

MICROBIOLOGIA ȘI DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECȚIILOR AEROGENE

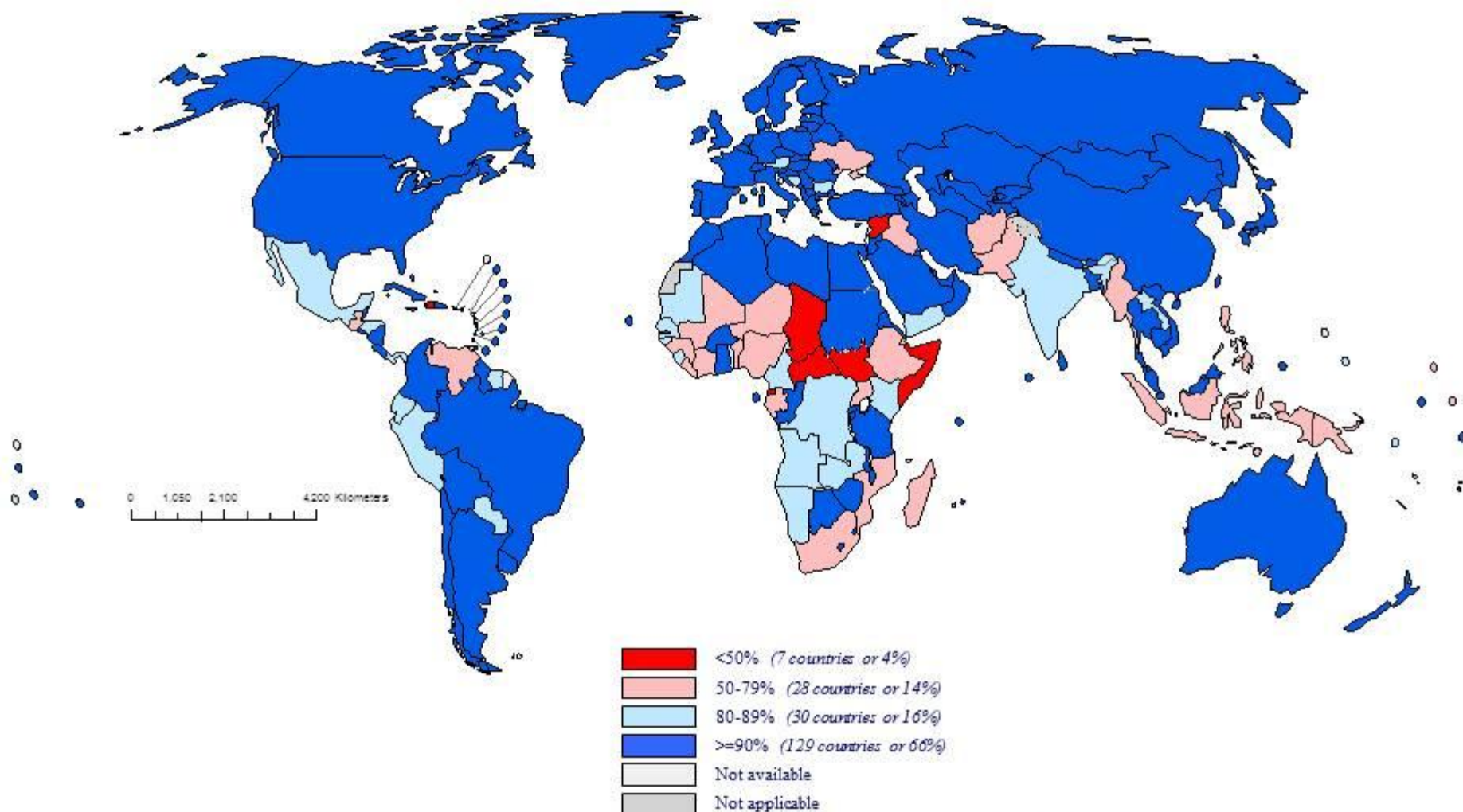
Valentina VOROJBIT, conf. univ.

MICROBIOLOGIA ȘI DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL DIFTERIEI



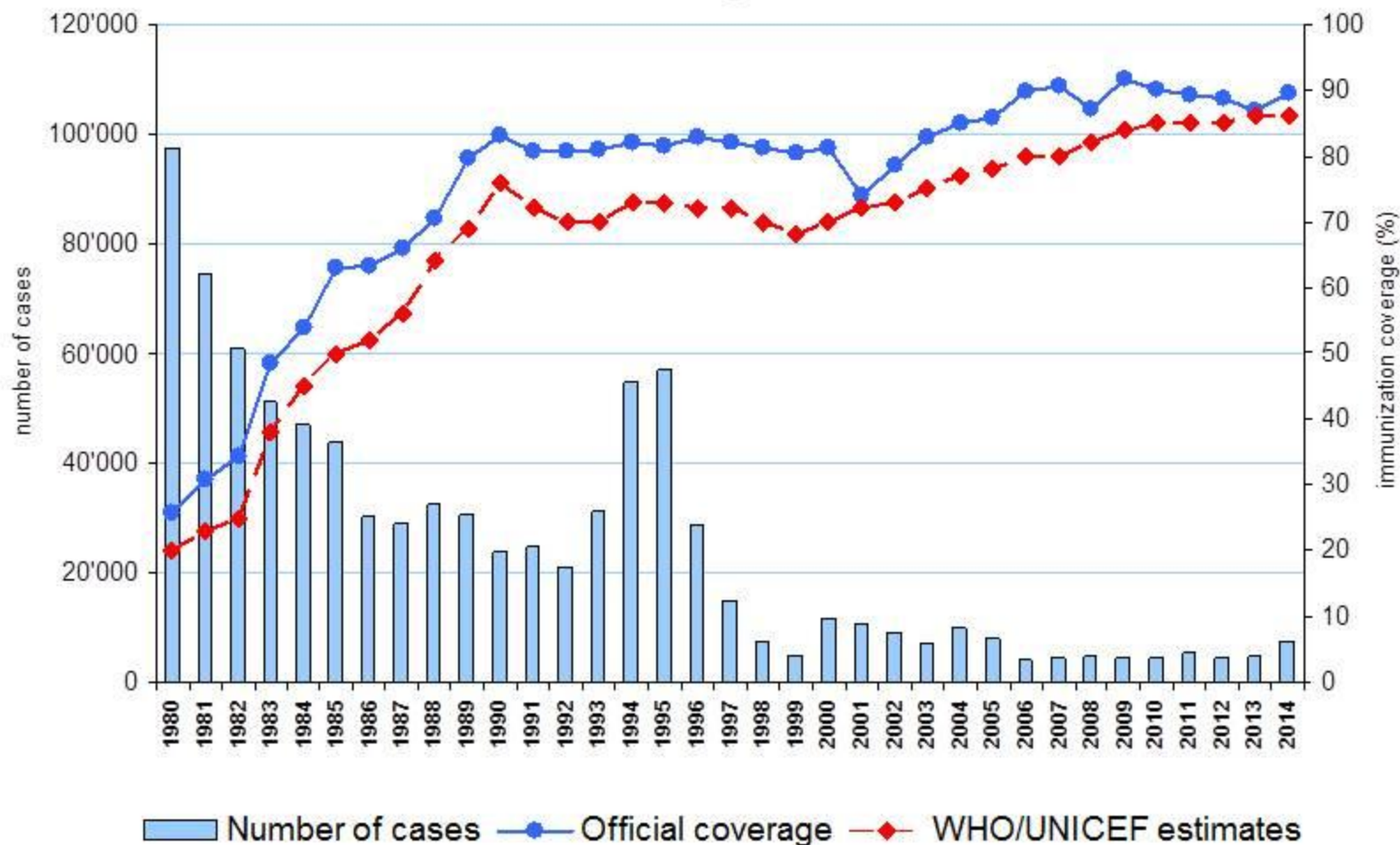
- **DIFTERIA** – toxiinfecție acută, caracterizată printr-o angină pseudo-membranoasă (greaca: *diphthera* – pereche de membrane de pergament) cu efecte toxice la distanță (miocardită, polineurită, nefroză).
- 2018 – 16000 cazuri raportate
- 2015 – 4500 cazuri raportate, 2100 decese
- 2014 – 7321 cazuri raportate
- 1991 – 2000 cazuri in fosta URSS
- 1998 – 200.000 cazuri, 5000 letale (Moldova – apr. 1000 cazuri, peste 200 decese)

Immunization coverage with DTP3 vaccines in infants (from <50%), 2014



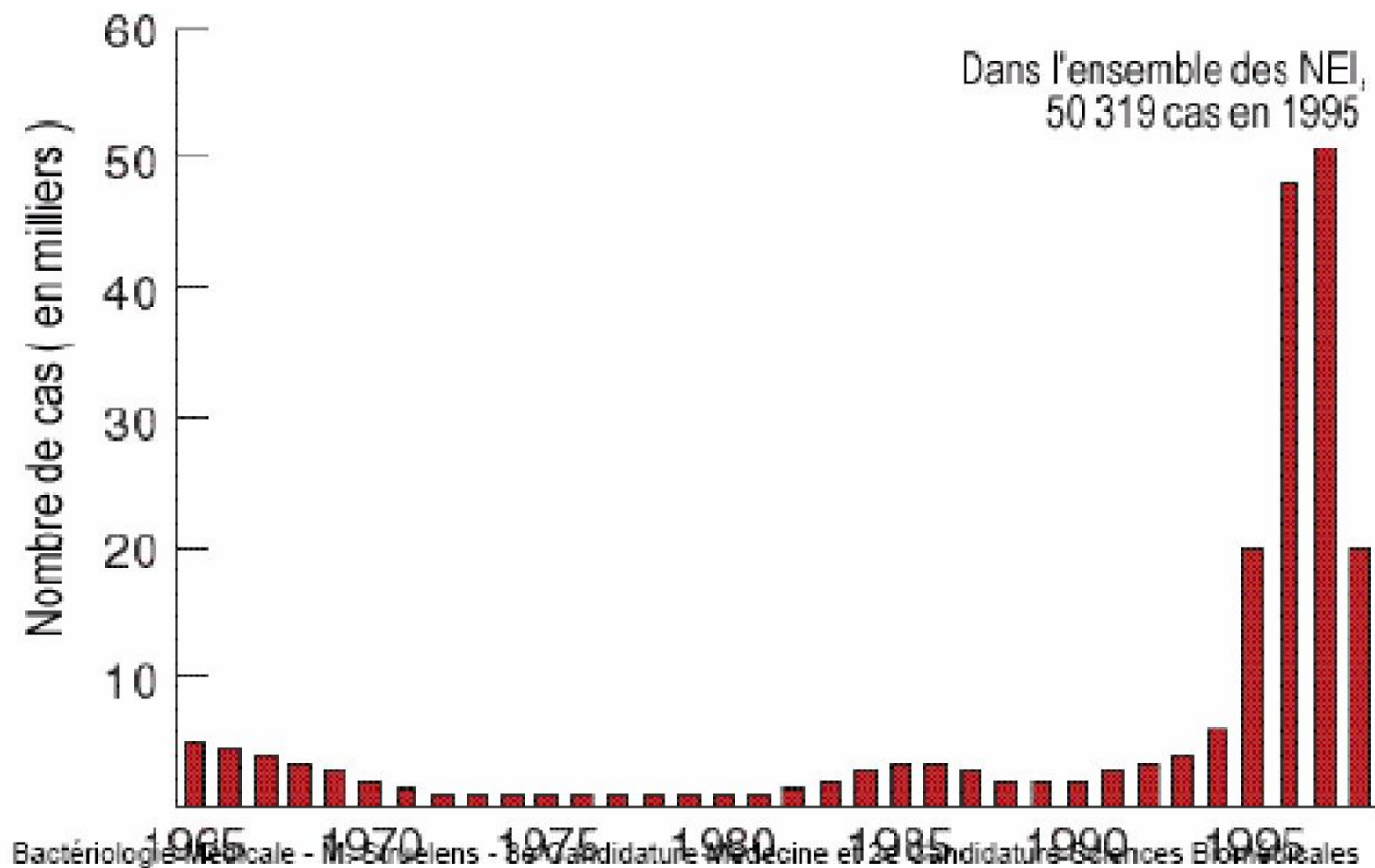
The boundaries and names shown and the designations used on this map do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the World Health Organization concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries. Dotted lines on maps represent approximate border lines for which there may not yet be full agreement. © WHO 2015. All rights reserved.

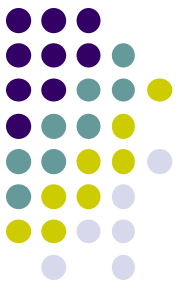
Diphtheria global annual reported cases and DTP3 coverage, 1980-2014



La diphtérie en Fédération de Russie et dans les Nouveaux Etats Indépendants

Nombre de cas notifiés chaque année





- 1821 – Bretonneau individualizează difteria și demonstrează caracterul ei contagios
- 1883 - Klebs descrie bacteria în membranele false de angine difterice
- 1884 - Loeffler izolează bacteria, apoi demonstrează patogenitatea ei pe cobai
- 1888 - Roux și Yersin demonstrează secreția exotoxinei și inoculând-o la animal reproduc manifestările difteriei
- 1890 - Behring și Kitasato imunizează animalele cu toxină modificată
- 1923 - Ramon prepară anatoxina difterică, primul vaccin antidifteric



Difteria este provocată de mi/o din genul *Corynebacterium*, familia *Corynebacteriaceae* (din greaca *κορωνή* *corönë* (nod, innodat) și *βακτηριον* *bacterion* (*bastonas*))

- Genul *Corynebacterium* reunește mi/o care se caracterizează prin prezența în compoziția peretelui celular a:
 - acidului mezo-diaminopimelic
 - acizilor micolici cu catenă scurtă (22-38 atomi de C)

Prezintă asemănări cu mi/o din genurile *Mycobacterium* și *Nocardia*



- **Clasificarea genului *Corynebacterium***

- I. Corinebacterii fitopatogene

- II. Corinebacterii patogene pentru animale, care afectează accidental omul:

C.pseudotuberculosis, *C.ulcerans*

- III. Corinebacterii cu tropism uman:



Specie patogenă: *C.diphtheriae* (biovaruri *gravis*, *mitis*, *intermedius*). Colonizează frecvent rinofaringele, mai rar tegumentul. Există și purtători sănătoși.



Specii comensale (specii pseudodifterice, difteroizi): *C.xerosis*, *C.jejkeium*, *C.pseudodiphthericum*, etc. Habitat – faringe, rinofaringe, uretra distală, tegument

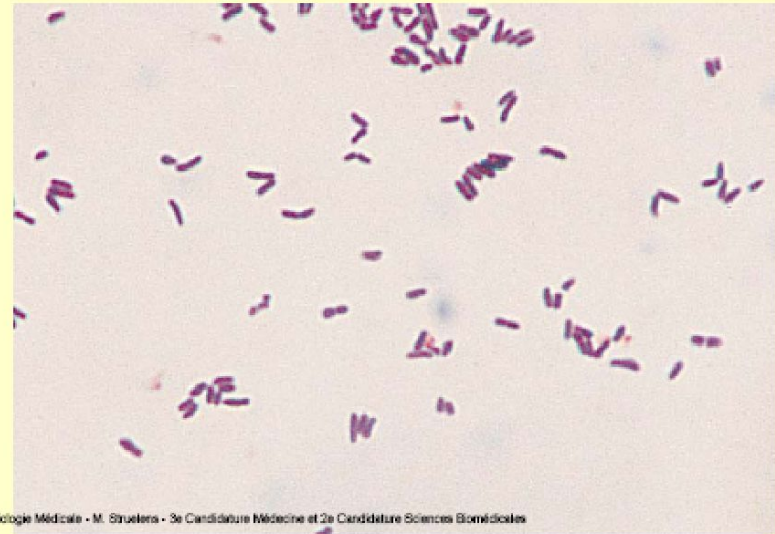
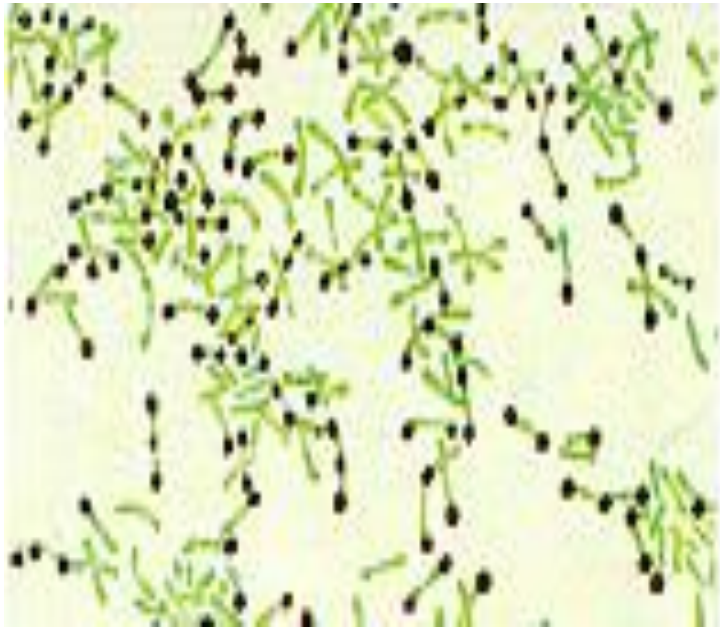


Caractere morfotinctoriale ale *C.diphtheriae*

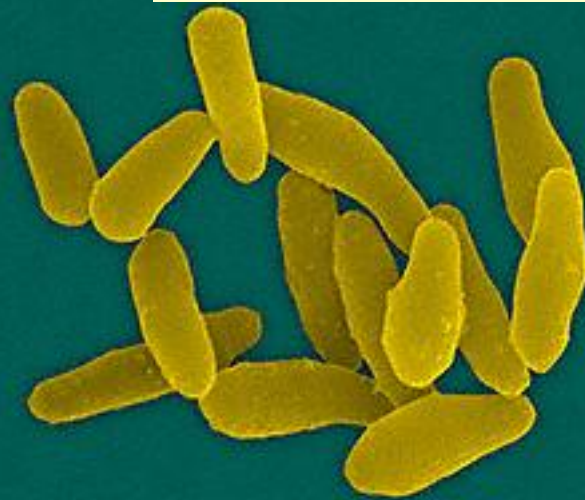
Bacterii (bastonașe) de 1-8 μm x 0,3-0,8 μm , drepte sau puțin încurbate, cu extremitățile rotunjite sau îngroșate (aspect de halteră sau de măciucă), datorită granulațiilor de volutină (corpui Babeș-Ernst). În frotiuri se aranjează unghiular, sub forma caracterelor chinezești, cifre romane sau litere majuscule: Y, M, N, V... Imobile, asporogene, necapsulate.

Se colorează G+, pentru evidențierea granulațiilor de volutină - Loeffler, Albert, Neisser

Corynebacterium diphtheriae



Bactériologie Médicale - M. Struelens - 3e Candidature Médecine et 2e Candidature Sciences Biomédicales







Caractere de cultură

C. diphtheriae este o specie facultativ anaerobă, exigentă la cultivare, temperatura optimă de cultivare 37°C, pH 7,4.

Medii de cultură electiv:

-  **Mediul Loeffler** (ser bovin coagulat): colonii S, mici, netede, opace, albe-cenușii, apar peste 16-24 ore de cultivare
-  **Geloză-sânge** (identic)

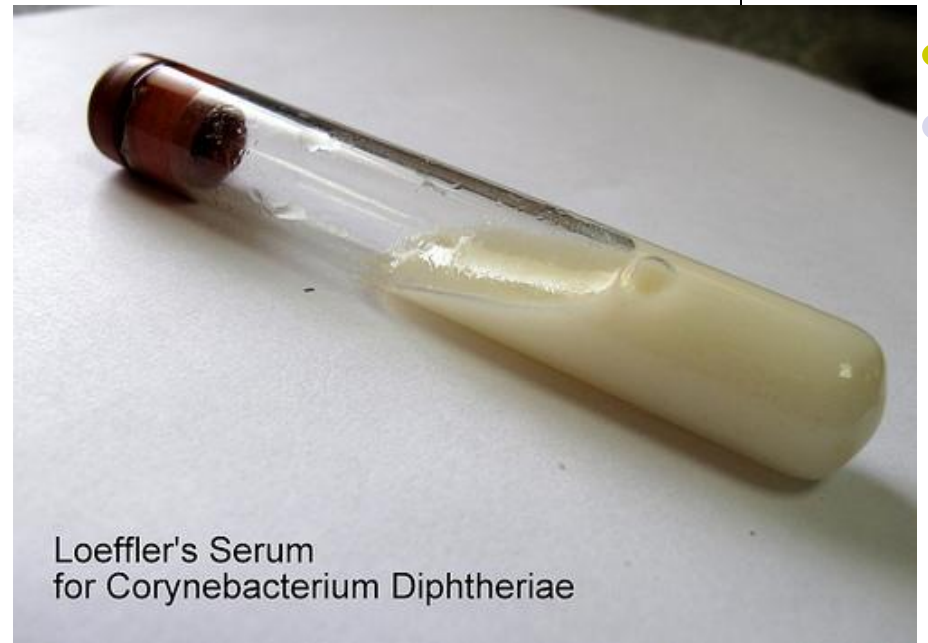


Medii de cultură selective diferențiale

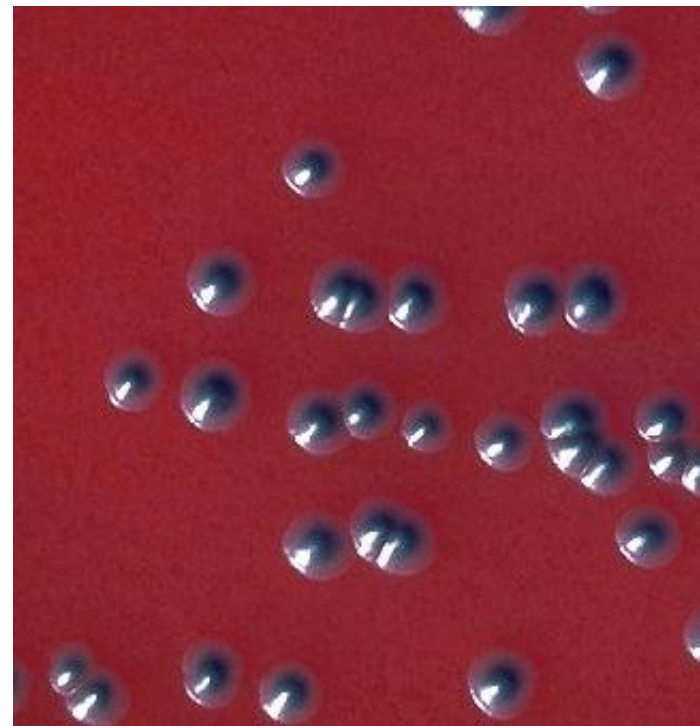
- **Mediul Clauberg** (geloză-sânge cu telurit de potasiu). *C.diphtheriae* **gravis**: colonii R, mari, negre (reducerea teluritului în teluriu), crenelate, aspect de “floare de margaretă”, nehemolitice; **mitis**: colonii S, mijlocii, negre, bombate, cu zonă de hemoliză
- **Mediul Tinsdale** (geloză-ser-cistină-telurit de potasiu-tiosulfat) - colonii negre cu halou brun
- **Mediul Bucin** (geloză-sânge cu hinozol) – colonii albastre



Corynebacterium diphtheriae

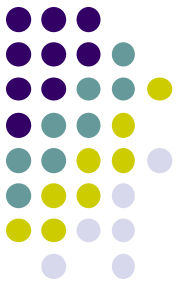


Loeffler's Serum
for *Corynebacterium Diphtheriae*



Medii de transport și îmbogățire

- 📌 Geloză-ser semisolidă cu telurit de K
- 📌 Mediul Stuart
- 📌 Mediul Amies
- 📌 Mediul OCST (ou-cistină-ser-telurit)



Activitatea biochimică a *C.diphtheriae*:

Proteolitică:

Ureaza- (testul Zaks), cistinaza+ (testul Pizu), indol-.

Zaharolitică:

Gravis: glucoza+, amidon+, zaharoza-

Mitis: glucoza+, amidon-, zaharoza-

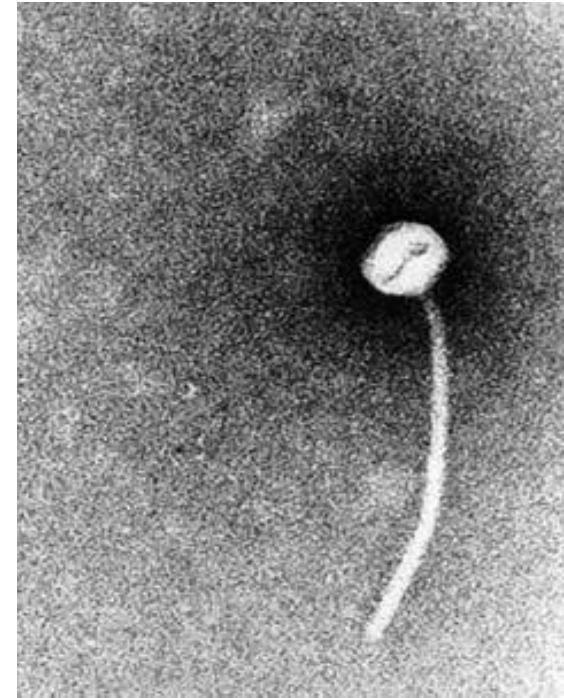
Posedă catalază, oxidaza-

Se disting 22 lizotipuri de *C.diphtheriae* și multiple serogrupuri (antigen O polizaharidic) și serovaruri (antigen K proteic)



Factori de patogenitate

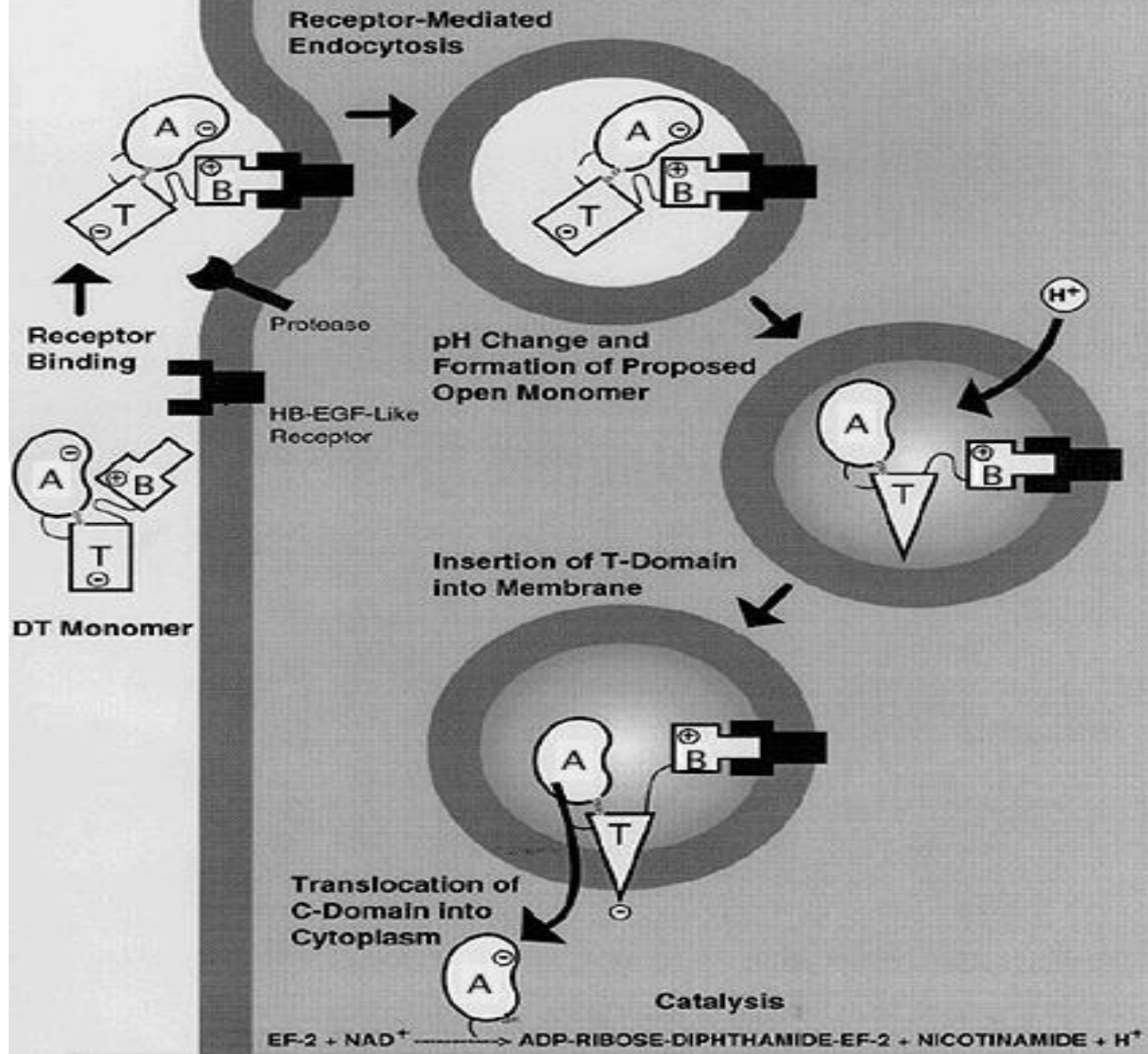
Toxina difterică - origine proteică, secretată de tulpinile lizogene (fagi beta, purtători ai genei *Tox*), în prezența unor cantități reduse de Fe. Un represor proteic bacterian (*DtxR*) controlează expresia genei *Tox*. Acest represor este activat de cantități mari de Fe.



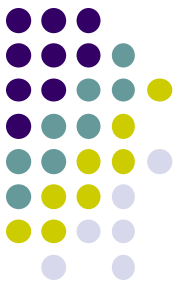
Toxina difterica



Exotoxină tipică (fragmente polipeptidice A și B).
Subunitatea B se leagă de un receptor de pe celula eucariotă care reglează creșterea și diferențierea celulei. Ulterior ambele fragmente (A și B) pătrund în celulă prin endocitoză. În interiorul endosomei are loc descompunerea toxinei în fragmente individuale. Fragmentul A este translocat în citoplasmă prin porii din membrana endosomei creați de fragmentul B.



Mecanismul de acțiune al toxinei difterice



Toxina hidrolizează NAD și transferă fragmentul ADP-riboză format pe factorul de elongare EF-2 (ADP-ribozilare), care nu mai asigură translocarea peptidil-ARNt de la situsul acceptor la situsul donator al ribosomului eucariot. Rezultă stoparea ireversibilă a sintezei proteice.

O singură moleculă este letală pentru celulă !!!

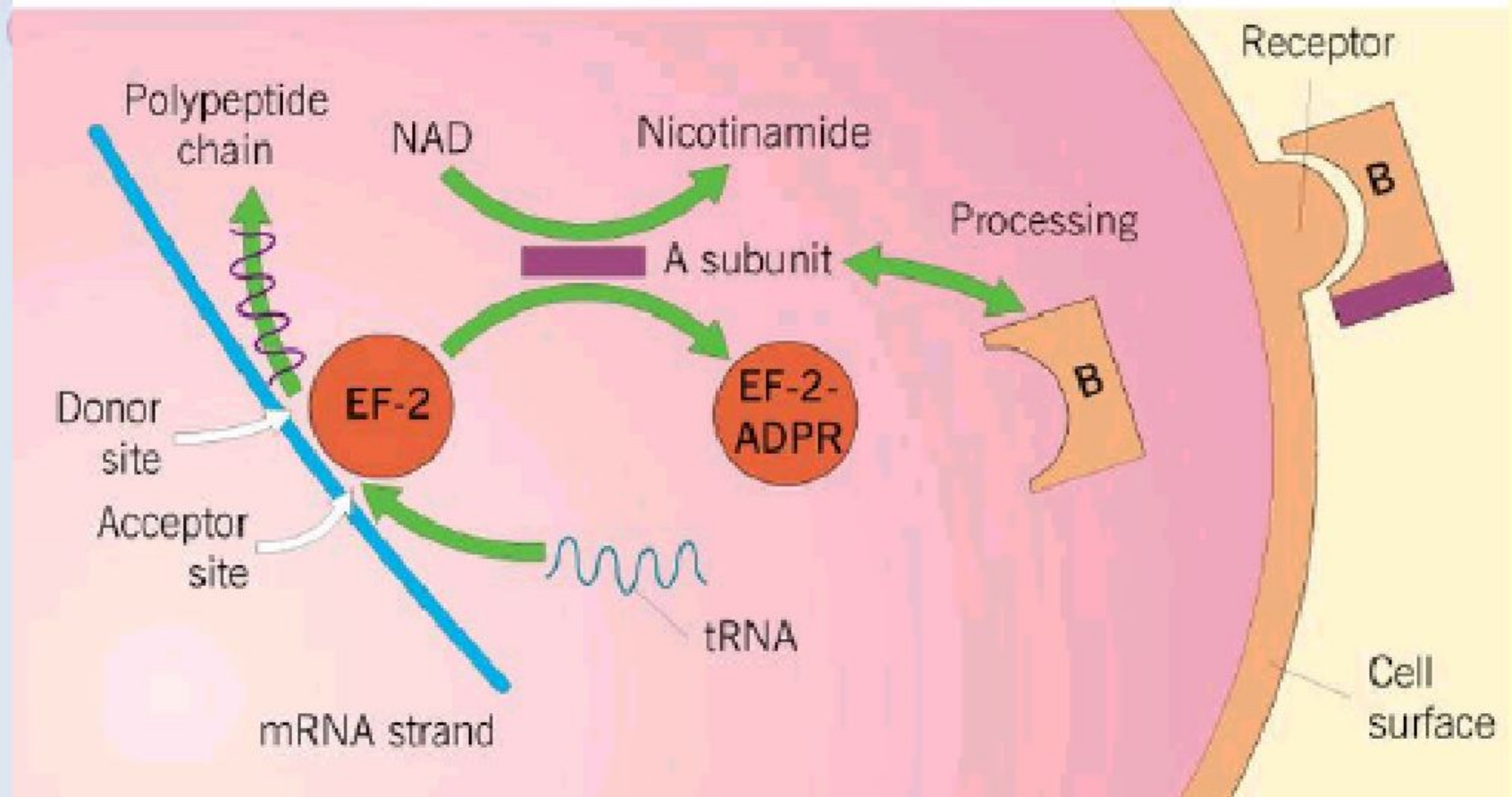
MOLECULAR ACTION OF *CORYNEBACTERIUM DIPHTHERIAE*

37 sur 310

B subunit of DT binds to host cell receptor

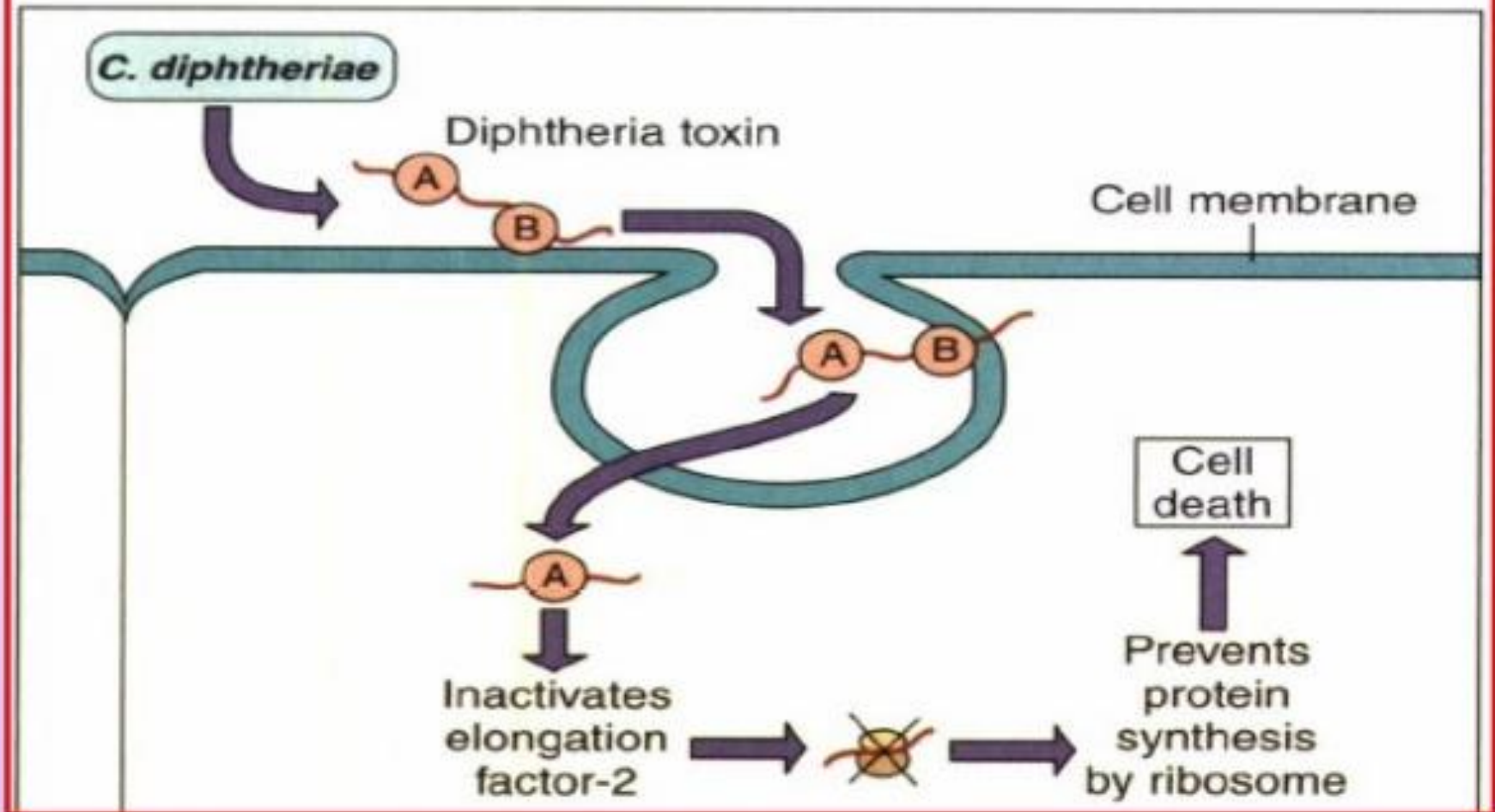
Proteolytic cleavage of B unit from the A subunit of DT

ACTION OF DIPHTHERIA TOXIN



Diphtheria toxin

A Inhibition of protein synthesis





Toxina acționează la poarta de intrare și difuzează în organism perturbând funcționarea diferitor organe (în special **SNC, cord, rinichi, suprarenale**), cauzând distrofii.

Poate fi transformată în **anatoxină**, utilizată în vaccinare.

Enzime de patogenitate: hialuronidaza, neuraminidaza

Cord factor – un glicolipid toxic din peretele celular

Patogeneza și formele clinice de difterie



Sursa de infecție: bolnavul cu difterie și purtătorii sănătoși de germeni (colonizează rinofaringele, rareori tegumentul sau conjunctiva).

Mecanismele și căile de transmitere:

- ✉ Direct pe cale aerogenă (picături) sau contact cu plăgi contaminate
- ✉ Indirect (foarte rar) prin obiecte (jucării, cărți), praf sau alimente contaminate (lactate)

Perioada de incubație – 2-4 zile.





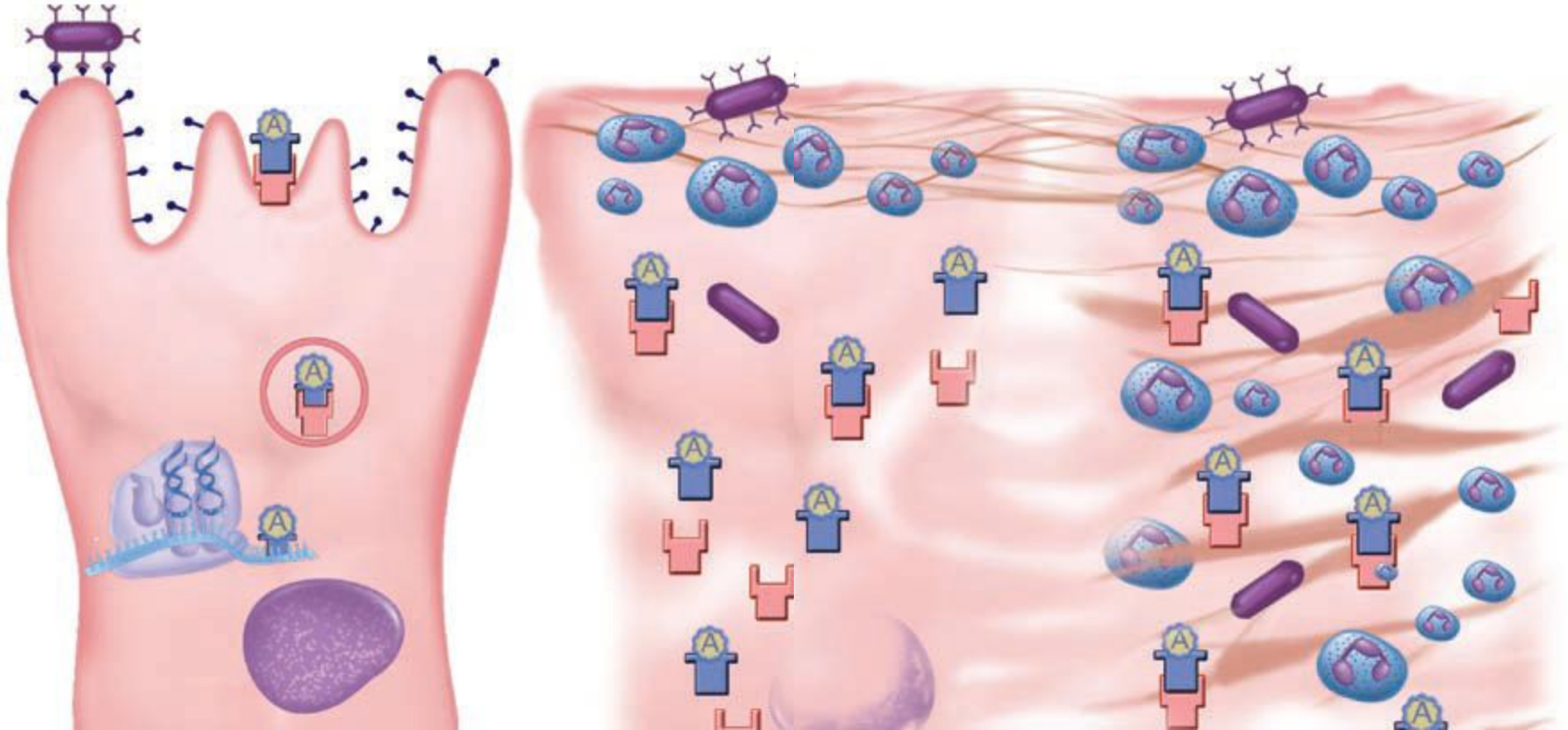
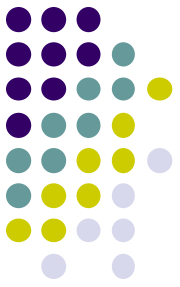
La poarta de intrare bacteriile se multiplică și provoacă un *focar inflamator local*, determinat de acțiunea toxinei, care fiind ulterior difuzată prin limfă și sânge provoacă starea de *intoxicație generală*.

Focarul inflamator se localizează în faringe (faringită, angină difterică), mai rar în laringe (crupul difteric), nas, urechi, conjunctivă, mucoasa organelor genitale, plăgi cutanate.



- **Leziunile locale** se caracterizează prin inflamație fibrinoasă. Exotoxina cauzează necroză, dilatarea vaselor și creșterea permeabilității, eliminarea fibrinogenului, care coagulează cu formarea unei **pseudomembrane fibrinoase** (amigdale, uvulă, palatul moale, faringe). Ea conține bacterii, hematii, PMN și celule necrozate. Se detașează dificil, nu se dizolvă în apă, este reproductibilă *in situ* în câteva ore. Membrana are tendință să se extindă (laringe, trahee) provocând asfixie.
- În cazuri necomplicate membrana este eliminată în 5-10 zile.
- În forma malignă difteria este însoțită de edem al gâtului, semne toxice și paralizia vălului palatin.

Pseudomembrana difterică





Diphthérie pharyngée





10 y/o boy with severe diphtheria

- ◆ conjunctivitis
- ◆ pharyngeal membrane
- ◆ bull neck
- ◆ severe myocarditis
- ◆ all vaccines contraindicated





Laryngite diphthérique ou croup





- Intoxicația generală afectează SNC (disfagie, paralizii), sistemul cardio-vascular (miocardite), suprarenalele (insuficiență a suprarenalelor), rinichii (nefroză)
- Tulpini de *C.ulcerans* pot produce toxină identică cu cea difterică.

Diagnosticul de laborator al difteriei

- Este **URGENT!!!**
- *Prelevate* – în funcție de forma clinică, (membrana falsă, tampoane de la periferia membranelor, tampoane cutanate, conjunctivale, etc), respectând strict regulile de prelevare și transport.

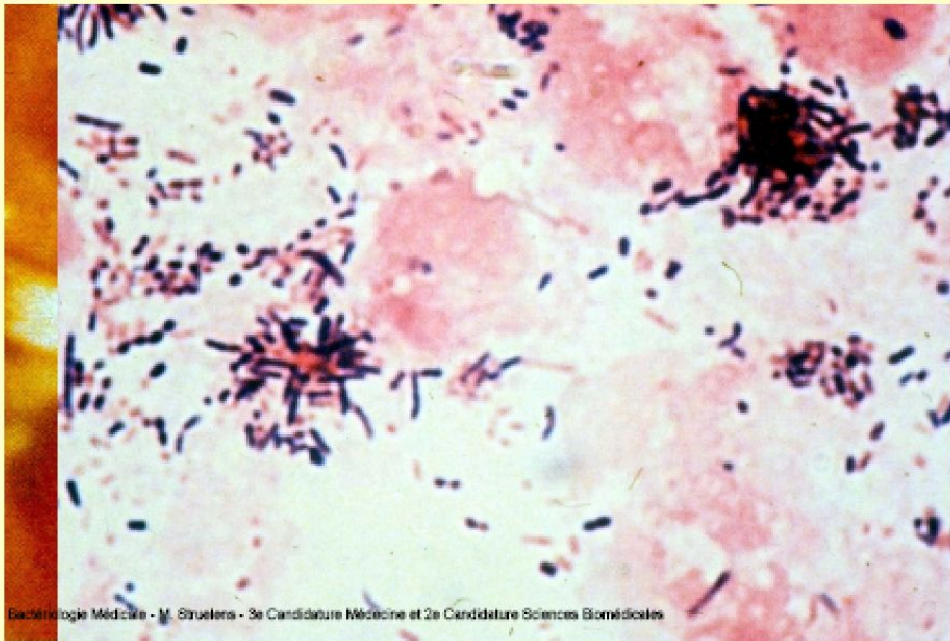


Metode de diagnostic

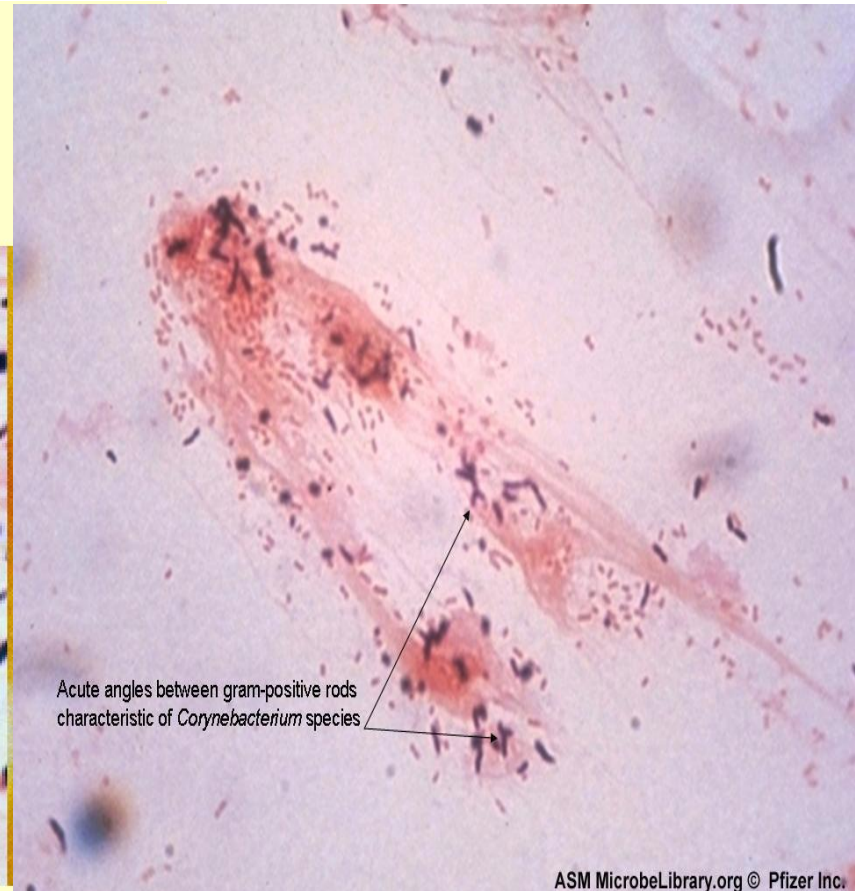
Examenul microscopic (Gram, Loeffler, Neisser, Albert), microscopia imunofluorescentă

39 sur 310

Pharyngite diphtérique: fausse membrane



Bactériologie Médicale - M. Struelens - 3e Candidature Médecine et 2e Candidature Sciences Biomédicales



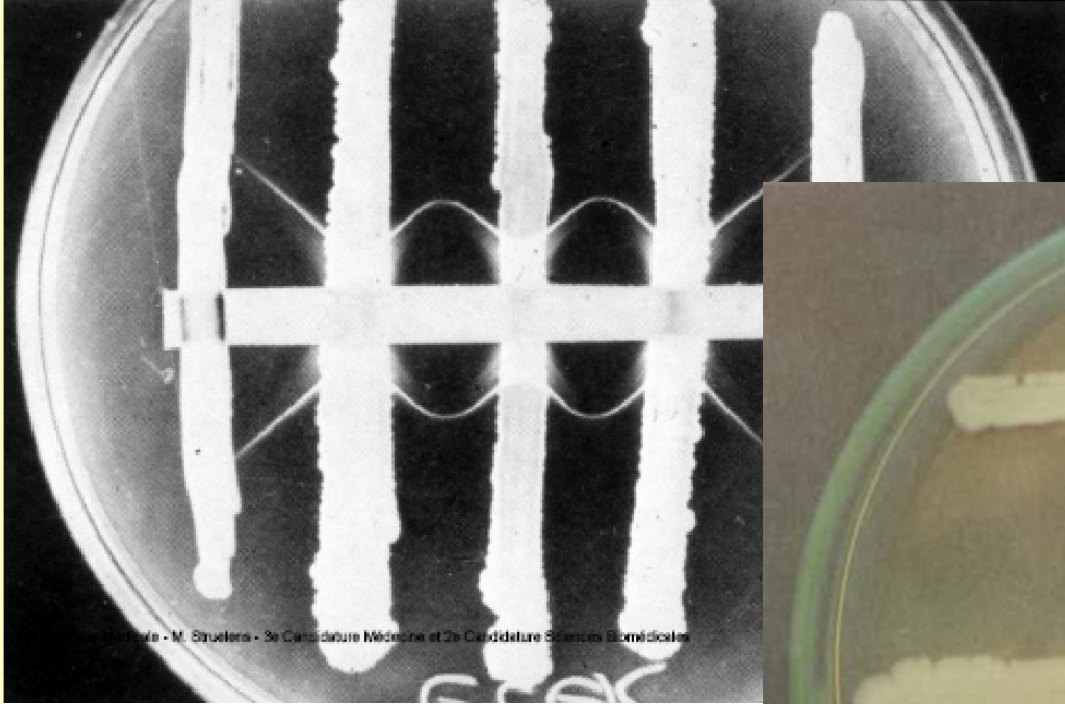
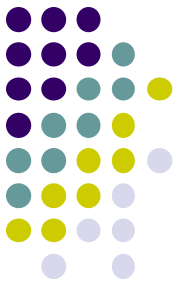
ASM MicrobeLibrary.org © Pfizer Inc.



Examenul bacteriologic (izolarea, identificarea culturii pure).

Studierea **toxigenezei** – obligator. Se efectuează prin RN cu ser antitoxic *in vitro* (RP Elek), *in vivo* (cobai), sau depistarea genei **Tox** în prelevat sau în cultura pură prin PCR.

Test d'immuno-diffusion: souches productrices de toxine diphthérique





Examenul serologic – retrospectiv

- RA cu seruri perechi (I săptămână și a III) și cultură de *C.diphtheriae*. Titrul semnificativ – 1:100 sau creșterea titrului de Ac.
- Evaluarea titrului de antitoxine în serul bolnavului (RN, RHAI, RLA, ELISA). La debutul bolii antitoxinele sunt absente sau nu depășesc nivelul de 0,5 UI/ml



Receptivitatea la difterie poate fi determinată prin:

📌 **Testul Schick** (*in vivo*): i/dermic 0,1 ml toxină difterică (1/40 DLM) – 48h

Reacție+: eritem 1cm (receptivitate la difterie),

reacție-: lipsa eritemului (persoană imună)

📌 **RN** *in vitro* / **RP**

📌 **RHAI**

📌 **ELISA**

Titrul antitoxinelor > 0,03 UA/ml – protector

Titru inferior 0,01 UA/ml – lipsa protecției



- **Tratamentul difteriei**
 1. Seroterapie precoce (ser antitoxic antidifteric, Ig). Neutralizează activitatea toxinei, blocând fixarea ei pe receptorii celulari.
 2. Antibiototerapie (macrolide, tetraciclone, cloramfenicol, aminozide, beta-lactamine). Asigură eradicarea germenilor.
 3. Tratament simptomatic



Profilaxia specifică a difteriei

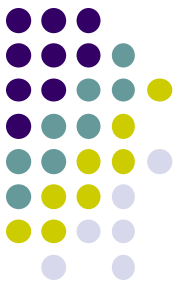
Vaccinarea obligatorie cu anatoxină difterică a copiilor conform calendarului de vaccinare. Există vaccinuri asociate: **DT, DTP, HepB+DTP+Hib**.

Vaccinarea primară cu DTP la 2-4-6 luni;
revaccinarea la 22-24 luni cu DTP; la 6-7 cu DT,
la 15-16 ani cu Td, revaccinarea adulților cu Td
la fiecare 10 ani începând cu vârsta de 20 de ani.

Quinvaxem – pentavaccin (DTP-HepB-Hib)

Recent a fost obținut un **vaccin sintetic antidifteric**.
Reprezintă un polipeptid antigenic situat la
joncțiunea fragmentelor A și B a toxinei difterice,
o moleculă peptidică “purtătoare” și un adjuvant
sintetic.

MICOBACTERIILE. MICROBIOLOGIA ȘI DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL TUBERCULOZEI



- **Familia** Mycobacteriaceae

- **Genul** *Mycobacterium*

- **Specii:**

I. Responsabile de tuberculoza umană:

M.tuberculosis, M.bovis, M.africanum, M.canetti
("tuberculosis complex") - cultivabile

II. Agentul leprei: *M.leprae* (strict umană,
necultivabila)

III. Micobacterii "atipice", condiționat patogene:
M.avium-intracellulare, M.ulcerans, M.fortuitum,
M.kansasii, M.marinum, etc. Cauzează
micobacterioze la persoane imunocompromise

IV. Micobacterii nepatogene: *M.smegmatis, M.gastri,*
M.phlei



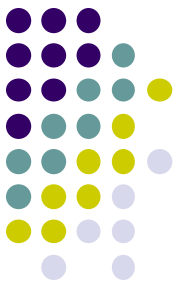
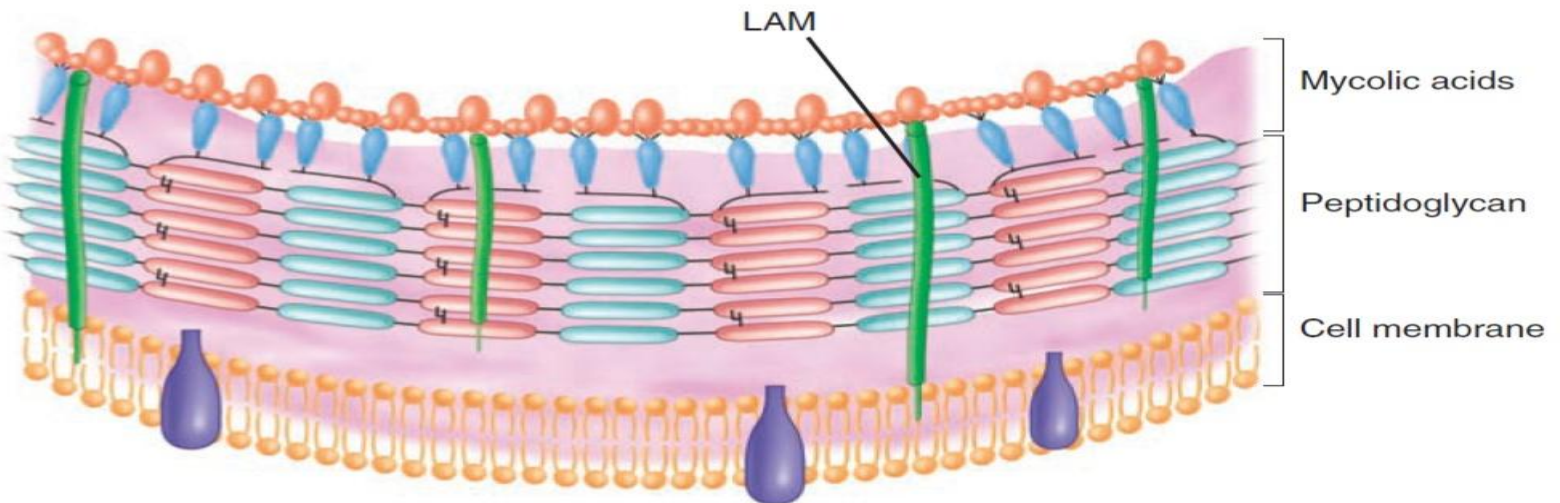
TABLE 27-1 Mycobacteria of Major Clinical Importance^a

CHARACTERISTICS									
SPECIES	RESERVOIR	VIRULENCE FOR HUMANS	DISEASE CAUSED	CASE-TO-CASE TRANSMISSION	GROWTH RATE	OPTIMUM GROWTH TEMPERATURE	PIGMENT PRODUCTION ^b	SUBSTANTIAL NIACIN PRODUCTION ^c	VIRULENCE FOR GUINEA PIGS ^d
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Human	+++	Tuberculosis	Yes	S	37	–	+	+
<i>M bovis</i>	Animals	+++	Tuberculosis	Rare	S	37	–	–	+
Bacillus Calmette-Guérin	Artificial culture	±	Local lesion	Very rare	S	37	–	–	–
<i>M kansasii</i>	Environmental	+	Tuberculosis-like	No	S	37	Photochromogen	–	–
<i>M scrofulaceum</i>	Environmental	+	Usually lymphadenitis	No	S	37	Scotochromogen	–	–
<i>M avium-intracellulare</i>	Environmental; birds	+	Tuberculosis-like	No	S	37	±	–	–
<i>M fortuitum</i>	Environmental	±	Local abscess	No	F	37	±	–	Local abscess
<i>M marinum</i>	Water; fish	±	Skin granuloma	No	S	30	Photochromogen	–	–
<i>M ulcerans</i>	Probably environmental; tropical	+	Severe skin ulceration	No	S	30	–	–	–
<i>M leprae</i>	Human	+++	Leprosy	Yes	NG	NG	NG	NG	–
<i>M smegmatis</i>	Human, external urethral area	–	None	–	F	37	–	–	–

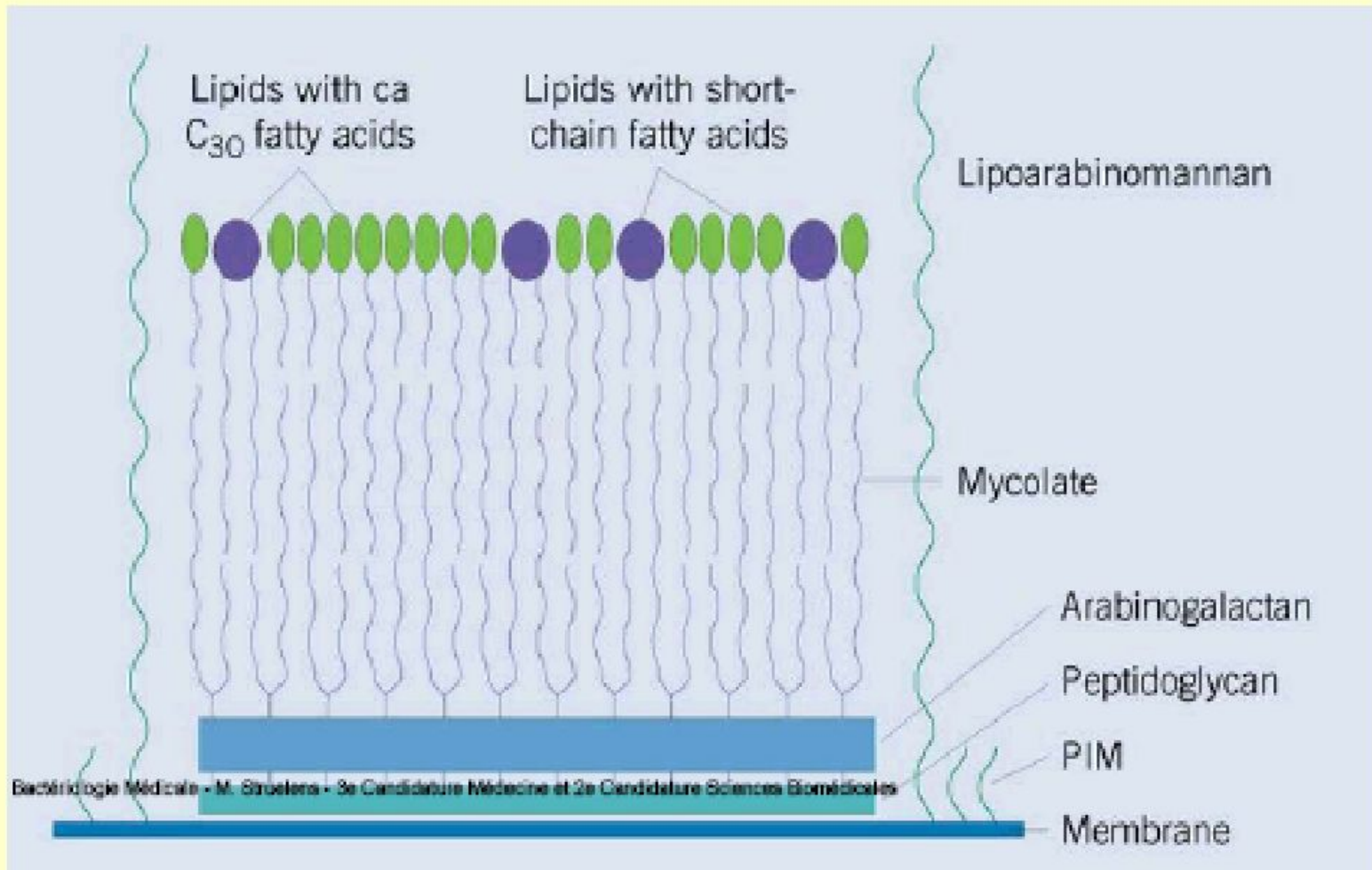
Caracteristica generală a micobacteriilor:

Bastonăse G⁺ drepte sau ușor încurbate, necapsulate, asporogene, imobile.

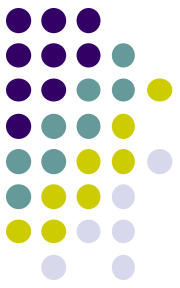
- **Particularități** - peretele celular este bogat în acizi grași cu catenă lungă - **acizi micolici** și un complex lipopolizaharidic - **lipoarabinomanan (LAM)**, care se extinde de la MCP până la suprafața celulei. Acești compusi determină acido-alcoolorezistență la colorarea Ziehl-Neelsen.



Mycobactéries : Enveloppe cellulaire



Caracterele morfobiologice ale *M.tuberculosis*



- ***M.tuberculosis*** este o bacterie patogenă strict umană, responsabilă de tuberculoză. Este sensibilă la căldură, lumină solară directă, raze UV sau X. Rezistentă la frig sau desicare. Este puțin sensibilă la acizi, baze (se utilizează în decontaminarea prelevatelor) sau detergenți și foarte sensibilă la soluția de alcool de 70°.
- Tulpina *M.tuberculosis* genotipurile *Beijing* și *Ural* – foarte virulente, rezistente la preparate antituberculoase



- *Mycobacterium tuberculosis* a fost cauza "Pestei Albe" în sec. 17 și 18 în Europa. În această perioadă aproape 100% din populația Europei a fost infectată cu *M.tuberculosis* și 25 % din adulți au decedat.
- R. Koch descoperă agentul tuberculozei la 24 martie 1882 (1905 - premiul Nobel în medicină)
- **Tuberculoza (TB)** în prezent este prima cauză de deces din lume dintre toate infecțiile bacteriene (3 mln /an). Aproximativ 1/3 din populație este infectată, anual apar peste 9 mln cazuri noi de tuberculoza.

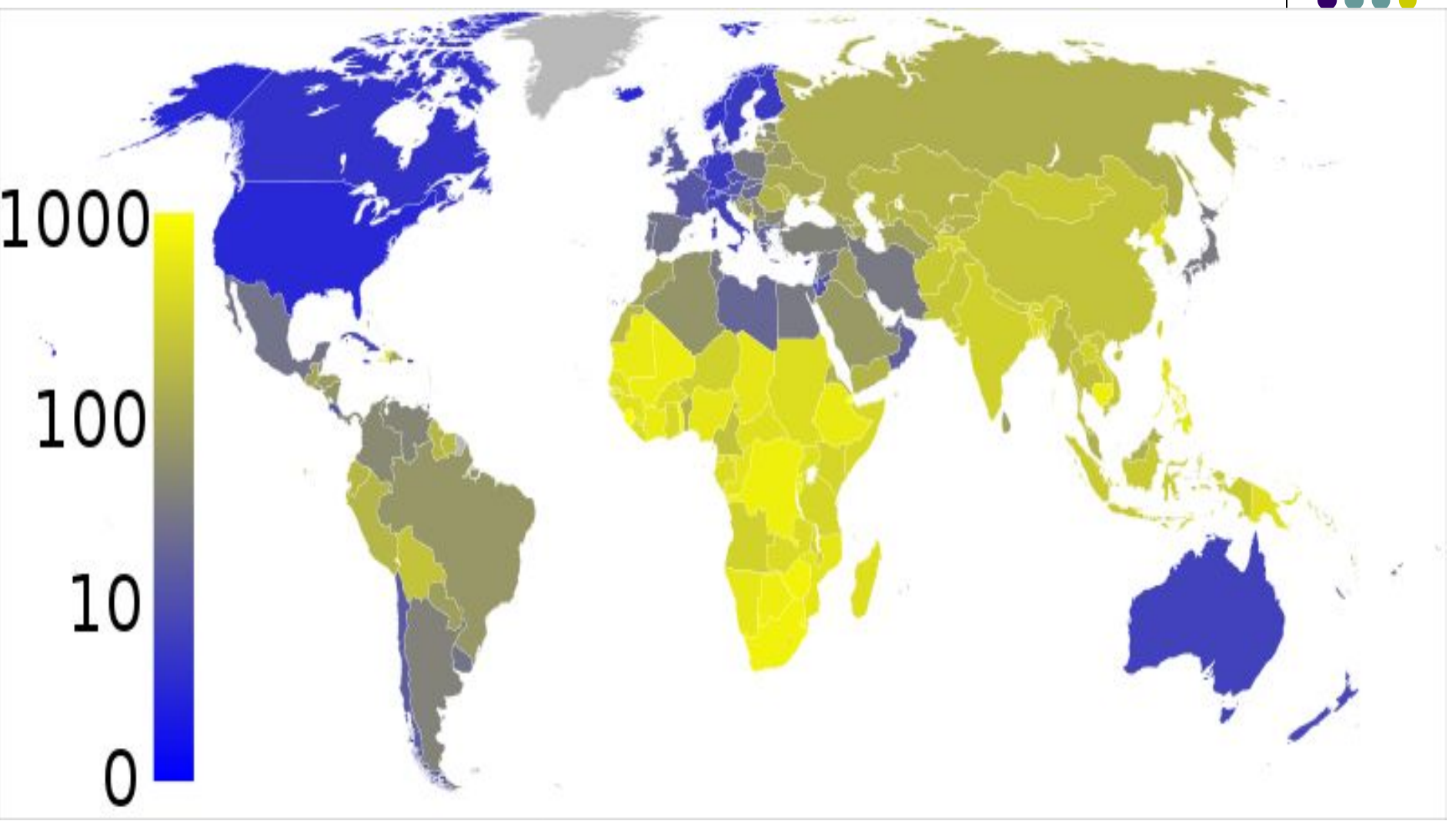


RM incidența TB:

- 1990 – 49 cazuri la 100.000 (2149);
- 2006 – 132 cazuri (5461 anual),
- 2013 – 106,4 (3788),
- 2014 – 95,6 (3399),
- 2015 – 83,9 (2981)
- 2016 – 70,2 (2829)
- 2017 – 66,2 (2663)
- 2018 – 86 (3500)

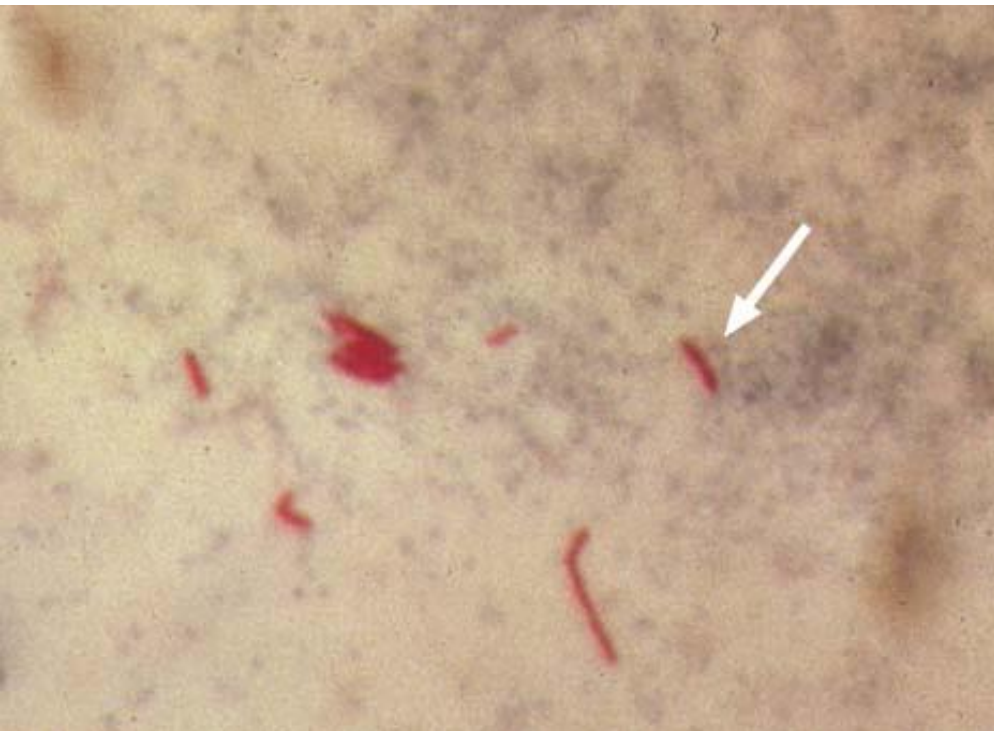
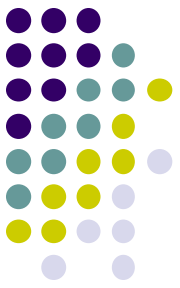


- În 2020 în Republica Moldova au fost înregistrate 1761 de cazuri de îmbolnăvire cu tuberculoză.
- În 2020, numărul total al bolnavilor de tuberculoză a fost de 2337 de persoane.
- Rata îmbolnăvirilor cu tuberculoză în Republica Moldova raportată la 100 de mii de locuitori constituie 43.9 persoane.
- În 2020 din cauza tuberculozei au decedat 208 locuitori ai Republicii Moldova.
- Raioanele cu cea mai înaltă rată a îmbolnăvirilor cu tuberculoză sunt Rîbnița, Dnestrovsk, Slobozia, Șoldănești, Rezina, Nisporeni, Leova.
- În 2020, au fost înregistrați 441 de bolnavi cu TB MDR.
- Prevalența TB MDR printre cazurile noi de tuberculoză înregistrate în 2020 (9 luni) este de 24,9 %.

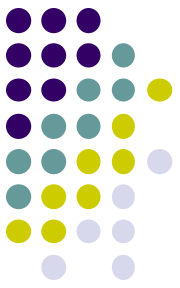


- **Caractere morfotinctoriale**

M.tbc este un bastonaș fin sau ușor încurbat, în frotiu se observă izolat, în grămezi sau corzi. Se colorează în roșu prin tehnica Ziehl-Neelsen



Copyright © 2004 Dennis Kunkel Microscopy, Inc.



Caractere de cultură

- *M. tuberculosis* este o bacterie strict aerobă, foarte exigentă la cultivare. Toate mediile de izolare au la bază ou coagulat. Mediul de referință – **Lowenstein-Jensen** (ou, glicerină, asparagină, verde de brilliant).
- Alte medii solide – **Popescu** (acid glutamic în locul asparaginei), **Finn** (glutamat de Na).



- Micobacteriile patogene cresc lent (perioada de generație – 20 ore), la 37° C, pH 6,8-7,0.

Coloniile de *M.tuberculosis* apar peste **2-4 săptămâni**, sunt rugoase, friabile, conopidiforme, opace, de culoare crem-bej (colonii **R**).

M.bovis și *M.africanum* formează colonii **S**, mici, netede, nepigmentate, vizibile peste **4-8 săptămâni**.





Medii de cultură lichide (mediul 7H9, Middlebrook 7H12, Sauton, etc).

Mediul Sauton conține săruri minerale, asparagină, glicerină. *M.tuberculosis* crește în 8-10 zile sub formă de voal. Este utilizat și pentru repicarea tulpinilor de BCG.

- **Activitatea biochimică** a micobacteriilor patogene

- ✉ Toate micobacteriile patogene produc o *catalază termolabilă*, distrusă la 68°C timp de 20 min. Celelalte micobacterii posedă catalază termostabilă.

- ✉ *M.tuberculosis* și *M.bovis* hidrolizează ureea

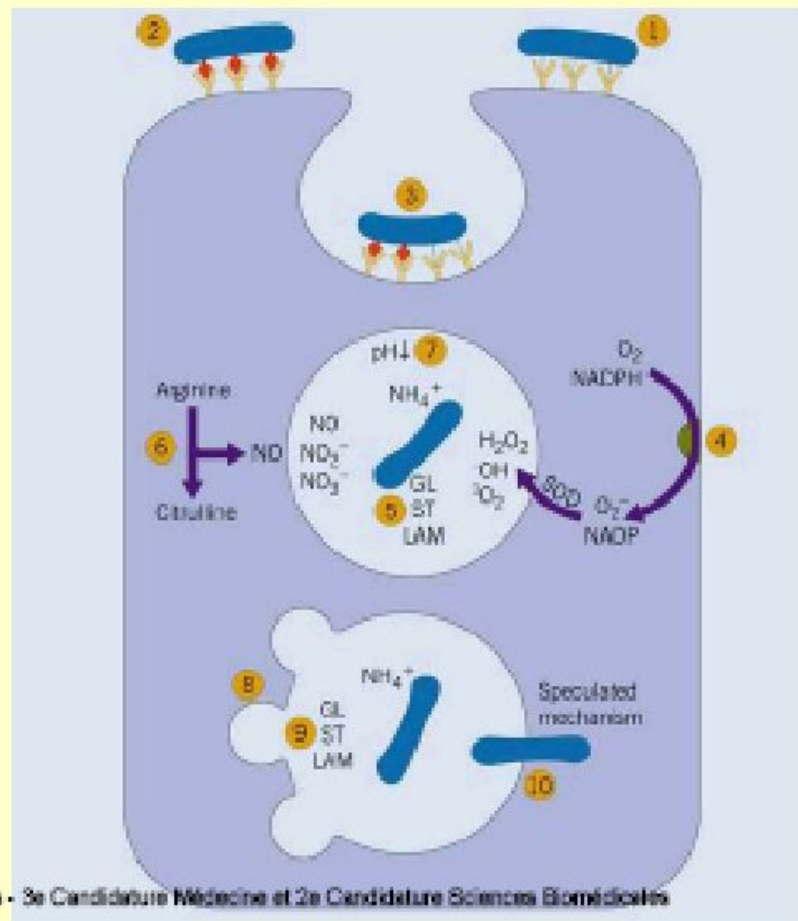
- ✉ *M.tuberculosis* produce acid nicotinic (niacină), reduce nitrații în nitriți. *M.bovis* nu manifestă astfel de activitate.

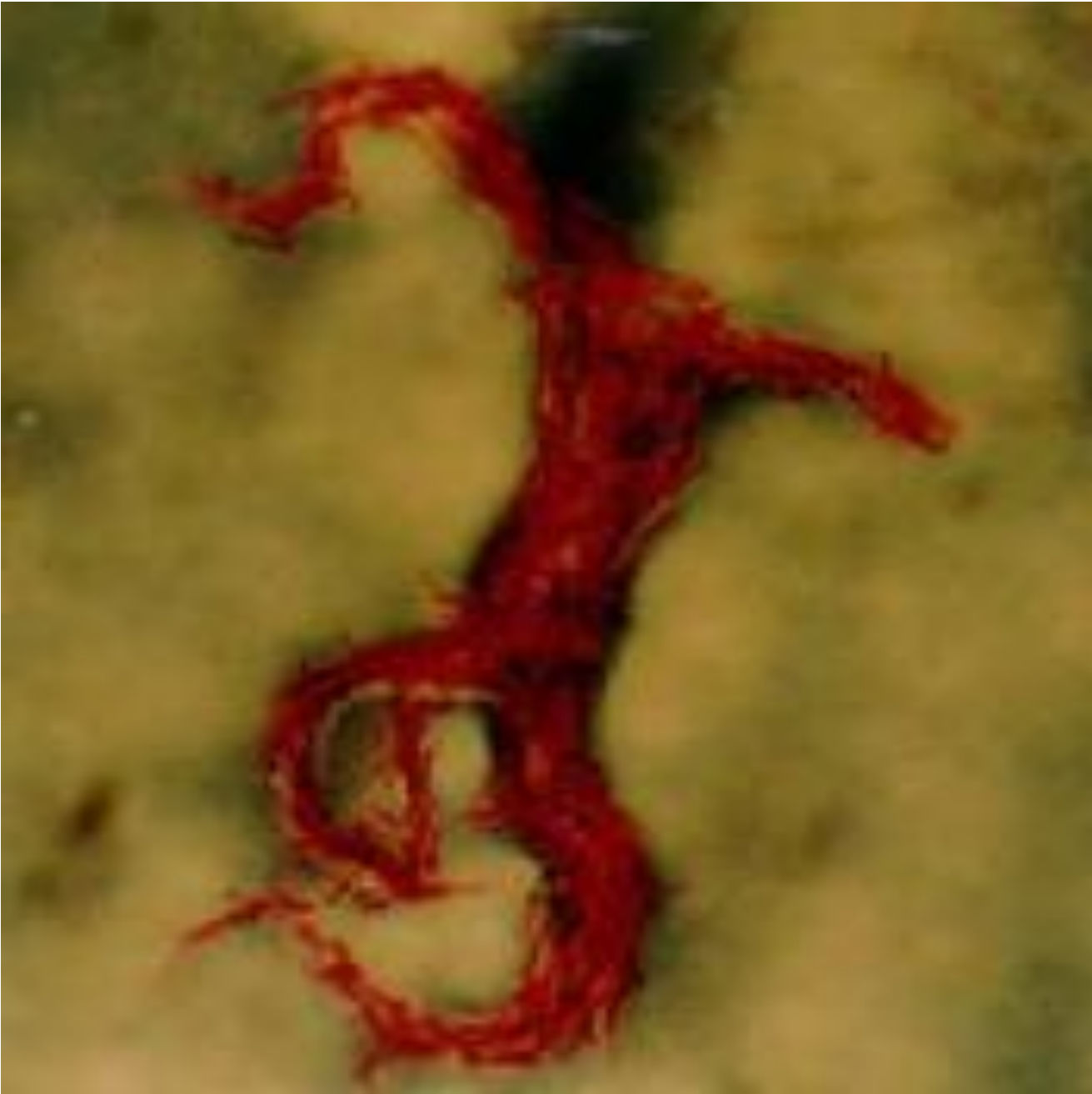


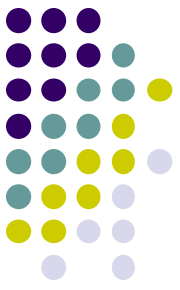
Factorii de patogenitate ai micobacteriilor

1. **Acizii micolici.** Previn distrugerea micobacteriilor în macrofage, protejează micobacteriile extracelulare de complementul din ser. Condiționează transformarea macrofagelor în celule epitelioides și celule gigante Langhans.
2. **Lipoarabinomananul** – efecte similare LPZ din bacteriile gramnegative
3. **Cord-factorul** (trehalose dimycolate) perturbă respirația în mitocondrii și inhibă migrația PMN. Induce cultivarea în corzi (cosițe) a *M.tuberculosis*.
4. **Ceara** – stimulează răspunsul imun celular, hipersensibilitatea tardivă
5. **Proteina ESAT-6** (*early secreted antigenic target*) – facilitează legarea bacteriilor de laminina din membrana bazală a celulelor epiteliale alveolare, cauzează citoliză
6. **1-tuberculosinyladenosine (1-TbAd)** – nucleozid particular cu rol de antacid. Secretat de *M.tbc*, acoperă bacteria și neutralizează pH din fagocite

M. tuberculosis : phagocytose et survie intra-macrophagique







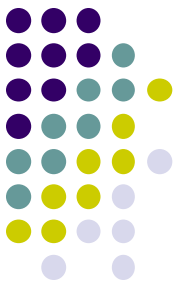
Lipidele din peretele celular al *Mycobacterium tuberculosis* sunt asociate cu următoarele proprietăți ale bacteriei:

- Impermeabilitate la colorare
- Rezistență la multe antibiotice
- Rezistență la substanțe acide și alcaline
- Rezistență la activitatea litică a complementului
- Rezistență la oxidare și supraviețuire în interiorul macrofagelor

Polizaharidele joacă un rol important în formarea Ac serici, conferind specificitatea imunologică.

Proteinele reprezintă suportul imunității celulare și al hipersensibilității tardive.

Patogeneza și formele clinice de tuberculoză



Sursa de infecție – omul bolnav cu TB pulmonară bacilară (*M.tuberculosis*, *M.africanum*) sau bovinele bolnave (*M.bovis*). Un bolnav cu tuberculoză activă infectează 10-15 persoane anual.

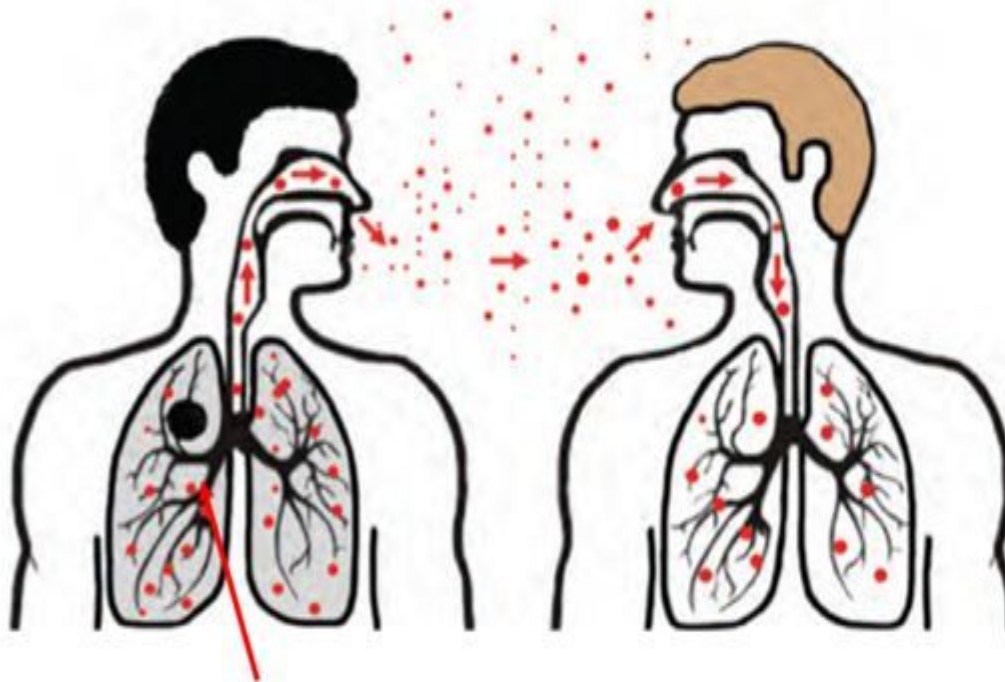
Transmiterea se efectuează pe cale aeriană (picături, praf). Inhalarea a cel mult 10 bacterii poate determina infecția. Rareori este posibilă contaminarea prin obiecte, alimente (lapte nepasteurizat) sau mâini contaminate.

Receptivitatea este influențată de vârstă și factorii de mediu: carențe nutritive, alcoolism, stare imunosupresivă, etc



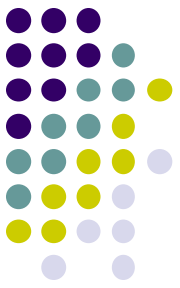
Gouttelettes de Flüge (1-5 bacilles / gouttelettes)

- ❑ Toux → 3500 gouttelettes
- ❑ Eternuement → 20 à 40 000 gouttelettes



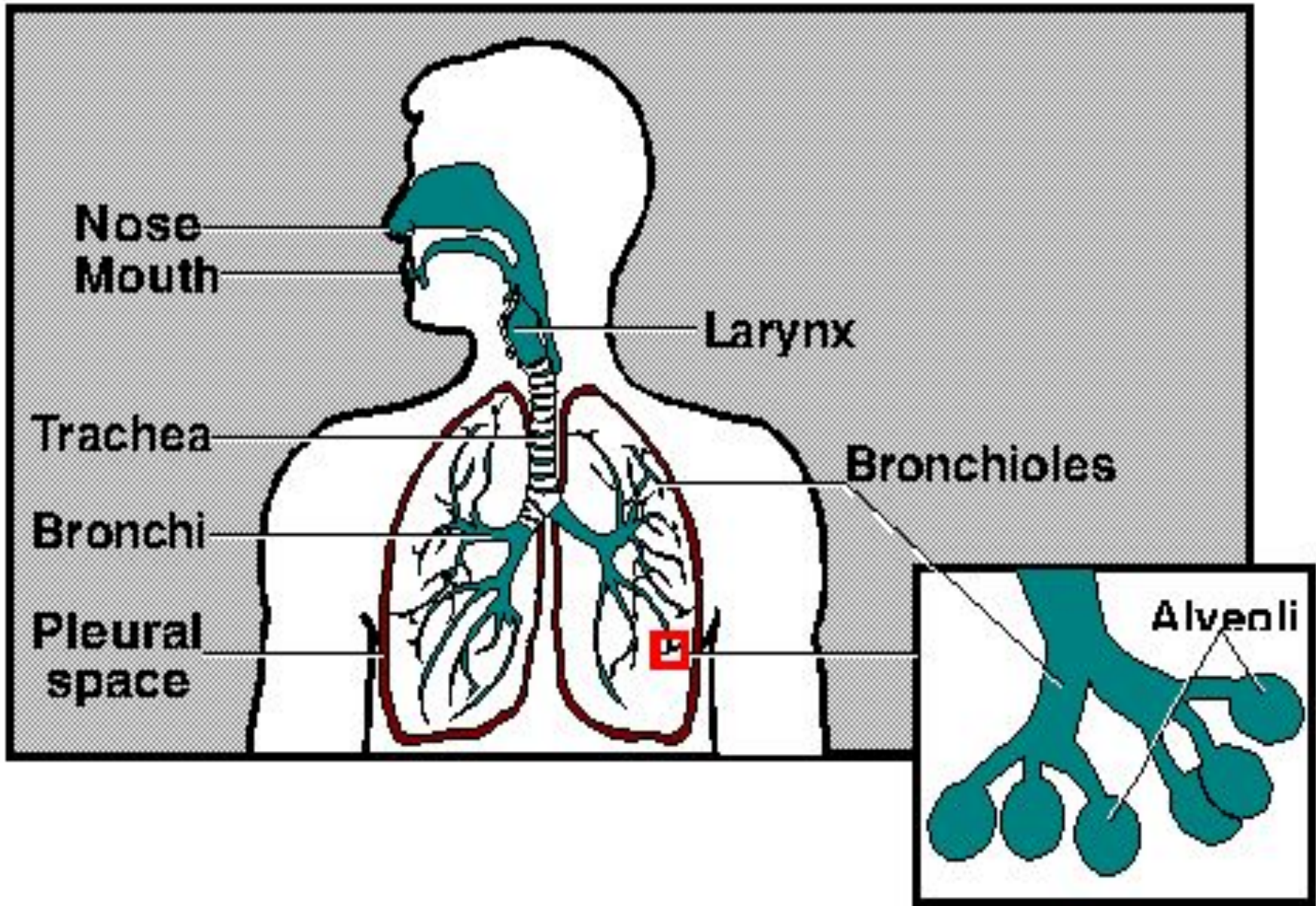
Caverne tuberculeuse, malade bacillifère
contagieux

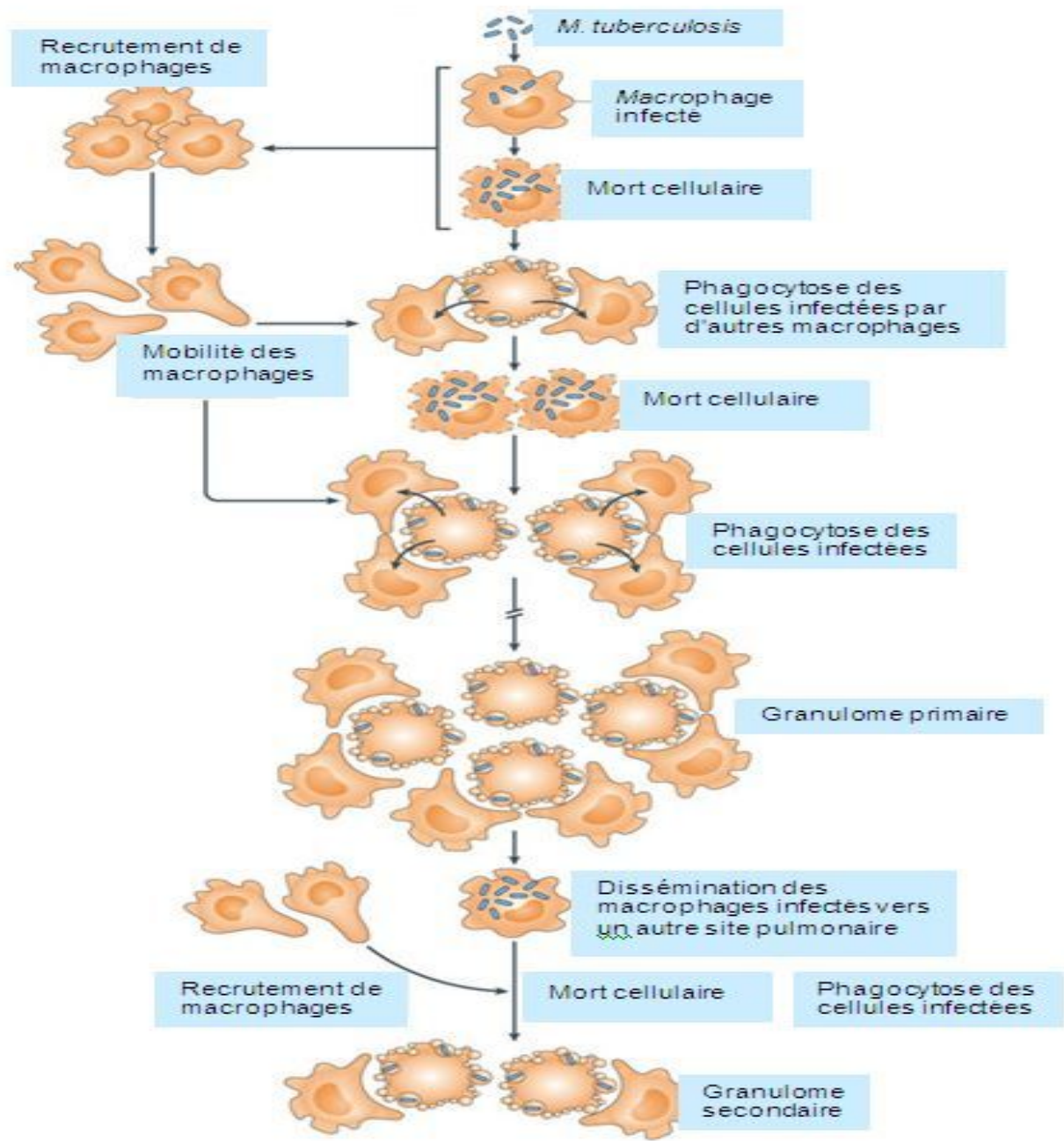
Primoinfecția tuberculoasă și tuberculoza latentă



Reprezintă un ansamblu de manifestări clinice, umorale și anatomice care se desfășoară în organism în urma primului contact cu agentul TB.

După contaminare (mai frecvent în copilărie), bacteriile pătrund în alveolele pulmonare (90%), unde sunt captate de celulele dendritice și macrofage în care se multiplică (bacterii facultativ intracelulare). Urmează moartea acestor celule cu fagocitarea lor de alte macrofage recrutate. Procesul se repetă determinând formarea unei leziuni inflamatoare nespecifice.



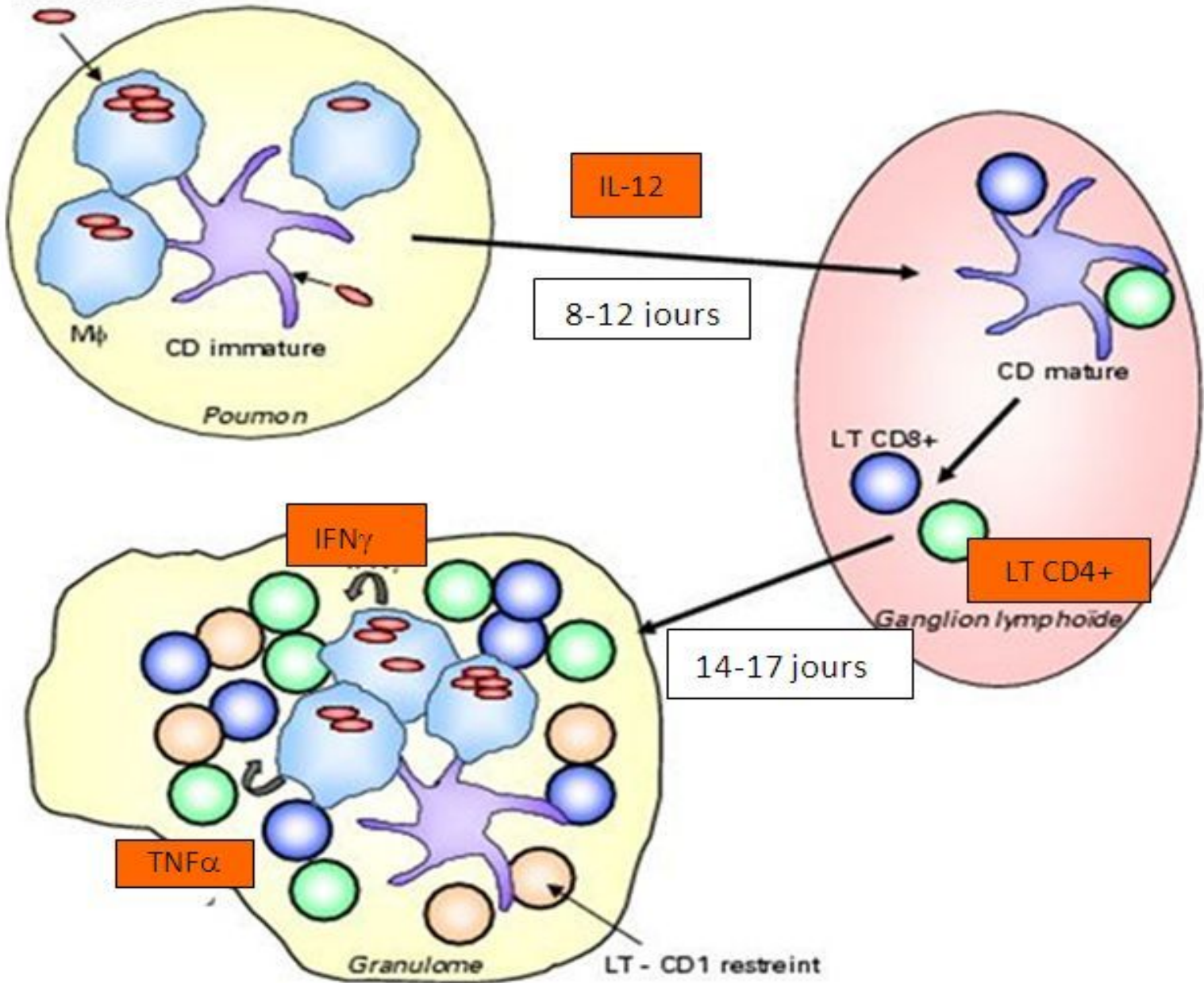




- Agentul tuberculozei determină întârzierea dezvoltării imunității dobândite celulare.
- Prin intermediul celulelor dendritice *M.tbc* ajunge în ganglionii limfatici regionali, unde are loc activarea și diferențierea LT naive în celule efectoare, care migrează în plămâni, la nivelul leziunii pulmonare inițiale, contribuind la formarea ***granulomului***.

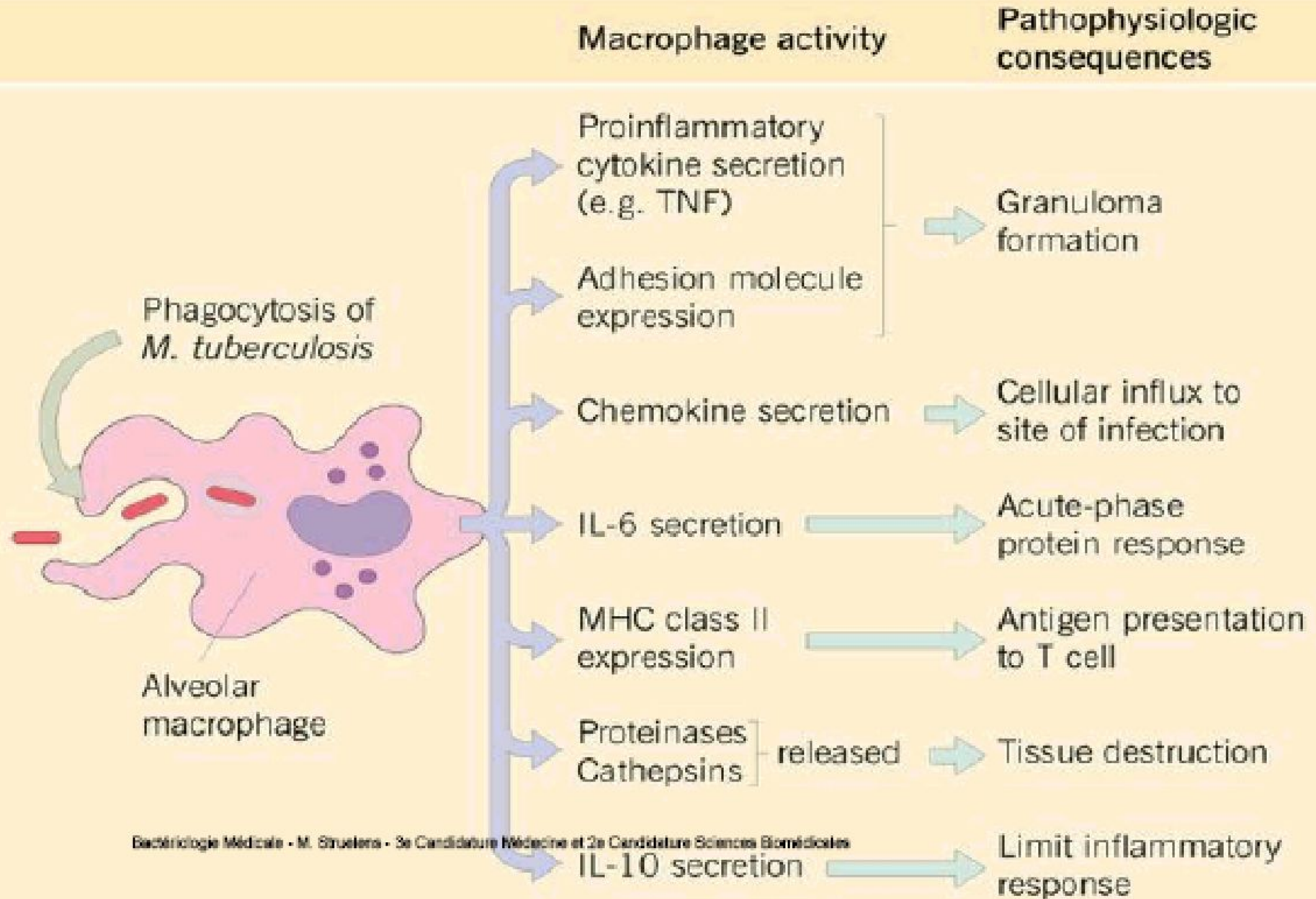


M. tuberculosis

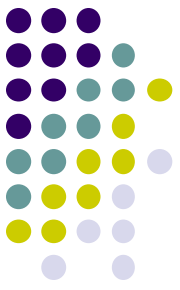


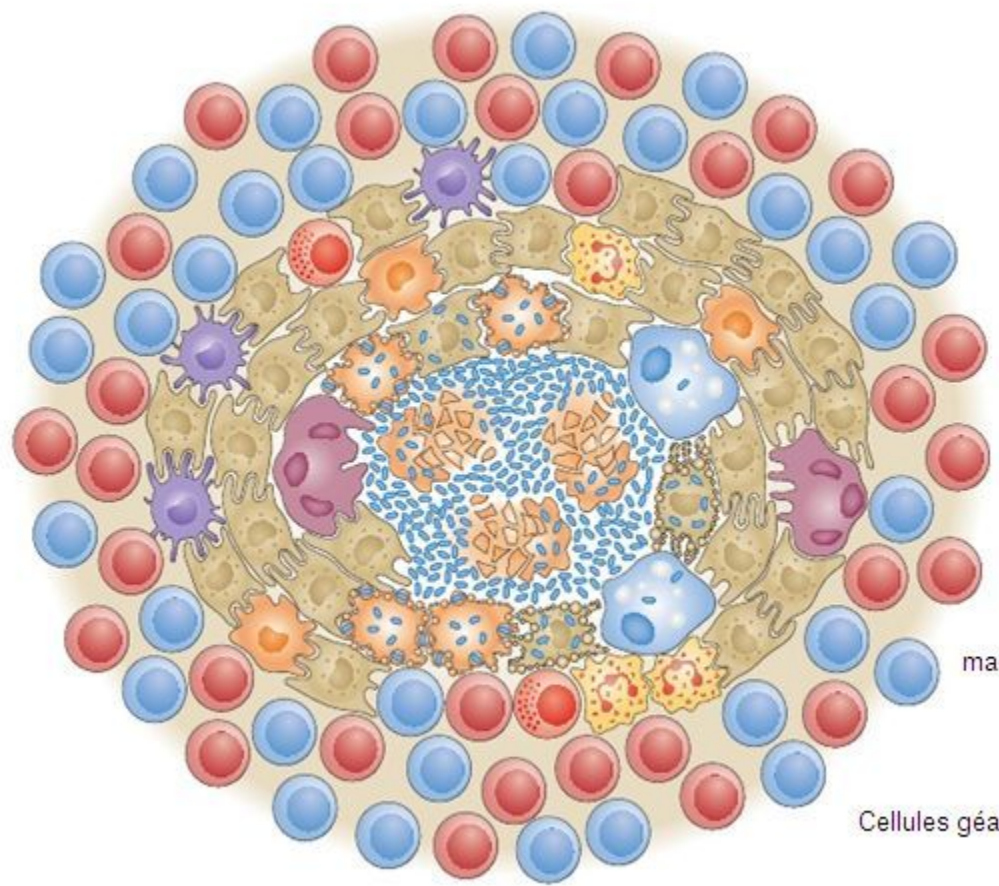
PHAGOCYTOSIS OF *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* BY MACROPHAGES

227 sur 310



Astfel, peste câteva săptămâni (4-12) se dezvoltă imunitatea celulară și leziunea primară evoluează în leziune granulomatoasă. Sub acțiunea unor citokine secretate de limfocitele T (în special IFN gamma, TNF) are loc **activarea macrofagelor**, care devin deja capabile să distrugă micobacteriile. În același timp macrofagele activate se diferențiază în celule epitelioid și celule multinucleate gigante Langhans. Sunt prezente și neutrofile, celule dendritice, NK. Ele sunt înconjurate de limfocite și fibroblaste. Acesta este **granulomul tuberculos**, semn **caracteristic primo-infecției**. Infecția se extinde pe cale limfatică, cu afectarea ganglionilor regionali.





LT



PN



NK



cellules épithélioïdes



macrophages



macrophages lysés



cellules dendritiques



Cellules géantes




Macrophages spumeux

Bacille tuberculeux



- **Primoinfecția inaparentă**. La cca 85-90% leziunile se vindecă cu persistența bacteriilor inactive sau cu autosterilizare. Nicio expresie clinică sau radiologică.

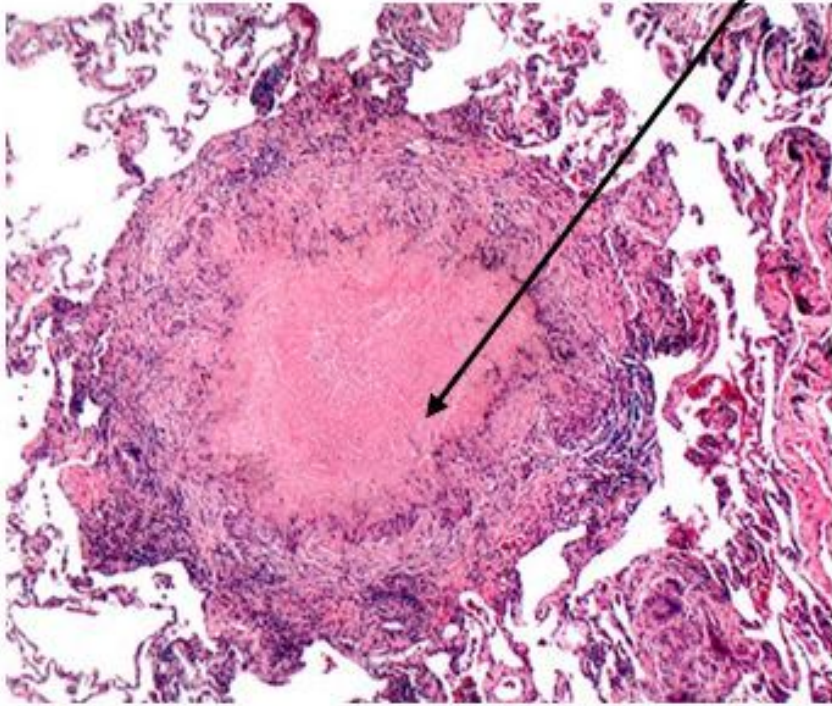
 Dacă multiplicarea bacteriilor este masivă, în leziunile tuberculoase se realizează o necroză cazeoasă (**tuberculom**).

Frecvent are loc calcifierea tuberculomului (leziunea este vizibilă radiologic), cu autosterilizarea spontană sau cu persistența unor bacterii în leziune. Bacteriile rămân inactive, dar viabile timp de mulți ani. Această stare este cunoscută ca **infecție tuberculoasă latentă** (90% din cazuri).

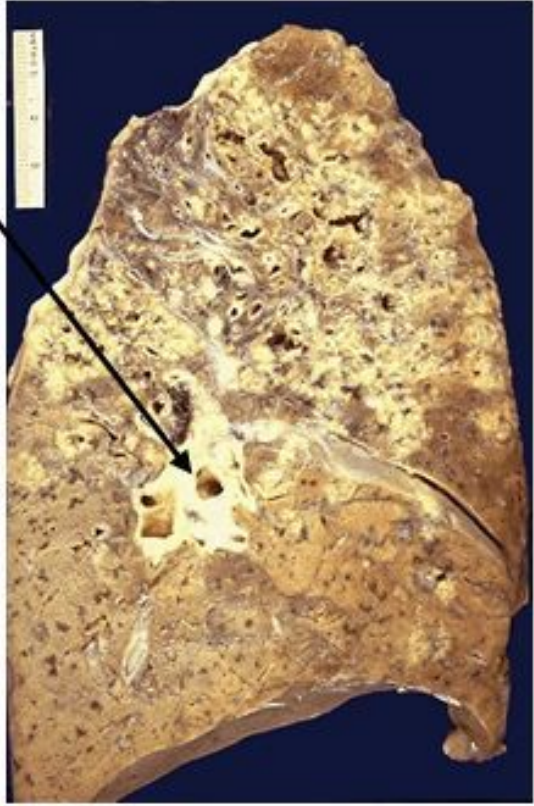
Consecințele primoinfecției inaparente sau latente: dezvoltarea imunității antituberculoase și a sensibilizării tuberculinice.



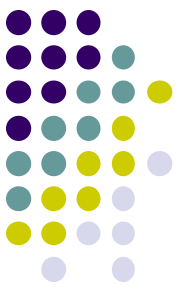
Nécrose caséuse



A



B



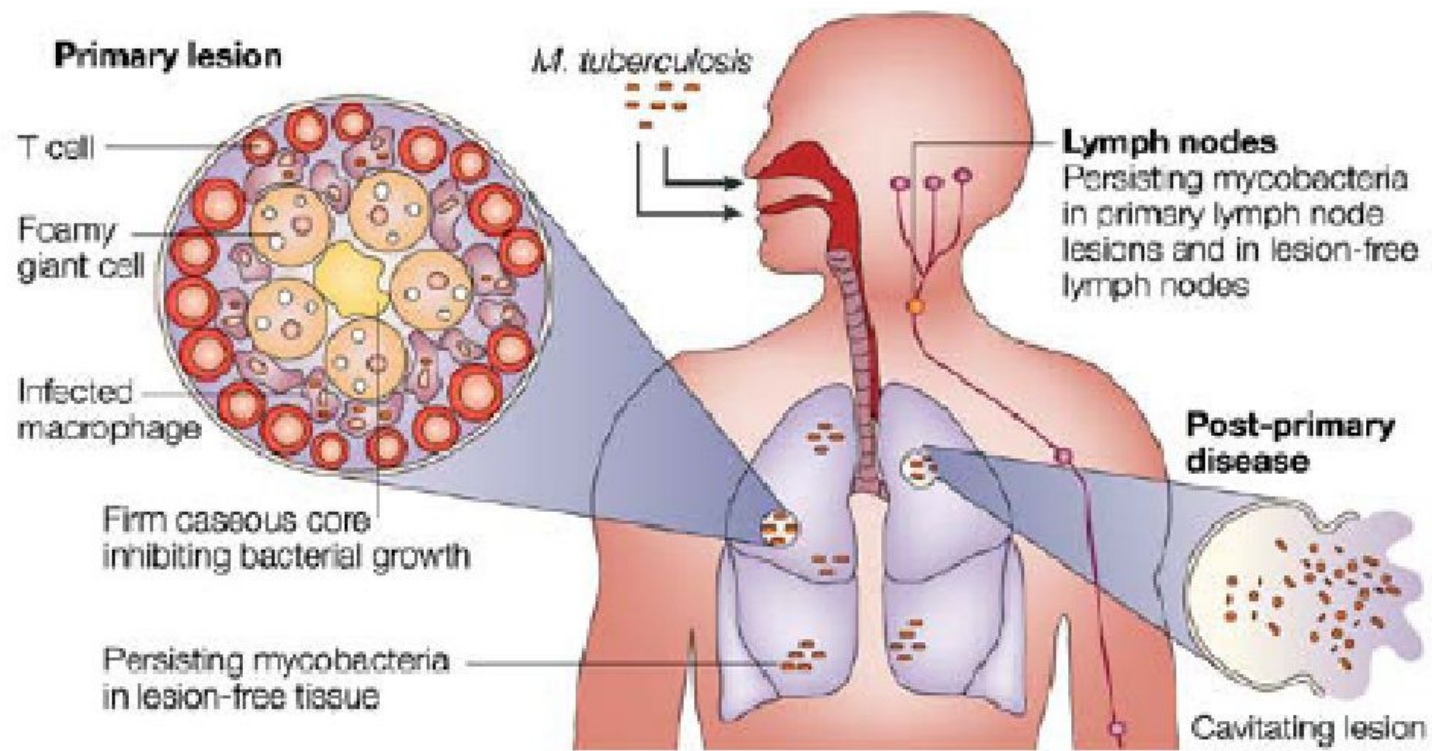
Tuberculoza primară manifestă necomplicată.

Pacienții au febră, tuse, astenie, pierdere în greutate, transpirații nocturne, etc. Etapa ganglionară poate fi depășită cu diseminări hematogene și afectarea pleurei, meningelui, măduvei osoase, parenhimei organelor. Leziunile pot evolua fie spre cicatrizare, fie spre agravare.

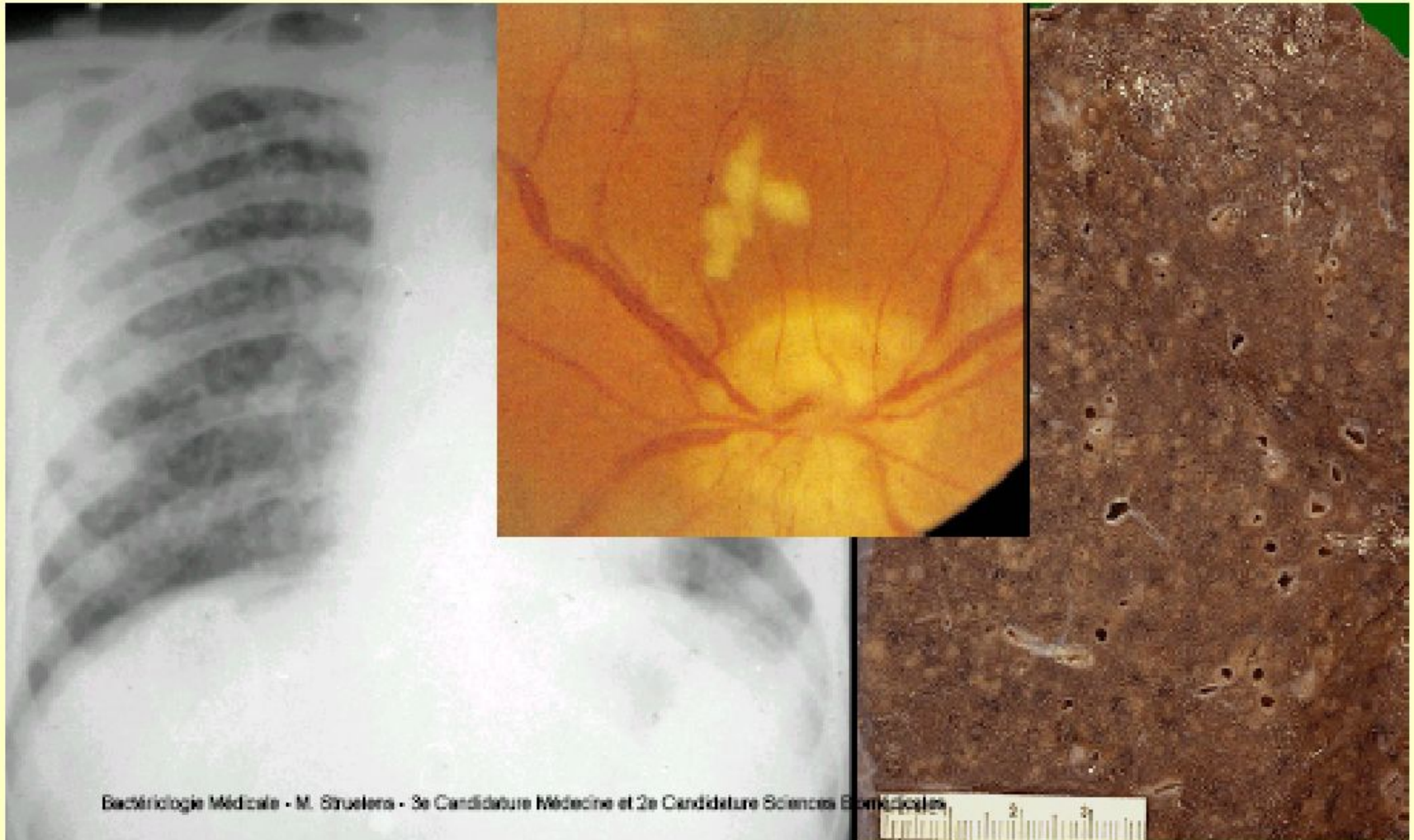
Tuberculoza primară cu complicații. Rareori (10% cazuri), evoluția este defavorabilă: masele necrotice sunt evacuate în bronșii, vase sanguine, pleură sau pericard cu formarea unei *caverne*, unde bacteriile se multiplică intens. Fistulizarea într-un vas sangvin diseminează infecția sistemic (*tuberculoza miliară*). Starea generală este alterată, cu febră, tuse, uneori hemoptizie.

Bolnavul este contagios, eliminând bacterii cu sputa.

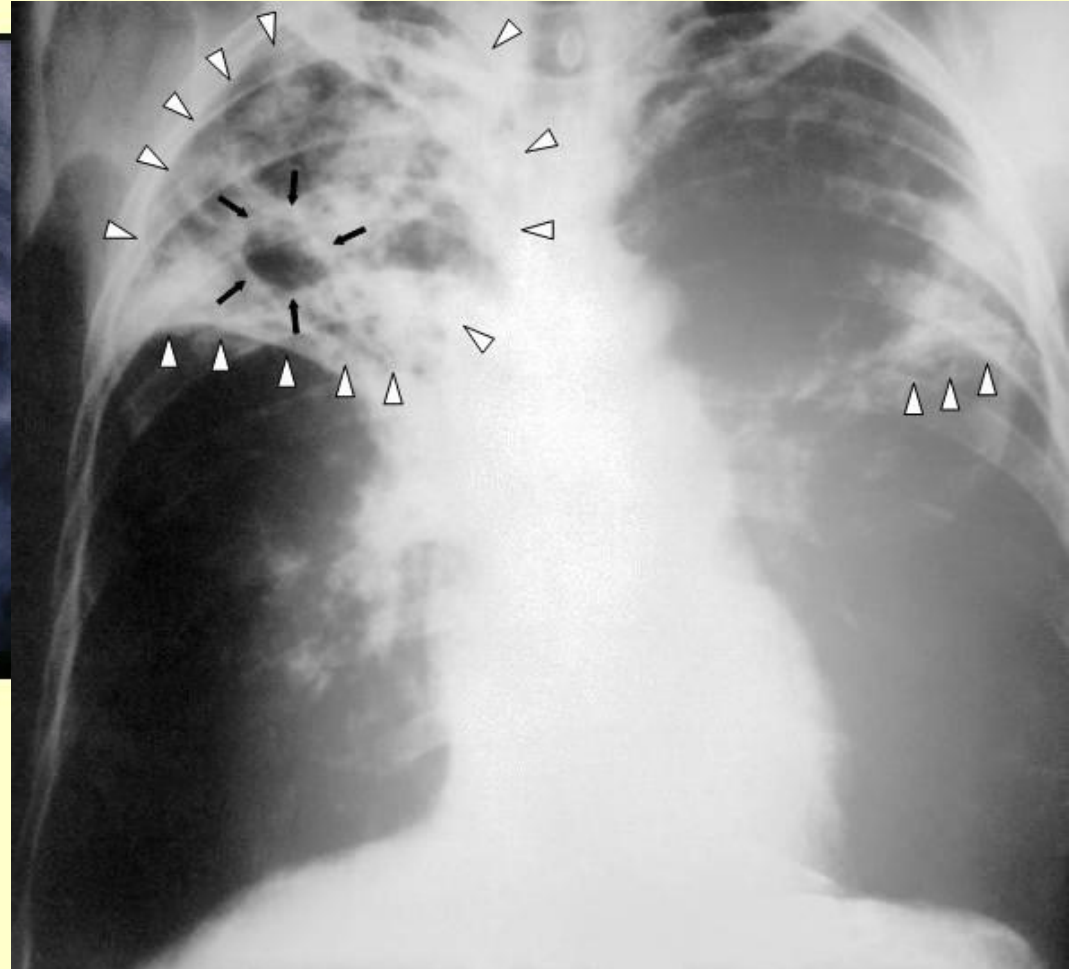
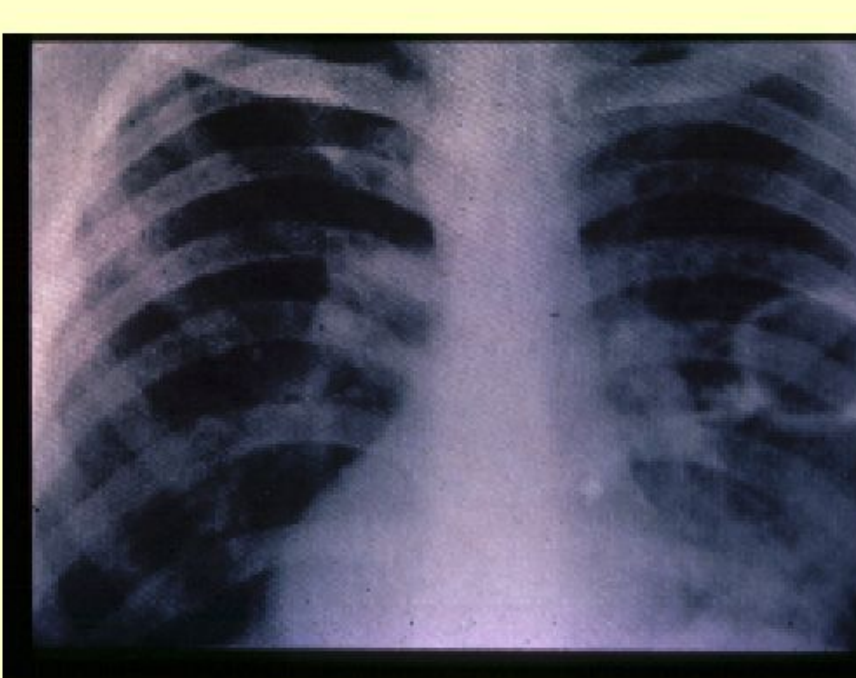
Pathogénèse de la tuberculose



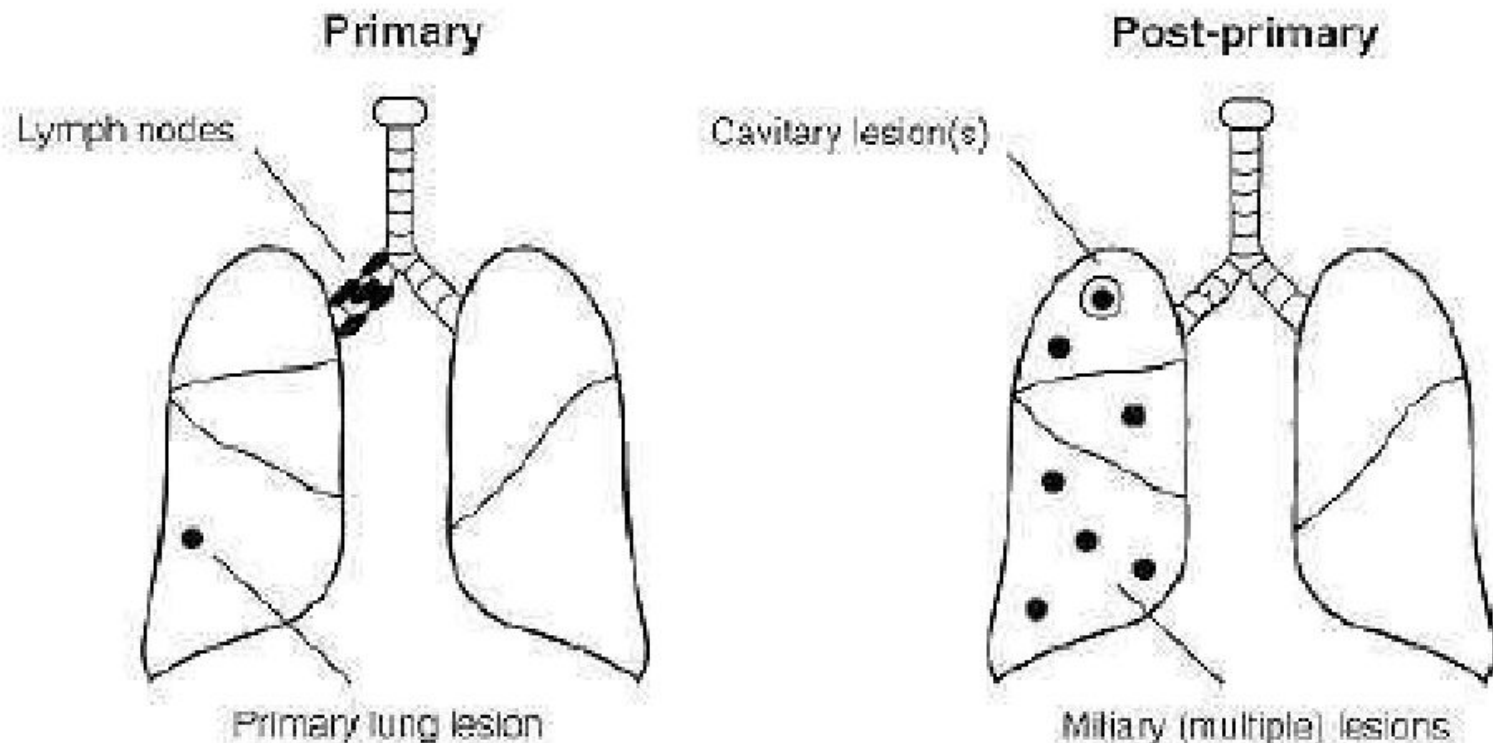
Tuberculose miliaire



Caverne tuberculeuse

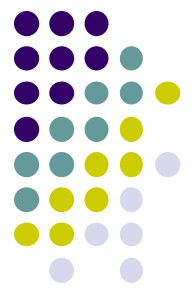


Tuberculose primaire et post-primaire



Symptoms of Tuberculosis

Grey lines = More specific
 Colored lines = Overlapping



(Established) pulmonary tuberculosis

Poor appetite

Miliary tuberculosis

Productive cough

Night sweats

Return of dormant tuberculosis

Primary pulmonary tuberculosis

Weakness

Cough with increasing mucus
 Coughing up blood

Fever

Structural abnormalities

Dry cough

Weight loss

Extrapulmonary tuberculosis

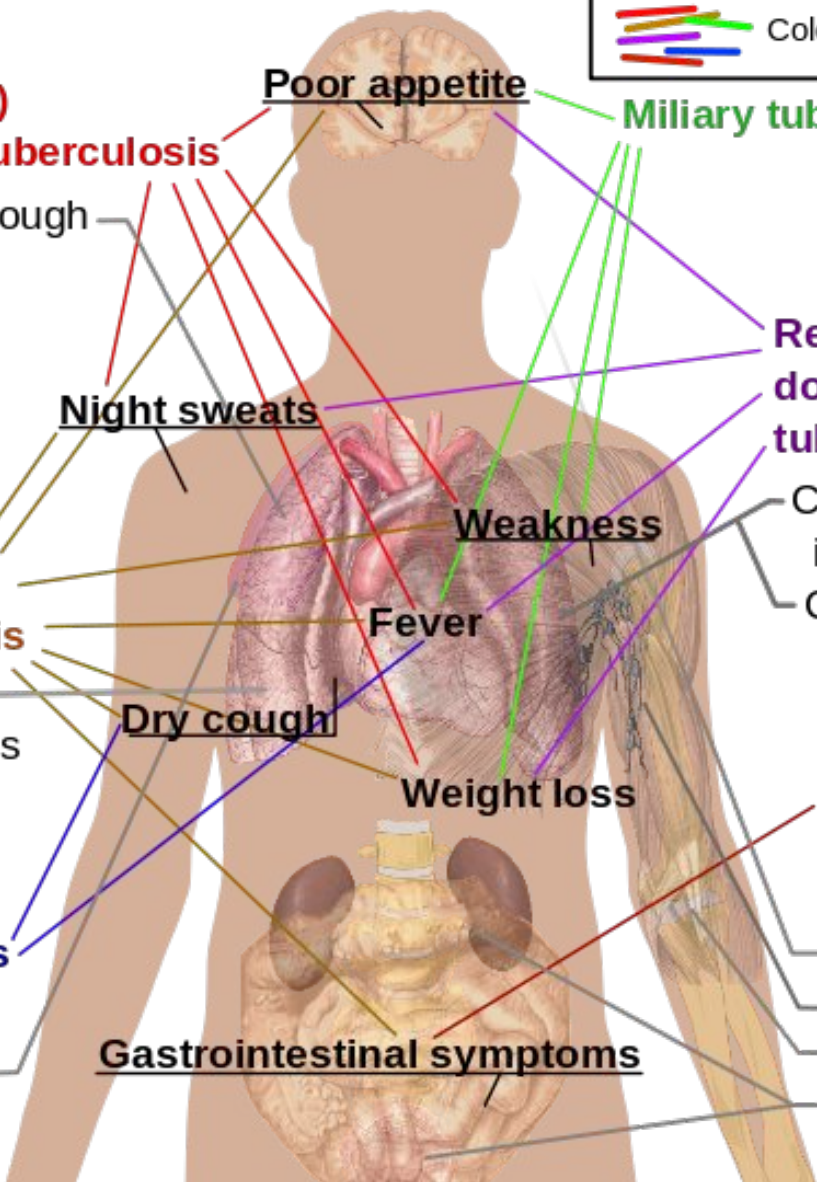
Tuberculous pleuritis

Common sites:
 Meninges

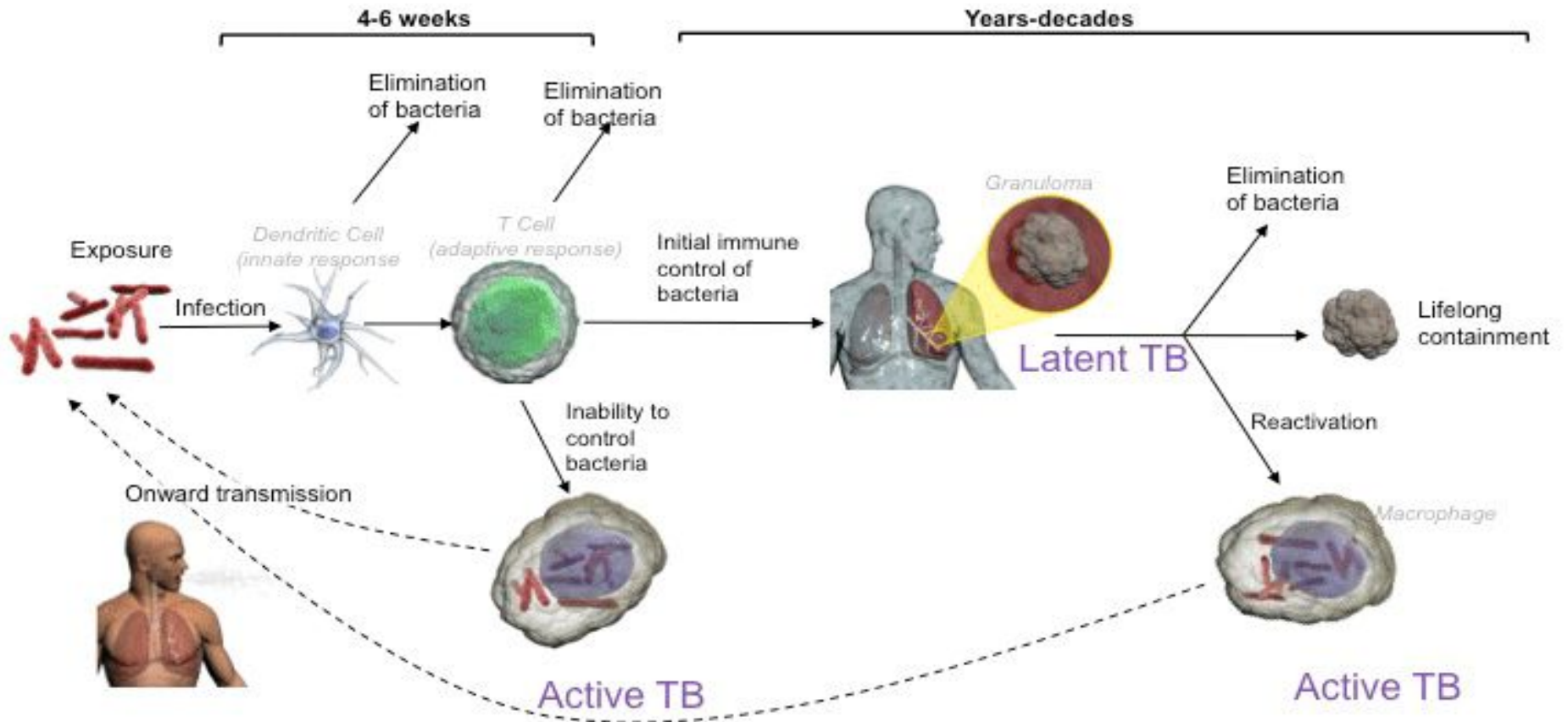
Chest pain

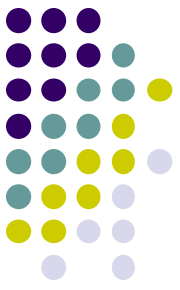
Gastrointestinal symptoms

Lymph nodes
 Bone and joint sites
 Genitourinary tract



Natural history of TB infection





Tuberculoza secundară. Se manifestă în condiții de scădere a reactivității imune, prin reinfecții masive sau reactivarea unor focare latente. Focarele noi apar în ritm lent și evoluează cronic fără tendință de vindecare spontană.

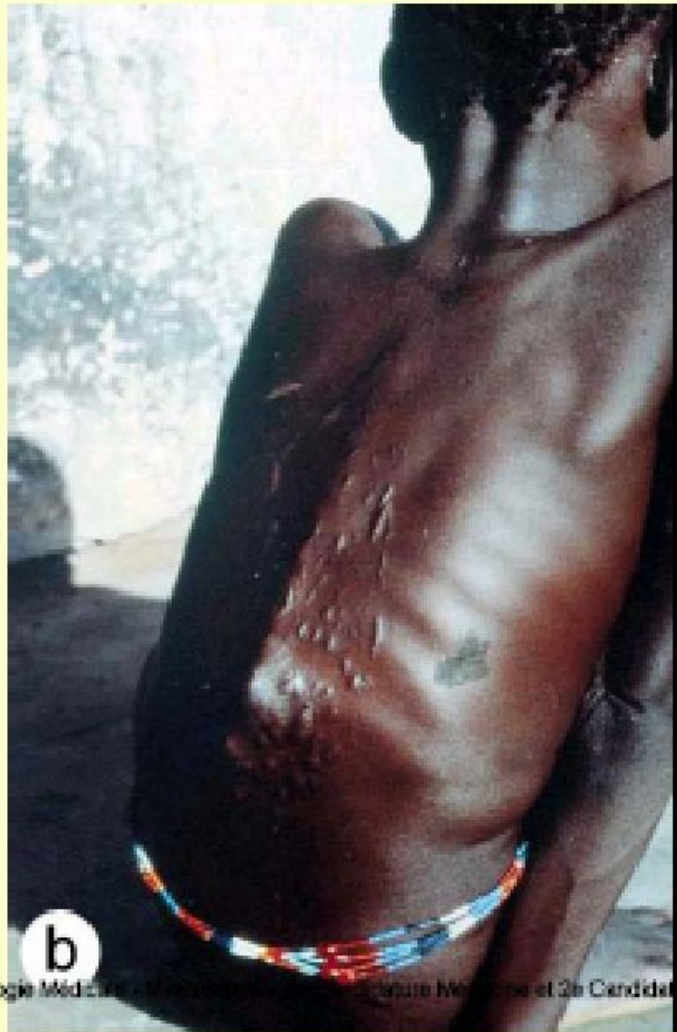
Alte forme clinice de tuberculoză: ganglionară, meningeană, osteo-articulară, uro-genitală.

Imunitatea antituberculoasă este celulară, nesterilă. Hipersensibilitatea tardivă însoțește imunitatea celulară. Ac circulanți nu au rol protector.

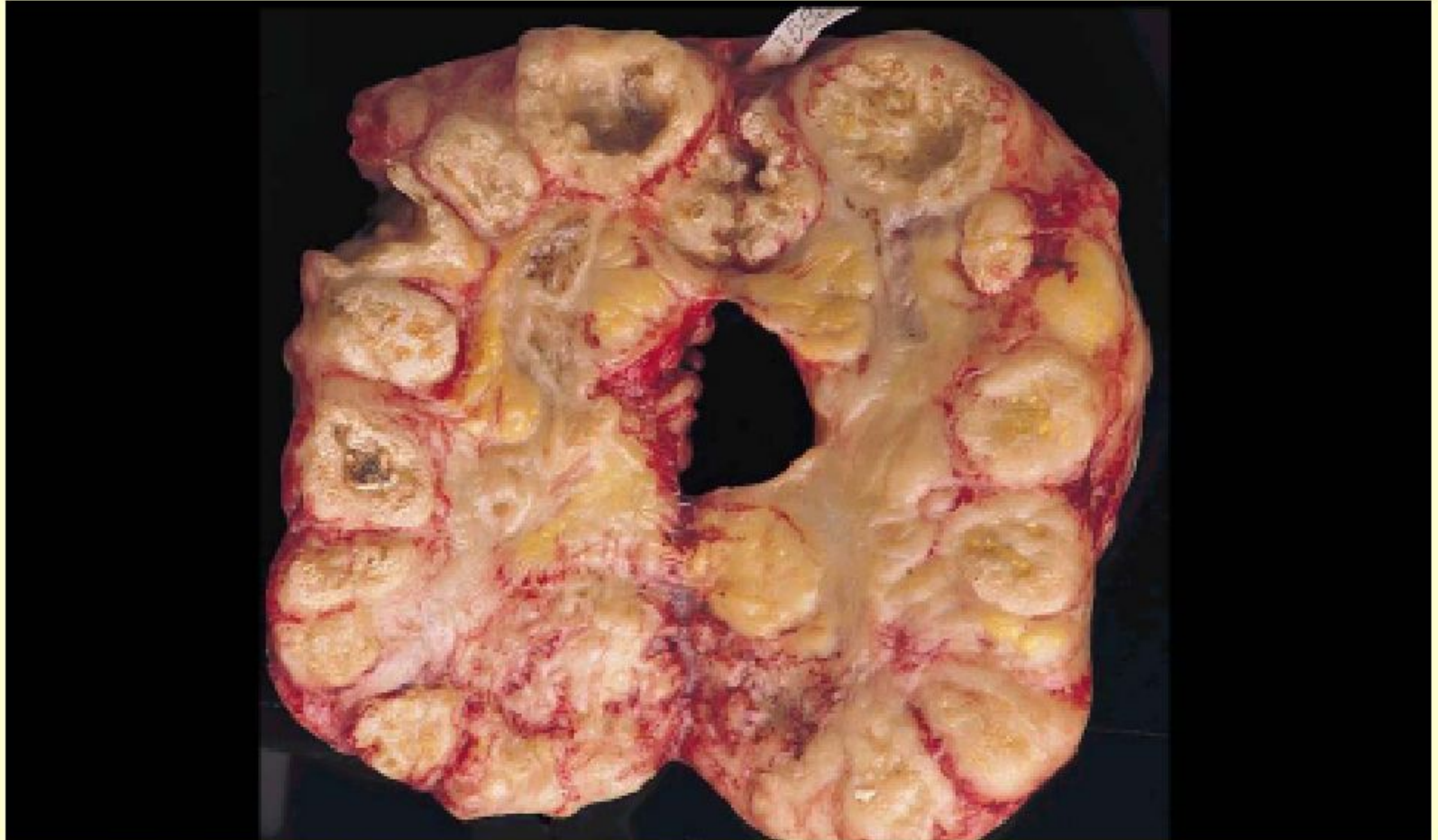
235 sur 310

Tuberculose extra-pulmonaire

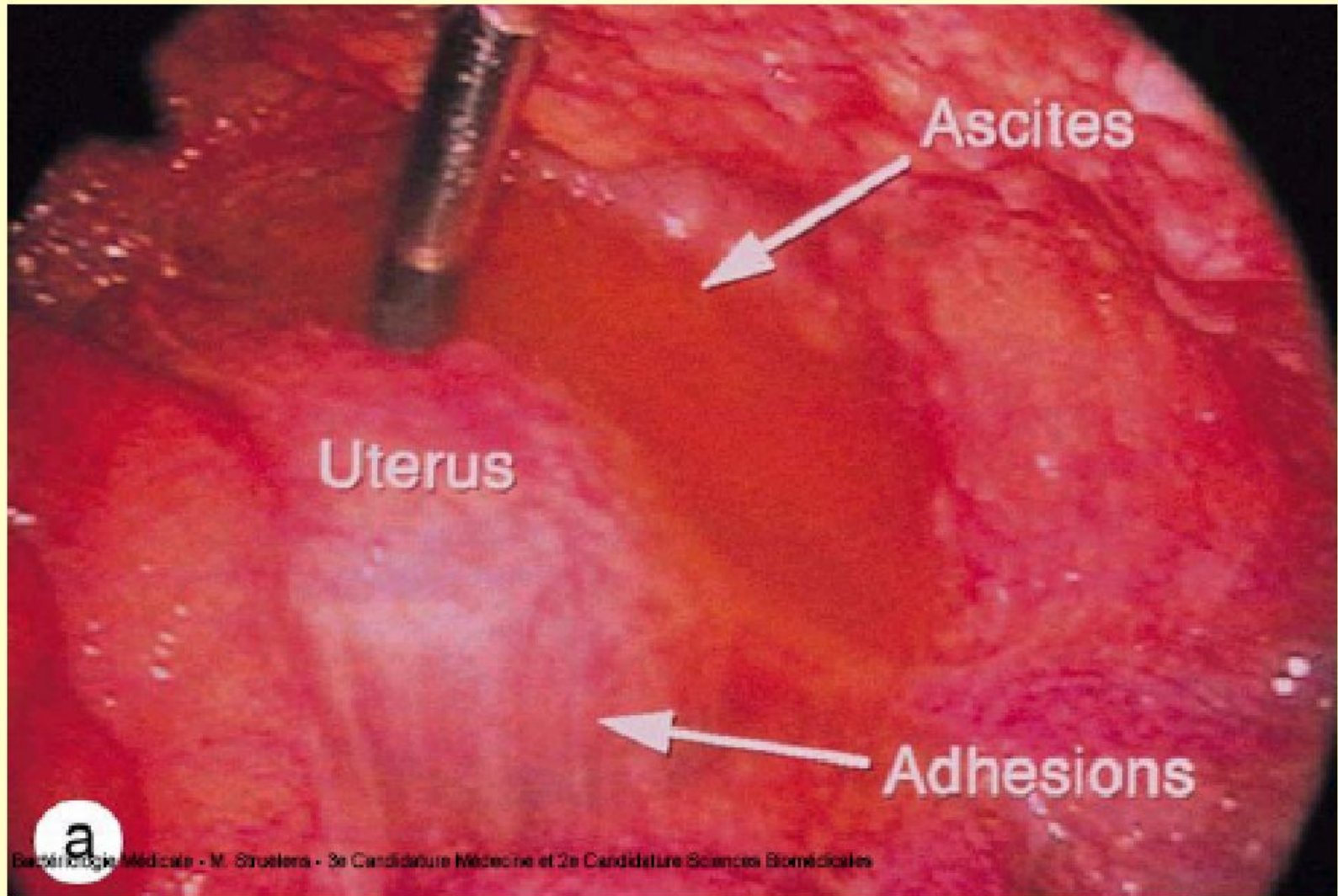
Mal de Pott



Tuberculose rénale



Tuberculose génitale et peritonéale







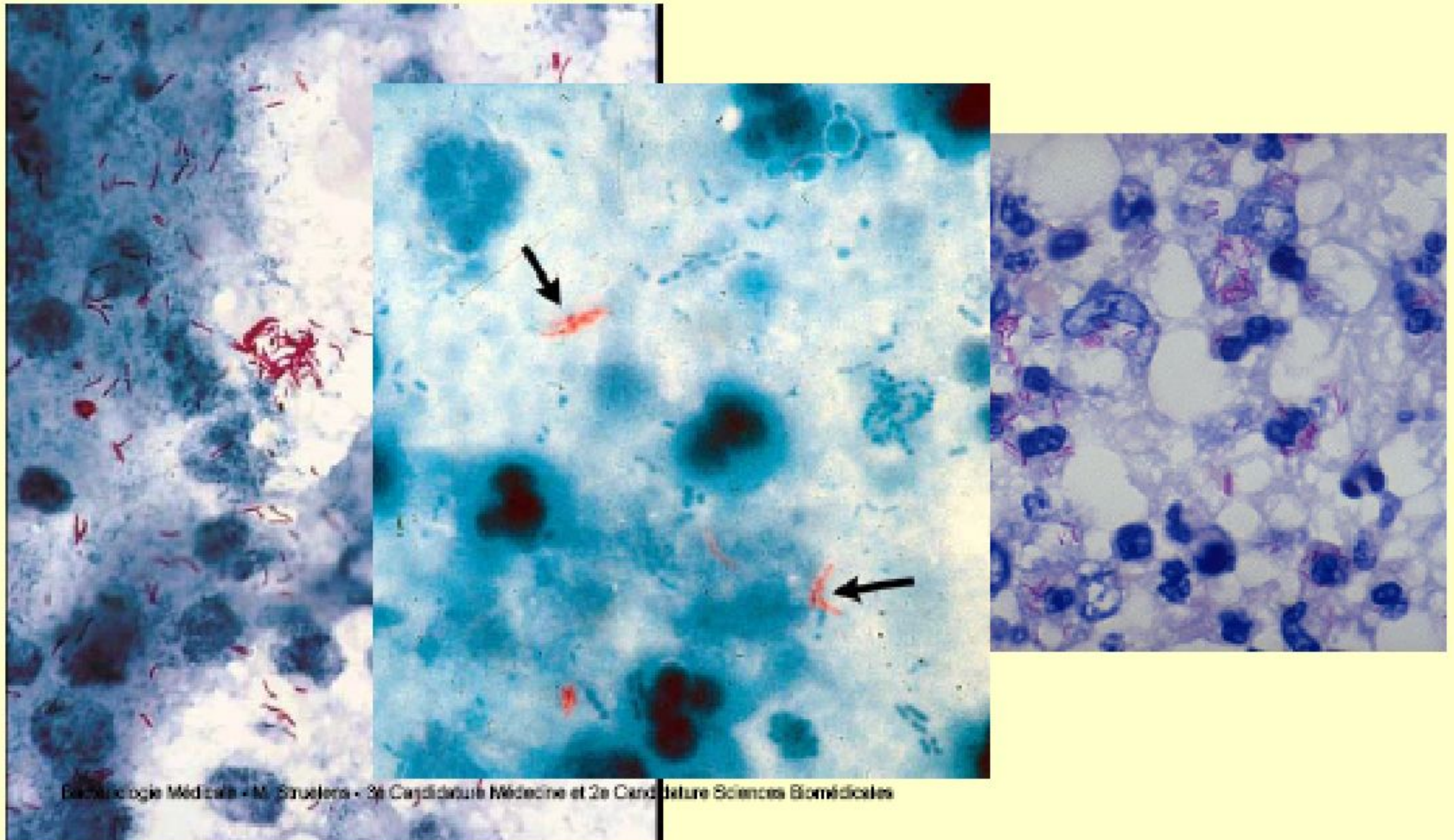
Diagnosticul de laborator al tuberculozei

- **Prelevate:** în funcție de forma clinică: sputa matinală (5-10 ml), tubaje gastrice, urină, lichid pleural, articular, peritoneal, LCR, bioptate, etc
- În caz de necesitate se efectuează omogenizarea /decontaminarea cu NaOH și concentrarea (prin centrifugare) a prelevatelor.

Metode de diagnostic

1. **Examenul microscopic** – frotiuri colorate Ziehl-Neelsen (bastonașe purpuriu izolate) sau cu fluorocromi (auramină sau amestec auramină+rodamină) - bastonașe galbene pe fond negru. Sensibilitatea – 10^4 bacili/ml

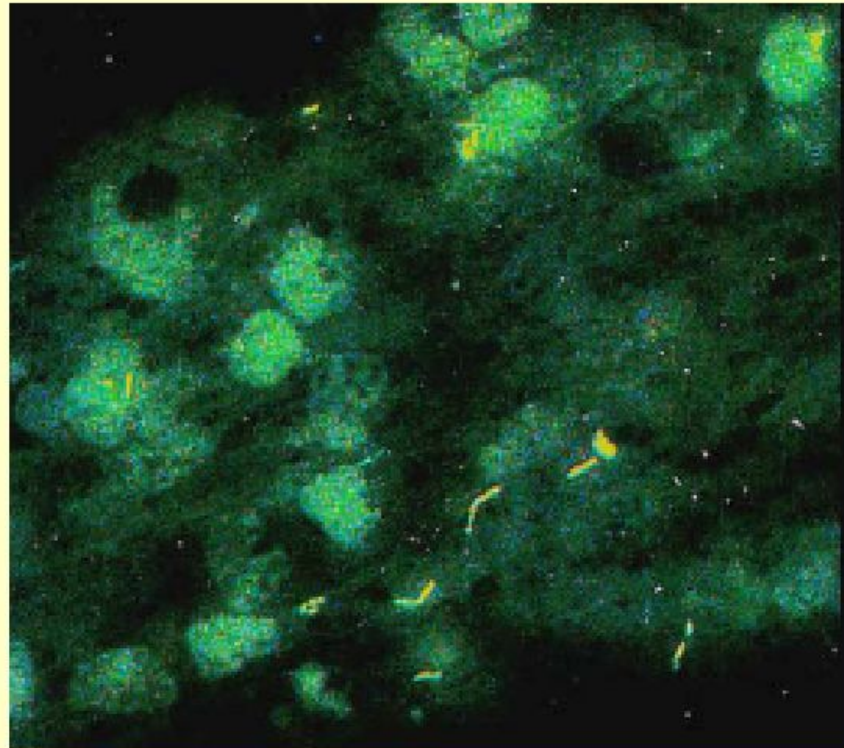
Coloration de Ziehl-Neelsen: Bacilles alcoolo-acido résistants



241 sur 310

Coloration à l'auramine

Bacilles alcoolo-acido-résistants



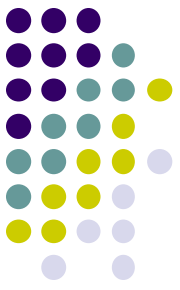
2. Examenul bacteriologic clasic– izolarea culturii pure pe mediile speciale, identificarea ei, testarea sensibilității la chimioterapice (prin metoda diluțiilor în mediu solid – metoda concentrațiilor absolute). Rezultat peste 2-2,5 luni

Examenul bacteriologic rapid (sistemul BACTEC, metoda MB/BacT). Rezultat pozitiv în 3-21 zile

Sunt utilizate medii lichide. Principiul metodei – se apreciază scăderea concentrației oxigenului din mediu odată cu multiplicarea micobacteriilor. Lectura este automată.

3. Metoda biologică (inocularea la cobai). Servește uneori pentru confirmarea virulenței micobacteriei

4. PCR pentru detectarea rapidă al ADN micobacteriilor direct în prelevate. Permite detectarea genelor de rezistență la preparate antituberculoase



Culture

Conventional

Solid media

Lowenstein-Jensen: egg-based

Middlebrook 7H 10 or 7H11: agar-based

Liquid media

Middlebrook 7H 12



Automated

Liquid media

More sophisticated equipment

Faster detection of growth

Higher sensitivity than solid media

Can also be used for drug-susceptibility testing

BACTEC 460 TB
MGIT





5. Intradermoreacția la tuberculină (reacția Mantoux).

Se cercetează starea de hipersensibilitate cutanată la tuberculină. Tuberculina reprezintă un filtrat proteic dintr-o cultură bulionică autoclavată de *M.tuberculosis*.

Pe fața anterioară a antebrațului se injectează i/dermic 2; 5 sau 10 UI de tuberculină în volum de 0,1 ml.

Lectura peste 72 ore. Reacția pozitivă se manifestă printr-o indurație și congestie cu diametrul superior sau egal cu 5 mm. Interpretarea se efectuează în funcție de contextul clinic

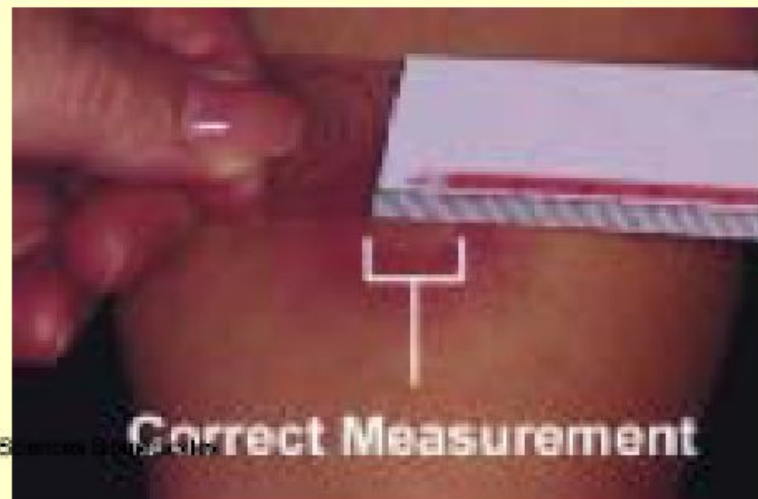
- **Reacția +** indică că subiectul a fost infectat cu micobacterii (primoinfecție), a fost vaccinat cu BCG sau este bolnav de tuberculoză (în acest caz diametrul depășește 10 mm).
- **Reacția negativă** exclude diagnosticul de tuberculoză și indică receptivitatea individului la tuberculoză.

Intra-dermo réaction à la tuberculine

- Injection intra-dermique de PPD (tuberculine)



- Examen après 72 h : induration (réaction d'hypersensibilité retardée) : diamètre > 10 mm







- **Interferon- γ (interferon-gamma) release assays (IGRAs).**
- Se bazeaza pe capacitatea unor antigene ale *M. tuberculosis* de a stimula producerea IFN- γ de catre gazda. Aceste Ag lipsesc la alte micobacterii sau la tulpina vaccinanta BCG, astfel poate fi depistata infectia tuberculoasa latentă.
- Un test ELISA este utilizat pentru cuantificarea interferonului.



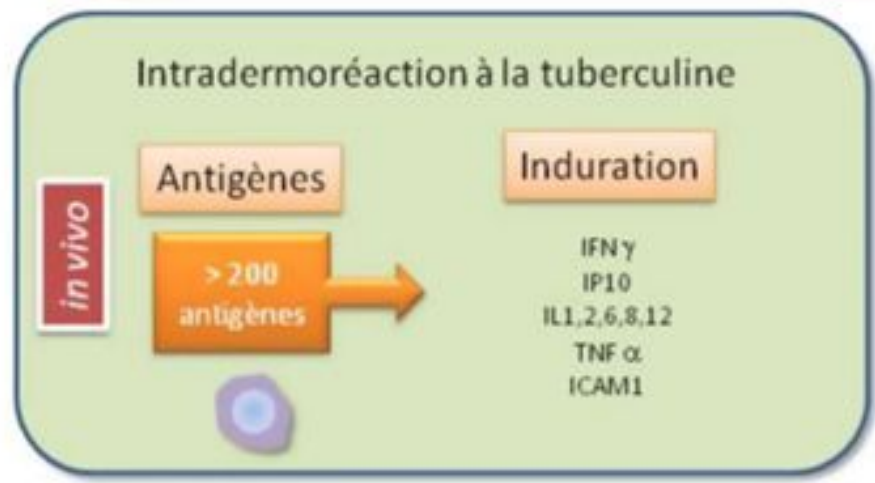
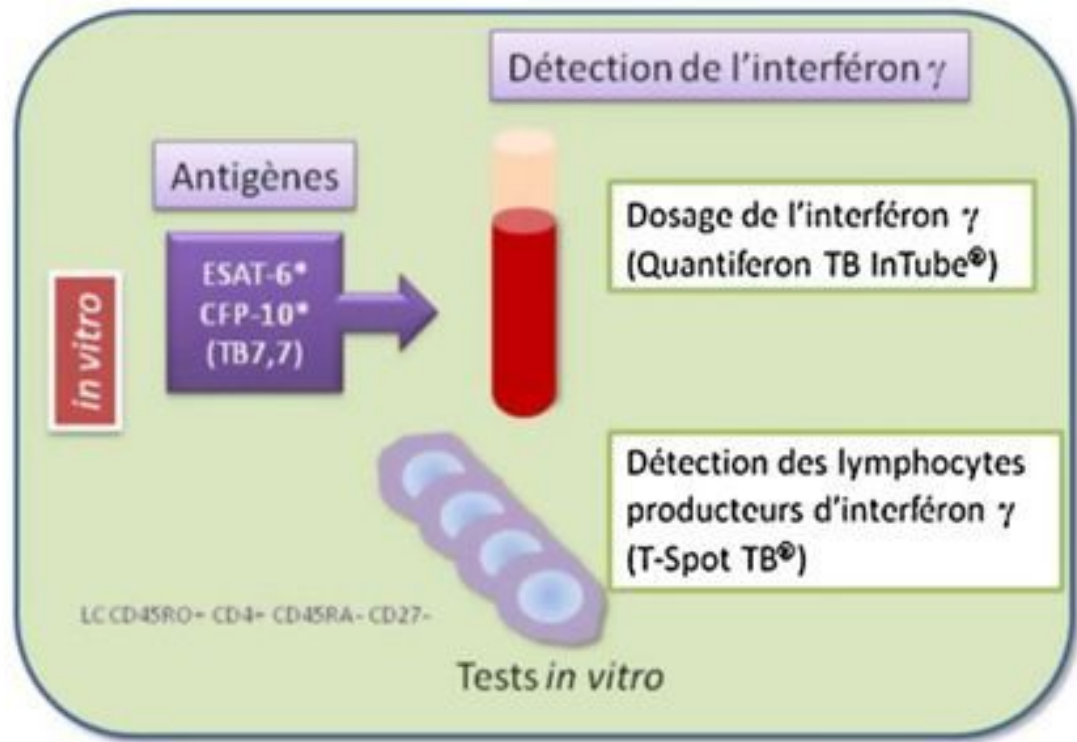
Sensibilisation préalable (infection tuberculeuse)

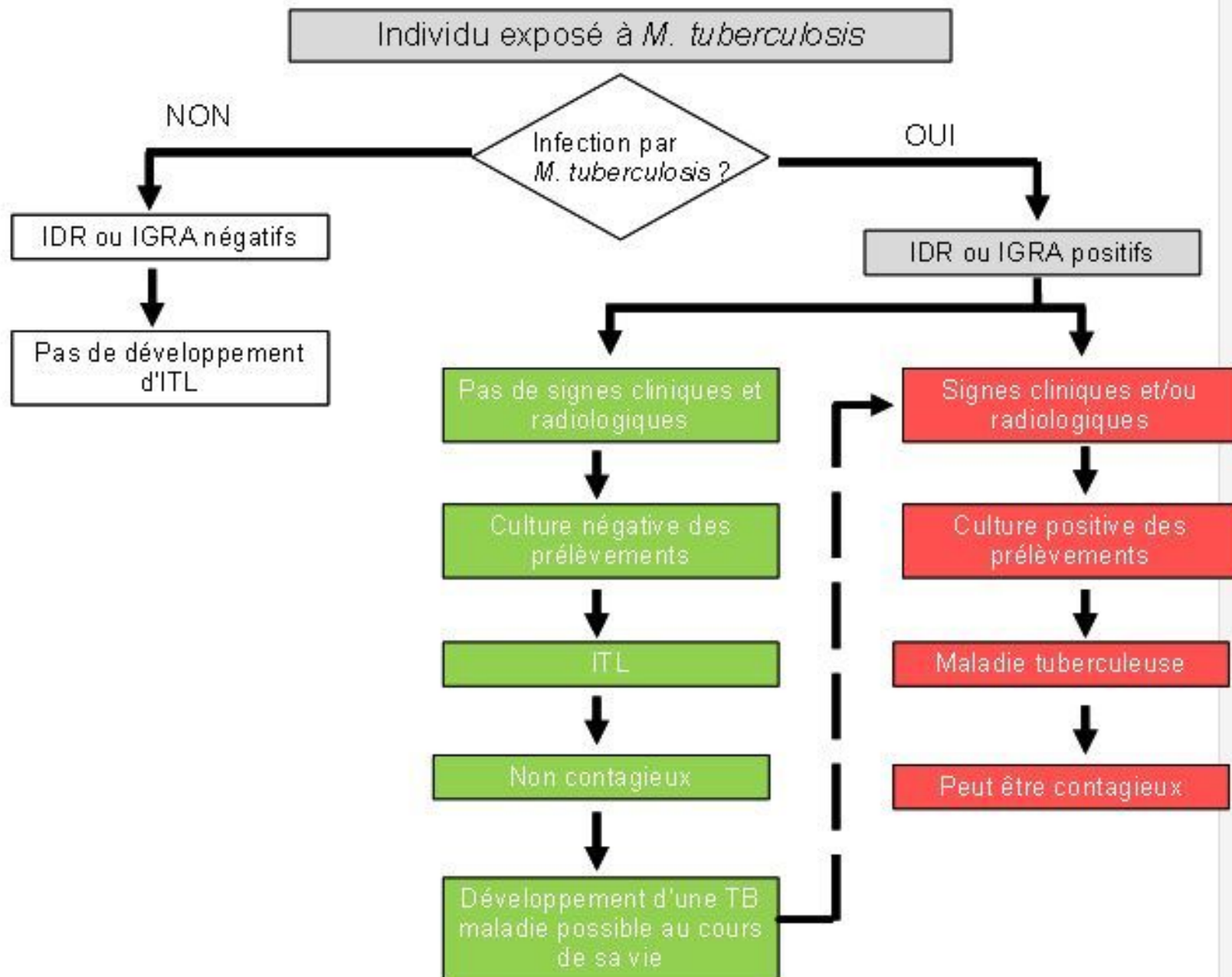
Cellule dendritique Lymphocyte T



Mycobacterium tuberculosis

* Absents du BCG, mais présents chez *M. kansasii*, *M. szulgai*, *M. marinum*, *M. flavescens* et *M. goodii*





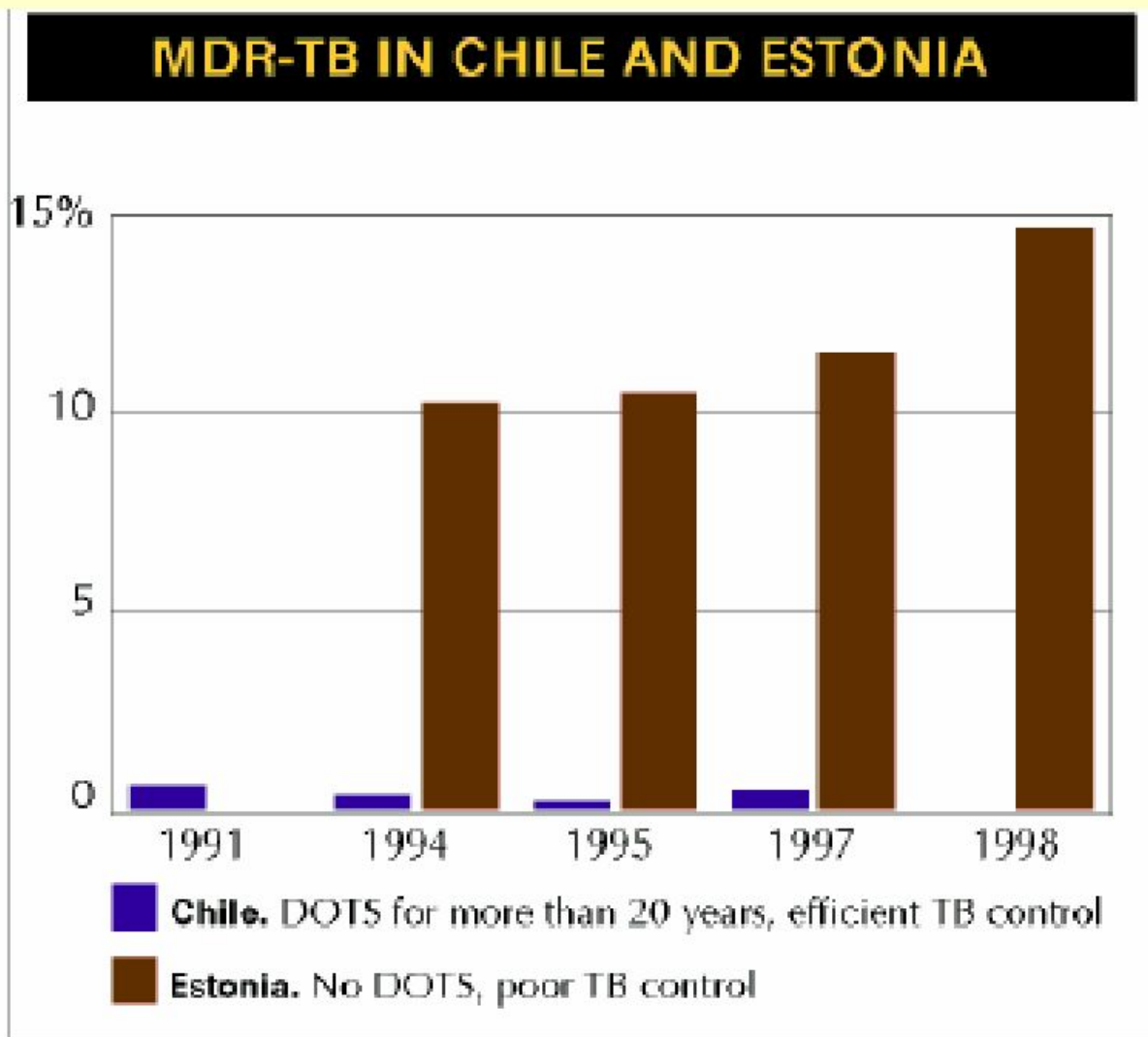


- În Moldova activează 59 de laboratoare de microscopie a sputei pentru depistarea *Mycobacterium tuberculosis*.
- În afară de aceasta, în Chișinău, Bălți, Bender și Vorniceni funcționează și Laboratoare de Referință în microbiologia tuberculozei unde se efectuează examene microbiologice pentru depistarea rezistenței la preparatele medicamentoase.



Tratamentul tuberculozei

- **DOTS (Directly Observed Treatment Short Course Chemoterapie). DOTS este o strategie a OMS implementată în 1993**
 - **Principiile DOTS**
 - tratament standardizat
 - tratament bifazic constituit dintr-o fază intensivă și faza de continuare
 - asocieri de medicamente antituberculoase
 - supraveghere directă a regularității administrării tratamentului antituberculos
- Din 2005 – Program Național de Control și Profilaxie a Tuberculozei



Source: CDS/CPE

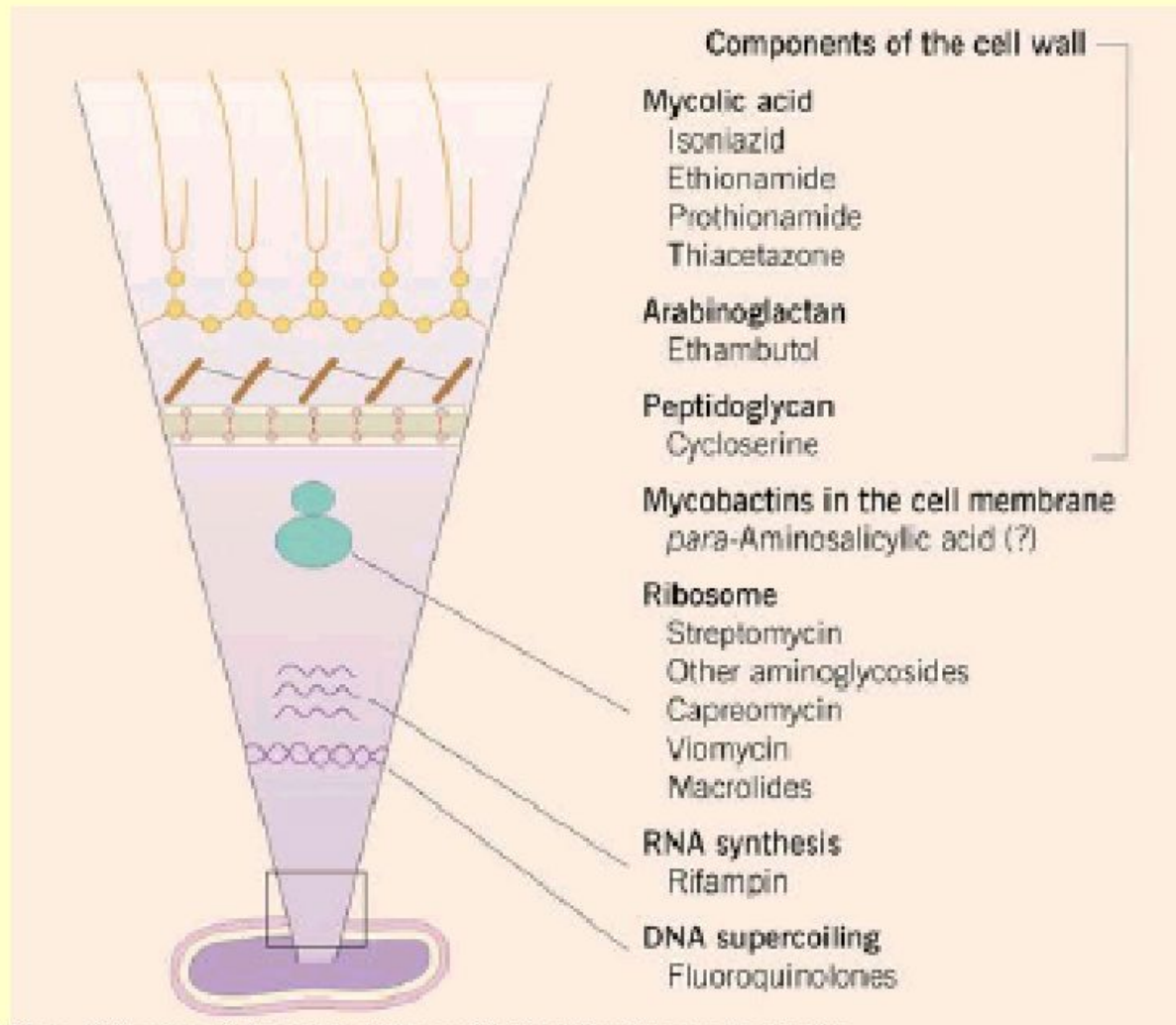


1. Chimioterapice care inhibă sinteza acizilor micolici (Isoniazida, Pirazinamida, Etambutolul, Etionamida) – de **prima linie**
2. Antibiotice cu spectru larg: rifampicină, streptomycină, kanamicină, D-cicloserină
3. Fluorochinolone – **linia a doua**
4. Antibiotice noi - Bedaquiline, Delamanid

Exigențele terapiei antituberculoase: a împiedica selecția mutanților rezistenți și a steriliza definitiv focarul.

În acest scop se utilizează asocierea a 3-4 preparate pe o perioadă de 6-12 luni.

Mode d'action des anti-tuberculeux





MDR-TB – tuberculoza multidrogrezistentă
(tulpini rezistente la **Izoniazidă** și
Rifampicină)

XDR-TB – tuberculoza cu rezistență extinsă
(tulpini rezistente la **chimioterapice de
linia a 2**)

OMS – 500.000 de cazuri noi de TB MDR pe an
79% din cazurile tuberculozei rezistente sunt
cauzate de tulpini XDR.

În RM prevalența MDR-TB printre cazurile noi
a constituit în 2006 19,4%, 2015 - 26%,
2017 – 28%, 2018 – 29%

Rata de acoperire cu tratament:

2013 – 80,8%, 2014 – 82,6%, 2017 – 83%,
2018 – 87%



The use of
delamanid in
the treatment of
multidrug-resistant
tuberculosis in
**children and
adolescents**
Interim policy guidance



Strategia OMS



- The WHO *End TB Strategy*, adopted by the World Health Assembly in May 2014, is a blueprint for countries to end the TB epidemic by driving down TB deaths, incidence and eliminating catastrophic costs. It outlines global impact targets to reduce TB deaths by 90%, to cut new cases by 80% between 2015 and 2030, and to ensure that no family is burdened with catastrophic costs due to TB.
- Ending the TB epidemic by 2030 is among the health targets of the newly adopted Sustainable Development Goals. WHO has gone one step further and set a 2035 target of 95% reduction in deaths and a 90% decline in TB incidence – similar to current levels in low TB incidence countries today.

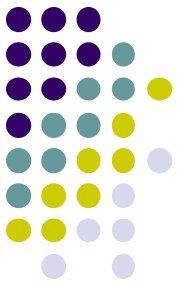
Profilaxia specifică



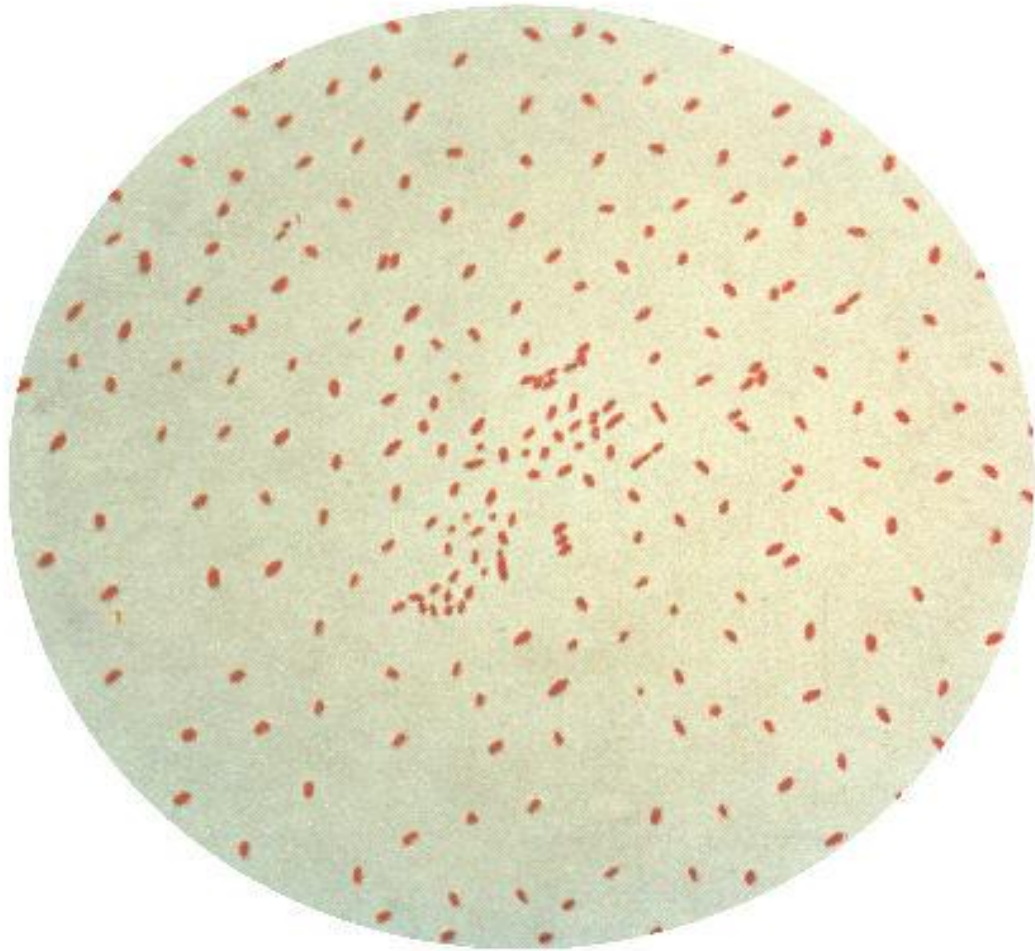
Vaccinarea obligatorie cu vaccinul BCG. El reprezintă o tulpină vie avirulentă de *M.bovis*. A fost obținută de Calmette și Guerin în 1921 după multiple repicări (230 pasaje) pe mediu cu cartof, bilă și glicerină.

Vaccinul se administrează i/dermic la vârsta de 2-5 zile de la naștere.

MICROBIOLOGIA ȘI DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL TUSEI CONVULSIVE



- **Familia** Halobacteriaceae
- **Genul** Bordetella
- **Specii:**
 1. *Bordetella pertussis* (agentul tusei convulsive)
 2. *Bordetella parapertussis* (agentul parapertusei)
 3. *Bordetella bronhiseptica* (pneumonii, bacteriemii)
 4. *Bordetella avium*
 5. *Bordetella holmensisii* (izolată din hemoculturi)
 6. *Bordetella hinzii* (izolată din prelevate respiratorii)
 7. *Bordetella trematum* (infecții cutanate și auriculare)





B.pertussis – agentul cauzal al tusei convulsive

- **Caractere morfobiologice**

Cocobacterii G-, asporogene, imobile, formează microcapsulă, în frotiu se dispun separat, în perechi sau lanțuri scurte.

Reprezintă mi/o strict aerobe, foarte pretențioase la cultivare.

Medii speciale de izolare:

- mediul Bordet-Gengou (geloză-sânge cu amidon și glicerină)

 geloză-cazeină-sânge-cărbune activat

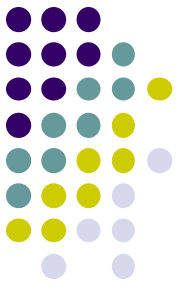
Mediul de transport Kuznețov (soluție tampon fosfat, 0,5% agar-agar, 0,2% cărbune activat)






- Peste 3-5 zile de incubare în atmosferă umedă la 37° C apar colonii S mici, bombate, lucioase, cu aspect de picături de mercur, hemolitice (corespund bacteriilor virulente – faza I), forme R – avirulente, faza IV.
 - Coloniile de *B.parapertussis* apar în 48 ore, *B.bronchiseptica* – în 24 ore
- B.pertussis* manifestă activitate biochimică redusă: oxidaza+, nu fermentează glucidele, ureaza-, nitrat-reductaza- .



- **Structura antigenică a *B.pertussis* este complexă: există Ag capsulare polizaharidice, Ag proteice, Ag fimbrial (hemaglutinina), Ag lipopolizaharidic.**
- **Factorii de patogenitate**
 1. **Adezine:**
 - **Hemaglutinina filamentoasă** (purtată de pili). Permite atașarea bacteriei la celulele epiteliale ciliate ale tractului respirator, de asemenea se fixează pe macrofage și limfocite.



-  **Aglutinogene.** Proteine de suprafață situate pe fimbrii. Participă la atașarea *B.pertussis* la celulele epiteliale.
-  **Pertactina.** Proteină a membranei externe, permite fixarea pe membrana celulelor eucariote
-  **Subunitatea B a toxinei pertusice.** determină adeziunea bacteriei la epiteliul traheal și celule fagocitare.



2. Toxine






Toxina pertussis (citotoxină de tip A-B). Poate fi fixată pe suprafața bacteriei sau secretată în spațiul extracelular. Acționează asupra diferitor celule eucariote, mărinđ concentrația intracelulară de AMP ciclic (fragmentul A este o ADP ribosil transferază). Provoacă hiperlimfocitoză, sensibilizare la histamină, hipersecreție de insulină, perturbarea activității fagocitelor.



Adenilat-ciclaza-hemolizină. Provoacă hemoliză, perturbă activitatea bactericidă a PMN, monocitelor și macrofagelor și stimulează secreția sero-mucoasă a căilor respiratorii.

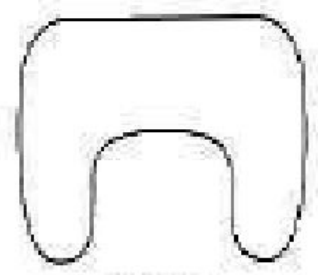
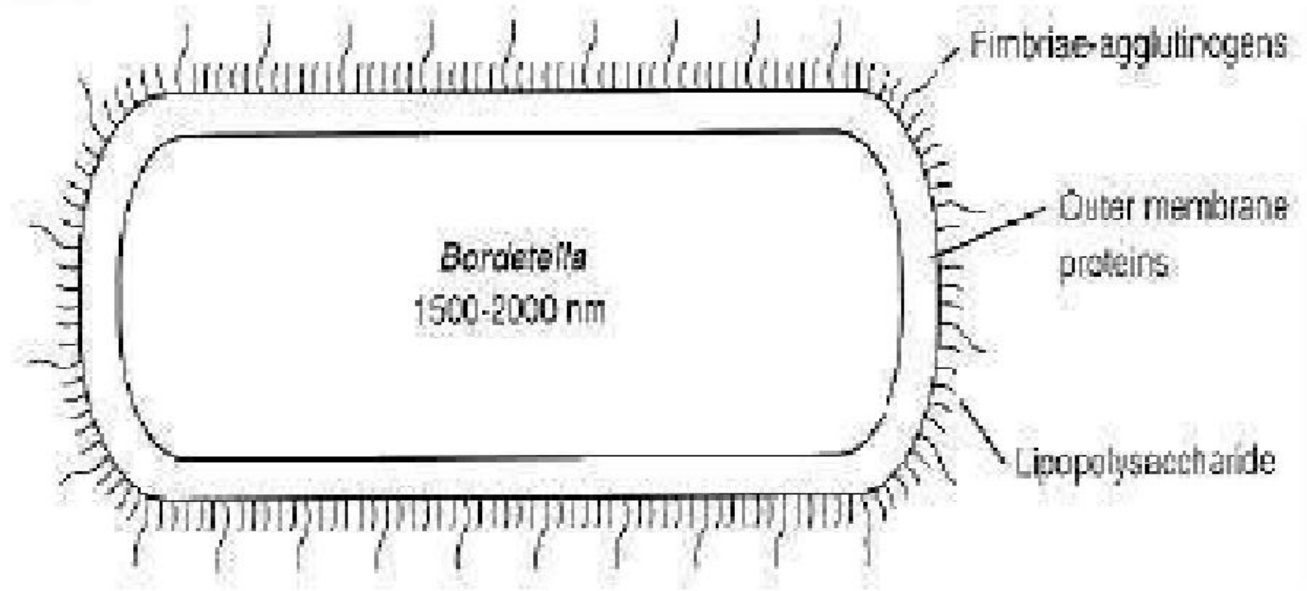


-  **Toxina dermonecrotică.** Se eliberează în urma lizei bacteriene. Determină inflamație și necroză locală.
-  **Toxina citotraheală.** Glicopeptid (fragmente de peptidoglican) care inhibă sinteza ADN, provocând distrugerea celulelor epiteliale ciliate. Stimulează eliminarea IL-1, cauzând febră.
-  **Endotoxina**

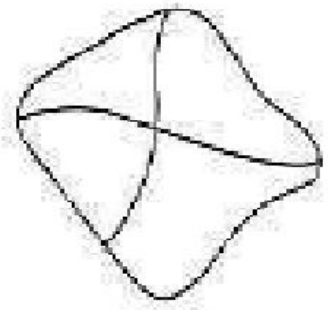
Patogeneza tusei convulsive

Sursa de infecție – omul bolnav, în special în perioada de debut al bolii.

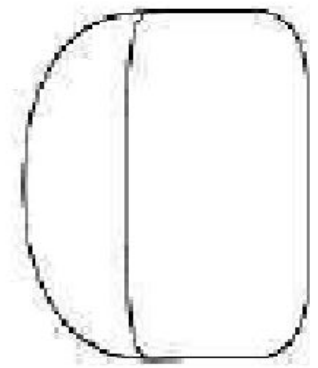
Mecanismul de transmitere – aerogen, prin picături



120 kD
Pertussis toxin



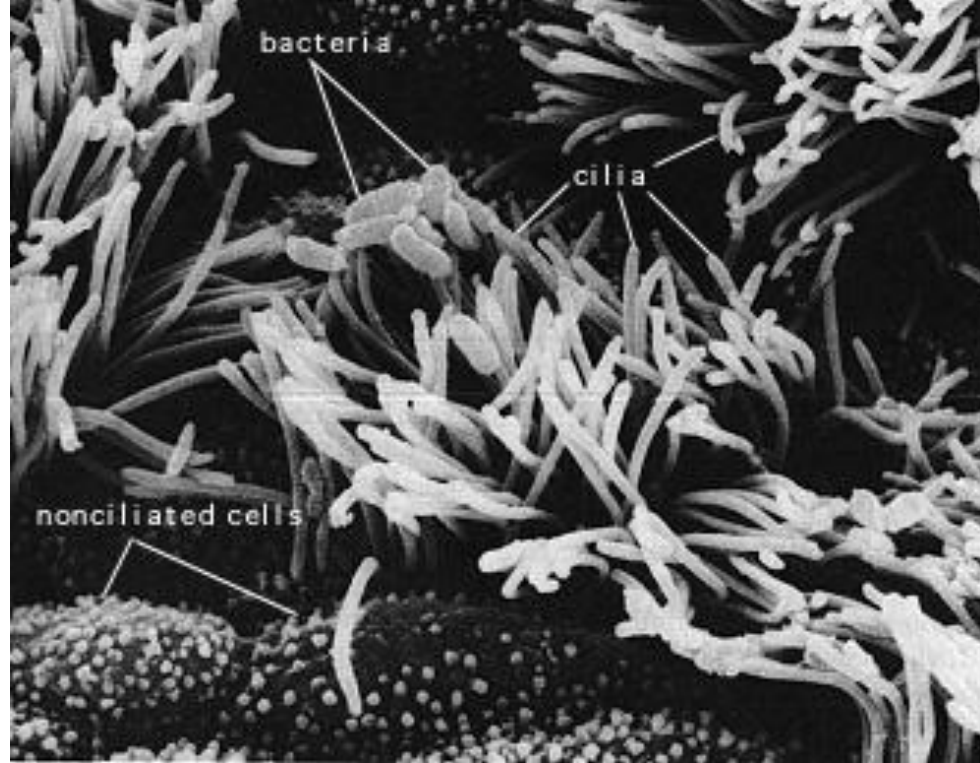
100 kD
Heat-labile toxin



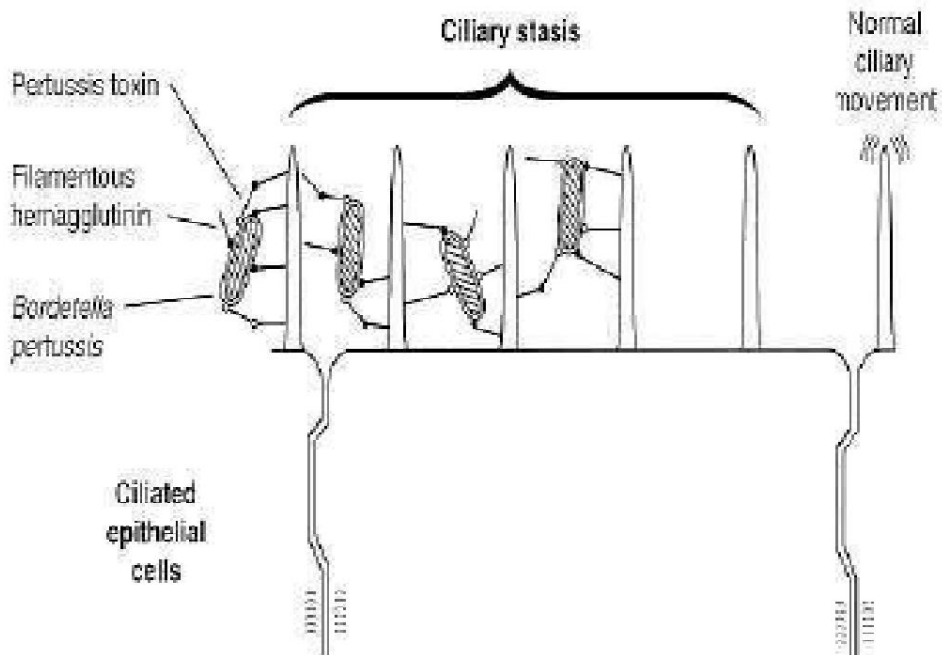
200 kD
Adenylate cyclase toxin



B.pertussis manifestă tropism pentru mucoasa căilor respiratorii: faringe, trahee, bronșii, bronhiole, chiar alveole. Alterarea epiteliului ciliat împiedică eliminarea mucusului, el fiind eliminat doar prin tuse. Tusea survine din cauza iritației mucoasei de către toxina bacteriană. Excitația de lungă durată a receptorilor terminali ai nervului pneumogastric determină un flux continuu de impulsuri în bulbul rahidian, ce duce la formarea unui focar de excitație dominant. El atrage excitații nespecifice de la alți receptori, fapt ce determină accesele de tuse, care devin tot mai grave și mai frecvente.



Respiratory Tract Lumen





Un stimul puternic poate stinge dominanta, cu atenuarea tusei. Focarul este foarte stabil, persistă și după dispariția bacteriei din organism.

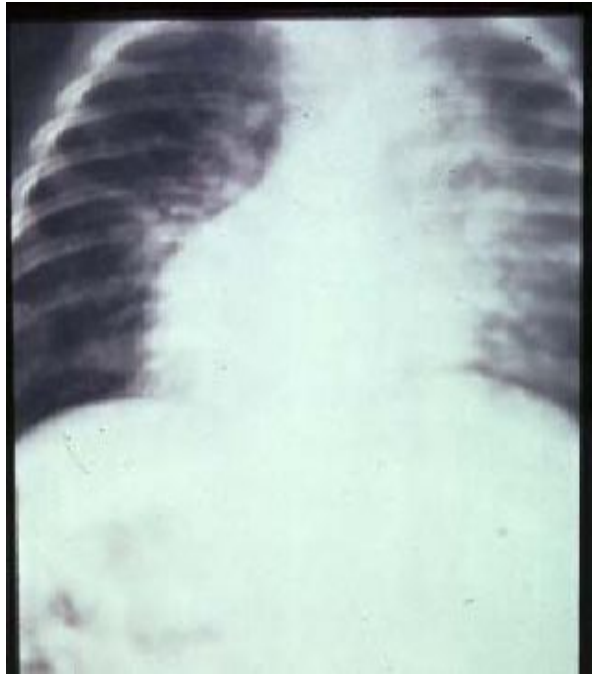
- În evoluția tusei convulsive se disting 4 stadii (perioade):

I. **Perioada de incubație** (3-15 zile)

II. **Perioada catarală**, foarte contagioasă. Caracterizată prin tuse seacă, rinoree (3-14 zile)

III. **Perioada convulsivă** (paroxistică). Accese de tuse spasmodică, epuizantă, asociată cu cianoză, vomă, convulsii. (2-4 săptămâni)

IV. **Perioada de convalescență** (2-4 săptămâni)





Complicații grave sunt posibile la copiii sugari: bronho-pneumonii, encefalite.

Imunitatea este durabilă, umorală și celulară. Rol protector au Ac anti-toxină pertussis și anti-hemaglutinină filamentoasă.

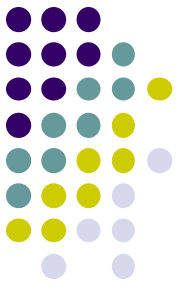
Diagnosticul de laborator al tusei convulsive



Prelevate: mucozități nasofaringiene sau bronșice, recoltate cât mai precoce.

Metode de diagnostic

1. RIF
2. Examenul bacteriologic (însămânțare cu tamponul sau prin tehnică “plăcilor tușite”)
3. Tehnnici de biologie moleculară (PCR)
4. Examenul serologic (RA, ELISA). Reacțiile se pozitivează din săptămâna a II a perioadei convulsive. Se examinează seruri perechi prelevate la interval de 14-21 zile. Semnificativă este o creștere de cel puțin 4 ori a titrului Ac.



Tratamentul tusei convulsive

Eritromicină sau cloramfenicol– cel puțin 10 zile (până la apariția Ac)

Imunoglobulină umană antipertussis

Profilaxia specifică

 Imunizarea artificială obligatorie:

1. Vaccinul ADTP. Componentul antipertusic este reprezentat de o suspensie de bordetele de faza I, adsorbite pe adjuvant.
 2. Vaccinul acelular conține unele componente bacteriene (anatoxina pertussis, hemaglutinina filamentoasă). Este mai bine tolerat, dar mai puțin eficace.
 3. Vaccinul multicomponent acelular conține anatoxina pertussis, hemaglutinina filamentoasă, pertactina și 2 tipuri de fimbrii
- Imunoglobulină umană antipertussis