

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 – Giardioza

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 vibriunii holerice.

Holera, salmonellozele, campylobacteriozele, infectiile cu *Yersinia*, *Listeria*, *Shigella*, precum si giardioza si cryptosporidioza sunt boli transmisibile cuprinse in HG 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, in baza Deciziei 2119/98/EC, in sistemul TESSy.

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 analizei pe tipuri gnosologice 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

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 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 un link epidemiologic

C. Caz confirmat:

Orice persoana care intruneste criteriile clinice si de laborator

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, toate cazurile de BDA raportate vor fi investigate **OBLIGATORIU** cu laboratorul si pentru vibrionul holeric (*sentinela*).

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

- mediu propice dezvoltarii vibrionului 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 sfarsitul lunii mai – inceputul lunii noiembrie a fiecarui an.

Prima zi de raportare este **5 iunie 2012**, pentru saptamana **28 mai – 3 iunie 2012**.

In cazul in care nu se transmit noi instructiuni, supravegherea BDA se va incheia in luna noiembrie, **ultima raportare** fiind in data de **5 noiembrie 2012**, pentru saptamana **29 octombrie – 4 noiembrie 2012**.

X. Date de raportare

- numar cazuri diagnosticate cu BDA
- numar cazuri cu suspiciune de holera
- numar cazuri internate cu suspiciune de BDA/holera
- numar cazuri externate: cu diagnostic de BDA cu etiologie precizata/cu agent etiologic neprecizat si cu infirmarea 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 coprobacteriologice efectuate si etiologiile identificate
- prezenta sau absenta sindromului hemolitic uremic (SHU)

XI. Frecventa raportarii: *saptamanal*

XII. Flux informational si feedback

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

a. in fiecare zi de *luni*, raporteaza catre DSP judetean, pentru saptamana precedenta:

- numarul de cazuri internate cu diagnosticul de BDA
- numarul de cazuri externate cu diagnosticul etiologic precizat (conform CIM)
- numarul de cazuri externate cu diagnosticul de BDA cu agent etiologic neprecizat
- numarul cazurilor externate cu infirmarea 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
- numar suspiciuni SHU

b. recolteaza probe biologice pentru diagnosticul etiologic

Prelevarea probelor biologice se va face inainte de administrarea de antibiotic.

c. 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 4, 5 si 6.

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

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

b. trimit toate tulpinile neidentificate la laboratorul de microbiologie al DSP judetean

Pastrarea si transportul tulpinilor izolate la laboratorul de microbiologie al DSP judetean, se va face conform protocoalelor din anexele 4, 5 si 6.

NOTA: In judetele Braila, Constanta, Galati si Tulcea, la toate cazurile raportate, internate sau nu, cu diagnosticul de BDA, probele prelevate pentru stabilirea etiologiei vor fi testate OBLIGATORIU si pentru vibrionul holerici.

Nivelul periferic: medici de familie - in judetele Braila, Constanta, Galati si Tulcea (sentinela)

- a. 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
 - numar suspiciuni SHU
- b. preleveaza probe biologice la cabinetul de medicina de familie sau redirectioneaza persoana suspecta catre laboratorul de microbiologie al DSP judetean
- Recoltarea probelor biologice se va face inainte de administrarea de antibiotic. Pastrarea si transportul probelor pentru diagnosticul de laborator la laboratorul de microbiologie al DSP judetean se vor face conform protocoalelor din anexele 4, 5 si 6.

Nivelul local: Directiile de Sanatate Publica Judetene si a municipiului Bucuresti

- a. *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 din saptamana precedenta raportarii (*luni-duminica*)
 - notificarea prezentei sau absentei sindromului hemolitic uremic (SHU) - **inclusiv raportare „zero”**
 - rezultatele testelor microbiologice efectuate in cadrul laboratorului propriu si in cadrul celorlalte laboratoare de analize medicale din judet, conform anexei 3
- b. trimit catre laboratoarele de microbiologie din CRSP-urile la care sunt arondate sau INCDMI Cantacuzino, in cazul judetelor arondate CRSP Bucuresti:
- o parte din tulpinile izolate de la cazurile de BDA si tulpinile care nu au putut fi identificate in laboratoarele proprii, pentru diagnostic, confirmare si teste suplimentare, inclusiv de evaluare a rezistentei la antibiotice, impreuna cu fisa de trimitere a tulpinii din anexa 1
- c. *lunar*, trimit catre cabinetele medicilor de familie si catre spitalele/sectiile de boli infectioase si pediatrie, rezultatul analizei epidemiologice efectuate la nivel local, in format electronic

Nivelul regional: Centrele Regionale de Sanatate Publica (CRSP)

- a. *saptamanal*, in fiecare zi de *miercuri*, transmit prin e-mail, in formatul electronic furnizat, la CNSCBT (cnscbt@insp.gov.ro) datele primite de la DSP judetene arondate, impreuna cu analiza si interpretarea acestora
- b. comunica catre DSP judetene arondate rezultatele pentru probele lucrate la nivelul laboratorului propriu
- c. activitatea laboratorului de microbiologie va fi raportata la CNSCBT utilizand sheet-urile desemnate din macheta excel furnizata
- d. trimit la CNEMM - INCDMI Cantacuzino:
- tulpinile care nu au putut fi identificate si tulpinile pentru care nu s-a putut face caracterizarea de serogrup si serotip, antibiograma
 - 10% din agentii etiologici izolati in laboratorul propriu (in cazul paucitatii de izolare se trimit toate tulpinile izolate) in vederea controlului extern de calitate
- e. *lunar* si la *sfarsitul perioadei de supraveghere*, trimit catre DSP judetene arondate, rezultatul analizei epidemiologice efectuate la nivel regional, in format electronic

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

a. *saptamanal*, in fiecare zi de *joi*, transmite prin e-mail, Directiei de Sanatate Publica si Control in Sanatate Publica din Ministerul Sanatatii (DSPCSP-MS) datele saptamanale, impreună cu analiza si interpretarea acestora

b. transmite prin e-mail datele privind situatiile epidemiologice deosebite depistate in cadrul sistemului de alerta precoce si raspuns rapid (caz suspect sau confirmat de holera, focare de BDA de colectivitate cu risc crescut pentru sanatatea publica), *in ziua raportarii*, catre Directia de Sanatate Publica si Control in Sanatate Publica din Ministerul Sanatatii (DSPCSP-MS),

c. *lunar*, trimite catre CRSP-uri, rezultatul analizei epidemiologice efectuate la nivel national, in format electronic, iar la *sfarsitul perioadei de supraveghere*, catre INCDMI Cantacuzino, CRSP-uri si DSP judetene

INCDMI Cantacuzino

a. comunica la CNSCBT:

- *saptamanal*, in fiecare zi de *miercuri*, numarul de tulpini primite, institutia care le trimite, scopul trimiterii (diagnostic, confirmare, serotipare)

- *lunar*, *pana in data de 10 a lunii*, pentru luna precedenta, rezultatele de confirmare, tipizare si rezistenta la antibiotice a tulpinilor trimise de laboratoarele DSP/CRSP, in baza electronica de date furnizata

XIII. Masuri de control in focar

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

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 trasarii infectiei, DSPJ/CRSP trimite la INCDMI Cantacuzino toate tulpinile izolate atunci cand in focar sunt implicati pana la 10 subiecti; cand se inregistreaza focare de extindere mai mare se expediaza 10 tulpini plus 10% din numarul care depaseste 10 cazuri

- **contactii** cazurilor de BDA se supravegheaza clinic la domiciliu/in colectivitate

- lucratorii cu diagnosticul 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*. Se vor trimite probe biologice la INCDMI Cantacuzino pentru diagnostic si genotipare.

De asemenea, vor fi avute in atentie *Giardia* si *Cryptosporidium*.

NOTA:

1. *pentru toate cazurile de BDA comunitare, indiferent de varsta, precum si pentru cazurile de sindrom hemolitico-uremic (SHU), diagnosticul etiologic include si tulpinile de E. coli producatoare de verotoxine (VTEC) serotip O157:H7.* 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 identificate in laboratoarele de microbiologie ale DSPJ/CRSP vor fi trimise pentru confirmarea diagnosticului 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/confirmit 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.

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

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

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 DSPJ, 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 4, 5 si 6.

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, 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 DSPCSP-MS, situatiile epidemiologice deosebite depistate in cadrul sistemului de alerta precoce si raspuns rapid (caz suspect sau confirmat de holera, 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 informeaza, cu privire la cazul de **holera**, Biroul RSI si Informare Toxicologica din cadrul Institutului National de Sanatate Publica (**BRSIIT-INSP**) si DSPCSP-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 fatalitate lunara si estivala specifica la grupa de varsta 0-1 an, la nivel judetean, regional si national
- ponderea lunara si estivala a cazurilor cu diferite etiologii identificate din totalul cazurilor raportate la nivel judetean, regional si national
- ponderea lunara si estivala a diferitelor etiologii din totalul celor identificate la nivel judetea, 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: _____

Telefon: _____

Data: ___/___/____

ANEXA 2

Laboratorul _____
Saptamana _____

**FORMULAR DE RAPORTARE NUMERICA SAPTAMANALA
A EXAMENELOR COPROBACTERIOLOGICE EFECTUATE IN
LABORATORUL DE ANALIZE MEDICALE DIN JUDET
SI A ETIOLOGIILOR IDENTIFICATE**

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	Crypto sporidium	Altele (precizati)	
Cazuri												
Contacti												
Sanatosi												
Total												

Data: ___/___/_____

**Semnatura si parafa medicului coordonator
al laboratorului de analize medicale**

ANEXA 3

DSPJ _____
Saptamana _____

**FORMULAR DE RAPORTARE NUMERICA SAPTAMANALA
A EXAMENELOR COPROBACTERIOLOGICE EFECTUATE IN
LABORATOARELE DE MICROBIOLOGIE DIN JUDET SI AL DSPJ
SI A ETIOLOGIILOR IDENTIFICATE**

Nr. total coproculturi efectuate in laboratorul DSPJ	Nr.coproculturi pozitive pentru :											Nr.coproculturi negative
	Salmonella	Shigella	E.coli O157	Alte patotipuri de E. coli	Yersinia	Vibron holeric	Campylo-bacter	Rotavirus	Giardia	Cryo sporidium	Altele (precizati)	
Cazuri												
Contacti												
Sanatosi												
Total												
Nr. total copro-culturi efectuate in alte laboratoare din judet	Nr.coproculturi pozitive pentru :											Nr.coproculturi negative
	Salmonella	Shigella	E.coli O157	Alte patotipuri de E. coli	Yersinia	Vibron holeric	Campylo-bacter	Rotavirus	Giardia	Cryo sporidium	Altele (precizati)	
Cazuri												
Contacti												
Sanatosi												
Total												

Data: ___/___/_____

Semnatura si parafa medicului sef
al laboratorului de microbiologie

ANEXA 4

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 patologice
- 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 fecaloida 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 5

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 (helminți).

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 intervenii 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"> - micsoreaza 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 6

DIAGNOSTICUL GASTROENTERITEI ROTAVIRALE

Infectia rotavirala este una din cauzele principale ale gastroenteritelor nebacteriene la copil. Dupa unii autori, acest virus este agentul etiologic la aproximativ 50% din copii in varsta de sub 2 ani, internati pentru boala diareica acuta.

Din experienta laboratorului nostru, *Rotavirusul* s-a izolat, in medie, in 21% din probele primite, in sezonul rece, de la copii, in varsta de pana la 3 ani, cu boala diareica acuta.

Deoarece tehnicile de izolare a virusului pe culturi celulare si microscopia electronica sunt laborioase si costisitoare, tehnicile imunologice sunt utilizate ca metode de electie pentru diagnosticul gastroenteritei rotavirale. Metoda imunoenzimatica (ELISA), care utilizeaza anticorpi monoclonali pentru identificarea rotavirusului, ofera un diagnostic rapid si permite evitarea administrarii inutile a antibioticelor si reducerea timpului de spitalizare.

Recoltarea probelor de materii fecale

- in cursul recoltarii probelor masurile de precautie privind manipularea sunt cele standard pentru materialele potential infectioase
- se recolteaza circa 1g de materii fecale, intr-un recipient curat (fara urme de detergent, ser sau conservanti)
- se recomanda ca recoltarea sa se faca in faza acuta a bolii, cat mai aproape de debut - exista posibilitatea ca probele recoltate la peste 6 zile de la aparitia simptomelor sa nu mai contina antigen suficient pentru a determina o reactie pozitiva

Pastrarea probelor

- la + 2 - 8°C pana la 24 ore
- peste 24 ore probele se vor pastra la -20°C
- congelarile-decongelarile repetate pot deteriora proba

Transportul probelor

- la + 2 - 8°C.