea cateterului.

1. Proceduri recomandate cu păstrarea cateterului

Metodele de diagnostic conservative includ: examenul bacteriologic al locului inserției în prezența inflamației și/sau a exudatului și recoltarea hemoculturilor.

Pentru examenul bacteriologic al locului inserției se șterge tegumentul din jurul inserției cu un tampon. Se recomandă în prezența inflamației și/sau a prezenței exudatului.

Pentru hemoculturi se recomandă recoltarea în paralel a unui set prin cateter și a unui al doilea set prin puncție venoasă.

Izolarea aceleiași tulpini din ambele seturi, în plus, pozitivarea cu cel puțin două ore mai devreme a setului recoltat prin cateterul intravascular considerat sursa sepsisului, susțin diagnosticul de sepsis asociat cateterului. În situația în care se recoltează 2 seturi de hemoculturi în paralel, un set prin cateter și al doilea set prin puncție venoasă, se va nota ora pozitivării pentru fiecare flacon, pentru a documenta infecția de cateter.

În cazul în care doar setul recoltat prin cateter se pozitivează, se consideră contaminare din cateter. În cazul în care doar setul recoltat prin venopuncție se pozitivează cu un germeni din flora tegumentară, se consideră contaminare.

2. Proceduri ce implică îndepărtarea cateterului

Sepsisul asociat cateterului se confirmă în cazul în care se evidențiază prezența aceluiași germeni pe capătul distal al unui cateter și în hemoculturile recoltate prin puncție percutană. Interpretarea se face întotdeauna în corelare cu rezultatul hemoculturii. Examenul bacteriologic al vârfului de cateter NU se face de rutină, doar în prezența semnelor de sepsis și când se exclud alte surse de infecție.

Metoda semicantitativă a lui Maki s-a dovedit a fi la fel de eficientă ca și metodele cantitative pentru diagnosticul sepsisului asociat cateterelor utilizate pe durată scurtă. Fiind o metodă foarte practică este preferată în cadrul diagnosticului de rutină al acestor infecții. Cateterul se îndepărtează după antisepsia zonei de inserție. După extragere se taie aseptice 4 cm din capătul distal al cateterului, folosind o foarfecă sterilă. Fragmentul se introduce într-un recipient steril și se trimite fără întârziere la laborator. În caz de întârziere, produsul poate fi păstrat la temperatura frigiderului (nu influențează semnificativ izolarea patogenilor).

Fragmentul se rostogolește pe un agar sânge. După incubare se numără coloniile dezvoltate pe placă. Creșterea este semnificativă în cazul în care se obține un număr de germeni de ≥ 15 UFC/placă. Nu se prelucrează mai mult de două specii bacteriene cu creștere semnificativă.

În cazul cateterelor de lungă durată, metoda Maki are sensibilitate mai mică, deoarece la aceste catetere colonizarea are loc în special intraluminal. Pentru acestea se recomandă **tehnicile cantitative cu determinarea numărului de germeni** obținuți după sonicare sau după irigarea lumenului cu ser fiziologic steril.

Nu se recomandă îmbogățirea fragmentelor în medii lichide. Aceasta permite doar determinarea calitativă a prezenței germenilor, însă nu permite diferențierea între colonizanti, contaminanți sau agenți etiologici ai unui sepsis asociat cateterului.

Tabelul 2. Prelucrarea hemoculturii în sepsisul asociat cateterului

Situția clinică	Produsul recoltat	Medii de cultură standard	Condiții de incubare			Citirea culturii	Microorganismele țintă
			Temp °C	Atmosferă	Timp h		
Bacteriemie sau sepsis asociat cateterului	Vârf de cateter	Agar sânge	35-37	Aerobă	24-48	Zilnic	≥15 UFC /placă Orice creștere de levuri
Bacteriemie sau sepsis asociat cateterului și în prezența semnelor locale de infecție	Tampon - locul de inserție a cateterului	Agar sânge	35-37	Aerobă	24-48	Zilnic	<i>Staphylococcus aureus</i> Stafilococi coagulazo-negativi Coryneformi Enterobacterii Enterococi Pseudomonade Streptococi <i>Bacillus</i> spp. Levuri

Endocardita infecțioasă

În cazul endocarditei bacteriemia este continuă. Pozitivarea seturilor succesive documentează bacteriemia continuă. Se recomandă recoltarea a 3 seturi de hemoculturi preferabil în decurs de 6-8 ore (6 flacoane în total) dar nu mai mult de 24 de ore. Convențional seturile cuprind un flacon aerob și unul anaerob. Alternativ pot fi recoltate două seturi de hemoculturi alcătuite din 2 flacoane aerobe și un flacon anaerob (în total tot 6 flacoane).

În cazul suspiciunii de endocardită și sepsis se recomandă recoltarea a 2 seturi de hemoculturi la interval de 1 oră.

Semnificația izolatului bacterian este determinat de:

- Tipul microorganismului izolat (stafilococii coagulazo-negativi se asociază mai frecvent endocarditelor pe proteze valvulare; streptococii de grup viridans sunt mai frecvent implicați în endocardite pe valve native)
- Izolarea aceleiași tulpini din seturi succesive
- Pozitivare rapidă după incubare

Testarea sensibilității față de antibiotice

Antibiograma directă

În anul 2019 EUCAST a stabilit un protocol pentru efectuarea antibiogramelor directe din hemoculturile pozitive. (Rapid AST in blood culture https://www.eucast.org/rapid_ast_in_blood_cultures/)

Implementarea acestei metode impune validare în fiecare laborator.

Antibiograma

Antibiograma se efectuează conform standardului EUCAST, cu caracterizarea, descrierea fenotipului de rezistență.

IV. Raportarea rezultatelor

Dacă nu s-au recoltat cel puțin două seturi de hemoculturi în cursul episodului bacteriemic, se va da o atenționare: *Set unic! Cantitate insuficientă de sânge! În vederea unui rezultat corect se recomandă recoltarea a cel puțin două seturi de hemoculturi (4 flacoane în total) prin două venopuncții diferite.*

În cazurile de hemoculturi pediatrice se va urmări de asemenea volumul sângelui total recoltat. În cazul în care acesta este sub cel recomandat, se va da atenționare: *”volum insuficient, vă rugăm să consultați manualul recoltării pentru a adapta volumul de sânge la greutatea corporală a pacientului”.*

Dacă se trimit probe în flacoane expirate, acestea se preiau cu mesaj de atenționare privind posibila sursă de eroare și se ia legătura cu secția pentru a se elimina flacoanele expirate rămase.

Rezultate negative: Flacon aerob și anaerob: negativ

Rezultate pozitive: se comunică specia.

Rezultatele parțiale (examen microscopic din flacon pozitiv, cultura pozitivă, teste rapide de rezistență bacteriană) se comunică telefonic și se introduc în SIL imediat ce sunt disponibile.

Tabelul 3. Semnificația izolatelor în funcție de numărul flacoanelor pozitive și raportarea rezultatului

Specia izolată	Numărul flacoanelor pozitive	Numărul seturilor	Informații clinice	Raportarea rezultatului/comentarii/recomandări
Stafilococi coagulazo-negativi (SCN)	1 sau 2 ale aceluiași set	Cel puțin două seturi	Fără factori de risc pentru infecție cu SCN	Contaminant, nu se continuă diagnosticul
			Pacient cu factori de risc (boală onco - hematologică, terapie intensivă, imunosupresie, CVC)	Se comunică: SCN, posibil contaminant. Se testează sensibilitatea la solicitarea clinicianului.
		Set unic	De fiecare dată	Se comunică: ”Stafilococ coagulazo- negativ; Set unic! <i>Cantitate insuficientă de sânge!</i> În vederea interpretării corecte se recomandă recoltarea a cel puțin 2 seturi de hemocultură din venopuncții diferite.” Decizia de a identifica la nivel de specie și testarea sensibilității se face în urma consultării cu clinicianul și explicarea rezultatului neinterpretabil.

Specia izolată	Numărul flacoanelor pozitive	Numărul seturilor	Informații clinice	Raportarea rezultatului/comentarii/recomandări
	Aceleași tulpini izolate din seturi diferite	Cel puțin două seturi	De fiecare data	Se identifică la nivel de specie și se testează sensibilitatea la antibiotic; Rezultatul se comunică în cazul în care profilul de sensibilitate este identic.
	Tulpini sau specii de SCN diferite în același flacon sau în mai multe seturi	Oricâte	De fiecare data	SCN - contaminare
	Doar flaconul recoltat prin cateter	2 seturi (un set recoltat prin cateter, un set recoltat prin venopuncție)	Suspiciune de sepsis asociat cateterului	SCN - contaminare
	Doar flaconul recoltat prin venopuncție	2 seturi (un set recoltat prin cateter, un set recoltat prin venopuncție)	Suspiciune de sepsis asociat cateterului	SCN – contaminare din flora tegumentară

Specia izolată	Numărul flacoanelor pozitive	Numărul seturilor	Informații clinice	Raportarea rezultatului/comentarii/recomandări
Coryneformi, <i>Bacillus</i> spp., <i>Micrococcus</i> spp., streptococi grup viridans	Mai multe flacoane din seturi succesive	Cel puțin 2		Se comunică specia izolată cu antibiogramă (pentru speciile care au standardizare)
	Un singur flacon	Cel puțin 2	În orice context	Contaminant
	Un singur flacon	Set unic		Nu se identifică la nivel de specie. Se comunică genul/categoria microscopică, cu mențiunea: posibil contaminant și atenționare pentru setul unic.

Specia izolată	Numărul flacoanelor pozitive	Numărul seturilor	Informații clinice	Raportarea rezultatului/comentarii/recomandări
<p><i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i>, Streptococi beta-hemolitici <i>Enterococcus</i> spp. Enterobacterii, <i>Pseudomonas aeruginosa</i>, <i>Acinetobacter baumannii</i>, <i>Candida albicans</i> Anaerobi <i>Neisseria meningitidis</i> <i>Haemophilus</i> spp. <i>Listeria monocytogenes</i> HACEK <i>Campylobacter</i> spp. <i>Pasteurella</i> spp. <i>Brucella</i> spp.</p>	<p>≥1</p>	<p>Orice număr</p>	<p>În orice context clinic</p>	<p>Se comunică specia izolată cu antibiogramă (pentru speciile care au standardizare)</p>

Comunicarea rezultatelor în cazul prelucrării vârfului de cateter și/sau a probei din jurul inserției cateterului

Vârf de cateter:

Rezultat pozitiv: comunică germele cu creșterea peste pragul de semnificație (≥ 15 UFC /placă) cu adăugarea unui comentariu interpretativ: poate fi asociat cu sepsis sau este un colonizant/contaminant - verifică rezultatul hemoculturilor!

În cazul creșterii sub 15 colonii/placă: creștere sub prag de semnificație clinică.

Rezultat negativ: fără creștere microbiană.

V. Criterii de performanță

Hemoculturile sunt printre cele mai importante analize microbiologice care permit stabilirea etiologiei în cazul unor infecții severe, amenințătoare de viață. Datele obținute în urma acestor investigații sunt deosebit de importante pentru tratamentul corect al pacientului, pentru utilizarea judicioasă a antibioticelor, dar în același timp și din punctul de vedere al urmăririi germeniilor implicați în aceste infecții și a schimbărilor survenite de-a lungul timpului în rezistența lor antimicrobiană.

Una dintre problemele frecvent întâlnite în spitalele cu resurse limitate este recoltarea selectivă a hemoculturilor: recoltarea hemoculturilor doar în cazurile în care evoluția pacientului este nefavorabilă sub tratament empiric cu spectru larg. Pe lângă subevaluarea incidenței unor patogeni comunitari sensibili (cum ar fi *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, șa), aceste obiceiuri de recoltare duc la supraestimarea rezistenței și la abuz de antibiotice, din cauza absenței frecvente a unei etiologii demonstrate, cu amplificarea fenomenului rezistenței bacteriene. În vederea unei evaluări corecte privind implicarea microorganismelor în infecții sistemice și a rezistenței lor antimicrobiene este importantă respectarea indicațiilor recoltării hemoculturilor. Omiterea diagnosticului poate să ducă și la subraportarea IAAM. (Numărul de hemoculturi efectuate la 1000 paturi-zile de spitalizare este considerat indicator de calitate al unității sanitare în unele țări).

Hemoculturile au o rată redusă de pozitivare, depinzând în mare măsură de patologia de bază. Aceasta este puternic influențată de volumele de sânge, numărul de seturi recoltate. Laboratorul trebuie să semnalizeze de fiecare dată când volumele și numărul seturilor sunt insuficiente.

De asemenea, trebuie urmărită supraîncărcarea flacoanelor cu sânge și data expirării flacoanelor. Unele sisteme de hemoculturi urmăresc acest aspect în mod automat.

Una dintre cele mai frecvente probleme întâlnite în cursul prelucrării hemoculturilor este contaminarea. Pentru interpretarea corectă a hemoculturilor este foarte importantă respectarea recomandării de recoltare a seturilor succesive din locuri de puncție diferite. De asemenea, personalul de recoltare trebuie reinstruit periodic despre tehnica de recoltare. Trebuie evitat ca și antiseptic iodul povidon și încurajată folosirea soluțiilor alcoolice pe bază de clorhexidină. Contaminările pe de o parte generează costuri inutile laboratorului prin reactivii și munca suplimentară depusă pentru clarificarea semnificației acestor izolate, pe de altă parte induc tratamente greșite sau inutile precum și un consum crescut de antibiotice.

În vederea îmbunătățirii calității acestui diagnostic, se impune urmărirea în timp a unor indicatori de calitate, cum ar fi: durata transportului, durata de la preluarea probei și incubarea ei, TAT, rata de recoltare, rata de contaminare, procentul flacoanelor supraîncărcate, rata seturilor unice, rata de pozitivare (Tabelul 4).

Rata de recoltare

Pe baza acestui parametru se poate stabili dacă se recoltează suficiente hemoculturi (sau dacă se recoltează în exces). Se determină numărul de seturi de hemocultură raportate la 1000 pacienți-zile de spitalizare. Acest parametru trebuie monitorizat de către fiecare instituție și poate sta la baza unor decizii de management.

Rata de contaminare

Rata de contaminare reprezintă procentul de seturi de hemoculturi din care se izolează un contaminant din numărul total de seturi hemoculturi. Conform recomandărilor ghidurilor rata de contaminare trebuie să fie sub 3%. Se analizează separat rata de contaminare a hemoculturilor recoltate prin puncție venoasă și separat cea a hemoculturilor recoltate prin catetere intravasculare. Unele secții, datorită specificului, au de obicei rate mai mari de contaminare (de exemplu secții de urgență, pediatrie, terapie intensivă, COVID-19), se recomandă ca rata de contaminare să se urmărească defalcat pe secții pentru a putea da feed-back țintit, conform problemelor observate.

Rata de pozitivare

Rata de pozitivare a hemoculturilor a fost estimată la 7,7% în urma unui audit național efectuat în SUA. Dacă rata de pozitivare scade sub 5%, poate fi un indiciu al recoltărilor în exces. O rată de pozitivare ce depășește 15% poate fi un indiciu al recoltării selective și al contaminării la o rată excesivă.

Rata seturilor unice

Se monitorizează de către laborator și se comunică coordonatorilor secțiilor în vederea adoptării unor măsuri la nevoie.

Procentul hemoculturilor recoltate după începerea tratamentului antibiotic

Este unul dintre factorii care influențează rata de pozitivare. Se monitorizează de către laborator și se comunică coordonatorilor secțiilor în vederea adoptării unor măsuri la nevoie.

Rata supraîncărcării flacoanelor de hemocultură

Observarea repetării acestui fenomen impune reinstruirea personalului privind regulile de recoltare.

Tabelul 4. Frecvența urmării indicatorilor de calitate

Indicator de calitate	Frecvența	Măsuri recomandate
Rata recoltării	Anual	Training privind indicațiile recoltării hemoculturilor (secțiile la care recoltările sunt în număr redus)
Rata contaminării	Lunar	Reinstruirea personalului care recoltează, dacă rata depășește 5%
Rata supraîncărcării	Lunar	Comunicarea către secții
Rata seturilor unice	La fiecare probă inițial, după aceea lunar și odată cu obținerea unei stabilități se poate trece la evaluări anuale	Menționarea în rezultat; Se comunică coordonatorilor secțiilor
TAT, durata timpului de încărcare a flacoanelor	Lunar	Reinstruirea personalului
Durata timpului de la pozitivarea hemoculturii și anunțarea rezultatului frotiului	Periodic, eventual în cazul unor reclamații (plângeri) din partea clinicienilor	Reinstruirea personalului

VI. Bibliografie

Amipara R, Winders HR, Justo JA et al: Impact of follow up blood cultures on outcomes of patients with community-onset gram-negative bloodstream infection. *EClinicalMedicine* 2021, 34:100811.

Baron JE, Weinstein MP, Dunne WM Jr, et al: *Cumitech 1C, Blood cultures IV*. Coordinating editor Baron JE, 2005, ASM Press, Washington DC.

Doern GV, Carroll KC, Diekema DJ et al.: A Comprehensive Update on the Problem of Blood Culture Contamination and a Discussion of Methods for Addressing the Problem. *Clin Microbiol Rev* 2020, 33:e00009-19.

Grohs P, Mainardi JC, Podglajen I et al: Relevance of Routine Use of the Anaerobic Blood Culture Bottle. *J Clin Microbiol* 2007, 45:2711–2715.

Karch et al: Proposing an empirically justified reference threshold for blood culture sampling rates in intensive care units. *J Clin Microbiol*, 2015:53:648

Lafaurie, M., d'Anglejan, E., Donay, J.L. et al.: Utility of anaerobic bottles for the diagnosis of bloodstream infections. *BMC Infect Dis* 20, 142 (2020).

Liesman RM, Pritt BS, Maleszewski JJ, Patel R. 2017. Laboratory diagnosis of infective endocarditis. *J Clin Microbiol* 55:2599 –2608

Miller M, Binnicker MJ, Campbell S et al: Guide to Utilization of the Microbiology Laboratory for Diagnosis of Infectious Diseases: 2018 Update by the Infectious Diseases Society of America and the American Society for Microbiology

Public Health England: Investigation of blood cultures (for organisms other than Mycobacterium species). UK Standards for Microbiology Investigations. 2019. B 37.

Sharp, S. E., A. Robinson, M. Saubolle, et al : Sending repeat cultures: is there a role in the management of bacteremic episodes? (SCRIBE study). *BMC Infect Dis* 2016

Thaden JT, Cantrel S, Dagher M et al: Association of Follow-up Blood Cultures With Mortality in Patients With Gram-Negative Bloodstream Infections A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Network Open*. 2022;5(9):e2232576.

Diagnosticul microbiologic al infecțiilor sistemului nervos central

I. Introducere

Infecțiile sistemului nervos central (SNC), deși mai rare comparativ cu infecțiile cu alte localizări, prezintă un risc crescut de morbiditate, mortalitate și sechele pe termen lung, de aceea diagnosticul precoce și inițierea rapidă a terapiei antimicrobiene țintite sunt esențiale. Aceste infecții pot fi cauzate de variate microorganisme (în special virusuri sau bacterii, mai rar fungi sau paraziți) și pot afecta diferite componente ale SNC (ex. meningite, ventriculite, encefalite, abcese cerebrale, mielite), uneori fiind afectate concomitent mai multe componente (ex. meningoencefalita). În funcție de durată se descriu infecții acute, subacute și cronice, iar în funcție de origine pot fi comunitare sau asociate îngrijirilor medicale.

Meningita bacteriană acută este o infecție invazivă a SNC, caracterizată prin inflamația meningelui, determinată de un agent bacterian, care se definește clinic prin prezența simptomelor meningiene (febră, cefalee, redoarea cefei, alterarea stării de conștiență până la comă etc.) și prezența în LCR a unui număr crescut de leucocite (pleiocitoza).

Agenții etiologici ai meningitei bacteriene acute la adult sunt, în ordinea frecvenței: *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, bacili Gram-negativi (*Haemophilus influenzae*, *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*), *Staphylococcus* spp., alte specii din genul *Streptococcus*, *Listeria monocytogenes* etc.

Meningita meningococică se deosebește de meningitele bacteriene de alte etiologii prin potențialul său de a determina epidemii pe scară largă. În țările dezvoltate boala endemică este cauzată, în general, de serogrupurile B și C.

Meningita determinată de *H. influenzae* se produce, cel mai adesea, la copiii sub 5 ani, majoritatea cazurilor fiind determinate de serotipurile capsulare “b”.

Meningita cauzată de *Streptococcus pneumoniae* se întâlnește mai frecvent la grupele extreme de vârstă (copii, vârstnici, dar și la tineri cu asplenie, hemoglobinopatii, comorbidități care asociază imunodepresie, terapie imunosupresoare etc.).

Meningita determinată de *Streptococcus agalactiae* apare cel mai frecvent la nou-născuți (care se pot infecta în timpul nașterii naturale de la mama colonizată vaginal), vârstnici și pacienții cu status imunitar precar.

Listeria monocytogenes determină meningite la nou-născuți și vârstnici, precum și la bolnavi cu alte afecțiuni cronice, alcoolici, persoane cu imunitate scăzută.

Diagnosticul microbiologic al infecțiilor SNC constă în efectuarea în paralel a mai multor teste complementare, alese în funcție de datele clinice, paraclinice și epidemiologice, de aceea este esențială o bună colaborare între infecționist și microbiolog. Majoritatea acestor examene microbiologice se realizează din proba de lichid cefalo-rahidian (LCR), obiectivele diagnosticului microbiologic fiind :

- orientarea rapidă a terapiei adecvate

- confirmarea diagnosticului de infecției și stabilirea etiologiei (bacteriene, virale sau fungice)
- stabilirea profilului de sensibilitate la antibiotice a izolatului bacterian și ajustarea tratamentului de primă intenție în cazul infecțiilor bacteriene sau oprirea acestuia, în cazul infecțiilor virale
- dacă este cazul, oferirea de informații necesare autorităților de sănătate publică.

Meningita acută bacteriană evoluează rapid spre deces în absența tratamentului, de aceea identificarea cauzei acestei infecții este o urgență, iar proba de LCR de la un pacient suspect de meningită trebuie prelucrată imediat. Recoltarea probei înainte de începerea terapiei antimicrobiene crește sensibilitatea metodelor de diagnostic. Temporizarea transportului sau a procesării probei întârzie obținerea diagnosticului și alterează calitatea probei (scad numărul PMN și viabilitatea bacteriilor fragile).

LCR este normal steril și, prin urmare, orice microorganism izolat în cultură este potențial agent etiologic și trebuie raportat imediat către medic. Deoarece în unele meningite numărul de organisme din LCR poate fi $< 10^3$ UFC / ml, concentrarea acestora prin centrifugarea LCR crește sensibilitatea diagnosticului rapid prin examenul frotiului Gram.

Meningita bacteriană este cauzată frecvent de bacterii aerobe. Bacteriile anaerobe pot fi prezente în LCR când există un proces infecțios adiacent meningelui, ca de exemplu în abcese cerebrale, ventriculite sau infecții ale șuntului ventricular, meningită post otită medie complicată. Inocularea LCR în medii anaerobe nu este recomandată în meningita comunitară. În infecțiile de șunt este recomandată inocularea probei și în bulion pentru a crește șansele izolării de aerobi și anaerobi.

Testarea directă antigenică poate fi utilă în unele situații. Sensibilitatea metodei este redusă pentru probele LCR cu examen microscopic negativ. Sensibilitatea testării este redusă pentru anumite serogrupuri de *Neisseria meningitidis*, în timp ce pentru *Haemophilus influenzae* serogrupul b este ridicată, dar boala este rară în țările cu programe de vaccinare neonatală extinsă. Pentru meningite neonatale streptococice sau cu *Escherichia coli*, frotiul Gram este de obicei pozitiv, cu excepția unor cazuri de meningită pretrată. În această ultimă situație testarea ar putea avea un beneficiu.

Testele moleculare bazate pe PCR din LCR sunt deosebit de utile în diagnosticul rapid al meningitelor, în special atunci când microorganismele sunt prezente în număr redus în probă sau sunt dificil de cultivat, și mai ales atunci când pacientul este pretratat cu antimicrobiene. Testele multiplex cresc eficiența diagnosticului microbiologic, scurtează intervalul de timp necesar diagnosticului etiologic, permit reducerea duratei de administrare a tratamentului mixt antiviral/antibiotic, contribuie la scurtarea duratei de spitalizare.

II.1. Recoltarea, transportul și recepția probelor

II. 1. 1. Recoltarea probelor - tipuri de probe

Recoltarea probelor se face cât mai precoce, pe cât posibil înainte de începerea terapiei antimicrobiene, pentru a crește sensibilitatea metodelor de diagnostic. În funcție de tipul infecției se aleg probele care oferă cele mai bune șanse de diagnostic etiologic.

Meningite, meningoencefalite

La orice pacient cu suspiciune de meningită trebuie recoltat LCR, cu excepția situațiilor în care puncția lombară este contraindicată. Din proba de LCR, recoltată ideal înainte de inițierea terapiei antibiotice, se vor efectua:

- examen citologic cantitativ și calitativ
- teste biochimice (glucoză, proteine, lactat)
- examene microbiologice (examen microscopic, cultivare, teste antigenice, teste moleculare).

Se recoltează și hemoculturi (ideal înaintea administrării de antibiotice) și probe de sânge pentru:

- hematologie (hemogramă completă; în cazul unei erupții purpurice sau peteșiale și teste de coagulare)
- teste biochimice (glicemie, ionogramă).

În cazul unei erupții purpurice biopsia din leziunile cutanate poate să fie luată în considerare, identificarea *N. meningitidis* prin cultivare sau mai ales prin PCR având o sensibilitate bună chiar și după inițierea terapiei antibiotice.

Infecții de șunt ventricular

Șunturile ventriculare sunt dispozitive utilizate pentru drenarea LCR, care au un capăt proximal plasat într-unul dintre ventriculii cerebrali și un capăt distal internalizat sau externalizat. Cele internalizate drenează obișnuit în cavitatea peritoneală (șunt ventriculo-peritoneal), mai rar în atriu sau spațiul pleural. Cele externalizate au capătul distal într-un rezervor. Infecțiile dispozitivelor asociate SNC sunt în majoritatea cazurilor rezultatul colonizării intraoperatorii sau postoperatorii a dispozitivului cu microbiota tegumentului. În suspiciunea de infecție de șunt ventricular se recoltează LCR (preferabil prin puncție direct din șunt sau, dacă nu este posibil, prin puncție lombară sau din rezervor, percutan) și probe de sânge.

a) Lichidul cefalorahidian

Prelevarea LCR se realizează prin puncție lombară, o tehnică invazivă care trebuie efectuată de către personal cu experiență, fiind de competența exclusivă a specialiștilor infecționiști, neurologi, neurochirurghi, pediatri.

Puncția lombară are o indicație majoră în suspiciunea de meningită.

Contraindicațiile sunt:

- Edem papilar (face parte din triada hipertensiunii intracraniene),
- Proces expansiv intracranian (tumoră, abces, malformație vasculară) demonstrate imagistic,
- Pierderea conștienței (neinvestigată imagistic sau oftalmologic),
- Tulburări de coagulare, trombocitopenie sau alte diateze hemoragice,
- Suspiciune de abces epidural spinal sau infecție la locul puncției.
- Hemoragii intracraniene neinvestigate angiografic.

Procedura

Recoltarea LCR se efectuează la patul bolnavului, prin rahicenteză, în condiții stricte de asepsie, pentru a se preveni atât producerea unei infecții iatrogene la pacient, cât și contaminarea probei cu microbiota cutanată. Se recomandă ca recoltarea să fie realizată cât mai aproape de debutul simptomelor și, de preferat, înaintea începerii tratamentului antibiotic.

Se decontaminează suprafața cutanată cu tinctură de iod, betadină, clorhexidină etc., la nivelul spațiului intervertebral L3-L4, L4-L5, L5-S1 sau (în situații speciale) suboccipital, transfontanelar. Se introduce un ac cu stilet în interspațiul L3-L4, L4-L5 sau L5-S1. Când se ajunge în spațiul subarahnoidian, se scoate mandrenul și se observă apariția LCR. Se recoltează un volum de 5-10 mL la adulți, respectiv 2-5 mL la copii, repartizat în 3 tuburi sterile, fără anticoagulant, cu capac:

- 2-5 mL pentru microbiologie și citologie (0,5 – 1 mL pentru teste moleculare, minim 1 mL pentru cultivare în sistem automat, 1 mL pentru detecție antigene bacteriene libere prin latex aglutinare); cantitatea minimă necesară, doar pentru teste microbiologice, este de 2 ml.
- 2- 3 mL pentru teste biochimice,
- 0,5-1 mL pentru teste imunologice.

b) Hemoculturi

Se recoltează în condiții de asepsie, conform procedurii descrise la capitolul Infecții sistemice (hemocultura).

c) Lichidul de șunt ventricular

Se curăță locul rezervorului cu soluție antiseptică înainte de recoltarea lichidului pentru a preveni contaminarea. Se scoate lichidul din rezervor și se transferă într-un tub steril.

d) Biopsie cutanată (în suspiciunea de meningocemie):

După decontaminarea suprafeței cutanate se puncționează leziunea purpurică.

II.1.2. Transportul probelor

Probele trebuie să fie etichetate cu informații despre pacient, data și ora recoltării. Probele trebuie să fie însoțite de o cerere cu informații necesare pentru procesarea adecvată a probei, informații referitoare la:

- pacient: date de identificare, vârsta, diagnostic, status imun, context clinic sau epidemiologic (purpură, convulsii, risc de expunere profesională, istoric de călătorie, existența unor cazuri familiale, intervenții chirurgicale SNC, traumatisme cranio-cerebrale etc.), tratament antibiotic administrat
- probă: tipul, data și ora recoltării, modul recoltării.

După prelevarea probei de LCR, se realizează transportul **imediat după recoltare** și se anunță laboratorul.

Transportul probelor la laborator și prelucrarea lor trebuie să se realizeze cât mai curând posibil, ideal în 10-15 min. Transportul LCR se face fără refrigerare. Condițiile improprie de transport afectează speciile sensibile (*H. influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* - care suferă fenomenul de autoliză) și leucocitele PMN.

II.1.3. Criterii de acceptarea a probelor și de alegere a testelor

Se verifică datele pacientului atât pe etichetă, cât și pe cerere.

Probele de LCR sunt prețioase fiind obținute printr-o procedură invazivă. Probele din tuburi cu scurgeri trebuie procesate, dar se avertizează medicul despre posibilitatea contaminării.

Dacă proba are un volum insuficient se apelează medicul pentru a stabili prioritatea testelor cerute.

Mycobacterium tuberculosis este mai bine diagnosticat prin PCR comparativ cu alte metode rapide.

III. Procedura de lucru

Proba se procesează **imediat** ce a fost primită. Se va utiliza hota pentru biosiguranță pentru prevenirea contaminării probei sau a culturii, precum și pentru protecția personalului laboratorului.

Examenul microbiologic al LCR rămâne metoda de referință pentru diagnosticul meningitei bacteriene acute. Această procedură este una dintre cele mai urgente determinări microbiologice din practica medicală, dată fiind gravitatea deosebită a infecțiilor sistemului nervos central (SNC), sensibilitatea agenților etiologici bacterieni la variațiile factorilor de mediu extern (temperatură); precum și necesitatea începerii tratamentului antimicrobian, cât mai rapid, ținut și corect.

LCR-ul normal: fluid steril, incolor și clar “ca apa de stâncă”, ce conține 3-5 celule nucleate/ mmc, 50- 70 mg/dl glucoză ($\frac{2}{3}$ din glicemie), 15- 40 mg/dl proteine; 680- 730 mg/ dl cloruri.

III.1. Examen macroscopic

Se înregistrează volumul LCR și aspectul macroscopic (transparență, culoare).

Aspectul LCR poate fi modificat în condiții patologice de cauză infecțioasă sau neinfecțioasă, în funcție de prezența în concentrații semnificative a leucocitelor, hematiilor, bacteriilor și/ sau proteinelor, astfel:

***Transparența:**

- **LCR normal:** incolor și clar “ca apa de stâncă”,
- **LCR clar:** meningite virale, tuberculoase, micotice, lues.
- **LCR opalescent:** conținut ridicat de celule (PMN, limfocite, hematii); opalescența se evidențiază la > 200 PMN/ mmc, > 400 limfocite/ mmc sau > 700- 800 eritrocite/ mmc
- **LCR tulbure, purulent** (crem gălbui, verzui ca “zeama de varză”) în meningite bacteriene acute, abces cerebral.

***Culoare:**

- **LCR sanguinolent:** accident de puncție, hemoragie meningeală, meningita hemoragică (meningita carbunoasă, meningita leptospirotică sau cu *Listeria monocytogenes*)
- **LCR roșu transparent, aspect “lacat”:** în hemoragii meningiene mai vechi,
- **LCR xantocromic** (cu diferite nuanțe de galben, datorită prezenței methemoglobinei sau bilirubinei): în hemoragie cerebrală, icter.

***Fluiditatea:**

- **LCR normal:** fluid ca apa,
- **LCR purulent:** vâscos, filant,
- **LCR care poate coagula sau forma vâl** (meningita tuberculoasă).

III.2. Examenul citologic cantitativ

Este necesar pentru probele de LCR clar, opalescent sau tulbure. Se efectuează cât mai repede posibil, pentru a evita scăderea numărului PMN (cu 50% după o oră la temperatura camerei, respectiv cu 68% după două ore).

Procedură

Se omogenizează proba și se aspiră aseptice un volum mic pentru camera de numărare.

Se numără leucocitele. Numărul acestora depinde de mai mulți factori: cauza meningitei, stadiul infecției, caracterul LCR. Astfel, în caz de LCR cu cheag sau vâl, numărul obținut prin citire este redus de absorbția celulelor pe fibrină, iar în caz de LCR hemoragic trebuie aplicată o corecție a numărului leucocitelor în funcție de numărul de hematii. Există mai multe formule de corecție, de ex. scăderea unui leucocit la 700 de hematii.

Numărătoarea elementelor nucleate în LCR:

- se face din LCR necentrifugat,
- se exprimă în număr elemente nucleate/ mmc,
- se realizează în camera Fuchs- Rosenthal, sistem automat de hemogramă (cu program pentru citire LCR) sau ambele.

***Lichid opalescent:** într-o eprubetă sterilă se amestecă o cantitate mică de LCR + 1 picătură ac. acetic glacial (pentru lizarea eventualelor hematii). Se așteaptă 1-2 min . Se agită bine pentru omogenizare. Se prelevă aseptice cu pipeta Pasteur o cantitate mică de lichid , suficientă pentru a umple camera de numărare Fuchs-Rosenthal, cu grijă, să nu se formeze bule de aer. Se asigură aderența lamei. Se numără elementele nucleate pe 5 rânduri (delimitate de linii triple), cu obiectiv de 10×. Pe un pătrat mic: se numără celulele de pe latura stângă, latura superioară, apoi restul suprafeței; în zona laturilor se numără numai celulele care intră cu mai mult de jumătate în aria pătratului.

***Lichid tulbure, purulent:** se efectuează diluții decimale cu ser fiziologic steril: 1/10; 1/100; 1/1000, la care se adaugă 1 picătură ac. acetic glacial, pentru liza eventualelor hematii. Nr.de elemente se înmulțește cu diluția.

***Lichid hemoragic:** se efectuează diluții decimale, la care se adaugă ac. acetic glacial (funcție de intensitatea hemoragiei); numărul de elemente se înmulțește cu diluția.

Interpretare:

Creșterea numărului de leucocite în LCR poate să apară în inflamații de cauză infecțioasă sau neinfecțioasă. Determinarea numărului de leucocite permite confirmarea suspiciunii clinice de meningită și orientarea cu privire la etiologia bacteriană sau virală, dar interpretarea semnificației este îmbunătățită prin corelarea cu rezultatele altor teste (examenul biochimic al LCR - glicorahie, raportul glicorahie/glicemie, proteinorahia, etc.). Interpretarea este mai dificilă în cazul suspiciunii de infecție de șunt, deoarece inflamația este mai redusă comparativ cu cea din meningita bacteriană și este dificil de diferențiat de inflamația postoperatorie.

Numărul leucocitelor în LCR crește variabil în funcție de natura și stadiul evolutiv al meningitei:

- 10^3 celule nucleate/mm³ în meningitele acute bacteriene;

- 50-1000/mm³ în meningitele virale;
- 50-500/mm³ în meningita tuberculoasă.

În meningitele bacteriene de debut sau în cele “decapitate” prin terapie antimicrobiană oarbă, numărul celulelor din LCR poate fi redus, iar citologia este mixtă.

III.3. Examenul biochimic al LCR

Se realizează în paralel cu examenele microbiologice, rezultatele fiind utile pentru diagnosticul meningitei. Modificări ale parametrilor biochimici ai LCR pot să apară în boli infecțioase sau neinfecțioase.

a) Determinarea proteinorahiei:

Creșterea albuminorahiei se întâlnește în: meningită, meningoencefalită, neuroleues, abcese cerebrale, hemoragii subarahnoidiene, tumori intracraniene, traumatism cranio-cerebral, scleroză multiplă.

b) Determinarea glucozei în LCR

În mod normal glicorahia are o valoare cuprinsă între 50-70% din glicemia pacientului. În meningita bacteriană glicorahia este scăzută (<40 mg/ dl). Hipoglicorahia poate fi mai dificil de identificat în contextul unei hiperglicemii, de aceea raportul glicorahie/ glicemie poate fi mai util.

Hiperglicorahia este întâlnită în tumori cerebrale, afecțiuni hipotalamice.

Hipoglicorahia este întâlnită în meningite bacteriene (inclusiv tuberculoase), meningite fungice, meningite neoplazice (carcinomatoase, limfomatoase, leucemice).

c) **Determinarea clorurorahiei:** concentrația clorului în LCR este superioară cu 15% celei plasmatică. Clorurorahia este dependentă de valoarea cloremiei, precum și de cea a proteinorahiei. Este un parametru chimic foarte important în diagnosticul etiologic diferențial al meningitelor cu LCR clar:

- **meningita tuberculoasă:** hipocloremie, hipoclorurorahie și hiperproteinorahie.
- **meningite virale:** ușoară hiperproteinorahie și nivel normal al clorurilor.

Tabelul 1. Profilul citologic și biochimic al LCR în diferite tipuri de meningită

Parametru	Meningita bacteriană	Meningita tuberculoasă	Meningită fungică	Meningita virală
Nr elemente nucleate/mmc	$10^3 - 10^4$	50-500	100-500	50-1000
tip celule	PMN >80%	Mononucleare >80-90%	Mononucleare	Mononucleare (până la 100%)*
Proteinorahie	mult crescută (150-500 mg/dL)	crescută (100-200 mg/dL)	crescută	ușor crescută (<100 mg/dl)
Glicorahie	scăzută (<40 mg/dL)	scăzută (<40 mg/dL)	scăzută (<40 mg/dL)	normală
Clorurorahie	scăzută	scăzută		normală

PMN - polimorfonucleare

*la debut predomină PMN

III.4. Realizarea frotiurilor pentru examenul citologic calitativ și bacterioscopic

Procedură

Frotiurile pentru aceste examene se realizează din sedimentul obținut prin centrifugarea probei, în cazul probelor de LCR clar, opalescent sau turbure; prin citocentrifugare se îmbunătățește sensibilitatea examenului microscopic.

În cazul probelor purulente se folosește proba necentrifugată.

- Dacă LCR este clar, opalescent sau turbure se centrifughează tubul la 1500 g, 10-15 min (în suspiciunea de meningită tuberculoasă 15 min la 3000 g). Se efectuează mai multe frotiuri. Etalarea sedimentului pe lamă se face în zona centrală a acesteia, efectuând cu anșa un frotiu în formă de spirală, cu spire care nu se suprapun, pentru a obține un frotiu în strat unicelular (permit evidențierea unei morfologii și tinctorialitate celulară corectă).
- Dacă LCR este purulent sau volumul de probă nu este suficient pentru concentrare se face frotiul punând 1-2 picături de LCR pe o lamă degresată și decontaminată în prealabil cu alcool. Nu se etalează frotiul în spirală, nu se dispersează picăturile de LCR.
- În suspiciunea de meningită cu *Cryptococcus* spp., se realizează preparat umed între lamă și lamelă, din sediment LCR, în tuș India sau suspensie nigrozină.

Se usucă lamele la aer într-o hotă de biosiguranță sau acoperite pe un aparat de încălzit lame. Se fixează frotiurile și se colorează albastru de metilen și Gram. În suspiciunea de meningită tuberculoasă un frotiu se colorează Ziehl-Neelsen.

Se examinează imediat frotiurile colorate Gram (examen bacterioscopic) și albastru de metilen (examen citologic calitativ și bacterioscopic). Examenul are sensibilitate mai bună la pacienții care nu au primit tratament antibiotic.

Frotiul colorat Giemsa permite examenul citologic: se apreciază procentual categoriile celulare: leucocite polinucleate, limfocite, monocite, macrofage, hematii, notându-se aspectul lor, gradul de maturizare, aspectul reactiv sau cronic al limfocitelor (limfocite mici, picnotice, cu zona de citoplasma foarte îngustă, aproape invizibilă).

Interpretare Orice bacterie observată este considerată semnificativă. Cu toate acestea, bacteriile văzute doar într-unul sau două câmpuri se confirmă cu un al doilea frotiu. Dacă examenul este pozitiv se anunță imediat medicul. Un rezultat negativ nu exclude infecția, mai ales la pacienții care au primit tratament.

III. 5. Teste rapide

Teste moleculare

Testele moleculare, bazate obișnuit pe PCR, în special cele în format point-of-care, pot să ofere rapid (30-90 min) informații importante atât pentru clinician cât și pentru microbiolog. În funcție de echipamentele și trusele disponibile aceste teste pot detecta un singur microorganism sau mai multe (virusuri, bacterii mai frecvent implicate). Testele moleculare reprezintă metoda de elecție pentru investigarea cauzei meningitelor virale.

Teste de detecție a antigenelor

Testul de detecție antigenică este deosebit de util în suspiciunea de meningită cu *Cryptococcus* deoarece are o sensibilitate mare (>90%). În cazul altor etiologii trusele de detecție a antigenelor bacteriene libere în LCR (latex-aglutinare) au specificitate foarte bună dar o sensibilitate moderată, de aceea absența reacției nu exclude prezența unor bacterii. Această metodă nu poate substitui colorația Gram și cultura. Dacă avem la dispoziție o cantitate foarte mică de LCR, frotiul colorat Gram și cultura trebuie să aibă prioritate față de detectarea antigenelor bacteriene.

III.6. Cultivarea

Inocularea mediilor și incubarea

Se aspiră cu o pipetă sterilă lichid din partea inferioară a tubului. Alternativ se poate folosi sedimentul obținut după centrifugare. Se inoculează câte 2 sau 3 picături pe mediile de cultură (uzual agar sânge și agar chocolate). Se epuizează în cadrane folosind o ansă separată pentru fiecare placă sau o ansă sterilizată în flacără. Dacă este disponibil mai mult de 1 ml pentru cultura de rutină se inoculează 1 ml în bulion de îmbogățire (mediul BHI, medii pentru hemocultură). În cazul probelor de la imunodeprimați pentru izolarea fungilor se inoculează în bulion Sabouraud un volum mare de probă pentru a crește randamentul cultivării *Cryptococcus* și *Coccidioides*. În cazul suspiciunii de meningită cu anaerobi (traumatisme ale extremității cefalice, neurochirurgie, chirurgie ORL) se inoculează pe medii și se incubează în atmosferă pentru anaerobi.

Se incubează la 35-37°C plăcile în atmosferă cu 5-10% CO₂ și bulioanele în aerul ambiant.

Examinarea culturii

Se examinează toate mediile la 24 h pentru observarea macroscopică a creșterii bacteriene.

Dacă după 24 h nu se observă o creștere vizibilă pe mediile de cultură, se reincubează.

a. Se citește zilnic plăcile timp de 4 zile.

- b. Dacă frotiul Gram este pozitiv și nu există creștere bacteriană pe plăci sau a fost solicitată cultura fungică, se incubează toate plăcile timp de cel puțin 1 săptămână.
- c. Se examinează bulionul zilnic timp de 4 zile și se ține timp de 7 zile înainte de eliminare.
Dacă se observă o cultură:
 - a. Se anunță medicul despre caracterele culturii pozitive.
 - b. Se identifică toate microorganismele, utilizând teste rapide: examen microscopic, teste biochimice, teste antigenice; dacă este disponibilă, identificarea prin MALDI-TOF este utilă pentru identificarea rapidă a izolatelor.
 - c. Se efectuează antibiograma pentru izolatele cu semnificație.
 - d. Nu se efectuează identificarea completă sau antibiograma dacă izolatul este în mod clar un contaminant. Izolatele de stafilococi coagulazo-negativi sau *Corynebacterium* sunt probabil contaminanți în infecțiile comunitare dar pot fi o cauză de infecție în infecțiile de șunt și cele post traumatice.

Interpretare

În general, o cultură pozitivă indică infecția cu microorganismul respectiv.

Lipsa leucocitelor în LCR nu exclude infecția, în special în rombencefalita cu *Listeria monocytogenes*. Prezența bacteriilor în număr mare în lipsa reacției inflamatorii poate fi întâlnită la pacienții imunocompromiși.

Cultura negativă din LCR dar izolarea din hemocultură la un pacient cu meningită confirmă diagnosticul.

Limite

Rezultate fals pozitive pot rezulta din contaminarea probei cu microbiota pielii.

Rezultatele fals negative pot fi cauzate de un prezența unui număr redus de organisme, de administrarea tratamentului antibiotic anterior recoltării sau de natura fastidioasă a microorganismului.

III.7. Testarea sensibilității la antibiotice

Testarea sensibilității la antibiotice se poate face direct din proba de LCR dacă microscopia a fost pozitivă, dar confirmarea rezultatului prin metoda difuzimetrică sau prin determinarea CMI trebuie făcută din inocul standardizat obținut din cultură.

IV. Raportarea rezultatelor

Se raportează rezultatul examenelor citologic cantitativ, citologic calitativ și bacterioscopic (frotiul Gram) cât mai curând posibil, de obicei în termen de 1 oră de la primirea probei.

Se raportează imediat rezultatul testelor moleculare, dacă au fost efectuate.

Se raportează identitatea izolatului (genul și specia probabilă de îndată ce testele preliminare sunt finalizate) sau absența cultivării.

Se comunică rezultatul la testarea sensibilității la antibiotice.

Se înregistrează notificarea medicului cu privire la rezultatele pozitive.

V. Bibliografie

Buiuc D, Neguț M - Tratat de microbiologie clinică. Ediția a III-a, Editura Medicală, 2017

Cornaglia G, Courcol R et al. European Manual of Clinical Microbiology, 1st ed, 2011

Garcia L S., Isenberg HD. Clinical Microbiology Procedures Handbook, 2nd Edition, ASM Press 2007

He T, Kaplan S et al. Laboratory Diagnosis of Central Nervous System Infection. *Curr Infect Dis Rep.* 2016; 18(11): 35.

McGill F., Heyderman R.S. et al. The UK joint specialist societies guideline on the diagnosis and management of acute meningitis and meningococcal sepsis in immunocompetent adults. *J Infect* 2016; 72:405-438

Public Health England. (2017). Investigation of Cerebrospinal Fluid. UK Standards for Microbiology Investigations. B 27 Issue 6.1.

Vandepitte J, Verhaegen J et al. Basic laboratory procedures in clinical bacteriology. 2nd ed. World Health Organization, 2003

Investigarea bacteriologică a tractului respirator superior și a cavităților conexe

I. Introducere

Infecțiile de tract respirator superior (ICRS) sunt printre cele mai frecvente îmbolnăviri pentru care pacienții se adresează medicului.

Majoritatea ICRS sunt de origine virală și sunt autolimitate, tratamentul fiind doar simptomatic. Solicitățile de examen bacteriologic excesive duc la supramedicalizarea cazurilor, creșterea costurilor, dar în același timp, nu oferă informații concludente care să contribuie la un tratament mai bun. În cele mai multe situații nevoia tratamentului antibiotic se decide pe criterii clinice, iar alegerea antibioticului se face empiric pe baza recomandărilor ghidurilor clinice. Diagnosticul bacteriologic efectuat fără indicații reale, duce frecvent la izolarea unor colonizanți cu atribuirea de rol etiologic și cu testarea sensibilității la antibiotice a acestora, ceea ce, de cele mai multe ori, conduc la tratamente antibiotice abuzive.

Factorul limitativ cel mai însemnat al examenului bacteriologic, din această sferă de patologie, este prezența în mod normal a unei flore bacteriene variate, inclusiv a unor potențial patogeni. De cele mai multe ori este practic imposibil de stabilit când o bacterie izolată este într-adevăr implicată în procesul infecțios. Este de accentuat că portajul bacteriilor cu potențial patogen nu justifică tratament antibiotic decât în situații foarte rare. De aceea examenul bacteriologic trebuie să se limiteze la situațiile în care se pot genera rezultate concludente. Astfel, analizele relevante și cu valoare informativă certă sunt:

- examenul bacteriologic al exsudatului faringian pentru stabilirea etiologiei streptococice a anginei acute,
- examenul bacteriologic al puroiului sinusal recoltat prin aspirare sau cu tampon de la nivelul meatului sinusal,
- examenul bacteriologic al puroiului otic aspirat,
- screeningul portajului de *S. aureus* (în anumite situații, detaliate mai jos)
- examenul bacteriologic al secreției nazofaringiene pentru detectarea *Bordetella pertussis*.

Flora microbiană a căilor respiratorii superioare

Căile respiratorii superioare prezintă o floră bacteriană bogată și variată. Componenta acesteia poate fi influențată de factori multipli. Se pot observa variații în funcție de vârstă, de patologii asociate, de expunerea la antibiotice, spitalizări anterioare, statusul imun, vaccinările aplicate (în urma introducerii vaccinului împotriva *Streptococcus pneumoniae* se observă o schimbare a serotipurilor colonizante).

La persoanele sănătoase, deși există o variație de la persoană la persoană, flora microbiană a orofaringelui este în general dominată de streptococi din grupul viridans, stafilococi coagulazonegativi, micrococi, coryneformi, neisserii nepatogene, *Haemophilus spp*, *Moraxella catarrhalis*. Sunt prezente în număr important bacteriile strict anaerobe, dintre care cel mai bine reprezentate sunt speciile din genul *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Fusobacterium*, speciile anaerobe streptococi, *Veillonella*, *Actinomyces*. Specii de *Candida* și alte levuri pot fi, de asemenea, prezente în număr

reduc. În flora cavității nazale predomină stafilococii coagulazo-negativi, coryneformii. În regiunea subglotică și în sinusurile paranazale nu sunt prezente bacterii în mod normal. La pacienții intubați și ventilați mecanic și la pacienții cu afecțiuni pulmonare cronice se poate detecta o floră colonizantă a regiunii subglotice.

Pe lângă flora normală a căilor respiratorii superioare, pot fi prezente pentru o perioadă variabilă de timp, specii bacteriene potențial patogene, de exemplu: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, acestea colonizând nazo- și/ sau orofaringele persoanelor sănătoase. De asemenea, la pacienți cu spitalizări recente se poate detecta prezența unor bacterii Gram-negative.

Spațiul sublaringeal, sinusurile, urechea medie și internă nu sunt populate, în general, de bacterii. În mod obișnuit, virusurile nu fac parte din flora microbială, deși uneori pot fi izolate și de la persoane asimptomatice.

Prezența potențialilor patogeni în flora normală a persoanelor sănătoase este un fenomen comun. Aproximativ 10-40% a populației este colonizată cu *S. aureus*, în colectivitățile de copii poate ajunge la rate mai înalte, până la 50-70%. *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* sunt bacterii care, ocazional, pot fi implicate în infecții ale tractului respirator și sunt foarte frecvent prezente la copiii asimptomatici din colectivități.

Datorită prezenței colonizării bacteriene, examenul bacteriologic al secreției nazale în infecțiile tractului respirator superior, nu este concludent din punct de vedere al diagnosticului etiologic și, în consecință, există riscul unui tratament antibiotic abuziv.

De asemenea, nu este justificat screeningul acestora la persoane sănătoase – cu excepția screeningului portajului nazal în anumite situații (vezi mai jos), pentru că detectarea acestora nu are nicio relevanță clinică, nu necesită tratament antibiotic și nu necesită măsuri speciale.

II. Examenul bacteriologic al exudatului faringian

Context clinic

Diagnosticul faringitei acute streptococice

S. pyogenes (streptococ beta-hemolitic grup A) este agentul etiologic principal al faringitei acute bacteriene. Simptomele comune sunt febra, odinodisfagia, adenomegalia laterocervicală de regulă dureroasă. Diferențierea clară între faringita streptococică și cea virală nu este posibilă pe baza simptomatologiei, este nevoie de examen bacteriologic pentru confirmarea etiologiei. Afectarea respiratorie difuză poate fi totuși un argument în favoarea etiologiei virale. Faringitele virale fiind mult mai frecvente, se recomandă utilizarea unor scoruri clinice pentru a efectua diagnostic bacteriologic, doar în acele cazuri în care etiologia streptococică este probabilă. Utilizând aceste scoruri se exclud de la analize cazurile în care probabilitatea infecției virale este mare, evitând prelucrările inutile și eficientizând diagnosticul bacteriologic. Analizele bacteriologice inutile în contextul faringitelor virale cresc riscul depistării portajelor streptococice, cărora li se vor atribui în mod fals rol etiologic.

Cel mai cunoscut este scorul Centor modificat, prin care se atribuie câte un punct pentru:

- prezența adenopatiei cervicale
- prezența exudatului pe amigdale
- lipsa tusei

- febră (temperatură peste 38°C)

La acestea se adaugă un punct în cazul pacienților cu vârsta între 3-14 ani și se scade un punct la cei peste 45 de ani.

Un scor ≤ 0 reprezintă un risc de infecție cu *S. pyogenes* de 1-2,5%. Scorul 1 este asociat cu un risc de 5-10%, cel de 2 cu 11-17%, cel de 3 cu 28-35%, cel de ≥ 4 cu 51-53% risc de infecție cu *S. pyogenes*.

Examenul bacteriologic se recomandă la scor de 2-3 puncte și opțional la 1 punct, în cazul în care se obțin cel puțin 4 puncte tratamentul antibiotic empiric poate fi început și în lipsa diagnosticului etiologic.

Rolul altor bacterii cum ar fi streptococii grup C și G este justificat de asemenea în situația prezenței simptomatologiei. Nu există date care să susțină rolul streptococilor grup B și F în etiologia faringitei.

Diagnosticul bacteriologic în situații particulare

Arcanobacterium haemolyticum poate să determine faringită însoțită de rash, sinuzită, celulită, septicemie.

La pacienții cu transplant și/sau hematologici se impune testarea pentru *Pseudomonas aeruginosa*, enterobacterii și *Candida* spp.

La pacienții cu fibroză chistică se urmărește portajul de *P. aeruginosa* și *S. aureus*.

Angina Plaut-Vincent sau angina ulcero-necrotică este determinată de asocierea a 2 specii bacteriene strict anaerobe: *Fusobacterium necrophorum* și *Borrelia vincentii*. Asocierea fusospirilară este evidențiată în frotiuri colorate Gram din secrețiile tonsilare.

În cazul prezenței pseudomembranelor la nivelul faringelui trebuie luată în considerare implicarea *Corynebacterium diphtheriae* sau mononucleoza infecțioasă, cu sau fără suprainfecție bacteriană.

Neisseria meningitidis colonizează mucoasa tractului respirator superior. Rata de colonizare crește în special în sezonul rece. Depistarea acestui germen din tractul respirator superior nu are valoare clinică.

Neisseria gonorrhoeae poate cauza forme ușoare de faringită. Urmărirea acesteia se va face la cererea clinicianului în prezența unor factori de risc sau anamneză sugestivă.

Mycoplasma pneumoniae se asociază statistic cu istoric de faringită recurentă. Detecția prin cultivare nu se efectuează de rutină. *Chlamydia pneumoniae* poate fi implicată în faringite acute însă diagnosticul de rutină nu se adresează acesteia.

În epiglotită agenții etiologici mai frecvent implicați sunt *Haemophilus influenzae* și *Haemophilus parainfluenzae* urmați de *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*. Recoltarea exsudatului faringian în epiglotită poate induce spasm cu obstrucția căilor respiratorii, din acest motiv trebuie evitată. Pe de altă parte prezența portajul frecvent al germenilor mai sus menționați îngreunează stabilirea etiologiei infecției. Deoarece epiglotita poate fi însoțită de bacteriemie, se poate efectua hemocultură în vederea unui diagnostic etiologic.

La pacienții cu abces amigdalian se va avea în vedere identificarea următoarelor microorganisme: *S. pyogenes*, *H. influenzae*, *S. aureus*, bacterii anaerobe (*Prevotella* spp, *Fusobacterium necrophorum*, *Bacteroides fragilis*, *Peptostreptococcus* spp, *Porphyromonas* spp) iar recoltarea nu se va face cu tamponul, ci din puroiul drenat.

În amigdalita cronică examenul bacteriologic este neconcludent. Procesul infecțios are loc în profunzimea criptelor amigdaliene, iar flora de pe suprafața amigdalelor accesibilă recoltării este diferită de cea din profunzime.

Portajul de *Staphylococcus aureus* din exudatul faringian se va urmări doar în cazul pregătirii preoperatorii (chirurgie cardiovasculară, ortopedie), preferabil pe lângă examinarea secreției nazale.

Indicații

Cea mai importantă indicație a examenului bacteriologic al exudatului faringian este confirmarea etiologiei streptococice a faringitei acute. În anumite situații clinice particulare pot fi urmărite și alte bacterii, conform tabelului nr. 1.

Persoanele asimptomatice nu trebuie testate prin teste rapide sau cultură deoarece un anumit procent din populație sunt purtători faringieni persistenți de streptococi fără efecte negative pentru sănătate.

Screeningul portajului asimptomatic de *S. pyogenes* nu se recomandă nici în cazul apariției faringitei streptococice sau a scarlatinei în colectivități de copii. Se va testa portajul asimptomatic doar în cazul contactilor unor pacienți cu istoric de febră reumatismală. De asemenea, poate fi luată în considerare testarea membrilor de familie a copiilor care au faringită streptococică recurentă de cel puțin 3 ori în decurs de 3 luni.

Recoltare și transport

Proba trebuie recoltată înaintea începerii terapiei antibiotice locale sau generale. Pentru recoltare se utilizează tamponane poliester Dacron sau alginat de calciu; se apasă limba iar cu tamponul se șterge bine aria amigdaliană și peretele posterior al faringelui. Se va evita atingerea limbii și a uvulei. O sensibilitate mai mare pentru detecția streptococilor beta-hemolitici s-a observat utilizând tamponane de nylon "flocked". Există câteva recomandări speciale pentru recoltare:

- În prezența ulcerărilor sau a exudatului recoltarea se va face de la acel nivel.
- În cazul suspiciunii de difterie recoltarea se va face de la periferia pseudomembranelor sau de sub acestea.
- Pentru *N. gonorrhoeae* este recomandată utilizarea unui mediu de transport adecvat.
- Pentru *Candida spp* proba se recoltează de pe limbă, palat, partea internă a obrazilor.
- În cazul abcesului tonsilar se va recolta puroi prin aspirare.

Proba recoltată se transportă în maxim 2 ore la laborator. Dacă intervalul de timp pentru transport se prelungește atunci se va utiliza mediu de transport Amies și proba poate fi păstrată până la 24 h la frigider sau la temperatura camerei.

Prelucrare bacteriologică

Examen microscopic

Examenul microscopic se efectuează și are semnificație doar în cazul anginei Vincent pentru evidențierea asocierii fuzo-spirilare. Frotiul colorat Gram din secrețiile recoltate cu tamponanele faringiene nu are valoare diagnostică pentru faringita streptococică, datorită prezenței streptococilor comensali.

Cultivare

Tamponul se rulează pe cca 1/6 din suprafața plăcii cu mediul de cultură apoi cu ajutorul ansei se face dispersia în 4 cadrane. Se fac câteva înțepături cu ansa în mediul de cultură, într-o arie neînsămânțată, pentru evidențierea hemolizei complete beta, în cazul tulpinilor de *Streptococcus pyogenes*, producătoare de hemolizină oxigen-labilă. Pentru obținerea coloniilor izolate este importantă diseminarea pe o placă întreagă a produsului. Însămânțarea a două sau mai multe probe pe aceeași placă este inacceptabilă.

În funcție de solicitarea primită la laborator și de datele clinice se utilizează mediile de cultură prezentate în tabelul 1.

Identificare

Atenție! – se vor lua în considerare doar coloniile „mari” beta-hemolitice (> 0,5 mm); pentru coloniile mici beta-hemolitice care aglutinează cu grupul A, C sau G (și care pot fi bacterii comensale de tip streptococi din grupul *anginosus*) se vor efectua obligatoriu teste de confirmare: PYR (care este pozitiv pentru *S. pyogenes*, *S. porcinus*, *S. iniae*, enterococi) și VP (care este negativ pentru *S. dysgalactiae subsp. equisimilis* și *S. equi subsp. zooepidemicus*), sisteme comerciale de identificare. MALDI-TOF oferă o identificare rapidă și precisă.

Streptococii de grup A sunt sensibili la bacitracină în procent de 95% iar unele tulpini de streptococi grup B, C și G pot să fie și ele sensibile la bacitracină. Streptococii grup C și G sunt sensibili la trimethoprim-sulfamethoxazol (SXT) iar streptococii grup A și B sunt rezistenți.

Atenție! Testarea sensibilității la bacitracină și SXT trebuie efectuate pe subculturi pure și nu pe însămânțarea primară. Conținutul discului de bacitracină trebuie să fie de 0,04 UI, în cazul utilizării unor discuri cu conținut de bacitracină mai mare se obține sensibilitate la mai mulți streptococi grup non-A.

În cazul în care pe froțiul Gram se evidențiază bacili Gram-pozitivi se va efectua testul catalazei și testul CAMP. *A. haemolyticum* este catalază negativ și revers CAMP pozitiv cu tulpina de referință *S. aureus* ATCC 25923. Atenție: *A. haemolyticum* poate aglutina cu seruri anti-streptococ de grup A, B, C, G, F, examenul microscopic fiind esențial pentru stabilirea morfologiei bacteriene.

Pentru prelucrarea streptococilor β-hemolitici și identificarea *Arcanobacterium haemolyticum* se vor urma algoritmi din figurile 1 și 2.

În cazul izolării *Corynebacterium diphtheriae* (de la persoane care călătoresc sau provin din zone endemice de difterie, simptomatici sau purtători) se impune identificarea tulpinilor toxinogene (cel mai rapid, prin metode PCR). Necesită confirmare într-un laborator de referință.

Tabelul 1. Mediile de cultură, condițiile de incubare și microorganismele urmărite din secreția faringiană și alte produse biologice relevante în funcție de situația clinică

Context clinic/ solicitare	Proba biologică	Mediu de cultură	Condiții de incubare			Microorganisme țintă
			Temperatura	Atmosfera	Timp	
Faringita amigdalita	Exsudat faringian	Agar sânge berbec	35-37°C	Aerobă 5-10% CO ₂ Sau anaerobioză (crește detecția beta- hemolizei)	18 – 48 h	Streptococi beta- hemolitici grup Lancefield A, C, G
Prezența de false membrane, călătorie în zone cu risc sau contact cu persoane confirmate cu infecție	Exsudat faringian si nazal sau Exsudat nazofaringian	Agar sânge de berbec și de dorit medii speciale: OST, Agar Loeffler, Mediu Tinsdale modificat	35-37°C	Aerobă	18 – 48 h	<i>Corynebacterium diphtheriae</i> (cazurile suspecte se trimit la spitalele de boli infecțioase unde se realizează și examenul microbiologic)
Portaj <i>S. aureus</i> Pregătire preoperatorie	Exsudat nazal Exsudat faringian	Agar sânge berbec Sau agar cromogen / selectiv	35-37°C	Aerobă	18 – 24 h	<i>Staphylococcus aureus</i>

Context clinic/ solicitare	Proba biologică	Mediu de cultură	Condiții de incubare			Microorganismele țintă
			Temperatura	Atmosfera	Timp	
Gonoree	Exsudat faringian	Agar chocolat și Agar selectiv GC, Sau Agar Thayer- Martin, Agar Martin-Lewis	35-37°C	5-10% CO ₂	40 – 48-72 h	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
Eșecul tratamentului sau amigdalita recurentă	Exsudat faringian	Agar sânge berbec	35-37°C	5-10% CO ₂	48-96 h	<i>Arcanobacterium haemolyticum</i>
Diabet, imunodeprimațicandidoz a orală	Exsudat faringian sau orofaringian Raclat lingual	Agar Sabouraud sau agar cromogen pentru fungi	35-37°C	Aerobă	40-48 h	Fungi
Durere sau amigdalită persistentă Boala Lemierre	Aspirat din colecție purulentă Fragment țesut necrotic	Agar anaerobi cu acid nalidixic și vancomicină	35-37°C	Anaerobă	5 – 7 zile	<i>Fusobacterium necrophorum</i>

Figura 1. Algoritm de diagnostic în faringita acută (coci Gram-pozitivi)

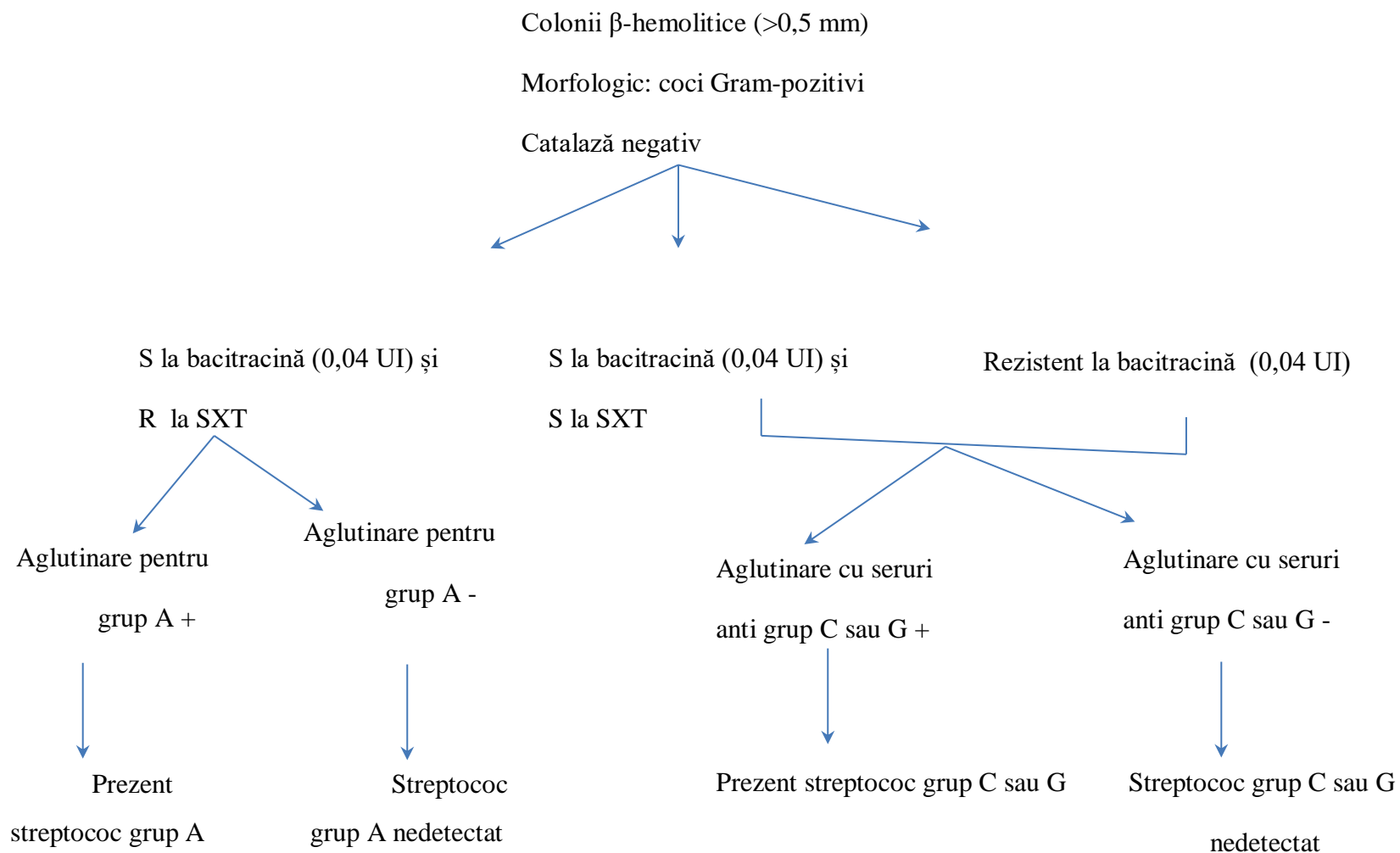


Figura 2. Algoritm de diagnostic în faringita acută (bacili Gram-pozitivi)

Colonii β -hemolitice

Morfologic: bacili Gram-pozitivi



Arcanobacterium haemolyticum

Testarea sensibilității față de antibiotice

Nu se va efectua de rutină, toate tulpinile de *S. pyogenes* și streptococii de grup C, G sunt sensibile la penicilină. Se va testa sensibilitatea la antibiotice alternative (macrolide, clindamicina) în cazul alergiei la penicilină. Antibiogramele se vor efectua conform recomandărilor standardului EUCAST.

Teste rapide de diagnostic

Testele rapide imunocromatografice de detecție a antigenului *Streptococcus pyogenes*, direct din exsudatul faringian, sunt teste de screening, „point-of-care”. Sunt recomandate pacienților cu scor Centor 3-4. Ele prezintă avantajul scurtării intervalului de timp până la diagnosticul etiologic, dar trebuie ținut cont de posibilele rezultate fals-negative (în situația unei cantități mici de bacterii, posibil ca urmare a unei recoltări neadecvate) sau fals-pozitive (prezența *S. anginosus*). Testele rapide nu evidențiază streptococii beta-hemolitici de grup C și G. Testele rapide au o sensibilitate de 70-90% și o specificitate de 98% față de cultură. Un test rapid negativ la un pacient adult nu justifică cultura de control decât în cazul în care sensibilitatea testului este sub 80%. Se recomandă confirmarea prin cultură a testelor rapide negative la pacienții pediatrici. Nu se vor confirma rezultatele pozitive indiferent de vârsta pacientului. Clinicianul este cel care alege dacă apelează la test rapid sau la cultură în funcție de datele clinice și de ghidurile de diagnostic și tratament.

Teste serologice

Titrul ASLO crește după 4-5 săptămâni de la infecție astfel testarea nu are rost în diagnosticul faringitei.

Important! Trebuie descurajată efectuarea testului ASLO în faringita acută deoarece rezultatele obținute în acest context pot fi derutante, au valoare informativă clinică limitată și pot genera utilizarea excesivă a antibioticelor.

Raportarea rezultatului

Examenul microscopic

Se raportează prezența fuzospirililor (angina Vincent).

Timp de raportare – cât de repede posibil, până la maxim 24 h de la primirea solicitării.

Cultivare:

Negativă: „streptococ beta-hemolitic grup A, C sau G nedetectat”; în cazul solicitărilor speciale (suspiciune difterie, gonoree, etc.) se va comunica „nu s-a izolat *Corynebacterium diphtheriae* sau *Neisseria gonorrhoeae* etc.”

Pozitivă: se raportează specia bacteriană izolată însoțită de o apreciere a cantității (prezența culturii în primul cadran = cultură săracă, sau până în al patrulea cadran = cultură bogată)

Observații:

- Pentru streptococi beta-hemolitici dacă sunt < 10 colonii pe aria de însămânțare se adaugă comentariul: „prezent streptococ beta-hemolitic grup A, C sau G în cultură săracă – posibil purtător sănătos; se va interpreta în context clinic”;
- Pentru *N. gonorrhoeae* se raportează prezența indiferent de cantitatea izolată
- Pentru *A. haemolyticum* se raportează prezența
- Pentru alte microorganisme izolate se adaugă comentariul „posibil colonizare, se va interpreta în context clinic”.
- Pentru *Candida spp.* se raportează prezența doar dacă sunt > 25 colonii pe aria de însămânțare (sub 25 colonii se consideră că face parte din flora normală)

Timp de raportare – raport preliminar la 16-24 de ore, raport scris în 48-72 ore

Limitele metodei

Un rezultat negativ pentru cultură poate fi urmarea dezvoltării în exces a florei normale, sau lipsa hemolizei β în culturile incubate aerob.

Rezultatele fals pozitive sunt urmarea interpretării greșite a testelor de identificare

III. Examenul bacteriologic al secreției nazale

Context clinic

Camera nazală anterioară este colonizată preferențial de către *S. aureus*. Pe lângă *S. aureus* pot fi regăsiți și alți potențiali patogeni, ca de exemplu *S. pyogenes*.

Bacteriile prezente în secrețiile nazale nu reprezintă factor predictiv pentru infecții ale sinusurilor, infecții otice, infecții de tract respirator inferior și superior. Nu se vor efectua culturi pentru microorganisme anaerobe. Din acest motiv prelucrarea secreției nazale în aceste situații duce la rezultate neconcludente.

Indicații

Portajul MRSA se urmărește la pacienții la risc pentru infecții asociate asistenței medicale. Fiecare unitate decide categoriile de pacienți la care să se efectueze screeningul, în funcție de specificul unității și a situației epidemiologice locale, conform recomandărilor ghidului național ”Diagnosticul, profilaxia și tratamentul infecțiilor determinate de *Staphylococcus aureus* meticilino-rezistent (MRSA)”. Portajul MSSA poate fi urmărit la pacienții la risc pentru infecții postoperatorii (chirurgie cardiovasculară, ortopedie) sau la pacienți cu patologii cutanate cronice, furunculoze recurente.

Atenție! Solicitarea examenului bacteriologic în afara situațiilor mai sus menționate reprezintă cereri nejustificate din punct de vedere medical. Orice rezultat pozitiv generat în acest context este neconcludent, contribuie la abuzul de antibiotice și în consecință la selectarea

rezistenței antimicrobiene. Astfel laboratorul de microbiologie are dreptul și obligația de a refuza examenul bacteriologic al secreției nazale recoltate în afara indicațiilor descrise mai sus.

Recoltare și transport

Se recoltează pe tampon alginat de calciu umectat în prealabil cu soluție salină sterilă. Se introduce tamponul în narinele anterioare și se rotește timp de 5 secunde în fiecare narină. Se utilizează mediu de transport Amies și se transportă în maxim 24 h, cu păstrare la temperatura camerei.

Sensibilitatea metodei de detecție a portajului de MRSA crește prin recoltarea concomitentă de tampoane și din alte zone ale corpului, respectiv axilă, regiunea inghinală, rect.

Prelucrare bacteriologică

Cultivare

Tamponul se rulează pe 1/4 din suprafața plăcii cu mediul de cultură după care se epuizează cu ansa. Mediile de cultură și condițiile de cultivare sunt prezentate în tabelul 2.

Tabelul 2. Mediile de cultură, condițiile de incubare și microorganismele urmărite din secreția nazală

Context clinic / solicitare	Proba biologică	Mediu de cultură	Condiții de incubare			Microorganisme țintă
			Temperatura	Atmosfera	Timp	
Portaj <i>S. aureus</i>	Secreție nazală	Agar sânge berbec Sau agar selectiv manitol-sare Sau agar cromogen MRSA	35-37°C	Aerobă	24 – 48 h	<i>S. aureus</i>

Testarea sensibilității la antibiotice

În cazul screeningului pentru determinarea portajului de MRSA la pacienții cu risc la infecții asociate asistenței medicale nu se va testa sensibilitatea la antibiotice.

În cazul în care screeningul se face în cadrul pregătirii preoperatorii sau la pacienții cu boli cutanate cronice sau recurente, în urma discuției cu medicii curanți, se pot testa antibiotice utilizate în cadrul regimului de eradicare a colonizării (de ex. mupirocin, acid fusidic)

Raportarea rezultatului:

Timp de raportare – raport preliminar cât de rapid posibil, raportul scris în 16-72 ore

- Rezultat pozitiv: pozitiv pentru MRSA/MSSA
- Rezultat negativ: MSSA/MRSA nedetectat

IV. Examenul microbiologic al secreției nazo-faringiene

Se recomandă în cazul suspiciunii de tuse convulsivă (*Bordetella pertussis* și *Bordetella parapertussis*). Tamponul nazofaringian se recoltează și pentru diagnosticul gripei și alte virusuri cu tropism respirator (nu se acceptă tampon nazal).

Recoltarea tamponului nazofaringian

Metoda de recoltare trebuie să evite contaminarea cu floră orală sau faringiană. Recoltarea se va face cu un tampon subțire care se va introduce în nas spre nazofaringe până la jumătatea distanței între ureche și baza nasului. Se rotește tamponul, se lasă 10-15 secunde pentru a absorbi microorganismele apoi se retrage și se introduce în mediul de transport. Tamponul nu se refrigerază și se transportă rapid la laborator.

În cazul diagnosticului molecular în gripă tamponul recoltat se introduce în mediul de transport lichid și se poate păstra la frigider 24 ore.

Examen microbiologic

Testele moleculare multiplex sunt utile pentru că pot detecta simultan și rapid variate microorganisme implicate în infecții respiratorii, în principal virusuri (gripale, v. respirator sincițial, v. paragripale, adenovirusuri, coronavirusuri, inclusiv SARS-CoV2, metapneumovirusuri, rinovirusuri) dar și unele bacterii (*Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydomphila pneumoniae*, *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis*). Rapiditatea obținerii acestor rezultate permite adoptarea eficientă a unor decizii terapeutice (reducerea duratei de administrare nejustificată a antibioticelor) sau de control al infecțiilor.

Teste moleculare pentru diagnosticul infecțiilor respiratorii diferă prin numărul de microorganisme detectabile, durata până la obținerea rezultatelor, complexitatea testării și echipamentul necesar, performanțe.

V. Examenul bacteriologic al puroiului sinusal

Context clinic - rinosinuzite acute, cronice

Analizele bacteriologice nu sunt indicate în cazul unei rinosinuzite acute bacteriene deoarece microorganismele implicate sunt bine caracterizate în cazul pacienților imunocompetenți. Se recomandă prelucrarea aspiratului sinusal obținut endoscopic de la pacienții cu afecțiuni persistente, forme supurative, pacienți imunosupresați, pacienți cu infecții asociate asistenței medicale. Tratamentul antibiotic se recomandă agenților patogeni cel mai frecvent izolați atât la copii cât și la adulți *H. influenzae*, *S. pneumoniae*, *M. catarrhalis*, *S. pyogenes*. Microorganismele asociate cu sinuzita cronică sunt cele din sinuzita acută plus anaerobi (*Peptostreptococcus spp*, *Fusobacterium spp*, *Prevotella spp*), *S. aureus*, iar la pacienți diabetici, imunosupresați fungii pot invada sinusurile. (*Mucor spp*, *Aspergillus spp*, etc). În 40% dintre cazuri nu se cultivă niciun microorganism. Acest lucru se poate datora utilizării de antibiotice, deficiențelor de recoltare, transport, prelucrare probă sau se poate suspiciiona implicarea

Mycoplasma pneumoniae și *Chlamydophila pneumoniae*. Bacili Gram-negativi (enterobacterii și nonfermentativi) frecvent multirezistenți la antibiotice pot fi implicați în sinuzita asociată asistenței medicale, în special la pacienți intubați, la cei cu sondă nazogastrică sau la cei cu intervenții la nivelul sinusurilor.

Recoltare și transport

Probele biologice sunt reprezentate de secreția sinusală obținută prin: aspirare, lavaj sinusal, chiuretaj sau biopsie. Recoltarea se va face de către un specialist ORL. Nu se acceptă: tampon nazal sau nazofaringian, sputa, saliva.

Prelucrarea bacteriologică

Examen microscopic

Se face colorația Gram; se urmărește prezența leucocitelor și categoriile microscopice bacteriene; leucocitele frecvente sau în cantitate moderată susțin diagnosticul de sinuzită,

Cultivare

Se însămânțează câte 1 probă pe placă, se face dispersia cu ansa pentru obținerea de colonii izolate (Tabelul 3.).

Interpretare

- Cultura pozitivă pentru *H. influenzae*, *S. pneumoniae*, *M. catarrhalis*, *S. pyogenes* indică infecție cu acest microorganism.
- Cultura pozitivă cu bacili Gram negativi sau *S. aureus* poate să nu reprezinte infecție.
- Cultura mixtă fără să predomine un microorganism în general indică o recoltare incorectă.
- Cultura negativă nu exclude sinuzita, adesea patogenii nu se pot cultiva.

Limite:

- Rezultatele inadecvate pot fi rezultatul contaminării probelor cu flora orală normală.
- Rezultatele fals negative sunt urmarea întârzierii în prelucrare.
- Rezultatele fals pozitive sunt urmarea suprainterpretării rezultatelor culturii.

Raportarea rezultatului

Timp de raportare – telefonic cât mai rapid posibil a rezultatelor preliminare, raportul scris în 16-72 ore.

Examenul microscopic

Se raportează prezența leucocitelor și a categoriilor microscopice observate cu referire la aspectul cantitativ (rare, frecvente).

Cultura

Se raportează:

- Specia bacteriană izolată, la care s-a stabilit semnificația clinică prin asocierea semnificativă a leucocitelor cu aceeași categorie microscopică cu organismul izolat în cultură.
- „Absența creșterii”

Tabelul 3: Mediile de cultură, condițiile de incubare și microorganismele urmărite din puroiul sinusal

Context clinic/ solicitare	Proba biologică	Mediu de cultura	Condiții de incubare			Microorganisme țintă
			Temperatura	Atmosfera	Timp	
Sinuzita	Puroi sinusal	Agar ciocolată	35-37°C	5-10% CO ₂	40-48 h	<i>H. influenzae</i> <i>M. catarrhalis</i> <i>S. pneumoniae</i> alte microorganisme în cultură pură care pot fi semnificative
		Agar sânge berbec	35-37°C	Aerobă	40 – 48 h	Streptococci beta-hemolitici grup A <i>S. aureus</i>
		Agar sânge berbec	35-37°C	5-10% CO ₂	40 – 48 h	<i>M. catarrhalis</i> <i>S. pneumoniae</i>
		Agar anaerobi	35-37°C	Anaerobă	48 h	Anaerobi
		Agar CLED sau MacConkey (dacă se observă bacili Gram-negativi pe frotiul direct sau în cazul sinuzitei nozocomiale)	35-37°C	Aerobă	16 - 24 h	Enterobacterales <i>Pseudomonas spp.</i>
		agar Sabouraud	35°C 25°C	Aerobă	40 – 48 h 15 zile	<i>Candida spp</i> <i>Aspergillus</i> și alți fungi

- „Creștere microbiană fără semnificație patogenă” cu precizarea speciilor bacteriene care au fost căutate dar nu au fost izolate (se declară capacitatea laboratorului pentru a izola și identifica microorganismele ținta).

VI. Examenul bacteriologic al puroiului otic

Context clinic

Infecții ale canalului auditiv extern sunt determinate de *P. aeruginosa* (otita externă malignă), *S. aureus*, *S. pyogenes*, enterobacterii, anaerobi, *Candida spp*, *Aspergillus niger*.

Microorganismele izolate de rutină în otita medie sunt *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *M. catarrhalis*, *Alloiococcus otitidis*. Pot să apară infecții localizate cu *S. aureus* și *S. pyogenes*. Infecții cronice sunt determinate în general de fungi, micobacterii, *Nocardia*. Flora tegumentară reprezentată de stafilococi și corinebacterii nu are semnificație clinică.

Indicații

În otita acută medie și otita medie recurentă recoltarea se va face de către un specialist ORL după curățarea și uscarea canalului auditiv extern. Se incizează/ perforează membrana timpanică cu seringă, se aspiră cu pompa sau se recoltează cu un tampon fin (interzis tamponul de bumbac). În cazul copiilor în lichidul din urechea medie se pot identifica alături de bacterii anumite virusuri dar diagnosticul virusologic nu este recomandat deoarece nu există terapie specifică.

Recoltare și transport

Produsul biologic este reprezentat de secreție otică din conductul auditiv extern recoltată pe tampon (produs calitativ inferior) sau secreție purulentă recoltată prin aspirare sau prin procedură chirurgicală din urechea medie. Pentru investigarea unei etiologii fungice se recoltează scuame din conductul auditiv extern. Probele se transportă cât mai repede posibil la laborator. Este de preferat ca tampoanele să fie introduse în mediu de transport Amies. Probele lichide vor fi transferate din seringă în recipient steril. Pentru etiologia anaerobă probele vor fi transportate în mediu de transport special pentru anaerobi.

Dacă transportul probelor se întârzie peste 2 ore, probele vor fi refrigerate cu excepția celor pentru anaerobi care vor fi păstrate la temperatura camerei.

Prelucrare bacteriologică

Examenul microscopic

Se prepară frotiuri din exsudatul recoltat din urechea medie. În cazul recoltării cu tamponul, se vor recolta 2 probe, una va fi folosită la efectuarea unui frotiu, iar cealaltă pentru efectuarea însămânțărilor. Frotiurile efectuate se colorează Gram.

Cultivare

Se însămânțează câte 1 probă pe placă, se face dispersia cu ansa pentru obținerea de colonii izolate (Tabelul 4).

Tabelul 4: Mediile de cultură, condițiile de incubare și microorganismele urmărite în otita externă și cea medie

Context clinic/ solicitare	Proba biologică	Mediu de cultura	Condiții de incubare			Microorganisme țintă
			Temperatura	Atmosfera	Timp	
Otita externă	Secreții recoltate pe tampon	Agar chocolate	35-37°C	5-10% CO ₂	40-48 h	<i>H. influenzae</i> <i>M. catarrhalis</i> <i>S. pneumoniae</i> alte microorganisme în cultură pură care pot fi semnificative
		Agar sânger berbec	35-37°C	Aerobă	40 – 48 h	Streptococci beta-hemolitici grup A <i>S. aureus</i>
Otita medie	Secreție purulentă recoltată prin aspirare sau prin procedură chirurgicală din urechea medie.	Agar sânger berbec	35-37°C	5-10% CO ₂	40 – 48 h	<i>M. catarrhalis</i> <i>S. pneumoniae</i>
		Agar anaerobi	35-37°C	Anaerobă	48 h	Anaerobi
		Agar CLED sau MacConkey	35-37°C	aerobă	16 - 24 h	Enterobacterales <i>Pseudomonas spp.</i>
		Agar Sabouraud	22-30 °C	aerobă	15 zile	Fungi

Bacterii cu rol etiologic posibil:

- *Alloiococcus otitidis* crește lent și dezvoltă colonii punctiforme umede de culoare galbenă și nu crește pe agar chocolate. Pe frotiul Gram nu se poate diferenția de stafilococi. Testele de identificare sunt: catalază negativ, PYR pozitiv, LAP (leucin aminopeptidază) pozitiv, sensibilitate la vancomicină.
- *Turicella otitidis* poate fi agent etiologic al otitei medii.

Interpretare

Cultură pozitivă pentru bacili Gram-negativi, streptococi beta-hemolitici sau *S. aureus* în otită externă în general indică prezența infecției.

Cultură pozitivă pentru *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *M. catarrhalis*, *Alloiococcus otitidis* în otită medie în general indică prezența infecției.

Cultura negativă nu poate exclude otita medie (în infecțiile cronice adesea cultura este negativă).

Limite

- Rezultatele fals negative pot fi urmarea cultivării excesive a florei normale cutanate.
- Rezultatele fals pozitive pot fi urmarea supradiagnosticului.
- *Alloiococcus otitidis* este dificil de cultivat.

Raportarea rezultatului:

Timpe de raportare – raport preliminar telefonic cât de rapid posibil, raportul scris în 16-72 ore.

Examenul microscopic

Se raportează prezența leucocitelor și a categoriilor microscopice observate cu referire la aspectul cantitativ (rare, frecvente).

Cultura

Se raportează:

- specia bacteriană izolată, la care s-a stabilit semnificația clinică prin asocierea semnificativă a leucocitelor cu aceeași categorie microscopică cu organismul izolat în cultură.
- „Absența creșterii” sau ”Fără creștere bacteriană”
- „Creștere microbiană fără semnificație patogenă” cu precizarea speciilor bacteriene care au fost căutate dar nu au fost izolate (se declară capacitatea laboratorului pentru a izola și identifica microorganismele țintă).

Mulțumiri

La realizarea acestui capitol a contribuit dr. Mirela Maria Magdalena Flonta de la Spitalul Clinic de Boli Infecțioase, Cluj-Napoca.

VII. Bibliografie

Chen AF, Heyl AE, Xu PZ, Rao N, Klatt BA: Preoperative decolonization effective at reducing staphylococcal colonization in total joint arthroplasty patients. J Arthroplasty. 2013, 28:18-20.

Choby BA: Diagnosis and treatment of streptococcal pharyngitis. *Am Fam Physician*, 2009, 79:383-390.

Ieven M, Vu-Thien H: Upper respiratory tract infections. in *European Manual of Clinical Microbiology*, editors Cornaglia G, Courcol R, Herrmann JL, Kahlmeter G, Publisher SFM, 2012: 145-152.

Leber A: Respiratory Tract Cultures, 3.11.1.1-9.4. In *Clinical Microbiology Procedures Handbook*, 2016, Fourth Edition. ASM Press, Washington DC.

Malcolm TL, Robinson LD, Klika AK et al: *Predictors of Staphylococcus aureus* colonization and results after decolonization. *Interdiscip Perspect Infect Dis*. 2016; 2016: 4367156.

Metodologia de urmărire a scarlatinei în România – Institutul Național de Sănătate Publică
<https://cnsb.ro/index.php/metodologii/scarlatina/451-metodologie-de-supraveghere-scarlatina-2016-01-08-2016/file>

Miller JM, Miller SA: *A guide to specimen management in clinical microbiology*, Third Edition, ASM Press, 2017

Moroski NM, Woolwine S, Schwarzkopf R: Is preoperative staphylococcal decolonization efficient in total joint arthroplasty. *J Arthroplasty*. 2015, 30:444-6

Ng CY, Huang YH, Chu CF, Wu TC, Liu SH: Risks for *Staphylococcus aureus* colonization in patients with psoriasis: a systematic review and meta-analysis. *Br J Dermatol*. 2017, 177:967-977

Pelucchi C, Grigoryan L, Galeone C,S: Guideline for the management of acute sore throat. *Clin Microbiol Infect*, 2012, 18(suppl 1):1-27

Public Health England (2015). Investigation of throat related specimens. . UK standards for microbiology investigations:
https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/423204/B_9i9.pdf

Public Health England. (2015). Investigation of Nasal Samples. UK Standards for Microbiology Investigations. B 5 Issue 7.1. <https://www.gov.uk/uk-standards-for-microbiology-investigations-smi-quality-and-consistency-in-clinical-laboratories>

van den Bergh MR, Biesbroek G, Rossen JWA, de Steenhuijsen P, Pitsers WAA, Bosch AATM, et al. (2012) Associations between pathogens in the upper respiratory tract of young children: interplay between viruses and bacteria. *PLoS ONE* 7(10): e47711.

Waites, K. B., M. A. Saubolle, D. F. Talkington, S. A. Moser, and V. Baselski. 2006. *Cumitech 10A, Laboratory Diagnosis of Upper Respiratory Tract Infections*. Coordinating ed. S. E. Sharp. ASM Press, Washington, D.C.

Diagnosticul microbiologic al infecțiilor tractului respirator inferior

I. Introducere

Acest document descrie izolarea din spută, lavaj bronhoalveolar și alte tipuri de probe asociate, a bacteriilor și fungilor care pot determina infecții respiratorii.

Diferențierea între colonizarea traheobronșică și infecția pulmonară adevărată este dificilă. Izolarea și recunoașterea microorganismelor implicate în etiologia pneumoniei depinde de:

- Recoltarea probei adecvate din tractul respirator inferior
- Evitarea contaminării cu flora din tractul respirator superior
- Utilizarea tehnicilor microscopice și de cultivare corecte
- Cunoașterea tratamentelor anterioare și curente cu antibiotic.

Pneumonia

Pneumonia poate fi clasificată ca fiind comunitară sau asociată asistenței medicale (survenită la mai mult de 48 ore de la internare), respectiv primară sau secundară. Etiologia pneumoniilor variază în funcție de aceste aspecte.

Există mai mulți factori care se asociază cu un risc crescut de pneumonie. Cei mai frecvenți sunt: afecțiuni pulmonare cronice precum BPOC, diabetul zaharat, insuficiența cardiacă sau renală și imunosupresia (congenitală sau dobândită). Nivelul scăzut de conștiență precum și diminuarea reflexelor faringian sau de tuse sunt factori de risc pentru pneumonia de aspirație. Infecții recente cu virusuri respiratorii, în particular cu virusuri gripale reprezintă de asemenea un factor de risc.

Evaluarea severității pneumoniei se face cu ajutorul semnelor clinice și a datelor de laborator, prezența unora din acestea fiind predictivă pentru riscul de deces.

Etiologia pneumoniei variază în funcție de modul de apariție (comunitară sau de spital) și de factorii de risc existenți. Multe din bacteriile care colonizează tractul respirator superior sunt implicate în etiologia pneumoniilor. Tratamentul antibiotic și spitalizarea favorizează colonizarea cu bacili Gram-negativi aerobi.

Acești factori afectează sensibilitatea și specificitatea sputoculturii iar rezultatele trebuie interpretate în baza datelor clinice. Rezultatele sputoculturii sunt frecvent înșelătoare, iar sensibilitatea culturii este mică pentru mulți patogeni. Singura excepție este reprezentată de probele de spută de la pacienții cu exacerbări severe ale BPOC.

Pneumonia comunitară

Principala etiologie a pneumoniei comunitare este *Streptococcus pneumoniae*, responsabil de până la 60% din cazuri și care poate fi multirezistent. Poate afecta indivizii la orice vârstă, inclusiv cei cu factori de risc cunoscuți. În prezența unor factori de risc cunoscuți și alți agenți bacterieni pot determina pneumonie. Pacienții cu BPOC și cei infectați cu HIV prezintă în plus, risc de pneumonie cu *Haemophilus influenzae* și *Moraxella catarrhalis*. Pneumonia cu *Staphylococcus aureus* survine fie în contextul unei infecții virale recente, fie (mai rar) ca rezultat al unei însămânțări pe cale hematogenă de la un focar la distanță, BPOC sau prin aspirație. Bacilii

gram-negativi aerobi reprezintă o cauză rară de pneumonie comunitară. Ocazional, *Klebsiella pneumoniae* determină pneumonia severă necrotizantă, ("pneumonia Friedländer") la pacienții reprezentați de persoanele fără adăpost și cu un istoric de abuz de alcool.

O serie de alți patogeni determină pneumonii atipice. *Mycoplasma pneumoniae* determină până la 20% din pneumoniile comunitare, pe locul 2 după *S. pneumoniae*. Infecțiile cu *Mycoplasma pneumoniae* au tendința de a apărea în epidemii, la 4-5 ani și afectează grupele de vârstă tinere. *Chlamydophila pneumoniae* este un patogen exclusiv uman. Mult mai rar pneumonia este determinată de *Chlamydophila psittaci* sau *Coxiella burnetii* și apare la indivizi la care există un context relevant de contact cu păsări sau animale de fermă. *Legionella pneumophila* este o cauză rară de pneumonie comunitară, asociată cu un istoric de călătorie recentă sau alți factori favorizanți (expunere la aerosoli generați de diverse instalații de apă, grădinarit). Virusurile respiratorii, precum virusul respirator sincițial (RSV), virusurile gripale și adenovirusurile pot determina pneumonia virală.

Pneumonia de spital

Pneumonia de spital se situează pe primele locuri în rândul infecțiilor asociate asistenței medicale (IAAM). Riscul crescut este reprezentat de afecțiuni preexistente și de diferitele intervenții și proceduri. Ventilația mecanică este un factor de risc major. Pacienții cu afecțiuni critice, care necesită ventilație mecanică prelungită, sunt expuși infecțiilor cu *Pseudomonas aeruginosa* și cu specii de *Acinetobacter* multirezistente (de ex. *Acinetobacter baumannii*). Bacilii Gram-negativi aerobi, inclusiv membri ai ordinului Enterobacterales (precum *Klebsiella* și *Enterobacter* spp) și *P. aeruginosa* sunt implicați în până la 60% din cazuri. Prezența cateterelor intravasculare și a portajului nazal sunt factori de risc pentru pneumonia determinată de *S. aureus* metilicilino-rezistent (MRSA). Speciile de *Legionella* sunt de asemenea o cauză ocazională de pneumonie de spital.

Pneumonia de aspirație

Pneumonia de aspirație se produce atunci când conținutul orofaringian pătrunde în tractul respirator inferior. Factorii de risc sunt reprezentați de nivelul redus de conștiență, de exemplu în urma unui traumatism cranio-cerebral sau supradoza de droguri, precum și reflex diminuat de tuse și/ sau reflex de deglutiție slab în urma unui accident vascular cerebral sau altă boală neurologică.

Abcesul pulmonar

Abcesul pulmonar se poate dezvolta secundar unei pneumonii de aspirație, în care caz cea mai des afectată este zona de mijloc a plămânului. Microorganisme ca: *S. aureus* și *K. pneumoniae* pot duce la dezvoltarea unor abcese multifocale și prezența de microabcese (<2 cm diametru) Este prezentat uneori ca pneumonie necrotizantă. Nocardioza, aproape întotdeauna survenită pe un fond de imunodepresie, se poate prezenta sub forma de abces pulmonar. Abcesele sunt rezultatul diseminării hematogene de la un focar situat la distanță, așa cum se întâmplă în cazul endocarditei infecțioase.

Burkholderia pseudomallei poate determina abces pulmonar sau pneumonie necrotizantă la persoane care au călătorit în zone endemice (în special Asia de sud-est și Australia de nord) și în prezența diabetului.

Sindromul Lemièrre sau necrobaciloza debutează ca o infecție acută orofaringiană. Tromboflebita infecțioasă a venei jugulare poate duce la embolie septică și infecții metastatice.

În mod frecvent este implicat și plămânul; se pot dezvolta abcese multifocale. La pacienții cu acest sindrom diagnosticul etiologic se bazează pe hemocultură, cel mai frecvent patogen izolat fiind *Fusobacterium necrophorum*.

Fibroza chistică

Monitorizarea microbiologică a colonizării pulmonare, în cadrul managementului pacienților cu fibroză chistică, este esențială. Primele specii implicate sunt *Haemophilus influenzae* și/ sau *Staphylococcus aureus*, care preced colonizarea cu *Pseudomonas aeruginosa* și alți bacili Gram negativi nefermentativi.

Colonizarea cu *Pseudomonas aeruginosa*, fenotip mucos (producător de alginat, implicat în formarea de biofilm), combinată cu evoluția cronică a bolii, reprezintă o etapă critică în cadrul acesteia. Pot fi izolate tulpini de *P. aeruginosa* cu sensibilități diferite la antibiotic, din aceeași probă. Variantele de tip "colonii mici" ale speciei *Staphylococcus aureus*, asociate cu formele de dezvoltare intracelulară, cu evoluția cronică a bolii și, mai rezistente la terapia cu antibiotice, trebuie recunoscute în culturile bacteriene.

Pot fi prezenți, de asemenea, anaerobi, specii de *Aspergillus* și micobacterii non-tuberculoase (MOTT - mycobacteria other than *Mycobacterium tuberculosis*).

Transmiterea bacteriilor din complexul *Burkholderia cepacia* între pacienți poate duce la decesul prin "sindromul *B. cepacia*", care este o pneumonie fulminantă uneori însoțită de septicemie.

Micobacteriile non-tuberculoase reprezintă o problemă în creștere pentru pacienții din acest grup; *M. abscessus* este mai frecvent decât alții.

Rezistența la antibiotice, în mod special pentru *Burkholderia* spp., *Stenotrophomonas maltophilia* și *P. aeruginosa*, limitează opțiunile de tratament.

Alte microorganisme precum *Ralstonia*, *Achromobacter* și *Pandoraea* sunt patogeni emergenți în boala cronică pulmonară. Pot fi, de asemenea, implicate și virusuri.

Pleurezia

Pleurezia este inflamația pleurei, a membranelor seroase care acoperă plămânii și fața interioară a cavității toracice.

II. Recoltarea și transportul probelor biologice

Diagnosticul microbiologic se face în caz de infecție acută, exacerbarea unei infecții cronice (bronșita cronică, fibroza chistică etc.) sau pneumonia de ventilație.

Conform ghidurilor tratamentul de primă intenție al pneumoniei îngrijite la domiciliu este empiric. Investigarea microbiologică se face doar dacă după 72 h de tratament nu există o evoluție favorabilă, pentru formele severe ce necesită internare la terapie intensivă sau când există risc crescut pentru infecție cu germeni rezistenți (*Pseudomonas aeruginosa*, MRSA).

Diagnosticul infecției pulmonare se bazează pe următoarele criterii:

- Clinice: istoric de infecție, semne fizice, generale și funcționale.
- Examinari imagistice sugestive.
- Biologice: hemoleucograma, VSH, CRP, procalcitonina
- Microbiologice:

- examenul microbiologic al secrețiilor din tractul respirator, hemocultura, lichid pleural,
- detecția de anticorpi în sânge,
- detecția de antigene în urină
- Histologice: biopsie pulmonară sau pleurală pentru diagnostic diferențial (tuberculoză sau cancer)

Sputa este ușor de recoltat dar dificil de interpretat, secrețiile bronșice recoltate prin lavaj bronho-alveolar, aspirare bronșică sau lavaj protejat sunt mai dificil de recoltat dar mai ușor de interpretat.

Tipurile de probe recoltate: spută, lavaj bronhoalveolar, aspirat bronșic, aspirat transtoracic, periaj bronșic, spălătură bronșică, secreții tub endotraheal, probe recoltate pe cateter protejat, lichid pleural.

Este foarte importantă etichetarea corectă a tipului de probă, deoarece prelucrarea lor în laborator este diferită.

Probe biologice recoltate în infecțiile tractului respirator inferior (TRI)

Proba de spută expectorată

Probele de spută au mari probleme de contaminare. Trebuie obținută proba de spută de dimineață (devreme) deoarece conține secrețiile adunate din cursul nopții, în care este o mai mare probabilitate să se concentreze bacteriile patogene.

Pneumonia asociată asistenței medicale implică o mortalitate ridicată dar este dificil de diagnosticat clinic și microbiologic. Criteriile de diagnostic microbiologic rămân dificil de interpretat. Sensibilitatea și specificitatea mică a culturii din spută în diagnosticul pneumoniei asociate asistenței medicale a determinat dezvoltarea unor tehnici de recoltare a secrețiilor din tractul respirator inferior, unele din ele implicând utilizarea bronhoscopului.

De regulă se recoltează numai o probă de spută în interval de 24 de ore, aceasta fiind prima de dimineață. Excepție fac probele recoltate cu ajutorul bronhoscopului. Acestea din urmă sunt cele mai bune probe care pot fi obținute prin tuse profundă.

Probele de spută cu o cantitate mai mică de 2 ml nu trebuie procesate, cu excepția celor care au aspect purulent.

Probele de spută se obțin foarte greu de la pacienții pediatrici. În plus copiii pot fi colonizați cu *H. influenzae*, *S. pneumoniae* sau *Neisseria meningitidis*.

Aspiratul traheal

Aspiratul traheal se recoltează prin tubul endotraheal cu un dispozitiv special care permite captarea secrețiilor din trahee într-un recipient. Se recoltează cca 10 ml de secreții. Are aceleași limitări ca și probele de spută.

Aspiratul bronșic

Aspiratele bronșice sunt recoltate prin aspirarea directă a materialului din bronhii cu ajutorul unui bronhoscop flexibil.

Lavajul bronhoalveolar

Probele de BAL se recoltează din bronhiiolele distale și alveole după ce bronhoscopul a fost fixat în lumenul căilor respiratorii distale sau în unul sau mai multe segmente pulmonare, în funcție de extinderea infecției.

(1) bronhoscopul se introduce transnazal sau transoral la pacienții neintubați sau prin tubul endotraheal la pacienții intubați.

(2) se recoltează probele de BAL prin fixarea cu grijă a vârfului bronhoscopului într-un lumen al căilor respiratorii și instilând un volum cât mai mare de 0,85% ser fiziologic fără acțiune antibacteriană (25 până la 30 ml pentru adulți și 5 până la 10 ml pentru copii). Se pot face instilări repetate în același loc, pentru a spăla alveolele și pentru a colecta lichid suficient pentru toate testele necesare.

(3) se aspiră ușor lichidul recuperat într-un recipient steril înainte de administrarea următoarei cantități de lichid. În general, 50 până la 75% din soluția salină instilată este recuperată în lichidul de lavaj.

(4) lichidul inițial se aruncă, fiind contaminat, restul este trimis la laborator.

NOTĂ: În laborator, probele din același loc pot fi combinate pentru culturi și frotiuri, dar probele recoltate din locuri separate (de exemplu, lobul superior drept și lobul inferior drept) pot fi combinate numai după consultarea medicului care a efectuat recoltarea.

Este o metodă de încredere în diagnosticul etiologic al pneumoniei și a altor infecții pulmonare.

MiniBAL - lavajul bronhoalveolar orb

MiniBAL nu necesită bronhoscop, însă este nevoie de un dispozitiv special, mai lung decât cel cu care se obține aspiratul endotraheal, cu care se ajunge în părțile distale ale tractului respirator. Prin dispozitiv se introduce ser fiziologic steril, după care se aspiră într-o seringă.

Periajul bronșic

Tehnica periajului bronșic folosește un cateter cu perie protejată (o perie între doua catetere sigilate la capăt cu un dop de polietilenglicol) pentru a obține material din căile respiratorii inferioare.

Se consideră că un număr de bacterii de peste 10^3 UFC/ml în produsul de periaj obținut bronhoscopic se corelează cu diagnosticul histologic de pneumonie.

Spălătura bronșică

Probele de spălătură bronșică sunt colectate din bronhiile mari, inclusiv bronhia principală, la bifurcație și bronhiile din dreapta și din stânga în funcție de extinderea leziunilor. Această procedură este cel mai frecvent utilizată pentru diagnosticul cancerului la pacienții cu leziuni bronșice. Testele de diagnostic pentru infecție pot fi făcute concomitent pentru a elimina infecția, mai ales dacă există obstrucție bronșică și pneumonie secundară acestei complicații.

(1) bronhoscopul se introduce transnazal sau transoral la pacienții neintubați sau prin sonda endotraheală la pacienții intubați.

(2) se injectează steril soluție sterilă 0,85% NaCl fără acțiune antibacteriană (în general 20 până la 30 ml la adulți și 5 ml la copii).

3) se aspiră lichidul de spălare bronșică într-un recipient steril. Deoarece volumul de soluție salină introdus este mai mic decât în cazul lavajului bronhoalveolar, proba primită la laborator este în cantitate mai mică comparativ cu BAL.

(4) Probe de spălătură bronșică recoltate din zone diferite din plămâni (de exemplu, bronhiile din dreapta și din stânga) nu trebuie amestecate.

Metoda are utilitate scăzută în diagnosticul pneumoniei, cu excepția anumitor agenți patogeni, cum ar fi *M. tuberculosis*, *Legionella*, fungi endemici.

A nu se eticheta ca BAL (lavaj bronhoalveolar), acest tip de produs nu poate fi prelucrat pentru a obține culturi cantitative.

Probe recoltate pe cateter protejat

Materialul este recoltat din plămân prin bronhoscop într-un mod similar cu periajul bronșic. Se utilizează un cateter interior și exterior cu dop din polietilen glicol la capăt pentru a preveni contaminarea din nazofaringe.

Aspiratul transtoracic

Probele de aspirat toracic se obțin prin puncția peretelui toracic cu un ac introdus prin spațiul intercostal. Această procedură poate fi utilizată pentru a recolta din leziuni focale accesibile precum aspergilomul, abcesul.

Revărsatul pleural

Revărsatul pleural este acumularea de lichid între straturile interioare și exterioare (viscerale și parietale) ale pleurei.

Revărsatul se produce la debutul pneumoniei, reprezentând răspunsul pleural la o reacție inflamatorie în plămânul adiacent. Bacteriile ajung în spațiul pleural pe diferite căi: răspândirea dintr-o zonă adiacentă a pneumoniei, chirurgia toracică sau drenaj, bacteriemia, traumatismul toracic sau prin transmiterea transdiafragmatică din infecția intraabdominală.

Revărsatul pleural tuberculos apare de obicei ca o extensie a infecției dintr-un focar subpleural. În revărsat se găsește un număr mic de bacili (produs paucibacilar) și, ca rezultat, microscopia este rareori pozitivă. Prin urmare, sunt preferate alte teste de confirmare, de exemplu: utilizarea sistemelor automate de incubare, timp de 42 zile, metode PCR de detecție ADN *Mycobacterium tuberculosis*, testele cutanate sau radiografia toracică.

Empiemul

Empiemul toracic este o colecție de puroi în cavitatea pleurală. Cel mai adesea apare ca o complicație a infecției bacteriene a parenchimului pulmonar: pneumonie sau abces pulmonar.

Deși cea mai frecventă cauză este *S. pneumoniae*, orice microorganism poate fi izolat din lichidul pleural, în special microorganismele asociate cu infecția tractului respirator inferior și microorganismele dobândite prin aspirarea florei orofaringiene, inclusiv streptococii și anaerobii orali.

Microorganismele asociate în special cu empiemul, la pacienții cu sindromul imunodeficienței dobândite (SIDA) includ: *Cryptococcus neoformans*, *Mycobacterium avium-intracellulare*, *M. tuberculosis* și *Nocardia asteroides*.

Alte microorganisme care pot provoca infecții la acest grup de pacienți includ *Pneumocystis jirovecii* și *Rhodococcus equi*.

Urină pentru detectarea antigenelor de *Legionella pneumophila* și *Streptococcus pneumoniae*

Se recoltează urină în recipient fără substanțe de conservare și se trimite imediat la laborator.

Recoltarea

Probele trebuie să fie proaspete și recoltate înainte de începerea tratamentului cu antibiotic. Sputa presupune recoltarea secrețiilor din tractul respirator inferior (subglotic), obținute în urma unui efort de tuse profundă. Dacă tusea este neproductivă se poate stimula producerea secrețiilor prin fizioterapie, drenaj postural sau inhalarea de aerosoli (soluție hipersalină). Recoltarea de salivă sau secreții nazale nu este acceptată.

Pentru diagnosticul infecției cu *Mycobacterium tuberculosis* se recomandă recoltarea sputei de dimineață în 3 zile consecutive.

Probe din tractul respirator

Tehnici invazive

- Lavaj bronho-alveolar – are 2 componente: fracția bronșică (50 ml) și fracția alveolară (150-200 ml) – proba se contaminează totuși cu flora din căile aeriene superioare.
- Recoltare distală protejată – este metoda gold standard pentru stabilirea etiologiei microbiene pentru pneumopatii – metoda Wimberley – capătul cateterului utilizat este tăiat cu foarfeca sterilă și introdus în recipient cu 1 ml soluție salină sterilă; se agită lângă patul pacientului și se trimite la laborator în maxim 2 ore.
- Lichid pleural: în mod ideal, un volum minim de 1 ml, în seringi spălate cu heparină
- Aspirat endotraheal – proba este recoltată în orb și are un risc ridicat de contaminare cu flora salivară.

Tehnici non-invazive:

- Sputa – se evaluează acceptabilitatea pe criterii citologice – este foarte rar de ajutor în diagnosticul etiologic al pneumoniei comunitare; recoltarea corectă este foarte importantă.

Alte probe

- Sânge pentru hemocultură (2 seturi)
- Urina pentru detecție antigene *Legionella pneumophila* sau *Streptococcus pneumoniae*
- Sânge pentru detecție de anticorpi în pneumopatii atipice (*Chlamydomphila pneumoniae*, *Chlamydia psittaci*, *Mycoplasma pneumoniae*, *L. pneumophila*)
- Probe de la nivelul epiteliului respirator (nas, trahee, bronhii) – se recoltează pentru teste virusologice cât mai devreme după debutul bolii, se utilizează mediu de transport special.

Transportul probelor

Transportul probelor se face în maxim 2 ore de la recoltare. În situații excepționale dacă transportul este întârziat, proba poate fi păstrată la 4°C până la 24 h.

Dacă se suspectează o infecție acută și rezultatul poate afecta managementul medical, probele recoltate se procesează cât mai rapid iar rezultatul examenului microscopic se pune la dispoziție în decurs de 2 ore de la preluarea probei.

III. Prelucrarea produselor biologice

Produsele din tractul respirator inferior pot avea aspect macroscopic de tip salivar, mucosalivar, mucoid, mucopurulent, purulent, hemoragic.

Pregătirea produsului

- Sputa – se fluidifică și omogenizează cu o soluție mucolitică (N-acetilcisteina, ditiotritol).
- Aspiratul traheal este tratat la fel ca sputa. Este necesar ca pe cererea de analize să se precizeze scopul investigației: pentru screening sau pentru diagnostic, deoarece prelucrarea probei este diferită în cele două situații. Pentru diagnostic este necesară interpretarea cantitativă, pentru care se pot face diluții.
- Lavajul bronhoalveolar: se pot face culturi cantitative. Se centrifughează 10 min la 1200 xg, se resuspendă sedimentul în 0,5 ml supernatant. Din probele mucoide se depune pe lamă în strat subțire o porțiune purulentă sau sanguinolentă; din probele nemucoide se face un frotiu în strat subțire din sedimentul obținut după centrifugare. Se vor identifica și testa maxim 2 patogeni aerobi. Peste 3 germeni izolați implicarea etiologică este greu de realizat (cu excepția situației când unul din cei 3 este un patogen clar, ex. *Mycobacterium tuberculosis*).

Lavajul bronhoalveolar este cel mai indicat pentru diagnosticul bolilor pulmonare atipice (*Nocardia*, *Legionella*, *Actinomyces*) și pentru diagnosticul infecțiilor la imunodeprimați (*Pneumocystis*, *Aspergillus*).

- Proba recoltată distal cu cateter protejat – se utilizează 1 ml ser fiziologic steril; se prepară frotiuri după centrifugare.
- Toate probele din cavitatea pleurală trebuie centrifugate în recipiente ermetice închise și prelucrate în condiții de nivel 2+ de biosiguranță, indiferent dacă este necesară sau nu examinarea speciilor de *Mycobacterium*.
- Lichidul pleural - pentru toate probele, cu excepția celor coagulate sau foarte vâscoase: se centrifughează într-un recipient steril, cu capac, cu fund conic, la 1200 x g pentru 5-10 minute;

Notă: Dacă se solicită, de asemenea, investigația pentru speciile *Mycobacterium*, timpul de centrifugare poate fi mărit la 15-20 minute; același sediment poate fi utilizat pentru insamantare *Mycobacterium*, precum și pentru microscopia de rutină.

Se transferă supernatantul, cu excepția ultimilor 0,5 ml, folosind o pipetă sterilă într-un alt recipient rezistent la scurgeri, plasat într-o pungă de plastic sigilată, pentru testare suplimentară, dacă este necesar (de exemplu, virusologie).

Cultivarea lichidului pleural pentru specii non- tuberculoase: se suspendă sedimentul în lichidul rămas.

Se inoculează fiecare placă de agar și bulionul de îmbogățire cu sediment rezultat din centrifugarea lichidului pleural, folosind o ansă sterilă. Pentru izolarea coloniilor individuale, se dispersează inoculul cu o ansă sterilă.

În suspiciune de empiem cu etiologie multiplă, pentru izolarea *Mycobacterium tuberculosis*, se practică decontaminarea lichidului de puncție (aceeași metodă ca pentru decontaminarea sputei).

Dacă se utilizează flacoane pentru hemocultură, inocularea se va face cu proba necentrifugată, în mod ideal la „patul bolnavului”.

Probele coagulate:

- Dacă este posibil, cheagul trebuie rupt cu o ansă sterilă și o porțiune folosită pentru a face un frotiu pentru colorația Gram.
- Se inoculează fragmentele de cheag pe plăcile de agar și bulionul de îmbogățire.
- Dacă proba conține doar un cheag mic, acesta trebuie inclus fie în bulionul de îmbogățire, fie inoculat pe placa de agar chocolate. Porțiunea necoagulată a probei trebuie cultivată în mod normal așa cum este descris mai sus.

Examenul microscopic:

Pe frotiul Gram se poate face aprecierea calității sputei și evidențierea categoriilor microscopice pentru posibili patogeni implicați (Tabelul 1).

Aprecierea calității sputei se face prin raportarea numărului de polimorfonucleare la numărul de celule epiteliale la mărire de 100x. Probele purulente vor fi prelucrate pentru însămânțare iar probele nepurulente sau contaminate cu celule epiteliale pot fi respinse.

Prezența macrofagelor și a celulelor bronșice certifică proveniența probei din TRI. Pentru *Legionella* și micobacterii criteriile calitative și cantitative nu se aplică, simpla lor prezență semnifică infecție (nu există purtători sănătoși). Nu se resping: probele pentru depistarea *Mycobacterium tuberculosis* sau provenite de la pacienți imunodeprimați, neutropenici.

Pot fi folosite și alte scoruri care permit aprecierea calității probei (de ex. scorul Q).

Examinarea lamelor colorate Gram se face pentru a evidenția prezența unei singure categorii microscopice predominante, asociată cu leucocitele polimorfonucleare și care nu aderă la celulele epiteliale.

Prezența unei singure categorii microscopice în asociere cu leucocitele (categoriile D și E) pot fi utile în prezicerea agenților patogeni pulmonari și ar trebui raportate.

Probele acceptabile sunt observate cu mărire 1.000 x I.U. Se pot întâlni următoarele situații:

- A. Nu se observă microorganisme
- B. Floră mixtă; niciuna din categoriile microscopice nu depășește 10 microorganisme / câmp cu I.U.
- C. Floră mixtă cu două sau mai multe categorii microscopice cu peste 10 microorganisme / câmp I.U.
- D. o singură categorie microscopică cu mai puțin de 10 microorganisme / câmp I.U.
- E. o singură categorie microscopică cu mai mult de 10 microorganisme / câmp I.U.

Tabelul 1. Aprecierea calității probelor de spută - Scorul de calitate Bartlett

Scor de calitate (metoda Bartlett)	Număr celule pe camp	
	Celule epiteliale	Leucocite
1	> 25	< 10
2	> 25	10 – 25
3	> 25	> 25
4	10 – 25	> 25
5	< 10	> 25

Probele cu scor 1, 2 și 3 sunt intens contaminate cu salivă și nu trebuie cultivate. Doar probele cu scor 4 și 5 sunt acceptabile, cele cu scor 5 sunt optime. Probele cu scor 4 și 5 și cu prezență de microorganisme monomorfe au o valoare înalt predictivă.

La examinarea frotiului Gram se va ține cont de informațiile legate de prezența tratamentului cu antibiotic. În această situație microorganismele evidențiate pe frotiu pot să nu fie viabile.

La solicitare specială se fac colorații specifice:

- Ziehl-Neelsen pentru micobacterii
- Giemsa pentru *Pneumocystis jirovecii*

Pentru funghi se examinează preparat umed între lamă și lamelă cu KOH.

Numărătoarea diferențială a leucocitelor din lichid pleural

Se efectuează diferențierea dintre leucocitele polimorfonucleare și leucocitele mononucleare.

1. Metoda camerei de numărare: recomandată pentru numărul mai scăzut de leucocite.

a) Eșantioane fără sânge sau ușor hemoragice

- colorați fluidul necentrifugat cu soluție de colorare 0,1%, cum ar fi toluidină, metilen sau albastru de nil. Aceasta colorează nucleele leucocitelor, ajutând astfel diferențierea celulelor
- factorul de diluare trebuie luat în considerare la calcularea numărului final de celule
- numărați și înregistrați numerele fiecărui tip de leucocit
- exprimă numărul de leucocite ca număr de celule pe unitatea de volum (μ l, ml, mmc, etc.)

b) Probe intens hemoragice

- diluați proba cu lichid de diluare și lăsați-l timp de 5 minute înainte de a încărca camera de numărare. Aceasta va liza celulele roșii din sânge și va colora nucleele leucocitelor pentru diferențiere.

- numărați și înregistrați numărul fiecărui tip de leucocit. Factorul de diluare trebuie luat în considerare la calcularea numărului final de celule.
- exprimați numărul de leucocite ca număr de celule pe unitatea de volum (μl, ml, mmc, etc.)

2. Metoda colorării

Recomandată pentru valori foarte mari de globule roșii unde diferențierea în camera de numărare este dificilă:

- pregătiți o lamă din sedimentul centrifugat ca pentru colorația Gram, dar lăsați să se usuce la aer
- se fixează în alcool și se colorează cu o colorație potrivită pentru morfologia leucocitelor
Notă: Fixarea la căldură distorsionează morfologia celulară
- numărați și înregistrați numărul fiecărui tip de leucocit ca procent din total.

3. Metoda automată - pe analizor de hematologie cu modul special pentru lichide de puncție;

Cultivarea

Sputa: se inoculează câte 10 μl din probă omogenizată pe fiecare mediu de cultură.

Lavaj bronhoalveolar:

- Metoda calitativă: se inoculează cu ansa din sedimentul obținut după centrifugare pe fiecare mediu de cultură.
- Metoda semicantitativă: se inoculează 10 μl cu ansa calibrată sau 100 μl cu o pipetă Pasteur. În final numărul de colonii obținute se vor înmulți cu inversul diluției pentru a calcula numărul de UFC/ml. Pentru diagnostic se utilizează pragul de 10^3 UFC/ml pentru probe obținute prin periaj protejat, și 10^4 UFC/ml pentru lavaj bronhoalveolar (Tabelul 2).

Aspirat traheal

- Pentru diagnostic se utilizează pragul de 10^6 UFC/ml

Limita pentru diagnostic poate să nu fie atinsă în caz de: infecție recentă, bronșiolită, tratament cu antibiotic. Pragurile de semnificație clinică se aplică în cazurile fără tratament antibiotic prealabil.

Tabelul 2. Diluțiile recomandate pentru o apreciere cantitativă în funcție de tipul probei

Tipul de probă	Diluția	Pragul de semnificație clinică (UFC/ml)
Lavaj bronhoalveolar și bronșic	10^{-2} , 10^{-4}	$\geq 10^4$
Recoltare prin periaj protejat	10^{-2}	$\geq 10^3$
Aspirat endotraheal	10^{-3} , 10^{-5}	$\geq 10^5$ - 10^6

Principalele microorganisme implicate în etiologia infecțiilor de tract respirator inferior sunt:

- *Streptococcus pneumoniae*
- *Staphylococcus aureus*
- *Pseudomonas aeruginosa*
- Enterobacterales
- *Haemophilus* sp.
- *Moraxella catarrhalis*
- *Neisseria meningitidis*

Izolarea *S. pneumoniae*, *H. influenzae* sau *S. aureus* necesită o evaluare atentă deoarece ei pot fi comensali în orofaringe.

În cazul suspiciunii de infecție cu fungi filamentoși:

- Pacienții fără fibroză chistică, imunodeprimați și alții: după tratare cu un agent mucolitic, dacă este necesar, se centrifughează proba. Se examinează o parte din sediment cu KOH și colorație cu calcofluor iar restul se însămânțează.
- Pacienții cu fibroză chistică: după tratarea cu un agent mucolitic se însămânțează pe câte o placă cu mediu de cultură un eșantion de 10 μL și un eșantion de 100 μL cu dispersie pe suprafața întregii plăci. Produsul rămas se centrifughează și se examinează o parte din sediment cu KOH și colorație cu calcofluor iar restul se însămânțează.

Medii de cultură utilizate și condiții de incubare

Mediile de cultură utilizate sunt în funcție de categoria microscopică observată sau în funcție de contextul clinic, cu incubare 24 – 48 h la 35°C cu și fără CO₂ sau cu incubare până la 20 zile pentru *Nocardia* spp., *Actinomyces* spp. (tabelele 3-5).

Tabelul 3. Mediile de cultură folosite, condițiile de incubare recomandate și microorganismele urmărite în cazul lavajului bronhoalveolar

Detalii clinice	Medii de cultură	Condiții de incubare			Microorganism țintă
		Temperatura °C	Atmosfera	Timp	
Exacerbări BPOC Pneumonie comunitară Pneumonie de spital	Agar sânge Agar chocolate simplu, opțional cu disc de bacitracină sau bacitracină incorporată în mediul de cultură	35-37	5-10% CO ₂	40 - 48 ore	<i>H. influenzae</i> <i>M. catarrhalis</i> <i>S. aureus</i> <i>S. pneumoniae</i> Sau alte microorganism izolate in cultură pură

	Agar Sabouraud	35	Aer	5 zile	Fungi
	Agar CLED sau MacConkey	35	Aer	40 - 48 ore	Enterobacterales Pseudomonade <i>Acinetobacter</i> spp.

Pentru următoarele situații se adaugă:

Detalii clinice	Medii de cultură	Condiții de incubare			Microorganism țintă
		Temperatură °C	Atmosferă	Timp	
Bronșiectazie Fibroză chistică	Agar manitol (Chapman)	35-37	aer	40-48 ore	<i>S. aureus</i>
Fibroza chistică	MacConkey sau mediu special pentru <i>Burkholderia cepacia</i>	35	aer	48 ore	<i>Burkholderia cepacia</i> complex
Pneumonie sugestivă pentru legioneloză cu test de antigene urinare de <i>Legionella</i> negative	Agar selectiv și/sau neselectiv de <i>Legionella</i>	35	Aer atmosferă umedă	Până la 10 zile	<i>Legionella</i> specie

Tabelul 4. Mediile de cultură folosite, condițiile de incubare recomandate și microorganismele urmărite în cazul sputei

Detalii clinice	Medii de cultură	Condiții de incubare			Microorganisme țintă
		Temperatura	Atmosfera	Timp	
Exacerbări BPOC Pneumonie	Agar sânge Agar chocolate simplu, opțional cu disc de bacitracină sau bacitracină incorporată în mediul de cultură	35-37 °C	5-10% CO2	40-48 ore	<i>H. influenzae</i> <i>M. catarrhalis</i> <i>S. aureus</i> <i>S. pneumoniae</i> Sau alte microorganisme izolate în cultură pură

Pentru următoarele situații se adaugă

Detalii clinice	Medii de cultură	Condiții de incubare			Microorganism țintă
		Temperatura °C	Atmosfera	Timp	
Bronșiectazie Fibroza chistică	Agar manitol (Chapman)	35-37	Aer	40-48 ore	<i>S. aureus</i>
Pacienți imunodeprimați sau din ATI	Agar CLED sau MacConkey	35	Aer	40-48 ore	Enterobacterales Pseudomonade
	Agar Sabouraud	35	Aer	40-48 ore	Fungi

Fibroza chistică	MacConkey sau mediu selectiv pentru <i>Burkholderia cepacia</i>	35	Aer	48 ore	<i>Burkholderia cepacia</i> complex
Pneumonie sau simptome de gripă	Agar selectiv <i>Legionella</i>	35	Aer atmosferă umedă	Până la 10 zile	<i>Legionella</i> spp.

Tabelul 5. Mediile de cultură folosite, condițiile de incubare recomandate și microorganismele urmărite în cazul lichidului pleural

Medii de cultură	Condiții de incubare			Citirea culturilor	Microorganismele țintă
	Temperatura °C	Atmosferă	Timp		
Agar sânge	35-37	5-10% CO ₂	40-48 h*	zilnic	toate microorganismele
Agar anaerobi	35-37	anaerobioză	40-48 h*	≥40 h	Anaerobi
Agar ciocolată	35-37	5-10% CO ₂	40-48h*	zilnic	toate microorganismele
Dacă se utilizează flacoane de hemocultură, atunci acestea pot înlocui necesitatea plăcilor prezentate mai sus, pe baza evaluării locale a riscurilor. Sau bulion anaerob apoi subcultivat pe plăcile de mai sus.	35-37	aerob	Monitorizare continuă	N/A	toate microorganismele
Dacă se suspectează o infecție fungică:					
Agar Sabouraud	35-37	aerob	21 zile	10 și 21 zile	Fungi

* plăcile pot fi incubate până la 5-7 zile, dacă este necesar, de exemplu dacă se suspectează *Nocardia* sau *Actinomyces*

Teste moleculare

Diagnosticul etiologic al infecțiilor respiratorii trebuie să cuprindă un număr relativ extins de microorganisme, deoarece manifestările clinice sunt adesea nespecifice. Utilizarea testelor moleculare de tip multiplex, care detectează și identifică simultan mai mulți patogeni respiratori (bacterii, virusuri), furnizează rapid informații utile pentru adoptarea unor decizii terapeutice. Aceste teste diferă prin numărul de ținte incluse (între 3 și 20 ținte), tipul de probă (de exemplu exsudat nazo-faringian, spută, aspirat bronșic), durata până la obținerea rezultatelor, complexitatea testării și echipamentul necesar.

Interpretarea rezultatelor:

- Este important să se compare rezultatele examinării microscopice cu rezultatele culturii cantitative.
- Sensibilitatea și specificitatea examenului sputei sunt reduse datorită contaminării cu flora orală – valoarea sa depinde de calitatea recoltării, prelucrării și existența unui morfotip bacterian predominant la examenul microscopic.
- Unele microorganisme sunt comensale (*S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *S. aureus*), de aceea este important să se țină cont de datele calitative și cantitative: număr de celule epiteliale, număr de leucocite, prezența/absența florei monomorfe, pragul de semnificație.

IV. Raportarea rezultatelor:

Examenul microscopic:

Dacă pacientul este imunocompetent, se raportează calitatea produsului și în caz de produs nesatisfăcător se solicită o nouă recoltare dacă există indicație clinică.

- Se raportează prezența leucocitelor, a celulelor epiteliale și a microorganismelor
- Numărul de celule (dacă este solicitat) - Raportați numărul de leucocite x 10^6 pe litru
- De asemenea, raportați PMN și leucocite mononucleare ca procent din totalul leucocitelor, dacă vi se solicită.
- Se raportează prezența elementelor fungice (levuri, spori, filamente)
- Se raportează prezența chiștilor de *Pneumocystis jirovecii* (colorație specifică)

Timpul de raportare a rezultatului examinării microscopice: cât mai curând posibil sau în funcție de reglementările locale. Rezultatele urgente vor fi comunicate telefonic sau electronic în maxim 2 ore.

Cultura

Se raportează microorganismele izolate și semnificative clinic, se raportează cantitativ dacă au fost izolate din lavaj bronho-alveolar sau altă metodă semicantitativă.

În cazul izolatelor de *Pseudomonas aeruginosa* provenite de la pacienți cu fibroză chistică se va specifica pe rezultat dacă tulpina are fenotip mucos.

Se raportează altă creștere, de ex: "flora mixtă din tractul respirator superior", sau "fără creștere microbiană".

Pentru lichidul pleural: raportați organismele izolate sau raportați absența creșterii.

Se raportează eventualele investigații suplimentare.

Timpul de raportare a culturii: în cazul detecției de izolate potențial semnificative clinic se vor elibera rapoarte intermediare/preliminare imediat ce s-a observat creșterea.

Rezultatele urgente se vor transmite telefonic sau electronic în funcție de protocolul de raportare stabilit.

Teste moleculare:

- Se eliberează imediat ce sunt disponibile,
- În cazul testelor multiplex se menționează agenții incluși în panelul de testare.
Raportul final scris se va elibera imediat ce este disponibil.

V. Bibliografie

Canton R, Segonds C: Pulmonary infections in cystic fibrosis. In European Manual of Clinical Microbiology, editors Cornaglia G, Courcol R, Herrmann JL, Kahlmeter G, Publisher SFM, 2012:153-163-169.

Cumitech 7B, Lower Respiratory Tract Infections. Coordinating ed., S. E. Sharp. ASM Press, Washington, D.C Miller M, Binnicker MJ, Campbell S et al: Guide to Utilization of the Microbiology Laboratory for Diagnosis of Infectious Diseases: 2018 Update by the Infectious Diseases Society of America and the American Society for Microbiology

Freytmuth F, Ieven M, Wallet F: Lower respiratory tract infections. In European Manual of Clinical Microbiology, editors Cornaglia G, Courcol R, Herrmann JL, Kahlmeter G, Publisher SFM, 2012:153-161.

Kenaa B, Richert ME, Claeys KC et al: Ventilator-Associated Pneumonia: Diagnostic Test Stewardship and Relevance of Culturing Practices. Current Infect Dis Rep, 2019, 21:50.

Public Health England. (2018). Investigation of Fluids from Normally Sterile Sites. UK Standards for Microbiology Investigations. B 26 Issue 6.2. <https://www.gov.uk/uk-standards-for-microbiology-investigations-smi-quality-and-consistency-in-clinical-laboratories>

Diagnosticul microbiologic al infecțiilor cutanate și ale părților moi

I. Introducere

În acest capitol se descriu:

- Prelucrarea produselor recoltate din diverse leziuni superficiale, inclusiv din plăgi traumatice, chirurgicale sau de altă natură, care sunt accesibile fără intervenție,
- Prelucrarea probelor de puroi aspirate din abcese, a probelor recoltate din colecții profunde,
- Prelucrarea probelor de fragmente tisulare,
- Diagnosticul microbiologic al infecțiilor arsurilor.

Infecțiile cutanate pot fi:

- Primare - apar pe tegumente intacte (impetigo, furuncul, carbuncul, foliculită).
- Secundare - apar pe fondul unor leziuni tegumentare preexistente (traumatice, afecțiuni cronice).

În funcție de profunzimea lor, infecțiile cutanate și de părți moi pot fi:

- Profunde și închise,
- Profunde și închise, dar care comunică cu un lumen ce conține floră comensală sau sunt fistulizate spre tegumente,
- Superficiale, deschise, având floră bacteriană colonizantă bogată.

II. Infecții cutanate și de părți moi

Tipuri de infecții - recoltarea probelor biologice

Eritrasma

Eritrasma este o infecție superficială a pielii ce afectează stratul cornos și este cauzată de *Corynebacterium minutissimum*. Apare de obicei în zonele intertriginoase ale pielii. Diagnosticul este clinic, însă dacă se dorește verificarea etiologiei, pentru examen microbiologic se recoltează două probe de pe suprafața zonei afectate, cu tampoane umectate în ser fiziologic steril.

Panarițiu

Cel mai frecvent este determinat de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, levuri, germeni anaerobi. Colecția purulentă se aspiră.

Infecții superficiale ale tegumentelor (impetigo, foliculită, furuncul, antrax)

Dacă există pustule intacte sau colecții purulente închise, suprafața acestora se curăță cu soluție alcoolică. Se deschide leziunea și în funcție de cantitatea colecției purulente, se aspiră într-o seringă sau se șterge cu un tampon.

Dacă leziunea este acoperită cu crustă, aceasta se îndepărtează și se recoltează de sub ea. Dacă leziunea este uscată, se folosește tampon umectat cu ser fiziologic steril.

Erizipel

Erizipelul este o infecție superficială a tegumentelor, caracterizată de eritem cu linie de demarcație clară și edem.

Agentul etiologic principal este *Streptococcus pyogenes*. Examenul bacteriologic din aria afectată nu este indicat. În prezența semnelor sistemice se recomandă efectuarea de hemoculturi, însă acestea au rată de pozitivare redusă.

Plăgi mușcate

Dacă există lichid în leziune, acesta se aspiră. Alternativ, după dezinfectia zonelor adiacente, se recoltează cu un tampon din adâncimea mușcăturii. Acesta se transportă în mediu de transport, în vederea protejării bacteriilor anaerobe.

Ulcere gambiere, escare, picior diabetic

Examenul microbiologic este indicat doar în cazul în care există semne locale de infecție (durere, inflamație) sau generale (febră, adenopatii).

Din escare se recoltează doar dacă leziunea este profundă, străbate fascia.

Vecinătatea leziunilor trebuie dezinfectată. Leziunile trebuie debridate, curățate de secreții stagnante, spălate cu ser fiziologic steril. Se recomandă recoltarea unui fragment de țesut sau chiuretarea zonei active a leziunii. Produsul recoltat se plasează în recipient steril. Alternativ, după curățarea leziunii se recoltează energic cu tamponul (se șterge leziunea rotind tamponul până la expresia de fluide; dacă este o zonă mai mare se recoltează de pe o suprafață de 1x1cm). În principiu, recoltarea cu tamponul nu este acceptabilă, deoarece tamponul poate absorbi în vată o cantitate semnificativă de material biologic și se poate contamina cu flora cutanată de vecinătate.

Fasceita necrozantă

Fasceita necrozantă este o inflamație, cu progresie rapidă a fasciei, asociată cu necroza țesuturilor subcutanate. Reprezintă o urgență medico-chirurgicală ce impune debridarea leziunilor. În funcție de agenții etiologici implicați, fasceita necrozantă poate fi de patru tipuri:

- Tipul I este polimicrobian, fiind implicați patogeni strict sau facultativ anaerobi (2-4 specii). Apare de obicei în prezența unor comorbidități (de ex. diabet zaharat), cel mai frecvent pe trunchi sau perineu.
- Tipul II (monomicrobian) este cauzat de *Streptococcus pyogenes* și se localizează pe membre.

- Tipul III are ca și etiologie specii de *Clostridium*, bacterii Gram-negative, vibrioni sau *Aeromonas hydrophila*. Se localizează pe membre, trunchi sau perineu.
- Tipul IV este cauzat de zygomycețe, *Candida* spp. și apare la pacienții imunosupresați, fiind localizat pe membre, trunchi sau perineu.

Pentru diagnosticul microbiologic probele recoltate pe tampon sunt inacceptabile, este nevoie de fragmente de țesut și hemoculturi.

Plăgi chirurgicale

În cazul infecțiilor superficiale de plagă chirurgicală se recomandă recoltarea secreției apărute la nivelul plăgii, preferabil prin aspirare, folosind o seringă. Alternativ se recoltează biopsie în cursul toaletei/ reintervenției chirurgicale. Recoltarea cu tamponul trebuie evitată, deoarece calitatea acestor produse este nesatisfăcătoare.

Arsuri

Arsurile inițial sterile se colonizează rapid cu coci Gram-pozitivi de pe tegumentele învecinate, după aceea cu flora orofaringiană sau gastrointestinală a pacientului și cu germeni din mediul exterior.

Se disting patru situații:

- Colonizarea - bacteriile sunt prezente pe suprafața arsurii în cantitate redusă ($<10^5$ UFC/g țesut).
- Infecția plăgii - un microorganism este prezent în cantitate mare; sunt prezente semne de infecție locală, dar nu și semne de infecție invazivă ($>10^5$ UFC/g țesut).
- Celulita - prezența în cantitate mare a unei specii bacteriene, însoțită de eritem, indurație, sensibilitate și căldură în zonele învecinate + sepsis.
- Fasceita/infecția necrozantă caracterizată de infecția agresivă a țesuturilor, cu necroză în țesuturile subcutanate.

Un aspect important în această patologie este că bacteriile sunt întotdeauna detectabile. Interacțiunile dintre bacterii și pacient sunt esențiale și din acest punct de vedere este importantă urmărirea cu atenție a plăgilor arse. De ex. *Pseudomonas aeruginosa* este un colonizant frecvent al plăgilor arse, care produce un exsudat verzui. Spre deosebire de simpla colonizare, infecțiile invazive cu acest germen reprezintă urgențe chirurgicale.

Dintr-un set inițial de probe recoltate din jurul arsurilor și din ariile arse se urmăresc patogenii potențiali. Ulterior se recoltează probe în contextul unor modificări survenite în aspectul leziunilor (aparitia puroiului, exsudat în cantitate crescută, schimbarea culorii plăgii, inflamația zonelor nearse), în cazul lizei graftului sau apariției semnelor de infecție sistemică.

Probele recoltate cu ajutorul tamponului permit analiza calitativă sau semicantitativă a colonizării, iar în prezența semnelor unei infecții, permite stabilirea agentului cauzal și a sensibilității acestuia față de antibiotice.

Fragmentele de țesut permit analiza cantitativă a bacteriilor/gram țesut. Fiind metode invazive sunt mai rar folosite. Se vor exciza două bucăți de 1,5x1-2 cm (20-50 mg) din marginea leziunii, care să conțină și țesut sănătos. Un fragment se trimite la examinări histopatologice, celălalt la examen microbiologic. Fragmentele de țesut sunt adecvate și pentru identificarea infecțiilor fungice.

Pentru recoltările efectuate cu tamponul, întâi se îndepărtează agenții topici aplicați cu ajutorul unei comprese sterile îmbibate cu ser fiziologic. Din zona astfel curățată se recoltează

proba cu două tampoane: se șterge o suprafață de 2-4 cm² în zig-zag sau se apasă tamponul pe o arie a plăgii rotind-o de câteva ori (se apasă energic, dar fără a cauza sângerare).

Abcese, furuncule, carbuncule

Abcesele reprezintă colecții purulente închise ce pot avea diferite localizări (subcutanate sau în diverse organe).

Carbunculii sunt abcese subcutanate profunde și extinse care implică mai mulți foliculi piloși și glande sebacee.

Abcesele cutanate pot fi cauzate de bacterii diverse. Cele localizate pe trunchi, axilă și membre sunt cauzate cel mai frecvent de *S. aureus*. Cele situate în vecinătatea organelor genito-urinare și perianal se datorează în principal florei genito-urinare și intestinale.

Diagnosticul microbiologic este recomandat în situațiile în care rezultatul obținut influențează atitudinea terapeutică.

Pentru diagnostic se recoltează puroiul din abces prin puncție și aspirare (dacă abcesul este accesibil puncției) după antisepsie locală sau în cursul unei intervenții chirurgicale.

Dacă volumul este mare, se aspiră cca 5-10 ml și se transferă în recipiente sterile pentru transport. Dacă se transportă în seringi, acestea trebuie închise. Cantitatea minimă recomandată este 1 mL. În puroaiile voluminoase anaerobii își păstrează viabilitatea mai bine. Probele din care se cultivă anaerobi nu se refrigerază, trebuie prelucrate cât mai repede.

Micoze superficiale

Micozele superficiale sunt infecții fungice ce afectează stratul cornos al tegumentelor, firele de păr și unghiile. Pot fi cauzate de dermatofiți, specii de *Candida* și levuri lipofile (de ex. *Malassezia* spp.). Pentru diagnostic se obțin scuame, fir de păr, raclat unghial.

Infecții cutanate produse de bacterii specifice

Antrax

Antraxul cutanat apare în urma contactului cu animale infectate sau produse (piele, blană, etc.) provenite de la aceste animale. Este caracterizat de dezvoltarea unei leziuni caracteristice, pustula malignă: ulceratie cu escară neagră, edem periulcerativ.

Suspiciunea clinică de antrax trebuie menționată la solicitarea examenului microbiologic.

În cazul formelor de prezentare veziculară, se recoltează lichid vezicular pe tampon. În cazul prezenței crustei, se recoltează probă de sub crustă pe tampon umectat. În cazul prezenței ulcerului, se recoltează proba de la baza leziunii cu un tampon umectat cu ser fiziologic steril.

Infecții produse de *Aeromonas* spp. și specii de *Vibrio* non-holerice

Aceste specii produc suprainfecția plăgilor traumatice asociate mediului acvatic (plăgi contaminate cu apă dulce sau sărată).

Erizipeloid

Este o boală ocupațională, determinată de *Erysipelothrix rhusiopathiae*, ce se manifestă în urma contactului cu animale infectate (porcine, bovine, cai, păsări, pești, etc.). Cel mai frecvent sunt afectați lucrătorii din abatoare, fermieri, veterinari, pescari.

Obișnuit, se dezvoltă o infecție localizată a părților moi, ocazional însă pot apărea și infecții sistemice, inclusiv endocardită. Bacteria este un bacil Gram-pozitiv pleomorf. Are rezistență naturală față de vancomicină.

Actinomicoza

Actinomicoza este o infecție supurativă cronică determinată de *Actinomyces* spp., caracterizată prin formare de fistule și eliminarea unei secreții purulente ce conține granule de sulf. Apariția acestor infecții, de obicei este legată de traumatisme ce implică mucoasa cavității bucale. Infecțiile pot avea și localizări toracice, abdominale sau pelvine. Se recomandă drenarea puroiului, colectarea granulațiilor de sulf și/sau obținerea de material biopsic în vederea diagnosticului bacteriologic.

Nocardioza

Nocardioza cutanată poate fi determinată de diseminarea microorganismului în urma unei infecții pulmonare. De obicei apare la persoane imunodeprimite.

Nocardioza cutanată primară afectează persoanele imunocompetente și, cel mai adesea, apare în urma unei leziuni cutanate. Se prezintă într-una din cele trei forme: infecție cutanată superficială, infecție limfocutanată sau micetoame.

Tabelul 1. Microorganismele cu importanță clinică în funcție de localizarea infecției și contextul clinic

Tipul leziunii	Contextul clinic	Microorganismele cu importanță clinică
Actinomycetoma, nocardioză		<i>Nocardia</i> spp.
Actinomicoza	Granule de sulf (sunt frecvente localizările cervicofaciale), leziuni supurative cu tendință la cronicizare	<i>Actinomyces israelii</i>
Angiomatoza bacilară	Imunosupresie (SIDA, cancer, transplant medular)	<i>Bartonella henselae</i> , <i>Bartonella quintana</i>
Antrax		<i>Bacillus anthracis</i>
Arsuri		<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , Enterobacterales,

		<i>Streptococcus pyogenes</i>
Celulită/fasceită		<i>Staphylococcus aureus</i> , Streptococi beta-hemolitici de grup A, B, C, G Enterobacterales <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Anaerobi
Celulită cu leziuni buloase, hemoragice	Contact cu fructe de mare crude, leziuni contaminate cu apă marină	<i>Vibrio vulnificus</i> și alți vibrioni
Erizipel		Streptococi beta-hemolitici de grup A, B, C, G
Eritrasma		<i>Corynebacterium</i> <i>minutissimum</i>
Foliculită	Asociată cu activități de recreere acvatică	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Furunculoză		<i>Staphylococcus aureus</i>
Hidrosadenită supurativă		<i>Staphylococcus aureus</i> , streptococi, Enterobacterales, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , anaerobi
Impetigo		<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Mușcătură (umană, de porc)		Streptococi de grup viridans Anaerobi, <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Eikenella corrodens</i> , stafilococi coagulază negativi, <i>Corynebacterium</i> spp., <i>Streptococcus pyogenes</i> . Infecțiile sunt frecvent polimicrobiene.
Mușcătură de câine, pisică, liliac, etc.		Virus rabic, streptococi beta- hemolitici și de grup viridans, <i>Staphylococcus</i>

		<i>aureus</i> , stafilococi coagulazo-negativi, <i>Pasteurella</i> spp., anaerobi, coryneformi
Mușcătura de șobolan		<i>Streptobacillus moniliformis</i> , <i>Spirillum minus</i>
Panarițiu		<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Plagă traumatică, contaminată cu sol		Clostridii
Plagă traumatică suprainfectată (fără contact cu mediu acvatic)		Polimicrobian: <i>Staphylococcus aureus</i> , streptococi beta-hemolitici de grup A, B, C, G, enterobacterii, clostridii
Plagă traumatică suprainfectată (contaminată cu apă dulce)		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Aeromonas hydrophila</i> , <i>Burkholderia pseudomallei</i>
Plagă traumatică suprainfectată (contaminată cu apă marină)		<i>Vibrio vulnificus</i>
Plagă chirurgicală		<i>Staphylococcus aureus</i> , streptococi beta-hemolitici de grup A, Enterobacterii, <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Plagă chirurgicală (intervenție pe tractul gastrointestinal, tractul genital feminin)		<i>Staphylococcus aureus</i> , streptococi beta-hemolitici de grup A, B, C, G Enterobacterii, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Anaerobi Enterococi

III. Recoltarea și transportul probelor

Deoarece există o varietate mare a infecțiilor cutanate, este important să se descrie exact leziunea din care provine proba recoltată, inclusiv localizarea acesteia. Adâncimea leziunii este de asemenea important de cunoscut, deoarece doar din cele adânci este indicată cultivarea anaerobilor. Pentru cultivarea anaerobilor se preferă probele aspirate față de probele recoltate pe tampoane.

Modul de recoltarea se va menționa de asemenea (intraoperator, puncție-aspirație).

Ca principiu de bază, probele recoltate prin aspirare sau probele biopsice (fragmente de țesut) sunt superioare calitativ probelor recoltate pe tampon. Fragmentele de țesut se transportă în recipiente sterile acoperite de ser fiziologic steril pentru a evita deshidratarea.

În cazul în care se recoltează cu tampon de pe suprafața unei leziuni deschise, înainte de recoltare, zona din care urmează să se recolteze se curăță cu ser fiziologic steril, iar zona adiacentă leziunii se dezinfectează. Tamponul se răsuște energic pe o suprafață de cca 1 cm² până la provocarea unei ușoare sângerări.

Examenul microscopic al acestor probe este important, de aceea în cazul probelor recoltate pe tampon, fie se va recolta și un al doilea tampon pentru efectuarea frotiului, fie se efectuează frotiu din același tampon după descărcarea pe mediile de cultură.

În cazul infecțiilor bacteriene întotdeauna sunt prezente leucocite. Celulele epiteliale scuamoase indică probe superficiale și o posibilă contaminare.

Probele trebuie să ajungă la laborator în 2 ore. Depășirea acestei durate impune folosirea unui mediu de transport.

IV. Prelucrarea probelor

Pregătirea probelor

Probele se prelucrează în hote de siguranță de clasă 2.

Fragmentele tisulare trebuie mojarate, cu excepția situațiilor în care se suspicionează infecție micotică, deoarece strivirea zigomicetelor duce la pierderea viabilității.

Examenul microscopic al frotiurilor colorate Gram

Se efectuează în cazul infecțiilor profunde, din probe de puroi aspirate sau din probele recoltate pe tampon.

În cazul fragmentelor tisulare, frotiul se efectuează din produsul omogenizat prin mojarare, alternativ se fac amprente pe lamă atingând fragmentul de mai multe ori de suprafața lamei. Fragmentul astfel utilizat pentru efectuarea frotiului nu se folosește pentru cultivare.

Dacă recoltarea s-a făcut cu două tampoane, dintr-unul se efectuează frotiuri, iar celălalt se însămânțează.

Dacă s-a trimis un singur tampon, din acesta se efectuează frotiuri după însămânțarea pe mediile de cultură.

Se notează prezența leucocitelor, a celulelor epiteliale și se urmărește prezența bacteriilor, cantitatea acestora și caracterele lor morfotinctoriale.

Cultivare

Tampoanele se descarcă pe mediile de cultură prin rotire în primul cadran. Se diseminează cu ansa sterilă.

Probele de puroi aspirate se depun cu pipetă sterilă și se diseminează cu ansa. Se vor însămânța de asemenea medii de îmbogățire.

Mojaratul obținut din fragmentele de țesut se însămânțează cu ansa de 10 μl sau se depune o picătură cu pipeta.

Se însămânțează maxim două probe pe o placă.

Dacă se suspicionează antrax, cultivarea se face doar în laboratoarele de nivel 3 de biosiguranță.

Tabelul 2. Prelucrarea probelor recoltate pe tampon

Entități clinice	Medii de cultură standard	Condiții de incubare			Citirea culturii	Microorganisme țintă
		Temperatura °C	Atmosfera	Timp h		
Probe recoltate pe tampon	Agar sânge +/-	35-37	5% CO ₂	48	Zilnic	Streptococi piogeni <i>Staphylococcus aureus</i> Și alți germeni în funcție de tipul leziunilor
	Mediu selectiv pentru stafilococi (MSA - manitol Salt Agar)	35-37	Aerobă	48	Zilnic	<i>Staphylococcus aureus</i>
	+ CLED/ MacConkey	35-37	Aerobă	18-24	>18	Enterobacterii Pseudomonade (Semnificația clinică trebuie determinată în funcție de patologie)
În următoarele situații se adaugă:						
Tampoane recoltate din plăgi profunde	Agar sânge pentru anaerobi	35-37	Anaerob	5 zile	La 2 - 5 zile	Anaerobi

Tampoane recoltate din abcese	Mediu tioglicolat	35-37	Aerob	5 zile		Orice microorganism
		35-37	Aerob/ CO ₂ / Anaerob	40-48	≥40 h	
	Subculturi pe agar sânge în cazul evidenței creșterii Sau la 5 zile			5 zile	La 2 - 5 zile	
Celulite la copii Mușcăături umane	Agar chocolate (poate fi selectiv, cu conținut de bacitracină)	35-37	5-10% CO ₂	40-48	Zilnic	Bacterii pretențioase, <i>Haemophilus influenzae</i>
Arsuri Imunosupresive Diabetici Panarițiu (dacă se observă fungi pe frotiu)	Agar Sabouraud	28-30	Aerob	Până la 14	Zilnic	Levuri Fungi filamentoși

Tabelul 3. Prelucrarea probelor de puroi aspirat și a fragmentelor biopsice

Entități clinice	Medii de cultură standard	Condiții de incubare			Citirea culturii	Microorganismele țintă
		Temp °C	Atmosferă	Timp h		
Probe de puroi recoltate prin aspirare Fragmente de țesut	Agar sânge	35-37	CO ₂	40-48	Zilnic	Orice bacterie
	CLED sau MacConkey Agar	35-37	Aerob	18-24	>18	
	Agar sânge pentru anaerobi	35-37	Anaerob	5 zile	La 2-5 zile	Bacterii strict anaerobe
	Bulion tioglicolat	35-37	Aerob	5 zile	NA	Orice

	Dacă se observă tulburare se fac treceri pe mediile mai sus menționate (excepție: MacConkey/CLED)	35-37	Aerob/CO ₂ Anaerob	40-48	>40 La 2-5 zile	microorganism
În situațiile următoare adaugă:						
Abces submandibular Abces pulmonar Abces cerebral Abces spinal Abces psoas Abces hepatic	Agar chocolat	35-37	5-10% CO ₂	40-48	Zilnic	Bacterii pretențioase
Pacient imunosupresat sau se observă fungi pe frotiu	Agar Sabouraud cu cloramfenicol	28-30	Aerob	14 z	Zilnic	Fungi
Puroi recoltat în cazul peritonitei primare la femei, Abces prostatic	Agar chocolat selectiv	35-37	5-10% CO ₂	40-48	>40	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
Opțional în cazul unor infecții mixte (pe baza frotiului)	Medii selective pentru stafilococi/streptococi	35-37	Aerob	40-48	Zilnic	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus spp.</i>

Identificarea microorganismelor izolate

Tabelul 4. Nivelul de identificare a izolatelor din infecții ale părților moi

Bacterii izolate	Nivelul minim de identificare		
	Infecții superficiale (probe recoltate pe tampon)	Infecții profunde (puroi aspirat sau recoltat pe tampon)	Fragmente de țesut
Anaerobi	-	Menționarea prezenței anaerobilor	Menționarea prezenței anaerobilor
Actinomycete		Gen	Gen
<i>Bacillus</i> spp	Specie*	-	-
Streptococi hemolitici β-	Grup Lancefield	Specie	Specie
<i>Staphylococcus aureus</i>	Specie	Specie	Specie
Stafilococi coagulază negativi	Coagulazo-negativ	Coagulazo-negativ	Coagulazo-negativ
Enterobacterii	Coliformi Specie (plăgi chirurgicale)	Specie	Specie
<i>Corynebacterium</i> spp.	În funcție de situația clinică: la nivel de specie în suspiciunea de difterie cutanată Eritrasma	-	-
<i>Haemophilus</i> spp.	Specie	Specie	Specie
Levuri	Gen	Specie	Specie
Mucegaiuri	Gen	Specie	Specie
<i>Streptococcus anginosus</i> grup	Grup	Grup	Grup
<i>Pasteurella</i> spp. și alți germeni	Specie	Specie	Specie

zoonotici*			
Pseudomonade	Pseudomonade (la nivel de specie: foliculita recreațională, fasceita necrozantă, arsuri)	Specie	Specie
Vibrioni	Specie	-	-

*aceste culturi se manipulează doar în laboratoare de biosiguranță de nivel 3

Testarea sensibilității față de antibiotice

Se efectuează conform standardului EUCAST în vigoare. Raportarea sensibilității se va face selectiv.

V. Raportarea rezultatelor

Examenul microscopic:

Se descrie prezența leucocitelor și a bacteriilor vizualizate. Rezultatul examenului microscopic se introduce în fișa electronică și se validează imediat ce este disponibil.

Cultivare:

Se menționează:

- Microorganismul semnificativ cu cuantificare (creștere săracă - creștere doar în primul cadran de însămânțare, moderată sau bogată - creștere până în ultimul cadran al însămânțare)
- Alte creșteri (ex. floră comensală fără semnificație patogenă)
- Absența creșterii.

Se comunică rezultatele pe măsură ce sunt disponibile: prezența culturii cu germeni semnificativi, eventuale teste rapide de rezistență bacteriană efectuate direct din cultură.

Teste moleculare

Se menționează microorganismul/ microorganismele detectate. În cazul testelor multiplex se include lista agenților potențial detectabili.

Eliberarea rezultatelor

Se eliberează rezultate parțiale în cazul în care se izolează germeni semnificativi. Rezultatele urgente se comunică și telefonic. Raportul final se eliberează atunci când sunt disponibile rezultatele tuturor testărilor efectuate.

VI. Bibliografie

Greenhalgh DG, Saffle JR, Holmes JA et al: American Burn Association consensus conference to define sepsis and infections in burns. *J Burn Care Res*, 2007, 28:776-790.

Misiakos EP, Bagias G, Patapis P et al: Current concepts in the management of necrotizing fasciitis. *Front Surg*, 2014, 1:1-10.

Public Health England. (2018). Investigation of swabs from skin and superficial soft tissue infections. UK Standards for Microbiology Investigations. B 11 Issue 6.5.

Public Health England. (2018). Investigation of tissues and biopsies from deep-seated sites and organs. UK Standards for Microbiology Investigations. B 17 Issue 6.3.

Public Health England. (2016). Investigation of pus and exudates. UK Standards for Microbiology Investigations. B 14 Issue 6.2.

Stevens DL, Bisno AL, Chambers HF et al: Practice guidelines for the diagnosis and management of skin and soft tissue infections: 2014 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*, 2014, 59:e10-52/

Diagnosticul microbiologic al infecțiilor de tract urinar

I. Introducere

Protecția împotriva infecției urinare este în mod normal dată de fluxul urinar constant și unidirecțional prin uretere și de golirea regulată a vezicii urinare. Urina este un mediu nefavorabil de cultură, sărac pentru multe bacterii datorită acidității sale, concentrației ridicate de uree și osmolalitate variabilă și, la bărbați, posibil parțial ca urmare a activității antibacteriene a secrețiilor prostatice. Alterarea acestor factori protectori permite colonizarea căilor urinare, adică persistența și multiplicarea anumitor microorganisme care se pot adapta condițiilor de la acest nivel.

Infecția tractului urinar (ITU) reprezintă una dintre cele mai frecvente infecții comunitare și este rezultatul inflamației determinate de prezența și multiplicarea microorganismelor, în una sau mai multe structuri ale tractului urinar. Acest lucru poate da naștere la o mare varietate de sindroame clinice. Acestea includ:

- pielonefrita acută și cronică
- cistita
- uretrita

Infecția se poate extinde la țesuturile înconjurătoare (de exemplu, abcesul perinefretic) sau în circulația sanguină.

Termeni folosiți:

Bacteriuria - implică prezența bacteriilor în urină. Pacientul poate fi sau nu simptomatic.

Bacteriuria asimptomatică - reprezintă prezența bacteriilor în urină în lipsa simptomatologiei sugestive pentru ITU. Corespunde colonizării căilor urinare, condiție ce necesită investigare microbiologică doar în sarcină sau înainte de intervenții urologice. **Screeningul și tratamentul bacteriuriei asimptomatice nu sunt recomandate în alte situații.**

Piuria este definită ca prezența într-o probă de urină a 10 sau mai multe leucocite pe milimetru cub, a 3 sau mai multe leucocite pe câmp de mare putere de mărire, sau a unui test pozitiv pentru esteraza leucocitelor. Este cel mai frecvent asociată cu infecție bacteriană a tractului urinar superior sau inferior.

Alte afecțiuni care ar putea provoca piuria sunt infecțiile genitale (cum ar fi cea cauzată de *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae* sau virusul herpes simplex și ocazional la femei infecții vaginale cu *Trichomonas vaginalis* sau *Candida*), necroză papilară, diabet, calculi renali, boala Kawasaki și cancer al vezicii urinare.

Piuria "sterilă" (adică fără creștere pe mediile de cultură de rutină și prezența persistentă a leucocitelor în urină) poate fi rezultatul multor factori printre care:

- Tratament anterior cu agenți antimicrobieni;
- Cateterizare la nivelul căilor urinare;
- Litiază sau neoplasm al vezicii urinare;
- Infecții ale tractului genital;
- Boli cu transmitere sexuală, de exemplu *Chlamydia trachomatis* sau o infecție cu organism fastidios,

- Infecții urinare cu adenovirusuri
- Tuberculoza renală poate fi, de asemenea, implicată în piuria sterilă, dar este mai puțin frecventă, deși trebuie luată în considerare dacă este suspiciune clinică.

Hematuria - Găsirea 1-2 eritrocite/câmp la mărirea de 400x este considerată normală. Hematuria poate să apară în stări patologice neinfecțioase ale tractului urinar sau în infecții urinare, infecții cu micobacterii. Hematuria macroscopică poate fi și rezultatul menstruației (pentru evitarea acestei situații se recomandă folosirea tamponului intravaginal în cazul recoltării în timpul menstruației). Eritrocitele pot fi lizate în urina hipertona sau hipotona, devenind nedetectabile prin microscopie.

Pacienții simptomatici pot avea bacteriurie sau nu. La copii și persoanele în vârstă, simptomele, atunci când sunt prezente, pot fi nespecifice și dificil de interpretat.

II. Manifestări clinice ale ITU

Sindrom uretral acut

Sindromul uretral acut apare la femei și constă în simptome acute ale tractului urinar inferior în absența infecției urinare (fie cu un număr de bacterii ce nu îndeplinește criteriile de semnificație, fie fără bacteriurie) sau asociat cu o infecție vulvovaginală.

ITU necomplicată

Infecție sporadică sau recurentă acută, joasă (cistită necomplicată) sau înaltă (pielonefrită necomplicată) la femei în afara sarcinii, aflate în pre-menopauză, fără anomalii anatomice/funcționale ale tractului urinar, fără comorbidități.

Se consideră că au infecții urinare recidivante persoanele care au minim trei episoade anual (minim două episoade în șase luni).

ITU complicată

Apare la pacienții la care există leziuni inflamatorii secundare unei infecții anterioare sau post explorări instrumentale, obstrucției, calculilor, anomaliilor anatomice sau funcționale ale tractului urinar. Acestea interferă cu drenarea urinei și favorizează colonizarea prelungită. Pot apărea recidive cu același microorganism. Exemple de ITU complicată:

- Pielonefrita acută complicată
- Pielonefrita cronică (nefrită interstițială cronică sau nefropatie de reflux)
- ITU la bărbați
- ITU asociat sondei
- urosepsis
- Abces perinefretic
- Pionefroză
- Abces renal.

Spectrul etiologic al ITU complicate este mai larg comparativ cu cel al ITU necomplicate, iar bacteriile izolate sunt mai frecvent rezistente, în consecință evoluția infecțiilor poate fi mai severă.

III. Aspecte clinice particulare

Incidența ITU este influențată de vârstă, sex sau de factorii predispozanți care afectează o mare varietate de mecanisme normale de apărare a gazdei.

ITU la copii

Confirmarea ITU la copii depinde de calitatea probei, care este adesea dificil de obținut curată.

Probele recoltate în pungi sterile speciale aplicate pe organele genitale externe sunt frecvent contaminate cu flora perineală. Rezultatele obținute prin această metodă au valoare doar pentru excluderea unei infecții (în lipsa creșterii microbiene). Probabilitatea ITU este crescută prin izolarea aceluiași organism din două probe de urină.

La copiii care nu cooperează la recoltare este de preferat obținerea probei de urină prin cateter "in and out" sau puncție suprapubiană.

Adulți femei

Incidența ITU este cea mai mare la femeile tinere. Aproximativ 10–20% dintre femei vor face ITU simptomatică la un moment dat. La femeile cu simptome acute, ITU poate să fie asociată cu prezența unui singur izolat uropatogen chiar și la un nivel redus cantitativ. Cu toate acestea, interpretarea rezultatelor culturii trebuie făcută cu grijă, luând în considerare factori precum vârsta și condițiile de păstrare a probei, nivelul de contaminare indicat de prezența celulelor epiteliale scuamoase și sensibilitatea metodei.

Creșterile de $<10^5$ UFC/mL la femeile asimptomatice, care nu sunt însărcinate, sunt rareori persistente și reprezintă de obicei contaminare.

Urocultura nu este indicată în cazurile de cistită acută la femei peste 15 ani care nu au alți factori de risc sau comorbidități. Urocultura trebuie indicată în:

- suspiciunea de pielonefrită acută
- în cazul în care simptomele de cistită persistă sau reapar în decurs de o lună de la tratament
- la gravide.

Sarcina

Bacteriuria asimptomatică (colonizarea persistentă a tractului urinar fără simptome urinare) poate să apară la cca. 4% dintre gravide.

La gravide ITU sunt mai frecvente comparativ cu femeile în afara sarcinii. Se consideră că 20–40% dintre femeile însărcinate cu bacteriurie netratată vor dezvolta pielonefrită. Cu excepția cazului în care ITU este detectată și tratată devreme, există un risc crescut de naștere prematură și pielonefrită care poate afecta atât mama cât și fătul. La aproximativ 30% dintre paciente pielonefrita acută apare în special la momentul nașterii. Se consideră că 20–40% dintre femeile însărcinate cu bacteriurie netratată vor dezvolta pielonefrită.

Bărbați

Infecțiile urinare la bărbații adulți sunt complicate și de cele mai multe ori sunt legate de anomalii ale tractului urinar. O incidență scăzută de ITU există și la bărbații tineri sănătoși.

Persoanele în vârstă

Incidența ITU crește odată cu vârsta pentru ambele sexe și este una dintre cele mai frecvente infecții asociate cu această grupă de vârstă. De asemenea, se estimează că 10% dintre bărbați și 20% dintre femeile cu vârsta peste 80 de ani au bacteriurie asimptomatică. Nu este indicat niciun tratament pentru pacienții asimptomatici, cu excepția situațiilor care preced procedurile invazive genito-urinare.

Diabet

Femeile cu diabet au o incidență mai mare a bacteriuriei asimptomatice decât cele fără diabet. Nu există nicio diferență în prevalența bacteriuriei între bărbații cu diabet și bărbații fără diabet.

Boli neurologice

Pacienții cu tulburări neurologice ale vezicii urinare congenitale sau dobândite (spina bifida, leziuni ale măduvei spinării) prezintă un risc crescut de ITU și poate fi o cauză semnificativă de deces.

Transplantul renal

Majoritatea infecțiilor apar la scurt timp după transplant, de obicei ca rezultat al cateterizării, prezența unui tub de drenaj ureteral sau a unei UTI anterioare în timpul dializei. Mai puțin frecvent, infecția poate fi introdusă prin rinichiul donatorului.

Imunosupresia

În general, incidența ITU nu este mai mare la pacienții imunocompromiși.

Cateterizare

Infecțiile tractului urinar dobândite prin cateter reprezintă una dintre cele mai frecvente infecții asociate îngrijirilor medicale. Cu toate acestea, probele de la pacienții cu catetere pot fi contaminate și nu reflectă cu precizie adevăratul agent patogen al vezicii urinare și conține adesea mai multe specii bacteriene. Rezultatele culturii trebuie interpretate cu prudență. Uroculturile pot să nu reflecte prezența bacteriilor la nivelul vezicii urinare, deoarece organismele izolate din urină pot fi din biofilme de pe suprafața interioară a cateterului.

Prezența leucocitelor în urină la pacienții cateterizați este constantă și nu are obligatoriu semnificație de infecție urinară.

IV. Recoltarea și transportul probelor

Urina recoltată prin jet mijlociu

Pacienții sunt instruiți să recolteze singuri. Proba de urină va fi recoltată la cel puțin 4 ore de la micțiunea anterioară. După o spălare atentă a mâinilor și a organelor genitale externe și meatului uretral, cu o singură mișcare din față spre spate:

- Se elimină primul jet (o cantitate de cca 20 ml de urină), apoi se recoltează următorii 10 ml într-un recipient steril, având grijă să nu se atingă marginea superioară a flaconului;
- Recipientul este apoi închis etanș, suprafața exterioară este curățată și se spală mâinile
- Se etichetează recipientul cu datele de identificare a pacientului.

Urina recoltată prin cateter ”in situ”

Se recomandă evitarea recoltării prin cateter ”in situ”, se preferă recoltarea prin cateterul nou introdus. Această probă este reprezentativă pentru bacteriile prezente în vezica urinară și nu pentru bacteriile care au aderat, eventual, la peretele intern al cateterului.

Când există motive obiective care împiedică schimbarea cateterului se va recolta proba de urină prin portul cateterului destinate recoltării sau în lipsa acestuia prin puncționarea cateterului. Se va dezinfecta o porțiune de cateter și se va puncționa direct cateterul. Cu toate acestea, acest tip de probă nu este reprezentativă pentru speciile bacteriene din vezica urinară, așa cum este aspiratul suprapubian, tehnica gold-standard de recoltare pentru pacienții cateterizați.

Nu se va lua niciodată urină din punga de colectare, unde există o multiplicare microbiană considerabilă. Nu se decuplează cateterul de la punga de colectare în vederea recoltării.

Urina recoltată la sugari și copiii mici

Recoltarea urinei din jet mijlociu după dezinfectia atentă a organelor genitale externe este cea mai bună metodă non-invazivă la copiii care urinează voluntar. Poate fi utilizată și la sugarii care nu au încă controlul voluntar, deoarece, cu excepția situației în care sunt deshidratați, ei urinează la fiecare 20-30 min.

Recoltarea cu ajutorul punguței sterile, deși este o metodă controversată, este cea mai utilizată pentru copiii sub 2-3 ani. Acest dispozitiv de unică utilizare este plasat în poziție după o atentă antiseptizare a organelor genitale externe. Ea nu trebuie lăsată pe poziție mai mult de 1 oră.

După depășirea acestui interval de timp, în cazul în care copilul nu a urinat, punguța este îndepărtată și este înlocuită cu una nouă. După ce copilul a urinat, se îndepărtează punga iar urina este transferată cu grijă într-un recipient steril care este trimis imediat la laborator. Pentru copiii spitalizați, se poate face cateterizare sau puncție suprapubiană. Cateterizarea se face cu un cateter flexibil, lubrifiat, cu diametru mic (cateterizare intermitentă ”in and out”). Primele picături de urină obținute prin cateter se aruncă.

Recoltarea din urostomă

Stoma va fi curățată cu atenție, apoi se atașează o pungă sterilă. În continuare se va proceda la fel ca la copii.

Recoltarea urinei la pacienții cu incontinență

La femei recoltarea urinei prin cateterizare intermitentă, cu un cateter cu diametru mic, este acceptabilă numai atunci când nu este posibilă recoltarea în timpul micțiunii. Chiar și la femeile incontinente cateterizarea nu este esențială, și poate fi acceptată și o probă recoltată după o toaletă atentă a organelor genitale externe.

La bărbați, pentru a evita apariția prostatitei post-cateterizare, se preferă recoltarea unei probe printr-o pungă sterilă fixată pe penis sau chiar prin cateterizare supra-pubiană în caz de retenție urinară.

Cantitatea adecvată și numărul adecvat de probe

La nou-născuți și sugari se recoltează un volum minim de 1 ml într-un recipient steril și etanș. Un volum de maximum 10 ml este suficient la adulți.

În recipiente cu conservant de acid boric se completează până la linia marcată conform instrucțiunilor producătorului.

Pentru *Mycobacterium tuberculosis* se recoltează trei probe consecutive, cantitatea totală a primei urini de dimineața (dacă nu se poate reține cantitatea totală, este acceptabil jetul mijlociu, însă această probă este de calitate inferioară).

Transportul și depozitarea probelor de urină

Probele trebuie transportate și procesate în decurs de 2 ore, dacă este posibil, cu excepția cazului în care se folosește conservant acid boric. În acest caz se mărește timpul maxim permis pentru transportul la laborator până la 48 h.

Dacă procesarea este întârziată până la 24 de ore, refrigerarea este esențială.

Trebuie remarcat faptul că acidul boric poate fi inhibitor pentru unele organisme și poate inhiba reacția pentru esteraza leucocitară.

Întârzierile și depozitarea la temperatura camerei permit multiplicarea organismelor, care generează rezultate care nu reflectă adevărata situație clinică.

V. Prelucrarea probelor de urină

Cultura bacteriană și citologia sunt indicate la persoane simptomatice din următoarele categorii: copii și bărbați adulți tineri, pacienți cu diabet sau altă boală cronică, imunodeprimați, sarcină, infecții urinare recurente, pacienți cu malformații ale tractului urinar, pentru investigarea unei pielonefrite sau în caz de eșec terapeutic.

Următoarele informații, necesare pentru interpretarea rezultatului culturii și citologiei, trebuie să fie prezente în cererea de analiză :

- vârsta, sexul,
- anomalii anatomice sau funcționale, afecțiuni neurologice, sarcina
- boala renală cronică a tractului urinar
- spitalizări sau intervenții chirurgicale recente
- terapie imunosupresivă, diabet
- tratament anterior cu antibiotic și cu ce antibiotic

- semne de pielonefrită: febră, frisoane, dureri lombare
- modul de recoltarea a probei de urină (jet mijlociu sau primul jet, sondă vezicală)
Investigarea de laborator a ITU implică în mod normal microscopie (sau o metodă alternativă de măsurare a componentelor celulare) și cultura cantitativă cu screening biochimic.

Screening cu dipstick

Poate fi utilizat pentru screeningul persoanelor asimptomatice (de ex. gravide) sau pentru diagnosticul cistitei acute necomplcate la femei.

Testul detectează prezența esterazei leucocitare și a nitriților. Un rezultat negativ nu exclude diagnosticul de ITU la pacienți simptomatici.

De exemplu bacteriuria de nivel scăzut ($10^3 - 10^4$ UFC/ml) nu este evidențiată prin testul nitriților. Reacția la nitriți nu este pozitivă în cazul *Staphylococcus saprophyticus*, *Pseudomonas* spp., *Candida* spp., *Enterococcus* spp., *Acinetobacter* spp., care nu utilizează nitrații.

Nu se face screening cu strip la pacienții:

- cu vezică neurogenă (care au oricum leucociturie)
- cateterizați, care au uzual leucociturie și ITU cu microorganisme care nu utilizează nitrat reductaza (*Pseudomonas* spp., *Candida* spp., *Enterococcus* spp., *Acinetobacter* spp.)
- tratați cu anumite medicamente care interferează cu testele de pe strip.

Examenul microscopic

Microscopia este utilizată pentru a identifica prezența de leucocite, eritrocite, celule epiteliale scuamoase (CES), bacterii și alte componente celulare din urină.

Microscopia (sau examinarea automată a celulelor din urină) este recomandată pentru toate grupurile de pacienți simptomatici, pentru a ajuta în interpretarea rezultatelor culturii și diagnosticul ITU.

Urina conține normal < 1000 leucocite/ml.

Aprecierea leucocituriei se face pe camera de numărat! Este recomandată însă numărarea automată.

La o probă atent recoltată, piuria semnificativă se corelează bine cu bacteriuria și cu prezența simptomatologiei la majoritatea pacienților pentru a sugera un diagnostic de ITU.

Este definită piuria semnificativă ca mai mult 10^4 leucocite/ml, deși un număr mai mare de leucocite există adesea la femeile sănătoase asimptomatice. Un nivel $> 10^5$ leucocite/ml a fost sugerat ca fiind mai potrivit în discriminarea infecției.

Efectuarea frotiului Gram – din urina necentrifugată:

Oferă microbiologului o orientare rapidă asupra prezenței bacteriilor în urină, a tipului de bacterie, prezența celulelor epiteliale (mai ales la femei este semn de recoltare defectuoasă); prezența lactobacililor este semn de contaminare vaginală

Nu detectează bacterii sub $10^3 - 10^4$ UFC/ml = sub 1 bacterie/câmp microscopic la examinare cu imersie.

Cultivare

Există mai multe metode de cultură pentru cuantificarea bacteriilor în urină. Cea mai ușoară și cea mai utilizată este tehnica ansei calibrate.

Metoda ansei calibrate

Amestecați ușor urina pentru a evita spumarea.

Scufundați capătul unei anse sterile calibrate (de exemplu, 1μL sau 10μL) în urină chiar sub suprafața și îndepărtați-l vertical. Se verifică prezența peliculei de lichid în bucla ansei.

Utilizați ansa pentru a inocula placa cu mediu CLED sau agar cromogen și dispersați în conformitate cu numărul de specimene. Se recomandă inocularea a maximum două eșantioane pe placă cu diametrul de 9 cm.

Dacă se utilizează o ansă de 1μL, o colonie este egală cu 1000 UFC/mL, iar dacă se folosește ansa de 10μL, o colonie este egală cu 100 UFC/mL.

Din probele de urină recoltate din jet mijlociu și cele care provin de la pacienți cu cateter permanent se însămânțează o cantitate de 1 μL de urină.

Din probele recoltate prin cateter uretral intermitent (cateterizare în vederea recoltării), cistoscopie, ureterostomă, pielostomă se va însămânța o cantitate de 10 μL. Pentru aceste probe pragul de semnificație clinică este de $\geq 10^2$ UFC/mL.

Aspiratele suprapubiene, alte probe obținute chirurgical și probele de urină cu bacteriurie semnificativă de până la 10^3 UFC/ml necesită un inocul mai mare: 100 μL (0,1 mL). Pentru a obține colonii izolate se dispersează inoculul cu o ansă sterilă pe întreaga suprafață a plăcii. Nu se utilizează un tampon steril (va absorbi o mare parte din inocul). În acest caz numărul de germeni va fi numărul de colonii pe placă x 10 UFC/mL.

Interpretarea culturii

Infecția urinară presupune prezența simptomelor; absența lor semnifică colonizare!

Se ține cont de:

- Circumstanțe epidemiologice (istoric, localizare, infecție de spital/comunitară)
- Factori de risc: cateter, instrumentație pe tract urinar
- Simptome urinare sau febră
- Tratament cu antibiotic curent sau în antecedente
- Nivelul leucocituriei
- Absența florei locale pe frotiul Gram
- Nivelul bacteriuriei și tipul de bacterie izolat

E. coli, *S. saprophyticus*, *Salmonella* – sunt semnificative la peste 10^3 UFC/ml.

S. agalactiae poate fi patogen urinar, mai ales la diabetici. Izolarea sa are semnificație la femeia gravidă chiar și în cazul probelor contaminate, prezența acesteia se menționează deoarece indică colonizare și impune aplicarea profilaxiei intrapartum în vederea prevenirii infecției neonatale cu *S. agalactiae*;

Stafilococii coagulazo-negativi alții decât *S. saprophyticus* sunt mai degrabă contaminanți sau colonizanți.

Tabelul 1. Urocultura - medii de cultură și condiții de incubare

Entități clinice	Medii de cultură standard	Condiții de incubare			Citirea culturii	Microorganisme țintă
		T °C	Atmo-sferă	Timp		
ITU Screening în sarcină pt bacteriurie asimptomatică (prin cultură)	Agar CLED sau agar cromogen +/- agar sânge	35–37	Aerob	16–24 ore	>16 ore	<i>Enterobacterales</i> Enterococi streptococi Group B Lancefield Pseudomonade <i>S. saprophyticus</i> alți stafilococi coagulază-negativ <i>S. aureus</i>
Urina pacienților din terapie intensivă, Unități de îngrijire specială pentru copii, Unități de arși Unități de transplant sau dacă au fost văzuți fungi la examenul microscopic	Agar CLED sau agar cromogen În plus Agar Sabouraud	35–37	Aerob	40-48 ore	>16 ore	<i>Enterobacterales</i> <i>Acinetobacter</i> spp. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Fungi
Piurie sterilă	Agar anaerobi (doar în cazul probelor recoltate prin puncție) suprapubiană)	35–37	anaerob	40-48 ore	≥40 ore	Anaerobi Streptococi
	Agar ciocolată	35–37	5-10% CO2	40-48 ore	≥40 ore	Pretențioși

Izolarea streptococilor alfa-hemolitici, corynebacterii altele decât *C. urealyticum* și *C. seminale*, stafilococi coagulazo-negativ – pot fi considerați patogeni doar dacă sunt izolați din proba recoltată prin puncție suprapubiană sau confirmați prin izolare din a doua probă care să nu fie contaminată cu flora locală.

De asemenea, este necesară creșterea dimensiunilor inoculului la pacienții cu simptome persistente fără bacteriurie, dacă pacientul are „piurie sterilă” recurentă sau pentru probe la care sunt de așteptat un număr mai mic, cum ar fi aspiratul suprapubian sau alte probe de urină obținute chirurgical.

Infecții comunitare:

- La pacienții fără cateter o leucociturie de $\geq 10^4$ leucocite/ml se consideră semnificativă, frecvent asociată cu hematuria $\geq 10^4$ hematii/ml.
- Leucocituria poate fi absentă în primele ore de la debutul infecției sau la pacienți neutropenici.
- Leucocituria nu are semnificație la pacienți cateterizați sau la cei cu vezică neurogenă.
- Infecțiile comunitare sunt foarte rar polimicrobiene.
- Prezența lactobacililor la femei semnifică contaminarea probei.
- Cultura negativă în prezența simptomelor și a bacteriilor pe frotiu Gram semnifică fie tratament cu antibiotic fie microorganism care se cultivă greu (*Corynebacterium urealyticum*, *Haemophilus*, *Candida*, *E. coli* dependent de CO₂).

Infecțiile de spital

Interpretarea se face în funcție de următoarele criterii:

- Febră, urinare imperioasă, durere suprapubiană,
- Pacient în vârstă cu deteriorarea stării mentale sau dependenței, apariția sau agravarea incontinenței fără altă cauză,
 - Leucociturie $\geq 10^4$ /ml și bacteriurie $\geq 10^3$ UFC/ml cu cel mult 2 feluri de microorganisme la pacient fără cateter urinar sau altă abordare a tractului urinar,
 - Bacteriurie $\geq 10^5$ UFC/ml cu cel mult 2 microorganisme diferite la pacient cu cateter urinar sau altă abordare a tractului urinar cu până la 7 zile înainte de recoltare.

Tabelul 2 – Interpretarea infecțiilor comunitare și infecțiilor asociate asistenței medicale la pacienți fără cateter

Semne clinice	Leucociturie $\geq 10^4$ /ml	Bacteriurie (UFC/ml)	Număr de specii	Comentarii	Efectuarea antibiogramei
+	+	$\geq 10^3$ <i>E. coli</i> sau <i>S. saprophyticus</i> $\geq 10^5$ alte specii	≤ 2	Infecție urinară (cistita acută) Bacteriurie $\geq 10^4$ UFC/ml pentru pielonefrita acută	Da
+	+	$< 10^3$		Inflamație fără bacteriurie. Sub tratament cu antibiotic. Investigare pentru bacterii cu creștere lentă sau pretențioși nutritiv. Etiologie non-infecțioasă.	N/A
+	-	$\geq 10^5$	≤ 2	a.pacient imunocompetent: se repeta ex citologic și bacteriologic al urinei (posibil infecție la debut) b.pacient imunodeprimat (chimioterapie, transplant)	Nu Da
-	Variabil	$10^3 - 10^4$	≥ 1	Probabil contaminare la recoltare	Nu
-	Variabil	$> 10^5$	≥ 2	Colonizare	Nu
variabil	-	$< 10^3$		Nu este infecție sau colonizare	N/A

Tabelul 3 – Interpretare în cazul infecțiilor asociate asistenței medicale la pacienți fără cateter

Semne clinice	Leucociturie $\geq 10^4$ /ml	Bacteriurie (UFC/ml), număr de specii bacteriene ≤ 2	Comentarii	Efectuarea antibiogramei
+	+	$\geq 10^3$	Infecție urinară	Da
		$< 10^3$	Inflamație fără bacteriurie. Sub tratament cu antibiotic. Investigare pentru bacterii cu creștere lentă sau pretențioși nutritiv. Etiologie non-infecțioasă.	N/A
-	Variabil	$\geq 10^3$	Colonizare	Nu
		$< 10^3$	Nu este infecție urinară	N/A
+	-	$\geq 10^5$	a. pacient imunocompetent: se repeta examenul citologic si bacteriologic al urinii (posibil infecție la debut)	Nu
			b. pacient imunodeprimat (chimioterapie, transplant)	Da

Tabelul 4 – Interpretarea infecțiilor urinare la pacienții cu cateter

Semne clinice	Leucociturie $\geq 10^4$ /mL	Bacteriurie ≤ 2 microrganisme diferite	Comentarii	Efectuarea antibiogramei
+	Fără semnificație	$\geq 10^5$ UFC/ml	Infecție urinară	Da
		$< 10^5$ UFC/ml	Inflamație fără bacteriurie. Sub tratament cu antibiotic. Microorganisme cu creștere lentă sau pretențioase nutritiv. Etiologie non-infecțioasă.	Nu
-	Fără semnificație	$\geq 10^3$ UFC/ml	Colonizare	Nu
		$< 10^3$ UFC/ml	Nu este infecție urinară sau colonizare	NA

Tabelul 5 – Interpretarea pentru urina recoltată prin cateter ureteral, pielostomă, ureterostomă, cistoscopie sau aspirație suprapubiană.

Tehnica de recoltare	Simptome	Leucociturie (> 10 ⁴ /ml)	Bacteriurie (UFC/ml)	Număr specii bacteriene	Efectuarea antibiogramei
Cateter uretral intermitent	+ sau -	+ sau -	< 10 ²	1 sau 2	Nu
Cistoscopie, ureterostomă, pielostomă			≥ 10 ²		Da
Aspirație suprapubiană	+ sau -	+ sau -	≥ 10	1 (sau 2)	Da

Nivelul de identificare al izolatelor urinare

Tabelul 6. Nivelul de identificare al izolatelor urinare

Anaerobi	“anaerobi”
Streptococi beta-hemolitici	Grup Lancefield
Enterobacterales	Nivel de specie
Enterococi	Nivel de specie
<i>Pseudomonas</i>	Nivel de specie “aeruginosa”, “non-aeruginosa”
Stafilococi coagulazo-negativi	“coagulazo-negativ” <i>Staphylococcus saprophyticus</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	Nivel de specie
<i>Salmonella</i> Typhi / Paratyphi (screening pentru febră tifoidă)	Nivel de specie (atenție manipularea culturilor se face în hota de siguranță nivel 3)
Fungi	Nivel de specie

Testarea sensibilității la antimicrobiene

Se testează sensibilitatea izolatelor semnificative conform ghidului EUCAST.

VI. Raportarea rezultatelor

Examenul microscopic

Se raportează numărul sau tipul de leucocite și hematii pe ml.

Se raportează prezența bacteriilor, celulelor epiteliale, cilindrilor, drojdiilor și *Trichomonas vaginalis*.

Se raportează suplimentar, la solicitare, eritrocitele dismorfice.

Toate rezultatele trebuie să fie comunicate clinicianului solicitant de îndată ce sunt disponibile. Rezultatele urgente trebuie să fie transmise telefonic sau electronic în conformitate cu politicile locale.

Cultura

Se raportează creșterea bacteriană în unități formatoare de colonii (UFC).

Se includ comentarii acolo unde este cazul.

Se raportează absența creșterii cu precizarea pragului de detecție.

Se raportează creșterea fără semnificație.

Se raportează rezultatele investigațiilor suplimentare.

Eliberarea rezultatelor

Rezultatele intermediare sau preliminare trebuie emise imediat, dacă au semnificație pentru decizia terapeutică.

Rezultatele urgente trebuie să fie transmise telefonic sau electronic.

Rapoartele finale scrise trebuie să urmeze rezultatelor preliminare și verbale și se transmit cât mai curând posibil.

VII. Bibliografie

Bonkat G, Bartoletti R, Bruyer F et al: European Association of Urology guidelines on urological infections. 2021.

Buiuc D: Diagnosticul de laborator al infecțiilor tractusului urinar. In Buiuc D, Neguț M: Tratat de microbiologie clinică. Ediția a III-a, Editura Medicală, 2017:255-277.

Cavallo JD, Tenke P: Urinary tract infections. In European Manual of Clinical Microbiology, editors Cornaglia G, Courcol R, Herrmann JL, Kahlmeter G, Publisher SFM, 2012:153-133-143.

Public Health England. (2019). Investigation of urine. UK Standards for Microbiology Investigations. B 41 Issue 8.7.

Diagnosticul microbiologic al infecțiilor intraabdominale

I. Introducere

Infecțiile intraabdominale reprezintă o patologie frecventă asociată cu o rată de mortalitate importantă care necesită stabilirea diagnosticului fără întârziere, intervenții prompte pentru controlul sursei și antibioterapie adecvată.

Infecțiile intraabdominale cuprind diverse tipuri de infecții întâlnite în practica clinică și pot fi clasificate după mai multe criterii: comunitare sau asociate asistenței medicale, complicate sau necomplicate.

Infecțiile necomplicate se referă la acelea care implică un singur organ și nu se extind la peritoneu. Cele complicate se extind la mai multe organe și în cavitatea peritoneală.

În cazul infecțiilor comunitare pacientul se prezintă cu simptomatologia caracteristică sau aceasta se dezvoltă în primele 48 de ore de la internare și nu sunt prezente criteriile unei infecții asociate asistenței medicale.

Microorganismele implicate în infecțiile intraabdominale sunt variate, depinzând de sursa infecției și de eventualele contacte ale pacientului cu mediul de spital.

Infecțiile comunitare sunt de obicei mixte, cu participarea mai multor germeni enterici, cu predominanța tulpinilor de *Escherichia coli*, urmat de alți germeni din ordinul *Enterobacterales* (de ex. *Klebsiella pneumoniae*) sau bacili Gram-negativi nefermentativi (*Pseudomonas aeruginosa*). Streptococii din grupul *anginosus* se întâlnesc de asemenea frecvent. Mai puțin obișnuită în infecțiile comunitare este prezența enterococilor. Dintre bacteriile strict anaerobe predomină grupul *Bacteroides fragilis*. Spectrul etiologic al acestor infecții nu s-a schimbat semnificativ în ultimii ani, însă se observă o creștere a procentului tulpinilor de enterobacterii producătoare de β -lactamaze cu spectru extins.

În cazul infecțiilor asociate asistenței medicale există o varietate mai mare a speciilor bacteriene implicate. Enterobacteriile predomină și la aceste infecții, însă ponderea tulpinilor de *E. coli* este mai redusă, crește incidența altor specii de enterobacterii (de ex. *Enterobacter* spp, *Serratia* spp) și a *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. Streptococii de grup *viridans* se izolează mai rar, în schimb crește ponderea enterococilor. Deși întâlniți rar, pot fi de asemenea izolați stafilococii coagulazo-negativi sau *Staphylococcus aureus*. Speciile de *Candida* pot fi implicate mai ales la pacienții tratați în antecedente cu antibiotice cu spectru larg.

Germenii implicați în infecțiile asociate asistenței medicale de multe ori sunt cu rezistență multiplă față de antibiotice, în special în cazul pacienților care au beneficiat de multiple terapii antibiotice în antecedente.

Infecțiile comunitare la pacienții cu risc scăzut pentru eșec terapeutic sau deces se tratează empiric cu succes în majoritatea cazurilor, de aceea examenul microbiologic nu este recomandat de rutină. La aceste infecții eventualul eșec terapeutic se datorează implicării unei enterobacterii producătoare de ESBL. Documentarea creșterii incidenței acestor izolate în acest context clinic ar fi un argument pentru stabilirea indicației efectuării examenului microbiologic de rutină. Unde există resurse suficiente, se recomandă efectuarea examenului microbiologic în scop epidemiologic, pentru evaluarea circulației enterobacteriilor cu fenotip rezistent în infecții comunitare la pacienții cu risc scăzut într-o zonă geografică dată.

Examenul microbiologic este recomandat de rutină în cazul infecțiilor intraabdominale comunitare la pacienții cu risc crescut, respectiv la cele asociate asistenței medicale. Deoarece probabilitatea implicării unui germen rezistent este mai mare în cazul acestor infecții, tratamentul antibiotic cu spectru larg inițiat empiric va putea fi ajustat conform rezultatului examenului microbiologic.

II. Recoltarea și transportul probelor

Sunt valoroase pentru examenul microbiologic probele de lichid peritoneal/bilă/puroi aspirate, o cantitate de minim 1 ml. Acestea se transferă într-un recipient steril cu închidere etanșă și se transportă cât mai repede la laborator (în maxim 2 ore) în vederea păstrării viabilității germenilor strict anaerobi.

Probele recoltate pe tampon trebuie evitate deoarece au calitate inferioară probelor aspirate.

Nu sunt acceptabile probele de puroi recoltate prin tub de dren deschis sau capătul de tub de dren. Sunt acceptabile probele de puroi recoltate prin aspirare dintr-un sistem de drenaj închis.

III. Prelucrarea microbiologică

Examenul microscopic

Dacă lichidul peritoneal este limpede, se centrifughează și frotiul se efectuează din sediment. Din probele purulente și din bilă se efectuează un frotiu direct subțire din proba necentrifugată.

Frotiul se colorează Gram. Se urmărește prezența leucocitelor și a bacteriilor.

În cazul bilei se urmărește și prezența paraziților.

Cultivare

Se depun 2-3 picături de produs (din puroi, bilă sau sedimentul lichidului centrifugat) și se diseminează cu ansa. Se însămânțează o probă pe placă în cazul probelor de puroi, cel mult două probe pe placă în cazul sedimentului lichidului centrifugat.

Testarea sensibilității față de antibiotice

Se efectuează conform standardului EUCAST în vigoare.

Tabelul 1. Prelucrarea probelor în infecții intraabdominale

Produs prelucrat, situații particular	Medii cultură standard	Condiții de incubare			Citirea culturii	Microorganisme țintă
		Temperatură °C	Atmosferă	Timp h		
Puroi/lichid peritoneal/bilă recoltate intraoperator sau prin puncție-aspirare	Agar sânge + CLED/ MacConkey	35-37	5% CO ₂	48	Zilnic	Orice microorganism Strict anaerobe
		35-37	Aerobă	48	Zilnic	
	+ Agar pentru anaerobi	35-37	Anaerobă	40-48	≥40	
	Bulion tioglicolat Dacă mediul devine turbid se fac treceri pe medii solide (agar sânge, agar pentru anaerobi)	35-37 35-37	Aerob Aerob/ Anaerob	5 zile 40-48	NA >40	Orice germeni
Pentru următoarele situații se adaugă:						
Prezența levurilor în frotiu	Agar Sabouraud cu cloramfenicol	28-30	Aerobă	14 z	Zilnic	Fungi
Bilă - depistare portaj/infecție <i>Salmonella</i>	Bulion selenit Subculturi pe mediul SS sau XLD	35-37 35-37	Aerobă Aerobă	16-24 16-24	NA >16	<i>Salmonella</i>

IV. Raportarea rezultatelor

Examenul microscopic:

Se descrie prezența leucocitelor și bacteriilor vizualizate. Rezultatul examenului microscopic se introduce în fișa electronică și se validează imediat ce este disponibil.

Rezultatul cultivării:

Se va menționa:

- Microorganismul semnificativ + cuantificare
- Alte creșteri
- Absența creșterii

Eliberarea rezultatelor

Se eliberează rezultate parțiale în cazul în care se izolează germeni semnificativi. Rezultatele urgente se comunică și telefonic. Raportul final se eliberează când se finalizează toate testările .

V. Bibliografie

Mazuski JE, Tessier JM, May AK et al: The Surgical Infection Society revised guidelines on the management of intraabdominal infections

Public Health England. (2018). Investigation of bile. UK Standards for Microbiology Investigations. B 15 Issue 7.

Diagnosticul microbiologic al infecțiilor osteoarticulare

I. Introducere

Acest ghid descrie investigarea microbiologică a infecțiilor osului și a țesuturilor moi asociate cu osteomielită, a biopsiilor și aspiratelor recoltate pentru investigarea infecțiilor articulare protetice.

Infecțiile osteo-articulare reprezintă o problemă importantă care necesită abordare multidisciplinară ce include chirurg ortoped, medic infecționist și microbiolog.

Infecțiile osului sunt definite ca fiind acute și cronice. Managementul celor două tipuri de infecții diferă. În mod similar este diferită și abordarea infecțiilor cu sau fără dispozitiv ortopedic (proteză, implant, material de osteosinteză).

Osteomielita este o infecție progresivă care are ca rezultat inflamația oaselor și provoacă distrugerea oaselor, necroză și deformare. La copii localizarea cea mai frecventă a infecției este la epifizele în creștere ale oaselor lungi, în timp ce la adulți este coloana vertebrală.

Factorii de risc pentru osteomielita la adult (hematogenă) includ anemia falciformă, deficiențe imune și consum de droguri intravenoase.

Microorganismele izolate cel mai frecvent din infecțiile acute sunt:

- *Staphylococcus aureus*
- streptococi beta-hemolitici (grup A, C, G)
- streptococi grup B
- *Haemophilus influenzae*,
- *Escherichia coli*, *Salmonella*, alți bacili Gram-negativi din ordinul *Enterobacterales*, *Kingella kingae*. Bacili Gram-negativi au o importanță clinică majoră datorită fenomenului de rezistență microbiană.
- micobacterii
- fungi.

În infecțiile cronice diagnosticul microbiologic este mai dificil din următoarele motive:

- poate fi implicată orice specie bacteriană care aparține florei comensale tegumentare (stafilococi coagulazo-negativi, *Cutibacterium acnes*)
- prezența biofilmului – polizaharidul secretat de bacterie favorizează aderența bacteriilor la dispozitivul ortopedic
- prezența așa numitelor ”variante cu colonii mici”
- posibile infecții cu fungi sau micobacterii
- distribuția neomogenă a bacteriilor la locul infecției – necesită recoltare din mai multe puncte cu țesut afectat.

Diagnosticul infecțiilor protetice este complex și include criteriile clinice, biologice, microbiologice, histopatologice și imagistice.

Infecțiile întârziate sau de grad scăzut sunt cel mai dificil de diagnosticat, în același timp întârzierea intervenției prin tratament antibiotic corect și abordarea chirurgicală influențează șansa salvării protezei și a funcțiilor articulației.

Tabelul 1. Clasificarea și caracteristicile infecțiilor protetice

Clasificarea infecțiilor protetice	Caracteristici
<i>În funcție de patogeneză</i>	
Perioperatorii	Inocularea microorganismului în plagă chirurgicală în timpul operației sau imediat după
Hematogene	Prin sânge sau limfă de la un focar distal
Prin contiguitate	Transmisă prin traumatism penetrant sau focar adiacent de infecție (ex osteomielite preexistentă, leziuni ale pielii și țesuturilor moi)
<i>În funcție de apariția simptomelor după implantare</i>	
Precoce (< 3 luni)	Dobândită în timpul actului operator sau în următoarele 2-4 zile – de obicei cu organisme înalt virulente: <i>Staphylococcus aureus</i> , bacili Gram-negativi
Întârziată sau grad scăzut (3-24 luni)	Dobândită în timpul intervenției dar cu organisme cu virulență scăzută: stafilococi coagulazo-negativi, <i>Cutibacterium acnes</i>
Tardivă (> 24 luni)	Predominant prin însămânțare hematogenă de la un focar la distanță

Osteomielite acută prin inoculare directă sau de vecinătate - microorganismele pot fi inoculate în momentul traumatismului sau în timpul procedurilor intraoperatorii sau perioperatorii. Alternativ, ele se pot extinde de la un focar adiacent din țesutul moale. Factorii predispozanți sunt reprezentați de: reducerea chirurgicală și fixarea fracturilor, dispozitivele protetice, fracturi deschise și infecții cronice ale țesuturilor moi.

Osteomielite cu focar în vecinătate fără insuficiență vasculară

Plăgi localizate ale piciorului prin intermediul încălțămintei, cum ar fi pantofii de antrenament, se asociază în mod particular cu osteomielite cu *Pseudomonas aeruginosa*.

Osteomielite în urma mușcăturilor umane și a infecțiilor mușchilor masticatori care interesează mandibula este cauzată de anaerobi stricți, de exemplu specii *Actinomyces*.

La copii infecțiile osoase și articulare cu germeni anaerobi sunt rare.

Osteomielite cu focar în vecinătate cu insuficiență vasculară

Majoritatea pacienților cu osteomielite focalizată contiguă asociată cu insuficiența vasculară au diabet zaharat. Cel mai adesea sunt afectate oasele și articulațiile picioarelor.

Infecțiile acute la pacienții care nu au primit recent antimicrobiene sunt de obicei monomicrobiene (cel mai frecvent cu coci Gram-pozitivi aerobi precum *S. aureus* și streptococi β-hemolitici), în timp ce infecțiile cronice sunt adesea polimicrobiene cu cca 3-5 izolate, incluzând aerobii Gram-pozitivi și Gram-negativi (enterococi, bacili Gram-negativi din ordinul *Enterobacterales*, *Pseudomonas aeruginosa* și alți bacili Gram-negativi nefermentativi) și anaerobi.

Spitalizarea, procedurile chirurgicale și, în special, antibioterapia prelungită sau cu spectru larg poate predispuce la colonizare și/sau infecție cu organisme rezistente la antibiotice (de exemplu *Staphylococcus aureus* rezistent la meticilină (MRSA) sau enterococi rezistenți la vancomicină (VRE). Deficiența de apărare în țesutul moale sau în jurul osului necrotic poate

permite colonizarea cu microorganisme cu virulență scăzută, cum ar fi stafilococi coagulazo-negativi și specii de *Corynebacterium* („difterimorfi”).

La gazda imunocompromisă sau diabetică, ar trebui luate în considerare și speciile de *Nocardia* ca o cauză rară de osteomielită.

Osteomielita acută hematogenă

Osteomielita hematogenă a fost descrisă în mod clasic în copilărie, dar poate apare la orice grup de vârstă, mai ales atunci când există factori de risc, cum ar fi un dispozitiv intravascular recent, hemodializă, consum de droguri intravenoase sau infecții recurente cu alte localizări (cum ar fi infecții ale tractului urinar). La adulți cel mai des afectate sunt vertebrele, dar pot fi de asemenea afectate și oasele lungi, pelvisul sau clavicula.

Microorganismul cel mai des izolat este *S. aureus*; mai pot fi izolați streptococi β -hemolitici și microorganisme din grupul HACEK.

Speciile bacteriene izolate în osteomielita hematogenă variază în funcție de vârsta pacientului. La nou-născuți cel mai frecvent implicați sunt streptococii beta-hemolitici din grupul B, *S. aureus* și *Escherichia coli*. În intervalul de vârstă între unu și șaisprezece ani predomină *S. aureus* și *Haemophilus influenzae* tip b (deși acesta din urmă este rar după vârsta de cinci ani și din ce în ce mai rar la copii sub cinci ani din cauza vaccinării). *Streptococcus pneumoniae* este implicat ocazional. La adulți *S. aureus* este cel mai comun microorganism, iar la vârstnici bacilii aerobi Gram-negativi.

Speciile de *Candida* pot fi izolate la pacienți cu dispozitive intravenoase.

În osteomielita acută hematogenă este izolat de obicei un singur microorganism patogen, dar în osteomielita cronică, în special atunci când este asociată cu răni și ulcerații, etiologia poate fi polimicrobiană.

Speciile de *Salmonella* cauzează rar osteomielită la pacienții imunocompetenți; de obicei infecțiile cu specii de *Salmonella* (frecvent serotipuri non-typhi) sunt asociate cu anemie falciformă, alte hemoglobinopatii sau la pacienți imunocompromiși. *Salmonella* afectează obișnuit diafiza oaselor lungi (de obicei femurul sau humerusul) și vertebrele.

Spondilodiscita

Termenul de spondilodiscită se referă la osteomielită cu evoluție verticală, discită și spondilită.

Acestea sunt manifestări ale osteomielitei hematogene, care pot rezulta în cadrul aceluiași proces patologic și pot apărea în același timp. Spondilodiscita este responsabilă pentru 3-5% din toate cazurile de osteomielită și este principala cauză a osteomielitei la pacienții cu vârsta peste 50 de ani.

Organisme care determină infecții ale vertebrelor sunt: *S. aureus*, streptococii și bacili aerobi Gram-negativi (asociați cu infecții ale tractului urinar).

Pacienții dializați

La acești pacienți pot apărea infecții hematogene ca urmare a utilizării dispozitivelor de acces intravascular. De obicei sunt implicați: *S. aureus* sau stafilococi coagulazo-negativi. Infecțiile cu bacterii Gram-negative sunt mai frecvente la pacienții cu hemodializă decât la populația generală.

Consumatorii de droguri intravenoase

Artrita septică și osteomielita oaselor lungi sau a discurilor vertebrale sunt asociate cu infecție hematogenă la consumatorii de droguri intravenoase. Microorganismele cel mai frecvent izolate sunt *S. aureus*, *P. aeruginosa* și speciile de *Candida*.

Osteomielite cronică

Pacienții prezintă de obicei dureri cronice, secreții și pot avea antecedente de osteomielite în același loc. Tratamentul infecției poate fi dificil deoarece țesutul și osul din jur sunt afectate ; tratamentul singur cu antibiotice de obicei nu este suficient pentru a rezolva infecția. Factorii de risc includ fracturi deschise, bacteriemie și ulcere ischemice asociate cu diabetul zaharat, anemia falciformă și malnutriția.

Microorganismele frecvent implicate în etiologia osteomielitei cronice includ *S. aureus*, bacili Gram-negativi și bacterii anaerobe.

Osteomielite asociată cu dispozitive ortopedice

În infecțiile cronice legate de implant ortopedic, organismele pot fi prezente într-un biofilm asociat cu dispozitivul sau osul bolnav/necrotic.

Organismele pot fi introduse în articulație fie în timpul intervenției chirurgicale de implantare primară, fie pe cale hematogenă sau de la contaminarea postoperatorie a plăgii.

Acestea pot provoca infecții acute sau cronice.

Staphylococcus aureus (sensibil sau rezistent la meticilină) determină cel mai frecvent infecții acute, iar în infecțiile cronice pot fi izolați fie *S. aureus*, fie stafilococi coagulazo-negativi. Se estimează că până la 30% din infecțiile cu *S. aureus* pot fi asociate cu artrita septică la cei cu proteze articulare pre-existente. Multe alte microorganisme pot fi implicate fie prin inoculare directă, fie pe cale hematogenă, inclusiv flora normală a tegumentelor, streptococi, coliformi, enterococi și mai rar anaerobi, micobacterii sau fungi.

Odată ce infecția începe să se dezvolte în jurul unei proteze articulare, microorganismele pot forma biofilm.

În diagnosticul microbiologic al infecției, prezența biofilmului îngreunează izolarea bacteriilor în cultură. Microorganismele pot rezista în cadrul biofilmului, ele sunt la adăpost de acțiunea antibioticelor, astfel încât infecția nu poate fi eradicată fără îndepărtarea protezei.

Osteomielite acută hematogenă poate duce la osteomielite cronică caracterizată de apariția zonelor moarte ale țesutului osos și sinusal în care antibioticele nu pătrund. Din acest motiv infecția nu răspunde la tratament și persistă perioade lungi de timp. De asemenea pot reapărea infecții după mulți ani după primul episod.

Abcesul lui Brodie

Abcesul lui Brodie este o afecțiune neobișnuită, este un abces cronic localizat al osului, cel mai frecvent în partea distală a tibiei. De obicei se datorează *S. aureus* și apare în general la pacienții cu vârsta sub 25 de ani. Debridarea chirurgicală și antibioterapia specifică orientată în funcție de antibiogramă sunt de obicei eficiente în rezolvarea infecției.

Osteomielite fungică

Osteomielite fungică este rară, cu toate acestea, unele ciuperci endemice pentru anumite zone pot fi asociate cu osteomielite: *Cryptococcus*, *Blastomyces* și *Sporothrix*. La pacienții imunocompromiși sau la cei cu intervenții chirurgicale multiple în antecedente speciile de *Candida* sau de *Aspergillus* pot provoca, de asemenea, osteomielite.

II. Recoltarea și transportul probelor

Tipurile de probe

Este important să fie obținute informații clinice detaliate precum prezența unei proteze sau a unui dispozitiv (în cazul în care orice organism poate fi patogen, de exemplu un stafilococ coagulazo-negativ). De asemenea, sunt necesare informații despre suspiciune sau factori de risc pentru tuberculoză, brucelă, nocardie, micobacterii atipice sau ciuperci.

1. Biopsii osoase percutanate obținute sub ghidaj imagistic – atunci când nu se poate face puncție – aspirație în lipsa unei colecții lichidiene sau în cazul infecțiilor vertebrale.

2. Biopsii osoase intraoperatorii – sunt recoltate fie ca o procedură de diagnostic, fie ca prima parte a unei proceduri mai mari de debridare / rezecție. Probele multiple (minim 5) trebuie luate din locuri diferite folosind instrumente sterile separate (schimbate) pentru fiecare probă recoltată. În plus față de probele de os, se prelevează în același timp probe de țesut moale.

3. Lichid de puncție articulară - se recoltează aseptice, ideal sub control radiologic sau intraoperator. Ideală este recoltarea în tub heparinat sau citratat pentru a preveni coagularea probei și a permite efectuarea unei examinări citologice de calitate.

În infecțiile acute este utilă efectuarea unei colorații Gram din produsul biologic, deși un rezultat negativ nu ar trebui să excludă diagnosticul de infecție bacteriană. În infecțiile cronice sensibilitatea examinării frotiului Gram este <10%, dar specificitatea este mare.

În toate situațiile în care la un pacient cu proteză se detectează valori anormale de PCR și VSH, este utilă citologia lichidului sinovial cu determinarea numărului de leucocite și a procentului de neutrofile.

4. Implanturi ortopedice – se trimit piesele prelevate intraoperator, la laborator produsul de însămânțat se obține prin sonicare. Probele destinate sonicării se însoțesc de probe bioptice periprotetice.

5. Biopsie periprotetică - se recoltează în infecția cronică a protezei, intraoperator. Se recoltează minim 5 probe, din diferite locuri, în special din zonele cu aspect modificat. Pentru fiecare probă se schimbă instrumentul de recoltare pentru a preveni contaminarea de la o probă la alta. Se numerotează probele și se descrie pentru fiecare locul de prelevare.

6. Proteze, dispozitive de fixare – se trimit piesele, la laborator produsul de însămânțat se obține prin sonicare. Probele destinate sonicării se însoțesc de probe bioptice periprotetice.

7. Hemocultura

Criteriile diagnostice ale unei infecții periprotetice sau perifractură includ izolarea aceleiași bacterii din cel puțin 2 fragmente bioptice și lichidul obținut prin sonicare (în situația în care există acest tip de produs).

Tabelul 2. Citologia lichidului sinovial

Elemente celulare	Articulație nativă		Articulație protezată
	Valori normale	Artrită septică	Infecția protezei
Leucocite / μ l	< 200	>20 000	> 3000
Polimorfonucleare neutrofile	< 25%	>90%	> 70%

Recoltarea, transportul și depozitarea probelor

Reguli generale:

- Se folosește tehnică aseptică.
- Pentru a preveni rezultatele fals-negative se recomandă respectarea intervalului de minim 15 zile fără antibioterapie (cu excepția cazurilor de sepsis), 1 lună în caz de rifampicina sau ciclina
- Pentru a preveni rezultatele fals pozitive se recomandă respectarea strictă a regulilor de asepsie în momentul recoltării
- Tuburile de dren și lichidele de drenaj nu sunt recomandate pentru examinare datorită ratei mari de contaminare cu flora comensală
- În cazul infecției unui șurub fixator extern se recoltează cu o seringă din colecția de lângă șurub
- Microbiologul trebuie să încurajeze recoltarea a 2 seturi de hemocultură (4 flacoane) în caz de:
 - febră sau sepsis
 - artrită, osteomielită, spondilodiscită primitive
 - imediat postoperator, datorită bacteriemiei care se produce frecvent după intervenții chirurgicale (atenție la stabilirea semnificației în cazul izolării bacteriilor din flora tegumentară);

Recoltarea probelor

Timpul optim și metoda de recoltare

Atunci când este posibil probele vor fi recoltate înainte de a începe terapia antimicrobiană. Dacă este posibil, se opresc toate antibioticele cu cel puțin 2 săptămâni înainte de prelevare și se ia în considerare să nu se administreze antibiotice pentru profilaxie chirurgicală de rutină până după prelevare.

Probele recoltate intraoperator vor fi plasate într-un recipient steril etanș cu soluție Ringer sau soluție salină sterilă.

Probele recoltate pe tampon sunt de cantitate și calitate inferioară. Atunci când se recoltează cu tamponul, tamponanele pentru cultura bacteriană și fungică trebuie să fie plasate într-un mediu de transport adecvat (de ex. mediul Amies sau echivalent).

Cantitatea adecvată și numărul adecvat

Prelevarea de probe intra-operatorii în cazurile în care articulația este îndepărtată - trebuie recoltate probele de lichid, puroi, sinovială, țesut de granulare, membrană (țesutul care se formează la interfața os-ciment sau os-proteză) și orice zonă cu aspect anormal. Fiecare probă trebuie recoltată cu un set separat de instrumente și trebuie să fie plasată într-un recipient separat. Tamponanele nu sunt recomandate deoarece sunt de obicei contaminate cu floră cutanată.

Dimensiunea minimă a specimenului va depinde de numărul de investigații solicitate.

Numărul și frecvența probelor colectate depind de starea clinică a pacientului, în mod normal minimum 5 probe.

Probele trebuie etichetate corect: nume complet, data și ora, locul anatomic, informații clinice (istoric infecțios, antibioterapie, corticoterapie, protezare, etc)

Trebuie menționate pe cerere solicitările speciale pentru bacterii specifice – ex. micobacterii, fungi.

Condiții optime de transport și depozitare

Eșantioanele trebuie transportate și prelucrate cât mai curând posibil. Pentru a permite obținerea unui rezultat în timp util, probele trebuie prelucrate urgent.

Probele vor fi transportate la temperatura camerei și procesate în maxim 2h. Dacă se depășește acest interval se va utiliza mediu de transport pentru pretențioși nutritiv și anaerobi.

Dacă prelucrarea este întârziată, refrigerarea este preferabilă depozitării la temperatura ambiantă.

III. Examenul microbiologic

Pregătirea și prelucrarea probelor

Pre-tratament

Fragmentarea și omogenizarea probei favorizează extragerea bacteriilor aderente în biofilm și crește sensibilitatea detecției.

- a. Se examinează proba pentru prezența oricărui țesut moale. Se îndepărtează țesuturile moi folosind un bisturiu sau foarfece sterile și se omogenizează utilizând un bisturiu steril sau (de preferință) foarfeca sterilă și o placă Petri. Adăugarea unui volum mic (aproximativ 0,5 ml) de apa filtrată sterilă, soluție salină sau soluție Ringer vor ajuta procesul de omogenizare. După transferul într-un tub steril închis etanș, omogenizarea poate fi efectuată cu ajutorul unui vortex timp de 15 minute. Recipientul se deschide în hota de biosiguranță de nivel II.

Notă: Probele obținute chirurgical pentru cultura fungică trebuie tăiate (tăiate mărunț) mai degrabă decât omogenizate.

- b. Metoda de agitare prin vortexare sau centrifugare cu măregele de sticlă este relativ simplă și prezintă un risc scăzut de contaminare, este superioară omogenizării numai în bulion, în vederea recuperării sporilor de bacili de pe suprafețele polimerice.
- c. Fragmente mici de țesut pot fi strivite în dispozitive speciale (tissue grinder) sau mojarate.
- d. În cazul protezelor, dispozitivelor de fixare, implanturilor ortopedice îndepărtate, produsul de însămânțat se obține prin sonicare, pentru a detașa bacteriile prinse în structura biofilmelor. Imediat după prelevare (în sala de operație) probele trebuie plasate în recipiente sterile speciale destinate acestui scop.

Peste produs se adaugă soluție Ringer sau soluție de NaCl 0.9% sterilă în containerul de transport astfel încât implantul să fi acoperit în proporție de cel puțin 90%;

Dacă prelucrarea nu se poate începe imediat, trebuie păstrat până la momentul procesării, la temperatura camerei.

Procedura de sonicare

- Containerul trebuie agitat manual sau cu ajutorul aparatului vortex timp de 30 secunde;
- Containerul cu implantul de investigat se pune în baia de ultrasunete și se expune sonicării de intensitate 100% timp de 1 minut;
- Containerul trebuie agitat din nou manual sau cu ajutorul aparatului vortex timp de 30 secunde.

Se inoculează fiecare placă de agar și se depune pe o lamă pentru colorarea Gram câte o picătură de suspensie folosind o pipetă sterilă.

Pentru obținerea coloniilor individuale, se dispersează inoculul utilizând o ansă sterilă. Restul suspensiei și orice fragment de țesut rămas pot fi utilizate pentru a efectua culturi pe medii lichide.

În cazul lichidelor de sonicare se va efectua cultivare cantitativă.

Lichidul supus sonicării este inoculat pe următoarele medii de cultură:

- se însămânțează câte 100 μl pe plăci de geloză (geloză sânge, geloză ciocolată și opțional *Brucella* agar)
- 3-4 ml de lichid se însămânțează pe bulion tioglicolat

Numărul de UFC/placă se multiplică de 10 ori și se exprimă ca UFC/ml lichid sonicat;

Dacă se va efectua o analiză moleculară, atunci trebuie ca apa și recipientele să fie sterile, fără DNaze și fără RNaze (molecular biology grade). În cazul analizei moleculare volumul de probă necesar este de cca 2 ml.

Poate fi păstrat un eșantion de probă la -20°C pentru eventuale investigații suplimentare (micobacterii, fungi, tehnici de biologie moleculară).

Examenul microscopic

1. Frotiuri colorate Gram se efectuează din toate probele de puroi și pot fi efectuate din toate tipurile de eșantioane acolo unde este indicat clinic.

Folosind o pipetă sterilă, se pune o picătură de probă pe o lamă curată de microscop.

Se etalează picătura cu o ansă sterilă pentru a face un frotiu subțire pentru colorarea Gram.

2. Pentru numărătoarea diferențială a polimorfonuclearelor se utilizează colorația May-Grumwald-Giemsa sau altă colorație citologică.

Cultivare

Se inoculează fiecare placă de agar folosind o pipetă sterilă.

Pentru izolarea coloniilor individuale, dispersați inoculul cu o ansă sterilă.

Tabelul 3. Prelucrarea probelor în infecții osteoarticulare - medii de cultură și condiții de incubare

Detalii clinice	Tipul de probă	Medii de cultură	Condiții de incubare			Citirea culturilor	Microorganismele țintă
			Temperatura °C	Atmosfera	Timp		
Osteomielita Abcesul lui Brodie, Piciorul diabetic Osteomielită Discită Probe recoltate de la implanturi ortopedice	Os, Biopsie osoasă Țesut moale Aspirat Implanturi ortopedice: Aspirat articular protetic, biopsie periprotetică, probe intraoperatorii (chirurgie de debridare și retenție sau revizie), proteze, dispozitive de fixare	Agar cu sânge și Agar chocolate	35-37	5 - 10% CO ₂	40 - 48h Prelungit până la 5 zile*	zilnic	<i>Staphylococcus</i> spp. Streptococi Enterobacterales Pseudomonade grup HACEK <i>Nocardia</i> spp. (necesită incubare prelungită până la 3-5 zile)
		bulion tioglicolat (pentru anaerobi) sau infuzie cord-creier	35-37		5 zile	zilnic	<i>Staphylococcus</i> Streptococi <i>Enterobacterales</i> Pseudomonade Anaerobi
	Lichid articular	Flacon de hemocultură		aerob	5 zile		Toate speciile În particular pentru pretențioșii În special la copii (<i>Kingella kingae</i>)
Subculturi din mediile lichide de mai sus, în cazul în care se modifică	Din probele de mai sus	Agar pentru pretențioși anaerobi	35-37	anaerob	40 - 48h	≥40h	Anaerobi
		Agar chocolate	35-37	5 - 10% CO ₂	40 - 48h	zilnic	Toate tipurile

turbiditatea sau la finalul perioadei de incubare							
Infecție fungică profundă	Os, Biopsie osoasă Țesut moale Aspirat	Agar Sabouraud (pantă)	28-30	aerob	14 zile	Zilnic (Incubare până la 8 săptămâni pentru <i>Cryptococcus</i> sau <i>Histoplasma</i>)	Fungi
<i>Mycobacterium</i> spp. ! numai în caz de suspiciune clinică sau în caz de culturi negative pe mediile uzuale cu citologie sugestivă și în context clinic.	Toate tipurile	Loewenstein-Jensen	35-37°C	aerob	60 zile	săptămânală	<i>Mycobacterium</i> spp.

* pentru variantele cu colonii mici, în caz de lipsa creșterii

Variante cu colonii mici

În cazul culturilor pe agar în plăci, acestea trebuie examinate sub mărire pentru variantele de colonii de stafilococi ”cu colonii mici” care pot fi izolate din probe de țesut. Coloniile mici pot fi observate doar după prelungirea timpului de incubare. Aceste variante sunt dependente de timidină, nu cresc de obicei pe agar cu sânge și au aspect atipic asemănător hemofiliilor sau streptococilor de pe agar chocolate.

Chiar și în cazul culturilor pozitive la 24-28 ore, se continuă supravegherea culturilor până la 5 zile pentru a verifica prezența variantelor cu colonii mici, mai ales în cazul infecțiilor protetice.

Dimpotrivă, în cazul culturilor pozitive pe medii lichide, se oprește supravegherea culturilor în momentul pozitivării, pentru a preveni dezvoltarea altor specii microbiene contaminante.

Trebuie reținut faptul că în cazul rezultatelor negative la cultură și la examinarea microscopică nu poate fi eliminată posibilitatea unei infecții.

Teste moleculare

Testele moleculare pot furniza rapid informații privind agenți etiologici variați, complementare celorlalte rezultate.

Testarea sensibilității la antibiotice

Se efectuează conform standardului EUCAST în vigoare. Raportarea sensibilității se va face selectiv.

Este important să se includă o gamă largă de antibiotice care pot fi administrate pe o durată prelungită și care sunt active la nivelul biofilmului. Pentru organismele Gram-pozitive acestea pot include: CMI la teicoplanină, vancomicina plus antibiotice precum rifampicina, tetraciclinele, clindamicina, chinolonele, trimetoprim/sulfametoxazolul, acidul fusidic, linezolidul sau daptomicina.

IV. Raportarea rezultatelor

Examenul microscopic

Se raportează categoria microscopică a microorganismelor depistate. Are sensibilitate scăzută (6%) dar specificitate înaltă (99%) în diagnosticul infecțiilor cronice ale implanturilor ortopedice.

Pentru lichidul articular se raportează:

- numărul de leucocite/ μ L.
- se face numărătoare diferențială (se raportează leucocitele polimorfonucleare ca procent din totalul leucocitelor).

Toate rezultatele trebuie să fie comunicate clinicianului solicitant imediat ce sunt disponibile.

Rezultatele urgente trebuie să fie transmise telefonic sau electronic în conformitate cu protocoalele locale.

Cultura

Se raportează următoarele rezultate:

- microorganismele semnificative clinic
- altă creștere lipsită de semnificație clinică (floră de contaminare de origine tegumentară, etc.)
- absența creșterii

Din lichidul de sonicare se va raporta cantitativ prezența microorganismului (UFC/ml). Se consideră creștere semnificativă un număr de germeni de 50 UFC/ml. Rezultatele între 10-40 UFC/ml se interpretează în coroborare cu datele clinice.

Dacă doar culturile de pe bulion tioglicolat sunt pozitive, adică se observă creștere numai după îmbogățire, rezultatul nu este de obicei relevant (probabil contaminare în timpul extragerii, transportului sau procesării), cu excepția următoarelor situații:

- culturi pozitive pentru anaerobi
- pacienți sub antibioticoterapie

În aceste situații sunt necesare investigații suplimentare precum: culturi din țesut periprotetic, culturi din aspirat articular, examen histopatologic, date intra-operatorii, etc.

Rezultatele intermediare sau preliminare trebuie puse la dispoziția clinicianului imediat ce este detectată creșterea pentru izolatele semnificative clinic.

Rezultatele urgente trebuie să fie transmise telefonic sau electronic în conformitate cu protocoalele locale.

Rapoartele finale scrise sau generate de computer trebuie să urmeze cât mai curând posibil după rapoartele preliminare și verbale.

De asemenea, raportați rezultatele investigațiilor suplimentare.

Orice întârziere în transport trebuie menționată de către laborator în raportul final.

V. Bibliografie

Corvec S, Loiez C, Portillo ME et al: Bone and joint infections In European Manual of Clinical Microbiology, editors Cornaglia G, Courcol R, Hermann JL, Kahlmeter G, Publisher SFM, 2012:227-234.

Public Health England. (2016). Investigation of orthopaedic implant associated infections. UK Standards for Microbiology Investigations. B 44 Issue 2.

Signore A, Sconfienza LM, Borens O et al: Consensus document for the diagnosis of prosthetic joint infections: a joint paper by the EANM, EBJIS, and ESR (with ESCMID endorsement). Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2019, 46:971–988.

McNally M, Govaert G, Dudareva M et al: Definition and diagnosis of fracture-related infection. EFORT Open Rev 2020;5:614-619.

Diagnosticul microbiologic al infecțiilor gastrointestinale (cu excepția celor cauzate de *Clostridioides difficile*)

I. Introducere

Diareea se definește ca și eliminarea a cel puțin trei scaune de consistență moale, apoase, (neformate) pe zi. Consistența moale este un criteriu mai important decât frecvența scaunelor. Apariția sângelui în materiile fecale, asocierea tenesmelor sunt caracteristice dizenteriei.

Infecțiile gastrointestinale pot fi de origine bacteriană, virală sau parazitară. Dintre aceste etiologii cea mai frecventă este cea virală. Infecția cu Norovirus poate afecta persoane de orice vârstă, în schimb rotavirusul, declanșează diareea în special la copiii sub vârsta de 5 ani. Alte virusuri frecvent implicate în diaree sunt: astrovirusurile, adenovirusurile și coronavirusurile.

Bacteriile cel mai frecvent implicate în infecțiile gastrointestinale sunt *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. *Shigella* spp, *Yersinia* spp. În situații clinice particulare și în prezența unor date anamnestice sugestive pot fi suspicionate și alte etiologii, precum: *Aeromonas* spp., *Plesiomonas shigelloides*, *Vibrio cholerae* și alți vibrioni. Diareea asociată asistenței medicale cel mai adesea este determinată de *Clostridioides difficile*, însă la pacienții spitalizați cu tratamente antibiotice trebuie avută în vedere și posibilitatea declanșării diareei datorită efectelor secundare ale antibioticelor.

În cazul diareei persistente peste 14 zile trebuie efectuat un examen parazitologic și se recomandă căutarea unor cauze non-infecțioase.

Bolile infecțioase diareice sunt autolimitate și stabilirea etiologiei nu este întotdeauna importantă. Diagnosticul microbiologic se impune la pacienții cu risc crescut pentru infecții severe și în cazul investigării unor focare.

II. Indicațiile diagnosticului microbiologic

Examenul microbiologic este indicat în următoarele situații:

- Boală severă însoțită de febră înaltă și persistentă
- Prezența sângelui în materii fecale
- Scaune apoase frecvente
- Pacienți imunosupresați (HIV seropozitivi, neutropenici, etc)
- Pacienți cu vârstă extremă
- În cazul persoanelor care manipulează alimente în scopul consumului public
- Focare de gastroenterită
- Gastroenterite asociate asistenței medicale

În cazul pacienților spitalizați, se indică efectuarea coproculturii pentru evidențierea patogenilor comunitari doar dacă diareea apare în primele trei zile de la internare. După acest interval de timp coprocultura pentru germeni din genurile *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, *Campylobacter* este în marea majoritatea cazurilor nerelevantă, cu excepția focarelor de toxiinfecții alimentare. Se recomandă consultarea cu microbiologul în asemenea situații.

Cel mai adesea diareea ce debutează după trei zile de la internare este cauzată de *Clostridioides difficile*, în asemenea situații se recomandă orientarea diagnosticului către evidențierea acestei etiologii. (vezi Ghidul de diagnostic al infecțiilor cauzate de *C. difficile*).

Ce patogeni se urmăresc la pacientul diareic?

La pacientul diareic febril, care prezintă scaune cu sânge sau mucus însoțite de crampe abdominale intense sau care prezintă semnele unui sepsis se va efectua coprocultura pentru evidențierea obligatorie a următoarelor bacterii:

- *Campylobacter*
- *Salmonella*
- *Shigella*

La acestea se adaugă următoarele, în context clinic sugestiv:

- Diareea apasă a copiilor și a contactilor acestora: depistarea norovirusului, adenovirusului, rotavirusului
- Diareea copiilor sub 1 an: *Escherichia coli* enteropatogen (EPEC)
- Diaree cu sânge, sindrom hemolitic uremic, pseudoapendicită: *Escherichia coli* enterohemoragic (EHEC), *Yersinia enterocolitica*
- Diaree persistentă cu artralgi: *Yersinia enterocolitica* (însă artralgia apare adesea după remisia episodului diareic).
- La pacienții cu vârsta de peste 2 ani cu diaree post-antibioterapie sau diaree asociată asistenței medicale: *Clostridioides difficile*
- Reîntoarcerea din călătorii: *E. coli* enterotoxigenic (diareea călătorului), *Vibrio cholerae* (sindrom holeriform la o persoană care a călătorit în zonă endemică), febră enterală
- La pacienții cu SIDA se va extinde examenul microbiologic la evidențierea unor microorganisme ca *Cryptosporidium*, *Cyclospora*, *Mycobacterium avium* complex, ș.a.
- Toxiinfecții alimentare - în funcție de contextul clinic:
 - Incubație scurtă (1-4 ore), pacienți afebrili datorită enterotoxinelor produse de *Staphylococcus aureus* sau *Bacillus cereus*: se urmărește prezența bacteriilor și/sau a toxinelor în alimente;
 - Durată lungă de incubație (12-72 de ore): *Salmonella*, *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter* spp., *Clostridium perfringens*, EHEC
 - Simptomatologie neurologică caracteristică botulismului: se urmărește prezența toxinei de *Clostridium botulinum* în probele alimentare.
 - Toxiinfecțiile mai rar întâlnite asociate cu consumul de pește, fructe de mare: *Vibrio parahaemolyticus*, *Plesiomonas shigelloides*, *Aeromonas* spp.

Pe lângă coprocultură se va efectua hemocultura la toți sugarii diareici sub vârsta de 3 luni și la toți pacienții cu semne de sepsis sau când se suspectează febră enterală, la pacienții cu manifestări sistemice, imunosupresați.

Screening la persoane asimptomatice

Coproculturi efectuate la persoane asimptomatice pentru detectarea unor patogeni enterali cu impact asupra sănătății publice:

- În cazul persoanelor care lucrează în industria alimentară, catering, se urmărește detectarea următorilor patogeni: *Salmonella*, *Campylobacter*, *Shigella*.

III. Recoltarea și transportul probelor

Probele se recoltează înaintea începerii tratamentului antibiotic. De obicei o singură probă este suficientă pentru diagnostic, recoltarea în 3 zile succesive crește sensibilitatea diagnosticului bacteriologic. Pentru diagnosticul parazitologic bazat pe microscopie se recomandă recoltarea a 3 probe din două în două sau din trei în trei zile.

La recoltarea probei trebuie evitată amestecarea probelor de scaun cu urină.

Un eșantion de materii fecale (cantitate ce se colectează cu lingurița coprorecoltorului) de 1-2 g până la 10 g este suficient pentru prelucrare. Acesta se introduce în recipientul coprorecoltorului și se închide etanș. Dacă scaunul conține elemente patologice, se vor recolta din acestea. Pentru probele destinate examenului bacteriologic se folosesc medii de transport (de ex. Cary-Blair). Materiile fecale se amestecă în acest mediu (nu se pun deasupra mediului).

Probele recoltate pe tampon trebuie evitate, deoarece se obțin cantități reduse de materii fecale. Sunt acceptabile doar la sugarii și copii mici pentru investigarea sindromului hemolitic uremic post diareic și pentru diagnosticul infecției *C. difficile* la pacienții cu ocluzie intestinală.

Pentru diagnosticul oxiuriazii se recomandă efectuarea amprentei anale.

Probele trebuie să ajungă la laborator cât mai repede, însoțite de informațiile clinice relevante. Trebuie indicate data și ora recoltării probei.

IV. Prelucrarea produselor biologice

Posibilități diagnostice

- Diagnostic rapid: identificarea direct din probele biologice a unor
- Antigene virale, bacteriene sau parazitare - prin metode imunoenzimatic.
 - Factori de virulență (de ex. verotoxine) - prin metode imunoenzimatic
 - Elemente parazitare (ouă, chiști) - prin examen microscopic.
 - Gene specifice unui microorganism sau gene care codifică factori de virulență - prin teste moleculare tip PCR simplu sau multiplex
- Metode bazate pe cultivare - coprocultura.

Examinarea macroscopică a probei:

Se înregistrează consistența produsului și prezența elementelor patologice;

Scaunul trebuie să fie diareic, cu excepția probelor de screening a persoanelor care lucrează în industria alimentară, catering, bucătării din unități de profil. Dacă în cazul unui diagnostic de diaree se primește scaun format trebuie luată legătura cu medicul curant în vederea clarificării indicației examenului microbiologic.

Examenul microscopic

Examenul microscopic al materiilor fecale nu se recomandă.

Coprocitograma nu are sensibilitate și specificitate adecvată, astfel efectuarea acesteia nu se încurajează.

Cultivarea (coprocultura)

Se însămânțează o picătură sau o cantitate de cca 10 μl pe suprafața mediului solid. Aceasta se întinde pe suprafața unui cadran al mediului după care se diseminează cu ansa. Se însămânțează o singură probă pe placă. Acest lucru este important pentru obținerea coloniilor izolate. Alternativ se utilizează un inoculator.

Mediile de îmbogățire se însămânțează prin plasarea unei cantități aprox cât un bob de mazăre sau câteva picături.

Tabelul 1. Prelucrarea materiilor fecale - mediile de cultură folosite și condițiile de cultivare

Entități clinice	Medii de cultură standard	Condiții de incubare			Citirea culturii h	Microorganisme țintă
		Temperatură °C	Atmosferă	Timp h		
Diaree (în toate situațiile)	Agar selectiv pentru <i>Campylobacter</i>	39-42	Microaerofilă	≥48	≥40	<i>Campylobacter</i> spp.
	Agar înalt selectiv pentru enterobacterii (SS, XLD sau HE)	35-37	Aerobă	16- 24	≥16	<i>Salmonella</i> spp. <i>Shigella</i> spp.
	Bulion cu selenit, subculturi pe SS, XLD sau HE)	35-37	Aerobă	16- 24	≥16	<i>Salmonella</i> spp.
	Agar MacConkey cu sorbitol	35-37	Aerobă	16- 24	≥16	Screening pentru EHEC O157

În context clinic sugestiv adaugă următoarele:

Toxiinfecții alimentare (pe baza datelor clinice și în urma consultării cu microbiologul)	Agar cu sare și manitol	35-37	Aerobă	40- 48	16-24	<i>Staphylococcus aureus</i>
Suspiciune de holeră	Apă peptonată alcalină cu subculturi pe medii TCBS/BS A	35-37	Aerobă Aerobă	5-8 16- 24	- ≥16	<i>Vibrio cholerae</i> V. <i>parahaemolyticus</i>
Apendicită/ pseudoapendicită Limfadenită mezenterică Ileită Artrită reactivă	Agar CIN	35-37 (sau 28-30)	Aerobă	16- 24	≥24	<i>Yersinia enterocolitica</i> <i>Yersinia spp.</i>
<i>Clostridioides difficile</i> - vezi ghidul de diagnostic al infecțiilor cauzate de <i>C. difficile</i>						

Alte teste de considerat:

În cazul diareei cu sânge: determinarea prezenței verotoxinelor 1,2 prin metode imunoenzimatic, imunocromatografice

Persoane imunosupresate: specii de *Mycobacterium*

În caz de diaree persistentă (>14 zile) și suspiciune de infecție parazitară: examen coproparazitologic

Suspiciunea de botulism: determinarea prezenței toxinei botulinice

Teste rapide imunocromatografice pentru etiologii virale, bacteriene, parazitare

Teste moleculare multiplex (teste "sindromice") pentru determinarea etiologiei

CIN - mediu cu cefsulodin, irgasan și novobiocină

BSA - mediu cu săruri biliare

HE - Agar Hektoen Enteric

SS - Agar Salmonella-Shigella

TCBS - Mediu cu tiosulfat, citrat, săruri biliare, zaharoză

XLD - Agar xiloză, lizină, dezoxicolat

Tabelul 2. Nivelul minim de identificare a patogenilor enterali

Microorganism	Nivel de identificare
<i>Campylobacter</i>	Gen
EHEC	Specie + determinarea producerii de toxină +/- determinarea serogrupului
<i>Salmonella</i>	Specie
<i>Salmonella</i> Typhi/Paratyphi	Serovar (se trimit la laborator de referință pentru confirmare)
<i>Shigella</i>	Specie
<i>Staphylococcus aureus</i>	Specie
<i>Vibrio</i>	Specie (se trimit la laborator de referință pentru confirmare)
<i>Yersinia</i>	Specie

Teste moleculare

Testele moleculare au devenit indispensabile în diagnosticul unor infecții gastrointestinale. Având în vedere faptul că unii factori de virulență sunt transferabili plasmidic, caracterul de patogen enteral al unor tulpini de *Escherichia coli* poate fi demonstrat prin teste moleculare, determinarea structurii antigenice nu este acceptabilă pentru identificarea acestor patotipuri.

Sunt deosebit de utile testele multiplex care permit stabilirea etiologiei diareei dintr-o gamă extinsă de patogeni enterali (bacterii, virusuri, paraziți).

Testarea sensibilității față de antibiotice

Se testează sensibilitatea izolatelor bacteriene semnificative conform standardului EUCAST.

În cazul infecțiilor cauzate de EHEC nu se va comunica rezultatul antibiogrammei. Tratatamentul antibiotic în aceste infecții crește riscul declanșării sindromului hemolitic uremic.

În cazul izolatelor intestinale de *Salmonella* antibiograma se va comunica doar în cazul pacienților la risc pentru infecții severe (imunosupresie, vârste extreme, infecții diseminate).

V. Raportarea rezultatelor

Se comunică prezența sau absența patogenilor enterali urmăriți în cadrul examenului microbiologic.

VI. Bibliografie

Public Health England. (2014). Investigations of Faecal Specimens for Enteric Pathogens. UK Standards for Microbiology Investigations. B 30 Issue 8.1.

Shane AL, Mody RK, Crump JA et al: 20 17 Infectious Diseases Society of America Clinical Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of Infectious Diarrhea. Clin Infect Dis, 2017, 65:e45-65.

Diagnosticul microbiologic al infecțiilor cu *Helicobacter pylori*

Infecția cu *H. pylori* este cea mai frecventă infecție bacteriană cronică, se asociază cu ulcer peptic, gastrita cronică și este un factor de risc pentru adenocarcinomul gastric. Semnele și simptomele care însoțesc infecția sunt: , durere epigastrică, greață, vărsături , pirozis.

Principala indicație de testare este stabilirea etiologiei la pacienți adulți cu simptomatologie gastrică persistentă. Alte indicații posibile: pacienți cu limfom al țesutului limfoid asociat mucoasei gastrice, anterior inițierii unui tratament cronic cu AINS la pacienți cu risc crescut de ulcer, investigarea unei anemii feriprive de cauză neprecizată.

Diagnosticul infecției cu *H. pylori* se poate realiza prin mai multe metode, alegerea testului diagnostic depinde de contextul clinic, prevalența infecției, disponibilitatea echipamentelor și a personalului specializat, precum și de costuri. Metodele de diagnostic sunt invazive (bazate pe endoscopia gastrică) și non-invazive.

1. Metodele invazive sunt:

- Testul ureazei din proba de biopsie
- Examenul histologic
- Examenul microscopic bacteriologic
- Cultivarea
- PCR

Testul ureazei din fragmentele de biopsie este rapid, sensibil și cost-eficient. Se recomandă să fie lucrat împreună cu cultura sau examenul histologic. Testul poate fi efectuat în cabinetul de endoscopie. Creșterea numărului de fragmente (de la unul-două la patru) crește sensibilitatea testării. Există truse comerciale care au sensibilitate și specificitate mari.

Examenul microscopic din proba de țesut folosind colorația Giemsa sau Gram. Sensibilitatea este de cca 90% dacă sunt examinate 2 probe. Este o metodă rapidă dar necesită experiență din partea executantului.

Cultivarea este metoda cea mai specifică și oferă posibilitatea efectuării testării sensibilității la antibiotice. Necesită respectarea unor condiții de recoltare și transport (de exemplu fragmentele trebuie plasate în soluție salină izotonă sterilă înainte ca instrumentarul să fie contaminat cu formol). Rezultatul testării la antibiotice este important pentru a anticipa evoluția, pentru a evalua eficacitatea tratamentului și pentru a identifica reinfecțiile.

Examinarea histologică permite diagnosticarea infecției cu *H. pylori* și a leziunilor asociate, este la fel de sensibilă ca și cultura și are un grad mare de specificitate.

Nici cultura, nici examenul histologic nu dau rezultat rapid.

Testul PCR poate fi utilizat pentru detectarea *H. pylori* din diverse tipuri de probe dar rolul său în diagnosticul de rutină rămâne să fie evaluat. Există truse care au sensibilitate și specificitate bune și care pot detecta și mutații specifice de rezistență la claritromicină.

2. Metodele neinvazive cuprind:

a. Testul respirator cu uree (Urea Breath Test, UBT)

b. Detectarea antigenului fecal

c. Examenul serologic

Testul respirator cu uree și detectarea antigenului în fecale detectează infecția activă. Serologia nu diferențiază între o infecție activă și una în antecedente.

- a. Testul respirator cu uree marcată cu izotopi de C14 sau C13 este considerat testul neinvaziv “gold standard”. Testarea durează 15-20 minute. Utilizarea sa poate fi limitată datorită necesității unui echipament specific complex și a costurilor crescute. Recoltarea probei necesită timp și instruire. Testul permite evaluarea rapidă a eradicării infecției.
- b. Detectarea antigenului fecal este un test cu sensibilitate și specificitate bună pentru diagnosticul infecției cu *H. pylori* și are capacitatea de a confirma eradicarea infecției. Sensibilitatea este bună pentru testele imunoenzimaticice și moderată pentru cele imunocromatografice.
- c. Detectarea anticorpilor prin ELISA este un test de diagnostic indirect ieftin și accesibil. Există diverse tipuri de truse, bazate în principal pe detectarea anticorpilor de tip IgG. Există și kit-uri care detectează anticorpii de tip IgA. Există de asemenea diverse tipuri de teste de tip point-of-care din sânge integral. Proportia rezultatelor fals pozitive crește cu vârsta pacienților. Prevalența locală influențează valoarea predictivă a testării. Acest tip de test nu este indicat pentru a confirma eradicarea infecției datorită prezenței prelungite a anticorpilor în sânge, după vindecarea microbiologică.

I. Recoltarea probelor

Performanțele testelor de diagnostic direct (invazive și neinvazive) depind de prezența *H. pylori* în proba analizată, de aceea este important ca testarea să se realizeze la cel puțin patru săptămâni de la oprirea tratamentului cu antibiotice sau la una-două săptămâni de la întreruperea administrării de inhibitori de pompă de protoni.

Metode invazive - examene microbiologice

Se recoltează prin endoscopie probe de biopsie gastrică din zona antrumului sau din zona corpului gastric, în funcție de localizarea inflamației.

Mărimea și numărul probelor sunt la latitudinea specialistului care efectuează endoscopia și în funcție de extinderea inflamației.

II. Transportul și conservarea probelor

Probele trebuie transportate cât mai rapid la laborator (maxim 6 ore).

Este important ca în timpul transportului să fie menținută o atmosferă umedă. Proba de biopsie va fi plasată într-un recipient steril, de dimensiuni mici, care conține o cantitate mică (cca 100 ul) de ser fiziologic steril.

Notă: sensibilitatea examenului microscopic poate să scadă dacă biopsia este plasată în ser fiziologic deoarece mucusul se aglomerează în globuli care îngreunează efectuarea frotiului.

Dacă transportul probelor se întârzie peste 6 ore – proba de biopsie va fi acoperită cu cca 1 ml bulion infuzie cord-creier, într-un container steril. În acest fel poate fi păstrată la 4°C până la 48 ore.

Poate fi utilizat mediul de transport Dent.

Se poate utiliza mediul de transport Amies care asigură viabilitatea bacteriilor dar trebuie avut grijă deoarece există riscul de detașare a mucoasei de proba de biopsie.

Probele de biopsie pot fi păstrate până la 6 luni la -70°C în bulion cu glicerol 20-25%. Există însă riscul scăderii viabilității bacteriilor.

III. Prelucrarea probelor

Protocolul de diagnostic cu referire la tipurile de teste utilizate și ordinea în care sunt efectuate se elaborează de fiecare unitate medicală.

Testul ureazei

Pentru inocularea în bulion urează (dacă nu a fost efectuat în cabinetul de endoscopie) se zdrobește proba de biopsie de capătul tubului cu bulion. Tamponul ar trebui să fie lăsat în bulion până la finalul testului. Bulionul urează se incubează la temperatura camerei până la 24 ore. Se verifică din oră în oră în primele 6 ore dacă se produce virarea culorii care indică o reacție pozitivă.

Teste moleculare

Dacă este disponibil, testul de amplificare a acizilor nucleici (NAAT) se efectuează direct din proba biologică.

Examenul microscopic

- Se ia proba de biopsie cu un tampon și se aplică cu mișcări ferme pe lama de microscop curată. Dacă examenul microscopic se efectuează înaintea culturii, se vor utiliza lame de microscop sterile.

- Lamele vor fi colorate Gram sau Giemsa . Coloratia Gram cu utilizarea fucsinei diluate în timpul de recolorare crește sensibilitatea examinării.

- Colorarea și examinarea lamei este necesară numai dacă testul ureazei din proba de biopsie a fost pozitiv iar cultura negativă.

Cultivarea

Nu există un mediu ideal. Mediile suplimentate dar fără sânge nu sunt potrivite pentru obținerea culturii primare. Mediile de cultură pot fi suplimentate cu antibiotice pentru a inhiba creșterea contaminanților.

Cele mai bune rezultate se obțin prin utilizarea în paralel a unui mediu selectiv și a unui mediu neselectiv.

Se poate practica omogenizarea probei dar necesită timp și tuburi Griffiths sau o alternativă. Biopsiile pot fi tăiate fin cu bisturiu steril.

Cu același tampon (cu care s-a efectuat frotiul) se inoculează câte 1 placă cu agar selectiv pentru *H. pylori* și 1 placă cu agar-sânge. Pentru a obține colonii izolate se face dispersie cu ansa.

Se recomandă utilizarea mediilor selective, de ex. “*Helicobacter pylori* selective medium”, cu supliment antibiotic DENT (vancomicină, trimetoprim, cefsoludină și amfotericină B). Se pot utiliza și medii neselective, cum ar fi: BHI agar, Brucella Agar, Wilkins-Chalgren Agar, Trypticase Soy Agar, Agar Columbia cu 10% sânge defibrinat de cal, pentru obținerea culturii primare.

Incubarea se face în atmosferă umedă, microaerofilă (86% N₂, 4% O₂, 5% CO₂ și 5% H₂), în intervalul de temperatură 35-37°C, timp de 7-10 zile. Există kit-uri comerciale, sisteme generatoare de gaz sau incubatoare (cu butelii de gaz) în care se generează atmosferă microaerofilă (controlată, monitorizată).

După 48-72 de ore de incubare (prima citire) se pot vizualiza colonii mici, rotunde, tip “S”, gri, translucide.

Identificarea microorganismului izolat se bazează pe:

- test oxidază pozitiv
- test catalază pozitiv
- test rapid urează pozitiv
- aspectul de “pescăruș” la examenul microscopic din cultură
- kit-uri comerciale galerii API
- MALDI-TOF.

În cazul în care cultura nu este pozitivă până la ziua 10 de incubare și este raportată ca rezultat negativ, iar criteriile clinice și testele suplimentare (non-invazive) susțin diagnosticul de infecție cu *Helicobacter pylori*, este recomandat testul PCR specific de specie, din fragment de mucoasă gastrică (fragment deja recoltat și congelat sau o nouă biopsie de mucoasă gastrică).

Stocarea tulpinilor izolate se poate face în bulion Brucella cu 25% glicerol la -70°C și pe criobile.

IV. Testarea sensibilității la antibiotice

Efectuarea testării sensibilității la antibiotice a tulpinilor de *Helicobacter pylori* este importantă datorită creșterii ratei de eșec terapeutic față de prima linie de tratament empiric, la peste 30% în majoritatea țărilor europene. De asemenea, se recomandă testarea sensibilității la antibiotice când pacienții sunt refractari la a doua linie de tratament empiric.

Metoda disc-difuziei nu este recomandată pentru acest microorganism deoarece are creștere lentă și rezultatele pot fi influențate. Metoda recomandată este metoda gradient, conform instrucțiunilor producătorului.

Din cultura de 2-3 zile se face un inocul cu densitatea de 3 McFarland.

Cu ajutorul tamponului se inoculează plăcile cu agar Mueller-Hinton sau Wilkins-Chalgren cu 5-10% sânge de cal.

Se incubează la 35°C în condiții de microaerofilie pentru 3-5 zile.

Conform recomandărilor EUCAST, antibioticele testate sunt: amoxicilina, levofloxacina, claritromicina, tetraciclina, metronidazolul, rifampicina.

Se citește valoarea CMI la limita de inhibiție completă a creșterii, incluzând haloul sau coloniile izolate.

Pentru interpretarea rezultatelor se utilizează tabele EUCAST, versiunea actualizată.

Testarea sensibilității la claritromicină se recomandă a se efectua înainte administrării ei.

Metoda de testare a sensibilității la metronidazol nu este reproductibilă și relevanța clinică este limitată. Metoda de testare *in vitro* nu exprimă cu acuratețe activitatea reală *in vivo*, datorită activității diferite a metronidazolului, în condiții diferite de atmosferă de incubare (microaerofilie vs anaerobioză).

Rezistența față de amoxicilină și tetraciclina este redusă în Europa.

Creșterea consumului de fluoroquinolone a fost urmată de creșterea rezistenței izolatelor de *Helicobacter pylori* la levofloxacină.

Tehnicile PCR utilizate direct din fragmente de biopsie gastrică pentru detectarea mutațiilor care determină rezistența la claritromicină și levofloxacină pot fi alternative pentru înlocuirea cultivării și a testelor de sensibilitate.

V. Controlul calității

Tulpinile de control recomandate sunt:

- *H. pylori* ATCC 43504 / NCTC 11637
- *H. pylori* NCTC 12822 – tulpină sensibilă la metronidazol
- *H. pylori* NCTC 12823 – tulpină rezistentă la metronidazol.

VI. Teste de confirmare a eradicării infecției

Eradicarea poate fi confirmată prin testul respirator cu uree, prin detecția antigenului în fecale sau prin teste invazive. Testele de confirmare trebuie realizate la cel puțin patru săptămâni de la terminarea tratamentului antibiotic. Tratamentul cu inhibitori de pompă de protoni trebuie oprit pentru una-două săptămâni anterior testării, pentru a reduce riscul rezultatelor fals negative. Serologia nu trebuie folosită pentru confirmarea eradicării deoarece anticorpul pot persista după eradicare.

VII. Raportarea rezultatelor

Testul ureazei din biopsie

- se raportează pozitiv / negativ

Examenul microscopic

- se raportează prezența / absența “microorganismelor de tip *H. pylori*”

Cultura

- se raportează rezultatul pozitiv – “s-a izolat *H. pylori*”
- se raportează rezultatul negativ – “nu s-a izolat *H. pylori*”.

VIII. Bibliografie

1. Francis Me´graud, Norbert Lehn, Tore Lind, Ekkehard Bayerdo¨rffer, Colm O´morain, Robin Spiller, Peter Unge, Sander Veldhuyzen van Zanten, Michael Wrangstadh, and Carl Fredrik Burman. Antimicrobial Susceptibility Testing of Helicobacter pylori in a Large Multicenter Trial: the MACH 2 Study. *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY*, 0066-4804/99/\$04.0010, Nov. 1999, p. 2747–2752

2. "The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 13.0, 2023. <http://www.eucast.org>."

3. Martín Alonso Bayona Rojas, Bact., Esp., M. Sc.1. Microbiological conditions for culturing Helicobacter Pylori. *Rev Col Gastroenterol* / 28 (2) 2013

4. Francis Me´graud* and Philippe Lehours. Helicobacter pylori Detection and Antimicrobial Susceptibility Testing. *CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS*, Apr. 2007, p. 280–322 Vol. 20, No. 2 0893-8512/07/\$08.00_0 doi:10.1128/CMR.00033-06

5. JULIA FASHNER, MD, and ALFRED C. GITU, MD, Florida State University College of Medicine Family Medicine Residency, Lee Memorial Health System, Fort Myers, Florida. Diagnosis and Treatment of Peptic Ulcer Disease and H. pylori Infection. *Am Fam Physician*. 2015;91(4):236-242.

6. Sinéad M Smith, Colm O´Morain, Deirdre McNamara. Antimicrobial susceptibility testing for Helicobacter pylori in times of increasing antibiotic resistance. *World J Gastroenterol* 2014 August 7; 20(29): 9912-9921

7. Yao-Kuang Wang, Fu-Chen Kuo, Chung-Jung Liu, Meng-Chieh Wu, Hsiang-Yao Shih, Sophie SW Wang, Jeng-Yih Wu, Chao-Hung Kuo, Yao-Kang Huang, Deng-Chyang Wu. Diagnosis of Helicobacter pylori infection: Current options and developments. *World J Gastroenterol* 2015 October 28; 21(40): 11221-11235. ISSN 1007-9327 (print) ISSN 2219-2840 (online)

8. William D. Chey , MD, FACG1 , Grigorios I. Leontiadis , MD, PhD2 , Colin W. Howden , MD, FACG3 and Steven F. Moss , MD, FACG4; ACG Clinical Guideline: Treatment of Helicobacter pylori Infection. Am J Gastroenterol 2017; 112:212–238; doi: 10.1038/ajg.2016.563 ; published online 10 January 2017

9. Public Health England. (2015). Identification of Helicobacter species. UK Standards for Microbiology Investigations. ID 26 | Issue no: 3 | Issue date: 03.07.15.

10 World Gastroenterology Organisation Global Guidelines - Helicobacter pylori. May 2021 <https://www.worldgastroenterology.org/UserFiles/file/guidelines/helicobacter-pylori-english-2021.pdf>

11. Christophe Burucoa, Francis Megraud. Helicobacter pylori. European Manual of Clinical Microbiology 1st edition. pag. 283- 286. EMCM. 2012.

12. Marc Roger Couturier. 2019. *Helicobacter*. Pag. 1044- 1057. Manual of Clinical Microbiology, 12th Edition. Vol. 1.

Diagnosticul microbiologic al infecției determinate de *Clostridioides difficile*

I. Introducere

Specia *Clostridium difficile* a fost din 2016 reîncadrată taxonomic în genul *Clostridioides*. Diagnosticul infecției cu *Clostridioides difficile* (ICD) se bazează pe date clinice, epidemiologice și microbiologice.

II. Orientarea clinică

Orientarea clinică este esențială pentru inițierea rapidă a măsurilor de izolare și a terapiei adecvate.

Simptomatologie sugestivă pentru ICD și existența riscului de colonizare și a factorilor favorizanți pentru apariția ICD:

- Diaree asociată asistenței medicale fără alte cauze sau diaree post-antibiotică cu origine comunitară
- Mai ales la un pacient vârstnic
- Mai ales dacă pacientul a primit antibiotice, imunosupresoare sau antisecretorii gastrice
- Dacă nu aparține unui focar de boală diareică acută din comunitate.

Deoarece ICD poate să apară și la persoane fără factori de risc cunoscuți prezența unei simptomatologii sugestive pentru ICD trebuie să determine adoptarea măsurilor adecvate cu scop diagnostic, terapeutic și de control al infecției.

III. Diagnosticul etiologic

Diagnosticul etiologic aduce argumente în favoarea abordării inițiale și permite evaluarea intensității fenomenului epidemiologic

Indicații de testare

- Diaree care apare la pacienți după 48 de ore de la internare
- Diaree sau alte tablouri clinice sugestive la pacienți nespitalizați sau în primele 48 de ore ale spitalizării care au avut spitalizări recente sau tratament la domiciliu cu antibiotice, antisecretorii gastrice, imunosupresoare.
- Diaree de etiologie neprecizată

Nu este indicată testarea pentru evidențierea *C. difficile*

- La persoane asimptomatice (nu se testează scaune de consistență normală)
- La copiii sub 2 ani cu sindrom diareic (sugarii și copiii mici pot fi colonizați cu *C. difficile* toxigen fără a dezvolta ICD)

- Ca screening înainte de internare sau transfer.

IV. Recoltare și transport

- Cantități de 1-2 ml de scaun diareic sunt suficiente pentru diagnostic
- Doar la pacienții cu ileus se acceptă și probe recoltate pe tampon rectal.
Materiile fecale normale nu sunt acceptabile pentru prelucrare; acestea trebuie respinse cu un comentariu adecvat.
- Prelucrarea probei se va efectua în primele 2 ore de la recoltare
- Dacă proba nu se poate prelucra în maxim 2 ore se păstrează la 4°C (**toxina se degradează după 2 ore la temperatura camerei**), maxim 2 zile.
- Păstrarea probei pe o durată mai mare de timp este posibilă doar la -20°C.

V. Metode de diagnostic

Tipuri de teste

În practică se utilizează teste rapide, imunoenzimatică sau moleculare. Performanțele acestor teste se compară cu cele ale testelor de referință.

Teste uzuale

Detectarea glutamat dehidrogenazei (GDH)

Glutamat dehidrogenaza, o enzimă produsă atât de tulpinile toxigene cât și cele netoxigene de *C. difficile*, se poate detecta prin teste imunoenzimatică. Metoda are sensibilitate ridicată (pentru majoritatea truselor), însă specificitate redusă; de aceea poate fi utilizată drept test screening și necesită un test care să confirme prezența toxinelor.

Detectarea toxinelor A și B

Detectarea concomitentă a toxinelor A/B direct din materii fecale sau din supernatantul culturilor în bulion se poate realiza prin teste imunoenzimatică. Unele teste permit diferențierea între cele două toxine. Testele sunt de tip ELISA, ELFA, imunocromatografice și au performanțe variabile. Se recomandă folosirea testelor care au sensibilitate și specificitate bune. Există și truse care detectează GDH și toxine, dar performanțele acestora pot fi mai reduse comparativ cu cele ale truselor cu ținte distincte.

Detectarea genelor care codifică toxine

Detectarea genelor ce codifică toxinele *C. difficile* se realizează prin metode moleculare, în general bazate pe real-time PCR. Majoritatea testelor detectează gena *tcdB* care codifică toxina B. Există truse care detectează atât *tcdB* cât și genele pentru toxina binară (*cdtA* și *cdtB*) și deleția în nucleotidul 117 al genei represor *tcdC*, ținte care permit identificarea prezumtivă a *C. difficile* ribotip 027. Există de asemenea truse de tip multiplex care pot detecta simultan direct din probă

mai multe microorganisme implicate în sindroame diareice, inclusiv *C. difficile*. Testele moleculare au sensibilitate și specificitate mari și oferă un diagnostic rapid.

Limite: necesită infrastructura adecvată.

Teste de referință

Teste de neutralizare a citotoxicității

Testele de neutralizare a citotoxicității evidențiază prezența toxinei B în probă (toxina produsă *in vivo*) prin observarea efectului acesteia asupra unei culturi de celule și neutralizarea efectului cu ser antitoxină. Aceste teste au sensibilitatea cea mai ridicată și sunt utilizate în laboratoare de referință.

Limite: durata detectării din proba de scaun este de aproximativ 2 zile, necesită laborator cu dotări adecvate pentru culturi celulare și personal instruit în acest domeniu.

Cultivarea și demonstrarea toxigenzei (cultura toxigenă)

Constă în izolarea *C. difficile* și demonstrarea capacității de a produce toxine *in vitro*. Este de asemenea o metodă de referință, cu sensibilitate foarte bună dar cu durată de peste 2 zile.

Pentru a favoriza izolarea *C. difficile* anterior însămânțării probele se pregătesc prin:

- Tratament cu alcool (se omogenizează proba de scaun în raport de 1:1 cu alcool etilic absolut și se incubează 30 de minute la temperatura camerei)

SAU

- Încălzire la 80°C timp de 15 minute.

Incubarea se face 48-72 ore în anaerobioză. Medii de cultură adecvate:

- CCFA - Clostridium difficile agar,
- CDSA - Clostridium difficile selective agar,
- geloză-sânge Columbia cu supliment selectiv
- CMA – cefoxitin-mannitol agar-CLO agar, (incubare 48h)
- ChromID *C. difficile*, (incubare 24h), oferă un rezultat mai rapid, este mai sensibil, dar mai puțin specific.

Din coloniile suspecte se efectuează frotiuri colorate Gram, iar ulterior se continuă identificarea prin test de aglutinare sau MALDI-TOF. Tulpinile izolate se pot păstra în bulion tioglicolat sau prin congelare pentru analize ulterioare.

Notă: izolarea unei tulpini de *C. difficile* nu este suficientă pentru diagnosticul cert al ICD. Pentru a certifica diagnosticul, cultivarea trebuie întotdeauna combinată cu o metodă de detectare a toxigenzei.

Algoritm de diagnostic etiologic

Ghidurile actuale recomandă un diagnostic în 2 etape:

1. Efectuarea unui test de detecție rapidă cu sensibilitate mare (test imunoenzimatic pentru GDH sau test molecular):

- Rezultat negativ - diagnosticul de ICD este infirmat
- Rezultat pozitiv se trece la a doua etapă:

2. Efectuarea unui test de detecție rapidă cu specificitate mare (test imunoenzimatic pentru toxine):

- Rezultat pozitiv - se confirmă diagnosticul de ICD;

- Rezultat negativ – se evaluează clinic: posibil ICD sau portaj de *C. difficile* (toxigen).
În cazul în care primul test efectuat a fost unul imunoenzimatic pentru GDH și tox A/B:
- Rezultat negativ pentru ambele - diagnosticul de ICD este infirmat
- Rezultat pozitiv pentru ambele - diagnosticul de ICD este confirmat
- Rezultat pozitiv pentru GDH, dar negativ pentru toxine A/B - se poate trece la a doua etapă: test molecular sau cultură toxigenă. Dacă rezultatul este negativ diagnosticul de ICD este improbabil, dacă rezultatul este pozitiv se evaluează clinic.
- Rezultat negativ pentru GDH, dar pozitiv pentru toxine A/B – rezultat invalid. Este necesară retestarea.

În caz de probabilitate diagnostică mare în etapa pretestare (date clinice și factori de risc sugestivi) se acceptă un test PCR pozitiv pentru a confirma diagnosticul.

În cazul diagnosticării ICD se poate efectua cultură din proba de materii fecale, dar nu în scop diagnostic, ci pentru a avea disponibilă tulpina în scopul unor testări ulterioare (ex. ribotipare, testarea sensibilității la antibiotice), mai ales în cazul în care apar un nou focar epidemic sau modificări ale caracteristicilor clinico-evolutive ale cazurilor de ICD dintr-un anumit focar spitalicesc.

Retestare

- Nu se recomandă repetarea testării cu aceeași metodă dintr-o nouă probă de scaun la mai puțin de 7 zile de la un prim rezultat negativ, în situație *endemică*; repetarea testării după un prim test negativ poate fi utilă în cazul suspiciunii clinice și unui context *epidemic*.
- Nu se recomandă testarea pentru evaluarea eficienței bacteriologice a terapiei ICD (*C. difficile* poate persista în colon câteva luni după remisia simptomatologiei)

VI. Raportarea rezultatelor

Se menționează metoda/metodele utilizate.

Se interpretează și raportează conform algoritmului menționat la capitolul 3.2.

VII. Bibliografie

Crobach M J T, Planche T, Eckert C, Barbut F, Terveer E M, Dekkers O M, Wilcox M H, Kuijper E J - European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: update of the diagnostic guidance document for *Clostridium difficile* infection. Clin Microbiol Infect. 2016;22 S4:S63-81. doi: 10.1016/j.cmi.2016.03.010.

Lee HS., Plechot K, Gohil S, Le J – *C. difficile*: Diagnosis and the Consequence of Over Diagnosis. Infect Dis Ther. 2021; 10(2): 687–697. doi: 10.1007/s40121-021-00417-7

Popescu GA, Szekely E, Codiță I, Tălăpan D, Șerban R, Ruja G - Ghid de diagnostic, tratament și prevenire a infecțiilor determinate de *Clostridium difficile*, Ed a 2-a, București 2016. <https://cnscbt.ro/index.php/ghiduri-si-protocoale/ghiduri/520-ghid-diagnostic-tratament-si-prevenire-clostridium-difficile/file>

Diagnosticul microbiologic al infecțiilor genitale

I. Introducere

Acest ghid prezintă aspectele diagnostice ale infecțiilor genitale simptomatice și asimptomatice, cu și fără transmitere sexuală.

II. Infecții cu transmitere sexuală

Infecțiile cu transmitere sexuală (ITS) pot fi cauzate de o multitudine de microorganisme: bacterii, virusuri și paraziți. Infecțiile pot avea o perioadă asimptomatică prelungită, depistarea acestora fiind importantă pentru prevenirea complicațiilor tardive dar și pentru prevenirea transmiterii.

Astfel analizele pot fi efectuate în scop de screening la persoanele asimptomatice sau în scop diagnostic la persoanele simptomatice. Unul dintre punctele critice ale diagnosticului ITS este sensibilitatea metodei diagnostice alese.

- a. Se recomandă **screeningul tuturor ITS**:
 - dacă partenerul sexual a fost depistat cu o ITS
 - după activitate sexuală cu risc infecțios crescut (parteneri multipli, parteneri necunoscuți)
 - la încetarea utilizării prezervativului în cazul cuplurilor stabile
 - pentru investigarea infertilității
 - investigarea artritei reactive
 - consultații ginecologice la gravide sau pentru contracepție
 - la persoanele încarcerate
 - screening pentru *Chlamydia trachomatis* la tineri sub 25 de ani
 - în urma unor abuzuri sexuale.
- b. **Diagnosticul infecțiilor simptomatice** trebuie să aibă în vedere simptomatologia urogenitală, severitatea simptomelor și sensibilitatea metodelor de diagnostic. Acestea se manifestă sub următoarele forme: uretrită, epididimită, epididimo-orchită, proctită, cervicită și infecțiile tractului genital feminin superior, ulceratii genitale, faringită, conjunctivită. Întrucât coinfecțiile sunt frecvente, în cazul diagnosticării unei ITS este obligatorie investigarea tuturor etiologiilor posibile.

Cei mai frecvenți agenți etiologici ai ITS

Investigațiile trebuie să includă teste pentru *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* și eventual *Mycoplasma genitalium* și se recomandă efectuarea testelor pentru depistarea infecției cu HIV și a sifilisului.

Chlamydia trachomatis este endemică în Europa, fiind agentul etiologic cel mai frecvent implicat în ITS, cu o medie europeană de 185/100000 (luând în considerare datele țărilor care au sistem de supraveghere solid). Datele raportate din România arată o incidență foarte scăzută (0,1-0,3/100000), care probabil reflectă subdiagnosticarea acestei infecții. *C. trachomatis* cauzează uretrită, cervicită, proctită. Poate cauza boală inflamatorie pelviană, iar în caz de diseminare

peritoneală poate conduce la perihepatită. Se poate asocia cu artrita reactivă. Serotipurile L1-3 cauzează limfogranulomul venerian.

Perioada de incubație este în jur de 2 săptămâni, însă peste 50% a cazurilor rămân asimptomatice. Se descriu portaj faringian și rectal. Poate cauza infertilitate prin stricturi ale trompei uterine, sarcină extrauterină și dureri pelviene cronice. În cazul transmiterii verticale apare conjunctivita neonatală sau pneumonie.

Neisseria gonorrhoeae cauzează uretrită și/sau cervicită după o perioadă de incubație de 2-10 zile. În cazul a 10% dintre bărbați și până la 50% dintre femei infecția este asimptomatică. Pe termen lung, infecția poate cauza infertilitate, sarcină extrauterină, dureri pelviene cronice, stricturi uretrale. În cazul transmiterii verticale se dezvoltă conjunctivita neonatală.

Treponema pallidum cauzează o ITS care, netratată, are o evoluție cronică, în mai multe stadii: sifilisul primar caracterizat prin prezența șancrului dur se dezvoltă la 10-90 de zile după expunere, sifilisul secundar în 2-8 săptămâni de la apariția șancrului dur, după care urmează o perioadă de latență iar peste mai mulți ani se poate dezvolta sifilisul terțiar cu leziuni distructive, afectări cardiace, neurologice și osoase ireversibile.

Haemophilus ducreyi cauzează șancrul moale ce apare la 3-7 zile după expunere. Este o etiologie întâlnită în regiunile tropicale și mai rară în zona temperată.

Mycoplasma genitalium cauzează uretrite acute, cronice sau recurente la bărbați, cervicite, infecții pelvine subacute la femei. Infecția este frecvent asimptomatică (>30% la bărbați și >70% la femei).

Virusurile herpes simplex 1, 2 cauzează infecția primară la 7 zile de la expunere, urmată de ulcerații genitale recurente. Infecțiile asimptomatice sunt frecvente. În cazul transmiterii perinatale cauzează infecții herpetice neonatale de severitate variabilă.

HIV (virusul imunodeficienței umane) cauzează sindromul de imunodeficiență dobândită. Manifestări clinice pot fi prezente în primoinfecție sau după mai mulți ani de evoluție, fiind în principal expresia infecțiilor oportuniste asociate imunodepresiei. Virusul poate fi transmis și prin sânge sau secreții sau vertical, preponderent perinatal.

Virusul hepatitei B, deși transmisibil pe cale sexuală, nu duce la manifestări caracteristice infecțiilor genitale. După o perioadă de incubație de 1-6 luni în aproximativ 10% din cazuri apare hepatita acută. Infecția acută poate evolua la unii pacienți spre hepatita cronică, ciroză și cancer hepatic.

Papilomavirusul uman este responsabil pentru infecții cu diverse localizări. Genotipurile cu risc scăzut sunt responsabile de producerea vegetațiilor genitale. Infecția persistentă cu genotipuri de risc crescut este o cauză importantă de cancer de col uterin, anal sau faringian. În România este o infecție probabil subdiagnosticată.

Trichomonas vaginalis cauzează vaginită și/sau uretrită după o incubație de 4-28 de zile. Infecția rămâne asimptomatică la aproximativ 25% dintre femei și peste 90% în cazul bărbaților.

Screeningul persoanelor asimptomatice pentru ITS:

- **Serologie:** HIV, VHB (virusul hepatitei B), sifilis
- **Teste moleculare - teste de amplificare a acizilor nucleici (NAAT):** *Chlamydia trachomatis* (femei sub vârsta de 25 de ani și bărbați sub vârsta de 30 de ani sau fără limite de vârstă în cazul persoanelor la risc). La femei se recoltează secreție cervicală iar la bărbați primul jet de urină.
- În funcție de datele anamnestice și clinice:

- depistarea *N. gonorrhoeae* (prin cultivare sau NAAT) și *C. trachomatis* (prin NAAT) din secreții orofaringiene sau probe anorectale.

Diagnosticul infecțiilor cu transmitere sexuală simptomatice în funcție de patogenul suspectat

Tabelul 1. Metode de diagnostic în infecții cu transmitere sexuală simptomatice, în funcție de patogenul suspectat

Patogenul suspectat	Probele recoltate	Examen microscopic	Cultivare	Teste moleculare	Antibiogramă
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Secreția uretrală exteriorizată, probe cervicale sau uretrale, urină - primul jet, exudat faringian, tampon anorectal	Frotiu colorat Gram sau cu albastru de metilen	Important pentru izolarea germenului și antibiogramă (sensibilitate redusă)	Preferabil combinat cu cultivarea	Esențială pentru documentarea sensibilității față de antibiotice în condițiile răspândirii tulpinilor rezistente
<i>Chlamydia trachomatis</i>	Secreții uretrale și cervicale, tampon vaginal (în funcție de testul folosit!), exudat faringian și tampon anorectal	-	Doar pe culturi celulare (în laboratoare de referință)	Diagnostic de bază	Doar în laboratoare de referință
<i>Mycoplasma genitalium</i>	Secreție uretrală și cervicală, secreție vaginală, urină - primul jet	-	Dificil de cultivat (eventual în laboratoare de referință)	Diagnostic de bază	Doar în laboratoare de referință
<i>Trichomonas vaginalis</i>	Secreție uretrală, secreție vaginală, urină - primul jet	Preparat nativ proaspăt sau frotiu colorat Giemsa (sensibilitate acceptabilă la femei, redusă la bărbați)	Sensibilitate acceptabilă la femei, redusă la bărbați	Preferabil la bărbați	Valoare clinică limitată

Diagnosticul uretritei acute

- **Primul jet de urină:** *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae*, *M. genitalium* (prin NAAT)
 - la femei proba de urină este inferioară secreției cervicale, chiar și în cazul prezenței disuriei
- **Probe uretrale:** microscopie, cultivare și antibiogramă pentru *N. gonorrhoeae* și alți patogeni, microscopie pentru *Trichomonas vaginalis*, cultivare cantitativă pentru *Ureaplasma urealyticum* (prag de semnificație $>10^4$ UFC/ml - sub această valoare semnificația este incertă datorită portajului frecvent)
- În funcție de context: exudat faringian sau tampon anorectal pentru *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae* (NAAT) și hemoculturi în cazul prezenței febrei.
 - În cazul în care se suspicionează o ITS se recomandă screening pentru toți patogenii importanți cu transmitere sexuală (HIV, HBV, *Treponema pallidum*).

Diagnosticul infecțiilor genitale ulcerative în funcție de patogenul suspectat

Tabelul 2. Metode de diagnostic direct în infecții genitale ulcerative, în funcție de patogenul suspectat

Patogenul suspectat	Probele recoltate	Examen microscopic	Cultivare	Teste moleculare	Antibiogramă sau similar
Herpes simplex virus	Celule din baza ulcerăției	-	Culturi celulare	Preferabil (permite stabilirea tipului)	-
<i>Treponema pallidum</i>	Serozitate din șancrul dur	Microscopie cu fond întunecat în cel mult 15 minute de la recoltare (specificitate redusă în cazul sancrelor cu localizare anală sau orală din cauza prezenței treponemelor comensale)	-	Preferabil (sensibilitate superioară)	-
<i>Chlamydia trachomatis</i> serotipurile L1-3	În caz de suspiciune LGV: Probus anal sau biopsie rectală	-	Laboratoare de referință - culturi celulare	Diagnostic de bază	-
<i>Haemophilus ducreyi</i>	Puroi din periferia șancrului moale sau puroi aspirat	Frotiu colorat cu albastru de metilen, MGG sau Gram	Dificilă - se recomandă însămânțarea la patul bolnavului	Preferabil (sensibilitate crescută)	Relevanță clinică redusă

III. Infecțiile tractului genital feminin (altele decât cele cu transmitere sexuală)

Microbiomul vaginal al femeii mature este dominat de specii de *Lactobacili* care asigură un pH acid de 4,5. Pe lângă acestea microbiomul conține specii variate de streptococi, enterococi, stafilococi coagulazo-negativi, o multitudine de specii anaerobe și specii de *Candida*. Bacteriile

prezente în cantități mari în cazul vaginozei bacteriene, cum ar fi anaerobii, *Gardnerella vaginalis*, *Mobiluncus* spp., *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis* pot fi prezente în număr redus în condiții normale.

Vaginita candidozică apare în condițiile unor schimbări ale florei vaginale care favorizează multiplicarea excesivă a speciilor de *Candida*. Factorii care favorizează multiplicarea lor pot fi:

- tratamente antibiotice
- diabet zaharat
- imunosupresie
- utilizarea anticoncepționalelor orale
- obezitatea
- sarcina

Examenul microscopic este suficient de cele mai multe ori pentru stabilirea diagnosticului. În cazul infecțiilor recurente, rebele la tratament se recomandă cultivarea și identificarea speciei de *Candida* și antifungigramă în cazul speciilor non-albicans.

Vaginita în prepubertate poate fi cauzată de streptococi β -hemolitici de grup A (SGA) și de *Staphylococcus aureus*. Ocazional, SGA poate cauza vaginită cu leucoree purulentă și la adulți.

Vaginita atrofică se poate dezvolta în menopauză. Nivelul redus de estrogen duce la scăderea glicogenului și implicit a producerii acidului lactic cu creșterea pH-ului vaginal. Se caracterizează prin absența lactobacililor, apariția unei flora bacteriene mixte și prezența leucocitelor polimorfonucleare.

Vaginoza bacteriană (VB) reprezintă o alterare a microbiomului vaginal ce constă din reducerea numărului sau dispariția lactobacililor, aceștia fiind înlocuiți de o floră anaerobă mixtă. Reacția inflamatorie nu este caracteristică, iar pH-ul secreției vaginale depășește 4,5. VB este de multe ori asimptomatică. În cazurile simptomatice apare o leucoree cu miros caracteristic de pește. La femeile gravide poate cauza amniotită, naștere prematură, greutate scăzută a fătului la naștere, endometrită postpartum, boală pelvină inflamatorie, infecții de tract urinar.

Suspiciunea VB se ridică în cazul prezenței unei leucoree alb-cenușie, omogenă, aderentă de peretele vaginal, cu pH>4.5 și cu un miros de pește care se intensifică la adăugarea de KOH 10% (amine sniff test). În preparatul nativ efectuat din secreția vaginală se observă lipsa lactobacililor, a granulocitelor și prezența celulelor "clue" (celule țintate).

Bacteriile asociate cu VB, cum ar fi *Prevotella* spp., *Gardnerella vaginalis*, *Mobiluncus* spp. și micoplasmele urogenitale sunt dificil de cultivat. Diagnosticul se bazează fie pe criteriile mai sus menționate, fie pe scorul Nugent pe frotiul colorat Gram, descris mai jos.

Vulvovaginita se dezvoltă preponderent în prepubertate, însă se poate întâlni la orice vârstă. Pe lângă *Candida* spp. pot fi implicate în etiologie SGA, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae*. Frotiul vaginal relevă prezența granulocitelor.

Semnificația clinică a streptococilor β -hemolitici de grup B (SGB) - colonizează vaginul la cca 30% dintre femei. În cursul gravidității, SGB poate cauza amniotită (infecția lichidului amniotic), ruperea prematură a membranelor și infecția nou-născutului: sepsisul, meningita sau pneumonia neonatală. Infecțiile neonatale pot fi prevenite prin depistarea colonizării cu SGB și aplicarea profilaxiei intrapartum.

Infecțiile cu *Listeria monocytogenes* pot fi grave la gravide, manifestate printr-o boală febrilă sau chiar sepsis. Transmis transplacentar afectează fătul și poate duce la decesul intrauterin al acestuia. În cazul nașterilor vii de la mame infectate cu *Listeria monocytogenes* se dezvoltă infecții neonatale severe: sepsis, meningite neonatale, amenințătoare ale vieții.

Avortul septic implică infecții cu o floră bacteriană mixtă în care predomină anaerobii.

Bartholinita reprezintă inflamația glandelor Bartholin, ce se poate complica cu abcedare. Agenții etiologici pot fi variați, incluzând anaerobi, *N. gonorrhoeae* și alte specii de neisseria, streptococi, enterobacterii, *S. aureus*, *H. influenzae*, *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma hominis*.

Cervicita mucopurulentă implică inflamația epiteliului columnar. Patogenii cu rol cert în procesul infecțios sunt cei cu transmitere sexuală: *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae* și herpes simplex. Pe lângă acestea, rolul micoplasmelor urogenitale este controversat. Bacteriile implicate în cervicită pot cauza infecții ascendente.

În cazul cervicitei se evidențiază o secreție endocervicală mucopurulentă gălbuie. Examenul microscopic al acesteia relevă prezența polimorfonuclearelor.

Endometrita reprezintă inflamația endometrului. Poate fi cauzată de *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae*, *Mycobacterium tuberculosis*.

Cel mai adesea, endometrita se dezvoltă postpartum (endometrita puerperală). Etiologia acesteia este de obicei mixtă și include anaerobii, streptococii β -hemolitici, *S. aureus*, enterobacteriile, *G. vaginalis*, *M. hominis*, *C. trachomatis* și enterococii.

În endometrite hemoculturile se pozitivează în 10-30% din cazuri. Valoarea culturilor efectuate din secrețiile endocervicale este incertă din cauza riscului crescut de contaminare a probelor cu flora vaginală. În endometrita non-puerperală se recomandă diagnostic molecular pentru *C. trachomatis* și *N. gonorrhoeae*.

Salpingita este infecția trompelor uterine. Uneori polimicrobiană, etiologia acesteia include: *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae*, *M. hominis*, anaerobi, specii aerobe, facultativ anaerobe. Produsele recoltate din cervix sunt relevante doar pentru depistarea infecțiilor cauzate de *C. trachomatis* și *N. gonorrhoeae*, restul spectrului etiologic necesită probe recoltate intraoperator din salpinge.

Boală inflamatorie pelvină (BIP) include endometrita, salpingita, peritonita pelvină, caracterizate de dureri cronice, sarcini extrauterine, infertilitate, piosalpinx, abcese tubo-ovariene. Produsele acceptabile pentru diagnostic sunt cele aspirate din trompa uterină intraoperator. Cauzele cele mai frecvente sunt: *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae*, anaerobii, SGB și alți streptococi, *Escherichia coli*, *G. vaginalis*, *Actinomyces israelii*, *H. influenzae*, *M. hominis*. Aceste infecții pot fi polimicrobiene.

Infecțiile asociate cu utilizarea dispozitivelor intrauterine sunt cauzate cel mai frecvent de *Actinomyces israelii* și de diverse bacterii Gram-pozitive și Gram-negative în floră mixtă. Examenul bacteriologic se recomandă doar în prezența simptomatologiei sugestive pentru BIP sau alte boli inflamatorii.

IV. Infecțiile tractului genital masculin

Prostatita acută sau cronică poate fi cauzată de enterobacterii, *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae* și streptococi. Rolul patogenilor cu transmitere sexuală este insuficient demonstrat.

Epididimita și epididimo-orchita ce apare în adolescență și la adultul tânăr (până la 40 de ani) cel mai frecvent se datorează patogenilor cu transmitere sexuală, în special *C. trachomatis* și *M. genitalium*.

Balanita este inflamația glandului, iar **balanopostita** a glandului și a prepuțului. Pot fi cauzate de levuri, virusul herpetic, SGA, SGB, *S. aureus*, anaerobi.

V. Recoltarea probelor biologice de la nivelul tractului genital

Tipurile de probe prelucrate: secreție vaginală din fundul de sac vaginal recoltat cu tamponul, secreție vaginală, tampon vulvar, secreție cervicală recoltată pe tampon, secreție endocervicală recoltată pe tampon, tampon uretral, tampon din șanțul balano-prepuțial, secreții din ulcere genitale recoltate pe tampon, spermă, aspirate din abcese Bartholin, conținutul trompei uterine, puroi din abcese ovariene, dispozitiv intrauterin, lichid din sacul Douglas.

Condițiile de recoltare a probelor

În cazul suspiciunii de infecție cu *N. gonorrhoeae* se recomandă însămânțarea probelor imediat după recoltare, la patul bolnavului. Orice întârziere în transportul probelor trebuie evitată, durata transportului trebuie redus la minim deoarece este unul dintre cei mai importanți factori care influențează succesul cultivării.

În cazul infecției cu *Haemophilus ducreyi* se recomandă de asemenea însămânțarea la patul bolnavului.

Secreția cervicală și secreția vaginală din fundul de sac vaginal trebuie recoltate cu ajutorul valvelor sau a speculumului. Este important de evitat contaminarea cu flora vulvară.

În cazul secrețiilor cervicale este important de evitat și contaminarea cu flora vaginală. În acest scop, înainte de recoltarea propriu-zisă se curăță suprafața externă a colului cu un tampon diferit de cel folosit pentru recoltare.

Pentru depistarea infecției cu *Trichomonas vaginalis* se recoltează din fundul de sac vaginal, iar în cazul suspiciunii de infecții micotice, din placardele evidente (dacă sunt prezente). Pentru screeningul portajului de SGB se recomandă recoltarea a 2 tampoane: unul din secreția din treimea inferioară a vaginului și un tampon anal.

Pentru diagnosticul VB se recomandă efectuarea unor frotiuri din secreția vaginală care vor fi uscate la aer înainte de trimitere în cutii de transport lame.

Pentru examen virusologic și pentru depistarea *C. trachomatis* se recoltează produse separate.

Recoltarea secreției uretrale se face cu ajutorul unor tampoane speciale, mai subțiri decât tamponul faringian, cel puțin după o oră de la ultima micțiune. În cazul bărbaților, în absența unei secreții evidente se încearcă presarea ușoară a penisului pentru obținerea secreției prin uretră. Tamponul se trece ușor prin meat, se rotește pentru obținerea produsului.

Dispozitivele intrauterine îndepărtate se trimit integral, plasate într-un pahar steril cu capac filetat.

Tampoanele rectale se recoltează în cursul rectoscopiei.

Exudatul faringian se recoltează de pe suprafața amigdalelor și de pe mucoasa peretelui posterior al faringelui, după un repaus alimentar de cel puțin trei ore.

Probele purulente recoltate intraoperator din trompele uterine sau abcesele ovariene se transferă în recipiente sterile și se închid ermetic. Cantitatea optimă a acestora este peste 1 mL. Având în vedere că aceste probe pot conține germeni anaerobi, se recomandă recipiente de transport speciale pentru anaerobi sau în lipsa acestora probele trebuie transportate fără întârziere.

Probele recoltate pe tampon trebuie introduse în mediu de transport cu cărbune (necesar pentru permiterea supraviețuirii *N. gonorrhoeae*) pe durata transportului.

VI. Examenul microbiologic

Examenul microscopic

Examenul nativ (preparatul între lamă și lamelă) al secreției vaginale poate fi utilizat pentru detectarea *Trichomonas vaginalis*, a prezenței levurilor și pentru diagnosticul vaginozei bacteriene (descrie mai sus). Se poate efectua imediat după recoltare plasând o picătură de secreție pe lamă și acoperind-o cu o lamelă. Alternativ, se poate efectua din tamponul cu care s-a efectuat recoltarea (efectuând o suspensie în ser fiziologic).

Preparate colorate din secreții vaginale

Se întinde un frotiu din secreția vaginală, se usucă la aer și se colorează Gram. În cadrul examenului microscopic se urmărește:

- flora bacteriană vaginală
- scorul Nugent, prezența celulelor țintate
- prezența leucocitelor și a eventualelor diplococi fagocitați;
- prezența celulelor levurice, a pseudohifelor, a *Trichomonas vaginalis*

Pe preparatele colorate Giemsa sau MGG se pot urmări leucocitele, celulele țintate, *Trichomonas vaginalis*. Nedetectarea *T. vaginalis* la examenul microscopic nu exclude infecția!

Scorul Nugent de 7-10 confirmă diagnosticul de vaginoză bacteriană.

Tabelul 3. Criteriile Nugent

Scor	Morfotip de <i>Lactobacillus</i>	Morfotip de <i>Gardnerella</i> (cocobacili Gram-negativi)	Morfotip <i>Mobiluncus</i> (bacili Gram-variabili încurbați)
	Nr. mediu de bacterii/câmp (x1000)	Nr. mediu de bacterii/câmp (x1000)	Nr. mediu de bacterii/câmp (x1000)
0	>30	0	0
1	5-30	<1	1-5
2	1-4	1-4	>5
3	<1	5-30	-
4	0	>30	-

Scorul Nugent se calculează adunând scorurile obținute la cele trei categorii de morfotipuri.

În cazul vaginitelor se observă peste 10 granulocite/câmp (cu mărire x1000) și sunt prezente mai multe granulocite decât celulele epiteliale. Lactobacilii pot fi înlocuiți cu un singur

morfotip bacterian sau se observă prezența *Trichomonas vaginalis* sau a levurilor. Se recomandă testare suplimentară pentru *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae* și *M. genitalium* prin teste moleculare.

Preparate colorate din secreția uretrală recoltată de la bărbați sau secreția endocervicală în caz de suspiciune de gonoree.

Se prepară un frotiu subțire și se colorează Gram. Se urmăresc granulocitele și prezența diplococilor Gram-negativi intra- și extracelulari.

Examenul microscopic al aspiratelor și probelor de puroi

Aspiratele se centrifughează la 1500 g timp de 10 minute. Supernatantul se aruncă, lăsând cca 0,5 ml în care se resuspendă sedimentul. Din această suspensie se prepară un frotiu, întinzând o picătură pe suprafața lamei. După uscare se colorează Gram. Din probele de puroi se întinde un frotiu subțire și se colorează Gram.

Dispozitive intrauterine

Suprafața dispozitivului se șterge cu un tampon umectat în ser fiziologic steril. După însămânțarea mediilor de cultură, cu acest tampon se întinde un frotiu. Se colorează Gram. Dacă sunt prezente secreții purulente sau exudate, frotiul se prepară din acestea.

Cultivarea

Mediile de cultură și condițiile de cultivare în funcție de situațiile clinice și tipul de produs sunt descrise în tabelele 4 și 5.

Tabelul 4. Mediile de cultură utilizate și condițiile de cultivare în funcție de situațiile clinice

Situația clinică	Produsul recoltat	Medii de cultură standard	Condiții de incubare			Citirea culturii	Microorganismele țintă
			Temp °C	Atmosferă	Timp h		
Vaginită candidozică recurentă rebelă la tratament	Secreție recoltată cu tampon din fundul de sac vaginal	Agar Sabouraud	35-37	Aerobă	40- 48	≥40	Levuri
Screening portaj streptococi β-hemolitici de grup B la gravide (efectuată între săptămânile 35-	Secreție vaginală din treimea inferioară a vaginului ȘI tampon rectal	Agar sânge	35-37	5-10% CO ₂	16- 24	16-24	SGB

37 de graviditate)		Mediu de îmbogățire selectiv pentru SGB (bulion LIM) Treceri pe agar sânge	35-37	aerobă	16-24	-	SGB
Cervicită Uretrită	Secreție endocervicală sau uretrală recoltată cu tampon și transportate în mediul Amies cu cărbune	Agar sânge	35-37	5-10% CO ₂	16- 24	16-24	<i>Staphylococcus aureus</i> Streptococi β-hemolitici de grup A, C sau G
		Agar Sabouraud	35-37	aerobă	40- 48	≥40	Levuri
		Agar selectiv GC (cu substanță antifungică)	35-37	5-10% CO ₂	40- 48	≥40	<i>N. gonorrhoeae</i>

ITS	Orice produs recoltat pe tampon	Agar selectiv GC (cu substanță antifungică)	35-37	5-10% CO ₂	40- 48	≥40	<i>N. gonorrhoeae</i>
Suspiciune de trichomoniază	Secreție vaginală din fundul de sac vaginal	Mediu special pentru <i>T. vaginalis</i>	35-37	aerobă	40- 48	≥40	<i>T. vaginalis</i>
La gravide: Iminență de naștere prematură Ruptura membranelor de peste 12 ore	Secreție canal cervical	Agar chocolate	35-37	5-10% CO ₂	40- 48	Zilnic	<i>H. influenzae</i>
		Agar sânge	35-37	5-10% CO ₂	16- 24	16-24	SGB
		CLED sau MacConkey	35-37	aerobă	>16	>16	<i>E. coli</i>

Decesul intrauterin al fătului Avort septic	Țesut mojarat Secreție cervicală	Agar sânge selectiv pentru anaerobi (cu neomicină)	35-37	anaerobă	40- 48	≥40	Anaerobi
		Agar CLED	35-37	aerobă	≥16	≥16	Enterobacterii Pseudomonas
Suspiciune de listerioză	Secreție vaginală din fundul de sac vaginal	Agar sânge	35-37	Aerobă	40-48	Zilnic	<i>Listeria monocytogenes</i>
Fete sub 10 ani	Secreție vaginală	Agar ciocolată	35-37	5-10% CO ₂	40- 48	Zilnic	<i>H. influenzae</i>
Actinomicoză (suspiciune clinică sau pe baza frotiului)	Secreție vaginală recoltată cu tampon din fundul de sac vaginal Sau Dispozitiv intrauterin	Agar sânge	35-37	Anaerobă	10 z	≥40, 7 și 10 z	<i>Actinomyces spp.</i>
Șancru moale	Secreție din șancru Aspirat din bubon	Agar ciocolată	33-34	5-10% CO ₂	5 z	5 z	<i>Haemophilus ducreyi</i>

Tabelul 5. Mediile de cultură utilizate și condițiile de cultivare pentru: aspirate/puroaie sau produse recoltate pe tampon din abcese tubo-ovariene, din trompa uterină, glanda Bartholin, probe intraoperatorii, dispozitive intrauterine

Situția clinică	Medii de cultură standard	Condiții de incubare			Citirea culturii	Microorganismele țintă
		Temperatură °C	Atmosferă	Timp h		
BIP Salpingită Abces tubo-ovarian	Agar ciocolată	35-37	5-10% CO ₂	40- 48	Zilnic	<i>H. influenzae</i>
Abcesul glandei Bartholin Piosalpinge	Agar sânge	35-37	5-10% CO ₂	40- 48	Zilnic	<i>S. aureus</i> Streptococi <i>Enterobacterales</i>
Dispozitiv intrauterin (în prezența semnelor de infecție)	Agar sânge	35-37	Anaerobă	10 z	≥40, 7 și 10 z	<i>Actinomyces</i> spp.
	Agar sânge pentru anaerobi	35-37	Anaerobă	5 z	≥40 și 5 z	Anaerobi
	Agar selectiv GC	35-37	5-10% CO ₂	40- 48	Zilnic	<i>N. gonorrhoeae</i>
Actinomicoză (suspiciune clinică sau pe baza frotiului)	Agar sânge	35-37	Anaerobă	10 z	≥40, 7 și 10 z	<i>Actinomyces</i> spp.

Nivelul minim de identificare ai patogenilor izolați

- *Actinomyces*: actinomycete;
- Streptococii β -hemolitici: grup Lancefield;
- Enterobacterii: specie;
- *Haemophilus*: la nivel de specie;
- *Listeria*: la nivel de specie;
- *Neisseria*: la nivel de specie;
- Pseudomonade: *Pseudomonas aeruginosa* și pseudomonade
- *S. aureus*: la nivel de specie;
- Levuri: specie;

Testarea sensibilității față de antibiotice

Se efectuează doar pentru germeni semnificativi, conform standardului EUCAST.

VII. Raportarea rezultatelor

Frotiurile colorate Gram

Se raportează:

- prezența leucocitelor,
- prezența levurilor,
- prezența sau absența diplococilor Gram-negativi,
- prezența *T. vaginalis*.
- prezența celulelor țintate pe frotiurile vaginale și dacă frotiul indică vaginoză bacteriană.

La solicitarea clinicianului se poate raporta scorul Nugent:

- Scor Nugent 0-3: aspect normal
- Scor Nugent 4-6: sugestiv pentru VB - se solicită repetarea testării
- Scor Nugent ≥ 7 : VB

Rezultatele urgente se comunică telefonic sau electronic.

Rezultatul examenului microscopic se introduce în fișa electronică și se validează imediat ce este disponibil.

Cultivare

Se raportează izolatele clinic semnificative **sau**

alte creșteri (de ex. "Flora comensală") **sau**

absența unor microorganisme specifice (se denumesc cele urmărite) **sau**

absența creșterii microbiene.

Rezultatele urgente se comunică telefonic sau electronic.

Rezultatul în scris se eliberează în 16-72 de ore.

VIII. Bibliografie

de Barbeyrak B, Skov-Jensen J: Sexually transmitted infections. In European Manual of Clinical Microbiology, editors Cornaglia G, Courcol R, Hermann JL, Kahlmeter G, Publisher SFM, 2012:21-28.

Public Health England. (2017). Investigation of Genital Tract and Associated Specimens. UK Standards for Microbiology Investigations. B 28 Issue 4.6.

Public Health England. (2013). Sexually Transmitted Infections. UK Standards for Microbiology Investigations. S 6 Issue 1.2. <http://www.hpa.org.uk/SMI/pdf>.

Diagnosticul microbiologic al infecțiilor oculare

I. Introducere

Infecțiile oculare pot duce la pierderea unor structuri sau funcționalități, parțial sau total.

Infecțiile oculare pot fi determinate de o varietate de microorganisme. Tamponatele recoltate pot fi contaminate cu flora tegumentară, în același timp orice microorganism izolat poate fi la un moment dat implicat etiologic.

Microorganismele pot infecta ochiul fie pe cale exogenă (prin intermediul mâinilor, lentilelor de contact, traumatismelor sau postoperator), fie pe cale hematogenă.

II. Context clinic

Conjunctivita

Cea mai frecventă infecție oculară este conjunctivita, determinată de inflamația conjunctivei.

Conjunctivita poate surveni în asociere cu infecția pleoapei (blefaroconjunctivită) sau a corneei (keratoconjunctivită). Inflamația pleoapelor se numește blefarită.

Infecțiile mai puțin frecvente și mai severe includ cheratita (inflamația corneei) și endoftalmită (infecție în interiorul globului ocular). Alte infecții perioculare includ dacrioadenita (inflamația glandei lacrimale), dacriocistita (inflamația sacului lacrimal), canaliculită (infecția punctului lacrimal și a canalului lacrimal) și celulită preseptală și orbitală. Hipopionul este o afecțiune asociată cu un exsudat leucocitar, prezent în camera anterioară a ochiului, de obicei însoțit de hiperemia conjunctivei și a episclerei subiacente.

Conjunctivita poate fi acută sau cronică. Bacteriile cel mai frecvent implicate în etiologia infecțiilor la adulți sunt:

- *Staphylococcus aureus*
- *Streptococcus pneumoniae*
- *Haemophilus influenzae*

Conjunctivita la nou-născuți este cauzată de microorganismele întâlnite frecvent la adulți, în plus se pot întâlni:

- *Neisseria gonorrhoeae*
- *Haemophilus parainfluenzae*
- Streptococi din grupul Lancefield și enterococi
- *Enterobacteriales*, de exemplu *Klebsiella pneumoniae* și *Proteus mirabilis*
- *Pseudomonas aeruginosa*.

Cheratita

Cheratita este o infecție a corneei. Aceasta este o afecțiune gravă care necesită intervenție promptă și un diagnostic microbiologic meticolos. Ea poate evolua către perforație și orbire în lipsa unui tratament corect. Infecția inițială cu cheratită poate evolua până la endoftalmită dacă

este tratată necorespunzător. Factorii predispozanți sunt: uzura lentilelor de contact urmată de boală oculară preexistentă, inclusiv cheratită determinată de herpes simplex, traumatism ocular, chirurgie oculară, chirurgie cu laser și utilizarea steroizilor topici. Cheratita poate fi determinată de o gamă largă de bacterii, fungi și paraziți:

- Stafilococi
- Streptococi
- Pseudomonade
- *Enterobacteriales*
- *Corynebacterium* spp.
- *Moraxella* spp.
- *Haemophilus* spp.
- *Neisseria gonorrhoeae*
- *Acanthamoeba* spp.
- *Aspergillus* spp.
- *Candida* spp.
- *Fusarium* spp.
- *Propionibacterium* spp., *Cutibacterium acnes*

Endoftalmita infecțioasă

Endoftalmita infecțioasă este relativ rar întâlnită, dar infecția lichidelor și țesuturilor intraoculare poate pune în pericol vederea. Se poate dezvolta ca urmare a unei intervenții chirurgicale, traumatism, sau prin diseminarea hematogenă a microorganismelor. Cele mai potrivite produse biologice pentru investigarea endoftalmititei sunt lichidele intraoculare (umoarea apoasă din camera anterioară și umoarea vitroasă din cavitatea / corpul vitros). De asemenea se pot recolta tamponate. Microorganismele cel mai frecvent implicate sunt:

- Stafilococi coagulazo-negativi
- *Staphylococcus aureus*
- Streptococi
- *Cutibacterium acnes*
- fungi

Endoftalmita acută post-operatorie apare în decurs de 1 până la 7 zile de la intervenția chirurgicală. Sursa infecției este de obicei flora bacteriană prezentă pe suprafața oculară sau a pleoapei pacientului. Acest lucru face dificilă diagnosticarea prin cultură.

Deși practic orice microorganism poate provoca infecții, cel mai frecvente izolate sunt:

- Stafilococi coagulază negativi
- *Staphylococcus aureus*
- Streptococi
- *Enterobacteriales*
- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Cutibacterium acnes*

Endoftalmita asociată chirurgiei glaucomului poate fi localizată la nivelul bulei de filtrare („blebită”) sau se poate prezenta ca infecție intraoculară fulminantă. Ea poate să apară la săptămâni sau ani după operația inițială, inclusiv după vitrectomie prin pars plana, keratoplastie perforantă sau chirurgia glaucomului cu sisteme de drenaj.

Lista de microorganisme responsabile este similară cu cea enumerată mai sus.

Endoftalmita cronică apare după luni sau chiar ani de la intervenția chirurgicală intraoculară. Pacienții prezintă de obicei o uveită persistentă ușoară sau se pot prezenta ca endoftalmita acută. Microorganismele implicate sunt:

- *Cutibacterium acnes*
- Stafilococi coagulazo-negativi
- *Corynebacterium* spp.
- fungi
- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Staphylococcus aureus*
- *Mycobacterium* spp.

Endoftalmita posttraumatică apare după leziuni de penetrare sau perforare oculară. Această afecțiune este mult mai gravă dacă leziunea penetrantă conține și material organic. Poate fi determinată de orice microorganism, exemple mai cunoscute fiind:

- *Bacillus cereus*
- fungi
- Streptococi
- *Clostridium* spp.
- *Microsporidium* spp.

Endoftalmita endogenă este rară și apare la pacienții cu bacteriemie sau fungemie, se asociază frecvent cu terapia imunosupresivă, abuz de droguri injectabile sau proceduri chirurgicale invazive. În aceste situații sunt indicate hemoculturile. Microorganismele implicate sunt:

- fungi
- *Staphylococcus aureus*
- Streptococi
- *Enterobacterales*
- *Bacillus* spp.

Uveita

Uveita poate fi parte a unei infecții sistemice de origine bacteriană (*Borrelia* spp., *Treponema pallidum*, micobacterii), virală sau parazitară (toxoplasmoză, toxocara). *Toxoplasma gondii* este principala cauză de corioretinită.

Celulita orbitală

Celulita orbitală este infecția țesutului orbital. Se poate produce prin traumatisme, intervenții chirurgicale sau diseminarea infecțiilor sinusurilor paranazale. Este o infecție gravă și poate provoca orbire, tromboză septică a sinusului cavernos sau infecții intracraniene.

Microorganismele cel mai frecvent izolate la adulți sunt *S. aureus*, streptococii și anaerobii. La copii *Haemophilus influenzae* rămâne pe primul loc, dar în urma introducerii programului de vaccinare tulpina capsulată (tip b) este rar întâlnită. Streptococii, stafilococii, peptostreptococii și *Pseudomonas aeruginosa* pot cauza necroză. Fungii sunt o cauză rară, Zigomicetele pot determina infecții la imunodeprimați, diabetici sau pacienți cu infecție posttraumatică a sinusurilor. Recoltarea pe tampon are o valoare limitată în diagnosticul microbiologic al celulitei orbitale și preseptale. Ideal trebuie recoltate aspiratele din zonele afectate.

Canaliculita

Canaliculita este o afecțiune rară. Infecțiile sunt de obicei cronice și cauzate de actinomicete anaerobe precum *Actinomyces israelii* sau de *Propionibacterium propionicum*, *Nocardia* sau fungi.

Pentru diagnostic se recoltează probe de puroi canalicular cu tamponul.

Blefarita

Blefarita este un proces inflamator acut sau cronic al pleoapelor care se poate asocia cu conjunctivită și cu alte infecții oculare. De obicei nu se recoltează probe, cu excepția cazului în care se asociază cu alte infecții oculare. Bacteriile care pot fi implicate în această infecție sunt:

- *Staphylococcus aureus*
- *Staphylococcus epidermidis*
- Specii de streptococi
- *Moraxella* spp.
- *Corynebacterium* spp.
- *Cutibacterium acnes*

Pe lângă acestea pot fi implicați și fungi (*Pityrosporum ovalae*), *Demodex folliculorum*.

Aceste microorganisme pot fi izolate și de pe pleoapele sănătoase, necesitând o interpretare atentă a acestor culturi.

Infecții specifice

Chlamydia trachomatis

Conjunctivita de incluziune și trahomul sunt determinate de diferite serotipuri de *Chlamydia trachomatis*. Trahomul este asociat cu serotipurile A-C. Aceste serotipuri sunt asociate cu transmiterea sexuală și pot provoca, de asemenea, infecții la nou-născuți

Protozoare

Speciile de *Acanthamoeba* pot provoca cheratită severă, de obicei la purtătorii de lentile de contact sau după un traumatism ocular. Dacă nu este tratată prompt, infecția poate duce la ulcerarea corneene și chiar la orbire. Aceste protozoare pot fi izolate din țesutul corneei, precum și din lentilele de contact. Cu toate acestea, speciile *Acanthamoeba* pot să fie izolate din lichidul de păstrare a lentilelor de contact de la persoane fără semne sau simptome de boala. Diagnosticul se poate face prin biologie moleculară.

Scopul investigației microbiologice în infecțiile globului ocular și ale anexelor

Testarea pentru depistarea etiologiei se face în următoarele situații:

- Infecție acută severă a corneei sau conjunctivei sau infecție cronică rezistentă la tratamentul empiric
- Ulcer, keratită sau abces corneean, atunci când există criterii de severitate sau suspiciune de infecție fungică sau amoebiană
- Suspiciune de endoftalmită acută sau cronică, uveită sau retinită necrozantă

- Tratament chirurgical pentru infecții ale anexelor globului ocular
- Boală ocupațională
- Context epidemiologic

III. Recoltarea și transportul probelor

Tipuri de probe

Se recoltează: secreție conjunctivală, puroi canalicular, umoare apoasă și vitroasă, fragmente de cornee, cutii pentru lentile de contact și lichid de curățare a lentilelor de contact.

Timpi optimi, metode de recoltare

Probele cele mai utile pentru diagnostic se recoltează de către oftalmolog în sala de operație și se însămânțează direct pe medii de cultură.

Se colectează probe înainte de terapia antimicrobiană, acolo unde este posibil.

Se recoltează înainte de spălarea feței și fără machiaj.

Raclajul corneei și lichidele intraoculare vor fi colectate de un chirurg oftalmolog.

Secreția conjunctivală se recoltează de la unghiul intern al ochiului cu tamponul.

Raclatul conjunctival se recoltează de pe fața internă a pleoapelor.

Trahom: se întoarce pleopa și se identifică zonele cu foliculi, inflamație, leziuni – se raclează zona cu insistență.

Raclajul corneean se obține de la baza și marginile abcesului, după debridare și îndepărtarea materialului necrotic.

Endoftalmită, necroză retiniană, uveită: se recoltează lichid vitros prin aspirație sau tesut vitros (în caz de endoftalmită este mai indicat decât umoarea apoasă); probele de conjunctivă, raclajul din leziune au valoare mică în diagnosticul etiologic al endoftalmitei.

În cazul endoftalmitei endogene trebuie investigată prezența punctului de intrare sau a unui alt focar metastatic.

Dacriocistită – se recoltează puroiul exprimat din canalul lacrimal.

Gene – se recoltează 8-10 gene într-un recipient steril care se trimite rapid la laborator.

Datorită cantităților mici de material implicat, este mai indicat ca inocularea plăcilor și pregătirea frotiurilor să se facă lângă pacient. Ar trebui ca laboratoarele să stabilească un protocol pentru recoltarea probelor, inocularea mediilor și transportul către laborator cu oftalmologii și să furnizeze materialele necesare în acest scop.

Orice secreție purulentă disponibilă ar trebui prelevată. De asemenea, poate fi util însămânțarea lentilei de contact în sine, precum și cutia lentilelor de contact, împreună cu soluțiile de curățare disponibile.

Trebuie recoltate probe separate în medii de transport adecvate pentru detectarea virusurilor sau *Chlamydia trachomatis*, acolo, unde aceste investigații sunt disponibile.

Tampoanele nu sunt preferate deoarece cantitatea de produs este foarte mică și poate fi absorbit în tampon.

Cantitatea adecvată și numărul adecvat de probe

Numărul și frecvența recoltării eşantioanelor depind de starea clinică a pacientului.

În cazul în care cantitatea de probă este insuficientă pentru a efectua atât culturi cât și frotiuri, se preferă efectuarea culturilor.

Transportul și păstrarea probelor

Eșantioanele trebuie transportate și prelucrate cât mai curând posibil. Dacă procesarea este întârziată, refrigerarea este preferabilă depozitării la temperatura ambiantă.

Dacă probele pentru investigarea amibelor nu pot fi procesate în decurs de 8 ore, este preferabil să le depozitați la temperatura ambiantă.

Nu congelați probele, cu excepția celor care se păstrează pentru efectuarea testelor moleculare.

IV. Examenul microbiologic

Pregătirea probelor

Probele lichide se centrifughează, din sediment se fac frotiuri care se colorează Gram și se însămânțează pe medii de cultură și dispersate cu o ansă sterilă pentru obținerea coloniilor izolate. Inoculați fiecare placă de agar cu tampon sau secreție purulentă.

Dacă este disponibil material suficient, trebuie inoculate și medii de îmbogățire.

Raclajul cornean

Plăcile de agar pot fi inoculate direct lângă pacient. Apoi vor fi transportate imediat la laborator în vederea incubării. În laborator se va face diseminarea cu o ansă sterilă pentru obținerea coloniilor izolate.

Soluțiile pentru lentile de contact

Se transferă fluidul din cutia de depozitare a lentilelor de contact într-un recipient steril. Se procesează la fel ca pentru produsele lichide.

Se șterge bine interiorul cutiei de depozitare cu un tampon steril cu vârf de bumbac umezit cu apă distilată sterilă. Se exprimă lichidul din tampon în fluidul din recipientul steril. Se centrifughează la 800 x g timp de 5 minute. Folosind o pipetă sterilă, se aruncă supernatantul în dezinfectant, lăsând aproximativ 0,5 ml depozit centrifugat. Se resuspendă depozitul centrifugat în lichidul rămas și se pun 2 picături în centrul plăcii cu mediu de cultură.

Un eșantion poate fi păstrat congelat pentru teste moleculare.

Se recoltează probe separat pentru detectarea virusurilor. Raclajul cornean trebuie investigat pentru prezența speciilor *Acanthamoeba* în caz de suspiciune clinică (de exemplu, utilizarea lentilelor de contact sau ulcerării corneene).

Frotiurile și mediile pentru detectarea speciilor de *Mycobacterium* se procesează conform procedurilor specifice pentru micobacterii.

Examenul microscopic

Se efectuează frotiuri colorate Gram.

Cultivare

Tabelul 1. Prelucrarea probelor - mediile de cultură și condițiile de cultivare

Detalii clinice	Tipul de probă	Medii de cultură	Condiții de incubare			Citirea culturilor	Microorganisme țintă
			T °C	Atmosfera	Timp		
<p>Conjunctivită Ochi "lipiți" (cu secreții)</p> <p>Dacă nu există detalii clinice disponibile, tratați ca pe un „ochi cu secreții”</p> <p>Blefarită (asociat cu alte infecții)</p>	Toate tipurile	<p>Agar sânge</p> <p>Agar chocolate</p>	<p>35-37</p> <p>35-37</p>	<p>5-10% CO2</p> <p>5-10% CO2</p>	<p>40-48 h</p> <p>40-48 h</p>	<p>Zilnic</p> <p>Zilnic</p>	<p><i>Haemophilus influenzae</i> streptococci grup Lancefield A, B, C și G <i>Moraxella</i> spp. <i>Neisseria gonorrhoeae</i> <i>Neisseria meningitidis</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i> alte microorganisme</p>
Pentru următoarele situații se adaugă:							
<p>Ochi "lipiți" (cu secreții) în cadrul afecțiunilor genitourinare</p> <p>Nou-născuți</p>	Tampon	Agar selectiv gonococ	35-37	5-10% CO2	40-48 h	≥40 h	<i>N. gonorrhoeae</i>
<p>Imunodeprimăți</p> <p>blefarită cronică</p>	Tampon	Agar Sabouraud	28-30	aerob	40-48 h	≥40 h	Fungi
<p>Canaliculită</p> <p>Celulita orbitală</p> <p>Dacriocistita</p> <p>Dacrioadenită</p> <p>Keratita</p> <p>Endoftalmita</p> <p>Hypopyon</p>	<p>puroi canalicular, umoare apoasă și vitroasă, raclaj corneean</p>	Agar anaerobi fastidioși	35-37	anaerob	<p>40-48 h, poate fi prelungită până la 5 zile</p> <p>10 zile (în caz de suspiciune clinică sau</p>	<p>≥40 h</p> <p>≥40 h, 7 zile și 10 zile</p>	<p>Anaerobi</p> <p>Actinomicete</p>

După intervenții chirurgicale Posttraumatic					evidențiere a bacililor Gram-pozitivi ramificați în frotiul Gram)		
Bacili Gram-negativi prezenți în frotiul Gram	Toate tipurile	Agar CLED	35-37	aerob	16-24 h	≥ 16 h	<i>Enterobacterales</i>

Diagnosticul serologic – poate fi util în cazul uveitelor pentru diagnosticarea bolii Lyme, sifilis, rickettsioză, borrelioză.

De asemenea se pot face teste PCR pentru: virusul herpes 1 și 2, varicelo-zosterian, citomegalovirus, adenovirus, *Acanthamoeba* ș.a. în funcție de disponibilitate.

Testarea sensibilității la antibiotice

Testarea sensibilității la antibiotice se realizează conform capitolului respectiv și a ghidului EUCAST versiunea actualizată.

V. Raportarea rezultatelor

Microscopie

Se comunică prezența leucocitelor și categoria microscopică a microorganismelor detectate.

Se comunică prezența paraziților.

Rezultatul examenului microscopic se introduce în fișa electronică și se validează imediat ce este disponibil.

Rezultatele urgente trebuie să fie transmise telefonic sau electronic, conform protocolului local.

Cultura

Se comunică:

- Microorganismele izolate semnificative clinic sau
- Alte creșteri, de ex. „fără creștere semnificativă” sau
- Absența creșterii

Se raportează prezența sau absența speciilor *Acanthamoeba*, dacă este cazul.

Timpul de raportare a culturii:

- Cererile urgente: telefonic, imediat ce este disponibil.
- Raportul scris: 16–72 ore, precizând, în cazul rezultatelor parțiale, că va fi emis un alt raport.
- Pentru speciile *Acanthamoeba*, raportul scris în ziua a 4-a.

VI. Bibliografie

Bourcier T: Ocular infections. In European Manual of Clinical Microbiology, editors Cornaglia G, Courcol R, Hermann JL, Kahlmeter G, Publisher SFM, 2012:203-214.

Public Health England. (2017). Investigation of Bacterial Eye Infections. UK Standards for Microbiology Investigations. B 2 Issue 6.1.

Depistarea portajului de germeni multidrog rezistenți (MDR)

I. Introducere

Termenul de bacterie multidrog rezistentă se referă la prezența rezistenței dobândite la cel puțin 1 antibiotic din cel puțin 3 clase de antibiotice.

Protocolul de screening este legat de epidemiologia locală și de riscul de transmitere și se bazează pe incidența fiecărui tip de bacterie MDR.

Se consideră bacterii MDR:

- *Staphylococcus aureus* metilino-rezistent (MRSA)
- Enterobacterii rezistente la cefalosporinele de generația 3 (producătoare de ESBL sau AmpC),
- Enterobacterii rezistente la carbapeneme (CRE) sau producătoare de carbapenemaze (CPE)
- *Pseudomonas aeruginosa* multirezistent, rezistent la ceftazidim și/sau carbapeneme, în special tulpinile producătoare de metalo-betalactamaze
- *Acinetobacter baumannii* multirezistent, mai rar alte specii de *Acinetobacter*
- Enterococi rezistenți la vancomicină, speciile *Enterococcus faecalis* și *Enterococcus faecium*

Bacteriile XDR (extensively drug-resistant) sunt bacteriile care au rămas sensibile numai la 1-2 clase de antibiotice.

Bacteriile PDR (pandrug-resistant) sunt bacteriile la care se constată lipsa sensibilității la toate clasele de antibiotice.

Scopul screening-ului este de a cunoaște statusul pacientului pentru:

- A lua măsuri suplimentare față de cele standard
- A identifica rapid orice transmitere în cadrul unității medicale
- A evalua epidemiologia locală
- A efectua decontaminarea nazală, cutanată sau intestinală pre-operatorie.

La ce pacienți este indicată depistarea portajului: vezi ghidul de epidemiologie;

II. Recoltarea probelor

Principiile generale de recoltare includ:

- Înainte de orice spălare sau dezinfecție (în cazul screeningului efectuat din leziuni recoltarea se face ca în cazul plăgilor, după toaleta locală a plăgii);
- Cu tampoane și recipiente sterile;

Tipuri de probe:

- Tamponul nazal - se recoltează cu un singur tampon din ambele nări. Se plasează tamponul în vestibulul nazal și se rotește de 5 ori.
- Tamponul inghinal: tamponul va fi rulat de mai multe ori în pliul dintre perineu și coapsă.
- Tampon din orice orice leziune cutanată/site-uri de cateter/site-uri de drenaj.

- Exsudat faringian, mai ales în cazul suspiciunii de portaj de lungă durată.
- Tampon rectal – tamponul se inseră 2-3 cm prin anus, pe tampon trebuie să fie urme vizibile de materii fecale. Proba poate fi recoltată personal de pacient, asistenta verifică doar prezența materiilor fecale pe tampon. Această probă poate fi înlocuită de probă de materii fecale.
- Materii fecale; la pacienții cu stomă recoltarea se face din orificiul stomei. Dacă însămânțarea este prelungită până la 24 ore, tampoanele vor fi plasate în mediu de transport.

Pentru depistarea MRSA este indicată recoltarea a 2 tampoane: cu un tampon secreția nazală iar cu al doilea tampon se șterg cele 2 axile și cele 2 zone inghinale (dreaptă și stângă).

Pentru ESBL probele de screening recomandate sunt tamponul rectal, perirectal sau materii fecale (Tabelul 1)

Tabelul. 1. Tipurile de probe recoltate în funcție de bacteriile MDR urmărite

Tipul de bacterie MDR	Tipul de probă				
	Tampon rectal / materii fecale	Perineal/ inghinal	Exsudat faringian	Tampon nazal	Altele
MRSA	+ ^a	+++	+++	++++	++/++++ ^b
VRE	++++	++++	(+)	-	++
Enterobacterii MR	++++	++++	+	-	++
<i>Acinetobacter baumannii</i> MDR	+++	++(++)	++++ ^c	(+)	++++ ^d
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> MDR	++	+++	++++ ^c	-	++++ ^d

a – utilitate îndoielnică

b – aspirat traheal de la pacienți ventilați, probe din ulcere cronice, urină de la pacienți cu sondă urinară, tampon axilar

c – spută și exsudat de la traheostomă în loc de exsudat faringian

d – în special probe de secreții din plăgi.

III. Prelucrarea probelor

Metodele utilizate au drept scop obținerea unui rezultat rapid care să poată ghida măsurile de control a răspândirii tulpinii identificate.

Metode de screening:

a. cultura pe medii solide turnate în plăci Petri. Mediile selective cromogene oferă în același timp indicații atât asupra speciei bacteriene cât și asupra rezistenței. Există medii comerciale pentru depistarea MRSA, VRE, ESBL, CRE și de asemenea pentru *Acinetobacter baumannii* MR.

Pentru depistarea tulpinilor producătoare de ESBL se pot folosi și plăci cu agar CLED sau MacConkey cu disc de cefalosporină, metodă care va fi validată local.

b. prin tehnici de biologie moleculară - se depistează rapid gene de rezistență

c. prin îmbogățire - se poate face o îmbogățire în bulion nutritiv cu 2.5% NaCl, pentru MRSA, în paralel cu însămânțarea pe placă. În cazul folosirii unor concentrații de sare mai mari (de ex. 4%) se obține un nivel de selectivitate mai înalt însă cu riscul pierderii unor tulpini de MRSA.

d. cultură în bulion selectiv, cu cefoxitin, pentru MRSA.

După obținerea unui prim rezultat pozitiv prin metode rapide de screening, este important ca în anumite situații să se continue cu testările pentru confirmarea rezultatului:

- identificarea speciei,
- determinarea mecanismului de rezistență și
- testarea sensibilității la alte antibiotice.

Acest lucru este necesar în cazul unor medii care nu permit diferențierea *Enterococcus gallinarum* care conține gena *vanC* de un *E. faecalis* sau *E. faecium*; de asemenea, o enterobacterie hiperproducătoare de AmpC poate fi confundată cu un producător de ESBL. Testarea sensibilității față de antibiotice este importantă în cazul în care se impune tratament pentru reducerea colonizării MRSA.

Atenție!

Testele de latex-aglutinare efectuate din culturi pe medii cromogene pot da rezultate eronate!

Mediile cromogene sunt afectate de expunerea la lumină, iar plăcile trebuie păstrate la întuneric înainte și după inoculare.

IV. Comunicarea rezultatului

Raportul laboratorului trebuie să precizeze:

- pentru ce bacterie a fost făcută testarea
- prin ce metodă
- locul de unde a fost recoltată proba.

În cazul prezenței unei bacterii MDR se raportează:

- bacteria izolată
- fenotipul de rezistență

Un rezultat negativ nu exclude prezența unei bacterii MDR care să fie sub limita de detecție a metodei.

Rezultatele pozitive se anunță către secție și/sau CPCIN/SPIAAM, conform protocolului de comunicare stabilit local.

V. Bibliografie

Cornaglia G, Lawrence C, Martinez-Martinez L: Screening for multidrug-resistant bacteria in healthcare settings. In European Manual of Clinical Microbiology, editors Cornaglia G, Courcol R, Hermann JL, Kahlmeter G, Publisher SFM, 2012:421-425

EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance. Version 2.01, July 2017

Public Health England (PHE) in partnership with the NHS, Investigation of specimens for screening for MRSA, UK Standards for Microbiology Investigations, Issued by the Standards Unit, National Infection Service, PHE, <https://www.gov.uk/uk-standards-for-microbiologyinvestigations-smi-quality-and-consistency-in-clinical-laboratories>. Bacteriology | B 29 | Issue no: 7 | Issue date: 26.05.20

Public Health England (PHE) in partnership with the NHS, Detection of Enterobacteriaceae producing extended spectrum β -lactamases, UK Standards for Microbiology Investigations, Issued by the Standards Unit, National Infection Service, PHE, <https://www.gov.uk/uk-standards-for-microbiologyinvestigations-smi-quality-and-consistency-in-clinical-laboratories>. Bacteriology | B 59 | Issue no: 4.1 | Issue date: 17.08.16

Public Health England (PHE) in partnership with the NHS, Detection of bacteria with carbapenem-hydrolysing β -lactamases (carbapenemases), UK Standards for Microbiology Investigations, Issued by the Standards Unit, National Infection Service, PHE, <https://www.gov.uk/uk-standards-for-microbiologyinvestigations-smi-quality-and-consistency-in-clinical-laboratories>. Technical | B 60 | Issue no: 3 | Issue date: 18.09.2020

Controlul microbiologic al mediului de spital

I. Introducere

Investigarea microbiologică a probelor de mediu din spital are importanță în anumite situații. Trebuie evitat controlul de rutină și extensiv al mediului. Acest proces trebuie să includă un protocol scris, o analiză și o interpretare a rezultatelor precum și o listă a acțiunilor preconizate pe baza rezultatelor obținute.

Testele bacteriologice bazate pe cultivare sunt recomandate doar în situații de focar epidemic, pentru a stabili o eventuală sursă a focarului. Nu este recomandată investigarea mediului din jurul pacienților infectați/colonizați deoarece prezența germenilor în anturajul pacienților este evidentă. Se impune păstrarea curățeniei și igienizarea corespunzătoare a saloanelor pacienților colonizați/infectați pentru a evita transmiterea intraspitalicească a germenilor.

II. Recoltarea

Recoltarea probelor se face conform unui plan care stabilește metodele, locurile și momentul recoltării. Standardizarea acestor parametri este importantă pentru a putea compara ulterior rezultatele obținute.

Recoltarea probelor pentru verificarea sterilității apei

Sterilitatea apei se verifică doar în situația în care se suspicionează o deficiență în procedura de mentenanță a sistemelor de filtrare.

Apa sterilă va fi însămânțată direct într-un recipient cu bulion după o prealabilă flambare a robinetului și lăsarea apei să curgă timp de aproximativ 5 minute.

Se inscripționează recipientul cu numărul probei, locul de recoltă, apoi proba se înregistrează în fișa de recoltare.

Condiții de transport și timp de transport

Probele bacteriologice sunt transportate în ambalaje sterile etanșe. Cu excepția cazului în care în standarde specifice se indică altfel și dacă durata transportului este mai mare de 8 ore, probele se refrigerază (5 ± 3 °C).

Recoltarea probelor de aer

Se va determina compoziția microbiană în aer (numită în unele documente mai vechi microaerofloră) doar din acele încăperi unde riscurile de colonizare/infectare pentru asistați ar putea fi mai mari: săli de operații, săli de pansamente, săli de nașteri, saloane de prematuri etc, în context epidemiologic justificat sau în cazul în care se suspicionează deficiențe în mentenanța sistemului de filtrare, precum și după efectuarea lucrărilor de amenajare/reamenajare.

Punctele care sunt verificate cu prioritate trebuie definite anterior printr-o analiză a riscurilor și raportate în planul locului (plan de eşantionare).

Momentul controlului trebuie să fie compatibil cu activitatea zonei controlate și este definit în planul de recoltare.

Metoda de recoltare activă constă în utilizarea unor echipamente care colectează, analizează (cultivă) și cuantifică particulele conținute într-un anumit volum de aer. Particulele sunt colectate fie într-o soluție lichidă fie pe o suprafață solidă. Pot fi concentrate prin centrifugare sau prin filtrare.

Este recomandat să se poată măsura volumul de aer recoltat. Volume de aer cuprinse între 100 și 1000 de litri permit efectuarea numărării coloniilor pe placa de agar.

Metoda de recoltare pasivă (metoda sedimentării Koch) are sensibilitate redusă, rezultatele de multe ori sunt neconcordanțe, nu este adecvată determinării încărcăturii microbiene și nu se recomandă.

Condiții de transport și timp de păstrare

Condițiile pentru transportul probelor trebuie să asigure supraviețuirea microorganismelor recoltate:

- nu se pun la frigider,
- timpul de transport este de maximum 24 de ore la temperatura camerei.

Recoltarea probelor de pe suprafețe

În principiu recoltarea se poate face prin mai multe metode fie folosind tamponane umectate (în special de pe suprafețe care nu sunt plate, de ex. mânerul ușii) fie prin contactul (amprenta) cu o suprafață de mărime cunoscută a unui mediu de cultură agar. Metoda cu tamponul poate să aibă rezultate mai bune pentru suprafețe intens contaminate, în timp ce metoda plăcii de agar contact este mai potrivită pentru suprafețe cu un număr mai mic de germeni contaminanți.

Totuși, metoda cu tamponul este dificil de standardizat și de aceea trebuie evitată, chiar dacă usurița sa o face frecvent utilizată. Lipsa de reproductibilitate a rezultatelor se explică nu numai prin diferențe între dispozitivele de recoltare utilizate, tipul de suprafață, microorganismul țintă, dar și prin dificultatea de standardizare a presiunii exercitate pe suprafața de recoltare, suprafața ariei recoltate, unghiul cu care este aplicat tamponul pe suprafață, tehnica de recoltare individuală. Acești factori pot duce la o variație în rata de recuperare a microorganismelor între 22% și 58%. De pe tamponanele de tip "flocked" rata de recuperare este mai mare și nu necesită umectare prealabilă.

1. Metoda amprentei pe o suprafață agarizată

Obiectiv: metodă utilizată pentru detectarea microorganismelor viabile și aerobe pe suprafețe plane, solide, netede și uscate, mai degrabă ca parte a unei activități legate de managementul de calitate.

Metodă: recuperarea microorganismelor „detașabile” și cultivabile prin aplicarea directă a unui mediu de agar pe suprafața de prelevat într-un mod standardizat (timpul de contact și presiunea exercitată pe suprafață).

Metoda contribuie la cunoașterea ecosistemului unei anumite zone (aspect calitativ) și permite cuantificarea numărului de microorganisme cultivabile și „detașabile” de pe o suprafață prin metode testate, validate și reproductibile.

Tehnica de recoltare - conform instrucțiunilor producătorului.

Condiții de transport și păstrare a probelor

Condițiile pentru transportul probelor trebuie să asigure supraviețuirea microorganismelor recoltate:

- maxim 24 de ore la temperatura camerei,
- NU se țin la frigider.

În plus, eșantioanele trebuie plasate într-un ambalaj care să evite orice risc de contaminare externă (cutiile colectate în aceeași zonă vor fi grupate într-un „container de transport” pe care se menționează data, ora, locul recoltării probelor).

2. Metoda cu tamponul

Obiectiv: detectarea microorganismelor viabile (aerobe și/sau anaerobe) pe suprafețe neregulate și/sau zone dificil de accesat și/sau pentru cercetări specifice (condiții de cultura particulare, focar, etc.).

Evaluează calitativ flora microbiană.

Apreciază aproximativ numărul de microorganisme prezente (aspect semicantitativ).

Condițiile de cultivare și mediul de cultură pot fi adaptate la microorganismele țintă (de exemplu, *Clostridioides difficile* etc.).

Metodă: Recuperează microorganismele „detașabile” și cultivabile prin tamponarea suprafeței care trebuie prelevată.

Notă: în afară de tampoane, există și alte suporturi de prelevare (bureți, șervețele etc.) care permit prelevarea de suprafețe mari.

Echipamentul folosit :

- tampoane sterile (bumbac sau altele: Dacron, Rayon, poliester), tampoane din spumă sau mai bine din nylon; bureți sau comprese de tifon
- diluant - neutralizator:
 - este utilizat pentru umezirea tamponului și pentru a evita inhibarea creșterii germenilor de către reziduurile de detergenți sau dezinfectanți care ar putea fi prezenți pe suprafețe,
 - poate servi ca mijloc de transport;

Doar tampoanele special concepute pentru probe de pe suprafețe de mediu oferă un mediu de transport cu neutralizator!

- șablon (sterilizabil și/sau dezinfectabil), pentru a garanta o probă de pe o suprafață de dimensiuni identice de la un control la altul sau de la un punct de prelevare la altul, pentru standardizarea tehnicii și obținerea unui rezultat semicantitativ.

Tehnica de recoltare:

- se umezește tamponul folosind un diluant-neutralizator sau un mediu de clătire steril (apă distilată sterilă, ser fiziologic, bulion nutritiv plus neutralizator, tioglicolat pentru detectarea *Clostridioides*): acest pas îmbunătățește eliberarea bacteriilor de pe tampon;

Tampoanele cu capacitate mare de absorbție (flocked swab) nu necesită umidificare prealabilă .

- Se trece tamponul în striuri paralele aproape unul de celălalt pe suprafața de prelevat (delimitată de șablonul sterilizat sau dezinfectat anterior, prin rotirea ușoară a tamponului)
- Se repetă eșantionarea aceleiași zone cu striuri perpendiculare pe prima
- Se așează aseptice tamponul în tubul de transport;
- Se identifică eșantionul;

Atenție! Tamponul, buretele și compresa necesită extracția materialului recoltat pentru a putea fi procesat ulterior. Soluțiile de extracție pot fi: tampon fosfat salin, tampon Butterfield, tampon Butterfield și Tween, diluent neutralizator de extracție. Alegerea soluției de extracție are un impact foarte mare asupra eficienței extracției și influențează direct calitatea rezultatelor.

Condiții de transport și păstrare a probelor

Când timpul dintre recoltare și analiză nu este specificat de producător, tamponul trebuie trimis la laborator cât mai repede posibil în condiții care nu modifică viabilitatea sau numărul de microorganisme, protejate de contaminare, de preferință în mai puțin de 4 ore. Cu toate acestea, spre deosebire de plăcile de contact care nu trebuie refrigerate, tamponul va fi păstrat la 5 ± 3 °C dacă timpul de transport este mai mare de 4 ore. Timpul de transport nu va depăși niciodată 24 de ore.

III. Prelucrarea probelor

Prelucrarea probelor de mediu se face în zone dedicate, separate de spațiile în care se procesează probele de microbiologie clinică!

1. Probele de sterilitate

Apa sterilă va fi însămânțată direct într-un recipient cu bulion nutritiv.

Temperatura, timpul de incubare și atmosfera de incubare:

Tuburile cu bulion nutritiv se incubează 3-5 zile la termostat la 35-37°C;

Incubarea este, în mod convențional, în atmosferă aerobă, dar pentru anumite organisme țintă poate fi necesară fie o atmosferă anaerobă, fie o atmosferă îmbogățită în CO₂.

Citirea culturilor și identificarea microorganismelor indicator:

Se raportează microorganismul/microorganismele identificate sau lipsa creșterii microbiene.

Se consideră probă conformă proba sterilă, fără prezența germenilor de orice tip.

Rezultate

Rezultatele sunt validate de un responsabil autorizat al laboratorului de microbiologie de mediu. Acestea sunt apreciate ca fiind „conforme” sau „neconforme” cu privire la valorile țintă definite în contract și/sau protocoalele unității sanitare.

2. Probele de aer

Obiective

- Cuantificarea microorganismelor florei aere prezentă în proba de aer;
- Izolarea unui posibil microorganism patogen, identificarea acestuia și cuantificarea acestuia.

Temperatura, timpul de incubare și atmosfera de incubare:

Medii de cultură: Alegerea mediilor de cultură și a condițiilor de incubare (temperatură, timp, atmosferă) se face în funcție de microorganismele căutate. În mod obișnuit, se folosește un mediu neselectiv pentru flora bacteriană totală și, dacă este necesar, un mediu specific pentru o căutare țintită a florei fungice:

- Agar R2A sau PCA (plate count agar) pentru flora aerobă
- Agar malț pentru *Aspergillus* spp.

Mediile selective pot fi utilizate pentru cercetări bacteriene direcționate, în special în caz de epidemie.

Incubare: se incubează plăcile de agar pentru cercetarea florei aerobe la 35 ± 2 °C și cele pentru fungi la 22 ± 2 °C timp de 5 până la 7 zile.

Citirea culturilor:

- Prima lectură: după 48 până la 72 de ore de incubare:
 - Se numără flora aerobă totală numărând toate coloniile prezente pe agar,
 - Identificarea bacteriilor potențial patogene utilizând tehnici bacteriologice standard,
 - Dacă sunt prezente drojdii și/sau ciuperci filamentoase: identificați orice colonie suspectată de *Aspergillus* spp. și confirmați identificarea;
 - Plăcile sunt reincubate (în total 5 până la 7 zile); atenție la riscul de invazie a agarului dacă există ciuperci;
 - A doua lectură: după 5 până la 7 zile de incubare:
 - Se numără flora aerobă totală care ar fi putut evolua de la prima lectură și, dacă au apărut noi colonii de bacterii potențial patogene, se identifică în mod similar,
 - Se verifică din nou prezența drojdiilor și/sau a ciupercilor filamentoase și se continuă ca la prima lectură.
- Pentru fungi:
- Prima lectură: după 48 până la 72 de ore de incubare:
 - Se numără coloniile de levuri și/sau ciupercile filamentoase: se identifică orice colonie suspectată de *Aspergillus* și se confirmă identificarea,
 - Dacă nu există ciuperci, plăcile sunt reincubate (5-7 zile în total).
 - A doua lectură: după 5 până la 7 zile de incubare:
 - Se verifică din nou prezența drojdiilor și/sau a ciupercilor filamentoase și se continuă ca la prima lectură.

Rezultate

- Numărul de colonii este exprimat în UFC/m³. Se utilizează tabelul de conversie al dispozitivului utilizat.
- Aspectul calitativ este evaluat în funcție de prezența sau absența microorganismelor potențial patogene.

Rezultatele sunt validate de un responsabil autorizat al laboratorului de microbiologie de mediu. Acestea sunt încadrate ca fiind „conforme” sau „neconforme” cu privire la valorile țintă definite în protocoalele unității sanitare.

3. Probele de suprafețe

Scopul este izolarea unui posibil microorganism patogen în cadrul unei investigații de focar.

Calitatea rezultatelor depinde în mod categoric de calitatea recoltării. Are legătură directă cu tipul de material (plastic, metal, etc.), cu tipul suprafeței (netedă, rugoasă), cu forța de aplicare pe verticală a dispozitivului de recoltare (tampon sau lamă cu agar).

Însămânțarea tamponelor se efectuează fie:

- Direct prin epuizarea tamponului pe mediul (mediile) ales (e);
- După îmbogățire: pentru cercetări vizate, este posibil să se îmbogățească cu bulion selectiv apoi să se inoculeze pe mediu (medii) adecvat (e). (de exemplu se caută VRE după îmbogățire într-un bulion VRE);

Temperatura, timpul de incubare și atmosfera de incubare:

- Incubare la 35 ± 2 °C pentru flora aerobă, la 22 ± 2 °C pentru fungi, timp de 5 până la 7 zile;
- Medii de cultură: agar tripticază soia sau agar pentru numărarea coloniilor (plate count agar, PCA);
- Medii selective pot fi utilizate pentru cercetări specifice, în special în cazul unui focar.

Notă: Rezultatele obținute pot să difere în funcție de mediul de cultură utilizat.

În contextul unei epidemii pot fi necesare condiții și timpi de incubare, precum și medii de cultură specifice.

Citirea culturilor :

Prima lectură: după 48 până la 72 de ore de incubare:

- Se identifică bacteriile potențial patogene cu tehnicile uzuale de bacteriologie;
- Dacă sunt prezente levuri și/sau a fungi filamentoși: se identifică orice colonie suspectă să fie *Aspergillus* și se confirmă identificarea;
- Agarurile sunt reincubate (5-7 zile în total); atenție la riscul invaziei plăcii de agar, dacă există ciuperci;

A doua lectură: după 5 până la 7 zile de incubare:

- Se verifică dacă au apărut colonii de bacterii potențial patogene
- Se verifică din nou prezența levurilor și/sau a fungilor filamentoși și se continuă la fel ca la prima lectură;

Rezultate

Se comunică identificarea microorganismelor potențial patogene.

Rezultatele sunt validate de un responsabil autorizat al laboratorului de microbiologie de mediu.

Căutare specifică pentru fungi filamentoși

Se indică în zonele cu risc crescut de infecție fungică (de exemplu, onco-hematologie, pacienți cu transplant etc.) și care au un sistem de control al contaminării microbiologice a aerului.

Se utilizează medii specifice, de exemplu: agar malț, agar Sabouraud etc.

Aspergillus fumigatus se dezvoltă la 42°C în 48 de ore; se dezvoltă, de asemenea, foarte bine la 36°C sau 30°C, temperaturi disponibile în general într-un laborator, dar trebuie avut grijă să nu se contamineze termostatul (conidii foarte "volatile").

Pentru alte ciuperci filamentoase, incubarea se face la 22 ± 2°C (sau, în lipsa acesteia, la temperatura camerei) timp de 5 până la 7 zile;

Manipularea plăcilor poate duce la o dispersie a conidiilor, creând o însămânțare secundară a mediilor, care distorsionează interpretările ulterioare. De aceea este imperativ să se deschidă plăcile numai dacă sunt pozitive!

IV. Interpretarea rezultatelor

1. Probele de sterilitate

Se consideră probă conformă (probă sterilă), fără prezența germeilor de orice tip.

2. Probele de aer

Fiecare unitate medicală trebuie să evalueze riscurile asociate activităților desfășurate și tipurile de pacienți tratați și să definească nivelul adecvat de risc pentru fiecare zonă.

Prin planul de risc se încadrează spațiile controlate ca fiind de risc scăzut sau neglijabil, risc moderat, risc mare, risc foarte mare, iar pentru fiecare categorie se stabilește nivelul maxim de încărcătură microbiană admis. Exemple de valori admise în funcție de nivelul de risc se regăsesc în tabelul următor:

Nivel de risc al zonei de recoltare	Scăzut/ Neglijabil	Moderat	Mare	Foarte mare
Număr maxim de UFC/m ³	-	100	10	1

În toate cazurile prezența fungilor este considerată neconformă.

Dacă există o abatere de la limitele stabilite, trebuie luate măsuri corective. Numărul microbian (UFC/m³) este supus lipsei reproductibilității, ceea ce ar trebui să facă interpretările prudente.

3. Probele de suprafață

Din cauza rezultatelor puternic influențate de calitatea recoltării, aceste probe nu reflectă exact nivelul de contaminare. Depistarea unui anume patogen (ex. MRSA sau *Aspergillus* spp.) poate oferi informații importante pentru activitatea de control al infecțiilor și pentru investigarea epidemiologică în focar.

Metoda de recoltare este inseparabilă de interpretarea rezultatelor, acestea sunt (pentru punctele din planul de recoltare): absența/ prezența urmată de identificarea patogenilor urmăriți: *S. aureus*, enterobacterii, enterococi etc.

V. Raportarea rezultatelor

Raportul trebuie să conțină:

- Datele de identificare a laboratorului
- Data, tipul probei și locul recoltării
- Datele de identificare a persoanei care a efectuat recoltarea
- Tehnica de recoltare, inclusiv prezența unor agenți neutralizanți sau alte substanțe care ar putea să interfere cu rezultatul analizei
- Motivul recoltării: investigare în focar.
- Tehnica de lucru
- Rezultatul
- Concluzii
- Datele de identificare și semnătura responsabilului de analiză, a șefului de laborator.

VI. Bibliografie

Boulestreau H, Bousseau A, Castel O et al: Surveillance microbiologique de l'environnement dans les établissements de santé - Guide de bonnes pratiques, 2016

Rawlinson S., Ciric L., Cloutman-Green E.: How to carry out microbiological sampling of healthcare environment surfaces? A review of current evidence. J Hosp Infect; 2019, 103:363-374.