

Metodologia de supraveghere a bolii diareice acute (BDA) si holerei

I. Denumirea si incadrarea bolii

Cod CIM:

- **A00 = Holera**

A 00.0 – cu *Vibrio cholerae*, serogrup O1, biovar ElTor sau clasis/O139

- **A02 = Alte salmonelloze** (cuprinde infectia sau intoxicatia alimentara cu alte salmonelle decat *typhi* si *paratyphi*)

A02.0 – Enterita cu Salmonella (salmonelloze)

- **A03 = Shigelloza** (dizenteria bacilara)

A03.0 – Shigelloza cu *Shigella dysenteriae* (grupa A)

A03.1 – Shigelloza cu *Shigella flexneri* (grupa B)

A03.2 – Shigelloza cu *Shigella boydii* (grupa C)

A03.3 – Shigelloza cu *Shigella sonnei* (grupa D)

- **A04 = Alte infectii intestinale bacteriene**

A04.0 – Infectia enteropatogena prin *Escherichia coli* patogen

A04.1 – Infectia enterotoxigena prin *Escherichia coli* toxigen

A04.2 – Infectia enteroinvaziva prin *Escherichia coli*

A04.3 – Infectia enterohemoragica prin *Escherichia coli*

A04.5 – Enterita prin *Campylobacter*

A04.6 – Enterita prin *Yersinia enterocolitica*

A04.7 – Enterocolita prin *Clostridium difficile*

- **A07 = Alte boli intestinale prin protozoare**

A07.1 – Giardiază

A07.2 – Cryptosporidioza

- **A08 = Alte infectii virale si intestinale, precizate**

A08.0 – Enterita prin *Rotavirus*

A08.3 – Alte enterite virale (pentru *Norovirus*)

II. Fundamentare

Etiologia bolii diareice acute este insuficient documentata in Romania, iar riscul de import al cazurilor de holera continua sa existe. Conditile geo-climatice din zona Deltei Dunarii si cea a litoralului Marii Negre sunt favorabile dezvoltarii vibrionului holeric.

Holera, salmonelozele, campylobacteriozele, infectiile cu *Yersinia*, *Listeria*, *Shigella*, precum si giardioza si cryptosporidioza sunt boli transmisibile cuprinse in HG nr. 589/2007, cu raportare pe *Fisa unica de raportare caz de boala transmisibila* in 5 zile de la depistarea cazului suspect/confirmat.

De asemenea, aceste infectii sunt raportabile la UE/ECDC (sistemul TESSy), in baza Deciziei 2119/98/CE si Deciziei 2002/253/CE, modificata prin Decizia 2012/506/UE si Decizia 1082/2013/UE.

III. Scop

- evaluarea potentialului epidemiologic al bolii diareice acute in Romania si a profilului microbiologic al acesteia

IV. Obiective

- monitorizarea incidentei bolii diareice acute in vederea depistarii in timp util a focarelor/epidemiilor de BDA;
- identificarea etiologiei in vederea analizarii pe tipuri de agenti determinanti a sindromului diareic;
- monitorizarea rezistentei la antibiotice a germenilor bacterieni;
- determinarea eficientei masurilor de control aplicate;
- depistarea rapida a cazurilor sporadice suspecte de holera in Romania.

V. Definitii de caz

V.1. Boala diareica acuta

Criterii clinice

Diaree acuta: Orice persoana care prezinta cel putin trei scaune moi in ultimele 24 de ore, cu sau fara deshidratare.

Diaree acuta cu sange: Diaree acuta cu sange vizibil.

Criterii de laborator

- identificarea agentului etiologic al BDA (bacterian, viral)

Criterii epidemiologice

Cel putin unul din urmatoarele trei link-uri epidemiologice:

- expunere la o sursa comuna
- transmitere interumana
- expunere la elemente contaminate din mediu

V.2. Holera

Criterii clinice

Orice persoana care prezinta:

- diaree apoasa acuta
- varsaturi
- crampe musculare
- hipotermie
- deshidratare
- colaps

Criterii de laborator

- izolarea *Vibrio cholerae* dintr-o proba biologica

si

- detectia antigenului O1 sau O139 in izolat

si

- detectia enterotoxinei holerice sau detectia genei enterotoxinei holerice in izolat

Criterii epidemiologice

Cel putin unul din urmatoarele patru link-uri epidemiologice:

- expunere la o sursa comuna
- transmitere interumana
- expunere la alimente/apa de baut contaminate
- expunere la elemente de mediu contaminate

V.3. Sindrom hemolitic uremic (SHU)

Criterii clinice

Orice persoana cu insuficienta renala acuta care prezinta cel putin unul dintre urmatoarele doua:

- anemie hemolitica microangiopatica
- trombocitopenie

VI. Clasificarea cazului

VI.1. Boala diareica acuta

A. Caz posibil:

Orice persoana care intruneste criteriile clinice

B. Caz probabil:

Orice persoana care intruneste criteriile clinice si are un link epidemiologic

C. Caz confirmat:

Orice persoana care intruneste criteriile clinice si de laborator

VI.2. Holera

A. Caz posibil:

NA (nu se aplica)

B. Caz probabil:

Orice persoana care intruneste criteriile clinice si are un link epidemiologic

C. Caz confirmat:

Orice persoana care intruneste criteriile clinice si de laborator

VI.3. Sindrom hemolitic uremic (SHU)

Caz posibil de SHU asociat VTEC/STEC: Orice persoana care indeplineste criteriile clinice pentru SHU

VII. Tipuri de supraveghere

VII.1. Boala diareica acuta (BDA)

Supravegherea epidemiologica a bolii diareice acute (BDA), cu notificare si raportare in baza **HG nr. 589/2007**, este *pasiva* si se desfasoara la nivelul TUTUROR Directiilor de Sanatate Publica judetene (DSP judetene) si a municipiului Bucuresti.

VII.2. Holera

La nivelul DSP judetene Braila, Constanta, Galati si Tulcea, cazurile de boala diareica acuta care, pe baza simptomatologiei si a link-urilor epidemiologice, pot fi incadrate ca si cazuri *probabile* de holera, vor fi investigate **OBLIGATORIU** cu laboratorul pentru vibriionul holeric (*sentinela*).

Criteriile de selectie a judetelor Braila, Constanta, Galati si Tulcea pentru supravegherea circulatiei vibriionului holeric au fost:

- mediu propice dezvoltarii vibriionului holeric judetele Braila, Galati si Tulcea (riverane Dunarii si loc de varsare a fluviului);

si

- zona maritima importanta cu risc de import al holerei, judetul Constanta.

VIII. Populatie: toti rezidentii Romaniei

IX. Perioada supravegherii

Supravegherea epidemiologica a cazurilor se desfasoara in perioada iunie - octombrie a fiecarui an.

Prima zi de raportare este **7 iunie 2016**, pentru saptamana **30 mai - 5 iunie 2016**.

In cazul in care nu se transmit noi instructiuni, supravegherea BDA se va incheia in luna noiembrie, **ultima raportare** fiind in data de **1 noiembrie 2016**, pentru saptamana **24 - 30 octombrie 2016**.

X. Date de raportare

- numar total cazuri diagnosticate cu BDA (medici de familie + spitale);
 - numar cazuri BDA diagnosticate de medicul de familie;
 - numar cazuri internate cu suspiciune de BDA si diagnosticate ca: BDA cu etiologie precizata si ca BDA cu etiologie neprecizata;
 - numar cazuri internate cu suspiciune de BDA si infirmate ca BDA.
- Raportarea se face pe grupele de varsta: sub 1 an, 1-4 ani, 5-9 ani, 10-14 ani, 15-64 ani si 65 de ani si peste.
- numar decese prin BDA inregistrate la copilul sub 1 an;
 - numar examene microbiologice efectuate si etiologiile identificate;

Sindromul hemolitic uremic (SHU): depistarea unui caz posibil se anunta imediat, telefonic si se raporteaza pe fisa de supraveghere specifica conform metodologiei nou introduse.

XI. Frecventa raportarii: *saptamanal*

XII. Flux informational si feedback

XII.1.a. Nivelul periferic: spitale/sectii de boli infectioase, respectiv unitati sanitare altele decat cele cu profil de boli infectioase (inclusiv private)

1. In fiecare zi de *luni*, raporteaza catre DSP judetean, pentru saptamana precedenta:
 - numar total cazuri diagnosticate cu BDA;
 - numar cazuri internate cu suspiciune de BDA si diagnosticate ca BDA cu etiologie precizata;
 - numar cazuri internate cu suspiciune de BDA si diagnosticate ca BDA cu etiologie neprecizata;
 - numar cazuri internate cu suspiciune de BDA si infirmate ca BDA;pe grupele de varsta: sub 1 an, 1-4 ani, 5-9 ani, 10-14 ani, 15-64 ani si 65 de ani si peste
 - numarul de decese prin BDA inregistrate la copilul sub 1 an.
2. **Anunta imediat, telefonic, depistarea unui caz posibil de sindrom hemolitic uremic (SHU) si trimite fisa de supraveghere specifica conform metodologiei nou introduse.**
3. Recolteaza probe biologice pentru diagnosticul etiologic.
Prelevarea probelor biologice se va face inainte de administrarea de antibiotice.

4. Trimit probe pentru diagnostic de laborator si/sau pentru confirmare la laboratorul de microbiologie al DSP judetean.

Pastrarea si transportul probelor de la sectia/spitalul de boli infectioase, respectiv unitatile sanitare altele decat cele cu profil de boli infectioase, la DSP judetean se vor face conform protocoalelor de recoltare, pastrare si transport probe biologice din anexele 3, 4 si 5.

XII.1.b. Nivelul periferic: laboratoare de analize medicale (publice sau private, cu exceptia laboratorului DSP judetean)

In fiecare zi de *luni*, raporteaza catre DSP judetean, numarul de examene microbiologice efectuate si etiologiile identificate in saptamana precedenta, conform anexei 2.

XII.1.c. Nivelul periferic: medici de familie

In fiecare zi de *luni*, raporteaza catre DSP judetean, pentru saptamana precedenta:

- cazurile diagnosticate cu BDA in saptamana precedenta, pe grupele de varsta: sub 1 an, 1-4 ani, 5-9 ani, 10-14 ani, 15-64 ani si 65 de ani si peste;
- numarul de decese prin BDA inregistrate la copilul sub 1 an.

Depistarea unui caz posibil de sindrom hemolitic uremic (SHU) se anunta imediat si se raporteaza pe fisa de supraveghere specifica conform metodologiei nou introduse.

XII.2. Nivelul local: Directiile de Sanatate Publica judetene si a municipiului Bucuresti

1. *Saptamanal*, in fiecare zi de *marti*, transmit prin e-mail, sectiilor de epidemiologie a bolilor transmisibile din cadrul Centrelor Regionale de Sanatate Publica (CRSP) si la CNSCBT:

- macheta in format excel, care contine datele raportate in saptamana precedenta raportarii (*luni-duminica*);
- rezultatele testelor microbiologice efectuate in cadrul laboratorului propriu si in cadrul celorlalte laboratoare de analize medicale din judet, in macheta format excel.

2. Depistarea unui caz posibil de sindrom hemolitic uremic (SHU) se anunta imediat si se raporteaza pe fisa de supraveghere specifica conform metodologiei nou introduse.

3. Trimit pentru confirmare si teste suplimentare, inclusiv de evaluare a rezistentei la antibiotice, o parte din tulpinile izolate de la cazurile de BDA, insotite de fisele de trimitere a tulpinii din anexa 1, catre CRSP Iasi (DSP judetene arondate CRSP Iasi si CRSP Bucuresti), respectiv CRSP Cluj (DSP judetene arondate CRSP Cluj si CRSP Timisoara), fie catre INCDMI Cantacuzino.

XII.3. Nivelul regional: Centrele Regionale de Sanatate Publica (CRSP)

1. *Saptamanal*, in fiecare zi de *miercuri*, transmit datele primite de la DSP judetene arondate la CNSCBT, prin e-mail, in formatul electronic furnizat

2. *Lunar* si la *sfarsitul perioadei de supraveghere*, trimit catre DSP judetene arondate, rezultatul analizei epidemiologice efectuate la nivel regional, in format electronic

3. Arondarea judetelor la CRSP-uri este dupa cum urmeaza:

- CRSP Bucuresti: Arges, Braila, Buzau, Calarasi, Constanta, Dambovita, Giurgiu, Ialomita, Prahova, Teleorman, Tulcea, Bucuresti, Ilfov;
- CRSP Cluj: Alba, Bihor, Bistrita Nasaud, Brasov, Cluj, Covasna, Harghita, Maramures, Mures, Satu Mare, Salaj, Sibiu;
- CRSP Iasi: Bacau, Botosani, Galati, Iasi, Neamt, Suceava, Vaslui, Vrancea;
- CRSP Timisoara: Arad, Caras Severin, Dolj, Gorj, Hunedoara, Mehedinti, Olt, Timis, Valcea.

XII.4. Nivelul national: Centrul National de Supraveghere si Control al Bolilor Transmisibile (CNSCBT)

1. *Saptamanal*, in fiecare zi de *joi*, transmite Directiei Generale de Asistenta Medicala si Sanatate Publica din Ministerul Sanatatii (DGAMSP-MS) analiza si interpretarea datelor saptamanale, prin e-mail.
2. *La sfarsitul perioadei de supraveghere*, va realiza analiza epidemiologica a supravegherii estivale, care va fi trimisa catre Directia Generala de Asistenta Medicala si Sanatate Publica din Ministerul Sanatatii (DGAMSP-MS), INCDMI Cantacuzino, CRSP-uri si DSP judetene, in format electronic.

XII.5. Nivelul national: INCDMI Cantacuzino

Comunica la CNSCBT (cnscbt@insp.gov.ro):

1. *saptamanal*, in fiecare zi de *miercuri*, numarul de tulpini primite, institutia care le trimite, scopul trimiterii (ex. confirmare, serotipare);
 2. *lunar, pana in data de 10 a lunii*, pentru luna precedenta, rezultatele de confirmare, tipizare si rezistenta la antibiotice a tulpinilor primite.
- Datele vor fi transmise prin e-mail, in formatele excel furnizate.

XIII. Masuri de control in focar

Se instituie imediat dupa depistarea cazului **posibil/probabil**.

A. Boala diareica acuta (BDA) - Atitudinea fata de cazuri si contacti

- Toate *cazurile* de BDA depistate se evalueaza din punct de vedere al deshidratarii - cazurile de BDA cu deshidratare medie sau grava se interneaza.
- Investigarea etiologica a cazurilor de BDA internate este obligatorie pentru unitatea sanitara cu paturi. Tulpinile izolate de la cazurile internate vor fi trimise la laboratorul de microbiologie al DSP judetean.
- Pentru tipizare microbiologica in vederea confirmarii focarelor si a trasabilitatii infectiei, DSP judetene trimit la INCDMI Cantacuzino, toate tulpinile izolate atunci cand in focar sunt implicati pana la 5 subiecti, respectiv 10 tulpini/focar, cand se inregistreaza focare de extindere mai mare.
 - *Contactii* cazurilor de BDA se supravegheaza clinic la domiciliu / in colectivitate.
 - Lucratorii cu diagnostic de BDA din sectoarele de risc se scot temporar din productie. Fostii bolnavi de BDA din sectoarele cu risc se reprimesc la locul de munca conform legislatiei in vigoare.

- In situatiile de **focare de BDA** in care etiologia ramane neprecizata, daca datele clinice si epidemiologice aduc argumente, se vor face investigatii pentru etiologii virale, inclusiv *Rotavirus* si *Norovirus*.
- In limita disponibilitatilor, se vor trimite probe biologice la INCDMI Cantacuzino pentru diagnostic si genotipare.

NOTA:

1. Pentru **toate cazurile de BDA comunitare**, indiferent de varsta, precum si pentru cazurile suspecte de **sindrom hemolítico-uremic (SHU)**, diagnosticul etiologic include si tulpinile de ***E. coli* producatoare de verotoxine (VTEC)**.

Confirmarea si tipizarea acestor tulpini se va face la INCDMI Cantacuzino, prin metode fenotipice si moleculare.

2. **Orice tulpina de *E. coli***, provenita din coprocultura de la un pacient cu BDA, **identificata/suspectata ca producatoare de diaree** (date clinice si/sau epidemiologice, date de laborator – serogrup/serotip *E. coli* diareigen) se trimite pentru **confirmare** si tipizare la **INCDMI Cantacuzino**.

La acest nivel confirmarea se va face prin metode fenotipice si moleculare.

3. In cazul **unei coproculturi negative** pentru bacterii cu patogenitate intestinala recunoscuta (ex. *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, *Campylobacter*) si **suspiciune clinico-epidemiologica** de infectie cu ***E. coli* producator de diaree** (ex. BDA la copii < 5 ani, persoane imunocompromise, focare de TIA), se vor trimite la INCDMI Cantacuzino **colonii identificate ca *E. coli*** (de preferat 10 colonii/coprocultura).

La acest nivel se va efectua diagnosticul microbiologic (patotip *E. coli* diareigen - EPEC, EHEC/VTEC, EIEC, ETEC, EAEC) prin metode fenotipice si moleculare.

4. **Toate tulpinile de *Campylobacter* si *Yersinia* identificate** in laboratoarele de microbiologie ale DSPJ/CRSP vor fi trimise pentru **confirmarea diagnosticului** la INCDMI Cantacuzino.

5. Un numar **minim de 50%** din tulpinile izolate de *Salmonella*, in laboratoarele de microbiologie ale DSPJ/CRSP vor fi trimise pentru **confirmare/serotipare/lizotipare/antibiotipare** la INCDMI Cantacuzino.

50% dintre acestea vor fi genotipate si fenotipizate la INCDMI Cantacuzino.

B. Holera

In cazul emiterii unui diagnostic de *suspiciune de holera*:

1. Toti furnizorii de servicii medicale, in baza **HG nr. 589/2007**, vor raporta catre DSP judetean cazul suspect/confirmat de holera, **imediat** dupa depistare, *initial* telefonic, apoi pe *Fisa unica de raportare caz de boala transmisibila*, in 5 zile de la data depistarii/confirmarii. Pentru usurinta supravegherii epidemiologice, definitia **cazului suspect de holera** este urmatoarea: “*bolnav care prezinta diaree apoasa acuta, varsaturi, crampe musculare, hipotermie, colaps, deshidratare*”.

Suspiciunea de holera poate fi emisa de orice medic, pe baza definitiei de caz.

Orice suspiciune de holera va fi directionata pentru internare la sectia/spitalul de boli infectioase.

Responsabilitatea completarii fisei revine initial medicului curant si este definitivata de catre medicul epidemiolog din DSP judetean.

2. DSP judetene si a municipiului Bucuresti, vor notifica *in prima ora de la depistare, telefonic*, cazul suspect de holera atat la CRSP, cat si la CNSCBT, si vor incepe investigarea cazului.

Confirmarea cazului suspect de holera se bazeaza pe diagnosticul bacteriologic stabilit de catre INCDMI Cantacuzino.

NOTA: diagnosticul bacteriologic de holera se face ierarhizat.

- **TOATE tulpinile suspecte pe mediu de cultura BSA, aglutinabile cu ser de grup O1 si oxidazo-pozitive vor fi trimise la INCDMI Cantacuzino.**
- **Se vor trimite, de asemenea, toate tulpinile suspecte pe mediu de cultura BSA, oxidazo-pozitive, neaglutinabile cu ser O1, izolate de la bolnavii cu BDA.**
- Probele biologice vor fi prelevate inainte de administrarea de antibiotic si vor fi pastrate si transportate de la sectia/spitalul de boli infectioase la laboratorul DSP judetean, iar cele pozitive la INCDMI Cantacuzino, insotite de *Formularul de trimitere a tulpinii* din anexa 1, conform protocoalelor de recoltare, pastrare si transport din anexele 3, 4 si 5.

Atitudinea fata de cazuri, contacti si purtatori

- **Contactii** cazurilor de holera confirmate bacteriologic se izoleaza obligatoriu in spitalul/sectia de boli infectioase.
- **Purtatorii** de *Vibrio cholerae O1* si *O139* se supun tratamentului antibacterian in spitalul/sectia de boli infectioase.
- Externarea bolnavilor de holera, a contactilor acestora si a purtatorilor se face conform normelor.
- Reprimirea la fostele locuri de munca a lucratorilor in sectoarele cu risc se face conform legislatiei in vigoare.

In conformitate cu **Ordinul MS nr. 883/2005, privind aprobarea Metodologiei de alerta precoce si raspuns rapid in domeniul bolilor transmisibile:**

1. DSP judetene si a municipiului Bucuresti

- vor raporta *imediat, telefonic*, la sectiile de epidemiologie a bolilor transmisibile din CRSP regionale orice situatie epidemiologica speciala depistata in cadrul sistemului de supraveghere (caz suspect sau confirmat de holera, caz suspect de sindrom hemolitic uremic (SHU), focare de BDA etc.);

- vor trimite *Raportul preliminar de alerta epidemiologica*, in cazul depasirii pragului de alerta.

2. CRSP - sectiile de epidemiologie

- vor comunica, *imediat*, la CNSCBT datele referitoare la situatiile epidemiologice speciale raportate de DSP judetene arondate;

- vor trimite *Raportul preliminar de alerta epidemiologica*, in cazul depasirii pragului de alerta in unul sau mai multe dintre judete.

3. CNSCBT

- va transmite la DGAMSP-MS, situatiile epidemiologice deosebite depistate in cadrul sistemului de alerta precoce si raspuns rapid (caz suspect sau confirmat de holera, caz suspect de sindrom hemolitic uremic (SHU), focare de BDA de colectivitate cu risc crescut pentru sanatatea publica), *in ziua raportarii*;

- in calitate de structura competenta pentru supravegherea bolilor transmisibile desemnata de Ministerul Sanatatii: raporteaza la ECDC *holera*, boala aflata sub incidenta *Deciziei Comisiei Europene 2119/98/EC din 24.09.1998*, modificata prin *Decizia Comisiei Europene 2007/875/CE* si *Decizia 1082/2013/UE*, informeaza, cu privire la cazul de *holera*, Biroul RSI si Informare Toxicologica din cadrul Institutului National de Sanatate Publica (**BRSIIT-INSP**) si DGAMSP-MS.

XIV. Analiza epidemiologica recomandata

- numar de cazuri si rata incidentei lunare si estivale a BDA, pe grupe de varsta, sex, medii si arie geografica;

- rata de fatalitate lunara si estivala specifica, la grupa de varsta 0-1 an, la nivel judetean, regional si national;

- ponderea lunara si estivala a cazurilor diagnosticate ca BDA cu etiologie identificata din totalul cazurilor raportate la nivel judetean, regional si national;

- ponderea lunara si estivala a diferitelor etiologii din totalul celor identificate la nivel judetean, regional si national;

- profilul rezistentei la antibiotice a tulpinilor izolate, lunar si estival, la nivel judetean, regional si national;

- subtipuri circulante si evidentierea tulpinilor de import.

XV. Indicatori de evaluare a sistemului de supraveghere

- % din judetele care raporteaza - *cresterea cu 10% a cazurilor de BDA cu etiologie identificata*, comparativ cu anul precedent.

ANEXA 1

DSPJ/CRSP _____

FORMULARUL de TRIMITERE a TULPINII

Cod caz*: _____

Sex: masculin feminin

Domiciliu: _____

Data nasterii: (zz/ll/aaaa) ___/___/____ Varsta (luni/ani impliniti): _____

Data debutului bolii: ___/___/____

Data recoltarii probei: ___/___/____

Data expedierii tulpinii: ___/___/____

Tipul tulpinii: _____

Tulpina izolata din: materii fecale lichid de varsatura sange altele (specificati):

Diagnostic clinic: gastroenterocolita BDA TIA altul (specificati): _____

Investigarea starii de portaj: investigatie epidemiologica (contacti) control la angajare/
periodic

A primit antibiotic? DA NU

Daca DA, tipul si durata administrarii _____

*Cod caz = codul de caz din Registrul Unic

.....

Completat de: _____

Nr. telefon: _____

Data: ___/___/____

ANEXA 2

Laboratorul _____
Saptamana _____

FORMULAR de RAPORTARE NUMERICA SAPTAMANALA a EXAMENELOR MICROBIOLOGICE EFECTUATE in LABORATORUL de ANALIZE MEDICALE

Nr. total coproculturi efectuate/ categorii persoane	Nr.coproculturi pozitive pentru:											Nr. coproculturi negative
	Salmonella	Shigella	E.coli O157	Alte patotipuri de E. coli	Yersinia	Vibrio holeric	Campylobacter	Rotavirus	Giardia	Cryptosporidium	Altele (precizati)	
Cazuri												
Contacti												
Sanatosi												
TOTAL												

Data: ___/___/___

Semnatura si parafa medicului coordonator
al laboratorului de analize medicale

ANEXA 3

PROCEDURA pentru RECOLTAREA, STOCAREA si TRANSPORTUL PROBELOR de MATERII FECALE pentru COPROCULTURA si EXAMEN COPROPARAZITOLOGIC

Domeniu de aplicare

Prezenta procedura se aplica pentru::

- diagnosticul microbiologic al infectiilor enterice: bacteriene: *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Yersinia enterocolitica*, *E. coli* patotipurile diareigene, *Campylobacter*, *Vibrio cholerae* etc.; virale: *Rotavirusuri*, *Enterovirusuri* etc. si parazitare: *Giardia*, *Entamoeba*, *Criptosporidium* etc.;
- starii de portaj pentru: *Salmonella spp*, *Shigella spp*, *Vibrio cholerae* etc.

Consideratii de biosecuritate

Probele recoltate trebuie considerate potential infectate si tratate ca atare.

Orice manopera de prelevare reprezinta un risc biologic atat pentru pacient cat si pentru personalul medical implicat in prelevarea, ambalarea, transportul probelor si curatenie.

Reguli generale:

- prelevarea se face din recipiente curate (ex. plosca de unica utilizare)
- se respecta regulile generale de igiena personala si protectia muncii (echipament de protectie, spalarea mainilor, etc)
- se folosesc manusi in timpul recoltarii si manipularii produselor patologic
- transportul probelor se face in container etans, impachetat in pungi de plastic sigilate, cu respectarea recomandarilor din ghidul de biosecuritate privind stocarea si transportul probelor biologice
- cererea de analiza va fi ambalata in plicuri, separat de recipientele de recoltare.

Descrierea procedurii

I. Recoltare

I.1. Materiale necesare pentru recoltare

- container curat, uscat, de preferat de unica folosinta pentru colectarea materiilor fecale
- container etans, curat, uscat pentru colectarea esantionului de examinat/coprorecoltor cu mediu de cultura adecvat
- mediu de transport adecvat pentru transportul tampoanelor rectale de la copii
- solutie apoasa de formaldehida 10% sau polivinil-izopropil alcool (PAV)
- tampon rectal cu dop insurubat pentru recoltarea materiilor fecale de la copilul mic sau de la alte categorii de pacienti necooperanti

I.2. Momentul optim al recoltarii

- prelevarea produsului patologic trebuie facuta cat mai aproape de debutul bolii
- materiile fecale au cea mai mare valoare pentru diagnosticul microbiologic daca sunt colectate imediat dupa debutul sindromului diareic (pentru virusuri < 48 ore, pentru bacterii < 4 zile)

- este indicat ca recoltarea sa se realizeze inainte de initierea terapiei cu antibiotice
- pentru cresterea sanselor de izolare se recomanda colectarea a 2 sau 3 probe in zile diferite

I.3. Recoltarea

I.3.1. Prelevare din scaun emis spontan

- este de preferat
- se indica in toate formele de diaree acuta, cand emisia de materii fecale este frecventa
- prelevarea din masa fecaloidea se face cu tamponul sau "lingurita" coprorecoltorului, vizand portiunile: lichide, mucoase si/sau sangvinolente atunci cand ele exista
- se colecteaza materii fecale proaspat emise in cantitate de 5g (marimea unui bob de mazare) sau 5 ml, intr-un container
- se eticheteaza containerul

I.3.2. Prelevare cu tamponul rectal de la copii sau alte categorii de pacienti necooperanti

- se inmoaie tamponul in ser fiziologic steril
- se insera tamponul prin sfincterul anal si se roteste usor
- se retrage tamponul si se examineaza pentru a se asigura ca a venit in contact cu materiile fecale
- tamponul se introduce intr-un container cu mediu de transport adecvat pentru examen bacteriologic sau virologic
- partea superioara a batului se rupe, fara a atinge tubul si se insurubeaza ferm dopul containerului
- se eticheteaza containerul

Acest mod de prelevare este recomandat si in: investigarea purtatorilor cronici de *Shigella*, *Salmonella* cu exceptia purtatorilor de *Salmonella Typhi*.

II. Stocare si transport

II.1. Probe recoltate pentru coprocultura

REGULA: orice prelevat care nu se insamanteaza pe medii de izolare (imbogatire sau selective) intr-un interval de minimum 2 ore, trebuie supus unui proces de conservare.

II.1.1. Conservare prin refrigerare:

- **rotavirusuri** = - 70°C;
- **bacterii** = limitata, cel mult 24 h la +2°C...+8 °C

Nota 1: *Shigella* si *Campylobacter* sunt in mod deosebit sensibile la temperaturi inalte si la schimbari bruste de temperatura.

Nota 2: daca proba urmeaza a fi procesata in 24 ore, majoritatea probelor pot fi pastrate la temperatura camerei

Nota 3: pentru bacteriile sensibile la frig (ex. *Vibrio cholerae*), prezervarea prin refrigerare trebuie considerata cu rezerve

II.1.2. Conservare in medii speciale

*** semisolide:**

- **mediu Cary-Blair:** poate asigura o buna conservare la temperatura mediului ambiant pana la 7 zile; este pastrat in recipiente bine inchise care sa impiedice evaporarea
- **mediul Amies**
- **mediul Stuart:** foarte scump

*** lichide:**

- **solutie salina tamponata: Sachs**
- **solutie EDTA: Shipe**

II.1.3. In suspiciunea de holera se impune efectuarea examenului direct din scaunul apos proaspat recoltat pentru evidentierea vibrionilor.

II.2. Probe recoltate pentru examen coproparazitologic

II.2.1. Probele care se vor examina pentru paraziti

- se transporta dupa omogenizare cu formaldehida 10% sau alcool polivinil-izopropilic (PAV) in proportia: 3 parti materii fecale/1 parte prezervant
- se transporta la temperatura ambianta, in containere ambalate in pungi de plastic sigilate

II.2.2. Pentru evidentierea trofozoitilor

- este strict necesar examenul extemporaneu din proba proaspata
- ideal, pentru cresterea sansei de evidentiere a parazitilor, este necesara colectarea, in decurs de maximum 10 zile, a 3 probe consecutive, care vor fi examinate imediat

NOTA:

In context epidemic:

- personalul responsabil de recoltarea probelor va anunta laboratorul de destinatie in legatura cu transportul care urmeaza sa se faca si va furniza datele necesare despre proba
- laboratorul expeditor va face demersurile necesare pentru transportarea pe cale terestra a probelor
- laboratorul de destinatie va informa expeditorul daca a primit sau nu probele.

Neconformitati

Prelevatul poate fi refuzat de laborator in urmatoarele cazuri :

- absenta etichetei pe esantionul de analizat
- absenta cererii de analiza
- identificarea pacientului: absenta, incompleta, eronata sau indescifrabila
- lipsa datelor referitoare la prelevat
- tampon de prelevare necorespunzator (fara mediu de transport, uscat, etc.)
- nerespectarea intervalului si conditiilor de stocare si transport recomandate

Formulare/inregistrari, documente conexe

- formular insotitor proba
- registru de inregistrare probe
- buletin de analiza

ANEXA 4

EXAMENUL COPROPARAZITOLOGIC

Parazitii cu localizare intestinala sau biliara pot fi identificati prin examinarea materialului fecal, a aspiratului duodenal sau sigmoidian. Elementele parazitare sunt de obicei uniform raspandite in masa fecala datorita motilitatii colonului, care asigura o amestecare a continutului. Formele vegetative pot fi gasite eventual in portiunea terminala a bolului fecal mai curand decat in cea initiala, care este mai veche.

Deoarece eliminarea diferitelor stadii parazitare nu este continua, cel putin in infectiile cronice, se recomanda recoltari si examinari repetate: de exemplu, 3 probe, la intervale de 24-48 de ore. Uneori numarul probelor examinate trebuie sa fie mai mare.

Recoltarea

Recoltarea se face in recipiente speciale, bine inchise.

In general, aceste recipiente sunt prevazute cu mici dispozitive care usureaza operatia. Recoltarea se face din mai multe puncte ale bolului fecal, in special din portiunile mai putin consistente, din cele mucoase sau eventual cu sange.

!!!!!! Se recomanda ca materiile fecale sa nu fie amestecate cu urina.

Urina poate inactiva si distruge formele vegetative ale unor paraziti.

Uneori, medicul poate recomanda administrarea unui purgativ usor. De exemplu, astfel poate fi mai usor pusa in evidenta o eventuala infectie cu *Entamoeba histolytica*.

Proba recoltata trebuie supusa examinarii in cel mai scurt timp posibil (aproximativ 30 de minute), mai ales cand scaunul este diareic si deci, se presupune existenta unor forme vegetative ce au o durata de supravietuire scurta.

Scaunele formate sau cele consistente pot fi examinate dupa intervale de timp mai mari, deoarece se presupune ca vor contine forme chistice, oua sau fragmente de paraziti sau paraziti intregi (helminti).

In cazul in care examinarea nu se poate face imediat, se recomanda fixarea materialului fecal.

Fixarea

Fixarea are rolul de a prezerva forma si structura elementelor parazitare pentru a fi mai usor recunoscute, dar si de a realiza o inactivare a lor si a celorlalte forme biologice posibil patogene.

In tabelul urmator (dupa Garcia 1995 si CDC-Diagnostic Procedures) sunt prezentati principalii agenti fixatori impreună cu avantajele si dezavantajele ce pot interveni in utilizarea lor.

Nota: In cazul in care se suspicioneaza infectie cu norovirusuri, probele biologice, recoltate ca in cazul suspiciunii de infectie cu enterovirusuri, se trimit pentru investigatii la INCDMI Cantacuzino.

Agentul fixator	Avantaje	Dezavantaje
Formol 5% (tamponat sau netamponat)	<ul style="list-style-type: none"> - usor de preparat - perioada lunga de folosire - bun fixator mai ales al concentratelor parazitare - nu interfera cu diversele kituri de diagnostic ce utilizeaza anticorpi monoclonali si nici cu coloratiile acid-fast 	<ul style="list-style-type: none"> - nu conserva bine formele vegetative - nu conserva bine morfologia parazitilor mai ales atunci cand se urmareste obtinerea unor preparate microscopice fixate si colorate - influenteaza rezultatele obtinute prin PCR
Merthiolat - Iod - Formol	<ul style="list-style-type: none"> - in cazul preparatelor umede se obtine concomitent o fixare si o colorare a parazitilor - este usor de preparat - are o perioada lunga de folosire - nu contine mercur 	<ul style="list-style-type: none"> - pe preparatele permanente morfologia parazitilor nu este la fel de bine pastrata in comparatie cu PVA sau Schaudinn - iodul poate influenta unele coloratii sau reactii de fluorescenta
Sodiu acetat + Acid acetic + Formol (SAF)	<ul style="list-style-type: none"> - este un fixator cu actiune buna asupra concentratelor - este utilizat ca fixator al unor preparate colorate - nu interfera cu diversele kituri de diagnostic ce utilizeaza anticorpi monoclonali si nici cu coloratiile acid-fast - fixarea este compatibila cu tehnicile de diagnostic serologic - este utilizat in fixarea preparatelor obtinute din scaunul fecal proaspat sau pentru formele gasite mai ales la suprafaata mucoasei intestinale - este un excelent conservant atat ale formelor vegetative cat si al chistilor 	<ul style="list-style-type: none"> - micsoareaza capacitatea de aderare a organismelor pe lama (se poate adauga un amestec de albumina si glicerina) - in cazul in care, fixarea este urmata de coloratia trichrom, morfologia parazitilor apare mai putin bine pastrata; acest inconvenient poate fi inlaturat cand fixarea este urmata de o coloratie cu hematoxilina ferica - nu se recomanda utilizarea in procedeele de concentrare - contine saruri de mercur - asigura o aderenta scazuta in conditiile in care parazitii se afla inglobati intr-o faza lichida sau mucoasa - nu asigura o buna conservare a morfologiei helmintilor, a oualor, a larvelor, a coccidiilor si a microsporidiilor
PVA Schaudinn + Polivinylalcool	<ul style="list-style-type: none"> - conserva foarte bine formele vegetative si chistice pentru coloratii permanente - asigura o buna aderenta de lama - poate fi utilizat in procedeele de concentrare (totusi formalina este mai buna) - are durata lunga de utilizare 	<ul style="list-style-type: none"> - contine derivati de mercur - este dificil de preparat in laborator - nu poate fi utilizat atunci cand se folosesc kituri de diagnostic cu anticorpi monoclonali sau coloratii de tip acid-fast
PVA modificat (Cooper, zinc bases)	<ul style="list-style-type: none"> - poate fi utilizat in prepararea amprentelor si al frotiurilor colorate - poate fi utilizat in tehnicile de concentrare - nu contine compusi pe baza de mercur. 	<ul style="list-style-type: none"> - morfologia protozoarelor este mai putin bine conservata - conservarea este mai buna cu PVA pe baza de sulfat de zinc - vizualizarea organismelor necesita o oarecare experienta

ANEXA 5

DIAGNOSTICUL GASTROENTERITEI ROTAVIRALE

Infecția rotavirală este una din cauzele principale ale gastroenteritelor nebacteriene la copil. După unii autori, acest virus este agentul etiologic la aproximativ 50% din copii în vârstă de sub 2 ani, internati pentru boala diareică acută.

Din experiența laboratorului nostru, *Rotavirusul* s-a izolat, în medie, în 21% din probele primite, în sezonul rece, de la copii, în vârstă de până la 3 ani, cu boala diareică acută.

Deoarece tehnicile de izolare a virusului pe culturi celulare și microscopia electronică sunt laborioase și costisitoare, tehnicile imunologice sunt utilizate ca metode de elecție pentru diagnosticul gastroenteritei rotvirale. Metoda imunoenzimatică (ELISA), care utilizează anticorpi monoclonali pentru identificarea rotavirusului, oferă un diagnostic rapid și permite evitarea administrării inutile a antibioticelor și reducerea timpului de spitalizare.

Recoltarea probelor de materii fecale

- în cursul recoltării probelor măsurile de precauție privind manipularea sunt cele standard pentru materialele potențial infectioase
- se recoltează circa 1g de materii fecale, într-un recipient curat (fără urme de detergent, ser sau conservanți)
- se recomandă ca recoltarea să se facă în faza acută a bolii, cât mai aproape de debut - există posibilitatea ca probele recoltate la peste 6 zile de la apariția simptomelor să nu mai conțină antigen suficient pentru a determina o reacție pozitivă

Pastrarea probelor

- la + 2 - 8°C până la 24 ore
- peste 24 ore probele se vor păstra la -20°C
- congelările-decongelările repetate pot deteriora proba

Transportul probelor

- la + 2 - 8°C.