

Diagnosticul de laborator al infecțiilor produse de enterobacterii

Familia *Enterobacteriaceae* cuprinde bacili Gram negativi fermentativi (degradează glucoza pe cale oxidativă și fermentativă) și include 44 genuri, dintre care 25 au fost implicate în patologia umană.

Sunt bacili cu capetele rotunjite, de dimensiuni medii, cu dispoziție în general necaracteristică. La *Klebsiella* baciliile sunt dispuși în diplo, în sensul lungimii. Speciile de *Yersinia* sunt mai frecvent cocobacilare, colorate bipolar, *E. coli* sunt pleiomorfi, iar speciile de *Proteus* sunt uneori extrem de polimorfe. Pot fi mobili sau imobili. Nu sporulează. Majoritatea enterobacteriilor sunt necapsulate. Unele pot avea o capsulă proeminentă (*Klebsiella*), iar altele (*Salmonella*, *E. coli*) pot fi învelite de un material capsular.

Enterobacteriile sunt germeni aerobi, facultativ anaerobi, nepretențioși nutritiv.

Semnificația clinică : sunt germeni ubicuitari, iar majoritatea (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* etc.) fac parte din flora normală a organismului și pot produce infecții oportuniste. Unele specii, ca de pildă *Salmonella* Typhi, *Shigella* spp. - au habitat exclusiv uman.

În funcție de patogenitate, enterobacteriile se împart în: înalt patogene (*Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*), condiționat-patogene (*E. coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Serratia*, *Citrobacter*) sau lipsite de importanță în patologia umană.

Enterobacteriile produc **infecții intestinale și extraintestinale**, sau mai rar, pot apărea **infecții generalizate** pe un fond de rezistență scăzută a organismului, reprezentând 80% din totalitatea bacililor gram negativi izolați și peste 50% din totalul germenilor izolați. De asemenea, sunt implicate în etiologia a 30-35% din septicemii, în peste 70% din infecțiile urinare și în majoritatea toxiinfecțiilor alimentare. Sunt cauză frecventă a infecțiilor nosocomiale – infecții asociate asistenței medicale.

Recoltarea. Recoltarea probelor în infecțiile extraintestinale depinde de localizarea infecției. În infecțiile intestinale se recoltează materii fecale. Acestea trebuie recoltate cât mai aproape de debutul infecției, preferabil din scaunele spontane

Examenul direct al materiilor fecale. Examenul macroscopic este important, deoarece materiile fecale purulente și muco-sanguinolente orientează diagnosticul spre o infecție cu *Shigella* (dizenterie). *Examenul direct microscopic* nu intră în rutina laboratoarelor

Izolarea. Sunt germeni nepretențioși nutritiv, care se dezvoltă cu ușurință pe mediile uzuale (bulion, geloză, geloză-sânge), dar și pe mediile selective lactozate (Mac Conkey, AABTL, ADCL, XLD, Istrati-Meitert etc.), pe care putem diferenția enterobacteriile lactozo-pozitive de cele lactozo-negative.

Tulbură uniform mediile lichide (bulionul). Pe medii solide se dezvoltă sub formă de colonii S sau R. Între cele două tipuri pot exista și forme intermediare, sau uneori colonii mucoase de tip M (*Klebsiella*, unele tulpini de *E. coli*). Genul *Proteus* prezintă fenomenul de invazie pe medii neselective solide (geloză, geloză-sânge). Coloniile de *Yersinia* se dezvoltă mai lent, fiind minusculare după 18 ore de incubare.

Produsele extraintestinale care în mod normal sunt sterile, se însămânțează pe medii obișnuite cum este geloză sânge. Produsele puțin contaminate, cum sunt puroiul, sputa se însămânțează și pe un mediu selectiv lactozat, cum este mediul MacConkey. Materiile fecale se însămânțează în mod obligatoriu pe mai multe medii de cultură:

- un mediu de îmbogățire - bulion cu selenit acid de sodiu (Leifson), bullion cu tetratrat (Muller-Kauffmann),

- un mediu slab selectiv - MacConkey, agar EMB (Levin),
- un mediu moderat selectiv – ADCL (Leifson), agar Hectoen, agar XLD, agar SS (*Salmonella-Shigella* agar),
- eventual un mediu foarte selectiv, ca de pildă, mediul Wilson-Blair pentru salmonele.

Identificarea enterobacteriilor se bazează pe studiul caracterelor biochimice, ele constituind criterii importante de identificare a genului/speciei.

Enterobacteriile prezintă unele caractere biochimice comune, care le permit încadrarea în familia *Enterobacteriaceae*: fermentează glucoza, reduc nitrații la nitriți, sunt catalazo-pozitivi și oxidazo-negativi.

Unele enterobacterii fermentează lactoza, altele nu, fermentarea lactozei fiind un criteriu practic de diferențiere preliminară a lor. Astfel, utilizarea mediilor selective lactozate permite diferențierea enterobacteriilor lactozo-pozitive (*E. coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Serratia* etc.) de cele lactozo-negative (*Salmonella*, *Shigella*, *Proteus*, *Yersinia*).

Testele biochimice se efectuează pe medii turnate în eprubete mici, care după însămânțare se termostatează 24 de ore. Există și produse comerciale gata preparate ca, de pildă, sistemele microtest – API 10E., sistem automat Vitek, sau spectrometria de masă **MALDI-TOF**. Mediile minimale pentru identificarea biochimică a enterobacteriilor sunt:

- *geloza TSI*-pe care se testează fermentarea glucozei, lactozei, precum și producerea de H₂S și gaz.

- *mediul MIU* pentru cercetarea mobilității, prezenței indolului și ureazei.

- *reacția roșu metil (RM)*

- *utilizarea citratului de sodiu ca sursă unică de carbon*

- *testul fenilalanindezaminazei (FAD)* – pozitivă la tulpinile de *Proteus/Providencia/Morganella* spp.

Pentru unele specii identificarea de gen nu este suficientă, deoarece cuprind mai multe serotipuri (*Salmonella*, *Shigella*, *E. coli* enteropatogen). **Identificarea serologică pe baza structurii antigenice** constă în evidențierea unei structuri antigenice și/sau grupări de structuri antigenice, prin reacții antigen-anticorp (aglutinare, coaglutinare, latex-aglutinare). Studiul antigenic bazat pe determinarea antigenelor somatice O, capsulare K și flagelare H permite încadrarea bacteriilor aparținând unui gen în specii sau serotipuri.

Sensibilitatea la antibiotice. Determinarea sensibilității la antibiotice este obligatorie, deoarece enterobacteriile au dobândit, relativ repede, rezistență la o serie de antibiotice, cel mai frecvent prin transfer de plasmide. Dacă nu este posibilă antibiograma, medicul care prescrie antibioticul trebuie să cunoască rezistența naturală, genetică a enterobacteriilor și să fie orientat asupra rezistenței dobândite la tulpinile circulante în acea zonă. Testarea sensibilității la antibiotice se poate face fie difuzimetric, fie prin utilizarea de sisteme automate (Vitek, Sensititre, MicroScan, etc.) cu posibilitatea determinării CMI. Pe măsura unor noi descoperiri și a sporirii cerințelor epidemiologice și de diagnostic, au fost dezvoltate scheme de tipizare bacteriofagică (lizotipie), bacteriocinică (bacteriocinotipie) și ulterior antibiotică (antibiotipie). De asemenea, dezvoltarea tehnicilor moleculare au dus la introducerea tipizării genetice ca practică concomitentă sau alternativă la tipizarea fenotipică sau în vederea evidentierii genelor de rezistență la antibiotice.

Genul *Salmonella*

Genul *Salmonella* conține peste 1500 de serotipuri a căror clasificare este în continuă modificare și completare. Prin metode moderne de taxonomie moleculară sunt recunoscute în prezent în cadrul acestui gen 2 specii:

- *Salmonella enterica* cu 6 subspecii: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* și *indica*;

- *Salmonella bongori*.

99,5% din tulpinile de *Salmonella* implicate în patologia umană aparțin speciei *S. enterica subsp. enterica*. ;(*S. Typhi*, *S. Paratyphi A*, *S. Paratyphi B*, *S. Paratyphi C*)

Semnificația clinică. Salmonellele sunt germeni înalt-patogeni. Izolarea lor de la gazda umană are întotdeauna semnificație clinică: bolnav sau purtător sănătos.

Poarta de intrare digestivă (epiteliul intestinului subțire) este comună pentru toate speciile, dar numai *S. Typhi*, *S. Paratyphi A*, *B* și *C* sunt sistemic invazive.

Din punct de vedere al patogenității, unele salmonelle produc toxiinfecții alimentare, fără să depășească bariera intestinală, pe când altele, infecții grave sistemice (febre enterice). Febrele enterice sunt infecții sistemice (septicemice) cu evoluție ciclică, caracterizate prin stare tifică, febră în platou, erupție tegumentară cu macule lenticulare, semne de suferință intestinală precum și hepato-splenomegalie.

Prototipul febrei enterice este produs de *Salmonella Typhi* și poartă numele de *febră tifoidă*. Febrele enterice, care poartă denumirea de *febre paratifoide*, sunt produse de *S. Paratyphi A*, *S. Schottmuelleri* (cunoscut sub denumirea de *S. Paratyphi B*), precum și de *S. Hirschfeldii* (cunoscut sub denumirea de *S. Paratyphi C*) și au o evoluție mai blândă decât febra tifoidă. Diagnosticul diferențial se face pe baza examenelor de laborator.

Diagnosticul de laborator în febrele enterice este bacteriologic și serologic.

Diagnosticul bacteriologic

Recoltarea și izolarea. În cazul tuturor salmonelozelor se recoltează materii fecale, ia în cazul febrei tifoparatifoide în prima săptămână de boală se recoltează sânge(hemocultură) și urină(urocultură), din săptămâna a II a materii fecale(coprocultură), iar bila(bilicultură) se recoltează pentru depistarea purtătorilor de bacili tifici.

Izolarea se face pe medii de îmbogățire și pe medii selective cu lactoză(Wilson- Blair, mediu Ss, ADCL, Istrati Meitert, MacConkey)

Identificarea germenilor izolați din produsele patologice. Coloniile izolate pe mediile selective, obținute prin coprocultură și cele obținute pe geloza înclinată sau geloză sânge, prin hemocultură, vor fi identificate pe baza caracterelor morfologice, culturale, biochimice și antigenice.

Caractere morfologice. se evidențiază bacili gram-negativi, cu dimensiuni de 2-3 μm, cu dispoziție necaracteristică.

Caractere culturale: colonii S lactozo-negative

*Caractere biochimice.*fermentează Glucoza (G+), nu fermentează lactoza (L-), produce H₂S, citrat +, etc.

Identificarea pe baza structurii antigenice (identificarea serologică) se practică oricărei tulpini de *Salmonella*, indiferent de produsul biologic din care a fost izolată, după stabilirea genului pe baza caracterelor biochimice.

Grupul și tipul de *Salmonella* se pot identifica pe baza structurii antigenice după schema lui Kauffman și White. Pentru identificarea unei tulpini se folosește tehnica aglutinării pe lamă

Sensibilitatea la antibiotice. Antibioticul de elecție în febrele enterice este cloramfenicolul. În cazul tulpinilor rezistente la cloramfenicol se folosesc antibiotice de rezervă. Se recomandă efectuarea antibiogramelor pentru a putea urmări apariția tulpinilor rezistente prin transfer de plasmide.

Diagnosticul serologic al febrei tifoide. Diagnosticul serologic urmărește evidențierea și titrarea anticorpilor specifici față de antigenele somatice “O”, flagelare “H” și de înveliș “Vi”, în serul de cercetat. Pentru evidențierea anticorpilor specifici față de antigenele somatice “O” și flagelare “H” se utilizează reacția de aglutinare Widal (analiza serică calitativă). Diagnosticul serologic se practică începând din a doua săptămână de boală, când încep să apară anticorpii specifici în serul bolnavului (anticorpii anti-H și anti-O). Titrul lor crește, atingând un maximum în săptămâna a treia de boală, și se menține ridicat în convalescență și după vindecarea clinică, pentru un timp variabil.

Interpretarea reacției serice calitative se face diferit la bolnavii fără și cu antecedente vaccinale.

Diagnosticul toxiinfecțiilor alimentare cu salmonele este numai bacteriologic, prin coprocultură.

Genul *Shigella*

Pe baza criteriilor biochimice și antigenice, grupul (genul) *Shigella* este împărțit în 4 subgrupe serologice:

- Subgrupa A - *Shigella dysenteriae* cuprinde 10 tipuri de
- Subgrupa B - *Shigella flexneri* cuprinde tipurile 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 X și Y.
- Subgrupa C - *Shigella boydii* cuprinde 15 tipuri.
- Subgrupa D - *Shigella sonnei* se poate întâlni ca formă S sau R.

Semnificația clinică. Sunt germeni înalt patogeni cu habitat strict uman (bolnavi sau purtători sănătoși). Denumiți și bacili dizenterici, germenii din genul *Shigella* sunt agenții etiologici ai **dizenteriei bacteriene**, fiind localizați la nivelul colonului sigmoid. Caracterele de patogenitate se manifestă prin multiplicare, invazivitate și toxinogeneză.

Contaminarea se face pe cale fecal-orală, consecutiv consumului de alimente sau apă contaminată. Muștele sunt cei mai importanți vectori. Perioada de incubație este scurtă (1-3 zile), iar debutul brusc cu febră, crampe abdominale severe, tenesme, scaune direice frecvente mucopurulente și mucosangvinolente patognomonice, însoțite de semne neurologice și fenomene generale ca febră și deshidratare. Cea mai gravă formă de dizenterie este dată de *Sh. shigae* care secretă o neurotoxină.

În zona noastră geografică îmbolnăvirile cu *Shigella* spp. sunt produse mai frecvent de *S. flexneri* și *S. sonnei*.

Recoltare : materii fecale

Izolarea. Însămânțarea se face pe medii selective ADCL (Leifson), SS, MacConkey și XLD, pe care shigeele se diferențiază prin fermentarea xilozei.

Identificarea.

Caractere morfotinctoriale : bacili G-, imobili

Caractere culturale. Colonii S lactozo-negative

Caractere biochimice: Coloniile lactozo-negative vor fi identificate pe baza testelor biochimice, care permit încadrarea lor în genul *Shigella*: G+, L-, H₂S-, citrat-, etc.

Structura antigenică este reprezentată în mod special de antigenele somatice O, care stau la baza identificării serologice. Stabilirea subgrupe și a tipului se face prin reacția de aglutinare pe lamă, cu seruri polivalente și apoi cu seruri monovalente de tip.

Sensibilitatea la antibiotice. Se remarcă o creștere a rezistenței la unele antibiotice cu spectru larg (cloramfenicol, tetraciclină, ultima fiind utilizată mai ales în tratamentele scurte - “doză șoc” în focarele de dizenterie).

Genul *Yersinia*

Genul *Yersinia* cuprinde 12 specii, dintre care doar 3 sunt de interes medical: *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* și *Y. enterocolitica*.

Y. pestis, agentul etiologic al ciumei (pestei), are ca rezervor principal rozătoarele, în special șobolanii, dar și veverițele, iepurii etc. Interuman, contaminarea se face frecvent prin inhalare de aerosoli contaminanți

Yersinia pestis

Semnificația clinică. *Yersinia pestis*, o specie înalt patogenă, este agentul etiologic al **ciumei**, boală epidemigenă care, de-a lungul secolelor, a decimat continente. Astăzi este endemică doar în unele regiuni ale lumii. Este un patogen al rozătoarelor și se transmite la om prin mușcătura puricelui de șobolan. De la locul înțepăturii, germenii ajung la ganglionii limfatici regionali (mai ales inghinali și axilari), formând **bubonul pestos** (inflamație, necroză, fistulizare). În absența unui tratament adecvat, apar forme septicemice cu leziuni în diferite țesuturi și organe. Mortalitatea este de peste 60%.

Transmiterea interumană este neobișnuită, dar poate avea loc pe cale aerogenă, în timpul epidemiilor, când bolnavii devin eliminatori de bacili. Se produce **pesta pulmonară**, care se manifestă ca o pneumonie cu evoluție fatală.

Clinic cea mai frecventă formă este ciuma bubonică (bubonul pestos); forme mai rare sunt: ciuma pulmonară și ciuma septicemică. Imunitatea după boală este de lungă durată.

Diagnosticul de laborator se efectuează în laboratoare de referință.

Recoltarea. În forma bubonică se recoltează puroi bubonic, fragmente rezultate din puncție ganglionară și sânge iar în forma pulmonară spută și sânge.

Examenul direct. Din puroi se efectuează un frotiu colorat Gram ce evidențiază cocobacili gram negativi, de obicei colorați bipolar, dispuși izolați sau în perechi. Din punctatul ganglionar se efectuează preparate histologice.

Izolarea. *Yersinia pestis* crește pe medii uzuale, cum este geloza sânge, precum și pe mediile selective pentru enterobacterii. Se incubează 24 de ore la termostat, la 28-30°C.

Identificarea. Pe geloză-sânge se dezvoltă colonii mult mai mici decât ale celorlalte enterobacterii, nehemolitice, transparente, care prin învechire se măresc, dobândind un aspect mucoid.

Dacă în urma anchetei epidemiologice, a tabloului clinic, a examenului bacteriologic există suspiciunea de *Y. pestis*, cultura se trimite în condiții de maximă siguranță la laboratorul de referință cel mai apropiat.

Diagnosticul serologic are valoare retrospectivă și epidemiologică.

Sensibilitatea la antibiotice. Yersinile sunt sensibile la antibioticele cu spectru larg. Totuși se recomandă efectuarea antibiogrammei la fiecare izolat pentru a sesiza instalarea rezistenței.

Genul *Escherichia*

Genul *Escherichia* include mai multe specii, dintre care, singura de interes medical este *Escherichia coli*.

E. coli este un bacil gram negativ, scurt, cu capetele rotunjite, nesporulat, necapsulat, în general mobil (cu cili peritrichi). Este aerob, facultativ anaerob. Face parte din flora normală a intestinului la om și animale, reprezentând aproximativ 80% din flora rezidentă, aerobă, a colonului. Are un rol important în sinteza unor vitamine din grupul B și K și în menținerea unui echilibru în biocenoza intestinului.

Semnificația clinică. Sunt germeni condiționat-patogeni, fiind cei mai izolați microbi în laboratorul de bacteriologie. În anumite condiții, mai ales când scade rezistența locală sau generală a organismului, produc infecții cu localizare și gravitate diferită, grupate în:

a. infecții enterale

b. infecții extraenterale.

Infecțiile enterale - se realizează prin consumul unor alimente în care *E. coli* s-a multiplicat (toxiinfecții alimentare) sau prin consum de apă cu contaminare fecală intensă (infecții hidrice). Sunt produse de 6 patotipuri diareigene de *E. coli*: enterotoxigen (ETEC), enteroinvaziv (EIEC), enteropatogen (EPEC), enterohemoragic (EHEC) enteroagregativ (EAggEC) și enteroadherent difuz (DAEC).

Rezervorul de infecție al tulpinilor de EIEC, ETEC, EPEC este uman, iar al celor EHEC este bovin. **Recoltarea.** Se recoltează materiile fecale și se trimit imediat la laborator pentru a fi prelucrate.

Izolarea. Materiile fecale se însămânțează pe cel puțin 2 medii selective: un mediu slab selectiv – Mac Conkey și un mediu moderat selectiv - ADCL sau XLD. Pe aceste medii, care toate conțin lactoză și un indicator de pH, bacilul coli dezvoltă colonii lactozo pozitive, a căror culoare este în funcție de pH. Astfel:

- pe mediul MacConkey, pe mediul ADCL - care au ca indicator de pH roșu neutru (roșu în mediu acid și incolor în mediu bazic), *E. coli* dă colonii rotunde, lucioase de tip S, de culoare roșie, cu un diametru de 2-3mm,

- pe mediul AABTL, pe mediul Istrati-Meiert, cu albastru bromtymol ca indicator de pH, bacilul coli dezvoltă colonii cu aceleași caractere, dar de culoare galbenă.

Este de reținut faptul că din 100 de tulpini de *E. coli*, 95 fermentează lactoza, dar 5 nu.

Identificarea speciei se face pe baza caracterelor biochimice : G+, L+, H2S-, citrate -, etc.

Bacili coli care aparțin grupelor cu patogenitate intestinală nu se deosebesc din punct de vedere cultural și biochimic de tulpinile care se găsesc în mod normal în flora intestinală, de aceea trebuie urmărită structura antigenică.

b. Infecțiile extraenterale produse de *E.coli* sunt numeroase :infecții ale tractului urinar, infecții biliare, infecții respiratorii, infecții ORL, suprainfecții ale plăgilor și arsurilor, septicemii, meningite, mai ales la nou-născuți etc. Unele din infecțiile enumerate - urinare, ale plăgilor chirurgicale, etc. - pot lua caracter nosocomial (infecții asociate asistenței medicale).

Ne vom referi în continuare la **diagnosticul infecțiilor urinare**, al căror principal agent etiologic este *E. coli*.

Urocultura cantitativă este singura metodă care stabilește cu certitudine diagnosticul de infecție a tractului urinar.

Recoltarea. :urina

Examenul direct. Urina se centrifughează 10 minute la 3000 turații/minut. Din sediment se face un frotiu colorat Gram pe care, într-o infecție urinară, se văd în mod obligatoriu PMN și bacili gram negativi.

Însămânțarea:

Tehnica anselor calibrate. Se utilizează două anse calibrate (una cu diametrul interior de 5 mm și cealaltă de 2,5 mm) astfel încât volumul încărcat de urină omogenizată (nediluată) să reprezinte 0,01 ml, respectiv 0,001 ml. Cu ansa mică urina se însămânțează pe geloză sânge și cu cea mare pe mediu Mac Conkey. Plăcile se incubează la termostat la 37°C până a doua zi. Numărul de germeni/ml urină se obține prin înmulțirea numărului de colonii cu 100 (respectiv 1000) și apoi se face media aritmetică.

Interpretarea rezultatelor:

- $< 10^3$ UFC/ml (< 1.000 germeni/ml urină) este o bacteriurie nesemnificativă
- 10^4 (10.000 germeni/ml urină) posibil contaminare din căile urinare inferioare, se recomandă repetarea uroculturii,
- $10^4 - 10^5$ UFC/ml (între 10.000 - 100.000 germeni/ml urină), suspiciune de ITU, rezultatul este discutabil în funcție de context și germeni identificați, urocultura se poate repeta
- ($\geq 10^5$ UFC/ml (≥ 100.000 germeni/ml urină), infecția urinară este certă, dacă se izolează o singură specie microbiană.

NOTĂ: Pragul semnificativ pentru o ITU este pentru enterobacterii, *Pseudomonas*, enterococi, de 10^5 UFC/ml, pentru stafilococi de 5×10^4 UFC/ml, iar pentru *Candida* de 10^4 UFC/ml. Identificarea mai multor specii microbiene presupune contaminarea probei și se indică repetarea uroculturii.

Identificarea speciei se face pe baza testelor biochimice prezentate mai sus, iar identificarea de serotip se face numai în laboratoare de referință.

Sensibilitatea la antibiotice. *E. coli* este sensibil, în mod natural, la majoritatea antibioticelor, dar foarte multe tulpini au dobândit rezistența la chimioterapice antiinfecțioase prin transferul de plasmide. Antibiotograma este, deci, obligatorie pentru toate tulpinile izolate.

Genul *Klebsiella*

Genul *Klebsiella* cuprinde bacili gram negativi, scurți, cu capete rotunjite, imobili, capsulați, dispuși în diplo în sensul lungimii.

Semnificația clinică. Din cele 10 specii ale genului, 4 sunt importante în patologia umană: *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *K. ozenae* și *K. rhinoscleromatis*.

Sunt germeni condiționat-patogeni, componenți ai florei intestinale la om și animale, iar în număr redus se găsesc și la nivelul mucoasei tractului respirator. Se pot izola din apă, sol, plante. *K. pneumoniae* este specia cel mai frecvent izolată din cadrul genului. În cazul scăderii rezistenței antiinfecțioase a organismului (la prematuri și la vârstnici), *Klebsiella* poate cauza infecții grave - pneumonii, septicemii și meningite. Este agentul etiologic important al unor infecții nosocomiale (suprainfecția plăgilor chirurgicale, infecții urinare, septicemii). *K. oxytoca* produce infecții similare.

Recoltarea produselor este în funcție de localizarea infecției.

Examenul direct. Prezența PMN și a unor bacili scurți, gram negativi, colorați bipolar, capsulați dispuși în diplo în sensul lungimii sau în lanțuri scurte

Izolarea. Produsele normal sterile se însămânțează pe medii simple cum este geloză sânge.

Sângele pentru hemocultură se însămânțează în bulion (flacoane Bactec/Bactalert), făcându-se replicări pe geloză sânge din flacoanele pozitive.

Materiile fecale se însămânțează pe medii selective pentru enterobacterii: MacConkey, ADCL (Leifson), XLD

Identificarea. *Caractere culturale.* În bulion *Klebsiella* tulbură uniform mediul, iar la suprafață se formează un vâlc vâscos ce cade la fundul tubului.

Pe geloză sânge dezvoltă colonii mari, alb-cenușii, mucoase (aspect de cultură ce curge pe suprafața mediului), colonii care, prin învechire, devin cafenii.

Pe mediul Istrati-Meiert se dezvoltă colonii mari, mucoide, inițial lactozo-pozitive (galbene), apoi, după 24 de ore, "lactozo-negativ" (verzi), datorită fenomenul de "cameleonaj" prin alcalinizarea mediului.

Pe mediul Mac Conkey dezvoltă colonii mari, roșii, lactozo-pozitive, cu apariția fenomenului de "cameleonaj".

Caracterele biochimice. Bacilii din genul *Klebsiella* : G+, L+, H₂S -, imobili, ureaza +, indol-, etc. Scindarea malonatului de Na și creșterea pe mediul cu citrat Simmons diferențiază cele 4 specii de *Klebsiella*. *K. oxytoca* produce indol, caracter unic ce o diferențiază de *K. pneumoniae*. **Identificarea tipului** se face pe baza structurii antigenice prin reacții de aglutinare și umflare a capsulei cu seruri anticapsulare, dar numai în laboratoare de referință.

Sensibilitatea la antibiotice. antibiograma este obligatorie pentru orice tulpină izolată.

Genul *Proteus*

Genul *Proteus* cuprinde 8 specii, dintre care 3 se întâlnesc în patologia umană: *P. vulgaris*, *P. mirabilis* și *P. penneri*. Sunt bacili scurți, cu capetele rotunjite, gram negativi, cu polimorfism accentuat, foarte mobili (cili peritrichi), nesporulați, necapsulați, cu dispoziție necaracteristică, aerobi și facultativ anaerobi.

Semnificația clinică. La om și animale bacilul proteus face parte din microflora tubului digestiv. Sunt germeni condiționat patogeni, putând produce diferite infecții, în condițiile scăderii rezistenței organismului.

Recoltarea se face în raport cu localizarea infecției (urină, materii fecale, puroi, spută, L.C.R., sânge etc).

Examenul microscopic direct. Are valoare orientativă și se aplică doar produselor natural sterile (LCR, de pildă). Pe frotiuri colorate Gram, se evidențiază bacili gram negativi cu dispoziție necaracteristică.

Izolarea și identificarea. Produsele monomicrobiene se însămânțează pe medii simple, cum este geloza sânge, unde, bacilul proteus este ușor de recunoscut, prin **mirosul de putrefacție** degajat, precum și prin producerea **fenomenului de invazie**. El crește sub forma unor valuri concentrice care invadează toată placa. Dacă se repică pe geloză înclinată, mobilitatea apare sub forma **fenomenului de cățărare**.

Produsele patologice, în care există și altă floră, se însămânțează, în mod obligatoriu, pe mediile selective, pentru a obliga bacilul proteus să crească sub forma unor colonii izolate și să nu invadeze ceilalți microbi, care astfel nu mai pot fi identificați.

Bacilul proteus crește sub forma unor **colonii** rotunde, de culoarea mediului, transparente la periferie și **negre la centru datorită H₂S** pe care îl produce. Ele au fost comparate cu un **“ochi de pisică”**.

Testele biochimice definesc genul (G+, L-, H₂S, Mobilitate +, Uree +, citrat +), dar diferențiază și speciile de *Proteus* între ele. Toate speciile de *Proteus* sunt mobile (fenomenul de catarare, de invazie), produc urează și secretă fenilalanindezaminază (FAD).

În scop epidemiologic se utilizează o tehnică simplă : linia de demarcație a lui Dienes - pentru a stabili apartenența unor tulpini de *Proteus* unuia sau mai multor serotipuri. Tulpinile de *Proteus* izolate se însămânțează pe o placă cu geloză în puncte diferite și se incubează 18-24 de ore la 37°C. Fiecare tulpină va crește sub formă de valuri concentrice. Dacă tulpinile aparțin aceleiași serotip (deci, provin din aceeași sursă), valurile de invazie se suprapun, iar dacă tulpinile sunt diferite, la locul de întâlnire a valurilor de expansiune apare o linie de demarcație de 2 - 3 mm, care le delimitează.

Sensibilitatea la antibiotice. Antibiograma este obligatorie pentru fiecare tulpină izolată, sunt natural rezistenți la colistin.

Genurile *Morganella* și *Providencia*

Multă vreme clasificarea germenilor din genul *Proteus* a fost foarte controversată, apoi genul a fost scindat în 3 genuri: *Proteus*, genul *Morganella* și genul *Providencia* (care se diferențiază pe baza proprietăților biochimice). În prezent genul *Morganella* cuprinde o singură specie *Morganella morganii* (fostul *Proteus morganii*). De asemenea, specia *Proteus rettgeri* a fost inclusă în genul *Providencia*, care, în prezent, cuprinde 6 specii. Cele 3 genuri au fost incluse în tribul *Proteeae*. Identificarea se face biochimic.

Produc infecții urinare mai ales la pacienții cateterizați, dar și în alte infecții cu caracter nosocomiale. Tratamentul acestora este dificil, deoarece tulpinile au dobândit un grad înalt de rezistență. Din nefericire, colistinul nu poate fi administrat în tratament, deoarece sunt natural rezistente la colistin.