



MINISTERUL SĂNĂTĂȚII AL REPUBLICII MOLDOVA

IMSP INSTITUTUL DE FTIZIOPNEUMOLOGIE „CHIRIL DRAGANIUC”

**DIAGNOSTICUL
MENINGITELOR BACTERIENE ACUTE**

Ghid instituțional

Chișinău, 2023

Aprobat prin ordinul IMSP IFP „Chiril Draganiuc” nr.34 din 14.04.2023 Cu privire la aprobarea Ghidului instituțional „Diagnosticul meningitelor bacteriene acute”

Acest ghid instituțional a fost elaborat de către grupul de lucru al Comitetului de elaborare și implementare a protocoalelor clinice instituționale al Consiliului Calității în baza Ghidului național „Diagnosticul meningitelor bacteriene acute” elaborat în cadrul proiectului de cercetare „Studierea rezistenței bacililor gram negativi la antimicrobiene în vederea fortificării sistemului național de supraveghere și control al bolilor transmisibile”.

Autorii ghidului național:

Olga Burduniuc,	d.ș.m., conf. cercet., Agenția Națională pentru Sănătate Publică
Constantin Spînu,	d.h.ș.m., prof. univ., Agenția Națională pentru Sănătate Publică
Greta Bălan,	d.ș.m., conf. univ., USMF „Nicolae Testemițanu”
Gheorghe Plăcintă,	d.h.ș.m., conf. univ., USMF „Nicolae Testemițanu”
Liudmila Bîrcă,	d.ș.m., conf. univ., IMSP Spitalul Clinic Municipal de Boli Contagioase de Copii, USMF „Nicolae Testemițanu”
Tatiana Alexeev,	d.ș.m., conf. univ., USMF „Nicolae Testemițanu”
Elena Manole,	d.ș.m., conf. univ., USMF „Nicolae Testemițanu”
Anatolie Vișnevschi,	d.h.ș.m., prof. univ., USMF „Nicolae Testemițanu”
Veaceslav Guțu,	medic epidemiolog, șef secție Supravegherea epidemiologică a bolilor prevenibile prin vaccinare

Utilizatorii ghidului în cadrul instituției:

- Secția Consultativă
- Secția de internare
- Secția Ftiziopneumologie
- Secția Ftiziologie nr.1
- Secția Ftiziologie nr.2
- Secția MDR nr.1
- Secția MDR nr.2
- Secția Anesteziologie și Reanimatologie
- Laboratorul clinico-diagnostic

CUPRINS

Abrevieri	5
1. Introducere.....	6
2. Fiziopatologie și date clinice în MBA	8
3. Epidemiologia meningitelor bacteriene acute.....	11
4. Diagnosticul de laborator.....	16
4.1. Recoltarea și transportarea prelevatelor biologice (puncția lombară, hemocultura, sânge, lichid peteșial).....	17
4.2. Prelucrarea și analiza prelevatelor biologice (LCR, sânge)	21
4.3. Detectarea, izolarea, identificarea și caracterizarea agenților etiologici ai meningitei bacteriene acute (Examenul microbiologic al LCR)	29
4.3.1. Teste rapide de diagnostic pentru detectarea agenților etiologici ai meningitelor bacteriene acute	29
4.3.2. Izolarea agenților etiologici ai meningitelor bacteriene acute 32	
4.3.3. Identificarea și caracterizarea agenților etiologici ai meningitelor bacteriene acute	35
4.4. Testarea sensibilității la antimicrobiene	38
4.5. Caracterizarea moleculară a principalilor agenți etiologici ai MBA	39
Anexe.....	41
Bibliografie.....	70

ABREVIERI

ADN	Acid dezoxiribonucleic
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
GC	Geloză chocolat
GS	Geloză sânge
Hib	<i>Haemophilus influenzae</i> tip b
IRM	Imagistică prin Rezonanță Magnetică
LA	Latex-aglutinare
LCR	Lichid cefalorahidian
LPS	Lipopolizaharid
MBA	Meningita bacteriană acută
NAD	Nicotinamid adenin dinucleotidul
OMP	<i>eng.</i> Outer Membrane Proteines
OMS	Organizația Mondială a Sănătății
PCR	<i>eng.</i> Polymerase Chain Reaction
PL	Puncție lombară
PMN	Polimorfonucleate
rt-PCR	<i>eng.</i> Real Time PCR
SNC	Sistemul nervos central
TC	Tomografie computerizată
T-I	<i>eng.</i> Trans-Isolate
UFC	Unități formatoare de colonii

1 INTRODUCERE

Meningita bacteriană acută (MBA) este o infecție invazivă a SNC, caracterizată prin inflamația meningelui, determinată de un agent bacterian, care se definește clinic prin prezența simptomelor meningeale (cefalee, rigiditatea cefei, fotofobie) și prezența în lichidul cefalorahidian (LCR) a unui număr crescut al leucocitelor (pleiocitoză).

MBA constituie o cauză majoră de morbiditate și mortalitate, urmată uneori de sechele permanente (epilepsie, retard mental, surditate etc.). Meningita bacteriană se înscrie în continuare pe lista bolilor infecțioase ce reprezintă o problemă importantă de sănătate publică în întreaga lume. Se estimează circa un milion de cazuri de meningită bacteriană anual, rata de mortalitate menținându-se la cote alarmante (~200 000 decese, conform datelor OMS). În pofida atenției acordate pe plan mondial diagnosticului, antibioterapiei și profilaxiei prin vaccinare, rata cazurilor fatale rămâne la 5-10% în țările dezvoltate și 15-40% în țările în curs de dezvoltare; 10-20 % din supraviețuitori rămân cu sechele permanente.

MBA, prin particularitățile sale clinice, evoluează rapid spre deces în absența tratamentului, de aceea identificarea cauzei acestei infecții este o urgență, iar proba de lichid cefalorahidian de la un pacient suspect de meningită trebuie prelucrată imediat în scopul instituirii unei antibioterapii de urgență, de cele mai multe ori bazată pe raționament „empiric”.

În acest context, este necesară o strategie care să permită un diagnostic mai rapid (cu accent pe sensibilitate în regiunile cu incidență înaltă a bolii și cu accent pe specificitate în teritoriile cu incidență joasă), în baza unui algoritm de diagnostic actualizat, care să combine metodele convenționale, ieftine dar laborioase, cu cele moderne, rapide dar și costisitoare.

O altă problemă corelată cu managementul MBA este variabilitatea majoră a agenților etiologici în funcție de timp, arie geografică dar și particularitățile populației afectate (vârstă, starea imună a organismului etc.), impunând o supraveghere epidemiologică permanentă. OMS subliniază importanța supravegherii MBA: „Supravegherea, inclusiv investigația de laborator a cazurilor suspecte, este crucială pentru detectarea precoce a izbucnirilor epidemice și răspunsul corespunzător, clarificarea gravității bolii și evaluarea impactului asupra programelor de imunizare”.

Agenții etiologici ai MBA. Această patologie 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. Astfel, agenții etiologici ai MBA, în ordinea descreșterii frecvenței, sunt: *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, germeni gram-negativi (*Haemophilus influenzae*, *Acinetobacter* spp, *E. coli*, *K. pneumoniae*), *Staphylococcus* spp, alți germeni din genul *Streptococcus*, *Listeria monocytogenes* etc.

Streptococcus pneumoniae și *Neisseria meningitidis* sunt cei mai frecvenți agenți etiologici ai MBA **la adulți**, cuprinzând aproximativ 80% din totalul de cazuri. *Listeria monocytogenes* este al treilea cel mai frecvent germen patogen responsabil de MAB, preponderent la adulții cu vârsta de peste 60 de ani și imunocompromiși (diabet zaharat, administrare de remedii imunosupresante, cancer etc.). Bacilii gram-negativi (*Escherichia coli*, *Klebsiella* și *Pseudomonas aeruginosa*) contribuie la mai puțin de 10% din cazuri. Circa 2% din meningite sunt provocate de *Haemophilus influenzae* și stafilococi. Infecțiile bacteriene mixte, cu mai mult de un agent, apar în mod tipic în 1% din totalul de cazuri de MBA și se observă la adulții cu imunosupresie, care au fracturi craniene sau fistule durale care comunică cu mediul extern, surse de infecții parameningeale (otite și sinuzite) și intervenții neurochirurgicale în antecedente. Meningita bacteriană nozocomială este deseori cauzată de stafilococi (auriu și alb, inclusiv tulpinile rezistente la penicilină) și bacilii gram-negativi.

În general, în funcție de vârstă, se determină următoarea distribuție a celor mai des întâlniți agenți etiologici ai MAB:

- Nou-născuții și copiii până la 3 luni de viață – *Escherichia coli*, *Streptococcus agalactiae* (B), *Staphylococcus* spp., *Proteus mirabilis*, *Proteus morganii*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella* spp., *Streptococcus* spp. (non B), *Enterobacter* spp.
- Copii de vârstă de la 3 luni până la 5 ani: *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* (b), în special în țările în care nu este implementată vaccinarea împotriva infecției cu *Haemophilus influenzae*.
- Copiii mai mari de 5 ani și adulții: *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*.
- Meningitele secundare mai frecvent sunt cauzate de către *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus* spp., *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*.

Meningita cauzată de streptococul β -hemolitic de grup B (*S. agalactiae*) apare cel mai frecvent la nou-născuți, care se pot infecta în timpul nașterii

– de la mama colonizată vaginal sau după naștere – de la mamă sau personalul medical.

Listeria monocytogenes poate determina cel mai frecvent meningită la nou-născuți și la vârstnici. În cazuri rare, alte bacterii pot cauza meningita, de obicei la persoane cu afecțiuni cronice ce determină o diminuare a imunității.

Vaccinările au un rol important în controlul și prevenirea meningitelor bacteriene. Astfel sunt disponibile vaccinuri meningococice, pneumococice și vaccinul pentru prevenirea infecțiilor cauzate de Hib. Utilizarea acestor vaccinuri, în special în țările dezvoltate, a contribuit la scăderea evidentă a ratei de îmbolnăvire cu acești germeni.

2] [Fiziopatologie și date clinice în MBA

Conform caracteristicilor LCR – MBA pot fi:

- MBA purulente sau cu lichid tulbure
- MBA cu lichid clar, care pot apărea în mai multe circumstanțe etiologice (forme fulminante de meningite bacteriene sau cele decapitate de antibiotice (tratate anterior), tuberculoză, în infecții virale.
- Meningite cu lichid hemoragic: în antrax, infecția cu *Listeria* sau cea bacilară.

Căile de afectare a meningelor și de transmitere a bacteriei

O bacterie poate afecta meningele unei persoane pe diferite căi:

- 1) hematogenă;
- 2) diseminare din focare parameningiene: sinusuri paranazale, urechea medie, mastoida;
- 3) prin defecte osoase:
 - *congenitale*: defecte de închidere a tubului neural, mai frecvent la nivel de coloană cervicală sau lombo-sacrată;
 - *achiziționate*: fracturi ale bazei craniului, iatrogen.

O persoană poate achiziționa o bacterie, care ulterior afectează meningele în diferit mod în funcție de tipul bacteriei. Cea mai comună cale de transmitere a bacteriilor este de la persoană la persoană. De notat posibilitatea de transmitere a bacteriei de la purtători, cum are loc în cazul colonizării nazofaringelui cu *N. meningitidis*, fără ca aceștia să fie bolnavi.

Grupul *Streptococcus B* și *E.coli* pot fi achiziționați de copil în timpul nașterii. *H. influenzae*, *M. tuberculosis* și *S. pneumoniae* se vor răspândi prin tuse și strănut, *N. meningitidis* – prin tuse, sărut sau salivă în contextul unei conviețuiri în același spațiu sau contact apropiat cu persoanele purtătoare de

bacterie. *E. coli* va fi contractată pe cale fecalo-orală prin ingerarea alimentelor preparate de persoana care nu a respectat igiena mâinilor după utilizarea toaletei.

În majoritatea MBA, procesul infecțios se declanșează prin atașarea și multiplicarea agentului cauzal la poarta de intrare (mai frecvent — rinofaringe), traversarea barierei mucofaringiene și declanșarea bacteriemiei. Pe parcurs, după supraviețuirea în sânge la acțiunea bacteriolitică și fagocitară — agentul etiologic trece bariera hematoencefalică și provoacă inflamația acută a meningelui (congestie, edem, exsudat).

Meningita bacteriană acută poate fi dificil de diagnosticat după semne și simptome mai ales la sugari și copilul până la 5 ani, acestea fiind adesea nespecifice.

Manifestări clinice

Triada clasică a semnelor și simptomelor clinice ale MBA **la adulți** include febra, rigiditatea mușchilor cervicali și statutul mental alterat. Aceasta însă este prezentă la circa 41-50% de pacienți. Absența semnelor clasice la etapa de prezentare a pacientului la spital nu trebuie să excludă posibilitatea prezenței meningitei.

Manifestările clinice cele mai frecvente ale MBA la copii mai mari de 5 ani și adulți sunt următoarele:

- debutul bolii acut
- febră (39-40⁰C)
- cefalee acută, pronunțată
- vome repetate
- confuzie
- somnolență
- fotofobie
- agitație, iritabilitate, delir
- convulsii
- tulburări de conștientă: somnolență, comă.
- hiperestezie cutanată
- mialgii, artralгии
- semne meningeene pozitive (redoarea mușchilor cervicali, semnele Kernig, Brudzinski).

Complicații și sechele post-meningită la copii și adulți. Sunt mult mai puțin frecvente în prezent datorită antibioterapiei. Apar în cazuri de tratament întârziat. Acestea sunt:

- colecții subdurale;
- abces cerebral;
- ventriculită (piocefalie);
- paralizii de tip central (mono-, hemi-, paraplegii);
- paralizii de nervi cranieni (surditate, cecitate, strabism);
- hidrocefalie;
- edem pulmonar;
- insuficiență renală acută;
- pneumonie;
- hipertensiune intracraniană;
- sechele psihice: depresie, slăbirea memoriei, insomnie, cefalee persistentă etc.;
- sindrom epileptiform.

3] Epidemiologia meningitelor bacteriene acute

Agentul etiologic

S. pneumoniae. Diplococ gram-pozitiv are o capsulă polizaharidă externă peretelui celular. Pe baza diferențelor antigenice ale capsulei, au fost identificate cel puțin 93 de serotipuri. Doar un număr limitat dintre acestea sunt responsabile de boala pneumococică invazivă. Serotipurile identificate au variat în diferite regiuni geografice, la diferite grupe de vârstă, conform cercetărilor de la 6 până la 11 dintre cele mai comune serotipuri cauzează aproximativ 70% din toate infecțiile invazive la copiii din întreaga lume. *S. pneumoniae* apare în mod normal în tractul respirator superior, unde locuiește fără a produce simptome la persoanele sănătoase. Bacteriile devin patogene în mod obișnuit la persoanele cu un sistem imunitar slăbit, cum ar fi sugarii, persoanele în vârstă și persoanele care fumează, și la persoanele a căror funcție imunitară este suprimată, cum ar fi cele cu afecțiuni de bază (de exemplu, diabetul zaharat) și cei care iau medicamente ce slăbesc imunitatea (de exemplu, chimioterapie).

H. influenzae. Cocobacil gram-negativ pleomorf. Această bacterie poate avea sau nu capsulă. Atât tulpinile incapsulate, cât și cele neincapsulate sunt potențial patogene pentru ființele umane, dar diferă prin virulența și mecanismele lor patogene. Capsula conține polizaharidă specifică care le permite să fie clasificate în șase serotipuri antigenice încapsulate a, b,c, d și f (clasificarea Pittman). *H. influenzae* tip b (Hib) este cea mai virulentă, urmată de serotipul a (Hia) și (Hif) care afectează în principal copiii sub doi ani. Bacteria dată este un locuitor comun al nasului și gâtului care poate invada fluxul sangvin, producând meningită, pneumonie și diverse alte boli. Deși alte serotipuri de *H. influenzae* cauzează unele boli, tipul b este responsabil pentru

majoritatea cazurilor severe de *H. influenzae* la copiii sub cinci ani. Aproape toate studiile pe populație indică faptul că > 97% din meningita cu *H. influenzae* se datorează Hib. La copii este cea mai frecventă cauză de epiglottită acută, o infecție în care țesutul din spatele limbii devine rapid umflat și obstrucționează căile respiratorii, creând o afecțiune potențial fatală. *H. influenzae* este, de asemenea, cea mai frecventă cauză de meningită și pneumonie la copiii sub cinci ani și se știe că provoacă bronșită la adulți.

N. meningitidis. Diplococ gram-negativ incapsulat care poate apărea extracelular și intracelular în leucocitele polimorfonucleare (PMN). Condițiile optime de creștere sunt temperaturile 33-37°C, 5% CO₂ și 50% umiditate relativă. Cu diferențe în compoziția lor, au fost identificate treisprezece serogrupuri de meningococ, iar șase (A, B, C, W, Y, X) sunt cele mai frecvent asociate cu boală. *N. meningitidis* colonizează mucoasa nazofaringelui și se transmite prin contact direct cu secrețiile tractului respirator cu picături mari de la pacienți sau purtători asimptomatici. Ratele de purtător nazofaringian sunt cele mai mari la adolescenți și adulții tineri, care servesc drept rezervoare pentru transmiterea *N. meningitidis*. Boala invazivă este o consecință a colonizării nazofaringiene.

Rezervor și mecanisme de transmitere

Ființele umane sunt singurul rezervor de *S. pneumoniae*, *H. influenzae* și *N. meningitidis*. Transmiterea acestor patogeni se face prin contact direct (de la persoană la persoană) sau prin contact cu secrețiile nazofaringiene (picături) ale persoanelor infectate.

Distribuție și sezonabilitate

Distribuția *S. pneumoniae*, *H. influenzae* și *N. meningitidis* este globală. În ceea ce privește sezonabilitatea lor, cea mai mare incidență este iarna și primăvara în Europa și Statele Unite. În Africa Centrală Subsahariană, cazurile tind să atingă vârful în timpul sezonului uscat. Distribuția bolii cauzată de infecția meningococică este foarte specifică în funcție de regiune cu variații în serogrupuri, perioadele de vârf de-a lungul anului și incidența.

- ***S. pneumoniae*** este prezent în toate climatele și în toate anotimpurile. Temperatură, țările se confruntă cu o incidență mai mare a pneumoniei pneumococice iarna și primăvara.
- ***H. influenzae*** nu prezintă, în general, o sezonabilitate bine definită. Cu toate acestea, studiile efectuate în epoca pre-vaccin descriu vârfuri în lunile de toamnă și primăvară în țările cu climă temperată.
- ***N. meningitidis*** serogrupul A este agentul cauzal cu cea mai mare incidență la nivel mondial care provoacă boli invazive la sugarii sub 1 an. Cea mai

afectată zonă geografică este Africa Subsahariană. Serogrupurile B și C cauzează majoritatea cazurilor în Europa și emisfera americană, în timp ce serogrupurile A și C sunt cea mai frecventă cauză de boala cauzată de infecția meningococică în Asia și Africa. De la mijlocul anilor 1990, au fost observate creșteri ale cazurilor de boala cauzată de infecția meningococică din serogrupul Y în Statele Unite și Israel, în timp ce serogrupul X a provocat epidemii locale în Africa sub-sahariană. Mai mult, un număr tot mai mare de infecții cu serogrupul W a fost identificat în SUA din 2007.

Factorii de risc și susceptibilitate

Susceptibilitatea la *S. pneumoniae*, *H. influenzae* și *N. meningitidis* este universală, cu alte cuvinte, toți oamenii sunt susceptibili la infecțiile cauzate de acești agenți. Cu toate acestea, anumite condiții pot crește susceptibilitatea unei persoane la aceste bacterii și la bolile invazive pe care le provoacă.

Infecția cu pneumococ este cea mai frecventă la copiii cu vârsta cuprinsă între două luni și 3 ani, deși scade după 18 luni. Riscul crește din nou de la vârsta de 65 de ani. Riscul de infecție cu Hi este cel mai mare la copiii cu vârsta cuprinsă între două luni și 3 ani și scade după vârsta de 2 ani. În țările în curs de dezvoltare, cea mai mare incidență este la copiii cu vârsta sub 6 luni, în timp ce în țările dezvoltate acest vârf se observă la copiii cu vârsta cuprinsă între 6 și 12 luni. Infecția este mai puțin frecventă după vârsta de 5 ani. În ceea ce privește meningococul, cele mai mari rate de cazuri sunt raportate la copiii sub 1 an, cu un vârf în acest grup în intervalul de la 3 la 5 luni. Totuși poate afecta și adolescenții și adulții tineri. Ca și alte microorganisme infecțioase din aer, pe lângă vârstă, și alte afecțiuni crește riscul de infecții cu pneumococ, Hi și meningococ: supraaglomerare, sărăcie, expunere activă sau pasivă la tutun și infecții concomitente ale căilor respiratorii superioare. Purtătorii unor boli cronice prezintă, de asemenea, un risc mai mare de infecții cauzate de aceste bacterii.

Imunitate

Imunitatea la *S. pneumoniae*, *H. influenzae* și *N. meningitidis* poate fi dobândită pasiv (transplacentar) sau activ prin infecție sau imunizare anterioară. Nou-născuții pot avea anticorpi împotriva pneumococului din cauza transmiterii pasive de la mamă. Acești anticorpi dispar în câteva luni, coincidentă cu creșterea bolilor invazive. După vârsta de 18 luni, copiii prezintă răspunsuri imune specifice la majoritatea serotipurilor de pneumococ circulant din cauza expunerii repetate.

Începând cu vârsta de 5 ani, majoritatea copiilor nevaccinați au anticorpi

anticapsulari *H. influenzae* din cauza expunerii la bacterie.

În ceea ce privește meningococul, există un răspuns imun de durată necunoscută în urma infecțiilor clinice și subclinice și care crește odată cu vârsta.

Statutul de purtător

S.pneumoniae, *H.influenzae* și *N.meningitidis* sunt în general agenți de colonizare nazofaringian la persoanele asimptomatice, care sunt considerate purtători. Se estimează că între 4 și 35% dintre adulții sănătoși neimunizați sunt purtători *H.influenzae*. Procentul purtătorilor este mai mare în rândul copiilor preșcolari.

Infecția pneumococică este precedată de colonizarea nazofaringiană asimptomatică de durată variabilă. Perioada în care o persoană este purtătoare și sursă de transmitere de la persoană la persoană s-a dovedit adesea a fi între o lună și cinci ani (în medie șase luni). Prevalența purtării pneumococului este mai mare la copii, în special cei care frecventează centrele de zi și la adulții aflați în contact strâns cu aceștia.

Se estimează că practic toți copiii au fost purtători de pneumococ cel puțin o dată în etapa preșcolară. S-a observat că vaccinurile conjugate reduc numărul de purtători cu tulpini incluse în vaccin și asta pare să aibă o relație directă cu capacitatea de a produce anticorpi antipolizaharidici IgA și IgG. Totuși studiile efectuate după introducerea vaccinului nu au detectat o reducere a procentului de purtători în populație, dar au constatat că serotipurile au fost înlocuite cu alte serotipuri non-vaccinale.

Pneumococul colonizează de obicei mucoasa nazofaringelui, a cărei prezență la adulți sănătoși poate atinge 5-10%, la copii 20-40%, iar în unele cazuri 50-70%, în special în colectivele de copii. Rata portajului este crescută în perioada de iarnă, având o durată de la 2-4 săptămâni până la 2-5 ani. Bacteria *S. pneumoniae* este prezentă permanent în cavitatea bucală, nazală, faringiană, este flora normală a tractului respirator superior.

Bacteria *H. Influnezae* type b (Hib) este prezentă permanent în cavitatea nazală sau faringe. Copiii infectați pot fi purtători ai bacteriei Hib fără a prezenta careva semne sau simptome de boală. Tratamentului preventiv vor fi supuși doar contacții conform următoarelor categorii:

- Contacții familiari:
 - Contactele familiale sunt definite ca persoane care locuiesc cu persoană bolnavă.
 - Nerezidenții care au petrecut cumulativ 4 sau mai multe ore cu persoana

bolnavă pentru cel puțin 5 din cele 7 zile anterioare zilei de confirmare a persoanei bolnave.

Chimioprofilaxia este recomandată atunci când o persoană este un contact familial al persoanei bolnave, așa cum este descris mai sus și se încadrează în următorul grup de persoane:

- vârsta mai mică de 4 ani și este neimunizat sau incomplet imunizat;
- vârsta mai mică de 12 luni și nu a primit seria primară completă de vaccin Hib;
- este un copil imunodeprimat, indiferent de starea de imunizare a copilului.

Chimioprofilaxia în grup (copii, personal) de persoane este recomandată atunci când:

- două sau mai multe cazuri apar într-un grup de îngrijire a copiilor (creșă/grădiniță) în decurs de 60 de zile;
- copiii neimunizați sau incomplet imunizați care frecventează instituția.

Purtătorii de meningococ sunt considerați sursa principală și rezervorul agentului patogen în natură, pentru infecția meningococică. Aceasta se explică prin numărul mare de purtători sănătoși în rândul populației umane. Durata portajului constituie 2-3 săptămâni și numai la persoanele cu procese inflamatoare ale nazofaringelui — până la 5-6 luni.

Persoanele care au contactat cu bolnavul vor fi supuse supravegherii medicale timp de 10 zile, cu examinarea zilnică, măsurarea de două ori pe zi a temperaturii corpului, examinarea nazofaringelui și a tegumentelor cu implicarea otorinolaringologului.

Persoanele contactante în colectivitățile pentru copii sunt examinate bacteriologic de două ori, la intervale de 3-7 zile, iar cele din focarele familiale — o singură dată.

Purtătorii de meningococi vor fi supuși tratamentului la fel ca și bolnavii cu nazofaringită meningococică, urmând un control bacteriologic după 3 zile de la finisarea tratamentului. La izolarea repetată a meningococilor, se repetă cura de tratament cu alt tip de antibiotic.

Tratamentul va fi aplicat în conformitate cu protocoalele clinice naționale.

Clasificarea cazurilor:

Infecția provocată de *Neisseria meningitidis*.

Posibil: Caz care îndeplinește criteriile clinice de boală meningococică.

Probabil: Un caz care îndeplinește criteriile clinice de boală

meningococică și are legătură epidemiologică cu un caz confirmat sau cu un caz care îndeplinește criteriile de sindrom clinic invaziv.

Confirmat: Caz care îndeplinește criteriile clinice și cel puțin unul din criteriile de laborator.

Infecția provocată de *Haemophilus influenzae* tip b.

Posibil: Un caz cu epiglotită clinică fără confirmare în laborator sau cu o identificare doar dintr-un loc nesteril.

Probabil: Un caz compatibil cu descrierea clinică, cu detectarea antigenului, astfel cum e indicat în criteriile de laborator.

Confirmat: Un caz compatibil cu descrierea clinică și confirmat în laborator.

Infecția provocată de *Streptococcus pneumoniae*.

Posibil: Un caz compatibil cu descrierea clinică fără confirmare în laborator sau cu identificare într-un loc nesteril.

Probabil: Un caz compatibil cu descrierea clinică și detectarea antigenului *S. pneumoniae* într-un biosubstrat fiziologic steril (Reacția de latex-aglutinare).

Confirmat: Un caz compatibil cu descrierea clinică și confirmat în laborator.

4] [Diagnosticul de laborator

Confirmarea suspiciunii clinice de meningită prin investigații de laborator (izolarea, identificarea și caracterizarea agentului cauzal) este un pas foarte important, fiind esențial pentru aplicarea măsurilor de prevenire și tratament ale acestei maladii.

Etapele importante ale diagnosticului de laborator (algoritmul de diagnostic – vezi Anexa 1) sunt:

- 1) recoltarea și transportarea prelevatelor biologice;
- 2) prelucrarea și analiza prelevatelor biologice;
- 3) detectarea, izolarea, identificarea și caracteristica agenților etiologici ai meningitei bacteriene acute.

4.1. Recoltarea și transportarea prelevatelor biologice (vezi Anexa 2)

Recoltarea probei înainte de începerea terapiei antimicrobiene crește sensibilitatea metodelor de diagnostic (izolarea și identificarea agentului cauzal al meningitei). Temporizarea transportării sau a procesării probei întârzie obținerea diagnosticului și alterează calitatea probei (scad numărul PMN, viabilitatea bacteriilor fragile). Este preferabil de recolectat materialul

înainte de antibioterapie. Cu toate acestea, tratamentul bolnavului nu trebuie întârziat așteptând recolectarea specimenelor.

N.meningitidis, *S.pneumoniae* și *H.influenzae* sunt bacterii pretențioase și sensibile la acțiunea factorilor de mediu. Lichidul cefalorahidian (LCR) trebuie să fie procesat în laboratorul microbiologic timp de o oră după recoltare sau inoculat în mediu de transport T-I (Trans-Isolate), dacă procesarea timp de o oră nu este posibilă. Sângele trebuie inoculat imediat în flaconul cu mediul de cultură și transportat la laboratorul microbiologic cât de repede este posibil pentru incubare.

Puncția lombară (PL)

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 microorganisme din LCR poate fi $<10^3$ UFC/ml, concentrarea acestora prin centrifugarea LCR crește sensibilitatea diagnosticului rapid prin examenul frotiului Gram. Examinarea LCR prin puncție lombară este o parte indiscutabilă și indispensabilă a evaluării pacienților care prezintă simptome și semne de meningită, cu excepția cazurilor în care procedura este contraindicată din motive de siguranță. La pacienții îngrijiți în spital, tratamentul cu antimicrobiene în MBA trebuie luat în considerare înainte de analiza LCR doar dacă PL este contraindicată sau dotările pentru imagistică cerebrală rapidă (tomografie) înainte de PL nu sunt disponibile imediat. O tomografie computerizată normală la un pacient cu manifestări clinice de herniere cerebrală (dereglări de respirație, instabilitate hemodinamică (tensiune arterială, puls dereglate), tulburări de conștiență, leziuni de nervi cranieni) nu garantează lipsa riscului legat de procedura în cazul efectuării PL. La toți pacienții la care urmează a fi efectuată PL trebuie examinat fundul de ochi pentru excluderea semnelor indirecte de edem cerebral (de ex., ștergerea marginilor papilei nervului optic). În toate cazurile de MBA, hemocultura trebuie obținută înainte de administrarea oricărui tratament.

Recoltarea LCR reprezintă o manoperă invazivă care trebuie efectuată doar de personal cu experiență, fiind de competență exclusivă a specialiștilor infecționiști, neurologi sau neurochirurghi. În cazul suspjecției la meningită, LCR este specimenul clinic ideal utilizat pentru izolarea și identificarea agentului etiologic.

Recoltarea LCR are o indicație majoră în suspiciunea de meningită și se efectuează imediat la internare.

Contraindicațiile puncției lombare în cazurile de suspiciune de meningită acută bacteriană:

Absolute (puncția lombară nu este recomandată)

- 1) semne de creștere a presiunii intracraniene (edem papilar, postura de decerebrare);
- 2) infecție locală a pielii pe traseul acului (regiunea lombară a coloanei vertebrale);
- 3) dovezi de hidrocefalie obstructivă, edem cerebral sau herniere la scanarea TC (sau IRM) cerebrală.

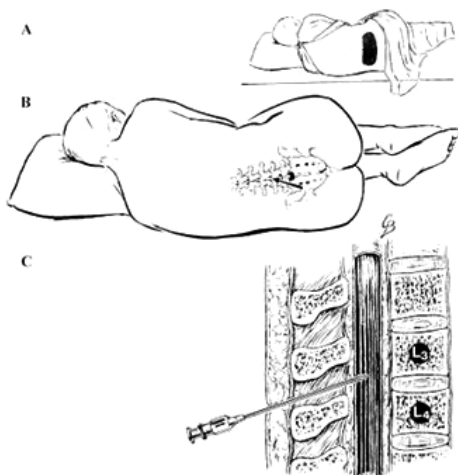
Relative (înainte de puncția lombară sunt indicate măsuri și/sau investigații terapeutice potrivite)

- 1) sepsis sau hipotensiune (tensiunea sistolică <100 mmHg, tensiunea diastolică <60 mmHg); pacienții trebuie mai întâi stabilizați;
- 2) tulburări de coagulare (coagulopatie intravasculară diseminată, nr. trombocite $<50,000$ mm³, utilizarea warfarinei în intervalul terapeutic cu INR 2-3); sunt necesare corecții mai întâi;
- 3) prezența deficitului neurologic focal, îndeosebi când este suspectată o leziune în fosa posterioară;
- 4) scor Glasgow de 8 sau mai puțin;
- 5) crize epileptice.

În toate aceste cazuri, efectuarea TC sau IRM cerebral ar trebui să constituie primul pas. Leziunea izolată a unui singur nerv cranian fără edem papilar nu contraindică în mod necesar PL fără imagistică cerebrală.

Recoltarea LCR se execută la patul bolnavului, prin rahicenteză, în condiții stricte de asepsie pentru securitatea pacientului, precum și pentru securitatea microbiologică a probei față de contaminarea cu flora cutanată. Bolnavul este așezat în decubit lateral, în poziția de „cocoș de pușcă“ (cu genunchii apropiati de bărbie) (fig. 1).

Pielea bolnavului se dezinfectează cu alcool 70% și apoi cu tinctură de iod pe o suprafață pătrată cu latura de 20 cm. Medicul se spală pe mâini și apoi își pune două mănuși sterile. După aproximativ două minute, timp necesar acțiunii de dezinfecție, se face puncția prin pătrunderea în spațiul intervertebral L3-L4, L4-L5 sau L5-S1 fie cu seringă cu acul lung (de 8-10 cm pentru adult și 6-7 cm pentru



copil), fie numai cu acul lung steril.

Figura 1. Colectarea LCR prin puncție lombară

Se preferă ace speciale pentru puncții rahidiene sau, în lipsa lor, ace sterile de oțel inoxidabil, cu bizoul scurt și bine ascuțit, prevăzute cu un mandren, care la un capăt să nu depășească vârful acului, iar la celălalt capăt să fie îndoit în dreptul pavilionului. Se introduce mandrenul în ac în mod steril, se apucă acul de pavilion, prin intermediul unei comprese sterile și se pătrunde în spațiul intervertebral. Pătrunderea în spațiul subarahnoidian este însoțită de senzația de a fi ajuns într-un spațiu gol și de scurgere a LCR. Se recoltează în tuburi sterile minimum 1 ml sau 3-5 ml, dacă este posibil.

Volumul necesar este de 5-10 ml pentru adulți și de 2-5 ml pentru copii și se recoltează de obicei în 3 tuburi: 2-5 ml pentru examenul microbiologic și citologic (inclusiv 0,5-1 ml pentru biologie moleculară, minim 1 ml LCR pentru cultivare în sistem automat, 1 ml pentru detecție antigene bacteriene libere/ latex aglutinare), 2-3 ml pentru teste biochimice și 0,5-1 ml pentru teste imunologice. Cantitatea minimă admisă în lucru, exclusiv pentru diagnostic bacteriologic, este de 1-2 ml. Analiza LCR se repetă numai la pacienții care nu răspund în 48 de ore la tratamentul antimicrobian. PL este de obicei recomandată a fi repetată la pacienții cu meningită pneumococică determinată de tulpini penicilin-rezistente sau cefalosporin-rezistente și care au primit tratament cu dexametason și vancomicină.

Specimenele se transportă la temperatura de 20-35°C și se procesează cât mai repede posibil (în maximum 15 min.). Temporizarea examinării duce la distrugerea celulelor. Se va evita expunerea la temperaturi extreme (refrigerare, căldură excesivă), lumina soarelui. Cei mai influențați de intervalul prelevare-examinare sunt germenii sensibili (haemophilus, meningococii și pneumococii, care suferă fenomenul de autoliză) și leucocitele polimorfonucleare.

Stocarea LCR este admisă la temperatura camerei, mai puțin de 24 de ore, cu riscul autolizei germenilor sensibili. În situația în care probele nu pot fi prelucrate imediat, se recomandă:

- inocularea LCR în mediul T-I (Trans-Isolate)
- dacă nu dispuneți de mediul T-I, atunci LCR se incubează la 35°C cu 5% CO₂.

Inocularea și transportarea mediului T-I

Mediul T-I este un mediu bifazic care este utilizat pentru cultura primară de meningococi și alți agenți etiologici ai meningitelor bacteriene (*S. pneumoniae* și *H. influenzae*) din LCR. Acest mediu poate fi folosit ca mediu de creștere și

mediu de transport. Metoda de preparare a mediului T-I este descrisă în anexa 12. Mediul T-I se păstrează la temperatura de 4°C și este încălzit la temperatura camerei (25°C), înainte de utilizare.

Procedura:

1. Etichetează flaconul cu mediul T-I cu informația corespunzătoare: numele pacientului, data, timpul de inoculare a LCR și numărul unic de identificare.
2. Utilizează forcepsul steril pentru înlăturarea capacului din aluminiu și dezinfectează dopul de cauciuc cu alcool 70% (nu utilizați iod-povidonă), după care se lasă să se usuce.
 - Nu utilizați dezinfectanții care conțin iod, deoarece pot fi introduși în mediu cu acul și inhiba creșterea microorganismelor.
 - Nu îndepărtați complet capacul din aluminiu.
3. Cu o seringă și un ac steril inoculați 0,5-1,0 ml de LCR în mediul T-I. Restul LCR se păstrează în tubul de colectare. Acesta nu se refrigerază, dar se păstrează la temperatura camerei (20-25°C) până la efectuarea frotiului gram sau alte teste.
4. După inoculare, agitați flaconul cu mediu T-I de câteva ori.
5. Dacă transportarea în laboratorul de referință întârzie (următoarea zi sau mai mult), introduceți un ac de ventilare prin dopul de cauciuc al flaconului cu mediu T-I, ceea ce va stimula creșterea și viabilitatea bacteriilor.
 - Asigurați-vă că acul de ventilare nu atinge bulionul.
6. Incubați mediul T-I inoculat la temperatura de 35-37°C cu ~5% CO₂ (sau într-un borcan cu lumânare) peste noapte sau până când este posibilă transportarea. Dacă transportarea întârzie mai mult de 4 zile, scoateți flaconul cu mediu din termostat sau din borcanul cu lumânare și plasați-l la temperatura camerei până la expediere.
7. Îndepărtați acul de ventilare și ștergeți dopul de cauciuc cu alcool 70%, înainte de expediere.
8. Dacă flacoanele cu mediul T-I sunt transportate în laboratorul de referință în aceeași zi, atunci nu ventilați flacoanele până când acestea nu ajung în laborator.

Hemocultura – recomandată a fi efectuată în sistem automat, de ex. BacT/Alert, BACTEC etc.

Recoltarea, procesarea și interpretarea hemoculturii sunt descrise în ghidul „Principii și proceduri în testarea microbiologică a hemoculturilor”.

Sânge. Recoltarea sângelui se face prin venipunctură, fără anticoagulant, în vacutainer, cu respectarea condițiilor de sterilitate. Se realizează coagularea la

temperatura camerei sau în incubator la 37° C pentru minim 1h, urmată de separarea serului, care va fi utilizat pentru testele convenționale, precum și pentru teste imunologice și serologice.

Lichidul peteșial. Aspirația lichidului peteșial în meningococemie este o investigație foarte puțin utilizată în ultima vreme. Un studiu efectuat a demonstrat că peteșiile de la 2/3 din pacienți conțin meningococi; aceștia au putut fi văzuți în frotiul colorat Gram sau în cultură. Antibioticele nu afectează vizualizarea meningococilor în aspiratele din piele. Această investigație este utilă prin aceea că poate fi făcut un diagnostic al meningocociemiei atunci când semnele clinice exclud puncția lombară.

Exsudat nazofaringian. Recoltarea, procesarea și interpretarea rezultatelor sunt descrise în ghidul „Diagnosticul microbiologic al infecțiilor tractului respirator”.

Criterii de acceptare a probelor și de alegere a testelor. Probele din tuburi cu scurgeri trebuie procesate, dar se avertizează medicul despre posibilitatea contaminării. Dacă proba are un volum insuficient, se aplează medicul pentru a stabili prioritatea testelor cerute. *Mycobacterium tuberculosis* este mai bine diagnosticat prin PCR, comparativ cu alte metode rapide.

4.2. Prelucrarea și analiza prelevatelor biologice

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

Analiza LCR rămâne metoda de referință pentru diagnosticul meningitei. Procedura referitoare la investigarea bacteriologică a LCR este una dintre cele mai urgente probe de microbiologie clinică, dată fiind gravitatea deosebită a infecțiilor sistemului nervos central (mortalitate mare și sechele grave), sensibilitatea principalilor agenți cauzali la variațiile de mediu și temperatură, precum și terapia antimicrobiană ținută, corectă, benefică în cele mai multe din cazuri. Acest examen se execută ori de câte ori este prezent un sindrom meningeal, un sindrom neuronal sau o stare de intoxicație gravă.

Lichidul cefalorahidian normal este un fluid steril, incolor și clar care conține cel mult 5 celule/mm³, 50-70 mg/dl (2,0-4,4 mmol/l) glucoză, 15-40 mg/dl (0,15-0,33 g/l) proteine, 680-730 mg/dl (7,0-7,5 mmol/l) cloruri.

În momentul recoltării se pot face aprecieri asupra presiunii și aspectului lichidului (transparență, culoare, fluiditate):

Presiunea LCR. Presiunea LCR nu depășește 250 mm H₂O; aceste valori pot fi mai scăzute la nou-născut, sugar și copii cu MBA.

Presiunea este:

- **normală:** în meningite limfocitare benigne, scleroza în plăci, encefalite, poliradiculonevrite,
- **ușor crescută:** în meningita luetică și unele meningite limfocitare,
- **foarte crescută:** în meningite bacteriene și meningita tuberculoasă,
- **scăzută** în blocaje spinale.

La o presiune normală, LCR se elimină prin acul de puncție cu o viteză de 60 de picături pe minut, la mărirea presiunii lichidul se elimină ca o șuviță. De rutină tensiunea este determinată la începutul și la sfârșitul puncției.

Densitate – se determină cu picnometrul. Valori normale – 1002-1008. Valori crescute se observă în meningite și encefalite, valori scăzute – în hidrocefalie.

Transparență — în mod normal LCR este transparent, clar ca „apa de stâncă”. Clară poate fi în meningitele seroase, virale; opalescent în meningitele virale și turbure purulent în meningitele bacteriene purulente. În meningita tuberculoasă este mai frecvent clar, la fel și la începutul celor bacteriene.

Culoare – în condiții fiziologice, LCR este incolor. Culoarea poate fi apreciată la comparația cu apă distilată în eprubete incolore de diametru egal.

Culoare roșie (lichid hemoragic, eritrocromie), aspect roșietic sugerează prezența sângelui. Amestecul de sânge poate fi cauzat sau de o hemoragie subarahnoidiană, sau de penetrarea unui vas sangvin în momentul puncției. În aceste cazuri trebuie eliminată posibilitatea unui incident de puncție. În cadrul unui incident de puncție, intensitatea culorii treptat se va micșora de la prima până la a treia eprubetă, și invers, în hemoragii subarahnoidiene lichidul va fi de culoare roșie uniformă în toate eprubetele.

Prezența eritrocitelor în lichid poate fi apreciată macroscopic (vizual) prin aspectul roșietic, în acele cazuri când numărul lor depășește 500 într-un mkl. O cantitate mai mică de eritrocite poate fi determinată doar la examenul microscopic. În unele cazuri pentru diferențierea sângelui proaspăt din LCR de cel mai vechi se recurge la centrifugare. Dacă sângele din lichid este proaspăt (un incident de puncție, cu penetrarea unui vas sangvin, hemoragii meningiene recente) centrifugatul este incolor, iar dacă sângele există în lichid de mai multă vreme (câteva ore), centrifugatul este de culoare roză, ușor gălbuie sau chiar xantocromică (colorat în galben până la maro). Lichidul cu un conținut

considerabil de sânge poartă numirea de lichid hemoragic, iar cu o cantitate redusă — sangvinolent.

În toate cazurile când în LCR se stabilește prezența sângelui (lichid hemoragic), apare problema necesității examenului de laborator al acestui lichid. De notat că rezultatele examenului de laborator al lichidului hemoragic nu reflectă corect valorile indicilor studiați și trebuie interpretate atent.

De obicei lichidul hemoragic poate fi întâlnit în: hemoragie cerebrală, hemoragie meningiană (subarahnoidiană), traumatismelor SNC ș.a.

În dinamică (independent de etiologie și gradul hemoragiei), eritrocitele treptat sunt scoase din lichid: peste două zile 25-50%, peste 3-4 zile 52- 97% din cantitatea eritrocitelor stabilită în prima zi. La pacienții cu traumatism craniocerebral, eritrocitele dispar din LCR la 5-10-a zi.

Există două mecanisme de îndepărtare a eritrocitelor din LCR:

I — eritrocitele nemodificate morfologic din spațiul subarahnoidian trec în spațiul subdural și apoi în vasele sangvine;

II — fagocitarea eritrocitelor de către celulele arahnoidoteliului tunicilor meningiale. În rezultatul hemolizei eritrocitelor, hemoglobina sub influența enzimelor se transformă în bilirubină. Bilirubina pătrunde în spațiul subarahnoidian, oferind lichidului culoarea galbenă. În așa mod apare xantocromia LCR.

Xantocromia prezintă un sindrom lichidian care se caracterizează prin colorarea LCR în galben sau galben-marou și este cauzat de apariția produselor degradării hemoglobinei — bilirubinei. Xantocromia poate fi de natură hemoragică sau de stază. Xantocromia hemoragică poate apărea în primele câteva ore după hemoragie, uneori peste 1,2,3 zile și nu prezintă un semn de hemoragie veche (învechită). Nivelul xantocromiei crește treptat și dispare peste 10-14 zile și nu este asociat de majorarea pronunțată a valorilor proteinelor.

Xantocromia de stază apare ca rezultat al reducerii vitezei curentului sangvin în vasele creierului, ce cauzează pătrunderea plasmei colorate în galben prin pereții vasculari cu permeabilitatea crescută în lichid. Xantocromia de stază este mai stabilă și asociată de majorarea pronunțată a valorii proteinelor din LCR.

Culoarea verde a LCR apare în rezultatul oxidării bilirubinei în biliverdină sub influența enzimelor din leucocite (puroi). De obicei, lichidul verde și turbid-purulent se întâlnește în meningitele purulente.

Examenul microscopic (elementele celulare)

Examenul citologic are scopul de a determina citoza — evaluarea cantitativă a numărului de elemente în lichidul necentrifugat (la mm^3) după numărarea făcută în camera Fuchs-Rozenthal sau Goreaev. Importanța clinică are în primul rând evaluarea numărului de leucocite și diferențierea lor în preparate colorate (Anexa 13).

Numărarea eritrocitelor în camera de numărat

Principiul se bazează pe numărarea directă, la microscop, în camera de numărătoare pentru eritrocite. Numărarea se efectuează în orice cameră (Burker, Goreaev, Fuchs-Rozenthal, Toma, Neibauer ș.a.) care au diverse volume și pătrate de numărat. În Republica Moldova este preferată camera Goreaev și se procedează la fel ca și la numărarea elementelor sângelui.

Valori normale — eritrocite absente. Prezența eritrocitelor sugerează hemoragia subarahnoidiană sau penetrarea unui vas sangvin. Pentru diagnosticarea hemoragiilor intracraniene are importanță nu numai prezența eritrocitelor în LCR, ci și creșterea numărului lor în punctiile repetate.

Diferențierea elementelor celulare în camera de numărat

Această metodă este preferată mai frecvent în activitatea cotidiană. În camera de numărat (ocular x 10 sau x 15, obiectivul x 40) pot fi diferențiate aproape toate elementele celulare. Reactivul Samson colorează nucleele într-o nuanță roz-violetă, citoplasma rămânând incoloră. Se examinează taliacelulelor, forma și poziția nucleelor, corelația nucleocitoplasmatică, înglobări în citoplasmă ș.a.

Diferențierea în preparatele colorate

Deoarece în LCR conținutul în celule este foarte mic, în prealabil este necesar de a îmbogăți lichidul prin centrifugare. Sunt utilizate câteva metode de colorare a frotiurilor pentru diferențierea celulelor.

Colorația Rozina. Lichidul se centrifughează 7-10 minute. Supernatantul se înlătură, sedimentul se aplică pe o lamă degresată, apoi clătinând ușor se distribuie uniform pe suprafața lamei și peste 1-2 min. partea lichidă se varsă. Tehnica preparării frotiului din sedimentul rămas pe lamă depinde de gradul pleocitozei (numărul de leucocite într-un mkl). În cazul unei pleocitoze nepronunțat (10-15 leucocite (mkl)), sedimentul se repartizează pe o porțiune de 1 cm^2 ; la o pleocitoză mai mare de 30 leucocite/mkl — pe o porțiune 1,5-2,0 cm^2 ; la o pleocitoză de 150 de leucocite/mkl — pe o porțiune de 2-3 cm^2 . Când numărul de leucocite este foarte mare și în sediment are loc prezența eritrocitelor, sedimentul se repartizează pe toată suprafața lamei și imediat se varsă. Lama se așază în poziția verticală. În așa mod se obține grosimea minimală a frotiului. Frotiurile se usucă într-un dulap de uscat la 40 — 50°C.

Frotiurile uscate se fixează cu alcool metilic 1-2 min. și se colorează după metoda Romanovschi: preparatele mai subțiri cu citoză mică — 6-7 min., cele cu citoză mare și prezența sângelui — 10-12 min. Apoi colorantul se varsă, frotiul se spală cu apă distilată și se usucă. Dacă nucleele celulelor au o culoare albastră-deschisă, frotiurile se recolorează încă 2-3 min.

Colorația Voznaia. Sedimentul se aplică pe lamă, se clatină ușor astfel ca lichidul să fie repartizat uniform pe suprafață. Frotiul se usucă la temperatura camerei timp de 24 de ore, se fixează cu alcool metilic 5 min., se acoperă cu colorantul ce conține azur-eozină (la fel ca și pentru vopsirea frotiurilor sangvine, însă diluat de 5 ori). Se lasă pentru colorare timp de 1 oră. Dacă celulele sunt palide, frotiul se recolorează cu vopsea nediluată sub controlul microscopului 2-10 min. Timpul colorației adăugătoare este direct proporțional numărului de celule din lichid.

Colorația Alexeev. Pe frotiul uscat, însă nefixat, se aplică 6-10 picături colorant Romanovschi. Cu aceeași pipetă foarte atent colorantul se repartizează pe toată suprafața preparatului și se lasă timp de 30 sec., după ce se mai adaugă (fără a vărsa colorantul) încă 12-20 picături de apă, preventiv încălzită până la 50-60⁰ C. Raportul dintre picăturile de colorant și cele de apă trebuie să fie 1:2. Preparatul se clatină ușor astfel ca vopseaua să se amestece cu apa și se lasă pentru 3 min. Apoi colorantul se spală cu apă distilată, se usucă cu hârtie de filtru și se examinează la microscop. Această metodă poate fi utilizată pentru examenul citologic de urgență.

Morfologia elementelor celulare

Limfocitele — diametrul 5-8 mkm, nucleul rotund, compact, citoplasma bazofilă (slab), subțire, uneori se observă numai într-o singură parte a celulei. Valori normale 1-2 limfocite la 1 mkl. Pleocitoza limfoidă (majorarea pronunțată a numărului de limfocite) poate avea loc în inflamațiile cronice ale tunicilor meningiale (meningite tuberculoase, virale) nepronunțată — în tumorile S.N.S., primele zile după operații pe creier.

Neutrofilele — morfologic celulele sunt asemănătoare cu neutrofilele sângelui circulant. Prezența neutrofilelor (în diverse cantități) indică meningita bacteriană sau abcesele cerebrale. Prezența neutrofilelor morfologic nemodificate este caracteristică pentru inflamațiile acute, prezența celulelor morfologic modificate indică micșorarea intensității procesului inflamator.

Eozinofilele pot fi diferențiate conform granulațiilor citoplasmatiche — granule mari de culoare roșie-cărămizie, uniforme, strălucite. Por apărea în LCR în procese patologice de natură parazitară, meningite toxice, reactive, tuberculoase, sifilitice.

Monocite tisulare — celule cu diametrul 7-10 mkm. Pot fi întâlnite în lichidul normal sub formă de exemplare unice. Prezența în cantități mari este caracteristică pentru procese inflamatoare cronice, după operație pe țesuturile SNC.

Macrofagi — diametrul 7-17 mkm, uneori 20-30 mkm, nucleul de diferite forme, situat la periferia celulei, citoplasma conține înglobări și vacuole. Pot fi prezente în procese inflamatoare, în perioada postoperatorie pe țesuturile SNS, în aceste cazuri având un semn prognostic pozitiv.

Celulele plasmatică. Celule mai mari decât limfocitele, nucleul voluminos, situat excentric, citoplasma abundentă. Sunt prezente în LCR în cadrul proceselor inflamatoare cronice a creierului și meningelor, ș.a.

Celulele tumorale și complexe lor pot fi depistate în preparatele colorate și în camera de numărat. Morfologic pot fi identificate de către citologii cu experiență în domeniu, indică neoplasme cerebrale.

Examenul chimic

Deosebirea esențială a particularităților chimice dintre LCR și plasma sangvină constă în concentrația foarte mică a proteinelor în lichid (aproximativ de 200 ori), considerabil mai mică a colesterolului, glucozei și mai mare a clorului.

Din aceste considerente determinarea concentrației diferitor substanțe în LCR trebuie asociată și comparată cu concentrația aceluiași substanțe în plasmă. Uneori modificările unor substanțe din lichid nu reflectă modificările ce au loc în SNC, ci a compoziției sângelui circulant.

Metodele de determinare a proteinelor pot fi subdivizate în cantitative și calitative. Probele calitative au un caracter de orientare și au la baza lor principiul de sedimentare a globulinelor: reacția Pandy; reacția Honne Apelt; reacția Lange; reacția Fridman.

În principiu, rezultatele dozării proteinelor totale în LCR prezintă un test puțin informativ pentru diagnosticarea bolilor sistemului nervos central. O informație mai amplă poate fi obținută prin electroforeza proteinelor. În cadrul proceselor inflamatoare ale SNC în LCR crește conținutul fracțiilor globulinice gama, alfa-1, alfa-2 și scade conținutul albuminelor.

De notat că o concentrație în limitele normale a proteinelor în LCR încă nu mărturisește lipsa afecțiunilor organice ale SNC.

Examenul bacterioscopic

Bacterioscopia este cea mai accesibilă metodă rapidă pentru diagnosticul etiologic al meningitelor.

Frotiurile pentru aceste examene se realizează din sedimentul obținut prin centrifugarea probei, în cazul probelor de LCR clar, opalescent sau tulbure; în cazul probelor purulente se folosește proba necentrifugată.

- Dacă LCR este clar, opalescent sau tulbure, se centrifughează tubul la 1500 g, 10-15 min. (în suspiciunea de meningită tb, 15 min. la 3000 g). Se efectuează mai multe frotiuri.
- 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 clătită în prealabil cu alcool. Nu se dispersează lichidul.
- În suspiciunea de meningită cu *Cryptococcus* se realizează preparat umed între lamă și lamelă din sediment 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 antimicrobian.

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 este pozitiv, se anunță imediat medicul.

Colorația Gram. Lamele colorate Gram se vor examina în mod amănunțit, timp de cca 20 min. Probabilitatea vizualizării bacteriilor pe un frotiu din LCR, colorat Gram, depinde de concentrația bacteriilor în LCR, precum și de specia bacteriană care a cauzat meningita. Astfel, 75 până la 90% din speciile de LCR cu cultura pozitivă sunt pozitive la colorația Gram, în timp ce procentajul descrește la 40-60% la pacienții care au primit antimicrobiene înainte de puncția lombară. Colorația Gram este acceptată a fi sigură în detectarea agenților bacterieni atunci când concentrația acestora este $\geq 10^5$ UFC/ml LCR; astfel 25%, respectiv 60% din speciile de LCR cu $< 10^3$, 10^3 - 10^5 UFC/ml au fost pozitive prin colorația Gram, în timp ce 97% au fost pozitive când concentrația bacteriilor pe ml de LCR a fost $> 10^5$.

Acest test este ieftin, rapid și înalt, specific pentru diagnosticul meningitei bacteriene.

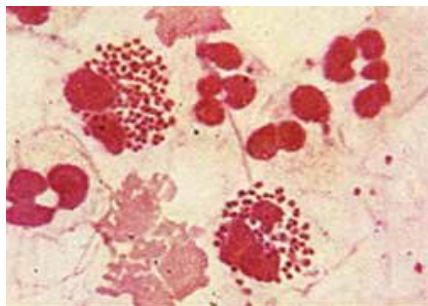
Tehnica colorației Gram este descrisă în Anexa 3.

Bacterioscopia pe frotiuri colorate cu albastru de metilen este frecvent mai

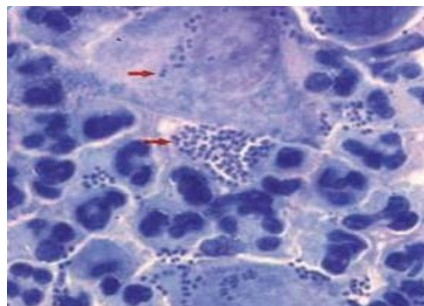
sensibilă decât cea pe frotiuri colorate Gram.

Aspectul frotiurilor pentru bacteriile mai des implicate în meningită:

- *Neisseria meningitidis*: diplococi gram-negativi, cu fețele adiacente applatizate – „în boabe de cafea”, sau înfundate – „aspect reniform”, extraleucocitari și predominant intraleucocitari (fig. 2).



A



B

Figura 2. *Neisseria meningitidis* A. Colorație Gram; B. Colorație cu albastru de metilen

- *Streptococcus pneumoniae*: coci gram-pozitivi, lanceolați, dispuși în diplo sau în lanțuri, uneori capsulați (fig. 3).

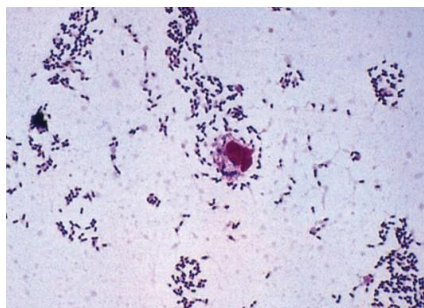


Figura 3. *Streptococcus pneumoniae*, colorația Gram

- *Haemophilus influenzae*: coco-bacili, bacili scurți, drepti / incurbați gram-negativi, uneori capsulați, rar polimorfi, cu sau fără filamente subțiri, deseori intra-leucocitari (fig. 4).

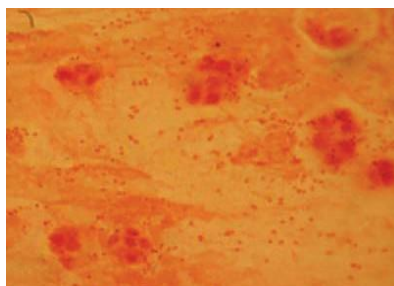


Figura 4. *Haemophilus influenzae*, colorația Gram

- Enterobacterii: bacili gram-negativi groși, capete rotunjite.

- *Listeria monocytogenes*: bacili gram-pozitivi, mici, cu dispoziție unghiulară, colorație inegală, aspect “difteroid”.

4.3. Detectarea, izolarea, identificarea și caracterizarea agenților etiologici ai meningitei bacteriene acute (Examenul microbiologic al LCR)

4.3.1. Teste rapide de diagnostic pentru detectarea agenților etiologici ai MBA

Examenul microscopic al LCR (vezi mai sus)

Testarea directă antigenică poate fi utilă. Sensibilitatea metodei este redusă pentru probele cu examen microscopic negativ. Sensibilitatea testării pentru anumite serogrupuri de *Neisseria meningitidis* este redusă, 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 pretratată. În această ultimă situație, testarea ar putea avea un beneficiu.

Latex-aglutinarea (LA) (fig. 5, Anexa 4) a fost adaptată pentru detectarea rapidă a antigenelor bacteriene solubile direct din LCR a pacienților suspectați de MBA. LA detectează în interval de 2-10 minute antigene bacteriene în cantități de ordinul ng/ml. Acest test ne aduce date suplimentare la investigația microscopică (colorația Gram) și cultura din LCR. De asemenea, ne poate furniza rezultate pozitive reale, în timp ce colorația Gram și cultura din LCR sunt negative la pacienții cu MBA care au primit antibiotice înaintea internării în spital. În plus, rezultatele acestei testări pot ajuta la instituirea precoce și specifică a antibioterapiei, înainte de obținerea rezultatelor culturii și a testării sensibilității la antibiotice.

Cei mai frecvenți agenți patogeni detectați prin LA au fost: *H. influenzae* tip b, *S. pneumoniae*, *Streptococcus* group B și *N. meningitidis* serogrupurile A, B, C, Y, și W135. Aceste bacterii, cu excepția *Streptococcus* group B, posedă antigene polizaharidice capsulare; *Streptococcus* group B posedă antigene polizaharidice specifice de tip la nivelul peretelui celular.

Concentrația minimă de antigen bacterian detectabil în LCR prin LA este de 0,1-5 ng antigen *H. influenzae* tip b/ml și 50-100 ng antigen *N. meningitidis*/ml. Dacă LCR nu poate fi obținut, pot fi testate, prin LA, urina (PZ capsulari solubilizați pot străbate celulele endoteliale ale capilarelor și sunt excretați în urină) sau serul sangvin (serul este adesea mai sărac în antigene solubile polizaharidice din cauză că acestea pot fi legate de anticorpi sau alte proteine

serice, pot fi metabolizate și/sau pot fi eliminate de către limfocite). Antigenele bacteriene pot fi detectate în LCR-ul pacienților cu MBA mai multe zile după ce LCR a devenit steril în urma antibioterapiei. Astfel, antigenele *H. influenzae*, *N. meningitidis* și *S. pneumoniae* pot fi detectate prin LA în LCR și ser de la 1 până la 10 zile după inițierea tratamentului cu antibiotice. Thirumoorth și Dajani au detectat prin LA concentrații mai mari de antigen *H. influenzae* type b în urină și ser decât în LCR la pacienții tratați cu antibiotice de la 1 până la 3 zile; antigenul *H. influenzae* a fost detectat în urină până la 18 zile (în medie 10 zile) de la inițierea antibioterapiei.

Specimenul clinic de elecție pentru detectarea antigenelor bacteriene este LCR – când pacientul cu MBA nu a fost tratat sau a primit antibiotic < 24 ore, iar urina este specimenul clinic de elecție pentru detectarea antigenelor bacteriene – când pacientul cu MBA a primit antibiotic >24 ore. Metodele de detecție a antigenelor solubile pot fi limitate de reacții nespecifice, reacții încrucișate și/sau concentrații mici ale antigenului bacterian în specișenele clinice.

Latex-aglutinarea este simplu de realizat și nu necesită echipamente, având o sensibilitate și specificitate crescută. Totuși un rezultat negativ nu infirmă etiologia bacteriană a meningitei.

Există kituri comerciale care utilizează reacția de latex-aglutinare pentru identificarea direct din prelevatul clinic (LCR) a antigenelor specifice de serogrup, serotip precum:

- serogrupurile de *N. meningitidis* – A, B, C, W135, Y,
- *S. pneumoniae*,
- *S. agalactiae* (streptococ Grup B),
- *H. influenzae* tip b.

Deși specificitatea acestor chituri este foarte bună, sensibilitatea este mai mică, depinzând de numărul de germeni din LCR. Alte studii au remarcat prezența reacțiilor fals pozitive (54%) datorită contaminării prelevatelor sau imunizării recente cu vaccin conjugat Hib, ceea ce a avut un impact clinic negativ (prelungirea spitalizării și a antibioterapiei, chiar și la apariția unor complicații).

Astfel că această metodă nu poate substitui colorația Gram și cultura; dacă s-a recoltat o mică cantitate de LCR, cultura și colorația Gram trebuie să aibă prioritate față de această metodă de detecțare a antigenului bacterian.



Figura 5. Latex-aglutinarea

Testele moleculare bazate pe PCR 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. Aceste teste bazate pe tehnici de biologie moleculară, 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). În suspiciunea de meningită cu *Cryptococcus*, testul de detecție antigenică este deosebit de util, deoarece are o sensibilitate mare (>90%). În cazul altor etiologii, trusele de detecție antigenică au o sensibilitate moderată, de aceea absența reacției nu exclude prezența unor bacterii.

Teste rapide de diagnostic pentru LCR

Imunocromatografie cu flux lateral

Testele permit diagnosticarea *Neisseria meningitidis* (serogrupurile A, C, W, X și Y), MeningoSpeed și *Streptococcus pneumoniae* (Sp), PneumoSpeed timp de până la 15 min. (fig. 6).

Implementarea pe scară largă a acestor teste în rutina clinică va avea un impact pozitiv asupra pacienților, medicilor și sistemelor de sănătate prin îmbunătățirea semnificativă a monitorizării bolii într-un mod sigur și în timp util, reducerea deceselor și sechelelor și prevenirea epidemiilor globale. În plus, aceste teste vor oferi economii sistemului de sănătate prin oferirea unui tratament adecvat și în timp util (economii potențiale de costuri de 1 miliard de euro pe an la nivel global). Aceste teste posedă sensibilitate și specificitate înaltă.

La efectuarea acestor teste se respectă instrucțiunile producătorului.

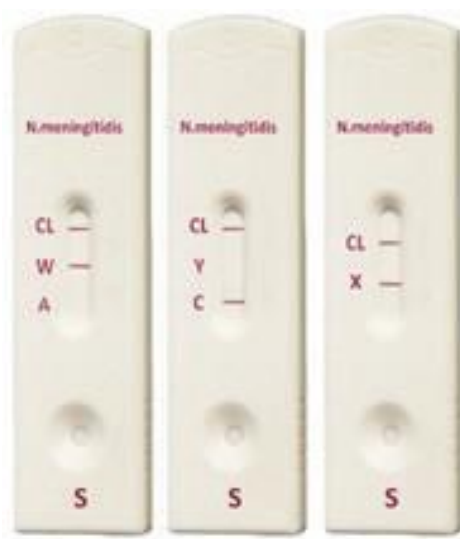


Figura 6. Teste rapide de detectare a *N. meningitidis* (serogrupurile A, C, W, X și Y)

4.3.2. Izolarea agenților etiologici ai meningitelor bacteriene acute

Selectarea mediilor pentru cultivarea primară

Cel mai bun mediu pentru creșterea *S. pneumoniae* este geloza sânge (GS), care este o placă de agar cu tripticază de soia care conține 5% sânge de berbec. Sângele uman NU este acceptat ca substituent, deoarece anticorpii conținuți în sângele uman pot inhiba creșterea bacteriilor. *S. pneumoniae*. De asemenea *S. pneumoniae* va crește și pe o placă cu geloză chocolate (GC).

Pentru *H. influenzae*, se utilizează GC cu sânge lizat la căldură sau suplimentat cu hemină (factor X) și nicotinamidă-adenină-dinucleotidă (NAD; factor V). Creșterea *H. influenzae* pe geloză sânge poate fi realizată prin adăugarea unei surse de NAD, realizată în mod tradițional prin inocularea mediului cu o tulpină de *Staphylococcus aureus* sau *Enterococcus* spp. *H. influenzae* formează colonii satelit de-a lungul creșterii stafilococilor sau enterococilor. În plus, aplicarea hârtiei de filtru (sau discuri) saturate cu hemină și NAD pe suprafața GS, după ce mediul a fost inoculat, va produce un halou de creștere în jurul benzii sau discului.

N. meningitidis crește atât pe GS, cât și pe GC. Deoarece *N. meningitidis* crește bine într-o atmosferă umedă, în cazul în care se suspectează o infecție cu *N. meningitidis*, este indicat să se pună o tavă puțin adâncă cu apă în termostat. Sursa de umiditate trebuie schimbată în regulat pentru a preveni contaminarea cu fungi. De asemenea, atât GS, cât și GC sunt utilizate pentru subcultură. Dacă este disponibil un singur tip de mediu, ar trebui utilizat GC deoarece conține hemină și NAD necesare pentru dezvoltarea *H. influenzae*, în timp ce un GS nu conține aceste componente.

Dacă culturile primare par a fi contaminate, mediile selective pot îmbunătăți izolarea acestor bacterii din specimene care conțin o floră mixtă de bacterii și/sau micete. Pentru izolarea primară a *N. meningitidis*, se poate folosi obază de geloză chocolate care conține vancomicină, colistină, nistatină și trimetoprim. Pentru izolarea *S. pneumoniae*, poate fi utilă agar triptic de soia cu 5% sânge de berbec și fie gentamicină, neomicină, fie trimetoprim-sulfametoxazol (SXT). Pentru izolarea *H. influenzae* se poate folosi geloza chocolate cu bacitracină. Sunt disponibile și alte formulări de antimicrobiene.

La necesitate pot fi utilizate și alte medii (ex. cromogene) destinate pentru cultivarea microorganismelor ce provoacă MBA.

Inocularea primară a mediilor de cultură cu probe de LCR

◇ Cultivarea primară direct din LCR

1. Dacă LCR poate fi transportat imediat la laboratorul microbiologic (timp de 1 oră de la momentul recoltării), se inoculează 1-5 picături de LCR (în funcție de volumul primit în laborator) direct atât pe GS, cât și pe GC în termen de 1 oră după colectare.
 - Dacă LCR a fost centrifugat, pentru cultura primară se utilizează 1 picătură de sediment bine amestecat.
2. Folosind o ansă bacteriologică sterilă, repartizați inoculul pentru a obține colonii unice, izolate.
 - Sunt indicate ansele de unică folosință, dar dacă se folosește o ansă metalică, aceasta trebuie sterilizată înainte de fiecare etapă a procesului de inoculare a plăcii.
3. Un bulion de rezervă (de exemplu, bulion cord-creier infuzie cu suplimente adecvate) trebuie inoculat cu o parte din sediment.
4. Plăcile și bulionul inoculate cu sedimentul de LCR trebuie incubate timp de 18-24 ore la 35-37°C cu ~5% CO₂ (sau într-un borcan cu lumânare).

◇ Cultivarea primară din mediu T-I

1. Dacă LCR nu poate fi transportat la laborator imediat (în termen de 1 oră de la momentul recoltării), acesta se inoculează în mediul T-I.
2. La sosire, se prelucrează dopul de cauciuc cu alcool 70%, după care se introduce un ac de aerisire în sticla T-I și se incubează la 35-37°C cu ~5% CO₂ (sau într-un borcan cu lumânare). Zilnic mediul lichid se examinează la turbiditate până la 7 zile.
 - Înainte de a repica pe medii în plăci, acul de aerisire se scoate și dopul de cauciuc se prelucrează cu alcool 70%.
 - Nu utilizați pentru prelucrarea dopului iod-povidonă, deoarece acesta poate nimeri în mediu și inhiba astfel creșterea bacteriilor.
3. După 18-24 de ore de incubare la 35-37°C cu ~5% CO₂, din mediul T-I, cu un ac steril și o seringă, se transferă 50-100 μl pe mediile GS și GC pentru izolarea culturii primare.
 - Aproximativ 50-100 μl sunt utilizați pentru a însămânța fiecare placă. Pentru a repica pe două plăci, se aspiră aproximativ 100-200 μl cu seringă odată pentru a minimiza posibilitatea contaminării mediului T-I.
4. Plăcile se incubează la 35-37°C cu ~5% CO₂ și se examinează zilnic timp de până la 72 de ore.
5. Dacă nu se observă creștere, subcultivați mediul T-I din nou în ziua a 4-a și ziua a 7-a.
6. Izolatele trebuie întotdeauna examinate pentru puritatea creșterii, analizând morfologia coloniei înainte de efectuarea oricărui test. Dacă se observă contaminare, culturile trebuie să fie repicate pentru a asigura

puritatea înainte de testare.

7. Dacă mediul T-I pare a fi contaminat, se pot folosi medii selective (vezi mai sus).

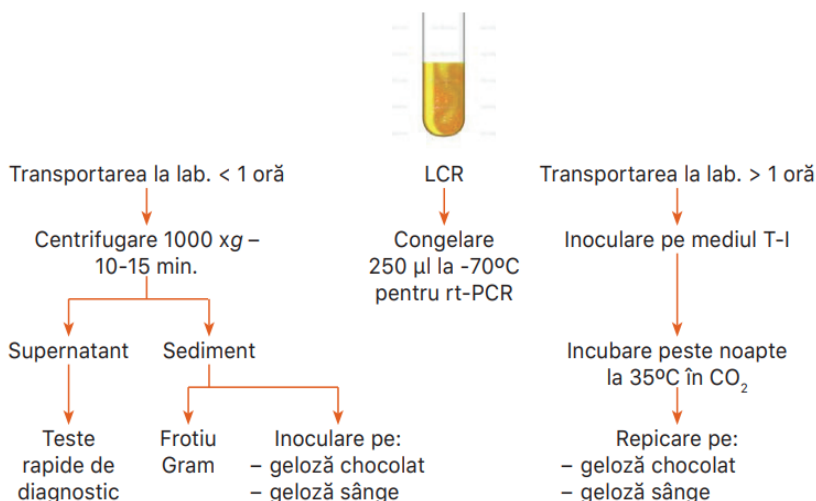


Figura 7. Prelucrarea lichidului cefalorahidian

Cultura LCR este pozitivă în 70-85% din pacienții care nu au primit antibioticoterapie la 48h.

O porțiune din LCR se va stoca anterior puncției lombare, dar prin cultură identificarea agentului cauzal poate dura până la -70°C sau la temperatura camerei, ori la 37°C pentru eventuale reinoculări pe mediile de cultură. Deși concentrațiile bacteriene $>10^7$ UFC/ml de LCR au fost corelate cu creșterea morbidității și mortalității, cultivarea cantitativă a LCR nu este o procedură comună saupractică. Culturile vor fi examinate zilnic și rezultatele prezumtive, corelate cu frotiurile Gram, vor fi comunicate medicului clinician.

Dezvoltarea unei flore normale cutanate ar putea ridica suspiciunea de contaminare, în special când creșterea este minimă pe mediile solide sau pe o singură placă cu mediu de cultură. Plăcile cu mediu de cultură fără creștere bacteriană vor fi aruncate după 72 h de incubare, iar mediile de cultură lichide fără creștere bacteriană vor fi aruncate după 5 zile de incubare.

În afară de sistemul clasic de însămânțare pentru izolare bacteriană, se pot utiliza și sisteme automate de incubare (BacT/ Alert, MB/ Bact, Bactec) a flacoanelor cu medii speciale, destinate izolării germenilor pretențioși și/sau a produselor patologice provenite de la bolnavi tratați cu antibiotic: flacoane cu

medii lichide – bulion tripticază-soia, agenți reducători pentru anaerobi, ecosorb pentru inhibarea antibioticelor din lichidele biologice etc.

Lichidul peteșial

Se realizează frotiul Gram din aspiratul peteșial. Se însămânțează pe mediile de cultură:

- Agar bază cu adaos de sânge de berbec 5%, incubare în atmosferă cu 5-10% CO₂, la 35-37°C, 24 – pentru 48 ore;
- Geloză chocolate, cu incubare în atmosferă cu 5-10% CO₂, la 35-37°C, pentru 24-48 de ore.

Această investigație este utilă prin aceea că poate fi făcut un diagnostic al bolii meningococice atunci când semnele clinice exclud puncția lombară. Identificarea se realizează conform caracterelor menționate pentru *N. meningitidis*.

4.3.3. Identificarea și caracterizarea agenților etiologici ai MBA

În cazul pozitivării culturilor din diverse prelevate, pe mediile solide sau lichide însămânțate, se efectuează identificarea și caracterizarea agenților etiologici ai MBA:

Identificarea prezumptivă a agenților cauzali prin:

- examinarea aspectului cultural al coloniilor (caractere de cultură)
- examinarea caracterelor morfotinctoriale (frotiu colorat Gram din colonii)

Identificarea definitivă a agenților cauzali prin:

- teste de identificare specifice
- testarea sensibilității la antimicrobiene
- caracterizarea izolatelor prin metode moleculare

***Neisseria meningitidis* (Anexa 11 A):**

- **morfologia coloniilor:** colonii rotunde, convexe, lucioase gri-albe, translucide, Smooth (S) (fig. 1, Anexa 14), cu testul oxidazei pozitiv, când se adaugă o picătură de reactiv direct peste colonii (vezi Anexa 5);
- **colorația Gram:** diplococi Gram(-), cu fețele adiacente aplatizate, “în boabe de cafea”, sau înfundate “aspect reniform”, extraleucocitari, predominant intraleucocitari;
- **teste de identificare:**
 - testul oxidazei (+)
 - teste de fermentare a zaharurilor (producerea de acid prin utilizarea

carbohidraților): Maltoza (+), Glucoza (+), Lactoza (-), Zaharoza (-); (Anexa 7)

– teste serologice pentru identificarea pe baza caracterelor antigenice (Anexa 8):

a) *serogruparea* – pe baza antigenelor polizaharidice (PZ) (există 12 grupe: A, B, C, 29E, H, I, K, L, W135, X, Y, Z);

b) *tiparea și subtiparea* – pe baza antigenelor proteice de membrană externă (OMP = Outer Membrane Proteines): proteinele de clasa 1 (OMP1) permit identificarea tipurilor – notate cu cifre arabe, uneori însoțite de litere mici ale alfabetului (ex.: 1, 2a, 2b...); proteinele de clasa 2 și 3 (OMP2 și 3) permit identificarea subtipurilor, notate cu P urmat de un indicativ numeric (Ex.: P1,2; P1,7 etc.);

c) *imunotiparea* – în cadrul serotipurilor și subtipurilor – pe baza antigenelor polizaharidice (LPS); la grupele B și C au fost identificate 8 imunotipuri, caracterizate de 8 clase diferite de LPS, notate de la L1 la L8.

Streptococcus pneumoniae (Anexa 11 B):

- **morfologia coloniilor:** colonii gri-opace, cu diametru de 1 mm, α -hemolitice, uneori mucoase sau ușor escavate (fig. 2, Anexa 14).
- **colorația Gram:** coci Gram (+), alungiți, lanceolați, dispuși în diplo sau în lanțuri, uneori capsulați
- **teste de identificare:**
 - testul catalazei (-),
 - testul sensibilității la optochin (+) (fig. 3, Anexa 14, Anexa 9),
 - testul bilolizei (+) (Anexa 10),
 - identificarea antigenică – serogrupare/serotipare pe baza PZ (există > 80 serogrupuri/serotipuri, notate cu cifre arabe, uneori însoțite de litere ale alfabetului (ex.: 1, 8, 14 L, 19 F, 23 F etc).

Haemophilus influenzae (Anexa 11 C):

- **morfologia coloniilor:** colonii gri-lucioase/semiopace, netede, plate/convexe (fig. 4, Anexa 14)
- **colorația Gram:** cocobacili, bacili scurți, subțiri, dreți/încurbați Gram(-), uneori capsulați, rar polimorfi, cu/fără filamente
- **teste de identificare:**
 - creștere satelită a striului de *Staphylococcus aureus* (fig. 5, Anexa 14)
 - creștere pe medii speciale (Anexa 11)
 - creștere satelită lângă suplimentul de factori XV (fig. 6, Anexa 14)
 - identificarea antigenică:
 - a) pe baza antigenelor polizaharidice capsulare, se descriu 6 serotipuri: a, b, c, d, e și f – prin reacția de aglutinare pe lamă cu seruri anti H.

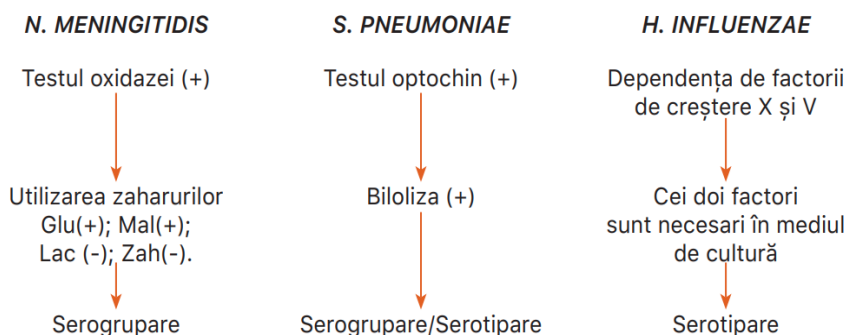
- influenzae* specifice de tip pe baza antigenelor OMP, se realizează serotiparea tulpinilor ne-capsulate și subtiparea serotipului b;
- b) pe baza lipooligozaharidelor, la serotipul b au fost descrise 11 subtipuri.

Tabelul 1. Identificarea prezumtivă a tulpinilor de *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* și *H. influenzae*

Cultura pe:		Colorație Gram	ID prezumtivă
Geloză chocolată	Geloză sânge		
+	+	Diplococi Gram(-)	<i>N. meningitidis</i>
+	+	Diplococi Gram(+)	<i>S. pneumoniae</i>
+	-	Cocobacili Gram(-)	<i>H. influenzae</i>

După identificarea prezumtivă a agentului cauzal al MBA, pe baza caracterelor microscopice și de cultură, se trece la identificarea definitivă.

Etapele importante în identificarea agenților cauzali cei mai importanți sunt redate în figura 8. Astfel, fiecare din agenții patogeni ai MBA vor fi identificați pe baza caracterelor microscopice, de cultură și a testelor de identificare definitivă (caractere biochimice și antigenice), urmat de testarea



sensibilității la antibiotice.

Figura 8. Identificare definitivă

O însumare a caracterelor pe baza cărora se face identificarea principalilor agenți etiologici ai MBA se regăsește în Tabelul 2.

Tabelul 2. Identificarea principalilor agenți cauzali ai MBA

Teste de diagnostic	<i>N. meningitidis</i>	<i>S. pneumoniae</i>	<i>H. influenzae</i>
---------------------	------------------------	----------------------	----------------------

Colorația Gram	Diplococi Gram(-)	Diplococi Gram(+)	Cocobacili polimorfi G(-)
Cultură pe geloză ciocolată	+	+	+
Cultură pe geloză sânge	+	+	-
Testul oxidazei	+	-	V
Testul optochin	NA	+	NA
Dependența de factorii X și V	NA	NA	+
Utilizarea glucozei	+	NA	NA
Utilizarea maltozei	+	NA	NA
Utilizarea lactozei	-	NA	NA
Utilizarea zaharozei	-	NA	NA
Testul bilolizei	NA	+	NA
Serogrupare	+	+	NA
Serotipare	NA	+	+

Notă: NA – neaplicabil

4.4. Testarea sensibilității la antimicrobiene

Emergența rezistenței la antibiotice a germenilor patogeni incriminați în etiologia meningitelor bacteriene este un alt aspect bine cunoscut pe plan mondial, ridicând probleme serioase de terapie. În acest context se impune studiul rezistenței la antibiotice a tuturor tulpinilor bacteriene izolate din LCR și realizarea antibiotipurilor de rezistență. Studiul este necesar atât pentru instituirea terapiei empirice până la obținerea rezultatelor pentru fiecare bolnav, cât și pentru stabilirea politicii de utilizare a antibioticelor la nivel local, regional și/sau național pe baza datelor obținute.

Metodologia de testare a sensibilității la antibiotice va fi realizată conform standardului EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) în vigoare.

4.5. Caracterizarea moleculară a principalilor agenți etiologici MBA

PCR este o tehnică moleculară, care implică utilizarea primerilor selectați pentru a produce copii multiple, de lungime uniformă ale regiunilor specificeale genomului ADN.

N. meningitidis – PCR este utilizat pentru:

- detectarea ADN specific, utilizând gene țintă specifice meningococilor (*ctrA* sau *crgA*);
- confirmarea serogrupării, utilizând primeri specifici genelor care codifică polysialyltransferaze;
- tiparea moleculară, este realizată prin PCR, urmată de secvențierea

genelor *porA*, *fetA* și 7 gene „housekeeping”, conform schemei Multilocus Sequence Typing.

Identificarea serogrupului reprezintă primul pas în caracterizarea tulpinilor de meningococ și cel mai important pentru managementul prompt al contactilor. Pentru acest motiv au fost dezvoltate metode PCR de amplificare a acizilor nucleici, pentru identificarea serogrupului la nivel molecular (genogrup), care sunt sau trebuie să devină o parte importantă a funcției laboratorului de referință. Identificarea simultană a serogrupurilor (genogrupuri) A, B, C, Y și W135 este folosită în mod curent, în laboratoarele de referință din Europa. Protocolul optimizat în laboratorul nostru cuprinde o reacție PCR multiplex, urmată de alte două reacții „single” pentru diferențierea genogrupurilor Y și W135. În reacția multiplex se folosesc 5 perechi de amorse care țintesc: gena *ctrA* – codifică o proteină de membrană externă, implicată în transportarea capsulei, prezentă în toate tulpinile de meningococ; gena *orf2* – necesară pentru biosinteza capsulei serogrupului A și gena *siaD* care codifică o polisialiltransferază, responsabilă de polimerizarea homopolimerilor sau heteropolimerilor de polizaharid care conțin acid sialic în tulpinile care aparțin serogrupurilor B, C, Y și W135. Alelele genei *siaD*, specifice de serogrup, pot fi detectate prin PCR cu amorse specifice pentru fiecare serogrup în parte. Pentru diferențierea serogrupurilor Y și W135, reacția multiplex este urmată de două reacții PCR separate, cu alte două perechi de amorse specifice fiecărui serogrup, dar care dau ampliconi de aceeași dimensiune (120 pb).

Serogruparea meningococilor se poate realiza prin PCR din speciimenele recoltate de la pacient (sânge, LCR, țesut) sau din tulpina izolată, și vizualizarea produsului PCR prin electroforeză, tiparea moleculară necesită pași adiționali de purificare a ADN-ului extras, secvențiere și analiza secvenței utilizând bazele de date de referință.

Pentru *S. pneumoniae* se utilizează PCR pentru detectarea:

- genei *lytA* care codifică autolizina
- genei *ply* care codifică pneumolizina

Autolizina și pneumolizina sunt markeri importanți de virulență ai *S. pneumoniae*, care contribuie la patogenitatea acestui germene în diferitele forme de boală. Numeroase studii au raportat rolul lor în patogeniza pneumococi-că, sugerând faptul că aceste proteine pot fi mai adecvate ca antigene vaccinale față de portajul nazal și ocular, dar și față de infecțiile pneumococice invazive. Un studiu realizat de Corless și col. a demonstrat că perechea de amorse folosite pentru amplificarea genei *ply* a dat rezultate pozitive pentru toate cele 23 de serotipuri de pneumococ testate.

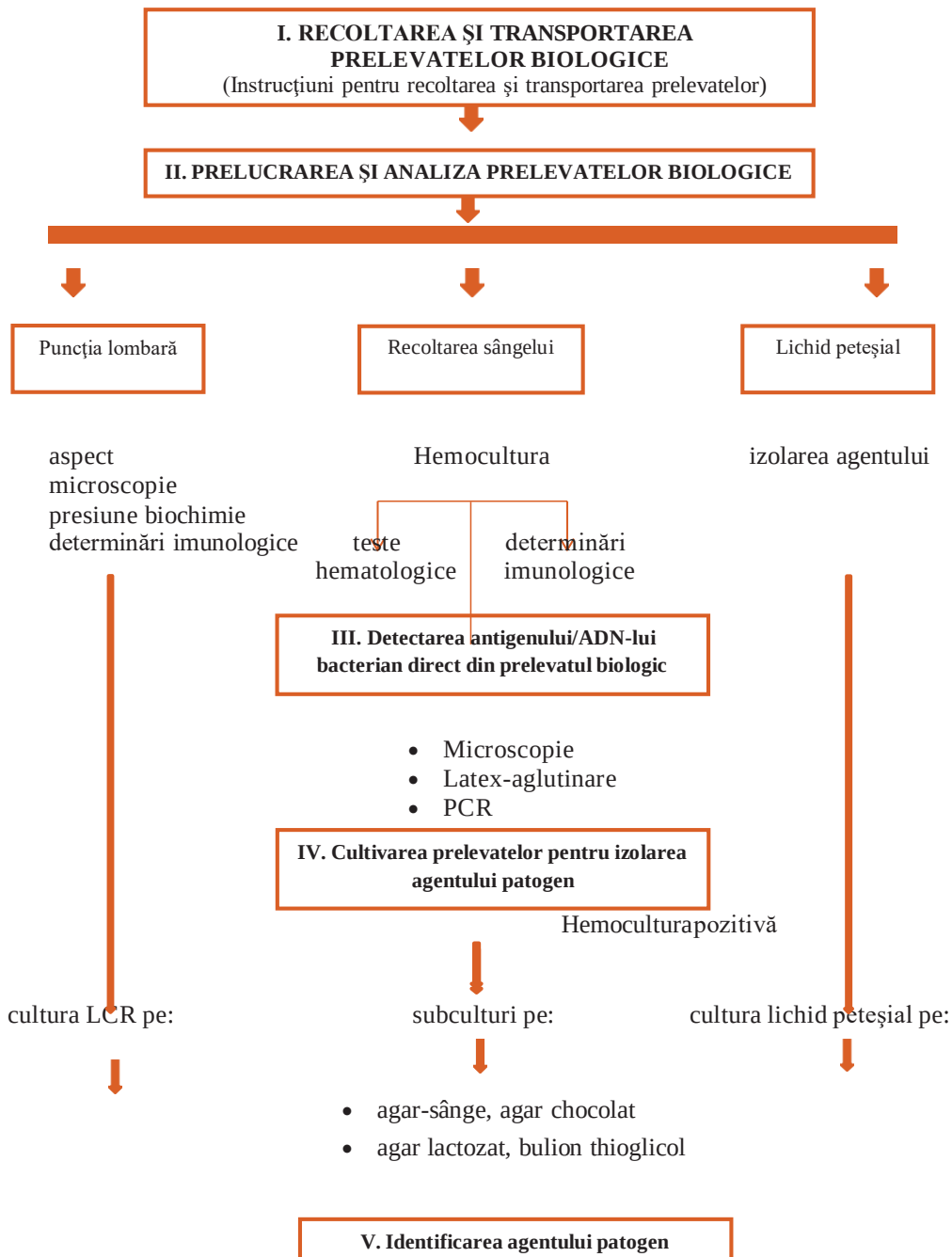
Pentru *Haemophilus influenzae*, PCR detectează prezența a trei gene:

- 1) gena *omp P2* (outer membrane protein) – confirmă tulpina ca *H. influenzae*, fie că este capsulată sau nu.
- 2) gena Van Ketel (*bex A*) – detectează capacitatea tulpinilor de a exporta capsula la suprafața celulei (deci este specifică tulpinilor capsulate).
- 3) o genă capsulară (a-f) – confirmă serotipul tulpinei de *H. influenzae* pe baza polizaharidului capsular specific de tip.

Acești produși sunt vizualizați prin electroforeză.

Studiile efectuate pe probe biologice în diferite laboratoare au evidențiat sporirea numărului de rezultate pozitive înregistrate în diagnosticul etiologic al meningitelor acute bacteriene, obținute prin utilizarea unei reacții PCR multiplex și sunt unanim de acord asupra utilității includerii unor reacții de acest tip în diagnosticul molecular de rutină.

ALGORITM DE DIAGNOSTIC AL MBA





N.meningitidis

S.pneumoniae

H.influenzae

Aspectul coloniilor:

rotunde, convexe, lucioase
gri, transparente,
S, ± mucoide

gri-opace, ± mucoid, ±
concave, α-hemolitice

gri-lucioase/semiopacenetede,
plate/convexe

Colorația Gram:

diplococi gram (-),
(boabe de
cafea/reniformi), extra- și
intracelulari

coci lanceolați, gram (+),
diplo,
± capsulați

Cocobacili, scurți, subțiri,
drepti/incurbați, gram (-), ±
capsulați, polimorfi

Oxidaza, test:

(+)

(+)

v

Utilizarea carbohidraților:

Glucoza (+), Maltoza (+)
Lactoza (-) Zaharoza (-)

Inulina (+)

Optochin test:

NA

(+)

NA

Biloliza test:

NA

(+)

NA

Factori de creștere:

NA

NA

X, V

Serogrupuri:

A, B, C, X, Y, W135 (PZ)

>80 serogrupe/serotipuri (PZ)

NA

Serotipuri:

1, 2a, 2b, 3...(OPM2/3)

a,b,c,d,e,f

Imunotipuri:

L1 – L8 (LPZ) grB și C

NA

NA

Testarea sensibilității la antibiotice:

Conform EUCAST

Caracterizarea moleculară a tulpinilor bacteriene:

Confirmarea speciei, grupului, tipului

Detectarea genelor de rezistență

RECOLTAREA, PROCESAREA ȘI TRANSPORTAREA PRELEVATELOR BIOLOGICE

(LCR, sânge și exsudate faringiene și nazale)

I.LCR

Momentul optim al recoltării:

Recoltarea LCR se realizează în suspiciunea clinică de meningită și de preferință înaintea administrării de antibiotice, imediat la internare.

Recoltarea:

- Prelevarea probelor de LCR este de competență exclusivă a specialiștilor infecționiști, neurologi sau neurochirurghi. Se face prin rahicenteză, în condiții strict aseptice, pentru a asigura protecția pacientului contra infecției și securitatea microbiologică a probei față de contaminarea cu flora cutanată.
- LCR este recoltat direct în tuburi sterile cu capac etanș, care vor fi etichetate pentru identificarea pacientului, a orei de recoltare și apoi trimise imediat la laborator, examenul LCR reprezentând o urgență bacteriologică.
- Volumul de 8-10 ml LCR la adult și 2-4 ml la copil satisface necesitățile pentru citologie, biochimie și bacteriologie.

Stocare și transportare:

- Verificarea datelor de identificare a probei și completarea fișei de însoțire a prelevatului
- Transportarea probelor la laborator și prelucrarea lor cât mai curând posibil; ideal în 10 min. până la 1 h (temporizarea examinării duce la distrugerea celulelor).
- Dacă transportarea necesită mai mult de 1 h, probele LCR pentru bacteriologie trebuie să se transporte la 35°C, **niciodată la frig** (refrigerarea prelevatului omoară meningococii și hemofili), și în general fără mediu de transport. Numai cantitatea necesară a probelor biochimice/ imunologice se stochează la frigider.
- În cazul în care este necesar transportul, sunt de preferat mediile bifazice (mediul T-I)
- Probele de LCR pentru diagnosticul imunologic și virologic nu necesită mediu de transport. Acestea pot fi transportate la +2°..+8°C, în interval de 48 h, sau la – 70°C pentru perioade mai lungi.
- Transportarea se va face în containere speciale, cu respectarea procedurii de transportare pentru substanțe de diagnostic sau substanțe infecțioase.

Pentru bacteriologie

- prelucrarea LCR trebuie realizată cât mai curând posibil; ideal în 10 min. până la 1 h.
- aprox. 2 ml LCR se centrifughează 2000 rpm/20 min.:
 - supernatantul va fi utilizat pentru decelarea antigenului bacterian prin reacția de latex-aglutinare, iar restul se repartizează pentru teste imunologice (vezi mai jos)
 - sedimentul va fi utilizat pentru realizarea frotiurilor și inocularea pe următoarele medii de cultură:
 - 1) agar Columbia cu adaos de sânge de berbec 5-7%, cu incubare în atmosferă cu 5-10% CO₂, la 35-37°C, pentru 48 de ore
 - 2) agar chocolate, cu incubare în atmosferă cu 5-10% CO₂, la 35-37°C, pentru 48 de ore
 - 3) agar lactozat, cu incubare în aerobioză, la 35-37°C, pentru 16-24 ore.

Identificarea izolatelor bacteriene obținute se realizează conform protocolului intern.

- Restul LCR brut va fi repartizat, prelucrat și/sau stocat pentru teste de biochimie, imunologie, biologie moleculară și virologie (vezi mai jos).

Tulpinile izolate vor fi înșămânțate în medii de stocare sau de transportare care mențin viabilitatea culturii. Recipientele vor fi etichetate cu codul de identificare al probei, data recoltării.

Astfel, pentru:

Neisseria meningitidis și ***Haemophilus influenzae***: recoltează cultura proaspătă de pe o placă cu agar – sânge sau agar chocolate cu ajutorul unui tampon steril și plasează tamponul în mediul de transport Stuart sau Amies. Etichetează tubul și trimite-l la laboratorul de referință în maximum două zile, la temperatura camerei sau la +2°C ...+8°C, împreună cu fișa de însoțire a prelevatului/tulpinii. Atenție; nu se păstrează la 37°C și nu mai mult de două zile până la inocularea mediului de transport!

Streptococcus: înșămânțează în profunzime în două tuburi de sticlă sau tip Eppendorf, cu agar nutritiv 3‰, îmbogățit cu sânge de berbec 5-7%. Notează pe fiecare tub numărul unic de identificare al probei, data recoltării, rezultatul identificării fenotipice. Se incubează la 37°C pentru 18-20 h, apoi se pot stoca la +2°C...+8°C. Trimite-l la laboratorul de referință la interval de 2-3 săptămâni împreună cu fișa de însoțire.

Alte bacterii nepretențioase: înșămânțare în profunzime în două tuburi de sticlă sau tip Eppendorf, cu agar nutritiv 3‰. Se notează pe fiecare tub numărul

unic de identificare al probei, data recoltării, rezultatul identificării fenotipice. Se incubează la 35-37°C pentru 18-20 h, apoi se pot stoca la +2°C...+8°C. Se pot transporta la laboratorul de referință în loturi mai mari, când se adună probe, împreună cu fișele de însoțire.

Pentru teste imunologice:

- se repartizează 2 x 100 µL LCR brut sau supernatant / recipient (criotub/tub Eppendorf)
- se congelează imediat (-20°C / -80°C)

Pentru biologie moleculară:

- se repartizează 2 x 400 µL LCR brut / recipient (criotub/tub Eppendorf)
- se congelează imediat (-20°C / -80°C)

Pentru virologie:

- se repartizează 2 x 100 µL LCR brut / recipient (criotub/tub Eppendorf)
- se congelează imediat (-20°C / -800C)

II. SÂNGE

Momentul recoltării: la internare

Metodologie de recoltare:

- recoltare sânge fără anticoagulant, în vacutainer, în condiții de respectare a normelor de sterilitate,
- coagulare la temperatura camerei sau în incubator de 37°C pentru minimum 1 h,
- separare ser, care va fi utilizat pentru testele convenționale, precum și pentru teste imunologice și serologice.

Pentru teste imunologice:

- repartizare 2 x 200 µL/recipient (tuburi Eppendorf sterile) în condiții sterile (hotă cu flux laminar, bec de gaz etc.);
- imediat congelare (-20°C).
- transport: păstrare și transportare la aceeași temperatură (se va evita decongelarea!); probele vor fi stocate la congelator și vor fi trimise mai multe odată într-un ambalaj care menține temperatura necesară (-20°C) sau în gheață carbonică.

Pentru teste de serologie (virologie):

- se repartizează în două tuburi câte 0,5 ml/tub ser în condiții sterile (hota cu flux laminar, bec de gaz etc.)
- păstrare maximum 7 zile la +4...+8°C și maximum 30 de zile la -20°C,
- transportare: pe gheață carbonică sau la -20°C.

Anexa 3

COLORAȚIA GRAM

Materiale necesare:

- ansă bacteriologică
- **lame din sticlă**
- prelevatul clinic sau cultura proaspătă (18 – 24 h) a bacteriei de testat
- stativ și cuvă pentru colorare
- soluție salină izotonă/apa distilată
- reactivi pentru colorația Gram (cristal violet, solția iodo-iodurată (Iugol), soluție decolorantă, fucsină bazică sau safranină)

Prepararea frotiului din prelevatul clinic (LCR):

- lama din sticlă se degresează și se etichetează (nr. prelevat/cultură, data preparării etc.).
- etalarea:
 - 1) aplică pe lamă 1-2 picături din depozitul obținut prin centrifugarea LCR.
 - 2) întinde produsul pe o zonă din mijlocul lamei prin mișcări de rotație, pentru a obține un frotiu în strat cât mai subțire și uniform etalat.
- lasă frotiul etalat să se usuce la temperatura camerei.
- fixează frotiul uscat utilizând metoda fizică (trece lama prin flacăra de câteva ori, încercând gradul de încălzire pe dosul mâinii), cu atenție – pentru că o temperatură mai mare poate distruge preparatul, iar, pe de altă parte, o temperatură mai mică nu realizează fixarea, preparatul putând fi îndepărtat de pe lamă în timpul colorării.

Prepararea frotiului din cultura proaspătă (18-24 h) a bacteriei de testat

- lama din sticlă se degresează și se etichetează (nr. prelevat/cultură, data preparării etc.).
- etalarea :
 - 1) aplică pe lamă o picătură de soluție salină izotonă.
 - 2) ia o porțiune dintr-o colonie din cultura de examinat cu ansa bacteriologică și emulsionează în picătura de soluție salină izotonă.
 - 3) întinde suspensia pe o zonă din mijlocul lamei prin mișcări de rotație, pentru a obține un frotiu în strat cât mai subțire și uniform etalat.
- lasă frotiul etalat să se usuce la temperatura camerei.
- fixează frotiul uscat utilizând metoda fizică (trece lama prin flacăra de câteva ori, încercând gradul de încălzire pe dosul mâinii), cu atenție

– pentru că o temperatură mai mare poate distruge preparatul, iar, pe de altă parte, o temperatură mai mică nu realizează fixarea – preparatul putând fi îndepărtat de pe lamă în timpul colorării.

Colorația Gram:

- acoperă frotiul fixat cu colorantul cristal-violet pentru 1 min.
- scurge colorantul și spală ușor cu apă rece de robinet, scurge excesul de apă.
- acoperă frotiul pentru 2 min. cu soluție mordantă – lugol.
- înlătură mordantul prin spălare ușoară cu apă rece de robinet.
- decolorează frotiul cu ajutorul soluției decolorante – 30 – 60 sec. (până ce solventul care se scurge de pe lamă este incolor).
- spală lama cu apă rece de robinet.
- recolorează frotiul cu fucsină bazică sau safranină pentru 30-60 sec. (pentru hemofili 1-2 min.).
- spală lama cu apă rece de robinet.
- usucă lama cu hârtie absorbantă sau lasă să se usuce la temperatura camerei.
- examinează frotiul la microscop.

Criterii de interpretare:

- Bacteriile *gram-pozitive* rețin complexul colorant violet-iod (datorită structurii peretelui celular) și împiedică decolorarea, astfel încât bacteriile rămân colorate în *violet*.
- Bacteriile *gram-negative* nu rețin complexul colorant violet-iod, se decolorează și se recolorează cu contracolorantul, care este roșu, astfel aceste bacterii apar colorate în *roșu*.

Controlul de calitate:

Săptămânal se realizează **controlul de calitate** al coloranților Gram: se colorează frotiuri realizate din culturi de 18 – 24 h din germeni *gram-pozitivi* (*S. aureus* ATCC 25923) și *gram-negativi* (*E. coli* ATCC 25922). Notează în caietul de lucru și în caietul pentru colorații.

Este acceptată colorația Gram atunci când tulpinile de control se colorează conform criteriilor de interpretare.

TESTUL DE LATEX-AGLUTINARE

Testul de latex-aglutinare este utilizat pentru detectarea, direct din prelevatul clinic (LCR), a antigenelor specifice de specie/serogrup/serotip (Pastorex Biorad meningitis kit, BD DirectigenTM Meningitis Combo Test kit etc.) a unor bacterii care provoacă MBA:

1. *N. meningitidis* – serogrupurile A, B, C, W135, Y
2. *H. influenzae* tip b
3. *S. pneumoniae*
4. *S. agalactiae* (streptococ grup B)

Principiu: antigenul prezent în materialul de testat este identificat cu ajutorul particulelor de latex pe suprafața cărora sunt adsorbiți anticorpii specifici. Aceste particule se aglutinează puternic în prezența antigenului omolog, sau rămân în suspensie omogenă în absența acestuia.

Prezentare:

R1: *N. meningitidis* B/E coli K1

R2: *N. meningitidis* B/E coli K1 – control negativ

R3: *H. influenzae* b **R4:** *S. pneumoniae* **R5:** SGB

R6: *N. meningitidis* A

R7: *N. meningitidis* C

R8: *N. meningitidis* Y/W 135 **R9:** Control negativ polivalent **R10:** Control pozitiv polivalent

Mod de lucru:

Eșantioane: LCR, ser, urină, hemocultură, tulpini bacteriene izolate pe medii în plăci

I. LCR

- În cazul LCR foarte tulbure sau cu o cantitate importantă de hematii – centrifughează pentru 5 min. la 350 g și decantează supernatantul.
- Fierbe proba 3 min. la 100°C (incubator sau baie de apă).
- Lasă să se răcească la temperatura camerei, apoi centrifughează 5 min. la 3000 g sau filtrează cu filtru de 0,45 μm.
- Din supernatant pune câte o picătură în fiecare cerc al cardului de aglutinare.

- Omogenizează bine reactivii latex.
- Adaugă câte o picătură din fiecare reactiv, ținând flaconul în poziție verticală, urmând repartizarea indicată: R9, R6, R7, R1, R2 în cercurile albe și R8, R3, R4, R5 în cercurile negre.
- Amestecați reactivul latex și eșantionul cu ajutorul unui stic; schimbă sticul pentru fiecare latex.
- Agită cardul printr-o mișcare de rotație (120 rpm) timp de 10 min.
- Citește cu ochiul liber sau lupa sub o lumină bună.
- Aruncă sticurile și cardurile în saci autoclavabili.

II. Ser proaspăt:

- Adaugă 3 vol. de diluant R11 (1,5 ml) la un vol. ser (0,5 ml).
- Încălzește eșantionul 3 min. la 100°C (incubator sau baie de apă).
- Centrifughează 5 min. la 3000 g.
- Testează supernatantul ca LCR tratat.

III. Urina:

- Pentru a crește concentrația de antigen, prelevatul poate fi concen-trat până la 25 ori cu o membrană tip Amicon B-15 (Amicon Franța).
- Încălzește eșantionul 3 min. la 100°C (incubator sau baie de apă).
- Centrifughează 5 min. la 3000 g.
- Testează supernatantul ca LCR tratat.

IV. Hemocultura:

- Verifică morfologia și efectuează o colorație Gram pentru o orientare prezumptivă.
- Prelevează 1-2 ml din hemocultura pozitivă.
- Centrifughează 5 min. la 3000 g.
- Testează supernatantul ca LCR tratat.
- Observă apariția unei aglutinări în 5 min.

Anumite medii de cultură pot antrena reacții nespecifice sau probleme de lizibilitate. În caz de nesiguranță, testează paralel un bulion de hemocultură inoculat cu sânge steril sau contaminat cu un germene diferit de cei detec- tați cu trusa Pastorex Meningitis.

V. Serogruparea tulpinilor bacteriene izolate pe medii de cultură:

- Verifică morfologia – colorația Gram.
- R. oxidazei la bacterii G (-): (+) pentru *N. meningitidis*; (-) pentru *E. coli*
- R. catalazei la bacterii G (+): Nu se testează tulpinile catalază (+)

- Tulpinile de *S. pneumoniae* necapsulate nu pot fi identificate prin această tehnică.
- Prelevați 2-3 anse bacteriene și puneți-le în 0,5 ml ser fiziologic steril, până se obține o suspensie lăptoasă.
- Centrifugheați 5 min. la 3000 g.
- Testează supernatantul ca LCR tratat.
- Observă apariția unei aglutinări în 2 min.
- Confirmă identificarea speciei prin teste biochimice convenționale.

VI. Streptococii grup B, colonii α -hemolitice

- Pune în suspensie 5 col. în 2 ml bulion Todd Hewitt.
- Incubează la 37°C pentru 2-3 h.
- Centrifugheați 5 min. la 3000 g.
- Testează supernatantul ca LCR tratat.
- Observă apariția unei aglutinări în 1 min.
- Confirmă identificarea speciei prin teste biochimice convenționale.

VII. Interpretarea rezultatelor

- Reacție pozitivă: aglutinare vizibilă cu ochiul liber.
- Intensitatea aglutinării și timpul de apariție sunt în funcție de concentrația antigenului din eșantionul testat.
- Apariția unei discordanțe între detectarea pozitivă a antigenului și cultura negativă poate fi explicată prin absența bacteriei viabile în eșantionul inoculat în mediul de cultură (transport inadecvat pentru supraviețuirea bacteriilor fragile sau antibioterapie înainte de recoltarea probelor biologice).
- O reacție pozitivă cu latex anti *N. meningitidis* B / *E. coli* K1, la un nou născut sau prematur indică, în majoritatea cazurilor, o infecție cu *E. coli* K1. La o persoană mai în vârstă este mai probabil *N. meningitidis*. Cultura eșantionului trebuie să permită o confirmare de diagnostic.

VIII. Controlul de calitate:

- a) după agitare, soluțiile de latex trebuie să fie perfect omogene;
- b) martorul pozitiv polivalent R10 permite verificarea imunoreactivității fiecărui latex;
- c) soluția salină fiziologică permite verificarea absenței autoaglutinării fiecărui latex;
- d) reactivii latex nu trebuie utilizați dacă ei nu reacționează cu R10 sau când prezintă o autoaglutinare.

TESTUL OXIDAZEI

Principiu: Testul oxidazei detectează prezența enzimei citocromoxidaza și este util pentru diferențierea speciilor *Neisseria* și *Haemophilus* de speciile *Streptococcus*. Speciile *Haemophilus* și *Neisseria* posedă enzima citocromoxidaza (oxidază pozitiv), în timp ce speciile de *Streptococcus* nu (oxidază negativ). Sub acțiunea citocromoxidazei, diclorhidratul de N,N,N',N'-tetrametil-p-fenilendiamină servește ca donor de electroni la citocromoxidaza. Dacă un organism posedă enzima este oxidată, rezultând o schimbare imediată a culorii de la incolor la albastru (sau violet-închis).

Reactivi și medii

1. Medii în plăci necesare pentru creșterea microorganismelor
2. Benzi/discuri de oxidază

Consumabile

1. Anse bacteriologice doar din plastic sau platină
2. Pungă pentru deșeuri cu risc biologic
3. Cutii Petri

Pregătirea probei

1. Testul se efectuează utilizând cultură pură de 24 de ore.

Procedura de testare

1. Pentru a minimiza posibila răspândire a contaminării, așezați banda/discul de oxidază într-o cutie Petri.
2. Cu o ansă bacteriologică, repicați o colonie pe banda/discul de oxidază și observați schimbarea culorii în 30 de secunde.

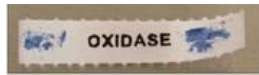
Notă: Pot fi testate mai multe izolate pe o singură bandă de oxidază – aveți grijă să aplicați bacteriile pe porțiuni separate ale benzii, care nu se suprapun.

3. După finalizarea procedurii, banda/discul și cutia Petri se aruncă într-un sac de deșeuri cu risc biologic.

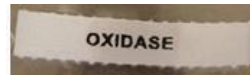
Interpretarea rezultatelor

Test pozitiv: schimbarea culorii în albastru sau violet-închis timp de 30 de secunde.

Test negativ: absența culorii timp de 30 de secunde. O schimbare de culoare după 30 de secunde este interpretată ca un rezultat negativ.



Test pozitiv



Test negativ

Specia microbiană	Oxidaza
<i>Neisseria meningitidis</i>	+
<i>Haemophilus influenzae</i>	+
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+
<i>Escherichia coli</i>	-

Limitări ale testului

1. Nu utilizați ansa din nicrom sau de fier pentru a efectua testul, deoarece poate duce la rezultate fals pozitive.
2. Coloniile mai vechi de 18-24 de ore pot produce reacții mai slabe.
3. Bacteriile trebuie să fie cultivate pe un mediu agarizat adecvat înainte de efectuarea testului la oxidază.
4. Testul oxidazei nu trebuie efectuat pe colonii crescute pe medii care conțin concentrații mari de glucoză, deoarece fermentația glucozei poate inhiba activitatea oxidazei.
5. Utilizați medii neselective și nediferențiale pentru a asigura rezultate valide ale testului.

Controlul calității

Martor pozitiv: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

Martor negativ: *Escherichia coli* ATCC 51739

TESTUL CATALAZEI

Principiu: Unele bacterii produc catalaza, o enzimă care facilitează detoxifierea celulară. Catalaza neutralizează efectele bactericide ale peroxidului de hidrogen (H_2O_2) prin descompunerea H_2O_2 în apă (H_2O) și oxigen (O_2). Apariția bulelor de gaz în timpul reacției se datorează producerii și eliberării de oxigen, care reprezintă o reacție pozitivă a catalazei.



Testul catalazei poate fi utilizat pentru a face diferențierea între cocii gram-pozitivi, cum ar fi stafilococii (catalază pozitivă) și streptococii/ente-rococii (catalază negativă).

Reactive și medii

1. Medii în plăci necesare pentru creșterea microorganismelor
2. Soluție 3% peroxid de hidrogen (sensibilă la lumină – se păstrează la frigider într-o sticlă întunecată)

Consumabile

1. Anse de inoculare sau tampoane din poliester
2. Pipetă Pasteur
3. Tuburi de 5 ml sau lame din sticlă
4. Recipient pentru obiecte ascuțite cu risc biologic
5. Pungă pentru deșeuri cu risc biologic

Pregătirea probei

1. Testul se efectuează utilizând cultură pură de 24 de ore.
2. Tuburile/lamele se etichetează cu numărul de identificare al probei.

Procedura de testare

1. Metoda în tub (este mai indicată din punctul de vedere al biosecurității comparativ cu metoda pe lamă, deoarece în timpul reacției se produc aerosoli, care sunt mai bine reținuți într-un tub decât pe lamă).
 - a. Folosind o ansă bacteriologică, se colectează câteva colonii, carese aplică la baza tubului.
 - b. Aveți grijă să NU transferați bucăți de mediu, în special geloză-sânge.
 - c. Se adaugă 4-5 picături de 3% H_2O_2 în tub.
 - d. Tubul se închide rapid.

- e. Citirea rezultatului.
- 2. Metoda pe lamă (se recurge la această metodă numai dacă nu sunt disponibile tuburi de 5 ml).
 - a. Folosind o ansă bacteriologică, se colectează câteva colonii, carese aplică pe o lamă din sticlă.
 - b. Aveți grijă să NU transferați bucăți de mediu, în special geloză-sânge.
 - c. Se adaugă 4-5 picături de 3% H₂O₂ pe lamă.
 - d. Citirea rezultatului.

Interpretarea rezultatelor

Test pozitiv: Apariția bulelor de gaz până la efervescentă imediat după adăugarea de H₂O₂.

Test negativ: Absența bulelor de gaz la 20 de secunde după adăugarea de H₂O₂.



Testul catalazei: a) metoda pe lamă, b) metoda în tuburi

Limitări ale testului

1. Catalaza este exprimată numai de cultura vie de microorganisme. Prin urmare, nu se testează culturi mai vechi de 24 de ore, ceea ce poate duce la rezultate fals negative.
2. Eritrocitele din plăcile de agar-sânge posedă enzima catalază.
3. Selectarea coloniilor cu o ansă metalică poate duce la rezultate fals- pozitive.

Controlul calității

Martor pozitiv: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538

Martor negativ: *Streptococcus pneumoniae* ATCC 6305

PRODUCEREA DE ACID PRIN UTILIZAREA CARBOHIDRAȚILOR

Testele de utilizare a carbohidraților se realizează pentru identificarea de specie a microorganismelor din genul *Neisseria*. Aceste microorganisme produc acid din carbohidrați prin oxidare.

Materiale necesare:

- tulpina de testat în cultură pură.
- mediile cu glucide.
- ansa bacteriologică.

Prepararea mediului cu glucide

- 1) La mediul agar bază cistine-tripticase se adaugă diferiți carbohidrați până la concentrația finală de 1%.
- 2) Pentru a confirma o tulpină ca *N. meningitidis* se utilizează un set de 4 tuburi, fiecare conținând un glucid: glucoza, maltoza, lactoza și zaharoza. Mediul cu glucid este turnat în pantă.
- 3) În mediu este inclus un indicator — roșu fenol, care este sensibil la modificarea pH-ului: dezvoltă culoarea galbenă în prezența acidului, la $\text{pH} < 6,8$.

Procedura propriu-zisă:

- Repică, cu ajutorul ansei bacteriologice, o colonie din cultura proaspată și însămânțează un spot pe mediul în pantă.
- Incubează în aerobioză (fără CO_2) la 35°C ; incubează pentru cel puțin 72 de ore înainte de a da un rezultat negativ.

Citirea și interpretarea

- *Reacție pozitivă*: dezvoltarea culturii bacteriene și virarea culorii mediului la galben indică producerea de acid.
- *Reacție negativă*: dezvoltarea culturii bacteriene și neschimbarea culorii mediului; rezultatul negativ nu trebuie interpretat înainte de 72 ore de incubare.

N. meningitidis oxidează glucoza și maltoza, dar nu și lactoza și zaharoza.

N. gonorrhoeae oxidează numai glucoza.

N. sicca oxidează glucoza, maltoza și zaharoza.

N. lactamica oxidează glucoza, maltoza și lactoza.

Moraxella catarrhalis nu fermentează niciunul din glucidele sus-menționate.
Utilizarea carbohidraților de unele specii ale genurilor *Neisseria* și *Moraxella*

SPECIA	PRODUCEREA DE ACID DIN			
	glucoză	maltoză	lactoză	zaharoză
<i>Neisseria meningitidis</i>	+	+	-	-
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	+	-	-	-
<i>Neisseria sicca</i>	+	+	-	+
<i>Neisseria lactamica</i>	+	+	+	-
<i>Moraxella catarrhalis</i>	-	-	-	-

Pentru identificarea tulpinilor de *N. meningitidis* și *H. influenzae*, se pot utiliza și sisteme comerciale, ca de ex. ApiNH sau carduri în sistemul VITEK 2C (BioMerieux).

TESTE SEROLOGICE PENTRU IDENTIFICAREA BAZA CARACTERELOR ANTIGENICE

Se realizează identificarea de grup și tip a tulpinilor bacteriene.

1. Identificarea de serogrup a *N. meningitidis*

Determinarea apartenenței tulpinilor de *N. meningitidis* la un anumit sero- grup, folosind seruri antimeningococice pentru serogrupele A, B, C, H, I, K, L, X, Y, Z, W135 și E29. Serogrupele care cauzează cel mai frecvent menin-gita sunt A, B, C, W135 si Y.

Materiale necesare:

- tupina de testat în cultură pură
- plăci cu geloză Mueller-Hinton cu adaus de 5-7% sânge de berbec
- trusa cu seruri polivalente (I: A + B + C; II: X + Y + Z + W135 + E29) și monovalente specifice de grup
- ansa bacteriologică
- pipete Pasteur
- lame din sticlă
- lupă

Procedura propriu-zisă

- Utilizează cultura pură de 18-24 h pe mediul Mueller-Hinton cu sânge.
- Pune câte o picătură din serurile polivalente I și II și o picătură de soluție salină izotonă (martor pentru autoaglutinare).
- Prepară aproximativ 1 ml suspensie foarte densă în soluție salină izotonă din cultura de testat.
- Depune câte o picătură din suspensia bacteriană preparată alături de picăturile de ser polivalent și soluție salină izotonă.
- Omogenizează fiecare picătură din suspensia bacteriană cu serul polivalent corespunzător și soluția salină izotonă cu ajutorul ansei bacteriologice.
- Agită lama din sticlă prin mișcări de rotație și înclinare pentru a completa amestecarea reactanților.
- Urmărește pe fond negru apariția sau lipsa aglutinării.
- Urmărește lipsa aglutinării suspensiei bacteriene cu soluția salină izo-tonă (martor pentru autoaglutinare).
- Urmărește prezența unei aglutinări vizibilă cu ochiul liber, apărută în interval de 1 min., cu unul dintre cele două seruri polivalente.
- Continuă reacția de aglutinare cu serurile monovalente conținute în

serul polivalent care a determinat aglutinarea.

- Serogrupul tulpinii de *N. meningitidis* va fi dat de serul monovalent care a aglutinat cu suspensia bacteriană testată.

Interpretarea rezultatelor

- *Test pozitiv*: aglutinare evidentă cu unul dintre serurile polivalente și, respectiv, monovalente și lipsa aglutinării cu soluția salină izotonă.
- *Test negativ*: lipsa aglutinării cu cele două seruri polivalente și cu soluția salină izotonă.
- *Tulpina autoaglutinabilă*: lipsa aglutinării cu serurile polivalente și prezența aglutinării cu soluția salină izotonă.
- *Tulpina poliaglutinabilă*: prezența aglutinării cu ambele seruri polivalente și lipsa aglutinării cu soluția salină izotonă.

2. Reacția de latex-aglutinare pentru serotiparea *S. pneumoniae*

Determinarea apartenenței tulpinilor de *S. pneumoniae* la un anumit serotip se realizează printr-o reacție rapidă de aglutinare pe lamă între seruri hipe- rimmune antipneumococice specifice de tip și suspensia bacteriană în soluție salină izotonă sau supernatantul unei culturi în mediu lichid.

Materiale necesare:

- Cultura bacteriană de testat, proaspătă, pe placa cu geloză Columbiacu sânge sau în mediu lichid.
- Seruri aglutinante specifice de tip antipneumococice.
- Pipete Pasteur.
- Ansa bacteriologică.
- Lame din sticlă
- Soluție salină izotonă (NaCl 0,85%).

Tehnica de lucru:

1. Colonii izolate pe geloză Columbia cu sânge:

- depune pe o lamă din sticlă mai multe picături de soluție salină izotonă.
- repică colonii α -hemolitice suspecte și omogenizează-le în fiecare din picăturile de soluție salină.
- adaugă câte 1 picătură din serurile antipneumococice specifice de tip peste câte o picătură de suspensie bacteriană.
- agită lama prin mișcări ușoare de rotație.

2. Cultura pură de 18 h în mediu lichid (bulion cord creier, BHI):

- centrifugă 1ml din cultura proaspătă 10 min. la 2000 rpm.
- cu supernatantul realizează reacția de aglutinare descrisă mai sus.

Citire și interpretare:

Reacție negativă: suspensie omogenă sau apariția unei ușoare aglutinăricare nu se intensifică în următoarele 2 min.

Reacție pozitivă: apariția unei aglutinări nete în mai puțin de 2 min.

Tulpinile de pneumococ care nu conțin antigen capsular nu pot fi identifica-te printr-o tehnică imunologică.

Controlul de calitate:

- Fiecare nou lot de antiser este testat cu un antigen corespunzător pentru controlul pozitiv și cel negativ; după verificare, se repartizează în părți corespunzătoare pentru lucru și se stochează la $-50^{\circ}\text{C} \dots -80^{\circ}\text{C}$; se etichetează fiecare parte cu tipul antiserului, numărul de lot, data stocării și data primirii.
- Antiserul de lucru este decongelat, etichetat cu data decongelării, data expirării (6 luni după decongelare) și numărul lotului.
- Antiserul pentru lucru este testat lunar cu antigenul corespunzător pentru controlul pozitiv și cel negativ.
- Antiserul de lucru se păstrează la $+2^{\circ}\text{C} \dots +8^{\circ}\text{C}$, când nu se utilizează imediat.

3. Reacția de aglutinare pe lamă (RAL) pentru serotiparea *H. influenzae*

Materiale necesare:

- cultura pură, proaspătă (18-24 ore) de *H. influenzae* de pe mediu specific (geloză chocolate);
- seruri aglutinante *H. influenzae* a, b, c, d, e, f și polivalent obținute prin imunizarea iepurilor;
- ansă bacteriologică;
- soluție salină izotonă (NaCl 0,85%);
- două lame din sticlă, bine curățate și degresate;
- pipete Pasteur;
- tuburi 12/120 mm.

Procedura:

- se efectuează o suspensie densă dintr-o cultură pură de 18-24 ore de pe mediu chocolate în 0,5 ml soluție salină (NaCl 0,85%).
- pe două lame din sticlă curate, flambate în momentul utilizării, se repartizează:
- picătură soluție salină (NaCl 0,85%);
- o picătură ser polivalent;
- câte o picătură din serurile tip a, b, c, d, e, f.
- se repartizează apoi câte o picătură din suspensia bacteriană.
- se omogenizează, apoi se agită ușor prin rotire, având grijă să nu se unească picăturile.
- se urmărește apariția aglutinării în maximum două minute.

Citire: se citește la lumină, pe fond negru. Aglutinarea se notează astfel:

- grunji fini și rari: +
- grunji fini și frecvenți: ++
- grunji mari: +++
- grunji voluminoși cu lichid clar: ++++

Interpretare:

- absența aglutinării în toate picăturile = tulpină netipabilă (NT);
- aglutinare în toate picăturile = tulpină autoaglutinabilă;
- aglutinare cu +...++++ în picătura cu ser polivalent și ++...++++ într-o altă picătură de ser monovalent = tulpina aparține serotipului respectiv;
- aglutinări în mai multe picături, dar de intensități diferite = tulpina aparține serotipului unde aglutinarea a fost mai rapidă și mai intensă.

Din rațiuni clinice și economice, se efectuează un screening al izolatelor: se testează mai întâi izolatul cu soluție salină și ser polivalent;

Dacă rezultatul acestei testări este:

- soluție salină: negativ (-)
- ser polivalent: +++++,

se testează mai departe cu serotip b; dacă rezultatul este negativ (-), se testează pentru restul serotipurilor.

Controlul de calitate:

- Fiecare nou lot de antiser este testat cu un antigen corespunzător pentru controlul pozitiv și negativ; după verificare, se repartizează în părți corespunzătoare pentru lucru și se stochează la -50°C...-80°C; se etichetează fiecare parte cu tipul antiserului, numărul de lot, data stocării și data primirii.
- Antiserul de lucru este decongelat, etichetat cu data decongelării, data expirării (6 luni după decongelare) și numărul lotului.
- Antiserul pentru lucru este testat lunar cu antigenul corespunzător pentru controlul pozitiv și cel negativ.
- Antiserul de lucru se păstrează la +2°C...8°C, când nu se utilizează imediat.

TESTUL SENSIBILITĂȚII LA OPTOCHIN

Testul sensibilității la optochin se aplică pentru diferențierea prezumtivă a *S. pneumoniae* de streptococii viridans. Acest test se realizează cu ajutorul discurilor de 5 µg clorhidrat de etilhidrocupreină.

Majoritatea pneumococilor sunt sensibili la optochin, în timp ce streptococii viridans sunt rezistenți. Specificitatea testului este de peste 90%.

Materiale necesare:

- tulpina de testat în cultură pură.
- discuri de optochin, care conțin de 5 µg ethylhydrocupreina (cu Ø discului de 6 sau 10 mm).
- pensă/dispenser.
- ansă bacteriologică.
- placă cu geloză nutritivă cu adaos de sânge de oaie 5% (preferabil geloză Columbia).

Procedura propriu-zisă

- repică 3-4 colonii suspecte din cultura prelevatului.
- descarcă-le în 3-4 sectoare separate, în striuri paralele strânse, pe geloză Columbia cu 5% sânge de oaie.
- plasează cu ajutorul unei pense sterile, în mijlocul fiecărei arii însămânțate, câte un disc de optochin.
- incubează peste noapte la 35-37°C în atmosferă cu 5% CO₂.
- interpretează rezultatele.

Citirea și interpretarea

- Masoară diametrul zonei de inhibiție în jurul discului de optochin.
Test pozitiv: diametrul zonei de inhibiție a creșterii ≥ 14 mm (Ø discului = 6 mm),
Test negativ: diametrul zonei de inhibiție a creșterii ≥ 16 mm (Ø discului = 10 mm).
- Tulpina este *S. pneumoniae* incert (cu necesitatea realizării testului bilolizei), atunci când avem:
 - diametrul zonei de inhibiție a creșterii între 9-13 mm (Ø discului = 6 mm),
 - diametrul zonei de inhibiție a creșterii < 16 mm (Ø discului = 10 mm).
- O tulpina nu este *S. pneumoniae* atunci când avem:
 - absența zonei de inhibiție a creșterii.

Controlul de calitate

Martor pozitiv: *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619. Martor negativ: *Streptococcus viridans*.

TESTUL BILOLIZEI

Testul bilolizei este recomandat pentru testarea tulpinilor de streptococi α -hemolitici care au diametre mici ale zonelor de inhibiție a creșterii, în cazul testării sensibilității la optochin.

Bila sau sărurile biliare activează autolizina N-acetilmuramil-L-alaninamidază, determinând liza culturilor de *S. pneumoniae* prin atacarea peptidoglicanului.

Materiale necesare:

- cultura proaspătă pură de testat.
- tuburi 12/120 mm.
- ansă bacteriologică.
- soluție salină izotonă (8,5% NaCl).
- soluție 10% dezoxicolat de sodiu.

Procedura propriu-zisă:

- pregătește o cultură proaspătă de 18-24 h a tulpinii de testat pe gelo-ză cu 5% sânge de oaie.
- realizează din această cultură o suspensie în 1 ml soluție salină izotonă, cu densitatea $\sim 0,5-1,0$ McFarland.
- împarte suspensia obținută în două părți egale ($\sim 0,5$ ml/tub).
- adaugă într-un tub 3-4 picături din soluția 10% dezoxicolat de Na, celălalt tub fiind martorul (M).
- agită ușor tuburile și incubează-le la $35-37^{\circ}\text{C}$ până la 30 min.

Citirea și interpretarea:

Test pozitiv (S. pneumoniae (+)): clarificarea suspensiei din tubul cu dezoxicolat, dar nu și în tubul cu apă distilată.

Test negativ (S. pneumoniae (-)): opacitate identică în cele două tuburi.

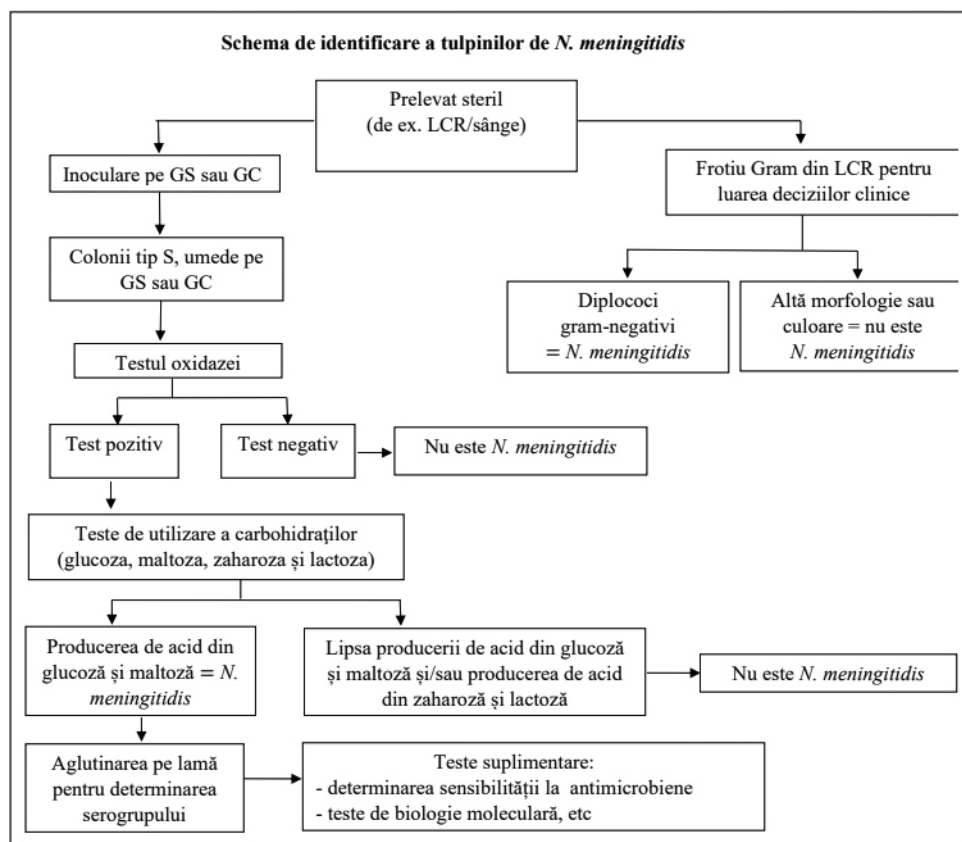
Interpretarea testelor combinate: optochin – biloliză:

- *S. pneumoniae (+)*: optochin (+); biloliză (+)
optochin incert; biloliză (+)
- *S. pneumoniae (-)*: optochin (-)
optochin (-); biloliză (-) optochin incert; biloliză (-)

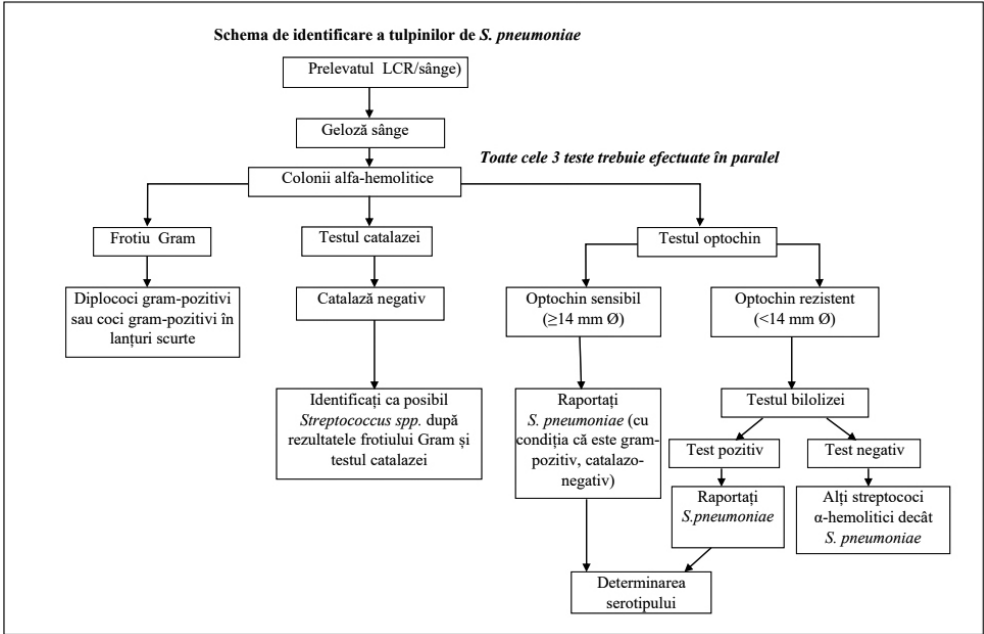
Controlul de calitate:

Martor pozitiv: *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619. Martor negativ: *Streptococcus viridans*.

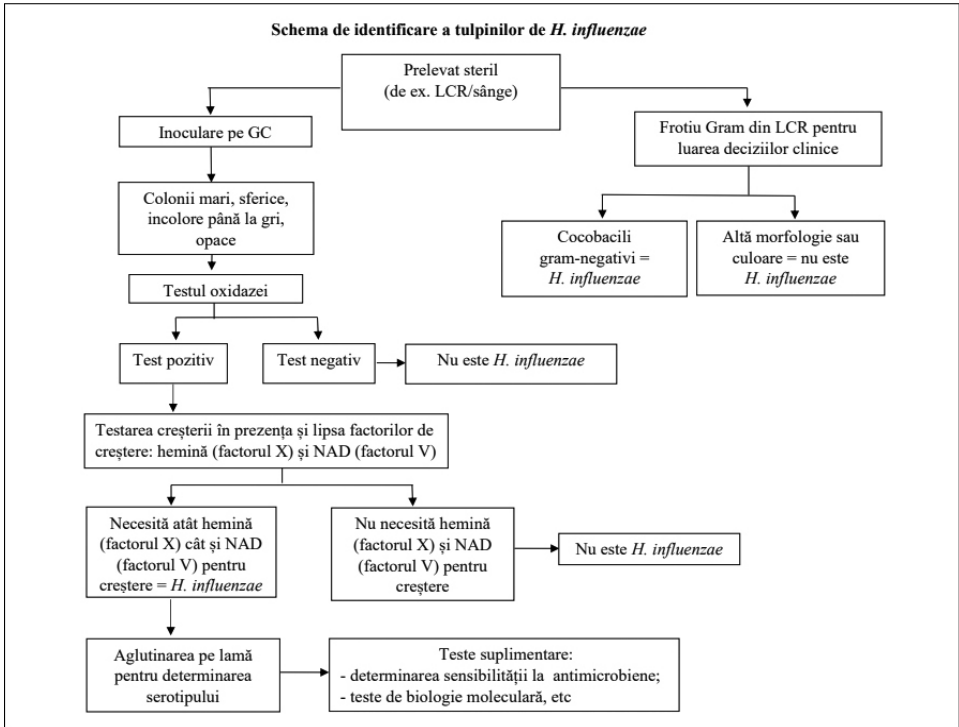
A) IDENTIFICAREA *NEISSERIA MENINGITIDIS*



B) IDENTIFICAREA *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE*



C) IDENTIFICAREA *HAEMOPHILUS INFLUENZAE*



Metoda de preparare a mediului T-I (Trans-Isolate)

Mediul T-I este un mediu bifazic, utilizat pentru cultivarea primară a *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* și *H. influenzae* din LCR și sânge. Acesta poate fi utilizat ca mediu de creștere, precum și de transport (fig.17).

Necesar:

A) Flacoane din sticlă cu capac de cauciuc, fixat cu capac metalic. Se utilizează flacoane cu volum de 20 sau 30 ml, cu condiția că volumul fazelor lichidă și solidă ale mediului să constituie o jumătate din capacitatea flaconului.

Diluent pentru fazele lichidă și solidă:

acid 3- (N-morpholino) propaneosulfonic (MOPS) sol. tampon 0,1 M, pH 7,2
20,93g

Apă distilată sterilă până la 1000 ml după ajustarea pH-ului la 7,2 cu NaOH

B) Faza solidă:

Cărbune activat	2,0 g
Amidon solubil	2,4 g
Agar (Difco)	10,0 g

Suspendă componentele fazei solide în 500 ml de sol. tampon MOPS, amestecând cu o bară. În timp ce se amestecă, pentru a menține cărbunele în suspensie, distribuie câte 5,0 ml în flaconul de 20 ml. Flacoanele se închid cu capac de cauciuc steril, fixat cu capac metalic și se autoclavează la temperatura de 121°C timp de 20 minute. După autoclavare, flacoanele se răcesc în poziție înclinată pentru a forma panta solidă.

C) Faza lichidă:

Bulion tripticază soia (Difco)	30,0g	Gelatină	10,0 g
sol. tampon MOPS	500,0 ml		

Mediul se încălzește pentru a dizolva gelatina și pentru a evita coagularea, apoi se autoclavează la temperatura de 121°C timp de 15 minute.

Pentru a permite utilizarea mediului pentru hemocultură, se adaugă aseptice, când este rece:

Polyanetholsulfonat de sodiu (SPS) 250,0 mg

Dizolvă prin amestecare viguroasă în 5 ml de sol. tampon MOPS.

Trece prin membrane filtrante (cu diametrul porilor de 0,22- μ) pentru a steriliza, înainte de a fi adăugat la mediu.

Aditiv opțional: 10 ml de supliment de creștere (Vitex sau IsoVitaleX) poate fi adăugat aseptically la mediul rece, pentru a stimula creșterea *H. influenzae*. Alternativ, se adaugă 0,1 ml supliment la un flacon de mediu T-I (1% din volumul ambelor faze), sau la un număr limitat de flacoane, dacă este necesar.

D) Se repartizează aseptically câte 5 ml de bulion în fiecare flacon, care conține fază solidă. Se închide cu capac de cauciuc steril fixat cu capac metalic. Pentru fixarea capacului metalic se utilizează un instrument manual, în cazul în care nu este disponibil un dispozitiv automatizat.

Flacoanele cu mediul T-I pot fi stocate (la temperatura de 4°C) și utilizate timp de cel puțin 2 ani. La temperatura frigiderului, faza lichidă a mediului devine gelatinoasă, însă se re-lichefiază la temperatura camerei. Înainte de utilizare, se face controlul sterilității mediului prin incubare la 35°C și controlul creșterii meningococilor. Înainte de inoculare, flacoanele se preîncălzesc în termostat (35°C-37°C) sau sunt lăsate să ajungă la temperatura camerei (25°C - 30°C).



Mediul T-I (Trans-Isolate)

NUMĂRAREA LEUCOCITELOR

Principiu – se determină cu ajutorul microscopului și al camerei de numărat a numărului de leucocite în LCR necentrifugat după distrugerea eritrocitelor.

Reactivi: reactivul Samson.

Echipament

1. Microscop
2. Camera Fuchs-Rozenthal.

Notă:

1. Deoarece LCR posedă mari capacități citolitice, numărarea leucocitelor cereo execuție rapidă, în primele 30 min. după puncție.
2. Celulele din LCR foarte repede se lipesc de pereții eprubetei, din aceste con-siderente lichidul înainte de examinare trebuie agitat bine.

Tehnica de lucru

Se introduce într-un tub cu o pipetă o picătură de reactiv Samson și 10 picături lichid. Reactivul Samson hemolizează eritrocitele și colorează leucocitele. Pentru colorarea mai pronunțată a celulelor lichidul se agită și se lasă pe timp de 10-15 min. După agitare se umple camera Fuchs-Rozenthal. Camera este compusă din 16 pătrate mari. Adâncimea camerei este de 0,2 mm, volumul total – 3,2 mkl (mm^3). Se numără leucocitele în toate 16 pătrate. Numărul leucocitelor numărate se împarte la 3,2 (volumul camerei) și se înmulțește cu 1,1. Astfel, aflăm numărul de leucocite într-un mkl (mm^3) de lichid. Practic, cifra de leucocite numărate în 16 pătrate se împarte la 3. În cazurile când LCR este tulbure înainte de umplerea camerei se dizolvă (1:10), cifra primită se înmulțește cu diluția.

Pentru a transforma rezultatele în unități SI (numărul de celule într-un litru LCR, cifra găsită în 1 mm^3 se înmulțește cu 10^6 /L.

Posibile erori pot apărea la păstrarea îndelungată a LCR.

Valori normale pentru lichidul recoltat prin puncția lombară: nou-născuți – 0 –

30 celule/mkl;

1-5 ani – 0-20 celule/mkl;

6-18 ani – 0-10 celule/mkl; adulți – 0-5 celule/mkl.

Interpretarea rezultatelor. Majorarea numărului de leucocite în lichid poartă numirea de pleocitoză. Pleocitoza prezintă un simptom important al proceselor inflamatoare ale tunicilor meningiale, în special al meningitelor bacteriene sau al afecțiunilor organice ale sistemului nervos central (encefalite, abcese cerebrale ș.a.).

Pot fi separate câteva grade de pleocitoză:

- | | |
|---------------------|------------------------------------|
| 1. Ușoară | $5 - 50 \times 10^6/l$ |
| 2. Moderată | $51 - 200 \times 10^6/l$ |
| 3. Majoră | $200 - 700 \times 10^6/l$ |
| 4. Extrem de majoră | mai mult de $1000 \times 10^6/l$. |

Pleocitoza pronunțată este caracteristică pentru meningitele purulente, pleocitoza ușoară și moderată pentru meningitele virale, tuberculoase. În cantități mici, leucocitele pot fi depistate în meningite seroase, neurosifilis, tumori, encefalite.



Fig. 1. Colonii de *Neisseria meningitidis*

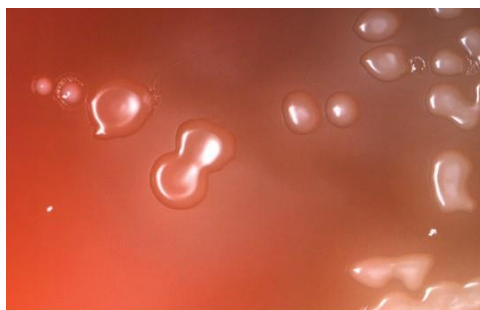


Fig. 2. Colonii de *Streptococcus pneumoniae*



Fig. 3. Testul sensibilității la optochin



Fig. 4. Colonii de *Haemophilus influenzae*

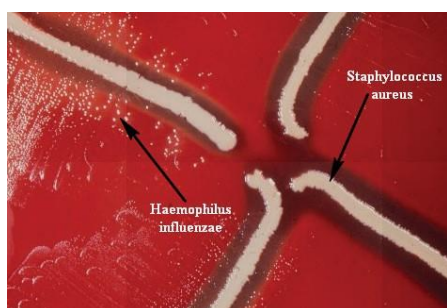


Fig. 5. Creștere satelită a *Haemophilus influenzae* strîlului de *Staphylococcus aureus*



Fig. 6. Creștere satelită a *Haemophilus influenzae* lângă suplimentul de factori XV

BIBLIOGRAFIE

1. Alexeev T. Meningita bacteriană acută la copil. Elaborare metodică pentru studenți. Chișinău 2012, pag. 6-13.
2. Bonadio W., Smith D., Goddard S., Burroughs J., Khaja G. Distinguishing cerebrospinal fluid abnormalities in children with bacterial meningitis and traumatic lumbarpuncture. *J Infect Dis* 1990; 162:251-4.
3. Borrow R., Alarcon P., Carlos J., Caugant D., Christensen H., Debbag R. et al. The Global Meningococcal Initiative: global epidemiology, the impact of vaccines on meningococcal disease and the importance of herd protection. *Expert Rev Vaccines*.2017;16(4):313–28.
4. Brouwer M., Tunkel A., van de B. Epidemiology, diagnosis, and antimicrobial treatment of acute bacterial meningitis. *ClinMicrobiolRev* 2010; 23:467-92.
5. Burtis C., Ashwood E., Bruns D. Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics. Philadelphia: Elsevier; 2006. 871-872.
6. Chang W., Lu C., Huang C., Chuang Y. Mixed infection in adult bacterial meningitis. *Infection* 2000; 28:8-12.
7. Chaudhuri A., Martin P. M., Kennedy P. G. E. et al. EFNS guideline on the management of community-acquired bacterial meningitis: report of an EFNS Task Force on acute bacterial meningitis in older children and adults. *European Journal of Neurology* 2008, 15:649–659.
8. Dyckhoff-Shen S., Koedel U., Pfister H.-W., Klein M. SOP: emergency workup in patients with suspected acute bacterial meningitis. 2021, 7p.
9. Dominic R., Prashanth H., Shenoy S., Baliga S. Diagnostic value of latex agglutination in cryptococcal meningitis. *JLab Physicians* 2009; 1:67-8.
10. Esparcia O., Montemayor M., Ginovart G., Pomar V., Soriano G., Pericas R. et al. Diagnostic accuracy of a 16S ribosomal DNA gene-based molecular technique (RT-PCR, microarray, and sequencing) for bacterial meningitis, early-onset neonatal sepsis, and spontaneous bacterial peritonitis. *DiagnMicrobiolInfectDis* 2011; 69:153-60.
11. Furugen M., Yamashiro S., Tamayose M., Naha Y., Miyagi K., Nakasone C. et al. Elsberg syndrome with eosinophilic meningoencephalitis caused by *Angiostrongylus cantonensis*. *Intern Med* 2006; 45:1333-6.
12. Ginsberg L., Kidd D. Chronic and recurrent meningitis. *PractNeurol* 2008;8:348-61.
13. Gray L., Fedorko D. Laboratory diagnosis of bacterial meningitis. *Clin Microbiol Rev* 1992; 5:130-45.
14. Griffiths M., McGill F., Solomon T. Management of acute meningitis. *Clinical Medicine*. 2018, 18 (2) 164-169; DOI: 10.7861/clinmedicine.18-2-164.
15. Jing-Zi P., Zheng-Xin H., Wei-Jun C., Yong-Qiang J. Detection of bacterial meningitis pathogens by PCR-mass spectrometry in cerebrospinal fluid. *Clin*

Lab. 2018; 64: 1013-1019.

16. Kahlmann V., Roodbol J., van Leeuwen N., Ramakers C., van Pelt D., Neuteboom R. et al. Validated age-specific reference values for CSF total protein levels in children. *Eur J Paediatr Neurol* 2017.
17. Leen W., Willemsen M., Wevers R., Verbeek M. Cerebrospinal fluid glucose and lac-tate: age-specific reference values and implications for clinical practice. *PLoS One* 2012; 7:e42745.
18. Salaki J., Louria D., Chmel H. Fungal and yeast infections of the central nervous system. A clinical review. *Medicine (Baltimore)* 1984; 63:108-32.
19. Marchandin H., Ventura V., Alonso J., Van de P. Mixed bacterial meningitis due to *Streptococcus pneumoniae* and *Neisseria meningitidis* in an 18-month-old child. *J Clin Microbiol* 2005; 43:1477-9.
20. Menkes J., Sarnat H., Maria B. *Child Neurology*. Philadelphia: Wolters Kluwer Health; 2011.
21. McPherson R., Pincus M. *Henry's clinical diagnosis and management by laboratory methods*. St. Louis, Missouri: Elsevier; 2017. 481-508.
22. Nascimento-Carvalho C., Moreno-Carvalho O. Normal cerebrospinal fluid values in full-term gestation and premature neonates. *Arq Neuropsiquiatr* 1998; 56:375-80.
23. Nigrovic L., Kuppermann N., Macias C., Cannavino C., Moro-Sutherland D., Schremmer R. et al. Clinical prediction rule for identifying children with cerebrospinal fluid pleocytosis at very low risk of bacterial meningitis. *JAMA* 2007; 297:52-60.
24. Nigrovic L., Kimia A., Shah S., Neuman M. Relationship between Cerebrospinal Fluid Glucose and Serum Glucose. *New England Journal of Medicine* 2012; 366:576-8.
25. Negrini B, Kelleher KJ, Wald ER. Cerebrospinal fluid findings in aseptic versus bacterial meningitis. *Pediatrics* 2000; 105:316-9.
26. Obaro S. Updating the diagnosis of bacterial meningitis. *Infectious Diseases*. 2019, vol. 19, nr. 11, p. 1160-1161.
27. Perkins M., Mirrett S., Reller L. Rapid bacterial antigen detection is not clinically useful. *J Clin Microbiol* 1995; 33:1486-91.
28. Rusu G. Boli infecțioase la copii. Manual (ediția a 3-a). Chișinău 2021, pag.81-102.
29. Schuurman T., de Boer R., Kooistra-Smid A., van Zwet A. Prospective study of use of PCR amplification and sequencing of 16S ribosomal DNA from cerebrospinal fluid for diagnosis of bacterial meningitis in a clinical setting. *J Clin Microbiol* 2004; 42:734-40.

30. Shah S., Ebberson J., Kestenbaum L., Hodinka R., Zorc J. Age-specific reference values for cerebrospinal fluid protein concentration in neonates and young infants. *J Hosp Med* 2011; 6:22-7.
31. Seiden J., Zorc J., Hodinka R., Shah S. Lack of cerebrospinal fluid pleocytosis in young infants with enterovirus infections of the central nervous system. *Pediatr Emerg Care* 2010; 26:77-81.
32. Spanos A., Harrell F., Durack D. Differential diagnosis of acute meningitis. An analysis of the predictive value of initial observations. *JAMA* 1989; 262:2700-7.
33. Van de Beek D., de Gans J., Spanjaard L. et al. Clinical features and prognostic factors in adults with bacterial meningitis. *N Engl J Med* 2004; 351:1849–59.
34. Van de Beek D. et al. ESCMID guideline: diagnosis and treatment of acute bacterial meningitis. *Clin Microbiol Infect* 2016; 22: S37–S62.
35. Wang X., Theodore M., Mair R., Trujillo-Lopez E., du P., Wolter N. et al. Clinical validation of multiplex real-time PCR assays for detection of bacterial meningitis pathogens. *J Clin Microbiol* 2012; 50:702-8.
36. White K., Ostrowski K., Maloney S., Norton R. The utility of cerebrospinal fluid parameters in the early microbiological assessment of meningitis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2012.
37. Wu H., Cordeiro S., Harcourt B., Carvalho M., Azevedo J., Oliveira T. et al. Accuracy of realtime PCR, Gram stain and culture for *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* and *Haemophilus influenzae* meningitis diagnosis. *BMC Infect Dis* 2013, p. 13:26.
38. Advisory Committee on Dangerous Pathogens. The Approved List of Biological Agents. Health and Safety Executive 2013, p. 1-32.
39. Advisory Committee on Dangerous Pathogens. Infections at work: Controlling the risks. Her Majesty's Stationery Office 2003.
40. Advisory Committee on Dangerous Pathogens. Biological agents: Managing the risks in laboratories and healthcare premises. Health and Safety Executive 2005.
41. Advisory Committee on Dangerous Pathogens. Biological Agents: Managing the Risks in Laboratories and Healthcare Premises. Appendix 1.2 Transport of Infectious Substances – Revision. Health and Safety Executive 2008.
42. Centers for Disease Control and Prevention. Guidelines for Safe Work Practices in Human and Animal Medical Diagnostic Laboratories. *MMWR Surveill Summ* 2012; 61:1-102.
43. Home Office. Anti-terrorism, Crime and Security Act. 2001.
44. UK National External Quality Assessment Scheme for Immunochemistry Working Group. National Guidelines for analysis of cerebrospinal fluid for

- bilirubin in subarachnoid haemorrhage. *Ann Clin Biochem* 2003; 40:481-8.
45. World Health Organization. Guidance on regulations for the Transport of Infectious Substances 2013-2014. 2012.
 46. World Health Organization. Defeating Meningitis by 2030 a Global Road Map. 2021, 32p.
 47. Castillo D., Harcourt R., Hatcher C. et. al. Laboratory Methods for the Diagnosis of Meningitis Caused by *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, and *Haemophilus influenzae*. WHO Manual, 2nd edition. 2011, 323

