

B. LISTA DE PROCEDURI

- 1. Microscopie pe fond intunecat**
- 2. VDRL**
- 3. RPR**
- 4. TPHA**
- 5. FTA-Abs**
- 6. ELISA Syphilis M Capture**

Microscopia pe fond intunecat pentru detectarea *Treponemei pallidum* in leziuni

Un diagnostic de sifilis se confirma folosind microscopia in camp intunecat pentru a demonstra prezenta *Treponemei pallidum* in materialul din leziunile suspecte sau din ganglionii limfatici regionali. Un rezultat pozitiv in microscopia cu fond intunecat semnifica un diagnostic sigur de sifilis primar, secundar sau congenital recent. In sifilisul primar, examinarea la microscopul cu camp intunecat poate furniza mijlocul prin care se identifica agentul etiologic al sifilisului si diagnosticul bolii inainte ca aparitia anticorpilor fata de *Treponema pallidum* sa poata fi detectata. Pentru evidentierea prezentei *Treponemei pallidum* in materialul lezional este nevoie de echipament adecvat si de personal cu experienta. Uzual se examineaza trei lame.

Principiile microscopiei in camp intunecat (termenul vechi, iesit din uz, este ultramicroscopie).

Microscopul cu lumina directa (standard) poate fi echipat pentru examinare in camp intunecat prin inlocuirea condensatorului pentru lumina directa cu un condensator cu camp intunecat (cardioid). Iluminarea pentru camp intunecat se obtine cand razele de lumina lovesc oblic preparatul, astfel ca in obiectivul microscopului nu intra raze directe ci numai razele reflectate de catre obiect. Deaceea obiectul apare stralucitor pe un fond intunecat, de unde termenul de camp intunecat. Cand un fluid continand particule, inclusiv bacterii, este pus pe o lama, razele oblice sunt reflectate de pe suprafete, ascendent si aceste particule apar iluminate stralucitor pe un fond negru. Microscopia cu fond intunecat se aplica **microorganismelor vii, mobile, transparente**, invizibile in microscopia obisnuita.

Recoltarea de probe

Leziuni pe mucoase (cervicale, vaginale, bucale, anale)

- a. Se indeparteaza orice crusta care acopera leziunea
- b. Exudatul leziunilor secundare, daca exista, se indeparteaza cu un tampon de tifon
- c. Daca este necesar se comprima baza leziunii pentru a favoriza acumularea lichidului interstitial pe suprafata ulceratiei.
- d. Se aplica o lama de sticla (grosime maxima 1mm) pe leziunea umeda, sau se foloseste o ansa bacteriologica, sau o pipeta Pasteur, pentru a transfera fluidul din leziune pe lama de sticla. Din fiecare leziune se recolteaza cate trei probe.
- e. Se aplica o lamela de sticla peste proba evitandu-se formarea bulelor de aer.
- f. Lama se examineaza imediat.
- g. Pentru a se evita uscarea lamelor aditionale, acestea se pastreaza intr-o camera umeda (de ex. o cutie Petri de dimensiuni potrivite, cu o hartie de filtru umezita). Preparatul nu trebuie sa contina o cantitate prea mare de fluid, dar trebuie sa fie in cantitate suficienta, pentru a evita uscarea inainte de examinare.

La femeie, pentru leziuni cervicale, vaginale, se procedeaza la fel, utilizandu-se pentru vizualizarea leziunii un specul (bivalva). Este foarte importanta etapa de curatire a leziunii inainte de recoltare, pentru indepartarea resturilor tisulare, florei locale (inclusiv *Treponema vaginalis*)

Leziunile mucoasei bucale: se insista asupra curatirii leziunii pentru indepartarea florei locale, inclusiv *Treponema denticola* si alte eventuale spirochete bucale sau faringiene. Daca examinarea microscopica a exudatului lezional este negativa se poate recomanda examinarea produsului de punctie a ganglionilor sateliti superficiali.

Leziunile pielii (chiar pe cale de vindecare):

Se face o incizie liniara superficiala cu varful unui ac de seringa steril si se recolteaza exudatul seros dupa indepartarea celui sanguinolent sau se injecteaza la baza leziunii 1-2 picaturi de SF steril, care apoi se aspira si se depune pe lama.

Ajustarea microscopului trebuie sa fie facuta INAINTE de colectarea probei de la pacient.

Procedura de reglare a microscopului

1. Se pune o lama goala pe platina microscopului si **se ridica condensatorul de camp intunecat** pana la inaltimea maxima. Capatul condensatorului ar trebui sa fie putin sub nivelul platinei dar in apropierea lamei fara insa sa o impinga.
2. Se deschide transformatorul in asa fel incat sa furnizeze maximum de intensitate luminoasa.
3. Se coboara usor condensatorul si se pune pe suprafata lui ulei de imersie.
4. Se pune lama cu proba pe platina centrandu-se deasupra condensatorului.
5. Se ridica cu grija condensatorul pana cand picatura de ulei imersie asigura un contact complet intre suprafata condensatorului si suprafata inferioara a lamei.
6. Deasupra probei se centreaza un obiectiv cu marire mica.
7. Se focalizeaza proba cu macroviza
8. Se centreaza lumina in camp
9. Se centreaza condensatorul ridicand sau coborand , pana se obtine cel mai mic diametru al ariei circulare de lumina intensa.
10. Se plaseaza deasupra probei obiectivul uscat 40x.
11. Se focalizeaza imaginea cu microviza
12. Daca se foloseste obiectivul 90x se pune o picatura de ulei imersie pe lamela.
13. Se aduce deasupra probei obiectivul cu imersie in contact cu uleiul de imersie de pe lamela. Daca obiectivul cu imersie are diafragma iris, se inchide diafragma pentru a reduce apertura numerica sub aceea a condensatorului cu camp intunecat
14. Se focalizeaza imaginea cu microviza. Intensitatea luminoasa a sursei de lumina poate fi crescuta sau scazuta pentru a se obtine cel mai bun contrast.

Examinarea probei pentru *Treponema pallidum*

1. Se pune lama de examinat (proba pacientului) pe platina microscopului reglat.
(Este posibil sa fie nevoie de mici ajustari de reglare).
2. Se examineaza metodic intreaga proba cu obiectivul uscat 40x cautandu-se organisme spiralate cu caracteristici morfologice si motilitate caracteristice *Treponemei pallidum* :
 - microorganism spiralat (tirbuson) avand, in functie de lungime, 8-14 spire, regulate, stranse, adinci si rigide
 - lungime : 6-14 μm cu o medie de 10 μm (ceva mai mare decat diametrul unui eritrocit)
 - foarte subtire : diametrul aproximativ de 0.25-0.35 μm
 - in timpul miscarilor active spirele nu se deformeaza
 - mobilitatea : nu se deplaseaza rapid in campul microscopic, poate fi imobila dar are miscari de translatie lente (inainte-inaoi); rotatie lenta in jurul axului longitudinal , cu sau fara inaintare, cu flexie usoara sau ondulatatie de la un capat la celalalt; flexie mediana cu revenire brusca (ca un resort elastic).
- Orice organism cu spirale grosolane care manifesta mare flexibilitate si miscari rapide dintr-un loc in altul al campului microscopic nu este *Treponema pallidum*

- Un criteriu practic pentru diferentierea *T. pallidum* de alte organisme spiralate nespecifice care se pot gasi in cavitatea bucala sau in vagin este acela ca organismele relativ uniforme ca marime, forma si motilitate vor fi de regula *T. pallidum*.
Pe de alta parte este posibil ca in preparat sa existe alte tipuri de bacterii spiralate de forme, marimi si mobilitate variabile, care pot coexista cu *T.pallidum*.
Este de preferat sa se evite examinarea lezunilor orale dat fiind morfologia asemanatoare a *T.pallidum* si *T. denticola* si sa se examineze cu atentie speciala leziunile vaginale
 - Inainte de a da un rezultat negativ, proba trebuie examinata sistematic, in intregime.
Pentru examinarea adecvata a probei se incepe din coltul superior stang al lamelei, traversare spre latura dreapta a lamelei, coborare usoara si traversare spre stanga; se continua in aceeaasi maniera pana cand se acopera toata lamela.
3. Daca se observa un organism suspect, se centreaza in camp pentru examinarea ulterioara cu obiectivul cu imersie
4. Fiecare din cele 3 specimene colectate trebuie sa se examineze minimum 10 min. inainte de a se da un rezultat negativ. Lamele aditionale se pun intr-o camera umeda pana la examinare.
5. Masuri de precautie : manusi pentru examinator, containere de bioprotectie, potrivite pentru aruncarea lamelor.

Raportarea si interpretarea rezultatelor

Raportare	Rezultate
Camp intunecat pozitiv	Organisme care au caracteristicile morfologice si de motilitate ale <i>Treponemei pallidum</i>
Camp intunecat negativ /neconcludent	Nu s-au gasit organisme treponemice sau spiralate; nu s-au gasit organisme care au caracteristicile morfologice si de motilitate ale <i>Treponemei pallidum</i>
Camp intunecat nesatisfacator	Nu s-a gasit <i>Treponema pallidum</i> dar proba a avut prea multe elemente refractile (hematii, leucocite, bule de aer, fragmente de tesut) sau lama era uscata.

Orice leziune genitla trebuie considerata sifilitica pana la proba contrarie. Leziunile extragenitale nedureroase sau putin dureroase, induratiile si adenopatia regionala trebuie considerate ca probabil sifilitice. Imposibilitatea de a gasi treponemele nu exclude diagnosticul de sifilis.

Rezultatele negative pot avea urmatoarele semnificatii :

1. Numarul organismelor este insuficient pentru a fi detectate
2. Pacientul a fost tratat cu antibiotice local sau sistemic
3. Leziunea este veche, in curs de rezolutie.
4. Leziunea este de sifilis tardiv
5. Leziunea nu este sifilitica.

Surse de eroare.

Erori de pregatire a preparatului microscopic.

- a. Daca proba contine prea multe hematii si leucocite, bule de aer sau fragmente de tesut, aceste elemente refractile pot masca prezenta *Treponemei pallidum*
- b. Daca lamele de microscop sunt mai groase de 1mm, sau daca lamele sau lamelele sunt murdare sau zgariate, este greu sa se faca o examinare reusita.
- c. Daca in proba este o cantitate de fluid excesiva sau insuficienta, examinarea va fi dificila.

Erori de microscopie

- a. Daca nu se pune ulei de imersie intre condensator si lama, lumina nu va ajunge la proba
- b. Daca condensatorul de camp intunecat nu este bine centrat sau focalizat, iluminarea nu va fi optima
- c. Daca ajunge ulei pe obiectivele uscate, imaginea obtinuta va fi tulbure

Erori de interpretare

- a. Daca examinatorul nu este familiarizat cu caracteristicile morfologice si de motilitate ale *Treponemei pallidum* poate sa dea un rezultat fals pozitiv sau fals negativ
- b. Daca se confunda organisme sau obiecte spiralate nespecifice, fragmente de tesut, fibre textile sau alte obiecte exogene cu treponemele, se poate ajunge la un rezultat fals pozitiv
- c. Un interval prea lung intre pregatirea preparatului si examinarea lui poate produce miscari atipice (ocasionale, eratic) ale *Treponemei pallidum* ajungandu-se la un rezultat fals negativ.