



## Diagnosticul de laborator al infecțiilor cauzate de germeni anaerobi

### Clasificare

#### Anaerobi endogeni

Coci Gram-pozitivi: Peptostreptococcus, Peptococcus

Coci Gram-negativi: Veillonella

Bacili Gram-pozitivi: Lactobacillus, Propionibacterium, Actinomyces, Eubacterium, Bifidobacterium

Bacili Gram-negativi: Bacteroides spp., Prevotella, Porphyromonas, Fusobacterium  
fac parte din flora normală a organismului: cavitate bucală, tub digestiv, vagin, etc. –  
leziuni la aceste nivele favorizează infecții cu germeni anaerobi

#### Anaerobi exogeni

Bacili Gram-pozitivi sporulați - Genul Clostridium

#### Indicii ale infecțiilor cu germeni anaerobi:

- abcese profunde (cerebrale, hepatice, etc.)
- miros fetid
- prezența în plăgi a corpurilor străini, țesuturi necrotice, insuficiență circulatorie, tumori, tulburări de metabolism
- contaminare cu floră anaerobă – intervenții chirurgicale (abdominal, sfera genitală feminină, maxilo-facial)

#### Produs patologic:

- Produse patologice **adecvate** pentru detectarea anaerobilor:
  - puroi din abcese,
  - probe din plăgi adânci (plăgi mușcate, contaminate cu pământ, țesuturi zdrobite)
  - abcese gingivale, periorale
  - puroi din sinusurile paranazale
  - secreții din căile respiratorii inferioare, recoltate cu dispozitive cu lumen dublu
  - ulcerații (“diabetic foot”, decubitus)
  - probe recoltate intraoperator



- urină prelevată prin aspirație suprapubiană
- sânge pentru hemocultură
- Produse patologice **inadecvate** pentru detectarea anaerobilor:
  - exsudat faringian, nazofaringian
  - tampon cu secreție de pe gingii
  - spută (eliminată spontan, aspirație nazo/orotraheală)
  - conținut gastric
  - materii fecale (excepție: dg. *C. botulinum*, *C. difficile*)
  - urină (emisă spontan/cateter)
  - secreție vaginală/cervicală (excepție: vaginoză bacteriană)
  - secreție din plagă superficială
- protejarea de efectele toxice ale oxigenului a bacteriilor anaerobe prezente în probă
  - recipiente speciale
  - mediu de transport pentru anaerobi
- păstrare la temperatura laboratorului
- prelucrare
  - în 30 de minute – produs patologic în cantitate redusă (0,5 ml)
  - bacteriile își păstrează viabilitate timp de câteva ore – produs patologic purulent în cantitate mai mare (peste 1 ml)
  - în mediu de transport bacteriile pot supraviețui câteva zile

## Principii de diagnostic

### Examen microscopic:

- se descriu morfotipurile bacteriene prezente în produsul patologic

### Cultivare

- medii adecvate pentru cultivarea anaerobilor (pp întotdeauna se însămânțează în paralel și pentru aerobi)
  - medii lichide: mediul cu tioglicolat
  - medii solide: geloza sânge pentru anaerobi ( Columbia, Schaedler, etc)
  - medii speciale, selective pentru diagnosticul anerobilor (PEA- Phenyl-etyl alcool, BBE – bacteroides bile-esculin, KVLB – kanamycin-vancomycin laked blood, EYA – egg-yolk agar)



- incubare: în condiții de anaerobioză
  - o metode clasice (cu pirogalol, metoda Fortner)
  - o în „jar” anaerob, anaerostate cu plicuri generatoare de anaerobioză
  - o chamber anaerob
- durata incubării: peste 48 de ore – până la 7 zile

### **Identificare**

- demonstrarea caracterului strict anaerob! (lipsa creșterii în atmosferă obișnuită, microaerofilie)
- ex. microscopic: pp nativ (spori, mobilitate), pp colorate Gram
- caractere de cultură - examinare sub lupă (frecvent culturi mixte: izolare!);
- identificări pe baza caracterelor biochimice:
  - o creșterea pe diverse medii selective
  - o discuri de identificare (vancomicină, kanamicină, colistin etc)
  - o prezența pigmentilor
  - o fluorescență
  - o hemoliză
  - o producere de lipază, lecitinază
  - o producere de urează, indol, catalază, oxidază etc.
- sisteme comerciale de identificare
  - o truse API
    - pe baza unor teste teste biochimice (fermentarea a 16 zaharuri, producere de indol, uează, descompunerea esculinei și a gelatinei, testul catalazei și oxidazei)
- gazcromatografie
  - o identificare pe baza detectării produșilor metabolici (caracteristic pentru specie)

### **Testarea susceptibilității față de antibiotice**

- metoda difuzimetrică – inadecvată pentru testarea anaerobilor
- determinare CMI prin metoda microdiluțiilor sau E-teste



## Diagnosticul gangrenei gazoase

*Clostridium perfringens*

*Clostridium oedematiens*

*Clostridium septicum*

*Clostridium histolyticum*

*Clostridium bifermentas*

*Clostridium falax*

### Produsul patologic

- secreții din profunzimea plăgii
- fragmente de țesuturi

### Examenul direct

- **macroscopic**: secreție murdară, fetidă
- **microscopic**: bacil Gram pozitiv, prezintă un spor central sau subterminal ce deformează corpul bacterian. Sunt ciliați peritrichi, cu excepția *C. perfringens* care are capsulă. În frotiurile din produs patologic nu prezintă spori deoarece nu sporulează in vivo.

### Izolare

- mediul Schaedler
- în condiții de anaerobioză

### Identificare

- pe baza **caracterelor morfotinctoriale**
- pe baza **caracterelor de cultură**
  - pe mediul Schaedler: colonii de tip S/R cu hemoliză beta (dublă la *C. perfringens*)
- produc gaz, emană un miros fetid
- identificarea speciei se face prin boala experimentală la șoareci:
  - Se inoculează cultură la un lot martor și la un lot imunizat în prealabil cu ser antigangrenos specific de specie;
  - Vor face boala lotul martor și animalele injectate cu seruri ce nu corespund speciei inoculate;
  - Supraviețuiesc animalele protejate cu serul specific corespunzător speciei inoculate (izolate).



## Diagnosticul în tetanos

*Clostridium tetani*

### Produsul patologic:

- fragmente din plăgi
- soluții perfuzabile, materiale chirurgicale

### Examenul direct

- bacil Gram pozitiv cu un spor rotund, terminal ce deformează corpul bacteriei, prezintă cili peritrichi.

### Izolare

- în condiții de anaerobioză, pe mediile amintite anterior

### Identificare

- pe baza caracterelor morfotinctoriale
- pe baza caracterelor de cultură
  - pe mediul Schaedler: colonii de tip S/R cu hemoliză beta.
  - produc gaz, emană un miros de corn (copită) ars

Diagnosticul de tetanos este un diagnostic clinic. Diagnosticul de laborator se solicită numai când trebuie stabilită responsabilitatea medicală (tetanosul postoperator, postpartum, tetanosul neonatal cu punct de plecare de la bontul ombilical).

## Diagnosticul botulismului

*Clostridium botulinum*

### Produsul patologic

Diagnosticul de laborator evidențiază **prezența toxinei** în ser, materii fecale, conținut gastric, vărsături, alimente.

Produsele se trimit la laboratoare de referință.

Tipizarea toxinei se face prin boala experimentală pe șoareci:

Se imunizează 7 șoareci, fiecare cu câte un ser antibotulinic specific de tip.

Se injectează produsul patologic recoltat la fiecare șoarece și la un șoarece martor.

Vor muri toți șoarecii cu excepția celui imunizat cu ser antibotulinic ce corespunde toxinei din produsul patologic.

C. botulinum este: un bacil Gram pozitiv, prezintă un spor central sau subterminal ce deformează corpul bacterian; sunt ciliați peritrichi



## **Diagnosticul infecțiilor cauzate de Clostridium difficile**

Bacil Gram pozitiv, cili peritrich, spori ovalari, subterminal sau terminal, deformează corpul bacterian

- portaj asimptomatic
  - o adulți 3-8%; sugari 15-63%
  - o în cursul spitalizării 20%, administrare de antibiotice 46%
- colită pseudomembranoasă
- colită asociată tratamentului antibiotic
- diaree asociată tratamentului antibiotic
- boli extraintestinale: peritonite, abcese ....

Produs patologic: materii fecale

Detectarea toxinei direct din materiile fecale (ELISA, VIDAS)

Detectarea genelor toxinei prin amplificare genică direct din pp.

Izolarea germenului pe medii speciale selective și demonstrarea producerii toxinei (pe culturi celulare sau reacții ag-ac - ELISA, VIDAS)