



## Controlul creșterii microorganismelor

- **în practica medicală**
  - spitale – secții medicale și chirurgicale – infecții nozocomiale
  - cabinete medicale, stomatologice
- **în microbiologie**
  - material infecțios – risc pentru contaminarea mediului, îmbolnăvirea personalului
  - diagnostic corect: prevenirea contaminării probelor din mediul extern

### **Definiții:**

**DECONTAMINARE:** reducerea numărului de germeni de pe un obiect sau dintr-o substanță până la 0, poate fi efectuată prin mai multe metode:

**ANTISEPSIE:** decontaminarea tegumentelor și mucoaselor cu ajutorul unor substanțe chimice antiseptice *bacteriostatice* (netoxice pentru tegument): alcool etilic 70°, tinctură de iod 5%,  $\text{KMnO}_4$  0,1%, detergenți cationici. Distrugă doar formele vegetative

**DEZINFECȚIE:** distrugerea patogenilor (mai puțin a sporilor) de pe suprafețe, din aer, cu ajutorul unor substanțe chimice dezinfectante *bactericide* (toxice pentru țesuturi vii): fenoli, formol,  $\text{H}_2\text{CO}_3$ . Împiedică răspândirea bolilor infecțioase.

**STERILIZARE:** distrugerea sau îndepărtarea tuturor formelor vii (**inclusiv spori**)

**ASEPSIE:** absența patogenilor – menținerea sterilității – presupune aplicarea tehnicilor aseptice pentru a împiedica pătrunderea microbilor într-un substrat steril.

**SANITIZARE** – măsuri pentru asigurarea sănătății publice

**PREZERVARE, CONSERVARE** - păstrarea viabilității microorganismelor o durată variabilă de timp

**CURAT** – lipsit de murdărie organică/anorganică (fără referire la microorganisme)

### **Factori care influențează eficacitatea metodelor de control**

- mărimea populației bacteriene
  - moartea bacteriilor este exponențială (mai mulți germeni = mai mult timp)
- timpul de expunere la agentul decontaminant
  - creșterea timpului de expunere crește rata distrugerii
- efectul concentrației, a temperaturii și a pH-ului
  - creșterea concentrației crește rata distrugerii
  - temperatura, concentrația, pH-ul la care acționează agentul
  - stabilitatea agentului la pH, temperatură
- structura germenului
  - endospori - clostridii
  - chist – Protozoa
  - peretele celular - Mycobacterium
- interacțiunea cu mediul înconjurător – protecția germenilor
  - prezența substanțelor organice protejează microorganismele (curat – murdar)
  - dezinfecție în spitale – selectarea rezistenței



## Metode de decontaminare

Metodele se aleg în funcție de situația practică. (materialele care urmează a fi tratate sunt termostabile/ termorezistente, etc. ?)

Nu toate metodele de decontaminare sunt și metode de sterilizare!

## Metode fizice

### I. Căldura

#### a. Căldura uscată:

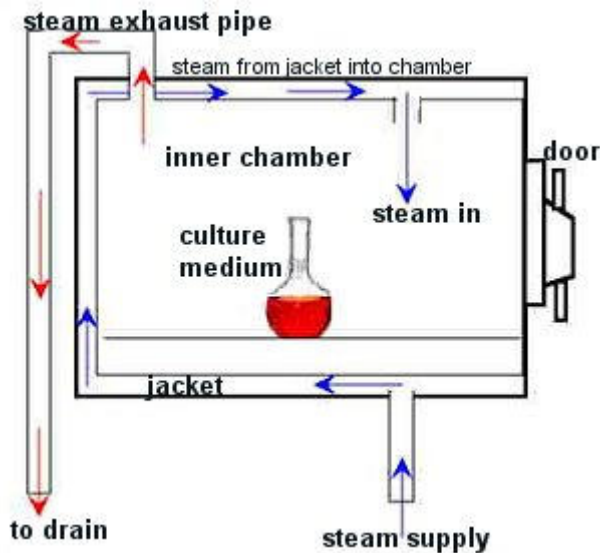
- Încălzirea la roșu – ansa de platină
- Flambare – completarea sterilizării – trecerea obiectului prin flacără
- Incinerarea – arderea cu reducere la cenușă
  - **indicații:** materiale dispozabile din plastic, reziduuri organice solide, carcasele, cadavrele animalelor
- Sterilizarea prin aer cald – mecanism de acțiune: oxidare
  - **indicații:** sticlărie de laborator, vase din porțelan, instrumentar chirurgical, pulberi termostabile
  - **contraindicații:** soluții apoase, obiecte din cauciuc, plastic, țesături și vată din bumbac sau fibră sintetică, materialele contaminate din laborator
  - se realizează în etuvă (cuptorul Pasteur, Poupinel)
  - 160°C 2h, 180°C 1h

#### b. Căldura umedă:

- Fierberea – mecanism de acțiune: denaturare
  - distruge formele vegetative, nu și sporii
  - nu este metodă de sterilizare eficientă
  - 100°C, 30 minute
- Vaporii fluenți – în vasul Koch, Arnold
- Tindalizarea – sterilizarea fracționată: evită încălzirea la temperaturi de peste 100°C
  - încălzire în 3 zile consecutive, între încălziri incubare la termostat pentru germinarea sporilor
  - tindalizare la 100°C în vasul Koch (Arnold) utilizând vapori fluenți
  - tindalizare la 65°C în baie de apă
  - sterilizarea unor medii de cultură, alimente
- Sterilizare prin vapori sub presiune – **autoclavarea**; mecanism de acțiune: denaturare
  - temperatura vaporilor de apă într-un spațiu închis crește proporțional cu presiunea
    - 0,5 atm – 115°C
    - 1 atm – 121°C
    - 2 atm 134°C
  - în microbiologie: 121°C timp de 15' - 30'
  - în blocurile operatorii: 134°C timp de 30'



- **indicații:** sterilizarea materialului infecțios din laborator, medii de cultură termostabile, instrumente chirurgicale, halate, câmpuri operatorii, etc.
- **contraindicații:** material plastic, piele, blană



schemă autoclav orizontal

## II. Pasteurizarea

- denaturarea proteinelor – expunere la temperaturi de sub 100°C
- produse alimentare termolabile
- nu se distrug: micobacteriile, enterovirusurile
  - joasă (LTLT – low temperature long time)
  - înaltă (HTST – high temperature short time)
  - (UHT – ultra high temperature)

## III. Filtrarea

- reținerea microorganismelor din medii lichide sau aer
- trecerea prin membrane cu porozități diferite (0,22μ, 0,45μ, 0,8μ)
- membrane: acetat, nitrat celuloză, policarbonat, teflon
- sterilizarea lichidelor termolabile și sterilizarea aerului pentru crearea unui mediu aseptice (boxe cu flux de aer laminar – HEPA filter: High-efficiency Particulate Air)

## IV. Centrifugarea – pentru virusuri se folosesc viteze mari (10000 rpm)

## V. Radiații

- ionizante – distrug ADN-ul
  - penetrație mare
  - sterilizarea instrumentelor chirurgicale, stomatologice
  - nu este o metodă des folosită
- neionizante – alterarea ADN-ului
  - ex. razele UV – lampa germicidă
  - nu sunt penetrante
  - sterilizarea suprafețelor de lucru netede, curate, sanitizarea saloanelor, sălilor de operație

## VI. Vibrații ultrasonice



## Substanțe chimice

### I. Agenții alkilanți:

- au acțiuni sporo- și bactericidă (glutaraldehida, oxidul de etilen); formaldehida are doar efect dezinfectant
- sterilizarea instrumentelor medicale, a echipamentelor endoscopice, a medicamentelor
- oxidul de etilen: substanță gazoasă cu penetrabilitate mare
- glutaraldehida: soluție apoasă 2%

### II. Soluții dezinfectante și antiseptice

- Halogenii
  - Clorul și derivații de clor, hipocloriți
  - Iodoforii
- Derivații fenolici
- Detergenți
- Alcoolii – etanol 70-80%

Substanțe chimice utilizate în microbiologie:

- pentru dezinfecție: cloramină 5%, fenol 3%, etc.
- pentru antisepsia mâinilor: bromocet 1%, cloramină 1%, etc.

## Metode de prezervare

### 1. Frigul

- refrigerare: 4°C: stare de viață latentă
- congelare la -21°C – sterilizare
- congelare bruscă la -70°C: prezervare

### 2. Desicare

- liofilizarea – congelare bruscă și desicare: prezervarea pe termen lung a culturilor,
- presiune osmotică – îndepărtarea apei din alimente (fructe, lapte praf)

## Controlul sterilizării și al sterilității

**Controlul sterilizării:** controlul procesului de sterilizare

- metode fizice – controlul temperaturii (termometru), presiunii (manometru), timpului de expunere
- metode chimice: se folosesc substanțe cu punct de fuziune apropiat de temperatura la care se face sterilizarea (acidul benzoic are punctul de fuziune la temperatura de 121°C)
- metode biologice: fiole Stearotest – suspensie de spori de *Bacillus stearothermophilus*; atingerea temperaturii de 121°C duce la distrugerea sporilor, indicatorul din fiole virează.

**Controlul sterilității:** eficiența sterilizării și menținerea sterilității; se realizează prin metode bacteriologice (recoltarea probelor de pe suprafețe sterile, cultivare)



## **Recoltarea și transportul produselor patologice în examenul virusologic**

Obținerea unui rezultat corect la examenul microbiologic impune respectarea unor reguli privind:

- modul de recoltare al produsului patologic (PP)
- metodele de conservare
- modalitățile de transport

Se pun următoarele **întrebări**:

- **Ce** se recoltează? – care este PP sugestiv pentru stabilirea diagnosticului
  - Căutăm virusul:
    - la poarta de intrare
    - în organe țintă
    - căile de răspândire (sânge, ganglioni)
    - căile de eliminare (intestin, secreții, lichid vezicular)
  - Căutăm antigenelor virale
    - umori
    - exsudate
    - sânge
    - urină
  - Căutăm anticorpii specifici antivirali
    - sânge
- **Cum** se recoltează? – care este calea de acces indicată pentru prelevarea PP
- **Cât** se recoltează? – cantitatea produsului prelevat
- **Când** se recoltează? – care este momentul optim de recoltare
- **În ce scop** se recoltează? – precizarea examenelor de laborator solicitate

Se ține cont de următoarele **reguli**:

- se folosesc recipiente curate și sterilizate pentru a preveni contaminarea probelor
- evitarea contactului cu substanțe antiseptice/dezinfectante a produsului
- în unele cazuri trebuie folosite medii de transport
- recipientele de transport se închid ermetic pentru a preveni contaminarea mediului și a personalului care manipulează PP
- produsul să fie însoțit de un bilet de trimitere completat corect
- probele să fie etichetate și transportate la laborator în cel mai scurt timp posibil



### Pentru examen virusologic

- se transportă **imediat** în recipiente închise ermetic, pe gheață, însoțite de formular de cerere de analiză completată corespunzător
- unele virusuri sunt deosebit de labile și își pierd viabilitatea/infectivitatea rapid (ex: citomegalovirus, varicella-zoster virus, virusul respirator sincițial), de aceea dacă produsele nu pot fi prelucrate imediat trebuie congelate rapid la -70°C
- produsele nu se congeleză la -20°C (virusurile își pierd viabilitatea)

Nr. Crt.	Produsul patologic	Examen virusologic
1.	Exudatul faringian	<ul style="list-style-type: none"> <li>• se șterge ferm mucoasa faringiană cu un tampon uscat</li> <li>• tamponurile încărcate se așează în mediu de transport, se păstrează/se transportă la laborator pe gheață</li> <li>• izolarea virusurilor de pe tamponuri este mai puțin eficientă decât izolarea din aspirate sau lavaje, dar recoltarea cu tamponul este mult mai ușor de efectuat</li> <li>• se transportă la laborator pe gheață</li> </ul>
2.	Secreția nazală	<ul style="list-style-type: none"> <li>• se rotește tamponul umectat cu mediu de transport în cavitatea nazală</li> <li>• tamponurile încărcate se așează în mediu de transport, se păstrează/se transportă la laborator pe gheață</li> <li>• se transportă la laborator pe gheață</li> </ul>
3.	Secreția nazo-faringiană	<ul style="list-style-type: none"> <li>• tamponul inserat pe tijă flexibilă se introduce printr-o nară până ce se atinge peretele posterior al nazofaringelui, se așteaptă câteva secunde și se retrage</li> <li>• în primele 5 zile de la apariția simptomelor</li> <li>• se transportă la laborator pe gheață</li> </ul>
4.	Sputa	<ul style="list-style-type: none"> <li>• se transportă la laborator pe gheață</li> </ul>
5.	Sânge	<ul style="list-style-type: none"> <li>• în cursul diagnosticului serologic                             <ul style="list-style-type: none"> <li>○ se recoltează sânge în vacutainere fără anticoagulanți (dop roșu)</li> <li>○ sângele recoltat se transportă fără refrigerare, la temperatura camerei</li> <li>○ serul este separat în laborator.</li> </ul> </li> <li>• în cazul determinării statusului imun                             <ul style="list-style-type: none"> <li>○ se recoltează o singură probă</li> <li>○ pentru detectarea infecțiilor acute se recoltează probe perechi                                     <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ o probă de sânge în perioada de stare a bolii</li> <li>▪ o probă în starea de convalescență, interval de 10-14 zile între probe</li> </ul> </li> </ul> </li> </ul>
6.	LCR	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Recoltarea se face în primele 7 zile de la debut</li> <li>• se transportă la laborator pe gheață</li> </ul>



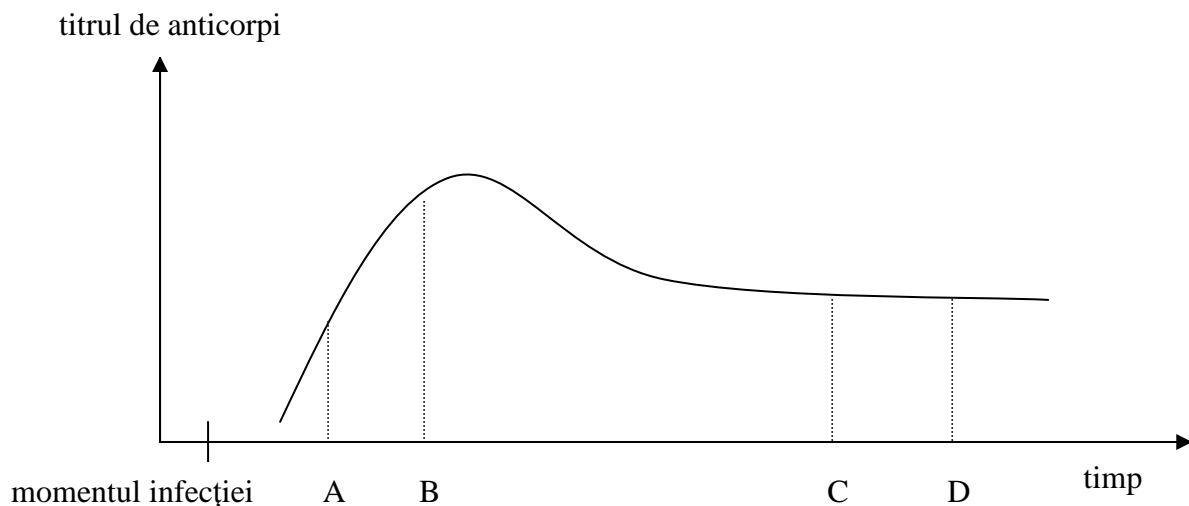
7.	Urina	<ul style="list-style-type: none"> <li>• se recoltează jetul mijlociu în recipient steril cu capac filetat</li> <li>• se transportă imediat la laborator pe gheață</li> <li>• recoltarea se face             <ul style="list-style-type: none"> <li>○ în primele 2 săptămâni de boală</li> <li>○ pentru CMV – oricând pe durata bolii</li> </ul> </li> <li>• se transportă la laborator pe gheață</li> </ul>
8.	Secrețiile genitale – la femei	<ul style="list-style-type: none"> <li>• se transportă la laborator pe gheață</li> </ul>
9.	Secrețiile genitale – la bărbați	<ul style="list-style-type: none"> <li>• se transportă la laborator pe gheață</li> </ul>
10.	Materii fecale	<ul style="list-style-type: none"> <li>• scaun emis spontan</li> <li>• primele 2 – 3 zile de boală</li> <li>• NU conservanți, medii de transport</li> <li>• NU recoltare cu tamponul – o mare parte de virus se absoarbe pe tampon</li> <li>• conservare             <ul style="list-style-type: none"> <li>○ refrigerare la 4<sup>0</sup>C</li> <li>○ congelare la -70<sup>0</sup>C</li> </ul> </li> <li>• container steril</li> <li>• 5 – 10 cm<sup>3</sup></li> </ul>
11.	Leziuni tegumentare	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Lichid vezicular și raclaje             <ul style="list-style-type: none"> <li>○ șansa izolării virusurilor din vezicule este cea mai mare în primele 3 zile de la apariția leziunilor</li> <li>○ se aspiră conținutul veziculelor cu ac steril subțire și se introduce într-un volum mic de mediu de transport</li> <li>○ dacă vezicula se sparge, se poate efectua recoltarea cu un tampon, raclând baza veziculei pentru a obține și celule, tamponul încărcat se introduce în mediu de transport</li> <li>○ se transportă pe gheață</li> </ul> </li> </ul>



## Schema diagnosticului virusologic

- I. Metode directe
  1. Determinarea virusului, antigenelor virale, acizilor nucleici virali direct din produsul patologic
    - examen microscopic
      - evidențierea incluziilor virale – microscopie optică
      - microscopie electronică
    - reacții antigen-anticorp (evidențierea antigenului)
    - reacții de hibridizare, amplificare genică (PCR)
  2. Cultivarea virusurilor pe:
    - culturi celulare, linii celulare
    - oul de găină embrionat
    - animale de laborator
  3. Identificarea virusului izolat
    - prin modificările caracteristice apărute pe culturile celulare, OGE, animale de experiență
    - prin metodele de la punctul 1.
- II. Metode indirecte
  - detectarea anticorpilor din serul bolnavilor
  - anticorpii se urmăresc în dinamică

Seroconversia: creșterea titrului de anticorpi în probele de ser recoltate la interval de 10-14 zile (demonstrarea unei infecții recente, actuale)



**probele A, B:** creșterea titrului de anticorpi = seroconversie – infecție recentă, diagnostic pozitiv

**probele C, D:** nu se detectează seroconversia; infecția a avut loc în trecut;



## Morfologia virală

- Virion = virus
  - unitatea virală, morfofuncțională, completă, intactă, infecțioasă, cu diametrul cuprins între, capabil să infecteze bacterii, plante, animale, omul
- Se multiplică doar în interiorul unei celule vii

### • Structura virusurilor

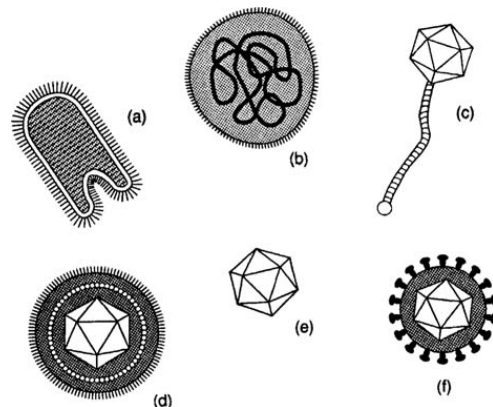
- genom viral - ARN/ADN
- capsida
- înveliș viral

### • Morfologia virală

- cubică/icosaedrică: v. herpetic, adenovirus (d), polio (e)
- helicoidală: v. gripal, v. rabic (a,b)
- binară: bacteriofag (c)

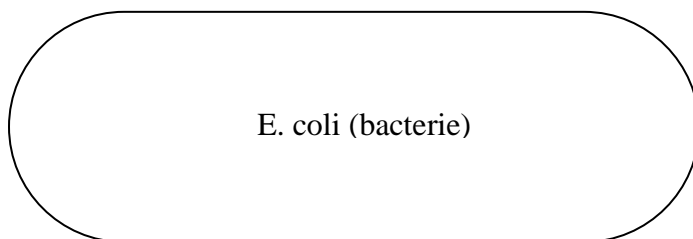
### • Aspectul electrono-microscopic al virusurilor

- sferic: v.gripal (b), v.herpetic (d), v. HIV (f)
- cilindric, bastonaș: v. mozaicului tutunului
- paralelipiped: v. variolic, v. vaccinia
- cartuș: v. rabic (a)
- filamentos: v. Ebola
- sferic cu coadă: bacteriofag (c)
- 



### • Dimensiuni

- variabile, variind de la 20-900 nm
- se evidențiază doar la microscopul electronic



v. vaccina



adenovirus



v. mozaicului tutunului



poliovirus



## Examenul microscopic

### Examinare prin microscopie optică (MO)

Prin MO pot fi urmărite incluziile virale (aglomerări de particule virale situate intranuclear sau intracitoplasmatic).

### Colorația Mann

Permite evidențierea incluziilor pe secțiuni de organe incluse în parafină.

Modul de lucru:

- Deparafinare – hidratare în apă distilată
- Amestec de colorant: albastru de metil + eozină gălbuie (24 de ore la 37°C, 1,5-2 ore la 56°C)
- Spălare: alcool absolut
- Diferențiere cu alcool sodat (preparatul devine roz)
- Spălare: alcool absolut
- Trecere rapidă prin acid acetic (preparatul devine albastru)
- Clarificare cu xilol
- Montare în balsam de Canada

Se vor colora:

- citoplasma în albastru
- nucleul în violet
- nucleolii în roșu violet
- incluziile în roșu strălucitor
- Ex.: studierea incluziilor virale Babeș-Negri formate de virusul rabiei

### Microscopia electronică (ME)

Permite studierea morfologiei, structurii virale.

Pentru ME pot fi prelucrate materiale sub formă de suspensii sau secțiuni.

Prepararea secțiunilor din fragmente de țesut sau culturi celulare:

- După un anumit tratament (prefixare cu glutaraldehidă, fixare cu tetraoxid de osmiu, deshidratare) fragmentele se includ în rășini sintetice polimerizabile (Durcupan, Vestopal), într-o capsulă de gelatină. Rășinile au proprietatea de a se solidifica în urma polimerizării la 65-95°C.
- Din secțiunile incluse în rășină și solidificate se decupează secțiuni având grosimea între 56-200Å cu ajutorul ultramicrotomului.
- Pentru susținerea preparatului examinat se folosesc grile speciale (plasă metalică țesută). Pe aceasta se depune o picătură din suspensie sau secțiune pregătită în prealabil.
- Se efectuează o colorare negativă cu acid fosfotungstic.
- După uscare se examinează la ME, cu o mărire de 20000-40000x, se efectuează fotografiile.
- Se studiază particula virală, forma, detaliile de suprafață, incluzii.

Metode îmbunătățite

- ultracentrifugarea suspensiilor direct pe grilă – permite o depunere și atașare mai fermă a particulelor, a celulelor



- criomicroscopia electronică – se prelucrează secțiuni congelate
- imunomicroscopie electronică – pe grila îmbrăcată cu anticorpi se atașează virusurile cu antigenele corespunzătoare