

ISTORICUL DIAGNOSTICULUI BACTERIOLOGIC

Conf. univ. dr. **Mihaela Idomir**, prof. univ. dr. **Codruța Nemet**,
prof. univ. dr. **Liliana Rogozea**, șef lucr. dr. **Alexandru Bălescu**, șef lucr.dr. **Pascu Alina**
Universitatea Transilvania din Brașov, Facultatea de Medicină

Abstract:

The study of the historical sources showed that, until the 18th century, medicine was dominated by idealist concepts. In the second part of the 19th century, microbiology became a independent science. Microbes have been observed the first time by Antoni van Leeuwenhoek, but a huge step forward was done by the epochal discoveries of the French scientist Louis Pasteur, who could determine the relation of causality between microbes and infections, founding the „theory of germs”. A very important contribution was also that of the German doctor Robert Koch who has confirmed, in his postulates, the observations of Pasteur, has discovered and cultivated agents of some infectious diseases and has introduced new techniques of diagnosis. In this period several researchers have contributed to the development of the scientific bacteriology. In the 20th century, there were made important progresses regarding the introduction of the electronic microscopy and the techniques with radioactive isotopes. Also, the use of genetic engineering has opened new perspectives. In our days, a tendency for the modernization and standardization of the bacteriological diagnostic can be observed.

Keywords: bacteriological diagnoses, theory of germs

Bacteriile au constituit primele forme de viață de pe Terra, cele mai vechi rămășițe fosilizate descoperite până în prezent datând de circa 3,5 miliarde de ani. Este demonstrat în prezent faptul că a fost necesară o perioadă îndelungată, de aproximativ 1,5-2 miliarde de ani, până la apariția organismelor superioare. Prin urmare, specia umană și-a dus existența, încă de la începuturile evoluției sale, într-o lume populată de microorganisme.

Din cele mai vechi timpuri, omenirea a fost apăsată de povara unor mari „flageluri” ca variola, ciuma, tifosul exantematic, holera, febra galbenă, difteria, etc. care au decimat-o secole de-a rândul. Există dovezi că oameni celebri din diverse perioade istorice și-au găsit sfârșitul din cauza unor boli identificate astăzi ca fiind cu etiologie infecțioasă. Dintre aceștia fac parte faraonii Ramses I, mort din cauza unei infecții a urechii și Ramses V, răpus de variolă, împăratul roman Marcus Aurelius Antoninus, victima unei epidemii de variolă, Alexandru cel Mare, decedat din cauza unei infecții pulmonare și bunul său prieten, Hephaestion, care a suferit de febră tifoidă. De asemenea, de-a lungul secolelor, multe personalități artistice au fost afectate de sifilis sau de tuberculoză.

Încă din antichitate, teama de aceste boli necruțătoare i-a determinat pe oameni să încerce să prevină izbucnirea unei epidemii chiar în contextul în care nivelul redus al cunoștințelor lor nu le permitea înțelegerea cauzelor acestora.

Astfel, cadavrele și obiectele contaminate erau incinerate iar în case ardeau sulf.

Medicina antică era dominată de empirism, bolile fiind abordate mai mult din perspective mitologice sau filozofice. Unii oameni luminați ai epocii s-au situat totuși pe poziții materialiste, bazându-se pe observațiile personale asupra naturii, dar din cauza inexistenței mijloacelor tehnice de obiectivare, interpretarea acestora a fost adeseori eronată. Aristotle (384-322 î.Ch.), a observat că materia organică în descompunere este populată de viețuitoare mărunte (muște, viermi) și a considerat că acestea apar în mod spontan. El a enunțat „teoria generațiilor spontane”, care, deși eronată, a dominat secole de-a rândul. Unii medici sau filozofi au intuit existența unor particule vii, posibil implicate în producerea sau transmiterea unor boli, pentru care au folosit denumiri diferite: Tucidide - „contagium animatum”, Hippocrat - „miasme morbide”. Lucretius Carus - „germeni ai bolii și ai morții”. În anul 50 î.Ch., Marcus Terentius Varro vorbea despre existența, în vecinătatea mlaștinilor, a unor mici creaturi, pe care le numea „animalis minuta”, care nu sunt vizibile, dar pot pluti în aer, pătrund în corp prin nas și gură și pot cauza boli grave. În 30 î.Ch., Columella spunea că febra poate fi cauzată de insecte de mlaștină. În lucrarea sa „Canoanele medicinei”, în anul 1010, Avicenna scria că secrețiile corpului uman sunt contaminate cu corpi străini înainte de debutul unor infecții.

Până la sfârșitul secolului al XVI-lea, nu au fost realizate progrese importante în ceea ce privește bolile contagioase. În 1546, omul de știință italian Girolamo Fracastoro a sugerat că unele boli epidemice sunt produse de forme de viață invizibile pe care le numea „seminaria prima”. În anii care au urmat, alți cercetători au încercat să explice contagiozitatea unor boli prin existența unor particule invizibile (Kircher – 1646, Hauptmann – 1650, Langius – 1650, Boghurst – 1665, Diemerbroeck – 1665, Hooke – 1665, Redi – 1668).

Un uriaș pas înainte în aprofundarea cunoașterii naturii a constat în construirea primelor microscopice. Majoritatea autorilor îi consideră constructorii ai primului microscop pe opticienii olandezi Zacharias și Hans Jansen. În 1590, aceștia au plasat o lentilă în spatele alteia realizând un microscop cu un tub de 2 metri lungime. Antoni van Leeuwenhoek (1632-1723), un șlefuitor de lentile olandez, a reușit să obțină lentile cu putere de mărire de până la 270 de ori și distanță focală de 1mm. A fost primul care, analizând apa reziduală și diverse produse biologice, a observat microorganisme pe care le-a desenat și tipărit, între 1675 și 1708, numindu-le „viva animalcule”. În 1667, Robert Hooke, în lucrarea „Micrographie”, a tipărit desene ale unor celule vegetale pe care le-a văzut la microscop. În a doua jumătate a secolului al XVIII-lea, utilizarea microscopiei a fost restrânsă datorită concepțiilor conservatoare din epocă și a faptului că interpretările erau adesea greșite din cauza aberațiilor cromatice. În 1695, Gregory D. a introdus combinații de lentile cu dispersii diferite pentru a corecta această deficiență. În 1774, matematicianul Euler L. a explicat științific aberațiile cromatice și a calculat ce obiective trebuie să se construiască pentru a le diminua, fapt pus apoi în practică de Beeldsnyder F. G. (1735-1808). Din 1821, pe parcursul activității sale, Amici G. D. a dezvoltat sistemele de lentile acromatice și în 1855 a inventat obiectivul cu imersie ce a permis observarea detaliilor de structură ale bacteriilor. În 1854, Ridell a realizat microscopul binocular iar în 1878, Ernst Karl Abbé E. (1840-1905) a formulat teoria formării imaginii în microscop, care a condus la reproductibilitatea rezultatelor și la creșterea performanțelor, a introdus condensatorul ce îi poartă numele și examinarea microscopică cu imersie.

Studierea microorganismelor a devenit

preocuparea unei pleiade de cercetători (Francesco Redi, John Needham, Lazzaro Spallanzani, Theodore Schwan, Georg Friedrich Schroder, Theodor van Dusch, Felix Pouchet, John Tyndall, Ferdinand Cohn, etc.).

Momentul culminant care a marcat începuturile microbiologiei ca știință și a deschis era diagnosticului bacteriologic a constat în descoperirile epocale ale marelui savant francez Louis Pasteur (1822-1895), considerat „părintele microbiologiei”. Acesta a stabilit relația de cauzalitate între microb și infecție și a elaborat „teoria germenilor”. Unele dintre contribuțiile sale esențiale se referă la practica diagnosticului bacteriologic. A recomandat folosirea flacoanelor sterile, acoperite cu dopuri de vată. De asemenea a introdus procedeul de sterilizare cu aer cald (la temperatură de 180°C, timp de 2 ore), în cuptorul Poupinel și flambarea instrumentelor și recipientelor din sticlă. Prin urmare, Pasteur a propus modul de lucru aseptice în bacteriologie fiind inițiatorul asepticii. El sugera 3 metode prin care pot fi îndepărtate bacteriile aflate dintr-un produs: filtrarea, prelucrarea termică și expunerea la soluții chimice. Ca urmare a studiilor efectuate asupra bolilor epidemice umane și animale (holera găinilor, antraxul, ciurma, tuberculoza, febra tifoidă, difteria, etc.) și asupra fermentației alcoolice, lactice sau butirice, a furnizat informații importante despre proprietățile fiziologice ale bacteriilor și despre diversitatea lor, care au stat la baza încercărilor ulterioare de sistematizare a bacteriologiei. În anul 1877 a descoperit specia *Clostridium septicum* iar în 1880 a însămânțat puroi extras dintr-un furuncul într-un mediu lichid și a reușit să cultive pentru prima dată in vitro stafilococii, germeni descoperiți microscopic în 1878 de o altă personalitate marcantă din epocă, Robert Koch (1843-1910).

În 1884 Hans Christian Gram a introdus colorația care îi poartă numele, folosită cel mai frecvent în bacteriologie și în zilele noastre.

Microbiologul francez Charles Chamberland (1851-1908), colaborator al lui Louis Pasteur, a dezvoltat, în 1884, un filtru din porțelan care astăzi îi poartă numele, cu pori de dimensiuni mai mici decât bacteriile, putând astfel introduce metoda sterilizării prin filtrare. De asemenea, un proiect de cercetare pe care l-a coordonat a condus la inventarea autoclavului.

Medicul german Robert Koch, „părintele școlii germane de microbiologie”, laureat al

premiului Nobel pentru Fiziologie sau Medicină în 1905, cunoscut mai ales pentru postulatele ce fundamentează „teoria germenilor” enunțată de Pasteur, a demonstrat că infecțiile specifice sunt cauzate de germeni patogeni specifici. Una dintre contribuțiile sale la diagnosticul bacteriologic a constat în introducerea frotiului în practica microscopiei. De asemenea, a fost preocupat de cultivarea bacteriilor *in vitro* și de izolarea agentului patogen în cultură pură. Folosind aceste metode, el a observat agentul antraxului (1876), stafilococii (1878), bacilii tuberculoși (1882) și vibrionii holerei (1883). În 1883, Koch a descoperit hemofili pe frotiurile din secreții conjunctivale.

Înainte de Louis Pasteur, au existat puține tentative de cultivare a bacteriilor. În 1823, Bizzi reușise să izoleze și să transfere bacterii pe materiale făinoase. În anul 1872, Schroeter, a reușit să separe bacterii cromogene folosind ca substraturi solide cartof, albuș de ou coagulat, paste, carne. Nu a reușit acest lucru în cazul bacteriilor acromogene, mai ales al celor cu culori apropiate de cea a mediului de cultură. Mai târziu Klebs (1873), Lister (1878), Salomonsen (1876) și alții au încercat să obțină culturi bacteriene pure, cu grade diferite de succes. Folosirea mediilor lichide ridica greutăți insurmontabile din acest punct de vedere. Găsirea unei metode de izolare a bacteriilor din produsele bolnavilor și cultivarea lor în cultură pură devenise dezideratul microbiologilor, preocupați de descoperirea unui substrat solid.

Meritul de a introduce tehnica cultivării bacteriilor pe medii solide i se atribuie lui Robert Koch. El izolase agenții antraxului (1876) și streptococii din puroi (1881). A înțeles că mediile pentru obținerea unor culturi pure trebuie să fie solide, transparente și sterile. Căuta un agent de solidificare eficient. Un colaborator al său cu contribuții valoroase în domeniul bacteriologiei a fost naturalistul german Ferdinand Julius Cohn. Este unanim recunoscut meritul colaboratorilor săi, Walter și Fannie Hesse. Walter Hesse lucra în laboratorul lui Koch, în poziție postdoctorală, fiind preocupat de cultivarea florei bacteriene din aer. În acest scop folosea medii cu gelatină, agentul de solidificare utilizat de microbiologii din perioada sa. Dezavantajele acesteia constau în faptul că la 37°C era fluidă și era lichefiată de unele bacterii. Soția sa, Fannie Eilshemius Hesse, îi prepara

mediile de cultură. Văzând eșecul experimentelor lui Walter, Fannie a propus folosirea, ca agent de solidificare, a unui extract de alge numit agar-agar, pe care îl folosea la prepararea gemurilor. În anul 1881, i-au comunicat printr-o scrisoare lui Robert Koch rezultatele, acesta a preluat metoda și, în 1884, a reușit să obțină agenții tuberculozei în cultură pură.

Pasteur și Koch, sunt considerați fondatorii microbiologiei, dar obiectul cercetărilor lor au fost bacterii de importanță medicală. Fondatorii microbiologiei generale pot fi considerați Martinus Beijerinck (1851-1931) și Sergei Winogradsky (1856-1953). Martinus Beijerinck a contribuit la diagnosticul bacteriologic prin punerea la punct a unor tehnici de îmbogățire a culturilor iar Sergei Winogradsky a reușit să izoleze bacteriile nitrificatoare.

În 1887, microbiologul german Richard Julius Petri (1852-1921), concomitent cu tehnicile de cultivare nou introduse de Robert Koch, a propus în acest scop un recipient din sticlă care permitea creșterea bacteriilor pe suprafața unui mediu solid, în condiții de sterilitate, care este și astăzi denumit placa Petri. Aceste plăci puteau fi sterilizate prin căldură uscată. În prezent, aceste plăci sunt făcute din materiale plastice și sunt de unică folosință.

Cultivarea bacteriilor în condiții de laborator a început să fie practică din secolul al XIX-lea însă primele încercări de testare în condiții de laborator a sensibilității bacteriilor la antibiotice precum și de determinare a eficienței antibioticoterapiei în practica clinică au început să se realizeze din anul 1940. Ulterior, pentru eliminarea sau diminuarea acțiunii unor factori perturbatori, pentru antibiogramă s-au adoptat proceduri standardizate, care au crescut eficiența acestei tehnici și valoarea sa în practica medicală.

După 1950, principalele momente în dezvoltarea diagnosticului bacteriologic au constat în introducerea microscopiei electronice și a tehnicilor cu izotopi radioactivi, ce au permis observarea infrastructurii bacteriene și identificarea unor noi specii patogene. În laboratoarele performante, pentru diagnosticul bacteriologic sunt utilizate teste genetice și P.C.R. (polymerase chain reaction).

În anul 1977, Gilbert W. și Sanger F. au determinat secvența bazelor în acizii nucleici iar în 1983, Kary Mullis a inventat P.C.R.

În medicina modernă este de neconceput stabilirea diagnosticului infecțiilor fără utilizarea investigațiilor microbiologice care pot confirma suspiciunile clinicianului. În contextul perioadei actuale, caracterizată printr-o dinamică continuă a etiologiei și modalităților de manifestare a bolilor infecțioase, dezvoltarea diagnosticului bacteriologic rămâne o problemă mereu actuală.

Bibliografie

1. Alcamo E. – Fundamentals of microbiology. The Benjamin/Cummings Publishing Company, USA, 1994.
2. Baron S. – Medical Microbiology (4th edition), University of Texas Medical Branch, 2003.
3. Bîlbî V., Pozsgî N. – Bacteriologie medicală - vol. II. Ed. Medicală, București, 1985.
4. Lucia Debeleac, Popescu-Drânda M. – Microbiologie. Ed. Amaltea, București, 1994.
5. Kaiser G. – Microbiology. The Community College of Baltimore County , 2003.
6. Kathleen Talaro, Talaro A. – Foundations in microbiology, basic principles. Wm. C. Brown Publishers, USA, 1996.
7. Nester E., Roberts E., Nancy Pearsall, Denise Anderson, Martha Nester – Microbiology, a human perspective, WCB/McGraw-Hill, USA, 1998.
8. Paustian T. – Microbiology Webbed Out. University of Wisconsin-Madison, 2003.
9. Prescott L., Harley J., Klein D. – Microbiology, WCB/McGraw-Hill, USA, 1999.
10. Todar K. – Prokaryotic microbiology. University of Wisconsin-Madison, 2003.
11. Highlights in the History of Microbiology, <http://users.stlcc.edu/kkiser/History.page.html>
12. MicrobiologyBytes, <http://microbiologybytes.wordpress.com>
13. A History of Microbiology, <http://microbes.historique.net/history.html>