

ASPECTE ALE DIAGNOSTICULUI DE LABORATOR ÎN BOALA DIAREICĂ PRODUSĂ DE PATOTIPURI ENTERICE DE *ESCHERICHIA COLI*

Dr. Maria Nica

Laboratorul de Microbiologie Clinică,
Spitalul Clinic de Boli Infecțioase și Tropicale „Dr. V. Babeș”, București

REZUMAT

Prin extindere epidemică, boala diareică acută (BDA) este una dintre cauzele majore de îmbolnăvire și deces la copii, în țările în curs de dezvoltare. Enteritele bacteriene constituie un domeniu evolutiv, unde zonele de umbră sunt încă numeroase, cu etiologie insuficient cercetată, ceea ce incită microbiologul să ia o atitudine critică în conduita investigației etiologice. Familia Enterobacteriaceae reprezintă o cauză majoră de producere a bolii diareice, iar genul *Escherichia* pare să fie „redescoperit”. *E. coli* devine capabilă a produce o serie de factori de virulență și patogenitate noi, ca: adevizine, invazine, toxine. Importă gene de rezistență la antibiotice, devenind lider în portajul de gene care codifică sinteza de beta lactamaze cu spectru extins (ESBL). Identificarea și emergența patotipurilor agresive (*E. coli* enteropatogen – EPEC, *E. coli* enterohemoragic – EHEC, *E. coli* enteroinvaziv – EIEC) în etiologia bolii diareice, a impus metode noi de investigare, confirmate prin metode moderne, de mare certitudine: ELISA, culturi celulare, metode de biologie moleculară.

Cuvinte cheie: sindrom diareic infecțios, patotip enteric, coprocultură orientată

ABSTRACT

Acute diarrheal disease is a major cause of morbidity and mortality in children, in developing countries, due to epidemical expansion. Bacterial enteritis issues are intriguing and interesting, because of the numerous unrevealed areas as insufficiently defined etiology. These are incentives for specialist in clinical microbiology that needs to adopt a critical attitude in the etiological investigation. Enterobacteriaceae family represents a major cause for diarrhea syndromes and *E. coli* genus seems to be “rediscovered”. *E. coli* is still able to produce some new virulence and pathogenicity factors: adherence factors, invasins, toxins. *E. coli* genus is leader in gene-carrying for extended-spectrum beta-lactamase (ESBL), because its capability of acquisition of resistance genes for antibiotics. The aggressive serovars identification and emergence in diarrhea etiology (*E. coli* enteropathogen-EPEC, *E. coli* enterohaemorrhagic-EHEC, *E. coli* enteroinvasive-EIEC) has led to new identification tools, confirmed through modern methods, like as: ELISA, cellular cultures, and molecular biology.

Key words: intestinal infections, diarrheagenic *E. coli*, Shiga toxin - producing *E. coli*/ STEC

INTRODUCERE

Sindromul clinic al bolii diareice acute (BDA) infecțioase este determinat de un număr mare și mereu în creștere de agenți etiologici. Sindromul diareic infecțios implică preocupări în diverse domenii: clinice – prin intensitatea și gravitatea manifestărilor; epidemiologice – prin manifestările extensive (endemice și, mai ales, epidemice) ale procesului epidemiologic; sănătatea publică – prin nivelul de morbiditate și mortalitate, și îndeosebi a costurilor ridicate ale asistenței medicale.

Boala diareică este mereu și pretutindeni prezentă, de regulă cu manifestări benigne și

autolimitante, nu însă și în rândul copiilor, al celor până la 5 ani, în rândul bătrânilor și al pacienților imunodeprimați. Prin extindere epidemică, BDA este una dintre cauzele majore de îmbolnăvire și deces la copii, în țările în curs de dezvoltare (8).

Enteritele bacteriene constituie un domeniu evolutiv, unde zonele de umbră sunt încă numeroase, cu etiologie insuficient cercetată, ceea ce incită microbiologul să ia o atitudine critică în conduita investigației etiologice.

Cerințele actuale de identificare a bacteriilor enteropatogene nu se rezumă doar la determinarea apartenenței la o specie bacteriană, ci trebuie să pună în evidență factorii de agresivitate identificați

și la grupări etichetate până nu demult ca „sa-profiți”.

Familia *Enterobacteriaceae* reprezintă o cauză majoră de producere a bolii diareice, iar genul *Escherichia* pare să fie „redescoperit” (4).

Transferul de material genetic conferă tulpinilor de *E. coli* proprietăți patogenice noi, periculoase, fiind necesară o disociere între diagnosticul taxonomic și diagnosticul de patogenitate. Identificarea unei tulpini ca fiind *E. coli* nu prezintă nici un interes dacă nu a fost completată cu un inventar de posibili factori (sau gene) de patogenitate.

Astfel, *E. coli* devine capabilă a produce o serie de factori de virulență și patogenitate noi, ca: adevine, invazine, toxine. Importă gene de rezistență la antibiotice, devenind lider în portajul de gene care codifică sinteza de beta lactamaze cu spectru extins (ESBL).

Noțiunea de patogenitate este relativă, deoarece multe microorganisme se pot situa la originea mecanismelor bolii diareice, dacă apărarea imunitară a organismului este alterată. Astfel, manifestările digestive sunt frecvente la bolnavii infectați HIV. În explorarea bolii diareice la acești pacienți, o atenție cu totul particulară trebuie acordată și altor agenți etiologici, cum ar fi: protozoare, virusuri, levuri, mycobacterii, deoarece deficitul imun determină o susceptibilitate crescută la infecții, legată de germenii reputați comensali, care pot deveni patogeni ocazionali de temut (8).

Odată cu analiza mecanismelor moleculare de patogenitate, legate de structura antigenică și a factorilor de virulență, s-a realizat următoarea clasificare a patotipurilor de *E. coli* diareigene, agresive intestinal:

1. Patotipul *E. coli* enteropatogen (EPEC);
2. Patotipul *E. coli* enterotoxigen (ETEC);
3. Patotipul *E. coli* enteroinvaziv (EIEC);
4. Patotipul *E. coli* enterohemoragic (EHEC);
5. Patotipul *E. coli* enteroagregativ (EAaggEC);
6. Patotipul *E. coli* difuz aderent (DAEC):

DATE EPIDEMIOLOGICE CARE INFLUENȚEAZĂ CONDUITA ÎN DIAGNOSTICUL BACTERIOLOGIC

S-a introdus noțiunea de „zonă de influență epidemiologică” (ZIE) (4,5), de care depinde laboratorul de analize bacteriologice și noțiunea de „ecologie bacteriană”, pentru a defini parametrii care caracterizează coprocultura standard și pe cea complementară. Deosebiri între zonele temperate și calde, diareea copilului și cea a adultului, nivelurile diferite de dezvoltare economică, pot constitui criterii majore de aplicare a unei coproculturi standard sau complementare.

COPROCULTURA STANDARD ȘI COMPLEMENTARĂ (1,2)

Conceptul de coprocultură tradițională este uneori confundat cu acela de coprocultură standardizată, în timp ce coprocultura complementară se poate confunda cu cercetarea factorilor de virulență. Acest lucru provine din faptul că inițial, analiza „standardizată” s-a suprapus studierii speciilor bacteriene enteropatogene prin tehnici tradiționale de bacteriologie. În plus, bacteriile reputate comensale, care au câștigat proprietăți enteropatogene, sunt identificate prin metode complementare, cercetând factorii de virulență elaborați.

Din rațiuni legate de raportul eficiență-cost, laboratorul nu poate cerceta sistematic, de rutină, toți agenții susceptibili a fi enteropatogeni. În funcție de circumstanțe, microbiologul derulează investigațiile progresiv, parcurgând etapele coproculturii standard și ale celei complementare, două tehnici care nu se exclud una pe cealaltă, ci doar se completează. Fără indicațiile precise ale clinicianului, microbiologul este cel care decide examenele ce trebuie efectuate.

Coprocultura standardizată pentru copil și adult: trebuie să constituie un „standard local” care se bazează pe metodologia și protocoalele alese conform caracteristicilor epidemiologice ale zonei de activitate a laboratorului: bacteriile reputate enteropatogene din această zonă, nivelul socio-economic, obiceiurile alimentare, evenimentele istorice (război, migrații populaționale), contextul geografic particular (zone litorale, deltă, munți). În zonele temperate, această analiză se bazează doar pe studierea patogenilor ca *Salmonella* și *Shigella*, în timp ce în zonele intertropicale, este necesar a include în coprocultura standardizată și alte bacterii, al căror nivel de incidență este crescut: ex. *Vibrionaceae*.

Coprocultura complementară: este în principal practică în caz de eșec al analizei standardizate sau dacă pacientul a contractat boala diareică în afara zonei de influență epidemiologică, de care depinde laboratorul (diaree după un sejur într-o zonă endemică, unde etiologia bacteriană poate fi diferită de cea din care provine pacientul).

În realizarea efectivă a unei coproculturi, se țin cont de:

- bacteriile a căror virulență este legată de caracterele de specie, care beneficiază de identificare prin metode tradiționale (caractere enteropatogene constitutive și exprimate). Stabilitatea caracterelor de patogenitate asociată cu anumite proprietăți culturale,

metabolice sau structurale, au permis o analiză bazată pe tehnici de identificare morfolo-gică, biochimică și antigenică,

- bacteriile cu un caracter enteropatogen câștigat și/sau parțial sub control cromosomic a căror identificare se bazează pe punerea în evidență a factorilor de virulență exprimați. Eventualele caractere culturale și proprietățile biochimice sau antigenice nu permit deosebirea lor de flora endogenă; se poate suspecta prezența unor factori de patogenitate particulari, rămânând un diagnostic de prezumpție. Observarea riguroasă a izolatelor asociată cu anumite manifestări clinice și o bună cunoaștere a condițiilor epidemiologice locale, permit suspectarea prezenței acestor bacterii.

ALEGEREA METODOLOGIEI POTRIVITE

Coprocultura beneficiază azi de o evoluție tehnologică calitativă și cantitativă prin numărul de factori de virulență ce pot fi identificați, dar și prin dezvoltarea metodelor rapide de identificare în mai multe eșantioane de produs. Astfel există metode de diagnostic direct pentru anumite bacterii sau pentru factorii de virulență pe care îi exprimă. Aceste tehnici se bazează pe principii diverse (imunodiagnostic, hibridizare moleculară, amplificare genică), iar microbiologul trebuie să evalueze contextul clinic sau epidemiologic pentru a pune în practică aceste metode rapide: urgența de a demonstra prezența toxinelor din familia Shiga în prelevate fără a aștepta izolarea bacteriană.

OBȚINEREA UNUI REZULTAT CARE SĂ PERMITĂ MEDICULUI INDICAȚIA UNUI TRATAMENT ADECVAT

Intenția medicului microbiolog este de a stabili dacă este prezentă sau nu o bacterie enteropato-genă.

Identificarea unei bacterii cu caractere de enteropatogenitate sau punerea în evidență a unui factor de virulență cunoscut, nu pune în general probleme de interpretare. O bacterie este suspectată a avea rol enteropatogen dacă este izolată în cultură pură sau predominantă (dismicrobism marcat) și contextul epidemiologic este evocator.

Dacă nici un factor de virulență cunoscut nu a fost identificat, clinicianul împreună cu microbiologul integrează datele clinice, epidemiologice și microbiologice pentru a interpreta rezultatele disponibile, știindu-se că virulența enterică este

un fenomen evolutiv și că nu toți factorii de virulență sunt cunoscuți.

Rezultatul trebuie să cuprindă: rezultatele examinărilor macroscopice, microscopice, germenii și factorii de virulență studiați, prezența sau absența lor trebuie menționată, precum și metoda de lucru aplicată. Antibiograma trebuie efectuată pe germeni identificați ca potențiali patogeni.

METODOLOGIA INVESTIGAȚIILOR DE LABORATOR

În practica actuală a diagnosticului bacteriologic al sindromului diareic sunt conturate două tipuri de metodologii:

I. Metodologii convenționale: bazate pe postulatele lui Koch, care urmăresc „izolarea și identificarea agentului cauzal“, deci cultivarea și caracterizarea sa fenotipică: coprocultura (1,2).

Recoltarea și însămânțarea prelevatelor

Prelevarea eșantioanelor de materii fecale se efectuează la debutul bolii (faza acută), atunci agenții patogeni sunt în număr mare în scaun și, desigur, înaintea administrării unui tratament cu antibiotice sau pansamente digestive.

Cantitatea minimă prelevată trebuie să fie de aproximativ 10 grame. La un pacient în episod acut diareic sunt necesare 2 sau 3 eșantioane, în timp ce pentru determinarea portajului cronic (în medicina preventivă) este considerată suficientă o singură probă.

Recomandări de care trebuie să se țină cont:

- analiza bacteriologică a materiilor fecale trebuie să pornească, teoretic, de la examinarea scaunului emis spontan sau, când acest lucru nu este posibil, examinarea a 3 tamponuri rectale,
- biopsia de mucoasă rectală sau colică, precum și biopsia de ganglion mezenteric, efectuată prin rectoscopie, se tratează ca și materiile fecale,
- în cazul copiilor bolnavi, prelevarea scaunului poate fi posibilă și din scutece, lenjerie; o atenție deosebită trebuie acordată prelevării de mucus, lambouri de epiteliu, striuri de sânge.

Recoltarea de materii fecale prin emisie naturală (spontană)

Materiile fecale emise spontan trebuie recoltate în recipiente sterile de unică utilizare, comerciale, suficient de mari, închise ermetic, prevăzute cu o

spatulă pentru prelevarea produsului. Se aleg fragmente purulente, mucoase, sanghinolente – dacă acestea există. Eșantionul odată sosit în laborator este recepționat, înregistrat și prelucrat în mai puțin de o oră de la recoltare.

Tamponul rectal

Prelevarea cu tamponul se practică la copii nou-născuți sau adulți, în contextul clinic al unui sindrom dizenteric, când bacteriile invadează mucoasa recto-sigmoidiană, iar izolarea acestora de pe mucoasa rectală este recomandată. Tamponurile sterile se umectează în soluție de transport, lipsită de activitate bacteriostatică. Se recoltează minim 3 tamponuri pentru: examen microscopic, însămânțare pe medii neselective și pe medii de îmbogățire.

Tamponamentul rectal nu amplifică frecvența izolării bacteriilor enteropatozene.

CONSERVAREA EȘANTIONULUI RECOLTAT

În măsura în care este posibil, prelevatele sunt expediate la laborator în ora următoare recoltării. Această cerință, adesea neglijată, a stat la originea unui număr important de eșecuri ale diagnosticului bacteriologic. După emisia de materii fecale se petrec următoarele fenomene:

- prelevatul se acidifică în 30 minute de la recoltare; această modificare de pH periclitează supraviețuirea bacteriilor enteropatozene,
- proliferarea bacteriilor comensale duce la izolări aleatorii și face dificil studiul dismicrobismului.

Eșantioanele de materii fecale care nu pot fi prelucrate în vederea diagnosticării (examinare microscopică, însămânțare culturi), în intervalul de o oră, trebuie refrigerate la 4°-8°C, evitând deshidratarea și scăderea volumului. În aceste condiții, probele nu trebuie să stea mai mult de 4h.

Este de menționat că se preferă utilizarea unui mediu de transport pentru germenii care supraviețuiesc mai puțin de 2 ore. Bacteriile enteropatozene rezistă câteva zile (o săptămână) în mediu de transport, la o temperatură de 15°C. Nu există un mediu de transport ideal ce ar permite prezervarea tuturor bacteriilor potențial enteropatozene.

MEDII DE TRANSPORT

La o temperatură exterioară de peste 20°C este de preferat a se refrigera mediul de transport însămânțat, la o temperatură de 4°-8°C. Medii de transport utilizate au fost:

- mediul Cary-Blair recomandat și utilizat de rutină în laboratoarele din țara noastră, pentru *Salmonella*, *E. coli*, *Vibrionaceae*, *Yersinia enterocolitica*,
- soluție salină glicerolată și tamponată (în cazul sindromului dizenteriform) pentru *Shigella spp.*, *E. coli* EIEC.

EXAMINAREA MACROSCOPICĂ

Această examinare nu trebuie neglijată, pentru că orientează diagnosticul bacteriologic și decizia de a pune în practică o tehnică particulară de lucru. În funcție de aspectul macroscopic al prelevatului, se poate decide izolarea pe un mediu cu sorbitol a *E. coli enterohemoragic* – EHEC, cercetarea unei bacterii invazive sau producătoare de citotonină, utilizarea de medii de îmbogățire.

Principalele aspecte ale unui scaun anormal sunt:

Mirosul:

- fecaloid (salmoneloze, shigeloze, campilobacterioze),
- fetid: (caracteristic *V. cholerae*, *E. coli* enteropatozen),

Culoarea:

- verzuie (*V. cholerae*),
- galben necaracteristică (*E. coli*, *Salmonella*),
- roșu-viu („sindromul scutecului roșu“ – colonizare anormală cu *Serratia marcescens* la nou-născut, rarismă),
- hemoragică-sindrom enterohemoragic (EHEC, EIEC, *Shigella*).

Aspectul:

- moale, fecaloid neformat (*Salmonella*, *Campylobacter*),
- moale, cu grunji fecaloizi (*Yersinia*, *Aeromonas*),
- lichid ca apa de orez, nefecal (*Vibrio*, *E. coli* enterotoxigen),
- muco-sanguinolent (*Shigella*),
- hemoragic cu lambouri de epiteliu (*E. coli* enterohemoragic),
- mucopurulent și sanghinolent sau scaun înglobat în mucus (*Shigella*, *E. coli* enteroinvaziv) (1,2).

Aceste observații relevă mecanismul fiziopatologic legat de factorii de virulență exprimați de bacterie precum și de faza bolii.

OBSERVAȚII MICROSCOPICE

După studierea buletinului însoțitor al prelevatului și examinarea macroscopică, se trece la examinarea microscopică. Se efectuează pe două

frotiuri (albastru metilen și Gram) și un preparat proaspăt. În acest stadiu, s-au putut emite uneori, informații preliminare asupra tipului de proces fiziopatologic probabil, foarte important pentru orientarea clinicianului.

Frotiul colorat albastru metilen: se urmărește prezența granulocitelor, celulelor epiteliale, hematiilor, apreciate ca fiind caracteristice într-un proces invaziv.

În cazul unei salmoneloze, numărul de leucocite este adesea inferior celui de 20/câmp. Sindromul dizenteric se caracterizează prin prezența a > 50 leucocite/câmp, în grămezi, hematii și celule degradate grupate, macrofage. În cazul diareei cu *Campylobacter*, exudatul este format din leucocite, hematii și germeni cu morfologie și mobilitate caracteristică.

În holeră, infecții cu ETEC, viroze, numărul de PMN este foarte redus: 2-5/câmp.

Frotiul colorat Gram: este mult mai sărac în informații din cauza abundenței florei Gram negative. El pune în evidență un eventual dismicrobism, dezechilibru al florei bacteriene, apreciază densitatea relativă a diferiților germeni, permite observarea prezenței (majoritare sau nu) unei morfologii bacteriene caracteristice. Aspectul monomorf și dominanța (>75%) unei categorii de germeni orientează diagnosticul bacteriologic. Totuși:

- flora Gram negativă dominantă cu bacili incurbați sub formă de virgulă, indică posibil *Campylobacter spp.* ca agent etiologic,
- flora Gram pozitivă: coci Gram pozitivi în tetrade și grămezi (posibil toxiinfecție alimentară cu *Staphylococcus aureus*), bacili Gram pozitivi cu capete tăiate drept, așezați frecvent în lanțuri scurte, cu spor oval central sau subterminal (posibil toxiinfecție bacteriană cu *Bacillus cereus*), bacili Gram pozitivi în scaunul pacienților sub terapie orală cu antibiotice (posibil *Clostridium difficile*).
- dominantă fungilor.

Absența leucocitelor și a hematiilor sugerează prezența unei diaree al cărei mecanism fiziopatologic se bazează pe un proces citotonic ce orientează etiologia spre bacterii care nu alterează vilitățile sau nu implică emisia de citotoxine în procesul patologic (4).

PREPARATUL PROASPĂT

Un eșantion de materii fecale (în funcție de consistență, se practică și o diluție în ser fiziologic) sau tamponul rectal (mucus, sânge) se suspensio-

nează într-o picătură de ser fiziologic și se aplică pe două lame curate. Preparatul proaspăt se examinează imediat, cu obiectiv 40X. Se are în vedere examinarea coproparazitologică, calitatea digestiei și identificarea mobilității bacteriene majoritare și caracteristice: *Campylobacter*, *Vibrionaceae*, care orientează etiologia.

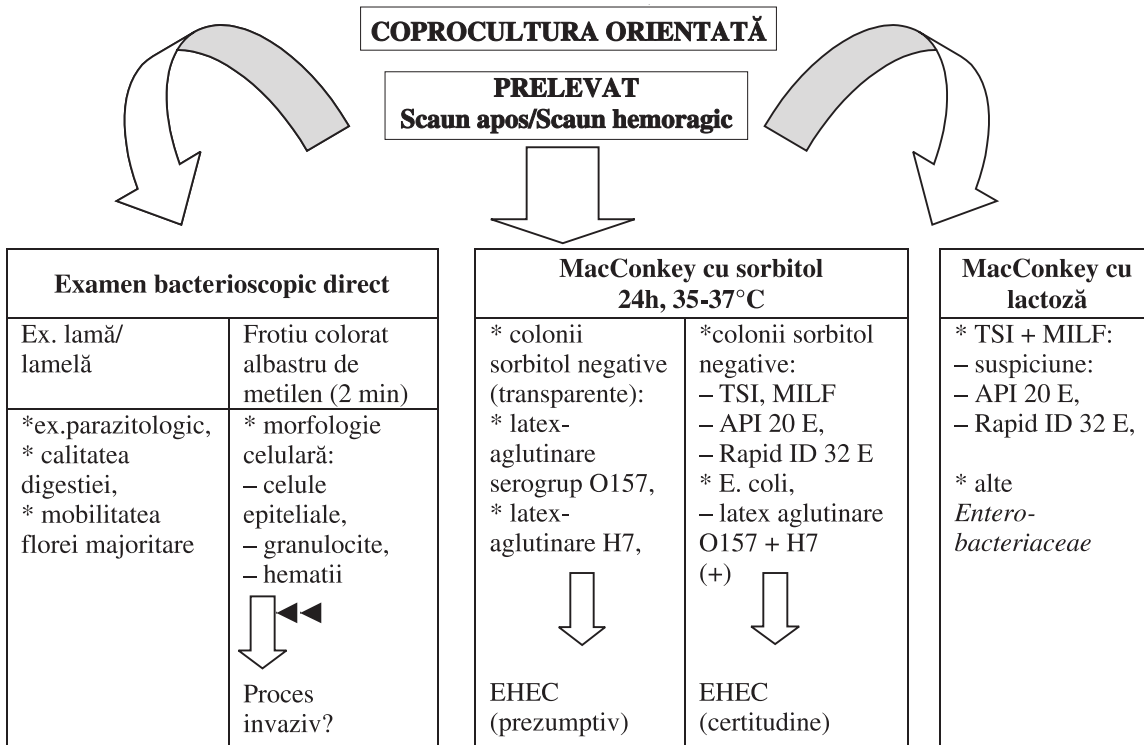
IZOLAREA *E. COLI*, ÎN CULTURĂ PURĂ

Constă din însămânțarea prelevatului direct pe mediile selective, pentru obținerea de colonii izolate caracteristice, în scopul identificării lor. Mediile selective sunt întotdeauna medii solide (agari-zate), cu componente nutritive, factori selectivi și diferențiali.

Identificare preliminară: are ca scop încadrarea taxonomică a izolatelor printr-un minim de teste, compus din asocierea de medii multitest, TSI, MIU, MILF. *E. coli* produce gaz din glucoză în cantități moderate, nu produce H₂S și acidifică partea înclinată a mediului TSI (lactoză/zaharoză). Este, în general, o grupare de germeni mobili (sunt frecvente și tulpinile imobile), care produce constant indol și variabil, lizindecarboxilază; nu produc fenilalanindeaminază.

Coprocultura orientată (1,2): În prezența unui scaun de consistență redusă, cu aspect mucosanguinolent, în context epidemiologic, dar și cu examen microscopic de aspect caracteristic (neutrofile, hematii, preponderență de bacili Gram negativi monomorfi), orientarea diagnosticului de laborator trebuie să se facă spre izolarea și identificarea *E. coli* enterohemoragic (EHEC/STEC-Shiga-Toxin *E. coli*). Pentru aceasta, se urmărește schema de diagnostic:

- scaun diareic hemoragic sau, eventual, apos (în faza inițială, de diaree apoasă, febrilă, șansa izolării EHEC este mai mare, probabilitatea izolării tulpinilor scade după apariția scaunelor hemoragice),
- însămânțare, izolare bacteriană pe mediu cu sorbitol. Prepararea mediului MacConkey cu sorbitol: la MacConkey, mediu de bază (fără lactoză), se adaugă 1% sorbitol.
- selectarea coloniilor sorbitol negative (incolore pe MacConkey cu sorbitol),
- o parte dintre colonii sunt supuse unei reacții de aglutinare, pentru a identifica *E. coli* serogrup O157 (latex sensibilizat sau aglutinare directă cu ser anti O157).



Identificarea de certitudine: s-a bazat pe caracterizarea exoenzimatică a izolatelor.

Se pot folosi diverse metode automate de identificare și anume: galerii API 20E, kituri cu citire rapidă, ID32E, precum și sistem VITEK 2 Compact. Întrucât costurile pentru identificare sunt relativ înalte, pentru identificarea izolatelor dintr-o coprocultură (3+10 colonii), în practică s-a preferat „screeningul” prealabil al coloniilor suspecte pe baza asocierii mediilor multitest TSI, MIU, MILF, citrat Simmons.

Sistemul API: sistem standardizat de identificare a germenilor din familia *Entero-bacteriaceae*, utilizează teste biochimice miniaturizate, precum și o bază de date adiacentă.

O condiție esențială în obținerea unei identificări corecte, este utilizarea de cultură bacteriană pură, provenită dintr-o singură colonie izolată, pe mediu neinhibitor.

Sistemul VITEK 2 Compact: sistem automat cu performanță ridicată, care identifică și testează sensibilitatea la antibiotice a bacteriilor izolate din prelevatele clinice.

Citirea cardurilor se bazează pe metoda colorimetrică, pentru identificarea speciilor bacteriene și metoda turbidimetrică, pentru testarea rezistenței la antibiotice.

Identificarea biochimică trebuie completată de o identificare serologică, pentru precizarea apartenenței la un serogrup „O”, utilizând seruri aglutinante polivalente și monovalente.

Metodologii neconvenționale: ce pun în evidență prezența agentului etiologic în prelevat, prin identificarea unor elemente structurale (antigenice ori genetice) caracteristice (3,9,10).

Metode imunologice (identificarea structurilor antigenice caracteristice):

- imunofluorescența (directă, indirectă),
- aglutinare (latex-aglutinare, coaglutinare),
- imunodifuzie, imunobloting,
- imunoenzimatice,
- alte imunoteste.

Metode genetice (recunoașterea agentului etiologic):

- amplificare genică,
- hibridare acizi nucleici.

IDENTIFICAREA DE CERTITUDINE

Identificarea patotipurilor de *Escherichia coli*: în tabelul 1 sunt grupate metodele ce pot fi utilizate pentru identificarea fenotipurilor diareigene. Alegerea metodelor în practică depinde de accesibilitatea laboratoarelor la unul sau mai multe mijloace de testare (1,2).

Testele imunoenzimatice și latex aglutinarea s-au impus îndeosebi prin sensibilitatea și accesibilitatea lor, pentru detectarea toxinelor la patotipurile ETEC și EHEC (4,5).

Încadrarea serologică într-un grup „O” este frecvent aproximativă, din cauza neconcordanței între activitatea patogenă și apartenența la serovar.

Tabelul 1
Identificarea tipurilor patogene enterice de *Escherichia coli* (2)

PATOTIP	METODE				
	IN VIVO	IN VITRO			
		Serotipare	Citopato- genitate (linii celulare)	Imunologice	Genetice (PCR)
ETEC	Iepure: – ansa ligaturată, – factor de permeabilitate cutanată, Șoarece n.n. – inoculare intra-gastrică	–	CHO -Globulizare Y1 -picnoză	LTI: – latex, – ELISA, – imuno-difuzie. STa: – ELISA	<i>lt I</i> <i>st I</i>
EHEC	Purcel: -inoculare intragastrică	O157 H7	Vero: – leziuni tip A/E	– aglutinare latex, – ELISA: SLT 1 și 2 – sero-neutralizare	<i>Slt IB</i> <i>eae A</i>
EIEC	Cobai: – sac conjunctival (Test Sereny)	28,29,124, 136,143,144 152,164,167	HeLa: – dezvoltare intracelulară	– aglutinare latex	<i>ipa H</i>
EAggEC	–	–	HEP2, HeLa: – agregare	–	Plasmid EAggEC
EPEC	–	26,55,86, 111,114,11912 5,126,127128, 142,158	HEP2, HeLa: – aderență difuză, – leziuni tip A/E	Agglutinare latex	Operon <i>afa</i> , <i>eae A</i>
DAEC	–	–	HeLa- nedif. CaCo2- Aderență difuză	–	grup gene <i>afa</i>

Multe tulpini aparținând grupelor „O” listate nu dovedesc activitate patogenă, așa cum tulpini aparținând altor serogrupe pot fi enteroaderente ori enteropatogene. Chiar în patotipul EHEC, alături de serogrupul O157, cunoscut și acceptat ca patogen, au mai fost incluse recent alte două serogrupe: O126 și O111, altădată acceptate ca EPEC (5,6).

Citotoxicitatea: pe diverse linii celulare este accesibilă laboratoarelor cu o dotare corespunzătoare, care pot produce, întreține și testa culturi celulare. Aprecierea efectului citopatogen, aderent difuz sau localizat, agregativ etc., se face corect de persoane cu experiență (4).

INVESTIGAREA CARACTERELOR GENOTIPICE DE ENTEROPATOGENITATE LA *E. COLI* (3,9,10)

Tehnica de hibridizare moleculară este utilizată în identificarea tulpinilor patogene de *E. coli*. Folosirea sondelor ADN în detectarea genelor codante pentru entero-toxinele produse de tulpinile patotipului ETEC, respectiv toxina termolabilă (LT) și cea termostabilă (ST), a revoluționat studiul acestor microorganisme, contribuind la înlocuirea

unor metode fenotipice, care se dovediseră greoaie și costisitoare.

Metoda cel mai frecvent utilizată este hibridizarea pe colonii, care necesită, în prealabil, izolarea tulpinilor de *E. coli* din produsul patologic (materii fecale). Deoarece atât tulpinile patogene, cât și cele comensale prezintă caractere tinctoriale, culturale și exoenzimatiche identice, există riscul pierderii tulpinii de interes clinic în cadrul etapelor de diagnostic bacteriologic clasic.

Identificarea prezenței genelor de virulență prin hibridizare se poate realiza și folosind cultura primară, obținută direct din produsul patologic (ex. materii fecale). Teoretic, metoda este mai avantajoasă datorită rapidității, fiindcă eludează etapa de izolare, cât și a sensibilității, tulpina patogenă fiind detectată chiar în condițiile în care nu domină cantitativ. Se susține că pragul limită al concentrației patogenului țintă trebuie să fie de aproximativ 100.000-1.000.000 UFC/g materii fecale pentru ca rezultatul hibridizării să fie edificator. În plus, nu întotdeauna folosirea bloturilor, efectuate direct din produsul patologic, ușurează munca de laborator, deoarece fără o izolare a tulpinii, deci fără

cultura pură, nu se poate realiza concomitent și analiza fenotipică a acesteia.

Tehnologia PCR a pătruns cu succes în laboratorul clinic, răspunzând prin caracteristicile sale exigențelor diagnosticului microbiologic definite prin rapiditate, sensibilitate și specificitate. Protocoalele PCR concepute pentru a permite diagnosticul la nivel de patotip *E. coli* ținesc individual sau concomitent (PCR multiplex) structuri genetice cromosomale sau plasmidice codante pentru factori de virulență (adezine fimbriale, afimbriale, toxine, siderofori etc.). Aceste metode, deși ne-standardizate, se pot aplica atât izolatului clinic, în cultură pură, cât și direct produsului patologic (tabelul 2).

Pentru că se pretează mai bine la standardizare, varianta „real time PCR” tinde să ia locul testului PCR tradițional, datorită capacității acesteia de a cuantifica și identifica în timp real infecția/contaminarea cu tulpini patogene de *E. coli*. (7).

Atenția se concentrează în principal pe tulpinile O157:H7 și non O157:H7 aparținând patotipului Shiga-like Toxin *E. Coli* (SLTEC), recunoscute ca deosebit de patogene pentru om. Analiza tulpinilor EHEC/SLTEC reprezintă una dintre cele mai importante aplicații PFGE, metoda fiind considerată „standardul de aur” pentru tipajul molecular al tulpinilor de *E. coli*. (3, 9, 10).

Pe lângă utilizarea ca alternativă în diagnosticul bacteriologic convențional al tulpinilor de *E. coli*, metodele moleculare și-au dovedit utilitatea în tiparea acestora în scopuri epidemiologice. Pentru a identifica tulpinile de *E. coli* cu același fond

genetic, în investigarea unor focare de toxiinfecție alimentară asociate cu consumul de apă, alimente sau în anchetele epidemiologice declanșate pentru identificarea căilor de transmitere și a factorilor de risc în cazuri izolate de boală, se aplică tehnici diverse, în funcție de avantajele pe care le oferă în respectivul context. Se folosesc următoarele metode: analiza prin PFGE, ribotipia și o serie de metode bazate pe tehnica PCR (RAPD, rep-PCR, PCR-RFLP, AFLP) (7).

Ribotipia, folosită multă vreme ca prima metodă de analiză epidemiologică, și-a demonstrat utilitatea în identificarea tulpinilor de *E. coli*. Tulpini de EPEC și SLTEC au fost studiate prin ERIC-PCR și ribotipie, în scopul evaluării metodelor din punct de vedere al specificității și reproductibilității. Tulpini aparținând la 26 de serotipuri au fost încadrate în 24 de ribotipuri și 25 de tipuri ERIC. Clonele înrudite de O55:H7 și O157:H7 au prezentat ribotipuri similare și au fost încadrate în același cluster în dendrogramă, în timp ce tulpini cu evoluție divergentă de EPEC și EHEC au fost incluse în clustere diferite. Rezultatele au demonstrat utilitatea asocierii celor două metode în studiul clonalității tulpinilor (7).

Tehnicile de biologie moleculară se recomandă prin specificitate, selectivitate și rapiditate ca metode de analiză epidemiologică. Extracția și secvențierea automată a acizilor nucleici au redus considerabil consumul de reactivi și timp de execuție, iar aparatele pentru PCR au revoluționat diagnosticul infecțiilor microbiene, reacțiile putându-se efectua direct pe produsul patologic (3,9,10).

Tabelul 2

Structuri genetice implicate în patogenitatea tulpinilor de *E. coli* diareigene

Patotip	Factor de virulență	Determinant genetic codant	Localizare
ETEC	toxina LT	<i>lt</i>	plasmid
	toxina ST	<i>st</i>	plasmid
EIEC	invazina	<i>ipaH</i>	plasmid
EHEC	toxina Stx 1	<i>stx 1</i>	bacteriofag
	toxina Stx 2	<i>stx 2</i>	bacteriofag
	enterohemolizina	<i>ehx A</i>	plasmid
EPEC	adezina BFP	<i>bfp A</i>	plasmid
	intimina	<i>eaeA</i>	cromosom
EAEC	adezina AAF/1	<i>agg</i>	plasmid
	toxina EAST 1	<i>astA</i>	plasmid
DAEC	adezine DR	<i>afa</i>	cromosom/plasmid

Legenda: BFP: bundle forming pilus, AAF/1: factor de aderență agregativă; EAST1=EAEC enterotoxina termo-stabilă;

BIBLIOGRAFIE

1. **Barzoi, Dobre, Sergiu Meica, Marian Neguț** – Toxiinfecțiile alimentare. Editura „Diacon Coresi”, cap. IX, X, XI, XII, XIV, p.311-372.
2. **Buiuc D și Neguț M** – Tratat de Microbiologie Clinică. 1999. Editura Medicală. P. 698- 770, 550- 573, 1999.
3. **Damian Maria, Codruța-Romanița Usein, Dorina Tatu-Chitoiu, et al** – Incidence of virulence-encoding genes among enteric *Escherichia coli* strains isolated from healthy subjects. Rom. Archives Microbiol. Immunol. 64 (1-4): 34-38, 2005.
4. **Germani Y** – „Les *Escherichia coli* agents d’enterites: pouvoir enteropathogene et diagnostic”. Suport de stage 24-29 nov. 1997. Institut Pasteur de Bangui.
5. **March SB and Ratman S** – Sorbitol–MacConkey medium for detection of *Escherichia coli* O157: H7 associated with hemorrhagic colitis. *J. Clin. Microbiol.* 23: 869- 872. 1986
6. **March SB and Ratman S** – Latex agglutination test for detection of *Escherichia coli* serotype O157. *J. Clin. Microbiol.* 27: 1675- 1677, 1989.
7. **Morinet F** – Reaction de polymerization en chaine (PCR) en microbiologie. *Presse. Med.*, 21, pp. 1377- 1380, 1992.
8. **Murray PR, Ellen Jo Baron, Jameas H Jorgensen, Michael A Pfaller, Robert H Yolken** – Manual of Clinical Microbiology, 8th Edition. 2003.
9. **Usein Codruța Romanița** – Teză doctorat, Universitatea de Medicina și Farmacie „Carol Davila” București, Facultatea de Medicină. Catedra de Microbiologie Epidemiologie: „Distributia și diversitatea factorilor de virulență la tulpinile de *Escherichia coli* uropatogene”, p. 80-150, 2004.
10. **Usein C, Palade A, Popovici N, Grigore L, et al** – Genetic profiles of intestinal *Escherichia coli* isolates from Romanian subjects. 17th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID) & 25th International Congress of Chemotherapy (ICC), 2007, Munich, 31.03-03.04.