

Microbiologie, Virologie, Imunologie

Întroducere în microbiologie.
Metodele microbiologice de
diagnostic.
Clasificarea și nomenclatura
microorganismelor.
Morfologia bacteriilor.

- **Microbiologie** (*mikros bios logos* – mic, viu, studiu). Microbiologia studiază microorganismele și activitățile lor.
- **Microorganisme / microbi** – organisme microscopice, cu dimensiuni de ordinul μm (10^{-6} m) sau nm (10^{-9} m).
- Mi/o reunesc **bacteriile** și alte tipuri de organisme: **alge, ciuperci microscopice (fungi, micete), protozoare, virusuri și agenți subvirali, de ex. prioni.**
- Termenul “**microb**” a fost utilizat în 1878 de chirurgul francez Charles-Emmanuel Sedillot.

LUMEA MICROBIANĂ

- **Vârsta** (3,5 mld ani!!!)
- **Abundența și diversitatea**
 - 60% din biomasă;
 - apă, aer, sol - scoarța terestră la 15 km!, surse termale la 100 grade C;
 - 4000 specii descrise – mai puțin de 1% din apr. 10^6 specii necultivabile în laborator)
- **Informația genetică**
 - genomul *Pseudomonas aeruginosa* - 5000 gene,
 - diversitate genetică superioară eucariotelor, schimb intens de material genetic
- **Sisteme eficiente de percepere a lumii, comunicare și adaptare la condiții variate ale mediului**

● Microbiologia studiază:

- forma mi/o
- structura
- nutriția
- metabolismul
- creșterea și multiplicarea mi/o (pentru a le identifica)
- urmărește relațiile mi/o cu organismele-gazdă și cu mediul ambiant

DE CE STUDIEM MICROORGANISMELE?

- **Studiul mi/o patogene și oportuniste**
 - Prevenirea și controlul maladiilor infecțioase
- **Studiul mi/o utile, inofensive**
 - Producerea antibioticelor
 - Obținerea medicamentelor (streptokinaza, insulina), vaccinurilor, etc. prin tehnologii de ADN recombinant
 - Producerea alimentelor: unt, brânză, cașcaval, chefir, yaurt, oțet, alcool, cacao, cafea, etc.
 - Rol de “insecticide” biologice
 - Fabricarea plasticului biodegradabil
 - Descompunerea deșeurilor și metanului
 - Extragerea metalelor din minerale
 - Asigurarea rolului major în ciclurile geochimice, etc

● Disciplinele microbiologice în raport cu:

- ✓ **Particularitățile biologice ale mi/o:**
Algologia, Protozoologia, Micologia, Bacteriologia, Virologia
- ✓ **Implicațiile în activitățile umane:**
Microbiologia medicală, veterinară, industrială, alimentară, etc
- ✓ **Habitatul: Microbiologia solului, Microbiologia marină, Microbiologia cosmică, etc**
- ✓ **Genetica microbiană**
- ✓ **Ecologia microbiană**

MICROBIOLOGIA MEDICALĂ

STUDIAZĂ:

- Relațiile dintre microorganismele și gazda lor umană
- Capacitățile patogene ale mi/o
- Capacitățile antiinfecțioase ale gazdei
- Principiile și metodele diagnosticului etiologic al infecțiilor
- Bazele terapiei antimicrobiene
- Bazele profilaxiei antimicrobiene



METODELE MICROBIOLOGICE DE DIAGNOSTIC



• **DIAGNOSTICUL DIRECT**

- Constă în detectarea agentului patogen, a componentelor lui sau a unui produs (ex. toxina) în prelevate de la bolnav sau din mediul extern
1. **Examenul microscopic** - studierea mi/o în stare vie/nativă sau în frotiuri colorate. Este o metodă de orientare. Informează despre prezența bacteriilor, forma lor, structura, numărul.
 2. **Depistarea antigenelor microbiene solubile în lichide biologice** (ser sangvin, LCR, urină...)
 3. **Examenul bacteriologic** – izolarea pe medii nutritive a culturilor pure de bacterii, care vor fi identificate și testate la sensibilitate față de antibiotice

4. **Examenul biologic (metoda experimentală)** – inocularea directă a produsului patologic la animale de laborator receptive. Mi/o se multiplică provocând maladia tipică. Din lichide biologice sau țesuturi afectate bacteria poate fi izolată și identificată.
5. **Identificarea ADN sau ARN** microbial prin tehnici de biologie moleculară



• **DIAGNOSTICUL INDIRECT** (imunologic)

1. **Serodiagnosticul** – depistarea și titrarea anticorpilor specifici în serul bolnavului. Ei apar peste 7-10 zile de la debutul maladiei și persistă deseori după vindecare
2. **Intradermoreacțiile (metoda alergică)** – introducerea pe cale epidermică sau intradermică a alergenului microbial și apariția, peste 2-4 zile, a unei reacții celulare locale (eritem, infiltrat). Reacția pozitivă semnifică o stare de hipersensibilitate specifică (întâlnire repetată cu acest agent)



CLASIFICAREA ȘI NOMENCLATURA MICROORGANISMELOR

- Lumea microbială este extrem de diversă, ceea ce determină necesitatea aranjării lor în grupe conform asemănării lor.
- Se disting 3 noțiuni:
 1. **Taxonomie** – știința despre clasificare
 2. **Clasificare** – aranjarea organismelor în grupe sau **taxoni** în funcție de asemănări sau înrudiri
 3. **Nomenclatura** – numirea științifică a grupelor taxonomice conform unor reguli internaționale



- **Clasificarea fenotipică** (prima tentativă – Carl von Linne în sec. XVII) - reunirea mi/o în baza caracterelor fenotipice comune (caractere morfologice, de cultură, fiziologice, biochimice, antigenice, etc)
- **Clasificarea genotipică**
 - Gradul de omologie al secvențelor nucleotidice ale ADN microbial. Tulpinile cu gradul de omologie de cel puțin 70 % aparțin unei specii, de 30 % - aceluiași gen, etc
 - Gradul de omologie al secvențelor nucleotidice ale ARN ribosomal
 - Conținutul relativ de **guanină+citozină (GC%)** al ADN purificat. La bacterii variază între 25 și 75 %.
- **Clasificarea filogenetică**
Determină locul mi/o într-un arbore filogenetic și se bazează pe studiul fosilelor sau al HLA.



- **Principalele grupe taxonomice (taxoni)**

- Domeniu
- Regn
- Tip
- Clasă
- Ordin
- Familie
- Gen
- Specie (unitate fundamentală)

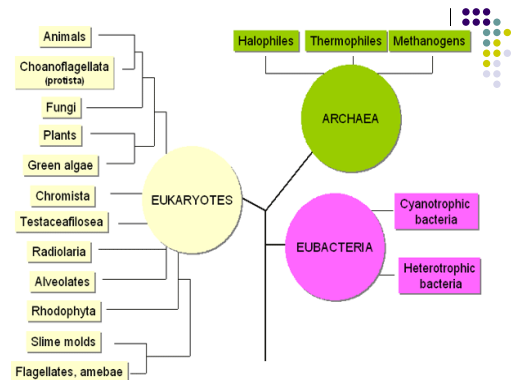
Culturile microbiene ce aparțin unei specii, dar sunt izolate în laborator din diverse prelevate reprezintă **tulpini** bacteriene (sușe). Tulpinile corespund în general caracterelor de specie, dar pot manifesta variații ne semnificative.

În cadrul speciilor pot fi delimitați **taxoni infraspecifici** (*variante / tipuri*), care prezintă diferențe minore în activitatea biochimică sau fiziologică (**biovar**), în structura antigenică (**serovar**), în gradul de patogenitate (**patovar**), în sensibilitatea la bacteriofagi (**lizovar**) sau la antibiotice (**antibiovar**).

Pot fi utilizați ca **markeri epidemiologici** pentru descifrarea unor epidemii (infecții nozocomiale, toxinfecții alimentare, etc)

Conform ultimei clasificări internaționale ale microorganismelor (*Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2001*) se disting:

- I. **Forme acelulare (virusuri, viroizi, prioni)**
- II. **Forme celulare**, repartizate în 3 domenii:
 - **Bacteria** – procariote (bacterii adevărate, *eubacterii*).
 - a) Bacterii cu perete celular fin, gram-negativ;
 - b) Bacterii cu perete celular gros, gram-pozitiv;
 - c) Bacterii lipsite de perete celular (micoplasme).
 - **Archaea** – procariote, perete celular fără peptidoglican, cu habitat în condiții extreme
 - **Eukarya** – eucariote. Include regnurile *Fungi*, *Animalia* (subregnul *Protozoa*) și *Plantae*



Nomenclatura mi/o

Numirea mi/o este stabilită de către *Comitetul Internațional de Bacteriologie Sistematică*.

Nomenclatura taxonilor are la origine un **substantiv** grec sau latin, care definește cel mai evident caracter al mi/o studiate, la care se adaugă un anumit **suffix** latin.

Ordinul – Actinomycetales, Spirochaetales

Familia – Enterobacteriaceae, Spirochaetaceae

Genul – Staphylococcus, Leptospiraa, Clostridium, Pseudomonas

Specia – denumire binară (**Gen + specie**): *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium tuberculosis*, etc.

- **EXEMPLU:**

Specia – *Escherichia coli*

Genul – *Escherichia*

Familia – *Enterobacteriaceae*

Ordinul – *Enterobacteriales*

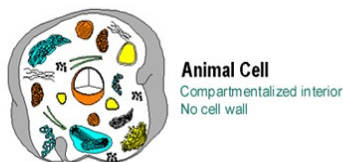
Clasa – *Gammaproteobacteria*

Tipul – *Proteobacteria*

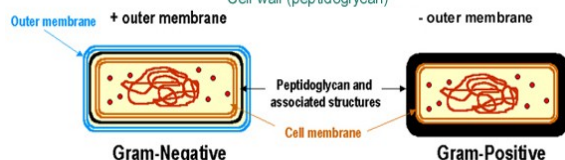
Domeniul - *Bacteria*

BACTERIOLOGIA GENERALA. CELULA BACTERIANĂ

- Bacteriile sunt organisme unicelulare procariote autonome, cu dimensiuni între 0,2 și 10 μm (Spirochaeta – 250 μm) și care diferă esențial de celulele eucariote animale sau vegetale.

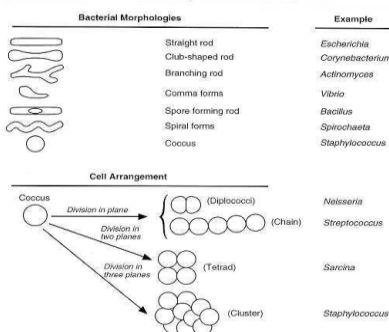


Bacterial Cell
Non-compartmentalized interior
Cell wall (peptidoglycan)



Gram-Negative

Gram-Positive



Celule eucariote	Celule procariote
Aparatul nuclear – nucleu cu nucleoli, înconjurat de membrană nucleară	Moleculă de ADN circular, lipsa membranei nucleare
Cromozomi cu structură complexă, histone asociate, set diploid	Structură cromozomică simplă, set haploid
Celula se divide prin mitoză sau meioză	Diviziune binară
Lipsa peretelui celular (în caz de prezență conține chitină sau celuloză)	Prezența peretelui celular ce conține obligator peptidoglican
Prezența organitelor celulare	Absența organitelor celulare, citoplasma omogenă, ne-compartimentată
2 tipuri de ribosomi – în citoplasmă și în mitocondrii sau cloroplaste	Toți ribosomii sunt identici
Coeficientul de sedimentare al ribosomului 80 S (citoplasma) 70 S (mitocondrii)	70 S (50S , 30 S)

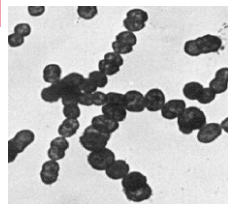
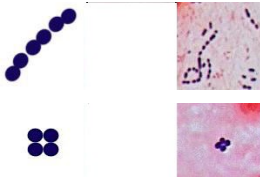
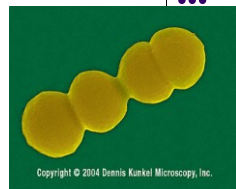
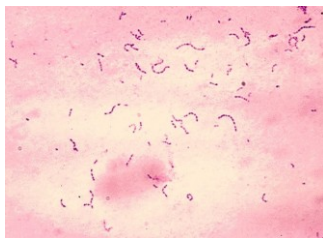
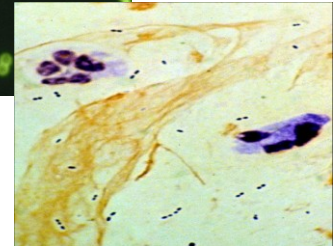
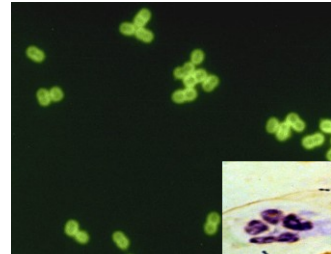
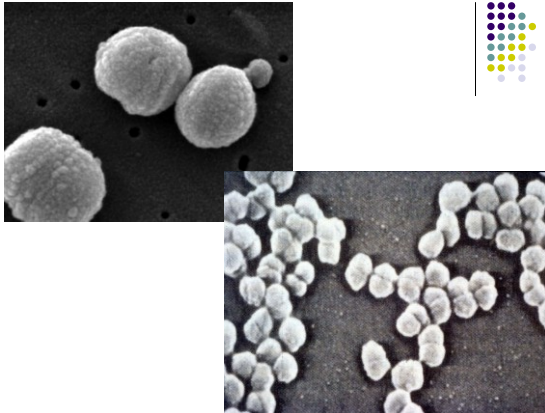
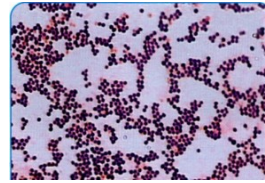
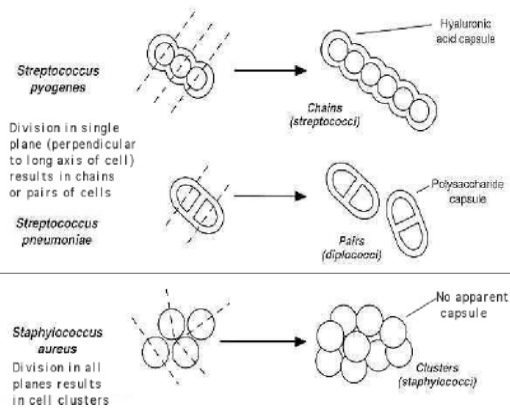
MORFOLOGIA BACTERIILOR

Morfologic se disting 4 grupe de bacterii:

- Forme sferice (coci)
- Forme alungite (bastonașe)
- Forme încurbate/spirale
- Bacterii polimorfe: *Actinomyces*, *Rickettsia*, *Chlamydia*, *Mycoplasma*

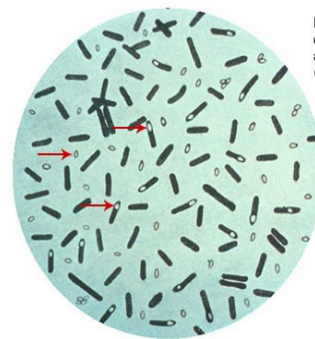
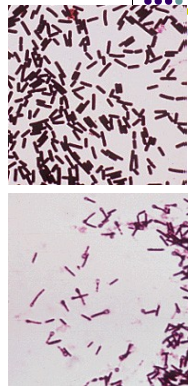
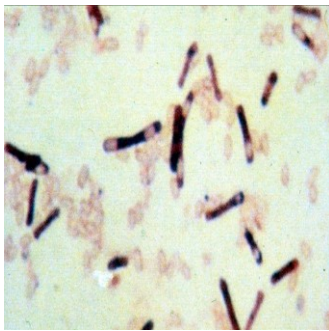
Formele sferice (coccus)

- Micrococi** (Micrococcus) – celule izolate
- Diplococi** (Diplococcus) – perechi (neisserii - bob de cafea, pneumococi - lanceolati)
- Streptococi** (Streptococcus) - lanțuri
- Tetracoci** (Tetracoccus) – câte 4 celule
- Sarcine** – (Sarcina) – pachete din 8-16-32 coci
- Stafilococi** – (Staphylococcus) – grămezi neregulate de coci



● Formele alungite (bastonașe)

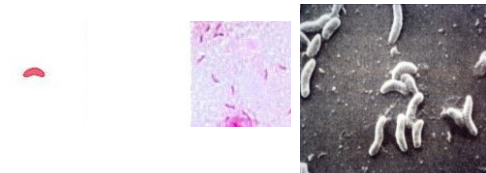
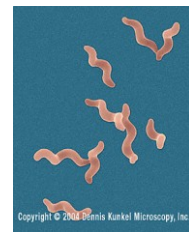
1. **Bacterium** – bastonașe cu capetele rotunjite, nu formează spori (Mycobacterium, Corynebacterium, enterobacterii, etc)
2. **Bacillus** – bastonașe mari cu capetele retezate, formează spori ce nu depășesc diametrul celulei (ex.: *Bacillus anthracis*). Posibilă aranjarea în lanțuri - streptobacili
3. **Clostridium** – bastonașe cu capetele rotunjite, formează spori ce depășesc diametrul celulei (ex.: *Clostridium tetani*, *Clostridium botulinum*, *C. perfringens*, etc)

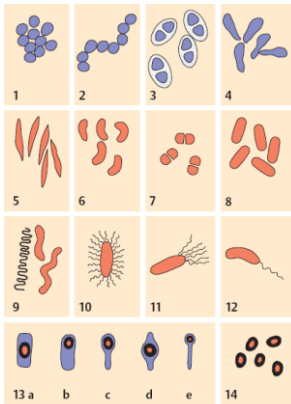
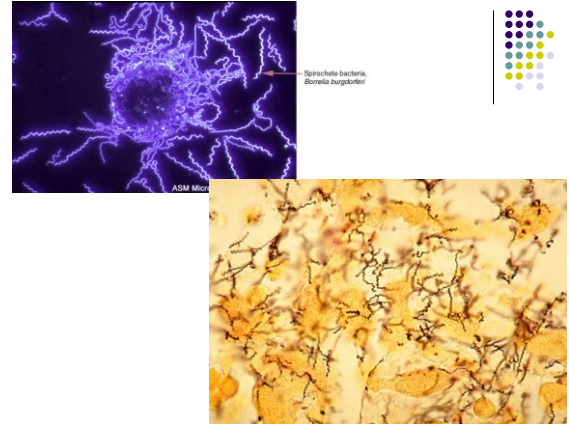
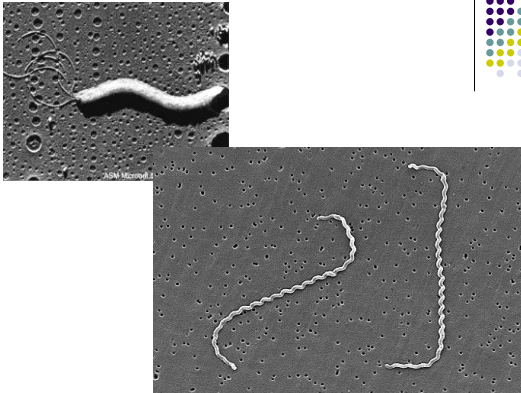


Red arrows indicate
endospores
and spores of
Clostridium botulinum

- **Formele încurbate (spiralate)**

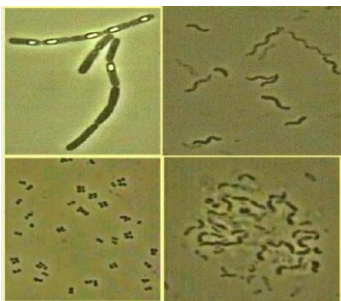
1. **Vibrio** – bastonașe încurbate (1/2 spirală, aspect de virgulă) (ex.: *Vibrio cholerae*)
2. **Campylobacter, Helicobacter** – 2 spire, aspect de “pasăre în zbor” (ex.: *Campylobacter jejuni*)
3. **Spirillum** – celule spiralate rigide
4. **Spirochaeta** – celule spiralate, cu 5-25 spire, flexibile (ex.: *Treponema*, *Leptospira*, *Borrelia*)





EXAMENUL MICROSCOPIC

- Studiază morfologia și structura bacteriilor, precum și caracterele lor tinctoriale.
- Examenului microscopic pot fi expuse lichide biologice sterile (sânge, LCR, lichid pleural), precum și prelevate nesterile din căile respiratorii, tubul digestiv, aparatul uro-genital, tegument, urechi, ochi, etc
- Examenul microscopic poate fi efectuat:
 1. În **stare nativă** (preparate umede, necolorate: "între lamă și lamelă", "picătură suspendată"). Studiază morfologia, mobilitatea bacteriilor, unele activități (ex.: sporogeneza)
 2. În **frotiuri** (preparate fixate și colorate)



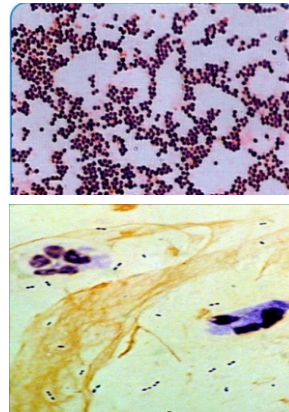
Prepararea frotiului

1. **Etalarea** materialului microbial (produs patologic, cultură microbială) în strat subțire pe suprafața unei lame de sticlă degresată
2. **Uscarea**
3. **Fixarea** (termică, chimică). Omoară microbii și mărește afinitatea lor pentru coloranți
4. **Colorarea**. Asigură contrastul dintre microbi și fondul preparatului
5. **Examinarea** frotiului la microscopul optic cu imersie

Caracter tinctorial – capacitatea bacteriilor de a fixa diferiți coloranți

Coloranții **bazici** (violetul de gențiană sau de metil, **fucsina** bazică, **albastrul de metilen**, **vezuvina**, **chrizoidina**, etc) au afinitate pentru structurile acide ale celulei bacteriene

Tipuri de colorații: simple, complexe (diferențiale, speciale)



ETAPELE ISTORICE DE EVOLUȚIE A MICROBIOLOGIEI

I – EMPIRICĂ (până în sec. XV)

Hippocrate considera că maladiile infecțioase sunt cauzate de modificarea aerului prin miasme

Girolamo Fracastoro, de la Universitatea din Padua, a presupus existența unei "*seminaria contagiosus*", mi/o infectante, capabile să se multiplice

II – MORFOLOGICĂ (sec. XVI – XVIII)

Antonie van Leeuwenhoek, 1673 – prima observare și descriere a mi/o

III - FIZIOLOGICĂ (sec. XIX)

Theodor Schwann și Frantz Schultze discreditează teoria generației spontane. Louis Pasteur, Robert Koch confirmă teoria germenilor.

Louis Pasteur – a demonstrat specificitatea proceselor fermentative (bolile vinului), a identificat agenții cauzali ai bolii viermilor de mătase, a preparat vaccinuri eficiente pentru prevenirea turbării, antraxului, holerei găinilor, a susținut necesitatea sterilizării instrumentelor, bandajelor, etc.

Robert Koch – a utilizat frotiul, a introdus mediile de cultură solide, a izolat agentul antraxului și al tuberculozei. Autor al teoriei de confirmare a rolului etiologic al unui mi/o (postulatele lui Koch)

Iliia Mecinicov – argumentează rolul antagonist al florei intestinale normale, a descoperit fagocitoza și rolul inflamației în apărarea antimicrobiană.

Alexander Fleming – descoperă penicilina

Emil Roux – propune mediul de cultivare a agentului difteriei, obține și utilizează serurile imune antitoxice contra difteriei, fondator al imunității umorale

Victor Babeș – fondator al microbiologiei în România, autor al primului manual de microbiologie. Studiază rabia.

Ion Cantacuzino – a studiat patogeniza holerei, tuberculozei, vaccinul și vaccinarea antiholerică. Fondatorul școlii de microbiologie din România