

Tehnici de laborator în micologia medicală

Sub redacția:

Dr. Mihai Mareș

Șef de lucrări

- Departamentul de Microbiologie, Facultatea de Medicină Dentară,
Universitatea “Petre Andrei”, Iași
- Laboratorul de Micologie – Micotoxicologie, Departamentul de Sănătate
Publică, Facultatea de Medicină Veterinară,
Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară
“Ion Ionescu de la Brad”, Iași

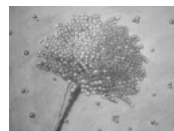


Editura PIM
Iași, România

2007

Copyright © 2007

Societatea Română de Micologie Medicală și Micotoxicologie



Nici o parte a acestei publicații nu poate fi reprodușă, transmisă, stocată sau difuzată în orice formă sau prin orice mijloace, fără acordul scris al S.R.M.M.M. Toate cererile de reproducere a materialelor publicate vor fi adresate în scris pe adresa:

Societatea Română de Micologie Medicală și Micotoxicologie
OP 6, CP 1356
Iași – România

Editor volum și design copertă:

ing. Ionuț Ailincăi

Comenzi la:

Societatea Română de Micologie Medicală și Micotoxicologie
OP 6, CP 1356

Iași – România

e-mail: comenzi@fungi.ro

www.fungi.ro

Descrierea CIP a Bibliotecii Naționale a României
Tehnici de laborator în micologia medicală / sub red.:

Mihai Mareș. – Iași : PIM, 2007

Bibliogr.

Index.

ISBN 978-973-716-677-7

I. Mareș, Mihai (ed.)

543.06

582.28

Editura PIM

Șos. Ștefan cel Mare nr. 11

www.pimcopy.ro

Iași România

Autori

- **Ingrid Cezara Apetrei**
Doctor medic veterinar, doctorand
Laboratorul de Microbiologie – Imunologie
Departamentul de Sănătate Publică
Facultatea de Medicină Veterinară
Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară
“Ion Ionescu de la Brad”, Iași
- **Olimpia Bazgan**
Doctor medic veterinar, doctor în Medicină Veterinară
Profesor universitar
Laboratorul de Micologie - Micotoxicologie
Departamentul de Sănătate Publică
Facultatea de Medicină Veterinară
Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară
“Ion Ionescu de la Brad”, Iași
- **Petru Cazacu**
Doctor medic veterinar, doctorand
Laboratorul de Histologie
Departamentul de Științe Fundamentale
Facultatea de Medicină Veterinară
Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară
“Ion Ionescu de la Brad”, Iași
- **Maria Dan**
Doctor medic, doctor în Medicină
Laboratorul de Microbiologie
Institutul de Boli Cardiovasculare “G. Georgescu” Iași
- **Bogdan Doroftei**
Doctor medic, doctor în Medicină
Preparator universitar
Clinica II Obstetrică - Ginecologie
Facultatea de Medicină
Universitatea de Medicină și Farmacie “Gr. T. Popa” Iași

- **Luminița - Iuliana Malic**
 Doctor medic veterinar, doctorand
 Laboratorul de Micologie - Micotoxicologie
 Departamentul de Sănătate Publică
 Facultatea de Medicină Veterinară
 Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară
 “Ion Ionescu de la Brad”, Iași

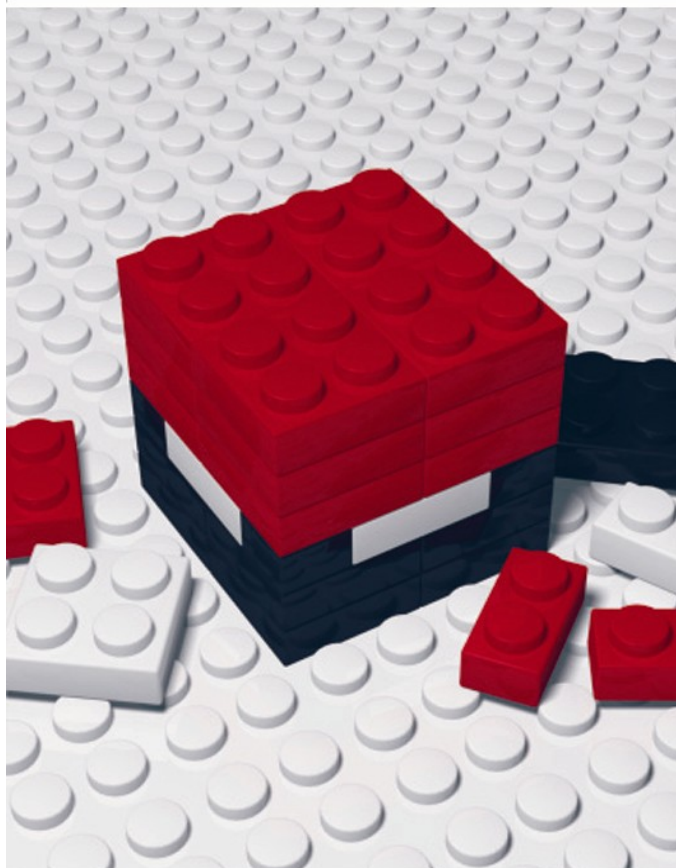
- **Magdalena Mareș**
 Medic dentist, doctorand
 Preparator universitar
 Departamentul de Protetică
 Facultatea de Medicină Dentară
 Universitatea “Petre Andrei”, Iași
 SC Dentomedica SRL

- **Mihai Mareș**
 Medic dentist, doctor medic veterinar, doctor în Medicină
 Șef de lucrări
 Departamentul de Microbiologie
 Facultatea de Medicină Dentară
 Universitatea “Petre Andrei”, Iași
 Laboratorul de Micologie – Micotoxicologie
 Departamentul de Sănătate Publică
 Facultatea de Medicină Veterinară
 Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară
 “Ion Ionescu de la Brad”, Iași



BRD
GROUPE SOCIETE GENERALE

Tot mai simplu



TelVerde: 0800 803 803

www.brd.ro

Volum editat cu sprijinul BRD-GSG

Cuprins

Cap. 1 Tehnici de recoltare, transport și procesare primară a prelevatelor clinice.....	1
1.1. Sângele.....	2
1.1.1. Recoltarea sângelui pentru hemocultură.....	3
1.1.2. Numărul de hemoculturi și momentul prelevării.....	4
1.1.3. Volumul de sânge ce urmează a fi însămânțat.....	4
1.1.4. Medii de cultură.....	4
1.1.5. Durata incubării și prelucrarea hemoculturilor.....	7
1.1.6. Semnificația hemoculturilor pozitive cu fungi saprobioți	8
1.2. Măduva osoasă hematogenă.....	8
1.3. Lichidul cefalo-rahidian	8
1.4. Raclatul cornean.....	9
1.5. Prelevatul otic	9
1.6. Fluidele intraoculare	9
1.7. Firele de păr	9
1.8. Fragmentele unghiale și scuamele cutanate	9
1.9. Secrețiile respiratorii joase.....	10
1.10. Aspiratul pulmonar	11
1.11. Biopsia pulmonară	11
1.12. Alte fluide organice normal sterile.....	11
1.13. Secrețiile purulente din abcese subcutanate sau din plăgi deschise	12
1.14. Produsele patologice de la nivelul mucoasei orale.....	12
1.15. Urina	12
1.16. Secrețiile vaginale.....	14
1.17. Produse patologice de la nivelul tractului genital masculin	15
1.18. Fragmentele tisulare biopsice.....	15
1.19. Tehnica aspirației cu ac fin	15
Bibliografie selectivă	18
 Cap. 2 Tehnici de microscopie directă.....	 21
2.1. Colorația negativă cu tuș de India.....	22
2.2. Colorația negativă cu mercurochrom 2% și tuș de India	23
2.3. Colorația cu lactofenol și albastru de anilină	24
2.4. Colorația cu hidroxid de potasiu și cerneală Parker.....	25
2.5. Clarificarea cu hidroxid de potasiu și dimetil sulfoxid	25
2.6. Colorația cu calcofluor alb și KOH 10%	26
2.7. Colorația Gram.....	28
2.8. Colorația Gram - calcofluor alb	30
2.9. Colorația Giemsa.....	31
2.10. Colorația May-Grunwald-Giemsa.....	32
2.11. Colorația Wright	34
2.12. Colorația cu mucicarmin Southgat.....	35
2.13. Colorația Musto	36
Bibliografie selectivă	39

Cap. 3 Medii de cultivare	41
3.1. Generalități	41
3.2. Compoziția mediilor de cultură	42
3.3. Prepararea și sterilizarea mediilor	43
3.4. Controlul de calitate și păstrarea mediilor	44
Medii de cultivare	46
Bibliografie selectivă	96
Cap. 4 Tehnici de însămânțare și transplantare	101
4.1. Tehnici uzuale	101
4.2. Tehnici speciale	103
4.2.1. Tehnica de purificare a izolatelor levurice	103
4.2.2. Tehnica însămânțării levurilor pe Agarul cu făină de porumb și tween 80	105
4.2.3. Tehnica de cultivare pe suporturi transparente	105
4.2.4. Tehnica de cultivare în „picătură suspendată”	106
4.2.5. Tehnica de cultivare pe bloc de geloză	106
4.3. Tehnici de transplantare	107
Bibliografie selectivă	108
Cap. 5 Tehnici de examinare microscopică a fungilor din culturi	109
5.1. Preparatul extemporaneu cu lactofenol și albastru de anilină (levuri)	109
5.2. Preparatul extemporaneu cu lactofenol și albastru de anilină (fungi filamentoși)	110
5.3. Preparatul extemporaneu cu bandă adezivă	110
5.4. Lutarea preparatelor extemporanee	111
Bibliografie selectivă	112
Cap. 6 Tehnici de histopatologie	113
6.1. Obținerea probelor	113
6.2. Examenul macroscopic	113
6.3. Fixarea	113
6.3.1. Formol soluție 10% tamponată pH 6,8	115
6.3.2. Fixatorul Bouin	116
6.3.3. Fixatorul Hollande	116
6.4. Procesarea țesuturilor	117
6.4.1. Deshidratarea	118
6.4.2. Clarificarea	119
6.4.3. Impregnarea cu parafină	119
6.4.4. Includerea	120
6.4.5. Secționarea	120
6.4.6. Etalarea secțiunilor	121
6.4.7. Colorarea	123
6.5. Montarea	148

6.6.	Etichetarea și arhivarea	150
	Bibliografie selectivă	151
Cap. 7	Tehnici de seromicologie	153
7.1	Fungitell™	153
7.1.1.	Principiul testului.....	153
7.1.2.	Materiale furnizate împreună cu testul Fungitell.....	154
7.1.3.	Materiale necesare dar nefurnizate împreună cu kitul	154
7.1.4.	Atenționări și precauții	155
7.1.5.	Păstrarea reactivilor	155
7.1.6.	Recoltarea / Stocarea / Marcarea probelor.....	155
7.1.7.	Tehnică de lucru	155
7.1.8.	Interpretarea rezultatelor.....	157
7.1.9.	Controlul calității	158
7.1.10.	Limite	158
7.1.11.	Interferarea cu alte substanțe	159
7.1.12.	Valori așteptate	159
7.2.	Platelia® Aspergillus	160
7.2.1.	Principiul testului.....	160
7.2.2.	Materiale furnizate odată cu kitul.....	160
7.2.3.	Materiale necesare, dar nefurnizate odată cu kitul	161
7.2.4.	Conservarea reactivilor desigilați și a celor reconstituiți.....	161
7.2.5.	Tehnica de lucru	162
7.2.6.	Interpretarea rezultatelor.....	164
7.3.	Platelia® Candida Ac.....	165
7.3.1.	Introducere.....	165
7.3.2.	Principiul testului.....	165
7.3.3.	Materiale furnizate împreună cu kitul.....	165
7.3.4.	Materiale necesare dar nefurnizate împreună cu kitul	166
7.3.5.	Tehnica de lucru	166
7.3.6.	Interpretarea rezultatelor.....	167
7.4.	Platelia® Candida Ag	169
7.4.1.	Introducere.....	169
7.4.2.	Principiul testului.....	169
7.4.3.	Materiale furnizate odată cu kitul.....	169
7.4.4.	Materiale necesare dar nefurnizate odată cu kitul	169
7.4.5.	Tehnica de lucru	170
7.4.6.	Maniera de calcul și interpretarea rezultatelor.....	171
7.5.	Identificarea speciei Candida dubliniensis prin latex-aglutinare.....	172
	Bibliografie selectivă	173
Cap. 8	Teste biochimice și fiziologice	179
8.1.	Fermentarea zaharurilor	179
8.2.	Capacitatea de asimilare a surselor de carbon.....	180
8.3.	Capacitatea de asimilare a surselor de azot.....	180

8.4.	Testul de hidroliză a ureei (producerea de urează) la levuri	180
8.5.	Testul de hidroliză a ureei (producerea de urează) la dermatofiți	181
8.6.	Testarea rezistenței la cicloheximidă	181
8.7.	Producerea de fenol-oxidază	182
8.8.	Testarea producerii altor enzime	182
8.9.	Testul de depistare a necesităților nutritive speciale	182
8.10.	Testul de cultivare pe Agar BCP-lapte-glucoză	183
8.11.	Testul de perforare a firului de păr in vitro	184
8.12.	Testul de cultivare pe boabe de orez	185
8.13.	Testul de filamentare (testul de blasteză sau germ-tube test)	185
8.14.	Testul de termotoleranță / termostimulare	186
	Bibliografie selectivă	188
Cap. 9	Tehnici de micologie moleculară	191
9.1.	Extracția ADN-ului pentru PCR	191
9.2.	Extracția ADN-ului cu ajutorul kit-ului High Pure Template Preparation Kit (levuri)	191
9.3.	Extracția ADN-ului prin crioprecipitare (funghi filamentoși)	192
9.4.	Controlul calității acizilor nucleici extrași	193
9.5.	Identificarea speciei <i>Candida dubliniensis</i> prin PCR duplex	194
9.6.	Identificarea moleculară a levurilor prin PCR și secvențializarea regiunilor ITS	196
9.7.	Reactivi utilizați în tehnicile de biologie moleculară	200
	Bibliografie selectivă	201
Cap. 10	Tehnici de evaluare a sensibilității la antifungice	203
10.1.	Tehnica de lucru pentru levuri	203
10.2.	Tehnica de lucru pentru funghi filamentoși	206
10.3.	Testarea sensibilității la antifungice prin metoda difuzimetrică Kirby-Bauer	208
	Bibliografie selectivă	210
Cap. 11	Tehnici de aeromicologie	211
11.1.	Caseta AIR-O-CELL™	212
11.2.	Caseta MICRO-5	214
11.3.	Caseta CYCLEX-D	215
11.4.	Caseta BIOCELL	215
11.5.	Caseta LARO 100	216
11.6.	Impactorul Zefon Z-A6	217
11.7.	Dispozitivul CIP 10M	219
11.8.	Aprecierea încărcăturii fungice aeropurtate	224
11.9.	Tehnici de recoltare/examinare directă a probelor	225
	11.9.1. Banda adezivă BIO TAPETM (Zefon International)	225
	11.9.2. Recoltarea fragmentelor inerte	226
	11.9.3. Recoltarea cu ajutorul tamponului tip exsudat	226
	Bibliografie selectivă	227

Cap. 12 Norme generale de biosecuritate în	
laboratoarele de micologie medicală	229
12.1. Clasificarea fungilor în funcție de clasele de risc biologic	229
12.2. Norme generale de biosecuritate	230
12.2.1. Tehnici de laborator folosite în zona de lucru	232
12.3. Metode de protecție primară	232
12.3.1. Hote de protecție biologică	232
12.4. Substanțe decontaminante folosite în	
laboratoarele de micologie medicală	233
12.5. Măsuri de protecție împotriva substanțelor chimice	235
Bibliografie selectivă	236
Anexă	237
Index	245

Prefață

Fungii – microorganisme familiare tuturor prin omniprezența și diversitatea lor, au fost considerați mult timp inofensivi pentru om, singurele manifestări induse de aceștia – candidozele superficiale și dermatofitozele – având un prognostic vital favorabil. Odată cu individualizarea micologiei medicale ca știință de sine stătătoare în cadrul microbiologiei, în prima jumătate a secolului trecut, și intensificării investigațiilor în acest domeniu, au apărut date din ce în ce mai certe privind implicarea fungilor într-o serie de entități nosologice care pot fi grupate în micoze (superficiale, profunde, sistemice), micotoxicoze și alergoze.

În condițiile actuale, când organismele umane sunt supuse intervenției a numeroși factori agresivi care le destabilizează homeostazia și le induc modificări reactive detrimentale, referindu-ne la posibilitatea implicării unei specii fungice sau a alteia în determinarea unor entități morbide, aserțiunea că *“practic, putem întâlni orice, oriunde”* este cât se poate de veridică. Limita dintre patogen și nepatogen, dintre colonizare și oportunism, este extrem de labilă, neexistând practic o delimitare strictă. Fungi considerați cu cca. 1 – 2 decenii în urmă ca nepatogeni, existând în mediul ambiant doar ca banali contaminanți, sunt astăzi recunoscuți ca agenți patogeni redutabili în cazul gazdelor imunocompromise. Fungii patogeni reprezintă astăzi o provocare pentru lumea medicală, atât din punct de vedere epidemiologic (augmentarea incidenței micozelor invazive), cât și diagnostic sau terapeutic. Se consideră că aproximativ 5% dintre decesele intraspitalicești se datorează unei cauze sau complicații fungice. Micoze precum aspergiloza invazivă, zygomicozele sau scedosporiozele sunt responsabile de un număr crescând de decese prin diagnosticarea adeseori dificilă și terapia extrem de costisitoare și de multe ori ineficace.

Scopul prezentului volum este de a pune la dispoziția medicului de laborator și clinicianului o suită de tehnici utile în diagnosticarea și managementul ulterior al micozelor. Am încercat prezentarea acestora în succesiunea lor logică, într-o manieră cât mai comprehensibilă, urmărind toate etapele demersului diagnostic, de la prelevarea probelor până la testele de sensibilitate la antifungice. De asemenea, am imprimat lucrării un caracter de ghid practic, reducând la maxim considerațiile teoretice. Inevitabil, unele tehnici sau proceduri au fost omise, fie pentru a nu supraîncărca textul cu informație redundantă, fie din cauza performanțelor reduse ale acestora. Bineînțeles, varianta propusă este perfectibilă, iar sugestiile cititorilor avizați vor sta la baza unei eventuale noi ediții.

Speranța noastră, a autorilor, este ca acest ghid să aducă o viziune unitară în micologia clinică din România și să contribuie la ameliorarea capacității de diagnostic și control a micozelor, atât a celor superficiale, dar mai ales a celor invazive, cu prognostic infaust. Salvarea și ameliorarea calității vieții pacienților critici, printr-un diagnostic etiologic corect și o monitorizare riguroasă a terapiei antifungice, au reprezentat argumentele primordiale ale acestui demers publicistic.

Autorii

Iași, iulie 2007

1

Tehnici de recoltare, transport și procesare primară a prelevatelor clinice

Maria Dan, Bogdan Doroftei, Petru Cazacu, Magdalena Mareș, Mihai Mareș

Recoltarea sau prelevarea probelor este o acțiune deosebit de importantă pentru diagnosticul diverselor micoze interne sau superficiale, ea fiind o etapă critică a acestui demers. Modul de prelevare a probelor și operațiunile ulterioare la care acestea vor fi supuse sunt specifice fiecărui situs de recoltare și pot reprezenta tot atâția factori limitativi pentru un diagnostic eficient în cazul executării lor incorecte. Se recomandă ca prelevarea probelor să fie realizată de personalul laboratorului de micologie, special instruit în acest scop. Cantitatea / volumul prelevatului trebuie să fie suficient de mare pentru a permite efectuarea examenului microscopic direct, cultivarea și eventual examenul histopatologic pe biopsie. Procesarea probelor va începe cât mai curând după recoltare, fără a depăși timpul maxim de așteptare.

Formularul de cerere pentru analize microbiologice

Probele prelevate vor fi însoțite obligatoriu de un formular de cerere pentru analize microbiologice care va cuprinde datele de identificare ale pacientului, tipul prelevatului, ora recoltării și examenele de laborator necesare. Unele date anamnetice (profesie, călătorii în zone endemice etc.) ca și unele informații clinice relevante sunt importante pentru medicul de laborator în procesarea optimă a probelor și vor fi furnizate de către clinician în același formular. Formularul de cerere va conține și numele medicului, numărul de telefon, clar indicate, pentru a fi contactat în cazul unor rezultatele critice sau urgente.

Tratamentele recente cu antifungice trebuie imperios specificate pentru a ajuta microbiologul la interpretarea rezultatelor testelor și la efectuarea antifungigramei. Rezultatele serologice și culturale anterioare trebuie de asemenea specificate dacă au fost efectuate.

Precauții

1. Se urmează precauțiile standard pentru recoltarea și manipularea produselor biologice. Se tratează toate probele ca fiind potențial periculoase.
2. După recoltare în recipiente adecvate, probele se introduc în pungi din plastic tip ziplock, cu buzunar lateral (pentru formularul de cerere).

Recoltarea

1. Când este posibil, probele se recoltează înaintea administrării agenților antimicrobieni.
2. Se identifică sursa probei și se specifică corect zona, astfel încât în cursul procesării în laborator să fie selectat mediul de cultură adecvat.
3. Se indică când un microorganism particular este căutat în mod special în probă.
4. Dacă o probă este recoltată prin traversul pielii intacte, aceasta se va dezinfecta cu alcool etilic 70%, urmat de o soluție pe bază de iod (1-2% tinctură de iod sau 10% soluție de povidonă-iod). Excesul de tinctură de iod se îndepărtează cu ajutorul unui tampon îmbibat în alcool, pentru a preveni eventualele iritații.
5. Pentru recoltarea din situsuri normal sterile se utilizează echipament sterilizat și tehnică aseptică pentru a preveni contaminarea cu microorganisme în timpul procedurilor invazive.
6. Colectarea probelor se va face în recipiente ermetice, sterile și rezistente, cu capac filetat, care nu permit crearea de aerosoli în momentul deschiderii.
7. Se etichetează clar recipientul de transport cu numele pacientului, numărul de identificare, data și ora de colectare.
8. Probele obținute prin aspirație cu ac fin trebuie transferate într-un tub steril sau flacon de transport înainte de a fi trimise la laborator.
9. Dacă din probele fluide s-au executat frotiuri imediat după recoltare, acestea vor fi individualizate corespunzător prin notare pe capătul mat al lamei. Se recomandă trimiterea a 1-5 frotiuri pentru evaluare citologică. Acestea se vor fixa imediat prin pulverizarea frotiului cu un fixator citologic sau se introduc în etanol 95 % pentru 20 minute.

1.1. Sângele

Hemocultura este o importantă metodă de diagnostic care poate orienta sau reorienta terapia antimicrobiană în cazul bolilor infecțioase grave. Obiectivul major al tuturor metodelor de hemocultură este reprezentat de depistarea unui număr mic de microorganisme în sânge, de aceea metodele de hemocultură variază și sunt aproape proprii fiecărui laborator. Indiferent de metoda aleasă, este esențială prelevarea sângelui în condiții strict aseptice, însămânțarea acestuia pe un mediu lichid, folosirea unor metode pentru depistarea creșterii microorganismelor în mediu lichid și o fază finală de subcultivare pe un mediu solid pentru identificarea și testarea sensibilității la antifungice.

Printre factorii cheie pe care șeful de laborator trebuie să-i stabilească se numără și metoda de hemocultură, cantitatea și compoziția mediului de cultură, numărul și momentul prelevării hemoculturilor, volumul de sânge care urmează a fi însămânțat, frecvența subcultivărilor și interpretarea rezultatelor.

Prelevarea se face direct în flacoanele de hemocultură de tipul *Hemoline Performance Duo*, *BacT/ALERT[®]FA* (bioMérieux) sau, mai recomandat, *BD BACTEC[™] - Mycosis IC/F Medium* (BD Diagnostics). În cazul suspectării unor infecții fungice cu localizare intracelulară a microorganismului (e.g. *Histoplasma*

capsulatum), tehnica de liză-centrifugare și utilizarea flacoanelor *BD BACTEC™ – Myco/F Lytic Medium* (BD Diagnostics) cresc esențial șansa de izolare a agentului patogen.

1.1.1. Recoltarea sângelui pentru hemocultură

Sângele pentru hemoculturi trebuie recoltat prin *puncție venoasă periferică*, astfel:

1. Se dezinfectează flaconul de hemocultură cu alcool izopropilic 70%, se așteaptă 1 minut;
2. Se palpează vena;
3. Se antiseptizează tegumentul cu alcool 70%, apoi cu tinctură de iod 1-2% (sau iodofori 10%), concentric, începând din centru;
4. Se așteaptă să se usuce și nu se mai palpează vena;
5. Se recoltează sângele, iar după puncție se înlătură iodul de pe tegument cu alcool (acest pas nu mai este necesar dacă se utilizează iodofori).

Recoltarea sângelui prin dispozitive intravasculare, arteriale sau venoase, este o problemă controversată. Unele studii comparative arată că nu există diferențe semnificative între sensibilitatea și specificitatea hemoculturilor prelevate de pe cateter și prin puncție venoasă periferică. Factorii care influențează acest rezultat favorabil sunt durata scurtă a menținerii cateterului și tehnicile stricte de asepsie. Alte studii arată că, atunci când rezultatele între cele două prelevări sunt discordante, hemoculturile prelevate prin puncție periferică sunt mai fidele în evidențierea bacteriemiilor / fungemiilor adevărate față de cele prelevate pe cateter. Cu toate acestea, există un consens asupra faptului că orice hemocultură pozitivă necesită și interpretarea clinicianului, iar acesta trebuie avertizat cu privire la particularitățile hemoculturilor pozitive prelevate pe cateter. Multe dispute a ridicat și *problema înlocuirii sau nu a acului după flebotomie* pentru inocularea sângelui în flaconul de hemocultură. Majoritatea studiilor arată că nu există nici o diferență semnificativă statistic între cele două metode, astfel că schimbarea acului nu ar fi necesară, reducând astfel și riscul accidentelor prin înțepare. O antiseptizare atentă a tegumentului este mai importantă decât schimbarea acului. O meta-analiză a studiilor care au comparat rata contaminării hemoculturilor cu și fără schimbarea acului înainte de inoculare a arătat că această rată este de 2,0% când se schimbă acul, față de 3,7% când nu se realizează schimbarea acului. Pe de altă parte, reducerea contaminării hemoculturilor prin schimbarea acului ar determina o economie de aproximativ 85000 \$ pentru fiecare 1000 de hemoculturi. La modul ideal, pentru recoltarea hemoculturilor, ar trebui să se apeleze la personal special calificat (flebotomiști).

1.1.2. Numărul de hemoculturi și momentul prelevării

Majoritatea cercetărilor sunt de acord că peste trei hemoculturi în 24 ore nu determină o creștere semnificativă a rezultatelor pozitive. Trei prelevări intermitente în 24 ore, din zone de puncție diferite, cresc sensibilitatea izolării aproape de 100%. Hemoculturile trebuie prelevate pe cât posibil înaintea instituirii antibioticoterapiei (dacă au fost administrate antibiotice, această informație trebuie luată în considerație la interpretarea rezultatelor) și conform evoluției predictive a curbei febrile sau / și în momentul când bolnavul semnalează apariția frisoanelor.

1.1.3. Volumul de sânge ce urmează a fi însămânțat

Majoritatea autorilor recomandă să se recolteze la adulți 10-30 ml de sânge pentru fiecare set de hemoculturi. Însămânțarea a 20, respectiv 30 ml sânge, crește sensibilitatea cu 38% și 68% față de însămânțarea a 10 ml de sânge. Recoltarea a peste 30 ml de sânge *per* set de hemocultură îmbunătățește foarte puțin sensibilitatea hemoculturii și contribuie la instalarea anemiei iatrogene. La copii este necesar un volum mai mic de sânge datorită bacteriemiilor cu un număr mai mare de UFC/ml față de adulți. Se recomandă 1-2 ml de sânge *per* set la nou-născuți, 2-3 ml la sugari și 3-5 ml la copii.

O rație optimă de diluție a sângelui în bulion nu a fost încă stabilită. Majoritatea autorilor recomandă ca această diluție să fie între 1:5 și 1:10, iar unii au arătat că un raport de diluție de 1:10 este superior celui de 1:5 în ceea ce privește rapiditatea și sensibilitatea izolării. Majoritatea sistemelor de hemocultură conțin polianetol sulfonat de sodiu, care pe lângă efectul anticoagulant inactivează și anumiți agenți antimicrobieni (e.g., aminoglicozidele, polimixinele).

1.1.4. Medii de cultură

Mediile pentru hemocultură prezintă variații în compoziție și de aceea studiile comparative realizate sunt greu de interpretat.

Sistemele de hemocultură automate și semiautomate computerizate pentru detecția rapidă a microorganismelor în hemoculturi sunt utilizate în multe laboratoare.

Sistemul BACTEC (Becton Dickinson Instruments Systems, Sparks, MD, SUA) se bazează pe detecția directă a producerii de CO₂ prin prelevare seriată de eșantioane de gaz din flaconul de cultură, iar în camera de citire prezența CO₂ este depistată cu ajutorul luminii infraroșii, ultraviolete sau radiometric. Câteva studii comparative au arătat că sistemul *BACTEC* identifică o gamă largă de microorganisme, în special levuri și fungi dimorfici, în timp scurt. În comparație cu sistemul *Isolator*, mediile *BACTEC* pentru fungi (*BACTEC MYCO/F Lytic bottle* și *BACTEC high-blood-volume fungal medium*) au avantajul monitorizării automate continue, dar timpii de izolare sunt echivalenți, cu excepția tulpinilor de *Histoplasma capsulatum* care au fost izolate doar în sistemul *Isolator*.

În sistemul *BacT/Alert* (Organon Teknika Corp., Durham, NC) creșterea este semnalizată tot prin detecția CO₂, dar cu ajutorul unui detector colorimetric. *BACTEC*

și *BacT/Alert*, similare în compoziția bulionului pe bază de tripticază-soia și cazeină, diferă în suplimentele nutritive și în concentrația de polianetol sulfonat de sodiu. Studiile comparative ale celor două sisteme au arătat că sistemul *BacT/Alert* este superior în izolarea microorganismelor, în special a stafilococilor și levurilor.

BACTEC este superior bulionului cu supliment de peptonă și sistemului *VITAL* în depistarea bacteriemiilor și fungemiilor, iar această superioritate nu se datorează metodei de detecție.

Flacoanele speciale pentru fungi ar trebui luate în considerare în anumite situații particulare (pacienți HIV infectați), deoarece fungii filamentoși și dimorfici necesită o atenție specială. Studii recente arată că flacoanele pentru izolarea bacteriilor sunt foarte potrivite pentru cultivarea levurilor genului *Candida*.

Sistemul Oxoid Signal (Oxoid USA, Inc., Columbia, MD) este format dintr-un singur flacon de cultură, în care presiunea CO₂ degajat de creșterea microorganismelor, forțează fluidul de cultură să treacă într-un compartiment semnal, de unde poate fi examinat microscopic și subcultivat. Deși evaluările inițiale au fost favorabile, studiile ulterioare au arătat că furnizează un număr crescut de rezultate fals pozitive și are dificultăți în semnalizarea creșterii bacteriilor anaerobe, a majorității levurilor, a *Hemophilus influenzae*, bacililor gram-negativi nonfermentativi, *Neisseria meningitidis*, *Nocardia spp.*, și *Corynebacterium jeikeium*. Noile modele care au îmbunătățit compartimentul de semnalizare (creșterea volumului) și beneficiază de agitare, au dovedit proprietăți superioare în izolarea microorganismelor.

Mediile difazice (*Septi-Chek*: Roche Diagnostic Systems, Nutely, NJ; *Hemoline Performance Duo*: BioMerieux, *Vacutainer agar slant*: Becton Dickinson) sunt de asemenea larg utilizate. Au calități superioare bulionului suplimentat cu peptonă, sunt avantajoase pentru izolarea micobacteriilor și brucelelor. Însămânțarea frecventă a pantei poate să furnizeze cultură suficientă pentru testarea sensibilității și identificare, astfel încât timpul de depistare a microorganismelor poate fi comparabil cu al sistemelor automate. Folosite în asociație cu sistemul *BACTEC* s-a observat o creștere cu 25% a depistării episoadelor bacteriemice, față de folosirea izolată a sistemului *BACTEC*.

Metoda lizei cu centrifugare (denumită anterior *DuPont Isolator tube*, în prezent este comercializată de Wampole Laboratories, Cranbury, NJ) izolează majoritatea microorganismelor, dar este indicată în special pentru depistarea fungemiilor, (mai ales cu fungi dimorfici, fungi filamentoși, *Malassezia furfur*), a infecțiilor cu micobacterii la pacienții cu SIDA și a oportuniștilor (*Bartonella henselae*). Sângele, prelevat în tuburi cu „liquid” (polietilenglicol și saponină) este lizat, apoi centrifugat, iar sedimentul este însămânțat pe medii solide adecvate. Metoda este echivalentă sistemului difazic în izolarea fungilor (chiar superioară în izolarea *Histoplasma capsulatum*), de asemenea și în izolarea bacteriilor (metoda lizei cu centrifugare fiind mai rapidă). Unii autori nu recomandă această metodă în investigația de rutină a episoadelor febrile la pacienții neutropenici, datorită ratei crescute de rezultate fals pozitive.

Hemoculturile anaerobe. Setul standard de hemoculturi conține un flacon aerob și unul cu incubare anaerobă. Deoarece există o șansă mică de a izola fungi sau bacterii strict aerobe în flaconul anaerob, folosirea de rutină a flaconului cu incubare anaerobă poate determina scăderea sensibilității hemoculturii. Câteva studii au arătat că în ultimii 20 de ani s-a produs o scădere a incidenței infecțiilor sistemice determinate de bacteriile anaerobe; pe de altă parte, tot în această perioadă s-a produs o creștere a incidenței fungemiilor. Aceste schimbări în etiologia infecțiilor sistemice au început să pună sub semnul întrebării utilitatea folosirii de rutină a flaconului anaerob.

Unii autori au arătat că folosirea a două flacoane aerobe și doar în cazuri selecționate a flaconului anaerob, a dus la creșterea cu 6% a izolării microorganismelor cu semnificație clinică, în comparație cu practica standard (un flacon aerob și unul anaerob). Date asemănătoare au fost găsite la copii și având în vedere cantitatea mică de sânge care se poate recolta de obicei de la acești pacienți, este indicat ca întreaga cantitate să se însămânțeze în flacoane aerobe și doar în cazurile cu risc crescut să se utilizeze flaconul anaerob.

Pe de altă parte, utilizarea flacoanelor anaerobe determină o creștere semnificativă a izolării bacteriilor strict anaerobe. În concluzie, la ora actuală este indicată folosirea a două flacoane aerobe *per set* și în circumstanțe bine selecționate (e.g., afecțiuni intraabdominale, infecții orale, neutropenii, celulite, mușcătură de om) și pe cea a flaconului anaerob.

Neutralizarea și inactivarea substanțelor antimicrobiene. Datorită frecvenței recoltării a sângelui pentru hemoculturi de la pacienți aflați sub terapie antimicrobiană, pe piață au apărut produse care încearcă să înlăture posibilele efecte inhibitorii ale creșterii. Sistemul *BacT/Alert* are variante FAN pentru flacoanele aerobe și anaerobe. Utilizarea acestora a demonstrat îmbunătățirea izolării microorganismelor în comparație cu mediile standard, iar noua formulă a mediului a optimizat și microscopia directă din hemocultură. Studiile comparative ale sistemelor *BacT/Alert FAN* și *BACTEC* cu rezină au arătat că performanțele celor două medii sunt echivalente.

Mediile hipertone cu 10% sucroză sunt utilizate pentru a crea un mediu osmotic protector, îmbunătățind astfel izolarea bacteriilor și fungilor cu perete defectiv din sângele pacienților care au primit antibioticoterapie. În general, aceste medii au fost evitate în laboratoarele care utilizează citirea vizuală a creșterii datorită rezultatelor fals pozitive date de efectul hemolitic, dar pe de altă parte producerea unor mari cantități de gaz de către anumite bacterii, poate fi utilă în evidențierea creșterii. Valoarea acestor medii în depistarea bacteriemiilor și fungemiilor este controversată. Unele studii arată o îmbunătățire a izolării stafilococilor, bacililor gram-negativi (*Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa*) și fungilor, dar o reducere și o întârziere în izolarea bacteriilor anaerobe și a *Neisseria gonorrhoeae*.

Noile metode rapide de identificare și testare a sensibilității la antibiotice (*Vitek* - bioMérieux Vitek, Hazelwood, MO, USA, *autoSCAN-W/A* - W/A; Dade Behring Microscan Inc., West Sacramento, Calif.; *BD PHOENIX Automated Microbiology System*; PCR) a microorganismelor direct din hemoculturile pozitive,

furnizează rezultate corecte în aproximativ 2-6 ore și pot determina inițierea antibioticoterapiei, schimbarea terapiei de primoințenție cu o terapie mai eficientă sau mai puțin costisitoare. Unii autori au estimat o economie de aproximativ 158 \$ *per* pacient, apreciată la pacienții la care s-a administrat un antibiotic mai ieftin sau la care a fost întreruptă antibioticoterapia, prin primirea rezultatelor cu 24-48 de ore mai devreme.

Metodele moleculare au o sensibilitate și o specificitate de aproximativ 100% în identificarea bacteriilor și levurilor din hemoculturile monomicrobiene și furnizează rezultatele în aproximativ 2 ore.

1.1.5. Durata incubării și prelucrarea hemoculturilor

Majoritatea laboratoarelor care utilizează sisteme automate, incubează hemoculturile 5-7 zile. Laboratoarele care deservește spitale în care fungii, *Pseudomonas aeruginosa* și grupul HACEK sunt izolați frecvent din sângele pacienților, ar trebui să evalueze cu atenție necesitatea subcultivărilor terminale, iar hemoculturile ar trebui incubate peste 7 zile.

Dacă apare semnalizarea creșterii în timpul incubării, proba este examinată microscopic (frotiu colorat Gram) și subcultivată pe medii solide în funcție de categoria microscopică observată. În cazul observării fungilor este indicată subcultivarea pe Agar Sabouraud cu incubare la 30° sau 37°C. În situația în care nu sunt depistate microorganisme pe frotiu, trebuie realizate subcultivări oarbe, iar flaconul reintrodus la incubat.

Pentru sistemele manuale de depistare a creșterii, în cazul suspiciunii fungemiilor, ar trebui realizate subcultivări „oarbe” la 48 ore și apoi săptămânal, până la 30 de zile, pe Agar Sabouraud, cu incubare la 30°C.

Examinarea microscopică de rutină, cu ajutorul colorației Gram, a hemoculturilor negative macroscopic după 24-48 ore de incubare este controversată și puțin indicată, datorită numărului mic de microorganisme care pot fi detectate utilizând frotiul colorat Gram (aproximativ 10^5 UFC/ml). Colorația cu *acridină orange* este mai sensibilă, detectând între 10^3 și 10^4 UFC/ml. Unii autori au comunicat o creștere de 16,8% în depistarea rapidă a septicemiilor prin examinarea cu *acridină orange* a hemoculturilor negative macroscopic.

Pentru metoda lizei-centrifugare, sângele (7,5-10 ml) este recoltat în tuburi cu saponină (lizează hematiile și globulele albe). După recoltare, tuburile se agită de câteva ori pentru liza completă, iar apoi se centrifughează 15 minute la 3000 rpm pentru concentrarea microorganismelor. Sedimentul este aspirat și însămânțat astfel: o placă cu Agar sânge-ciocolat și o placă cu Agar tripticază-soia, se incubează 3 zile la 37°C, apoi 18 zile la 30°C; o placă cu Agar Sabouraud și una cu Agar infuzie cord-creier, 4 săptămâni la 30°C. Rata contaminărilor accidentale poate fi controlată printr-o bună tehnică aseptică în incinta hotei de siguranță microbiologică de clasă II.

1.1.6. Semnificația hemoculturilor pozitive cu fungi saprobioți

Aspergillus spp. reprezintă cea mai frecventă cauză a infecțiilor fungice invazive, dar este rar izolat din sânge. Pe de altă parte, *Fusarium spp.* este izolat în 60-70% din hemoculturile pacienților cu fusarioză diseminată. Printre fungii emergenți implicați tot mai des în infecții invazive, inclusiv în fungemii, se numără *Scedosporium spp.*, *Alternaria spp.* și *Paecilomyces spp.*

Cu excepția fungemiilor asociate cu prezența cateterelor venoase centrale, determinarea semnificației clinice a hemoculturilor pozitive cu fungi, chiar și la pacienții cu hemopatii maligne reprezintă o provocare. Cele mai frecvente cauze de fungemie adevărate sunt determinate de *Scedosporium spp.*, iar prezența leucemiei sau transplantului medular reprezintă un factor de risc important.

Semnificația hemoculturilor pozitive cu *Aspergillus spp.* este încă neclară. În literatură sunt doar puține cazuri documentate din punct de vedere clinic, histologic și microbiologic pentru evidențierea aspergilozei invazive cu hemocultură pozitivă certă. O singură hemocultură pozitivă, în sistemul lizei cu centrifugare, reprezintă în mod obișnuit un indicator al pseudoaspergilemiei, iar în fața unei asemenea situații trebuie căutate argumentele clinice și radiologice pentru stabilirea semnificației clinice a izolatului. Totuși, se consideră că hemoculturile pozitive pentru *Aspergillus*, cu reală semnificație clinică, sunt foarte rare.

Candida spp. (în particular *Candida albicans*) este frecvent izolată în hemoculturi, reprezentând până la 10% dintre infecțiile sistemice nosocomiale; cu toate acestea aproximativ 50% din hemoculturi rămân negative la pacienții cu candidemie. În cazul hemoculturilor pozitive cu *Candida spp.*, trebuie depistată posibila sursă a infecției, iar cateterele intravasculare înlocuite. Candiduria poate apare secundar candidemiei.

1.2. Măduva osoasă hematogenă

Se recoltează prin aspirație cu seringă heparinizată, calea de acces fiind creată prin puncție sternală sau puncția crestei iliace. Puncția se realizează respectând cele mai severe măsuri de asepsie. Aspiratul medular, în volum de minim 0,5-1 ml, se transferă într-un tub steril cu dop de cauciuc și se expediază la laborator în maxim 2 ore. Pe parcursul acestui interval de timp, prelevatul se menține la temperatura camerei.

1.3. Lichidul cefalo-rahidian

Lichidul cefalo-rahidian (fluidul cerebro-spinal sau LCR) se recoltează prin puncție rahidiană în spațiile intervertebrale L3-L4, L4-L5 sau L5-S1. Puncția se realizează respectând cele mai severe măsuri de asepsie și decontaminarea zonei cu povidonă-iod 2%. După poziționarea în spațiul subarahnoidian a cateterului de puncție, LCR se colectează prin curgere liberă, în tuburi sterile, în volum de 3-5 ml. Înainte de examinare, proba se concentrează prin centrifugare la 1500 rpm timp de 10 minute. Supernatantul se păstrează pentru testarea antigenică, iar sedimentul pentru cultură și microscopie directă. Timp de așteptare în vederea procesării: maxim 15 minute. Nu se refrigerază!

1.4. Raclatul cornean

Se instilează 1-2 picături de anestezie topic, apoi cu ajutorul unei microchiurete oftalmologice / spatule Kimura sterile, printr-o mișcare scurtă, se raclează zone multiple din segmentul ulcerat. Prelevatul se însămânțează direct pe medii de cultură cu ajutorul instrumentului de recoltare, prin înțepare; totodată, se pregătesc frotiuri pentru examenul microscopic direct. Timp maxim de așteptare: 15 minute la temperatura camerei.

1.5. Prelevatul otic

Din conductul auditiv extern se pot preleva probe cu ajutorul tampoanelor sterile (secrețiile) sau prin raclare cu o chiuretă (scuamele). Timp maxim de așteptare: 2 ore la temperatura camerei sau 24 ore la 4°C.

1.6. Fluidele intraoculare

Se recoltează prin aspirație cu un ac fin steril sau prin vitrotomie, apoi se transferă la laborator în maxim 15 minute pentru procesare. Volumul recomandat este de cca. 0,5 ml.

1.7. Firele de păr

Se recoltează cu ajutorul unei pense, de preferat sub lumină UV, în cameră obscură. Se expediază la laborator în plicuri de hârtie. Timp maxim de așteptare: 72 ore la temperatura camerei.

1.8. Fragmentele unghiale și scuamele cutanate

Fragmentele unghiale se recoltează de la nivelul joncțiunii țesutului sănătos cu cel afectat, prin raclare cu o chiuretă sterilă sau prin cupare cu ajutorul unui foarfecă, după toaletarea zonei cu apă și săpun. Nu se recomandă decontaminarea cu alcool deoarece diminuează șansa de izolare a dermatofitelor prin cultivare. Raclarea se realizează de obicei pe partea inferioară a tablei unghiale, distal sau lateral, la joncțiunea zonei normale cu cea modificată. În cazul leziunilor de leuconichie superficială, raclarea va interesa suprafața superioară a unghiei. Materialul recoltat se expediază la laborator în plicuri de hârtie. Timp maxim de așteptare: 72 ore la temperatura camerei.

La pacienții suspecți de *tinea* sau *impetigo*, unguentele sau alte preparate aplicate în prealabil trebuie îndepărtate prin ștergere cu alcool. Pentru recoltare, se va utiliza un bisturiu neascuțit, o pensă, o chiuretă Vidal sau un careu rectangular de mochetă. Dacă leziunile sunt multiple, se va alege pentru prelevarea de probe cea mai recentă, deoarece raclarea scuamelor vechi, în curs de detașare este adesea nesatisfăcătoare pentru diagnostic. Scuamele tegumentare se recoltează prin raclarea zonei active a leziunii (de obicei cea periferică) cu ajutorul unei chiurete sterile sau prin ștergere apăsată și repetată cu un tampon steril preumezit în ser fiziologic steril.

Recoltarea cu tamponul este recomandată în cazul leziunilor de epidermofitie circinată și presupune însămânțarea imediată a prelevatului pe medii de izolare. Recoltarea cu ajutorul mochetei este mai eficientă deoarece asigură concomitent abrazarea leziunii și reținerea sporilor, crescând astfel șansele de izolare în cultură. Careurile de mochetă se aplică direct pe suprafața mediului de cultivare, se lasă în contact cu acesta cca. 5-10 minute, după care se îndepărtează.

Când leziunile sunt localizate la nivelul unor pliuri (axilar, fesier, mamar, crural etc.) și sunt umede / inflamate, recoltarea se va face cu ajutorul unui tampon pentru exsudate umectat în prealabil cu ser fiziologic, recoltarea fiind indoloreasă.

La pacienții cu *Pityriasis versicolor*, scuamele se recoltează cel mai bine utilizând un fragment de bandă adezivă transparentă (tip scotch) cu care se amprentează leziunea și care apoi se etalează pe o lamă de microscopie; în laborator, pentru efectuarea examenului microscopic direct, se va adăuga între lamă și banda adezivă o picătură de colorant, de obicei lactofenol cu albastru de anilină.

1.9. Secrețiile respiratorii joase

Sputa poate fi prelevată prin expectorație spontană (neprovocată) și prin expectorație indusă (provocată).

- a) În cazul expectorației spontane, pacientul va fi sfătuit să-și clătească cavitatea bucală cu apă distilată sterilă sau cu o soluție slab antiseptică (apă de gură) anterior colectării sputei. De asemenea, pacientul va fi instruit să nu expectoreze saliva. Colectarea probelor se va realiza prin tuse profundă urmată de expectorarea secreției într-un recipient steril, cu capac etanș. Volumul minim recoltat va fi de 2 ml. Proba se trimite la laborator în maxim 2 ore (dacă se menține la temperatura camerei) sau în 24 ore (dacă este pastrată la temperatura de refrigerare);
- b) În cazul expectorației induse, pacientul va fi îndrumat să-și perieze dinții, mucoasa linguală și gingiile, apoi să se clătească riguros cu apă. Pentru inducerea expectorației, pacientul va inhala aproximativ 30-50 ml de soluție cloruro-sodică 3-10%, aerosolizată prin intermediul unui nebulizator ultrasonic. Sputa obținută prin expectorația astfel indusă se colectează într-un recipient steril, cu capac filetat;
- c) Aspiratul traheostomic
Canula de traheostomie este colonizată într-un interval de cca. 24 ore după inserție. Aspirarea probelor se realizează cu catetere de sucțiune, iar sputa astfel obținută se colectează în recipiente sterili. Rezultatele trebuie corelate cu datele clinice și imagistice;
- d) Aspiratul endotraheal
Pentru recoltare, se utilizează un cateter de sucțiune nou, iar secreția aspirată se stochează într-un captator de spută steril. Tubul endotraheal este frecvent colonizat cu bacterii și levuri, de aceea rezultatele trebuie să fie corelate cu constatările clinice și cu datele imagistice. Extremitățile inferioare ale tuburilor endotraheale nu reprezintă probe acceptabile;
- e) Prelevatele bronhoscopice

Acestea includ lavajul bronhoalveolar (LBA), spălătura bronșică, periajul bronșic și probele biopsice transbronhiale;

Principalele etape ale bronhoscopiei:

- Bronhoscopul se introduce transnazal sau transoral la pacienții neintubați sau prin sonda endotraheală la pacienții intubați. Se înaintează cu bronhoscopul până la nivelul unei bronhii segmentare (pentru spălătura bronșică) sau a unei bronhii subsegmentare (pentru LBA);
- Se instilează fracționat soluție de NaCl 0,85% sterilă, de obicei în volum total de până la 150 ml, cu o seringă prin canalul bronhoscopului. Se aspiră ușor soluția salină într-un recipient steril înaintea administrării următoarei fracții. Se consideră că lavajul obținut reprezintă secrețiile de la nivelul a cca. un milion de alveole și bronhiiolele aferente și conține aproximativ 1 ml secreție;
- Probele recoltate în flacoane sterile, în volume suficiente, se tratează cu substanțe mucolitice de tipul N-acetil-cisteinei și se centrifughează timp de 20 minute la 1500 rpm. Timp maxim de așteptare: 2 ore la temperatura camerei sau 24 ore la 4°C.

1.10. Aspiratul pulmonar

Se recoltează prin inserarea transtoracică a unui ac în infiltratul pulmonar, sub ghidaj radiologic sau computer-tomografic. Se aspiră materialul din leziune. Dacă leziunea este de dimensiuni mari sau dacă leziunile sunt multiple, se vor colecta mai multe probe din zonele reprezentative. Aspiratul se transferă într-un recipient steril și se expediază imediat la laborator.

1.11. Biopsia pulmonară

Se efectuează în serviciile de chirurgie toracică și vizează obținerea unei piese de 1-3 cm³ țesut. Dacă leziunea este de dimensiuni mai mari sau dacă se decelează leziuni multiple, se recomandă recoltarea mai multor probe din zonele reprezentative. Probele se trimit la laborator în recipiente sterili, fără formol, protejate într-o compresă umectată cu ser fiziologic steril. Timp de așteptare: 15 minute la temperatura camerei.

1.12. Alte fluide organice normal sterile (pericardic, peritoneal, pleural, sinovial)

Se recoltează prin puncție, în volume de minim 5-10 ml, stocându-se în flacoane sterile. Probele se concentrează prin centrifugare, sedimentul însămânțându-se pe medii solide de izolare sau se transferă ca atare în flacoane conținând medii pentru hemocultură. Timp maxim de așteptare: 15 minute la temperatura camerei sau 24 ore la 4°C.

1.13. Secrețiile purulente din abcese subcutanate sau din plăgi deschise

Se prelevează fie prin aspirație, fie prin tamponament profund. Se recomandă folosirea sistemelor de transport pentru tamponate, în vederea prevenirii desicării materialului patogen. De la pacienții cu suspiciune de micetom, se recoltează puroi din leziuni pentru studierea culorii granulelor, examenul microscopic direct și cultură. De la pacienții suspecti de cromomicoză se recoltează exsudat sau cruste din leziuni pentru efectuarea de frotiuri sau preparate extemporanee în vederea decelării corpiilor fumagoizi prin examen microscopic direct. De la pacienții cu sporothricoză se recoltează probe prin amprentarea leziunilor cu ajutorul unei lame de microscopie, frotiul obținut colorându-se Gram, Musto sau cu calcofluor alb. În cazul criptococzei diseminate sau a celei cutanate, se recomandă recoltarea de probe biopsice sau raclate din leziunile cutanate în vederea efectuării de frotiuri pentru examenul microscopic direct. În cazul ulcerelor și nodulilor se urmează pașii: se decontaminează suprafața cu soluție de povidonă-iod, se îndepărtează detritusurile suprapuse și se chiuretează baza ulcerelor sau a nodulilor. Dacă exsudatul este prezent, acesta se colectează cu o seringă sau cu un tampon steril.

Timp maxim de așteptare: 2 ore la temperatura camerei.

1.14. Produsele patologice de la nivelul mucoasei orale

Se recoltează cu ajutorul unui tampon steril, preumezit în ser fiziologic, prin trecerea repetată a acestuia, de minim 10 ori, peste zonele cu leziuni. Alternativ, în cazul leziunilor pseudo-membranoase sau ulcerate, se poate recurge la raclarea ușoară a acestora cu ajutorul unei chiurete sterile. În cazul aparatelor protetice amovibile, prelevarea probelor se realizează de pe fața mucozală a acestora – zona predilectă de apariție a biofilmelor levurice. Din pungile parodontale prelevarea probelor se efectuează cu sonda parodontală, în zonele vestibulară, orală, vestibulo-distală, vestibulo-mezială, oro-distală și oro-mezială. În endodontite, probele se prelevează cu ajutorul conurilor de hârtie sterile, de diferite diametre, funcție de dimensiunea canalelor radiculare. Timp maxim de așteptare: 2 ore la temperatura camerei.

1.15. Urina

Tehnici de recoltare (fracțiunea mijlocie în timpul micțiunii spontane):

a) la femei:

- Persoana care recoltează proba trebuie să-și igienizeze mâinile în prealabil, prin spălare cu apă și săpun. Înainte de recoltare, pacientul va fi instruit în detaliu asupra manoperelor ce vor urma;
- Se îndepărtează lenjeria intimă, se toaletează zona vulvo-vaginală și deschiderea uretrei cu apă și săpun lichid, folosind un tampon de tifon, din față către spate;
- Se clătește zona cu apă sau se șterge cu un tifon umed, cu aceleași mișcări din față către spate. Fiecare tampon se utilizează o singură dată;
- În timpul micțiunii, labiile se îndepărtează;

- Se elimină un volum de aproximativ 40-50 ml urină, fără ca pacienta să-și întrerupă apoi micțiunea;
- Se recoltează apoi urina din jetul urinar mijlociu, într-un recipient steril, având grijă ca deschiderea acestuia să nu vină în contact cu suprafețe posibil contaminate;

b) la bărbați:

- Persoana care va recolta proba trebuie să fie corect igienizată prin spălarea mâinilor cu apă și săpun. Dacă pacientul este cel ce colectează urina, el trebuie să primească în prealabil instrucțiuni detaliate;
- Se toaletează glandul penisului și meatul urinar prin retractarea prepuțului (dacă nu este circumcis) și spălare cu apă și săpun lichid;
- Menținându-se prepuțul retractat, se începe micțiunea, lăsând să curgă primii mililitri de urină. Pacientul nu-și va întrerupe emisia de urină;
- Se colectează apoi urina din jetul urinar mijlociu, într-un recipient steril.

c) Recoltarea prin cateterizare vezicală

Inserarea cateterului pentru colectarea unei probe de urină este în general descurajată. Se poate totuși utiliza când urina se nu se poate obține altfel sau când pacientul se află în stare critică.

- Se toaletează deschiderea uretrei pacientului și a zonei adiacente, cu apă și săpun lichid, apoi se clătește cât mai riguros;
- Se introduce cateterul până în vezică prin tehnica recomandată, funcție de sexul pacientului;
- Se îndepărtează fracțiunea inițială, de 30-50 ml urină;
- Se colectează urina din fracțiunea mijlocie sau terminală, într-un recipient steril.

d) Recoltarea pe cateter preexistent

Trebuie de obicei evitată datorită colonizării uneori masive cu microorganisme a cateterelor.

- Se dezinfectează peretele cateterului cu alcool 70%;
- Se puncționează cateterul, în condiții de asepsie, cu ajutorul unui ac atașat la o seringă. *Niciodată se va recolta urina din puna de colectare !*
- Se aspiră urina și apoi se descarcă seringă într-un recipient steril.

e) Recoltarea prin puncție suprapubiană

Aspirația suprapubiană se practică pentru diagnosticarea infecțiilor urinare la adulți, în cazul în care se suspectează o infecție și rezultatele procedurilor de rutină au fost nerelevante. Aspirația suprapubiană este de asemenea utilizată la pacienții pediatrici, atunci când probele de urină sunt dificil de obținut.

- Se rade pilozitatea din zona suprapubiană (dacă este necesar) și se dezinfectează tegumentul cu soluție de povidonă-iod;
- Se puncționează vezica, pe linia mediană, în dreptul simfizei pubiene superioare;
- Se aspiră prin acul de puncție cca. 50-100 ml urină și se descarcă seringă într-un recipient steril.

Țimp maxim de așteptare: 2 ore la temperatura camerei.

1.16. Secrețiile vaginale

Se recoltează cu ocazia examinării pereților vaginali și a porțiunii vaginale a colului uterin. Se va efectua întotdeauna înaintea tușeului vaginal pentru a evita modificarea secrețiilor cervicale sau vaginale prin contaminare sau manevre septice. Se efectuează cu pacienta pe masa ginecologică, în poziție ginecologică (decubit dorsal, coapsele în abducție, flexate pe abdomen, gambele flexate pe coapse și sprijinite în suporturi). Valvele se aleg în funcție de mărimea vaginului pacientei. Ele sunt inegale - una mai mare și alta mai mică. Introducerea valvelor în vagin trebuie să fie indoloreă. Nu se folosește lubrifiant dacă se recoltează probe pentru frotiu citobacteriologic sau cultură. Folosirea serului fiziologic steril ca lubrifiant poate fi utilă în cazul examinării unor paciente cu vagin atrofic, deoarece facilitează introducerea valvelor și nu modifică rezultatele testelor de laborator.

Se îndepărtează cu policele și indexul mâinii stângi labile mici și se introduce mai întâi valva posterioară cu lama situată vertical, apoi printr-o mișcare de rotație și înaintare se aduce lama orizontal, menținându-se tracțiunea asupra valvei. Valva anterioară se introduce direct cu lama situată orizontal până în fundul de sac vaginal anterior. Se exercită o tracțiune divergentă asupra valvelor pentru a împiedica prinderea peretelui vaginal între valve și pentru a evidenția colul și fundurile de sac vaginale. Extragerea valvelor se face în ordine inversă introducerii lor, extrăgându-se inițial valva anterioară și ulterior valva posterioară.

Vizualizarea pereților vaginali se poate obține și prin folosirea unui speculum - instrument ginecologic care poate fi confecționat din plastic sau din metal și este alcătuit din două valve care sunt articulate printr-un șurub sau ecartor. Sunt de mai multe tipuri, mari, mici, cu lame egale, cu lame inegale, cu diverse denumiri (Cusco, Graves, Pederson, Collin). Introducerea speculumului se face fie cu lamele situate orizontal (mai ușor la multipare), fie cu lamele vertical, imprimându-se ulterior introducerii o mișcare de rotație și împingere. După introducerea speculumului, se îndepărtează lamelele cu ajutorul ecartorului și se examinează fundurile de sac vaginale și colul. Extragerea speculumului se face apropiind lamele și efectuând mișcarea în sens invers introducerii.

După introducerea valvelor sau a speculumului se observă și se notează starea mucoasei vaginale și a colului. Normal, mucoasa vaginală este de culoare roz-trandafirie, uniformă. Poate deveni violacee în sarcină sau palidă, atrofiată după menopauză. Se mai are în vedere troficitatea mucoasei vaginale, eventuale cicatrici, chisturi, noduli endometriozi, ulceratii, vegetatii, malformații și nu în ultimul rând secrețiile patologice. Acestea diferă în funcție de agentul patogen; în candidoze, secreția este albă, grunjoasă, în infecțiile cu *Trichomonas* este spumoasă, aerată, abundentă, iar gonococul produce o secreție galben-verzuie, fetidă.

Examenul colului va obiectiva situarea, orientarea, forma, mărimea, aspectul exocolului, prezența unor secreții patologice, prezența unor leziuni. Normal, colul este de culoare roz, după menopauză este palid, iar în sarcină este de culoare violacee (semnul Jacquemier). În caz de inflamații, mucoasa este hiperemiată. Pe suprafața colului se mai pot observa chiști Naboth, focare endometrioze sau noduli fibromatoși.

Pentru a fi cât mai concludentă, prelevarea trebuie să respecte anumite condiții:

- prelevarea se face înaintea instituirii tratamentului antimicrobian sau antifungic;

- nu se folosesc creme vaginale sau ovule cu cel puțin 2 zile înainte;
- nu se folosesc irigații vaginale cu cel puțin 24 de ore înainte;
- prelevarea nu se realizează în prezența sângelui în vagin;
- se folosesc recipiente sterile, pentru a preveni contaminarea probelor;
- evitarea contactului cu substanțe antimicrobiene a produsului patologic;
- în unele cazuri trebuie folosite medii de transport sau lichide conservante;
- recipientele de transport se închid ermetic pentru a preveni contaminarea mediului și a personalului care manipulează produsul biologic;
- produsul va fi însoțit de un bilet de trimitere completat corect;
- probele vor fi etichetate și transportate la laborator în cel mai scurt timp posibil.

Secreția se recoltează cu ajutorul valvelor sau a speculumului, nelubrifiate, folosind mici tampoane de vată montate pe pense port-tampon sau pipete absorbante. Instrumentarul trebuie să fie steril. Tampoanele de vată pot fi inițial umezite în ser fiziologic. Prima recoltare se face din fundul de sac posterior. Produsul recoltat se etalează pe o lamă în strat subțire, se aplică o picătură de ser fiziologic, eventual o picătură de albastru de metilen și apoi o lamelă. A doua prelevare se realizează în același mod, iar după etalarea pe lamă se aplică o picătură de KOH 10%, apoi lamela. A treia recoltare se realizează cu o baghetă sterilă sau cu un tampon pentru exsudate și presupune ștergerea fundului de sac posterior cu vârful acestora.

Probele se expediază la laborator în maxim 2 ore (stocare la temperatura camerei).

1.17. Produse patologice de la nivelul tractului genital masculin

În această grupă includem prelevatele balano-prepuțiale (pseudo-membranele candidozice), secreția prostatică, aspiratul prostatic și biopsia testiculară. În cazul leziunilor balano-prepuțiale, recoltarea probelor se realizează facil prin ștergere repetată cu un tampon steril de vată, umețat în prealabil cu ser fiziologic.

Secreția prostatică se obține prin efectuarea unui masaj digital transrectal. Colectarea probelor se realizează în tuburi sterile sau cu ajutorul unui tampon steril și va fi precedată obligatoriu de toaletarea peniană. Detectarea ecografică a abceselor prostatice permite recoltarea de probe prin aspirație cu ac fin. Aspiratul de prostată se trimite în recipiente sterile.

Biopsia testiculară se efectuează în servicii chirurgicale, în condiții de asepsie și antisepsie depline, iar probele se trimit la laborator în recipiente sterile (cele pentru cultură) sau conținând fixator Bouin (cele pentru diagnostic histopatologic).

1.18. Fragmentele tisulare biopsice

Se recoltează în timpul intervențiilor chirurgicale și se transportă învelite în tifon steril umețat cu ser fiziologic, în containere sterile. Timp maxim de așteptare: 15 minute la temperatura camerei. Fragmentele de țesut suspectate a proveni dintr-un focar de zygomicoză nu se mojarază, nu se triturează, deoarece se distruge miceliul și crește enorm riscul de a obține culturi negative.

1.19. Tehnica aspirației cu ac fin

Aspirația cu ac fin (AAF) este utilă pentru diagnosticul leziunilor care sunt ușor palpabile, cum ar fi excrescențele pielii, leziunile deformante ale țesutului subcutanat, tiroidă, limfonoduri, glande salivare și sâni. Aspirația ghidată prin tehnici imagistice cum ar fi computer-tomografia sau ultrasonografia permite obținerea de probe și în cazul leziunilor organelor interne ca pulmonul, organele abdominale și retroperitoneale, prostata etc. Riscul scăzut al complicațiilor permite executarea ei în ambulatoriu. AAF este indicată și la pacienții debilitați, cu leziuni multiple, fiind o tehnică minim invazivă.

Acele pentru puncție vor avea un calibru standard de 22-24 G și lungime de 2,5-4 cm. Lungimea și calibrul acului trebuie să fie adecvate mărimii, profunzimii, zonei și consistenței „țintei”. Pentru leziunile subcutanate mici, acele de calibru 23G și lungime de 2,5 cm sunt ideale, deși în leziunile profunde sunt necesare ace mai lungi și cu diametru mai mare. Acele fine sunt de asemenea recomandate pentru copii, și pentru organele vascularizate, cum ar fi tiroida.

Seringile recomandate în această tehnică sunt cele *single-use*, cu volum util de 10 ml. Seringile trebuie să fie de calitate, capabile să producă o presiune negativă adecvată aspirării. Seringile cu capacitate de 5 ml pot fi utilizate pentru organele vascularizate precum tiroida. Un factor important este adaptarea etanșă a acului la capătul seringii. O potrivire neglijentă a acestuia poate compromite procedura. Manipularea pistonului seringii se realizează cu o mână, iar cu cealaltă se fixează leziunea.

Tehnica aspirației

Înainte de executarea aspirației trebuie urmate etapele:

1. Efectuarea unei anamneze riguroase și a unui examen clinic detaliat, cu revederea rezultatelor radiologice și stabilirea diagnosticului prezumtiv. Trasarea cu ajutorul unui marker a zonei corporale în care se va executa aspirația;
2. Leziunea ce urmează să fie aspirată este palpată și fixată pentru a aprecia punctul optim de abordare. Se va alege în consecință acul cel mai adecvat;
3. Procedura trebuie să fie clar explicată pacientului și consimțită de acesta. Pacientul poate prezenta o stare de anxietate, fiind necesară o premedicație cu tranchilizante. Pielea se dezinfectează ferm cu un tampon de vată îmbibat în soluție iodată. Anestezia locală este uneori necesară;
4. Înainte de începerea procedurii, ne vom asigura că tot echipamentul necesar, instrumentarul și accesoriile sunt disponibile;
5. Poziționarea pacientului: orice poziție poate fi aleasă, ținându-se bineînțeles cont de confortul pacientului și asigurarea căii de abord. AAF este de obicei executată cu pacientul așezat în decubit dorsal pe un pat de examinare;
6. Imobilizarea leziunii: leziunea este fixată între policele și indexul mâinii stângi, cu pielea ușor tensionată. Se încearcă evitarea interpușierii maselor musculare importante;
7. Penetrarea leziunii: se puncționează leziunea printr-o mișcare atentă și rapidă, unghiul și profunzimea penetrării variind după caz. Pentru formațiunile mici,

este indicată aspirația din zona centrală . Pentru formațiunile mai mari, care pot avea necroze, modificări chistice sau hemoragice centrale, aspirația poate fi executată și de la periferie. Dacă se aspiră numai puroi sau material necrotic din leziunile mari, AAF poate fi repetată imediat, de la periferie. Dacă acul se plasează tangențial în cazul unei formațiuni mici sau dacă penetrează dincolo de formațiune, materialul nu va putea fi recoltat.

Notă: Dacă suprafața zonei de execuție a AAF este localizată lângă cutia toracică (formațiuni nodulare axilare sau supraclaviculare), aspirația se va executa într-un plan paralel față de cutia toracică pentru a evita pneumotoraxul. În AAF la nivelul tiroidei, pacientul trebuie instruit să nu înghită sau să vorbească când acul este plasat în interiorul formațiunii.

8. Crearea vacuumului și obținerea materialului biologic: aspirația este executată după pătrunderea în leziune și se menține în timp ce acul este acționat viguros prin multiple mișcări de „du-te - vino”, în câteva direcții diferite dar convergente. Întreaga procedură trebuie să dureze maxim 6-8 secunde. Nu se rotește acul și nici nu se fac mișcări de pompare a pistonului seringii (înăuntru-înafară). Rezultatul aspirației este extragerea de fragmente de țesut și celule dislocate de bizoul acului.
9. Eliberarea vacuumului și retragerea acului: când materialul biologic este observat la baza acului, procedura se întrerupe. Înaintea retragerii acului, se eliberează din tensiune pistonul seringii, apoi acul se scoate din formațiune, drept, fără al înclina. Pistonul revine singur, încet (fără a fi împins). O eliberare insuficientă a presiunii negative în interiorul formațiunii va cauza aspirarea materialului biologic la intrarea în seringă, ceea ce-l va face dificil de recuperat. În situații excepționale, seringă și acul pot fi clătite cu ser fiziologic sau fixator care apoi se va centrifuga pentru a prepara un frotiu. Imediat după retragerea acului, pe zona puncționată se aplică un tampon îmbibat cu dezinfectant și se presează câteva minute, de preferat de către un asistent. Aceasta se realizează cu scopul de a preveni formarea unui hematom în zonele intens vascularizate.

Bibliografie selectivă

1. Artal M E (2004) - Diagnóstico histopatológico de las micosis; ***Rev Iberoam Micol***; 21:1-9.
2. Bates D W, Cook E F, Goldman L, *et al.* (1990) - Predicting bacteremia in hospitalized patients: a prospectively validated model; ***Ann Intern Med***; 113:495-500.
3. Brouqui P, Raoult D (2001) - Endocarditis Due to Rare and Fastidious Bacteria; ***Clin Microbiol Rev***; 24(1): 177-207.
4. Buiuc D, Neguț M (1999) - ***Tratat de microbiologie clinică***; Ed. Medicală; București.
5. Cicalese L (1999) - Bacterial translocation in intestinal transplant recipients; ***Transplantation***; 67(9): S589.
6. Darby J M, Linden P, Pasculle W, *et al.* (1997) - Utilization and diagnostic yield of blood cultures in a surgical intensive care unit; ***Crit Care Med***; 25:989-994.
7. Debelian G J (1998) - Anaerobic bacteremia and fungemia in patients undergoing endodontic therapy: an overview; ***Ann Periodontol***; 3(1):281-287.
8. Doern G V (1994) - Manual blood culture systems and the antimicrobial removal device; ***Clin Lab Med***; 14:133-147.
9. Edgeworth J D, Treacher D F, Eykyn S J (1999) - A 25-year study of nosocomial bacteremia in an adult intensive care unit; ***Crit Care Med***; 27:1421-1428.
10. Golăescu M (1997) - ***Diagnosticul și tratamentul micozelor interne***; Ed. Viața Medicală Românească; București.
11. Grillot R (1996) - ***Les mycoses humaines - démarche diagnostique***; Elsevier; Paris.
12. Hampton J R, Harrison M J G (1964) - Sterile blood cultures in bacterial endocarditis; ***QJ Med***; 36:167-174.
13. Harlod C N (1986) - Cost Effective Blood Cultures - Is It Possible or Impossible to Modify Behavior? ***Infection Control***; 7(1):32-33.
14. Hoog G S de, Guarro J, Gené J, Figueras M J (2000) - ***Atlas of clinical fungi***; 2nd edition; Centraalbureau voor Schimmelcultures / Universitat Rovira i Virgili.
15. Jaimes F, Arango C, Ruiz G *et al* (2004) - Predicting Bacteremia at the Bedside; ***Clinical Infectious Diseases***; 38:357-362.
16. Lichtman Steven M (2001) - Bacterial Translocation in Humans; ***Journal of Pediatric Gastroenterology & Nutrition***; 33(1):1-10.
17. Lionaskis M S (2004) - The significance of blood cultures positive for emerging saprophytic moulds in cancer patients; ***Clin Microb Infect***; 10 (10):922-926.
18. Maoxin W, David E B (2004) - Fine Needle Aspiration, ***Cancer Investigation***; 22(4).
19. Pețeanu V, Pețeanu V, Baltă M (1997) - ***Examene și investigații în ginecologie și obstetrică***; Ed. Ex Ponto, București.

20. Richardson M D, Warnock D W (2003) - ***Fungal infection - Diagnosis and Management***; Blackwell Publishing.
21. Ronveaux O, Jans B, Suetens C, Carasauw H (1998) - Epidemiology of Bloodstream infections in Belgium 1992-1996; ***Eur J Clin Infect Dis***; 17: 695-700.
22. Sutton D A (2003) - Specimen collection, transport, and processing: Mycology; In Murray P R *et al.* (eds.); ***Manual of clinical microbiology***; 8th edition; ASM Press; Washington D C; 2:1659-1667.
23. Varghese C, Venkataraman K, Bhagwat S *et al.* (2005) - ***Manual for Cytology***; Directorate General of Health Services Ministry of Health and Family Welfare, India.
24. Warran D, Zack J, Elward A, Cox M, Fraser V (2001) - Nosocomial primary bloodstream infections in intensive care unit patients in a nonteaching community medical center: a 21-month prospective study; ***Clin Infect Dis***; 33:1329-1335.
25. Wingard J R (1999) - Fungal infections after bone marrow transplant; ***Biol Blood Marrow Transplant***; 5(2):55-68.

2

Tehnici de microscopie directă

Mihai Mareș, Bogdan Doroftei, Petru Cazacu, Maria Dan

Examenul microscopic direct al produselor patologice recent recoltate poate orienta diagnosticul către o infecție fungică și uneori poate chiar oferi indicii importante privind etiologia acesteia prin evidențierea unor formațiuni sau elemente caracteristice. El este obligatoriu pentru orice tip de prelevat cu excepția sângelui și are valoare diagnostică intrinsecă deoarece permite confirmarea rapidă a suspiciunii de infecție micotică și informarea timpurie a clinicianului, cu mult timp înainte de pozitivarea culturii. Se efectuează pe prelevate în stare proaspătă, cu sau fără colorare prealabilă (calcofluor, Giemsa etc.): lavaj bronhoalveolar (după centrifugare), biopsii (frotiuri prin amprentă), spută (după tratare cu N-acetil-cisteină), hemoculturi, prelevate superficiale – cutanate, sinusale, conjunctivale, unghiale, auriculare.

Produsele patologice pentru care există suspiciunea că ar conține fungi se pot examina microscopic prin una dintre următoarele forme:

- preparat extemporaneu între lamă și lamelă, cu soluție 20% KOH (scuame, fragmente unghiale, secreții linguale, vaginale); sensibilitatea metodei este relativ scăzută, depinzând de abilitatea și experiența anterioară a examinatorului. În acest scop, se omogenizează pe o lamă de microscopie volume egale din materialul patologic și soluția clarificantă, după care se acoperă cu o lamelă, astfel încât să se evite formarea bulelor de aer. Decelarea formațiunilor fungice în prelevate este mult ameliorată dacă la soluția clarificantă se adaugă un colorant – negru clorazol, cerneală Parker sau o substanță fluorescentă cu afinitate pentru glicanul din peretele fungilor (Blankophor, Calcofluor – în proporție de 0,1%). Utilizarea substanțelor fluorescente incumbă examinarea preparatului la un microscop cu fluorescență.
- preparat extemporaneu cu soluție 20% KOH + substanță fluorescentă sau frotiu colorat cu aceeași substanță fluorescentă (Calcofluor, Blankophor etc.); este metoda optimă de detecție a fungilor în prelevate datorită unei sensibilități și specificități excelente, dar necesită microscopie în lumină ultravioletă (fig. nr. 2-1 *vezi Anexa*). Câteva fragmente din prelevatul recoltat de la pacient se depun pe o lamă de sticlă, într-o picătură de lichid clarificant (soluție 10-20% KOH cu adaos de calcofluor 0,1%) care prin „digerarea” keratinei și a celulelor somatice va permite observarea la microscop a diverselor formațiuni

caracteristice fungilor. După un contact de cca. 10-15 minute (eventual mai îndelungat în cazul fragmentelor unghiale), lama se acoperă cu o lamelă și se examinează la microscop, cu obiectivele 10, 20 și 40, după caz. Acțiunea lichidului clarificant poate fi intensificată prin încălzirea lamei la flacăra unui bec de gaz, fără însă a-l aduce la fierbere. În general, lama se poate examina când opacitatea preparatului s-a diminuat vizibil.

- frotiu colorat Gram: pune cu ușurință în evidență filamentele, pseudohifele, artrosporii și blastosporii de dimensiuni mari, însă este inadecvată pentru detecția celulelor levurice de dimensiuni mici – de exemplu, *Candida glabrata* (fig. nr. 2-2 vezi Anexa)
- frotiu pregătit pentru imunofluorescență prin tratare cu anticorpi monoclonali cuplați cu markeri fluorescenți (în special pentru detecția *Pneumocystis jiroveci* în prelevatele respiratorii)
- preparat extemporaneu colorat cu tuș de India: pune în evidență levurile capsulate din genul *Cryptococcus*, în sedimentul LCR, urinar, etc. (fig. nr. 2-3 vezi Anexa)
- frotiu colorat May-Grunwald-Giemsa: metodă de rutină pentru depistarea levurilor intracelulare de tip *Histoplasma*, dar poate fi utilizată și pentru detectarea levurilor prin microscopie directă (fig. nr. 2-4 vezi Anexa)
- frotiu necolorat sau colorat cu albastru de metilen 3%: metoda se poate folosi pentru detectarea levurilor din hemoculturi, însă alte tehnici cu specificitate mai ridicată sunt recomandate (fig. nr. 2-5 vezi Anexa)
- preparat extemporaneu cu bandă adezivă, colorat cu albastru de metilen în lactofenol: metodă expeditivă de diagnostic tip „one-step” a leziunilor de *Pityriasis versicolor* (fig. nr. 2-6 vezi Anexa)
- frotiuri obținute prin etalare sau amprentă (pornind de la prelevate ca aspiratul bronșic, LBA sau biopsiile) care apoi se colorează Musto sau cu calcofluor și se examinează în vederea decelării aspectelor particulare care ar pleda pentru o zygomicoză, aspergiloză etc.

Elementele morfologice identificabile prin examen microscopic direct sunt levurile (burjeonate sau nu, intra- sau extracelulare, cu sau fără capsulă), fragmentele hifale, septate sau nu, uneori ramificate, celulele fumagoide - celule cu aspect muriform, melanizate, de 4-12 μm diametru, septate longitudinal și transversal, granulele (numite și scleroți - elemente sferice, dure, de cca. 1 μm diametru, formate la nivelul micetoamelor prin întreteserea densă a hifelor), rar structurile de fructificare ale unor fungi filamentoși.

2.1. Colorația negativă cu tuș de India

Scop

Se recomandă pentru decelarea levurilor aparținând speciei *C. neoformans* în sedimentul unor fluide biologice (LCR, urină, etc.).

Echipamente

Lame și lamele de microscopie, mănuși de unică folosință, pipete

Reactivi

Tuș de India sau tip Parker

Mod de lucru

1. Pe o lamă de sticlă degresată se depun și se amestecă o picătură din sedimentul probei de analizat și o picătură tuș de India;
2. Se acoperă cu o lamelă de sticlă evitând formarea bulelor de aer;
3. Preparatul extemporaneu astfel obținut se examinează la microscop (x100, x400).

Rezultatul colorării

Cryptococcus neoformans se prezintă sub formă de celule levurice rotunde, înmugurite sau nu, înconjurată de un halou clar, necolorat, facil de vizualizat pe fondul maron-negru al preparatului. Datorită necolorării capsulei polizaharidice, metoda mai poartă denumirea de “colorația negativă cu tuș de India”.

2.2. Colorația negativă cu mercurochrom 2% și tuș de India

Scop

Reprezintă o variantă îmbunătățită a metodei anterioare, permițând vizualizarea a trei zone în componența capsulei și a unor corpusculi în interiorul celulelor levurice la *C. neoformans*, ceea ce crește considerabil specificitatea examenului microscopic direct.

Echipamente

Lame și lamele de microscopie, mănuși de unică folosință, pipete

Reactivi

Soluție 2% mercurochrom ($C_{20}H_8Br_2HgNa_2O_6$ – sarea disodică a 2,7-dibrom-4-(hidroxomercurio)-fluoresceinei)

Tuș India (sau tuș negru tip Parker)

Mod de lucru

1. Pe o lamă de sticlă degresată se depun succesiv și se omogenizează o picătură din sedimentul probei de analizat, o picătură sol. 2% mercurochrom și o picătură tuș de India;
2. Se acoperă cu o lamelă;
3. Se examinează la microscop (x100, x400, x1000).

Rezultatul colorării

Cryptococcus neoformans se prezintă sub formă de celule levurice rotunde, înmugurite sau nu, înconjurată de o capsulă clară, formată din 3 zone concentrice; în interiorul celulelor levurice sunt adesea observabili corpusculi de formă rotundă.

2.3. Colorația cu lactofenol și albastru de anilină (Lactophenol Cotton Blue)

Scop

Metodă destinată colorării și evidențierii prin microscopie a fungilor din unele prelevate clinice și culturi.

Echipamente

Lame și lamele de microscopie, curate și degresate, ansă de însămânțare, mănuși de protecție, pahar Berzelius, pâlnie, hârtie de filtru, agitator magnetic.

Reactivi

Lactofenol cu albastru de anilină

Albastru de anilină.....	0,05 g
Fenol, cristale	20,00 g
Glicerol.....	40,00 ml
Acid lactic.....	20,00 ml
Apă distilată.....	20,00 ml

Prepararea acestei soluții durează cca. două zile:

1. În prima zi, se dizolvă albastrul de anilină în apa distilată. Se lasă peste noapte pentru decantarea colorantului insolubil;
2. A doua zi, purtând mănuși de protecție, se adaugă cristalele de fenol în acidul lactic, într-un pahar Berzelius. Se omogenizează apoi folosind un agitator magnetic până la dizolvarea completă a fenolului;
3. Se adaugă glicerolul;
4. Se filtrează soluția de albastrul de anilină și se adaugă în soluția de fenol / glicerol / acid lactic. Se amestecă și se păstrează la temperatura camerei în flacoane cu dop picurător.

Mod de lucru

1. Se etalează pe o lamă o cantitate suficientă de probă;
2. Se adaugă 1-2 picături soluție de lactofenol și albastru de anilină;
3. Se omogenizează ușor;
4. Se acoperă cu o lamelă și se examinează la microscop.

Rezultatul colorării

Fungii – albastru-închis

Notă:

Soluția de lactofenol și albastru de anilină este disponibilă comercial: Merck, Remel, Becton-Dickinson (Lactophenol blue solution)

2.4. Colorația cu hidroxid de potasiu și cerneală Parker

Scop

Evidențierea elementelor fungice în raclatele tegumentare, păr și fragmente unghiale, prin examen microscopic direct.

Echipamente

Lame și lamele de microscopie, curate și degresate, ansă de însămânțare, pensă

Reactivi

Hidroxid de potasiu	10 g
Glicerol.....	10 ml
Cerneală Parker Quink Permanent Blue.....	10 ml
Apă distilată.....	80 ml

Se dizolvă KOH în apă, apoi se adaugă glicerol și cerneala Parker. Glicerolul previne cristalizarea reactivului și deshidratarea probei.

Mod de lucru

1. Se utilizează o ansă de însămânțare sau pensă pentru îndepărtarea unei mici porțiuni din proba de țesut, în special din zonele necrotice sau purulente. Aceasta se etalează într-o picătură de colorant, pe o lamă de microscopie;
2. Se acoperă cu o lamelă și apoi se comprimă preparatul cu ajutorul capătului unei anse de însămânțare pentru îndepărtarea excesului de fluid. Se încălzește ușor preparatul prin trecerea acestuia de 2-3 ori prin flacăra, evitându-se fierberea;
3. După clarificarea preparatelor (15-20 minute pentru raclatele pielii și câteva ore pentru raclatele unghiale), acestea se vor examina la microscop (x10, x20, x40) pentru punerea în evidență a elementelor fungice.

Rezultatul colorării

Elementele fungice apar colorate în albastru pal.

Notă:

1. Această tehnică este frecvent utilizată, dar timpul necesar pentru clarificarea și colorarea completă poate fi mai îndelungat. Preparatele se pot păstra până când rezultatele culturii sunt cunoscute.
2. Probele negative la prima citire trebuie păstrate și reexamine în ziua următoare pentru a evita raportarea unor rezultate fals negative, datorită întârzierii clarificării și colorării probei.

2.5. Clarificarea cu hidroxid de potasiu și dimetil sulfoxid

Scop

Evidențierea elementelor fungice prin examenul microscopic direct al raclatelor tegumentare, păr și unghii (în special detecția dermatofitozelor).

Echipamente

Lame și lamele de microscopie, curate și degresate, ansă de însămânțare, pensă

Reactivi

Dimetil sulfoxid (DMSO)..... 40 ml

Apă distilată..... 60 ml

Hidroxid de potasiu 10 g

Se adaugă dimetil sulfoxidul în apa distilată și apoi se dizolvă KOH în soluția respectivă.

Mod de lucru

1. Se utilizează o ansă de însămânțare sau o pensă pentru recoltarea unei mici porțiuni din prelevat. Aceasta se etalează apoi într-o picătură de KOH-DMSO pe o lamă de microscopie;
2. Se acoperă cu o lamelă, se comprimă ușor preparatul cu ajutorul capătului unei anse de însămânțare și apoi se îndepărtează excesul de fluid. Preparatul nu se încălzește;
3. Se examinează la microscop, cu diafragma semideschisă pentru a surprinde mai ușor elementele fungice refringente, necolorate.

Note:

1. *DMSO permite o macerare și o clarificare mult mai rapide decât hidroxidul de potasiu singur.*
2. *Preparatele nu se vor păstra după examinare.*

2.6. Colorația cu calcofluor alb și KOH 10%

Scop

Evidențierea elementelor fungice din diverse prelevate, prin microscopie cu fluorescență.

Echipamente

Lame și lamele de microscopie, curate și degresate, ansă de însămânțare, pensă.

Reactivi**Soluția A**

Hidroxid de potasiu 10 g
 Glicerol 10 ml
 Apă distilată 90 ml

Se dizolvă KOH în apă și apoi se adaugă glicerolul.

Soluție B

Calcofluor alb 0,1 g
 Apă distilată 100,0 ml

Se dizolvă calcofluorul alb pulbere în apa distilată ușor încălzită.

Mod de lucru

1. Se amestecă o picătură din fiecare soluție (A și B) în centrul unei lame de microscopie;
2. Se etalează proba de țesut în soluție și apoi se acoperă cu o lamelă, comprimând preparatul cu capătul unei anse de înșămânțare. Excesul de lichid se elimină;
3. Alternativ, în funcție de natura prelevatului se pot obține și frotiuri prin amprentă sau ștergere, care se tratează apoi cu soluțiile reunite menționate;
4. Se încălzește ușor lama și se examinează la microscopul cu fluorescență echipat cu filtre adecvate.

Rezultatul colorării

Elementele fungice prezente în preparat vor apare colorate în albastru fluorescent sau verde-deschis, în funcție de filtrele utilizate.

Note:

1. *Este o metodă expeditivă și sensibilă, totuși este necesar ca microscopul cu fluorescență să fie dotat cu filtre care să determine o sensibilizare la lumina ultravioletă, cu o lungime de undă joasă, de cca. 400 nm.*
2. *Calcofluorul alb (M2R pulbere - Polysciences sau Blankophor BA - Bayer) este utilizat ca agent de albire în industria hârtiei, legându-se selectiv de celuloză și chitină. Este un colorant fluorescent pentru fungi.*

2.7. Colorația Gram *

Scop

Identificarea fungilor prin examenul microscopic al frotiurilor executate din diverse lichide biologice.

Fixator

Metanol absolut

Echipamente

Lame de sticlă pentru microscopie (25/75 mm) cu un capăt mat, pipete Pasteur, anse de însămânțare microbiologică, ace de inoculare, recipiente pentru depozitarea de deșeuri biologice

Materiale opționale, depinzând de sursa probelor și de protocolul laboratorului:

- a) plită încălzitoare, 60°C;
- b) centrifugă;
- c) agitator tip Vortex;
- d) tuburi sterile cu dop filetat;
- e) foarfece sterile, bisturie, pense.

Reactivi

Soluția de cristal violet

Cristal violet	2 g
Etanol 95%	20 ml
Oxalat de amoniu.....	0,8 g
Apă distilată.....	80 ml

Se dizolvă cristalul violet în etanol și oxalatul de amoniu în apă. Se lasă soluția de oxalat de amoniu peste noapte pentru solubilizare completă sau se încălzește ușor până la dizolvare. Se amestecă cele două soluții și apoi se filtrează.

Soluția iod-iodurată Gram (soluția Lugol)

Iod.....	1 g
Iodură de potasiu	2 g
Apă distilată.....	275 ml

Se adaugă iodul peste iodura de potasiu, în aproximativ 25 ml apă distilată. Când solubilizarea este completă se adaugă restul de apă.

Atenție! Iodul este coroziv. Se evită inhalarea, ingestia sau contactul cu pielea.

* vezi colorația Gram-calcofluor alb

Soluția de alcool-acetonă

Etanol 95% 100 ml
 Acetonă..... 100 ml

Se omogenizează și se păstrează într-un recipient brun, etichetat cu data preparării, la temperatura camerei. Soluția este stabilă 1 an.

Atenție! Etanolul și acetona sunt inflamabile.

Safranină O 0,4 %

Safranină O..... 1 g
 Apă distilată..... 250 ml

Mod de lucru

1. Frotiurile pot fi fixate prin încălzire sau cu metanol;
2. Frotiurile se pot usca în aer sau se mențin pe o platină încălzitoare electrică, la 60°C, până la uscare;
3. Dacă frotiurile sunt uscate în aer se vor trece de două sau trei ori printr-o flacăra. Pentru a evita denaturarea frotiului, acesta nu se supraîncălzește.
4. Se lasă lama să se răcescă înainte de colorare;
5. Fixarea cu metanol previne liza eritrocitelor. De asemenea, fixarea cu metanol este recomandată pentru toate prelevatele clinice lichide, în special pentru urină, deoarece previne spălarea probelor în timpul colorării. Metanolul se stochează în sticle brune cu dop etanș. O cantitate de lucru poate fi păstrată în recipienti de plastic, dacă aceasta se înlocuiește la fiecare 2 săptămâni. Pentru fixare, se adaugă câteva picături de metanol pe lamă, se lasă în contact timp de 1 minut, apoi se varsă și se lasă lama să se usuce la aer;
6. Se inundă frotiul astfel fixat, cu soluție de cristal violet. Se lasă în contact 60 secunde;
7. Se varsă soluția de cristal violet și se clătește lama ușor cu apă de robinet. *Atenție!* Clătirea excesivă poate determina îndepărtarea cristalului violet din celulele gram-pozitive. Apa se varsă pe unul din capetele lamei, oblic, pentru a asigura o curgere lentă peste frotiu.
8. Se clătește apoi cu soluție Lugol, timp de 3 secunde;
9. Se inundă frotiul cu soluție Lugol și se lasă în contact 30 secunde;
10. Se spală cu apă de robinet;
11. Se toarnă soluție alcool-acetonă peste frotiu, într-un capăt al lamei, oblic, până când soluția care se scurge la capatul opus devine clară. Timpul de decolorare variază în funcție de grosimea frotiului (în general 8-10 secunde);
12. Se spală cu apă de robinet;
13. Se inundă lama cu soluție de safranină 0,4 %, timp de 30 secunde;
14. Se îndepărtează colorantul (safranină 0,4%) cu un jet de apă de robinet ;
15. Se usucă lama în aer, în poziție verticală, iar apoi se șterge reversul acesteia cu un șervețel îmbibat în alcool sau acetonă.

Rezultatul colorării

Fungii sunt Gram-pozitivi, deci se vor colora în violet.

Note:

1. Dacă soluția de cristal violet prezintă precipitat sau sediment, se refiltrează înainte de utilizare. Unii coloranți, în special safranina, se pot contamina. Când se suspectează acest lucru, se înlocuiesc.
2. Evaporarea poate altera eficacitatea reactivilor; soluțiile de lucru trebuie schimbate regulat.
3. Zilnic sau când se folosește un nou lot de reactivi se realizează controlul de calitate prin executarea unui frotiu din *Escherichia coli* (ATCC 25922) și *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) sau *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). Acesta se fixează și se colorează după tehnica descrisă mai sus. Rezultatele colorării frotiului de control:
 - a) coco-bacili Gram-negativi: roz;
 - b) coci Gram-pozitivi: violet intens.
4. Câteva dintre cauzele cele mai frecvente care duc la obținerea unor rezultate nesatisfăcătoare ale colorației Gram:
 - a) utilizarea unor lame de microscopie insuficient degresate. Pentru acest lucru, se păstrează lamele într-un pahar cu etanol 95%. Excesul de alcool se îndepărtează prin ștergerea sau flambarea lamelor înainte de utilizare;
 - b) executarea unor frotiuri prea groase;
 - c) supraîncălzirea frotiului când acesta este fixat prin căldură;
 - d) spălarea excesivă pe durata procedurii de colorare.

2.8. Colorația Gram - calcofluor alb

Scop

Uneori, fungii nu se pot distinge cu acuratețe în frotiurile colorate Gram sau pot rămâne mascați de alte materiale din probă. În această situație, calcofluorul alb poate fi utilizat pentru supracolorarea frotiurilor colorate Gram în vederea unei mai bune evidențieri a elementelor fungice.

Echipamente

Lame și lamele pentru microscopie, hârtie de filtru, bețișoare din lemn, microscop cu fluorescență, sticlărie de laborator

Reactivi

Xilen

Metanol absolut

Soluție de hidroxid de potasiu 10 sau 20%

Calcofluor alb

Mod de lucru

1. Se colorează frotiul prin tehnica de colorare Gram;
2. Se aplică peste frotiul colorat Gram un fragment de hârtie absorbantă, pentru a-l usca;

3. Se inundă lama cu xilen pentru 1-2 ore, în funcție de grosimea frotiului;
4. Se clătesc lamele în metanol absolut pentru a îndepărta resturile tisulare;
5. Se inundă lama cu soluție KOH 10-20% pentru 1-2 ore, în funcție de grosimea frotiului;
6. Se îndepărtează KOH, se adaugă o picătură de calcofluor alb 0,1% și se omogenizează ușor cu un bețișor de lemn;
7. Se aplică apoi o lamelă prin presare ușoară. Preparatul se examinează la microscopul cu fluorescență folosind filtre speciale (490-520 nm);
8. Elementele fungice care în prealabil nu sunt vizibile sau sunt neidentificabile în frotiurile colorate Gram, pot fi distinse mai facil ca structuri fluorescente.

Notă:

Multe din prelevatele clinice trimise laboratoarelor de microbiologie pentru examinare pot conține și elemente fungice, care de multe ori sunt nedetectate sau confundate. De aceea este imperios necesară o instruire a personalului în vederea creșterii performanțelor examenului microscopic direct și în ceea ce privește detectarea elementelor fungice pe frotiuri colorate Gram.

2.9. Colorația Giemsa

Scop

Evidențierea trofozoiților și a corpurilor intrachiștici (nu și a chiștilor) la *Pneumocystis carinii*, prin examenul microscopic al frotiurilor executate din prelevate respiratorii joase.

Fixator

Metanol absolut

Echipamente

Lame și lamele pentru microscopie, curate și degresate, sticlărie de laborator, hârtie de filtru

Reactivi

Soluția Giemsa stoc

Colorant Giemsa, pulbere	0,8 g
Glicerol	50,0 ml
Metanol absolut	50,0 ml

Se dizolvă pulberea de colorant Giemsa în glicerol, apoi se încălzește soluția pe baie de apă până la 56°-60°C, timp de 90-120 minute. Se adaugă metanolul, se omogenizează și se filtrează. Soluția stoc se va păstra la temperatura camerei într-un recipient închis.

Soluție Giemsa de lucru

Soluția stoc se diluează în proporție de 1:50 cu soluție de fosfat Sorensen.

Soluție fosfat Sorensen pH 6,4

Fosfat de potasiu monobazic 6,63 g
Fosfat de potasiu dibazic anhidru 2,56 g
Apă distilată..... 1000 ml

Mod de lucru

1. Se usucă frotiul în aer;
2. Se fixează cel puțin 30 secunde (uzual 3-4 minute) în metanol absolut;
3. Se îndepărtează metanolul prin înclinarea lamei sau prin scoaterea acesteia din paharul cu fixator, apoi se usucă în aer;
4. Se introduc lamele complet uscate într-un pahar Berzelius sau se așează orizontal în suportul unei baterii de colorare care conține soluție Giemsa de lucru, pentru 20-30 minute;
5. Se spală lama cu apă distilată;
6. Se șterge pe verso, apoi se usucă în aer;
7. Se montează sau nu, apoi se examinează la microscop. Înainte de montare, lamela se introduce în xilen pentru a evita apariția bulelor.

Rezultatul colorării

Trofozoii – apar de obicei în plaje, aglomerați, cu nucleul colorat în roșu-violet și citoplasma în gri.

Note:

1. Prelungirea imersiei în soluția Giemsa diluată poate face ca materialul biologic de pe lamă să se desprindă.
2. Colorantul Giemsa este disponibil comercial.

2.10. Colorația May-Grunwald-Giemsa (MGG)

Scop

Este o colorație de elecție pentru depistarea intramacrofagică a formei levurice aparținând speciei *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*.

Fixator

Metanol absolut

Echipamente

Lame și lamele pentru microscopie, curate și degresate, sticlărie de laborator, hârtie de filtru

ReactiviSoluția de colorare I (May- Grünwald)

May-Grünwald pulbere 0,3 g
 Metanol absolut 100,0 ml

După preparare se păstrează într-un recipient etanș, la temperatura camerei timp de 24 ore. Se filtrează înainte de utilizare.

Soluția de colorare II (Giemsa)

Colorant Giemsa pulbere 1 g
 Glicerol 66 ml
 Metanol absolut 66 ml

Colorantul Giemsa se dizolvă în glicerol și apoi se încălzește la 56°C timp de 90-120 minute. Se adaugă metanolul agitând pentru omogenizare. Soluția finală se păstrează la temperatura camerei într-un recipient închis. Se filtrează înainte de utilizare.

Soluția tampon Sörensen pH 6,8

Fosfat de sodiu dibazic 0,3 g
 Fosfat de sodiu monobazic 0,7 g
 Apă distilată 100,0 ml

După preparare, soluția se păstrează la frigider; este stabilă timp de 1 an.

Mod de lucru

1. Se fixează frotiurile în metanol absolut, timp de 30 secunde;
2. Se îndepărtează metanolul;
3. Se aplică soluția de colorare I proaspăt diluată 1:1 cu soluție tampon, timp de 5 minute (lama va fi poziționată orizontal sau introdusă într-un pahar);
4. Se transferă lamele fără spălare prealabilă în soluția de colorare II diluată recent cu 9 părți de soluție tampon, pentru 10-15 minute;
5. Se imersează lamele în soluție tampon pentru îndepărtarea colorantului;
6. Se spală lamele cu apă de robinet din abundență;
7. Se transferă într-un pahar cu apă pentru 2-5 minute;
8. Se usucă apoi într-o poziție oblică. Nu se usucă prin ștergere;
9. Se poate monta o lamelă, însă nu este neapărat necesar.

Rezultatul colorării

Fungii – nuanțe de roz, albastru, violet

Note:

1. Este important ca lamele să nu se usuce în timpul colorării, pentru a preveni apariția artefactelor sau formarea de precipitate.
2. Soluția stoc May-Grunwald și colorantul Giemsa sunt disponibile comercial

2.11. Colorația Wright

Scop

Evidențierea formelor levurice la *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* prin examen microscopic al frotiurilor executate din sânge și măduvă osoasă hematogenă

Fixator

Metanol absolut

Echipamente

Lame și lamele pentru microscopie, curate și degresate, sticlărie de laborator, hârtie de filtru

Reactivi

Soluție de colorare (care poate fi achiziționată ca soluție gata preparată sau ca pulbere din diverse surse comerciale)

Colorant Wright pulbere 0,3 g
Metanol absolut 100,0 ml

După preparare, soluția se menține într-un recipient etanș la temperatura camerei timp de 24 ore și se filtrează înainte de utilizare.

Soluție tampon Sorensen pH 6,4

KH_2PO_4 anhidru 6,63 g
 Na_2HPO_4 anhidru 2,56 g
Apă distilată ad 1000 ml.

Mod de lucru

1. Se usucă frotiul și se fixează apoi cel puțin 30 secunde în metanol absolut;
2. Se îndepărtează metanolul prin înclinarea lamei;
3. Se aplică soluția de colorare, timp de 2 minute, peste lama poziționată orizontal, numărând picăturile;
4. Se adaugă peste colorant aceeași cantitate din soluția tampon. Se omogenizează atent colorantul și soluția tampon fără a atinge suprafața filmului de lichid (va apare o strălucire metalică la suprafața amestecului);
5. Se lasă amestecul în contact cu frotiul timp de 3 minute;
6. Se clătește lama cu apă distilată timp de 30 secunde;

7. Lamele se usucă în poziție verticală. Nu se vor șterge;
8. Dacă se dorește, frotiul se poate monta prin acoperire cu o lamelă.

Rezultatul colorării

Fungii – culoare violetă

2.12. Colorația cu mucicarmin Southgat

Scop

Colorația se utilizează pentru detectarea materialului capsular la *Cryptococcus neoformans*

Echipamente

Lame și lamele de microscopie, curate și degresate, ansă de însămânțare, pahare Berzelius, pâlnie de filtrare, hârtie de filtru, baie de apă

Reactivi

Roșu Carmin..... 1,0 g
Hidroxid de aluminiu pulbere..... 1,0 g
Etanol 50% 100,0 ml

După omogenizarea acestor substanțe, în soluție se adaugă:

Clorură de aluminiu anhidră..... 0,5 g

Se fierbe pe baia de apă pentru 2-3 minute, apoi se lasă să se răcească. Se completează până la volumul inițial cu etanol 50% și apoi se filtrează. Soluția stoc este stabilă câteva luni.

Hematoxilina Ehrlich

Vezi colorația hemalaun-eozină

Alcool acid 0,5%

Vezi colorația hemalaun-eozină

Mod de lucru

1. Se hidratează secțiunile sau se execută un frotiu (după caz);
2. Se colorează cu hematoxină timp de 15 minute;
3. Se diferențiază cu alcool-acid și apoi se clătesc cu apă de robinet;
4. Se colorează pentru 30 minute în soluția roșu carmin;
5. Clătire în apă distilată, deshidratare, clarificare și montare.

Rezultatul colorării

Mucicarminul colorează mucinele acide în roz (capsula va deveni astfel colorată)

2.13. Colorația Musto

Scop

Punerea în evidență a elementelor fungice prin examenul microscopic al frotiurilor

Echipamente

Lame și lamele pentru microscopie, curate și degresate, sticlărie de laborator, plită electrică, vase din sticlă Pyrex

Reactivi

Metenamină - soluție stoc

Metenamină 3 %..... 100 ml

Azotat de argint 0,15 %..... 5 ml

În momentul adăugării soluției de metenamină peste soluția de azotat de argint, se va forma un precipitat alb, care va dispărea prin agitarea paharului. Soluția finală este stabilă 3 luni și se păstrează la 4°C.

Atenție! Corozivă, posibil carcinogenă.

Metenamină - soluție de lucru

Borax 5%..... 2 ml

Apă distilată..... 25 ml

Metenamină soluție stoc 25 ml

Se adaugă soluția de borax în apă distilată, apoi se omogenizează cu soluția stoc de metenamină. Se prepară extemporaneu.

Acid cromic 5%

Trioxid de crom 5 g

Apă distilată..... 100 ml

Soluția se poate păstra 6 luni.

Atenție! Acidul este coroziv, posibil carcinogen. Se vor evita contactul și inhalarea.

Borax 5%

Borat de sodiu..... 5,0 g
Apă distilată..... ad 100,0 ml

Soluția este stabilă 3 luni.

Bisulfid de sodiu 1%

Bisulfid de sodiu..... 2 g
Apă distilată..... ad 200 ml

Se păstrează la 4°C.

Clorură de aur 0,2%

Clorură de aur 0,2 g
Apă distilată..... 100,0 ml

Se păstrează la frigider în recipiente etanșe, riguros igienizate în prealabil.
Soluția este stabilă 1 an.

Atenție! Se evită contactul și inhalarea.

Tiosulfat de sodiu 2 %

Tiosulfat de sodiu 4 g
Apă distilată..... ad 200 ml

Se păstrează la 4°C.

Verde luminos 1%

Verde luminos SF yellow 1 g
Apă distilată..... ad 100 ml
Acid acetic glacial 5 picături

După preparare se păstrează la frigider.

Atenție! Se evită contactul și inhalarea.

Mod de lucru

1. Fixarea: se încălzește acidul cromic 5% până la 65°C pe o plită electrică și apoi se imersează imediat lamele timp de 1 minut;
2. Clătire de două ori în apă distilată ;
3. Se introduc preparatele în bisulfitul de sodiu, timp de 1 minut;
4. Se clătesc lamele în apă distilată

5. Impregnarea argentică: soluția de lucru se transferă într-un vas de sticlă Pyrex și apoi se imersează lamele. Se încălzește rapid la 90-95°C timp de 2-3 minute: soluția își schimbă culoarea de la cenușiu la negru, iar lamele devin maro;
6. Clătire de trei ori în apă distilată;
7. Lamele se introduc în clorură de aur 0,2% timp de 1 minut;
8. Clătire cu apă distilată;
9. Imersare în tiosulfat de sodiu, timp de 1 minut;
10. Clătire cu apă distilată;
11. Contra-colorarea cu verde luminos, timp de 1 minut;
12. Clătire cu apă de robinet, timp de 2 minute;
13. Deshidratare în etanol 95% câteva secunde, apoi în alcool absolut, de două ori timp de câteva secunde;
14. Se introduc lamele în xilen sau metil-ciclohexan câteva secunde, pentru clarificare;
15. Se montează lamele în Eurik.

Rezultatul colorării

Fungii – culoare brun-negriciosă

Fondul – verde

Notă:

1. *Colorația Musto este versiunea rapidă a metodei Gomori-Grocott, utilizând tot principiul impregnării argentice.*
2. *Soluțiile din bateria de colorare se reînnoiesc după 4 etape sau din 2 în 2 săptămâni.*
3. *Această metodă comportă în principal trei faze:*
 - *fixarea cu acid cronic*
 - *colorarea cu nitrat de argint - metenamină*
 - *contra-colorare cu verde luminos*
4. *Oxidarea grupării hidroxil a polizaharidelor fungice parietale și complexarea lor cu reactivul argentic, determină colorația brun-negricioasă a fungilor pe un fond verde al preparatului.*
5. *Această tehnică prezintă mai multe avantaje:*
 - *reproductibilitate excelentă și rapiditate (aproximativ 20 minute)*
 - *costuri moderate*
 - *posibilitatea de aplicare pentru o varietate largă de probe biologice, inclusiv pentru prelevatele bronho-alveolare în investigarea pentru pneumocistoză*
 - *simplitatea tehnicii și ușurința cu care se detectează elementele fungice, chiar dacă acestea sunt foarte rare*
6. *Pentru reușita colorației trebuie respectate trei condiții esențiale:*
 - *indicațiile tehnice*
 - *folosirea unei lame-martor la fiecare serie de colorare*
 - *reînnoirea regulată a reactivilor*
7. *Frotiurile sero-fibrinoase (lichid pleural, articular etc.) prezintă uneori inconvenientul că se desprind de pe lamă în cursul colorării. Acest inconvenient nu poate fi remediat, dar dacă frotiul nu s-a desprins în totalitate se poate recurge la o metodă de examinare microscopică directă între lamă și lamelă.*

Bibliografie selectivă

1. Bridgman C P (1992) - ***Micoscopic Anatomy Laboratory Manual***; Washington University School of Medicine, St. Louis, Missouri.
2. Buiuc D, Neguţ M (1999) - ***Tratat de microbiologie clinică***; Ed. Medicală; Bucureşti.
3. Golăescu M (1997) - ***Diagnosticul şi tratamentul micozelor interne***; Ed. Viaţa Medicală Românească; Bucureşti.
4. Grillot R (1996) - ***Les mycoses humaines - démarche diagnostique***; Ed. Elsevier; Paris.
5. Hoog G S de, Guarro J, Gené J, Figueras M J (2000) - ***Atlas of clinical fungi***; 2nd ed; Centraalbureau voor Schimmelcultures / Universitat Rovira i Virgili.
6. Houwen B (2000) - ***Blood Film Preparation and Staining Procedures***; Laboratory Hematology; Carden Jennings Publishing Co Ltd.
7. Richardson M D, Warnock D W (2003) - ***Fungal infection - Diagnosis and Management***; Blackwell Publishing.
8. Zerba R, HuiHuicho L, Guillen A (1996) - Modified India ink preparation for *C.neoformans* in cerebrospinal fluid specimens; ***J Clin Microbiol***; 34(9):2290-2291.

3

Medii de cultivare

Luminița Malic, Olimpia Bazgan, Mihai Mareș

3.1. Generalități

Definirea mediilor de cultură într-o manieră completă și complexă, în contextul varietății covârșitoare a entităților taxonomice microbiene și a exigențelor nutritive extrem de diverse pe care acestea le reclamă în dezvoltarea lor, este o încercare destul de dificilă pentru microbiologul practician. Acest demers rămâne în domeniul speculativ, deoarece orice încercare în acest sens va tinde să satisfacă mai curând legile semanticii decât rigorile practicii medicale.

Totuși, putem defini mediile de cultură ca un complex de substanțe chimice pure sau dimpotrivă, de substraturi organice și minerale cu un grad mai redus de puritate, care să ofere microorganismelor posibilitatea dezvoltării și multiplicării, imitând pe cât posibil condițiile trofico-habituale din organisme gazdă sau din biotopurile naturale specifice.

Izolarea în condiții de laborator a fungilor din prelevatele patologice, indiferent de natura lor, este o necesitate indiscutabilă pentru înțelegerea procesului morbid infecțios și pentru inițierea terapiei etiotrope.

Diversitatea fungilor, ca bioentități cu potențial patogen, justifică includerea în mediile de cultură a unei game largi și variate de nutrienți care să asigure izolarea și/sau identificarea lor în condiții optime. Au fost formulate astfel o multitudine de medii de cultivare incluzând ingrediente cu grade diferite de specificitate, care să corespundă dezideratelor de eficiență, precizie și expeditivitate din micologia clinică.

Investigarea particularităților biochimice ale fungilor, în special a profilului lor enzimatic, a făcut posibilă în ultimul timp formularea unor medii de cultură mai complexe, care permit identificarea mai facilă a acestor microorganisme din prelevatele patologice. Astăzi, o adevărată industrie, susținută de o intensă activitate de cercetare, produce o gamă extrem de diversificată de substraturi nutritive și medii de cultivare, care oferă generoase posibilități de folosire în demersul diagnostic al bolilor infecțioase induse de fungi.

3.2. Compoziția mediilor de cultură

Particularitățile metabolice și numărul apreciabil al fungilor incumbă folosirea unor substraturi nutritive variate, făcând practic imposibilă obținerea unui mediu standard pentru toate speciile de interes medical. Unele formule (Sabouraud, Czapek, PDA) permit totuși dezvoltarea unui număr mare de entități taxonomice aparținând mai multor genuri.

În general, principalele componente ale mediilor de cultură sunt reprezentate de substanțele nutritive, agenții revelatori, factorii inhibitori, apa și agenții de solidificare (în cazul mediilor solide).

Substanțele nutritive sau nutrienții sunt reprezentate de o grupare pletorică de substanțe chimice care sunt incluse în medii pentru a oferi fungilor: o sursă de carbon, o sursă de azot și promotori de creștere (substanțe minerale, vitamine, acizi grași etc.). Din punct de vedere al structurii chimice, nutrienții pot fi:

- în cazul surselor de carbon:
 1. monozaharide (glucoza sau dextroza, fructoza, manoza, galactoza, xiloza, ramnoza, arabinoza)
 2. di- și oligozaharide (zaharoza sau sucroza, lactoza, maltoza, celobioza, trehaloza, rafinoza)
 3. polizaharide (amidon, glicogen, celuloză, chitină etc.)
 4. acizi organici (tartric, citric, oxalic, malonic etc.)
 5. lipide
- în cazul surselor de azot:
 1. substanțe anorganice azotate (nitrați, nitriți, săruri de amoniu)
 2. peptide și proteine (peptonă, hidrolizat de cazeină, gelatină, cazeină, keratină, ovalbumină)
 3. aminoacizi (glicină, triptofan, glutamină, histidină ș.a.)
 4. uree
- în cazul promotorilor de creștere:
 1. substanțe minerale (sub formă de săruri care să conțină Na, K, Mg, Ca, Fe, Cu, Zn, Co, P, S ș.a.)
 2. vitamine (tiamină, acid nicotinic, inozitol etc.)
 3. acizi grași cu lanț lung de atomi de carbon (C_{12} - C_{24}), necesari pentru dezvoltarea levurilor lipodependente ale genului *Malassezia*.

Se recomandă ca în mediile de cultură solide destinate izolării fungilor, raportul C:N să fie de 9-12:1. Factorii inhibitori sunt reprezentați de substanțe ce pot supresa dezvoltarea unor categorii de microorganisme, mai ales a celor contaminante, indezirabile în manoperele de izolare și identificare a fungilor cu semnificație clinică. Este vorba, în principal, de bacterii și fungi saprobioți, ubicuitari, care alături de fungii patogeni sau condiționat patogeni, compun în mod obișnuit microflora diverselor prelevate recoltate din situsuri normal nesterile. Pentru anihilarea dezvoltării bacteriilor, se recomandă înglobarea în mediile de cultură destinate izolării fungilor, a unor substanțe din grupa antibioticelor (penicilină, streptomycină, cloramfenicol, gentamicină, ciprofloxacina, tobramicină) sau a coloranților (cristal violet, Rose Bengal).

Izolarea fungilor patogeni este favorizată de însămânțarea prelevatelor pe medii solide ce conțin cicloheximidă, substanță capabilă să inhibe parțial sau total dezvoltarea fungilor contaminanți.

Formularea unor medii diferențiale, care să asigure o bună discriminare între diferitele specii de fungi potențial prezente în diverse prelevate, a presupus includerea unor agenți revelatori în compoziția mediilor de cultură; în marea lor majoritate, aceștia sunt substraturi ale diverselor enzime produse în special de micromiceții levuriformi, prin a căror scindare se formează compuși fluorescenți (identificabili în lumina ultravioletă) sau compuși caracterizați printr-o culoare specifică.

Primele medii diferențiale cromogene, utilizate pentru identificarea prezumtivă a diverselor specii de *Candida*, au fost mediul Nickerson și mediul Pagano-Levin, agenții revelatori folosiți fiind reprezentați de sulfitul de bismut, respectiv sărurile de trifenil-tetrazoliu. Însă numărul redus de specii identificabile a determinat în timp renunțarea la aceste medii și înlocuirea lor cu altele mai performante, atât ca spectru de microorganisme identificabile, cât și ca grade de specificitate și sensibilitate ale metodei.

Paleta acestor medii diferențiale este destul de largă, doar în cazul speciei *Candida albicans* și a altor câtorva levuri, fiind disponibile comercial nu mai puțin de 6 astfel de medii (*tabelul 1-1*). Ele conțin substratul fluorogen sau cromogen pentru una sau două enzime (β -D-galactozaminidază și/sau L-prolin-aminopeptidază), permițând chiar izolarea și identificarea simultană, într-o singură etapă, a levurilor din diverse prelevate, fără a fi necesară utilizarea suplimentară a altor medii.

3.3. Prepararea și sterilizarea mediilor

Prepararea mediilor este o etapă extrem de importantă, care condiționează hotărâtor dezvoltarea, replicarea și exprimarea fenotipică plenară a tuturor caracterelor culturale ale fungilor. Calitatea ingredientelor, modul de solubilizare a acestora, succesiunea adăugării lor, ajustarea pH-ului și repartizarea mediilor în vederea sterilizării pot reprezenta tot atâtea factori limitativi ai demersului diagnostic, dacă nu li se acordă importanța cuvenită.

În prezent, în laboratoarele de diagnostic microbiologic este cvasigeneralizată prepararea mediilor de cultură prin hidratarea asocierilor complete de ingrediente standardizate, condiționate sub formă de pulbere, comercializate de diferite firme. Prin utilizarea unor astfel de medii standardizate sunt eliminate inconvenientele legate de procurarea unor ingrediente de calitate, iar rezultatele obținute prin cultivarea fungilor sunt reproductibile.

În general, mediile deshidratate sunt reconstituite prin solubilizarea unor cantități precise de pulbere în apă distilată sau apă de robinet, de preferat încălzită la 70°-80°C, urmată apoi de fierberea amestecului până la dizolvarea completă a tuturor ingredientelor. În cazul mediilor ce conțin ingrediente care nu suportă încălzire la temperaturi crescute, se va renunța la etapa de fierbere.

În general, la prepararea mediilor de cultivare comercializate se vor respecta riguros instrucțiunile firmei producătoare.

După preparare, mediile repartizate în flacoane sau tuburi se vor steriliza prin autoclavare, timp de 15-20 minute la 121°C (sau respectând parametrii recomandați de

producător). Componentele ce nu pot fi autoclavate datorită termolabilității lor, se vor prepara separat și se vor adăuga la mediul de bază după sterilizarea acestuia.

În vederea autoclavării eficiente se recomandă repartizarea mediilor în flacoane cu o capacitate care să nu depășească 400-500 ml. Cele mai indicate sunt cele confecționate din sticlă Pirex, gradate, cu capac filetabil, tip Deltalab - Spania.

3.4. Controlul de calitate și păstrarea mediilor

Fiecare nou lot de medii de cultură, indiferent de proveniența sa (medii gata de folosire, repartizate în plăci sau tuburi "single-use" livrate de diverse firme sau medii preparate în laborator) va fi supus unui control de rutină care vizează analiza unor însușiri esențiale cum ar fi aspectul, pH-ul, sterilitatea și performanțele mediului.

Aspectul (culoare, transparență, consistență) și pH-ul trebuie să corespundă parametrilor standard specifici pentru respectivul mediu de cultivare. Starea de sterilitate a mediilor se verifică prin incubarea câtorva recipiente la temperaturile de 30°C, respectiv 37°C, timp de 24-48 ore. Absența dezvoltării unor colonii bacteriene sau fungice indică o corectă sterilizare a mediului. Performanțele de creștere se verifică utilizând tulpini tip din colecția laboratorului, alese în funcție de tipul de mediu și de recomandările privind aplicabilitatea acestuia în diagnostic:

- Mediile de izolare neselective se verifică prin evaluarea capacității lor de a asigura dezvoltarea optimă a tulpinilor însămânțate;
- Mediile selective se verifică prin însămânțarea unor tulpini tip rezistente și a unora sensibile la agenții inhibitori existenți în mediu;
- Calitatea mediilor diferențiale se evaluează prin modul de reacție al acestora în urma însămânțării cu tulpini producătoare de reacții pozitive și negative.

Conservarea mediilor de cultură preparate în laborator și a celor reconstituite prin rehidratare se face de preferință la temperaturi de refrigerare (2°-8°C), plăcile Petri plasându-se în pungi de polietilenă sau cutii închise ermetic, iar tuburile vor fi etanșeizate cu dopuri confecționate din material neporos pentru a preveni desicarea. În aceste condiții, mediile condiționate în plăci Petri se pot păstra până la 3 luni, iar cele în tuburi cu dop etanș până la 6 luni. Excepție fac unele medii ce conțin ingrediente perisabile, degradabile, a căror stocare în timp este limitată.

Tabelul 3-1

Utilitatea diagnostică a unor medii cromogene

Denumirea mediului și firma producătoare	Specii identificate	Aspectul coloniilor
CandiSelect™ 4 (Bio-Rad)	<i>Candida albicans</i>	Culoare roz-violet, contur regulat
	<i>C. tropicalis</i>	Culoare turcoaz intensă, bombate, contur regulat, de tip S.
	<i>C. glabrata</i>	Culoare turcoaz mai estompată, strălucitoare, plate, contur regulat, de tip S.
	<i>C.krusei</i>	Culoare verde-turcoaz, mate, contur neregulat, de tip R.
Chromogenic Candida Agar (Oxoid)	<i>C. albicans</i>	Culoare verde
	<i>C. tropicalis</i>	Culoare albastru-închis
	<i>C. krusei</i>	Culoare roz-închis, mate, contur neregulat
	<i>C. glabrata</i>	Culoare galben-bej
	<i>C. parapsilosis</i>	Culoare brună
CHROMagar Candida (BD Sciences)	<i>C. albicans</i>	Culoare verde-smarald
	<i>C. glabrata</i>	Culoare violet-deschis (lila), mate
	<i>C. krusei</i>	Culoare roz-pal, albicioase la periferie, de tip R
	<i>C. tropicalis</i>	Culoare albastră-verzuie până la albastru-metalizat
Candida ID2 (bioMérieux)	<i>C. albicans</i>	Culoare albastră
	<i>C. tropicalis</i>	
	<i>C. lusitaniae</i>	Culoare roz
	<i>C. kefir</i>	
Candichrom II (Elitech, Franța)	<i>C.albicans</i>	Culoare alb -crem, colonii lucioase, albastre verzui
	<i>Alte levuri</i>	Culoare albă
Agar cu extract de semințe de Niger (Birdseed Agar)	<i>Cryptococcus neoformans</i>	Culoare brună
	<i>Alte levuri</i>	Culoare alb – crem

Medii de cultivare**M01 Agar acetat Fowell**

Compoziție	
<i>Acetat de sodiu x 3H₂O</i>	5 g
<i>Agar</i>	20 g
<i>Apă purificată</i>	ad 1000 ml

- Preparare:** se dizolvă acetatul de sodiu trihidrat în apă, după care se ajustează pH-ul între 6,5-7 înainte de a adăuga agarul. Se încălzește amestecul până la completa solubilizare a agarului. Se sterilizează prin autoclavare, la 121°C timp de 15 minute.
- Aspect:** geloză translucidă
- pH final la 25°C :** 6,5-7
- Controlul calității:** *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763 – dezvoltare cu producere de ascospori
- Utilizare:** stimularea producerii formelor sexuate la levuri
- Stocare:** în eprubete, 4 luni la 2°-8 °C, în plăci o lună la 2°-8°C
- Disponibil comercial:** nu se comercializează.

M02 Agar acetat McClary

Compoziție	
<i>Acetat de potasiu</i>	9,8 g
<i>Glucoză</i>	1 g
<i>Clorură de sodiu</i>	1,2 g
<i>Sulfat de magneziu heptahidrat</i>	0,7 g
<i>Extract de drojdie</i>	2,5 g
<i>Agar</i>	15 g
<i>Apă purificată</i>	ad 1000 ml

- Preparare:** se dizolvă ingredientele în apa preîncălzită, înainte de a adăuga agarul. Se încălzește amestecul până la completa solubilizare a agarului. Se sterilizează prin autoclavare, la 121°C timp de 15 minute.
- Aspect:** geloză gălbuie, translucidă
- pH final la 25°C :** 6,0 ± 0,2
- Controlul calității:** *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763 – dezvoltare cu producere de ascospori
- Utilizare:** stimularea producerii formelor sexuate la levuri
- Stocare:** în eprubete 4 luni la 2°-8 °C, în plăci o lună la 2°-8°C
- Disponibil comercial:** nu se comercializează.

M03 Agar BCG Candida

Compoziție	
<i>Peptonă</i>	10,0 g
<i>Extract de drojdie</i>	1,0 g
<i>Dextroză</i>	40,0 g
<i>Agar</i>	15,0 g
<i>Verde de bromcrezol</i>	0,02 g
<i>Apă distilată</i>	ad 1000 ml

- Preparare:** ingredientele se dizolvă în apa distilată și se fierb un minut până la completa dizolvare. Se autoclavează la 121°C timp de 15 minute. Se adaugă neomicină 500 mg/l, după răcirea mediului la o temperatură de 50-55°C.
- Aspect:** geloză albastru-verzuie, ușor opalescentă
- pH final la 25°C:** 6,1 ± 0,1
- Controlul calității:** *Candida albicans* ATCC 10231: virarea culorii mediului spre galben.
Candida tropicalis ATCC 9968: virarea culorii mediului spre galben.
Escherichia coli ATCC 25922: virarea culorii mediului spre verde.
- Utilizare:** mediu diferențial și selectiv folosit pentru izolarea primară și detecția speciilor genului *Candida* din prelevatele clinice. Plăcile Petri însămânțate se incubează 72 ore la o temperatură de 30° ± 2 °C.
- Stocare:** 2°–8 °C
- Disponibil comercial:** Difco (SUA)

M04 Agar BIGGY (Agar bismut - sulfat - glucoză - glicină - drojdie)
Agar Nickerson

Compoziție	
<i>Citrat amoniacal de bismut</i>	5,0 g
<i>Sulfat de sodiu</i>	3,0 g
<i>Dextroză</i>	10,0 g
<i>Glicină</i>	10,0 g
<i>Extract de drojdie</i>	1,0 g
<i>Agar</i>	16,0 g
<i>Apă distilată</i>	ad 1000 ml

- Preparare:** ingredientele se dizolvă în apa distilată preîncălzită, sub agitare continuă. Mediul se răcește la 45 - 50°C, după care se

Medii de cultivare

	repartizează în plăci Petri. Nu se autoclavează. Înainte de utilizare se recomandă verificarea sterilității și a pH-ului.
Aspect:	mediu omogen, opalescent, alb-gălbui
pH final la 25°C:	6,8 ± 0,2
Controlul calității:	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231 ++ <i>Candida kefyr</i> ATCC 8553 ++ <i>Candida tropicalis</i> ATCC 1369 ++
Utilizare:	mediu recomandat pentru izolarea și identificarea speciilor aparținând genului <i>Candida</i> . Inocularea se realizează din culturi proaspete, iar incubarea are loc la o temperatură de 25° ± 2°C, 18-24 ore (3-5 zile dacă este necesar)
Stocare:	2°-8°C
Disponibil comercial:	Becton – Dickenson (SUA)

M05 Agar Blasto "D"

Compoziție	
<i>Glucoză</i>	7 g
<i>Tween 80</i>	0,2 ml
<i>Sulfat de potasiu</i>	0,5 g
<i>Citrat de magneziu</i>	1,5 g
<i>Fosfat dipotasic</i>	5 g
<i>Asparagină</i>	5 g
<i>Aminoacizi de tipul</i>	
<i>"Casamino"</i>	3 g
<i>Clorură de sodiu</i>	0,85 g
<i>Agar</i>	15 g
<i>Apă deionizată</i>	ad 1000 ml

Preparare:	ingredientele se adaugă în apa purificată preîncălzită și se fierb apoi sub agitare până la completa lor dizolvare. Se sterilizează prin autoclavare la 121°C timp de 15 minute.
Aspect:	geloză clară, transparentă
pH final la 25°C:	6,6 ± 0,2
Utilizare:	transformarea formei filamentose în formă levurică la specia <i>Blastomyces dermatitidis</i> , prin incubare la 37°C.
Stocare:	în eprubete 2 luni la 2°-8 °C, în plăci o lună la 2°-8°C
Disponibil comercial:	nu se comercializează.

**M06 Agar Bromcrezol purpur – cazeină - glucoză
(Bromcresol purple casein glucose Agar)**

Compoziție soluție A	
Lapte ecremat	80 g
Soluție etanolică de Bromcrezol purpur 1,6%	2 ml
Apă distilată	ad 1000 ml

Compoziție soluție B	
Glucoză	40 g
Agar	30 g
Apă distilată	ad 1000 ml

- Preparare:** după solubilizarea ingredientelor în apa distilată preîncălzită, cele două soluții se sterilizează separat astfel: sol. A - 8 minute la 115°C, sol. B - 15 minute la 121°C. După răcire la 45°-50°C, cele două soluții se amestecă, se omogenizează, se ajustează pH-ul la valoarea 6,6 și apoi se repartizează în tuburi sterile, în pantă.
- Aspect:** geloză în pantă, bleu pal, opacă
- pH final la 25°C :** $6,6 \pm 0,2$
- Controlul calității:** *Trichophyton rubrum* ATCC 28188: dezvoltare fără alcalinizare (mediul nu își modifică nuanța);
Trichophyton mentagrophytes ATCC 9533: dezvoltare cu alcalinizare (virarea culorii în violet-purpuriu);
- Utilizare:** test de identificare a speciilor de dermatofiți
- Stocare:** o lună la temperatura de refrigerare
- Disponibil comercial:** nu se comercializează.

M07 Agar Ciocolat (Agar Chocolate)

Compoziție	
Triptonă	15,0 g
Peptonă din soia	5,0 g
Clorură de sodiu	5,0 g
Agar	15,0 g
Apă distilată	ad 1000 ml
Sânge defibrinat ovin	5-10 %

- Preparare:** se dizolvă ingredientele în apa distilată preîncălzită și se fierb un minut. Mediul se repartizează (câte 90 ml) în flacoane și se sterilizează prin autoclavare la 121°C timp de 15 minute. După sterilizare, mediul se răcește la 75°-80°C, moment în care se

Medii de cultivare

	adaugă câte 10 ml de sînge defibrinat ovin în fiecare flacon. Se agită sub protecția unei hote bacteriologice de clasă II, până la apariția culorii brun-ciocolatii.
Aspect:	geloză brun-roșcată, opacă
pH final la 25°C :	7,3 ± 0,2
Controlul calității:	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231 ++ (colonii gri, de consistență cremoasă, cu filamentare evidentă la periferie - aspect stelat) <i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019 ++ (colonii netede, fără filamentare periferică)
Utilizare:	identificarea tulpinilor de <i>Candida albicans</i> prin incubare la 37°C, în atmosferă cu 6% CO ₂ , timp de 48 ore
Stocare:	2°-8°C
Disponibil comercial:	mediul bază - Becton Dickenson (SUA), Remel (SUA), Biokar Diagnostics (Franța)

M08 Agar Christensen

Compoziție soluția A	
<i>Peptonă</i>	1 g
<i>Glucoză</i>	1 g
<i>Fosfat monopotasic</i>	2 g
<i>Clorură de sodiu</i>	5 g
<i>Uree</i>	20 g
<i>Roșu fenol</i>	0,012 g
<i>Apă distilată</i>	100 ml

Compoziție soluția B	
<i>Agar</i>	15 g
<i>Apă distilată</i>	900 ml

Preparare:	se pregătește soluția A și se sterilizează prin filtrare, apoi se fierbe agarul cu apa distilată până la dizolvare. Soluția B se sterilizează prin autoclavare la 121°C timp de 15 min, iar după răcire la 50°C se adaugă soluția A preîncălzită. Mediul astfel obținut se repartizează în tuburi și se lasă să se solidifice în poziție înclinată. Soluția A se poate steriliza și prin autoclavare, în acest caz ureea adăugându-se sub formă de soluție sterilă, după răcirea amestecului la 50°C.
Aspect:	geloză galben-orange, transparentă
pH final la 25°C :	6,8 ± 0,2
Controlul calității:	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231 – dezvoltare fără modificarea culorii mediului; <i>Cryptococcus albidus</i> ATCC 66030 – dezvoltare cu virarea culorii mediului spre roz-roșu;

- Utilizare:** identificarea speciilor fungice ureazo-pozitive (*Cryptococcus spp.*, *Rhodotorula spp.*, *Trichosporon spp.* și unii dermatofiti)
- Stocare:** 2 luni la temperatura de refrigerare
- Disponibil comercial:** un mediu-bază care se aditivează după autoclavare cu soluție sterilă de uree Merck (Germania), Remel (SUA).

M09 Agar cu acid cafeic și citrat feric

Compoziție	
<i>Sulfat acid de sodiu</i>	5 g
<i>Glucoză</i>	5 g
<i>Extract levuric</i>	2 g
<i>Fosfat dipotasic</i>	0,8 g
<i>Sulfat de magneziu hidratat</i>	0,7 g
<i>Acid cafeic</i>	0,18 g
<i>Cloramfenicol</i>	0,05 g
<i>Citrat feric</i>	0,002 g
<i>Agar</i>	15 g
<i>Apă distilată</i>	ad 1000 ml

- Preparare:** ingredientele se adaugă în apa purificată preîncălzită și se fierb apoi sub agitare până la completa lor dizolvare. Se sterilizează prin autoclavare, la 121°C timp de 15 minute.
- Aspect:** geloză maron deschis, translucidă
- pH final la 25°C:** nu se determină
- Controlul calității:** *Cryptococcus neoformans* ATCC 14116: colonii brune cu aspect mucoid;
- Utilizare:** mediu pentru izolarea și identificarea speciei *Cryptococcus neoformans*;
- Stocare:** în eprubete 2 luni la 2°-8 °C, în plăci o lună la 2°-8°C
- Disponibil comercial:** nu se comercializează.

M10 Agar cu extract de cartof și glucoză (PDA)

Compoziție	
<i>Glucoză (dextroză)</i>	20 g
<i>Infuzie de cartofi pulbere</i>	4 g
<i>Agar</i>	20 g
<i>Apă purificată</i>	ad 1000 ml

- Preparare:** ingredientele se adaugă în apa purificată preîncălzită și se fierb apoi sub agitare până la completa lor dizolvare. Se sterilizează prin autoclavare, la 121°C timp de 15 minute
- Aspect:** geloză alb-gălbuie, translucidă
- pH final la 25°C :** $5,6 \pm 0,2$
- Controlul calității:** *Aspergillus niger* ATCC 16404 ++
Candida albicans ATCC 10231 ++
Saccharomyces cerevisiae ATCC 9763 ++
Trichophyton mentagrophytes ATCC 9533 +
- Utilizare:** mediu folosit pentru cultivarea și identificarea levurilor și fungilor filamentoși
- Stocare:** în eprubete 2 luni la 2°-8 °C, în plăci o lună la 2°-8°C
- Disponibil comercial:** Merck (Germania), Remel (SUA), Biokar Diagnostics (Franța).

M11 Agar cu extract de drojdie și cloramfenicol (Yeast Extract Glucose Chloramphenicol Agar)

Compoziție	
<i>Extract de drojdie</i>	5,0 g
<i>Glucoză</i>	20,0 g
<i>Cloramfenicol</i>	0,1 g
<i>Agar</i>	13,0 g
<i>Apă distilată</i>	ad 1000 ml

- Preparare:** ingredientele se dizolvă în apa distilată preîncălzită, după care se fierb un minut. Se autoclavează la 121°C timp de 15 minute.
- Aspect:** geloză galben pal, translucidă
- pH final la 25°C:** $6,6 \pm 0,2$
- Controlul calității:** *Aspergillus niger* ATCC 16404 ++
Candida albicans ATCC 10231 ++
Escherichia coli ATCC 25922 -
Saccharomyces cerevisiae ATCC 9763 +
- Utilizare:** cultivarea și identificarea fungilor levuriformi și filamentoși
- Stocare:** în eprubete 4 luni la 2°-8 °C, în plăci o lună la 2°-8°C
- Disponibil comercial:** Difco (SUA).

**M12 Agar cu extract de drojdie și fitonă
(Phytone Yeast Extract Agar)**

Compoziție	
<i>Peptonă din soia</i>	10,0 g
<i>Extract de drojdie</i>	5,0 g
<i>Dextroză</i>	40,0 g
<i>Cloramfenicol</i>	0,05 g
<i>Agar</i>	17,0 g
<i>Apă distilată</i>	ad 1000 ml

- Preparare:** ingredientele se dizolvă în apa distilată preîncălzită, amestecând continuu, cu menținerea temperaturii de fierbere timp de un minut. Autoclavarea are loc la o temperatură de 121°C timp de 15 minute.
- Aspect:** geloză gălbuie, translucidă
- pH final la 25°C:** $6,6 \pm 0,2$
- Controlul calității:** *Aspergillus niger* ATCC 16404 +
Candida albicans ATCC 10231 +
Penicillium roqueforti ATCC 9295 +
Saccharomyces cerevisiae ATCC 25923 –
Trichophyton verrucosum ATCC 38485 +
- Utilizare:** mediu pentru izolarea și identificarea fungilor din prelevatele clinice, în special a dermatofitelor din specia *Trichophyton verrucosum*
- Stocare:** în eprubete 2 luni la 2°-8 °C, în plăci o lună la 2°-8°C
- Disponibil comercial:** Difco (SUA).

M13 Agar cu extract de orez

Compoziție	
<i>Extract de orez</i>	5,0 g
<i>Agar</i>	20,0 g
<i>Apă distilată</i>	ad 1000 ml

- Preparare:** ingredientele se dizolvă în apa distilată preîncălzită, amestecând continuu, cu menținerea temperaturii de fierbere timp de un minut. Autoclavarea are loc la o temperatură de 121°C timp de 15 minute.
- Aspect:** geloză de culoare galben-pal, translucidă
- pH final la 25°C:** $6,6 \pm 0,2$
- Controlul calității:** *Candida albicans* ATCC 10231 +
Candida albicans ATCC 60193 +
- Utilizare:** formarea clamidosporilor la speciile de *Candida*
- Stocare:** în eprubete 2 luni la 2°-8 °C, în plăci o lună la 2°-8°C

Medii de cultivare

Disponibil comercial: Becton Dickinson (SUA).

***M14 Agar cu extract de paprika
(Ground red hot pepper agar)***

Compoziție	
<i>Paprika</i>	40,0 g
<i>Glucoză</i>	4,0 g
<i>Agar</i>	15,0 g
<i>Apă distilată</i>	ad 1000 ml

Preparare: ingredientele se adaugă în apa distilată și se aduc la punctul de fierbere, apoi se sterilizează prin autoclavare la 116°C timp de 30 minute.

Aspect: geloză opacă, de culoare brun-roșcată, cu miros de paprika

pH final la 25°C: 4,9

Controlul calității: *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* – colonii alb-cremoase după 48 ore de incubare la 30°C, care se pigmentează în brun după această perioadă

Utilizare: izolarea și identificarea prezumtivă a tulpinilor de *Cryptococcus neoformans*

Stocarea: 2°- 8°C

Disponibil comercial: nu se comercializează.

M15 Agar cu extract de sol

Prepararea

extractului de sol: 1 kg sol de grădină se amestecă cu 1000 ml apă de robinet, se încălzește 30 de minute, se decantează, se filtrează și se completează la 1000 ml cu apă distilată. La 1000 ml extract de sol se adaugă 2 g glucoză, 1 g extract de drojdie, 15 g agar și 6,6 g de păr uman tocat și sterilizat. Mediul este recomandat pentru obținerea de cleistoteci la specii de *Arthroderma* (formele teleomorfe ale dermatofităilor).

Stocare: în eprubete 4 luni la 2°-8 °C, în plăci o lună la 2°-8°C

Disponibil comercial: nu este disponibil comercial.

M16 Agar cu extract de tutun (Tobacco Agar)

Compoziție	
<i>Extract din frunze de tutun</i>	1000 ml
<i>Agar</i>	20 g

- Preparare:** 50 grame frunze de tutun se fierb timp de 30 minute într-un litru de apă distilată. Extractul obținut se filtrează; se ajustează pH-ul la valoarea 6 și se reduce volumul la 1000 ml cu apă distilată. După adăugarea agarului, amestecul se încălzește până la dizolvarea completă a acestuia. Mediul se sterilizează prin autoclavare la 121°C timp de 15 minute. După sterilizare, mediul se repartizează în plăci Petri sterile (ø 90 mm), câte 25 ml/placă.
- Aspect:** geloză translucidă, de culoare galben-maronie
- pH final la 25°C:** 6,0 ± 0,1
- Controlul calității:** *Candida dubliniensis* CBS 7987 (formare de clamidospori în urma însămânțării prin tehnica Dalmeau și incubare la 30°C)
- Utilizare:** mediu destinat identificării tulpinilor de *Candida albicans* și *Candida dubliniensis* pe baza stimulării producerii de clamidospori (*C. albicans* 96% dintre tulpini, *C.dubliniensis* 100% dintre tulpini)
- Stocare:** 2°-8°C
- Disponibil comercial:** nu se comercializează.

M17 Agar cu făină de porumb (Cornmeal agar)

Compoziție	
<i>Făină de porumb</i>	40 g
<i>Glucoză</i>	10 g
<i>Agar</i>	15 g
<i>Apă distilată</i>	ad 1000 ml

- Preparare:** se amestecă făina de porumb cu apa distilată și se încălzește amestecul la 52°C timp de o oră sau la 121°C timp de 10 minute. După tratamentul termic, amestecul se filtrează prin tifon și vată, apoi prin hârtie de filtru. În filtratul obținut se introduc agarul și glucoza, fierbându-se până la topirea acestora. Se reduce volumul la 1000 ml, apoi se sterilizează la 121°C timp de 15 minute.
- Aspect:** geloză albicioasă, translucidă
- pH final la 25°C :** 6,0 ± 0,2

Medii de cultivare

- Controlul calității:** *Trichophyton rubrum* ATCC 28188: pigment roșu în mediul subiacent
Trichophyton mentagrophytes ATCC 9533: pigment brun sub colonie
- Utilizare:** stimulează pigmentogeneza la sușele de *T. rubrum* și le diferențiază de tulpinile aparținând speciei *T. mentagrophytes*.
- Stocare:** în eprubete 4 luni la 2°-8 °C, în plăci o lună la 2°-8°C
- Disponibil comercial:** Remel (SUA).

M18 Agar cu făină de porumb și Tween 80 (Cornmeal Agar Tween 80)

Compoziție	
Făină de porumb	40 g
Tween 80	10 ml
Agar	20 g
Apă distilată	ad 1000 ml

- Preparare:** făina de porumb se adaugă în 500 ml apă distilată și se macerează timp de o oră la 65°C; după filtrare și reajustarea volumului la 500 ml, soluția astfel obținută se amestecă cu agarul în prealabil solubilizat în 500 ml apă distilată și cu 10 ml Tween 80. Se ajustează pH-ul la 6,6 - 6,8 și apoi se sterilizează prin autoclavare la 121°C timp de 20 minute.
- Aspect:** geloză albicioasă, translucidă
- pH final la 25°C :** 6,8 ± 0,2
- Controlul calității:** *Candida albicans* ATCC 10131 ++
Candida albicans ATCC 60193 (cu apariția clamidosporilor prin cultivare submersă)
- Utilizare:** identificarea diferitelor specii ale genului *Candida* prin studierea caracterelor morfologice microscopice etalate de acestea în urma cultivării submerse, la 30°C timp de 48 ore
- Stocare:** în eprubete 4 luni la 2°-8 °C, în plăci o lună la 2°-8°C
- Disponibil comercial:** Becton Dickenson (SUA), Remel (SUA)

M19 Agar cu frunze de garioafă

- Preparare:** frunzele de garioafă sunt tăiate în bucăți, uscate și sterilizate prin expunerea la radiații gamma sau oxid de etilenă. Câteva bucăți sterile sunt introduse în 1,5% agar nesolidificat. În locul frunzelor de garioafă se pot folosi de asemenea și bucăți de hârtie de filtru sterile. Acest mediu este recomandat pentru cultivarea și identificarea speciilor aparținând genului *Fusarium*.

M20 Agar cu L-canavanină – glicină - albastru de bromtimol (CGB Agar)

Compoziție soluția A	
Glicină	10 g
Fosfat monopotasice	1 g
Sulfat de magneziu	1 g
Tiamină HCl	1 mg
L-canavanină sulfat	30 mg
Apă distilată	ad 100 ml

După solubilizarea completă a ingredientelor enumerate, se ajustează pH-ul la 5,6 și amestecul se sterilizează prin filtrare utilizând filtre cu porozitate de 0,22 μm . Soluția astfel obținută se păstrează la frigider (+4°C).

Compoziție soluția B	
Albastru de bromtimol	0,4 g
Hidroxid de sodiu 0,01 N	64 ml
Apă distilată	36 ml

Preparare:

Albastrul de bromtimol se dizolvă în soluția de hidroxid de sodiu, apoi se adaugă apa distilată.

pentru obținerea unui litru de mediu, se amestecă 880 ml apă distilată cu 20 ml soluție B și 20 g pulbere de agar. Sterilizarea se realizează prin autoclavare la 121°C, timp de 15 minute. După răcirea mediului la 48°C, se adaugă 100 ml soluție A și se omogenizează, apoi se repartizează în plăci Petri.

Aspect:

geloză translucidă de culoare galben-verzuie

pH final la 25°C :

5,8 $\pm$ 0,1

Controlul calității :

Cryptococcus neoformans var. *neoformans* – dezvoltare disgonică, fără modificarea culorii mediului;

Cryptococcus neoformans var. *gattii* - dezvoltare eugonică, cu virarea culorii mediului de la galben-verzui la albastru-cobalt;

Utilizare:

mediul este recomandat pentru diferențierea celor două varietăți ale speciei *Cryptococcus neoformans* (var. *neoformans* și var. *gattii*). După însămânțarea tulpinilor de testat, incubarea se realizează la 25°C timp de 5 zile. Doar var. *gattii* are capacitatea de a cultiva în prezența L-canavaninei și de a folosi glicina ca unică sursă de carbon. Aceste particularități metabolice determină pozitivarea testului pe Agar CGB, adică schimbarea de pH (de la 5,8 la aproximativ 7,0) și modificarea culorii mediului (de la galben-verzui la albastru-cobalt).

Stocare:

în plăci o lună la 2°-8°C

Medii de cultivare

Disponibil comercial: nu se comercializează.

M21 Agar cu sucroză și creatină

Compoziție	
<i>Creatină</i>	3 g
<i>Sucroză</i>	30 g
<i>KCl</i>	0.5 g
<i>MgSO₄</i>	0.5 g
<i>FeSO₄</i>	0.01 g
<i>K₂HPO₄</i>	1.3 g
<i>Bromcrezol purpur</i>	0.05 g
<i>Agar</i>	15 g
<i>Apă distilată</i>	ad 1000 ml

Preparare: ingredientele se introduc în apa distilată preîncălzită și se omogenizează până la completa dizolvare. Se autoclavează la 121°C timp de 15 minute. Se ajustează pH-ul la valoarea $6,0 \pm 0,2$.

Aspect: geloză opalescentă, de culoare roz

pH final la 25 °C: $6,0 \pm 0,2$

Controlul calității: *Aspergillus niger* ATCC 1015 ++

Utilizare: mediu destinat izolării și identificării fungilor filamentoși

Stocare: 2°-8°C

Disponibil comercial: nu se comercializează.

M22 Agar cu sucroză, creatină și dicloran
(Creatine Sucrose Dichloran Agar)

Compoziție	
<i>Creatină</i>	<i>3 g</i>
<i>Sucroză</i>	<i>30 g</i>
<i>KCl</i>	<i>0.5 g</i>
<i>KH₂PO₄</i>	<i>1 g</i>
<i>MgSO₄</i>	<i>0.5 g</i>
<i>FeSO₄</i>	<i>0.01 g</i>
<i>K₂HPO₄</i>	<i>0,05 g</i>
<i>Cloramfenicol</i>	<i>0,05 g</i>
<i>Dicloran</i>	<i>0,002 g</i>
<i>Bromcrezol purpur</i>	<i>0,05 g</i>
<i>ZnSO₄</i>	<i>0,01 g</i>
<i>CuSO₄</i>	<i>0,005 g</i>
<i>Agar</i>	<i>20 g</i>
<i>Apă distilată</i>	<i>ad 1000 ml</i>

- Preparare:** ingredientele se dizolvă în apa distilată preîncălzită, se sterilizează prin autoclavare la temperatura de 121°C timp de 15 minute. Se adaugă 0,05 g clortetraciclină și se ajustează pH-ul la valoarea 4,8.
- Aspect:** geloză de culoare roz, ușor opalescentă
- pH final la 25 °C:** 4,8
- Controlul calității:** *Aspergillus niger* ATCC 1015 +
- Utilizare:** mediu destinat izolării și identificării fungilor filamentosi
- Stocare:** 2°-8°C
- Disponibil comercial:** nu se comercializează.

M23 Agar - acid acetic – dicloran - extract de drojdie
(Acetic Acid Dichloran Yeast Extract Agar)

Compoziție	
<i>Extract de drojdie</i>	<i>20 g</i>
<i>Sucroză</i>	<i>150 g</i>
<i>MgSO₄ x 7 H₂O</i>	<i>0.5 g</i>
<i>Dicloran</i>	<i>0.002g</i>
<i>Agar</i>	<i>20 g</i>
<i>Apă distilată</i>	<i>ad 1000 ml</i>

- Preparare:** ingredientele se dizolvă în apa distilată preîncălzită, se autoclavează la 121 °C timp de 15 minute, după care se adaugă 0,5 % acid acetic glacial.
- Aspect:** geloză translucidă, de culoare gălbuie

Medii de cultivare

Controlul calității: *Aspergillus niger* ATCC 1015 ++
Utilizare: mediu destinat izolării și identificării fungilor filamentoși
Stocare: 2°-8°C
Disponibil comercial: nu se comercializează.

M24 Agar – dicloran - extract de drojdie - 18 % glicerol
(Dichloran Yeast Extract 18% Glycerol Agar)

Compoziție	
<i>Extract de drojdie</i>	20 g
<i>Sucroză</i>	150 g
<i>K₂HPO₄</i>	1 g
<i>MgSO₄</i>	0,5 g
<i>Cloramfenicol</i>	0,05 g
<i>Dicloran (0,2% în etanol)</i>	1 ml
<i>ZnSO₄</i>	0,01 g
<i>CuSO₄</i>	0,005 g
<i>Agar</i>	20 g
<i>Glicerol</i>	220 g
<i>Apă distilată</i>	ad 1000 ml

Preparare: ingredientele se dizolvă în apa distilată preîncălzită, se sterilizează prin autoclavare la temperatura de 121°C timp de 15 minute. Se adaugă 0,05 g clortetraciclină.
Aspect: geloză de culoare gălbuie, ușor opalescentă
pH final la 25 °C: nu se determină
Controlul calității: *Aspergillus niger* ATCC 1015 +
Utilizare: mediu destinat izolării și identificării fungilor filamentoși
Stocare: 2°-8°C
Disponibil comercial: nu se comercializează.

M25 Agar diferențiere Aspergillus

Compoziție
<i>Mediu deshidratat Becton</i> <i>– Dickenson</i>

Preparare: conform recomandărilor firmei producătoare
Aspect: geloză gălbuie, translucidă
pH final la 25°C: 7,0 ± 0,5
Controlul calității: tulpinile de *A. flavus* produc virarea culorii mediului în galben-portocaliu. Alte specii de *Aspergillus* (*A. parasiticus*, *A. sclerotiorum*, *A. thomii*) produc de asemenea modificări ale culorii mediului de cultivare, dar acestea sunt distincte față de cele produse de *A. flavus*.

- Utilizare:** acest mediu de cultură conține cazeină, aminoacizi, extract de drojdie îmbogățit cu complex vitaminic B. Citratul feric este esențial pentru producerea pigmentului galben care ajută la diferențierea speciei *A. flavus* de alte specii cu semnificație clinică ale aceluiași gen. Cu ajutorul unei anse sterile, se etalează pe suprafața mediului câteva colonii după care se incubează la 25°C timp de 10 zile, pentru a permite virarea culorii spre diferite nuanțe de galben.
- Stocare:** 2°-8°C
- Disponibil comercial:** Difco (SUA).

M26 Agar Dixon

Compoziție	
<i>Agar cu extract de malț</i>	60 g
<i>Bilă de bou deshidratată</i>	20 g
<i>Tween 40</i>	10 ml
<i>Glicerol mono-oleat</i>	2,5 ml
<i>Apă distilată</i>	ad 1000 ml

- Preparare:** glicerolul mono-oleat se emulsionează cu Tween 40 apoi se adaugă treptat, sub agitare continuă, mediul preparat prin amestecarea celorlalte ingrediente. Se sterilizează prin autoclavare, la 121°C timp de 15 minute.
- Aspect:** geloză închisă la culoare, translucidă
- pH final la 25°C :** $5,6 \pm 0,2$
- Controlul calității:** *Malassezia furfur* ATCC 12078 ++
- Utilizare:** izolarea levurilor lipofile aparținând genului *Malassezia*
- Stocare:** în eprubete 4 luni la 2°-8 °C, în plăci o lună la 2°-8°C
- Disponibil comercial:** nu se comercializează.

M27 Agar Dixon modificat

Compoziție	
<i>Extract de malț</i>	36 g
<i>Bilă de bou deshidratată</i>	20 g
<i>Tween 40</i>	10 ml
<i>Peptonă</i>	6 g
<i>Glicerol</i>	2 ml
<i>Acid oleic</i>	2 ml
<i>Agar</i>	15 g
<i>Apă distilată</i>	ad 1000 ml

- Preparare:** glicerolul și acidul oleic se emulsionează cu Tween 40, apoi se adaugă treptat, sub agitare continuă, mediul preparat prin amestecarea celorlalte ingrediente. Se sterilizează prin autoclavare, la 121°C timp de 15 minute.
- Aspect:** geloză închisă la culoare
- pH final la 25°C :** 6,0 ± 0,2
- Controlul calității:** *Malassezia furfur* ATCC 12078++
- Utilizare:** izolarea levurilor lipofile din prelevate patologice
- Stocare:** în eprubete 4 luni la 2°-8 °C, în plăci o lună la 2°-8°C
- Disponibil comercial:** nu se comercializează.

M28 Agar glucoză - peptonă - drojdie
(Glucose Peptone Yeast Extract Agar)

Compoziție	
<i>Glucoză</i>	20 g
<i>Peptonă</i>	5 g
<i>Agar</i>	20 g
<i>Extract de drojdie</i>	5 g
<i>Apă distilată</i>	ad 1000 ml

- Preparare:** ingredientele se solubilizează în apa preîncălzită. Se sterilizează prin autoclavare la 121°C timp de 15 minute.
- Aspect:** geloză gălbuie, ușor opalescentă
- pH final la 25°C :** nu se determină
- Controlul calității:** *Candida albicans* ATCC 10231 ++
Saccharomyces cerevisiae ATCC 9763 ++
- Utilizare:** cultivarea levurilor în vederea conservării
- Stocare:** în eprubete 4 luni la 2°-8 °C, în plăci o lună la 2°-8°C
- Disponibil comercial:** nu se comercializează.

M29 Agar infuzie cord - creier (Brain Heart Agar BHI)

Compoziție	
<i>Infuzie de cord</i>	250 ml
<i>Infuzie de creier</i>	200 ml
<i>Peptonă</i>	10 g
<i>Glucoză</i>	2 g
<i>Clorură de sodiu</i>	5 g
<i>Fosfat disodic</i>	2,5 g
<i>Agar</i>	15 g
<i>Apă distilată</i>	ad 1000 ml

- Preparare:** ingredientele se adaugă în apa distilată preîncălzită, apoi amestecul se fierbe sub agitare până la completa dizolvare a acestora. Mediul astfel obținut se repartizează în eprubete sau flacoane și se sterilizează prin autoclavare, la 121°C timp de 15 minute. Rețeta se poate modifica prin îmbunătățirea cu 5-10% sânge defibrinat de berbec sau prin adaos de cloramfenicol și/sau gentamicină (500 mg/l).
- Aspect:** geloză transparentă, de culoare galben-pal; geloză opacă de culoare roșie (variante aditivată cu sânge)
- pH final la 25 °C:** 7,4 ± 0,2
- Controlul calității:** *Candida albicans* ATCC 10231 ++
Streptococcus pyogenes ATCC 19615 ++ (- în cazul variantei aditate cu antibiotice)
- Utilizare:** izolarea unei game largi de microorganisme cu exigențe nutritive particulare, cum ar fi fungii dimorfici
- Stocare:** eprubete 4 luni la 2°-8 °C, în plăci o lună la 2°-8°C
- Disponibil comercial:** Remel (SUA), Biokar Diagnostics (Franța), Becton Dickinson (SUA), bioMérieux (Franța).

M30 Agar izolare Candida

Compoziție	
<i>Extract de drojdie</i>	3,0 g
<i>Extract de malț</i>	3,0 g
<i>Peptonă</i>	5,0 g
<i>Dextroză</i>	10,0 g
<i>Agar</i>	20,0 g
<i>Albastru de anilină</i>	0,1 g
<i>Apă distilată</i>	ad 1000 ml

Medii de cultivare

- Preparare:** ingredientele se adaugă în apa distilată și se fierb un minut până la completa solubilizare. Se autoclavează la 121°C timp de 15 minute.
- Aspect:** geloză de culoare albastră, opalescentă
- pH final la 25°C:** $6,2 \pm 0,2$
- Controlul calității:** *Candida albicans* ATCC 10231: produce fluorescență bleu-verzuie la 354 nm;
Bacillus subtilis ATCC 6633: nu produce fluorescență;
Escherichia coli ATCC 25922 : nu produce fluorescență;
- Utilizare:** izolarea și identificarea speciei *Candida albicans* din prelevate clinice. Plăcile Petri înșămânțate se incubează 72 ore la o temperatură de 30 ± 2 °C.
- Stocare:** 2°–8°C
- Disponibil comercial:** Becton – Dickinson (SUA).

M31 Agar Lactrimel (Borelli)

Compoziție	
<i>Făină de grâu</i>	14 g
<i>Lapte praf ecremat</i>	14 g
<i>Miere</i>	7 g
<i>Agar</i>	20 g
<i>Cloramfenicol</i>	0,5 g
<i>Cicloheximidă</i>	0,5 g
<i>Apă distilată</i>	ad 1000 ml

- Preparare:** ingredientele se amestecă cu apa distilată preîncălzită, sub agitare continuă, până la completa lor solubilizare. Se sterilizează prin autoclavare la 105°C timp de 10 minute. După autoclavare se repartizează în plăci Petri.
- Aspect:** Geloză opacă, de culoare albă
- pH final la 25°C:** $6,8 \pm 0,2$
- Controlul calității:** *Microsporum canis* ATCC 1162: dezvoltare cu sporulare intensă și pigmentogeneză
- Utilizare:** favorizează sporularea mării majorități a dermatofiților și stimulează producerea pigmentului specific în cazul *M. audouinii*, *M. canis* și *T. rubrum*
- Stocare:** o lună, în plăci Petri la 2°–8°C
- Disponibil comercial:** nu se comercializează.

M32 Agar Leeming

Compoziție	
<i>Peptonă</i>	<i>10 g</i>
<i>Glucoză</i>	<i>5 g</i>
<i>Bilă de bou deshidratată</i>	<i>4 g</i>
<i>Tween 60</i>	<i>0,5 ml</i>
<i>Glicerol</i>	<i>1 ml</i>
<i>Glicerol mono-stearat</i>	<i>0,5 g</i>
<i>Lapte integral</i>	<i>10 ml</i>
<i>Extract de drojdie</i>	<i>0,1 g</i>
<i>Cloramfenicol</i>	<i>0,5 g</i>
<i>Agar</i>	<i>12 g</i>
<i>Apă distilată</i>	<i>ad 1000 ml</i>

- Preparare:** glicerolul și glicerolul mono-stearat se emulsionează cu Tween 60, apoi se adaugă treptat, sub agitare continuă, mediul preparat prin amestecarea celorlalte ingrediente. Se sterilizează prin autoclavare, la 121°C timp de 15 minute.
- Aspect:** geloză închisă la culoare
- pH final la 25°C :** $6 \pm 0,2$
- Controlul calității:** *Malassezia furfur* ATTC 12078 ++
- Utilizare:** izolarea levurilor lipofile din prelevate patologice
- Stocare:** în eprubete 4 luni la 2°-8 °C, în plăci o lună la 2°-8°C
- Disponibil comercial:** nu se comercializează.

M33 Agar Littman (Littman Oxgall Agar)

Compoziție	
<i>Peptonă</i>	<i>10,0 g</i>
<i>Dextroză</i>	<i>10,0 g</i>
<i>Bilă de bou deshidratată</i>	<i>15,0 g</i>
<i>Agar</i>	<i>20,0 g</i>
<i>Cristal violet</i>	<i>0,01 g</i>
<i>Streptomicină</i>	<i>30,0 mg</i>
<i>Apă distilată</i>	<i>ad 1000 ml</i>

- Preparare:** ingredientele se dizolvă în apa distilată, amestecând continuu, cu menținerea temperaturii de fierbere timp de un minut. Autoclavarea are loc la o temperatură de 121°C timp de 15 minute, cu răcire la 47°C pentru adăugarea antibioticului; streptomicina se poate înlocui cu cloramfenicol, acesta putându-se adăuga chiar înaintea autoclavării.
- Aspect:** geloză de culoare bleu-cenușie, ușor opalescentă

Medii de cultivare

pH final la 25°C: 7,0 ± 0,2

Controlul calității: *Candida albicans* ATCC 10231 +
Escherichia coli ATCC 25922 ±
Trichophyton mentagrophytes ATCC 9533 ++

Utilizare: mediu pentru cultivarea și identificarea fungilor, în special a celor dermatofiți

Stocare: în eprubete 2 luni la 2°-8 °C, în plăci o lună la 2°-8°C

Disponibil comercial: Remel (SUA), Difco (SUA).

M34 Agar Mueller – Hinton - glucoză 2%

Compoziție	
<i>Extract de carne pulbere</i>	2 g
<i>Cazeină</i>	17,5 g
<i>Amidon</i>	1,5 g
<i>Agar</i>	15 g
<i>Glucoză</i>	20 g
<i>Albastru de metilen</i>	0,5 mg
<i>Apă distilată</i>	ad 1000 ml

Preparare: ingredientele se solubilizează în apa distilată preîncălzită, sub agitare continuă. Se repartizează în tuburi sau flacoane și se sterilizează prin autoclavare la 110°C, timp de 20 minute.

Aspect: geloză opalescentă

pH final la 25°C: 6,9 - 7,1

Utilizare: mediul se folosește pentru testarea susceptibilității la antifungice (voriconazol și fluconazol) prin metoda CLSI M44-A (metodă difuzimetrică cu discuri). Se recomandă ca grosimea stratului de mediu să fie de 4 ± 0,5 mm (cca. 25 ml/ placă Petri cu ø 90mm sau cca. 60 ml / placă Petri cu ø 150 mm).

Stocare: 2°-8°C

Disponibil comercial: mediul bază (fără glucoză) este comercializat de Remel (SUA), Biokar Diagnostics (Franța), Becton Dickinson (SUA), bioMérieux (Franța).

M35 Agar cu făină de ovăz (Oatmeal Agar)

Compoziție	
<i>Făină de ovăz</i>	60,0 g
<i>Agar</i>	18,0 g
<i>Apă distilată</i>	ad 1000 ml

Preparare: ingredientele se dizolvă în apa distilată, amestecând continuu, cu menținerea temperaturii de fierbere timp de un minut.

	Autoclavarea are loc la o temperatură de 121°C timp de 15 minute.
Aspect:	geloasă albicioasă, ușor opalescentă
pH final la 25°C:	6,0 ± 0,2
Controlul calității:	<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404 + <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 + <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9763 +
Utilizare:	mediu pentru cultivarea și studierea caracterelor morfologice ale fungilor filamentoși; stimulează sporularea
Stocare:	în eprubete 2 luni la 2°-8 °C, în plăci o lună la 2°-8°C
Disponibil comercial:	Difco (SUA).

M36 Agar Pal

Compoziție	
<i>Glucoză</i>	1 g
<i>Fosfat monopotasic</i>	1 g
<i>Creatinină</i>	1 g
<i>Agar</i>	15 g
<i>Extract apos din semințe integrale de floarea-soarelui</i>	ad 1000 ml

Preparare:	se mărunțesc 50 g semințe de floarea-soarelui nedecorticate, nesărate, cu ajutorul unui blender și se fierb timp de 30 minute într-un litru de apă distilată. Se filtrează, se adaugă restul ingredientelor, se ajustează pH-ul la 5,5 și se sterilizează apoi prin autoclavare la 110°C timp de 20 minute.
pH final la 25°C:	5,5
Controlul calității:	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231 ++ <i>Candida dubliniensis</i> CBS 7987 ++
Utilizare:	diferențierea speciilor <i>C. albicans</i> și <i>C. dubliniensis</i> pe baza morfologiei coloniilor și producerii de clamidospori; <i>C. dubliniensis</i> produce clamidospori și colonii cu filamentare periferică evidentă, prin incubare la 30°C timp de 48-72 ore, în timp ce <i>C. albicans</i> nu.
Stocare:	2°-8°C
Disponibil comercial:	nu este disponibil comercial.

**M37 Agar pentru studierea morfologiei levurilor
(Yeast Morphology Agar)**

Compoziție	
<i>Sulfat de amoniu</i>	3,5 g
<i>Asparagină</i>	1,5 g
<i>Dextroză</i>	10,0 g
<i>L-histidină HCl</i>	10,0 mg
<i>LD-metionină</i>	20,0 mg
<i>LD-triptofan</i>	20,0 mg
<i>Biotină</i>	2,0 µg
<i>Calciu pantotenat</i>	400,0 µg
<i>Acid folic</i>	2,0 µg
<i>Inizitol</i>	2000,0 µg
<i>Niacin</i>	400,0 µg
<i>Acid p-aminobenzoic</i>	200,0 µg
<i>Piridoxină HCl</i>	400,0 µg
<i>Riboflavină</i>	200,0 µg
<i>Tiamină HCl</i>	400,0 µg
<i>Acid boric</i>	500,0 µg
<i>Sulfat de cupru</i>	40,0 µg
<i>Iodură de potasiu</i>	100,0 µg
<i>Clorură ferică</i>	200,0 µg
<i>Sulfat de magneziu</i>	400,0 µg
<i>Molibdat de sodiu</i>	200,0 µg
<i>Sulfat de zinc</i>	400,0 µg
<i>Fosfat monopotasic</i>	1,0 g
<i>Sulfat de magneziu</i>	0,5 g
<i>Clorură de sodiu</i>	0,1 g
<i>Clorură de calciu</i>	0,1 g
<i>Agar</i>	18,0 g
<i>Apă distilată</i>	<i>ad 1000 ml</i>

- Preparare:** ingredientele se dizolvă în apa distilată preîncălzită, după care se fierb un minut. Se autoclavează la 121°C timp de 15 minute.
- Aspect:** geloză galben-pal, opalescentă
- pH final la 25°C:** $5,6 \pm 0,2$
- Controlul calității:** *Kloeckera apiculata* ATCC 9774 +
Saccharomyces cerevisiae ATCC 9080 +
Candida albicans ATCC 10231 +
- Utilizare:** cultivarea și identificarea levurilor pe baza caracterelor culturale și a celor morfologice
- Stocare:** în eprubete 4 luni la 2°-8 °C, în plăci o lună la 2°-8°C
- Disponibil comercial:** Difco (SUA)

M38 Agar peptonă - glucoză - fluconazol

Compoziție	
<i>Peptonă</i>	10 g
<i>Glucoză</i>	20 g
<i>Agar</i>	20 g
<i>Cloramfenicol</i>	40 mg
<i>Gentamicină</i>	25 mg
<i>Fluconazol</i>	5 mg
<i>Apă distilată</i>	ad 1000 ml

- Preparare:** ingredientele se solubilizează în apa distilată preîncălzită. Se ajustează valoarea pH-ului la 7,0. Se autoclavează la 121°C timp de 15 minute.
- Aspect:** geloză gălbuie, translucidă
- pH final la 25°C:** 6,8-7,0
- Controlul calității:** *Aspergillus flavus* ATCC 10124 ++
Candida albicans ATCC 66027 ±
- Utilizare:** mediu destinat izolării precoce a fungilor filamentoși din prelevate contaminate cu levuri (ex. spută)
- Stocare:** în eprubete 2 luni la 2°-8 °C, în plăci o lună la 2°-8°C
- Disponibil comercial:** nu se comercializează.

M39 Mediul RPMI 1640
(cu glutamină, glucoză 0,2%, roșu fenol, fără bicarbonat)

Compoziție	
<i>L-arginină</i>	200 mg
<i>L-asparagină anhidră</i>	50 mg
<i>Acid L-aspartic</i>	20 mg
<i>L-cistină hidroclorică</i>	65,2 mg
<i>Acid L-glutamic</i>	20 mg
<i>L-glutamină</i>	300 mg
<i>Glicină</i>	10 mg
<i>L-histidină</i>	15 mg
<i>L- hidroxiprolină</i>	20 mg
<i>L-izoleucină</i>	50 mg
<i>L- lizină hidroclorică</i>	40 mg
<i>L- metionină</i>	15 mg
<i>L- fenilalanină</i>	15 mg
<i>L-prolină</i>	20 mg
<i>L-serină</i>	30 mg
<i>L-treonină</i>	20 mg
<i>L-triptofan</i>	5 mg
<i>L-tirozină disodică</i>	28,83 mg
<i>L-valină</i>	20 mg
<i>Biotină</i>	0,2 mg
<i>Acid D-pantotenic</i>	0,25 mg
<i>Colină HCl</i>	3 mg
<i>Acid folic</i>	1 mg
<i>Mio-inozidol</i>	35 mg
<i>Niacinamidă</i>	1 mg
<i>PABA</i>	1 mg
<i>Piridoxină HCl</i>	1 mg
<i>Riboflavină</i>	0,2 mg
<i>Tiamină HCl</i>	1 mg
<i>Vitamina B₁₂</i>	0,005 mg
<i>Nitrat de calciu monohidrat</i>	100 mg
<i>Clorură de potasiu</i>	400 mg
<i>Sulfat de magneziu</i>	48,84 mg
<i>Clorură de sodiu</i>	6000 mg
<i>Fosfat disodic anhidru</i>	800 mg
<i>D-glucoză</i>	2000 mg
<i>Glutation redus</i>	1 mg
<i>Roșu fenol</i>	5,3 mg
<i>Apă distilată</i>	ad 1000 ml

- Preparare :** mediul se găsește sub formă „ready for use” (Sigma Aldrich), cât și sub formă de pulbere pentru prepararea în laborator. Pulberea se dizolvă în apă bidistilată în cantitate de 10,4 g pentru mediul uzual și 20,8 g pentru mediul dublu concentrat.
- Aspect:** bulion transparent de culoare roșiatică
- Utilizare:** pentru utilizare, mediul se tamponează cu MOPS [3-(N-morpholino) propanesulfonic acid], concentrația finală a acestuia fiind 0,165 mol/litru. Se obține astfel un pH cu valoarea 7,0 convenabil dezvoltării microorganismelor ce vor fi testate.
- Stocare:** 2°-8°C
- Disponibil comercial:** Sigma Aldrich (Germania).

M40 Agar SABHI

Este un mediu de cultivare disponibil comercial în multiple variante (cu și fără Cloramfenicol, Gentamicină sau Cicloheximidă) obținut prin amestecul unor cantități echivalente de Agar Sabouraud și Agar infuzie cord - creier. Se recomandă pentru cultivarea și izolarea selectivă a fungilor patogeni.

Disponibil comercial: Remel (SUA), Becton Dickinson (SUA).

M41 Agar Sabouraud cicloheximidă

Compoziție	
<i>Peptonă</i>	10,0 g
<i>Dextroză</i>	10,0 g
<i>Agar</i>	15,5 g
<i>Cicloheximidă</i>	0,4 g
<i>Cloramfenicol</i>	0,05 g
<i>Apă distilată</i>	ad 1000 ml

- Preparare:** ingredientele se dizolvă în apa distilată, amestecând continuu, cu menținerea temperaturii de fierbere timp de un minut. Autoclavarea are loc la o temperatură de 115°C timp de 15 minute.
- Aspect:** geloză de culoarea chihlimbarului, transparentă
- pH final la 25°C:** 6,9 ± 0,2
- Controlul calității:** *Aspergillus niger* ATCC 16404 ±
Aureobasidium pullulans ATCC 9348 ±
Blastomyces dermatitidis ATCC 56218 +
Candida albicans ATCC 10231 +
Escherichia coli ATCC 25922 ±
Microsporum audouinii ATCC 9079 +

Penicillium roquefortii ATCC 9295 ±
Phialophora verrucosa ATCC 10223 +
Staphylococcus aureus ATCC 25923 –
Streptomyces rimosus ATCC 10970 ±
Trichophyton mentagrophytes ATCC 9533 +

Utilizare: mediu pentru izolarea selectivă a fungilor rezistenți la cicloheximidă, în special a dermatofiților
Stocare: în eprubete 2 luni la 2°-8 °C, în plăci o lună la 2°-8°C
Disponibil comercial: Becton Dickinson (SUA), Merck (Germania), Remel (SUA), Biokar Diagnostics (Franța).

M42 Agar Sabouraud cloramfenicol

Compoziție	
<i>Peptonă</i>	10 g
<i>Glucoză</i>	40 g
<i>Cloramfenicol</i>	0,5 g
<i>Agar</i>	15 g
<i>Apă distilată</i>	ad 1000 ml

Preparare: ingredientele se adaugă în apa distilată preîncălzită, apoi amestecul se fierbe sub agitare până la completa dizolvare a acestora; mediul astfel obținut se repartizează în eprubete sau flacoane și se sterilizează prin autoclavare, la 121°C timp de 15 minute.

Aspect: geloză de culoarea chihlimbarului, transparentă

pH final la 25 °C: 5,6 ± 0,2

Controlul calității: *Candida albicans* ATCC 10231 ++
Aspergillus niger ATCC 16404 ++
Trichophyton rubrum ATCC 28188 ++
Escherichia coli ATCC 25922 –
Proteus vulgaris ATCC 13315 –

Utilizare: izolarea unei game largi de fungi patogeni și oportuniști din prelevatele patologice

Stocare: în eprubete 4 luni la 2°-8 °C, în plăci o lună la 2°-8°C

Disponibil comercial: Remel (SUA), Biokar Diagnostics (Franța), Becton Dickinson (SUA), bioMérieux (Franța).

M43 Agar Sabouraud Emmons

Compoziție	
<i>Peptonă</i>	10 g
<i>Glucoză</i>	20 g
<i>Agar</i>	15 g
<i>Apă distilată</i>	ad 1000 ml

- Preparare:** ingredientele se adaugă în apa distilată preîncălzită, apoi amestecul se fierbe sub agitare până la completa dizolvare a acestora. Se ajustează pH-ul la valoarea 7,0. Mediul astfel obținut se repartizează în eprubete sau flacoane și se sterilizează prin autoclavare, la 121°C timp de 15 minute.
- Aspect:** geloză de culoarea chihlimbarului, transparentă
- pH final la 25 °C:** $7,0 \pm 0,2$
- Controlul calității:** *Candida albicans* ATCC 10231 ++
Aspergillus niger ATCC 16404 ++
Trichophyton rubrum ATCC 28188 ++
Escherichia coli ATCC 25922 ±
Proteus vulgaris ATCC 13315 ±
- Utilizare:** izolarea unei game largi de fungi patogeni și oportuniști din prelevatele patologice (variantele aditivate)
- Stocare:** în eprubete 4 luni la 2°-8 °C, în plăci o lună la 2°-8°C
- Disponibil comercial:** există numeroase variante îmbunătățite cu Cloramfenicol, Gentamicină, Cicloheximidă.

M44 Agar sânge - glucoză - cisteină

Compoziție	
<i>Triptonă agar bază</i>	33 g
<i>L-cisteină</i>	1 g
<i>Sânge de berbec defibrinat</i>	50 ml
<i>Cloramfenicol</i>	0,5 g
<i>Apă deionizată</i>	ad 1000 ml

- Preparare:** ingredientele (cu excepția sângelui) se solubilizează în apa preîncălzită, apoi se autoclavează timp de 15 minute la 121°C. După autoclavare, mediul se răcește lent la 45°-50°C, moment în care se adaugă sângele și se omogenizează.
- Aspect:** geloză de culoare roșie-vie, opacă
- pH final la 25°C:** $7,2 \pm 0,2$
- Controlul calității:** *Escherichia coli* ATCC 25922 -
- Utilizare:** mediu de conversie (folosit pentru transformarea formei filamentose în cea levurică) pentru identificarea tulpinilor de *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, *Paracoccidioides brasiliensis* și *Sporothrix schenckii*.
- Stocare:** în plăci o lună la 2°-8°C
- Disponibil comercial:** nu se comercializează.

M45 Agar selectiv cu triptofan

Este un mediu solid cu o compoziție simplă, incluzând ca ingrediente principale doar L-triptofan (0,01%) și o sursă lipidică. La pH 5 și 37°C, permite dezvoltarea selectivă a speciei *Malassezia furfur*, cu producerea unui pigment brun ce difuzează în substratul nutritiv subiacent.

M46 Agar Staib (Agar cu infuzie de Niger) Bird seed Agar

Compoziție	
<i>Extract apos din semințe de Niger</i>	1000 ml
<i>Glucoză</i>	10 g
<i>Fosfat monopotasic</i>	1 g
<i>Creatinină</i>	1 g
<i>Agar</i>	15 g

- Preparare:** 50 g semințe de Niger (*Guizotia abyssinica*) se autoclavează într-un litru de apă timp de 10 minute la 115°C, apoi se filtrează. În acest extract apos se adaugă restul ingredientelor și se încălzește până la completa dizolvare a acestora. Se readuce volumul la 1000 ml și se autoclavează la 121°C timp de 15 minute. Mediul se poate aditiva cu cloramfenicol (500 mg/l).
- Aspect:** geloză de culoare bej, opalescentă
- pH final la 25°C :** 5,5- 6,0
- Controlul calității:** *Cryptococcus neoformans* ATCC 14116: colonii brune, cu aspect mucoid;
Candida albicans ATCC 10231 : colonii netede, lucioase;
- Utilizare:** mediu diferențial pentru *Filobasidiella* (*Cryptococcus*) *neoformans*; mediul este util și pentru diferențierea speciilor *Candida albicans* (colonii de tip S, lucioase, similare celor de pe mediile uzuale de cultivare) și *Candida dubliniensis* (colonii de tip R, majoritatea cu marginile franjurate).
- Stocare:** în eprubete 2 luni la 2°-8 °C, în plăci o lună la 2°-8°C
- Disponibil comercial:** Becton - Dickinson (USA)

M47 Agar Takaschio (Agar Sabouraud diluat)

Compoziție	
<i>Glucoză</i>	2 g
<i>Neopeptonă</i>	1 g
<i>Sulfat de magneziu</i>	1 g
<i>Fosfat monopotasic</i>	1 g
<i>Agar</i>	20 g
<i>Apă distilată</i>	ad 1000 ml

- Preparare:** ingredientele se amestecă cu apa distilată preîncălzită, sub agitare continuă, până la completa lor solubilizare. Se sterilizează prin autoclavare la 121°C timp de 15 minute.
- Aspect:** geloză translucidă, de culoare gălbuie
- pH final la 25°C:** $6,2 \pm 0,2$
- Controlul calității:** *Microsporum canis* ATCC 11621 - dezvoltare cu sporulare intensă
- Utilizare:** favorizează sporularea tulpinilor de dermatofiti
- Stocare:** în eprubete 4 luni la 2°-8 °C, în plăci o lună la 2°-8°C
- Disponibil comercial:** nu se comercializează.

M48 Agar Tween 80 (destinat testului de opacifiere)

Compoziție	
<i>Bacto peptonă</i>	10 g
<i>Clorură de sodiu</i>	5 g
<i>Clorură de calciu</i>	0,1 g
<i>Tween 80</i>	5 ml
<i>Agar</i>	15 g
<i>Apă distilată</i>	ad 1000 ml

- Preparare:** ingredientele (cu excepția Tween-ului) se dizolvă în apa distilată preîncălzită și se fierb un minut. Se sterilizează prin autoclavare la 121°C timp de 15 minute. Se răcește la 50°C, moment în care se adaugă Tween-ul. Mediul se repartizează în plăci Petri sterile (ø 90 mm), câte 25 ml/placă.
- Aspect:** geloză transparentă, de culoare galben pai
- pH final la 25°C:** 6,8
- Controlul calității:** permite dezvoltarea diferitelor specii ale genului *Candida*, cu apariția unui halo opac în jurul coloniilor de levuri secretoare de esterază (*Candida albicans*, *Candida guilliermondii*, *Candida rugosa*, *Candida tropicalis*).
- Utilizare:** mediul este recomandat pentru diferențierea tulpinilor de *C. albicans* și *C. dubliniensis*. Tulpinile de testat se inoculează în

puncte separate, iar incubarea se realizează la 30°C timp de 10 zile. Tulpinile de *C. albicans* și *C. tropicalis* determină apariția unui halo opac în jurul coloniilor, la 2-3 zile post-inoculare, în timp ce tulpinile de *C. dubliniensis* nu pozitivă testul nici în 10 zile post-inoculare. Tulpinile cu acțiune lipolitică secretă o estereză capabilă să scindeze Tween-ul și să elibereze acizii grași care se vor cupla cu ioni de Ca^{2+} formând săruri vizibile sub forma unei zone de opacifiere în jurul coloniilor. *C. dubliniensis* este lipsită de acțiune lipolitică, comportament util în diferențierea de *C. albicans*.

Stocare: 2°-8°C

Disponibil comercial: nu se comercializează.

M49 Agar cu amidon

Compoziție	
<i>Amidon solubil</i>	40 g
<i>Extract de drojdie</i>	5 g
<i>Agar</i>	20 g
<i>Apă distilată</i>	ad 1000 ml

Preparare: substanțele se introduc în apă și se dizolvă pe baie de apă. Nu este necesară ajustarea pH-ului care, după sterilizare, are valoarea 6,5-7.

Aspect: geloză gălbuie, ușor opalescentă

pH final la 25°C: 6,5-7

Controlul calității: *Fusarium solani* ATCC 22278 - dezvoltare cu sporulare intensă;

Utilizare: mediu destinat stimulării sporulării la fungii filamentozii

Stocare: în eprubete 4 luni la 2°-8 °C, în plăci o lună la 2°-8°C

Disponibil comercial: nu este disponibil comercial.

M50 Agar – apă de robinet

Compoziție	
<i>Agar</i>	15-25 g
<i>Apă de robinet</i>	ad 1000 ml

Preparare: agarul se dizolvă în apă preîncălzită și apoi se sterilizează 20 minute la 121°C. Se pot adăuga paie de grâu sau boabe de orez sterilizate.

Aspect: geloză gălbuie, translucidă

pH final la 25°C: nu se determină

Controlul calității: *Fusarium solani* ATCC 22278 - dezvoltare cu sporulare

- Utilizare:** mulți fungi sensibili sporulează bine pe acest mediu. Este utilizat atât pentru izolarea genului *Pythium*, cât și pentru izolarea și stimularea sporulării la speciile de *Fusarium*. De asemenea, transferul pe acest mediu a culturilor pleomorfe ale dermatofitelor induce sporularea și chiar revenirea la tipul „wild” a speciilor dezvoltate în prealabil pe mediul Sabouraud.
- Stocare:** în eprubete 4 luni la 2°-8 °C, în plăci o lună la 2°-8°C
- Disponibil comercial:** nu este disponibil comercial.

M51 Bulion cu uree (test rapid pentru identificarea levurilor)
(Rapid Urea Broth Test for Yeasts)

Compoziție	
Peptonă	1 g
NaCl	5 g
Fosfat monopotasic	2 g
Roșu fenol	0,012 g
Glucoză	1 g
Uree	20 g
Apă distilată	ad 1000 ml

- Preparare:** ingredientele (cu excepția ureei) se solubilizează în 500 ml apă distilată preîncălzită și apoi se sterilizează prin autoclavare la 121°C timp de 15 minute. Ureea se solubilizează în apa distilată rămasă și se sterilizează prin filtrare, utilizând membrane cu porozitate de 0,22 μm. Cele două soluții astfel obținute se răcesc la temperatura camerei și se amestecă sub protecția unei hote microbiologice de clasă II; bulionul obținut se repartizează în tuburi (câte 3 ml).
- Aspect:** bulion transparent, de culoare gălbuie
- pH final la 25°C:** 6,8 ± 0,2
- Controlul calității :** *Cryptococcus neoformans* ATCC 66031 - ureazo pozitiv (roșu)
Candida albicans ATCC 1023 - ureazo negativ (galben)
- Utilizare:** diferențierea tulpinilor levurice ureazo-pozitive de cele ureazo-negative și identificarea prezumtivă a unor genuri (*Cryptococcus*, *Rhodotorula* și *Trichosporon*)
- Stocare:** - 20°C timp de 2 luni
- Disponibil comercial:** Remel (SUA).

M52 Bulion Sabouraud

Compoziție	
<i>Peptonă</i>	10 g
<i>Glucoză</i>	20 g
<i>Apă distilată</i>	ad 1000 ml

- Preparare:** ingredientele se solubilizează în apa distilată preîncălzită, apoi mediul astfel obținut se repartizează în eprubete, în volum de câte 5 ml. Se sterilizează prin autoclavare, la 121°C timp de 15 minute.
- Aspect:** bulion de culoare gălbuie, transparent
- pH final la 25 °C:** $5,6 \pm 0,2$
- Controlul calității:** *Candida albicans* ATCC 10231 ++
Aspergillus niger ATCC 16404 ++
- Utilizare:** purificarea sușelor de fungi contaminate cu bacterii; în acest caz mediul se aditivează cu acid clorhidric 1N
- Stocarea:** o lună la temperatura de refrigerare
- Disponibil comercial:** Remel (SUA), Biokar Diagnostics (Franța), Becton Dickinson (SUA), bioMérieux (Franța).

M53 CHROMagar Candida

Compoziție	
<i>Peptonă</i>	10 g
<i>Amestec cromogen</i>	22 g
<i>Cloramfenicol</i>	0,5 g
<i>Agar</i>	15 g
<i>Apă purificată</i>	ad 1000 ml

- Preparare:** ingredientele se dizolvă în apa distilată și se fierb un minut până la completa solubilizare. Se autoclavează la 121°C timp de 15 minute. Se adaugă neomicină, 500 μg/ml, în momentul răcirii mediului la o temperatură de 50°-55°C.
- Aspect:** transparent, ușor opalescent
- pH final la 25°C:** $6,1 \pm 0,1$
- Controlul calității:** *Candida albicans* ATCC 10231 ++
Candida tropicalis ATCC 1369 ++
Candida krusei ATCC 34135 ++
- Utilizare:** izolarea levurilor din prelevatele patologice și identificarea speciilor: *C. albicans* - colonii de culoare verde-smarald, *C. krusei* - colonii de tip R de culoare roz-pal, albicioase la periferie, *C. tropicalis* - colonii de culoare albastru-verzui până la albastru-metalizat, *C. glabrata* - colonii mate de culoare violet deschis (lila);

Stocare: în plăci, 2 luni, la temperatura de refrigerare
Disponibil comercial: Becton Dickinson (SUA)

M54 Cireșe - Agar

Compoziție	
<i>Extract de cireșe</i>	<i>300 ml</i>
<i>Agar</i>	<i>20 g</i>
<i>Apă distilată</i>	<i>ad 1000 ml</i>

Preparare: obținerea extractului de cireșe - se scot sâmburii din fructele roșii, la 450 g pulpă de cireșe adăugându-se 1000 ml apă distilată. Amestecul se fierbe înăbușit 2 ore. Se filtrează prin tifon și se sterilizează o oră la 110°C. Extractul se păstrează în flacoane, la frigider. Se dizolvă agarul în apă și se adaugă extractul. Se distribuie în eprubete sterilizate și se autoclavează 5 minute la 120°C. Nu se supraîncălzește deoarece reacția acidă a mediului împiedică solidificarea.

Aspect: geloză roșiatică, translucidă
pH final la 25°C: 3,5 - 4,6
Utilizare: favorizează sporularea la fungii filamentoși superiori
Stocare: în eprubete 4 luni la 2°-8°C, în plăci o lună la 2°-8°C
Disponibil comercial: nu este disponibil comercial.

M55 Agar – glicerină

Compoziție	
<i>Glicerină</i>	<i>7,5 g</i>
<i>Sucroză</i>	<i>7,5 g</i>
<i>Peptonă</i>	<i>5,0 g</i>
<i>MgSO₄ x 7H₂O</i>	<i>0,05 g</i>
<i>KH₂PO₄</i>	<i>0,06 g</i>
<i>NaCl</i>	<i>4,0 g</i>
<i>Agar</i>	<i>20,0 g</i>
<i>Apă distilată</i>	<i>ad 1000 ml</i>

Preparare: glicerina, sucroza, sulfatul de magneziu și fosfatul de potasiu se adaugă în 200 ml apă. Se omogenizează peptonă și clorura de sodiu cu 200 ml apă preîncălzită la 60°C și se adaugă peste prima soluție. Agarul se dizolvă în 600 ml apă și apoi se amestecă cu celelalte soluții. Nu se ajustează pH-ul. Autoclavarea mediului se face la 121°C timp de 20 minute.

Aspect: geloză gălbuie, ușor opalescentă
pH final la 25°C: nu se determină

Medii de cultivare

Controlul calității: *Aspergillus niger* ATCC 16404 ++
Utilizare: cultivarea și identificarea speciilor aparținând genului *Aspergillus*.

M56 Infuzie de cartofi

Compoziție	
<i>Cartofi</i>	300 g
<i>Apă de robinet</i>	900 ml

Preparare: se lasă cartofii tăiați, în apă, la frigider, timp de 24 de ore, după care se filtrează și se autoclavează infuzia 1 oră la 110°C.
Aspect: lichid alb-gălbui, translucid
pH final la 25°C : nu se determină
Controlul calității: nu se realizează
Utilizare: pentru prepararea mediului PDA
Stocare: se recomandă utilizarea imediată
Disponibil comercial: nu se comercializează.

M57 Malț agar (Malt Agar)

Compoziție	
<i>Extract de malț</i>	30,0 g
<i>Agar</i>	15,0 g
<i>Apă distilată</i>	ad 1000 ml

Preparare: ingredientele se dizolvă în apă distilată, amestecând continuu, cu menținerea temperaturii de fierbere timp de un minut. Autoclavarea are loc la o temperatură de 121°C timp de 15 minute. Mediul nu se va reîncălzi.
Aspect: geloză de culoarea chihlimbarului, ușor opalescentă
pH final la 25°C: $5,5 \pm 0,2$
Controlul calității: *Aspergillus niger* ATCC 16404 ++
Candida albicans ATCC 10231 ++
Saccharomyces cerevisiae ATCC 9763 +
Utilizare: mediu pentru conservarea fungilor și pentru studierea caracterelor morfologice ale acestora în vederea identificării
Stocare: în eprubete 2 luni la 2°-8 °C, în plăci o lună la 2°-8°C
Disponibil comercial: Merck (Germania), Remel (SUA), Biokar Diagnostics (Franța).

M58 Malț extract agar (Malt Extract Agar)

Compoziție	
<i>Maltoză</i>	12,75 g
<i>Dextrină</i>	2,75 g
<i>Glicerol</i>	2,35 g
<i>Peptonă</i>	0,78 g
<i>Agar</i>	15,0 g
<i>Apă distilată</i>	ad 1000 ml

- Preparare:** ingredientele se dizolvă în apa distilată, amestecând continuu, cu menținerea temperaturii de fierbere timp de un minut. Autoclavarea are loc la o temperatură de 121°C timp de 15 minute.
- Aspect:** geloză de culoarea chihlimbarului, transparentă
- pH final la 25°C:** $4,7 \pm 0,2$
- Controlul calității:** *Aspergillus niger* ATCC 16404 ++
Candida albicans ATCC 10231 ++
Saccharomyces cerevisiae ATCC 9763 +
- Utilizare:** mediu pentru cultivarea, identificarea și aprecierea cantitativă a fungilor filamentoși și levuriformi
- Stocare:** în eprubete 2 luni la 2°-8°C, în plăci o lună la 2°-8°C
- Disponibil comercial:** Remel (SUA), Becton Dickinson (SUA), Merck (Germania)

M59 Mediu bază pentru levuri
(Yeast Carbon Base)

Compoziție	
<i>Dextroză</i>	<i>10,0 g</i>
<i>L-histidină</i>	
<i>monohidroclorică</i>	<i>1,0 g</i>
<i>LD-metionină</i>	<i>2,0 mg</i>
<i>LD-triptofan</i>	<i>2,0 mg</i>
<i>Biotină</i>	<i>2,0 µg</i>
<i>Calciu pantotenic</i>	<i>400,0 µg</i>
<i>Acid folic</i>	<i>2,0 µg</i>
<i>Inozitol</i>	<i>2000,0 µg</i>
<i>Niacină</i>	<i>400,0 µg</i>
<i>Acid p-amino benzoic</i>	<i>200,0 µg</i>
<i>Piridoxină hidroclorică</i>	<i>400,0 µg</i>
<i>Riboflavin</i>	<i>200,0 µg</i>
<i>Tiamină hidroclorică</i>	<i>400,0 µg</i>
<i>Acid boric</i>	<i>500,0 µg</i>
<i>Sulfat de cupru</i>	<i>40,0 µg</i>
<i>Iodură de potasiu</i>	<i>100,0 µg</i>
<i>Clorură ferică</i>	<i>200,0 µg</i>
<i>Sulfat de mangan</i>	<i>400,0 µg</i>
<i>Molibdat de sodiu</i>	<i>200,0 µg</i>
<i>Sulfat de zinc</i>	<i>400,0 µg</i>
<i>Fosfat monopotasic</i>	<i>1,0 g</i>
<i>Sulfat de magneziu</i>	<i>0,5 g</i>
<i>Clorură de sodiu</i>	<i>0,1 g</i>
<i>Clorură de calciu</i>	<i>0,1 g</i>
<i>Apă distilată</i>	<i>ad 1000 ml</i>

- Preparare:** în vederea sterilizării prin filtrare se prepară o soluție de concentrație 10 x prin dizolvarea a 11,7 g pulbere în 100 ml apă distilată preîncălzită. Apoi se filtrează utilizând filtre cu porozitate de 0,2 µm. Varianta de lucru se prepară prin adăugarea de apă distilată sterilizată în proporție de 9 volume la un volum mediu concentrat.
- Aspect:** bulion transparent, de culoare galben-pai
- pH final la 25°C:** 5,5 ± 0,2
- Utilizare:** mediu bază pentru auxonograma levurilor
- Stocare:** 2° - 8°C
- Disponibil comercial:** Difco (SUA)

M60 AM3
(Antibiotic medium 3)

Compoziție	
<i>Extract de carne pulbere</i>	5,0 g
<i>Extract de drojdii</i>	1,5 g
<i>Peptonă</i>	5,0 g
<i>Dextroză</i>	1,0 g
<i>Clorură de sodiu</i>	3,5 g
<i>Fosfat dipotasic</i>	3,68 g
<i>Fosfat monopotasic</i>	1,32 g
<i>Apă distilată</i>	ad 1000 ml

- Preparare:** ingredientele se dizolvă în apă distilată preîncălzită sub agitare continuă. Se repartizează în tuburi sau flacoane și se autoclavează la 121°C timp de 15 minute.
- Aspect:** mediu transparent de culoarea chihlimbarului
- pH final la 25°C:** $7,0 \pm 0,5$
- Controlul calității:** incubare la $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ / 24 ore
Escherichia coli ATCC 10536 +
Staphylococcus aureus ATCC 6538 +
Candida albicans ATCC 10231 +
- Utilizare:** mediu destinat depistării rezistenței la amfotericină prin metoda benzilor E-test.
- Stocare:** $2^{\circ}\text{--}8^{\circ}\text{C}$
- Disponibil comercial:** Becton Dickenson (SUA)

M61 Mediu sintetic pentru testul de filamentare

Compoziție	
<i>Glucoză</i>	0,5 g
<i>Fosfat monopotasic</i>	2,0 g
<i>Clorură de calciu</i>	0,05 g
<i>Sulfat de magneziu</i>	0,05 g
<i>Sulfat de amoniu</i>	0,5 g
<i>Apă distilată</i>	ad 1000 ml

- Preparare:** după solubilizarea glucozei și a tuturor sărurilor, pH-ul se ajustează la 6,75 cu ajutorul unei soluții de hidroxid de potasiu 2M și amestecul se sterilizează prin autoclavare
- Aspect:** mediu lichid, transparent
- pH final la 25°C:** 6,75-6,80
- Controlul calității:** *Candida albicans* ATCC 10231 ++
Candida parapsilosis ATCC 22019 ++

- Utilizare:** permite producerea de tubi germinativi la tulpinile de *Candida albicans*, prin incubare pe baia de apă, la 37°C timp de 4 ore. Este utilizat pentru trierea selectivă a tulpinilor levurice și identificarea prezumtivă a speciilor *C. albicans* și *C. dubliniensis* (diferențierea între acestea necesită teste suplimentare).
- Stocare:** în eprubete 4 luni la 2°-8°C, în plăci o lună la 2°-8°C
- Disponibil comercial:** nu este disponibil comercial.

M62 Mediul Bilai

Compoziție	
<i>KH₂PO₄</i>	1 g
<i>KNO₃</i>	1 g
<i>MgSO₄ x 7H₂O</i>	0,5 g
<i>KCl</i>	0,5 g
<i>Amidon pudră</i>	0,2 g
<i>Glucoză</i>	0,2 g
<i>Sucroză</i>	0,2 g
<i>Agar</i>	18,0 g
<i>Apă distilată</i>	ad 1000 ml

- Preparare:** ingredientele se dizolvă în apa distilată preîncălzită, se fierb un minut, apoi se autoclavează la 121°C timp de 15 minute.
- Aspect:** geloză albicioasă, opalescentă
- pH final la 25°C:** nu se determină
- Controlul calității:** *Fusarium solani* ATCC 22278 - dezvoltare cu sporulare intensă
- Utilizare:** mediul induce formarea conidiilor la *Fusarium*
- Stocare:** în eprubete 4 luni la 2-8 °C, în plăci o lună la 2-8°C
- Disponibil comercial:** nu este disponibil comercial.

M63 Mediu cu lapte diluat

Compoziție	
<i>Lapte natural pasteurizat</i>	170 ml
<i>Cloramfenicol</i>	0,250 g
<i>Apă distilată sterilă</i>	ad 1000 ml

- Preparare:** ingredientele se omogenizează sub protecția unei hote cu flux laminar de clasă II și se repartizează în flacoane. Este obligatorie folosirea laptelui pasteurizat UHT, deoarece este steril.
- Aspect:** mediu lichid, de culoare albă, opac

- Controlul calității:** *Candida albicans* ATCC 10231 (dezvoltare abundentă, cu producere de pseudomiceliu și clamidospori)
- Utilizare:** mediu recomandat pentru studierea caracterelor morfologice la levuri (clamidospori, hife, pseudohife, blastoconidii, artrospori). În acest scop se suspensionează o colonie tânără în 3-4 ml mediu și se incubează la 28°-30°C timp de 24-48 ore. Se observă la microscop între lamă și lamelă (x100 ... x400).
- Stocare:** 2°-8°C
- Disponibil comercial:** nu se comercializează.

M64 Mediu cu pâine

Felii de pâine se taie în formă de prisme de 5 cm lungime și 1 cm lățime. Se introduc în eprubete și se adaugă apă. Pentru sterilizare se încălzește treptat pentru a evita fărâmițarea miezului. Folosind cantități variabile de apă se obține sporularea speciilor higrofile, mezofile, xerofile, în special la *Aspergillus*, *Penicillium* și *Mucor*; mediu utilizat de asemenea pentru izolarea zygomycetelor din infecții cerebrale (fragmente de țesut cerebral cu dimensiuni de câțiva mm diametru se însămânțează în mai multe puncte, pe fragmentele de pâine, apoi se incubează la 37°C).

- Stocare:** în eprubete 4 luni la 2°-8°C, în plăci o lună la 2°-8°C
- Disponibil comercial:** nu este disponibil comercial.

M65 Mediu cu sol

Solul (pământ de grădină cernut printr-o sită fină) se introduce în eprubete sau flacoane și se sterilizează 30 de minute la 121°C. După 7 zile se sterilizează din nou pentru a distruge toate microorganismele termorezistente care au supraviețuit primei sterilizări. Se inoculează solul și se umezește în același timp cu 2-3 ml suspensie de spori. Se incubează culturile 10-14 zile apoi se păstrează la 3°-6°C. Mediul este recomandat pentru conservarea fungilor.

- Stocare:** în eprubete 4 luni la 2°-8°C, în plăci o lună la 2°-8°C
- Disponibil comercial:** nu este disponibil comercial.

M66 Bulion / Agar Czapek-Dox (Czapek - Dox Broth / Agar)

Compoziție	
Zaharoză	30,0 g
Nitrat de sodiu	3,0 g
Fosfat dipotasic	1,0 g
Sulfat de magneziu	0,5 g
Clorură de potasiu	0,5 g
Sulfat feric	0,01 g
Apă distilată	ad 1000 ml

- Preparare:** ingredientele se dizolvă în apa distilată, amestecând continuu, cu menținerea temperaturii de fierbere timp de un minut. Autoclavarea are loc la o temperatură de 121°C timp de 15 minute; în cazul mediului solid se adaugă 15 g agar.
- Aspect:** transparent, ușor opalescent; uneori poate prezenta un ușor precipitat
- pH final la 25°C:** $7,3 \pm 0,2$
- Controlul calității:** *Aspergillus niger* ATCC 9642 ++
Candida albicans ATCC 10231 ++
Candida tropicalis ATCC 750 ++
Saccharomyces cerevisiae ATCC 9763++
- Utilizare:** mediu utilizat pentru izolarea fungilor aparținând speciilor *Aspergillus*, *Penicillium* și *Paecilomyces* din probele de apă conform unor standarde; mediu pentru identificarea tulpinilor de *Aspergillus*
- Stocare:** în eprubete 2 luni la 2°-8 °C, în plăci o lună la 2°-8°C
- Disponibil comercial:** Merck (Germania), Remel (SUA), Biokar Diagnostics (Franța).

M67 Mediul Kurung-Yegian

Compoziție soluția A	
Fulgi de cartofi	5 g
Apă deionizată	500 ml

Compoziție soluția B	
Melanj de ouă	250 ml
Gălbenuș de ou	500 ml

- Preparare:** se prepară separat cele două soluții, apoi se amestecă și se repartizează în tuburi. Se sterilizează prin autoclavare la 110°C timp de 10 minute.
- Aspect:** mediu în tuburi, turnat în pantă, de culoare galbenă, opac

- pH final la 25°C :** $6,6 \pm 0,2$
Utilizare: asigură conversia la forma levurică în cazul speciilor *Histoplasma capsulatum* și *Blastomyces dermatitidis*
Stocare: în eprubete o lună la 2°-8°C
Disponibil comercial: nu se comercializează.

M68 Mediul Nikersen-Mankovski

Compoziție	
<i>Fosfat monopotasic</i>	1,0 g
<i>Sulfat de amoniu</i>	1,0 g
<i>Biotină</i>	5,0 g
<i>Albastru de tripan</i>	0,10 g
<i>Agar</i>	15,0 g
<i>Apă distilată</i>	ad 1000 ml

- Preparare:** se solubilizează toate substanțele în apa distilată preîncălzită. Se sterilizează prin autoclavare la 121°C timp de 15 minute. Mediului răcit (la 50°C) i se adaugă 20 g glicogen sau amidon purificat și sterilizat prin tindalizare.
Aspect: geloză opalescentă, de culoare bleu- pal
Controlul calității: *Candida albicans* ATCC 10231 dezvoltă clamidospori în 24-48 de ore de incubare la 25°C
Utilizare: mediu destinat stimulării producerii de clamidospori la levuri
Stocare: 2°-8°C
Disponibil comercial: nu se comercializează.

M69 Mediul Pagano-Levin (TTC Sabouraud Agar)

Compoziție	
<i>Peptonă</i>	10,0 g
<i>Dextroză</i>	40,0 g
<i>Agar</i>	15,0 g
<i>Clorură de trifeniltetrazoliu sol.1% (TTC)</i>	10 ml
<i>Neomicină sau Cloramfenicol</i>	0,5 g
<i>Apă distilată</i>	ad 1000 ml

- Preparare:** ingredientele se dizolvă în apa distilată, amestecând continuu, cu menținerea temperaturii de fierbere timp de un minut. Autoclavarea are loc la o temperatură de 115°C timp de 15

	minute. La temperatura de 50°-55°C se adugă sol. 1% TTC și antibioticul.
Aspect:	geloză transparentă, de culoare slab gălbuie, opalescentă
pH final la 25°C:	5,6 ± 0,2
Controlul calității:	<i>Candida albicans</i> ATCC 26790 ++ <i>Candida albicans</i> ATCC 36232 ++ <i>Candida krusei</i> ATCC 34135 ++ <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 –
Utilizare:	acest mediu diferențial este recomandat pentru identificarea speciei <i>Candida albicans</i> din prelevatele patologice. Tulpinile acestei specii prezintă pe mediul Pagano-Levin culoarea alb-deschis, în timp ce alte specii din genul <i>Candida</i> prezintă colonii roz, de diferite nuanțe.
Stocare:	în plăci o lună la 2°-8°C
Disponibil comercial:	bioMérieux (Franța).

M70 Mediu pentru izolarea dermatofităilor (DTM)

Compoziție	
<i>Peptonă din soia</i>	10,0 g
<i>Dextroză</i>	10,0 g
<i>Roșu fenol</i>	0,2 g
<i>Cicloheximidă</i>	0,5 g
<i>Cloramfenicol</i>	0,1 g
<i>Agar</i>	20,0 g
<i>Apă distilată</i>	ad 1000 ml

Preparare:	ingredientele se dizolvă în apa distilată, amestecând continuu, cu menținerea temperaturii de fierbere timp de un minut. Autoclavarea are loc la o temperatură de 121°C timp de 15 minute
Aspect:	agar galben-portocaliu, ușor opalescent
pH final la 25°C:	5,5 ± 0,2
Controlul calității:	<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404 ± <i>Microsporum audouinii</i> ATCC 9079 ++ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 10145 ± <i>Trichophyton mentagrophytes</i> ATCC 9533 ++
Utilizare:	mediu selectiv și diferențial pentru izolarea și identificarea dermatofităilor din prelevatele clinice
Stocare:	în eprubete 2 luni la 2°-8 °C, în plăci o lună la 2°-8°C
Disponibil comercial:	Remel (SUA), Becton – Dickinson (SUA)

M71 Mediul RPMI 1640 - MOPS (CLSI)

Compoziție	
<i>Mediu RPMI 1640</i>	10,4 g
<i>MOPS</i>	34,53 g
<i>Apă distilată</i>	ad 1000 ml

- Preparare:** se amestecă ingredientele sub agitare continuă până la completa dizolvare. La 25°C se ajustează pH-ul la valoarea 7,0 cu ajutorul unei soluții de NaOH 1M. Se sterilizează prin filtrare utilizând un filtru cu porozitate 0,2 μm. Se stochează la 4°C până la utilizare. Înainte de utilizare se testează sterilitatea și pH-ul.
- Aspect:** bulion transparent, de culoare roșiatică
- pH final la 25°C:** 6,9 - 7,1
- Controlul calității:** trebuie să se obțină CMI-urile recomandate pentru tulpinile test.
- Utilizare:** mediu destinat testării susceptibilității la antifungice prin tehnicile CLSI
- Stocare:** 2°C–8°C
- Disponibil comercial:** nu se comercializează.

M72 Mediul RPMI 1640 - MOPS (EUCAST)

Compoziție mediu concentrație uzuală 1X	
<i>Mediu RPMI 1640</i>	10,4 g
<i>MOPS</i>	34,53 g
<i>Glucoză</i>	18 g
<i>Apă distilată</i>	ad 1000 ml

Compoziție mediu dublu concentrat 2X	
<i>Mediu RPMI 1640</i>	20,8 g
<i>MOPS</i>	69,06 g
<i>Glucoză</i>	36 g
<i>Apă distilată</i>	ad 1000 ml

- Preparare:** se adaugă ingredientele în apă bidistilată, amestecându-se continuu până la dizolvarea lor completă. Se ajustează pH-ul la valoarea 7,0 folosind NaOH soluție 1 M. se completează cu apă bidistilată până la 1 litru. Se sterilizează prin filtrare, utilizând un filtru cu porozitate 0,22 μm. Se păstrează la 4°C până în momentul folosirii. Înainte de utilizare, se testează sterilitatea mediului și se verifică pH-ul.

Medii de cultivare

Aspect:	bulion transparent de culoare roșiatică
pH final la 25°C:	6,9- 7,1
Controlul calității:	trebuie să se obțină CMI-urile recomandate pentru tulpinile test
Utilizare:	mediu destinat testării susceptibilității la antifungice prin tehnicile EUCAST
Stocare:	2°-8°C
Disponibil comercial:	nu se comercializează.

M73 Agar RPMI - MOPS - glucoză 2 %

Compoziție	
<i>Mediu RPMI 1640</i>	
<i>(cu L-glutamină și roșu fenol, fără bicarbonat)</i>	
	8,4 g
<i>MOPS</i>	34,5 g
<i>Glucoză</i>	20,0 g
<i>Agar pulbere</i>	15,0 g
<i>NaOH soluție 1M</i>	80-90 ml
<i>Apă distilată</i>	ad 1000 ml

Preparare:

se dizolvă pulberile de RPMI și MOPS în cca. 450 ml apă distilată și se sterilizează prin filtrare utilizând un filtru cu porozitate 0,2 μm. Se solubilizează glucoza și agarul în cca. 450 ml apă distilată și se sterilizează prin autoclavare timp de 15 minute la 121°C; se răcește apoi amestecul la 45°-50°C. Se încălzește lent soluția conținând RPMI și MOPS la cca. 45°C și se amestecă cu cea care conține glucoza și agarul, sub protecția unei hote microbiologice de clasă II. Se ajustează pH-ul amestecului la valoarea 7,0 utilizând soluție NaOH 1M, și se aduce volumul final al amestecului la 1000 ml. Se toarnă mediul în plăci Petri (cca. 60 ml/ placă ø 150 mm sau cca 25 ml / placă Petri ø 90 mm, sub protecția lămpii UV, utilizând o hotă microbiologică de clasă II. Se stochează la 4°C.

Aspect:	geloză translucidă, de culoare roșiatică
pH final la 25°C:	6,9-7,1
Controlul calității:	se realizează cu benzi E-Test la 48 ore

Intervalul CMI ($\mu\text{g}/\text{ml}$)

Tulpina test	FC	AP	FL	IT	VO
<i>C.parapsilosis</i> ATCC 22019	0,064 - 0,258	0,25 - 1	1 - 4 (rar colonii izolate la 8)	0,064 - 0,25	0,016 - 0,064
<i>C.krusei</i> ATCC 6258	≥ 32	0,5 - 2	128 ≥ 256	0,25 - 1	0,25 - 1
<i>C.albicans</i> ATCC 90028	0,5 - 2	0,125 -0,5	0,125 -0,5	0,064 - 0,25	0,004 - 0,016

Utilizare: mediu destinat testării susceptibilității la antifungice cu benzi
E-test
Stocare: 2°-8°C
Disponibil comercial: AES Laboratoire (Franța)

M74 Agar Dicloran - Rose Bengal - cloramfenicol
(DRBC Agar)

Compoziție	
<i>Peptonă proteazică 3</i>	<i>5,0 g</i>
<i>Dextroză</i>	<i>10,0 g</i>
<i>Fosfat monopotasic</i>	<i>1,0 g</i>
<i>Sulfat de magneziu</i>	<i>0,5 g</i>
<i>Dicloran</i>	<i>2,0 mg</i>
<i>Roz Bengal</i>	<i>25,0 mg</i>
<i>Cloramfenicol</i>	<i>0,1 g</i>
<i>Agar</i>	<i>15,0 g</i>
<i>Apă distilată</i>	<i>ad 1000 ml</i>

Preparare: ingredientele se dizolvă în apa distilată, amestecând continuu, cu menținerea temperaturii de fierbere timp de un minut. Autoclavarea are loc la o temperatură de 121°C timp de 15 minute
Aspect: geloză de culoare roz, transparentă sau ușor opalescentă

Medii de cultivare

pH final la 25°C: 5,6 ± 0,2

Controlul calității: *Aspergillus niger* ATCC 1015 - colonii albe
Candida albicans ATCC 10231 - colonii roz.
Escherichia coli ATCC 25922 -
Micrococcus luteus ATCC 10240 -

Utilizare: mediu pentru cultivarea și identificarea fungilor filamentoși

Stocare: în eprubete 2 luni la 2°-8°C, în plăci o lună la 2°-8°C

Disponibil comercial: Remel (SUA), Biokar Diagnostics (Franța).

M75 Trichophyton Agar 1-7

** Trichophyton Agar 1*

Compoziție	
<i>Aminoacizi Casamino</i>	
<i>Difco</i>	2,5 g
<i>Dextroză</i>	40,0 g
<i>Fosfat monopotasic</i>	1,8 g
<i>Sulfat de magneziu</i>	0,1 g
<i>Agar</i>	15,0 g
<i>Apă distilată</i>	ad 1000 ml

** Trichophyton Agar 2*

Compoziție	
<i>Aminoacizi Casamino</i>	
<i>Difco</i>	2,5 g
<i>Dextroză</i>	40,0 g
<i>Fosfat monopotasic</i>	1,8 g
<i>Sulfat de magneziu</i>	0,1 g
<i>Agar</i>	15,0 g
<i>Inozitol</i>	50,0 mg
<i>Apă distilată</i>	ad 1000 ml

*** Trichophyton Agar 3**

Compoziție	
<i>Aminoacizi Casamino</i>	
<i>Difco</i>	2,5 g
<i>Dextroză</i>	40,0 g
<i>Fosfat monopotasic</i>	1,8 g
<i>Sulfat de magneziu</i>	0,1 g
<i>Agar</i>	15,0 g
<i>Inozitol</i>	50,0 mg
<i>Tiamina HCL</i>	200 µg
<i>Apă distilată</i>	ad 1000 ml

*** Trichophyton Agar 4**

Compoziție	
<i>Aminoacizi Casamino</i>	
<i>Difco</i>	2,5 g
<i>Dextroză</i>	40,0 g
<i>Fosfat monopotasic</i>	1,8 g
<i>Sulfat de magneziu</i>	0,1 g
<i>Agar</i>	15,0 g
<i>Tiamină HCl</i>	200 µg
<i>Apă distilată</i>	ad 1000 ml

*** Trichophyton Agar 5**

Compoziție	
<i>Aminoacizi Casamino</i>	
<i>Difco</i>	2,5 g
<i>Dextroză</i>	40,0 g
<i>Fosfat monopotasic</i>	1,8 g
<i>Sulfat de magneziu</i>	0,1 g
<i>Acid nicotinic</i>	200 µg
<i>Agar</i>	15,0 g
<i>Apă distilată</i>	ad 1000 ml

*** *Trichophyton Agar 6***

Compoziție	
<i>Nitrat de amoniu</i>	1,5 g
<i>Dextroză</i>	40,0 g
<i>Fosfat monopotasic</i>	1,8 g
<i>Sulfat de magneziu</i>	0,1 g
<i>Agar</i>	15,0 g
<i>Apă distilată</i>	ad 1000 ml

*** *Trichophyton Agar 7***

Compoziție	
<i>Nitrat de amoniu</i>	1,5 g
<i>Histidină HCl</i>	30,0 mg
<i>Dextroză</i>	40,0 g
<i>Fosfat monopotasic</i>	1,8 g
<i>Sulfat de magneziu</i>	0,1 g
<i>Agar</i>	15,0 g
<i>Apă distilată</i>	ad 1000 ml

- Preparare:** ingredientele se amestecă cu apa distilată până la completa dizolvare și se fierb un minut. Se autoclavează la 121°C timp de 12 minute.
- Aspect:** geloză gălbuie, ușor opalescentă
- pH final la 25°C:** $6,8 \pm 0,2$
- Controlul calității:** *Trichophyton concentricum* ATCC 9358 ++
Trichophyton schoenleinii ATCC 4822 ++
Trichophyton verrucosum ATCC 34470 ++
- Utilizare:** cultivarea și identificarea speciilor aparținând genului *Trichophyton*
- Stocare:** în eprubete 4 luni la 2°-8°C, în plăci o lună la 2°-8°C
- Disponibil comercial:** Difco (SUA)

M76 Agar peptonă 3% (Agar Sabouraud conservare)

Compoziție	
<i>Peptonă</i>	30,0 g
<i>Agar</i>	20,0 g
<i>Apă distilată</i>	ad 1000 ml

- Preparare:** ingredientele se dizolvă în apa distilată, amestecând continuu, cu menținerea temperaturii de fierbere timp de un minut.

	Autoclavarea are loc la o temperatură de 121°C timp de 15 minute.
Aspect:	geloză de culoare galben-pal, translucidă
pH final la 25°C:	nu se determină
Controlul calității:	<i>M. persicolor</i> - colonii cu tentă roz-lila
Utilizare:	mediu pentru diferențierea <i>M. persicolor</i> de <i>T. mentagrophytes</i> și pentru conservarea sușelor de dermatofii
Stocare:	în eprubete 2 luni la 2°-8°C, în plăci o lună la 2°-8°C
Disponibil comercial:	nu se comercializează

Bibliografie selectivă

1. Abildgren M P, Lund F, Thrane U, Elmholt S (1987) - Czapek-Dox agar containing iprodione and dicloran as a selective medium for the isolation of *Fusarium* species; ***Lett Appl Microbiol***; 5:83-86.
2. Acha P N, Szyfrer B (1989) - ***Zoonoses et maladies transmissibles communes à l'homme et aux animaux***; Office International des Epizooties; 2nd edition; Paris.
3. Andrews S (1992) - Differentiation of *Alternaria* species isolated from cereals on dichloran malt extract agar. In ***Modern Methods in Food Mycology***, Samson R A, Hocking A D, Pitt J I, King A D (eds.); Ed. Elsevier, Amsterdam; 351-355.
4. Andrews S, Pitt J I (1986) - Selective medium for the isolation of *Fusarium* species and dematiaceous Hyphomycetes from cereals; ***Appl Environ Microbiol***; 51:1235-1238.
5. Baertschi C, Berthier J, Guiguettaz C, Valla G (1989) - A selective medium for the isolation and enumeration of *Mucor* species; ***Mycological Research***; 95:373-374.
6. Baron E J, Peterson L R, Finegold S M (1994) - ***Bailay & Scott's diagnostic microbiology***; 9nd edition. Mosby-Year Book; Inc; St. Louis; M.O.
7. Barr F S, Collins G F (1996) - A rapid method for isolation and identification of *Candida*; ***J Southern Med Assoc***; 59:694-695.
8. Baumgartner C, Freydiere A-M, Gille Y (1996) - Direct identification and recognition of yeast species from clinical material by using Albicans ID and CHROMagar Candida plates; ***J Clin Microbiol***; 34:456-465.
9. Bensignore E, Feuillade de Chauvin M (1999) - *Microsporium persicolor* (Sabouraud) Guiard et Grigorakis 1929 chez l'animal et chez l'homme: etude *in vitro* et revue de la littérature; ***Rec Méd Vét***; 175(1-2):45-60.
10. Booth C (1971) - Fungal culture media. In ***Methods in Microbiology***, ed. Booth C; Academic Press, London; 49-94.
11. Buiuc D, Neguț M (1999) - ***Tratat de microbiologie clinică***; Ed. Medicală; București.
12. Chabasse D (Editor) (2004) - Les dermatophytes; ***Cahier de formation en Biologie médicale***; Bioforma; Paris; No. 31.
13. Chabasse D, Cimon B, Gentile L, Bouchara J P (1991) - Les mycoses transmises d'animal à l'homme; ***Revue française des laboratoires***; 10(228):77-83.
14. Chermette R, Bussieras J (1993) - ***Abrégé de parasitologie vétérinaire***; Fasc. V; Mycologie vétérinaire; ENV d'Alfort; Paris.
15. Coman I, Mareș M (2000) - ***Micologie medicală aplicată***; Ed. Junimea, Iași.
16. Constantinescu O (1974) - ***Metode și tehnici în micologie***; Ed. Ceres; București.

17. Costa S O, de Lourdes Branco C (1964) - Evaluation of a molybdenum culture medium as selective and differential for yeasts; **J Pathol Bacteriol**; 87:428-431.
18. Cutsem Van J, Rochette F (1992) - **Mycoses des animaux domestiques**; Janssen Researchers Foundation.
19. Freydière A M, Guinet R (1997) - Rapid methods for identification of the most frequent clinical yeasts; **Rev Iberoam Micol**; 14:85-89.
20. Freydière A-M, Rousselle P, Gille P (1995) - Apport des milieux d'identification rapide de *Candida albicans*: Fluoroplate et Albicans ID; **J Med Mycol**; 5:190-191.
21. Garcia-Martos P, Garcia-Agudo R, Hernandez- Molina J M *et al.* (1998) - Identificacion de levaduras de interes clinico en el medio de cultivo CHROMagar Candida; **Rev Iberoam Micol**; 15:131-135.
22. Golăescu M (1997) - **Diagnosticul și tratamentul micozelor interne**; Ed. Viața Medicală Românească; București.
23. Grillot R (1996) - **Les Mycoses humaines: demarche diagnostique**; Ed. Elsevier, Paris.
24. Gueho E, Midgley G, Guillot J (1996) - The genus *Malassezia* with description of four new species; **Antonie van Leeuwenhoek**; 69:337-355.
25. Guillot J, Gueho E, Mialot M, Chermette R (1998) - Importance des levures du genre *Malassezia* en dermatologie vétérinaire; **Le point Vétérinaire**; 29:691-701.
26. Hocking A D, Pitt J I (1980) - Dichloran-sucrose agar, a differential medium for enumeration of xerophilic fungi from low-moisture foods. **Appl Environ Microbiol**; 39:488-492.
27. Hoog de G S, Guarro J, Gené, Figueras M J (2000) - **Atlas of clinical fungi**; 2nd edition; Centraalbureau voor Schimmelcultures / Universitat Rovira i Virgili.
28. Hopfer R L, Blank F (1975) - Caffeic acid - containing medium for identification of *Cryptococcus neoformans*; **J Clin Microbiol**; 2:1158-1200.
29. Jacquemin P, Jacquemin J L (1974) - **Abrégé de parasitologie clinique**; Masson et C^{ie}; Paris.
30. Jarvis B (1973) - Comparison of an improved rose bengal-chlortetracycline agar with other media for the selective isolation and anumeration of moulds and yeasts in foods; **J Appl Bacteriol**; 36:723-727.
31. Kane J (1984) - Conversion of *Balstomyces dermatitidis* to the yeast form at 37°C and 26°C; **J Clin Microbiol**; 20:594-596.
32. King A D, Hocking A D, Pitt J I (1979) - Dichloran-rose bengal medium for enumeration and isolation of moulds from foods; **Appl Environ Microbiol**; 37:959-964.
33. Kumar Girish C P, Menon T (2005) - Tobacco agar: a new medium for chlamydosporulation in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*; **Med Mycol**; 43(5):473-475.

34. Kurtzman C P, Boekhout T, Robert V, Fell W, Deak T (2003) - Methods to identify yeasts. *In* Boekhout T, Robert V (eds) - ***Yeasts in Food***; B Behr's Verlag GmbH & Co; Hamburg; Germany.
35. Kurung J M, Yegian D (1954) - Medium for maintenance and conversion of *Histoplasma capsulatum* to the yeast like phase; ***Am J Clin Pathol***; 24:505-508.
36. Kwon-Chung K J, Bennett J E (1992) - ***Medical Mycology***; Lea & Febiger; Philadelphia.
37. Leeming J P, Notman F H (1987) - Improved methods for isolation and enumeration of *Malassezia furfur* from human skin; ***J Clin Microbiol***; 25:2017-2019.
38. Martin M V, Schneidau J D (1970) - A simple and reliable assimilation test for the identification of *Candida* species; ***Am J Clin Pathol***; 53:875-879.
39. Mayser P, Wille G, Imkampe A., Thoma W *et al.* (1998) - Synthesis of fluorochromes and pigments in *Malassezia furfur* by use of triptophane as single nitrogen source; ***Mycoses***; 41:265-271.
40. Mc Ginnis M R (1980) - ***Laboratory handbook of medical mycology***; Academic Press; New York.
41. Mitroiu P (1976) - ***Micoze și micotoxicoze la animale***; Ed. Ceres; București.
42. Mosaid al A, Sullivan D, Coleman D C (2003) - Differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans* on Pal's Agar; ***J Clin Microbiol***; 41(10): 4787-4789.
43. Mosaid al A, Sullivan D, Salkin I F *et al.* (2001) - Differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans* on Staib Agar and Caffeic Acid- Ferric Citrate Agar; ***J Clin Microbiol***; 39(1):323-327.
44. Moser S A, Lyon F L, Greer D L (1988) - Sistemic mycoses; *In* BB Wentworth (ed.) - ***Diagnostic procedures for mycotic and parasitic infection***; American Public Health Association; Washington DC; 173-238.
45. Nelson C S, Yau Y C W, Richardson E S, Matlow A (1995) - Improved detection of *Malassezia* species in lipid-supplemented Peds Plus Blood Culture Bottles; ***J Clin Microbiol***; 33:1005-1007.
46. Peman J, Martin-Mazuelos E, Rubio Calvo M C (eds) (2001) - ***Guia Practica de Identificacion y Diagnostico en Micologia Clinica***; Rev Iberoam Micol; Bilbao.
47. Percebois G (1973) - ***Introduction à une etude des dermatophytes***; Société d'Impressions Typographiques; Nancy.
48. Pfaller M A, Messer S A, Boyken L *et al.* (2004) - Evaluation of the NCCLS M44-P Disk Diffusion Method for Determining Susceptibilities of 276 Clinical Isolates of *Cryptococcus neoformans* to Fluconazole; ***J Clin Microbiol***; 42(1):380-383.
49. Randhawa H S, Chowdhary A, Sinha K P *et al.* (2006) - Evaluation of peptone glucose fluconazole agar as a selective medium for rapid and enhanced isolation of *Aspergillus fumigatus* from the respiratory tract of

- bronchopulmonary aspergillosis patients colonized by *Candida albicans*; **Med Mycol**; 44(4):343-348.
50. Rousselle P, Freydiere A-M, Couillerot P J *et al.* (1994) - Rapid identification of *Candida albicans* by using Albicans ID and Fluoroplate agar plates; **J Clin Microbiol**; 32:3034-3036.
 51. Segretain G, Drouhet E, Mariat F (1987) - **Diagnostic de laboratoire en micologie médicale**; Maloin; Paris.
 52. Sheth C C, Johnson E, Baker E M *et al.* (2005) - Phenotypic identification of *Candida albicans* by growth on chocolate agar; **Med Mycol**; 43(8):735-738.
 53. Sinski J T, Kelley L M, Reed G L (1975) - Pagano-Levin *Candida* test medium; evaluation using vaginal samples; **J Clin Microbiol**; 1:206-211.
 54. Slifkin M (2000) - Tween 80 opacity test responses of various *Candida* species; **J Clin Microbiol**; 38(12):4626-4628.
 55. Staib F, Arastéh K (2000) - Chlamydospore formation on Staib Agar. Observations made before *Candida dubliniensis* was described; **Mycoses** ; 44:23-27.
 56. Staib F, Seibold M, Antweiler E *et al.* (1987) - The brown color effect (BCE) of *Cryptococcus neoformans* in the diagnosis, control and epidemiology of *Cryptococcus neoformans* infections in AIDS patients; **Zentralbl Bakteriol Microbiol Hyg A**; 266:167-177.
 57. Staib P, Morschhauser J (1999) - Chlamydospore formation on Staib agar as a species-specific characteristic of *Candida dubliniensis*; **Mycoses**; 45:521-524.
 58. Stepanović S, Vuković D, Radonjić I *et al.* (2002) - Ground red hot pepper agar in the isolation and presumption identification of *Cryptococcus neoformans*; **Mycoses**; 45:384-388.
 59. Strachan A A, Yu R J, Blank F (1971) - Pigment production of *Cryptococcus neoformans* grow with extracts of *Guizotia abyssinica*; **Appl Microbiol**; 22:478-179.
 60. Summerbell R C, Rosenthal A S, Kane J (1988) - Rapid method for differentiation of *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, and related dermatophyte species; **J Clin Microbiol**; 26(11): 2279-2282.
 61. Waller J, Koenig H, Debruyne, Contant (1993) - Evaluation d'un nouveau milieu d'isolement des levures et de diagnostic rapide de *Candida albicans*; **Revue Française de Laboratoire**; 252:89-92.
 62. Warren N G, Hazen K C (1995) - *Candida*, *Cryptococcus* and other yeasts of medical importance; In Muray P R, Baron E J, Pfaller M A *et al.* (eds) - **Manual of clinical microbiology**; 6nd edition; American Society for Microbiology; Washington D C; 723-737.
 63. Willinger B, Hillowoth, Selitsch B (2001) - Performance of Candida ID, a new chromogenic medium for presumptive identification of *Candida* species, in comparison to CHROMagar Candida; **J Clin Microbiol**; 39:3793-3795.

64. Willinger B, Manafi M, Selitsch B, Hillowoth C (1999) - Bewertung von CHROMagar Candida zum schnellachweis von *Candida* - Arten aus Klinischer Untersuchungsmaterial; *Mycoses*; 42:61-65.
65. Willinger B, Manafi, Rotter M L (1994) - Comparison of rapid methods using flourogenic assays for detecting *Candida albicans*; *Lett Appl Microbiol*; 18:47-49.
66. Yamane N, Saitoh Y (1985) - Isolation and detection of multiple yeasts from a sigle clinical sample by use of Pagano-Levin agar medium; *J Clin Microbiol*; 21:276-277.
67. * * * CLSI (2002) - *Quality assurance for commercially prepared microbiological culture media*; Approved Standard: M22-A2; Villanova; P.A.
68. * * * Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (AFST) of the ESCMID European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) (2002) - *Method for the determination of minimum inhibitory concentration (MIC) by broth diluaton of fermentative yeasts* (E. Dis. 7.1).

4

Tehnici de însămânțare și transplantare

Mihai Mareș, Olimpia Bazgan

4.1. Tehnici uzuale

Ca regulă generală, însămânțarea prelevatelor se poate face prin mai multe tehnici uzuale:

- *epuizare pe medii solide* condiționate fie în plăci Petri, fie în tuburi (în pantă) – asigură separarea fungilor cu semnificație clinică de cei contaminanți și inhibă prin diluare eventualele substanțe antimicrobiene cu rol antifungic;
- *etalare în puncte izolate – prin spotare*: la unele prelevate paucibacilare sub formă de lichide organice – LCR, pasaje din hemoculturi (fig. nr. 4-1 *vezi Anexa*), sedimente, fragmente de țesut și *prin înțepare*: la fire de păr, scuame, diverse raclate;
- *înglobare* în medii solide pretopite și răcite la 45°C: la fire de păr, fragmente unghiale, scuame.

În timpul însămânțărilor se va ține seama de următoarele reguli:

- Însămânțările se vor executa în boxe sau hote speciale, care se pot steriliza periodic și nu permit formarea de curenți de aer în timpul lucrului. Însămânțarea prelevatelor provenite din situsuri normal sterile se va face preferabil sub protecția unei hote microbiologice clasă 2, pentru a preveni eventuala lor contaminare cu spori fungici ambientali.
- Se evită conversația și orice mișcare în jurul operatorului;
- Instrumentul utilizat la însămânțare (ansă microbiologică, ac de însămânțare, pipetă etc.) nu se va atinge de obiecte nesterilizate (halat, masă de lucru);
- Însămânțările se vor executa într-un timp scurt, pentru a reduce la minim contactul materialului de însămânțat cu atmosfera ambiantă;
- În timpul cât tuburile de cultură sunt deschise, vor fi ținute într-o poziție oblică, cât mai aproape de orizontalitate și cu deschiderea în imediata apropiere a flăcării becului de gaz;
- Operatorul trebuie să poarte mască de protecție;
- Tuburile și plăcile Petri însămânțate se notează cu markerul, fără a omite numărul probei, denumirea abreviată a mediului de cultivare și data însămânțării.

Însămânțarea se execută în fața flăcării unui bec de gaz care asigură condiții de antisepsie în timpul acțiunii. În micologia medicală, produsele patologice se însămânțează în mod similar cu cel din bacteriologie. Acul de însămânțare / ansa se flambează și se răcește în ser fiziologic sterilizat, apoi se ia un fragment de produs patologic ce aderă de ac și se depune pe suprafața mediului de cultură. Din aceeași probă, se însămânțează mai multe plăci sau tuburi, în puncte separate, câte 3 – 4 fragmente de cercetat.

Culturile se examinează zilnic, urmărindu-se aspectul macroscopic (suprafața, relieful, culoarea, prezența pigmentării, consistența și viteza creșterii). În timpul dezvoltării, coloniile își schimbă aspectele macroscopice. Aspectele coloniilor se notează periodic, pentru a surprinde toate caracterele culturale. Paralel se face și examenul morfologic al fragmentelor de colonii.

Șansele de izolare a fungilor cu semnificație clinică cresc direct proporțional cu numărul probelor însămânțate. Temperatura de incubare după însămânțare este de 36°-37°C pentru prelevatele interne / profunde și de 30°C pentru cele superficiale.

Atenție! Fragmentele biopsice recoltate din leziuni suspecte de zygomicoză nu se omogenizează cu diluant prin mojarare sau fragmentare, deoarece se distruge miceliul și cultura va fi fals negativă. Temperatura de incubare recomandată este 37°C.

Pentru izolarea levurilor, însămânțarea prelevatelor se face pe Agar Sabouraud aditivat cu cloramfenicol. Acest mediu permite o bună dezvoltare a levurilor și supresează multiplicarea eventualelor bacterii contaminante. Pentru levurile lipodependente ale genului *Malassezia*, cultivarea prelevatelor se face fie pe Agarul Sabouraud cu cloramfenicol pe suprafața căruia s-a etalat prin striere o fină peliculă de ulei de măsline sterilizat prin autoclavare, fie pe medii speciale (Dixon, Leeming). Pe Agar Sabouraud cu cloramfenicol, culturile mixte apărute prin asocierea a două sau mai multe specii de levuri sunt uneori dificil de observat, de aceea ideal ar fi ca însămânțarea prelevatelor să se facă pe un mediu diferențial cromogen, care pe lângă discriminarea între speciile levurice poate aduce informații esențiale pentru identificarea agentului etiologic. Se realizează astfel într-o singură etapă, atât izolarea, cât și identificarea levurii / levurilor incriminate. Pe mediile de izolare, levurile de interes medical se dezvoltă în 24-72 ore de incubare. În funcție de proveniența prelevatului se va face și alegerea temperaturii de incubare. Pentru prelevatele provenind din situsuri în care în mod normal temperatura este identică cu cea a organismului, se va alege temperatura de 37°C pentru incubare. În cazul celor provenind de la nivelul tegumentului sau unghiilor, incubarea se va face atât la 37°C, cât și la 30°C, deoarece unele levuri cultivabile la 30°C dar necultivabile la 37°C, pot avea semnificație clinică fiind cauza unor micoze superficiale.

În cazul dermatofitozelor, se recomandă ca primocultura să se efectueze în plăci Petri și nu în tuburi, deoarece atât însămânțarea cât și manoperele ulterioare sunt mult facilitate. Mediul de elecție pentru izolarea dermatofităilor este Agarul Mycobiotic (Agar Sabouraud aditivat cu cloramfenicol și cicloheximidă); prezența cloramfenicolului suprimă dezvoltarea bacteriilor care pot contamina prelevatul, iar cicloheximida (Actidione) inhibă multiplicarea fungilor contaminanți, facilitând izolarea dermatofităilor. Materialul patologic se însămânțează în mai multe puncte pentru a crește probabilitatea izolării dermatofităilor și a putea acorda semnificație

clinică tulpinii izolate. Cu cât numărul punctelor de însămânțare pozitive este mai mare, cu atât implicarea clinică a tulpinii izolate este mai sigură. Este posibilă și însămânțarea prin înglobarea prelevatului în mediul de cultură, însă interpretarea semnificației clinice devine mai dificilă. Incubarea se realizează la 25°-30°C, timp de cca. 4 săptămâni. Când se suspicionează o infecție cu *T. verrucosum*, plăcile se vor incuba la 37°C (creștere accelerată). În cazul absenței sporulării în primocultură, tulpinile se pot pasa pe medii speciale care favorizează producerea macroconidiilor și pigmentogeneza: mediul Lactrimel (Borelli), PDA, agar peptonă 3%. Se recomandă observarea culturilor de 2 ori / săptămână pentru a surprinde în dinamică aspectele caracteristice coloniilor de dermatofiți. Importante din punct de vedere diagnostic sunt viteza de creștere, caracterele morfologice macro- și microscopice. La unele specii de dermatofiți apar așa-numitele „formațiuni ornamentale” care reprezintă de fapt hife cu aspect modificat, al căror rol nu este încă elucidat: hife „în rachetă” sau cu aspect de „tijă de bambus”, candelabre favice, hife spiralate (vrile), celule osiforme (aspect de „ganteră”), organe nodulare, hife pectinate.

4.2. Tehnici speciale

4.2.1. Tehnica de purificare a izolatelor levurice

După obținerea primoculturii, se va verifica obligatoriu puritatea acesteia deoarece contaminarea bacteriană este indezirabilă în acțiunea ulterioară de identificare a speciei. În acest scop, se pregătesc fie preparate între lamă și lamelă, fie frotiuri colorate Gram care se examinează la microscop, cu obiectivul de imersie. În cazul prezenței bacteriilor, se recurge la pasarea tulpinii în bulion Sabouraud aditivat cu acid clorhidric soluție 1N, conform schemei prezentate în fig. nr. 4-2.

După incubare și reverificare prin colorația Gram, se epuizează 0,1 ml din tubul cu numărul maxim de picături de HCl care a permis dezvoltarea levurilor, pe suprafața unui Agar Sabouraud cu cloramfenicol în vederea obținerii coloniilor purificate.

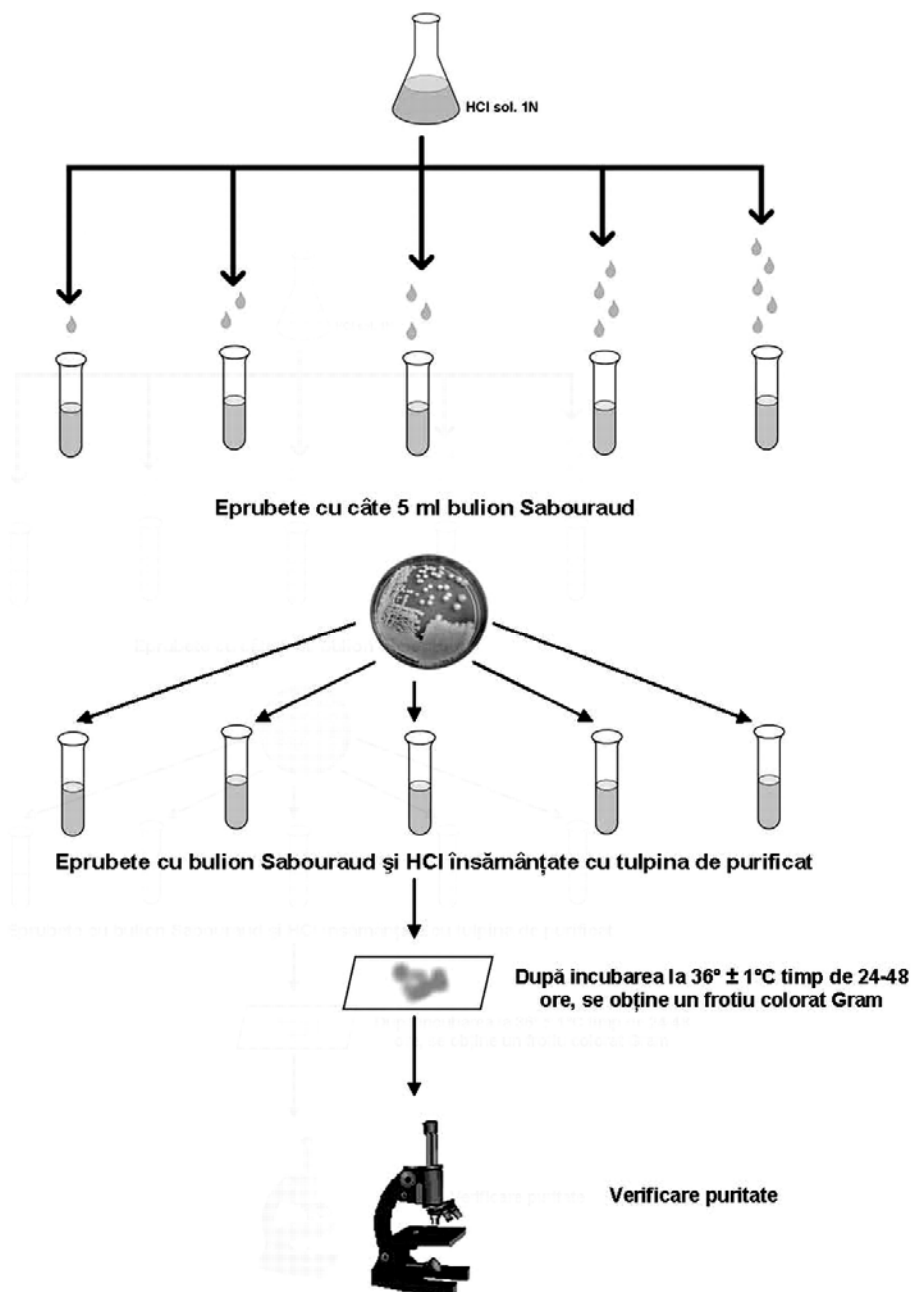


Fig. nr. 4-2. Purificarea izolatelor levurice – metodologie de lucru

4.2.2. Tehnica însămânțării levurilor pe Agarul cu făină de porumb și tween 80 (metoda Dalmau)

Prin cultivare submersă pe acest mediu, levurile își exprimă plenar toate detaliile morfologice: blastospori, pseudohife (pseudofilamente), filamente (hife), clamidospori, artrospori, ascospori. În funcție de gen și specie, aceste formațiuni apar sau nu și prezintă anumite caracteristici utile identificării. Rezultatele acestui test pot fi doar rareori utilizate singular; de obicei, ele se coroborează obligatoriu cu rezultatele profilului biochimic al tulpinii în cauză (fermentarea zaharurilor, asimilarea diverselor surse de carbon sau azot, producerea unor enzime ca ureaza, fenol-oxidaza, hexozaminidaza, L-prolin-aminopeptidaza, catalaza).

Tehnica de lucru: se pregătesc plăci Petri cu o grosime a mediului de 4-5 mm (cca. 25-30 ml mediu / placă cu $\varnothing$ 90 mm); după solidificare, cu ajutorul ansei microbiologice cu care s-a prelevat în prealabil o mică porțiune din colonia levurii de identificat, se practică 3 „incizii” ale mediului, după cum urmează: primele două – paralele între ele, la distanță de cca. 1-1,5 cm, apoi o aIIIa – perpendiculară pe celelalte (fig. nr. 4-3). În timpul însămânțării mediului, ansa se menține înclinată sub o incidență de cca. 60° - 70° față de orizontală. Porțiunea de agar astfel însămânțată se acoperă cu o lamelă sterilizată. După o incubare de 48-72-96 ore la 25°C - 30°C , placa Petri se examinează direct la microscop, formațiunile dezvoltate în mediu fiind observabile prin traversul lamelei. Alternativ, după însămânțare, mediul nu se acoperă cu lamelă, iar pentru examinare se prelevează cu ajutorul ansei un bloc de geloză de pe linia de însămânțare și se etalează prin strivire între lamă și lamelă. Se examinează apoi la microscop, fără colorare suplimentară, urmărindu-se prezența clamidosporilor, forma și mărimea pseudohifelor, modul de dispunere a blastosporilor (blastoconidiilor) de-a lungul acestora.

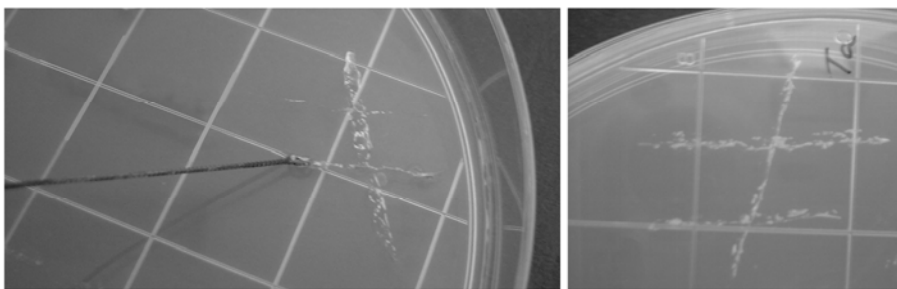


Fig. nr. 4-3. Tehnica însămânțării levurilor pe CMA (cultivare submersă).

4.2.3. Tehnica de cultivare pe suporturi transparente

Metoda constă în plasarea unei lamele sterilizate pe suprafața gelozei, foarte aproape de colonia activă. Miceliul va crește peste lamelă, care la un anumit interval de timp poate fi ridicată și examinată la microscop.

În locul lamelelor se pot folosi pătrate de celofan de mărimea lamelelor, sterilizate prin autoclavare. Inoculul se depune în mijlocul pătratului de celofan, iar după dezvoltarea miceliului, pelicula de celofan se montează pe lamă și se examinează la microscop.

4.2.4. Tehnica de cultivare în „picătură suspendată”

Inele de sticlă cu diametrul de 2 cm și înălțimea de 1 cm se iversează în parafină topită și imediat se așează pe o lamă de sticlă sterilizată. În interiorul inelului de sticlă se pune o picătură de apă distilată sterilizată. Lamela de sticlă se flambează și în zona centrală se depune o picătură de bulion Sabouraud, în care se însămânțează materialul de cercetat. Marginea superioară a inelului de sticlă se gresează cu lanolină, se trece prin flacăra pentru sterilizare și se aplică apoi lamela cu picătura însămânțată în jos.

Lamela se examinează la microscop după câteva zile de incubație.

4.2.5. Tehnica de cultivare pe bloc de geloză (cultivarea pe lamă)

Cultura pe bloc de geloză (pe lamă) este recomandată pentru studierea în dinamică a morfologiei structurilor de fructificare (generatoare de conidii) la fungii filamentoși septați (nu însă la cei din genurile *Aspergillus* și *Penicillium*). În acest scop, fungul de identificat se însămânțează în două puncte opuse ale unui bloc de geloză (PDA) de 1 x 1 x 0,5 cm etalat pe o lamă de sticlă. După însămânțare, acesta se acoperă cu o lamelă, iar lama se așează pe o baghetă de sticlă în formă de „U” plasată într-o cameră umedă (de fapt, o placă Petri ce conține un fragment de hârtie de filtru umectat cu cca. 5 ml apă distilată). Camera umedă (fig. nr. 4-4) se incubează la 25°-30°C, un timp variabil, până la apariția pe lamă a structurilor de fructificare cu morfologie caracteristică, fapt constatat în urma examinării microscopice. În final, blocul de geloză se îndepărtează, iar din lamă, respectiv lamelă, se obțin prin adăugare de lactofenol și montare, două preparate extemporanee. Aceste două preparate obținute se pot păstra, dacă vor fi lutate, timp de aproximativ cinci ani.



Fig. nr. 4-4. Cameră umedă pentru cultivarea fungilor pe bloc de geloză.

4.3. Tehnici de transplantare

Prin transplantări sau pasaje se urmărește izolarea în stare pură a fungilor de interes medical din culturile mixte sau menținerea lor în timp, în condiții de laborator (tulpini de colecție) și obținerea de colonii monosporale.

Din culturile pe medii lichide, recoltarea materialului de transplantat se poate face cu pipeta Pasteur sau cu ansa de însămânțare. Cu pipeta Pasteur se recoltează o cantitate din cultura veche, din care se însămânțează câteva picături în mediul lichid și câteva picături pe suprafața mediului solid. În cazul transplantării cu ansa, se introduce ansa sterilizată în cultura veche, apoi se face însămânțarea pe mediile proaspete (întâi pe mediul lichid și apoi în trei puncte pe mediul solid).

Din culturile pe medii solide, transplantarea se face cu ansa sau cu o microspatulă, luând o cantitate redusă de miceliu de la periferia coloniei vechi. Acest material biologic se transferă pe bulion și pe un mediu agarizat (Agar Sabouraud, PDA, Agar Czapek – Dox, Agar cu extract de malț etc.).

Bibliografie selectivă

1. Bazgan O (1999) - ***Diagnostic de laborator și igiena alimentelor de origine animală***; Ed. Moldogrup; Iași.
2. Buiuc D, Neguț M (1999) - ***Tratat de microbiologie clinică***; Ed. Medicală; București.
3. Coman I, Mareș M (2000) - ***Micologie medicală aplicată***; Ed. Junimea; Iași.
4. Constantinescu O (1974) - ***Metode și tehnici în micologie***; Ed. Ceres; București.
5. Golăescu M (1997) - ***Diagnosticul și tratamentul micozelor interne***; Ed. Viața Medicală Românească; București.
6. Grillot R (1996) - ***Les mycoses humaines démarche diagnostique***; Elsevier; Paris.
7. Guého E, Midgley G, Guillot J (1996) - The genus *Malassezia* with description of four new species; ***Antonie van Leeuwenhoek***; 69:337-355.
8. Hoog G S de, Guarro J, Gené J, Figueras M J (2000) - ***Atlas of clinical fungi***; 2nd edition; Centraalbureau voor Schimmelcultures / Universitat Rovira i Virgili.
9. Ribes J A, Vanover-Sams C L, Baker D J (2000) - Zygomycetes in Human Disease; ***Col Rev***; 2(13):236-301.
10. Ribes J A, Vanover-Sams C L, Baker D J (2000)– Zygomycetes in Human Disease; ***Col Rev*** ; vol. 13(2): 236-301.

5

Tehnici de examinare microscopică a fungilor din culturi

Mihai Mareș, Olimpia Bazgan

Examenul microscopic al fragmentelor de colonii fungice urmărește:

- Aspectul hifelor - septate sau nu;
- Aspectul miceliului - difuz, gros, colorat, incolor;
- Prezența și tipul sporilor sexuați - zigospori, ascospori;
- Prezența corpurilor fructificanți asexuați (tipul și aspectul sistemului sporal, aranjarea (îmbinarea) conidioforilor și a sporangioforilor, forma, culoarea, mărimea și eventuala septare a sporului);
- Prezența și tipul unor structuri particulare: rizoizi, stoloni, scleroți, celule Hülle.

Pentru studiul morfologiei microscopice a fungilor obținuți în urma însămânțării prelevatelor se utilizează mai multe tehnici, în funcție de tipul acestora:

- levuri - frotiuri (colorate Gram, cu albastru de metilen etc.) sau preparate extemporanee (între lamă și lamelă) cu tuș de India sau lactofenol și albastru de anilină;
- fungi filamentoși – preparate extemporanee cu lactofenol și albastru de anilină, preparate cu bandă adezivă sau preparate obținute prin cultivare pe lamă.

5.1. Preparatul extemporaneu cu lactofenol și albastru de anilină (levuri)

Este o metodă mai rar utilizată pentru studierea morfologiei levurilor, însă este uneori preferată pentru expeditivitatea sa, mai ales în cazul levurilor din primoculturi. În acest scop, pe o lamă de microscopie curată și degresată, se depune o picătură de lactofenol cu albastru de anilină în care se va suspensiona apoi cu mișcări cât mai fine, cu ajutorul unei anse microbiologice, o mică porțiune din colonia levuristică de studiat. Suspensia astfel obținută se acoperă cu o lamelă și se examinează la microscop (x10, x20, x40, x100 – după caz). Pentru reușita preparatului, este importantă cantitatea de material biologic prelevat din colonie; aceasta trebuie să fie cât mai redusă, astfel încât densitatea suspensiei obținute să fie mică.

5.2. Preparatul extemporaneu cu lactofenol și albastru de anilină (funghi filamentoși)

Se obține parcurgând următoarele etape:

- se depune o picătură de lactofenol pe o lamă de microscopie, curată și degresată;
- se prelevează cu ajutorul unui ac sau al unei microspatule metalice un fragment de dimensiuni milimetrice din colonia de examinat, se etalează în picătura de lactofenol și se dilacerează cu mișcări fine miceliul, utilizând două ace;
- se acoperă cu o lamelă curată, se presează, se încălzește ușor la flacără pentru a obține un film cât mai fin de lactofenol și a elimina eventualele bule de gaz;
- se examinează la microscop, folosind succesiv obiectivele x10, x20, x40, eventual x100;
- în cazul în care se dorește păstrarea preparatului în lamotecă, pentru conservarea sa, acesta se poate luta (fig. nr. 5-1 vezi *Anexa*).

5.3. Preparatul extemporaneu cu bandă adezivă

În acest caz, prelevarea structurilor fungice de la nivelul coloniilor se face cu ajutorul unui fragment de bandă adezivă transparentă (tip scotch), cu dimensiuni de 1,0-1,5 x 2,5-3,0 cm, cu care se amprentează marginea coloniei. Acest fragment de bandă adezivă se lipește apoi pe o lamă pe care s-a etalat în prealabil o picătură de lactofenol (fig. nr. 5-2). Opțional, peste bandă se pot etala o nouă picătură de lactofenol și apoi o lamelă, în vederea ameliorării vizibilității la examinarea microscopică ulterioară. În cazul coloniilor care sporulează intens (*Aspergillus spp.*, *Penicillium spp.* etc.) se recomandă pregătirea a 2-3 preparate cu bandă adezivă din același loc – prima va fixa sporii, iar următoarele vor recolta conidioforii, astfel încât prin examinarea ulterioară să fie surprinse toate aspectele utile încadrării taxonomice.

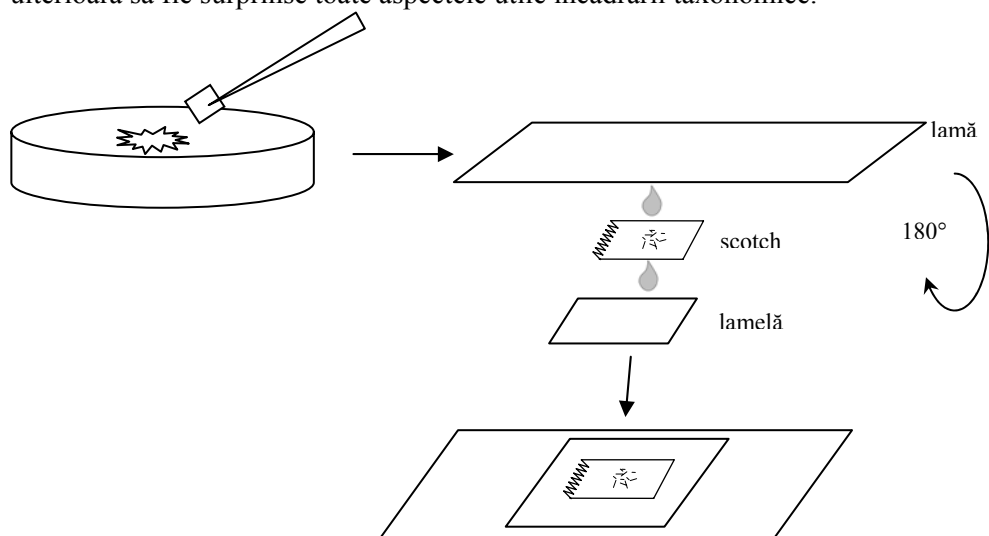


Fig. nr. 5-2. Obținerea preparatului extemporaneu cu bandă adezivă

O altă variantă a tehnicii presupune etalarea fragmentului de bandă adezivă pe o lamelă cu o picătură de lactofenol, adăugarea peste aceasta a unei alte picături de colorant și apoi a lamei de microscopie. Preparatul se rotește apoi cu 180° pentru a-l aduce în poziția de examinare. Prin acest procedeu, claritatea imaginii este maximă datorită faptului că între ochiul examinatorului și structurile fungice se interpune doar lamela, nu și banda scotch ca în tehnicile anterioare.

5.4. Lutarea preparatelor extemporanee

Etanșarea sau lutarea preparatelor este necesară pentru a evita evaporarea lichidului de montare. Suprafețele lamei și lamelei, pe care se aplică substanțele de etanșare, trebuie să fie perfect uscate și curate. Substanțele folosite la etanșare nu trebuie să reacționeze cu lichidul de montare, să fie impermeabile, elastice, persistente și să adere de suprafața sticlei.

Rășinile naturale

Se pot folosi pentru lutare colofoniul, guma arabică, șerlacul, balsamul de Canada.

Lacul pentru unghii este cel mai utilizat la etanșarea preparatelor deoarece se usucă repede și se manipulează ușor. Se îndepărtează excesul de lichid de montare de pe lamă și lamelă, prin ștergere cu un fragment de hârtie de filtru. Cu un penson se aplică un strat subțire de lac peste marginea lamelei și suprafața lamei din imediata apropiere a acesteia. Se lasă să se usuce, apoi se poate stoca.

Cimentul Thorner, cunoscut sub denumirea de „Glyceel” este format din:

- ulei polimerizat 31,75 ml
- alcool metilic industrial..... 4,76 ml
- acetat de butil 20,41 ml
- toluen (fără sulf)..... 20,41 ml

Glyceelul este un lichid siropos, incolor, se usucă repede, formând o peliculă elastică, rezistentă și care aderă bine de sticlă.

Amestecul de ceară galbenă de albine și colofoniu

20 g ceară de albine se topesc într-o capsulă de porțelan, apoi se adaugă treptat 80 g colofoniu și se încălzesc până la topirea completă. Amestecul se aplică cu o spatulă pe marginile lamei și lamelei montate. Înainte de fiecare folosire, amestecul se retopeste.

Amestecul de colofoniu și lanolină (60%, respectiv 40%)

Se omogenizează prin topire, apoi se distribuie în plăci Petri și se lasă la solidificare. În momentul folosirii, se lichefiază cu ajutorul aplicatorului încălzit la flacără. Se folosește similar cu celelalte lichide de lutare.

Bibliografie selectivă

1. Bazgan O (1999) - ***Diagnostic de laborator și igiena alimentelor de origine animală***; Ed. Moldogrup; Iași.
2. Buiuc D, Neguț M (1999) - ***Tratat de microbiologie clinică***; Ed. Medicală; București.
3. Coman I, Mareș M (2000) - ***Micologie medicală aplicată***; Ed. Junimea; Iași.
4. Constantinescu O (1974) - ***Metode și tehnici în micologie***; Ed. Ceres; București.
5. Golăescu M (1997) - ***Diagnosticul și tratamentul micozelor interne***; Ed. Viața Medicală Românească; București.
6. Harris J (2000) - Safe, low-distortion tape touch method for fungal mounts; ***J Clin Microbiol***; 38(12):4683-4684.
7. Hoog G S de, Guarro J, Gené J, Figueras M J (2000) - ***Atlas of clinical fungi***; 2nd edition; Centraalbureau voor Schimmelcultures / Universitat Rovira i Virgili.

6

Tehnici de histopatologie

Petru Cazacu

Fragmentele de țesut recoltate de la pacient în vederea diagnosticului trebuie procesate în laboratorul de histopatologie pentru a obține preparate permanente care vor fi examinate microscopic de către morfopatolog. Fragmentele de țesut pot fi recoltate prin biopsie, prin exereză chirurgicală și prin autopsie. Procesarea țesuturilor în vederea diagnosticului histopatologic presupune o suită de operațiuni și tehnici care vor permite vizualizarea elementelor fungice intratisulare și / sau a leziunilor specifice determinate de acestea.

6.1. Obținerea probelor

Probele de țesut primite în laboratorul de histopatologie trebuie să fie însoțite de un formular de cerere a examenului de laborator în care vor fi specificate datele pacientului și istoricul bolii, precum și descrierea zonei de origine a fragmentului de țesut. Probelor primite li se va atribui un număr care va identifica fiecare probă pentru fiecare pacient. Acest număr va corespunde cu numărul de ordine din registrul laboratorului.

6.2. Examenul macroscopic

Examinarea macroscopică constă în descrierea probelor, alegerea zonelor relevante pentru diagnostic și introducerea lor (totală sau parțială) în mici casete din plastic, unde vor sta pe toată durata procesării inițiale, până în momentul includerii în parafină. Inițial, casetele sunt plasate într-un fixator.

6.3. Fixarea

Fixarea are scopul de a conserva morfologia țesuturilor așa cum se prezintă ea în momentul recoltării. Fixarea trebuie realizată cât mai curând posibil după prelevarea probelor de țesut pentru a preveni autoliza. Nu există un fixator perfect, deși formaldehida este considerată aproape un „gold standard”. Există o varietate de fixatori, care se vor folosi în funcție de tipul de țesut.

Factorii care influențează procesul fixării:

- soluția-tampon;
- penetrarea;
- volumul piesei vs. volumul fixatorului;
- temperatura;
- concentrația fixatorului;
- intervalul de timp.

Fixarea trebuie realizată la un pH aproape de neutralitate, adică între 6 și 8. Datorită hipoxiei țesuturilor, fixatorul trebuie să aibă capacitatea de a tampona aciditatea acestora prevenind dehiscenta lizozomală și autoliza tisulară consecutivă acesteia. Aciditatea favorizează formarea de pigment hem - formol care apare colorat în negru, prin depuneri polarizate în țesuturi. Soluțiile-tampon includ fosfatul de sodiu, bicarbonatul de sodiu, cocodilatul de sodiu și veronalul. Formolul comercial este o soluție de formaldehidă în tampon fosfat cu pH 7.

Penetrarea țesuturilor depinde de difuzibilitatea fiecărui fixator. Formolul și alcoolul penetrează foarte bine, iar glutaraldehida foarte prost. Ceilalți fixatori au un grad intermediar de penetrabilitate tisulară. O posibilitate de a rezolva acest inconvenient este secționarea cât mai fină a țesuturilor (2-3 mm grosime), deoarece penetrarea unei secțiuni subțiri va fi mult mai rapidă decât cea a unei secțiuni mai groase.

Volumul de fixator este de asemenea extrem de important. Acesta trebuie să fie în raport de 10:1 (fixator-țesut). Se recomandă schimbarea fixatorului la diferite intervale de timp pentru a evita o eventuală scădere a volumului acestuia. Agitarea probelor în fixator va intensifica fixarea.

Creșterea temperaturii, ca în cazul tuturor reacțiilor chimice, va crește viteza de fixare, dar se va avea totuși în vedere să nu degradeze țesuturile. Formolul fierbinte va fixa țesuturile mai repede și acesta este adesea primul pas în procesarea automatizată a țesuturilor.

Concentrația fixatorului va fi cea mai redusă concentrație activă, acest fapt reprezentând și un avantaj economic. Formolul este cel mai activ la 10%; glutaraldehida este în general activă la concentrații de 0,25-4%. Concentrațiile prea ridicate pot avea efect advers asupra țesuturilor producând artefacte asemănătoare cu cele ale creșterii temperaturii fixatorului.

De asemenea, foarte important este intervalul de timp recomandat pentru menținerea probelor în afara fixatorului. După fixare, probele vor fi prelucrate rapid deoarece prin deshidratare se vor produce artefacte. Țesuturile menținute temporar în afara vasului cu fixator, se vor umezi cu ser fiziologic.

Tipul fixatorului indicat este dat de tipul de țesut și de detaliile histologice care urmează a fi vizualizate. Formolul este utilizat pentru toate țesuturile recoltate chirurgical și necropsic, când se dorește obținerea unor preparate colorate H-E. Formolul este cel mai puțin pretențios dintre toți fixatorii atunci când condițiile de fixare nu sunt cele ideale, el dăunând aproape neglijabil țesutului respectiv. Pentru fixarea țesuturilor în vederea procesării lor pentru diagnosticul histopatologic al micozelor profunde se folosesc frecvent următorii fixatori: soluția de formol 10% tamponată pH 6,8, fixatorul Bouin și fixatorul Hollande. Pentru fixarea frotiurilor

citologice cu importanță în diagnosticul micologic se folosesc: metanolul absolut, etanolul 90% și acidul cronic 5%. Alcoolii sunt fixatori rapizi și ieftini. Deoarece frotiurile nu sunt groase, acestea nu pun probleme de contractare și întrucât frotiurile nu sunt secțiuni, acestea nu prezintă inconvenientul friabilității. Alcoolii nu se recomandă pentru fixarea frotiurilor obținute din fluide biologice sau patologice.

Alături de imersie, fixarea frotiurilor se poate realiza și prin pulverizarea fixatorului peste frotiu. Fixatorii care se pulverizează sunt compuși dintr-un alcool care fixează celulele și parafină care formează un strat protector subțire peste acestea (Carbowax - conține polietilenglicol). Fixativii de păr (e.g. Diaphine Spray), cu un conținut ridicat de alcool și un minimum de lanolină sau ulei, sunt de asemenea fixatori eficace. Distanța optimă de pulverizare a fixatorilor este de 25-30 cm. Fixarea cu fixatori aerosolizabili nu este recomandată pentru frotiurile de sânge sau a celor executate din lichide hemoragice pentru că determină *clumping* eritrocitar (aglutinare). Parafinele și uleiurile din spray-urile fixative de păr modifică reacțiile de colorare dacă nu sunt îndepărtate adecvat. Astfel, înaintea colorării, lamele trebuie menținute peste noapte în etanol 95% pentru a îndepărta fixatorul de acoperire.

6.3.1. Formol soluție 10% tamponată pH 6,8

Scop

Este un fixator larg utilizat, cu pH 6,8

Reactivi

Fosfat de sodiu monobazic	4,0 mg
Fosfat de sodiu dibazic	6,5 mg
Formaldehidă 37%.....	100,0 ml
Apă distilată.....	900,0 ml

Se omogenizează, apoi se etichetează și se datează.

Atenție! Carcinogen.

Timpul de fixare

Fragmentele biopsice ar trebui fixate timp de minim 1-4 ore. Un timp mai îndelungat se recomandă pentru piesele mai mari.

Tehnica fixării

1. Piesele recoltate de chirurghi sunt păstrate în acest tip de fixator;
2. Primele două stații ale tuturor procesoarelor de țesuturi conțin formol 10%;
3. Probele pot fi păstrate în formol 10% indefinit sau sunt transferate în etanol 70%.

Note:

1. Se lucrează într-un spațiu ventilat. Se vor purta ochelari de protecție, mănuși și halat.
2. Formaldehida este puternic iritantă pentru ochi și piele. Este sensibilizantă (prin contact) pentru piele și aparatul respirator. Este toxică prin ingestie și inhalare. Are

acțiune corozivă și carcinogenă. Se etichetează cu inscripția: ATENȚIE FORMALDEHIDĂ!

6.3.2. Fixatorul Bouin

Scop

Se utilizează pentru fixarea pieselor biopsice; de asemenea este un mordantant în diferite tehnici de colorare.

Reactivi

Acid picric saturat..... 3000,0 ml
Formaldehidă..... 1000,0 ml
Acid acetic glacial 200,0 ml

Atenție! Soluția este carcinogenă, iritantă și toxică.

Timpul de fixare

Probele biopsice de dimensiuni mici, 2-4 ore, iar probele de dimensiuni mari pot rămâne în fixator până la trei zile.

Tehnica fixării

1. Țesuturile fixate pot rămâne în formol 10% sau etanol 70%;
2. Se îndepărtează acidul picric din țesut înainte de colorare prin:
 - a) spălare cu apă de robinet;
 - b) tratare cu etanol 50%;
 - c) sau soluție saturată de etanol 70% cu carbonat de litiu.

Note:

1. *Se lucrează în spații bine ventilate, se vor purta mănuși, halat și ochelari de protecție. Se evită contactul și inhalarea.*
2. *Acidul picric poate deveni exploziv dacă se usucă. Este toxic de contact.*
3. *Formaldehida este puternic iritantă pentru ochi și piele. Este sensibilizantă prin contact, pentru piele și aparatul respirator. Este toxică prin ingestie și inhalare. Are acțiune corozivă și carcinogenă. Se etichetează cu inscripția: ATENȚIE FORMALDEHIDĂ!*
4. *Acidul acetic: aparatul respirator este organul ținută afectat. Este coroziv.*

6.3.3. Fixatorul Hollande

Scop

Acest fixator conferă o strălucire colorațiilor care utilizează hematoxilină - eozină și reduce consistența țesuturilor evitând astfel obținerea unor secțiuni casante. Acidul picric lizează hematiile.

Reactivi

Acetat de cupru.....	75 mg
Apă distilată.....	3000 ml
Acid picric	120 mg
Formaldehidă.....	300 ml
Acid acetic glacial	45 ml

Se dizolvă acetatul de cupru în apă fără încălzire, apoi se adaugă treptat acidul picric. Se amestecă până se dizolvă complet. Se adaugă formaldehida și acidul acetic. Se etichetează și se datează.

Atenție! Soluția este carcinogenă, iritantă și corozivă.

Timpul de fixare

Probele de dimensiuni mici 2-4 ore, iar cele mai mari până la 3 zile.

Tehnica fixării

1. Probele biopsice sunt imersate imediat în fixatorul Hollande, notându-se timpul pe recipient;
2. Când fixarea este completă, proba de țesut se trece apoi în etanol 70%;
3. Nu se permite ca probele fixate cu Hollande să vină în contact cu soluția de formol 10%, deoarece poate determina apariția unui precipitat albastru.

Note:

1. Se lucrează într-un spațiu bine ventilat sau în nișa chimică, se poartă mănuși, halat și ochelari de protecție. Se evită contactul și inhalarea.
2. Acidul picric poate exploda dacă se usucă. Este toxic prin expunere cutanată.
3. Formaldehida este iritantă puternic pentru ochi și piele. Este toxică prin ingestie și inhalare. Afectează aparatul respirator. Este corozivă și carcinogenă. Se etichetează cu: **ATENȚIE FORMALDEHIDĂ !**
4. Acidul acetic afectează aparatul respirator. Este coroziv.

6.4. Procesarea țesuturilor

Odată ce țesuturile au fost fixate, ele trebuie înglobate într-o formă care să permită manipularea și efectuarea unor secțiuni seriate foarte subțiri. Cel mai folosit material în acest scop este parafina. Țesuturile incluse în parafină pot fi secționate în fragmente cu grosimi de la 3 la 10 μm , uzual 4-6 μm . Tehnica de includere în parafină a țesuturilor fixate se numește „Procesarea țesuturilor”. Pașii principali ai acestui proces sunt deshidratarea și clarificarea.

- Țesuturile fixate umed (în soluții apoase) nu pot fi direct impregnate cu parafină deoarece aceasta nu este miscibilă cu apa. De aceea, țesuturile trebuie deshidratate. Aceasta se realizează de obicei cu ajutorul unor soluții de etanol, de concentrații crescânde - 70%, 95% și 100%. Uneori, primul pas este tratarea cu un amestec format din formol și etanol. Pot fi utilizați și alți deshidratanți, dar unii prezintă dezavantaje majore: acetona deși este foarte rapidă, este inflamabilă, de aceea se poate utiliza doar pentru mici seturi de țesuturi

procesate manual. Dioxanul poate fi utilizat fără clarificare, dar vaporii săi sunt toxici.

- Etapa următoare se numește „Clarificare” și constă în îndepărtarea deshidratantului cu o substanță care va fi miscibilă cu mediul de includere (adică cu parafina). Xilenul este agentul de clarificare cel mai frecvent întrebuințat. Toluenu clarifică bine și este mult mai tolerant față de cantitățile mici de apă rămase în țesuturi, dar este de 3 ori mai costisitor decât xilenul. Cloroformul acționează lent și este periculos pentru cei care-l manipulează. Salicilatul de metil este rar utilizat datorită costului ridicat.

În final, proba de țesut este impregnată cu agentul de includere care aproape întotdeauna este parafina. Parafina poate avea diferite puncte de topire, ceea ce permite obținerea unor grade variate de duritate. Un produs numit *Paraplast* conține un adaos de plastifianți care fac ca blocurile de parafină să fie mai ușor de procesat de către tehnologi în vederea secționării. Pentru a asigura o mai bună penetrare a țesutului de către agentul de includere, în interiorul procesatorului de țesuturi se poate crea o presiune negativă cu ajutorul unei pompe de vacuum.

Procedurile de mai sus sunt aproape întotdeauna automatizate pentru un volum mare de probe ce trebuie procesate de rutină. Automatizarea constă într-un dispozitiv circular, programabil, care imersează succesiv probele de țesut în diferite băi de deshidratare și clarificare, după o scală de timp presetată.

După procesarea probelor în procesatorul de țesuturi, acestea sunt încă în casete, urmând a fi incluse în parafină lichidă. Procesul este foarte important deoarece țesuturile trebuie orientate corespunzător în momentul includerii pentru a asigura obținerea ulterioară a unor secțiuni de calitate. O alternativă pentru includerea în parafină este folosirea diverselor mase plastice care permit obținerea unor secțiuni subțiri. Astfel de mase plastice sunt meta-acrilatul de metil, meta-acrilatul glicol și eponul. Materialele plastice necesită reactivi speciali pentru deshidratare și clarificare, de obicei foarte costisitori. Pentru secționarea acestor blocuri este necesar un microtom special. Blocurile trebuie să fie mici, tehnica pretându-se de exemplu pentru biopsiile hepatice sau cerebrale.

6.4.1. Deshidratarea

1. Dacă piesa de țesut a fost imersată în apă după scoaterea din fixator, ea trebuie să fie transferată în etanol 30%, 1-2 ore;
2. Etanol 50%, 1-2 ore;
3. Etanol 70%, 1-2 ore;
4. Etanol 95%, 1-2 ore;
5. Etanol 100%, 1-2 ore;
6. Etanol 100%, 1-2 ore;
7. Țesuturile deshidratate vor fi pregătite pentru clarificare, adică se scot piesele histologice din etanol și se trec în toluen.

Notă: Etanolul absolut produce o deshidratare foarte rapidă a țesuturilor: pentru a avea această siguranță, flacoanele cu etanol se vor păstra închise etanș.

6.4.2. Clarificarea

1. Se transferă piesele histologice din etanol 100% într-un amestec constituit din o parte toluen și 3 părți etanol 100%, 1 oră;
2. Se trec apoi în amestecul de 1:1 toluen-etanol 100%, 1 oră;
3. Apoi în amestecul de 3:1 toluen-etanol 100%, 1 oră;
4. Toluen 100%, 3-4 ore;
5. Toluen 100%, 3-4 ore;
6. După clarificare, țesuturile sunt gata pentru impregnare cu parafină.

Notă:

Agenții de clarificare, cum ar fi etanolul, trebuie introduși lent pentru a preveni degradarea țesuturilor. Aceste amestecuri de toluen și etanol permit în plus și îndepărtarea oricăror urme de apă. Flacoanele se închid etanș. Apariția unei turbidități a soluțiilor sau a unor pete opace pe țesuturi sunt indicatori siguri ai deshidratării incomplete. În ambele cazuri, lamele cu secțiuni se reintroduc în etanol 100% pentru o deshidratare suplimentară, apoi se continuă cu băile de toluen - etanol. Insuficienta îndepărtare a alcoolului va determina imposibilitatea impregnării cu parafină în zonele respective ale țesutului, ceea ce va produce dificultăți de secționare. Actualmente, există numeroși agenți de clarificare disponibili comercial (Histosolve, Americlear etc.) care sunt mai puțin toxici și au un miros mai plăcut decât toluenul sau xilenul.

6.4.3. Impregnarea cu parafină

1. Se transferă țesuturile din agentul de clarificare într-un nou flacon cu un amestec preîncălzit de parafină - toluen 1:2. Se acoperă etanș flaconul și se lasă la etuvă, la 45°C, timp de 1 oră;
2. Se transferă țesuturile într-un al doilea flacon care conține un amestec încălzit de parafină - toluen 1:2. Se acoperă flaconul și se menține la 45°C timp de 1 oră;
3. Se transferă piesele apoi în prima baie de parafină pură. Aceasta este un flacon cu parafină lichidă care se menține în etuvă setând o temperatură superioară punctului de topire al parafinei. Piesele se mențin în această baie timp de 2-4 ore;
4. Se transferă piesele în a doua baie de parafină, unde se mențin încă 2-4 ore;
5. Se includ (pasul următor).

Notă:

O alternativă a metodei de impregnare:

1. Se introduce piesa histologică în agentul clarificator proaspăt și apoi se adaugă parafină până la saturarea clarificatorului. Se lasă în repaus 1 oră la 30°C – 60°C, apoi se mai adaugă parafină și se lasă peste noapte. În dimineața următoare, se adaugă parafină până când amestecul conține aproximativ 75 % parafină, apoi se menține 1 oră la 45°C.
2. Se trece piesa apoi direct prin 2 băi de parafină pură.

6.4.4. Includerea

1. Se lubrificiază interiorul barelor Leuckart, al sticlelor de ceas sau al diferitelor tăvițe metalice cu un amestec de etanol 60% - glicerină 9:1. Acesta va preveni aderarea parafinei la recipientul ce constituie forma de turnare a blocurilor. Acest lucru nu este necesar dacă se utilizează matrițe de hârtie.
2. Se răcește matrița prin menținerea părții sale inferioare pe gheață câteva minute.
3. Se scoate recipientul cu parafină topită din etuvă și se varsă în matriță.
4. Se introduce țesutul în matriță cu ajutorul unei pense hemostatice încălzite și se verifică dacă piesa a fost orientată corect. În funcție de dimensiunea matriței, se pot include simultan mai multe piese (1-10) obținându-se un număr echivalent de blocuri. Etichetele din hârtie sunt atașate în parafină, la marginea matriței, în dreptul piesei histologice.

6.4.5. Secționarea

După includere, țesuturile trebuie secționate pentru a putea fi etalate pe lamă. Secționarea se realizează cu un microtom, la grosimi de 4-6 μm . Pentru realizarea unor secțiuni corespunzătoare este necesar ca lama cuțitului să fie perfect ascuțită; se preferă utilizarea cuțitelor *single use*. Odată obținute secțiunile, acestea se depun pe suprafața apei dintr-o baie de apă preîncălzită, fapt care ajută la deplicarea panglicii secționate. Fragmente de panglică sunt recuperate cu ajutorul unei lame de microscopie. Lama cu secțiunea etalată este apoi plasată într-o etuvă timp de aproximativ 15 minute pentru ca, prin topirea parafinei, secțiunile să adere mai bine la lamă.

1. Blocurile de parafină cu piesele incluse, se secționează rectangular pe lângă țesut, lăsându-se câțiva milimetri de parafină pe fiecare față a blocului;
2. Urmează o nouă fasonare a blocului cu ajutorul unei lame de ras. Se va îndepărta mai întâi parafina de pe fața de secționare la microtom, cât mai aproape de țesutul din bloc. Următoarele secționări se vor face pe celelalte fețe ale blocului, în așa fel ca acestea să devină paralele una cu alta. Se va lăsa suficientă parafină la baza blocului astfel încât acesta să poată fi atașat la obiectiv. Tăierea bazei blocului se va face în așa fel încât ea să fie paralelă cu fața de secționare;
3. Se atașează blocul de parafină la discul obiectiv. Se depune un mic fragment de parafină pe discul obiectiv și se modelează cu o spatulă încălzită prin flambare la un bec de gaz. Se lasă ca stratul de parafină să se răcească, apoi se pregătesc cele două suprafețe (baza blocului și suprafața obiectului) în vederea aderării prin topirea stratului superficial de parafină (se ating cele două suprafețe timp de câteva secunde cu spatula bine încălzită). Se presează apoi blocul de parafină pe discul obiectiv și se lasă în repaus pentru solidificare;
4. Se fixează discul obiectiv cu blocul atașat în mandrina microtomului, se ajustează poziția în așa fel ca blocul să fie paralel cu tășul cuțitului de microtom;
5. Ajustarea unghiului cuțitului se face prin încercări succesive. Unghiul diedru format de fața cuțitului și fața blocului trebuie să fie de aproximativ 5 grade.

6. Se alege grosimea de secționare (4-6 μm pentru majoritatea țesuturilor) și se începe secționarea cu viteză moderată. Se manevrează panglica rezultată prin înlănțuirea secțiunilor cu ajutorul unui penson, preferabil din păr de cămilă. Se secționează aproximativ 25 de secțiuni, apoi se îndepărtează panglica de la cuțit și se depune pe o coală de hârtie colorată în negru.
7. Dacă se vor practica secțiuni mai subțiri (de 2-4 μm) sau dacă țesutul este dur, se pot obține rezultate superioare prin răcirea blocului de parafină și a cuțitului. În acest scop, se ia un cub de gheață și se lasă să se topească în așa fel ca gheața topită să se prelingă peste partea frontală a blocului. Alt cub de gheață se pune pe fața anterioară a cuțitului. Se va folosi un material absorbant (lavete, prosoape de hârtie) pentru colectarea apei rezultate în urma topirii gheții și răcirii piesei / cuțitului. Cuburile de gheață se vor menține cca. 1-2 minute, apoi se îndepărtează orice picătură de apă de pe cuțit și bloc cu ajutorul unui prosop de hârtie și se începe secționarea. Răcirea blocului de parafină se poate face și prin menținerea sa timp de câteva minute în congelator.
8. Microtomul și cuțitul de secționare se toaletează după fiecare utilizare. Niciodată nu se lasă fixat cuțitul în microtom când nu este folosit.

6.4.6. Etalarea secțiunilor

Albumina Baker

Albuș de ou.....	50,0 ml
Apă distilată.....	50,0 ml
NaCl.....	0,5 g
p-hidroxibenzoat de sodiu ¹	0,1g

În apa distilată încălzită la 90°C, se dizolvă clorura de sodiu și conservantul (p-hidroxibenzoatul de sodiu). După răcire se adaugă albușul, se centrifughează până când supernatantul devine clar, se filtrează prin vată ori se lasă în repaus până când stratul superior devine clar. Ca adeziv, se utilizează numai supernatantul clar. Pentru o bună conservare, acesta se păstrează la frigider.

Albumina Baker diluată

Albumină Baker.....	4 picături
Apă distilată.....	10 ml

¹ Moldex, Tegosept, timolul sau salicilatul de sodiu se pot folosi ca substituenți ai p-hidroxibenzoatului de sodiu.

Albumina Baker comercială

Adeziv 2,5 ml

Apă distilată..... 100,0 ml

Soluția trebuie încălzită și corect omogenizată înainte de utilizare. Se va prepara extemporaneu.

Mod de lucru

Procedura 1

1. Se degresează lamele și lamelele prin imersia lor în alcool acidifiat 95% (1 ml HCl concentrat la 100 ml etanol) și se șterg energic cu o pânză curată din bumbac. Secțiunile nu vor adera la lamă dacă acestea nu sunt complet degresate. Se evită contactul degetelor cu suprafața lamelor;
2. Se plasează secțiunile pe lamă cu ajutorul unor ace de disociere. Acestea vor pluti la adăugarea câtorva picături de albumină diluată la marginea panglicii. Ne vom asigura că secțiunile au fost montate pe fața lamei cu capătul mat și nu pe fața cu capătul lucios;
3. Secțiunile se plasează pe lama încălzită cu ajutorul unei platine încălzitoare reglată la o temperatură cu aproximativ 5-10°C sub punctul de topire al parafinei;
4. Secțiunile se vor întinde și netezi rapid. Excesul de fluid se va îndepărta prin înclinarea lamei, menținând panglica cu secțiuni cu ajutorul unor ace de disociere;
5. Se transferă lamele cu secțiuni în etuvă, la 30-40°C și se lasă peste noapte pentru a se asigura deshidratarea completă a acestora.

Procedura 2

1. Se utilizează lame degresate ca mai sus; se adaugă o picătură de adeziv nediluat pe lamă și se etalează cu pulpa degetului mic prin mișcări circulare. Excesul se șterge cu pulpa degetului inelar. Degetele vor fi degresate în prealabil cu alcool acidifiat 95 %;
2. Se plasează una sau două secțiuni pe suprafața apei într-o baie reglată la o temperatură cu 5-10°C sub punctul de topire a parafinei. Se lasă câteva minute pentru întinderea secțiunilor;
3. Se introduce lama în baie, sub secțiune și folosind un ac de disociere se prinde și se fixează fragmentul de panglică pe lamă, după care aceasta se scoate din baie; fragmentul de panglică va adera la lamă;
4. Se lasă lamele cu secțiuni în etuvă peste noapte pentru uscare. Dezlipirea secțiunilor de pe lamă în timpul colorării este o problemă frecvent întâlnită la histotehnicienii debutanți. Dacă lamele sunt curate și secțiunile sunt întotdeauna uscate complet după etalare, aceste incidente vor fi rare.

6.4.7. Colorarea

Procesul de includere în parafină, necesar secționării pieselor, trebuie urmat de deparafinarea secțiunilor etalate pe lamă astfel încât să fie permisă penetrarea coloranților hidrosolubili. Lamele cu secțiuni se deparafinează prin trecerea succesivă în băi de xilen (sau înlocuitori), alcool etilic și apă. Tehnicile de colorare sunt diverse și se selectează în funcție de abilitatea lor de a colora diferite componente celulare și țesuturi. Colorația de rutină este Hematoxilină-Eosină (HE), celelalte metode de colorare sunt „colorații speciale”, pentru că se utilizează în situații specifice conform nevoilor de diagnostic.

6.4.7.1. Colorația Hemalaun – Eozină

Scop

Aceasta este cea mai comună colorație histologică și histopatologică utilizată pentru studierea de ansamblu a citoarhitectonicii tisulare. În cazul micozelor profunde, permite aprecierea leziunilor la nivel microscopic, însă are o valoare diagnostică redusă pentru decelarea speciei implicate. Hemalaun-Eozină este o metodă de colorare de rutină, dar care necesită o execuție atentă pentru a asigura obținerea unor rezultate corecte și uniforme. Evidențiază elemente fungice aparținând genurilor *Pneumocystis*, *Blastomyces*, *Coccidioides*, dar și unele aspecte din cromomicoze, rinosporidioză, adiaspiromicoză, ca și fenomenul Splendore-Hoepli sau culoarea originală a fungilor dematiacei (pigmentați).

Fixator

Se obțin rezultate excelente, comparabile, folosind diverși fixatori

Tehnica de secționare

Secțiuni cu grosimea de 4-5 μm, din fragmente de țesut incluse în parafină

Echipament

Sticlărie de laborator, *timer* de laborator

Reactivi

Hematoxilina Ehrlich (1886)

Hematoxilină	2 g
Etanol 95%	100 ml
Apă distilată.....	100 ml
Glicerină	100 ml
Alaun de potasiu, în exces	aprox. 20 g
Acid acetic	10 ml

Hematoxilina Harris

Hematoxină	5,0 g
Etanol 95%	50,0 ml
Alaun de potasiu	100,0 g
Apă distilată	1000 ml
Oxid de mercur	2,5 g

Se dizolvă hematoxilina în etanol și alaunul în apă cu ajutorul căldurii. Se amestecă cele două soluții. Amestecul se aduce la fierbere cât mai repede posibil și apoi se adaugă oxidul de mercur. Se continuă fierberea până când apare o culoare purpurie intensă (roșu-închis, violet), apoi se introduce recipientul într-o baie de apă până la răcirea completă. După răcire, se adaugă 40 ml de acid acetic glacial. Când se observă o strălucire aurie a soluției, aceasta se filtrează. Dacă această strălucire nu apare, colorația va fi de calitate inferioară.

Hematoxilina Mayer

Hematoxină	5,0 g
Apă distilată	700,0 ml
Alaun de potasiu	50,0 g
Glicerină	300,0 ml
Iodat de sodiu	0,4 g
Acid acetic glacial	20,0 ml

Se dizolvă hematoxilina într-o cantitate redusă de apă, apoi alaunul în aproximativ 650 ml de apă distilată. Se amestecă cele două soluții și se completează până la 700 ml. Se adaugă iodatul de sodiu în soluție, după care aceasta se încălzește blând pentru a grăbi oxidarea hematoxilinei. Soluția se lasă la răcit pentru o jumătate de oră, se filtrează, apoi se adaugă acidul acetic glacial și glicerina. Soluția poate fi utilizată imediat și este stabilă 2-3 luni.

Soluția de albăstrire Scott

Sulfat de magneziu	20,0 g
Bicarbonat de sodiu	3,5 g
Apă distilată	1000 ml

Se dizolvă sărurile separat, apoi se amestecă soluțiile și se adaugă un cristal de timol.

Alcool - acid 0,5 %

Etanol 70%	100,0 ml
HCl	0,5 ml
sau	

HCl 3 ml
 Etanol 95% 97 ml

Se adaugă acidul clorhidric peste alcool.

Eozină Y - alcoolică, soluția stoc

Eosină Y, solubilă în apă și alcool..... 2,5 g
 Apă distilată..... 500,0 ml
 Acid clorhidric concentrat 4 ml

Se dizolvă eozina (tetrabromfluoresceină de sodiu) în apă și se adaugă treptat acidul clorhidric care se va combina cu sodiul. Precipitatul rezultat este forma acidă a tetrabromfluoresceinei, insolubilă în apă. Se lasă precipitatul să se stabilizeze și apoi se decantează supernatantul fluid. Se adaugă aproximativ 500 ml apă distilată peste precipitat și se agită până când colorantul se află complet în suspensie, apoi se lasă în repaus pentru sedimentare. Se repetă procesul de spălare de aproximativ 6 ori, până dispar toate urmele de ioni de sodiu și clor. Se filtrează și apoi se lasă hârtia de filtru împreună cu colorantul la uscat în etuvă (max. 60°C). Pondere pulberii de colorant dizolvate în 100 ml de etanol 95% este de 0,5 g. Se filtrează și se stochează într-un recipient transparent cu dop rodat. Tratând eozina astfel, se va obține un colorant cu o putere tinctorială mai mare, colorantul fiind mult mai stabil în alcool. Pentru utilizare se diluează 1:5 în etanol 95%.

Tehnica de colorare

1. Deparafinarea și hidratarea cu apă distilată a secțiunilor;
2. Se imersează preparatele într-una din soluțiile de hematoxină, un timp variabil, conform variantei de hematoxină întrebuințate: 5-10 minute pentru hematoxina Mayer, 5 minute pentru hematoxina Harris și 15 minute pentru hematoxina Ehrlich;
3. Se spală lamele cu apă distilată, apoi se introduc în soluția de albăstrire Scott pentru 1-2 minute. Se clătesc în apă distilată și se examinează la microscop. Secțiunea trebuie să fie supracolorată;
4. Se diferențiază cu alcool - acid 0,5% pentru a îndepărta excesul de colorant din fond, lăsând colorați numai nucleii;
5. Clătire cu apă distilată și apoi reimersare în soluția de albăstrire Scott pentru încă 1-2 minute;
6. Se reexaminează la microscop și dacă secțiunile sunt suficient decolorate se continuă cu pasul următor. Dacă secțiunea este insuficient diferențiată atunci se repetă pașii 4 și 5;
7. Spălare în apă de robinet 5-10 minute;
8. Colorare cu eozină alcoolică (se lasă lamele cu secțiuni în soluția de colorare până când acestea sunt ușor supracolorate);
9. Clătire în 2 băi de etanol 95%;
10. Diferențiere în alcool absolut până când se obține o colorație optimă;

11. Deshidratare într-o baie de alcool absolut;
12. Clarificare în câteva băi de xilol;
13. Montarea lamelelor cu balsam de Canada, Xam sau alte medii neutre de montare care sunt miscibile cu xilolul.

Rezultatul colorării

Nucleii – albastru purpuriu

Hematiile – roșu

Celulele musculare – roz intens

Fibrele de collagen – roz

Notă:

Pentru realizarea colorației Hematoxilină-Eozină, se poate folosi oricare din soluțiile de hematoxilină prezentate la reactivi.

6.4.7.2. Albastru Alcian pH 2,5 – pentru mucopolizaharide acide

Scop

Colorația cu Albastru Alcian pune în evidență mucopolizaharidele acide. Se poate utiliza pentru evidențierea mucopolizaharidelor capsulare la *Cryptococcus neoformans*. Este o metodă destul de eficientă pentru diferențierea criptococilor capsulați tipici de alți patogeni *yeast-like*, cu formă și dimensiuni similare.

Fixator

Formol 10% tamponat pH 6,8, Bouin sau Hollande

Tehnica de secționare

Secțiuni cu grosimea de 4 μm, din fragmente de țesut incluse în parafină

Echipamente

Pahare Berzelius, pH-metru, cuptor cu microunde, microscop

Reactivi

Acid acetic 3%

Acid acetic glacial 3 ml

Apă distilată..... ad 100 ml

Soluția este stabilă 1 an.

Soluție Albastru Alcian

Acid acetic glacial 3% 100 ml

Albastru Alcian 8GX..... 1 g

Se amestecă cele două ingrediente apoi se ajustează pH-ul la 2,5, utilizând acid acetic. Se filtrează și se adaugă un cristal de timol, apoi se etichetează și se datează. Soluția este stabilă 2 până la 6 luni.

Atenție! Conține acid, evitați contactul și inhalarea.

Nuclear fast red (Kernechtrot)

Sulfat de aluminiu.....25,0 g

Apă distilată.....500 ml

Nuclear fast red.....0,5 g

Se dizolvă sulfatul de aluminiu în apă. Se adaugă Nuclear fast red și se dizolvă prin încălzirea soluției. Se filtrează și se adaugă un cristal de timol. Soluția este stabilă timp de 1 an.

Atenție! Iritant - se va evita contactul și inhalarea.

Tehnica de colorare

1. Se hidratează preparatul în apă distilată;
2. Se introduc lamele în acid acetic 3%, 3 minute;
3. Se introduc preparatele în soluția de albastru Alcian, la cuptorul cu microunde (la o treaptă superioară), timp de 30 secunde; în metoda convențională, soluția de albastru Alcian cu lamele, se menține la temperatura camerei, timp de 30 minute;
4. Se spală lamele cu apă de robinet 2 minute și apoi se clătesc în apă distilată;
5. Se colorează cu Nuclear fast red, 5 minute, apoi se spală în apă de robinet;
6. Se deshidratează, se clarifică și se montează lamela.

Rezultatul colorării

Mucopolizaharidele acide: albastru

Nucleii: roz-roșiatic

Note:

1. Nu este o colorație specifică pentru capsula *C. neoformans*, deoarece s-a constatat că peretele altor fungi ca *Blastomyces dermatitidis*, *Paracoccidioides brasiliensis* sau *Rhinosporidium seeberi* pot fixa colorantul; însă, datorită diferențelor morfologice certe, acești fungi nu pot fi confundați cu *C. neoformans*.
2. Albastru Alcian face parte din grupul coloranților bazici polivalenți solubili în apă. Culoarea albastră se datorează prezenței cuprului în moleculele sale. Soluția de acid acetic glacial 3% (pH 2,5) și soluția de albastru Alcian colorează mucopolizaharidele acide sulfatate și carboxilate dar și sialomucinele (glicoproteinele) sulfatate și carboxilate. Se crede că sărurile formează legături cu grupările acide ale acizilor mucopolizaharidici.
3. Pentru siguranță se poartă mănuși, ochelari de protecție și halat. Se adaugă acidul acetic în apă. Colorația se face sub hotă. Se evită contactul și inhalarea coloranților. Acidul acetic este iritant pentru aparatul respirator. Este de asemenea coroziv.

6.4.7.3. Colorația Bauer

Scop

Colorația Bauer pune în evidență glicogenul, diferite mucosubstanțe și fungii

Fixator

Este recomandat formolul 10% tamponat pH 6,8, dar se pot folosi și alți fixatori. Majoritatea colorațiilor tricromice necesită ca fixatori acidul picric sau clorura mercurică. Formolul fixează bine țesuturile, dar pentru obținerea unei colorații de calitate superioară se recomandă o fixare secundară cu lichidul Bouin.

Tehnica de secționare

Secțiuni cu grosimea de 5 μ m, din fragmente de țesut incluse în parafină

Echipament

Sticlărie de laborator, microscop

Reactivi

Reactiv Schiff – de Tomasi

Fucsina bazică	1 g
Apă distilată.....	ad 200 ml
Metabisulfid de potasiu	1 g
Acid clorhidric 1N.....	20 ml
Cărbune activat (pulbere)	2 g

Se încălzește apa distilată până la fierbere într-un flacon Erlenmeyer de dimensiuni mari. Se îndepărtează flaconul de pe sursa de căldură și se adaugă imediat colorantul, cu grijă, pentru că dizolvarea are loc cu efervescență. Se agită până la dizolvarea colorantului. Se lasă soluția să se răcească până la 50°C, apoi se adaugă acidul clorhidric și se omogenizează. Se lasă în continuare soluția la răcit până la 25°C, moment în care se adaugă metabisulfidul de potasiu. Se omogenizează din nou. Se închide flaconul cu dop etanș și se păstrează la întuneric pentru 1-2 zile. Dacă soluția nu este limpede, se adaugă cărbune activat și se agită pentru aproximativ un minut. Se filtrează soluția. Se păstrează la temperatura de refrigerare, într-un flacon de sticlă închis etanș. Metabisulfidul de potasiu se poate înlocui cu cel de sodiu, fără a diminua calitatea colorației. Conform Indexului Merck, bisulfidul de sodiu comercial este realizat predominant din metabisulfid de sodiu. Soluția finală trebuie să fie incoloră sau de culoarea chihlimbarului, dar foarte pal. Soluțiile brune vor colora adesea foarte prost. De obicei, acestea au fost realizate dintr-o fucsina bazică care conține o cantitate inferioară de pararosanilină.

Hemalaun Mayer (hematoxilina Mayer, Langeron 1942)

Hematoxilină	1,0 g
Alaun de potasiu	50,0 g
Apă distilată.....	ad 1000 ml
Iodat de sodiu	0,2 g
Acid citric	1,0 g
Cloral hidrat.....	50,0 g

Se dizolvă hematoxilina în apa distilată, se încălzește apoi și se fierbe timp de 5 minute. Se îndepărtează recipientul de pe sursa de căldură și se adaugă iodatul de sodiu, apoi se lasă soluția pentru maturare timp de 10 minute. Se adaugă treptat restul substanțelor în ordinea dată, dizolvând-o pe fiecare înainte de adăugarea celeilalte. Se etichetează cu inițialele denumirii și data preparării, soluția fiind stabilă timp de un an.

Atenție! Se va evita contactul și inhalarea.

Acid cromic

Trioxid de crom	4 g
Apă distilată.....	ad 100 ml

Acid sulfuros

Metabisulfid de sodiu 10% sol. apoasă	6 ml
Acid clorhidric 1N.....	5 ml
Apă distilată.....	ad 100 ml

Tehnica de colorare

1. Se introduc secțiunile în apă distilată după ce au fost trecute prin băile cu xilen și etanol;
2. Se oxidează în acid cromic timp de 40-60 minute;
3. Se clătesc lamele în apă de robinet, apoi în apă distilată;
4. Se introduc preparatele în reactivul Schiff pentru 15 minute;
5. Apoi în acid sulfuros, 3 băi a câte 2 minute fiecare;
6. Se spală cu apă de robinet;
7. Supracolorare cu hemalaun, 1 minut;
8. Se deshidratează cu etanol;
9. Se face clarificarea cu xilen și montare cu balsam de Canada.

Rezultatul colorării

Glicogenul și mucosubstanțele – roșii

Fungii – roșii

Nucleii celulelor somatice – albaștri

Note:

1. În practica modernă se evită clătirea cu acid sulfuros, spălarea realizându-se cu cantități mari de apă de robinet.
2. Mucinele, de obicei, nu sunt așa de intens colorate ca în colorația PAS.
3. Menținerea în acid cromic un timp mai îndelungat va reduce colorarea datorită continuării oxidării aldehydelor.

6.4.7.4. Colorația Chick

Scop

Prin această colorație se pot pune în evidență fungii, la microscopul cu fluorescență.

Fixator

Formol 10% tamponat pH 6,8

Tehnica de secționare

Secțiuni cu grosimea de 5 μm, din fragmente de țesut incluse în parafină

Echipament

Sticlărie de laborator, microtom, microscop cu fluorescență

Reactivi

Hematoxină ferică Weigert

Soluția stoc A

Hematoxină 5,0 g
Etanol 95% 500,0 ml

Se omogenizează, apoi se etichetează, notând inițialele denumirii și data preparării. Soluția este stabilă 1 an.

Atenție! Inflamabil, se evită contactul și inhalarea.

Soluția stoc B

Clorură ferică 29% 20,0 ml
Apă distilată..... 475,0 ml
Acid clorhidric..... 5,0 ml

Se omogenizează, apoi se etichetează, notând inițialele și data preparării. Soluția este stabilă 1 an.

Atenție! Coroziv, se evită contactul și inhalarea.

Soluția de lucru

Soluția stoc A 25,0 ml

Soluția stoc B..... 25,0 ml

Se omogenizează cât mai atent. Soluția va rămâne stabilă 3-4 zile.

Acridină orange

Acridină orange 0,1 g

Apă distilată..... 100,0 ml

Tehnica de colorare

1. După trecerea lamelor cu secțiuni prin xilen și etanol, acestea se introduc într-o baie de apă;
2. Hematoxilină ferică Weigert (soluția de lucru), 5 minute;
3. Se spală cu apă de robinet;
4. Se introduc lamele în soluția de acridină orange, 2 minute;
5. Se spală în apă de robinet, 30 minute;
6. Se deshidratează, clarifică și montează într-o rășină nefluorescentă.

Rezultatul colorării

Se utilizează filtrele BG 12 și OG 4 (galben) și / sau OG 5 (portocaliu).

Fungii vor apare colorați fluorescent verde-roșu.

Notă:*Aceasta este cea mai indicată metodă de screening.***6.4.7.5. Colorația Gridley****Scop**

Colorația Gridley pune în evidență fungii viabili din preparatele histologice obținute din țesuturi incluse în parafină și secționate. Nu este satisfăcătoare pentru detecția elementelor fungice neviabile, degradate.

Fixator

Țesuturile se fixează în soluție tamponată de formol 10 %, cu pH 6,8

Tehnica de secționare

Secțiuni cu grosimea de 5 μm, din fragmente de țesut incluse în parafină

Echipament

Sticlărie de laborator, microscop

Reactivi

Reactiv Schiff – de Tomasi

Vezi colorația Bauer (6.4.7.3).

Fucsin-aldehidă

Fucsină bazică 1 g
Paraldehidă, proaspătă..... 1 ml
Acid clorhidric concentrat 1 ml
Etanol 70 % 200 ml

Se dizolvă colorantul în etanol, apoi se adaugă paraldehida și acidul clorhidric. Se lasă la temperatura camerei timp de 48-72 ore, pentru maturare. Se păstrează la frigider, soluția fiind stabilă 2-3 luni.

Acid cromic

Trioxid de crom 5 g
Apă distilată..... 500 ml

Decolorant

Metabisulfit de sodiu 5 g
Apă distilată..... 500 ml

Metanil yellow (Galben metanil)

Metanil yellow 1 g
Apă distilată..... 400 ml
Acid acetic glacial 2 picături

Tehnica de colorare

1. După trecerea secțiunilor prin băile cu xilen și etanol, acestea se imersează în apă distilată;
2. Se introduc apoi în acid cromic, 1 minut;
3. Se spală cu apă de robinet;
4. Se tratează cu soluție de metabisulfit, 1 minut;
5. Se spală cu apă de robinet;
6. Se clătesc cu apă distilată;
7. Se introduc lamele în reactivul Schiff, 20 minute;
8. Se spală cu apă de robinet;
9. Se clătesc cu etanol 70%;
10. Colorare cu fucsin-aldehidă, 30 minute;
11. Se clătesc cu etanol 95%;
12. Se spală cu apă de robinet;

13. Supracolorare cu metanil yellow, 1 minut;
14. Se clătesc cu apă distilată;
15. Preparatele colorate se deshidratează, clarifică și apoi se montează lamela cu balsam de Canada.

Rezultatul colorării

Fungii – culoare purpurie

Fondul – galben

Notă:

La pasul 2, menținerea în soluția de acid cromic 10% pentru 10 minute va da rezultate similare.

6.4.7.6. Colorația Schmorl

Scop

Această metodă de colorare pune în evidență fungii din preparatele histologice obținute din fragmente de țesut incluse în parafină și secționate la microtom.

Fixator

Fragmentele de țesut se fixează în soluție de formol 10 % tamponat 6,8, dar se pot folosi și alți fixatori.

Tehnica de secționare

Secțiuni cu grosimea de 5 μ m, din fragmente de țesut incluse în parafină

Echipament

Sticlărie de laborator

Reactivi

Decolorantul Mallory

Soluția A

Permanganat de potasiu 1 g

Apă distilată 100 ml

Soluția B

Acid sulfuric 1 ml

Apă distilată 100 ml

Tehnici de histopatologie

Soluția C

Acid oxalic 1 g
Apă distilată..... 100 ml

Soluția de lucru

Soluția A..... 1 volum
Soluția B..... 1 volum

Soluție de acid periodic

Se folosește soluția de acid periodic 0,5% (McManus) din colorația PAS sau următoarea variantă:

Iodat de sodiu 1 g
Acid nitric 0,5% soluție apoasă 100 ml

Ambele soluții de acid periodic dau aceleași rezultate.

Acetanilină

Anilină 10 ml
Acid acetic glacial 90 ml

Tiosemicarbazidă

Tiosemicarbazidă..... 1 g
Apă distilată..... 100 ml

Soluție Schmorl

Clorură ferică, sol. apoasă 1% 30 ml
Ferocianură de potasiu, sol. apoasă 1%..... 4 ml
Apă distilată..... 6 ml

Soluția trebuie să fie proaspătă, preparându-se înainte de utilizare. Nu se reutilizează!

Tehnica de colorare

1. După trecerea secțiunilor prin băile cu xilen și etanol, acestea se introduc în apă distilată;
2. Urmează decolorarea Mallory:
 - Lamele cu secțiuni etalate se introduc în soluția de lucru timp de 10 minute;
 - Se clătesc apoi în apă distilată;

- Se introduc în soluția C câteva minute, până când se observă decolorarea secțiunilor;
 - Se clătesc cu apă;
 - Se continuă cu următorii timpi ai tehnicii de colorare;
3. Se spală cu apă de robinet;
 4. Se oxidează în acid periodic pentru 10-20 minute;
 5. Se clătesc cu apă de robinet;
 6. Tratare cu acetanilină, 30 minute;
 7. Se spală cu apă de robinet;
 8. Se readuc preparatele în acid periodic pentru încă 20 minute;
 9. Se clătesc cu apă de robinet;
 10. Se introduc lamele în tiosemicarbazidă, 10 minute;
 11. Se spală cu apă de robinet pentru îndepărtarea tuturor urmelor de tiosemicarbazidă;
 12. Se introduc lamele în soluția proaspătă Schmorl, 10 minute;
 13. Se spală cu apă de robinet;
 14. Opțional, supracolorare cu nuclear fast red sau eosină;
 15. Se clătesc cu apă de robinet;
 16. Se deshidratează cu etanol, se clarifică cu xilen și se montează lamelele cu balsam de Canada.

Rezultatul colorării

Fungii – albaștri

Nucleii celulelor somatice – roșii

Fondul – roz

Note:

1. Este binecunoscut faptul că azidele metalelor pot fi explozive. Totuși, tiosemicarbazida nu este o simplă azidă metalică.
2. Formula tiosemicarbazidei este $H_2NNHCSNH_2$. Grupul hidrazinic (H_2NNH-) combinat cu orice aldehydă generează prin acidul periodic o reacție de oxidare. Gruparea tiocarbamilică ($-CSNH_2$) este un agent reducător mult mai puternic decât sunt aldehydele și reduce rapid fericianida la ferocianidă, cu formarea imediată a unui depozit de albastru de Prusia.
3. Decolorantul Mallory clarifică ușor fondul, îmbunătățind contrastul. El poate produce și unele aldehyde care vor fi îndepărtate în etapa 6.

6.4.7.7. Colorația Fontana-Masson

Scop

Această metodă de colorare se utilizează pentru a evidenția melanina și substanțele de tip *melanin-like*. Melanina este un pigment negru-brun prezent în mod normal în păr, piele, retină, iris, în unele zone ale sistemului nervos central, dar și în peretele unor fungi (*Cryptococcus spp.*, fungii dematiacei). De asemenea, colorația poate fi utilizată pentru detecția intratisulară a fungilor aparținând genurilor *Aspergillus*, *Candida* sau *zygomycetelor*.

Fixator

Fragmentele de țesut se fixează în soluție de formol 10 % tamponată 6,8

Tehnica de secționare

Secțiuni cu grosimea de 4 μm, din fragmente de țesut incluse în parafină

Echipamente

Sticlărie de laborator, cuptor cu microunde (sau etuvă reglată la 60°C),
microscop

Reactivi

Argint amoniacal, soluție stoc

Nitrat de argint 10% 25,0 ml

Se adaugă hidroxid de amoniu, picătură cu picătură, până la precipitarea
soluției și apoi limpezirea ei;

Se adaugă apoi nitrat de argint 10% 1,0 ml

Soluția va deveni puțin tulbure și se va lăsa în repaus pentru 4-24 ore. După
utilizare, soluția se aruncă.

Atenție! Soluție corozivă - se va evita contactul și inhalarea.

Argint amoniacal, soluție de lucru

Argint amoniacal, soluție stoc 12,5 ml

Apă distilată..... 37,5 ml

Se pipetează tot argintul amoniacal, lăsându-se apoi la decantat. Se filtrează.
Soluția nu se reutilizează.

Atenție! Soluție corozivă - se va evita contactul și inhalarea.

Nitrat de argint 10%

Nitrat de argint..... 20,0 g

Apă distilată..... ad 200,0 ml

Se agită amestecul pentru solubilizare. Soluția se păstrează la frigider într-un
recipient brun de sticlă, tratat în prealabil cu amestec sulfo-cromic. Soluția se poate
folosi timp de 6 luni de la preparare.

Atenție! Se evită contactul și inhalarea.

Clorură de aur 0,1 %

Clorură de aur 1%, soluție stoc..... 5,0 ml
 Apă distilată..... 45,0 ml

Atenție! Se evită contactul și inhalarea.

Tiosulfat de sodiu 5%

Tiosulfat de sodiu 200 g
 Apă distilată..... ad 4 l

Se dizolvă tiosulfatul de sodiu în apa distilată. Se păstrează într-un recipient cu volum corespunzător, care se etichetează și datează.

Atenție! Se evită contactul și inhalarea.

Nuclear fast red (Kernechtrot)

Sulfat de aluminiu..... 25, 0 g
 Apă distilată..... 500, 0 ml
 Nuclear-fast red 0,5 g

Se dizolvă sulfatul de aluminiu în apa distilată, apoi nuclear fast red-ul, folosind căldura (fierbere pentru 5 minute). Se lasă soluția să se răcească, apoi se filtrează, adăugându-se câteva cristale de timol pentru conservare. Se etichetează și se datează. Soluția este stabilă timp de 1 an.

Atenție! Iritantă, se evită contactul și inhalarea.

Tehnica de colorare

1. Secțiunile etalate se vor deparafina și hidrata cu apă distilată;
2. Soluția de lucru de argint amoniacal cu lamele se introduce în cuptorul cu microunde (la o treaptă superioară), timp de 2 minute. Se verifică lamele la microscop pentru a observa dacă intensitatea impregnării este adecvată, iar dacă este necesar, soluția cu lame se va plasa suplimentar în cuptorul cu microunde timp de câteva secunde (în metoda convențională soluția se introduce în etuvă la 60°C pentru 1 oră);
3. Clătire în apă distilată;
4. Clorură de aur 0,1%, 10 minute;
5. Clătire în apă distilată;
6. Tiosulfat de sodiu 5%, 5 minute;
7. Se spală lamele în apă de robinet și apoi se clătesc în apă distilată;
8. Nuclear fast red, 5 minute;
9. Se spală în apă de robinet;
10. Se deshidratează, clarifică și se acoperă cu lamelă.

Rezultatul colorării

Melanina și celulele argentafine – negre (fig. nr. 6-1 vezi *Anexa*)

Nucleii celulelor somatice - roșii

Note:

1. O reacție argentafină pozitivă este dată de faptul că celulele absorb argintul pe care îl reduc apoi la o formă metalică vizibilă, fără ajutorul unui agent reducător.
2. *Atenție!* Se vor purta în timpul lucrului mănuși, ochelari de protecție și halat de laborator. Se evită contactul și inhalarea. Nitratul de argint: este iritant sever pentru piele și ochi, oxidant, ingestia va produce un puternic disconfort gastrointestinal; posibil carcinogen. Soluția de argint amoniacal poate fi explozivă; în caz de vărsare accidentală, se va îndepărta folosind un volum mare de apă de robinet. Hidroxidul de amoniu: este un iritant puternic pentru ochi și aparatul respirator. Se manipulează în nișă chimică. Tiosulfatul de sodiu: toxic prin ingestie, iritant gastric, tegumentar, ocular și respirator.

6.4.7.8. Colorația Gridley fluorescentă

Scop

Această metodă de colorare pune în evidență fungii din preparatele histologice, prin microscopia cu fluorescență

Fixator

Fragmentele de țesut se fixează în formol 10% tamponat pH 6,8, dar se pot folosi și alți fixatori.

Tehnica de secționare

Secțiuni din fragmente de țesut incluse în parafină, cu grosimea de 5 μm

Echipamente

Sticlărie de laborator, microscop cu fluorescență

Reactivi

Reactiv Schiff fluorescent

Acriflavină.....	1 g
Apă distilată.....	200 ml
Metabisulfit de potasiu	2 g
Acid clorhidric 1N.....	20 ml

Se dizolvă colorantul în apă și se omogenizează. Se adaugă apoi succesiv acidul clorhidric și metabisulfitul, omogenizându-se cât mai atent. Se închide etanș recipientul, se lasă la întuneric pentru 48 ore, apoi se filtrează. Acridina orange poate fi de asemenea utilizată la prepararea acestei soluții.

Soluția A

Trioxid de crom 50 g
 Apă distilată 500 ml

Soluția B

Sulfit de sodiu 5 g
 Apă distilată 500 ml

Soluție C

Etanol 70% 495 ml
 Acid clorhidric 5 ml

Tehnica de colorare

1. După trecerea secțiunilor prin băile cu xilen și etanol, acestea se introduc în apă distilată;
2. Imersare în soluția A, 10 minute;
3. Clătire cu apă de robinet;
4. Decolorare în soluția B, 1 minut;
5. Spălare cu apă de robinet;
6. Clătire cu apă distilată;
7. Tratare cu reactiv Schiff fluorescent, 20 minute;
8. Spălare cu apă de robinet;
9. Imersare în soluția C, două băi, câte 5 minute fiecare;
10. Spălare cu apă distilată;
11. În final, preparatele se deshidratează, clarifică și apoi se montează lamela cu o rășină nefluorescentă.

Rezultatul colorării

Pentru examinare se utilizează filtrele BG 12, OG 4 (galben) și / sau OG 5 (portocaliu). Fungii apar colorați în galben-fluorescent cu acriflavină și verde-roșu cu acridină orange.

Note:

1. Această metodă de colorare este utilizată frecvent ca metodă de screening.
2. Dacă fluorescența fondului este prea intensă pentru a distinge fungii, aceasta se poate atenua prin tratare cu hemalaun (1 minut) sau cu soluție apoasă 0,5% de permanganat de potasiu (1 minut). Această atenuare se realizează înainte de deshidratarea finală, cu precauție pentru a nu reduce excesiv fluorescența fungilor.

6.4.7.9. Colorația Gomori-Grocott (Methenamine silver - modificată)**Scop**

Evidențierea fungilor în țesuturi. Este o colorație superioară pentru depistarea filamentelor aspergilar, a chiștilor de *Pneumocystis*, a elementelor tipice pentru

Tehnici de histopatologie

Candida, zygomycete, *Cryptococcus*, *Histoplasma*, *Blastomyces*, *Paracoccidioides*, *Coccidioides*, *Lacazia loboi*, *Penicillium marneffei*, *Rinosporidium*, *Emmonsia*. De asemenea, evidențiază actinomicetele, *Nocardia* și algele de tipul *Prototheca* sau *Chlorella*.

Fixator

Fragmentele de țesut se fixează în soluție de formol 10 % tamponat pH 6,8.

Tehnica de secționare

Secțiuni din fragmente de țesut incluse în parafină, cu grosimea de 4-5 μm

Echipamente

Sticlărie de laborator, cuptor cu microunde

Reactivi

Acid cromic 2%

Trioxid de crom 10,0 g
Apă distilată..... ad 500 ml

După solubilizare, soluția se transferă într-un recipient etanș în care poate fi stocată până la 6 luni.

Atenție! Acidul este coroziv, posibil carcinogen, se evită contactul și inhalarea.

Metabisulfit de sodiu 1%

Metabisulfit de sodiu 5,0 g
Apă distilată..... ad 500 ml

Soluția este stabilă 6 luni.

Borax 5%

Borat de sodiu..... 5,0 g
Apă distilată..... ad 100 ml

Soluția este stabilă 3 luni.

Metenamină-argint, soluția stoc

Metenamină 3%
(hexametilentetraamină) 100,0 ml
Nitrat de argint 5% 5,0 ml

Cele două soluții se amestecă într-un recipient brun de sticlă, tratat în prealabil cu amestec sulfo-cromic, clătit în apă distilată și uscat. Soluția este stabilă 3 luni, la temperaturi de refrigerare.

Atenție! Corozivă, posibil carcinogenă.

Clorură de aur 0,5%

Clorură de aur 0,5 g
Apă distilată ad 100,0 ml

Se păstrează la frigider, în recipiente tratate cu amestec sulfo-cromic, clătite și uscate. Soluția este stabilă 1 an.

Atenție! Se evită contactul și inhalarea.

Verde luminos 0,2%

Verde luminos (Light Green SF yellow) 0,2 g
Apă distilată 100,0 ml
Acid acetic glacial 0,2 ml

Soluția este stabilă 6 luni.

Atenție! Se evită contactul și inhalarea.

Tehnica de colorare

1. Deparafinare și hidratare în apă distilată;
2. Lamele cu secțiuni se transferă în soluția de acid cromic 2% și se mențin în cuptorul cu microunde la o treaptă superioară, 45 secunde; alternativ, se pot menține și 5 minute, dar la o treaptă inferioară (în metoda convențională, acidul cromic 5%, se menține pe baie de apă la 60°C, timp de 1 oră);
3. Se spală lamele în apă de robinet și apoi se clătesc cu apă distilată;
4. Urmează tratarea cu soluția de metabisulfid de sodiu 1%, 1 minut, la temperatura camerei;
5. Spălare în apă de robinet, apoi clătire în 3 băi succesive de apă distilată;
6. Se introduc lamele cu secțiuni în soluția de metenamină-argint, la cuptorul cu microunde (treaptă superioară), 70 secunde: țesuturile trebuie să capete o colorație brună, asemănătoare hârtiei de ambalaj. Se agită preparatul în soluția fierbinte (în metoda convențională soluția de argint se încălzește pe baie de apă la 60°C, pentru o oră sau până la apariția unei colorații brune);
7. Clătire în 2 băi de apă distilată;
8. Tratare cu clorură de aur 5% , 1 minut sau până la apariția unei colorații gri;
9. Spălare în apă distilată;
10. Tiosulfat de sodiu 5%, 3 minute;
11. Spălare în apă de robinet și clătire în apă distilată;
12. Verde luminos 1 minut;
13. Clătire în apă distilată;
14. Preparatele se deshidratează, se clarifică și apoi se montează lamela.

Rezultatul colorării

Fungii – brun-negri

Fondul – verde

Note:

1. Componentele mucopolizaharidice ale peretelui celulelor fungice sunt oxidate până la punerea în libertate a grupărilor aldehidice. Grupările aldehidice reacționează ulterior cu nitratul de argint, reducându-l până la argint metalic.
2. În cazul în care culoarea acidului cromic virează în brun, atunci este necesar ca acesta să fie schimbat. De notat că soluția 2% este mai indicată decât cea 5%, utilizată în metoda convențională, acidul cromic mai concentrat provocând desprinderea țesutului de pe lamă când se utilizează tehnica cu microunde.
3. Când culoarea fungilor nu virează în negru, se verifică prospețimea acidului cromic, a metabisulfidului de sodiu și a boraxului.
4. Când lucrăm cu soluția de nitrat de argint, dacă se observă o tulburare a sa sau un aspect de “ogindă” pe fața paharului, atunci este necesară prepararea unei noi soluții.
5. Pentru protecție se vor purta mănuși, ochelari de protecție și halat de laborator. Se respectă modul de lucru cu soluțiile sub hotă. Se evită contactul și inhalarea. Acidul cromic: coroziv pentru piele și mucoase. Foarte toxic! Organul țintă este rinichiul. Carcinogen. Metabisulfitul de sodiu: toxic prin ingestie, poate cauza gastroenterite. Iritant pentru piele, ochi și mucoase. Nitratul de argint: iritant sever pentru piele și ochi, oxidant. Posibil carcinogen. Tiosulfatul de sodiu: toxic prin ingestie, poate irita stomacul. Iritant pentru piele, ochi și tractul respirator. Verde luminos SF yellow: posibil carcinogen.
6. Există în comerț și kit-ul de colorare *GMS Staining Kit*, produs de Ventana, nr. catalog 860-007 ; informații: Europe Ventana Medical Systems, S.A. Parc d’Innovation – BP 30 144 Rue G. de Kayserberg F - 67404 Illkirch Cedex France 33 (0) 3 90 40 52 00.

6.4.7.10. Colorația fluorescentă cu acid periodic Schiff (PAS - fluorescentă)

Scop

Această metodă de colorare pune în evidență fungii, prin microscopia cu fluorescență.

Fixator

Fragmentele de țesut sunt fixate în soluție de formol 10% tamponată pH 6,8, dar pot fi folosiți și alți fixatori.

Tehnica de secționare

Secțiuni din fragmente de țesut incluse în parafină, cu grosimea de 5 μm

Echipamente

Sticlărie de laborator, microscop cu fluorescență

ReactiviSoluție de acid periodic

Vezi colorația Schmorl (6.4.7.6.).

Reactiv Schiff fluorescent

Vezi colorația Gridley fluorescentă (6.4.7.8.).

Alcool - acid 5%

Vezi colorația hemalaun – eozină (6.4.7.1.).

Tehnica de colorare

1. Se deparafinează și se hidratează secțiunile;
2. Tratare cu acid periodic, 10 minute;
3. Spălare în apă de robinet;
4. Clătire cu apă distilată;
5. Tratare cu reactiv Schiff fluorescent, 20 minute;
6. Spălare în apă de robinet;
7. Alcool - acid, două băi a 5 minute fiecare;
8. Spălare cu apă de robinet;
9. Lamele cu secțiuni se deshidratează, se clarifică și apoi se montează lamela cu o rășină nefluorescentă.

Rezultatul colorării

Se utilizează filtrele BG 12, OG 4 (galben) și / sau OG 5 (portocaliu). Fungii apar colorați în galben-fluorescent cu acriflavină și verde-roșu cu acridină orange.

Note:

1. Unele formațiuni fluorescente vor apare colorate în roșu sau roz la colorația PAS.
2. Dacă fluorescența fondului este prea intensă pentru a distinge fungii, aceasta se poate atenua prin tratare cu hematoxină 1 minut sau cu soluție apoasă 0,5% de permanganat de potasiu 1 minut. Fluorescența se atenuază înaintea deshidratării finale. Aceasta atenuare a fluorescenței de fond trebuie să se facă cu precauție pentru a nu reduce fluorescența fungilor.

6.4.7.11. Colorația cu acid periodic Schiff**Scop**

Colorația cu acid periodic Schiff (*engl.* Periodic Acid Schiff, PAS) se poate utiliza pentru colorarea fungilor din preparatele histologice.

Fixator

Probele de țesut sunt fixate în soluție formol 10% tamponată pH 6,8, dar se pot utiliza și alți fixatori (însă glutaraldehida trebuie evitată).

Tehnica de secționare

Secțiuni din fragmente de țesut incluse în parafină cu grosimea de 4-5 μm

Echipamente

Sticlărie de laborator, cuptor cu microunde

Reactivi

Acid periodic 0,5 %, după McManus

Acid periodic 0,5 g

Apă distilată..... 100,0 ml

După completa solubilizare a acidului periodic, soluția se etichetează cu data preparării și inițialele denumirii. Soluția este stabilă 1 an.

Atenție! Se va evita contactul și inhalarea.

Reactivul Schiff (Lillie, la rece)

Fucsină bazică 10,0 g

Metabisulfid de sodiu 18,0 g

Apă distilată..... 1000,0 ml

Acid clorhidric..... 10,0 ml

Se adaugă fucsina și metabisulfitul în acidul clorhidric. Se agită soluția timp de 2 ore, apoi se menține la întuneric, la temperaturi de 8°-10°C. Soluția devine limpede, de culoare brun-deschis până la galben-deschis. A doua zi se adaugă:

Cărbune activat (pulbere) 5,0 g

Se omogenizează 1-2 minute, apoi se filtrează prin hârtie de filtru Whatman nr. 2 într-un cilindru gradat de 1000 ml. Hârtia de filtru se va înlocui frecvent. Se readuce volumul la 1000 ml cu apă distilată. Soluția finală trebuie să fie incoloră sau de culoarea chihlimbarului, dar foarte pal. Soluțiile brune vor produce frecvent colorații necorespunzătoare. De obicei, aceste soluții au fost preparate cu fucsină bazică ce conține o cantitate mică de pararosanilină. Se păstrează la frigider, soluția fiind stabilă timp de 6 luni. La prepararea reactivului se vor purta mănuși, ochelari de protecție, mască și halat de protecție. Se lucrează sub hotă, recipientul cu reactiv se păstrează acoperit, iar soluțiile de preparare în nișa chimică.

Atenție! Reactivul este carcinogen și corosiv, se evită inhalarea. Acidul clorhidric este caustic, se va utiliza cu atenție!

Hematoxilina Gill

Hematoxilina	4,0 g
Sulfat de aluminiu	70,4 g
Apă distilată	750,0 ml
Etilenglicol	250,0 ml
Iodat de sodiu	4,0 g
Acid acetic glacial	20,0 ml

Se amestecă etilenglicolul cu apa distilată, se adaugă hematoxilina, iodatul de sodiu, apoi sulfatul de aluminiu și acidul acetic glacial. Se agită o oră la temperatura camerei. Se filtrează înainte de utilizare. Soluția poate fi utilizată imediat și este stabilă pentru aproximativ un an. Hematoxilina trebuie să fie anhidră; dacă este hidratată ($C_{16}H_{14}O_6 \times 3H_2O$) se utilizează o cantitate de 4,72 g.

Tehnica de colorare

1. Deparafinarea și hidratarea secțiunilor cu apă distilată;
2. Se introduc apoi lamele în acid periodic 0,5 %, timp de 5 minute;
3. Clătire în apă distilată;
4. Se introduc lamele cu secțiuni în reactivul Schiff, la cuptorul cu microunde (treaptă superioară), pentru 45-60 secunde; preparatul va căpăta o culoare magenta (în metoda convențională, reactivul Schiff se menține la temperatura camerei, timp de 30 minute);
5. Se spală continuu în apă de robinet, timp de 5 minute;
6. Tratare cu hematoxilina, timp de 3 minute;
7. Se spală în apă de robinet, apoi în apă distilată;
8. Se deshidratează în alcool, se clarifică și se montează lamela.

Rezultatul colorării

Glicogenul și fungii: magenta (fig. nr. 6-2 vezi Anexa)

Nucleii celulelor somatice: albaștri

Note:

1. Pentru a verifica calitatea reactivului Schiff, se adaugă în 10 ml de formaldehidă câteva picături de reactiv Schiff; culoarea trebuie să vireze imediat în roșu-purpuriu.
2. Dacă în timpul păstrării la frigider a reactivului culoarea acestuia virează în roz, reactivul Schiff se înlocuiește.
3. Dacă se observă un precipitat alb în recipientul cu reactiv Schiff, acesta se poate redizolva prin încălzirea ușoară a reactivului și agitarea soluției.

6.4.7.12. Colorația Ziehl - Neelsen**Scop**

Această colorație este utilizată pentru evidențierea bacteriilor din genul *Mycobacterium*, diferențierea filamentelor de *Nocardia* (Ziehl pozitive) și actinomicete

(Ziehl negative). De asemenea, se pot pune în evidență elemente fungice caracteristice speciilor de *Histoplasma* și *Blastomyces*.

Fixator

Fragmentele de țesut se fixează în soluție de formol 10 % tamponată pH 6,8.

Tehnica de secționare

Secțiuni din fragmente de țesut incluse în parafină, cu grosimea de 4-5 μm

Echipamente

Sticlărie de laborator, cuptor cu microunde

Reactivi

Fenol-Fucsină Ziehl - Neelsen

Fucsină bazică	2,5 g
Apă distilată.....	250,0 ml
Etanol absolut	25,0 ml
Cristale de fenol topite.....	12,5 ml

Se omogenizează, se filtrează și se păstrează într-un recipient brun de sticlă. Acesta se etichetează cu data preparării și cu timpul de stabilitate al soluției (cca. 1 an).
Atenție! Carcinogenă și toxică.

Alcool - acid 1%

Acid clorhidric.....	10 ml
Etanol 70 %	990 ml

Se omogenizează și se etichetează cu data preparării și timpul de stabilitate al soluției (1 an).
Atenție! Corozivă.

Albastru de metilen, soluția stoc

Albastru de metilen.....	0,7 g
Apă distilată.....	50,0 ml

Se omogenizează, se filtrează și se păstrează într-un recipient etanș. Se etichetează menționându-se data preparării și perioada de stabilitate a soluției (1 an).

Albastru de metilen, soluția de lucru

Albastru de metilen sol. stoc	5 ml
Apă distilată.....	45 ml

Soluția se păstrează într-un recipient de sticlă, fiind stabilă timp de 2 luni. Se va evita contactul și inhalarea.

Tehnica de colorare

1. Deparafinare, apoi hidratare cu apă distilată a secțiunilor etalate pe lame;
2. Lamele se introduc în soluția de fenol-fucsină, care apoi se menține în cuptorul cu microunde (treaptă intermediară), 45 secunde. Lamele se vor lăsa în soluția fierbinte timp de încă 5 minute. Soluția se filtrează o dată pe săptămână;
3. În metoda convențională, preparatele se mențin la etuvă, la 60°C timp de 1 oră;
4. Spălare cu apă de robinet;
5. Tratare cu alcool - acid 1% până la apariția culorii roz-deschis, persistente;
6. Spălare cu apă de robinet, 5 minute;
7. Clătire cu apă distilată;
8. Albastru de metil, soluție de lucru, 30 secunde;
9. Clătire cu apă de robinet;
10. Se deshidratează, se clarifică și se montează lamela cu balsam de Canada.

Rezultatul colorării

Structurile acido-rezistente – roșii strălucitoare
Fondul – albastru

Note:

1. Componenta lipoidică a bacteriilor acido-rezistente se colorează cu fenol-fucsină, rezistentă la decolorarea cu acid diluat.
2. Se utilizează filtre „Millipore™” pentru filtrarea apei necesare în procesul colorării.
3. În timpul preparării soluțiilor se vor purta mănuși, ochelari de protecție și halat. Se evită contactul și inhalarea soluțiilor.
4. Fucsina bazică este carcinogenă.
5. Acidul clorhidric: iritant puternic pentru piele, ochi și aparatul respirator.

6.4.7.13. Reactivi suplimentari

Amestec sulfo-cromic (pentru tratarea sticlăriei)

Scop

Curățarea sticlăriei utilizate la colorare și pentru proceduri care necesită sticlărie perfect igienizată.

Echipamente

Balon de 4000 ml, agitator magnetic, un recipient de sticlă cu volum de 6-7 litri, cu capac

Reactivi

Soluție acidă de curățare

Bicromat de potasiu..... 400 g
Apă distilată..... 4000 ml
Acid sulfuric 400 ml

Se dizolvă bicromatul de potasiu în apă. Se toarnă soluția într-un recipient de 6-7 litri, apoi se adaugă încet acidul sulfuric. Soluția se păstrează până când culoarea sa devine maro-închis (depinde de frecvența utilizării). Se etichetează și se datează.

Soluție acidă de spălare a sticlăriei 1,5%

Apă distilată..... 985 ml
Acid clorhidric..... 15 ml

Se omogenizează și se etichetează.

Note:

Pentru protecție se vor utiliza mănuși, ochelari și halat. Acidul sulfuric: vaporii sunt toxici, nu se inhalează. Afectează pielea, aparatul respirator, reproducător și țesuturile fetale. Este iritant pentru piele, ochi și aparatul respirator. Acidul sulfuric concentrat se adaugă lent în apă și soluții apoase, nu invers. Bicromatul de potasiu: toxic prin inhalare și ingestie. Afectează sistemul reproducător și țesuturile fetale. Coroziv pentru piele, ochi și mucoase. Acidul clorhidric: puternic iritant pentru piele, ochi și aparatul respirator. Este coroziv.

6.5. Montarea

Montarea presupune în prealabil deshidratarea și clarificarea secțiunilor.

Înainte de introducerea lamelor cu secțiuni în prima baie de etanol, acestea se usucă prin compresare ușoară cu hârtie de filtru pe ambele fețe. De asemenea, lamele se șterg pe verso cu un tifon curat pentru a îndepărta resturile de colorant.

Urmează deshidratarea:

1. Etanol 95 %, 5 minute;
2. Etanol 95 %, 5 minute;
3. Etanol 100 %, 5 minute;
4. Etanol 100%, 5 minute;
5. Toluen, 10 minute.

Dacă secțiunile nu sunt complet deshidratate, la introducerea lor în toluen va apare o turbiditate albicioasă. Aceasta va limita conservabilitatea preparatelor.

Medii de montare

Balsamul de Canada

Este o rășină a coniferului *Abies balsamea*, dizolvată în proporție de 55 % în xilol. Prin învechire capătă o colorație gălbuie, iar unele colorații nu se conservă corespunzător (ex. colorațiile cu fucsină acidă, verde luminos).

D.P.X.

Distiren 80 10,0 g
Dibutilftalat 80,5 ml
Xilol..... 35,0 ml

Este o rășină sintetică, neutră chimic, ceea ce asigură o conservare mai bună a coloranților și implicit a preparatelor.

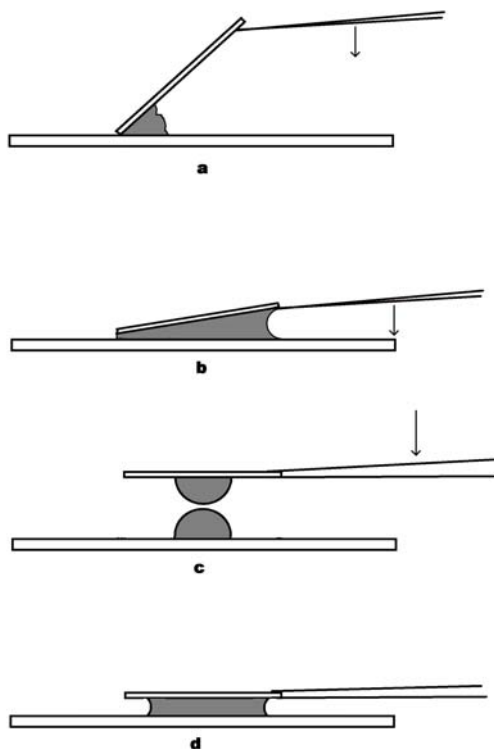


Fig. nr. 6-3
Montarea secțiunilor în medii anhidre (a, b) și în medii apoase (c, d).

Pe lama umectată cu toluen se pune o picătură de mediu de montare, iar deasupra se așează o lamelă:

1. Lamela se așează pe lamă, sub o incidență de 45°, atingând cu marginea picătura de mediu de montare; după ce picătura s-a extins pe toată lungimea marginii ce formează unghiul diedru cu lama, aceasta se presează ușor (fig. nr. 6-3 a, b).

2. Se depune o picătură de mediu de montare pe lamă și una pe lamelă, apoi acestea se aduc paralel până când cele două picături confluează, apoi lamela se presează ușor (fig. nr. 6-3 c, d).

Se îndepărtează eventualele bule de aer de sub lamelă cu ajutorul unui ac de disociere. Excesul de mediu de montare se îndepărtează cu ajutorul unui tifon îmbibat în benzen. Preparatele histologice astfel obținute se mențin în poziție orizontală la temperatura camerei, timp de 2-3 zile.

6.6. Etichetarea și arhivarea

După ce excesul de mediu de montare este îndepărtat, preparatele se pot eticheta. Preparatele histologice se etichetează prin plasarea unor mici etichete dreptunghiulare adezive la capătul mat al lamei. Această etichetă se completează cu ajutorul unei tuș rezistent la apă și va cuprinde instituția, numărul din registrul laboratorului, anul, natura probei, colorația etc.

Arhivarea preparatelor histologice trebuie să asigure în primul rând protejarea acestora de șocuri mecanice, de lumină, umiditate și praf. După interpretarea microscopică și fotografierea aspectelor morfologice de interes, preparatele histologice permanente se arhivează în cutii speciale în ordinea seriei, în fante numerotate, iar cutiile se introduc în sertarele histotecii. Blocurile de parafină se vor păstra în plicuri care vor avea aceleași însemnări ca și preparatele și vor fi depozitate în rafturile unor dulapuri special destinate acestui scop. În registrul de laborator, în dreptul fiecărei probe de țesut, se vor nota datele de identificare și locul de depozitare al preparatelor și blocurilor (Histoteca nr...., sertarul nr....., cutia nr....., rândul nr.....). Ele se mențin minim 10 ani și sunt refăcute când este necesar. Pentru o mai bună conservare, preparatele histologice permanente se vor luta. Lutarea se poate realiza cu lac de unghii, parafină topită sau cu amestecul 3:6:1 format din colofoniu, ceară de albine și seu. Acestea se aplică cu o pensulă fină pe marginea lamelei, de jur împrejur, astfel încât să se realizeze etanșeizarea secțiunii.

Bibliografie selectivă

1. Bancroft J, Stevens A (1982) - ***Theory and Practice of Histological Techniques***, 2nd ed., Churchill Livingstone, N.Y.
2. Bancroft, J D, Stevens A (1982) - ***Theory and practice of histological techniques*** 2nd ed., Churchill Livingstone, Edinburgh & London, UK.
3. Carson F (1990) - ***Histotechnology: A Self-Instructional Text***, 1st ed., ASCP, III.
4. Crookham J, Dapson R (1991) - ***Hazardous Chemicals in the Histopathology Laboratory***, 2nd ed., Anatech.
5. Culling C F A (1974) - ***Handbook of histopathological and histochemical techniques***; 3rd ed., Butterworth, London, UK.
6. Golăescu M (1997) - ***Diagnosticul și tratamentul micozelor interne***; Ed. Viața Medicală Românească; București.
7. Gray P (1954) - ***The Microtome's Formulary and Guide***. The Blakiston Co. Robert E. Krieger Publishing.
8. Hayashi I , Tome Y, Shimosato Y (1989) - ***Thiosemicarbazide used after periodic acid makes methenamine silver staining of renal glomerular basement membranes faster and cleaner***; *Stain Technology*.
9. Humason G L (1967) - ***Animal tissue techniques***, 2nd ed., W H Freeman & Company, San Francisco, Ca, USA.
10. Lillie R D (1954) - ***Histopathologic technique and practical histochemistry*** 2nd ed., Blakiston, New York, USA.
11. Lillie R D, Glenner G G (1957) - ***Journal of Histochemistry and cytochemistry***; 5:311.
12. Luna L (1968) - ***Manual of Histologic Staining Methods of the AFIP***, 3rd ed., McGraw-Hill, NY.
13. McManus J F A, Mowry R W (1960) - ***Staining Methods Histologic and Histochemical***; Harper & Row, New York, NY, USA.
14. Sheehan D, Hrapchak B (1980) - ***Theory and practice of Histotechnology***; 2nd ed., Battelle Press, Ohio.
15. <http://www-medlib.med.utah.edu/WebPath/webpath.html>

7

Tehnici de seromicologie

Ingrid Apetrei, Mihai Mares

7.1 Fungitell™ (Cape Code Inc. SUA) Test de detecție rapidă a (1,3)-β-D-glucan-ului

7.1.1. Principiul testului

Fungitell este un test cromogen, sensibil și rapid, ce poate detecta (1,3)-β-D-glucanul din serul de analizat în circa o oră. (1,3)-β-D-glucanul este un constituent al peretelui celor mai importanți fungi de interes medical precum *Candida* sau *Aspergillus*. Abilitatea testului de a detecta în ser (1,3)-β-D-glucanul cu exprimare în picograme, reprezintă un „balon de oxigen” pentru clinicieni, privind identificarea precoce a infecțiilor fungice invazive. (1,3)-β-D-glucanul se regăsește în doze mici în sângele indivizilor sănătoși, dar valorile serice de 80 pg/ml sau mai mari, la pacienții cu risc crescut vor putea fi corelate cu infecții fungice invazive. Analiza seriată a probelor prelevate de la pacienții cu risc pentru infecții fungice a relevat utilitatea diagnostică a acestui test, rezultatele fiind verificate prin metode alternative de diagnostic.

Fungii care nu sintetizează (1,3)-β-D-glucan, precum specii din genul *Cryptococcus* sau aparținând clasei *Zygomycetes*, respectiv *Absidia*, *Mucor* sau *Rhizopus*, nu vor pozitiva testul. Un rezultat pozitiv nu va indica și clasa fungică a speciilor incriminate, testul fiind recomandat pentru stabilirea unui diagnostic prezumtiv în colaborare cu alte proceduri de diagnostic, precum examenul micologic al prelevatelor clinice, tehnicile de histopatologie în cazul prelevatelor biopsice sau analiza imagistică (Rx, CT, RMN). Testul poate decela (1,3)-β-D-glucanul produs de fungii primar patogeni sau de cei oportuniști aparținând genurilor: *Candida*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Trichosporon*, *Saccharomyces*, *Acremonium*, *Coccidioides*, *Histoplasma*, *Sporothrix*, *Blastomyces* și *Pneumocystis*.

Rezultatele testului sunt cuantificate în pg/ml ser, cu valori minime de detecție stabilite la 31,25 pg/ml. Cu toate acestea, intervalul de detecție a fost încadrat în limite superioare pentru o mai bună acuratețe a testării și pentru evitarea unor posibile interferări antigenice. Valori ale (1,3)-β-D-glucanului mai mici de 60 pg/ml sunt considerate a fi negative, iar depășirea acestei valori (pozitivarea testului) nu va putea fi automat corelată cu prezența evolutivă a bolii fără o serie de investigații clinice /

paraclinice complementare, în vederea stabilirii unui diagnostic cât mai exact. Valori mai mari sau egale cu 80 pg/ml sunt interpretate ca fiind net pozitive, cu valoare mare de diagnostic pentru evoluția unei afecțiuni invazive cu etiologie fungică.

Valorile cuprinse în intervalul 60-79 pg/ml sugerează o posibilă infecție fungică, dar acestea au valoare diagnostică incertă, fiind recomandată retestarea serică a pacienților la intervale de timp prestabilite (2-3 ori pe săptămână). Rezultate fals pozitive au fost înregistrate la pacienții hemodializați, în cazul folosirii membranelor celulozice sau administrării unor produse de origine sangvină precum albumina sau imunoglobulinele, în timp ce utilizarea pentru hemodializă a unor membrane confecționate din celuloză triacetat sau polimetil-metacrilat nu au provocat creșteri ale valorilor de (1,3)- β -D-glucan seric. Fiind un test cromogen rezultatele obținute mai pot fi interferate de prezența bilirubinei serice sau de turbiditatea serului de analizat cauzată de hiperlipemie.

7.1.2. Materiale furnizate împreună cu testul Fungitell

Fungitell este destinat diagnosticului *in vitro*. Următoarele materiale (libere de orice urmă de 1,3- β -D-glucan) sunt furnizate împreună cu kitul și suficiente pentru 2 plăci de microtitrare:

1. Reactivul Fungitell - (1,3)- β -D-glucan liofilizat, specific LAL (*Limulus Amebocyte Lysate*) sau lizat din amebocitele unei specii de crab;
2. Tampon Pyrosol (Tris HCl 2M pH 7,4);
3. Glucan standard liofilizat ce conține între 250 și 350 pg s.a. / fiolă și solvent inert;
4. Apă - reactiv conform standardului ISO 3696:1987;
5. Microplăci de titrare cu 96 godeuri, cu fund plat;
6. KCl 1,2 M
7. KOH 0,25 M

7.1.3. Materiale necesare dar nefurnizate împreună cu kitul

Toate materialele și sticlăria trebuie să fie libere de interferare glucanică. Sticlăria trebuie să fie uscată la cald, depirogenată la 235°C timp de 7 ore, pentru a fi adecvată folosirii. Toate recipientele din material plastic vor fi libere de orice tipuri de interferări. Materialele de unică folosință sunt de preferat.

1. Vârfuri pipete 10-100 μ l, 250 μ l, 1000 μ l;
2. Micropipete pentru volume de 20 μ l, 200 μ l și 1000 μ l;
3. Micropipetă multipas pentru volume de 100 μ l;
4. Tuburi de testare pentru diluția probelor și pregătirea mixului de extracție serică;
5. Incubator-cititor cu fluorescență, lungime de undă 405 nm monocromă, cu 2500 unități densitate optică și software pentru interpretare asistată de PC;
6. Tuburi sterile de plastic cu dop, pentru mixarea probelor;
7. Tuburi de colectare a serului.

Atenție! Vârfurile de pipetă cu filtru de bumbac pot constitui sursă de glucan. Toate produsele furnizate de Cape Code. Inc. sunt certificate ca fiind libere de interferare glucanică.

7.1.4. Atenționări și precauții

Testul Fungitell necesită o atenție sporită din punct de vedere tehnic și procedural.

1. Specii nedetectate de test. Unele specii fungice produc cantități reduse de (1,3)- β -D-Glucan și nu sunt de regulă detectate de test. Din această categorie fac parte specii ale genului *Cryptococcus*, precum și specii din categoria zygomycetelor, ca *Absidia*, *Mucor* și *Rhizopus*;
2. Nu se pipetează nici o substanță cu gura, nu se fumează, nu se consumă alimente în spațiul destinat testărilor;
3. Se utilizează reactivi și materiale care sunt certificate ca fiind libere de glucani, știut fiind că apa, hainele, praful pot fi surse de glucan;
4. Nu se utilizează reactivi cu termenul de valabilitate depășit, seruri hiperlipemice sau care conțin bilirubină;
6. Se utilizează echipament de protecție și mănuși fără talc în manoperele ce implică prelevatele;
7. Pacienții hemodializați pot acumula un nivel ridicat de (1,3)- β -D-glucan când sunt utilizate membrane celulozice. Cele de tipul triacetat sau polimetilmetacrilat nu par a afecta concentrația sanguină de glucan;
8. Anumite manopere chirurgicale ce implică utilizarea unor materiale absorbante sau de sutură derivate din bumbac sau mătase pot conduce postoperator la acumularea unui nivel ridicat de (1,3)- β -D-glucan, care să contribuie la falsa pozitivare a rezultatelor testării acestor pacienți.

7.1.5. Păstrarea reactivilor

Toate substanțele se vor păstra la 2°-8°C, ferite de lumină. Reactivul Fungitell reconstituit va fi păstrat la 2°-8°C și utilizat în maxim 2 ore. Pe termen mai îndelungat, soluția reconstituită poate fi congelată o singură dată la -20°C, pentru circa 20 zile.

7.1.6. Recoltarea / Stocarea / Marcarea probelor

1. Probele de ser se vor recolta în tuburi vidate (tip Venoject) care să permită o rapidă formare a coagulului și centrifugarea ulterioară în vederea separării cât mai nete a serului de analizat, la 1800 rpm timp de 10 minute. Serul astfel obținut, se transferă în condiții aseptice în fiole sterile și se stochează;
2. Stocarea probelor înaintea începerii testării se realizează la 2°-8°C pentru maxim 48 de ore sau se pot congela la -20°C;
3. Marcarea prelevatelor constă în notarea numelui și prenumelui pacientului alături de data recoltării sau se utilizează sisteme de identificare unică.

7.1.7. Tehnică de lucru

1. Prepararea glucanului standard furnizat odată cu kitul
 - a. Se dizolvă o fiolă de glucan standard într-un volum corespunzător de apă standard preîmbuteliată, pentru obținerea unei soluții cu 100 pg/ml (soluția 1);

Se vortexează cel puțin 10 secunde pentru omogenizarea soluției. Soluția astfel preparată va fi stocată la 2°-8°C și utilizată în maxim 3 zile;

b. Se prepară apoi o soluție standard cu 50 pg/ml prin mixarea a 400 μl apă reactiv cu 400 μl din soluția 1, într-un tub liber de glucan (soluția 2);

c. Din soluția 2 se prepară un nou standard cu 25 pg/ml prin mixarea a 400 μl apă reactiv și 400 μl din soluția 2, într-un tub liber de glucan (soluția 3);

d. Pornind de la soluția anterioară, se prepară un standard cu 12.5 pg/ml prin mixarea a 400 μl apă reactiv cu 400 μl din soluția menționată, într-un tub liber de glucan (soluția 4);

e. Se prepară apoi un ultim standard cu 6.25 pg/ml prin mixarea 400 μl apă reactiv cu 400 μl din soluția 4, într-un tub liber de glucan (soluția 5);

2. Prepararea reagentului de tratare a serului

Tratarea alcalină a serului va desface triplul helix al glucanului conferindu-i o reactivitate mai mare în timpul testului. Un pH mai alcalin va inactiva serin-proteazele precum și inhibitorii acestora, care pot da rezultate fals positive sau fals negative.

a. Pregătirea reagentului de tratare a serului (0.6 M KCl și 0.125 M KOH) prin transferarea a 400 μl din soluția 0.25 M KOH într-un tub liber de glucan și adăugarea a 400 μl din soluția 1.2 M KCl. Soluția se omogenizează ușor și se utilizează în cel mult 30 de minute. Fiolele se acoperă cu parafilm, putând fi stocate la 2°-8°C pentru a fi utilizate mai târziu, cu cea de-a doua microplacă.

Notă: Când se trasează curba de etalonare, se multiplică pg/ml cu cinci, astfel încât limita să fie încadrată în intervalul 31.25 - 500 pg/ml. Volumul standard din testare este de 25 μl pentru fiecare godeu, adică de cinci ori volumul probei de ser. Placa de microtitrare are zonă standard (st), zonă martor (blank = blk) și zonă test (unknowns = uk) cu fiecare variantă în triplu exemplar, după următorul model (fig. Nr. 7-1).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		st1	st1	st1		uk1	uk1	uk1	uk7	uk7	uk7	
C		st2	st2	st2		uk2	uk2	uk2	uk8	uk8	uk8	
D		st3	st3	st3		uk3	uk3	uk3	uk9	uk9	uk9	
E		st4	st4	st4		uk4	uk4	uk4	uk10	uk10	uk10	
F		st5	st5	st5		uk5	uk5	uk5	uk11	uk11	uk11	
G		Blk	Blk	Blk		uk6	uk6	uk6	uk12	uk12	uk12	
H												

Fig. nr. 7-1 Zonele standard (st), martor (blk) și test (uk) ale plăcii de microtitrare

3. Tratarea serului cu reactivul de tratare a serului. *Notă: Pentru evitarea contaminării accidentale se păstrează microplăcile acoperite pe parcursul desfășurării manoperelelor, capacul îndepărtându-se pentru citire.*

- a. Decongelarea probelor de ser se realizează la temperatura camerei, iar omogenizarea lor se realizează prin vortexare timp de 10 secunde;
 - b. Se transferă 5 μ l din proba de ser în fiecare din cele trei godeuri desemnate (uk). Operațiunea se repetă pentru fiecare probă de ser;
 - c. Se adăunează 20 μ l din reagentul de tratare a serului în fiecare godeu ce deja conține cei 5 μ l de ser;
 - d. Se agită placa 5 secunde și se incubează 10 minute la 37°C în cititor;
4. Pipetarea blanc-ului și a standardelor. Se îndepărtează microplaca din cititor și:
- a. Se adaugă 25 μ l din soluția standard 1 în godeurile notate B2, B3, B4;
 - b. Se adaugă 25 μ l din soluția standard 2 în godeurile notate C2, C3, C4;
 - c. Se adaugă 25 μ l din soluția standard 3 în godeurile notate D2, D3, D4;
 - d. Se adaugă 25 μ l din soluția standard 4 în godeurile notate E2, E3, E4;
 - e. Se adaugă 25 μ l din soluția standard 5 în godeurile notate F2, F3, F4;
 - f. Se distribuie câte 25 μ l apă standard în godeurile notate G2, G3, G4;
5. Prepararea reagentului Fungitell și conduita procedurală
- a. Se reconstituie o fiolă de reagent Fungitell cu 2,8 ml apă standard și se aditivează cu 2,8 ml de Pyrosol tampon, cu ajutorul micropipetei de 1000 μ l;
 - b. Se agită ușor fiola pentru dizolvarea completă a conținutului; nu se vortexează. Se adaugă apoi 100 μ l de reagent Fungitell în fiecare godeu cu ajutorul micropipetei multicanal. Se îndepărtează capacul de pe microplacă și se așează în cititor odată cu setarea temperaturii la 37°C. Îndepărtarea capacului este opțională, excepție făcând situațiile când acesta ar putea împiedica vizualizarea probei. Microplaca se agită timp de minim 5 secunde înaintea citirii. Citirea are loc la 405 nm, la intervale de 15-30 secunde, timp de 40 minute, la 37°C;
 - c. Colectarea rezultatelor și analiza acestora: se calculează rata medie de variație a densității optice (mili-unități de absorbantă/minut) pentru toate punctele, între 0 și 40 minute;
 - d. Se înregistrează concentrația de glucan a probelor testate.

7.1.8. Interpretarea rezultatelor

Rezultatele testului Fungitell vor fi utilizate în diagnosticul infecțiilor invazive fungice doar în coroborare cu alte date. Rezultatele sunt exprimate în pg/ml ser, începând cu valori considerate a fi nedetectabile ($< 31,25$ pg/ml) până la valori mai mari de 500 pg/ml, acestea fiind printate cu ajutorul softului furnizat sau sunt citite pe curba etalon. Pentru acuratețea aprecierilor, în cazul valorilor de peste 500 pg/ml, se recomandă diluarea probei de ser cu apă standardizată și retestarea acesteia. Laboratorul care efectuează testările are obligația de a informa clinicianul că sfera de detecție a kitului nu cuprinde specii ale genului *Cryptococcus* (produc cantități infime de (1,3)- β -D-glucan) sau specii de zygomycete precum *Absidia*, *Mucor* sau *Rhizopus* care nu produc (1,3)- β -D-glucan.

Rezultate negative: un rezultat negativ înseamnă că (1,3)- β -D-glucanul nu a fost detectat sau că valorile s-au încadrat sub limita de detecție a kitului. Valori ale (1,3)- β -D-glucanului mai mici de 60 pg/ml sunt interpretate ca fiind negative.

Rezultate pozitive: un rezultat pozitiv înseamnă că (1,3)- β -D-glucanul a fost detectat, dar acest rezultat nu este definitoriu pentru prezența bolii și trebuie interpretat în coroborare cu rezultatele metodelor complementare de diagnostic. Valorile mai mari sau egale cu 80 pg/ml sunt considerate pozitive.

Rezultate incerte: valorile cuprinse în intervalul 60-79 pg/ml sugerează o posibilă infecție fungică. Pentru certitudine, sunt necesare probe seriate și testări adiționale pentru o interpretare corectă a rezultatelor.

7.1.9. Controlul calității

Ghidul controlului de calitate al standardelor de laborator poate fi accesat la adresa URL www.nccls.org (documentul C24-A).

- Curba etalon cu cele cinci concentrații de glucan servește drept model de control pozitiv a kitului Fungitell. Coeficientul de corelație al curbei standard (ordonată / abscisă) ar trebui să fie mai mare de 0,980;
- Blanc-ul (25 μ l de apă standard) reprezintă controlul negativ, cu valori mai mici cu 50% decât cea mai mică valoare incertă indicată de standard. Dacă nu se îndeplinesc aceste condiții, testarea trebuie repetată cu înlocuirea tuturor reagenților;
- Dacă se observă că probele de ser sunt hemolizate, prezintă turbiditate sau dau prin citire la densitatea optică de 405 nm o valoare mai mare de 0,06, acestea vor fi diluate cu reagentul bază și retestate. O bună practică de laborator înseamnă că ambele verificări de pozitivare sau negativare a probelor vor fi puse în practică, în vederea verificării reagenților și tehnicii de lucru. Fiecare laborator care utilizează această test de diagnostic va stabili și o serie de criterii proprii privind controlul de calitate.

7.1.10. Limite

1. Localizarea tisulară a infecțiilor fungice, încapsularea și nivelul de (1,3)- β -D-glucan produs de anumiți fungi influențează concentrația serică de antigen. *Cryptococcus spp.* produce un nivel scăzut de (1,3)- β -D-glucan. Specii aparținând genurilor *Absidia*, *Mucor* și *Rhizopus*, nu produc (1,3)- β -D-glucan;
2. Anumiți indivizi sănătoși au concentrații serice detectabile de (1,3)- β -D-glucan ceea ce poate conduce spre o zonă de incertitudine privind calitatea diagnosticului. În astfel de cazuri sunt recomandate testările suplimentare;
3. Frecvența testării pacienților se va stabili în funcție de riscul la care aceștia sunt expuși, cu o rată de cel puțin 2-3 ori pe săptămână;
4. Rezultate pozitive datorate creșterii valorilor de (1,3)- β -D-glucan seric au fost evidențiate la pacienții hemodializați al căror tratament constă în administrarea unor produse de origine sanguină, albumină serică sau imunoglobuline;
5. Intervalul de detecție al testului este între 31,25 și 500 pg/ml.

7.1.11. Interferarea cu alte substanțe

În următoarele situații pot avea loc interferări privind acuratețea rezultatelor:

- Hemoliza;
- Turbiditatea probei cauzată de hiperlipemie;
- Prezența vizuală a bilirubinei;
- Turbiditatea serului.

7.1.12. Valori așteptate

Valorile crescute de β -glucan sunt relevante într-o varietate de infecții fungice. Când semnele / simptomele sunt prezente la nivelul de 80 pg/ml sau mai mare, valoarea predictivă la care subiectul este pozitiv pentru infecții fungice se încadrează în intervalul 74,4% - 91,7%. În absența semnelor clinice și mai puțin de 60 pg/ml, predicția negativă se încadrează în intervalul 65,1% - 85,1%.

7.2. *Platelia*® *Aspergillus*

7.2.1. *Principiul testului*

Kitul *Platelia Aspergillus* este un test imuno-enzimatic de tip sandwich care permite detecția galactomananului (GM) în serul uman. Acest test utilizează anticorpi monoclonali (Ac) de șobolan EBA-2, dirijați contra GM aspergilar. Acești anticorpi permit o marjă de detecție de 1 ng GM/ml. Calitatea și acuratețea rezultatelor depind de maniera de lucru a fiecărui laborator în parte, de reactivii utilizați, de urmarea cu strictețe a specificațiilor privind protocolul de lucru. Se vor utiliza seruri de control pozitiv și negativ pentru validarea rezultatelor.

Încălzirea serului în prezența EDTA are rolul de a disocia complexe imune și de a precipita proteinele serice care ar putea interfera rezultatele testării, crescând astfel sensibilitatea reacției. După tratarea serului și centrifugare, supernatantul este recuperat și analizat rapid (în aceeași zi). Dacă se dorește retestarea unei probe de ser, întotdeauna se depozitează serul ca atare și nu prelevatul tratat.

Se vor incuba simultan serul și conjugatul în godeurile microplăcii sensibilizate în prealabil cu anticorpii monoclonali, permițându-se astfel formarea complexelor de tip Ac – GM – Ac – peroxidază. După spălare, complexe sunt evidențiate prin adăugarea substratului. Rezultatul reacției este detectat la un spectrofotometru cu lungime de undă 450 / 620 nm, după 30 minute de incubare la temperatura ambiantă, reacția fiind stopată prin adăugarea acidului sulfuric 1,5N.

Din cauza problemelor de falsă pozitivitate, serurile intermediare sau pozitive vor fi sistematic retestate; este recomandat să se recolteze o nouă probă de ser de la pacienții cu risc, pentru a fi testată suplimentar. Datorită caracterului ubicuitar al conidiilor de *Aspergillus* și *Penicillium*, în vederea evitării contaminării accidentale a serului sau reactivilor, se vor utiliza doar materiale sterile, ferite de praf. Galactomananul fiind termostabil, sterilizarea nu poate garanta absența GM contaminant, de aceea se va limita la maxim contactul serului sau al reactivilor cu aerul ambiant. Se recomandă manipularea în hotă cu flux de aer laminar clasă II.

7.2.2. *Materiale furnizate odată cu kitul*

- **Microplăci** cu 96 godeuri sensibilizate cu anticorpi monoclonali EBA-2 antigalactomanan, 1 buc;
- **Soluție concentrată de spălare** – soluție concentrată (10X); Tampon TRIS-NaCl (pH 7,41), Tween 20 sol.1%; conservant: 0,01% tiomersal – 1x 100ml;
- **Control negativ** – ser de control negativ (liofilizat): ser uman liber de galactomanan, negativ la testarea pentru anticorpi anti-HIV1 și anti-HIV2, pentru antigene HBs și anticorpi anti-HCV; 2 x 1ml;
- **Ser de calibrare** – ser standard (liofilizat): ser uman cu conținut în galactomanan (1ng/ml), negativ pentru anticorpi anti-HIV1 și anti-HIV2, antigene HBs și anticorpi anti – HCV; 2 x 1ml.
- **Control pozitiv** – ser de control pozitiv (liofilizat): ser uman conținând galactomanan, negativ pentru anticorpii anti-HIV1 și anti-HIV2, pentru antigene HBs și anticorpi anti-HCV; 2 x 1ml;

- **Conjugat** – conjugat gata de utilizare: anticorpi monoclonali anti-galactomanan marcați cu peroxidază; conservant: 0,01% tiomersal – 1 x 8ml;
- **Soluție de tratare a serului** (gata de utilizare): soluție acidă EDTA, fără conservanți; 1 x 10,5 ml;
- **TMB (Tetra-Metil-Benzidină) tampon substrat** – tampon substrat pentru peroxidază (gata de utilizare): soluție de acid citric și acetat de Na, pH 5,2 conținând 0,009% H_2O_2 și 4% dimetilsulfoxid (DMSO); 1x 60 ml;
- **Soluție cromogenă TMB** – soluție cromogenă (concentrată): soluție DMSO 90% cu 0,6% Tetra-Metil-Benzidină (TMB); 1 x 1 ml;
- **Soluție de stopare** (gata de utilizare): soluție de acid sulfuric 1,5 N.

7.2.3. Materiale necesare, dar nefurnizate odată cu kitul

- Apă distilată sau perfect demineralizată pentru soluția de spălare;
- Apă purificată sterilă pentru reconstituirea serurilor de control;
- Hârtie absorbantă;
- Mănuși de unică folosință;
- Ochelari de protecție;
- Hipoclorit de Na (apă Javel) și bicarbonat de Na;
- Pipete simple și multicanal, reglabile sau fixe, pentru măsurarea și distribuirea a 50μl, 100 μl, 300 μl și 1000 μl;
- Tuburi Eppendorf conice, de 1,5 ml capacitate, cu închidere ermetică, capabile să suporte temperaturi de minim 100°C;
- Centrifugă pentru tuburi Eppendorf conice de 1,5 ml, care să dezvolte minim 10000 rpm;
- Agitator tip Vortex;
- Baie de apă cu termostatare la 100°C;
- Incubator de microplăci cu termostatare la 37°C;
- Sistem de spălare automat, semiautomat sau manual pentru microplăci;
- Sistem de citire a microplăcilor echipat cu filtre de 450 / 620 nm.

7.2.4. Conservarea reactivilor desigilați și a celor reconstituiți

- Microplăcile – după deschiderea pachetului vidat, pot fi păstrate la 2°-8°C în ambalajul original, timp de până la 5 săptămâni, verificându-se periodic în privința desicării;
- Soluția concentrată de spălare – după diluare, aceasta se poate conserva 15 zile la 2°-8°C. După utilizare, dacă nu a suferit contaminări, poate fi păstrată la 2°-25°C până la data înscrisă pe ambalaj;
- Soluția cromogenă, după ce a fost diluată, este stabilă cca. 6 ore la temperatura ambiantă (18° – 30°C) și la întuneric;
- Serurile de control negativ, pozitiv și soluția de calibrare – după reconstituire, pot fi imediat congelate la – 20°C.

Se vor incuba simultan serul și conjugatul în godeurile microplăcii sensibilizate în prealabil cu anticorpii monoclonali, permițându-se astfel formarea complexelor de tip Ac – GM – Ac – peroxidază. După spălare, complexe sunt evidențiate prin adăugarea substratului. Rezultatul reacției este detectat la un spectrofotometru cu lungime de undă 450 / 620 nm, după 30 minute de incubare la temperatura ambiantă, reacția fiind stopată prin adăugarea acidului sulfuric 1,5N.

Din cauza problemelor de falsă pozitivitate, serurile intermediare sau pozitive vor fi sistematic retestate; este recomandat să se recolteze o nouă probă de ser de la pacienții cu risc, pentru a fi testată suplimentar. Datorită caracterului ubicuitar al conidiilor de *Aspergillus* și *Penicillium*, în vederea evitării contaminării accidentale a serului sau reactivilor, se vor utiliza doar materiale sterile, ferite de praf. Galactomananul fiind termostabil, sterilizarea nu poate garanta absența GM contaminant, de aceea se va limita la maxim contactul serului sau al reactivilor cu aerul ambiant. Se recomandă manipularea în hotă cu flux de aer laminar clasă II.

7.2.5. Tehnica de lucru

Se va urma întocmai protocolul de lucru. Înaintea utilizării, toți reactivii vor fi lăsați să atingă temperatura mediului ambiant.

7.2.5.1. Reconstituirea reactivilor

- Soluția concentrată de spălare se diluează de 10 ori în apă distilată sterilă, obținând astfel soluția gata de utilizare. Vor fi necesari 160 ml pentru spălarea a 2 barete cu câte 8 godeuri;
- Controlul negativ, soluția de calibrare și controlul pozitiv – conținutul unui astfel de flacon va fi reconstituit cu 1000 μl de apă sterilă extrapură, va fi lăsat 2-3 minute pentru rehidratare și omogenizat ușor. Se vor repartiza 3 x 300 μl, în tuburi Eppendorf, iar dacă două tuburi nu se utilizează în aceeași zi pot fi congelate la – 20°C. Această reconstituire trebuie să se realizeze înaintea utilizării serurilor în reacția imunoenzimatică și tratate ca toate serurile provenite de la pacienți (300 μl de ser + 100 μl soluție de tratare);
- Nu se conservă serurile de control după tratare;
- Se va dilua de 50 de ori soluția cromogenă în substratul tampon pentru peroxidază. Se vor prepara 4 ml soluție de revelare pentru fiecare baretă de reacție (e.g. 200 μl de soluție cromogenă + 10 ml de reactiv substrat peroxidază).

7.2.5.2. Tratarea serurilor

- Se introduc 300 μl ser de testat într-un tub Eppendorf de 1,5 ml;
- Se adaugă 100 μl din soluția de tratare a serului;
- Se omogenizează cu ajutorul vortexului;
- Se închide ermetic tubul;
- Tubul va fi plasat 3 minute pe baie de apă la 100°C;
- Se centrifughează la 10000 rpm timp de 10 minute;

- Supernatantul obținut va fi utilizat pentru detecția antigenului – galactomanan. Odată ce serul a fost tratat, va trebui testat în cel mai scurt timp posibil;
- Dacă după analiza rezultatelor se decide retestarea unui ser, se va lucra cu serul de origine și nu cu cel deja tratat;
- Stricta respectare a condițiilor de temperatură reprezintă un factor esențial pentru reușita reacției, de aceea se recomandă ca pe tot parcursul desfășurării operațiunilor să se utilizeze un termometru tip sondă;
- Nu se conservă serul după tratare, nici cel de control, nici cel provenit de la pacienți.

7.2.5.3. Reacția imunoenzimatică

- Se stabilește un plan de distribuție a serurilor de analizat provenite de la pacienți, precum și a celor de control și calibrare;
- Baretele necesare testului se scot din ambalaj, restul fiind păstrate conform condițiilor amintite;
- Se omogenizează flaconul ce conține conjugatul;
- Dacă se utilizează o pipetă multicanal, se va preleva doar volumul necesar realizării unei serii, adică 2 ml pentru 16 godeuri;
- Se vor distribui succesiv în godeuri, cu respectarea regulilor de mai jos:
 - 50 μl conjugat;
 - 50 μl din supernatantul serului tratat;
 - un godeu va fi destinat serului de control negativ, două pentru cel de calibrare și încă unul pentru serul de control pozitiv, distribuția acestora pe placă făcându-se la alegere;
- Se acoperă microplaca cu un film adeziv ce să asigure o bună etanșeizare;
- Incubarea microplăcii pe baie de apă cu termostat sau într-un incubator, timp de 90 minute la 37°C;
- Prepararea soluției de spălare (diluată);
- Se îndepărtează filmul adeziv, se aspiră conținutul tuturor godeurilor și se depune în soluția decontaminantă. Apoi se procedează la spălarea succesivă a acestora de cinci ori. Ulterior, baretele sunt lăsate să se usuce prin întoarcere pe o foaie absorbantă, pentru absorbția soluției de spălare;
- Prepararea soluției revelatoare - soluția cromogenă diluată 1/50 în soluția tampon pentru substratul peroxidazei și distribuirea rapidă a câte 200 μl în fiecare godeu. Operațiunea se va desfășura în lumină puternică. Se lasă ca reacția să se desfășoare apoi în obscuritate, timp de 30 minute la temperatura laboratorului (18 – 30°C), fără a se proteja godeurile cu filmul adeziv;
- Se stopează reacția enzimatică prin adăugarea a 100 μl soluție de stopare în fiecare godeu, în ordinea în care a fost adăugată și soluția revelatoare;
- Se va citi densitatea optică la 450 / 620 nm cu ajutorul unui cititor de plăci, pe parcursul celor 30 de minute de după stoparea reacției;
- Înainte de transcrierea rezultatelor ne asigurăm că există concordanță între valorile citite, aferente fiecărui godeu / microplăci și planul de distribuție prestabilit al acestora.

7.2.6. Interpretarea rezultatelor

Rezultatele sunt exprimate prin densitatea optică (DO) a eșantionului vs. valoarea standard. Acest calcul permite limitarea variațiilor de DO între testări, cât și între rezultatele raportate între diferite laboratoare.

Testul este valid dacă:

- Valoarea de referință este mai mare sau egală cu valori cuprinse în intervalul 0,3 – 0,8 DO;
- Valoarea serului pozitiv este mai mare de 2 DO;
- Valoarea serului negativ este mai mică de 0,5 DO;

Un ser este:

- negativ, dacă indicele este mai mic de 1 DO;
- intermediar, dacă se încadrează în intervalul 1 – 1,5 DO;
- pozitiv, dacă valorile sunt mai mari sau egale cu 1,5 DO.

7.3. *Platelia® Candida Ac* ***Detecția anticorpilor serici anti-manan*** ***prin metoda imunoenzimatică***

7.3.1. *Introducere*

Incidența crescută a infecțiilor fungice invazive reprezintă o constantă a patologiei umane în ultimele două decenii. Infecțiile produse de diverse specii aparținând genului *Candida* au rangul de infecții nosocomiale, oportuniste grave, caracterizate printr-o morbiditate accentuată asociată mediului spitalicesc, traduse prin prelungirea perioadei de spitalizare a pacienților și creșterea consumului de antifungice sistemice. Mortalitatea directă atribuibilă acestor infecții se plasează în jurul valorii de 40%. Diagnosticul se stabilește cu dificultate ca urmare a lipsei unor semne clinice cu caracter patognomonic. În practica clinică, la stabilirea unui diagnostic concură o serie de tehnici - radiologice, micologice etc., care permit evaluarea riscului instalării unei candidoze invazive.

În acest context, dozarea anticorpilor anti-*Candida*, bisăptămânal, va ajuta la orientarea diagnosticului etiologic prin completarea examenelor micologice de rutină. Seroconversia și nivelul ridicat al anticorpilor sunt în general asociate unui focar de candidoză profundă.

Chiar dacă apariția anticorpilor și cuantificarea acestora se realizează tardiv, acestea sunt elemente prețioase în vederea stabilirii unui diagnostic, fie el chiar și retrospectiv în cazul în care pacienții au fost tratați empiric, fără o examinare micologică anterioară. Observarea unui nivel ridicat de anticorpi poate pune în discuție existența unei candidoze evolutive. În practica clinică, este recomandat ca reacția de evidențiere a anticorpilor anti-*Candida* să fie dublată și de detecția antigenelor circulante (GM). În fapt, numeroasele studii efectuate au demonstrat că pacienții care au fost diagnosticați cu o candidoză profundă au prezentat pe parcursul infecției o antigenemie crescută în absența anticorpilor sau un nivel ridicat al anticorpilor în absența antigenelor detectabile, astfel încât cele două teste sunt complementare.

7.3.2. *Principiul testului*

Platelia Candida Ac este o tehnică imunoenzimatică de tip indirect, în doi timpi, ce permite detecția anticorpilor anti-manan (izotip A, G și M) în serul uman. Acest test automatizabil se pretează practicii medicale într-un laborator spitalicesc de micologie clinică.

7.3.3. *Materiale furnizate împreună cu kitul*

- Soluție de lavaj concentrată, care se va dilua de 10 ori în apă distilată sterilă : 10 ml soluție de lavaj la 90 ml apă distilată;
- Conjugat (gata de utilizare) - anticorpi de capră anti-Ig (A, G, M) umane marcați cu peroxidază;
- Diluant pentru eșantioane (gata de utilizare);

- Tampon pentru substrat de peroxidază (gata de utilizare) - soluție de acid citric și acetat de sodiu pH 5,2 conținând 0,009% H_2O_2 și 4% DMSO;
- Soluție cromogenă (concentrată) - soluție de DMSO 90% conținând tetra-metil benzidină (TMB);
- Soluție de stopare (gata de utilizare) - soluție de acid sulfuric 1,5N;
- Film adeziv.

7.3.4. Materiale necesare dar nefurnizate împreună cu kitul

- Apă distilată sau perfect demineralizată pentru pregătirea soluției de lavaj;
- Agitator tip Vortex;
- Centrifugă pentru tuburi Eppendorf conice, de 1,5 ml capacitate;
- Spălător de microplăci;
- Spectrofotometru echipat cu filtre de 450 / 620 nm;
- Incubator de microplăci (37°C);
- Kit comercial Platelia Candida Ac.

7.3.5. Tehnica de lucru

Înainte de utilizare, toți reactivii vor fi aduși la temperatura ambiantă (20 – 25°C).

Pregătirea gamei de etalonare :

Soluția-mamă, gata de utilizare (se diluează R4 în raport 1/20).

- Exemplu : 40 μ l de R4 Ac + 800 μ l din soluția diluant

Realizarea gamei de etalonare în 6 puncte (concentrații variabile de anticorpi) :

- 80 UA (unități anticorpi) - diluția soluției-mamă 1/5 : 100 μ l soluție-mamă + 400 μ l diluant.....Tubul E1;
- 40 UA : diluția soluției-mamă până la punctul 80 UA : 200 μ l din tubul E1 + 200 μ l diluant.....Tubul E2;
- 20 UA : diluția soluției-mamă până la punctul 40 UA : 200 μ l din tubul E2 + 200 μ l diluant.....Tubul E3;
- 10 UA : diluția soluției-mamă până la punctul 20 UA : 200 μ l din tubul E3 + 200 μ l diluant.....Tubul E4;
- 5 UA : diluția soluției-mamă până la punctul 10 UA : 200 μ l din tubul E4 + 200 μ l diluant.....Tubul E5;
- 2,5 UA : diluția soluției-mamă până la punctul 5 UA : 200 μ l din tubul E5 + 200 μ l diluant.....Tubul E6.

Diluția eșantioanelor (seruri de testat, seruri de control negativ și pozitiv)

Se diluează extemporaneu eșantioanele - două diluții succesive de 1/80 : 10 μ l ser + 790 μ l de diluant rezultând 1/80, apoi 10 μ l din diluția precedentă + 790 μ l diluant rezultând diluția finală 1/6400.

Reacția imunoenzimatică

- Se stabilește un plan de lucru privind distribuția serului de control și a etaloanelor în funcție de numărul eșantioanelor de testat;
- Se distribuie serul diluat (punctele de reper de la E1 – E6, eșantioanele de testat și cele de control) 100 μ l *per* godeu;
- Se identifică baretele cu ajutorul unui marker permanent;
- Se acoperă microplaca cu ajutorul unui film adeziv, întinzându-se cât mai bine pe toată suprafața în vederea asigurării unei bune etanșeizări;
- Se așează placa în incubatorul de microplăci timp de 60 minute la 37°C;
- Se prepară soluția de lavaj (prin diluare 1:10). Se pregătesc 200 ml pentru două barete, respectiv 20 ml soluție de lavaj concentrată la 180 ml de apă distilată;
- Se îndepărtează filmul adeziv și se aspiră conținutul tuturor godeurilor;
- Conținutul aspirat se depune într-o soluție de hipoclorit de sodiu 2%, iar spălarea godeurilor se face de 4 ori, cu circa 300 μ l soluție de spălare / godeu;
- Se usucă baretele prin tamponare cu o hârtie absorbantă și se lovesc ușor pentru eliminarea în totalitate a soluției de spălare;
- Se omogenizează flaconul ce conține conjugatul, apoi se distribuie câte 100 μ l în godeurile aferente;
- Se acoperă din nou microplaca cu filmul adeziv și se incubează timp de 60 minute la 37°C;
- Se îndepărtează filmul adeziv și se aspiră conținutul tuturor godeurilor, în maniera prezentată anterior;
- Prepararea soluției de revelare prin diluarea de 50 de ori a soluției cromogene concentrate în soluția tampon pentru peroxidază (e.g. 5 ml de reactiv tampon substrat de peroxidază la 100 μ l de soluție cromogenă concentrată tetrametilbenzidină) și distribuirea rapidă a acesteia, în volum de câte 200 μ l, în toate godeurile;
- Reacția este lăsată să se desfășoare în obscuritate, timp de 30 minute, la temperatura ambiantă;
- Se stopează reacția enzimatică prin adăugarea a 100 μ l soluție de stopare în fiecare godeu;
- Se citește densitatea optică la 450 / 620 nm pe parcursul a 30 de minute după stoparea reacției.

7.3.6. Interpretarea rezultatelor

Valori ale densității optice așteptate:

Densitate optică : $0,400 < DO$ la punctul din scala etalon $5 \text{ UA} < 1,200$

Raport :

- DO corespunzătoare punctului etalon 20 UA / DO înseamnă $5 \text{ UA} > 2$
- DO corespunzătoare punctului etalon 10 UA / DO înseamnă $5 \text{ UA} > 1,4$

Tehnici de seromicologie

- DO corespunzătoare punctului etalon 2,5 UA / DO înseamnă 5 UA < 0,8
Concentrația în anticorpi;
- C3 < 2,5 UA/ml
- C5 = concentrația indicată pe flacon $\pm$ 2,5 UA/ml

Curba etalon este realizată în baza a 6 repere / etaloane - 2,5, 5, 10, 20, 40, 80 UA/ml preparate pe baza R4, etalonul etichetat și furnizat odată cu kitul. Se va opta pentru trasarea sigmoidă a curbei de etalonare care să permită extrapolarea pe abscisă a concentrațiilor în UA/ml (interpretare logaritmică) și pe ordonată DO (liniar). Dacă cititorul nu permite acest tip de trasare, se poate opta doar pentru o trasare de reliefare a etaloanelor.

- < 0,5 UA/ml: ser negativ
- între 5 – 10 UA/ml: ser intermediar (rezultat incert)
- $\geq$ 10 UA/ml: ser pozitiv

7.4. *Platelia® Candida Ag* ***Deteția mananului seric prin metoda imunoenzimatică***

7.4.1. *Introducere*

Antigenul *Candida*, în acest caz mananul - polizaharid major de perete, reprezintă markerul principal în identificarea unei candidoze invazive. Eliberarea acestui polizaharid în organism are loc intermitent, iar prezența serică a acestuia este de multe ori pasageră. Deteția rapidă a acestui compus depinde de o serie de factori, precum captarea de către anticorpii specifici circulanți și degradarea de către manozidazele serice. Deci evidențierea mananului seric va trebui corelată cu cea a anticorpilor antimanan circulanți. Tandemul celor două tipuri de teste va concura atât la ameliorarea gradului de sensibilitate cât și la cea a precocității stabilirii unui diagnostic integrat.

7.4.2. *Principiul testului*

Platelia® *Candida Ag* este o tehnică imunoenzimatică de tip sandwich ce permite deția semicantitativă a mananului în serul uman. Această metodă se bazează pe utilizarea anticorpilor monoclonali de șobolan (EBCA-1) dirijați contra unui penta-manozid - exprimat prin manan și manoproteine, existent la principalele specii de interes clinic ale genului *Candida*. Acești anticorpi sunt utilizați în dublu sens: agenți de sensibilizare a plăcii de microtitrare și revelatori după cuplarea cu peroxidaza.

7.4.3. *Materiale furnizate odată cu kitul*

- Soluție de lavaj concentrată care se va dilua de 10 ori în apă distilată;
- Conjugat (gata de utilizare) - anticorpi monoclonali anti-manan, marcați cu peroxidază;
- Soluție de tratare a serului (gata de utilizare) - soluție acidă EDTA fără conservanți;
- Tampon pentru substratul peroxidazei (gata de utilizare) - soluție de acid citric și acetat de sodiu pH 5,2 conținând 0,009% H₂O₂ și 4% DMSO;
- Soluție cromogenă (concentrată) - soluție de DMSO 90% conținând tetra-metil-benzidină (TMB);
- Soluție de stopare (gata de utilizare) - soluție de acid sulfuric 1,5N.

7.4.4. *Materiale necesare dar nefurnizate odată cu kitul*

- Apă distilată sau perfect demineralizată pentru pregătirea soluției de lavaj;
- Agitator tip Vortex;
- Centrifugă pentru tuburi Eppendorf conice, de 1,5 ml capacitate;
- Baie uscată cu dispozitiv de încălzire (temperatura preconizată 120°C) sau baie de apă reglabilă la 100°C;
- Spălător de microplăci;
- Spectrofotometru echipat cu filtre de 450 / 620 nm;

- Incubator de microplăci (37°C);
- Tuburi Eppendorf conice, de 1,5 ml capacitate;
- Kit comercial Platelia Candida Ag.

7.4.5. Tehnica de lucru

Înainte de utilizare, toți reactivii vor fi lăsați să ajungă la temperatura ambiantă (20° – 25°C).

Pregătirea curbei etalon:

- Etalon: concentrația în manan - 2ng/ml, 1ng/ml, 0,5ng/ml și 0,25ng/ml;
- Ser control negativ - 150μl, 225μl și 262,5μl;
- Ser etalon de 2ng/ml - 300 μl, 150 μl, 75 μl și 37,5 μl.

7.4.5.1. Tratarea serului de control și a celui etalon

Serurile de control (negativ și pozitiv) și concentrațiile etalon vor trebui tratate concomitent cu eșantioanele prelevate de la pacienți după modelul următor :

- Se repartizează 300 μl ser de testat într-un tub Eppendorf de 1,5 ml;
- Se adaugă 100 μl soluție de tratare;
- Se omogenizează energetic la Vortex;
- Se închide ermetic tubul (prin apăsarea capacului sau atașarea unui dispozitiv de siguranță);
- Tubul va fi plasat 6 min la 120°C în vederea distrugerii complexelor imune deja existente în ser (Ag-Ac);
- Centrifugare la 10000 rpm timp de 10 minute;
- Testarea supernatantului.

7.4.5.2. Reacția imunoenzimatică

- Se stabilește un plan de lucru privind distribuția serului de control și a etaloanelor în funcție de numărul eșantioanelor de testat;
- Se omogenizează flaconul ce conține conjugatul prin întoarceri repetate înainte de utilizare și se prelevează doar volumul necesar realizării seriei (e.g. pentru două barete a câte 8 godeuri sunt necesari 2 ml);
- Se distribuie succesiv în godeuri, cu respectarea ordinii de distribuție a reactivilor, 50 μl conjugat și 50 μl supernatant din serul de testat tratat în prealabil;
- Se acoperă microplaca cu ajutorul unui film adeziv, acesta întinzându-se cât mai bine pe toată suprafața în vederea asigurării unei bune etanșeizări;
- Se așează placa în incubatorul de microplăci timp de 90 minute la 37°C;
- Se prepară soluția de lavaj prin diluare 1:10. Se pregătesc 200 ml pentru două barete, respectiv 20 ml de soluție de lavaj concentrată la 180 ml de apă distilată;
- Se îndepărtează filmul adeziv și se aspiră conținutul tuturor godeurilor;
- Conținutul aspirat se depune într-o soluție de hipoclorit de sodiu 2%, iar spălarea godeurilor se repetă de 5 ori cu cca. 300 μl soluție de spălare / godeu;

- Se usucă baretele prin întoarcere pe o hârtie absorbantă și se lovesc ușor pentru eliminarea în totalitate a soluției de spălare;
- Prepararea soluției revelatoare prin diluarea de 50 ori a soluției cromogene concentrate în soluția tampon – peroxidază (e.g. 160 μ l soluție cromogenă în 8 ml de reactiv tampon substrat de peroxidază) și distribuirea rapidă a acesteia, 200 μ l în toate godeurile. Reacția este lăsată să se desfășoare în obscuritate timp de 30 minute, la temperatura ambiantă;
- Se stopează reacția enzimatică prin adăugarea a 100 μ l soluție de stopare în fiecare godeu;
- Se citește densitatea optică la 450 / 620 nm pe parcursul celor 30 de minute de la stoparea reacției.

7.4.6. Maniera de calcul și interpretarea rezultatelor

Valori ale densității optice așteptate:

- la 0,5 ng/ml, DO va fi de 0,300 – 1,100;
- pentru concentrația de manan a controlului pozitiv, valorile sunt cele indicate pe flacon $\pm$ 20%;
- raportul DO privind etaloanele trebuie să fie mai mare de 2,1.

Trasarea curbei etalon

Curba etalon este realizată în baza a patru repere: 2, 1, 0,5, 0,25 ng/ml. Astfel se trasează o curbă cu diferite puncte reprezentate de cantitățile amintite, pe abscisă concentrațiile de manan în ng/ml și pe ordonată densitatea optică.

Determinarea concentrației în manan a serurilor de testat și interpretarea rezultatelor

Având ca punct de plecare valorile prestabilite trasate de curba etalon se poate determina pentru fiecare probă de ser concentrația în manan exprimată în ng/ml.

- Mananemia cu valori mai mici de 0,25 ng/ml se consideră rezultat negativ;
- În intervalul 0,25 ng/ml – 0,5 ng/ml vorbim de un rezultat echivoc, altfel spus incert;
- Dacă valorile constatate depășesc sau sunt egale cu pragul de 0,5 ng/ml, rezultatul este pozitiv.

Toate rezultatele pozitive vor trebui confruntate cu simptomatologia observată clinic și corelate cu alte tehnici în vederea stabilirii unui diagnostic fără echivoc de candidoză invazivă, fapt ce va fi urmat de instituirea unei medicații antifungice.

7.5. Identificarea speciei *Candida dubliniensis* prin latex-aglutinare (BICHRO-DUBLI, Fumouze)

Un test expeditiv, perfect adaptat pentru utilizarea în laboratoarele clinice în vederea diferențierii speciilor *C. albicans* și *C. dubliniensis*, este testul de latex-aglutinare Bichro-Dubli (Fumouze – Franța). Acest test folosește particule de latex „sensibilizate” cu anticorpi monoclonali specifici unui antigen de suprafață întâlnit doar la *C. dubliniensis*.

Tehnica de lucru

- Se depun câte 20 μ l reactiv în fiecare cerc al cardului de testare;
- Se stabilesc prin numerotare locurile pentru martorul pozitiv (o tulpină de *C. dubliniensis*), martorul negativ (o tulpină de *C. albicans*) și proba de testat (o tulpină de interes clinic, pozitivă la testul de filamentare);
- Cu ajutorul unei anse microbiologice se prelevează pe rând câte 2-3 colonii din tulpinile respective;
- Se suspensionează coloniile în reactivul adăugat în prealabil astfel încât să se obțină un amestec omogen;
- Se imprimă cardului de testare o mișcare circulară lentă, timp de 3-5 minute;
- Se notează eventuala apariție a aglutinării la proba de testat (similar martorului pozitiv);
- Proba pozitivă este indicată de apariția unui aspect granular (aglomerări bleu pe fond roz sau violet) datorat particulelor de latex care au aderat la celulele de *C. dubliniensis*.

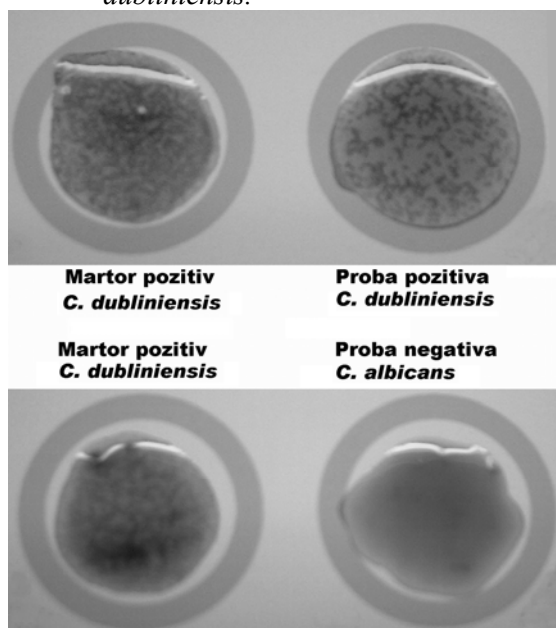


Fig. nr. 7-2. Testul de latex-aglutinare BICHRO-DUBLI. Aspectul testului pozitiv (*C.dubliniensis*) și negativ (*C.albicans*).

Bibliografie selectivă

1. Aketagawa J, Tanaka S, Tamura H, Shibata Y, Saito H (1993) - Activation of Limulus coagulation factor G by several (1,3)- β -D-glucans: Comparison of the potency of glucans with identical degree of polymerization but different conformations; **J Biochem**; 113:683-686.
2. Alexander B (2002) - Diagnosis of fungal infection: new technologies for the mycology laboratory; **Transpl Infectious Dis**; 4 (Suppl. 3):32-37.
3. Becker M J, de Marie S, Willemse D, Verbrugh H A, Bakker-Woudenberg I A J M (2000) - Quantitative galactomannan detection is superior to PCR in diagnosing and monitoring invasive pulmonary aspergillosis in an experimental rat model; **J Clin Microbiol**; 38:1434-1438.
4. Bretagne S, Costa J-M, Marmorat-Khuong A *et al.* (1995) - Detection of *Aspergillus* species DNA in bronchoalveolar lavage samples by competitive PCR; **J Clin Microbiol**; 33:1164-1168.
5. Bretagne S, Costa J-M, Bart-Delabesse E *et al.* (1997) - Comparison of serum galactomannan antigen detection and competitive polymerase chain reaction for diagnosing invasive aspergillosis; **J Clin Infect Dis**; 26:1407-1412.
6. Chambon-Pautas C, Costa J-M, Chaumette M-T, Cordonnier C, Bretagne S (2001) - Galactomannan and polymerase chain reaction for the diagnosis of primary digestive aspergillosis in a patient with acute myeloid leukaemia; **J Infect**; 43:213-214.
7. Costa C, Costa J-M, Desterke C, Botterel F, Cordonnier C, Bretagne S (2002) - Real-time PCR coupled with automated DNA extraction and detection of galactomannan antigen in serum by enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of invasive aspergillosis; **J Clin Microbiol**; 40:2224-2227.
8. Erjavec Z, Verweij P E (2002) - Recent progress in the diagnosis of fungal infections in the immunocompromised host; **Drug Resist**; 5:3-10.
9. Faille C, Mackenzie D W, Michalski J C, Poulain D (1992) - Evaluation of an enzyme immunoassay using neoglycolipids constructed from *Candida albicans* oligomannosides to define the specificity of anti-mannan antibodies; **Eur J Clin Microbiol Infect**; 11:438-446.
10. Fishman J A, Rubin R H (1998) - Infection in organ-transplant recipients; **New England Journal of Medicine**; 338(24):1741-1751.
11. Freydiere A M, Guinet R, Boiron P (2001) - Yeast identification in the clinical microbiology laboratory: phenotypical methods; **Med Mycol**; 39:9-33.
12. Fukazawa Y (1989) - Antigenic structure of *Candida albicans*. Immunochemical basis of the serological specificity of the mannans in yeasts; **Immunol Ser**; 47:37-62.
13. Georges E, Garrigues M L, Stynen D, Poirot J L (1991) - Spécificité *in vitro* d'un anticorps monoclonal (Acm) anti-mannane et du latex sensibilisé

- par cet anticorps au cours de la candidose disséminée expérimentale; **J Mycol Med**; 118:21-24.
14. Hashiguchi K, Niki Y, Soejima R (1994) - Cyclophosphamide induces false-positive results in detection of *Aspergillus* antigen in urine; **Chest**; 105:975-976.
 15. Hashimoto A, Yamakami Y, Kamberi P *et al.* (1998) - Comparison of PCR, (1-3)-beta-D-glucan and galactomannan assays in sera of rats with experimental invasive aspergillosis; **J Clin Lab Anal**; 12:257-262.
 16. Hebart H, Loeffler J, Kanz L, Einsele H (2000) - Molecular methods in the diagnosis of infections in the immunocompromised host; **Curr Opin Infect Dis**; 13:355-359.
 17. Hyams K C (1998) - Developing case definitions for symptom-based conditions: the problem of specificity; **Epidemiol Rev**; 20:148-156.
 18. Iwanaga S, Morita T, Nakamura T, Aketagawa J (1986) - The hemolymph coagulation system in invertebrate animals; **J. Protein Chem**; 5: 255-268
 19. Jacquinot P M, Plancke Y, Sendid B, Strecker G, Poulain D (1998) - Nature of *Candida albicans*-derived carbohydrate antigen recognized by a monoclonal antibody in patient sera and distribution over *Candida* species; **FEMS Microbiol Lett**; 169:131-138.
 20. Jacquinot P M, Plancke Y, Sendid B, Strecker G, Poulain D (1998) - Nature of *Candida albicans*-derived carbohydrate antigen recognized by a monoclonal antibody in patient sera and distribution over *Candida* species; **FEMS Microbiol Lett**; 169:131-138.
 21. Jarvis W R (1995) - Epidemiology of nosocomial fungal infections, with emphasis on *Candida* species; **Clin Infect Dis**; 20:1526-1530.
 22. Kappe R (1989) - Coexistence of free antigens, free antibodies and immune complexes in sera from patients with suspected deep-seated candidosis; **Mycoses**; 32:24-32.
 23. Kato A, Takita T, Furuhashi M *et al.* (2001) - Elevation of blood (1,3)- β -D-glucan concentrations in hemodialysis patients; **Nephron**; 89:15-19.
 24. Kawamura S, Maesaki S, Noda T *et al.* (1999) - Comparison between PCR and detection of antigen in sera for diagnosis of pulmonary aspergillosis; **J Clin Microbiol**; 37:218-220.
 25. Kontoyiannis D P, Vaziri I, Hanna H A *et al.* (2001) - Risk factors for *Candida tropicalis* fungemia in patients with cancer; **Clin Infect Dis**; 33:1676-1681.
 26. Kurzai O, Heinz W J, Sullivan D J *et al.* (1999) - Rapid PCR test for discriminating between *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* isolates using primers derived from the pH-regulated *PHR1* and *PHR2* genes of *C.albicans*; **J Clin Microbiol**; 37:1587-1590.
 27. Latge J P (1999) - *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis; **J Clin Microbiol**; 12:310-340.
 28. Lescher-Bru V, Cavalier A, Pernot-Marino E *et al.* (1998) - *Aspergillus* galactomannan antigen detection with Platelia® *Aspergillus*: multiple positive antigenemia without *Aspergillus* infection; **J Mycol Med**; 8:112-113.

29. Loeffler J, Herbart H, Sepe S (1998) - Detection of PCR - amplified fungal DNA by using a PCR-ELISA system; **Med Mycol**; 36:275-279.
30. Loeffler J, Schmidt K, Hebart H, Schumacher U, Einsele H (2002) - Automated extraction of genomic DNA from medically important yeast species and filamentous fungi by using the MagNA Pure LC system; **J Clin Microbiol**; 40:2240-2243.
31. Maertens J, Verhaegen J, Lagrou K, Van Eldere J, Boogaerts M (2001) - Screening for circulating galactomannan as a noninvasive diagnostic tool for invasive aspergillosis in prolonged neutropenic patients and stem cell transplantation recipients: a prospective validation; **Blood**; 97:1604-1610.
32. Maertens J, Van Eldere J, Verhaegen J *et al.* (2002) - Use of circulating galactomannan screening for early diagnosis of invasive aspergillosis in allogeneic stem cell transplant recipients; **J Infect Dis**; 186:1297-1306.
33. Manso E, Montillo M, De Sio G *et al* (1994) - Value of antigen and antibody detection in the serological diagnosis of invasive aspergillosis in patients with haematological malignancies; **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**; 13:756-760.
34. Mitsuya M, Wada K, Yamaguchi H (1994) - *In vitro* studies on the release of G Test-positive (1,3)- β -D-glucans from various fungal pathogens; In **Committee on Organic Dusts, ICOH, Report 1/94**, Rylander R, Goto H. (eds.); 29-37.
35. Miyazaki T, Kohno S, Mitsutake K *et al.* (1995) - Plasma (1-3)- β -d-glucan and fungal antigenemia in patients with candidemia, aspergillosis, and cryptococcosis; **J Clin Microbiol**; 33:3115-3118.
36. Morace G, Pagano L, Sanguinetti M *et al.* (1999) - PCR-restriction enzyme analysis for detection of *Candida* DNA in blood from febrile patients with haematological malignancies; **J Clin Microbiol**; 37:1871-1875.
37. Morace G, Sanguinetti M, Posteraro B, Lo Cascio G, Fadda G (1997) - Identification of various medically important *Candida* species in clinical specimens by PCR-restriction enzyme analysis; **J Clin Microbiol**; 35:667-672.
38. Obayashi T (1995) - Plasma (1,3)-beta-glucan measurement in diagnosis of invasive deep mycosis and fungal febrile episodes; **Lancet**; 345:17-20.
39. Obayashi T, Yoshida M, Mori T, *et al.* (1995) - Plasma measurement in diagnosis of invasive deep mycosis and fungal febrile episodes; **Lancet**; 345: 17-20.
40. Odabasi Z, Mattiuzzi G, Estey E, *et al.* (2004) - β -D-glucan as a diagnostic adjunct for invasive fungal infections: Validation, cutoff development, and performance in patients with Acute Myelogenous Leukemia and Myelodysplastic Syndrome; **Clin Infect Dis**; 39:199-205.
41. Pfaller M A, Jones R N, Doern G V *et al.* (1999) - International surveillance of blood stream infections due to *Candida* species in the European SENTRY program: species distribution and antifungal susceptibility including the investigational triazole and echinocandin agents; **Diagn Microbiol Infect Dis**; 35:19-25.

42. Pfaller M A, Jones R N, Doern G V *et al.* (2000) - Bloodstream infections due to *Candida* species: SENTRY antimicrobial surveillance program in North America and Latin America, 1997-1998; ***Antimicrob Agents Chemother***; 44:747-751.
43. Pinel C, Fricker-Hidalgo H, Lebeau B *et al.* (2003) - Detection of circulating *Aspergillus fumigatus* galactomannan: value and limits of the Platelia test for diagnosing invasive aspergillosis; ***J Clin Microbiol***; 41:2184-2186.
44. Podzorski R P, Gray G R, Nelson R D (1990) - Different effects of native *Candida albicans* mannan and mannan-derived oligosaccharides on antigen-stimulated lymphoproliferation *in vitro*; ***J Immunol***; 144:707-716.
45. Ponton J, Quindos G (2002) - Non-culture-based diagnostics, In R. A. Calderone (ed.), ***Candida and candidiasis***; American Society for Microbiology; 393-425.
46. Reiss E, Morrison C J (1993) - Nonculture methods for diagnosis of disseminated candidiasis; ***Clin Microbiol Rev***; 6:311-323.
47. Richardson M D, Kokki M H (1999) - New Perspectives in the diagnosis of systemic fungal infections; ***Ann Med***; 31:327-333.
48. Saito H, Yoshioka Y, Uehara N (1991) - Relationship between conformation and biological response for (1,3)- β -Dglucans in the activation of coagulation factor G from *Limulus* amoebocyte lysate and host-mediated antitumor activity. Demonstration of single-helix conformation as a stimulant; ***Carbohydrate Res***; 217:181-190.
49. Sanguinetti M, Posteraro B, Pagano L *et al.* (2003) - Comparison of real-time PCR, conventional PCR and galactomannan antigen detection by enzyme-linked immunosorbent assay using bronchoalveolar lavage fluid samples from hematology patients for diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis; ***J Clin Microbiol***; 41:3922-3925.
50. Sendid B, Poirot J L, Tabouret M *et al.* (2002) - Combined detection of mannanaemia and antimannan antibodies as a strategy for the diagnosis of systemic infection caused by pathogenic *Candida* species; ***J Med Microbiol***; 51:433-442.
51. Sendid B, Tabouret M, Poirot J L *et al.* (1999) - New enzyme immunoassays for sensitive detection of circulating *Candida albicans* mannan and antimannan antibodies: useful combined test for diagnosis of systemic candidiasis; ***J Clin Microbiol***; 37:1510-1517.
52. Sendid B, Tabouret M, Poirot J L, Mathieu D, Fruit J, Poulain D (1999) - New enzyme immunoassays for sensitive detection of circulating *Candida albicans* mannan and antimannan antibodies: useful combined test for diagnosis of systemic candidiasis; ***J. Clin. Microbiol***; 37:1510-1517.
53. Skladny H, Buchheidt D, Baust C *et al.* (1999) - Specific detection of *Aspergillus* species in blood and bronchoalveolar lavage samples of immunocompromised patients by two-step PCR; ***J Clin Microbiol***; 37:3865-3871.
54. Stynen D, Sarfati J, Symoens F, Goris A, Nolard N, Latge J-P (1991) - Rat monoclonal antibodies against exocellular carbohydrate antigens of

- Aspergillus* and dermatophytes; Latge J-P, Boucias D (eds.), ***Fungal cell wall and immune response***; Springer - Verlag; 181-193.
55. Sulahian A, Touratier S, Ribaud P (2003) - False positive test for *Aspergillus* antigenaemia related to concomitant administration of piperacillin and tazobactam; ***N Engl J Med***; 349:2366-2367.
 56. Suzuki S (1997) - Immunochemical study on mannans of genus *Candida*. I. Structural investigation of antigenic factors 1, 4, 5, 6, 8, 9, 11, 13, 13b and 34. Curr. Top; ***Med Mycol***; 8:57-70.
 57. Swanink C, Meis J F G, Rijs A J M M, Donnelly J P, Verweij P E (1997) - Specificity of a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for detecting *Aspergillus* galactomannan; ***J Clin Microbiol***; 35:257-260.
 58. Tamura H, Tanaka S, Obayashi T, Yoshida M, Kawai T (1992) - A new sensitive microplate assay of plasma endotoxin; ***J Clin Lab Anal***; 6(4):232-238.
 59. Tanaka S, Aketagawa J, Takahashi S, Tsumuraya Y, Hashimoto Y (1991) - Activation of a Limulus coagulation factor G by (1,3)- β -D-glucans; ***Carbohydrate Res***; 218:167-174.
 60. Trinel P A, Faille C, Jacquinet P M, Cailliez J C, Poulain D (1992) - Mapping of *Candida albicans* oligomannosidic epitopes by using monoclonal antibodies; ***Infect Immun***; 60:3845-3851.
 61. van Burik J, Myerson D, Schreckhise R, Bowden R (1998) - Panfungal PCR assay for detection of fungal infection in human blood specimens; ***J Clin Microbiol***; 36:1169-1175.
 62. Verweij P E, Figueroa J, van Burik J, Holdom M D, Del-Cas E, Gómez B-L, Mendes-Giannini M-J (2000) - Clinical applications of non-culture based methods for the diagnosis and management of opportunistic and endemic mycoses; ***Med Mycol***; 38:(Suppl. 1):161-171.
 63. Verweij P E, Meis J F (2000) - Microbiological diagnosis of invasive fungal infections in transplant recipients; ***Transplant Infect Dis***; 2:80-87.
 64. Walsh T J, Groll A H (1999) - Emerging fungal pathogens: evolving challenges to immunocompromised patients for the twenty-first century; ***Transpl Infectious Dis***; 1:247-261.
 65. Yeo S F, Wong B (2002) - Current status of non-culture methods for diagnosis of invasive fungal infections; ***Clin Microbiol Rev***; 15:465-484.
 66. Yera H, Sendid B, Francois N, Camus D, Poulain D (2001) - Contribution of serological tests and blood culture to the early diagnosis of systemic candidiasis; ***Eur J Clin Microbiol Infect Dis***; 20:864-870.

8

Teste biochimice și fiziologice

Mihai Mareș, Olimpia Bazgan

Fungii prezintă o serie de însușiri metabolice și eco-fiziologice care pot fi utile în demersul de identificare a speciei, în special pentru discriminarea între specii cu caractere culturale și aspecte microscopice similare. Evaluarea prezenței sau absenței acestor însușiri se realizează prin punerea în practică a unor teste cum ar fi cele biochimice și cele fiziologice.

Aceste teste sunt mijloace absolut necesare în laboratorul clinic, în special pentru identificarea levurilor de interes medical. Deși importanța lor este covârșitoare și unanim recunoscută, aceste teste nu reușesc de fiecare dată să elucideze cu exactitate apartenența taxonomică a unei anumite tulpini și sunt necesare teste suplimentare, în principal de biologie moleculară, pentru identificarea acesteia. Deoarece testele de biologie moleculară bazate pe analiza ADN-ului sunt accesibile doar laboratoarelor din Centrele de Referință și sunt relativ costisitoare, utilizarea profilul biochimic și a caracterelor morfologice reprezintă o soluție acceptabilă pentru laboratoarele clinice, răspunzând de manieră satisfăcătoare cerințelor de diagnostic din spitale și ambulatorii de specialitate. Profilul biochimic cuprinde datele obținute prin efectuarea unei multitudini de teste, între care cele mai importante sunt redate în continuare.

8.1. Fermentarea zaharurilor

Utilizarea metabolică a zaharurilor în condiții de anaerobioză presupune cultivarea levurilor pe medii minimale conținând 0,3% extract de drojdie și 0,5% peptonă, aditivate cu un anumit substrat glucidic în proporție de 2%. Interpretarea se face pe baza dioxidului de carbon acumulat în tubulețele Durham introduse în mediu. Cele mai utilizate zaharuri sunt: D-glucoza, D-galactoza, maltoza, sucroza, rafinoza, trehaloza și D-xiloza. Acest test este util în diferențierea diverselor specii aparținând genului *Candida*, dar nu și a levurilor din genurile *Cryptococcus* și *Rhodotorula* care sunt nefermentative.

8.2. Capacitatea de asimilare a surselor de carbon

Abilitatea levurilor de a crește pe diverse medii în prezența anumitor substanțe chimice adăugate ca unică sursă de carbon, poartă numele de auxanogramă. Substanțele folosite pentru acest test sunt mai numeroase și mai diverse în ceea ce privește complexitatea structurală:

- hexoze: D-glucoză, D-galactoză, L-ramnoză, L-sorboză;
- pentoze: D-xiloză, D-riboză, L-arabinoză, D-arabinoză;
- dizaharide: sucroză, maltoză, celobioză, trehaloză, lactoză, melibioză;
- trizaharide: rafinoză, melezitioză;
- polizaharide: amidon solubil, inulină;
- alcooli: eritritol, adonitol, D-manitol, m-inozitol, metanol, etanol, glicerol, glicol, 1,2-propandiol, 2,3-butandiol, dulcitol, D-sorbitol;
- acizi organici: succinat, citrat, DL-lactat, D-gluconat, D-glucuronat, 2-ceto-D-gluconat, 5-ceto-D-gluconat;
- alți compuși: D-glucozamină HCl, N-acetil-glucozamină.

8.3. Capacitatea de asimilare a surselor de azot

Principiul acestui test este similar cu cel al testului anterior. Sursele de azot testate sunt: nitrații, etilamina, L-lizina, cadaverina, nitriții, creatina, creatinina. Testul de asimilare a nitratului de sodiu este important pentru diferențierea levurilor aparținând genurilor *Cryptococcus* și *Rhodotorula* prin determinarea activității nitratreductazei cu anumiți agenți revelatori de tipul acidului sulfanilic și alfa-naftilaminei.

8.4. Testul de hidroliză a ureei (producerea de urează) la levuri

Scop

Acest test pune în evidență capacitatea unor levuri de a produce enzima numită urează. Se folosește pentru identificarea prezumtivă a levurilor aparținând genurilor *Cryptococcus*, *Rhodotorula* și *Trichosporon*.

Tehnică de lucru

Se folosesc medii lichide care conțin uree și un indicator (roșu-fenol): bulion Christensen preparat în laborator, medii gata de utilizare comercializate de diverse firme (BD Diagnostics, BioMérieux, Remel etc.). În urma scindării ureei de către ureaza secretată de levuri, se produce o creștere a pH-ului prin eliberarea amoniacului, fapt semnalat de virarea culorii indicatorului de la galben-chihlimbar la roz-roșu.

Se însămânțează 0,5 ml mediu de testare cu o ansă încărcată de celule, prelevată din cultura levurii de identificat. În paralel, se însămânțează obligatoriu un martor pozitiv (*Cryptococcus neoformans*) și unul negativ (*Candida albicans*). Rezultatele se citesc după 3, respectiv 24 ore de incubare la 37°C. Interpretare: testul este pozitiv pentru genurile *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Trichosporon* și negativ pentru *Blastoschizomyces*, *Candida* și *Geotrichum*.

Precauții

Tulpina de testat trebuie să fie necontaminată bacterian, deoarece se pot produce erori prin interferarea reacției.

8.5. Testul de hidroliză a ureei (producerea de urează) la dermatofiți**Scop**

Pune în evidență producerea de urează de către dermatofiți, prin cultivare pe bulion sau agar Christensen. În cazul producerii acestei enzime, ureea din mediu este descompusă cu generare de amoniac care va modifica pH-ul mediului (alcalinizare), fenomen indicat de schimbarea culorii indicatorului; astfel, culoarea mediului va vira de la galben-orange la roz-roșu (fig. nr. 8-1, *vezi Anexa*).

Tehnică de lucru

Mediul solid, turnat în pantă, se inoculează într-un singur punct, cu tulpina de analizat. În paralel, se inoculează un martor pozitiv (*e.g. T. mentagrophytes*) și un martor negativ (*e.g. T. verrucosum*). După inoculare, mediul se incubează la 25°-30°C, timp de până la 7 zile.

Testul ureazei este:

- pozitiv pentru următoarele specii de dermatofiți – *M. canis*, *M. cookei*, *M. gypseum*, *M. nanum*, *M. persicolor*, *M. praecox*, *T. ajelloi*, *T. mentagrophytes* (ambele varietăți) și *T. Terrestre*;
- slab pozitiv pentru următoarele specii de dermatofiți – *E. floccosum* și rar *M. canis*;
- variabil (inconstant pozitiv sau negativ, în funcție de tulpină) pentru următoarele specii de dermatofiți – *M. audouinii*, *T. rubrum*, *T. schoenleinii*, *T. tonsurans* și *T. violaceum*;
- negativ pentru următoarele specii de dermatofiți – *M. ferrugineum*, *T. concentricum* și *T. verrucosum*.

Precauții

Este obligatorie absența contaminării bacteriene a culturii dermatofitului din care se fac pasajele pe mediul Christensen.

8.6. Testarea rezistenței la cicloheximidă

Testul se referă la abilitatea levurilor de a se dezvolta pe medii de cultură conținând două concentrații de cicloheximidă – 0,01%, respectiv 0,1%. Aceste concentrații pot fi critice pentru anumite specii, supresându-le total sau parțial dezvoltarea, sau dimpotrivă, pot fi permissive pentru altele, creșterea lor nefiind deloc stânjenită.

8.7. Producerea de fenol-oxidază

Producerea acestei enzime este detectată cu ajutorul unor discuri impregnate cu acid cafeic (*Caffeic Acid Disk*, Remel – SUA) sau prin cultivarea levurilor pe medii bogate în polifenoli de tip acid cafeic (Agar pe bază de extract din semințe de Niger sau Agar cu acid cafeic și citrat feric) și permite identificarea speciei *Cryptococcus neoformans* pe baza unei reacții de culoare. Sub acțiunea fenol-oxidazei, care catalizează oxidarea polifenolilor și transformarea lor în pigment melanic, apare o brunificare a discului într-un interval de aproximativ 4 ore de incubare la 30°C, respectiv colonii brune pe mediile amintite, după 48-72 ore (fig. nr. 8-2, *vezi Anexa*).

8.8. Testarea producerii altor enzime

Enzime cum ar fi β -galactozaminidaza, L-prolin-aminopeptidaza etc., sunt evidențiabile prin cultivarea levurilor pe medii cromogene: CandiSelect™ 4 (fig. nr. 8-3, *vezi Anexa*), Candichrom® II, Albicans ID2 agar, CHROMagar Candida (fig. nr. 8-4, *vezi Anexa*), Oxoid Chromogenic Candida Agar (fig. nr. 8-5, *vezi Anexa*).

Diferite combinații ale acestor însușiri biochimice au fost folosite pentru conceperea unor teste comercializabile, utile pentru identificarea rapidă a speciilor levurice de interes medical în laboratoarele clinice. Aceste teste pot identifica un număr diferit de specii, după cum urmează:

- o singură specie: Caffeic Acid Disk (Remel), *C. albicans* Screen (Remel), Rapid Trehalose Assimilation (Remel), RTT Glabrata (Fumouze);
- câteva specii: CandiSelect (Bio-Rad), CHROMagar Candida (BD Sciences), Candida ID2 (bioMérieux), Candichrom II (International Microbio), Chromogenic Candida Agar (Oxoid);
- specii multiple (zeci de specii din câteva genuri): ID 32C (bioMérieux), RapID Yeast Plus Panel (Remel), Uni-Yeast Tek Plates (Remel), Auxacolor 2 (Bio-Rad) (fig. nr. 8-6 și 8-7, *vezi Anexa*), Microplate (Biolog) (fig. nr. 8-8, *vezi Anexa*).

8.9. Testul de depistare a necesităților nutritive speciale

Unele specii de dermatofiți au exigențe nutritive particulare, reclamând prezența în mediile de cultură a unor factori trofici ca vitaminele (acid nicotinic, inozitol, tiamină) sau aminoacizii (histidină). Testul presupune cultivarea sușei de identificat pe un set de 7 medii (*Trichophyton* Agar) notate 1...7:

1. mediu bazal ce conține cazeină, fără vitamine;
2. 1 + inozitol;
3. 1 + inozitol + tiamină;
4. 1 + tiamină;
5. 1 + acid nicotinic;
6. mediu bazal conținând nitrat de amoniu, fără aminoacizi;
7. 6 + histidină.

Acest set de medii este disponibil comercial: Trichophyton Agar 1-7 (Remel, BD Diagnostics).

Tuburile cu cele 7 medii se însămânțează prin transferul unui mic fragment din colonia de testat, având grijă să nu se preleveze și porțiuni de mediu. Ele se incubează apoi la 25°-30°C sau la 37°C (când se suspicionează *T. verrucosum*), timp de 14 zile. Interpretarea rezultatelor se face după 7, respectiv 14 zile, ținând cont de eventuala stimulare a creșterii pe mediile aditivate cu vitamine sau aminoacizi comparativ cu cea observată pe mediile bazale (tabelul 8-1).

Tabelul 8-1

Comportamentul dermatofiților pe setul de 7 medii aditivate cu factori trofici

Specia	1	2	3	4	5	6	7
<i>E. floccosum</i>	+	+	+	+	+	±	±
<i>M. audouinii</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>M. canis</i>	++	++	++	++	++	++	++
<i>M. cookei</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>M. ferrugineum</i>	+	+	+	++	+	+	+
<i>M. gypseum</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>M. nanum</i>	+	+	+	+	++	+	+
<i>M. persicolor</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>M. praecox</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>T. ajelloi</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>T. concentricum</i>	-	+	++	+	+	-	±
<i>T. mentagrophytes</i> var. <i>interdigitale</i>	++	++	++	++	++	++	++
<i>T. mentagrophytes</i> var. <i>mentagrophytes</i>	++	++	++	++	++	++	++
<i>T. rubrum</i>	++	++	++	++	++	+, -	++
<i>T. schoenleinii</i>	+	+	+	++	+	+	+
<i>T. terrestre</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>T. tonsurans</i>	+, -	+, -	+, -	+++, -	+	+, -	±, -
<i>T. verrucosum</i>	-	±	++	+	-	-	-
<i>T. violaceum</i>	+, -	+	+	++	+	+	+

Legendă: + (creștere normală), - (absența creșterii), ++ (creștere stimulată), ± (creștere disgonică)

8.10. Testul de cultivare pe Agar BCP – lapte – glucoză.

Scop

Permite observarea schimbărilor de pH datorită indicatorului (bromcrezol purpur) inclus în mediu și ajută la diferențierea speciilor de dermatofiți de interes clinic.

Tehnică de lucru

Mediul, turnat în plăci Petri sau flacoane cu capacitate de 25-30 ml (înclinat în acest caz), se însămânțează cu tulpina dermatofitului de identificat într-un singur punct. Recipientele însămânțate se incubează la 30°C timp de 5-10 zile, funcție de viteza de creștere a fiecărei tulpini în parte. Alcalinizarea mediului în urma dezvoltării culturii

dermatofitului va antrena virarea culorii acestuia, de la albastru-pal la violet-purpuriu. Speciile capabile să alcalinizeze mediul sunt: *E. floccosum*, *M. audouinii*, *T. mentagrophytes* (var. *interdigitale*), *T. schoenleinii*, *T. terrestre*, *T. verrucosum*, *T. violaceum*. Unele specii (*T. verrucosum*) sunt capabile să hidrolizeze cazeina din lapte, producând o clarificare a mediului în jurul coloniei.

Precauții

Trebuie să ne asigurăm că tulpina de testat nu este impurificată cu alte microorganisme (bacterii sau fungi) care ar putea da reacții pozitive eronate.

8.11. Testul de perforare a firului de păr *in vitro*

Scop

Diferențierea speciilor de dermatofiți de interes clinic pe baza producerii organelor perforatoare *in vitro*.

Tehnică de lucru

Se utilizează fire de păr de copil, care se cupează în fragmente de 0,5-1 cm și se autoclavează în plăci Petri timp de 10 minute la 121°C. După autoclavare, se adaugă în fiecare placă câte 25 ml apă distilată sterilizată și câteva picături extract de drojdie 10%. Plăcile astfel pregătite se însămânțează cu câteva fragmente din colonia dermatofitului de identificat, apoi se incubează la 25°C, timp de 21 zile. La fiecare 7 zile, utilizând fragmente de păr inoculate, se pregătesc preparate extemporanee (cu lichid clarificant, între lamă și lamelă). O altă variantă, ar fi etalarea unor fragmente de 0,5-1,5 cm din firele de păr autoclavate direct pe suprafața coloniilor dezvoltate pe Agar Sabouraud și continuarea incubării timp de 21 zile. Testul pozitiv este indicat de prezența organelor perforatoare care străbat tija pilară din loc în loc, având traiect perpendicular pe aceasta (fig. nr. 8-9, *vezi Anexa*). Comportamentul speciilor de dermatofiți la acest test este prezentat în *tabelul 8-2*.

Tabelul 8-2

Comportamentul speciilor de dermatofiți la testul de perforare a firului de păr

Test de perforare pozitiv	Test de perforare negativ	Test de perforare variabil
<i>M. canis</i>	<i>M. audouinii</i>	<i>E. floccosum</i>
<i>M. cookei</i>	<i>M. praecox</i>	<i>T. erinacei</i>
<i>M. gypseum</i>	<i>T. equinum</i>	<i>T. tonsurans</i>
<i>M. persicolor</i>	<i>T. concentricum</i>	
<i>T. ajelloi</i>	<i>M. ferrugineum</i>	
<i>M. galinae</i>	<i>T. rubrum</i>	
<i>M. nanum</i>	<i>T. schoenleinii</i>	
<i>T. terrestre</i>	<i>T. verrucosum</i>	
<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. violaceum</i>	
	<i>T. soudanense</i>	

8.12. Testul de cultivare pe boabe de orez

Scop

Este util pentru diferențierea *M. audouinii* (creștere restrictivă, pigment brun-marونی, absența sporulării) de *M. canis* (creștere abundentă, pigment galben, sporulare intensă) (fig. nr. 8-10, vezi *Anexa*). Această metodă este utilă și pentru inducerea sporulării unor tulpini dermatofitice nesporulate, disgonice sau cu sporulare atipică.

Tehnică de lucru

Mediul se prepară în flacoane Erlenmeyer cu capacitate de 100 ml, în care se adaugă 8 g orez decorticat și 25 ml apă distilată. Se sterilizează prin autoclavare la 121°C timp de 15 minute. După inoculare, flacoanele se incubează la 25°-30°C timp de până la 2 săptămâni.

8.13. Testul de filamentare (testul de blasteză sau germ-tube test)

Scop

Test tip *screening* pentru trierea izolatelor de levuri în laboratorul clinic și identificarea prezumtivă a tulpinilor de *C. albicans* și *C. dubliniensis*.

Tehnică de lucru

Ca medii pentru blasteză se utilizează serul sanguin de cal, serul sanguin uman (*Atenție! Risc crescut de contaminare cu HIV, HVB*) sau medii artificiale comercializate de diverse firme (Germ Tube Solution – Remel, SUA). În fiole cu capacitatea de 2 ml se pun în contact 0,5 ml suspensie levurică și 0,5 ml ser sanguin de cal. Fiolele se mențin apoi în baia de termostatare la 36°C timp de 2 ore. Suspensia levurică se prepară în soluție salină fiziologică, densitatea acesteia ajustându-se la 0,5 Mc Farland (cca. 10^5 - 10^6 celule/ml). După expirarea celor 2 ore, fiolele se agită și din fiecare amestec se prelevează un volum de 25 μ l care se etalează apoi între lamă și lamelă. Preparatul extemporaneu astfel obținut se examinează la microscop în vederea decelării tubilor germinativi caracteristici tulpinilor de *Candida albicans* și *Candida dubliniensis* – filamente scurte care emerg din blastospor fără ștrangulare (fig. nr. 8-11, vezi *Anexa*). Ca martor al filamentării, se utilizează de fiecare dată o tulpină-tip de *Candida albicans*. Se va avea în vedere că și alte levuri pot produce formațiuni similare de tipul pseudofilamentelor, însă ele se diferențiază de adevărații tubi germinativi prin existența unei ștrangulări la locul de emergență din blastospor.

Precauții

Nu se recomandă suspensionarea levurilor direct în mediul de blasteză, deoarece concentrația mare a acestora pe unitatea de volum scade sensibilitatea reacției prin diminuarea drastică a numărului de celule care vor produce tubi germinativi. Nivelul rezultatelor fals negative este în mod normal de cca. 5%, însă el tinde să crească odată cu mărirea densității suspensiei levurice.

8.14. Testul de termotoleranță / termostimulare

Scop

Testul este folosit în special pentru diferențierea speciilor de dermatofiți, dar este aplicabil și în cazul altor fungi filamentoși sau levuriformi. Are la bază faptul că unele specii de dermatofiți tolerează temperatura de 37°C pentru dezvoltare (*E. floccosum*, *T. mentagrophytes*, *T. rubrum*, *T. schoenleinii*, *T. tonsurans*, *T. verrucosum*, *T. violaceum*), altele nu (*T. ajelloi*, *T. terrestre* etc.); în plus, pentru unele specii (*T. verrucosum*, *T. soudanense*), temperatura de 37°C acționează chiar stimulativ asupra dezvoltării coloniilor comparativ cu temperaturile mai scăzute (25°C, 30°C).

Tehnică de lucru

În vederea studierii acestor caracteristici, se însămânțează perechi de tuburi conținând Agar Sabouraud solidificat în pantă cu tulpinile în cauză și se incubează diferențiat la 25° sau 30°C și 37°C (în cazul dermatofiților), la 30°C, 37°C, 40°C, 42°C și 45°C (în cazul levurilor) și la 30°C, 37°C, 40°C, 42°C, 45°C, 52°C și 54°C (în cazul fungilor filamentoși). Interpretarea testului se realizează în momentul când coloniile ajung la maturitate pe mediile incubate la temperatura cea mai scăzută (25°-30°C sau 37°C). Principalele aspecte privind permisivitatea dezvoltării la aceste temperaturi în cazul unor specii de fungi de interes clinic sunt prezentate în *tabelul 8-3*.

Tabelul 8-3

Comportamentul diverselor specii de fungi la testul de termotoleranță

Nr. crt.	Specia	37°C	40°C	42°C	45°C	52°C	54°C
1	<i>Absidia corymbifera</i>	+	+	+	+	+	-
2	<i>Cunninghamella bertholletiae</i>	+	+	+	+	+	-
3	<i>Mucor circinelloides</i>	+	-	-	+	-	-
4	<i>Mucor indicus</i>	+	+	+	-	-	-
5	<i>Rhizomucor variabilis</i>	+	-	-	-	-	-
6	<i>Rhizomucor pussilus</i>	+	+	+	-	-	+
7	<i>Rhizomucor miehei</i>	+	+	+	+	+	+
8	<i>Rhizopus azygosporus</i>	+	+	+	+	+	-
9	<i>Rhizopus microsporus</i>	+	+	+	+	-	-
10	<i>Rhizopus oryzae</i>	+	+	?	+	+	-
11	<i>Saksenaea vasisformis</i>	+	+	+	-	-	-
12	<i>Syncephalastrum racemosum</i>	+	+	-	-	-	-
13	<i>Malassezia furfur</i>	+	+	-	-	-	-
14	<i>Malassezia pachydermatis</i>	+	+	-	-	-	-
15	<i>Malassezia slooffiae</i>	+	+	-	-	-	-
16	<i>Malassezia sympodialis</i>	+	+	-	-	-	-
17	<i>Arxiozyma telluris</i>	+	+	-	-	-	-
18	<i>Candida albicans</i>	+	+	+	+	-	-
19	<i>Candida chiropterorum</i>	+	+	-	-	-	-
20	<i>Candida dubliniensis</i>	+	+	+	-	-	-
21	<i>Candida glabrata</i>	+	+	+	-	-	-
22	<i>Candida kefyr</i>	+	+	-	-	-	-
23	<i>Candida krusei</i>	+	+	-	-	-	-
24	<i>Candida lusitaniae</i>	+	+	+	-	-	-
25	<i>Candida tropicalis</i>	+	+	-	-	-	-
26	<i>Geotrichum capitatum</i>	+	+	-	-	-	-
27	<i>Pseudoallescheria boydii</i>	+		-	-	-	-
28	<i>Acremonium alabamense</i>	+	+	+	+	-	-
29	<i>Coccidioides immitis</i>	+	+	+	-	-	-
30	<i>Cladophialophora arxii</i>	+	+	-	-	-	-
31	<i>Cladophialophora bantiana</i>	+	+	-	-	-	-
32	<i>Emmonsia parva</i>	+	+		-	-	-
33	<i>Epidermophyton floccosum</i>	+	-	-	-	-	-
34	<i>Exophiala dermatitidis</i>	+	+	-	-	-	-
35	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	+	-	-	-	-	-
36	<i>Trichophyton rubrum</i>	+	-	-	-	-	-
37	<i>Trichophyton schoenleinii</i>	+	-	-	-	-	-
38	<i>Trichophyton tonsurans</i>	+	-	-	-	-	-
39	<i>Trichophyton verrucosum</i>	+	-	-	-	-	-
40	<i>Trichophyton violaceum</i>	+	-	-	-	-	-
41	<i>Scedosporium prolificans</i>	+	+	-	-	-	-
42	<i>Sporothichium pruinosum</i>	+	+	+	+	-	-
43	<i>Aspergillus fumigatus</i>	+	+	+	+	v	v
44	<i>Bipolaris specifera</i>	+	+	-	-	-	-

Legendă: + (dezvoltare normală), ? (nu sunt date disponibile), v (răspuns variabil), - (absența dezvoltării)

Bibliografie selectivă

1. Artal M E (2004) - Diagnóstico histopatológico de las micosis; **Rev Iberoam Micol**; 21:1-9.
2. Barnett J A, Payne R W, Yarrow D (2000) - **Yeasts: Characteristics and Identification**; 3rd edition; Cambridge University Press; Cambridge.
3. Bosnea D, Diaconescu V, Colar L *et al.* (2003) - Particularitățile izolatelor din hemoculturi la Centrul de Cardiologie Iași (2001-2003); **Rev Med Chir**; 107-3(Supl.1):176-179.
4. Buiuc D (1998) - **Microbiologie clinică**; Ed. Didactică și Pedagogică RA; București.
5. Buiuc D, Neguț M (1999) - **Tratat de microbiologie clinică**; Ed. Medicală; București.
6. Coman I, Mareș M (2000) - **Micologie medicală aplicată**; Ed. Junimea; Iași.
7. Fidel P L, Vazquez J A, Sobel J D (1999) - *Candida glabrata*: review of epidemiology, pathogenesis and clinical disease with comparison to *Candida albicans*; **Clin Microbiol Rev** ; 12(1):80-96.
8. Freydière A-M, Guinet R (1997) - Rapid methods for identification of the most frequent clinical yeasts; **Rev Iberoam Micol**; 14:85-89.
9. Giammanco G M, Pizzo G, Pecorella S, Distefano S, Pecoraro V, Milici M (2002) - Identification of *Candida dubliniensis* among oral yeastisolates from an Italian population of human immunodeficiency virus-infected (HIV+) subjects; **Oral Microbiol Immunol**; 17:89-94.
10. Golăescu M (1997) - **Diagnosticul și tratamentul micozelor interne**; Ed. Viața Medicală Românească; București.
11. Gorka B Z (2002) - Vulvovaginitis candidiasica; **Rev Iberoam Micol**; 19:22-24.
12. Grillot R (1996) - **Les mycoses humaines – démarche diagnostique**; Elsevier; Paris.
13. Hazen K C, Howell S A (2003) - *Candida*, *Cryptococcus* and other yeasts of medical importance; In Murray P (ed.) - **Manual of clinical microbiology**; 8th edition.; ASM Press; Washington.
14. Hoog G S de, Guarro J (1995) - **Atlas of clinical fungi**; Centraalbureau voor Schimmelcultures; Baarn.
15. Hoog G S de, Guarro J, Gené J, Figueras M J (2000) - **Atlas of clinical fungi**; 2nd edition; Centraalbureau voor Schimmelcultures / Universitat Rovira i Virgili.
16. Jabra-Rizk M A, Ferreira S M S, Sabet M *et al.*(2001) - Recovery of *Candida dubliniensis* and other yeasts from human immunodeficiency virus-associated periodontal lesions; **J Clin Microbiol** ; 39(12):4520-4522.
17. Ribes J A, Vanover-Sams C L, Baker D J (2000) - Zygomycetes in Human Disease; **Clin Microbiol Rev**; 13(2):236-301.
18. Salkin I F, Gordon M, Samsonoff W, Rieder C (1985) - *Blastoschizomyces capitatus*, a new combination; **Mycotaxon**; 22:375-380.

- 189

9

Tehnici de micologie moleculară

Mihai Mareș

9.1. Extracția ADN-ului pentru PCR

Se preferă folosirea kit-urilor comercializate (e.g. *High Pure PCR Template Preparation Kit*, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) metodelor artizanale de extracție a ADN-ului. Recomandabil este ca fiecare laborator să se familiarizeze și să folosească de rutină unul, cel mult două metode / kit-uri de extracție.

9.2. Extracția ADN-ului cu ajutorul kit-ului *High Pure Template Preparation Kit* (levuri)

Principiul metodei

Reactivii acestui kit permit lizarea celulelor într-o scurtă perioadă de timp de coincubare cu proteinaza K, în prezența unui inactivator al nucleazelor (guanidina hidroclică). Acizii nucleici precipită și aderă la suprafața unor fibre de sticlă existente într-un microtub, ceea ce ulterior va permite preservarea lor în timpul operațiunilor de spălare-centrifugare destinate îndepărtării moleculelor indezirabile. Nu sunt necesare precipitări sau extracții suplimentare cu solvenți organici.

Etape

- 1) din cultura tulpinii levurice (pe medii solide uzuale, vechi de 24-48 ore) se prelevează o ansă de 10 μ l bine încărcată (aproximativ 10^8 - 10^9 celule);
- 2) se suspensionează levurile prelevate într-un ml apă purificată / distilată sterilizată;
- 3) se centrifughează suspensia obținută 5 minute la 10000 rpm;
- 4) se îndepărtează supernatantul, apoi se adaugă peste sediment 200 μ l *Tissue lysis buffer* (TLB);
- 5) se adaugă 40 μ l proteinază K;
- 6) se vortexează energic;
- 7) se incubează la 55°C timp de 30 de minute;
- 8) se centrifughează imediat pentru a readuce în supernatant picăturile de condens apărute pe bușon;
- 9) se adaugă 200 μ l *Lys Binding Buffer* (LBB);

- 10) se vortexează;
- 11) se incubează la 70°C timp de 15 minute;
- 12) se repetă etapa nr. 8;
- 13) se adaugă 100 µl izopropanol;
- 14) se vortexează;
- 15) se transferă în microcoloană (disponibilă în kit);
- 16) se centrifughează 1 minut la 8000 rpm;
- 17) se înlocuieşte tubul colector pentru microcoloană;
- 18) se adaugă 450 µl *Inhibitor Removal Buffer*;
- 19) se centrifughează 1 minut la 8000 rpm;
- 20) se repetă etapa nr. 17;
- 21) se adaugă 450 µl *Washing Buffer*;
- 22) se centrifughează 2 minute la 13000 - 14000 rpm;
- 23) se aşează microcoloana pe un tub Eppendorf de 1,5 ml;
- 24) se adaugă exact în centrul microcoloanei 50 µl *Elution Buffer* preîncălzit la 70°C;
- 25) se centrifughează 1 minut la 8000 rpm;
- 26) se marchează corespunzător şi se păstrează la + 4°C.

9.3. Extracţia ADN-ului prin crioprecipitare (funghi filamentoşi)

Principiul metodei

Celulele sunt lizate cu ajutorul cloroformului, după care ADN-ul este precipitat prin menţinerea la temperaturi scăzute.

Etape

- 1) într-un tub Eppendorf de 1 ml capacitate, conţinând 40-100 mg Kieselgel-2, se introduc 300 µl *CTAB buffer*;
- 2) se adaugă apoi cu ajutorul unei spatule, o mică porţiune din colonia de analizat, care se fragmentează în porţiuni cât mai mici;
- 3) se adaugă 200 µl *CTAB buffer*;
- 4) se vortexează;
- 5) se incubează la 65°C, timp de 10 minute;
- 6) se adaugă 500 µl cloroform;
- 7) se vortexează;
- 8) se centrifughează 5 minute la 14000 rpm;
- 9) se transferă stratul superior într-un nou tub Eppendorf;
- 10) se adaugă un volum dublu (aprox. 800 µl) de alcool etilic absolut prerăcit (+ 4°C);
- 11) se agită uşor;
- 12) se menţine amestecul la – 20°C, minim 30 minute (chiar şi până a II-a zi), pentru precipitarea ADN-ului;
- 13) se centrifughează 5-10 minute la 14000 rpm;
- 14) se lasă în repaus pentru decantare;
- 15) se spală precipitatul cu alcool etilic 70% rece;

- 16) se usucă timp de 10 minute într-o instalație de vacuum;
- 17) se resuspendă precipitatul în 97,5 μ l *TE buffer* cu 2,5 μ l ribonuclează.

9.4. Controlul calității acizilor nucleici extrași

Indicații

Confirmarea calității acizilor nucleici obținuți în urma extracției și a lipsei degradării acestora

Metoda

Electroforeză în gel de agaroză

Etape

- 1 - Prepararea gelului de agaroză 1% în *TAE* 1x
 - a) se adaugă pulberea de agar în soluția *TAE*, apoi se încălzește amestecul pe o plită electromagnetică sau într-un cuptor cu microunde până la solubilizarea totală;
 - b) se răcește câteva minute sub agitare continuă;
 - c) se toarnă gelul în suport, evitând formarea de bule care pot afecta migrarea ADN-ului și se lasă în repaus până la solidificarea sa completă.
- 2 - Pregătirea probelor de ADN și a markerilor de greutate moleculară
 - a) probe: 10 μ l extract ADN + 2 μ l albastru de bromfenol 2x;
 - b) markeri de greutate moleculară (500 μ g/ml):
 - 1 μ l marker 1 kb + 9 μ l apă distilată sterilă + 2 μ l albastru de bromfenol 6 x;
 - c) pipetarea probelor de ADN și a markerilor de greutate moleculară pe linia de start a gelului de agaroză (12 μ l);
- 3 - Electroforeza : ca tampon se folosește *TBE* 0,5x, iar migrarea va dura 20 minute la 100 V;
- 4 - Colorarea: după încheierea migrării, blocul de gel se imersionează timp de cel puțin 15 minute într-o baie de colorare conținând bromură de etidiu în *TAE* 1x (10 μ g/ml).

Atenție !!! Bromura de etidiu este o substanță cu potențial carcinogen. Se va manipula doar cu mănuși de protecție !
- 5 - Vizualizarea gelului în lumină ultravioletă (folosind un transluminator) și fotografierea acestuia; ADN-ul de calitate se prezintă sub forma unei benzi compacte, cu greutate moleculară mare (fig. nr. 9-1)

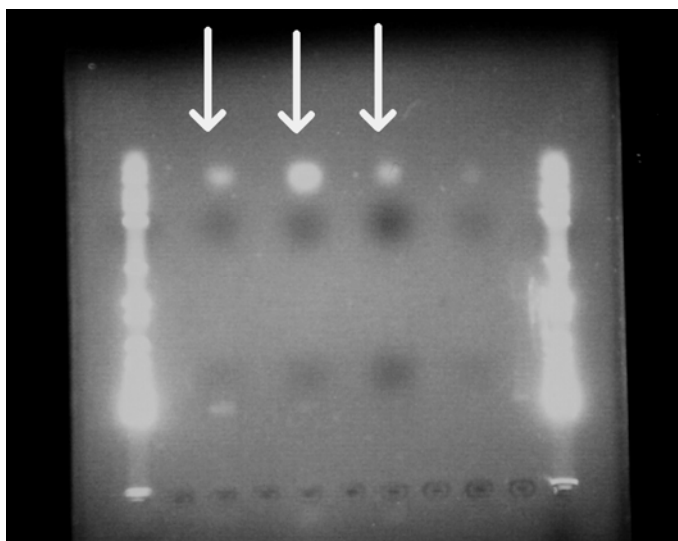


Fig. nr. 9-1 Controlul calității ADN-ului

9.5. Identificarea speciei *Candida dubliniensis* prin PCR duplex

Diferențierea cu acuratețe a speciilor *Candida albicans* și *Candida dubliniensis* exclusiv pe baza caracterelor fenotipice este discutabilă datorită rezultatelor inconstante. În vederea identificării corecte a speciei *Candida dubliniensis*, este preferabilă, pentru siguranța și expeditivitatea ei, o tehnică de biologie moleculară care presupune folosirea a două perechi de primeri (amorse): una de amorse specifice unui intron al genei codante pentru actină (DUBF / DUBR) și alta de amorse universale pentru ADN-ul ribozomal (ITS1 / ITS4). Dintre cele două specii amintite, doar *Candida dubliniensis* generează în urma amplificării două benzi - una de 288 perechi de baze (pb) cu setul DUBF / DUBR și una de cca. 600 pb, cu amorsele universale (fig. nr. 9-2). *Candida albicans* va genera o singură bandă, pe cea de 600 pb, cu amorsele universale.

ITS 1: 5' TCCTGAGGTGAACCTGCGG3'

ITS 4: 5' TCCTCCGCTTATTGATATGC3'

DUBF: 5' GTATTTGTCGTTCCCCTTTC3' (nucleotidele 251-270)

DUBR: 5' GTGTTGTGTGCACTAACGTC3' (nucleotidele 519-538)

Reactivi necesari

- ADN *Candida albicans* (martor pozitiv 1)
- ADN *Candida dubliniensis* (martor pozitiv 2)
- ADN-ul tulpinii de identificat
- soluții stock ale reactivilor destinați PCR
- apă purificată (martor negativ)

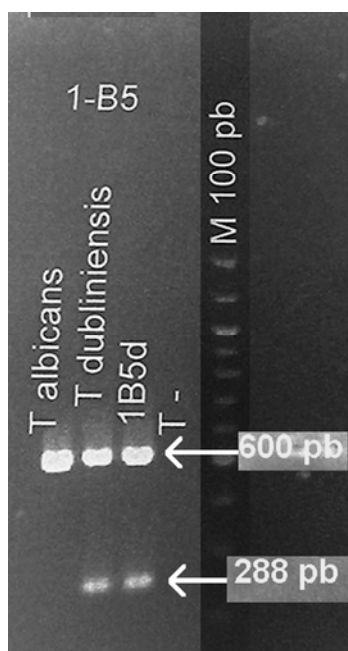


Fig. nr. 9-2 Aspectul celor două tipuri de benzi după dezvoltarea gelului de agaroză în bromură de etidiu și fotografiere în UV; în ordine, de la stânga la dreapta: *Candida albicans* – martor, *Candida dubliniensis* – martor și o tulpină de identificat (1B5D - *C. dubliniensis*).

Mod de lucru

- 1 - Se calculează cantitățile de reactivi necesare preparării mixului (conform tabelului 9-1) având în vedere cele patru eșantioane ce vor fi folosite (martor pozitiv 1, martor pozitiv 2, martor negativ, proba de testat). Se vor adăuga în plus cantitățile de reactivi necesare pentru încă un eșantion, astfel încât în momentul divizării mix-ului, cantitățile necesare pentru cele patru eșantioane să fie suficiente.

Tabelul 9-1

Prepararea mixului

Număr de eșantioane: 4+1		
MIX		Volum / eșantion (μl)
PCR Buffer 10x		2
MgCl ₂ 25 mM		2
dTTP, dATP, dCTP, dGTP 2,5 mM		2
Amorse	DUBF (20 μM)	0,5
	DUBR (20 μM)	0,5
	ITS 1 (20 μM)	0,5
	ITS 4 (20 μM)	0,5
Amplitaq gold 5 U/μl		0,25
Apă purificată ad 20 μl		10,5
ADN		1 μl
		Volum / Mix (μl)
		10
		10
		10
		2,5
		2,5
		2,5
		2,5
		1,25
		52,5

2. Se decongelează reactivii (cu excepția Amplitaq gold) și se mențin la gheață până la utilizare;
3. Se prepară mixul, se adaugă enzima și apoi se vortexează;
4. Se distribuie mixul în tuburi PCR de 0,2 ml;
5. Se adaugă:
 - 1 μ l ADN *Candida albicans* în eșantionul pentru martorul pozitiv 1;
 - 1 μ l ADN *Candida dubliniensis* în eșantionul pentru martorul pozitiv 2;
 - 1 μ l ADN tulpină de identificat în eșantionul probei de testat;
 - 1 μ l apă purificată în eșantionul martorului negativ.
6. Se introduc tuburile în *thermocycler* și se supun următorului regim termic:

50°C/5 minute
 95°C/ 10 minute

 apoi, 94°C/ 30 sec. | 30 cicluri
 58°C/ 30 sec. |
 72°C/ 30 sec. |

 apoi, 72°C/ 10 minute
7. După încheierea amplificării, eșantioanele se mențin la + 4°C până la vizualizarea pe gel de agaroză.

9.6. Identificarea moleculară a levurilor prin PCR și secvențializarea regiunilor ITS

Reactivii necesari acestei tehnici constau în:

- matricea ADN care conține regiunea de amplificat (în cazul de față : ITS 1 și ITS 4 din cadrul ADN-ului codant al ARN-ului ribozomal);
- doi primeri (amorse) specifici care identifică începutul și sfârșitul regiunii de amplificat;
- ADN-polimeraza care copie regiunea de amplificat;
- nucleotide, cu ajutorul cărora ADN-polimeraza va genera noul ADN;
- soluția tampon care asigură condițiile de reacție necesare activității ADN-polimerazei;

Primeri pentru regiunile ITS

ITS 1 : 5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCGG (3')

ITS 4 : 5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC (3')

ITS 5: 5'-GGA AGT AAA GTC GTA ACA AGG (3')

LR6: 5'-CGC CAG TTC TGC TTA CC (3')

V9D: 5'-TTA AGT CCC TGC CCT TTG TA (3')

LS266: 5'- GCA TTC CCA AAC AAC TCG ACTC (3')

Tehnica de lucru

1. Se decongelează reactivii necesari (cu excepția enzimei Taq) și apoi se mențin la gheață până în momentul utilizării;
2. Se calculează cantitățile necesare pentru amplificarea numărului de eșantioane luate în lucru (conform *tabelului 9-2*), adăugând totdeauna un supliment pentru un eșantion în plus (în vederea suplinirii pierderilor din timpul pipetării ulterioare a mix-ului). Volumul final al fiecărui eșantion va fi de 50 μ l. Astfel, dacă avem doar o singură probă de ADN pentru identificare, vom pregăti un mix pentru 3+1 eșantioane: proba ADN pentru identificare, un martor pozitiv, un martor negativ și un eșantion suplimentar; în cazul a două probe pentru identificare: 4+1 ș.a.m.d.

Tabelul 9-2

Prepararea mixului

Reactivi	Volum/eșantion (μ l)	Volum/ total mix (μ l)	Concentrația finală
Tampon PCR 10x	5	(nr. eșantion+supliment)x5	1x
MgCl ₂ 25 mM	5	(nr. eșantion+ supliment)x5	2,5 mM
dNTP 2,5 mM	5	(nr. eșantion+ supliment)x5	0,25 mM
Primer ITS 1 20 μ M sau primer V9D 20 μ M	1,25	(nr. eșantion+ supliment)x1,25	25 p mol
Primer ITS 4 20 μ M sau primer LS 266 20 μ M	1,25	(nr. eșantion+ supliment)x1,25	25 p mol
Amplitaq Gold 5U/ μ l	0,25	(nr. eșantion+ supliment)x0,25	1,25 U
Apă distilată sterilă ad 45 μ l	27,25	(nr. eșantion+ supliment)x27,25	-
ADN *	5 μ l		-

* fiecare eșantion cu ADN-ul său, exceptând martorul negativ și eșantionul suplimentar

3. Se vortexează mix-ul și se repartizează câte 45 μ l în tuburi PCR cu volum de 0,2 ml;
4. Se adaugă în fiecare tub (martor pozitiv, probe de analizat) 5 μ l ADN, omogenizând apoi conținutul cu ajutorul pipetei;
5. Se plasează tuburile în *thermocycler* și se supun următorului regim termic:

95°C/ 10 min	30 cicluri
apoi, 94°C/ 30 sec.	
58°C/ 30 sec.	
72°C/ 30 sec.	
apoi, 72°C/ 10 min.	

6. Purificarea produșilor PCR obținuți, cu ajutorul kit-urilor comercializate (de tip QIAquick, Qiogen)

Această etapă este necesară pentru îndepărtarea primerilor, nucleotidelor, enzimelor, sărurilor, agarozei, bromurii de etidiu și a altor impurități restante în eșantioanelor de ADN și obținerea în stare pură a regiunilor amplificate prin PCR.

- se transferă produșii de PCR într-un tub Eppendorf de 1,5 ml;
 - se adaugă un volum de 5 ori mai mare de tampon PB și se omogenizează (225 μ l tampon PB pentru 45 μ l);
 - se introduce amestecul într-o coloană QIAquick;
 - se centrifughează apoi timp de 30-60 sec la 13000 rpm pentru fixarea ADN-ului pe coloană;
 - se îndepărtează faza lichidă, plasându-se coloana pe același tub colector;
 - se spală ADN-ul fixat pe coloană adăugând 0,75 ml tampon PE și se centrifughează apoi 30-60 sec la 13000 rpm;
 - se îndepărtează lichidul și se recentrifughează;
 - se așează coloana pe un tub Eppendorf de 1,5 ml;
 - se eluează ADN-ul prin depunerea strictă în centrul membranei a 50 μ l tampon EB (10 mM Tris Cl, pH 8,5);
 - se menține 1 minut la temperatura camerei;
 - se centrifughează 1 minut la 13000 rpm;
7. Verificarea produșilor de PCR prin migrare în gel de agaroză.

Precizări importante

- gel de agaroză 3% în TAE 1x;
 - eșantioanele ce urmează a fi pipetate se compun din 5 μ l produs PCR și 2 μ l albastru de bromfenol;
 - martorii de greutate moleculară ce urmează a fi co-pipetați (500 μ g/ml) se prepară din 1 μ l marker 100 pb, 9 μ l apă distilată sterilă și 2 μ l albastru de bromfenol 6x;
 - migrare timp de o oră la 100 V;
 - dezvoltare în baie cu bromură de etidiu, timp de minim 15 minute;
 - vizualizarea gelului în lumină UV (la transluminator și fotografierea benzilor de ADN).
8. Secvențializarea fragmentelor de ADN amplificate prin PCR (de preferat utilizând un secvențializator de tip BigDye – Perkin Elmer, SUA)
9. Analiza secvențelor cu ajutorul unui soft specializat (e.g. CHROMAS – fig. nr. 9-3) și compararea cu secvențele dintr-o bază de date în vederea detectării speciilor cu un înalt grad de omologie a secvențelor. Sistemul BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (fig. nr. 9-4) și baza de date GenBank a National Center for Biotechnology Information (NCBI) - Bethesda (SUA) sunt cele mai utilizate mijloace pentru identificarea fungilor (adresa URL: www.ncbi.nlm.nih.gov/blast).

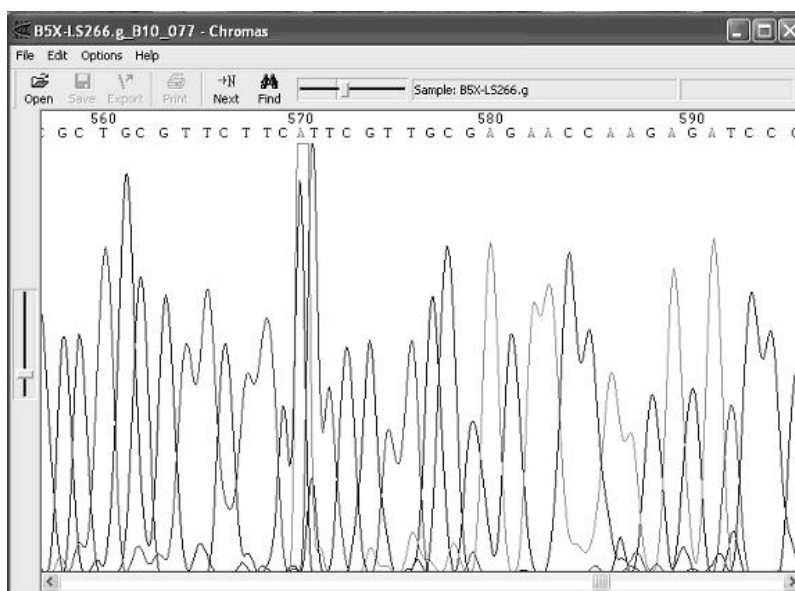


Fig. nr. 9-3. Interfața de lucru a software-ului CHROMAS

NCBI	Enter	BLAST 2 sequences	BLAST	Example
BLAST 2 SEQUENCES				
This tool produces the alignment of two given sequences using BLAST engine for local alignment. The stand-alone executable for blasting two sequences (bl2seq) can be retrieved from NCBI ftp site. Reference: Tatiana A. Tatusova, Thomas L. Madden (1999), "Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences", <i>FEBS Lett.</i> 174:247-250				
Program: blastn Matrix: Not Applicable				
Parameters used in BLASTN program only: Reward for a match: 1 Penalty for a mismatch: -2				
☐ Use Mega BLAST Strand option: Both strands View option: Standard				
Masking character option: X for protein, n for nucleotide Masking color option: Block				
☐ Show CDS translation				
Open gap: 5 and extension gap: 2 penalties				
gap x_dropoff: 50 expect: 10.0 word size: 11 Filter: ☒ Align: Align				
Sequence 1 Enter accession, GI or sequence in FASTA format from: 0 to: 0				

Fig. nr. 9-4. Pagina de lucru pentru analiza secvențelor de ADN

9.7. Reactivi utilizați în tehnicile de biologie moleculară

- CTAB tampon

Tris..... 2,42 g
Clorură de sodiu..... 8,2 g
EDTA sodic 0,74 g
Bromură de cetil-amoniu 2,0 g
Apă bidistilată..... 100 ml

Se ajustează pH-ul la valoarea 7,5 cu ajutorul unei soluții HCl 1N.

Se autoclavează 15 minute la 121°C. Se păstrează la temperatura camerei.

- Proteinaza K

Proteinază K 10 U/ml
Tris (pH 7,4) 0,24 g
Clorură de calciu dihidrat 3,0 mg
Apă bidistilată..... 100 ml

Se sterilizează prin filtrare și se păstrează în fiole la -20°C.

- TAE tampon 50x (Tris-acetate EDTA buffer 50x)

Tris-HCl.....240 g
Acid acetic glacial 57,1 ml
EDTA disodic 0,5 M 100 ml
Apă bidistilatăad 1000 ml

Se sterilizează prin autoclavare timp de 15 minute la 121°C. Se stochează la temperatura camerei. Se diluează cu apă bidistilată în momentul folosirii.

- TE tampon (Tris-EDTA buffer)

Tris 0,12 g
Na-EDTA 0.04 g
Apă bidistilată ad 100 ml

Se ajustează pH-ul la valoarea 8,0 cu soluție NaCl 1 N. Se sterilizează prin autoclavare timp de 15 minute la 121°C. Se stochează la temperatura camerei.

- TBE tampon (Tris Borate EDTA buffer)

Tris 108 g
Acid boric..... 55 g
EDTA tetrasodic 9,3 g
Apă bidistilată ad 1000 ml
pH 8,3

- PB tampon (Phosphate Buffer 0,2 M)

Fosfat disodic anhidru 21,8 g
Fosfat monosodic anhidru 6,4 g
Apă bidistilată ad 1000 ml

Se ajustează pH-ul la 7,4; se stochează la temperatura camerei.

- PE tampon (Phosphate Elution Buffer)

Constă într-o soluție 4mM de fosfat monopotasic care se prepară prin diluarea cu apă bidistilată a unei soluții stoc de fosfat monopotasic 1M.

Bibliografie selectivă

1. Donnelly S M, Sullivan D J, Shanley D B, Coleman D C (1999) - Phylogenetic analysis and rapid identification of *Candida dubliniensis* based on analysis of ACT 1 intron and exon sequences; ***Microbiol***; 145(8):1871-1882.
2. Hoog de G S, Guarro J, Gené, Figueras M J (2000) - ***Atlas of clinical fungi***; 2nd edition ; Centraalbureau voor Schimmelcultures / Universitat Rovira i Virgili.
3. Kawasaki M, Aoki M (2006) - Application of molecular biological techniques to medical mycology; *In* Topley & Wilson's, ***Microbiology and Microbial Infections*** 10th edition; Hodder Arnold.
4. Kurtzman C P, Boekhout T, Robert V, Fell W, Deak T (2003) - ***Methods to identify yeasts***; *In*: Boekhout T, Robert V (eds) - *Yeasts in Food*; B.Behr's Verlag GmbH & Co; Hamburg; Germany.
5. Peman J, Martin-Mazuelos E, Rubio Calvo M C (eds) (2001) - *Guia Practica de Identificacion y Diagnostico en Micologia Clinica*; ***Rev Iberoam Micol***; Bilbaos.

10

Tehnici de evaluare a sensibilităţii la antifungice

Mihai Mareş

Tabelul 10-1

Codul şi intervalul concentraţiilor de antifungic al benzilor E-test
(AB Biodisk, Solna-Suedia)

Cod	Denumire antifungic	Intervalul concentraţiilor (μm /ml)
AP	Amfotericină B	0,002 – 32
FC	5 Flucitozină	0,002 – 32
FL	Fluconazol	0,016 – 256
IT	Itraconazol	0,002 – 32
VO	Voriconazol	0,002 – 32
CS	Caspofungină	0,002 – 32
POS	Posaconazol	0,002 - 32

10.1. Tehnica de lucru pentru levuri (fungi din genurile *Candida*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Trichosporon*)

1 - Prepararea inoculului

Pornind de la culturi efectuate pe Agar Sabouraud sau PDA, vechi de 24 ore (*Candida spp.*) sau 48-72 ore (*Cryptococcus neoformans*) se prepară o suspensie în ser fiziologic sterilizat utilizând ansa microbiologică.

Densitatea suspensiei se ajustează la valoarea 0,5 McFarland pentru levurile genului *Candida* şi 1 McFarland în cazul tulpinilor de *C.neoformans*.

2 - Însămânţarea mediului

Ca mediu de testare se foloseşte Agar RPMI – MOPS – glucoză 2%, cu grosime de $4 \pm 0,5$ mm. În cazul amfotericinei B, pentru depistarea cu acurateţe a rezistenţei este recomandat mediul AM3.

În vederea însămânţării mediului, se depun în centrul plăcii cca. 200 μl inocul (pentru cele cu $\varnothing$ 90 mm) sau 400 μl (pentru cele cu $\varnothing$ 150 mm). Inoculul se dispersează apoi în trei direcţii cu ajutorul unui tampon. Plăcile se lasă în repaus la 35°C timp de 10–15 minute,

pentru uscarea suprafeței mediului (o alternativă ar fi expunerea suprafeței mediului la fluxul de aer laminar dintr-o hotă microbiologică cls. II).

3 - Alegerea antifungicelor

În funcție de tulpinile testate vom alege benzile E-test cu antifungice (tabelul 10-2).

Tabelul 10-2

Alegerea antifungicelor pentru testare

<i>Trichosporon spp.</i>	<i>Candida spp.</i>	<i>Cryptococcus spp.</i>	<i>Rhodotorula spp.</i>
AP (CMI-uri obișnuit crescute) FL IT VO	AP CS (frecvent CMI-uri crescute pentru <i>C.parapsilosis</i>) FC FL (rezistență primară pentru <i>C.krusei</i>) IT VO	AP FL VO	AP FL(frecvent CMI-uri crescute) IT VO

4 - Aplicarea benzilor E-test

- Numărul optim al benzilor ce vor fi aplicate este de 5/placă ø 150 mm și 1/placă ø 90 mm, dispuse radiar, concentrația maximă fiind plasată excentric;

- Benzile se stochează la -20°C și se lasă la temperatura camerei 15 – 20 de minute, înainte de a fi utilizate;

- Benzile se pot aplica cu ajutorul unei pense, cu aplicatorul manual, cu stiloul vacuumatic Nema C88 sau cu aplicatorul automat Simplex C76. După aplicare, se verifică contactul între benzi și mediu, eliminând prin presare eventualele bule de gaz;

- Benzile se aplică cu scala gradată înspre capacul plăcii și cu concentrația maximă spre periferia acesteia;

- Odată aplicate, benzile nu se mișcă.

5 - Incubarea plăcilor se face cu capacul în jos, timp de 24-48 ore (*Candida spp.*) și 48-72 de ore (*C.neoformans*).

6 - Citirea concentrației minime inhibitorii (CMI) se face luând în considerare punctul în care lipsa zonei de inhibiție intersectează banda E-test.

Reguli de citire a CMI în cazul levurilor

- **AP:** se va ține cont de toate coloniile ; citire la 100% inhibiție (fig. nr. 10-1);

- **FL, IT, VO:** citire la 80 % inhibiție; se ține cont de prima schimbare în modul de creștere a coloniilor (diminuarea dimensiunilor acestora). Nu se va ține cont de microcolonii (chiar semiconfluente) care pot apare în interiorul zonei de inhibiție. În schimb, dacă sunt prezente macrocolonii – ele semnifică heterorezistență (prezența unei clone rezistente pe lângă cea sensibilă) și se va raporta CMI-ul maxim (fig. nr. 10-2);

Atenție! Plăcile se citesc sistematic la 24 și 48 de ore.

- **FC:** citire la 90- 95 % inhibiție. Nu se ține cont de microcoloniile ce pot apare la periferia zonei de inhibiție (fig. nr. 10-3);

- CS : citire la 100 % inhibiție. Poate apare uneori efectul paradoxal de creștere - microcolonii în jurul concentrațiilor maxime: nu va fi luat în considerare la lectura CMI (fig. nr. 10-4);
În cazul asimetriilor (concentrații diferite pe cele două laturi ale benzii E-test) se va raporta drept CMI concentrația cea mai mare.

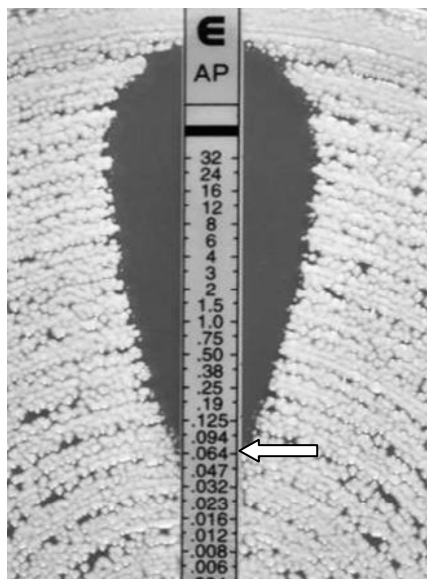


Fig. nr. 10-1. Aspectul zonei de inhibiție în cazul AP (CMI: 0,064 mg/l)

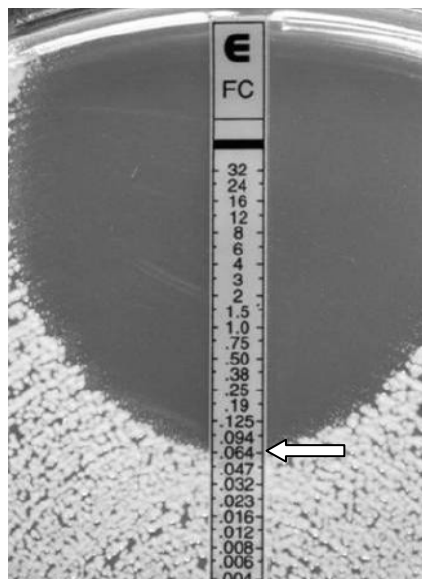


Fig. nr. 10-2. Aspectul zonei de inhibiție în cazul FC (CMI: 0,064 mg/l)

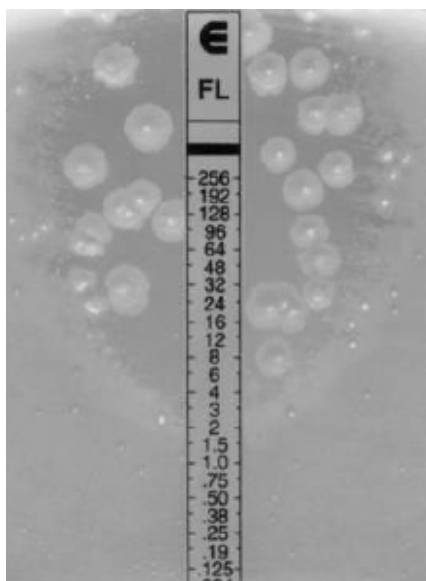


Fig. nr. 10-3. Aspectul zonei de inhibiție în cazul unei tulpini de *C. krusei* (rezistență la FL); CMI: > 256 mg/l

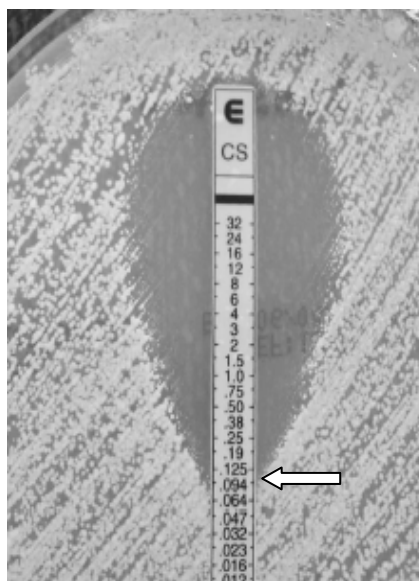


Fig. nr. 10-4. Aspectul zonei de inhibiție în cazul CS (CMI: 0,094 mg/l)

10.2. Tehnica de lucru pentru fungi filamentoși (fungi din genurile *Aspergillus*, *Fusarium*, *Rhizopus*, *Scedosporium*)

1- Prepararea inoculului

Peste culturile de 5-7 zile dezvoltate pe SDA sau PDA înclinat, se adaugă 1-2 ml ser fiziologic steril și cu ajutorul unei pipete Pasteur sau anse microbiologice se realizează o suspensie de spori și hife care se transferă într-un tub steril. Acesta se vortexează ușor și apoi se lasă în repaus cca. 15-20 minute pentru sedimentarea particulelor grosiere. După expirarea acestui interval de timp, supernatantul se recuperează și se transferă în alt tub steril. Turbiditatea acestuia se ajustează cu ser fiziologic la 0,5 McFarland sau se corectează astfel încât să se obțină o transmitanță de cca. 70% prin citire la spectrofotometru (530 nm). Concentrația obținută va fi de cca. 10^6 UFC/ml inocul.

2- Inocularea plăcilor

Se realizează în mod similar celui prezentat pentru levuri.

3- Alegerea antifungicelor (tabelul 10-3)

Tabelul 10-3

Alegerea antifungicelor pentru testare

<i>Aspergillus spp.</i>	<i>Fusarium spp.</i>	<i>Rhizopus spp.</i>	<i>Scedosporium spp.</i>
AP (<i>A. terreus</i> rezistență primară) CS IT POS VO	AP VO POS	AP POS	CS* POS* VOR*

*doar pentru *S. apiospermum* și *S. aurantiacum****4 - Aplicarea benzilor E-test***

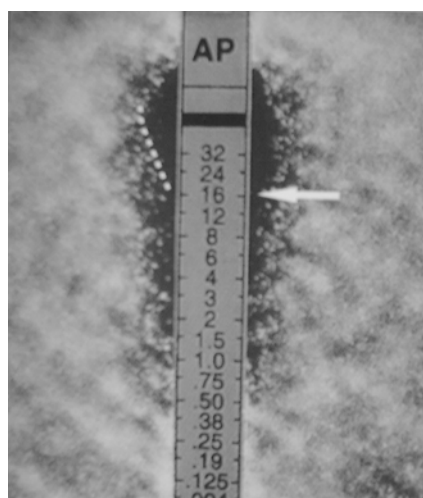
Se realizează în mod similar celui prezentat la levuri.

5 - Incubarea plăcilorSe realizează la 35°C timp de 24-48-72 de ore în funcție de dinamica dezvoltării fiecărei tulpini. Pentru tulpinile de *Fusarium spp.* plăcile se incubează la 35°C timp de 24-48 de ore, apoi se mențin la 25°C pentru 24-48 ore în vederea clarificării CMI.***6 - Citirea CMI:***

- *Rhizopus spp.* - la 18-24 ore;
- celelalte specii- 24-48 (chiar 72 ore pentru tulpinile cu creștere lentă) .

Reguli de citire a CMI în cazul fungilor filamentozii

- **AP:** citire la 100% inhibiție; elipsa zonei de inhibiție trebuie să fie clară (fig. nr. 10-5)
- **IT, VO, POS :** citire la 100% inhibiție (fig. nr. 10-6)
- **CS :** citire la inhibiție parțială (fig. nr.10-7)

Fig. nr. 10-5 Aspectul zonei de inhibiție în cazul AP
(CMI: 16 mg/l)

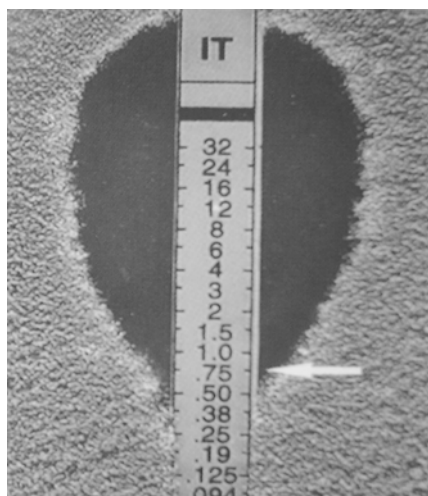


Fig. nr. 10-6. Aspectul zonei de inhibiție în cazul IT (CMI: 0,75 mg/l)

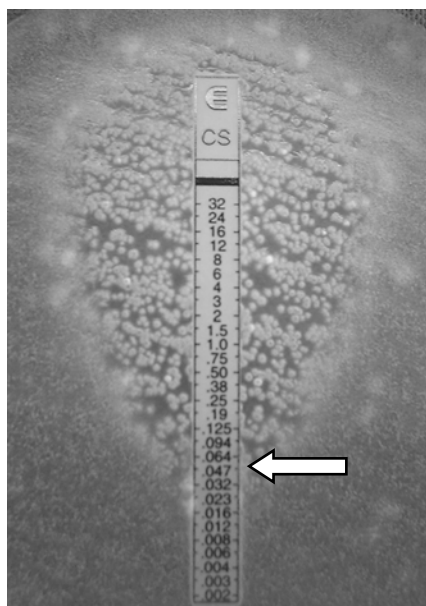


Fig. nr. 10-7. Aspectul zonei de inhibiție în cazul CS (CMI: 0,047 mg/l)

10.3. Testarea sensibilității la antifungice prin metoda difuzimetrică Kirby-Bauer (cu discuri)

Pentru testarea sensibilității la voriconazol și fluconazol a levurilor din genul *Candida* și *Cryptococcus* se poate folosi și metoda recomandată de CLSI (M44-A). În acest scop, se utilizează ca mediu de testare Agarul Mueller-Hinton aditivat cu 2% glucoză (ca agent de stimulare a creșterii) și 0,5 μg/ml albastru de metilen (pentru evidențierea optimă a conturului zonelor de inhibiție a creșterii), volumul repartizat în

placa Petri fiind de aproximativ 25 ml/placă cu $\varnothing$ 90 mm și 67-70 ml/placă cu $\varnothing$ 150 mm. Mediul se inoculează cu 200 μ l (400 μ l în cazul plăcilor cu $\varnothing$ 150 mm) suspensie levurică 0,5 McFarland care se distribuie uniform prin strieri în 3 direcții cu ajutorul unui tampon steril. Suprafața plăcilor astfel înșămânțată se usucă la fluxul de aer laminar al unei hote microbiologice după care se etalează în centrul acestora câte un disc de voriconazol (1 μ g) sau fluconazol (25 μ g).

Plăcile se incubează 20-24 ore la $36^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$, după care se măsoară diametrul zonei de inhibiție (fig. nr. 10-8). Se consideră că procentul de 80% inhibare a creșterii este aplicabil și în cazul acestor 2 derivați azolici, de aceea microcoloniile apărute la limita sau în interiorul zonei de inhibiție nu vor fi luate în considerare. Pentru interpretarea semnificației diametrului zonei de inhibiție a creșterii se utilizează recomandările prezentate în *tabelul 10-4* și *tabelul 10-5*.

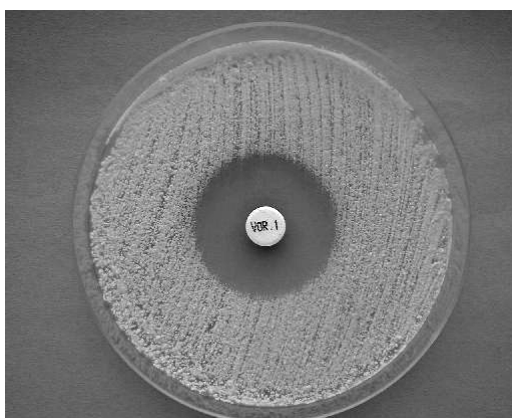


Fig. nr. 10-8. Aspectul zonei de inhibiție pentru voriconazol în cazul unei tulpini de *Candida albicans*

Tabelul 10-4

Recomandări de interpretare a susceptibilității la fluconazol

Sensibil	Sensibil dependent de doză	Rezistent
≥ 19 mm	15 – 18 mm	≤ 14 mm
$\leq 8\mu\text{g/ml}$	16 – 32 $\mu\text{g/ml}$	≥ 64 $\mu\text{g/ml}$

Tabelul 10-5

Recomandări de interpretare a susceptibilității la voriconazol

Sensibil	Sensibil dependent de doză	Rezistent
≥ 17 mm	14 – 16 mm	≤ 13 mm
$\leq 1\mu\text{g/ml}$	2 $\mu\text{g/ml}$	≥ 4 $\mu\text{g/ml}$

Bibliografie selectivă

1. Espinel-Ingroff A, Rezusta A (2002) - E-Test Method for Testing Susceptibilities of *Aspergillus* spp. to the New Triazoles Voriconazole and Posaconazole and to Established Antifungal Agents: Comparison with NCCLS Broth Microdilution Method; ***J Clin Microbiol***; 40(6):2101-2107.
2. Groll A. H, Kolve H (2004) - Antifungal Agents: *In Vitro* Susceptibility Testing, Pharmacodynamics, and Prospects for Combination Therapy, ***Eur J Clin Microbiol Infect***, 23(3):256-270.
3. John H R, Pfaller, M A, Walsh T J *et al.* (2001) - Antifungal Susceptibility Testing: Practical Aspects and Current Challenges; ***Clin Microbiol Rev***; 14(4): 643-658.
4. Pfaller M A , Boyken L, Messer S A *et al.* (2005) - Comparison of Results of Voriconazole Disk Diffusion Testing for *Candida* Species with Results from a Central Reference Laboratory in the ARTEMIS Global Antifungal Surveillance Program; ***J Clin Microbiol***; 43(10):5208-5213.
5. Pfaller M A, Messer S A, Boyken L *et al.* (2004) - Evaluation of the NCCLS M44-P Disk Diffusion Method for Determining Susceptibilities of 276 Clinical Isolates of *Cryptococcus neoformans* to Fluconazole; ***J Clin Microbiol***; 42(1):380-383.
6. Peman J, Martin-Mazuelos E, Rubio Calvo M C (2001) - Guia Practica de Identificacion y Diagnostico en Micologia Clinica; ***Rev Iberoam Micol***; Bilbao.

11

Tehnici de aeromicologie

Ingrid Cezara Apetrei

O gamă variată de metode analitice este astăzi disponibilă pentru a studia agenții biologici din spatele ușilor închise. Din moment ce nu există la ora actuală o metodă standardizată, universal acceptată, în plan național și internațional pentru determinarea / cuantificarea fungică de macro / microclimat, studierea comparativă a mai multor metode sau tehnici de recoltare și analiză va servi unei mai bune aprecieri ambientale, dezideratul final constând în scăderea încărcăturii microbiologice în ansamblu. În general, încărcătura fungică de microclimat ar trebui să aibă corespondență cu cea exterioară în privința genurilor / speciilor identificate și să fie mai redusă din punct de vedere cantitativ.

Fungii aeropurtați sunt factori antisanogeni binecunoscuți, producând alergeni, substanțe cu efect iritant și/sau toxic. Inhalarea sau contactul direct cu aceste substanțe pot induce la indivizii mai sensibili un răspuns alergic amplu cu episoade febrile, strănut, congestie conjunctivală, rinoree, dermatită etc. În funcție de particularitățile imunitare ale fiecărui caz în parte, răspunsul alergic poate fi imediat sau întârziat. Cercetările privind influența sporilor fungici din habitate asupra sănătății umane sau animale sunt în continuă desfășurare. Dacă se constată un nivel fungic mai ridicat în spațiile închise decât în exterior, atunci sigur se poate vorbi de existența unor factori care favorizează această schimbare a raportului de forțe. În plus, identificarea anumitor genuri / specii fungice, chiar în quantum scăzut, la nivel de microclimat, impune efectuarea unor evaluări ulterioare ce să conducă la interpretări statistice. Scopul recoltării probelor este acela de a aprecia întregul prin analiza subseturilor populaționale ale acestuia. La ora actuală există o multitudine de metode de testare ce pot fi utilizate pentru detecția fungilor aflați în aerosuspensie sau sedimentați și a celor care se dezvoltă pe diverse suporturi / substraturi inerte din diverse spații.

11.1. Caseta AIR-O-CELL™²

Principii procedurale

Caseta Air-O-Cell™ destinată colectării probelor de aer este un dispozitiv destinat analizării rapide a unei game variate de particule aerosolizate (aeroparticule), precum spori fungici, pollen, celule epiteliale, fibre, particule anorganice sau porțiuni din corpul unor insecte (fig. nr. 11-1).

Aerul pătrunde în casetă absorbit cu ajutorul unei pompe, iar particulele sunt impactate pe un substrat incolor și aderent, într-o cameră numită „capcană de spori”, ca apoi acesta să fie eliberat printr-un orificiu de evacuare.

Designul și construcția casetei sunt gândite de o așa manieră încât particulele aspirate să fie distribuite și depozitate uniform pe suprafața aderentă a lamei de sticlă din interior.

Beneficii

Acest instrument de recoltare este util pentru testările inițiale, mai ales atunci când creșterea fungică nu este vizibilă. Este o tehnică rapidă, simplă și ferită de contaminările ce pot surveni în timpul manoperelor clasice.

Dezavantaje

Fungii nu vor putea fi identificați cu ușurință la nivel de specie prin utilizarea acestei metode, deoarece ei nu sunt cultivabili. De exemplu, *Aspergillus spp.* și *Penicillium spp.* sunt de cele mai multe ori identificate împreună ca urmare a similitudinilor privind morfologia sporilor. Viabilitatea sporilor nu va putea fi de asemenea analizată. Calibrarea fluxului de aer nu va putea fi modificată decât la cerere, depinzând de posibilitățile firmei producătoare, iar caseta va fi utilizată doar cu minipompa furnizată la livrare (fig. nr. 11-2).



Fig. nr. 11-1 Caseta AIR-O-CELL



Fig. nr. 11-2. Mini pompă
ZEFON, adaptată
Casetei AIR-O-CELL

Prelevarea probelor

Caseta este destinată pentru un debit de aspirare de 15 l/minut. Dacă rata de absorbție scade, sporii se pot pierde iar repartizarea particulelor în ansamblu se va

² Air-O-Cell™ este marcă înregistrată a Zefon International. EMSL Analytical

realiza de o manieră neuniformă, în timp ce creșterea acestora poate duce la deprecierea materialului recoltat.

1. Se calibrează pompa la 15 l/minut;
2. Se îndepărtează și se reține banda adezivă ce obturează orificiile de intrare și ieșire ale casetei Air-O-Cell™;
3. Se atașează capacul la tubul adaptor (valabil la cerere/comandă).
4. Se deschide pompa de aspirare pentru o perioadă variabilă de timp;
5. După expirarea timpului de aspirare, se îndepărtează caseta Air-O-Cell™ de la conexiunea cu tubul de absorbție și se resigilează cu benzile adezive originale;
6. Proba astfel obținută se trimite spre analiză unui laborator.

Durata de recoltare

Timpul de expunere al casetei este dependent de densitatea estimată a particulelor în spațiul analizat. Este important să se țină seama că supraîncărcarea casetei va face imposibilă o identificare cu precizie a tipurilor de spori sau a altor tipuri de particule prezente. Timpii următori sunt recomandați funcție de spațiul vizat, pentru obținerea unei cât mai bune dispersii a sporilor:

- Spațiu închis curat sau spațiul ambiental: 10 minute;
- Spațiu închis cu activitate susținută și personal prezent: 5 minute;
- Spațiu în amenajare, industrial sau murdar, cu miros sesizabil de mușchi: un minut.

Recomandări privind controlul de calitate

- O interpretare judicioasă a rezultatelor se va realiza în urma comparării datelor obținute prin colectarea probelor de exterior cu cele de interior. Prelevarea și analiza probelor de exterior va oferi o bază de calcul / raportare privind amplificarea fungică din spațiile închise;
- Se vor preleva spre comparare și probe din zonele adiacente celor supuse controlului;
- Rata de aspirare trebuie respectată cu strictețe pentru acuratețea rezultatelor, aceasta va fi calibrată și reglată după fiecare recoltare (15 l/minut);
- Nu se utilizează casete expirate sau uzate.

11.2. Caseta MICRO-5

Principii procedurale

Micro-5 (fig. nr. 11-3), prin utilizarea unei camere de impactare de 360° a reprezentat o premieră în maniera de colectare a aeroalergenilor precum polenul, sporii fungici, praful și alte particule animate sau inerte.

Caseta este destinată să opereze la o viteză de impactare de 5 l/minut în vederea obținerii unei eficiențe maxime a colectării. Caseta trebuie stocată la 20°-27°C. Ca principiu de funcționare, caseta conține o lamă de sticlă acoperită cu o substanță adezivă pentru capturarea sporilor. Eficiența colectării la 5 l/minut este de 50% pentru o dimensiune a particulelor de 0,8 microni și un volum total de aspirare de 25 litri.



Fig. nr. 11-3
Caseta
Micro5

Dezavantaj

Inconvenientul utilizării acestui dispozitiv este acela că timpul de expunere este prea scurt și probele astfel obținute nu pot fi reprezentative.

Prelevarea probelor

1. Se îndepărtează capacul din partea inferioară a casetei Micro-5;
2. Dacă se utilizează o pompă de aspirație convențională se va conecta tubul de aspirare la orificiul inferior al casetei, descoperit după îndepărtarea capacului, nefiind necesari alți adaptor (fig. nr. 11-4);
3. Se conectează apoi celălalt capăt al tubului la pompa de aspirare precălibrată la o rată de 5 l/minut;
4. Se îndepărtează capacul superior conic al casetei;
5. Se pornește pompa și se prelevează proba de aer;
6. După recoltare, se repun capacele casetei Micro-5, atât cel superior cât și cel inferior.

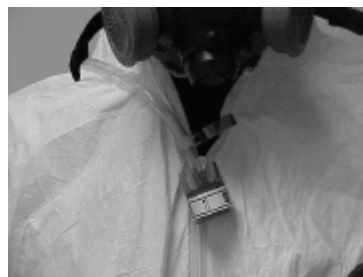


Fig. nr. 11-4.
Adaptarea casetei la
pompa de aspiratie

Durata de recoltare

- Spațiu închis, curat sau spațiu ambiental: 8-10 minute;
 - Spațiu închis cu activitate susținută și personal prezent: 5 minute;
 - Spațiu în amenajare, industrial sau murdar, cu miros sesizabil de mușcături: 1-3 minute;
 - Spațiile cavitare, cu adaptor special (guri de aerisire, hote): 1-2 minute;
- A nu se utiliza la temperaturi mai mici de 0°C !*

11.3. Caseta CYCLEX-D

Atât maniera de recoltare a probelor, cât și modul de utilizare a casetei Cyclex-D sunt asemănătoare cu cele întâlnite în cazul modelelor comerciale mai sus amintite. Diferențele sunt legate de viteza aerului pompat în casetă, în cazul de față 20 l/minut.

Durata de recoltare

- Spațiu închis curat sau spațiu ambiental: 10 minute;
- Spațiu închis cu activitate susținută și personal prezent: 5-8 minute;
- Spațiu în amenajare, industrial sau murdar cu miros, sesizabil de mușegai: 1-2 minute.

11.4. Caseta BIOCELL

Din punct de vedere procedural, pentru caseta BIOCELL (fig. nr. 11-5) se urmăresc instrucțiunile precizate la caseta Air-O-Cell.

Durata de recoltare

- Spațiu deschis (15 l/minut): 8-10 minute;
- Spațiu curat, fără depuneri de praf observabile (15 l/minut) : 5-8 minute ;
- Spațiu închis, cu activitate susținută și personal prezent (15 l/minut): 3-5 minute ;
- Spațiu în amenajare, industrial sau murdar, cu miros sesizabil de mușegai (15 l/minut): 1-3 minute;
- Spațiile cavitare, cu adaptor special (guri de aerisire, hote) (15 l/minut): 30 secunde – 1 minut.



Fig. nr. 11-5
Caseta
BioCELL

11.5. Caseta LARO 100³

Caseta LARO-100 (fig. nr. 11-6) poate absorbi în procent de 100% particulele fungice din aer, precum și orice alte tipuri de particule sau fibre, utilizând un filtru celulozic cu pori de 0,8 micrometri.

Durata de recoltare poate atinge 8 ore la un debit de aspirare de 0,5-1 l/minut (pentru a obține în final un volum total de 240-480 litri). Supraîncărcarea dispozitivului prin depășirea perioadei de recoltare va îngreuna mult analiza ulterioară. Probele obținute mai pot fi analizate și prin imersarea filtrului în apă, după recoltare, urmată de colectarea lichidului de spălare și însămânțarea acestuia pe medii de cultură.



Fig. nr. 11-6
Caseta
LARO 100

Principii procedurale

Caseta LARO-100 produce presiune negativă astfel încât este necesară utilizarea unui rotametrul calibrat deja la standardele indicate de producător, între pompă și dispozitivul de recoltare. Pompa va fi amplasată la capătul de descărcare al casetei, iar producătorul recomandă setarea acesteia la un volum de aspirare de 4-5 l/minut. Prelevarea probelor și stabilirea volumului de aer aspirat depind de condițiile de micro / macroclimat constatate. Gradul de vizibilitate în interiorul casetei este mare, astfel încât observarea nivelului de recoltare pe filtru se poate realiza cu ușurință.

Beneficii

Caseta, concepută ca un vortex, prezintă un spațiu îngust, rectangular, prevăzut cu un filtru de captură, fiind metoda ideală sub raport preț / calitate pentru analiza individuală a gradului de expunere la poluarea aeromicrobiologică. Probele astfel recoltate pot fi analizate imediat prin microscopie optică.

Durata de recoltare

- Interior/exterior, fără prezență fungică vizibilă (4 l/minut): 10 minute sau mai mult ;
- Monitorizare personală [8 ore] (1-2 l/minut): timpul necesar pentru a obține 300 – 480 l ;
- Zone comune de acces (4 l/minut): 3-6 minute;
- Suprafețe plane (4 l/minut): se eșantionează suprafețe de 10-100 cm².

³ *Environmental Monitoring Solutions* www.emssales.net • EMSL Analytical

11.6. Impactorul Zefon Z-A6⁴

Particulele aerosolizate, solide sau lichide, pot avea dimensiuni cuprinse între 0,1 și 100 microni diametru, putând fi individuale, neatașate sau agregate. Aceste caracteristici particulare produc dificultăți în obținerea unor probe de aer reprezentative care să poată fi utilizate în vederea aprecierii din punct de vedere microbiologic a calității aerului. Mai întâi, microorganismele vor fi recoltate din aer, pentru ca apoi, particulele viabile, capabile de multiplicare, să poată fi analizate, iar rezultatele interpretate statistic.

Principii procedurale

Zefon Z-A6 este un dispozitiv din aluminiu, format din două părți metalice susținute lateral de trei cleme (fig. nr. 11-7). Dispozitivul este prevăzut cu un tub lateral de circulație a aerului, un con superior cu o bază plată și 400 orificii. Când aerul este aspirat în aparat sub forma jeturilor multiple, particulele din aer sunt direcționate spre suprafața mediului de colectare din dispozitiv. Această metodă de recoltare implică impactarea unui volum de aer cunoscut pe suprafața mediului de cultură dintr-o placă Petri. Ulterior, plăcile sunt incubate astfel încât microorganismele impactate să se poată multiplica și genera colonii cuantificabile, atât din punct cantitativ, cât și calitativ.

Părțile componente livrate odată cu aparatul :

- Pompă de vacuum
- Rotametrul
- Tub flexibil



Fig. nr. 11-7
Dispozitiv Zefon Z-A6

Beneficii

- Cultivarea prelevatelor poate determina gradul de viabilitate fungică și permite ulterior identificarea la nivel de gen și specie.

Dezavantaje

- Dezvoltarea culturilor urmată de identificarea microorganismelor poate dura o perioadă îndelungată de timp (6-10, chiar 30 zile);
- Chiar dacă sunt prezente aeroparticule neviabile care nu se vor dezvolta pe mediile de cultură, acestea pot juca un rol semnificativ în instalarea unor reacții alergice sau iritative;
- Există posibilitatea ca unele microorganisme să nu poată fi identificate ca urmare a absenței corpurilor fructificanți sau să nu mai fi fost caracterizate anterior din punct de vedere al apartenenței taxonomice. De asemenea, particulele neviabile de origine fungică nu pot fi identificate.

Prelevarea probelor

1. În vederea evitării supracontaminării probelor se vor utiliza mănuși de protecție;

⁴ EMSL Analytical, Inc. www.emssales.net

2. Se conectează tubul flexibil la pompă și apoi la dispozitivul lateral al colectorului;
3. Înaintea începerii recoltării se pornește și se calibrează pompa de vacuum la 1 ACFM (28.3 l/minut) cu ajutorul rotametrelui;
4. După calibrare, se șterge dispozitivul pe întreaga sa suprafață cu alcool izopropilic, utilizând un tampon steril;
5. După pregătirea aparatului, se îndepărtează partea superioară a acestuia în vederea introducerii în interior, pe fundul plat, a unei plăci cu mediu solid ce va servi drept suprafață de recoltare. Placa a fost lăsată în prealabil acoperită pentru a ajunge la temperatura camerei. Se fixează componentele aparatului cu cele trei cleme metalice prin rășfrângerea acestora, acoperindu-se astfel imediat placa cu mediu prin atașarea părții superioare a dispozitivului;
6. Se pornește pompa de vacuum pentru 2-5 minute. Aerul este aspirat prin conul superior și dirijat prin orificiile de precizie, fiind apoi impactat pe suprafața de recoltare – placa Petri cu mediu solid. Exhaustarea se realizează prin împingerea aerului spre tubulatura de la baza aparatului unde va fi colectat de o cameră de vid atașată pompei de vacuum;
7. După recoltare, se va îndepărta dispozitivul de închidere și se va înlocui placa substrat, aceasta fiind acoperită, sigilată și trimisă laboratorului spre analiză în cel mai scurt timp;
8. Înainte de a se recolta o altă probă, dispozitivul de recoltare va trebui dezinfectat, iar manipularea se va face rapid și doar cu mănuși de protecție.

Mediile de cultivare și manipularea lor

În principiu, pot fi utilizate pentru recoltare cu acest impactor diverse medii de cultivare, turnate în prealabil în plăci Petri standard de 15 x 90 mm. Mediile de cultivare recomandate prelevării și analizei fungice sunt:

- PDA (Agar cu extract de cartof glucozat)
 - MEA (Agar cu extract de malț)
 - DG – 18 (Agar dicloran glicerol-18%)
-
- Plăcile cu medii agarizate vor fi păstrate la temperatura de refrigerare până în momentul utilizării, când vor fi lăsate (aproximativ 20 minute) să ajungă la temperatura mediului ambiant;
 - Capacul plăcii Petri se îndepărtează doar în momentul recoltării;
 - După recoltarea probelor, capacul plăcii se repune iar placa se va sigila cu Parafilm sau bandă adezivă și se va trimite laboratorului spre analiză în cel mult 24 de ore;
 - Dacă placile se transportă cu o geantă frigorifică acestea nu vor fi lăsate să vină în contact direct cu gheața pentru a se preveni degradarea mediului, testarea în acest caz fiind invalidată.

Recomandări

- Se vor purta mănuși de latex pe tot parcursul desfășurării manoperelor de recoltare;

- Se va folosi alcoolul izopropilic 70% pentru decontaminarea dispozitivului de recoltare după fiecare prelevare;
- Pe parcursul recoltării, capacul plăcii Petri se va păstra într-un sac steril de plastic;
- Pompa de vacuum trebuie să fie calibrată cu ajutorul unui rotametrul, cu atât mai des cu cât nu sunt întotdeauna întrunite condițiile optime de presiune și temperatură. O placă martor, neexpusă recoltării, va servi la fiecare prelevare drept control negativ. Probele prelevate din mediul ambiant vor fi comparate cu cele de microclimat. De asemenea, vor trebui recoltate probe și din zonele adiacente celei de interes. Niciodată nu se vor utiliza medii de cultivare expirate sau contaminate.

11.7. Dispozitivul CIP 10M

CIP 10 este un dispozitiv de dimensiuni reduse destinat colectării particulelor aerosolizate și a prafului din aer (fig. nr. 11-8). A fost schițat ca și concept în anii '80 la CHERCHAR (Centre d'Études et de Recherches de Charbonnage de France) actualmente INERIS (Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques) de către Paul Courbon. În prezent este produs și comercializat cu licență INERIS de către ARELCO A.R.C.

În 2003, a fost perfectat un nou subansamblu destinat recoltării microorganismelor, dispozitivul schimbându-și denumirea din CIP 10 în CIP 10 M.

Pentru recoltare, în mod normal este amplasat cât mai aproape de căile respiratorii, la nivelul toracelui, dar poate fi amplasat și în diverse zone ale spațiului de lucru considerate a fi puncte critice. Mai mult, scopul utilizării dispozitivului este acela de a recolta particulele ce reprezintă o reală amenințare la adresa sănătății umane (cantionabile la nivel alveolar, bronșic, sinusal), în conformitate cu CEN 481 și standardul ISO 7708. Particulele astfel recoltate pot fi cântărite grație interschimbabilității selectorilor, determinându-se totodată și greutatea probei recoltate, urmată când se impune și de analiza compoziției probei.

Dispozitivul are formă alungită, de bloc compact prevăzut cu un selector cilindric, o incintă rotativă în partea superioară - destinată colectării particulelor, și o bază plată de separare a circuitului electric din partea inferioară – motor, baterii și circuit electric. Forma ergonomică a dispozitivului facilitează atașarea acestuia cu un sistem de curele cât mai aproape de căile respiratorii sau purtarea acestuia într-un buzunar.



Fig. nr. 11-8
Dispozitivul CIP 10M

Beneficii

- Este de dimensiuni mici, compact, ușor, silențios;
- Arhitectura modulară permite aprecierea tuturor fracțiilor respiratorii conform standardelor, prin utilizarea la recoltare a selectorilor și a unui debit de aer prestabilit;
- Supapa omnidirecțională protejată de capac blochează pătrunderea accidentală pe parcursul aspirării, a unor particule de mari dimensiuni sau a picăturilor de apă;
- Aparatul nu este afectat de schimbarea poziției sau de mișcări bruște, având o construcție internă robustă și un exterior din plastic antistatic;
- Debitul este constant, iar filtrele sunt reutilizabile;
- Colectorul prezintă o serie de elemente de siguranță precum șuruburi speciale de închidere, întrerupător magnetic, led de funcționare este compus din materiale conforme standardelor europene privind utilizarea aparaturii de recoltare în medii ostile;
- Înălțime totală : 175 mm, diametru : 45 mm, greutate totală 300 g.

CIP 10 este echipat cu selectori de recoltare pentru aerosoli și praf, conform standardelor europene în vigoare NF EN 481, existând abateri doar în cazul particulelor foarte fine.

CIP 10 sau varianta CIP 10 M nu necesită pe parcursul timpului de funcționare un control extern sau ajustări suplimentare. Se remarcă printr-o remarcabilă stabilitate a fluxului de aer în corelație cu viteza de rotație a cupei menținută constantă de către un regulator de viteză.

Porii filtrului poliuretanice au câteva sute de microni diametru și cu toate acestea, rămân larg deschiși pe parcursul recoltării până în momentul când praful colectat atinge valoarea de 50 mg în cupa de rotație și câteva sute de miligrame la nivelul selectorului destinat fracțiilor respirabile alveolare.

1. Selectorul de particule destinat fracțiilor respirabile alveolar

Această selecție a particulelor respirabile alveolar se realizează cu aspirare în unghi de 45° prin două filtre poliuretane. Fracțiile aerosolizate obținute astfel, întrunesc condițiile impuse de standardele europene CEN AFNOR 481 și ISO 7708.

2. Selectorul de particule destinat fracțiilor respirabile toracic

CIP 10 T sau CIP 10 MT reprezintă două variante constructive ale dispozitivului destinat selecției particulelor ce pot pătrunde bronșic, printr-o serie de fante de dirijare a aerului în unghi de 90° către opt orificii dispuse radial în extremitatea superioară a tubului de inox. Întrucât particulele de dimensiuni mari exercită forțe gravitaționale sporite acestea nu sunt deviate, fiind capturate la baza selectorului (filtrului).

3. Selectorul de particule destinat fracțiilor inhalabile

CIP 10 I sau CIP 10 MI servesc selecției particulelor inhalabile prin direcționarea supapei de admisie și prezența orificiilor de selecție, tubul conic ghidându-le în continuare spre cupa rotativă de colectare.

4. Un nou selector destinat fracțiilor inhalabile

O nouă metodă de selectare a fracțiilor inhalabile a fost dezvoltată pentru a diminua depunerile nedorite pe suprafața interioară / superioară a peretelui capsulei de colectare și pentru o mai bună satisfacere a cerințelor standardului EN 481. Fluxul de aer va fi forțat să urmeze un traseu concentric convergent spre un punct de retur care să imprime apoi o direcționare verticală.

5. Selectorul de praf total – fracții maximale

Cu ajutorul dispozitivului CIP 10 se pot aprecia fracțiile maximale / praful total, în acest scop fiind indicată utilizarea unui cap alveolar cu păstrarea camerei de recoltare și a duzei aferente. Astfel, toate particulele suspendate în aer, inclusiv cele recent depuse vor fi aspirate de dispozitiv.

Prelevarea probelor

CIP 10 include o cupă de rotație echipată cu un filtru poliuretanic montat pe axul de rotație al motorului ce funcționează la turație mare într-o incintă, cu fluxul de intrare axial și cel de ieșire tangențial. Datorită rotației cupei, se generează un flux de aer asemănător cu efectul unui ventilator, asigurându-se astfel captura particulelor ce au scăpat de selecția filtrelor anterioare.

Motorul este acționat de acumulatori, iar viteza sa este setată de către un circuit de control electromagnetic. Debitul de aer este direct proporțional cu viteza de rotație. Aerul este aspirat prin supapa omnidirecțională, iar în interior acesta urmează o cale sau alta în funcție de dimensiunea particulelor ce urmează a fi studiate. Fracțiile nedorite din punct de vedere dimensional vor fi oprite de selectoarele superioare. Particulele care străbat selectorul rămân în suspensie în lichidul de eluare, iar aerul astfel filtrat se reîntoarce în atmosferă prin fantele laterale ale cupei de rotație.

Dispozitivul CIP 10M este dotat cu o cupă de rotație prevăzută în partea superioară cu lame orizontale care în mișcare imprimă aerului aspirat efectul de rotație centrifugală. Frecarea aerului de partea superioară a lichidului conținut de cupă, precum și de pereții laterali ai acesteia va genera o zonă de presiune scăzută ce facilitează direcționarea aerului dincolo de lichidul de recoltare. În acest mod, aerul astfel aspirat va urma o mișcare de rotație helicoidală pentru captarea ușoară a celulelor în lichidul colector, garantându-se astfel viabilitatea acestora. Înaintea începerii colectării cupa trebuie sterilizată prin autoclavare sau tratare cu solvenți speciali și alimentată cu 2-2,5 cm³ lichid de colectare - apă distilată sau soluție peptonată etc. Dacă soluția este adăugată în exces, aceasta va fi eliminată în momentul începerii recoltării.

Colectarea probelor în atmosferă uscată

Umiditatea relativă scăzută a mediului ambiant poate limita eficiența recoltării în sensul epuizării rapide a lichidului de recoltare, reducându-se astfel și perioada de recoltare.

Colectarea sporilor sau a miceliului

Luând în considerare natura hidrofobă a sporilor sau a miceliului, se poate anticipa o rată scăzută de capturare a acestora, de aceea este recomandată adăugarea în lichidul colector a unui agent surfactant tensioactiv pentru forțarea mixării bioaerosolilor cu lichidul camerei de compactare (de obicei Tween 80 în proporție de 0,05-0,1‰).

Transportul probelor

CIP 10 nu necesită precauții speciale privind transportul probelor. Este recomandată totuși, transportarea în poziție verticală a dispozitivului atunci când cupa de recoltare nu a fost îndepărtată.

Manipularea în laborator după colectare

După recoltare, aparatul CIP 10 (sau CIP 10M) este menținut în poziție verticală, i se îndepărtează capacul și se scoate cupa colectoare cu un extractor special. Se recoltează lichidul din cupă, cupa spălându-se de trei ori, lichidul de spălare păstrându-se de asemenea în vederea analizării prin cultură, identificare PCR, determinare ATP, epifluorescență.

Ajustarea și controlul debitului de aer

Reglarea debitului de aer între 7 și 10 l/minut, în funcție de necesități, reprezintă singura ajustare necesară pentru funcționarea dispozitivului CIP 10M și se realizează cu ajutorul unui potențiomtru plasat în interiorul carcasei. Operațiunile procedurale implică urmatorii pași: verificarea gradului de încărcare a bateriilor, îndepărtarea clemelor de fixare ale cupei de rotație și îndepărtarea acesteia pentru a avea acces la locația potențiometrului.

Se plasează apoi cupa de rotație ce conține filtrul poliuretanice deasupra motorului, se așează capacul, se pornește aparatul, potențiometrul ajustându-se pentru ca cititorul manometrului să indice 0 Pa și astfel să existe un echilibru între debitul de aer ce pătrunde în aparat și cel evacuat, fără pierderi de aer, urmărindu-se gradul de etanșeizare al aparatului. Cu ajutorul unui tahometru se va aprecia, după îndepărtarea capacului, viteza cupei de rotație fără ca aceasta să fie atinsă de dispozitiv pentru a se evita încetinirea acesteia (între 6800 - 7000 rpm în funcție de varianta constructivă). Doar în cazul în care se observă o deviație mai mare de 150 rpm de la standard se poate interveni cu ajustări suplimentare asupra dispozitivului. În caz contrar orice valoare observată sub cea amintită este considerată valoare nominală.

Determinarea greutății probei recoltate

Determinarea masei prafului colectat se realizează prin cântărirea cupei de rotație ce conține filtrul poliuretanic, atât înainte cât și după colectarea probelor, utilizându-se o balanță electronică de laborator cu o deviație standard admisă de maxim 0,1 mg. Filtrul poliuretanic este sensibil la umiditatea aerului, de aceea formula finală de calcul va ține cont de schimbările majore privind umiditatea relativă a zonei de microclimat unde are loc recoltarea.

INRS recomandă următoarea succesiune procedurală:

- Pregătirea cupei se va realiza cu atenție: va fi spălată cu o soluție decontaminantă fierbinte și clătită de mai multe ori, de preferat numai cu apă distilată sterilă;
- Va fi lăsată 12 ore să se usuce la temperatura de 50°C - 60°C;
- Filtrul se va pregăti separat și se va păstra într-un loc uscat ferit de praf sau alte impurități;
- Se vor purta mănuși de protecție pe toată durata desfășurării manoperelelor de recoltare.

Procesarea probelor după recoltare

După recoltare, cupele sunt recondiționate de maniera amintită anterior, fiind totuși recomandată plasarea lor, după înlăturarea capacului protector, într-un termostat la 50 – 60°C timp de 4 ore, dacă prelevarea a avut loc într-un spațiu cu umiditate relativă prea ridicată. După condiționare, se determină masa probei colectate cu formula:

$$M = M_m - M_r$$

unde:

M_m - reprezintă diferența de greutate a cupelor înainte și după recoltare;

M_r - reprezintă cea mai mare valoare de diferență înregistrată între cele două cântăriri, înainte și după recoltarea probelor.

Determinarea concentrației particulelor

Concentrația se calculează în mg/m³ fiind determinată prin formula :

$$C \left(\frac{mg}{m^3} \right) = \frac{M}{V}$$

unde :

M - reprezintă masa probei colectate, după specificațiile amintite (în mg);

V - reprezintă volumul de aer filtrat (în m³).

Manipularea filtrului poliuretanic al dispozitivul CIP 10

Filtrul poliuretanic este deosebit de rezistent la acțiunea agenților chimici și stabil din punct de vedere structural. Poate fi spălat prin metode uzuale, incinerat sau mineralizat funcție de tipul analizei ce urmează a fi realizată.

Următoarele operațiuni de spălare sunt permise asupra filtrului poliuretanic, în vederea recuperării prafului recoltat:

- Se lasă filtrul într-o soluție caldă de spălare, 15 minute;
- Se extrage din soluție cu mâna protejată de mănuși;
- Se clătește cu apă distilată de mai multe ori până când soluția de spălare rămâne clară;
- Se recuperează și praful depus la baza cupei de recoltare tot prin spălare și se adaugă lichidului deja obținut prin spălarea filtrului;
- Urmează filtrarea și centrifugarea în vederea recuperării depozitului de analizat, pierderile ce apar pe parcursul desfășurării manoperelor fiind neglijabile

11.8. Aprecierea încărcăturii fungice aeropurtate prin tehnica sedimentării Koch

Se utilizează plăci Petri sterilizate, cu diametrul de 90 mm, în care se repartizează câte 15-20 ml mediu agarizat special destinat cultivării fungilor (Sabouraud cloramfenicol agar, PDA, Agar cu extract de malt). Se oprește instalația de climatizare și în absența personalului de lucru se expun plăcile cu mediu, fără capac, în anumite puncte prestabilite, un interval de timp variabil între 5 și 15 minute.

În fiecare punct de recoltare se expun câte 2 plăci din fiecare mediu. Pe capacul fiecărei plăci se inscripționează tipul de mediu, data și ora recoltării, poziția plăcii, timpul de expunere. După expirarea timpului de expunere stabilit, plăcile se acoperă cu capacele proprii, se învelesc în hârtie și se transportă în caserole de plastic la laborator, unde se incubează, la temperatura de 25°C. Obligatoriu, în paralel se incubează câte o placă martor conținând aceleași medii, fără a fi deschise în prealabil.

După 5 zile se monitorizează eventuala dezvoltare a coloniilor și se calculează nr. UFC /m³ aer.

$$\frac{Nr.UFC}{m^3 aer} = \frac{N \times 10\ 000}{S \times K}$$

N - media numărului de colonii dezvoltate pe suprafața mediului din cele 2 plăci expuse;

S - suprafața plăcii (cm²) – (3,14 x R²);

K - coeficientul timpului de expunere: pentru 5 minute este egal cu 1, pentru 10 minute este egal cu 2, iar pentru 15 minute este egal cu 3.

11.9. Tehnici de recoltare/examinare directă a probelor de pe suprafețe

Examinarea directă permite detectarea rapidă a prezenței sporilor fungici într-un spațiu examinat precum și genurile incriminate într-o astfel de contaminare, contribuind astfel alături de alte metode de analiză la acuratețea rezultatelor obținute.

11.9.1. Banda adezivă *BIO TAPE™* (Zefon International)

Acest tip de bandă reprezintă varianta standardizată de recoltare a specimenelor de pe suprafețe. Probele se mai pot recolta și prin utilizarea unei benzi adezive tip scotch. În vederea examinării microscopice a particulelor colectate, banda adezivă trebuie să aibă proprietăți optice superioare și să suporte toate tipurile de coloranți ce pot fi utilizați în practica de laborator funcție de speciile suspectate.

Prelevarea probelor

1. Se pregătește lama prin exteriorizarea benzii adezive duble, evitându-se atingerea părții ce servește pentru colectarea probei (fig. nr. 11-9);

Mijlocul zonei adezive,
de recoltare a probei



Se îndepărtează celofanul
protector

Se înscriu elementele de
identificare a probei

Fig. nr. 11-9 Componentele lamei Bio-Tape

2. Se aplică zona centrală a benzilor pe suprafața de recoltare, prin apăsare moderată (fig. nr. 11-10);
3. Se desprind ușor benzile și se reatașează una de alta sau se lipesc de suprafața interioară a unui sac de plastic steril (ziplock), având grijă ca acesta să nu prezinte cute;
4. În fiecare ambalaj va fi transportată o singură probă.

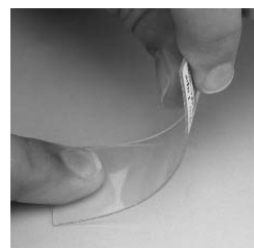


Fig. nr. 11-10.
Recoltarea probelor

Recomandări

- Benzile se vor utiliza doar în scopul pentru care au fost concepute și nu la temperaturi mai mici de 5°C;

- Nu se vor trimite către laborator, benzi atașate unei lame sau acoperite cu o lamelă, ci doar în ambalajul special destinat transportului, furnizat odată cu pachetul standard.

11.9.2. Recoltarea fragmentelor inerte

Aceste probe sunt reprezentate de porțiuni din diverse materiale ce ar putea fi contaminate, constituind astfel substrat al dezvoltării fungice (secțiuni de tapet, covoare, mochete, filtre de aer, fragmente de mobilier, de instalație sanitară). Dacă specimenul are dimensiuni mari, se vor alege fragmente de recoltat reprezentative, evitându-se contaminarea prin manopere suplimentare.

Scopul acestui tip de recoltare este acela de a obține porțiuni din materialele de analizat, suficient de mici pentru a putea fi ușor transportate și manipulate, dar reprezentative sub aspectul încărcăturii fungice. Analiza probelor se va realiza prin cultivarea pe medii speciale sau prin microscopie directă.

11.9.3. Recoltarea cu ajutorul tamponului tip exsudat

Principiul de lucru este foarte asemănător cu cel al benzii adezive. Tija cu tamponul steril este găzduită de o eprubetă / un tub cu soluție tampon pH 7,0 sau soluție de eluare a sporilor (ser fiziologic cu 0,05% Tween 80). Probele astfel obținute pot fi analizate prin cultivare sau prin microscopie directă.

Beneficii

- Examinarea directă este necostisitoare și poate fi rapid efectuată.
- Reprezintă un test preliminar de valoare și poate indica sursele generatoare de spori aeropurtați.

Dezavantaje

- Zona de recoltare fiind redusă ca dimensiuni, nu va oferi o imagine de ansamblu asupra gradului de contaminare fungică a unui habitat, de aceea se recomandă recoltarea din mai multe puncte.
- Problemele de sănătate cauzate de multiplicarea fungică din habitate sunt corelate cu inhalarea unui număr substanțial de spori aeropurtați, uneori perioade îndelungate de timp. Prezența microorganismelor sub formă de depozite pe diverse suprafețe nu poate constitui un indicator direct al aeropoluării.
- Prin intermediul acestor tehnici se pot detecta atât sporii viabili, cât și cei neviabili, fără a se putea face o distincție între cele două tipuri. Dacă testările interesează în mod special cunoașterea viabilității recoltatului este indicată combinarea tehnicilor directe cu cele de cultivare.
- De cele mai multe ori, fungii nu pot fi identificați la nivel de specie și nici chiar la nivel de gen prin intermediul tehnicilor directe, în absența corpurilor de fructificare.

Bibliografie selectivă

1. Barry S L, Wegman D H (2000) - ***Occupational Health: Recognizing & Preventing Work - Related Disease & Injury***, 4th edition; Lippincott Williams & Wilkins.
2. EMSL Analytical (2003) - ***LARO-100 Sampling Guide***.
3. Goddish Thad (2002) - ***Indoor Environment Notebook: Everything You Wanted to Know About Indoor Air Pollution and More***; Ball State University, Department of Natural Resources and Environmental Management; LARO-100 Product Information.
4. Grinshpun Sergey A (2002) - ***Collection and Enumeration of Airborne Spores Using Aerosol Impactors with Low Jet-To-Plate Distance, Project 3, Micro5 Microcell (5 lpm)***; University of Cincinnati Environmental Health Foundation.
5. * * * - Minnesota Department of Health (2003) - Environmental Health in Minnesota: Testing for Mold; Sampling methodology for fungal bioaerosols and amplifiers in cases of suspected indoor mold proliferation.
6. * * * - Qualité de l'air. Air des lieux de travail - Détermination du dépôt alvéolaire de la pollution particulaire. Méthode de la coupelle rotative. (Air-Quality: Workplace Air - Gravimetric determination of particulate pollution deposits. Rotating disk method); NF X43-262.
7. * * * - Atmosphères sur les lieux de travail - Définition des fractions de taille pour le mesurage des particules en suspension dans l'air. (Workplace Atmospheres - Size fraction definitions for measurement of airborne particles.); NF EN 481 X43-276.
8. * * * - Air des lieux de travail - Détermination par rayons X de la concentration de dépôt alvéolaire de silice cristalline- Échantillonnage par dispositif à coupelle rotative. (Workplace Air - X-Rays Determination of the conventional alveolate fraction of crystalline silica - Sampling using a rotating cup device); NF X43-295.
9. * * * - Qualité de l'air - Définitions des fractions de taille des particules pour l'échantillonnage lié aux problèmes de santé. (Air Quality - Particle size fraction definitions for health related sampling); NF ISO 7708.
10. * * * - Air des lieux de travail - Dosage par spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier de la silice cristalline - Échantillonnage par dispositif à coupelle tournante ou sur membrane filtrante. (Workplace Air - Fourier Transform Infrared Spectrometric determination of crystalline silica - Sampling using a rotating cup device or filtering membrane); XP X43-243.

12

Norme generale de biosecuritate în laboratoarele de micologie medicală

Luminița-Iuliana Malic

12.1. Clasificarea fungilor în funcție de clasele de risc biologic

În funcție de gradul de risc biologic pe care microorganismele îl prezintă pentru om, acestea se clasifică în trei clase:

- Clasa I – cuprinde acele microorganisme care rareori pot manifesta risc de îmbolnavire la om și animale;
- Clasa II – cuprinde acele microorganisme care pot cauza apariția de afecțiuni la om și animale și pot reprezenta un pericol pentru personalul din laborator – risc individual redus, risc colectiv neglijabil. Profilaxia și tratamentul folosite în afecțiunile cauzate de aceste microorganisme sunt eficace. Cuprinde majoritatea fungilor de interes clinic (*tabelul 12-1*);
- Clasa III – cuprinde acele microorganisme care pot cauza afecțiuni la om și care reprezintă un real pericol pentru personalul din laboratoarele de micologie – risc individual mare, risc colectiv semnificativ. De asemenea, există riscul diseminării în colectivitate. Tratamentul și profilaxia sunt eficace;
- Clasa IV – cuprinde acele microorganisme care pot cauza afecțiuni grave la om și care reprezintă un pericol pentru personalul din laborator – risc individual crescut, risc colectiv crescut. De asemenea, există riscul de contaminare a colectivităților, iar de cele mai multe ori, nu există un tratament eficace al afecțiunilor cauzate de aceste microorganisme

Tabel 12-1

Clasificarea principalelor specii de fungi în funcție de grupa de risc biologic și capacitatea alergizantă

Specia	Clasa de risc biologic	Capacitatea alergizantă
<i>Aspergillus fumigatus</i>	2	X
<i>Blastomyces dermatitidis</i>	3	
<i>Candida albicans</i>	2	X
<i>Cladophialophora bantiana</i>	3	
<i>Candida tropicalis</i>	2	
<i>Coccidioides immitis</i>	3	X
<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i>	2	X
<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>gattii</i>	2	X
<i>Emmonsia parva</i> var. <i>parva</i>	2	
<i>Emmonsia parva</i> var. <i>crescens</i>	2	
<i>Epydermophyton floccosum</i>	2	X
<i>Fonsecaea compacta</i>	2	
<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	2	
<i>Histoplasma capsulatum</i> var. <i>capsulatum</i>	3	
<i>Histoplasma capsulatum</i> var. <i>duboisii</i>	3	
<i>Madurella grisea</i>	2	
<i>Madurella mycetomatis</i>	2	
<i>Microsporum</i> spp.	2	X
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	3	
<i>Penicillium marneffei</i>	2	X
<i>Scedosporium apiospermum</i>	2	
<i>Scedosporium prolificans</i>	2	
<i>Sporothrix schenckii</i>	2	
<i>Trichophyton rubrum</i>	2	

12.2. Norme generale de biosecuritate

- Accesul în laborator este permis doar personalului autorizat;
- Personalul din laborator trebuie să participe la implementarea și respectarea normelor de biosecuritate;
- Pardoseala laboratorului va fi confecționată din materiale rezistente acoperite cu rășini epoxidice sau linoleu antistatic, netedă, ușor lavabilă;
- Pe ușile de acces în Laboratorul de Micologie Medicală se va aplica semnul internațional *Pericol biologic (Biohazard)* care, în cazul acestor laboratoare corespunde nivelului 2 de securitate microbiologică (fig. nr. 12-1). Cu același semn se vor marca frigiderele și congelatoarele folosite pentru păstrarea microorganismelor cu risc biologic 2;



Fig. nr. 12–1. Semnul convențional pentru risc biologic (Biohazard)

- Ușile și ferestrele laboratorului trebuie să fie în permanență închise pentru asigurarea izolării spațiului;
- Laboratorul va fi separat de zona de circulație a personalului cu ajutorul unui șas;
- Laboratorul trebuie să fie în permanență ventilat forțat. Aportul de aer va fi de cca. 60 m³ *per* persoană *per* oră;
- Toate suprafețele de lucru se vor spăla și dezinfecta zilnic. Toate reziduurile vor fi incinerate în incinte speciale, autorizate, iar depozitarea și transportul acestora se va face în cutii închise ermetic, rezistente și impermeabile, în funcție de fiecare tip de reziduu, marcate de asemenea cu semnul de risc biologic;
- Laboratorul trebuie să beneficieze de un lavoar pentru spălarea mâinilor, care să funcționeze prin acționarea cu ajutorul cotului sau cu o pedală;
- Transportul probelor de la și între laboratoare se va realiza cu ajutorul lăzilor izoterme, ermetice, rigide, rezistente la lovituri, ușor de curățat și dezinfectat;
- Personalul din laborator va evita contactul direct cu materialele potențial patogene. În acest scop se va folosi echipament de protecție adecvat în momentul manevrării probelor sau a culturilor fungice. Echipamentul de protecție va fi îndepărtat în momentul părăsirii zonei de lucru. Mâinile se vor spăla în mod repetat cu săpun lichid antiseptic, după fiecare îndepărtare a mănușilor de protecție;
- Este interzisă pipetarea materialului patologic cu gura;
- În zona de lucru nu se vor depozita cărți sau hârtii, deoarece sunt dificil de sterilizat;
- În laboratoarele de micologie medicală sunt strict interzise:
 - Consumarea de alimente sau băuturi de orice fel;
 - Depozitarea de alimente și băuturi;
 - Folosirea lentilelor de contact;

- Aplicarea de produse cosmetice;
 - Plăgile se vor acoperi cu bandaj înainte de aplicarea echipamentului de protecție.

12.2.1. Tehnici de laborator folosite în zona de lucru

- Toate culturile fungice (în special la speciile cu miceliu aerian sporulat) și prelevatele clinice se vor manevra de preferat în interiorul unei hote de protecție biologică clasă II, pentru evitarea contaminării personalului și incintei laboratorului;
- Plăcile ce conțin mediu de cultivare pentru fungi se vor închide și se vor așeza cu capacul în jos pentru evitarea deschiderii accidentale și contaminării;
- Incubarea plăcilor se va face în termostate cu umidificatoare;
- În cazul utilizării mediilor de cultivare repartizate în tuburi, acestea trebuie să beneficieze de dopuri fixe, sigure;
- Deschiderea plăcilor și tuburilor ce conțin medii de cultivare se va face doar sub protecția unei hote microbiologice de clasă II sau în vecinătatea flăcării unui bec de gaz;
- În cazul fungilor dimorfici se impune analizarea acestora sub protecția unei hote de securitate biologică grad III. Plăcile cu astfel de culturi se etanșează obligatoriu cu *Parafilm*.

12.3. Metode de protecție primară

Aceste metode se referă la echipamentele de protecție a personalului și la aparatura utilizată în vederea realizării protecției microbiologice.

12.3.1. Hote de protecție biologică

Hotele sau cabinetele de protecție sunt incinte în care fluxul de aer este filtrat și dirijat astfel încât să se obțină diferite grade de protecție biologică. Există trei tipuri de astfel de incinte specializate, în funcție de domeniul în care sunt folosite: hote fizico – chimice, hote cu flux laminar vertical sau orizontal, hote de protecție biologică clasa I, clasa II, clasa III și cabinete destinate aplicațiilor PCR.

Hotele fizico – chimice sunt folosite pentru reținerea fumului și vaporilor chimici ce apar în urma manipulării diferiților reactivi, dar nu realizează protecția biologică.

Hotele cu flux laminar de aer sunt dotate cu filtre principale HEPA (*High Efficiency Particulate Air*) aflate în spatele zonei de lucru, aerul fiind întotdeauna filtrat înainte de a trece peste probe. Fluxul de aer poate fi vertical sau orizontal. Aceste hote oferă protecție doar pentru materialul care se află în interior, operatorul nefiind protejat microbiologic. Aceste hote sunt recomandate pentru protecția în momentul manevrării mediilor de cultivare și a reactivilor sterilizați.

Hotele de protecție biologică sunt incinte puternic ventilate, destinate limitării riscului de contaminare a personalului din laborator ce lucrează cu agenți patogeni. Aceste echipamente sunt destinate limitării zonei de lucru și evitării diseminării

particulelor patogene pe calea aerului spre operator și în spațiul laboratorului. Hotele de protecție biologică dispun de două sisteme care împiedică diseminarea agenților patogeni: bariera de aer și filtrele. Bariera de aer se realizează prin recircularea aerului din incinta hotei într-o singură direcție, cu viteză constantă, fără turbulențe și poartă numele de flux de aer laminar. Filtrele au ca scop reținerea particulelor existente în fluxul de aer. Cele mai uzitate sunt filtrele tip HEPA care rețin particulele cu diametrul de până la 0,3 microni, în proporție de 99,9%.

Există trei tipuri de hote de protecție biologică: clasa I, clasa II și clasa III.

- Hotele de protecție biologică clasă I

Sunt incinte închise, cu deschidere frontală, ce permit accesul brațelor operatorului. Aerul pătrunde frontal în spațiul de lucru și este evacuat în exterior după trecerea prin filtrele HEPA. Viteza fluxului de aer este de cca. 4,4 m/s. Acest tip de hotă este recomandat pentru manipularea microorganismelor de clasă 1, 2 și 3. Dezavantajul acestui tip de hotă de protecție biologică este acela că nu asigură protecția materialului biologic, existând riscul contaminării acestuia. Din acest motiv, hotele de protecție biologică clasă I nu se recomandă a fi folosite în laboratoarele de micologie medicală.

- Hotele de protecție biologică clasă II

Se diferențiază de cele prezentate anterior prin gradul ridicat de protecție oferit utilizatorului, mediului ambiental, dar mai ales materialului biologic analizat, față de posibilității agenți contaminanți.

Spațiul de lucru este ventilat utilizându-se aer filtrat prin filtrele HEPA. De asemenea, evacuarea aerului se realizează după o filtrare ulterioară prin alte filtre HEPA. Acest tip de hotă este recomandat pentru manevrarea microorganismelor din clasa de risc biologic tip 1, 2 și 3, în care sunt incluși și fungii.

În funcție de caracteristicile de fabricație, fluxul de aer și sistemul de evacuare, hotele de protecție biologică clasă II sunt clasificate în:

- Hote de protecție biologică clasa II-A: evacuează aerul filtrat în incinta laboratorului sau în afara acestuia. Aerul poate fi recirculat în proporție de 70%;
- Hote de protecție biologică clasa II-B1: evacuează aerul filtrat în afara laboratorului. Recircularea aerului se realizează în proporție de 30%;
- Hote de protecție biologică clasa II-B2: evacuează aerul filtrat în afara laboratorului fără ca acesta să fie recirculat;
- Hote de protecție biologică clasa II-B3: evacuează aerul filtrat în afara laboratorului după o recirculare în proporție de 70%.

12.4. Substanțe decontaminante folosite în laboratoarele de micologie medicală

Capacitatea antifungică (fungicidă și fungistatică) a substanțelor decontaminante este diferită în funcție de structura chimică a acestora și de clasa de fungi asupra căreia dorim să acționăm. Astfel, gama este destul de limitată, existând doar câteva opțiuni utilizabile eficient (*tabelul 12-2*).

Tabel 12 – 2

Capacitatea antifungică a substanțelor decontaminante

Substanța dezinfectantă	Exemple	Nivelul de acțiune	Mod de acțiune	Concentrații recomandate
Fenoli / Bi-fenoli	Triclosan, Hexaclorofen	+++	Acționează asupra membranei citoplasmatică	1 – 3%
Hipocloriți	Hipoclorit de Na, K, Ca	+	Efect oxidant	0,5 – 1% Cl activ
Alcooli	Alcool etilic Alcool izopropilic	-	Nu manifestă efect fungicid	60- 90%
Aldehyde	Glutaraldehida	+++	Acționează asupra peretelui fungic interacționând cu chitina	2% Stocarea la pH acid, potențare la pH alcalin
	Formaldehidă	+++	Efect fungicid mai redus decât al glutaraldehidei	4 %
Biguanidine	Clorhexidina gluconat	++	Acțiune levuricidă prin coagularea constituenților citoplasmatici	0,2 – 0,5%
Iodofori	Povidonă iod	+++	Acțiune asupra nucleotidelor, acizilor grași și a unelor proteine	1 – 10%
Compuși cuaternari de amoniu	Clorură de benzalkoniu Clorură de cetilpiridiniu	+	Acțiune prin dezorganizarea membranei plasmatice	0,5%

- Zilnic, după terminarea programului, se va efectua curățirea suprafețelor cu hipocloriți, în concentrație de 0,5% Cl activ.
- Suprafețele de lucru se vor șterge cu detergent lichid și prosoape de hârtie pentru îndepărtarea substanțelor organice cu potențial contaminant, după care pot fi aplicați compuși pe bază de iod. Datorită colorației imprimate de iod suprafețelor tratate, se recomandă utilizarea derivaților iodoforici, de exemplu povidonă-iod (polivinilpirolidonă-iod) în concentrație de 2%, datorită efectului antifungic imediat, și clătirea cu apă după câteva minute pentru eliminarea colorației reziduale.

- În cazul contaminării accidentale cu suspensie fungică, suprafața respectivă se va acoperi cu hârtie de filtru pentru evitarea extinderii ei, se va pulveriza hipoclorit cu o concentrație superioară față de concentrația uzuală. Timpul de acțiune va fi de minim 20 minute. De asemenea, pot fi folosiți și compuși pe bază iod. Toate materialele care intră în contact cu suprafața contaminată vor fi aruncate într-o cutie specială pentru materiale patogene și se trimit spre incinerare.

12.5. Măsurile de protecție împotriva substanțelor chimice

- Hipocloritul de sodiu - produsele dezinfectante care conțin în compoziția lor hipoclorit de sodiu sunt agenți oxidanți puternici care eliberează clor gazos; eliberarea acestuia este accelerată în mediul acid.
- Compușii cuaternari de amoniu - sunt substanțe încorporate în multiple produse dezinfectante, datorită gradului redus de pericolozitate. Se va ține însă seama de capacitatea iritativă pentru tegument și de cea alergizantă;
- Formaldehida și glutaraldehida - sunt produse cu un înalt grad de toxicitate; formaldehida poate fi stocată în laborator în forma gazoasă, lichidă (soluție de formalină) sau solidă (paraformaldehida). Aceste substanțe pot produce, în urma contactului direct, iritații oculare și ale tractului respirator superior, iar contactul prelungit duce la apariția dermatitelor, alergiilor cutanate și respiratorii. Ambele substanțe posedă efect cancerigen. Din acest motiv, manipularea acestora se va face doar cu mască și ochelari de protecție;
- Coloranții - sunt substanțe folosite pentru diagnostic, în cantități foarte mici. Cu toate acestea, se va evita contactul direct cu aceștia, în special cu produșii derivați din acridină cunoscuți ca substanțe cancerigene.

Bibliografie selectivă

1. Block S S (1991) - ***Desinfection, sterilization and preservation***; Pennsylvania; Lea & Febiger.
2. Borell N, Mesquida X, Alomar P (2001) - Normas de seguridad; *In* Peman J, Martin-Mazuelos E, Rubio Calvo M C (eds) - ***Guia Practica de Identification y Diagnostico en Micologia Clinica***; Rev Iberoam Micol, Bilbao.
3. Collins C H (1993) - Laboratory-acquired; ***History, incidence, causes and prevention***; Oxford, Butterworth - Heinemann.
4. Hoog G S de, Guarro J, Gené J, Figueras M J (2000) - ***Atlas of clinical fungi***; 2nd edition; Centraalbureau voor Schimmelcultures / Universitat Rovira i Virgili.
5. Loza E, Alomar P, Bernal A, *et al.* (1999) - ***Seguridad en el Laboratorio de Microbiologia clínica***; Procedimientos en Microbiologia clínica; Recomendaciones de la Sociedad Espanola de Enfermedades infecciosa y Microbiologia Clinica; Madrid, SEIMC.
6. McDonnell G, Russell A D (1999) - Antiseptics and disinfectants: activity, action and resistance; ***Clin Microbiol Rev***; 12:147-179.
7. Sewell D L (1995) - Laboratory-associated infections and biosafety; ***Clin Microbiol Rev***; 8:389-405.
8. Warnock D W (2000) - Mycotic agents of human disease; *In* Fleming D O, Hunt D L (eds.) ***Biological safety principles and practices***; American Society for Microbiology Press; Washington D C.

Anexă

Fig. nr. 2-1.
Zygomicoză cerebrală experimentală; examen microscopic direct; frotiu prin amprentă, colorație cu calcofluor, x 200.

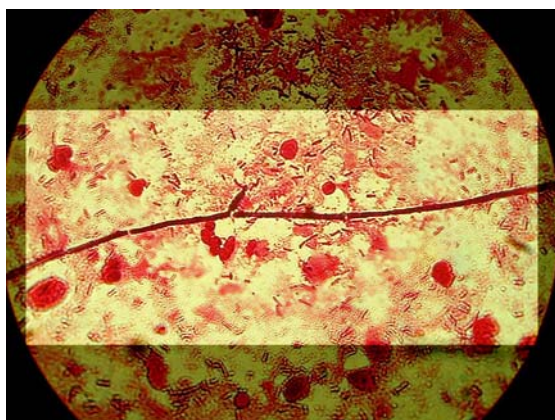


Fig. nr. 2-2.
Frotiu secreție vaginală; col. Gram, x 400.

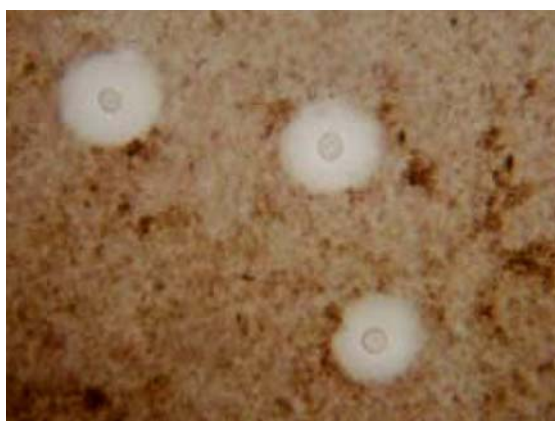


Fig. nr. 2-3.
Frotiu sediment LCR; col. tuș de India, x 400.

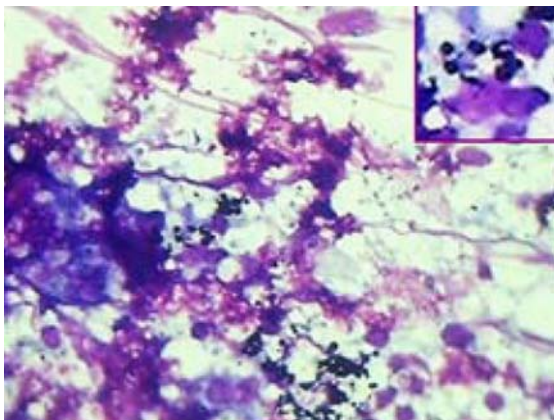


Fig. nr. 2-4.
Frotiu măduvă osoasă
hematogenă;
Col. May-Grunwald-Giemsa,
x 400.

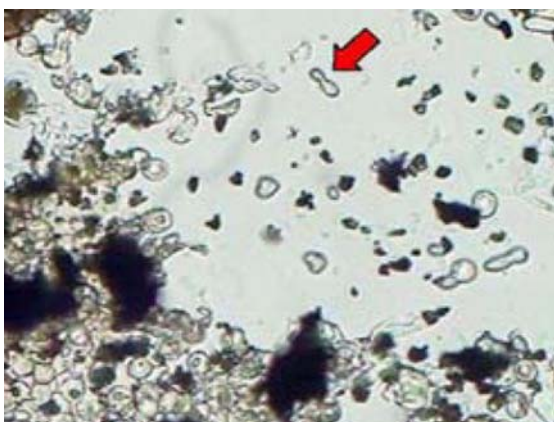


Fig. nr. 2-5.
Frotiu hemocultură;
necolorat, x 900.

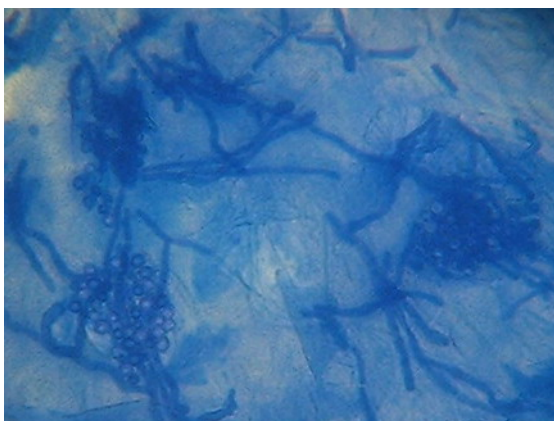


Fig. nr. 2-6.
Preparat extemporanu cu
bandă adezivă; lactofenol cu
albastru de metilen, x 900.

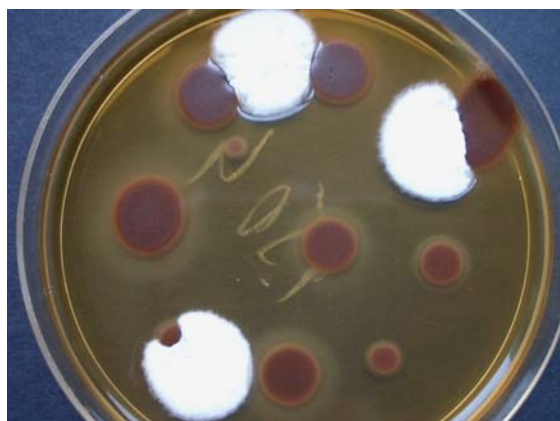


Fig. nr. 4-1.
Însămânțarea hemoculturii în picătură.



Fig. nr. 5-1.
Lutarea preparatelor extemporanee.

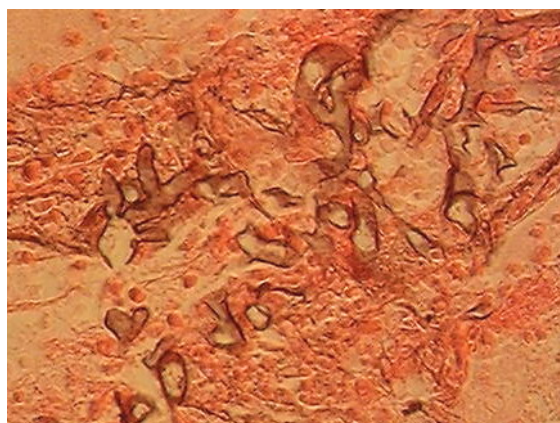


Fig. nr. 6-1.
Zygomicoză pulmonară;
Col. Fontana-Mason, x 400.

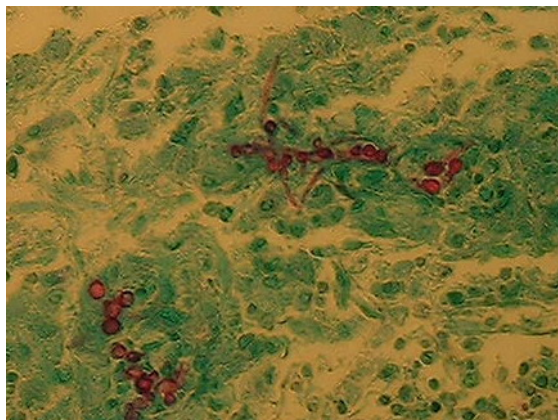


Fig. nr. 6-2.
Candidoză renală;
col. PAS, 400.



Fig. nr. 8-1.
Testul de hidroliză a ureei – negativ
(stânga), pozitiv (dreapta)

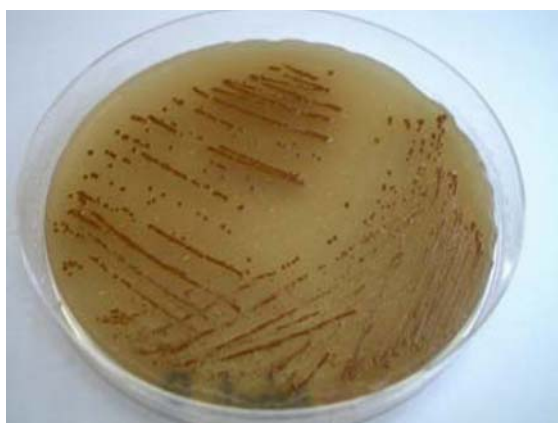


Fig. nr. 8-2.
Colonii de *C. neoformans* pe Agar cu
extract din semințe de Niger

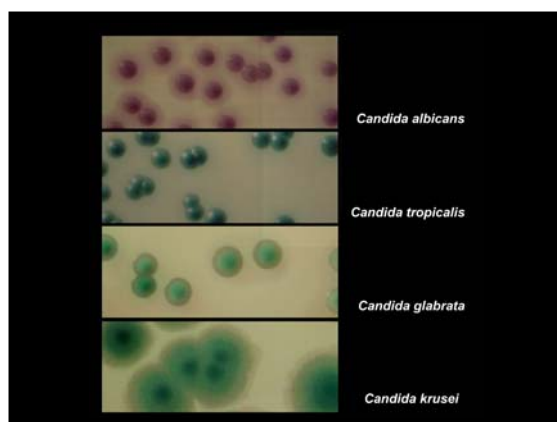


Fig. nr. 8-3.
Aspectul coloniilor aparținând speciilor levurice identificabile prin cultivare pe CandiSelectTM 4.

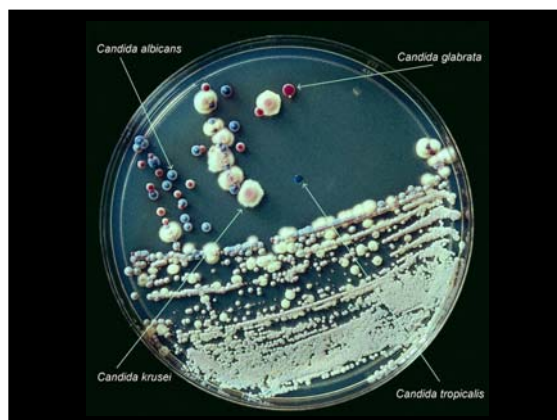


Fig. nr. 8-4.
Aspectul coloniilor aparținând speciilor levurice identificabile prin cultivare pe CHROMagar Candida.

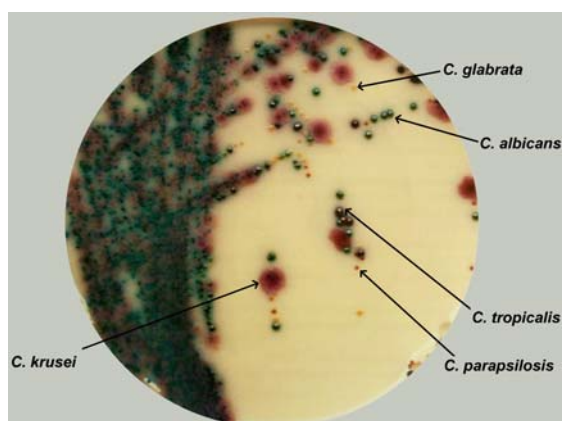


Fig. nr. 8-5.
Aspectul coloniilor aparținând speciilor levurice identificabile prin cultivare pe Chromogenic Candida Agar.



Fig. nr. 8-6.
Kitul Auxacolor 2



Fig. nr. 8-7.
Aspectul galeriei Auxacolor 2
în cazul speciei *C. tropicalis*

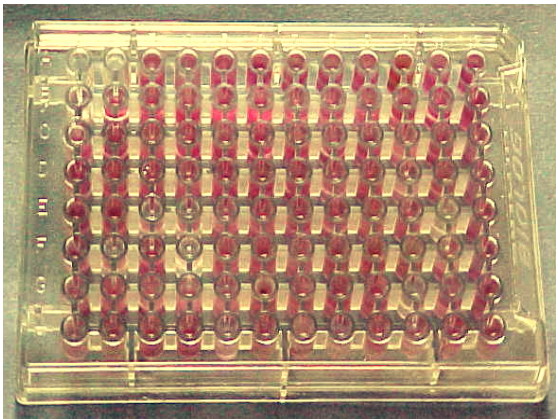


Fig. nr. 8-8.
Aspectul galeriei de
identificare -Microplate
(Biolog)

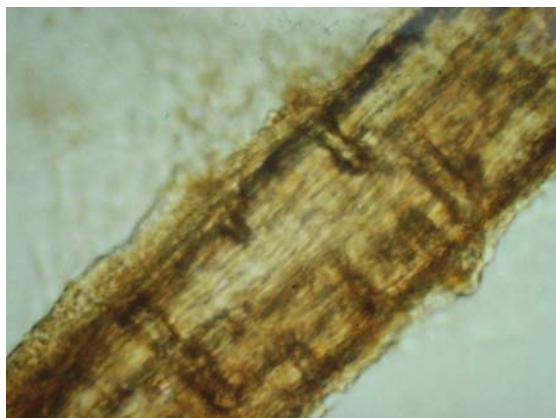


Fig. nr. 8-9.
Aspect microscopic, preparat
extemporanu, x 1000 – fir de
păr - organe perforatoare *in*
vitro.



Fig. nr. 8-10.
Cultură de *M. canis* pe boabe
decorticate de orez

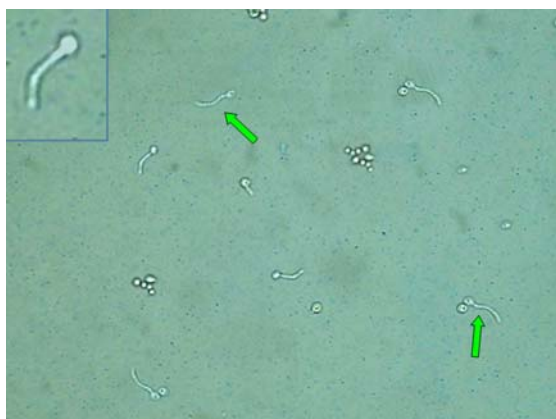


Fig. nr. 8-11.
Candida albicans
Tubi germinativi, preparat
extemporanu cu lactofenol și
albastru de anilină; x 400

*Index***(**

(1,3)- β -D-glucan, 153

5

5 flucitozină 203

A

abces subcutanat 12

acid cafeic 182

acid nicotinic 182

acridină 235

ADN-polimeraza 196

Agar

acetat Fowell 46

acetat McClary 46

acid acetic dicloran extract de drojdie 59

apă de robinet 76

BCG Candida 47

BIGGY 47

Blasto "D" 48

Borelli 64

Bromcrezol purpur cazeină glucoză 49

Christensen 50

Ciocolat 49

cireșe 79

cu acid cafeic și citrat feric 51

cu amidon 76

cu extract de cartof și glucoză 52

cu extract de drojdie și cloramfenicol 52

cu extract de drojdie și fitonă 53

cu extract de malt 81

cu extract de orez 53

cu extract de paprika 54

cu extract de sol 54

cu extract de tutun 55

cu făină de ovăz 66

cu făină de porumb 55

cu făină de porumb și Tween 80 56

cu frunze de garoafă 56

cu infuzie de Niger 74

cu L-canavanină glicină albastru de

bromtimol 57

cu sucroză și creatină 58

cu sucroză, creatină și dicloran 59

Czapek-Dox 86

Dicloran - Rose Bengal - cloramfenicol... 91

dicloran, extract de drojdie 18 % glicerol.. 60

diferențiere *Aspergillus* 60

Dixon 61, 62

glicerină 79

glucoză - peptonă - drojdie 62

infuzie cord - creier 63

izolare *Candida* 63

Lactrimel 64

Leeming 65

Littman 65

malt 80

Mueller – Hinton - glucoză 2 % 66

Nickerson 47

Pal 67

pentru studierea morfologiei levurilor..... 68

peptonă - glucoză - fluconazol 69

peptonă 3% 94

RPMI - MOPS - glucoză 90

SABHI 71

Sabouraud cicloheximidă 71

Sabouraud cloramfenicol 72

Sabouraud diluat 75

Sabouraud Emmons 72

Sabouraud TTC 87

sânge - glucoză - cisteină 73

selectiv cu triptofan 74

Staib 74

Takaschio 75

Trichophyton 92, 182

Trichophyton 1 92

Trichophyton 2 92

Trichophyton 3 93

Trichophyton 4 93

Trichophyton 5 93

Trichophyton 6 94

Trichophyton 7 94

Tween 80 56, 75

albastru de metilen 3% 22

alcalinizare 183

alcool etilic 234

alcool izopropilic 234

alcooli 234

aldehide 234

AM3 83

amfotericină B 203

amorse 196

amplitaq gold 195

antibiotic medium 3 83

Index

Antifungigrama

alegerea antifungicelor	204, 206
aplicarea benzilor E-test	204
<i>Aspergillus</i>	206
<i>Candida</i>	203
CLSI M44-A	208
<i>Cryptococcus</i>	203
<i>Fusarium</i>	206
heterorezistență	204
metoda difuzimetrică Kirby-Bauer	208
prepararea inoculului	203, 206
recomandări de interpretare	209
reguli de citire a CMI	204, 207
<i>Rhizopus</i>	206
<i>Rhodotorula</i>	203
<i>Scedosporium</i>	206
tehnica de lucru pentru fungi	
filamentoși	206
tehnica de lucru pentru levuri	203
<i>Trichosporon</i>	203
aparate protetice amovibile	12
artrospori	85
ascospori	46
asimilarea surselor de azot	180
asimilarea surselor de carbon	180
aspiratul endotraheal	10
aspiratul prostatic	15
aspiratul pulmonar	11
aspiratul traheostomic	10

B

bandă adezivă	22
banda adezivă BIO TAPE	225
BHI	63
bi-fenoli	234
biguanidine	234
biopsia pulmonară	11
biopsia testiculară	15
biosecuritate	229
Blankophor	21
Blast	198
blastoconidii	85
bromcrezol purpur	183
bromură de etidiu	193
bronhoscopie	11
Bulion	
cu uree	77
Czapek-Dox	86
Sabouraud	78

C

<i>C. albicans</i>	185
<i>C. dubliniensis</i>	185, 194
calcofluor	21
capacitate alergizantă	230
Caseta	
AIR-O-CELL	212
BIOCELL	215
CYCLEX-D	215
LARO 100	216
MICRO-5	214
caspofungină	203
cateter	3
cerneală Parker	21
CHROMagar <i>Candida</i>	45, 78
Chromas	198
clamidospori	55, 67, 85, 87
clarificarea cu KOH și dimetil sulfoxid	25
clase de risc biologic	229
clorhexidina gluconat	234
clorură de benzalkoniū	234
clorură de cetilpiridiniu	234
coloranți	235
Colorația	
albastru Alcian – pentru mucopolizaharide	
acide	126
Bauer	128
Chick	130
cu acid periodic Schiff	143
cu calcofluor alb și KOH 10%	26
cu hidroxid de potasiu și cerneală Parker .	25
cu lactofenol și albastru de anilină	24
cu mucicarmin Southgat	35
fluorescentă cu acid periodic Schiff	142
Fontana-Masson	135
Giemsa	31
Gomori-Grocott	139
Gram	28
Gram - calcofluor alb	30
Gridley	131
Gridley fluorescentă	138
Hemalaun – Eozină	123
May-Grunwald-Giemsa	32
methenamine silver-modificată	139
Musto	36
negativă cu mercurchrom 2 % și tuș de	
India	23
negativă cu tuș de India	22
PAS	143
PAS fluorescentă	142
Schmorl	133
Wright	34

Ziehl - Neelsen.....	145
compoziția mediilor de cultură.....	42
compuși cuaternar de amoniu.....	234
conservare dermatofiți.....	95
controlul calității acizilor nucleici.....	193
controlul de calitate.....	44
cromomicoză.....	12
cultivare submersă.....	105
cultivarea în „picătură suspendată”.....	106
cultivarea pe bloc de geloză.....	106
cultivarea pe lamă.....	106
cultivarea pe suporturi transparente.....	105

D

dermatofiți.....	184
detecția CO ₂	4
diferențiere.....	185
dispozitive intravasculare.....	3
dispozitivul CIP 10M.....	219
DTM.....	88
durata incubării.....	7

E

electroforeza în gel de agaroză.....	193
endodontite.....	12
epuizare pe medii solide.....	101
etalare în puncte izolate.....	101
evidențierea capsulei.....	22
examen microscopic direct.....	21
expectorație indusă.....	10
expectorație spontană.....	10
extract de cartofi.....	80
extracția ADN.....	191
extracția ADN-ului prin crioprecipitare.....	192

F

fenoli.....	234
fermentarea zaharurilor.....	179
filtre HEPA.....	232
fire de păr.....	9
fixarea.....	113
Fixatori	
Bouin.....	114, 116
Hollande.....	114, 116
soluția de formol 10% tamponată... 114, 115	
flacoane de hemocultură.....	2

fluconazol.....	203
fluidele intraoculare.....	9
formaldehidă.....	234
formular de cerere.....	1
fragmente tisulare biopsice.....	15
fragmente unghiale.....	9
frotiu citobacteriologic.....	14
frotiu colorat May-Grunwald-Giemsa.....	22
fungi aeropurtați.....	211
Fungitell.....	153
controlul calității.....	158
interpretarea rezultatelor.....	157
limite.....	158
tehnică de lucru.....	155
valori așteptate.....	159

G

galactomanan.....	160
gel de agaroză 1%.....	193
GenBank.....	198
germ-tube test.....	185
glutaraldehida.....	234
<i>Guizotia abyssinica</i>	74

H

Hemocultura	
volumul de sânge.....	4
hexaclorofen.....	234
hidroliza cazeinei.....	184
hife.....	85
hipoclorit de Ca.....	234
hipoclorit de K.....	234
hipoclorit de Na.....	234
hipocloriți.....	234
histidină.....	182
Histidină HCl.....	94
hote de protecție biologică.....	232
hotele de protecție biologică.....	233

I

impactorul Zefon Z-A6.....	217
impetigo.....	9
imunofluorescență.....	22
infuzie de cartofi.....	52, 80
înglobare.....	101
inozitol.....	182

Index

inozitol	93
iodofori	234
itraconazol	203
ITS 1	194, 195, 196, 197
ITS 4	194, 195, 196, 197

K

kit-uri de extracție ADN	191
--------------------------------	-----

L

latex-aglutinare <i>C. dubliniensis</i>	172
lavajul bronhoalveolar	11
LBA	11
lichid pericardic	11
lichid peritoneal	11
lichid pleural	11
lichid sinovial	11
lichidul cefalo-rahidian	8
L-prolin-aminopeptidaza	182
Lutare	
preparate extemporaneu	111

M

<i>M. audouinii</i>	185
<i>M. canis</i>	185
măduva osoasă hematogenă	8
manan seric	169
markeri de greutate moleculară	193
medii cromogene	45
medii de cultivare	46
medii difazice	5
medii diferențiale	43
medii hipertone	6
Mediu	
bază pentru levuri	82
cu lapte diluat	84
cu pâine	85
cu sol	85
de conversie	86
pentru izolarea dermatofitelor	88
sintetic pentru testul de filamentare	83
mediul	
Christensen	181
Mediul	
Bilal	84
Kurung-Yegian	86
Nikersen-Mankovski	87

Pagano-Levin	87
RPMI 1640	70, 89
RPMI 1640 MOPS (CLSI)	89
RPMI 1640 MOPS (EUCAST)	89
metoda Dalmau	105
metoda lizei cu centrifugare	5
micetom	12
momentul prelevării	4
mucoasa orală	12
mucopolizaharide capsulare	126
Musto	22

N

NCBI	198
negru clorazol	21

O

organe perforatoare	184
---------------------------	-----

P

păstrarea mediilor	44
PCR	191
PCR duplex	194
PDA	42, 52, 80
periajul bronșic	11
<i>Pityriasis versicolor</i>	10, 22
plăgi deschise	12
Platelia [®] Aspergillus	160
Platelia Aspergillus	
interpretarea rezultatelor	164
principiul testului	160
tehnica de lucru	162
Platelia Candida AC	
interpretarea rezultatelor	167
principiul testului	165
tehnica de lucru	166
Platelia Candida Ag	
interpretarea rezultatelor	171
principiul testului	169
tehnica de lucru	170
Platelia [®] Candida Ac	165
Platelia [®] Candida Ag	169
posaconazol	203
povidonă iod	234
prelevare balano-prepuțiale	15
prelevatul otic	9
prepararea mediilor	43

preparat extemporaneu	21, 22
Preparatul extemporaneu	
cu bandă adezivă	110
cu lactofenol și albastru de anilină	109
primeri	196
principiul impregnării argentică	38
probele biopsice transbronhiale	11
procesarea țesuturilor	117
Procesarea țesuturilor	
clarificarea	119
colorarea	123
deshidratarea	118
etalarea secțiunilor	121
etichetarea și arhivarea	150
impregnarea cu parafină	119
includerea	120
montarea	148
secționarea	120
producerea altor enzime	182
producerea de fenol-oxidază	182
producerea de urează	180
proteinaza K	191
pseudohife	85
puncție rahidiană	8
puncție sternală	8
puncție venoasă periferică	3
pungi parodontale	12
purificarea izolatelor levurice	103

R

raclatul cornean	9
Recoltare	
precauții	1
rezistența la cicloheximidă	181
risc colectiv	229
risc individual	229

S

sânge	2
scotch	110
scuame cutanate	9
secreția prostatică	15
secreții purulente	12
secreții respiratorii joase	10
secreții vaginale	14
secvențializarea fragmentelor amplificate ...	198
secvențializarea regiunilor ITS	196
secvențializator	198
semințe de Niger	182

semnificația hemoculturilor pozitive	8
ser sanguin	185
sisteme automate	4
sisteme semiautomate	4
spălătura bronșică	11
speculum	14
sporothricoză	12
sputa	10
sterilizarea mediilor	43
substanțe cancerigene	235
substanțe decontaminante	233

T

Tehnica

însămânțării levurilor pe Agarul cu	
făină de porumb și tween 80	105
tehnica aspirației cu ac fin	16
tehnica sedimentării Koch	224

Tehnici

de aeromicologie	211
de evaluare a sensibilității	
la antifungice	203
de examinare microscopică a fungilor	
din culturi	109
de histopatologie	113
de însămânțare	101
de microscopie directă	21
de procesare primară	1
de recoltare	1
de seromicologie	153
de transplantare	101, 107
de transport	1
test de opacifiere	75
test urează	77
teste biochimice	179
teste fiziologice	179

Testul

de blasteză	185
de cultivare pe Agar BCP-lapte-glucoză ..	183
de cultivare pe boabe de orez	185
de depistare a necesităților nutritive	
speciale	182
de filamentoare	185
de hidroliză a ureei la dermatofiți	181
de hidroliză a ureei la levuri	180
de perforare a firului de păr in vitro	184
de termostimulare	186
de termotoleranță	186
tiamină	182
tiamină HCl	93
tinea	9

Index

transluminator.....	193
triclosan	234
tub germinativ	185
tubi germinativi	84
tuș de India	22

U

Urina

cateterism vezical.....	13
cateterizare vezicală.....	13
recoltare la bărbați.....	13
recoltare la femei	12
recoltarea pe cateter preexistent.....	13
recoltarea prin puncție suprapubiană.....	13

V

valve	14
-------------	----

vizualizarea gelului	193
voriconazol	203

Y

Yeast Carbon Base.....	82
------------------------	----

Z

zygomycete	85
zygomicoza	15

B

β-galactozaminidaza.....	182
--------------------------	-----



Societatea Română de Micologie Medicală și Micotoxicologie

www.fungi.ro
www.journal.fungi.ro
micologiemedicala@gmail.com

OP 6, CP 1356
Iași, România

Consiliul director:

Președinte:

Dr. Mihai Mareș
mihaimes@fungi.ro

Vicepreședinte:

Dr. Bogdan Doroftei
bogdandoroftei@fungi.ro

Administrator publicații:

Ing. Ionuț Ailincăi
ionutailincai@fungi.ro

Secretar:

Dr. Ingrid Cezara Apetrei
ingridapetrei@fungi.ro

Trezorier:

Dr. Luminița Malic
luminitamalic@fungi.ro

