

Cap. V. CULTIVAREA BACTERIILOR

1. MEDIILE DE CULTURĂ

Pentru identificarea unei specii bacteriene, examenul microscopic direct al produsului patologic recoltat de la bolnav este de cele mai multe ori insuficient. Precizarea cauzei care a produs boala necesită cultivarea agentului patogen pe un complex de substanțe nutritive adecvate care alcătuiesc *mediile de cultură*.

Aceste medii de cultură, pentru a fi corespunzătoare, trebuie să îndeplinească câteva condiții: să conțină *substanțe plastice și energetice* necesare cultivării microbului însământat, adică să asigure surse de azot, de hidrați de carbon, de săruri minerale, de apă, de vitamine și factori de creștere necesari dezvoltării și reproducerii celulelor bacteriene, să *satisfacă cerințele de aerobioză sau anaerobioză* ale agentului ținând cont de faptul că, în timp ce bacteriile aerobe pot folosi oxigenul molecular, cele anaerobe nu se pot dezvolta în prezența oxigenului liber, să aibă o *concentrație de ioni de hidrogen (pH)* optimă și să *fie sterile*, pentru a permite izolarea în cultură pură a germeului respectiv.

Pe măsura cunoașterii tot mai aprofundate a exigențelor unei bacterii s-a ajuns la realizarea unor medii de cultură cu o compoziție adecvată și precisă. În unele cazuri s-a ajuns chiar la situația optimă de preparare a unor medii sintetice-standardizate, nemai fiind necesare ingrediente de origine animală sau vegetală a căror compoziție poate varia foarte mult.

În general, mediile de cultură se pot prezenta sub formă *lichidă* (bulion, apă peptonată etc.) sau *solidă* (medii în care se încorporează agar).

În funcție de scopul urmărit, mediile de cultură pot fi grupate astfel:

- *medii de izolare*, care permit izolarea bacteriei dintr-un produs patologic;
 - *medii de transport*, care permit supraviețuirea anumitor bacterii ce nu pot fi însământate imediat după recoltare (de exemplu, mediul Stuart pentru Neisserii, Carry-Blair pentru vibriionul holeric etc.);
 - *medii de îmbogățire*, destinate cultivării unor bacterii cu necesități nutritive particulare și care sunt stimulate să crească în mod special, deoarece numărul lor este redus în produsul patologic în momentul recoltării (de exemplu, bulion cu selenit și mediul Müller-Kauffmann pentru salmonelle);
 - *medii selective*, care conțin elemente ce permit creșterea numai a anumitor bacterii dintr-un produs (de exemplu, mediul Wilson-Blair pentru bacilul tific);
 - *medii diferențiale*, care conțin substanțe ce pun în evidență unele proprietăți biochimice ale bacteriilor studiate. La rândul lor, mediile diferențiale pot fi *simple* (de exemplu, mediul AABTL care pune în evidență fermentarea lactozei) sau *politrope* (de exemplu, mediul TSI care pune în evidență mai multe caractere biochimice).
- În tehnica preparării unui mediu nutritiv trebuie să se aibă în vedere următoarele:

- spălarea și pregătirea corespunzătoare a recipientelor în care se vor prelucra și repartiza mediile;

- trebuie ca mediile să fie clare, pentru a se putea urmări aspectul culturii în mediile lichide (modul de tulburare a bulionului) sau morfologia coloniilor pe mediile solide; clarificarea se obține printr-o filtrare corectă;

- substanțele organice care intră în compoziția mediului trebuie să aibă calitate nutritive optime și să nu fie degradate prin tratament chimic sau termic excesiv. Altfel, substratul respectiv devine necorespunzător.

La baza mediilor de cultură de origine animală, *maceratul de carne* este componentul principal. Carne folosită la prepararea acestuia trebuie să provină de la vite sănătoase. Maceratul de carne se prepară astfel:

- carnea proaspătă de vită sau de cal se curăță de tendoane, aponevroze și de grăsimi și se trece prin mașina de tocat. La 1 000 g tocătură se adaugă 2 000 ml apă de robinet și se ține 24 ore la rece (vara la frigider), după care se fierbe 30 min., amestecând cu o lopățică de lemn. Se filtrează apoi prin tifon. Se completează cu apă distilată la volumul inițial.

Maceratul nu se folosește ca atare, ci servește la prepararea altor medii. Dacă se folosește imediat, nu se sterilizează. Dacă se păstrează în depozit, atunci se sterilizează 30 min. la 120°C.

Bulionul simplu se prepară astfel: la 1 000 ml macerat se adaugă 10 g peptonă, 5 g sare și se încălzește până la fierbere. Se ajustează pH-ul la 8, folosind o soluție de hidroxid de sodiu 10%, după care se sterilizează 30 min. la 120°C pentru precipitarea sărurilor alcalinoteroase. Pentru îndepărtarea precipitatului, mediul se filtrează la cald prin hârtie de filtru și se repartizează bulionul obținut în recipiente adecvate întrebunătări (eprubete sau flacoane) și se sterilizează din nou 30 min., dar la 115°C, pentru a nu precipita alte săruri din soluție.

La fiecare sterilizare, pH-ul mediului scade cu valori de 0,2.

Maceratul de carne poate fi utilizat și la prepararea *gelozei simple*. Geloza sau agarul se extrage dintr-o algă, este lipsită de substanțe nutritive și servește numai la solidificarea mediului. Rămâne solid la 37°C, permițând obținerea de colonii microbiene izolate. Se topește la 80°C, rămâne în stare lichidă până la 45°C și se solidifică la 40°C.

La 1 000 ml macerat de carne se adaugă 10 g peptonă, 5 g sare, se dizolvă la cald și se adaugă apoi 20 g geloză spălată. Pentru spălare, geloză fibre împăturită într-un tifon este lăsată câteva ore în apă rece curgătoare. Bulionul cu agar se ține pe foc la fierbere, agitându-se până la completa topire a agarului. Se completează la volumul inițial cu apă distilată, se ajustează pH-ul la 8, se sterilizează 30 min. la 120°C, după care se filtrează la cald prin hârtie de filtru. Se repartizează în recipiente adecvate și în eprubete și se sterilizează din nou 30 min. la 115°C. După sterilizare, geloză din eprubete poate fi solidificată în poziție verticală sau prin înclinare.

Bulionul simplu și geloză nutritivă simplă se utilizează ca mediu de bază pentru prepararea unor medii mai complexe sau ca atare pentru cultivarea germeilor care nu au cerințe nutritive deosebite.

Apa peptonată simplă. Se prepară prin dizolvare la cald a 10 g peptonă și 5 g CINA în 1 000 ml apă distilată. Se ajustează pH-ul la 7,6 cu soluție 10% de NaOH după care se autoclavează la 120°C timp de 30 min. pentru precipitare. Se filtrează prin hârtie de filtru, se repartizează în tuburi sau baloane, după necesități și se sterilizează la 115°C timp de 20 min. - pH final 7,2-7,4.

Apa peptonată se utilizează fie ca mediu de bază pentru testele de fermentare ale zaharurilor și alcoolilor, fie pentru testele de producere de indol sau H₂S.

Geloza sânge. Se prepară din geloză nutritivă 2% lichefiată și răcită la 45°C. La 9 ml geloză se adaugă 0,5-3 ml sânge defibrinat. Se utilizează pentru cultivarea unor germeni mai pretențioși (streptococ) sau pentru punerea în evidență a capacității de hemoliză a unora dintre aceștia (streptococ, stafilococ).

Mediul Veillon. Se prepară dintr-o geloză nutritivă 2% la care se adaugă glucoză în proporție de 1%. Se repartizează în tuburi, se sterilizează 30 min. la 110°C și se solidifică în poziție verticală - pH final 7,6. Este mediul cel mai simplu utilizat pentru izolarea germeilor anaerobi. Se însămânțează produsul patologic în profunzimea mediului lichefiat prin încălzire urmată de resolidificare prin răcire.

Mediul Sabouraud solid se prepară din 1 000 ml apă de robinet, 10 g peptonă, 20 g glucoză și 20 g agar fibre. Se dizolvă peptona în 250 ml apă la fierbere, se autoclavează 30 min. la 120°C și se filtrează. În alți 250 ml apă se dizolvă glucoza și se filtrează. Se amestecă cele două soluții filtrate, se completează cu apă până la 1 000 ml și se adaugă agarul spălat. Se fierbe până la topirea agarului, se filtrează prin tifon, se repartizează după necesități și se sterilizează la 110°C timp de 30 min. - pH final 5,8-6,2. Un mediu similar *lichid* se poate prepara din aceleași ingrediente minus agarul. Aceste medii se utilizează pentru izolarea și cultivare ciupercilor microscopice.

Stabilirea și corectarea pH-ului mediilor de cultură este de o importanță deosebită pentru cultivarea microorganismelor. Este cunoscut faptul că prin autoclavare pH-ul mediului scade. Pentru acest motiv sunt necesare operațiunile de control și corectare a pH-ului. Determinarea pH-ului se poate face prin metoda electrometrică cu ajutorul unui pHmetru, care este foarte precisă, dar când nu dispunem de aparatul necesar se poate utiliza metoda colorimetrică. Aceasta din urmă se bazează pe proprietatea unor substanțe numite indicatori, de a-și modifica culoarea sau nuanța în funcție de gradul de aciditate sau alcalinitate al soluției în care sunt dizolvate. Principiul metodei constă în compararea culorii soluției de cercetat în care s-a introdus un indicator, cu o serie de etaloane colorate.

Practic, aparatul este compus dintr-un comparator Walpole (stativ cu locuri pentru eprubete și orificii de observare prevăzute cu geam mat) și o scară de etaloane numită scara Michaelis. Etaloanele sunt tuburi de sticlă care conțin soluții indicator. În tuburile 1, 2 și 3 ale comparatorului Walpole se introduc tuburi de aceeași grosime cu tuburile etalon din Scara Michaelis. În tuburile 1 și 2 ale comparatorului se pun câte

2 ml mediu. În tubul 1 se mai pun 4 ml apă distilată și 1 ml metanitrofenol 0,3% iar în tubul 2 se adaugă numai 5 ml apă distilată. În tubul 3 se pun 7 ml apă distilată iar în tubul 4 se pune un tub etalon din Scara Michaelis. Privind apoi prin cele două orificii în locul 4 se pune un tub etalon cu aceea a etalonului. Dacă nu se potrivește, se schimbă tubul etalon cu altul până când prin tuburile 1 și 3 vedem aceeași culoare ca și prin tuburile 2 și 4. Mediul cercetat are pH-ul care este scris pe tubul etalon respectiv.

În scop orientativ se poate utiliza metoda rapidă a hârtiei indicator care, umețată cu soluția de cercetat își modifică culoarea, după care este comparată cu o scară etalon colorată.

După verificarea pH-ului mediului de cultură, dacă este necesar se ajustează cu o soluție de NaOH sau HCl până la obținerea unui pH corespunzător.

2. ÎNSĂMÂNȚAREA MEDIILOR DE CULTURĂ

Scopul principal al oricărui examen microbiologic este acela de a identifica agentul etiologic al unei afecțiuni, pentru a se putea lua măsurile cele mai potrivite pentru tratarea și vindecarea bolnavului. Pentru aceasta este însă necesar ca, mai întâi, din produsele patologice recoltate în mod corect, să se obțină microbul în cultură pură. Multiplicarea și izolarea germinilor respectivi este posibilă prin însămânțare pe medii de cultură adecvate, sau în special pentru virusuri, dar și pentru unele bacterii, prin inoculare în țesuturi vii (culturi de celule, ouă embrionate, animale de laborator susceptibile).

Însămânțarea sau inocularea prelevatelor aduse în laborator se face în mod adecvat și cu luarea unor măsuri speciale fie pentru evitarea contaminării personalului care efectuează operațiunea respectivă și care, mai ales în această fază de lucru când nu se cunoaște agentul patogen, trebuie să respecte cu strictețe normele de protecția muncii, dar mai ales pentru împiedicarea contaminării produsului patologic cu agenți microbieni din exterior care nu au nici o legătură cu boala și care pot falsifica rezultatele.

Însămânțarea produselor patologice se execută în camere de laborator (boxe) cu materiale sterile (medii, plăci, tuburi, anse, pipete Pasteur sau gradate, tamponane etc.) în spațiile sterile din jurul flăcării becului de gaz, și cu recipiente cu substanțe dezinfectante (ex. amestec sulfo-cromic) și găleți de infecte la îndemână. În situații speciale când se bănuiește prezența în produsul patologic a unor agenți microbieni deosebit de periculoși (HIV, virus rabic etc.) nu trebuie să lipsească masca, mănușile și ochelarii de protecție, iar manipularea produsului în cursul însămânțării sau inoculării se va face cu o grijă deosebită pentru a se evita accidentele care în aceste cazuri sunt de regulă fatale.

În general, însămânțarea se face fie cu ansa bacteriologică ce se sterilizează în flăcără în timpul lucrului, fie cu pipete Pasteur sau gradate ori cu tampon de vată montat pe o tijă, toate în prealabil sterilizate.

Tehnici curente de însămânțare a mediilor lichide sau solide

Însămânțarea în medii lichide

Tehnica însămânțării cu ansa bacteriologică. Ansa cu firul înroșit în flăcără se introduce în recipientul ce conține prelevatul, se răcește alipind-o de peretele recipientului, apoi se ia o porțiune din produs. Se scoate dopul recipientului cu mediu și se flambează gura acestuia. Materialul luat pe bucla ansei din recipientul cu mediu în mediul din recipientul deschis sub protecția flăcării. Se descarcă ansa pe peretele recipientului, agitând ușor lichidul, se flambează din nou gura recipientului și dopul cu care apoi se astupă recipientul. După însămânțare, ansa se sterilizează din nou prin încălzire la roșu.

Tehnica însămânțării cu pipeta. Dacă se lucrează cu pipeta gradată, aceasta se scoate din ambalajul steril și se introduce rapid în flăcără atât capătul cât și toată lungimea ei. Se controlează apoi răcirea ei după flambare.

Dacă se lucrează cu pipeta Pasteur, se rupe vârful efilat al pipetei, după care se flambează capătul.

Pipeta flambată și răcită se introduce în recipientul cu produsul prelevat și se aspiră de la câteva picături până la 1 sau mai mulți ml, în raport cu materialul de însămânțat și cantitatea de mediu de cultură. Pipeta trebuie manipulată cu grijă pentru a nu uda dopul de vată. Materialul aspirat în pipetă se însămânțează într-un recipient cu mediu nutritiv cu aceleași precauțiuni de flambare a gâtului recipientelor și a dopurilor respective.

Pipeta folosită se pune într-un pahar cu amestec sulfo-cromic, aspirându-se din amestec până la aproximativ 1 cm sub dop.

Tamponanele care au servit la recoltarea produselor patologice vor fi descărcate direct în mediu, după care vor fi reintroduse în tub și puse în găleata de infecte.

Însămânțări pe medii solide

Tehnica însămânțării în suprafață. Însămânțarea pe suprafața mediilor solide se poate face cu ansa, cu bagheta de sticlă îndoită în formă de L, cu tampoane, cu pipete etc. În cursul însămânțării se iau aceleași precauțiuni pentru păstrarea sterilității ca și la operațiunile de însămânțare în medii lichide.

Când se însămânțează medii care au fost solidificate în tuburi, în poziție înclinată, se execută pe suprafața mediului mișcări în zig-zag, de la bază către exterior, cu precauția de a nu zgăria suprafața mediului.

În cazul mediilor solidificate în coloană dreaptă, însămânțarea se face prin înțepare în profunzime.

În plăci Petri, în care s-a turnat un strat de mediu gelozat, însămânțarea se poate face cu ansa, cu bagheta de sticlă sau cu tamponul de recoltare. Placa se ține în apropierea flăcării iar operațiunea de însămânțare trebuie executată rapid pentru a se evita pătrunderea altor microorganisme din exterior.

Tehnica însămânțării prin incorporare. Se lichiefiază mediul prin încălzire la +80°C, se răcește la +50°C și se introduce produsul de însămânțat cu o pipetă sterilă. Se omogenizează prin ușoară rotire a recipientului. Mediul astfel însămânțat se toarnă, după caz, în plăci Petri sterile, sau se lasă ca atare în recipientul în care s-a făcut însămânțarea.

Tehnici de însămânțare cu izolarea agentului microbial în cultură pură

Acestea urmăresc obținerea dintr-un produs bacterian, în general cu conținut polimicrobial, a agentului etiologic, izolat în cultură pură. Debarasarea de celelalte specii microbiene de balast care alcătuiesc flora de asociație se realizează prin diferite metode care pot acționa fie direct asupra florei de asociație, inhibând-o în dezvoltarea ei, fie indirect, acționând asupra germeului pe care dorim să-l izolăm, favorizându-l acestuia, în mod cu totul preferențial, dezvoltarea.

Tehnicile de izolare în cultură pură pot fi generale sau speciale.

Tehnicile generale mai frecvent utilizate sunt de diluții succesive în medii lichide sau de epuizare pe medii solide.

Tehnica diluțiilor succesive în medii lichide. În acest scop se utilizează un șir de eprubete cu aceeași cantitate de mediu lichid. Se introduce, cu o pipetă, o picătură din amestecul de germeni în primul tub. Se agită conținutul eprubetei. Apoi, schimbându-se pentru fiecare eprubetă pipetele, se trece succesiv dintr-o eprubetă în cealaltă câte o picătură.

Această tehnică se completează cu efectuarea de treceri pe medii solide: din fiecare tub însămânțat se trece, de fiecare dată cu o altă pipetă, câte o picătură, pe câte un tub sau o placă cu geloză.

Această tehnică a diluțiilor succesive se poate face și în lichidul de condensare al mediilor solide, urmând aceeași metodologie.

Tehnica epuizării ansei pe medii solide se realizează prin însămânțări cu ansa bacteriologică, încărcată o singură dată cu amestecul de germeni, într-un șir de eprubete cu geloză înclimată, fără a steriliza sau a reîncărca ansa bacteriologică pe parcurs. Astfel se epuizează conținutul ansei și, în final, se ajunge să se însămânțeze numai câteva celule microbiene într-un tub care prin incubare la termostat vor da naștere la colonii microbiene izolate. O astfel de colonie izolată trecută (replicată) pe un alt tub cu mediu, după incubare dă naștere la o cultură pură.

Tehnica diseminării (dispersiei) cu ansa pe medii solide. Cu ansa bacteriologică încărcată cu produsul patologic se descriu pe suprafața unui mediu solid, turnat într-o placă Petri, niște striuri paralele. După descrierea fiecărui grup de strițiuni paralele, ansa bacteriologică va fi sterilizată prin încălzire la incandescență și nu va fi încărcată cu inoculul amestec decât o singură dată la început. În momentul intersectării cu striurile precedente, ansa este reîncărcată cu o cantitate de inocul, dar o cantitate din ce în ce mai mică, până ce se va ajunge la câteva celule microbiene izolate ce vor fi diseminate pe placă și vor da naștere la colonii microbiene izolate.

Tehnici speciale de izolare. Sunt utilizate când urmăm izolarea anumitor specii bacteriene dintr-un produs polimicrobial. Ele se realizează cu diverse mijloace fizice, chimice sau biologice. Dintre mijloacele fizice, de izolare, menționăm încălzirea o oră la 80°C a amestecului de germeni, care se practică pentru a izola germeii sporulați de formele vegetative de microbi. De asemenea, filtrarea printr-un filtru bacteriologic permite izolarea unui virus ce străbate porii filtrului, dintr-un amestec cu bacterii ce sunt reținute de acesta.

Ca metode chimice menționăm: *mediile de cultură selective* care conțin un agent inhibitor pentru flora de asociație (mediul Löwenstein care conține verde malachit inhibă flora de asociație și permite izolarea b.Koch); *mediile electice* care conțin un substrat nutritiv ce, convenind preferențial speciei pe care dorim s-o izolăm, permite dezvoltarea sa mai rapidă (mediul Löffler electiv pentru bacilul difteric) și *mediile diferențiale* care permit relevarea unor caractere enzimatic proprii germeilor vizati de a fi izolați din amestec (mediul Istrati-Meitert utilizat în izolarea dintr-o coprocultură a unor enterobacterii lactozo pozitive sau negative).

Ca metode biologice de izolare menționăm *metoda de însămânțare pe medii cu agenți biologici selectivi*, deci utilizarea de medii selective pe bază de antibiotice (mediul selectiv LCN pentru izolarea meningococului care conține Lincomicină, Colimicină și Nistatin), și *utilizarea unor animale de laborator* pentru izolarea unor specii bacteriene dintr-un amestec – de exemplu, inocularea subcutanată a șoarecelui alb cu o spută în care se găsește un pneumococ. După 1-4 zile de la inoculare, șoarecele face o infecție septicemică letală cu pneumococ, putându-se izola în cultură pură acest germen din sânge. Un alt exemplu îl constituie inocularea subcutanată la un cobai a unui produs patologic în care se găsește b.Koch. Din viscerele acestui cobai după un interval variabil de timp, 1-6 luni, se va putea izola, în cultură pură bacilul Koch.

Metoda izolării unui singur microb prin *micromanipulare* se poate realiza cu ajutorul unui micromanipulator, a unei aparaturi speciale și a unor microinstrumente (pipete, anse, pense, seringi etc.) dar metoda nu este de uz curent ea fiind utilizată exclusiv în scop de cercetare.

Cap. VI. STERILIZAREA ȘI DEZINFECȚIA

I. STERILIZAREA

Este procedeul prin care se obține distrugerea tuturor microorganismelor saprofite sau patogene, fie că sunt în stare vegetativă fie că sunt sporulate.

Principali agenți fizici utilizați pentru realizarea sterilizării sunt: căldura, filtrarea, centrifugarea, radiațiile ultraviolete și, mai rar, ultrasunetele.

I.1. STERILIZAREA PRIN CĂLDURĂ

Căldura folosită pentru sterilizare poate fi uscată sau umedă.

Sterilizarea prin căldură uscată

Încălzirea la roșu este folosită mai ales pentru sterilizarea ansei înainte și după întrebuințare și constă din încălzirea firului de platină, până capătă culoarea roșie, la flacăra unui bec de gaz sau la flacăra unei lămpi cu alcool.

Flambarea constă din trecerea rapidă prin flacăra a unui obiect (pipetă, gățul flacoanelor sau al eprubetelor, al baghetelor, lame, spatule etc.), în scopul de a distruge microorganismele existente pe suprafața acestora.

Sterilizarea în cuptorul cu aer cald (pupinel). Acest procedeu se utilizează, în special, pentru sterilizarea sticlăriei de laborator (eprubete, pahare, cutii Petri, pipete, baloane de sticlă, seringi Luer etc.), a cutiilor cu instrumente metalice, tampoane de vată pentru recoltarea exsudatului faringian etc.

Materialele pregătite pentru sterilizare, puse în coșurile metalice, sunt depuse pe rafturile cuptorului, fără a fi sprijinite de pereții acestuia. Se închide ușa aparatului, se aprinde sursa de căldură și se urmărește cu atenție termometrul pentru atingerea temperaturii de 180°C și menținerea ei la acest nivel timp de o oră. După acest timp se întrerupe sistemul de încălzire și se așteaptă scăderea temperaturii din cuptor fără a deschide ușa, deoarece răcirea bruscă poate provoca spargerea sticlăriei. Materialele astfel sterilizate se depozitează în sertare și dulapuri până la utilizarea lor.

Sterilizarea prin căldură umedă

Sterilizarea prin căldură umedă se face prin mai multe procedee: fierbere, vapori de apă sub presiune, vapori de apă la 100°C, pasteurizare, tindalizare.

Fierberea în apă este utilizată mai ales pentru sterilizarea seringilor, a instrumentelor metalice și a tuburilor de cauciuc. Pentru aceasta se folosește un fierbător metalic. Obiectele supuse sterilizării se introduc în apă distilată, care este încălzită electric sau cu flacăra până la punctul de fierbere și menținută astfel timp de 30 min.

Fierberea distruge formele vegetative ale bacteriilor, virusurile și unii spori (tetanos, cărbune etc.).

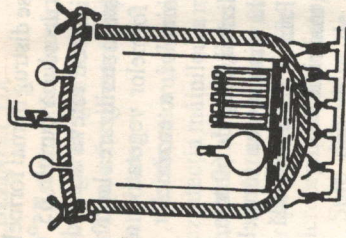


Fig. 11. Secțiune prin autoclav.

Sterilizarea cu vapori de apă sub presiune se realizează în autoclavă. Cu ajutorul acestui procedeu se poate realiza o sterilizare completă prin distrugerea tuturor microorganismelor și a sporilor, cu condiția să se ridice temperatura la 120°C, timp de o jumătate de oră.

Autoclava funcționează astfel: se pune apă în cazanul aparatului până aproape de suportul pe care se așază coșulețele cu materiale, se introduc în cazan materialele de sterilizat (baloane cu medii de cultură, apă distilată, soluție salină fiziologică, dopuri și tuburi de cauciuc, pâlnii, aparate de sângerat, filtre, casolete, găleți cu materiale infecte etc.) și se acoperă cu o coală de hârtie pentru a se evita umezirea lor cu apă rezultată din condensarea vaporilor. Se închide capacul și se fixează buloanele, două câte două, în diagonală, se deschide robinetul de vapori și se aprind becurile de gaz și, când vaporii ies în jet continuu, se închide robinetul de vapori. Din acest moment, manometrul începe să înregistreze ridicarea presiunii și, prin urmare, și creșterea temperaturii (la 1/2 at corespunde o temperatură de 115°C, la 1 at corespund 120°C, iar la 2 at, 134°C). Când s-a atins presiunea corespunzătoare temperaturii dorite se reglează flacăra, pentru a se asigura menținerea acestei temperaturi un anumit timp (de exemplu, 20-30 min. la 120°C).

După terminarea sterilizării se sting becurile de gaz și se așteaptă până ce acul manometrului revine la 0. Se deschide apoi robinetul de vapori și se desfac buloanele, pentru a se putea deschide capacul și a scoate materialele din interior. Dacă nu se respectă aceste reguli, se pot întâmpla accidente. Decompresivitatea bruscă provoacă aruncarea dopurilor și proiectarea lichidelor din recipient.

Controlul funcționării corecte a autoclavei se poate efectua în mai multe moduri. Temperatura din interior se poate controla cu un termometru special sau cu substanțe chimice sub formă de pulbere cu punct de topire cunoscut (benzonaftolul se topește la 110°C, sulful la 115°C, acidul benzoic la 121°C).

În aceste pulberi se pot incorpora urme de violet de gențiană, care colorează vizibil substanța topită. Testele chimice au dezavantajul că nu indică decât atingerea unei anumite temperaturi, fără a arăta durata acesteia. Pentru acest motiv s-a recurs la testele biologice, care constau din introducerea în autoclavă a unor culturi sporulate, rezistente la temperaturi înalte. Sterilizarea este eficientă dacă sporii sunt omorâți prin autoclavare; ei nu se mai dezvoltă dacă sunt însămânțați într-un mediu de cultură adecvat.

Sterilizarea cu vapori la 100°C se realizează cu ajutorul autoclavei, dar robinetul de vapori rămâne deschis tot timpul sterilizării. Prin această metodă se sterilizează produsele care nu suportă temperaturi mai mari de 100°C.

2. DEZINFECȚIA

Este un procedeu prin care se distrug microorganismele patogene, fără a fi necesară distrugerea germenilor saprofiti. În practică, totuși, tehnicile de dezinfecție, care folosesc în general substanțe chimice dezinfectante, realizează cel mai adesea o sterilizare.

În laboratorul de microbiologie sunt folosite o serie de substanțe chimice pentru dezinfecția mâinilor, a meselor, a dușumelelor, a cuștilor de animale, precum și pentru dezinfecția unor produse patologice (sputa, fecalele etc.).

Substanțele dezinfectante au o toxicitate ridicată, ceea ce contraindică aplicarea lor pe țesuturi vii. Ele se aplică numai pe substraturi inerte în scopul distrugerii microorganismelor patogene.

Spre deosebire de acestea, **antisepticele** sunt substanțe chimice cu acțiune antimicrobiană care au o toxicitate relativ redusă, fapt ce permite aplicarea locală externă a acestora pe țesuturile vii, în scopul de a împiedica producerea sau extinderea unei infecții.

Un dezinfectant bun trebuie să îndeplinească următoarele condiții:

- să acționeze asupra unui număr cât mai mare de agenți patogeni;
- să producă inactivarea ireversibilă a germeului într-un timp cât mai scurt și să acționeze cât mai independent de condițiile mediului în care se desfășoară activitatea sa;
- să fie cât mai puțin toxic pentru om și pentru animale, să nu aibă miros neplăcut și să nu degradeze țesuturile, pielea, metalele, lemnul și alte materiale supuse dezinfecțării;
- să fie cât mai stabil și să-și păstreze calitățile cât mai mult timp în condiții obișnuite;
- să fie ușor de manevrat și cât mai ieftin și să nu fie inflamabil sau explozibil.

În laboratoarele de microbiologie sunt folosite mai multe substanțe dezinfectante. *Meriolatul de sodiu* are o toxicitate redusă pentru om și pentru animale. În soluție de 1/2000 este utilizat pentru dezinfecția mâinilor, a instrumentelor contaminate, a obiectelor de piele și de cauciuc.

Formolul este soluția de aldehidă formică 40% în apă. Are o acțiune toxică puternică asupra bacteriilor – forme vegetative sau sporulate – și asupra virusurilor. Formolul poate fi utilizat atât sub formă de vapori, cât și sub formă lichidă; sub formă de aerosoli se folosește la dezinfecția camerelor. În mod obișnuit, pentru 1 m³ sunt necesari 6-10 ml formol comercial 40%. Când dezinfecția privește distrugerea unor germeni mai rezistenți, cantitatea de formol trebuie crescută. În cazul b.Koch sunt necesari 200 ml formol la 1 m³.

Vaporizarea formolului se face cu ajutorul autoclavei sau al unor aparate speciale. În prealabil, o parte formol comercial este diluată în 2-4 părți apă. Camerele supuse dezinfecției sunt închise ermetic, prin lipirea unor benzi de hârtie peste toate

Pasteurizarea este o metodă de sterilizare parțială, prin ea se distrug numai formele vegetative, deoarece utilizează temperaturi puțin ridicate și de scurtă durată: 65°C timp de 30 min, 80-90°C timp de 1-2 min. sau 91-95°C timp de câteva secunde. Scăderea temperaturii se face brusc. Acest procedeu se folosește la sterilizarea laptelui și a unor medii de cultură, când se urmărește distrugerea formelor vegetative ale germenilor patogeni, fără a provoca însă alterarea vitaminelor, a enzimelor, a proteinelor etc. din produsele sau mediile respective.

Tindalizarea constă din încălzirea produsului supus sterilizării, timp de 60 min, la 60-65°C, trei zile consecutiv. Încălzirea repetată duce la distrugerea formelor vegetative și degradarea treptată a formelor sporulate. Prin această metodă se sterilizează produsele biologice care nu suportă temperaturi mai ridicate.

1.2. STERILIZAREA PRIN FILTRARE

Este operația de trecere a unui lichid printr-o substanță poroasă care reține microorganismele. Metoda se aplică la sterilizarea serului, a ascitei, precum și a unor medii de cultură care conțin diverse lichide organice ușor alterabile sub influența căldurii. Se cunosc mai multe feluri de filtre:

Filtrele Seitz utilizează plăci de azbest (1) care se fixează într-o armătură metalică (2). Filtrelor EK₁ reține bacteriile și lasă să treacă virusurile, iar filtrelor EK₂ reține virusurile de dimensiuni mai mari.

Armătura metalică, prevăzută cu o pânză (3), se montează prin intermediul unui dop de cauciuc (4) la un balon Kitasato (5). Filtrelor astfel montat și sterilizat poate fi utilizat. Tubul lateral al balonului (6) este pus în legătură cu o pompă de vid, iar placa de azbest este umezită cu apă distilată sterilă înainte de începerea operațiunii de filtrare. Lichidul filtrat trece în balonul de sticlă, datorită vidului ce s-a creat în acesta.

Filtrele de sticlă (Schott) au diferite porozități: G1-G5. Filtrelor G5 reține bacteriile. Pentru a fi utilizate, ele se montează la baloane Kitasato. După fiecare utilizare este necesar ca filtrele de sticlă să fie fierse în apă distilată și spălate abundant, prin trecerea unei mari cantități de apă distilată prin ele.

1.3. STERILIZAREA CU RAZE ULTRAVIOLETE

Radiațiile ultraviolete sunt emise de lămpi speciale bactericide. Ele se folosesc, în general, pentru sterilizarea camerelor, a boxelor, a nișelor și a meselor de laborator. Nu este indicat să se lucreze sub lămpile aprinse. Când este totuși necesar să se lucreze astfel, se vor utiliza ochelari de protecție.

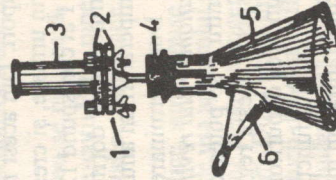


Fig.12. Filtrelor Seitz.

comunicațiile cu exteriorul. După vaporizarea formolului, camerele rămân închise cel puțin 6-8 h, după care trebuie bine aerisite.

Formolul, sub formă de soluție, este răspândit prin stropire, pulverizare cu vermorelul sau prin îmbibare. Soluția de lucru se obține amestecând o parte formol comercial (40%) cu 19 părți apă. Pentru dezinfectarea unor suprafețe de ciment, faianță, sticlă sunt necesari 30-40 ml soluție pe metru pătrat. Pentru alte materiale, cantitatea de soluție este mai mare.

Formolul este utilizat și la prepararea și conservarea unor vaccinuri și a unor produse de diagnostic microbiologic.

Alcoolul etilic (spiritul) este un dezinfectant utilizat frecvent în laborator. Alcoolul dublu rafinat (96° alcoolice) are o acțiune dezinfectantă slabă, deoarece coagulează rapid albuminele din mediu, care formează astfel un strat protector pentru bacterii. Alcoolul de 70° este mult mai eficient, deoarece acționează mai lent, dar mai profund. În laborator alcoolul este utilizat la dezinfectarea mâinilor, a unor instrumente etc. Alcoolul de 70° se obține din 1000 ml alcool 96° +400 ml apă distilată.

Alcoolul metilic este toxic pentru om și are o acțiune dezinfectantă mai slabă, motive pentru care nu este folosit în mod curent pentru dezinfecție.

Alcoolul sau spiritul sanitar este un produs numai pentru uz extern.

Glicerina (alcoolul propilic) este un lichid vâscos, care se amestecă bine cu apă; se utilizează pentru distrugerea unor bacterii. Glicerina conservă unele virusuri.

Fenolul (acidul fenic, acidul carboic cristalizat, hidroxibenzenul) în stare pură este format din cristale incoloro, care devin roșiatice în contact cu aerul, din cauza oxidării. Se păstrează în vase de culoare închisă. În concentrație de 3-5% omorâă microbii în 30-90 min.

Puterea dezinfectantă a unor substanțe chimice se exprimă în comparație cu cea a fenolului, stabilindu-se "indicele fenolic".

Crezoli (metilfenolii) se prezintă sub formă lichidă. Se solubilizează greu în apă. Au efect toxic asupra protoplasmii și putere bactericidă superioară fenolului.

Creolina este un amestec de crezoli activați cu săpun de gudron. Este un lichid de culoare brună-închis. Amestecat cu apă în proporție de 5-10% dă o emulsie cu efect bactericid apreciabil, dar cu miros neplăcut.

Amestecul sulfocromic este nelipsit de pe orice masă de laborator, fiind utilizat pentru sterilizarea pipetelor și a lamelor contaminate. Acesta se prepară astfel: se pun 100 g bicromat de potasiu la 400 ml apă distilată, care se încălzește fără a se fierbe, până la completa dizolvare a bicromatului. După răcire se adaugă 1600 ml apă distilată și, treptat, 1000 g acid sulfuric tehnic. Acest amestec se păstrează pe masa de laborator, în pahare conice de 1000 ml sau 2000 ml și în cristalizare. În momentul în care, prin utilizare, amestecul se oxidează și își schimbă culoarea sa roșie-portocalie în verde, este înlocuit cu altul proaspăt.

Sublimatul (sublimatul corosiv sau biclorura de mercur) este o sare slabă, cristalină, incoloră, solubilă în apă. Are o mare putere bactericidă. În soluții apoase 1% omorâă bacteriile în 1-10 min, în soluție 1/500 omorâă formele sporulate în 45-60

min. Nu alterează țesăturile și mobilierul, dar este toxic pentru om și pentru animale. Trebuie păstrat în sticle de culoare închisă, deoarece lumina zilei îl descompune. Activitatea sa este mult diminuată de prezența proteinelor și a grăsimilor și, de aceea, nu are o acțiune eficientă asupra sputei și a puroiului.

Poate fi utilizat pentru dezinfectarea mâinilor și a puroiului. *Lizolul* este un amestec de crezoli activați cu săpun de potasiu. Se prezintă sub formă de lichid transparent, roșu-brun, care se amestecă ușor cu apa și cu alcoolul. Se întrebuițează în concentrație de 3-5%, pentru dezinfectarea obiectelor de bumbac și în soluție de 5-10%, timp de 3-4 h, pentru dezinfectarea sputei, a puroiului, a materiilor fecale etc. Este una dintre puținele substanțe dezinfectante cu o acțiune eficientă asupra bacilului Koch. Nu atacă pielea și mucoasele, fiind utilizat și în dezinfectarea rănilor.

Varul cloros este o pulbere grunjoasă de culoare albă, cu miros puternic de clor, care se descompune ușor la aer și la lumină. Când pulberea este proaspătă și bine conservată, conține aproximativ 25% clor activ.

Varul cloros poate fi utilizat ca atare, prin adăugarea a 200-400 g var la fiecare kilogram de spută sau de fecale, dar și la obținerea laptelui de var.

Laptele de var (10%) se prepară astfel: peste 1 kg de var cloros se pune treptat o cantitate mică de apă până se obține o pastă, apoi se adaugă restul de apă până la 10 l. Laptele de var se poate folosi cu bune rezultate pentru dezinfectarea sputei, a puroiului, a fecalelor, a urinei, precum și pentru grupuri sanitare și cuști de animale infectate.

Cloraminele se prezintă sub formă de pulbere fină, cristalină, de culoare albă sau ușor gălbui, cu miros de clor și conținând 25% clor activ. Sunt compuși stabili care se folosesc în concentrații mergând de la 0,1 la 5% și chiar mai mult, atunci când se urmărește distrugerea unor spori. Pentru distrugerea bacilului Koch se folosesc soluții de 5-10%.

Cloramina se folosește la dezinfectarea halatelor, a unor obiecte de îmbrăcăminte, a mobilierului, a camerelor, a cuștilor de animale, a produselor infectate. Acest dezinfectant poate fi utilizat și sub formă de pulbere, pentru dezinfectarea materiilor fecale, a urinei, a puroiului, a sputei etc., adăugat în aceeași proporție ca și în cazul varului cloros.

Permanganatul de potasiu (KMnO₄) se prezintă sub formă de cristale mari, de culoare violetă-închis. Pentru dezinfectarea mâinilor se folosește o soluție de 1%, pentru mucoasa bucală soluția de 1/5000, iar pentru cea oculară 1/10 000.

Apa oxigenată (H₂O₂) sau peroxidul de hidrogen are o puternică acțiune bactericidă prin eliberarea oxigenului. Se utilizează în concentrație de 3%.

Acizii minerali. *Acidul azotic* soluție 2%, la temperatura de 40°C distruge germeii sporulați. După dezinfecție, obiectele trebuie spălate bine cu apă și neutralizate cu o soluție de carbonat de sodiu 20%.

Acidul clorhidric se folosește pentru dezinfectarea unor pici de animale moarte de diluac, a grupurilor sanitare etc.

Cap. VII. RECOLTAREA PRODUSELOR BIOLOGICE, A APEI ȘI A ALIMENTELOR, PENTRU EXAMENELOR DE LABORATOR

I. RECOLTAREA ȘI TRANSPORTUL PRODUSELOR PATOLOGICE

Rezultatele corecte ale unui examen microbiologic depind într-o mare măsură de modul de recoltare a produselor patologice, de condițiile în care acestea sunt transportate și conservate până la efectuarea examenului.

În cursul operațiunilor de recoltare a probelor trebuie respectate câteva reguli generale. Astfel:

- materialele (flacoanele, eprubetele, acele, seringile, pensele, spatulele etc.) necesare recoltării trebuie în prealabil sterilizate prin agenți fizici. Substanțele chimice trebuie evitate deoarece urme de substanțe antibacteriene pot împiedica dezvoltarea ulterioară a microorganismelor și falsifica astfel rezultatele;

- când se urmărește izolarea unui agent microbian este indicat ca, pe cât posibil, recoltarea produselor să se facă înainte de administrarea unui tratament local sau general ca antiseptice, antibiotice sau chimioterapice;

- recoltarea trebuie executată de medic sau sub directa îndrumare și controlul acestuia, astfel încât pe lângă corectitudinea execuției să se preleveze o cantitate optimă din produsele patologice cele mai caracteristice și cu maximum de semnificație etiologică;

- prelevarea produsului patologic trebuie să se facă în momentul optim, în funcție de evoluția clinică a bolii astfel încât produsul respectiv să conțină o cantitate maximă din agentul patogen;

- operațiunea de recoltare se va face, în condiții riguroase de asepsie, pentru a se evita contaminarea produsului cu agenți microbieni fără semnificație clinică;

- o atenție deosebită trebuie acordată etichetării (identitatea produsului recipientelor cu produse recoltate și atașării unei fișe complete care trebuie să cuprindă pe lângă datele personale ale bolnavului (nume, prenume, vârstă, ocupație etc.) inclusiv adresă, și următoarele: Instituția (care a efectuat recoltarea), data recoltării (ziua și ora), produsul recoltat, diagnosticul clinic, examenul solicitat, tratamentul cu antibiotice, chimioterapice, alte informații (antecedente vaccinale etc.), semnătura medicului.

Transportul probelor patologice trebuie de asemenea să aibă în vedere respectarea unor reguli de ordin general dintre care menționăm:

- o ambalare corectă, cu închidere ermetică, astfel încât să evite spargerea sau deschiderea recipientului și contaminarea personalului, în timpul transportului până la laborator;

Acidul sulfuric, ca și ceilalți acizi minerali, trebuie folosit cu multă precauție în concentrațiile prescrise, deoarece, odată cu distrugerea microorganismelor, poate provoca și distrugerea obiectelor supuse sterilizării.

Acidul boric are o acțiune dezinfectantă relativ slabă. În concentrație de 5% se folosește pentru dezinfectarea pielii și a mucoaselor.

Bazele tari. *Hidroxidul de sodiu* în concentrație de 2-4% omoară bacteriile și virusurile.

Varul nestins (oxidul de calciu) se stinge cu apă (600 ml apă la 1 kg var) și se transformă în hidroxid de calciu. Din acesta se obține laptele de var 10% sau 20% în apă.

Pentru dezinfecția excretelor (urină, fecale etc.) se pun 200-300 g var nestins la fiecare kilogram de excretă.

Săpunurile sunt săruri de sodiu ale unor acizi grași. Ele acționează prin emulsionarea grăsimilor și îndepărtarea mecanică a murdăriei și, implicit, a germenilor.

Detergenții sunt substanțe care, pe lângă acțiunea antibacteriană, au și calitatea de a emulsiona, fiind foarte utilizați la spălarea și curățirea materialelor de laborator, înlocuind în mare măsură săpunul.

Din punct de vedere chimic, detergenții sunt împărțiți în anionici, cationici și amfolitici.

Detergenții anionici (Perlan, Dero etc.) dau prin disociere anioni organici toxici. Sunt activi mai ales asupra bacteriilor Gram-pozitive. Sunt cei mai buni agenți de spălare, fiind utilizați la spălarea instrumentelor, a aparatelor, a pardoselilor, a mobilierului, a țesăturilor etc.

Detergenții cationici au o acțiune antiseptică mai puternică decât cei anionici. *Bromocetol* este folosit ca dezinfectant în soluție apoasă 1% și ca antiseptic în soluție 1%. Deoarece în prezența săpunurilor își pierde activitatea antimicrobiană, este necesar ca înainte de a fi utilizat pentru aseptizarea mâinilor să fie îndepărtat săpunul cu apă și, apoi, cu alcool.

Detergenții amfolitici (Tego, Tagonin) sunt utilizați în soluții apoase 1% pentru dezinfecția instrumentelor de laborator, a mobilierului etc. Aceștia au un bun efect de curățire mecanică și o puternică acțiune bactericidă.

- luarea unor măsuri de protejare a materialului patogen (refrigerare, lichide conservante, medii speciale de transport etc.) și expedierea rapidă a produsului, eventual prin curier special, niciodată prin poștă;

- când este posibil, pentru rapiditate, examenul de laborator se va începe chiar la locul recoltării prin însămânțări directe pe medii de îmbogățire, de cultivare etc.;

- pentru obținerea unor rezultate cât mai bune, examenul produselor recoltate trebuie să înceapă în cel mai scurt timp de la data recepționării acestora în laborator.

Tehnica de recoltare a unor produse biologice

Recoltarea sângelui pentru examene microbiologice

În infecțiile generalizate, bacteriile patogene produc o *stare septicemică*, cu evoluție clinică gravă. În astfel de situații examenul microbiologic al sângelui devine indispensabil. Există și unele situații în care pătrunderea germeilor în sânge este pasageră (bacteriemia). Aceasta survine la persoane cu rezistență scăzută la infecții (diabet, ciroză, iradieri etc.) și adesea nu este însoțită de fenomene clinice evidente.

Investigația bacteriologică a sângelui se poate face prin examen microscopic direct, prin hemoculturi sau în anumite situații prin inocularea sângelui la animale de laborator.

Examenul microscopic direct al sângelui poate da rezultate pozitive când concentrația în germeni este suficient de mare (peste 10 000 germeni/ml sânge).

Recoltarea se face din pulpa degetului inelar prin înțepare cu un ac steril, după o prealabilă aseptizare. Se îndepărtează prima picătură de sânge cu vată sterilă după care se recoltează picătura următoare. În funcție de scopul urmărit sângele va fi depus pe o lamă sub formă de *picătură groasă* sau va fi etalat sub formă de *frotiu*. Lama, numerotată, pentru identificare, este trimisă la laborator pentru colorare și examinare.

Examenul microscopic al sângelui proaspăt sau al plasmii pe fond întunecat este posibil în prima săptămână de boală în febră recurentă, leptospiroze, septicemie carbunoasă; oferă informații rapide dar rezultatele pozitive sunt rare.

Hemocultura este metoda cea mai importantă și cea mai utilizată în examenul bacteriologic al sângelui. Această metodă constă din însămânțarea sângelui pe medii de cultură artificiale, în vederea izolării și identificării agentului cauzal.

Recoltarea sângelui pentru hemocultură se face, de regulă, prin puncție venoasă, dar sângele poate fi obținut și prin puncție arterială sau chiar din măduva osoasă (medulocultura), mai ales când hemocultura din sângele venos rămâne sterilă.

Momentul cel mai potrivit pentru a recolta este cu aproximativ o oră înainte de apariția frisonului sau a creșterii temperaturii, deoarece atunci numărul de germeni în sânge este maxim.

În unele boli infecțioase cu bacteriemie obligatorie (febră tifoidă, bruceleoză), șansele cele mai mari de obținere a unor rezultate pozitive sunt în primele 7-14 zile de la debut.

De asemenea, hemoculturile trebuie făcute înainte de a se începe tratamentul cu antibiotice sau, dacă acest lucru nu a fost posibil, recoltarea sângelui se va face înainte

de administrarea unei noi doze de antibiotice. La nevoie se va neutraliza acțiunea inhibitoră a medicamentelor administrate prin introducerea unor substanțe în mediile de cultură: acid paraminobenzoic 1/100 000 împotriva sulfamidelor, penicilinază 1/100 împotriva Penicilinei, cisteină 5-6 mg pentru a neutraliza 100 mg Streptomycină și sulfat de magneziu 100 mg pentru 1 ml de sânge.

Adăugarea de polianetol sulfonat de sodiu în concentrație de 0,025% are un efect anticoagulant, antifagocitar și inhibitor al unor antibiotice.

Inactivarea acțiunii bactericide naturale a sângelui și chiar a medicamentelor antimicrobiene se realizează în general, în mod satisfăcător, prin simpla diluție a sângelui în mediul de cultură, într-o proporție minimă de 10%.

Recoltarea sângelui, aproximativ 10-20 ml, se face în mod curent din vena plicii cotului, după o prealabilă aseptizare a regiunii cu alcool sau cu tinctură de iod. În acest scop se folosește fie o seringă preferabil de tip Luer de 10-20 ml, fie un set de transfer adaptat la un balon cu mediu de cultură (Fig. 13).

În acest din urmă caz se realizează hemocultura în circuit închis cu însămânțarea directă și imediată, care evită contaminarea produsului cu germeni nepatogeni din aer sau de tegumente.

Toate materialele utilizate pentru hemoculturi trebuie să fie perfect sterile, iar tehnica de recoltare și însămânțare a sângelui trebuie executată cu o deosebită grijă, pentru a se evita supraînfectarea.

Inocularea sângelui la animale de laborator este necesară în cazuri speciale. Sângele trebuie inoculat la animale, în oul embrionat sau pe culturi de celule, imediat după recoltare sau, dacă acest lucru nu este posibil, trebuie făcut necoagulabil prin defibrinare cu perle de sticlă sau prin folosirea unor substanțe anticoagulante.

Recoltarea secrețiilor purulente

Puroiul este un exsudat bogat în leucocite, în mare parte alterate, cu o cantitate mai mare sau mai mică de fibrină și germeni.

Aspectul puroiului diferă în funcție de natura microbului care a provocat fenomenul și care imprimă diferite caracteristici exterioare, ce vor constitui informații prețioase pentru diagnostic.

De cele mai multe ori puroiul este rezultatul unei prezențe microbiene – *supurație septică*. Sunt totuși situații în care puroiul este consecința unei iritații provocate de diferite substanțe chimice iritante prin constituția lor – *supurație aseptică*.

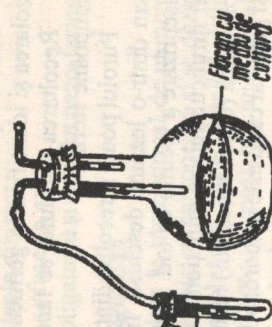


Fig. 13. Set de transfer pentru hemoculturi.

Pentru a putea determina natura etiologică a procesului supurativ sunt necesare izolarea și identificarea germeniilor.

Recoltarea puroiului se face prin puncție, aspirație sau prelevare cu ansa ori cu tamponane sterile.

Puroiul poate fi recoltat dintr-o *colecție închisă*: pustulă, furuncul, abces, flegmon sau dintr-o leziune deschisă. În primul caz, recoltarea se va face după o riguroasă aseptizare a locului cu iod. Dacă leziunea este foarte superficială (cazul pustulei sau al furunculului) se puncționează și se recoltează cu o pipetă Pasteur. Când este mai profundă (cazul abcesului) recoltarea se va face cu o seringă prevăzută cu un ac lung și gros, iar când este inabordabilă pe această cale, recoltarea are loc în urma unei incizii făcute într-un serviciu de chirurgie.

Atunci când este vorba de o *plagă deschisă*, recoltarea se face cu pipeta Pasteur, cu ansa sau cu tamponul.

Este bine ca recoltarea să fie practică înainte de instituirea tratamentului.

Caracterile macroscopice ale puroiului recoltat permit orientarea către un anumit germen deoarece:

- stafilococul produce un puroi cremos, vâscos;
- streptococul, un puroi serofibrinos, clar, mai puțin vâscos;
- meningococul, un puroi vâscos, cu reflexe verzui;
- piocianicul, un puroi de culoare albastră;
- bacilul Koch, un puroi fluent și puțin fibrinos;
- germenii anaerobi produc un puroi seros, tulbure, degajând miros putrid.

Recoltarea secrețiilor uretrale și vaginale

Uretra persoanelor sănătoase, exceptând porțiunea anterioară unde se pot găsi specii bacteriene saprofite, nu conține floră microbiană. Apariția unei secreții uretrale trebuie considerată proces patologic infecțios.

Recoltarea secreției uretrale la *bărbat* se face dimineața, înainte de micțiune, din meatul urinar, cu o ansă sterilizată prin flambare sau cu un tampon de vată steril. În infecțiile cronice, când secreția este absentă se recurge la masaj de prostată.

La *femei*, de regulă, odată cu recoltarea secreției uretrale se recoltează și secreții vulvo-vaginale.

În mod normal *secreția vaginală* este un transudat al mucoasei vaginale care conține celulele epiteliale de descumare și unii germeni saprofiti variabili în funcție de vârstă și starea fiziologică a femeii. De la pubertate și până la menopauză cavitatea vaginală a femeii sănătoase este populată cu bacili lactici care prin scindarea glicogenului cu formare de acid lactic, creează un pH local scăzut care împiedică dezvoltarea bacteriilor patogene.

De la femeie, recoltarea secrețiilor muco-purulente se face preferabil după 10 zile de la debutul ciclului menstrual, din orificiul colului uterin, orificiul glandelor Bartholin și uretră, cu ajutorul unei anse sterilizate prin flambare și răcită, sau cu tamponane

subțiri de vată sterile. Pentru o recoltare corectă din colul uterin trebuie utilizate valvele. Adeseori sunt necesare recoltări concomitente din rect.

La fete, recoltarea secrețiilor vulvo-vaginale se face cu ansa.

În caz de suspiciune de difterie, se recoltează obligatoriu și exsudat nazo-faringian.

Recoltarea exsudatului nazo-faringian și amigdalian

Cavitățile nazală și bucofaringiană sunt populate în mod normal de numeroase specii bacteriene saprofite. În cazuri patologice însă aici se cantonează și se dezvoltă unele bacterii sau virusuri care pot produce îmbolnăviri grave: bacilul difteric, meningococul, stafilococul, streptococul hemolitic etc. cu prezența unor exsudate specifice (angina difterică de exemplu).

Recoltarea exsudatelor se face cu ajutorul unor tamponane de vată nehidrofilă sterilizate și protejate prin menținerea lor în eprubete de sticlă sterile.

Recoltarea se face dimineața, pe nemâncate sau la cel puțin 3-4 ore după masă.

De regulă se utilizează cel puțin două tamponane: unul pentru exsudatul amigdalofaringian și altul pentru exsudatul nazal.

Bolnavul este așezat pe un scaun cu fața spre o sursă de lumină. Se folosește un apăsător de limbă steril (la nevoie sterilizat prin flambare) care, după utilizare este introdus într-o soluție de sublimat 1% sau hipermanganat de potasiu 2%. După evidențierea peretelui posterior al faringelui, a amigdalelor și pilierilor, se șterg cu un tampon secrețiile, falsele membrane și punctele albe de pe amigdale.

Se recomandă ca persoana care execută recoltarea să nu stea direct în fața bolnavului, ci lateral pentru a evita să fie contaminat cu picăturile declanșate de tuse sau strănut.

Recoltarea exsudatului nazal se va face cu ajutorul unui tampon de vată sterilă cu tija subțire, cu aceleași precauțiuni menționate mai sus.

În unele situații, când se presupune o infecție virală, prelevarea secreției nazo-faringiene se face sub formă de spălătură nazo-faringiană. Aceasta se execută cu ajutorul unei seringi de 10 ml la care se adaptează un tub de cauciuc, ambele sterile, prin care se introduce în una din fosele nazale ale bolnavului cca 10 ml soluție salină fiziologică (CINa 8,5%). Ulterior aceasta este recoltată din gură într-o placă Petri sterilă și transvazată într-un tub steril în care se adaugă câte 1 ml din soluția de Penicilină (2000 UI/ml) și Streptomycină (200 μg/ml) pentru protejarea virusurilor.

Recoltarea sputei

În cazul unor afecțiuni ale aparatului respirator, elementele patologice care apar sunt eliminate prin spută.

Sputa este recoltată de preferință pentru a se obține secrețiile acumulate în cursul nopții. După o gargară cu ser fiziologic steril, bolnavul este invitat să tușască și să expectoreze într-o placă Petri sau alt recipient curat, preferabil sterilizat prin căldură.

În cazuri speciale, secreția bronșică se va recolta prin aspirare în cursul broscopiei iar la copiii mici, care nu expectorează, sputa se va recolta prin spălătură gastrică.

Sputa recoltată trebuie introdusă în lucru într-un interval de timp cât mai scurt, de maximum 2 ore. În caz contrar va fi păstrată la frigider (+4°C).

În tuberculoza pulmonară, se examinează sputa recoltată în decurs de 24 ore.

Recoltarea lichidului cefalorahidian

În general, lichidul cefalorahidian se obține prin puncție rahidiană. Aceasta se execută, cu luarea unor măsuri de asepsie riguroasă, similare acelor menționate la recoltarea sângelui prin hemoculturi. Bolnavul este culcat lateral, cu coloana vertebrală flectată pentru a se crea spațiul necesar introducerii acului. Se asepticizează cu alcool și tinctură de iod, regiunea dorso-lombară la nivelul vertebrelor L4-L5 și se introduce un ac steril de 8 cm, cu mandrenul adaptat, până în spațiul subarahnoidian. Se scoate mandrenul, se colectează 5-8 ml lichid într-o eprubetă sterilă după care se închide steril eprubeta și se trimite la laborator. După recoltare bolnavul va sta în continuare culcat, fără pernă, cel puțin 1-2 ore.

Recoltarea urinei

Recoltarea urinei se face înainte de administrarea de antibiotice sau chimioterapie. La bărbați, se recomandă ca bolnavul să-și facă toaleta glandului cu apă caldă și săpun. Primele jeturi de urină, fiind contaminate cu floră microbiană saprofită, sunt îndepărtate; în continuare, se recoltează 20-30 ml urină în recipiente cu dop sterile (flacoane cu gât larg, borcane etc.).

La bolnavii cu retenție urinară, recoltarea se poate face prin sondaj vezical sau prin puncție suprapubică.

Explorarea ficăruui rinichi în parte este posibilă prin recoltarea separată a urinei din fiecare ureter în cursul cistoscopiei.

La copiii mici recoltarea se poate face în pungi speciale de plastic.

La femei urina se recoltează din mijlocul jetului, după o prealabilă toaletă locală urmată de tamponarea meatului urinar cu ser fiziologic steril. Recoltarea se face într-un flacon de sticlă cu gâtul larg, steril.

Recoltarea sterilă cu sonda se face numai în spitale și numai în cazuri excepționale. Pentru cercetarea bacilului Koch se recoltează aproximativ 1 l urină, în flacoane sterile, amestec din urina eliminată în 24 ore. În acest interval probele recoltate se păstrează la +4°C.

Când examenul se face în scopul depistării unei infecții gonococice sau cu trichomonas, atunci se recoltează și se prelucurează separat primul jet de urină.

Urina recoltată este transportată imediat la laborator pentru examinare. Urina lăsată la temperatura laboratorului mai mult de 2 ore de la recoltare nu mai poate fi utilizată pentru examene bacteriologice corecte.

În anumite cazuri, bolnavul trebuie pregătit în mod special înainte de recoltare.

Pentru cultivarea leptospirelor, este necesară alcalinizarea urinei prin administrare de bicarbonat de sodiu. Astfel, se schimbă pH-ul obișnuit al urinei care omoară rapid leptospirele.

Recoltarea materiilor fecale pentru coproculturi

Flora microbiană prezentă în materiile fecale este foarte complexă. Ea variază mult în funcție de vârstă și alimentație. Speciile bacteriene patogene pentru aparatul digestiv sunt, de asemenea, numeroase. În plus, chiar și unii germeni care populează intestinul omului sănătos, cum sunt *B. proteus*, *B. piocianic*, *Stafilococul* și alții pot produce afecțiuni grave în anumite situații, în care se modifică echilibrul biologic al florei bacteriene normale.

Izolarea și identificarea unui agent etiologic existent în materiile fecale sunt posibile prin efectuarea unor *coproculturi sistematice*. Acestea trebuie repetate după vindecarea clinică a bolnavului, pentru a depista la timp un eventual purtător de germeni. Materiile fecale sunt recoltate în recipiente speciale numite *coprocultoare* (Fig. 14).

Coproculturile sunt obligatorii în diagnosticul: holerei, salmonelozelor, dizenteriei bacilare, enterocolitelor provocate de bacilul coli, tuberculozei intestinale etc.

Pentru examenul bacteriologic, la bolnavii în perioada de stare, din scaunul emis spontan, defecat în vase sterile, se recoltează în recipiente de plastic sterile tip, cu ajutorul unei lingurițe fixată de obicei la capac. Se aleg porțiunile din scaun cu mucus și eventual urme de sânge; când acestea lipsesc se recoltează boluri de fecale din 2-3 locuri diferite. Când se solicită un examen microbiologic și parazitologic complet, cantitatea de fecale trebuie să fie de minimum 5 gr. Dacă scaunul este lichid, recoltorul tip va fi umplut pe jumătate.

La foștii bolnavi, purtători, nespitalizați, scaunul este provocat prin purgativ salin (amestec de sulfat de Na și Mg câte 15 gr. pentru adult, dizolvate în 250 ml apă). Pentru controlul bacilului tific și a infecției cu *E. histolytica* prelevarea se face timp de 3 zile consecutiv, după o administrare unică de purgativ. Defecarea se face în vase sterile din care se recoltează în recipiente sterile tip.

Tehnici speciale de recoltare:

Pentru dizenteria bacilară, prelevarea se face cu ajutorul sondei Nelaton nr. 16-18, în toate cazurile de dizenterie acută, sau cronică, pentru depistarea purtătorilor etc.

Sonda, sterilizată prin fierbere, se umezește cu soluție fiziologică sterilă, înainte de introducerea în rect. La adult se introduce 15-20 cm, la copii 10-12 cm, în colonul sigmoid. Produsul recoltat se suspendă în 2 ml. soluție NaCl 8,5% sterilă sau lichid conservant care se găsește într-un tub cu închidere ermetică.

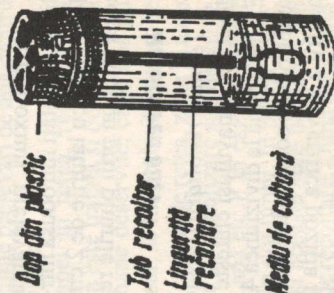


Fig. 14. Coprocultor.

Pentru febra tifoidă și holeră, când examinarea nu se poate face imediat, materiile fecale se introduc într-un lichid conservant.

Pentru virusuri, depistarea excretorilor de virus se face prin prelevarea fecalelor cu tamponane de vată (identice celor nazofaringiene) care se pregătesc în laborator, sterile, în tuburi cu 2 ml soluție Hanks cu 5% clorură de magneziu și antibiotice (500 U Penicilină + 500 micrograme Streptomycină/ml).

Pentru paraziți intestinali, cu excepția recoltelor pentru diagnosticul infecțiilor cu E. histolitica, proba de fecale se recoltează în general din scaun emis spontan fără utilizare de laxative sau purgative.

Din fecalele emise într-un vas curat se recoltează cu ajutorul linguriței care însoțește recoltorul, din diferite locuri o cantitate de aproximativ 50 gr., prelevând în special mucozitățile și zonele de sânge ale scaunului.

Macroelementele suspecte că reprezintă paraziți sau fragmente parazitare sunt recoltate separat în vase de sticlă, corespunzătoare (borcane închise ermetic sau cristalizatoare cu capac șlefuit) în soluție 10% formol în părți egale cu cantitatea de fecale.

Pentru oxiiuri, prelevarea se face cu ajutorul unei baghete de sticlă, care are una din extremități introdusă într-un dop de cauciuc, iar la cealaltă extremitate are un pătrat de celofan cu laturile de 2 cm, fixat pe benzi elastice. Produsul este prelevat plimbând acest tampon prin pliurile regiunii perianale (raclaj perianal).

Recoltarea bilei

Tehnica recoltării (tubajul duodenal). Recoltarea se face dimineața, pe nemâncate după ce bolnavul își clătește gura cu soluție cloruro-sodică sterilă. Se introduce sonda Einhorn până la diviziunea 45. Apoi se culcă bolnavul pe partea dreaptă și, foarte încet, se introduce sonda până la diviziunea 65. În acest moment se face controlul radiologic pentru a se verifica poziția intraduodenală a sondei. Dacă sonda are o poziție corectă se adaptează seringă și se introduce o soluție coleretic-cologogă de sulfat de magneziu sau sulfat de sodiu 15 gr dizolvate în 30 ml apă.

Se așteaptă câteva minute și se aspiră cu seringă până ce apare bila B (galbenă) din care se recoltează aproximativ 10-20 ml.

Scuamele cutanate (fire de păr, vezicule, unghii)

Tehnica prelevării. Scuamele se prelevează de la periferia leziunii prin raclare cu chiureta, sau cu marginea unei lame de sticlă sau vârful unui bisturiu și se adună pe o lamă.

Din vezicule, bule, se prelevează, după înțepare cu acul de disociere, lichid cu pipeta Pasteur și două-trei fragmente de perete vezicular, tăiat cu forfecuța de la marginea leziunii, care sunt introduse într-un tub, sau așezat între lame.

Din unghii, se taie mici porțiuni din locul leziunii, cu forfecuța, iar cu lanțeta și acul de disociere se recoltează fața profundă a unghiei. Probele se pun între lame sau în tuburi mici.

2. RECOLTAREA APEI PENTRU EXAMENUL BACTERIOLOGIC ȘI FIZICO-CHEMIC

Aprovizionarea cu apă de bună calitate are o importanță deosebită pentru păstrarea și promovarea sănătății populației. Este cunoscut că o serie de boli infecțioase cu poarta de intrare digestivă, de origine bacteriană (febrele tifo-paratifoide, holera, dizenteria etc.) sau virală (hepatita A, poliomielita) au, în principal, drept cauză consumul de apă necorespunzătoare.

Este cunoscut faptul că prima și cea mai importantă condiție bacteriologică de potabilitate este lipsa oricărui germe patogen în apa de băut.

Recoltarea probelor de apă pentru examenul microbiologic trebuie executată în condiții de asepsie iar materialele utilizate trebuie să fie sterile.

Controlul sanitar de laborator cuprinde recoltarea și analiza probelor de apă de la *sursă*, din *instalațiile de tratare a apei*, din *rezervoarele de immagazinare* sau din *rețeaua de canalizare*. Acest control se face în mod permanent (controlul curent) și periodic (controlul complex) în anumite situații critice.

Controlul sursei de apă este diferit după cum este vorba de apă de suprafață sau apă de profunzime. La instalațiile de tratare a apei se fac zilnic prelevări de apă pentru controale fizico-chimice, bacteriologice și eventual biologice.

În rețeaua de distribuție, la punctul de intrare a apei în rețea, recoltarea și examinarea probelor se face cel puțin odată pe zi când apa este tratată și ocazional, la diferite intervale de timp, în funcție de numărul de persoane deservite, când apa nu este tratată. De asemenea, ori de câte ori se consideră necesar, se fac prelevări de probe din toate punctele reprezentative ale rețelei de distribuție (capete de rețea, zone în care se produc întreruperi repetate ale apei, intersecții cu rețele de canalizare sau depozite de gunoai, rețea cu grad avansat de uzură și pierderi de apă etc.). În cazul rețelelor de apă cu distribuție intermitentă, recoltarea apei se face în doi timpi. În prima parte, se recoltează apa în momentul începerii distribuției apei și aceasta spre deosebire de metoda obișnuită care cere ca apa să curgă 10 min. înainte de recoltare. După o anumită perioadă de timp se recoltează și cea de a doua probă de apă.

Pentru recoltarea probelor de apă necesare examenului de laborator sunt necesare următoarele *materiale*: sticle de 100-500 ml cu dop de sticlă, sterilizate, pentru examenul bacteriologic; sticle de 1000 ml, incolore, curate, pentru examenul fizico-chimic și biologic; aparate pentru recoltat apa din profunzime; un ghem de sfoară subțire, foarfeci drepte; lampă de benzină; ladă izotermă; termometru de maximă-minimă.

Pregătirea materialului pentru recoltarea apei

Flacoanele se astupă cu un dop de vată hidrofobă.

Dopul de sticlă se învelește separat în hârtie și se leagă apoi de gâtul sticlei.

Pentru recoltarea apelor din profunzime se montează flaconul în aparatul respectiv și apoi se împachetează întreg dispozitivul în hârtie. În lipsa aparatelor speciale, flacoanele de sticlă se îmbracă în manșoane de plumb fixate cu sfoară. Materialele

astfel pregătite se sterilizează la 160-180°C, căldură uscată timp de 1 oră sau la 120°C căldură umedă, timp de 20 min. Flacoanele cu dop de cauciuc se vor steriliza numai la căldură umedă.

Luarea probelor pentru examenul bacteriologic

De la rețeaua de distribuție se alege un robinet branșat la o conductă principală. După curățirea și flambarea robinetului, acesta se deschide și se lasă să curgă apa 3-10 min., după care se micșorează debitul apei și se umple flacoanele până la 2-3 cm sub dop. Se va evita contaminarea, din afară, a gâtului sticlei și a dopului.

Din cursuri de apă, rezervoare, lacuri, fântâni sau izvoare, apa se va recolta cu ajutorul aparatelor sau dispozitivelor amintite, recoltarea făcându-se la nivelul punctului de captare.

Luarea probelor pentru examenul biologic și fizico-chimic se va face în recipiente de 1000 ml bine curățite, după ce acestea au fost clătite cu apă din sursa ce urmează a fi cercetată.

Din rețeaua de distribuție se recoltează după ce obiectul a fost curățit și apa a fost lăsată să curgă 10 min.

Din fântâni cu pompe, după pompare timp de 20 min.

Din fântâni cu găleată se recoltează de la 10-30 cm sub nivelul apei.

Din izvoare se va recolta punctul de scurgere liberă.

Din rezervoare se va recolta proba la punctul de ieșire.

Transportul apei la laborator se va face în lăzi izoterme cu gheață, în decurs de 6 ore pentru apele impure și de 10 ore pentru apele pure, probele fiind menținute la o temperatură de 6-10°C.

Recoltarea probelor de gheață. Cu o secure sterilizată prin flambare se sparge gheața cât mai departe de mal și se recoltează în bloc de 50/50 cm, care se introduce într-o cutie din de metal sterilă. În laborator se vor recolta bucăți de gheață din interiorul blocului, utilizând instrumente sterile. Bucățile de gheață se introduc în pahare sterilizate și se lasă să se topească. Din apa de topire a gheței se efectuează apoi examenul bacteriologic și chimic.

Notarea probelor. Probele de apă pentru analiză vor fi însoțite de o fișă în care se menționează: numele și calitatea persoanei care a recoltat proba; localitatea și denumirea sursei de apă; utilizarea apei; data și ora când s-a recoltat proba; temperatura apei în momentul recoltării probei; scopul analizei.

Se va face o descriere a sursei, a instalațiilor de captare sau extragere și a condițiilor igienico-sanitare ale sursei respective.

3. RECOLTAREA ALIMENTELOR PENTRU CONTROLUL SANITAR

Controlul sanitar al alimentelor se face în scopul de a preveni îmbolnăvirea oamenilor, prin consumarea unor alimente alterate, toxice sau contaminate cu germeni patogeni. Totodată, prin control, se urmărește și calitatea produselor alimentare.

Controlul alimentar se face în cadrul circuitului tehnologic la locurile de depozitare, în localurile de consumație și în timpul transportului.

Odată cu alimentele se vor controla și instalațiile, utilajele și vesela care se utilizează la prepararea alimentelor, precum și ambalajele și mijloacele de transport. O atenție deosebită se acordă controlului prin examene de laborator al persoanelor care manipulează alimente.

Controlul alimentar prezintă două aspecte:

- controlul *preventiv*, care se efectuează periodic, în toate fazele circuitului produsului respectiv și se execută conform indicațiilor din standarde, normelor interne de fabricație sau normelor stabilite de Ministerul Sănătății;
- controlul *curent*, care interesează produsul alimentar finit, destinat consumului. Acest control se efectuează cercetându-se aspectele de alterare sau falsificare a produsului.

În general, la **recoltarea și expedierea probelor alimentare** în vederea examenului bacteriologic și chimic se va ține seama de următoarele recomandări:

- probele recoltate trebuie să fie reprezentative. Pentru acestea se vor recolta probe din diferite ambalaje, apoi se vor amesteca. Din acest amestec se vor lua apoi probele pentru analiza de laborator;
- se vor lua două probe identice: una pentru analiza de control, care se va trimite la laborator, și alta pentru contra-expertiză, care se va lăsa la depozitul respectiv;
- pentru controlul alimentelor care se alterează ușor se va recolta o singură probă;
- probele se vor ambala în borcane curate de sticlă sau în pungi, apoi se vor sigila și eticheta. Pe etichetă se va specifica unitatea de la care s-a ridicat proba, felul produsului, data recoltării, numărul procesului verbal de recoltare și semnătura persoanei care a ridicat proba;
- se va întocmi un proces verbal de recoltare, după normele existente și un exemplar se va expedia împreună cu proba la laborator;
- expedierea se va face preferabil prin curier, după ce probele au fost ambalate în cutii de lemn.

Exemple: **La recoltarea probelor de carne în vederea examenului bacteriologic** se vor respecta următoarele indicații:

- se recoltează ganglioni, organe interne sau țesut muscular, în raport cu boala bănuită;
- probele se recoltează cu instrumente sterilizate, fără a face secțiuni în interiorul fragmentelor recoltate;
- probele se introduc în borcane de sticlă, tăvi sau cutii metalice nichelate sau cositorite, sterilizate;
- probele se pot împacheta și în hârtie de pergament, pe care se notează felul probei și regiunea din care s-a făcut recoltarea;
- toate probele recoltate de la același animal se introduc într-o cutie de metal bine închisă, luându-se măsuri să nu se răspândească în cursul transportului germeni infecțioși;

- probele vor fi trimise la laborator prin curier și vor fi însoțite de un proces verbal de recoltare, în care se vor menționa: unitatea care face trimiterea, data și ora recoltării probelor, specia animalului de la care s-a luat proba, ziua și ora tăierii animalului, informații asupra antecedentelor animalului și ale leziunilor constatate, numărul și felul probelor trimise, diagnosticul prezumtiv și examenul cerut și denumirea organului care a recoltat probele.

Recoltarea probelor de lapte și produse lactate pentru examenul bacteriologic.
Pentru recoltarea probelor se vor utiliza recipiente sterilizate. Pentru produsele lichide se vor folosi butelii cu dop șlefuit. Pentru produsele solide se vor utiliza recipiente cilindrice cu deschidere largă. Produsele lichide se vor omogeniza înainte de recoltare cu o lingură sterilizată. După omogenizare se recoltează, cu o lingură sterilizată, 100 ml produs în recipiente sterile. Aceste recipiente se închid imediat și se răcesc sub 5°C. Analiza bacteriologică se va face în cel mult 4 ore de la recoltarea probei.

Laptele concentrat se va recolta, flambându-se întâi cutia de metal, care se va deschide cu un perforator steril. După deschidere se recoltează steril aproximativ 25 gr produs, din care se cântăresc exact 10 gr care se diluează în 10 ml soluție citrat de sodiu 1,25% sterilă.

Laptele praf se recoltează cu o sondă sterilă, luându-se din diferite puncte ale ambalajului aproximativ 50 gr produs. Din această probă medie se cântăresc 10 gr care se dizolvă apoi în 90 ml soluție citrat de sodiu 3,5% sterilizată și încălzită în prealabil la 45°C.

Untul se recoltează cu o sondă sterilizată, din 2-3 puncte ale blocului. Astfel se realizează o probă medie, care se topește pe baia de apă la 45°C.

Brânzeturile se recoltează cu ajutorul unui cuțit steril sau al unei sonde sterile. Se recomandă să se recolteze bucăți întregi din care să se facă însămânțările în laborator.

Cap. XXVII. NOȚIUNI GENERALE DE PARAZITOLOGIE

1. PARAZITISM ȘI RELAȚIILE PARAZIT GAZDĂ

În secolele trecute, paraziții erau priviți ca o grupă de viețuitoare cu totul izolată și se atribuia apariției lor un sens misterios, socotindu-i ca "generații spontane". Odată cu includerea paraziților în sistemul general al lumii animale, a apărut necesitatea de a se defini paraziții și știința care se ocupă cu studiul lor.

Parazitologia este știința care se ocupă cu studiul morfologiei și biologiei paraziților, precizând relațiile care se stabilesc între paraziți și gazdele lor. Prin obiectul său, parazitologia este o ramură a biologiei generale.

Ca și multe alte viețuitoare, și organismul uman poate găzdui numeroși paraziți. Studiul acestor paraziți, al tulburărilor produse de ei în organismul uman parazitat, epidemiologia, terapia și combaterea lor constituie, în ansamblu, **parazitologia medicală**.

Pentru a putea înțelege ce reprezintă parazitologia, trebuie precizat, în primul rând, ce reprezintă un **parazit** și ce se înțelege prin **parazitism**:

— **parazitul** este o ființă de natură vegetală sau animală care trăiește temporar sau definitiv pe seama altei ființe vegetale sau animale, deseori producându-i tulburări evidente;

— **parazitismul** reprezintă un mod de viață în care o ființă folosește în parte sau în totalitate ca mediu necesar vieții sale o altă ființă.

În felul acesta, parazitismul ar reprezenta o asociație biologică particulară între doi factori, în care unul oferă locuință și hrană și reprezintă organismul-gazdă, iar celălalt este cel care folosește organismul-gazdă pentru a trăi, și reprezintă parazitul.

— **gazda** este, deci, ființa pe seama căreia trăiește parazitul, iar **parazitul**, ființa care trăiește pe seama gazdei. Viețuitoarele astăzi parazite nu au fost însă dintotdeauna parazite. Ele descind filogenetic din ființe ce duceau în trecut o viață liberă și care, ajunse accidental în organismele astăzi gazdă, s-au adaptat la noi condiții de viață. Astfel, parazitismul, la început accidental, s-a adâncit treptat în forme variate, transformându-se în parazitism obligatoriu. Putem deosebi mai multe tipuri de relații care se stabilesc între indivizii unor specii diferite. Astfel:

— **Saprofitismul** reprezintă primul pas spre viața parazită. Saprofitele se împart în *saprofite propriu-zise* (bacterii, ciuperci ș.a.) și *saprozoice* — organisme care se dezvoltă pe substanțe de descompunere (larvele diferitelor specii de muște).

— **Comensalismul** reprezintă un mod de viață a două ființe în care una trage foloase (prisos de hrană, protecție, locuință) de pe urma celei de-a doua (gazda), care nu este cu nimic vătămată.

— **Mutualismul** reprezintă o asociație biologică mai strânsă între două ființe, deoarece în acest caz ambii indivizi își aduc servicii reciproce.

— **Simbioza** reprezintă raportul biologic cel mai strâns dintre doi indivizi, care în acest caz vor alcătui o adevărată unitate biologică.

— **Parazitismul adevărat** este caracterizat prin faptul că gazda suferă din cauza parazitului, care se hrănește și se dezvoltă pe seama sa. Acesta "atacă" lent, dar continuu, gazda, sfârșind deseori prin a o distruge.

Pe lângă paraziții obișnuiți, care trăiesc pe seama unui organism-gazdă, există cazuri în care paraziții bine hrăniți și bogăți în substanțe nutritive de rezervă devin, la rândul lor, surse pentru obținerea hranei pentru alți paraziți mai mici. Acești paraziți ai paraziților se numesc **hiperparaziți**.

Relațiile care se stabilesc între o gazdă și un parazit pot fi, în general de trei feluri:

— acțiunea parazitului asupra gazdei poate depăși puterea de apărare a gazdei, care se îmbolnăvește și poate muri;

— acțiunea parazitului asupra gazdei este mai redusă în raport cu capacitatea de apărare a acesteia, care rămâne sănătoasă, rezistând agresivității parazitare;

— acțiunea parazitului asupra gazdei este slabă și, treptat, organismul-gazdă elimină parazitul.

2. CĂILE DE CIRCULAȚIE A PARAZIȚILOR ÎN NATURĂ. RĂSPÂNDIREA GEOGRAFICĂ A PARAZIȚILOR.

2.1. CĂILE DE CIRCULAȚIE A PARAZIȚILOR ÎN NATURĂ

Perpetuarea speciei la un parazit este asigurată în natură prin căile de circulație de la o gazdă la alta, iar întreruperea acestora împiedică desăvârșirea ciclului biologic. Circulația paraziților nu este asemănătoare, ea prezentând diferențe importante de la un grup de paraziți la altul sau chiar de la o specie la alta.

Relativ simplă la unii paraziți, la care transmiterea se face direct de la organismul-gazdă infectat la organismul-gazdă sănătos receptiv, ea devine din ce în ce mai complicată la paraziții al căror ciclu evolutiv reclamă un stagiu în sol, sau extrem de complicată la paraziții care își desăvârșesc ciclul biologic în una-două gazde intermediare.

Sistemalizând căile de circulație a paraziților în natură, se pot deosebi:

Parazitozele transmisibile direct (contagioase) la care ouăle, larvele, formele chistice sau vegetative prezente în fecale sau secrețiile bolnavului sunt eliminate în stadiu infectat. Deci, la acestea, transmiterea se realizează direct de la o persoană la alta sau prin intermediul variațiilor factori de mediu, care au simplul rol de a le vehicula.

Parazitozele transmisibile indirect.

— *prin sol și apă* se transmit parazitotozele în care ouăle sau larvele parazitului,

neinfectante în momentul eliminării de către bolnav, ajung în stadiul infectant după o perioadă de incubație în sol, variabilă în raport cu parazitul;

— prin carnea unor animale consumată de om (insuficient prelucrată termic) se pot contracta parazitoze. Ouăle sau larvele neinfectante în momentul eliminării de către bolnav ajung în stadiu infectant în carnea unor animale, care este apoi consumată de om.

Circulația paraziților în natură nu se limitează însă numai la om și animale domestice. Pe lângă această circulație, care este cunoscută sub numele de *focar peridomestic* sau *sinantrop*, mai există și circuite biologice ale paraziților cu mai multe gazde definitive și cu gazde intermediare reprezentate de animale sălbatice (*focare naturale*).

2.2. RĂSPÂNDIREA GEOGRAFICĂ A PARAZIȚILOR

Circulația paraziților în natură depinde de prezența parazitului, de prezența gazdelor intermediare și de prezența condițiilor de mediu fizic extern, care asigură realizarea legăturii între paraziți și gazdele lor. Există, în felul acesta, parazitoze de importanță mondială, care sunt răspândite pe aproape întreaga suprafață a globului unde se găsesc întru-mite condițiile de răspândire (*ascaridoza, hidatidoza, oxiuuroza*), după cum există parazitoze de importanță strict locală, în care existența în anumite teritorii a gazdelor intermediare sau a vectorilor limitează răspândirea parazitozelor ca, de exemplu, *botriocefaloza* în deltele unor fluvii, *malaria* între 60° latitudine nordică și 40° latitudine sudică sau *anchilostomiaza*, a cărei răspândire în zonele temperate este condiționată de prezența unor condiții speciale, care se întâlnesc numai în unele mine de cărbuni. În mod asemănător, condițiile de mediu fizic extern, obiceiurile populației, grupele de vârste și altele pot limita răspândirea unor parazitoze. Astfel, absența *ascaridozei* în zonele polare este datorată imposibilității dezvoltării în sol a elementelor infectante, din cauza frigului.

Stabilirea ariilor geografice de răspândire a parazitozelor și cunoașterea căilor de transmitere sunt extrem de importante, ele stând la baza organizării măsurilor de prevenire și combatere a tuturor bolilor parazitare.