

## **Diagnosticul de laborator al infecțiilor produse de coci gram negativi și bacili gram pozitivi ai cavității orale**

### **DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECȚIILOR PRODUSE DE COCI GRAM NEGATIVI**

#### **GENUL NEISSERIA**

Genul *Neisseria* cuprinde diplococi Gram negativi, imobili, de aspect reniform, așezați în diplo. Sunt bacterii care produc catalază și oxidază.

Genul reunește atât specii patogene cât și specii comensale. Neisseriile patogene sunt reprezentate prin *Neisseria gonorrhoeae* (gonococul) și *Neisseria meningitidis* (meningococul).

**Neisseria gonorrhoeae** determină infecții cu transmitere sexuală, care la bărbat se manifestă ca și uretrită acută, care greșit tratată sau netratată devine subacută, și în evoluție se complică cu prostatită, epididimită și orhită. Pe termen lung, urmare a diseminării hematogene se poate instala artrita. La femeie cel mai frecvent apare cervicita și colpita fără manifestări clinice evidente. În timp, infecția se complică cu salpingită, ovarită și sterilitate. Și la femeie se poate instala artrita ca și complicație tardivă.

La nou-născut există posibilitatea instalării infecției consecutiv străbaterii filierei pelvi- genitale materne, fapt care conduce la instalarea unei oftalmii purulente, care are ca și consecință cecitatea.

#### **Diagnosticul de laborator**

##### **Recoltarea probelor patologice:**

- la bărbat se recoltează secreție uretrală dimineața, înainte de micțiune, folosind fie ansa bacteriologică, fie tamponul uretral.
- la femeie recoltarea se face la nivelul colului uterin, din fundul de sac vaginal posterior și de la nivelul orificiului de deschidere al glandelor Bartholin.

**Examenul microscopic direct** este util numai din secreția uretrală. Se poate face fie în colorația simplă cu albastru de metilen, fie în colorația Gram. Se pun în evidență diplococi reniformi, Gram negativi (în colorația Gram) și numeroase polimorfonucleare. În infecțiile subacute diplococii apar fagocitați, iar în infecțiile cronice lipsesc polinuclearele, și cu destulă dificultate se pot pune în evidență diplococii care colonizează celule sau fragmente de celule epiteliale.

**Izolarea** se realizează pe geloză chocolat, **se incubează în atmosferă cu 10% CO<sub>2</sub>.**

**Identificarea** se bazează pe proprietățile morfotinctoriale (diplococi reniformi Gram negativi), caracterele de cultură (colonii mici, de tip S, gri, transparente), proprietățile biochimice (produce oxidază, catalază, degradează glucoza dar nu și maltoza), proprietățile de patogenitate (cu prezența endotoxinei, a pililor care asigură colonizarea mucoaselor, a capsulei polizaharidice).

**Antibiograma** este obligatorie pentru conturarea schemei terapeutice.

**Neisseria meningitidis** este un agent etiologic specific uman, izolabil din rinofaringele purtătorilor sănătoși, iar în cazul bolii clinic manifeste de la nivelul lichidului cefalorahidian.

Meningococii pătrund în organismul uman pe cale aerogenă și determină inițial o rinofaringită subclinică sau clinic manifestă. Dacă depășesc bariera mucoasă pătrund în sânge și determină bacteriemie. Sub acțiunea factorilor de apărare nespecifică - interferonii, sau specifică - anticorpilor antimeningococi infecția se poate opri în acest stadiu. În condiții de scădere a rezistenței generale organismului, meningococii depășesc bariera hemato-encefalică și se localizează la nivelul învelișurilor meningeale, determinând meningita meningococică.

**Diagnosticul de laborator** se face pe baza examenului direct bacteriologic.

**Recoltarea** probelor patologice:

- se recoltează LCR prin puncție lombară (înainte de instituirea tratamentului chimioterapie),
- în meningitele bacteriene, în general, și în cea meningococică în special, LCR este purulent (spre deosebire de meningitele virale în care LCR este clar și doar ușor hipertensiv - în meningita bacilară aspectul LCR este asemănător cu cel din meningitele virale).

**Examenul microscopic direct:**

- citologic preliminar realizează numărătoarea celulelor și folosește camere de numărare care se folosesc și pentru leucocite (se face pe LCR necentrifugat).
- pe LCR centrifugat se completează examenul citologic în frotiuri colorate Giemsa sau în colorație simplă cu albastru de metilen (în meningitele bacteriene predomină polimorfonuclearele, în timp ce în meningitele virale, dar și în meningita bacilară, predomină limfocitele). Pentru excluderea definitivă a etiologiei bacilare se face frotiu în colorația Ziehl-Nielsen. Informații esențiale se obțin în frotiul colorat Gram: în cazul infecției meningococice frotiul pune în evidență diplococi reniformi Gram negativi predominant fagocitați.

**Izolarea** se face pe geloză Muller-Hinton sau geloză \_chocolat (medii preîncălzite la 37°C), incubându-se în atmosferă cu 10% CO<sub>2</sub>.

**Identificarea** se bazează pe cercetarea proprietăților morfotinctoriale (frotiul colorat Gram evidențiază diplococii Gram negativi), cercetarea caracterelor de cultură (colonii de tip S, nepigmentate și nehemolitice, de dimensiuni foarte

mici care se prezintă sub aspectul picăturilor de rouă), pe proprietățile biochimice (cu producerea catalazei și a oxidazelor, metabolizarea glucozei și maltozei) și a proprietăților antigenice identificabile prin latex aglutinare și imunofluorescență (serogrupurile fiind notate cu litere majuscule - A, B, C, 29E, X, Y, Z, W135), și a proprietăților de patogenitate (endotoxina, capsula, proteinele de membrană externă și pili).

**Antibiograma** se realizează prin metoda difuzimetrică pe Muller Hinton cu sânge.

## DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECȚIILOR PRODUSE DE BACILII GRAM POZITIVI

### BACILI GRAM POZITIVI AEROBI NESPORULAȚI

#### *GENUL CORYNEBACTERIUM*

Genul *Corynebacterium* reunește un grup de bacterii care prezintă următoarele caracteristici: sunt bacili Gram-pozitivi ușor încurbați cu una sau ambele extremități măciucate, așezați în palisade, imobili, nesporulați, necapsulați aerobi, uneori microaerofili sau facultativ anaerobi.

*Corynebacterium diphtheriae*, agentul cauzal al difteriei, a fost acceptat ca și specie tip, nu numai datorită importanței sale ca și agent patogen al difteriei, dar și pentru caracteristicile sale bine definite, care-i conturează biologia.

#### Diagnosticul bacteriologic:

##### 1. Recoltarea probelor patologice.

Se face cu ajutorul a trei tamponane (se recoltează exsudatul faringian).

##### 2. Examenul microscopic direct

Din primul tampon faringian se fac două frotiuri, unul fiind colorat Gram, iar celălalt în colorația specială Neisser. Frotiul colorat Gram evidențiază bacili Gram pozitivi, așezați în palisade. Frotiul colorat Neisser servește la evidențierea corpusculilor metacromatici Babeș-Ernst.

##### 3. Izolarea

Produsul patologic se însămânțează pe mediul Löffler, pe mediu cu telurit de potasiu Tinsdale pe care bacilul difteric se dezvoltă sub formă de colonii mici, brune, înconjurate de un halou negru. Pe mediul Löffler coloniile sunt de tip R cu contur neregulat și au aspect de floare de margaretă (pentru tipul gravis).

##### 4. Identificarea

4.1. Caracterele morfotinctoriale: sunt reprezentative în frotiul efectuat de pe mediul Löffler - bacili Gram pozitivi, dreupți sau ușor încurbați, cu una sau ambele extremități măciucate. În colorația Neisser se evidențiază corpusculii metacromatici Babeș-Ernst (corpusculii se colorează în albastru violet iar corpul bacterian în galben brun).

#### 4.2. Caractere de cultură

În medii lichide tipul gravis lasă mediul limpede și formează peliculă, tipul mittis tulbură uniform mediul, iar tipul intermedius formează un inel aderent și sediment granular.

Pe mediul Gundel-Tietz : tipul gravis formează colonii de 1-2 mm cu marginea crenelată cu suprafața neregulată și de consistență friabilă, care dau aspectul de floare de margaretă; tipul mittis formează colonii de mărimi variabile cu suprafață convexă și lucioasă, conturul regulat și de consistență cremoasă; tipul intermedius formează colonii de talie variabilă, ce prezintă o suprafață ușor acuminată, marginile circulare și de consistență semicremoasă.

Pe mediul Tinsdale, diftericii formează colonii negre, înconjurată de un halou brun, în timp ce pseudodiftericii formează tot colonii negre dar fără halou.

#### 4.3. Caractere biochimice

Sunt utile pentru diferențierea diftericului de pseudodifterici dar și pentru identificarea tipurilor de difterici (se urmărește fermentarea amidonului, glicogenului și a dextrinei).

Bacilul difteric (toate tipurile) produce hidrogen sulfurat și nu scindează ureea. Pseudodiftericii scindează ureea, în schimb nu produc hidrogen sulfurat.

#### 4.4. Proprietăți de patogenitate.

Factorul de patogenitate este reprezentat de toxina difterică, sintetizată de către tulpinile lizogene. Toxina difterică acționează prin blocarea sintezei proteice.

Testele de patogenitate pot fi realizate *in vitro* (testul Elek), sau *in vivo* prin inocularea la cobai. Inocularea la cobai se realizează prin administrarea subcutanată a unei culturi de 48h de bacil difteric. Se folosesc animale protejate și neprotejate. Cobaiul neprotejat (prin ser antidifteric) moare în 1-4 zile de la inoculare prezentând ca și leziuni caracteristice : edem gelatinos la locul inoculării, revărsate sanguinolente în seroase și congestia suprarenalelor (cu aspect de cireasă).

Inocularea toxinei la cobai a permis stabilirea unității de măsură *in vivo* pentru toxina difterică, care este reprezentată de doza limită mortală (DLM). Un DLM de toxină difterică reprezintă acea cantitate de toxină care omoară un cobai în greutate de 250g în timp de 4 zile cu leziunile caracteristice descrise anterior.

Diagnosticul serologic- se realizează prin reacția de hemaglutinare pasivă

Biologic- este utilizat pentru testarea stării de imunitate în colectivități. Constă în IDR Shick: se inoculează intradermic toxina și se citește reacția după 24 de ore. Apariția unui eritem la locul inoculării este o reacție pozitivă care dovedește lipsa anticorpilor antitoxici și deci susceptibilitatea persoanei respective la infecție; aceste persoane se vaccinează cu anatoxină difterică. Lipsa eritemului (reacție negativă) este datorată neutralizării toxinei de către anticorpi specifici, fapt ce indică prezența imunității.

Profilaxia în difterie se bazează pe administrarea vaccinului antidifteric (anatoxina difterică - în trivaccinul DTP, sau în bivaccinul DT).

## **BACILI GRAM POZITIVI AEROBI SPORULAȚI**

### ***GENUL BACILLUS***

Bacteriile din genul *Bacillus* sunt bacterii Gram pozitive, cu capetele tăiate drept, dispuse în lanțuri, aerobe, în general mobile (*Bacillus anthracis* este întotdeauna mobil, sporulate (diametrul sporului, care are o localizare centrală, este mai mic decât diametrul bacteriei, astfel că celula bacteriană nu este deformată).

Toți reprezentanții acestui gen sunt foarte răspândiți în natură datorită sporului care le conferă rezistență în mediul exterior; sunt germeni telurici găsindu-se în special în sol, dar numeroase specii de *Bacillus* pot fi găsite în apă, aer sau pe materiale de origine animală și vegetală.

*Bacillus subtilis* - de regulă este o specie saprofită, însă a fost izolat în conjunctivite, iridociclite, sinuzite cronice și al infecțiilor urinare.

*Bacillus cereus* - în cazul în care se înmulțește excesiv în alimente se poate constitui în agent etiologic al unor toxiinfecții alimentare (fosfolipaza C hidrolizează lecitina din alimente și produce fosforilcolină activă). Specia a mai fost izolată în cursul bacteriemiei cu localizări meningeale și pulmonare.

*Bacillus anthracis* este agentul etiologic al antraxului- o antropozoonoză, care poate îmbrăca diferite forme clinice:

- antrax cutanat - pustula malignă (96% din cazuri), cu localizare predilectă la nivelul feței și a membrelor; la locul de inoculare apare o veziculă cu conținut serosanguinolent, urmată de o ulceratie-mică care se usucă și dă naștere unei cruste de culoare neagră, de unde și denumirea de cărbune cutanat. Regiunea subiacentă leziunii prezintă un edem gelatinos, nedureros.

- Edemul malign este forma cea mai gravă de manifestare a cărbunelui cutanat și se caracterizează printr-un edem extins, febră ridicată și stare toxică.

- antrax visceral

➤ forma pulmonară,

- forma gastro-intestinală
- meningita carbunoasă

Diagnosticul este bacteriologic

1. Recoltarea: în formele cutanate se recoltează serozitate din vezicule; în infecția pulmonară se recoltează spută; în infecțiile digestive se recoltează materii fecale și în meningită- LCR. De la animalele moarte, suspecte de infecție carbunoasă, se recoltează țesuturi.

2. Examenul microscopic direct: evidențiază bacili Gram pozitivi, mari, capsulați, izolați sau dispusi sub formă de lanțuri scurte.

3. Izolarea. Bacteria este puțin pretențioasă, dezvoltându-se ușor pe medii uzuale. Probele patologice se însămânțează pe geloza sânge pe care *Bacillus anthracis* se dezvoltă sub forma de colonii rugoase (de tip R) cu margini neregulate, care au aspect de cap de meduză sau coamă de leu (pe mediile cu sânge coloniile sunt nehemolitice).

4. Identificarea:

4.1. Proprietăți morfotinctoriale: în frotiu colorat Gram se evidențiază bacili Gram pozitivi cu capetele tăiate drept, prezentând aspectul bețelor de bambus. Dispoziția sporului este centrală, iar diametrul mai mic decât al celulei vegetative face ca aceasta să nu fie deformată.

În frotiul colorat cu safranină și verde malahit se pot pune în evidență sporangiile (formele vegetative) colorate în roșu precum și sporii colorați în verde.

4.2. Caractere de cultură - crește bine pe medii uzuale în condiții de aerobioză.

- agar nutritiv - colonii mari, alb-cenușii, cu suprafață rugoasă, margini neregulate și prezentând prelungiri laterale ca niște șuvițe de păr care conferă coloniilor un aspect caracteristic; sunt coloniile de tip R; în culturile atenuate la 42, 5°C pot să apară coloniile de tip S (tulpini atenuate).
- agar sânge - același aspect al coloniilor, nehemolitice.
- bulion nutritiv – tulpinile de tip R lasă mediul de cultură limpede și formează un depozit floconos

4.3. Caractere biochimice – zaharolitic, slab proteolitic, lichefiază gelatina.

4.4. Proprietăți antigenice – prezintă un antigen capsular de natură polipeptidică și două antigene de perete celular, unul de natură polipeptidică și celălalt de natură polizaharidică.

4.5. Caractere de patogenitate

Toxina este formată din antigenul protectiv (PA) și din: fie factorul letal LF fie factorul edemațiant (EF); antigenul protectiv se leagă de receptori și translocă în citosol LF sau EF.

*In vitro* demonstrarea patogenității unei sușe de *Bacillus anthracis* se poate realiza prin teste imunocromatografice.

Inocularea subcutanată la șoarece determină septicemie mortală în 24-48 h, iar la necropsie se constată prezența unui edem gelaținos la locul inoculării precum și congestia organelor interne. Splina este hipertrofică, iar amprente de din splină în colorația Gram pun în evidență bacili Gram pozitivi capsulați

5. Profilaxia folosește vaccinarea anticărbunoasă

6. Tratamentul chimioterapie folosește betalactamine și quinolone.

## BACILI GRAM POZITIVI ANAEROBI SPORULAȚI ȘI ALTE BACTERII ANAEROBE

Bacteriile anaerobe aparțin mai multor familii și genuri. Anaerobii nesporulați domină speciile aerobe la nivelul căilor aeriene și digestive superioare, a colonului, vaginului și a unităților pilosebacee. Anaerobii nesporulați sunt atât coci cât și bacili, Gram pozitivi și Gram negativi:

- bacili Gram pozitivi nesporulați din genurile *Actinomyces*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Propionibacterium*, *Lactobacillus*
- bacili Gram negativi nesporulați din genurile *Bacteroides*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Fusobacterium*,
- coci Gram pozitivi nesporulați din genurile *Peptococcus*, *Peptostreptococcus*
- coci gram negativi nesporulați din genurile *Veillonella*

Astfel de anaerobi nesporulați sunt implicați în general în producerea infecțiilor de vecinătate (corelate cu localizarea acestora la nivelul diferitelor cavități ale organismului).

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

## BACILI GRAM POZITIVI ANAEROBI SPORULAȚI

### *GENUL CLOSTRIDIUM*

Bacteriile din genul *Clostridium* sunt bacili Gram pozitivi, sporulați având spori ovali sau sferici, terminali sau subterminali, care deformează bacteria; sunt anaerobi stricți, mobili sau imobili.

Bacteriile strict anaerobe sunt bacterii sensibile la acțiunea oxigenului, acesta fiind toxic pentru ele. În genul *Clostridium* sunt clasificate specii patogene care sintetizează exotoxine care reprezintă principalii factori de patogenitate:

*Clostridium tetani*

Este un bacil Gram pozitiv, sporulat, cu sporul dispus terminal, ceea ce-i conferă un aspect de băț de chibrit. Există mai multe tipuri antigenice, însă toate sintetizează același tip de toxină. Acțiunea toxinei tetanice se manifestă la nivelul sistemului nervos central, unde blochează sinapsele inhibitorii și determină contractura musculară (tetanosul complet).

Profilaxia tetanosului se face prin vaccinare cu anatoxină tetanică (trivaccinul DTP sau divaccinul DT, intră în schema de vaccinări obligatorii). În prezența plăgilor cu potențial tetanigen se procedează la toaleta chirurgicală și la rapel cu ATPA (anatoxina tetanică purificată și adsorbită).

Pentru diagnosticul de laborator se recoltează puroi din plagă, care se însămânțează pe medii pentru anaerobi (agar sânge). Frotiul colorat Gram evidențiază bacili Gram pozitivi cu sporul dispus terminal. Formează colonii gălbui-cenușii care au tendința de confluație dacă concentrația de agar a mediului este mai mică de 4%. În mediile lichide formează sediment (datorat sporilor), iar culturile degajă un miros caracteristic de corn ars. Este hemolitic și slab proteolitic și zaharolitic.

Antibiograma, efectuată prin metoda difuzimetrică în dublu strat de agar, finalizează diagnosticul.

### *Clostridium botulinum*

Este un bacil Gram pozitiv mobil datorită cililor peritrichi, cu sporul dispus subterminal.

Este o bacterie răspândită în solul tuturor regiunilor geografice. Are mai multe tipuri antigenice, fiecare dintre tipurile antigenice sintetizând și eliberând o toxină proprie. Tipurile antigenice A, B, E și F produc botulismul la om. Toxina botulinică are neurotropism, iar mecanismul său de acțiune constă în blocarea transmiterii nervoase, prin inhibarea secreției de acetilcolină.

*Clostridium botulinum* se prezintă ca și bacili Gram pozitivi cu spori dispuși subterminal. Pe mediile solide (pentru anaerobi) formează colonii neregulate cu suprafața granulară și cu o margine în extensie continuă. Exerciță hemoliză pe mediile cu sânge. De regulă, însă diagnosticul intoxicației botulinice se face prin evidențierea toxinei și determinarea tipului acesteia. Toxina se caută în lichidul de spălătură gastrică sau de vărsătură în conținutul intestinal sau în lichidul din conserva incriminată. Pentru aceasta se procedează la o reacție de neutralizare in vivo, prin inocularea la șoareci de laborator. Se folosește 10 șoareci, din care 2 rămân ca și martori și nu se protejează cu ser antibotulinic. Ceilalți vor forma 4 perechi, fiecare dintre aceste perechi urmând a se proteja cu un alt ser antibotulinic specific de tip (A, B, E și F). Fiecare animal se inoculează cu filtratul alimentului incriminat. Animalele protejate prin serul antibotulinic specific de tip antigenic



supraviețuiesc, în timp ce celelalte animale, inclusiv martorii, mor. Dacă mor toate animalele se poate exclude botulismul.

### *Clostridiile gangrenei gazoase*

Gangrena gazoasă apare ca o complicație a plăgilor contaminate cu pământ unde se realizează condiții de anaerobioză necesare germinării sporilor și se caracterizează prin necroza și putrefacția țesuturilor afectate, la aceste semne locale adăugându-se și semne generale. Infecția este, de fapt, polimicrobiană, la producerea ei participând specii anaerobe, aerob-anaerob facultative și chiar aerobe.

Diagnosticul de laborator este numai bacteriologic și de urgență.

Recoltarea interesează exudatele din plagă, fragmente de țesuturi necrozate, sânge, puroi.

Examenul microscopic direct din produsul patologic are o mare valoare diagnostică. Pe frotiul colorat Gram se remarcă un polimorfism bacterian accentuat, evidențiindu-se bacili mari Gram pozitivi, izolați, în perechi sau lanțuri scurte, cu spor central, subterminal sau fără spori (*Clostridium perfringens* sporulează numai în culturi vechi), unii dintre ei capsulați (*Clostridium perfringens*).

Izolarea se face pe medii pentru anaerobi și este necesar ca fiecare specie să fie izolată în cultură pură pentru a se putea trece la etapa următoare. Pentru izolare se folosesc medii pentru anaerobi (Nagler, Willis-Hobbs).

Identificarea necesită parcurgerea tuturor etapelor (pe geloză glucozată cu gălbenuș de ou - mediul Nagler, *Clostridium perfringens* produce reacția Nagler, datorită alfa toxinei, o lecitinază, care difuzează în jurul coloniilor și descompune lecitino-vitelină din ou producând un precipitat care opacifică mediul).

Antibiograma se execută prin tehnica difuzimetrică în condiții de anaerobioză (în dublu strat).

Tratamentul gangrenei gazoase trebuie instituit de urgență și constă în administrarea de ser antigangrenos polivalent, antibiotice și desigur, îngrijirea chirurgicală a plăgii (eliminarea țesuturilor necrozate, drenarea colecțiilor închise).

### NOTE PERSONALE