

Metode si tehnici folosite in efectuarea examenului micologic

Introducere

Definitii si precizari de termeni

- Termenul generic de fung defineste o grupare de structuri biotice eucariote, imobile, unicelulare sau organizate in structuri pluricelulare, a caror evidentiere individuala necesita dispozitive optice de tipul microscopelor. In alternativa cu acest termen, dar cu aceeasi semnificatie semantica se utilizeaza si denumirile de micromiceti, ciuperci microscopice, mucegaiuri, drojdii etc. Sa facut aceasta precizare expresa pentru a accentua faptul ca obiectul de studiu al microbiologiei medicale sunt ciupercile microscopice, bioentitati capabile sa manifeste o puternica si extinsa actiune antisanogena, atat prin colonizarea substraturilor alimentare si furajera pe care le depreciaza sau carora le confera un grad inalt de toxicitate, cat si prin afectarea directa a organismelor omului si animalelor, declansand stari morbide specifice (*micoze*) a caror evolutie este de cele mai multe ori trenanta si rebela la tratament.
- Ciupercile patogene, desi nu par atat de numeroase ca cele saprobiote, paraziteaza organisme vii – plante, insecte, pesti, reptile, pasari, mamifere, om – provocand boli a caror gravitate depaseste uneori pe aceea cauzate de bacterii sau virusuri. Intre aceste doua categorii de micromiceti exista numeroase forme de trecere, intermediare; unele, considerate ca fiind parazite, pot trai in anumite faze ale dezvoltarii lor ca saprobiote, iar altele, recunoscute ca saprobiote pot deveni in anumite conditii patogene, daca intalnesc o gazda convenabila.

Terapia moderna presupune si un diagnostic de certitudine in micoze.

In acest scop se utilizeaza mai multe metode de examen paraclinic :

- testul florescentei;
- examenul microscopic al probelor patologice;
- examenul frotiurilor dupa colorare;
- insamantarea probelor patogene pe medii specifice;
- examenul caracterelor biochimice;
- examenul histologic;
- diagnosticul experimental;
- identificarea AND-ului specific;
- diagnosticul imunologic.

Testul fluorescentei cu lampa Wood

- Lampa Wood are capacitatea de a emite ultraviolete a caror lungime de unda este cuprinsa intre 330 si 365 nm. Ea este utilizata pentru evidentierea unor dermatofiti ce se gasesc pe parul si pielea animalelor. Metoda este folosita mai des la pisici care pot prezenta un parazitism subclinic cu dermatofiti.
- Cu 5-10 minute inainte de folosire, lampa Wood se aprinde, pentru a se incalzi, deoarece stabilitatea intensitatii luminii si a lungimii de unda este dependenta de

temperatura. Animalele de examinat (caini, pisici) se plaseaza in camere obscure, expunand corpul la lumina lampii Wood. Cu lampa Wood pot fi examinate de asemenea tesuturi si fragmente de par recoltate de la aceste animale. In cazul parazitismului cu *Microsporium canis* si *M. equinum* se poate observa o fluorescenta galben-verzuie data si pteridina secretata de fungi .Acest metabolit este produs de fungi in momentul invadarii active a firelor de par si nu in cazul infectiei in vitro a parului. Parul trebuie expus 3-5 minute la lumina ultravioleta, unele suse de fungi dand o fluorescenta mai slaba.

- Speciile genului *Trichopyton* nu dau fluorescenta parului, cu exceptia lui *T. schoenleinii*, care prezinta patogenitate pentru om dar aceasta este slaba si neregulata;
- Fluorescenta nu apare in cruste, scuame si in culturile de dermatofiti;
- Unele stadii de *Microsporium* nu prezinta fluorescenta sau au o fluorescenta slaba;
- Fluorescenta scade dupa aplicarea de alcool pe par;
- Unele preparate medicamentoase (iodate), aplicate anterior pe leziune, pot masca fluorescenta parului.
- Bacterii precum *Pseudomonas aeruginosa* si *Coriynobacterium minutissimum* pot da fluorescenta, dar nu de culoare verzuie precum dermatofitii;
- False reactii pozitive pot fi date de unele preparate medicamentoase (tetraciline), de cheratina, sapunuri, petrol, vaselina, par mic, fragmente de unghie.

Parul care prezinta fluorescenta se recolteaza pentru insamantare pe medii de cultura si pentru microscopie. Lipsa fluorescentei nu exclude dermatofitia.

Tabelul 1

Specia de dermatofit	Fluorescenta in lumina ultravioleta
<i>Microsporium canis</i>	+ (nu toatele susele)
<i>Microsporium equinum</i>	+
<i>Microsporium audouinii</i>	+
<i>Microsporium gypseum</i>	- sau ñ
<i>Microsporium nanum</i>	- sau ñ
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	-
<i>Trichophyton quinckenum</i>	Ñ
<i>Trichophyton simii</i>	Ñ
<i>Trichophyton verrucosum</i>	-
<i>Trichophyton tonsaureus</i>	-
<i>Trichophyton rubrum</i>	-
<i>Trichophyton ajelloi</i>	-
<i>Trichophyton schoenleinii</i>	+

- Unii autori recomanda examinarea in totalitate a suprafetei corporale a pacientilor intr-un spatiu intunecat, folosind lampa Wood mobila. Prezenta unor zone sau a unor produse biologice fluorescente constituie un prim semnal, in tentativa de a stabili diagnosticul unei microze.
- Radiatiile UV pot actiona nociv asupra structurilor anatomice ale globului ocular si de asemenea ele pot induce procese mutationale in celulele tinere, aflate in diviziune pe care o pot stimula pana la cote aberante, necontrolate. Din acest motiv, expunerea animalului la radiatiile UV va fii limitata la cateva minute, iar ochii acestuia vor fii protejati.
 - Examinarea in lumina UV, scuamele si perii recoltati de la pacienti cu microsporidie evidentiaza fluorescena albastra-verzuie sau galben-verzuie (Solcan si col,1999).Fluorescena se datoreste unor metaboli ai triptofanului elaborati de fungi. Wilkinson (1988) afirma ca tulpinile de *Microsporium canis* sunt fluorescente in proportie de 50-60%, iar alti autori (Miler si col,1989; Scott, 1989) mentioneaza ca fluorescena poate fii intalnita, dar mai rar, si la alte specii. Astfel, culoarea fluorescetei este albastra de diferite nuante pana la verde inchis in cazul speciei *Trichophyton schoenleinii* si galbena-verzuie cand infectia este produsa de *Microsporium audouinii*

Examenul microscopic direct al probelor patologice

1) Recoltarea probelor patologice

Pentru confirmarea diagnosticului de endo- sau recolteaza probe patologice (puroi, par, scuame, cruste, expectorantii, exudate, fecale, etc.) care fie sunt examinate de cel care recolteaza, fie acestea sunt trimise la un laborator de specialitate. In acest ultim caz, probele patologice recoltate vor fii trimise in cel mai scurt timp la laborator cu o nota de insotire. Acestea trebuie sa cuprinda date privind identificarea animalului (nume, specie, rasa, varsta), conditiile de viata, contactul cu alte animale, data si locul recoltarii probei, semne clinice si tipul leziunii, eventualele medicamente aplicate si rezultatul obtinut, tipul examenului cetur, diagnosticul prezumtiv.

- a) **Raclatul cutant** se recolteaza cu ajutorul unui bisturiu steril.
 - Raclarea se face de la marginea leziunii, de obicei de pe pielea aparent sanatoasa. Este preferata efectuarea unei raclari profunde pana apare o serozitate roz. O data cu crustele si scuamele se obtin, de obicei, si fragmente de par. Recoltarea se face direct pe lama, dupa ce bisturiul a fost imbibat in lactofenol, daca examinarea are loc instantaneu, sau in eprubete sau recipiente sterile, daca probele vor fi transportate la laborator. Pentru a reduce gradul de contaminare microbiana, inaintea recoltarii, pielea poate fi antiseptizata cu alcool 70%.
 - Recoltarea crustelor si scuamelor poate fi realizata si cu ajutorul unei benzi adezive transparente (schotch) care se ataseaza pe zona cu leziuni.Schotchul se desprinde si se impreuna cu materialul retinut, se aplica pe o lama pe care, in prealabil, s-a pus o picatura de lichid clarificator.
 - Daca lipsesc leziunile (de exemplu in parazitismul cu *M.canis* la pisica) se poate practica tehnica Mackenzie care se refera la piererea pielii cu o periuta de dinti sterila.Materialul patologic (scuame si par) este colectat pe o suprafata de hartie

- sau o lama.
- Scuamele recoltate din locuri diferite ale leziunii vor fi in cantitate suficienta. Recoltarea se va face indeosebi din leziunile aparute mai recent si care nu au fost tratate antimicotic. Din leziunile veziculoase sau buloase se va recolta plafonul veziculei sau al bulei.
 - b) **Probe de par** pot fii obtinute prin smulgere atat din centru, cat si de la periferia leziunii. Parul care prezinta fluorescenta, in cazul examinarii cu lampa Wood, reprezinta proba cea mai indicata a se recolta. Smulgerea parului este usor de realizat in cazul parazitismului cu *Microsporum* dar mult mai dificila in infestatia cu *Trichophyton*, parul fiind mai scurt, mai rar si mai greu de recoltat chiar si cu ajutorul pensei. In acest caz este preferabila recoltarea parului prin raclare.
 - c) **Unghiile si ghearale** se recolteaza cu ajutorul unor clesti speciali, incepand cu locul unde se termina zona sanatoasa. Uneori este necesar sa se sectioneze adanc pentru a recolta partea afectata.
 - d) **Puroiul** din abcese sau foliculite se recolteaza cu ajutorul unei seringi sau cu un tampon steril, In primul caz, zona afectata este punctiionata, iar in al doilea caz, fie se preseaza zona purulenta pentru exprimarea puroiului, fie se tamponeaza eventual traiect fistulos. Daca nu se examineaza imediat, pentru a nu se usca, in recipientul in care s-a recoltat puroiul se poate adauga putin ser fiziologic steril sau mediu Stuart, dar fara antibiotice. Probele se vor stoca la 4° C.
 - e) **Sputa si mucusul faringeal** pot fi obtinute prin aspiratie, fie cu ajutorul unor tamponne sterile. Proba recoltata se introduce in eprubete sterile, ca atare sau imersata cu mediu Stuart pentru a preveni uscarea. Probele se pastreaza la 4° C
 - f) **Secretiile nazale si vaginale** se recolteaza cu tamponne sterile ce se introduc apoi in eprubete.
 - g) Pentru recoltarea **secretiilor auriculare**, urechea este curatata, iar parul lung este taiat. Secretiile se obtin prin tamponare, avand grija sa se lucreze cat mai steril pentru a nu contamina proba
 - h) **Urina** de la animalele vi se recolteaza cu un cateter direct in eprubete sterile, iar de la cadavre cu seringi de unica folosinta.
 - i) **Fecalele** se recolteaza din rect si se aplica direct pe lama, cand examinarea are loc imediat, sau pe tamponne ce se introduc in eprubete cu solutie fiziologica si antibiotice, cand examinarea are loc mai tarziu.
 - j) Inaintea recoltarii **laptelui**, mameloanele se spala cu apa si se antiseptizeaza. Laptele (cativa mililitri) din fiecare sfert se recolteaza in eprubete sterile, dupa ce primele jeturi sunt inlaturate.
 - k) **Lichidul cerebrospinal** se obtine prin punctia lombara, iar **sangele** prin punctie venoasa. Recoltarea se face cu seringi sterile, iar materialul recoltat se depoziteaza in eprubete sau flacoane sterile.

2) Examinarea probelor patologice recoltate

Examenul microscopic direct are drept scop identificarea micetilor in probele patologice recoltate. In urma acestui examen se poate preciza pozitivitatea sau negativitatea diagnosticului, iar uneori, si specia de micet (tabelele 2 si 3).

Pentru evidentierea micetilor in probele recoltate este necesara utilizarea unor solutii clarificatoare. In acest sens se pot utiliza : hidroxidul de sodiu sau potasiu in

concentratie de 10-30%, cloral- lactofenolul, lactofenolul Amann si sulfura de sodiu in solutie hidroalcolica 10%

- Cloral lactofenolul are in componenta: cloral hidrat cristalin 20 g; fenol cristalin 10 g; acid lactic 10g; Clarificarea se obtine mai incet inasa produce mai putine artefacte, iar preparatul se poate pastra mai mult timp [3]
 - Lactofenolul Amann este compus din: fenol cristalin 10 g; acid lactic 10 g; glicerina 20 g; apa distilata 10 ml; Se poate adauga si un colorant specific albastru de anilina (bleu cotton) in proportie de 0,5%.
 - Sulfura de sodiu sol.10% : sulfura de sodiu 1 g; alcool pur 2,5 ml; apa distilata 7,5 ml. Se pastreaza in sticle inchise de culoare.Cu aceasta solutie, disocierea se face la rece fara flacara, iar clarificarea se produce mai rapid. De asemenea se pastreaza intacta vizibilitatea raportului dintre tesutul invadat si ciuperca invadanta producand cele mai putine artefacte [3]. Ca dezavantaj se consemneaza mirosul specific in urma degajari hidrogenului sulfurat.
- a) **Parul, scuamele, crustele etc.** materiale patologice cu consistenta ridicata, vor fi examinate dupa depunere pe o lama intr-o picatura de cloral-lactofenol. Daca nu s-a reusit disocierea, atunci se pot utiliza pentru clarificare solutii mai puternice precum sulfura de sodiu 10% sau hidroxidul de sodiu in concentratie de 10-30%. Examinarea se face imediat, in cazul primei solutii, sau dupa 20-30 minute in ultimele doua situatii. Pentru a grabi clarificarea, in cazul solutiilo NaOH si KOH, se poate practica incalzirea lamelor la o flacara, fara a se ajunge la fierbere.
- Probele sunt considerate pozitive daca reusim sa evidentiem spori si/sau hife. Parul parazitat este, in general, inconjurat de un manson de spori (ectotrix) sau hifele si/sau sporii se gasesc in interiorul acestuia (endotrix)
 - In crustele si scaumele cutanate pot fi identificate hife, spori, artrospori sau celule levurice rotunde sau ovale. Prezenta in calatul cutanat a unor celule in forma de dop sugereaza infectia cu *Malassezia (Pityrosporum)*.
 - In raclatul cutanat putem identifica, de asemenea spori si elemente fungice ce apartin speciilor: *Penicilium, Cladosporium, Aspergillus, Alternaria, Fusarium, Scopulariopsis etc.*
- b) Materiale patologice recoltate din **unghii si gheare** necesita un timp mai indelungat pentru clarificare, avand in vedere consistenta lor mai ridicata. Se pot identifica spori, hife si levuri. Unii sunt agenti micotici primari, iar altii s-au grefat pe infectiile existente. Unii miceti, precum *Candida*, pot avea rolul atat de agenti infectiosi primari cat si secundari.
- c) **Puroiul, sputa mucusul faringeal si secretiile nazale** se examineaza dupa clarificare cu hidroxid de potasiu. In preparatele microscopice necolorate se pot evidientia levuri, hife, celule sangvine bacterii.
- d) **Secretiile auriculare** se clarifica cu cloral-lactofenol sau KOH. La examenul microscopic se identifica bacterii, levuri, spori etc. Uneori se pot identifica fragmente de par cu filamente sau/si spor. La caine si pisici parazitismul cu celule levurice in forma de dop respectiv *Malassezia*, este frecvent intalnit.
- e) **Din fecale** se fac froiuri dupa diluare cu apa. Peste lame se aplica lamele si preparatele se examineaza microscopic. Desi acest examen nu are marea valoare pentru diagnostic, totusi indentificarea unor formatiuni micetice ne poate orienta

spre un diagnostic cultural complementar.

- f) **La urina** se examineaza sedimentul obtinut dupa centrifugare.
- g) **Lichidul cerebrospinal** se centrifugheaza. Cate o picatura din sediment sau supernatant se examineaza direct la microscop, intre lama si lamela. In cazul infectiei cu *Cryptococcus* se pot identifica celule rotunde ovale cu muguri.

Tabelul 2

Speciile genului	Gazde	Tipul de parazitare	Se izoleaza Din:	Artoconi dii	Lampa Wood	Antropofil si sau zoofil	Geofil
M.canis	Caine,pisica Rar: vaca, oaie, Cal, porc, Maimuta, cobai, lepure, om	ectotrix	Par, Scuame, Unghii	mici, abundent e in mozaic	+	+	0
M. audouinii	Om Rar: caine Cobai, maimuta	ectotrix	Par, Scuame,	mici, abundent e in mozaic	+	+	0
M.equinum	Cal	ectotrix	Par, Scuame	mici, abundent e in mozaic	+	+	0
M.gypseum	Om Rozatoare Caine, pisica, Porc, cal, Maimuta, capra Papagal	ectotrix	Par, scuame	Putine Sub forma De Lanturi	±	+	+
M.nanum	Porc, om, cobai		Par,scuame		±	+	+
M.praecox	Om, cal					±	±
M. cookei	Ocazional om si Animale		Leziuni, par			+	+
M.ferrugineum	Om	ectotrix	Par		+	+	

Tabelul 3

Speciile genului	Gazde	Tipul de Parazitare	Se izoleaza din:	Artoconidii	Lampa Wood	Antropofil si sau zoofil	Geofil
T.verrucosum	Bovine, cavaline, Ovine, caprine, Caine, om	Ectotrix	Par, Scvame,	mari sub forma de lanturi	0	+	0
T.mentagrophytes	Rozatoare, taurine, Cabaline,ovine, iepure, Caine,pisica,om	Ectotrix	Par, Scvame,	mici,sub forma de lanturi	0	+	
T.rubrum	om,bovine,ovine, Cabaline,caine	endo-Ectotrix	Par,scvame	mari, sub forma de lanturi	0	+	0
T.violaceum	om,bovine,pisica Soarece	Ectotrix	Par, scvame		0	+	0
T.tonsurans	om,bovine,cabaline	Ectotrix	Par		0	+	+
T.megninii	om, taurine, caine Pisica, galinacee	Ectotrix	Par, scvame	sub forma de lanturi	0	+	0
T.equinum	cal, om	ecto-Endotrix	Par, scvame	de dimensiuni Variabile,sub Forma de lanturi	0	+	0
T.schoenleinii	om, caine, pisica, Soarece, cal	Endotrix	Par, scvame	Foarte rare	0	+	0
T.quinckeanum	Soarece,caine,pisica, Bovine,ovine,cabaline, iepure,vulpe,sobolan	ecto-sau endotrix de tip favic	Par	mici,sub Forma de Lanturi	±	+	0
T.gallinae	Pasari,pisica,caine, Soarece, om	Ectotrix de tip favic	Scvame,par	Rare	0	+	0
T.erinacei	Arici, caine, pisica	Ecto-sau Endotrix	Scvame,par	mari, sub forma de lanturi	0	+	+
T.simii	Pasari,maimuta,caine	Ecto-sau Endotrix	Scvame, mai Rar par	mari, sub forma de lanturi	±	+	±
T.ajelloi	Caine, pisica, bovine, Cabaline, cobai, om						0 +
T.terrestre	Caine,pisica,alte Animale, om						0 +

Examenu microscopic direct este dificil, prin caracterul sau interpretabil. El poate crea confuzi deoarece filamentele fungice pot fi usor confundate cu fibrele vegetale, iar sporii pot fii mascati sau confundati cu diferite artefacte.Fungii levuriformi sau filamentosi primari, raspunzatori de declasarea bolii, pot fi deseori mascati de specii care se dezvolt

secundar, asa cum ar fi *Penicillium*, *Rhizopus*, *Scopulariopsis*, sau chiar despre *Candida*. Este totusi necesar de subniliat potentialul patogen deosebit al speciei *Candida albicans*, care in ultimii ani este implicata tot mai frecvent in declansarea unor afectiuni primare grave, atat la om, cat si la animale si a carei prezenta in preparate nu trebuie subestimata sau trecuta cu vedere.

Examenul frotiurilor dupa colorare

Prin colaborarea frotiurilor obtinute din materiale patologice se ating doua obiective: vizualizarea mai buna a elementelor fungice si conservabilitatea preparatelor. De asemenea, se pot pot colora si fragmente de miceti recoltate din coloniile ce au crescut pe mediile de cultura. Frotiurile se realizeaza prin suspendarea micetilor in apa distilata, pe lama degresata, si uscare la temperatura camerei.

- 1) Metoda de colorare rapida (dupa Schwartz si Lamkins)
 - Pe o lama degresata se pune materialul patologic de examinat (scvame sau fire de par) cu o picatura de colorant. Se aplica o lamela si lama se incalzeste cu o flacara. Lamela se preseaza usor pentru indepartarea colorantului in exces si preparatul se examineaza la microscop. Fungii apar colorati in albastru.
- 2) Metoda Hotchkiss – McManus
 - In aceste preparate, micetii au culoarea visinie intensa. Aceasta metoda se preteaza si pentru examenul histopatologic. In acest caz, tesutul parazitata are o culoare liliachie, iar formatiunile micotice sunt colorate in visiniu – intens.
- 3) Metoda Mann
- 4) Metoda Gray
 - Frotiurile fixate se coloreaza cu un amestec alcatuit din doua parti solutie A si opt parti solutie B. Solutia A este compusa din: verde de malachit 0.5 g; fuxina bazica 0,05 g; apa distilata 100 ml. Solutia B este reprezentata de NaCl 8%.
 - Tehnica de lucru: colorare timp de 10 minute cu amestecul dintre solutiile A si B; spalarea cu apa de robinet; colorare cu solutie 5% nigrosin, timp de doua minute; spalare cu apa de la robinet si uscare
- 5) Metoda de colorare cu albastru de metilen
 - Tehnica de lucru: colorare cu solutie apoasa 1% de albastru de metilen, timp de doua minute; spalare cu apa de robinet si uscare.
- 6) Metoda de colorare cu bleu cotton – acid acetic
 - Tehnica de lucru: fixare cu alcool 95°; colorare cu solutie bleu cotton – acid acetic (0,5 g bleu cotton + 100 ml solutie 3% de acid acetic), timp de un minut; spalare cu apa de robinet si uscare. Aceasta colorare permite o buna diferentiere a septelor hifelor.
- 7) Metoda de colorare cu albastru de touidina si fucsina bazica

- Tehnica de lucru: colorare timp de un minut cu albastru de toluidina (soluție apoasă 1,3%) și fucsina bazina (soluție 10% în alcool 90° ce conține 5% acid fenic); uscarea și montarea în balsam de Canada. Elementele fungice se colorează în roșu purpuriu, iar fondul este albastru.

8) Metoda de colorare cu negru – clorazol E

- Negru – clorazol E (0,1%) se amestecă cu potasă (5%) –90ml și dimetilsulfoxid (DMSO) –10 ml (negru – clorazol se dizolvă inițial în DMSO și apoi în potasă). Fungiile se colorează în albastru – verzui, iar fondul este gri.

9) Metoda Burri

- O picătură de apă distilată se amestecă pe o lamă degresată cu o picătură de tus China. Materialul patologic sau cel recoltat din cultură se suspendă în acest amestec, se usucă și se examinează.

10) Metoda Rackette

- Tehnica de lucru: frotiul efectuat din cultură se fixează cu alcool; colorare cu soluție apoasă saturată de verde de malachit, la cald, timp de 5 minute; spălare cu apă de robinet; colorare cu soluție apoasă 0,25% de safranină; spălare cu apă de robinet; colorare cu soluție apoasă 0,25% de safranină; spălare cu apă de robinet; uscarea și examinarea.

11) Metoda Kufferath modificată

- Tehnica de lucru: frotiul se usucă și se fixează (prin căldură) pe o platină sofantă; colorare cu fucsina Ziehl; spălare cu apă de robinet; decolorare cu alcool clorhidric 1% și apoi cu alcool lactic 2% timp de câteva secunde; spălare cu apă de robinet; colorare cu albastru de Nil 1%, 30 secunde; spălare cu apă distilată; aplicarea unei picături de tus de china diluat peste frotiul umed și întindere pe toată lama; uscarea și examinarea.
 - Ascoporiile se colorează în roșu, iar ascele și blastosporii în albastru – verde, pe fond întunecat.

12) Metoda Muller

- Tehnica de lucru: fixarea frotiurilor; colorare cu soluție 5% de acid cronic, timp de 5 minute; spălare cu apă de robinet; colorare la cald cu fucsina Ziehl; frotiul răcit se decolorează cu soluție 5% de acid sulfuric; spălare cu apă de robinet; recolorare cu albastru de metilen Löffler; spălare cu apă de robinet; uscarea și examinarea. Se utilizează pentru evidențierea sporilor.

13) Metoda de colorare Gram

- Tehnica de lucru: efectuarea frotiurilor; colorare cu soluție 1% de violet de Gentiană timp de un minut; îndepărtarea colorantului de pe lamă; acoperirea frotiului cu soluție Lugol, timp de 2 minute; decolorare cu amestec alcool-acetonă (în părți egale); spălare cu apă de robinet; colorare cu fucsina diluată (1/10, timp de 20-30 secunde); spălare cu apă de robinet; uscarea și examinarea. Metoda permite diferențierea micetilor intacti (Gram +) de cei în curs de degenerare (Gram -).

Insamantarea probelor patologice pe medii specifice

Indiferent de metodele de diagnostic utilizate anterior, probele patologice vor fi insamantate obligatoriu pe medii de cultura.

Probele patologice recoltate sunt de obicei crustele, scuamele si parul. Pentru ca probele patologice sa nu fie contaminate cu miceti, fie din mediu, fie de pe instrumentul cu care se recolteaza este necesara respectarea unor masuri elementare de igiena. In primul rand, instrumentarul si ustensilele cu care se lucreaza trebuie sa fie sterile. Inainte de recoltarea probelor patologice, locul va fi antiseptizat cu alcool 70°, prin plasarea de regiune a unui tampon de vata ce se mentine 30 secunde. In nici un caz nu se va utiliza tinctura de iod sau antimicoticele.

Insamantarea probelor patologice medii de cultura speciale pentru miceti se face conform regulilor din bacteriologie. Crustele, scuamele pentru miceti se face conform regulilor din bacteriologie. Crustele, scuamele si perii recoltati se fragmenteaza cu ajutorul unei lame, a unui bisturiu sau a unui ac steril. Cu ajutorul unui ac, umectat in apa distilata sterila, pentru ca materialele patologice sa adere, probele se insamanteaza pe mediile solide sau lichide, in eprubete sau cutii Petri. Insamantarea se va face in mai multe placi sau eprubete cu medii de cultura. Probele patologice uscate se plaseaza in mai multe locuri pe mediul de cultura. Produsele semilichide vor fi insamantate cu acul de insamantare, cu un tampon de vata special pregatit pentru recoltarea exsudatelor sau cu o pipeta Pasteur, prin atingerea mediului in mai multe puncte sau zgarierea mediului de cultura in zig-zag. Probele lichide se insamanteaza cu o pipeta Pasteur.

Materiile fecale se lasa 24 de ore la macerat in solutie de ser fiziologic cu antibiotice si de abia apoi se insamanteaza in medii de cultura. Dupa insamantare o parte din culturi se tin la temperatura camerei, iar restul la termostat la 37°C. Cresterea culturii depinde de temperatura si umiditatea aerului. La temperaturi scazute cresterea este mai inceata. Unii fungi nu cresc la peste 30°C, alti se dezvoltă cel mai bine la aceasta temperatura, pe cand alti miceti necesita 37°C. De aceea este preferabil sa se efectueze mai multe probe care sa fie tinute la temperaturi diferite.

Umiditatea crescuta favorizeaza dezvoltarea micetilor in mediul de cultura, pe cand uscaciunea o inhiba. Mediile insamantate se urmaresc zilnic pana la maturarea coloniilor de miceti ce au crescut. Timpul necesar pentru cresterea si maturarea coloniilor variaza cu specia, de la cateva zile la levuri, la cateva saptamani la *Trichophyton verrucosum*. Daca dupa o luna de zile nu creste nimic pe mediu cultura este considerata negativa. Cresterea greoaie sau chiar absenta cresterii micetilor pot fi intalnite in cazul recoltarii probelor patologice de pe leziuni care au fost supuse tratamentului antifungic. Pentru a preintampina aceste inconveniente este necesar ca, in acest caz, probele recoltate sa fie spalate, inainte de insamantare pe mediu, cu apa distilata sau cu ser fiziologic sterile.

Alegerea mediului de cultura depinde de natura probelor care se insamanteaza si de tipul de miceti suspectat. Dermatologii folosesc de obicei doua medii. Sabouraud cu dextroza si mediul test pentru dermatofiti (DTM). Folosirea consecutiva a celor doua medii de cultura este nevesara intrucat DTM-ul poate opri dezvoltarea coloniilor si masca pigmentarea coloniilor, cat si inhiba cresterea unor miceti patogeni.

Pentru probele de urina centrifugata, cat si pentru probele fecale, de secretii vaginale si de sputa se folosesc, de obicei, doua medii de cultura, respectiv Sabouraud cu si fara antibiotice. Pentru probele de urina, mediul agar MacConkey poate fi, de asemenea, utilizat.

1) Medii de cultura pentru micete

- Se compune din: 2% dextroza; 1% peptona; 2% agar.
- Daca lipseste agarul se obtine un mediu Sabouraud lichid.

Modul de preparare: 2g dextroza si 1 g peptona se dizolva in 100 ml apa distilata; se adauga 2 g agar (care cu 24 ore inainte a fost mentinut in apa); vasul cu acest amestec se introduce in autoclav incalzindu-se incet pana la 115 – 120°C; se scapa vasul si se raceste la 100°C; filtrarea la cald prin vata hidrofila sterila; repartizarea mediului in cutii Petri sau eprubete si se sterilizeaza din nou (eprubetele vor fi mentinute in pozitie inclinata, in cazul mediului solid).

- In lipsa autoclavului, amestecul de substante se fierbe 30 de minute.
- Propozitia glucozei poate creste la 4% dar, in acest caz, nu se dezvoltă micetele levuriforme.
- Mediul Sabouraud este favorabil si pentru cresterea bacteriilor, putand astfel impiedica dezvoltarea micetilor. De aceea se apeleaza fie la purificarea materialului de insamantat, fie la adaugarea de antibiotice.

Purificarea probelor de insamantat se poate realiza prin:

- insamantarea materialului patologic intr-un mediu acid. Se poate utiliza in acest sens, fie lichidul Raulin (pH 3,5), fie mediul Sabouraud lichid acidifiat cu acid clorhidric normal (trei picaturi de HCl pentru 5 ml mediu, obtinand un pH 3,1). Dupa 1-2 pasaje pe aceste medii acide, bacteriile mor, putandu-se trece la insamantarea pe medii specifice pentru micete.
- metoda inelului Raper. Un inel de sticla se introduce pe jumătate in mediul de cultura (din placuta Petri). Insamantarea materialului patologic se face in interiorul inelului. Bacteriile se vor dezvolta doar in spatiul delimitat de inel in timp ce micetele vor penetra mediul si se vor dezvolta doar in spatiul delimitat de inel in timp ce micetele vor penetra mediul si se vor dezvolta in afara inelului, liber de bacterii.
- Adaugarea de antibiotice la mediul Sabouraud este frecvent utilizata. Se poate utiliza, in acest sens, asocierea penicilina - streptomina: penicilina 20.000 U.I., streptomina 40.000 U.I. (40 mg), mediu Sabouraud un litru.
- Alte antibiotice ce pot fi utilizate pentru inhibarea dezvoltarii unor bacterii sunt: cloramfenicolul 50 mg/l mediu, aureociclina 0,05 - 0,1 mg/l mediu, cycloheximida (actidiona 400 - 500 mg/l mediu).
- Daca la mediul Sabouraud se adauga antibiotice, aceasta operatiune va fi efectuata inainte de turnare in placile Petri, dupa racire la 50°C.
- Antibioticele, la fel ca purificarea in mediu acid, nu asigura distrugerea ciupercilor saprofite care pot inhiba dezvoltarea micetelor patogene. Totusi, dintre antibiotice, cycloheximida are si actiune antifungica, prevenind dezvoltarea unor ciuperci parazite precum sunt: *Cryptococcus neoformans*, unele specii de *Candida* (in afara de *C. albicans*), *Aspergillus*, *Torulopsis*, unele specii ce apartin la *Zygomycetes*.
- Ciupercile pot, de asemenea, sa-si mentina viabilitatea timp de mai multi ani (chiar pana la 20 de ani) prin pastrare in apa distilata.

2) *Bulion Sabouraud glucozat (Mc Ginnis, 1980)*

- Permite dezvoltarea speciei *Trichophyton mentagropytes*. Se poate folosi la revitalizarea unor suse de fungi din culturi mai vechi; fie se inoculeaza un tub cu un fragment mai mare dintr-o colonie, fie se varsa bulionul direct pe suprafata

culturii de regenerat si se incubeaza 3-4 saptamani.

3) *Mediul test pentru dermatofiti (D.T.M)*

- D.T.M se utilizeaza, de obicei, in paralel cu mediul Sabouraud pentru izolarea si diferentierea dermatofitilor din mediile contaminate cu bacterii si alte ciuperci. Are urmatoarea compozitie: dextroza - 10g; peptona de faina de soia - 10g; agar-agar - 17g; rosu fenol - 0,2 g; cycloheximida - 0,5g; gentamicina sulfat - 0,1g; clortetraciclina - 0,1g; apa distilata - 1000 ml.
- La final, mediul se va aduce la pH de 5,5.
- Antibioticele din mediu se utilizeaza ca agenti antifungici si antibacterieni. Rosu fenol are rolul de indicator de pH. Dermatofitii utilizeaza la inceput proteinele din mediu cu eliberare de metaboliti bazici ce vireaza mediul de la galben la rosu. Multi alti fungi utilizeaza mai intai hidratii de carbon si mai tarziu proteinele, putand si ei sa vireze culoare mediului in rosu dar dupa o perioada de incubatie mai lunga (10 - 14 zile sau chiar mai mult). De aceea, pentru identificarea dermatofitilor sunt esentiale primele 10 zile de incubare.
- Fungi ca *blastomyces dermatitis*, *Sporothrix schenckii*, *H. capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *Pseudoallescheria boydii* si unele specii de *Aspergillus* pot vira culoare mediului in rosu. De aceea, examenul microscopic este obligatoriu pentru a preveni unele erori de diagnostic.
- Cycloheximida din D.T.M. determina inhibarea dezvoltarii unor micete, precum *Cryptococcus neoformans*, unele specii de *Candida* (exceptand *C. albicans*), *Aspergillus* si din grupa *Zygomycetes*. Daca se doreste identificarea acestora, se vor face insamantari paralele pe mediu Sabouraud care sa nu contina acest antibiotic.

4) *Geloza Blasto D (Kane, 1984)*

- Permite dezvoltarea formei levurice a micetului *Blastomyces dermatidis* la 37°C. Mediu specializat, care asigura transformarea formei filamentoase a micromicetului *B. dermatidis* intr-o forma levurica prin cultivare la 37°C.

5) *Geloza cord-creier*

- Permite dezvoltarea speciei *Candida albicans*, obtinerea formei levurice a speciei *Sporothrix schenckii* la 37°C. Mediul cu cloramfenicol inhiba dezvoltarea bacteriilor de contaminare, in special *Staphylococcus epidermis*.
- Mediul se poate folosi pentru izolarea fungilor patogeni prin insamantarea prelevatelor din leziuni. Varianta cu sange de oaie poate favoriza aparitia formelor levurice la fungii dimorfici. Se comercializeaza in forma deshidratata.

6) *Mediul Czapeck-Dox*

- Asigura cresterea si dezvoltarea speciei *Aspergillus flavus* (colonii verzi-galbui). Mediu de referinta pentru identificarea speciilor ce apartin genului *Aspergillus*.

7) *Geloza nutritiva 2% (Geloza simpla 2%)*

- Se compune din: agar - 20 g; apa distilata – 1000 ml.
- Modul de preparare: dupa adaugarea agarului in apa, acesta se fierbe pana la completa dizolvare;

- se sterilizeaza la 121°C timp de 15 minute.

Aspect: geloza incolora, transparenta. Favorizeaza sporularea majoritatii speciilor de micromiceti saprobioti (Mc Ginnis, 1980).

8) *Mediu cu extract de drojdie de bere*

- Se compune din: extract de drojdie de bere – 1000 ml; glucoza sau maltoza - 35 g; geloza – 20 g;
- Mediul trebuie sa fie adus la un pH de 5,6. Sterilizarea se face la 121°C, timp de 10 minute.
- Extractul de drojdie de bere se obtine prin fierbere, timp de 5 minute, a 100 g drojdie de bere in 1000 ml apa distilata. Se filtreaza si se raceste.
- Mediul este utilizat pentru fungi levuriformi si dermatofiti.

9) *Mediul Dixon*

- Se compune din: agar cu extract de malt (Oxoid) -60 g; bila de bou (Oxoid) –20 g; tween 40 – 10 ml; glicerol mono-oleat –2,5 ml; apa distilata pana la –1000 ml.
- Modul de preparare: se dizolva succesiv diferitele componente in apa si apoi se sterilizeaza mediul obtinut, 20 minute, la 115°C.
- Mediul se utilizeaza pentru izolarea si cultivarea speciei *Malassezia furfur*.

10) *Mediul Christense (Geloza cu uree) (Mc Ginnis, 1980)*

- Mediul se foloseste pentru identificarea unor dermatofiti, in special a speciilor *T. rubrum* si *T. mentagrophytes*. *T. mentagrophytes* este usor pozitiv (rosu), iar *T. rubrum* ureazo-negativ (oranje).

11) *Mediul cu extract de seminte de Niger (mediu selectiv pentru Cryptococcus neoformans)*

- Este mediu selectiv pentru cultivarea speciei *Cryptococcus neoformans*.

12) *Geloza Mycosel (Micobiotic Agar)*

- Mediul este compus din: peptona – 10 g; glucoza – 10 g; agar – 15 g; cicloheximida – 0,4 g; apa distilata – 1000 ml.
- Mod de preparare: se amesteca ingredientele si se fierb pana la dizolvarea lor completa;
- Se sterilizeaza la 121°C, timp de 15 minute.
- Aspectul mediului este de geloza galbuie, transparenta; pH-ul final la 20°C: 6,9 ± 0,2.
- Mediu selectiv utilizat pentru izolarea primara a dermatofitelor Cycloheximida inhiba dezvoltarea majoritatii levurilor si fungilor filamentosi potential patogeni). Mediu disponibil comercial (Difco). Trebuie sa permita dezvoltarea speciei *Trichophyton verrucosum* si sa inhive total sau partial pe aceea a speciilor *Aspergillus flavus* si *Staphylococcus epidermidis*.

13) *Geloza cu purpur de bromcrezol, lapte praf, glucoza*

- Mediu selectiv folosit la decelarea dermatofitelor si diferentierea speciilor *T.*

rubrum si *Microsporum persicolor* de *T. mentagrophytes*. *Trichophyton rubrum* nu produce nici o modificare de pH si creste greu in 7 zile la 25°C; *Trichophyton mentagrophytes* alcalinizeaza mediul si creste abundent in 7 zile la 25°C.

14) *Mediul cu orez* (Rebell si Talpin, 1970)

- Se utilizeaza pentru identificarea speciei *Microsporum audouinii* si a suselor nesporulate de *M. canis*. *M. canis* se dezvoltă bine, elaborează un pigment galben si sporulează abundent; *M. audouinii* nu crește sau creșterea este deficitară.

Medul si criteriile de stabilire a diagnosticului prin culturi

In stabilirea diagnosticului si precizarea speciei dezvoltate, se va tine seama de unele criteriiL

- Timpul necesar dezvoltării culturii si care difera de la o specie la alta.
- Aspectul macroscopic al coloniei, care se poate referi la suprafața – mata, strălucitoare, pufoasă sau prafoasă; relief (centrul) – friabilă, cremoasă, pastoasă; culoarea suprafeței coloniei si culoarea reversului – prezenta eventuală a unui pigment ce difuzează in mediu.
- Aspectul microscopic, care se stabilește prin recoltarea unui fragment din colonia de examinat, ce se așează pe o lama de sticla, peste care se toarna 2-3 picături de hidroxid de potasiu sau alt disociat si se examinează la microscop. Ansa cu care se face recoltarea se sterilizează prin flambare. Recoltarea se va face atât de la suprafața, cât si din profunzimea coloniei.

Elemente de morfologie microscopica a dermatofitelor din culturi

- La examenul microscopic al culturilor de dermatofiti se pot intalni, indeosebi, urmatoarele elemente, care, in ansamblul lor, formează organele de fructificare:
- **Macroconidiile** (fusuri) sunt elemente fuziforme, care se dezvoltă la capatul unui filament micelian sau pe una din laturile sale. Capatul liber este rotunjit sau ascutit. Sant impartite in câteva camarute (loji); pot fi gasite izolate sau grupate pe aceeași ramura miceliana.
- **Microconidiile** (aleurii, aleurospori) sant mici elemente celulare de forma rotunda, ovoida sau piriforma cu diametrul de 3 μ, legate de miceliu printr-un mic pendicul. Ele pot fi izolate sau dispuse “in spic” (acladium) sau “in ciorchine”. La unele specii de dermatofiti, sant foarte numeroase, formand la suprafața coloniei un depozit fainos (in limba greaca, aleuron = faina)
- **Clamidosporii** sunt elemente specifice foarte des intalnite. Sant spori voluminosi, rotunzi, avand o citoplasma foarte densa, un perete celular foarte gros, cu dublu contur, de aspect refrigent. Clamidosporii pot fi terminali (situati la extremitatea unui filament), intercalari (intre doua ramuri filamentoase) si, uneori “in lanturi”
- **Organele nodulare** sant formatiuni constituite dintr-o impletire stransa de filamente miceliene.
- **Miceliile** observate la microscop pot fi gasite sub diferite aspecte:
- “*in racheta*” – miceliu septat, ale carui articole prelungite au la extremitatea distala dilatatie in forma de maciuca, ca la o racheta;

- “*in spirala*” sau *vrile*, cu extremitatea libera rulata in forma de spirala, ca un arc de somiera
- “*in candelabru*”
- “*in coarne de cerb*”(ramificate)
- *denticulate* – asemanatoare dintilor unui fierestrau.

Tabelul 4

Specia	Caracteristici macroscopice			Caracteristici macroscopice					
	Avers		Revers	Macroconidii				Microconi	Elemente
	Aspect	Culoare	Culoare	Macroconidii	Perete	Loji	Numar		
M canis	Pufos	Alb-galbui	Galben-Oranj	Fus	gros, echinulat	7-14	mare	rare ca o maciuca	Hife
M.audouinii	Fin-Pufos	Alba	roz sau Galbui	Fus sau Neregulat	gros, Echinulat	1-8	mic	rare, piriform	Clamidospori, Organe nodulare Hife pectinate
M. equinum	Pufos	Incolor	Bruna	Fusuri Mici	Gros, Echinulat	4-8	mic	rare	Hife
M.persicolor	Pudros	Bej-roz	Galbel la Roz	Maciuca	Subtire, Rare echin	1-10	varialbil	multe pedunculat	Hife spiralate(vrile) Si in forma de croza
M. gypseum	Gipsos	Galben-brun Sau bej	Bej sau Brun-oranj	Suveica	Subtire, Echinulat	1-6	f. mare	rare	Hife "in racheta"
M. nanum	Pudros	Alb-galbuie, Bej	Brun-Roscat,bej	Ovoide Mici	Subtire,	1-3	Mare	rare	Hife
M.praecox	Pudros	Alb	Galben	Suveica	Subtire,	6-9	f. mare	Rare	Hife
M. cookei	Pudros	Galbuie	Rosu-Purpuriu	Suveica	Gros,	2-8	mediu	Numeroase	Hife
M. ferrugineum	Pudros	Alb-galbuie	Ruginiu						Hife septate ca "batul de bambus; Clamidospori Solitari sau in lant

Tabelul 5

Specia	Caracteristici macroscopice			Caracteristici macroscopice					
	Avers		Revers	Macroconidii				Microconidii	Elemente
	Aspect	Culoare	Culoare	Forma	Perete	Loji	Numar		Suplimentare
T. verrucosum	galben-cerebriform	Galbui-Bej	incolor-galben	in coada de sobolan	subtire		mic	rare	Clamidospori, hife In coarne de cerb
T. mentagrophytes	pufos, paros	Alb, Bej	alb-galbui, rosu	maciuca	subtire	1-6	variabil	multe rotunde	Hife cu vrili, coarne de cerb si organe Nodulare
T. rubrum	pufos	alb	roz-rosietic	cilindrica	subtire	2-3	variabil	ovoide	Uneori hife pectinate Si clamidospori
T. violaceum	ceros, plisat	crem sau violet	crem sau violet					0 lipses sau sunt putine	
T. tonsaurans	pufos	galbuie	acaju	neregulata	usor ingrosat		variabil	numeroase	Uneori cu clamidospori Si vrile
T. megninii	pufos	alb, apoi roz-pal	rosu	cilindrica			mic	mici, piriforme	
T. equinum	pufos	alb	acaju	maciuca	subtire,	2-6	mediu	numeroase	
T. schoenleinii	galben, plisat	alb-ceros						0 rare	miceliu cu aspect de Coarne de cerb si Clamidospori
T. quinckeanum	pufos	alb-liliachiu	Galbui	maciuca	subtire	1-5	mic	numeroase	
T. gallinae	pufos	alb	Roz-rosietic	maciuca	gros, uneori echinulat	4-7	mediu	rare	
T. erinacei	pufos	alb	galbui	maciuca	subtire	1-4	relativ mic	numeroase ovalare	vrile
T. simii	pufos	crem sau roz-pal	galben	cilindrica	subtire	1-6	mediu	numeroase	vrile numeroase
T. ajelloi	pufos	bej	brun	cilindrica	ingrosat	1-10	f. multe	rare	
T. terestre	Pufos	alb	rosietic	cilindrica	subtire	4-8	variabil	numeroase	Vrile

CANDIDA ALBICANS

Examen direct:- celule levurice mici,rotunde sau ovale,de 2-5 μ ,inmugurite,cu peretele subtire;

- *pseudomicelii*,constituite din blastospori alaturati.Ramurile pseudomiceliilor se formeaza in grupuri de cite 4-6 la capatul unora dintre celulele ce le constituie.Ramurile alcatuiesc o coroana (verticiliu),fiecare dintre ramuri putind forma noi coroane.La unele specii de *Candida*,se pot gasi si *filamente miceliene* veritabile.

Mediul de cultura: Sabouraud.

Dezvoltarea culturilor :24-48 de ore ,la temperatura camerei.

Aspectul macroscopic al culturilor :colonii rotunde ,mici ,de culoare crem sau crem-galbuie, reliefate ,convexe,umede lucioase, de consistenta cremoasa ,ca untul,neaderentede mediu(fig. 60)

Aspectul microscopic al culturilor:

- *celule levurice* (blastospori) de 2-4 μ diametru ,rotunde sau ovalare, multe in curs de inmugurire;

- *filamente*(filamentarea este caracteristica pentru *Candida*);

- *clamidiospori* (numai la *Candida albicans*)-celule sferice de 20-22 μ diametru ,refringente ,cu dublu contur ,ce se gasesc la extemitatea unor ramuri pseudomiceliene. Se produc atunci cind cultura de *Candida* este trecuta pe mediul P.C.B.

ASPERGILLUS FUMIGATUS

Examenul direct al materialului patologic (recoltat din sputa ,exudat din ureche , puroi):

- spori mici ,rotunzi , de 2-3 μ , de culoare verzuie-bruna;
- filamente miceliene fragmentate.

Mediul de cultura : Sabouraud ,la temperatura camerei.

Dezvoltarea culturilor : foarte rapida.

Aspectul macroscopic al culturilor : colonia apare sub forma unui disc alb , linos , la suprafata mediului. In scurt timp ,de vine verde spre negru-verzui (fig. 65).

Aspectul microscopic al culturilor : capete aspergilare caracteristice.Acestea sunt formatiuni globulare , situate la capatul filamentului micelian; suprafata lor este acoperita de prelungiri radiare , ce poarta lanturi lungi de spori.Capetele aspergilare se pot observa mai bine direct pe tubul de cultura.

SPOROTRICHUM SCHENCKII

Examenul direct al materialului patologic : parazitul micotic este rareori vizibil la examenul direct ,lama se coloreaza prin metoda May-Grunwald-Giemsa , dupa ce puroiul a fost diluat in 15 volume de ser fiziologic.Se poate observa :

- celule rotunde sau ovalare grupate;
- corpi asteroizi , care se gasesc la cazurile din America de Sud , Africa de Sud , mai rar in S.U.A. Nu se gasesc in Europa . Ei pot fi :

a) in forma de tigara ,cu extemitatea rotunjita , largi de 2-3 μ si lungi de 3-5 μ , asezati intercalat , in leucocite sau in celule gigante;

b) de forma asteroida , element regulat rotunjit , constituit dintr-un spor rotund , cu peretele dublu, mai colorat.Suprafata corpusculului este acoperita de raze ca niste "maciuci", dindu-i un aspect de stea .

Mediul de cultura : Sabouraud ,la temperatura camerei si la 37°. Se poate dezvolta si pe mediul cu singe si agar. Insamintarea puroiului se face depunind o picatura de puroi pe peretele eprubetei , in unghiul format de geloza si sticla .Se tine apoi la 37° sila temperatura camerei.

Dezvoltarea culturilor : pe mediul Sabouraud , la temperatura camerei, se dezvolta in 3-5 zile ;cultura neste singura metoda sigura de diagnostic .

Aspectul macroscopic al culturilor : coloniile sunt la inceput albe ,cremoase ,opace,netede,asemanatoare cu coloniile de *Candida* . Pe masura ce se dezvolta , suprafata devine incruntata , membranoasa, cu o usoara aureola pufoasa,ajungind sa ocupe ,cu timpul , toata suprafata mediului de cultura .Pigmentatia coloniilor poate sa varieze de la de la tulpina la tulpina -de la alb ,pe care unele il pasreaza in mod nedefinit,trecind progresiv prin galben ciocolatiu, la brun si chiar la negru. Pigmentul se poate schimba la trecere.

Aspectul microscopic al culturilor :o retea fina de filamente miceliene nu prea largi , cu diametrul de 2 μ ,septate si ramificate , avind pe ramurile laterale sau la capatul unei terminatii miceliene subtiri grupuri de *spori* caracteristici,ovalii sau sferici ,apoi rotunzi, de culoare bruna si cu perete dublu , in culturile vechi. Separati de suportul lor ,acesti spori ,al caror diametru variaza intre 3-5 si 2-4 μ , se pot inmulti prin inmugurire.

Coccidioides Immitis

Examen direct : corpi rotunzi prezenti , liberi sau intracelulari in celulele gigante , dediametru variabil (20-60 μ), cu peretii grosi, refringenti, cu continut omogen, apoi granular; sunt umpluti cu numerosi endispori mici (2-5 μ), uninucleati; uneori acesti corpi rotunzi au aspect echinulat.

Mediu de cultura : Sabouraud, la 25°.

Dezvoltarea culturilor in 4-5 zile.

Aspectul macroscopic al culturilor:

- filamente miceliene septate in artrospori dreptunghiulari, asezati in forma de lanturi, care, examinati in clorallactofenol, se prezinta sub forma de articole intunecate, separate de spatii filamentoase clare.

Histoplasma capsulatum

Mediu de cultura: Sabouraud.Se insamanteaza mai multe tuburi. Unde se tin la temperatura camerei, altele la 37°.Pentru continutul gastric,este preferabil sa se faca insemantarea sedimentului obtinut prin centrifugare.

Dezvoltarea culturilor: foarte lenta, dupa minimum 3-4 saptamani.

Aspectul macroscopic al culturilor : colonii rotunde, usor pufoase, albe, cu un miceliu aerian, care capata, cu timpul, culoarea bruna.

Aspectul microscopic al culturilor :

- filamente miceliene ramificate, unele “ in racheta” ;
- spori mici, rotunzi sau ovali, in ramurile laterale;
- clamidospori mari (10-20 μ), tuberculati, rotunzi sau piriformi, cu peretele gros.

CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS

Mediul de cultura: Sabouraud, 37° si la temperatura camerei

Dezvoltarea culturilor: pe mediul Sabouraud, la temperatura camerei, dezvoltarea este inceata; la 37°, insa *C. neoformans* patogen creste foarte repede. Prin aceasta se deosebeste de culturile criptococice similare, nepatogene.

Aspectul macroscopic al culturilor:

- la temperatura camerei-colonia levuriforma este la inceput alba, cutata si granulara; ulterior, se dezvolta o colonie tipica, umeda, vascoasa, mucoida, de culoare crem-cenusie.
- la 37°-colonie mucoida, vascoasa, de culoare crem spre cenusie; seamana uneori cu culturile de bacili Friedlander.

Aspectul microscopic al culturilor: celule in mugurite, scurt tub germinativ terminal.

Examenul caracterelor biochimice

- Un examen complementar pentru identificarea diferitelor specii de levuri este cel mai privind determinarea unor caractere biochimice ale acestora. Aceste metode au in vedere punerea in evidenta a dependentei levurilor de carbonul organic ca sursa de energie si a comportamentului diferi al speciilor fata de substratul pe care sunt puse sa se dezvolte.

- Fermentata zaharurilor, preconizata de Langeron si Guerra, este bazata pe proprietatea ciupercilor levuriforme de a fermenta unele mono- si dizaharide. Rezultatele, destul de stabile, permit folosirea acestei insusiri a diferitelor specii de *Candida* in scopul identificarii lor. Zaharurile utilizate sunt: glucoza, maltoza, zaharoza, lactoza, rafinoza.
- Metoda auxonogramei se bazeaza pe proprietatea ciupercilor din genul *Candida* de a asimila hidrantii de carbon sau azotul. Tulpina de *Candida* care urmeaza a fi identificata este incorporata in medii speciale, ce se toarna in cutii Petri, care contin substante glucidice sau azotoase necesare dezvoltarii ciupercii.

Tabelul 6

Specia	Fermentarea zaharurilor	Auxonograma	
		Aximilarea Zaharurilor	Asimilarea Azotului
	G M Z L R	G M Ga Z L R	Pe As Sa Np Ur
C. albicans	+ + - - -	+ + + + - -	+ + + - +
C. stellatoidea	+ + - - -	+ + + - - -	+ + + - -
C. tropicalis	+ + + - -	+ + + + - -	+ + + - -
C. pseudotropicalis	+ - + + -	+ - + + + +	+ + + - +
C. krusei	+ - - - -	+ - - - - -	+ + + - +
C. parakrusei	+ - - - -	+ + + - - -	+ + + - -
C. guilliermondii	+ - + - -	+ - + - - +	+ + + - -
C. periculosa	+ + + - -	+ + + - - -	- - - - -

Examenul caracterelor biochimice

Un examen complementar pentru identificarea diferitelor specii de levuri este cel privind determinarea unor caractere biochimice ale acestora. Aceste metode au in vedere punerea in evidenta a dependentei levurilor de carbonul organic ca sursa de energie si a comportamentului diferit al speciilor fata de substractul pe care sunt puse sa se dezvolte.

Testul cu alcool etilic

Se obtine un mediu format din: fosfat monopotasic – 1,0 g; sulfat de magneziu crist. – 0,5 g; sulfat de amoniu – 0,1 g; apa distilata – 1000,0 ml.

Mediul se sterilizeaza la 115°C, timp de 15 minute. Se raceste si se adauga alcool etilic 95° in proportie de 3% si cateva picaturi de drojdie de bere.

In paralel se pregateste si un mediu de cultura fara alcool etilic. Insamantarile se fac in paralel, in tuburi fara alcool etilic. Metoda se bazeaza pe capacitatea unor levuri de a se dezvolta in prezenta alcoolului etilic diferentiindu-le de ce care sunt inhibitate de acesta.

Testul degradari arbutinei

- Unele levuri au capacitatea de a degrada arbutina in glucoza si hidrochiona, caracteristica care este folosita pentru identificarea lor.
- Cultivarea se face pe un mediu compus din: extract de drojdie de bere 1000,0 ml; agar – 20,0 g; arbutina – 5,0 g;
- Dupa insamantare, la 2-6 zile, coloniile care au degradat arbutina prezinta un inel brun inchis in jurul lor.

Examenul histologic

- Punerea in evidenta a unui fung la nivelul tisular este o dovada a puteri sale patogene. Ea traduce invazia fungica, permitand astfel distinctia fata de o simpla contaminare (caz in care tesuturile nu sunt invadate).
- Leziunea caracteristica este granulomul micotic, leziune de tip inflamator cu evolutie subacuta/cronica. Evolutia poate fii spre necroza, ramoliment, goma, abcedare.

Structura granulomului micotic [2]

- La periferie o zona de fibroza
- Zona granulomatoasa: limfocite, plasmocite, eozinofile;
- Zona macrofagica: celule gigante, celule in palisada;
- Zona centrala purulenta: polimorfo-nucleare, elemente micotice.

Biopsia cutanata se executa in cazul micozelor profunde, la om, caine si cabaline.

Coloratia cu acid periodic schiff (PAS)

- Elementele micotice apar colorate in rosu pe un fond albastru deschis. Este o metoda specifica pentru ciuperci.

Metoda impregnatiei argentice(Gomori si Grocott)

- Micetele sunt colorate in negru pe un fond verde sau albastru, in functie de coloratia de contrast folosita.

Metoda de colorare dupa Gridlay

- Sporii si levurile se coloreaza in rosu (de diferite nuante) iar hifele in albastru inchis.

Coloratia – Hemalaun – eozin – safran (HES)

Diagnosticul imunologic

- Diagnosticul imunologic se bazeaza fie pe identificarea antigenelor sau anticorpilor circulanti, fie pe evidentierea starii hipersensibilizare. In functie de aceasta, se folosesc metode serologice pentru identificarea anticorpilor sau antigenelor si metode de evidentiere a starii de hipersensibilizare.

Cercetarea starii de hipersensibilitate cutanata

- pentru evidentierea starii de hipersensibilizare se utilizeaza antigene solubile metabolice sau somatice care sunt injectate intradermic.Se pune, astfel, in evidenta hipersensibilizarea de tip intarziat si, mai rar, hipersensibilizarea de tip imediat.
- Pentru prepararea tricofitinei se folosesc una sau mai multe specii de dermatofiti, mai ales cele bogate in organe de fructificare (de exemplu Trichophyton mentagrophytes).
- Levurina este un antigen preparat dintr-un filtrat steril de cultura de Candida albicans.[3]
- Hipersensibilizarea intarziata apare in aproximativ 15 zile dupa infectia micotica si dureaza mai mult timp. Pozitivitatea in cazul reactiei intarziate se caracterizeaza prin aparitia, la 24-72 de ore, a unei reactii papulo-eritematoase cu diametrul de cel putin 0,5 cm. Reactia poate fi mai puternica cu ulcere si necroze. Reactia negativa la inocularea intradermica nu inseamna intotdeauna absenta infectie.
- Anergia poate fi cauzata de carente alimentare, malnutritie, diabet, cancer, etc.
- Hipersensibilizarea de tip imediat este pusa in evidenta rapid (15-30 minute) si se caracterizeaza printr-o reactie papulo-eritematoasa de tip urticariform.
- In cazul reactiilor intense, se pot constata si fenomene de ordin general: cefalee,

curbatura, stare febrila. Uneori, se pot produce o exacerbare a focarelor de boala existente (reactie de focar). Pot aparea si mici leziuni diseminate in vecinatatea focarului sau in alte zone ale corpului. Este vorba de asa-numitele tricofitide.

- Evidentierea anticorpilor poate fi facuta utilizand diferite forme de dezvoltare ale micetelor (spori, filamente miceliene) sau antigene solubile. In acest scop, sunt utilizate urmatoarele metode: reactia de aglutinare, reactia de precipitare in lichid sau geloza, reactia imunoezimatica(ELISA). Pentru a fi eficiente, aceste metode trebuie sa fie specifice si sensibile. Metoda imunoelectroforezei pare a fi cea mai specifica.
- False reactii pozitive pot apare la pacientii care au trecut prin boala sau care au fost injectati cu antigene. Reactii negative pot fi intalnite la animalele imunodepresate, din diverse motive, datorita titrului redus de anticorpi. De asemenea, la inceputul infectiei micotice (8-14 zile) titlu de anticorpi este redus.
- Nivelul anticorpilor este cu atat mai mare cu cat invazia tisulara este mai pronuntata, dar prezenta anticorpilor nu este o dovada a unei micoze evolutive. [2]
- Coccidioidina este folosita ca antigen in reactia de precipitare pentru diagnosticul coccidioidomicozei.
- Extracte carbohidrate din culturi de *Sporotrichum schenckii* sau din mediul de cultura unde a crescut fungul au fost folosite ca antigene in testul de precipitare pentru sporotrihoza [1]

Evidentierea antigenelor (de exemplu *Criptococcus neoformans*, *Aspergillus funigatus*) prin aglutinarea particulelor de latex sensibilizate cu anticorpi monoclonali. Metode imunohistochimice – punerea in evidenta a antigenelor tisulare prin intermediul anticorpilor poli sau monoclonali prin tehnici de imunoflorescenta sau de imunoenzimologie. [2]

Inocularea experimentală a animalelor de laborator

- Aceasta metoda este utilizata, mai ales, pentru cercetare decat pentru diagnosticul propriu zis al micozelor. Inocularea experimentală, cu micete recoltate de la om sau animale, se face la animalele de laborator, precum cobaii, soarecii, sobolanii si iepurii. Inocularea poate fi facuta pe cele mai diverse cai: cutanata, subcutanata, intraperitoneala, intravenoasa etc. Este bine inoculul sa provina dintr-o cultura proaspata.

Identificarea ADN-ului specific

- Evidentierea ADN-ului specific micetelor este posibila, din probele patologice, prin amplificarea enzimatica a ADN-ului. Acest lucru se realizeaza prin PCR (reactia de polimizare in lant). Se produce, astfel o importanta cantitate de ADN specific pe baza caruia se identifica parazitul care l-a produs. Utilizarea sondelor nucleice in micologie este, totusi, limitata. Ciupercile sunt bogate in nucleaze, care complica operatiunile de purificare la analiza a ADN-ului. In plus, analizele genetice nu se pot aplica la fungii imperfecti, a caror reproducere sexuata nu este cunoscuta. Aceste sonde pot fi utilizate, cu succes, pentru diagnosticul candidozelor, aspergilozei si histoplasmozei cu *Histoplasma capsulatum*.

Antibiograma fungica

- este folosita pentru determinarea sensibilitatii unei anumite specii de agent micotic, izolat din leziune, fata de un produs antifungic. Se pot folosi urmatoarele metode:
- Metoda calitativa: rezultatul se citeste dupa un interval de 1-3 zile, masurandu-se diametrul ariei de inhibitie a agentului fungic, ca urmare a actiunii produsului antimicotic.
- Metoda cantitativa: aceasta metoda consta in punerea in contact a tulpinii agentului fungic in cauza cu antimicoticul pe care il testam, in diferite concentratii.

Contaminanti

- Recunoasterea contaminantilor care pot fi gasiti pe mediile inoculate cu materiale patologice prezinta o importanta deosebita deoarece nu de putine ori lor li se atribuie calitatea de agent etiologic.[5]
- Fungii nepatogeni pot contamina aerian mediul de cultura sau pot fi introdusi in mediu odata cu materialul patologic.
- Exemple de contaminatii uzual intalnite: *Penicillium* sp., *Paecilomyces* sp., *Scopulariopsis* sp., *Gliocladium* sp., *Monilia sitophila*., *Verticillium* sp., *Trichoderma* sp., *Cephalosporium* sp., *Fusarium* sp., *Oospora* sp., *Mycelia sterila*.