

# MICROBIOLOGIA SI DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECTIILOR MENINGO- SI GONOCOCICE



## Clasificarea (Bergey's 2001) :

Familia - *Neisseriaceae*

Genurile - *Neisseria*, *Kingella*, *Chromobacterium*,  
*Aquaspirillum*

Genul *Neisseria* include două specii patogene umane importante *N. gonorrhoeae* și *N. meningitidis* (neisserii "pretențioase").

**Specii comensale**, găzduite pe mucoasele tractului respirator și digestiv, conjunctivă, vagin, uretra distală (neisserii "nepretențioase"): *Neisseria flava*; *Neisseria flavescens*; *Neisseria subflava*; *Neisseria perflava*; *Neisseria lactamica*; *Neisseria mucosa*; *Neisseria pharyngis*; *Neisseria polysaccharea*; *Neisseria sicca*; *Neisseria* sp. În unele condiții se pot comporta ca patogeni oportuniști.



## Caractere generale ale genului *Neisseria*

- Coci gramnegativi, asociați în diplococi, uneori tetrade, imobili
- Bacterii carboxifile, cu metabolism respirator
- Catalazo- și oxidazo- pozitive
- Sunt găzduite pe mucoasele omului și animalelor
- Speciile patogene sunt exigente la cultivare



## • *Neisseria meningitidis*

**1884** - Marchiafava și Celli observă diplococi gramnegativi în LCR al unui pacient cu meningită

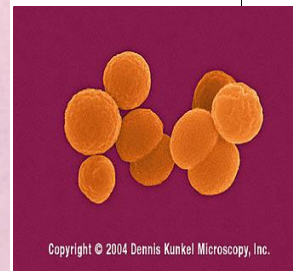
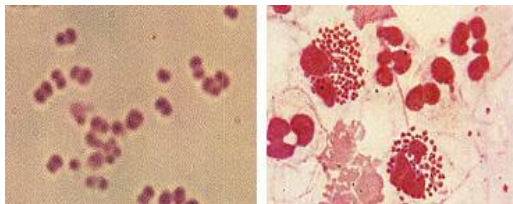
**1887** - Weichselbaum izolează bacteria din LCR și demonstrează rolul ei etiologic

Bacterie strict umană care colonizează rinofaringele la un număr mare de purtători sănătoși (5-30%). Portajul poate avea o durată de la câteva zile la câteva luni. În unele cazuri și cu frecvență redusă este capabilă să provoace septicemie și/sau o meningită cerebrospinală.



## Caractere morfobiologice

*N. meningitidis* se prezintă sub formă de coci imobili, gram-, în frotiu se aranjează în diplococi cu suprafețele adiacente aplatizate sau puțin concave (aspect riniform, de "boabe de cafea"). Posedă capsulă și fimbrii.

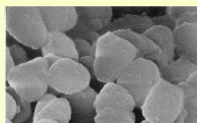


Copyright © 2004 Dennis Kunkel Microscopy, Inc.

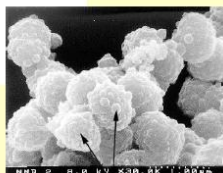


68 sur 310

## Surface cellulaire: gonocoques et méningocoques



The color of the texture on the cell surface is shown to be slight on *N. gonorrhoeae*.



Membrane folds are produced in the *N. meningitidis* cell surface.

Electronische Mikroskopie - M. Struelens - In: Candidature Médecine et De Candidature Sciences Biologiques

### Structura antigenică a *N. meningitidis*

1. Ag polizaharidice capsulare permit caracterizarea a 13 serogrupe: A, B, C, D, X, Y, Z, 29E, W135, H, I, K et L. Mai frecvent întâlnite sunt serogrupurile A, B, C, Y și W135.
2. Ag proteice din membrana externă (cinci proteine majore) permit distincția tipurilor serologice
3. Ag lipo-oligozaharidice (serotipurii)

Aceste antigene servesc în calitate de markeri epidemiologici.

### Caractere de cultură

*N. meningitidis* este un m/i/o carboxifil, foarte exigent la cultivare. Se cultivă doar pe medii îmbogățite cu sânge sau ser - geloză-ser, geloză-sânge, geloză-ciocolată, mediul Mueller-Hinton - și preîncălzite în termostat.

Coloniile S, mici (1-2 mm), cu marginile netede, bombate, translucide apar peste 24-48 ore de incubare la 37 C în atmosferă umedă îmbogățită cu 5-10% CO<sub>2</sub>.

### Activitate biochimică

*N. meningitidis* posedă catalază și oxidază, scindează glucoza și maltoza fără a produce gaz.

**Rezistența în mediul extern:** *N. meningitidis* este o bacterie deosebit de fragilă, sensibilă în special la desiccare, radiații solare, variații de pH și refrigerare; temperaturi sub 37 C determină autoliza bacteriilor.

### Factorii de patogenitate

1. **Adezine** (fimbriile și proteine ale ME)
2. **Capsula** – rol antifagocitar
3. **slg A-proteaza** – descompune slg A de pe mucoase
4. **Endotoxina** – declanșează secreția diferitor citokine
5. **Receptori și captatori de Fe** (receptori membranari pentru transferină și lactoferină, care permit captarea directă a Fe din aceste substanțe, precum și extragerea lui directă din hemoglobină)

### • Epidemiologia infecțiilor meningococice

**Sursa de infecție** – bolnavii cu meningită sau rinoaringită meningococică sau purtătorii de germeni

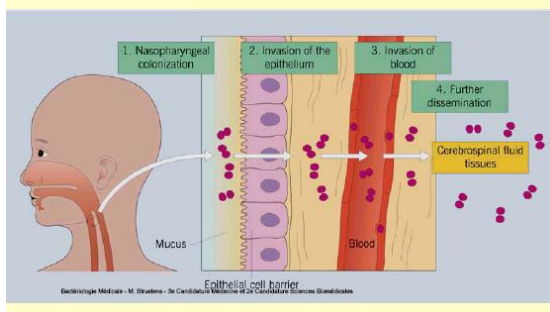
**Transmiterea** – aerogen, prin picături Pflugge, prin obiecte contaminate (jucării...) - exceptional

### Patogeneza infecțiilor meningococice

Meningococul aderă la epiteliul rinoaringelui, provocând sau o infecție locală (**rinoaringita**), sau o infecție inaparentă. În caz de diminuare a rezistenței organismului, bacteria trece în submucoasă și apoi în circulația sanguină generală (**meningococcemia**). Această translație este favorizată de inflamații rinoaringiene, în special virale.

69 sur 310

## Pathogénie de la méningococcie



- In circulația generală, grație capsulei, bacteria este protejată de mijloacele de rezistență a organismului. Prin tropism pentru celulele plexului choroïd, meningococul aderă la acest nivel și, prin translocație, trece în spațiul meningean, inducând **meningita cerebrospinală**.
- Odată cu dispariția anticorpilor materni, *N. meningitidis* devine principala bacterie responsabilă de meningite la nou-născuți. Ulterior, imunitatea antimeningococică se instalează progresiv și frecvența meningitelor meningococice diminuează.

## Formele clinice de infecții meningococice

- 1. Rinofaringita** (forma clinică cea mai frecventă, deseori asimptomatică)
- 2. Septicemia** (meningococcemia).  
Reprezintă etapa a doua a maladiei.  
*Complicații:* meningococcemie fulminantă (sindromul Waterhouse-Friderichsen) în 10 - 20 % de cazuri (șoc endotoxinic, purpură extensivă indusă de coagulopatie de consumare (coagulare intra-vasculară diseminată)).



## Méningococcémie : éruption pétéchiale puis purpurique (CIVD)



## Méningococcémie : purpura





### 3. Meningita cerebrospinală epidemică.

Este precedată de o faringită și însoțită de bacteriemie. Este caracterizată prin febră înaltă, cefalee, vomă, fotofobie, hiperestezie cutanată. Poate fi prezentă poziția caracteristică în "cocoș de pușcă" dată de sindromul de contractură. Frecvent se întâlnește herpesul labial, peteșii cutanate sau artralgii. Afectarea sistemului nervos se face în grade variabile, cu delir, agitație psihomotorie, somnolență, uneori comă, pareze și paralizii, convulsii.

**Evoluția** în absența tratamentului se face spre decés în 80-90% din cazuri, restul prezentând sechele grave.

- **Diagnosticul direct**

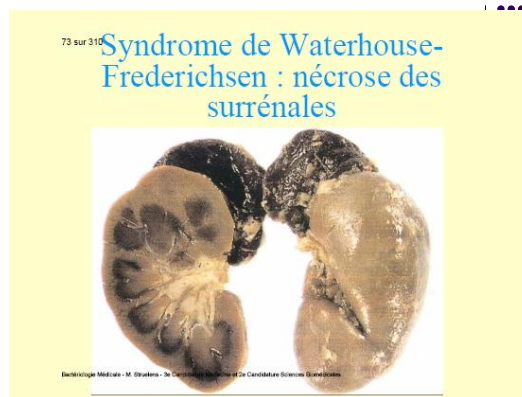
**Examenul LCR** este primordial pentru diagnosticul meningitei. Prelevat în condiții aseptice prin puncție lombară, în volum de 4-6 ml în 2 eprubete de centrifugă.

LCR este tulbure, conține mii sau zeci de mii de elemente celulare, cu predominanța de 95-100% a neutrofilelor. Această reacție celulară este însoțită de hipoglicorahie, de hiperalbuminorahie și pH acid prin acumularea de acid piruvic și lactic.

#### I. Examenul microscopic al sedimentului LCR

a) **Frotiuri colorate cu albastru de metilen sau Gram:** diplococi Gram-negativi riniformi în poziție intra și extracelulară, dar densitatea bacteriană este scăzută, și examenul este negativ în 1/3 cazuri. Prezența leucocitelor în număr mare pledează pentru un prognostic favorabil.

b) RIF

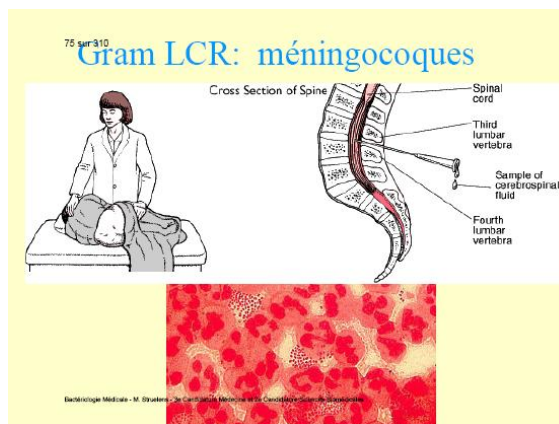


**4. Alte forme:** infecții bronhopulmonare, endocardite, pericardite, osteomielite, artrite (determinate de formarea de complexe imune), conjunctivite, angine.

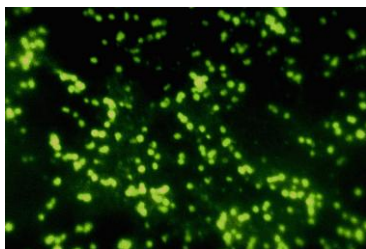
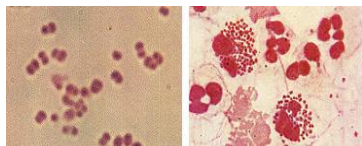
- **Diagnosticul de laborator al infecțiilor meningococice**

**Prelevate:** în funcție de forma clinică se prelevă exsudatul nasofaringean, sânge pentru hemocultură, LCR, lichidul articular, etc.

Probele se prelevă înainte de a se administra antibiotice și se transportă rapid la laborator, ferite de variații de temperatură și lumină. La necesitate se utilizează mediul de transport Stuart.







## II. Examenul bacteriologic

- **Sedimentul din LCR** se însemănțează pe medii de cultură îmbogățite, cum sunt geloza-sânge, geloza-ciocolată, mediul Mueller-Hinton preîncălzite la 37 C.
- **Exsudatul nazofaringean** se însemănțează imediat după recoltare pe medii cu adaos de antibiotice (lincomicină, vancomicină, ristomicină) pentru inhibarea altor specii microbiene existente în exsudat.
- **Sângele** pentru hemocultură se însemănțează direct pe medii de cultură lichide (bulion glucozat 2% respectând proporția de 5 % sânge). Examinările se fac zilnic timp de 5-7 zile prin subculturi.

**Identificarea** și diferențierea de neisseriile comensale se bazează pe aspectul morfologic pe froiuri colorate Gram, prin testul oxidazei care este pozitiv, scindarea numai a glucozei și maltozei, identificarea serologică prin RA cu seruri imune specifice de grup.

**III. Decelarea directă în sânge și LCR a antigenelor polizaharidice capsulare**, utilizând reacțiile de contraimunoelectroforeză, ELISA, latex și coaglutinare cu antiseruri specifice de grup.

## IV. Detectarea acizilor nucleici

### Diagnosticul indirect

**Diagnosticul serologic.** Pot fi titrați Ac antimeningococici utilizând RA sau RHA. Are valoare diagnostică redusă

**Tratamentul** trebuie instituit extrem de urgent, imediat după internare și efectuarea puncției lombare.

**Tratamentul etiotrop** constă în administrarea de antibiotice timp de 7-10 zile: penicilină G, ampicilină, cloramfenicol, cefalosporine.



- **Profilaxia specifică: imunizare activă** cu vaccin polizaharidic antimeningococic monovalent sau polyvalent (A, C, Y, W), care se poate administra intradermic sau subcutanat, după vârsta de 3 luni (pentru grupul A), oferind protecție de 95-100% pentru o durată de 2-3 ani; polizaharidul capsular de grup B este un homopolimer al acidului sialic și nu este imunogen pentru oameni.

**Contactii** vor fi supravegheați clinic timp de 10 zile. Chimioprofilaxia (rifampicină, ciprofloxacina, ceftriaxon) se aplică în familii sau în colectivități de preșcolari

**Purtătorii**, depistați în focar, vor fi tratați.

Cazurile de meningită sau meningococcemie vor fi declarate în 24 de ore de la depistare

## MICROBIOLOGIA ȘI DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL GONOREEI

Gonoreea este o uretrită specifică, cu eliminare masivă de puroi, mai aparent la bărbați decât la femei.

Termenul "*gonoreea*", a fost utilizat prima dată de Galen în secolul II și înseamnă "*surgerea seminței*".

Multe secole gonoreea și sifilisul erau confundate. Paracelsus (1530) credea că gonoreea este un simptom precoce al sifilisului. Aceasta confuzie a fost întărită de medicul englez John Hunter, în 1767. Hunter intenționat și-a inoculat puroi de la un bolnav cu simptome de gonoree, îmbolnavindu-se de sifilis!

Agentul cauzal al gonoreei, *Neisseria gonorrhoeae*, a fost descris pentru prima dată de A. Neisser în 1879 în puroi de la un bolnav de gonoree.

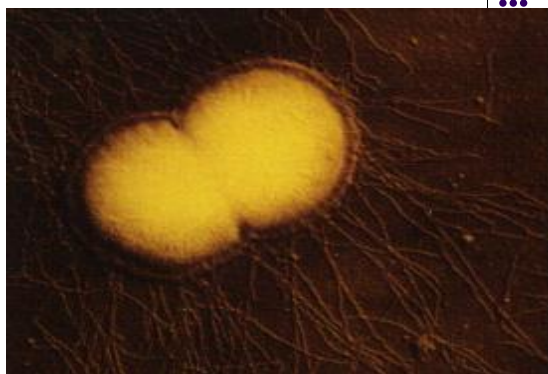
Mi/o a fost izolat în cultură pură în 1882 de către Loeffler pe ser coagulat și rolul său etiologic a fost stabilit ulterior pe voluntari umani (conform postulatelor lui Koch).



## • *Neisseria gonorrhoeae*

### Caractere morfobiologice

*Neisseria gonorrhoeae* este un coc gram-negativ, cu diametrul de 0.6 - 1.0 μm, uzual observat în perechi cu suprafețele concave alăturate. În prelevate patologice (puroi, exsudate) se localizează frecvent intracelular în leucocite polimorfonucleare (neutrofile). Imobil, posedă capsulă și fimbrii cu lungimea de câțiva micrometri. În funcție de prezența fimbriilor se cunosc patru tipuri de *N. gonorrhoeae* : T1, T2, T3, T4



### Caractere de cultura

Gonococul este exigent la cultivare. Pentru izolarea lui se utilizează medii îmbogățite cu ser sangvin, extract de drojii, lichid ascitic, etc (mediul HYL, Thayer-Martin, geloză-ciocolată). Culturile cresc la 35-36 C în atmosferă umedă cu 5-10 % CO<sub>2</sub>. Peste 24-48 ore apar colonii mici (0,5-1mm), netede, translucide.

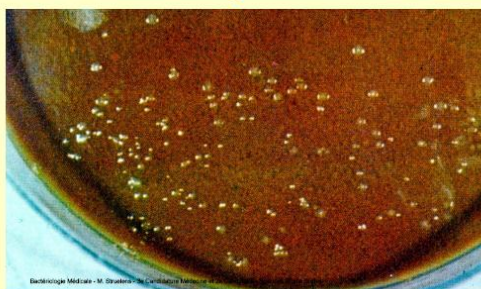
După aspectul coloniilor pot fi descrise 4 tipuri:

- Colonii de tipul I și II apar la izolare, corespund tulpinilor virulente, purtătoare de pili (fimbrii),
- Colonii de tipul III și IV, apar la repicare, mai mari, corespund tulpinilor fără pili



92 sur 310

### Gonocoques : colonies sur gélose chocolat



### Structura antigenică

- 3 proteine majore din ME (PI/ Por, PII/ Opa, PIII) definesc multiple serotipuri (variante). PII prezintă o mare variabilitate antigenică, chiar în interiorul unei tulpini.
- Lipopolizaharidul din ME
- Proteina fimbriilor, cu o mare diversitate antigenică

**Caractere biochimice:** gonococii sunt oxidazo-pozitivi, scindeaza doar glucoza pâna la acid, nu atacă maltoza

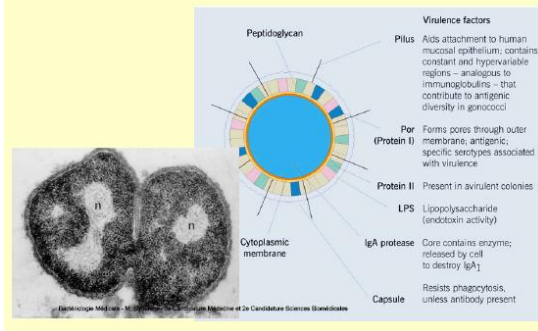


### Factorii de patogenitate

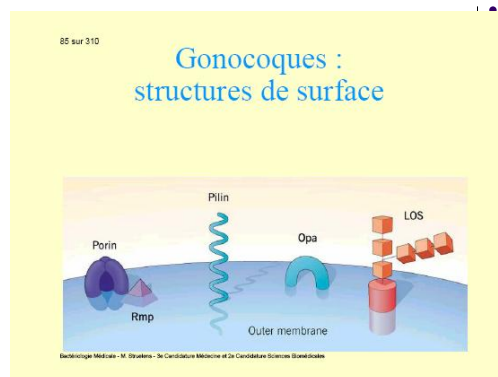
1. Adezinele (fimbriile PiiE, unele proteine din membrana externă – Pii/Opa). Opa de asemenea induce transitoza gonococilor în celulele epiteliale.
2. IgA-proteaze, cu rol în colonizarea mucoaselor
3. Proteine ale ME (PI/Por), care inhibă formarea fagolizosomei (supraviețuirea și multiplicarea gonococilor în fagocite)
4. Endotoxina (rezistență la complement, secreția citokinelor)
5. Sisteme de captare a Fe (receptori membranari pentru transferină și lactoferină)
6. Variația antigenică rapidă a fimbriilor de adeziune și a proteinei Opa (conversie, hipermutație, transformare)
7. Capsula din acid sialic



### Structure de *Neisseria gonorrhoeae*



Designation	Location	Contribution
PilE	major fimbrial protein	initial binding to epithelial cells
P.II (Opa)	outer membrane protein	contributes to invasion
P.I (Por)	outer membrane porin	may prevent phagolysosome formation in neutrophils and/or reduce oxidative burst
LOS	outer membrane lipooligosaccharide	elicits inflammatory response, triggers release of TNF
P.III (Rmp)	outer membrane protein	elicits formation of ineffective antibodies that block bactericidal antibodies against P.I and LOS
Tbp1 and Tbp2	outer membrane receptors for transferrin	iron acquisition for growth
Lbp	outer membrane receptor for lactoferrin	iron acquisition for growth



### Rezistența în mediul extern

*N. gonorrhoeae* este un mi/o fragil, sensibil la variații de temperatură, desicare, raze UV și alte condiții ale mediului extern.

Gonococul este inhibat de bumbacul din tampoane (hipoclorit...). Pentru prelevări sunt indicate tampoane cu alginat de Ca sau din dacron.

### • Epidemiologia infecției gonococice

**Sursa de infecție** – unica sursă este bolnavul cu gonoree, în special cu infecție inaparentă

### **Transmiterea**

- la maturi exclusiv prin contact sexual;
- la nou-născut – la trecerea prin canalul de naștere al mamei bolnave

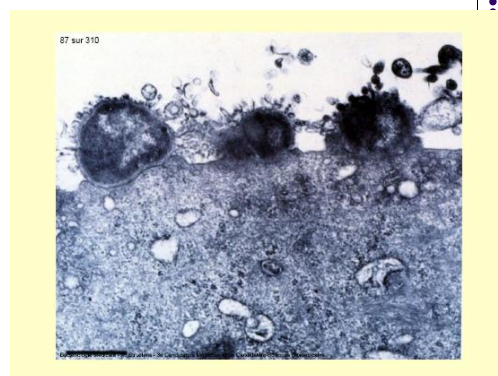
### • Patogeneza infecțiilor cauzate de *N.gonorrhoeae*

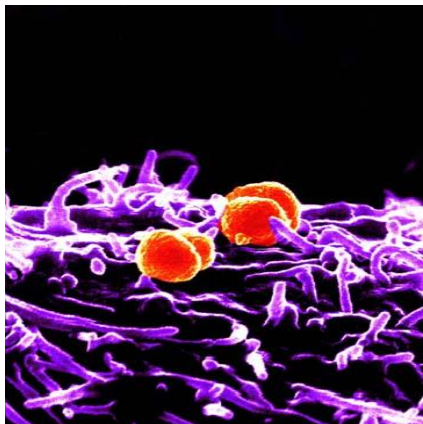
Infecția gonococică este în general limitată la mucoasele cu epiteliiu columnar. Mai frecvent implicată este [uretra](#), [cervixul](#), [rectul](#), [faringele](#) și [conjunctiva](#). Epiteliul scuamos al vaginului nu este sensibil la infecția cu *N. gonorrhoeae*. Totuși, la fetițe gonococul poate provoca vulvovaginite.

Infecțiile mucoaselor sunt caracterizate uzual prin secreții purulente.

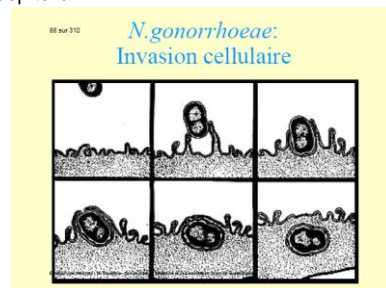
### **Patogeneza gonoreei**

Prin intermediul fimbriilor și a unor proteine din ME (Opa) gonococii aderă la vilozitățile celulelor epiteliale columnare neciliate.

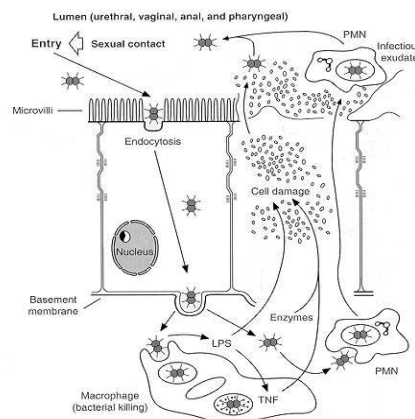




Urmează penetrarea lor în celulă (prin endocitoză), apoi vacuola este transportată la baza celulei, unde bacteria este eliberată prin exocitoză în țesutul subepitelial.



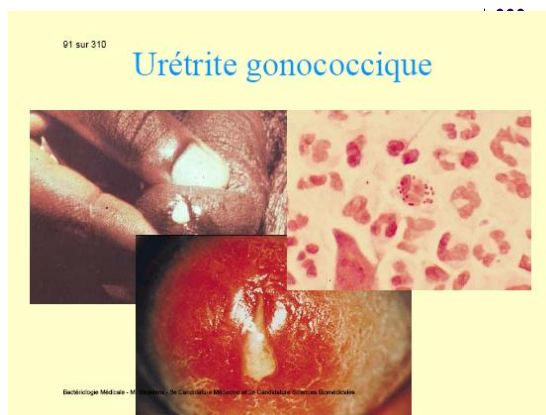
Pe parcursul infecției, lipopolizaharidul bacterian (LPZ/LOZ) și peptidoglicanul sunt eliberate prin autoliza celulelor. Ambele substanțe activează complementul pe calea alternativă, LPZ de asemenea stimulează producția factorului de necroză a tumorilor (TNF), care provoacă distugerea celulelor. Neutrofilele sunt imediat atrase în focar și înglobează bacteriile. Mulți gonococi sunt capabili să supraviețuească în interiorul fagocitelor până la moartea lor, cu eliberarea bacteriilor ingerate.



### ● Particularitățile gonoreei la bărbați

În majoritatea cazurilor decurge acut (85-95%), fiind manifestată clinic:

1. *Uretrita* (secreție uretrală alb – galbuie, durere și usturime la mictiune, dizurie)
2. *Prostatita*
3. *Orhita*
4. *Epididimita*





- **Particularitățile gonoreei la femei**

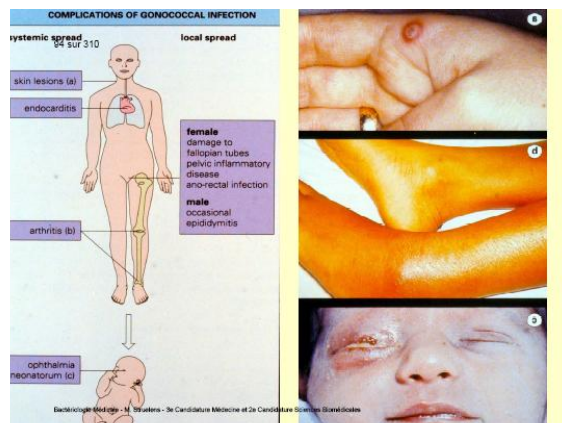
În majoritatea cazurilor infecția decurge asimptomatic (80% de cazuri), cu evoluție spre cronicizare.

**Formele clinice:**

1. *Cervicita* (cu sau fără leucoree) – forma cea mai frecventă
2. *Uretrita*
3. *Bartolinita*
4. *Salpingita* (pericol de sterilitate, graviditate extrauterină)
5. *Ovarita*
6. *Endometrita*
7. *Peritonita*

**Alte forme clinice:**

- *Faringita și proctita gonococică*
- Diseminarea infecției gonococice (1-3%) determină *artrite, leziuni cutanate, septicemii, endocardite, meningite*.
- Tulpinile de *N. gonorrhoeae* care cauzează infecții diseminate sunt uzual rezistente la complement și la reacția bactericidă a serului.
- La nou-născut *conjunctivita purulentă* cu extinderea rapidă a infecției la globul ocular (*ophthalmia neonatorum*) poate fi urmare a contaminării la trecerea prin canalul de naștere



- **Diagnosticul de laborator al gonoreei**

**Prelevate:**

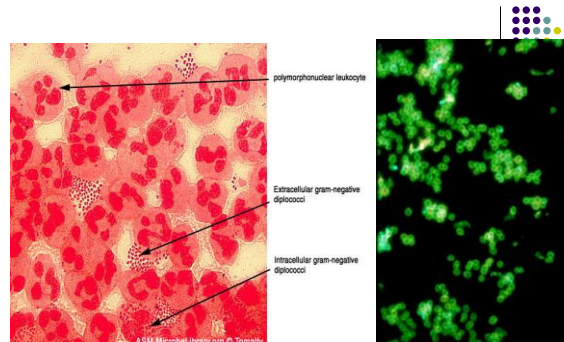
- La bărbați - secrețiile uretrale
- La femei - secrețiile uretrale, vaginale, din endocol sau orificiile glandelor vulvare
- Pot fi examinate conținutul leziunilor cutanate, exsudat articular, nasofaringean, sânge, puroi din conjunctivă, LCR, tampon rectal.

Pentru recoltarea acestor secreții se folosește un tampon de alginat de Ca (sau ansa bacteriologică), care este apoi trimis imediat în laborator pentru testare (după necesitate se folosește mediul de transport Stuart cu tioglicolat și cărbune activat).

- Dacă eliminările sunt sărace, se procedează la stimularea secreției (reactivare, provocare):
  - Alimentară (cu bauturi alcoolice – bere)
  - Chemică (instilații cu nitrat de Ag – sol. 1% în uretră, 10% în colul uterin)
  - Biologică (inocularea gonovaccinului, recoltarea secrețiilor imediat după menstruație la femei)
  - Mecanică (masaj al prostatei)
  - Termică (diatermie sau inductotermie)

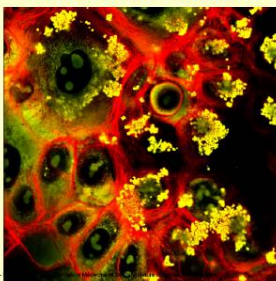
- **Metodele de diagnostic**

1. **Examenul microscopic** (elocvent doar în cazul uretritelor acute la bărbați).
  - În frotiuri din puroiul uretral colorate Gram sau cu albastru de metilen se observă diplococi gram- situați intra- sau extracelular.
  - RIF



88 sur 310

## *N.gonorrhoeae*: Invasion cellulaire



Bactériologie-Médicale

- **Examenul bacteriologic** (este obligator în forme asimptomatice sau cronice)

Gonococul fiind o bacterie foarte fragilă, este obligator de a înșămânța imediat prelevatele sau de a utiliza un mediu de transport adaptat. Pentru izolare se folosesc medii îmbogățite (ex.: mediul Thayer-Martin, care este bogat în factori de creștere și conține antibiotice (vancomicina, colistina, amfotericina) care inhibă alte bacterii din prelevat, geloza-ciocolata). Coloniile apar peste 18 - 24 h de incubare în atmosferă cu CO<sub>2</sub>.

Identificarea *N.gonorrhoeae* se efectuează în baza caracterelor morfotinctoriale, aspectul coloniilor crescute pe medii selective, oxidaza +, scindarea doar a glucozei până la acid. Seroidentificarea cu Ac monoclonali în reacția de co-aglutinare.

- Depistarea directă a *N. gonorrhoeae* în prelevate poate fi realizată prin tehnici ELISA sau RIF
- Detectarea acizilor nucleici prin hibridare sau amplificare genică
- **Examenul serologic (serodiagnosticul)**
  - RFC

- **Tratamentul gonoreei**

Antibiograma este indispensabilă unui tratament eficient!

- Peniciline
- Cefalosporine de generația III
- Fluorochinolone
- Cotrimoxazol

- **Profilaxia gonoreei**

- Nespecifica (individuală sau generală)
- Prevenirea oftalmiei gonococice se efectuează prin instilarea intraconjunctivală la nou-născuți a soluției 1% de nitrat de Ag