

Diagnosticul de laborator al infecțiilor produse de bacilli gram negativi non fermentativi și bacteriile anaerobe

Pseudomonas aeruginosa, cel mai reprezentativ bacil Gram-negativ non fermentativ, cunoscut și sub denumirea de bacil piocianic este răspândit în natură, în ape de suprafață, pe vegetale și în alimente. A fost izolat din mediul spitalicesc în: apă distilată, soluții saline, soluții antiseptice și dezinfectante, soluții pentru irigații, soluții perfuzabile, instalații și obiecte sanitare, instrumentar medical.

Cel mai frecvent sunt implicați în producerea infecțiilor oportuniste sau nosocomiale, la pacienți spitalizați sau cu imunodepresie, cu arsuri extinse, traumatisme ale pielii, catetere sau alte manevre medicale în zona paratului genito-urinar, fibroză chistică.

Căile de transmitere sunt: mâinile murdare, aparatele de respirație artificială, fluidele intravenoase (infecții nosocomiale).

Caracteristici morfologice: sunt bacili Gram negativi, subțiri, drepti cu dispoziție pleomorfă, necapsulați, nesporulați, mobili datorită unui cil dispus la unul dintre poli bacilului. Secretă pigmenți difuzibili cu ar fi: piocianină (culoare albastră), pioverdină (galben-verde), piorubină (culoare roșie), piomelanină (brun, brun-negru).

Diagnosticul de laborator

Diagnostic bacteriologic

- Recoltarea produselor patologice: puroi specific acestei etiologii (de culoare verde), urină, LCR, spută, soluție antiseptică slabă, săpun
- Examenul microscopic: se realizează un frotiu colorat Gram pe care se evidențiază bacili Gram negativi, subțiri.
- Însămânțarea pentru izolare pe geloză- sânge, mediul lactozat (cel mai utilizat- mediul Mac Conkey). De asemenea se pot utiliza și medii lichide simple (bulion nutritiv).
- Identificarea se realizează pe baza:
 - Caracterelor culturale: pe geloză sânge dezvoltă colonii mari, hemolitice cu hemoliză de tip beta, tip S, rotunde, cu producerea de pigment- mediul devine verde sau albastru, cu reflexe metalice, care emană un miros aromat. Uneori coloniile pot fi mucoase, cu tendință de confluație (izolate de la pacenții cu fibroză chistică). Pe mediul lichid formează o peliculă la suprafață. Pe mediul lactozat dezvoltă colonii lactozo-negative, aderente la mediu.
 - Caractere morfo-tinctoriale: bacili Gram-negativi, subțiri, cu dispoziție pleomorfă.

- Caractere biochimice: lactoză-negativă, produce citocrom oxidază și catalază, formează glucoză, reduce nitrații la nitriți, folosește citratul ca unică sursă de carbon.

Identificarea se poate realiza pe teste API 20 NE sau API 10S. Deasemenea este posibilă și identificarea automată pe sistem Vitek 2.

- Testarea sensibilității la chimioterapice antiinfecțioase este obligatorie pentru că aceste bacterii dobândesc rezistență la o mare varietate de chimioterapice antiinfecțioase.

Bacteriile anaerobe

Bacteriile strict anaerobe sunt microorganisme care nu se dezvoltă decât în absența oxigenului, prezența acestuia fiind foarte toxică culturii. Sunt implicate în etiologia unor infecții severe la om, dar sunt și cele mai frecvente microorganisme care colonizează organismul uman având rol în menținerea echilibrului ecologic al florei normale.

Astfel, numeroase specii bacteriene anaerobe fac parte din flora normală a tegumentului, mucoaselor oro și nazofaringiană, tractului gastro-intestinal și tractului uro-genital (mai frecvent colonizează uretra și vaginul).

Cunoașterea bacteriilor anaerobe ce colonizează diferite zone anatomice ale organismului este esențială, deoarece majoritatea infecțiilor anaerobe sunt endogene, determinate de bacterii ce fac parte din flora normală.

Infecția cu anaerobi trebuie suspectată în următoarele condiții:

- Evoluție într-un situs anatomic care comunică cu zone masiv colonizate cu anaerobi (uter post-partum și post-abortum, peritoneu după perforații intestinale sau chirurgie pe tractul gastrointestinal, pelvis, etc.),
- Infecția plăgilor mușcate de om,
- Pneumonii de aspirație,
- Infecții asociate tumorilor maligne, traumatismelor,
- Endocardite cu hemoculturi aerobe negative,
- Infecții apărute pe fondul administrării de aminoglicozide sau alte antibiotice la care anaerobii sunt rezistenți,
- Leziuni însoțite de prezența de gaz în țesuturi.

Identificarea anaerobilor este o manoperă laborioasă, care necesită personal medical cu experiență, aprecierea corectă din punct de vedere microscopic a izolatelor și medii de cultură adecvate care să fie inoculate cu inocul suficient de mare pentru a obține o creștere adecvată.

Identificarea rapidă a anaerobilor se poate face pe baza sensibilității la antibiotice. Testarea sensibilității la colistin și vancomicină diferențiază germenii gram negativi de cei gram pozitivi (sensibilitate la colistin → germeni gram negativi; sensibilitate la vancomicina → germeni gram pozitivi)

Examenul macroscopic orientează spre o infecție cu germeni anaerobi:

- Miros putrid al produsului patologic (rezultat al metabolismului bacterian)
- Prezența de fragmente de țesut necrotic de culoare neagră
- Prezența la nivelul plăgii a sângelui și a puroiului
- Dacă agentul etiologic este *Actinomyces* spp. sau *Propionibacterium* spp. se evidențiază în leziuni acele granule galbene "de sulf"

Examenul microscopic direct evidențiază prezența de celule inflamatorii precum și numărul și tipul de bacterii prin colorarea Gram a frotiului.

Se însămânțează tulpina de identificat pe :

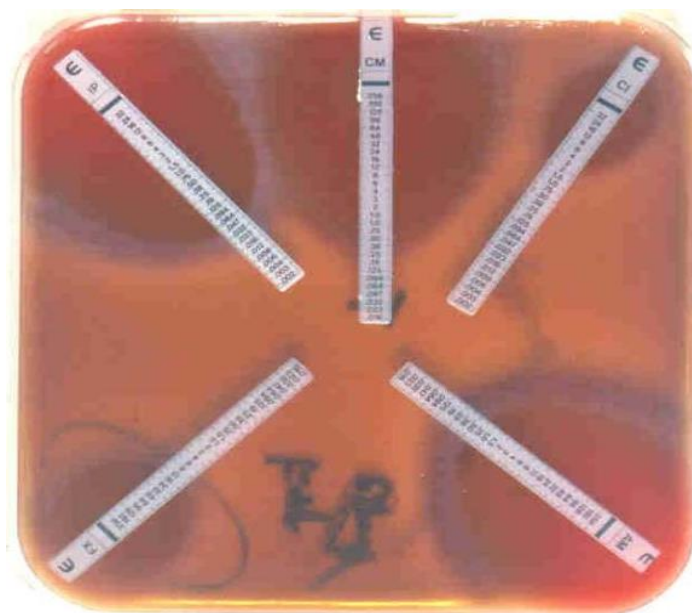
- bulion VF pentru hemoculturi
- geloză sânge cu 10% sânge de berbec, agar Columbia, agar Schaedler sau agar infuzie cord-creier
- mediu de cultură selectiv

Incubarea se face în anaerobioză, la 37°C, timp de 7 zile; se urmărește creșterea după cel puțin 48 de ore de incubare.

Firmele producătoare de medii de cultură comercializează sisteme rapide de identificare pe baza proprietăților biochimice.



Identificarea anaerobi utilizând API 32A



Test E pentru anaerobi

Germei anaerobi exogeni, sporulați, toxigeni

Clostridiile sunt bacili gram pozitivi, mobili cu flagelii dispuși peritrichi, sporulați, catalazo-pozitivi, anaerobi sau aerotoleranți (doar unele specii). Cresc pe mediile agarizate după 48 de ore iar pe mediile lichide chiar mai repede. Pe geloză sânge majoritatea coloniilor sunt hemolitice.

Clostridium perfringens se multiplică mai ales în țesuturile lezate.

Reacția Nagler pentru identificarea *Cl. perfringens*, caracterizată prin apariția unei turbidități R serului sanguin și mediului cu gălbenuș de ou după adăugarea de toxină de *Clostridium perfringens*, în cazul în care acest microorganism este prezent în ser. Opalescența este determinată de acțiunea lecitinazei toxice

Clostridium perfringens de tip A alături de enterobacterii, enterococi, este considerat a fi agentul etiologic principal al gangrenei gazoase, infecție invazivă gravă a țesuturilor subcutanate (celulita anaerobă) și musculare (gangrena gazoasă propriu-zisă), cu punct de plecare de la o plagă ce oferă condiții de anaerobioză. Infecția se generalizează rapid. CO₂ rezultat în țesuturi în urma metabolismului bacterian duce la apariția crepitațiilor în timpul compresunii țesuturilor afectate.

Diagnosticul de laborator

Presupune izolarea și identificarea clostridiilor din produsele recoltate (secreții din plagă, sânge, materii fecale) în funcție de tipul și localizarea infecției.

Tipizarea (identificarea speciei) se face prin boală experimentală la șoarece.

Clostridiile gangrenei gazoase sunt :

sensibile la penicilină G, eritromicină, ampicilină, metronidazol, cefoxitină în mod natural rezistente la tetraciclină.

Tratament:

- este o urgență chirurgicală, prognosticul bolii fiind influențat de precocitatea instituirii sale. Posibila prezență a unei flore de asociație impune asocierea în terapie a unei β -lactamine cu un aminoglicozid și metronidazol.
- oxigenoterapia și măsurile de reanimare sunt indispensabile.
- în cazul toxiinfecțiilor alimentare rehidratarea și tratamentul simptomatic sunt suficiente.

Clostridium tetani – sunt bacili gram pozitivi anaerobi, sporulați, cu sporul dispus terminal (are aspect de "măciucă", "rachetă de tenis").

Diagnosticul în tetanos este clinic.

Diagnosticul de laborator este un diagnostic de confirmare care se solicită numai când trebuie stabilită responsabilitatea medicală pentru un caz de tetanos (postoperator, postpartum, cu punct de plecare de la bontul ombilical).

Tratament

- curativ, prin administrare de ser antitetanic și anatoxină,
- preventiv, prin vaccinare și toaleta chirurgicală a plăgilor. Vaccinul DTP (anti diftero-tetano-pertusosis) face parte din vaccinările obligatorii ale copilului și se administrează la scurt timp după naștere sub forma unor injecții subcutanate, la o lună interval, cu rapel la 7 ani.

Clostridium botulinum

Sunt sunt bacili gram pozitivi anaerobi, mobili, cu capetele rotunjite, sporulați, cu sporul (termorezistent 3-5 ore la 100°C) dispus subterminal.

Sintetizează 6 tipuri de toxine, antigenic distincte (notate de la A-F) și eliberate prin autoliza celulei. Cel mai frecvent asociate patologiei umane sunt tipurile: A, B și F. Sunt toxice în doză foarte redusă.

Se descriu 5 forme clinice ale bolii:

- toxiinfecția alimentară botulinică sau botulismul clasic
- botulismul sugarului
- botulismul de plagă
- botulismul "ascuns" al adultului
- botulismul prin inadvertență

Toxina, (termolabilă) ingerată rezistă la acțiunea sucului gastric, pătrunde în intestin, de unde ajunge în circulația generală pe cale limfatică și acționează asupra sistemului nervos prin blocarea eliberării de acetilcolină la nivelul sinapsei neuromusculare. Se produce paralizia flască a musculaturii buco-faringiene (disfagie, grețuri, vărsături), cu paralizia în final a mușchilor respiratori.

Diagnosticul de laborator

Are rolul de a confirma diagnosticul clinic și urmărește evidențierea toxinei botulinice în ser, materii fecale, conținut gastric, vărsături și mai rar a bacilului botulinic în materiile fecale.

Tipizarea toxinei botulinice, care are 8 tipuri antigenice (de la A la G), se poate face prin boală experimentală la șoareci.

Este o maladie cu declarare obligatorie.

Profilaxia se referă la supravegherea procesului de fabricare a conservelor.

Tratamentul se efectuează în servicii de terapie intensivă și constă în seroterapie cu ser antibotulinic polivalent A,B,E și medicație simptomatică.

Germeni anaerobi endogeni, nesporulați

Bacili gram negativi anaerobi nesporulați

Principalele specii de interes medical sunt încadrate în genurile. *Bacteroides*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Fusobacterium*.

Diagnosticul infecțiilor produse de bacili gram negativi anaerobi constă în izolarea și identificarea lor din produsele patologice. Întrucât fac parte din flora normală a organismului, produsele contaminate cu această floră nu pot fi prelucrate. Diagnosticul este foarte laborios, durează mult (4 săptămâni) și implicația lor etiologică trebuie corelată cu realitățile clinice. Izolarea lor din produse normale sterile are întotdeauna semnificație patologică.

Sensibilitatea la antibiotice a bacililor gram negativi anaerobi este diferită constituind un criteriu de identificare.

Bacili gram pozitivi anaerobi

Propionibacterium spp are o morfologie similară corynebacteriilor.

Actinomicetele sunt bacili gram pozitivi anaerobi, nesporulați care cresc sub formă de filamente. Ele fac parte din flora normală a cavității bucale de unde pot iniția, în anumite condiții infecții endogene. Specia cel mai frecvent întâlnită în patologia umană este *Actinomyces israelii*, în asociație cu alte microorganisme anaerobe ale cavității bucale (*Bacteroides spp*). Dintre infecții menționăm actinomicoza cervicofacială, toracală, abdominală, parodontită etc.

Diagnosticul este bacteriologic. Examenul microscopic direct al puroiului recoltat din abcese este de mare valoare, deoarece morfologia filamentoasă, ramificată a actinomicetelor este caracteristică. Din puroiul recoltat, care este grunjos se zdrobesc 2-3 grunji (formați prin agregarea filamentelor germenilor ramificați) între 2 lame. Lamele se despart, și fiecare se colorează Gram. Cultivarea se face pe medii complexe în condiții de anaerobioză și durează mult.

Cocii gram pozitivi strict anaerobi sunt cuprinși în genurile *Peptococcus* și *Peptostreptococcus*. Ei fac parte din flora normală a cavității orale și produc infecții numai în asocieră cu alți anaerobi. Pătrund prin soluții de continuitate ale pielii în profunzime, unde produc împreună cu alte specii infecții purulente subacute de tipul abceselor cerebrale, otitelor, sinuzitelor etc. Pot participa de

asemenea în infecții ale tractului respirator inferior și ale regiunii abdominale (peritonită, apendicită, abces hepatic etc).

Ca și în cazul celorlalți germeni anaerobi endogeni nesporulați, diagnosticul este dificil și durează în timp.

Cocii gram negativi

Sunt reprezentați de genul *Veillonella* care face parte din flora normală a cavității orale. Poate produce piorei alveolare