

Infecții nosocomiale produse de două tulpini de *Klebsiella pneumoniae* cu morfotipuri coloniale și pattern-uri de rezistență diferite izolate din același produs patologic

Nosocomial infections caused by two strains of *Klebsiella pneumoniae* with different colonial morphotypes and resistance phenotypes isolated from the same sample

Ancuța Tutelcă^{2*}, Monica Licker¹, Liliana Dan¹, Cristina Orb², Roxana Moldovan¹

1. Disciplina de Microbiologie, Universitatea de Medicină și Farmacie „Victor Babeș” din Timișoara

2. Spitalul Clinic Județean Nr. 1 Timișoara, Laborator central de analize medicale, Compartimentul bacteriologie

1. „Victor Babeș” University of Medicine and Pharmacy Timișoara, Microbiology Department

2. County Emergency Hospital No 1, Timișoara, Laboratory - Bacteriology Department

Rezumat

Trei pacienți internați într-o secție de Anestezie și Terapie Intensivă, cu răspuns nesatisfăcător la terapia antiinfecțioasă administrată, au prezentat infecții nosocomiale produse de două tulpini de *Klebsiella pneumoniae* ssp. *pneumoniae* cu morfotipuri coloniale și pattern-uri de rezistență distincte, izolate din același produs patologic. Deși infecțiile nosocomiale cu tulpini de *Klebsiella pneumoniae* cu fenotipuri asociate de rezistență nu sunt neobișnuite în secțiile de terapie intensivă, asocierea în același produs patologic a două subpopulații diferite aparținând aceleiași specii bacteriene nu a mai fost raportată în România.

Toate cele trei cazuri prezentate constituie argumentul viu al necesității respectării riguroase a protocolurilor standardizate cu privire la etapele diagnosticului bacteriologic.

Cuvinte cheie: *Klebsiella pneumoniae* subspecia *pneumoniae*, morfotipuri coloniale, pattern-uri de rezistență

* **Adresa pentru corespondență:** Ancuța Tutelcă, Intrarea Cerceilor Nr. 2, Bl. D 65, Sc. A, Ap. 9, Timișoara, Cod 300473, Jud. Timiș, Romania.
Tel.: 0356-401456, Mobil 0744607874, E-mail: ancutaletitia@yahoo.com

Abstract

Three patients hospitalised in the Intensive Care Unit (ICU), who initially responded unsatisfactory to antimicrobial treatment, were found to be infected by two strains of *Klebsiella pneumoniae* ssp. *pneumoniae* with different colonial morphotypes and resistance phenotypes, isolated from the same sample. Although nosocomial infections with multidrug-resistant strains of *Klebsiella pneumoniae* are not uncommon in ICU, this association in the same sample of two different strains belonging to the same specie, had never been reported in Romania.

These three cases are a very strong argument for the strict following of the standard protocols of isolation, identification and susceptibility testing of bacterial strains.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae* subspecies *pneumoniae*, colonial morphotypes, resistance phenotypes

Introducere

Trei pacienți internați într-o secție de Anestezie și Terapie Intensivă, cu răspuns nesatisfăcător la terapia antiinfecțioasă administrată, au prezentat infecții nosocomiale produse de două tulpini de *Klebsiella pneumoniae* ssp. *pneumoniae* cu două morfotipuri coloniale și două pattern-uri de rezistență diferite.

Pneumoniile nosocomiale (PN) și infecțiile nosocomiale postoperatorii (INPO) reprezintă cauze importante de morbiditate și mortalitate în serviciile de terapie intensivă și în cele de chirurgie toraco-abdominală.

În 30-40% din cazuri, etiologia pneumoniei nosocomiale este plurimicrobiană. Spectrul bacterian este dominat de bacili aerobi Gram-negativi: *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella* spp., *Escherichia coli*, *H. influenzae*, *Serratia marcescens*. Numeroase studii arată însă importanța crescândă a *Staphylococcus aureus*, în special metilino-rezistent (MRSA), și a *Streptococcus pneumoniae* în etiologia PN. Deși, cel mai frecvent, în aspiratele bronșice se asociază doi sau mai mulți bacili Gram-negativi, nu de puține ori aceștia au fost izolați alături de coci Gram-pozitivi în același produs patologic, la pacienții asistați ventilator. În cele ce urmează vom prezenta o situație inedită, în sensul că din același produs patologic am izolat două populații microbiene cu caractere culturale, biochimice și fenotipice diferite ale aceleiași specii bacteriene.

Prezentare de caz

Cazul I

Pacientă în vârstă de 65 de ani (pacienta A), a fost internată în secția de Anestezie și Terapie Intensivă în data de 3.06.2005, cu diagnosticul accident vascular cerebral (AVC) hemoragic. Pacienta se află în comă de gradul III și necesită respirație asistată, caterer central și sondă vezicală. Aflată sub antibiopprofilaxie cu cefazolin și ciprofloxacina, la 2 săptămâni de la internare, pacienta prezintă semne de infecție respiratorie: febră, leucocitoză și tahicardie. Examinarea radiologică confirmă suspiciunea de pneumonie. Pacienta dezvoltase o pneumonie de ventilator – VAP. Se prelevă aspiratul bronșic. Se realizează un frotiu colorat Gram direct din produsul patologic, care evidențiază bacili Gram-negativi, dispuși în diplo în axul lung, capsulați, asociați cu 6 polimorfonucleare și fibrină (mărire de 1000 X)⁴. Aspiratul bronșic se însămânțează pe mediul geloză-sânge, Chapman, MacConkey și bulion nutritiv. Se incubează 24 de ore la 37°C. A doua zi se examinează plăcile de cultură.

Pe mediul MacConkey au fost puse în evidență două tipuri diferite de colonii:

- Izolatul A1: colonii mari, cu diametrul de 2 mm, lactozo-pozitive, uscate;
- Izolatul A2: colonii mari de 3 mm, lactozo-pozitive, foarte mucoase.
- Ambele morfotipuri coloniale au prezentat

fenomenul de cameleonaj¹¹.

Pe geloză-sânge:

- Izolatul A1: colonii mari, cu diametrul de 2 mm, opace, uscate;
- Izolatul A2: colonii mari de 3 mm, gri-cenușii, lucioase, netede, bombate, foarte mucoase.

- **Testul hipermucovâscozității (THV)**⁸: se efectuează pentru coloniile înșămânțate pe geloză cu 5% sânge defibrinat de berbec, incubate peste noapte la 37°C. Se utilizează ansa bacteriologică standardizată cu buclă, pentru a „întinde” o colonie mucovâscoasă sub forma unui fir. Hipermucovâscozitatea (HV) este definită prin formarea unui fir vâscos de > 5 mm lungime atunci când este folosită ansa pentru întinderea coloniei de pe placa cu agar (test pozitiv - vezi *Figura 1*).

THV a fost pozitiv pentru izolatul A2 și negativ pentru izolatul A1.

- Pentru **identificarea** izolatelor A1 și A2 s-a folosit sistemul standardizat de identificare a enterobacteriilor API 10S¹³ (bioMérieux). Ambele galerii, pentru identificarea izolatului A1 și respectiv A2, au prezentat același cod 7524, căruia îi corespunde



Figura 1. Testul hipermucovâscozității (THV) pozitiv: formarea unui „fir” vâscos de > 5 mm lungime la întinderea cu ansa bacteriologică de înșămânțare⁸

Klebsiella pneumoniae subspecia *pneumoniae*.

- S-a efectuat testarea sensibilității la chimioterapicele antiinfecțioase a ambelor izolate separat, prin metoda difuzimetrică standardizată Kirby-Bauer, utilizând normele CLSI/NCCLS⁶ (Clinical and Laboratory Standards Institute/ National Committee for Clinical Laboratory Standards). *Tabelul nr. 1* prezintă testarea sensibilității la chimioterapicele antiinfecțioase a izolatelor A1 și respectiv A2 prin metoda difuzimetrică standardizată Kirby-Bauer.

- Citirea antibiogramei și încadrarea în fenotipuri de rezistență s-a realizat cu ajutorul analizorului automat Osiris Evolution⁵ (BioRad), metodologia de lucru și baza lui de date fiind în conformitate cu standardele CLSI/NCCLS⁷.

Astfel:

- Izolatul A1 a prezentat următoarele fenotipuri de rezistență asociate: fenotip secretor de penicilinază cu nivel crescut (PAZA) + fenotip sensibil la aminoglicozide + fenotip de rezistență încrucișată la toate fluoroquinolonele;
- Izolatul A2: fenotip secretor de betalactamaze cu spectru extins (BLSE) + fenotip de rezistență la toate aminoglicozidele (KTGANt) + fenotip sensibil la fluoroquinolone.
- În cazul izolatului A2, certificarea fenotipului BLSE s-a efectuat cu ajutorul testului de sinergie între acidul clavulanic conținut în comprimatul de Augmentin (AMC = Amoxicilină + Acid clavulanic) și cefalosporinele de generația a 3-a (Ceftazidim, Ceftriaxonă, Cefotaxim) respectiv monobactami (Aztreonam), relevată printr-o imagine caracteristică de „bușon de șampanie”¹⁰.
- Ambele izolate au fost sensibile la cefamicine (cefoxitin) și carbapeneme (imipenem). Cu toate acestea, sistemul expertiză al analizorului automat Osiris Evolution⁵ a trecut, în cazul izolatului A2,

cefoxitinul de la sensibil la rezistent, datorită prezenței fenotipului BLSE.

Așadar, din același produs patologic s-au izolat două morfotipuri coloniale diferite, cu același biotip chimic, cu două pattern-uri de rezistență diferite ale aceleiași specii bacteriene^{9,14}. Comportamentul antiinfecțios diferit și chiar complementar față de aminoglicozide și fluoroquinolone al celor două izolate A1 și respectiv A2, explică eșecul antibioprolaxiei. Cefazolinul, omologul Cefalotinelui testat, este rezistent în cazul ambelor izolate, conform antibiogramelor și încadrării în fenotipuri de rezistență. Atât fenotipul BLSE, cât și fenotipul secretor de penicilinază cu nivel crescut presupun rezistența la cefalosporinele de primă generație

(Cefalotin, Cefazolin, etc.).^{1,10} Chiar dacă izolatul A2 este sensibil la Ciprofloxacin, izolatul A1 este rezistent, fapt ce impune schimbarea atitudinii terapeutice (vezi *Tabelul nr. 1*).

S-a prelevat și un set de hemoculturi, care s-au dovedit a fi negative.

Datorită datelor clinice și paraclinice de pneumonie, tratamentul antibiotic a fost schimbat cu imipenem/cilastatin (500 mg intravenos, la 6 ore), în conformitate cu antibiogramele celor două izolate. Tratamentul a continuat 24 de zile, obținându-se remisiunea pneumoniei.

Cazul II

Pacientă în vârstă de 58 de ani (pacienta B), a fost internată în secția de Anestezie și

Tabel nr.1. Testarea sensibilității la chimioterapicele antiinfecțioase a izolatelor A1 și respectiv A2 prin metoda difuzimetrică standardizată Kirby-Bauer

CHIMIOTERAPICE ANTIINFECȚIOASE	IZOLATUL A1			IZOLATUL A2		
	S	I	R	S	I	R
AMPICILINĂ			X			X
TICARCILINĂ			X			X
CEFALOTIN			X			X
CEFOXITIN	X			X →	→	→X
CEFOTAXIM	X					X
AMOXICILINĂ + ACID CLAVULANIC			X			X
CEFTAZIDIM	X					X
CEFUROXIM	X					X
IMIPENEM	X			X		
GENTAMICINĂ	X					X
TOBRAMICINĂ	X					X
AMIKACINĂ	X					X
NITROFURANTOIN		X			X	
TRIMETHOPRIM / SULFAMETHOXAZOL			X			X
NORFLOXACIN			X	X		
CIPROFLOXACIN			X	X		
FENOTIPURI ASOCIATE	-Secretor de penicilinază cu nivel crescut (PAZA) -Sensibil la aminoglicozide -Rezistență încrucișată la toate fluoroquinolonele			-Secretor de betalactamaze cu spectru extins (BLSE) -Rezistență la toate aminoglicozidele (KTGANt) -Sensibil la fluoroquinolone		

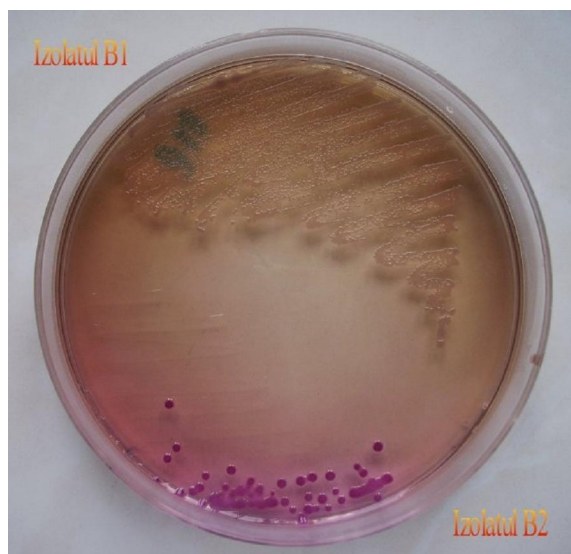


Figura 2a. Aspectele culturale ale celor două izolate B1 și B2, după repicarea celor două tipuri de colonii din cultura primară (colecție personală)

Terapie Intensivă în data de 29.08.2005, cu diagnosticul AVC ischemic. Pacienta se află în comă de gradul I/II, necesitând o monitorizare permanentă. Abolirea mecanismelor normale ale tusei, reflexului de deglutiție, imobilizarea

prelungită, abolirea stării de conștiență, protezarea respiratorie îndelungată sunt tot atâtea cauze care au favorizat dezvoltarea unei bronho-pneumonii.

În data de 14.09.2005 se prelevă aspiratul bronșic. Se realizează un frotiu colorat Gram direct din produsul patologic, care evidențiază bacili Gram-negativi, dispuși în diplo în axul lung, capsulați, asociați cu 8 polimorfonucleare și fibrină în cantitate moderată (mărire de 1000 X)⁴. Aspiratul bronșic se însămânțează pe mediul geloză-sânge, Chapmann, MacConkey și bulion nutritiv. Se incubează 24 de ore la 37°C. A doua zi se examinează plăcile de cultură.

Pe mediul MacConkey au fost puse în evidență două tipuri diferite de colonii:

- Izolatul B1: colonii mari, cu diametrul de 2 mm, lactozo-negative;
- Izolatul B2: colonii mari de 2-3 mm, lactozo-pozitive, foarte mucoase, cu cameleonaj (vezi Figura 2a).

Pe geloză-sânge:

- Izolatul B1: colonii mari, cu diametrul de 2 mm, translucide, mai puțin mucoase;
- Izolatul B2: colonii mari de 3 mm, gri-cenușii, lucioase, netede, bombate, foarte

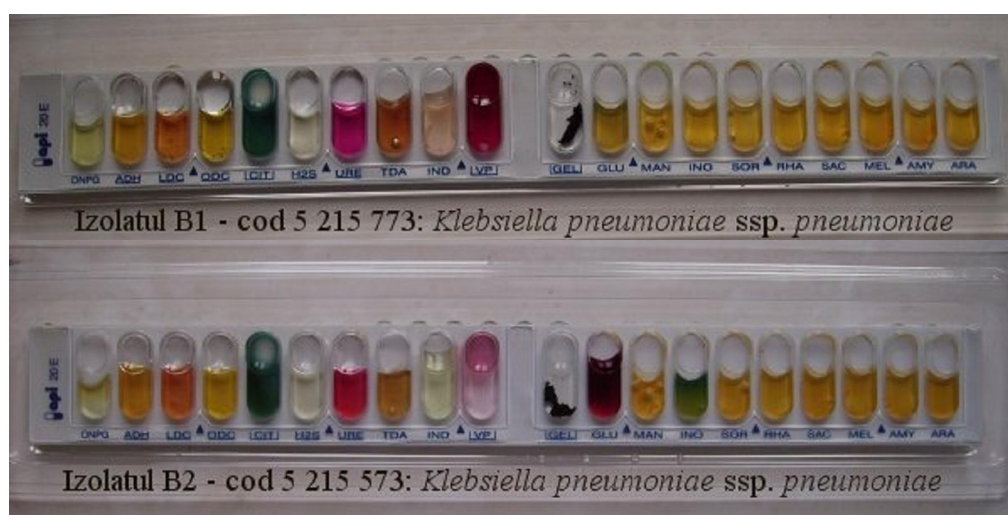


Figura 2b. Galerile API 20E ale celor două izolate B1 și B2 evidențiază o singură diferență a codului de identificare referitoare la fermentarea /oxidarea inozitolului (colecție personală)

mucoase.

- **Testul hipermucovâscozității (THV)⁸**: a fost pozitiv pentru izolatul B2 (> 5 mm) și negativ pentru izolatul B1 (4 mm).

- Pentru **identificarea** izolatelor B1 și B2 s-a folosit sistemul standardizat de identificare a enterobacteriilor API 20E¹² (bioMérieux). Galeria pentru identificarea izolatului B1 a avut codul 5.215.773 iar cea pentru identificarea izolatului B2, 5.215.573. Ambele coduri corespund aceleiași identificări, *Klebsiella pneumoniae* subspecia *pneumoniae*. După cum se observă, codurile se diferențiază printr-o singură cifră, corespunzătoare unui singur test biochimic: fermentarea /oxidarea inozitolului (INO), care este pozitivă pentru izolatul B1 și negativă pentru izolatul B2. *Figura*

2b ne arată cele două galerii după incubarea la 37°C, timp de 24 de ore. În tuburile ambelor galerii, pentru evidențierea triptofan-dezaminazei (TDA), pentru testarea producerii de indol (IND) și pentru producerea acetoiniei – reacția Voges Proskauer (VP), s-au adăugat reactivii corespunzători: TDA, reactivul James și respectiv reactivul VP1 + VP2. Reacția TDA și IND s-au citit imediat, iar reacția VP s-a citit la 10 minute. În galeria izolatului B2, s-au adăugat reactivii NIT1 și NIT2 în tubul pentru glucoză (GLU), pentru evidențierea reducerii nitraților la nitriți. Apariția culorii roșii se traduce ca reacție pozitivă. În cazul galeriei izolatului B1 nu s-au adăugat cei doi reactivi NIT1 și NIT2 anterior fotografierii, de aceea culoarea a rămas neschimbată.

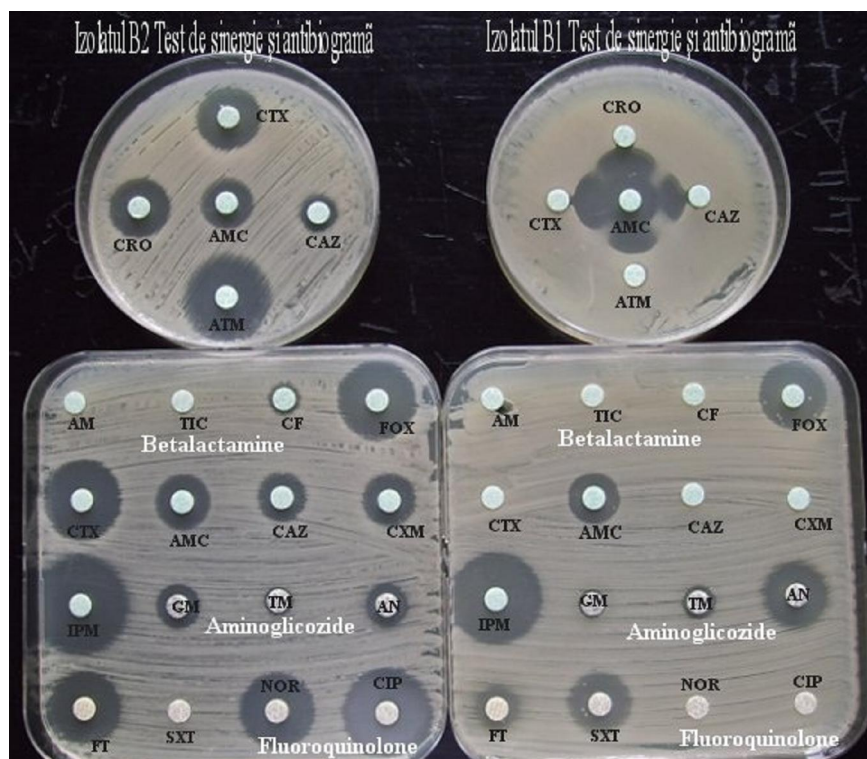


Figura 2c. Antibiotogramele și testele de sinergie pentru izolatele B1 și B2 (colecție personală): AM – Ampicilină; TIC – Ticarcilină; CF – Cefalotin; FOX – Cefoxitin; CTX – Cefotaxim; AMC – Amoxicilină + Acid clavulanic; CAZ – Ceftazidim; CXM – Cefuroxim; IPM – Imipenem; GM – Gentamicină; TM – Tobramicină; AN – Amikacină; FT – Nitrofurantoin; SXT – Trimethoprim/Sulfamethoxazol; NOR – Norfloxacin; CIP – Ciprofloxacin; CRO – Ceftriaxonă; ATM – Aztreonam;

- S-a efectuat testarea sensibilității la chimioterapicele antiinfecțioase a ambelor izolate separat, prin **metoda difuzimetrică standardizată Kirby-Bauer**, în conformitate cu normele CLSI/NCCLS⁶. Antibioramele celor două izolate sunt prezentate în *Tabelul nr. 2* și *Figura 2c*.

- Citirea antibiogramelor și încadrarea în fenotipuri de rezistență s-a realizat cu ajutorul analizorului automat Osiris Evolution⁵. Dat fiind aspectul celor două antibiogramă în ceea ce privește comportamentul față de betalactamine al celor două izolate (diminuarea diametrelor de inhibiție ale cefalosporinelor de generația a 3-a), s-au efectuat teste de sinergie între

cefalosporinele de generația a 3-a și amoxicilină + acid clavulanic pentru fiecare izolat în parte.

- Principiul **testului de sinergie între cefalosporinele de generația a 3-a și acidul clavulanic**¹ se bazează pe faptul că inhibitorii de betalactamaze (IBL) rămân activi asupra BLSE. Ca atare, un IBL va potența acțiunea unei cefalosporine de generația a 3-a³. Testul constă în evidențierea unei imagini de sinergie între un disc de antibiotic ce conține un inhibitor de betalactamază și un disc cu cefalosporină de generația a 3-a (ceftriaxonă, ceftazidim și cefotaxim) sau un monobactam (aztreonam). Este descrisă o imaginea caracteristică în „buzon de șampanie”^{1,10} (vezi *Figura 2c* – teste

Tabel nr. 2. Testarea sensibilității la chimioterapicele antiinfecțioase a izolatelor B1 și respectiv B2 prin metoda difuzimetrică standardizată Kirby-Bauer

CHIMIOTERAPICE ANTIINFECȚIOASE	IZOLATUL B1			IZOLATUL B2		
	S	I	R	S	I	R
AMPICILINĂ			X			X
TICARCILINĂ			X			X
CEFALOTIN			X			X
CEFOXITIN		X=17→	→X	X=21→	→	→X
CEFOTAXIM			X=6	X=23→	→	→X
AMOXICILINĂ + ACID CLAVULANIC		X			X	
CEFTAZIDIM			X=6			X=14
CEFUROXIM			X			X
IMIPENEM	X			X		
GENTAMICINĂ			X			X
TOBRAMICINĂ			X			X
AMIKACINĂ	X					X
NITROFURANTOIN			X	X		
TRIMETHOPRIM / SULFAMETHOXAZOL	X					X
NORFLOXACIN			X	X		
CIPROFLOXACIN			X	X		
FENOTIPURI ASOCIATE	-Secretor de betalactamaze cu spectru extins (BLSE) - Rezistență la aminoglicozide (KTG) -Rezistență încrucișată la toate fluoroquinolonele			-Secretor de betalactamaze cu spectru extins (BLSE) -Rezistență la toate aminoglicozidele (KTGANt) -Sensibil la fluoroquinolone		

de sinergie).

- În cazul izolatului B1, distanța dintre comprimate este de 2,5 cm, distanță suficient de mare pentru a pune în evidență imaginea caracteristică de sinergie în „bușon de șampanie”. Testul este elocvent pentru prezența BLSE.
- În cazul izolatului B2, distanța dintre comprimate este de 3 cm, distanță prea mare pentru a putea pune în evidență un nivel scăzut de BLSE – test fals negativ. Producerea de BLSE trebuie suspectată atunci când toate diametrele de inhibiție ale cefalosporinelor de generația a 3-a și a monobactamilor sunt reduse, sub următoarele valori: CTX ≤ 27 mm, CAZ ≤ 22 mm, CRO ≤ 25 mm, ATM ≤ 27 mm.¹ Valorile găsite au fost: CTX = 23mm, CAZ = 14 mm, CRO = 25 mm și ATM = 24 mm. Un rezultat fals negativ se poate observa în cazul sușelor care posedă două mecanisme de rezistență la betalactamine: unul producător



Figura 2d. Testul de sinergie AMC - TIC pentru izolatul B2, care ne arată prezența imaginii de sinergie la 20 mm distanță între centrele comprimatelor și mai evidentă la o distanță de 15 mm între acestea. (colecție personală)

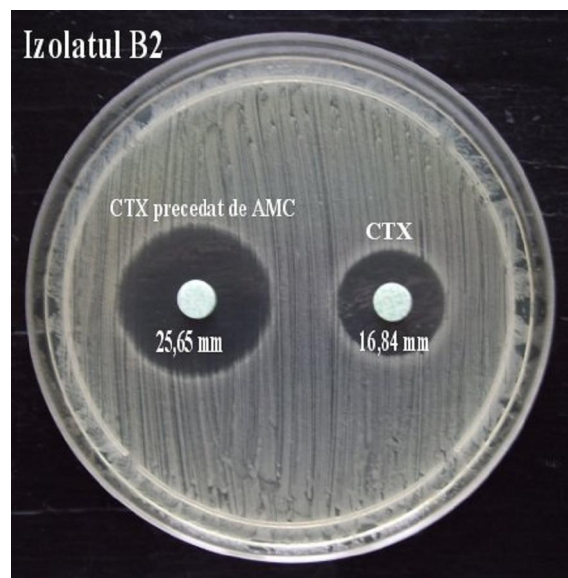


Figura 2e. Testul dublului disc pozitiv pentru izolatul B2; Diferența diametrelor de inhibiție: $\Delta \varnothing = 8,81$ mm (colecție personală)

de betalactamaze cu spectru extins (BLSE) și unul hiperproducător de penicilază naturală (PAZA)¹. Pentru a putea pune în evidență aceste mecanisme s-au realizat alte două teste suplimentare.

- **Testul de sinergie AMC-TIC¹**, pune în evidență prezența unei penicilinaze cu nivel crescut, atunci când apare o imagine de sinergie între Ticarcilină (TIC) și Acidul clavulanic, tradusă prin restaurarea sensibilității Ticarcilinei de către inhibitorul de betalactamază (vezi Figura 2d).

- **Testul dublului disc sau testul spaniol¹**, este un test complementar utilizat pentru a descoperi o tulpină producătoare de BLSE, atunci când testul de sinergie este fals negativ. Principiul testului constă în evidențierea creșterii diametrului de inhibiție al unei cefalosporine de generația a 3-a, precedată de aplicarea unui disc cu AMC, comparativ cu un alt disc al aceleiași cefalosporine, atunci când sunt plasate unul lângă celălalt, pe o placă cu agar Mueller-Hinton. După însămânțare, se plasează pe placă un disc cu AMC și unul cu o cefalosporină de

generația a 3-a (de exemplu CTX), la o distanță suficient de mare pentru a nu interfera, ca la testul de sinergie. Se lasă placa la temperatura ambiantă din laborator timp de o oră, după care discul cu AMC va fi înlocuit cu cel de cefalosporină, aceeași cu cea vecină pe placă (tot CTX). Se incubează 18 ore la 37°C. Testul este pozitiv dacă diametrul zonei de inhibiție al discului cu cefalosporină de generația a 3-a este inferior cu 4-5 mm celui al zonei de inhibiție al aceleiași cefalosporine precedate de AMC (vezi Figura 2e).

În urma analizării antibiogramelor coroborat cu datele testelor suplimentare s-a concluzionat:

- Izolatul B1 a prezentat următoarele fenotipuri de rezistență asociate: fenotip secretor de betalactamaze cu spectru extins (BLSE) + fenotip de rezistență la Kanamicină, Tobramicină, Gentamicină (KTG) + fenotip de rezistență încrucișată la toate fluoroquinolonele;
- Izolatul B2: fenotip secretor de betalactamaze cu spectru extins (BLSE) +

fenotip de rezistență la toate aminoglicozidele (KTGANT) + fenotip sensibil la fluoroquinolone.

Așadar, din același produs patologic s-au izolat două morfotipuri coloniale, cu două biotipuri chimice și cu pattern-uri de rezistență diferite ale aceleiași specii bacteriene^{9,14}. De asemenea, izolatele B1 și B2 au fost diferite de izolatele A1 și A2.

Cazul III

Pacient în vârstă de 25 de ani (pacientul C), a fost internat în secția de Anestezie și Terapie Intensivă în data de 5.09.2005, cu diagnosticul politraumatism prin accident rutier. Pacientul este supus unor intervenții chirurgicale succesive abdominale pentru rezolvarea unui hemoperitoneu cu origine splenică și toracale pentru rezolvarea unui pneumotorax.

În data de 14.09.2005 se prelevează secreția plăgii postoperatorii și un set de hemoculturi, în context febril (39,9°C). Se realizează un frotiu colorat Gram direct din produsul patologic, care evidențiază numeroși bacili Gram-negativi (7-8 /câmp microscopic, la o mărire de 1000 X) și prezența granulocitelor. Menționăm că o singură bacterie observată pe frotiu semnifică prezența a cel puțin 10⁵ UFC / g de țesut². Secreția plăgii se însămânțează pe mediul geloză-sânge, Chapmann, MacConkey și bulion nutritiv. Se incubează 24 de ore la 37°C. A doua zi se examinează plăcile de cultură.

Pe mediul MacConkey au fost puse în evidență trei tipuri diferite de colonii:

- Izolatul C1: colonii mari, cu diametrul de 3-4 mm, lactozo-pozitive, foarte mucoase, confluențe, cu cameleonaj;
- Izolatul C2: colonii mari de 2-3 mm, lactozo-pozitive, mucoase, cu cameleonaj mai puțin evident la 24 de ore de incubare¹¹;
- Izolatul C3: colonii mici, 1-2 mm, lactozo-negative (Figura 3).

Pe geloză-sânge:

- Izolatul C1: colonii mari, cu diametrul de 3 mm, gri-cenușii, lucioase, netede, bombate,

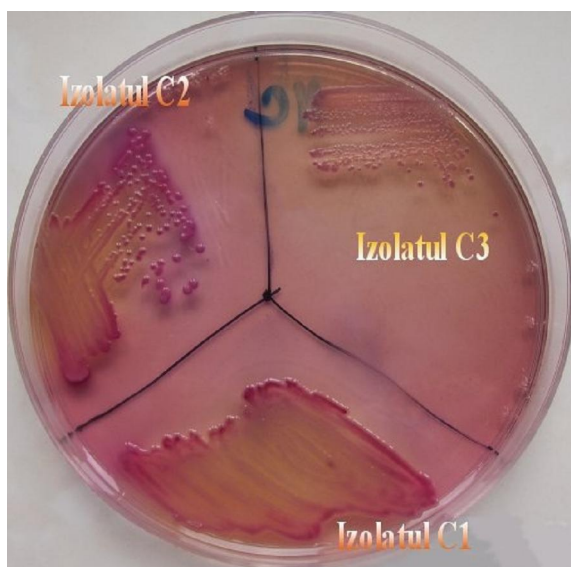


Figura 3. Aspectele culturale ale celor trei izolate C1, C2 și C3, după repicarea lor din cultura primară (colecție personală)



Fig. 4a.



Fig. 4b.



Fig. 4c.

Fig. 4a, 4b. Galerile API 10S ale celor două izolate C1 și C2 evidențiază o singură diferență a codului de identificare referitoare la prezența/absența ureazei; ambele coduri corespund aceleiași identificări *Klebsiella pneumoniae* ssp. *pneumoniae*. (colecție personală)

Fig. 4c. Galeria API 10S a izolatului C3 are codul 6000, căruia îi corespunde *Acinetobacter baumannii* (colecție personală)

foarte mucoase;

- Izolatul C2: colonii mari de 2 mm, alb-gri, mucoase;
- Izolatul C3: colonii mici, translucide.

- **Testul hipermucovâscozității (THV)**⁸ a fost pozitiv pentru ambele izolate lactozo-pozitive, mucoase: THV-C1 = 10 mm și

THV-C2 = 6 mm.

- Pentru **identificarea** izolatelor C1, C2 și C3 s-a folosit sistemul standardizat de identificare a enterobacteriilor API 10S¹³. Galerile au prezentat următoarele coduri și identificări corespunzătoare:

- pentru izolatul C1 - codul 7524: *Klebsiella pneumoniae* ssp. *pneumoniae*;
- pentru izolatul C2 - codul 7504: *Klebsiella pneumoniae* ssp. *pneumoniae*;
- pentru izolatul C3 - codul 6000: *Acinetobacter baumannii*;

După cum se observă, codurile pentru izolatele C1 și C2 se diferențiază printr-o singură cifră, corespunzătoare unui singur test biochimic referitor la prezența/absența ureazei. *Klebsiella pneumoniae* – izolatul C1 este ureazo-pozitiv, iar *Klebsiella pneumoniae* – izolatul C2 este ureazo-negativ. Figurile 4a, 4b și 4c ne arată cele trei galerii după incubarea la 37°C, timp de 24 de ore.

- Și în acest caz, s-a efectuat testarea sensibilității la chimioterapicele antiinfecțioase a ambelor izolate separat, prin metoda difuzimetrică standardizată Kirby-Bauer, în conformitate cu normele CLSI/NCCLS⁶. Antibioگرامele celor două izolate sunt prezentate în Tabelul nr. 3 și Figura 5.

Analiza antibiogramelor (cu ajutorul analizorului automat Osiris Evolution⁵) și a testelor de sinergie a izolatelor C1 și C2 ale *Klebsiella pneumoniae* a pus în evidență următoarele aspecte:

- Izolatul C1 a prezentat următoarele fenotipuri de rezistență asociate: fenotip secretor de betalactamaze cu spectru extins (BLSE) + fenotip de rezistență la Kanamicină, Tobramicină, Gentamicină (KTG) + fenotip de rezistență încrucișată la toate fluoroquinolonele;
- Izolatul C2: fenotip secretor de betalactamaze cu spectru extins (BLSE) + fenotip de rezistență la Kanamicină, Tobramicină, Gentamicină (KTG) + fenotip sensibil la fluoroquinolone.

Și cazul III ne-a demonstrat coexistența a două populații bacteriene diferite din punct de vedere cultural, biochimic și fenotipic ale aceleiași subspecii bacteriene: *Klebsiella pneumoniae* ssp. *pneumoniae*.

Concluzii

1. Izolatele A1 și A2 au fost diferite de izolatele B1 și B2 și respectiv C1 și C2. Cei trei pacienți au prezentat infecții nosocomiale cu asocieri diferite de tulpini ale *Klebsiella pneumoniae* ssp. *pneumoniae*, fiecare asociere având un comportament dual.

2. Termenul de „cameleonaj” referitor la caracterele culturale ale tulpinilor de *Klebsiella pneumoniae*, unde a fost descris pentru prima dată, ar putea fi extins la caracterele biochimice și la exprimarea pattern-urilor de rezistență ale subpopulațiilor aceleiași specii bacteriene.

3. Acest fenomen poate masca coabitarea a două subpopulații bacteriene aparținând aceleiași specii, în cazul unor subinvestigări sau erori în procedurile etapelor diagnosticului bacteriologic. Rezultatul final este un diagnostic bacteriologic eronat sau incomplet care va atrage eșecul terapeutic.

4. Indiferent de localizarea infecției și deci a situsului de prelevare a materialului biologic,

Tabel nr. 3. Testarea sensibilității la chimioterapicele antiinfecțioase a izolatelor C1 și respectiv C2 prin metoda difuzimetrică standardizată Kirby-Bauer

CHIMIOTERAPICE ANTIINFECȚIOASE	IZOLATUL C1			IZOLATUL C2		
	S	I	R	S	I	R
AMPICILINĂ			X			X
TICARCILINĂ			X			X
CEFALOTIN			X			X
CEFOXITIN			X=8		X=16→	→X
CEFOTAXIM			X=6			X=6
AMOXICILINĂ + ACID CLAVULANIC		X=15			X=14	
CEFTAZIDIM			X=6			X=6
CEFUROXIM			X			X
IMIPENEM	X			X		
GENTAMICINĂ			X			X
TOBRAMICINĂ			X			X
AMIKACINĂ	X			X		
NITROFURANTOIN			X			X
TRIMETHOPRIM / SULFAMETHOXAZOL	X					X
NORFLOXACIN			X	X		
CIPROFLOXACIN			X	X		
FENOTIPURI ASOCIATE	-Secretor de betalactamaze cu spectru extins (BLSE) -Rezistență la aminoglicozide (KTG) -Rezistență încrucișată la toate fluoroquinolonele			-Secretor de betalactamaze cu spectru extins (BLSE) -Rezistență la aminoglicozidele (KTG) -Sensibil la fluoroquinolone		

Klebsiella pneumoniae poate da naștere la două subpopulații independente, care se manifestă pe rând sau concomitent, spontan sau indus de factori externi.

5. Toate cele trei cazuri prezentate constituie argumentul viu al necesității respectării riguroase a protocoalelor standardizate cu privire la etapele diagnosticului bacteriologic.

6. Asocierea în același produs patologic a celor două subpopulații bacteriene cu fenotipuri complementare față de principalele clase de antibiotice (betalactamine, aminoglicozide și fluoroquinolone) a redus dramatic posibilitățile terapeutice.

7. Tratamentul de elecție al celor trei cazuri a fost reprezentat de Imipenem/Cilastatin, singura „armă” disponibilă în situațiile de multirezistență asociată a fiecărui biopattern subpopulațional.

8. Rămâne de demonstrat dacă cele două subpopulații aparțin aceleiași clone bacteriene. De asemenea, trebuie elucidate mecanismele coexistenței în același produs patologic a două izolate cu pattern-uri de rezistență distincte ale aceleiași specii / clone bacteriene.

Lista abrevierilor utilizate în textul lucrării:

ICU – Intensive Care Unit
 PN – Pneumoniile nosocomiale
 INPO – Infecțiile nosocomiale postoperatorii
 MRSA – *Staphylococcus aureus* metilicilino-rezistent
 AVC – Accident Vascular Cerebral
 VAP – Pneumonie de ventilator
 THV – Testul hipermucovâscozității
 HV – Hipermucovâscozitatea
 CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute
 NCCLS – National Committee for Clinical Laboratory Standards
 PAZA – Fenotip secretor de penicilinază cu nivel crescut
 BLSE – Fenotip secretor de betalactamaze cu spectru extins
 KTGANt – Fenotip de rezistență la toate aminoglicozidele
 AMC – Augmentin = Amoxicilină + Acid clavulanic
 INO – Fermentarea /oxidarea inozitol
 TDA – Evidențierea triptofan-dezaminazei
 IND – Producerea de indol
 VP – Reacția Voges Proskauer (Producerea acetoiniei)
 GLU – Glucoză

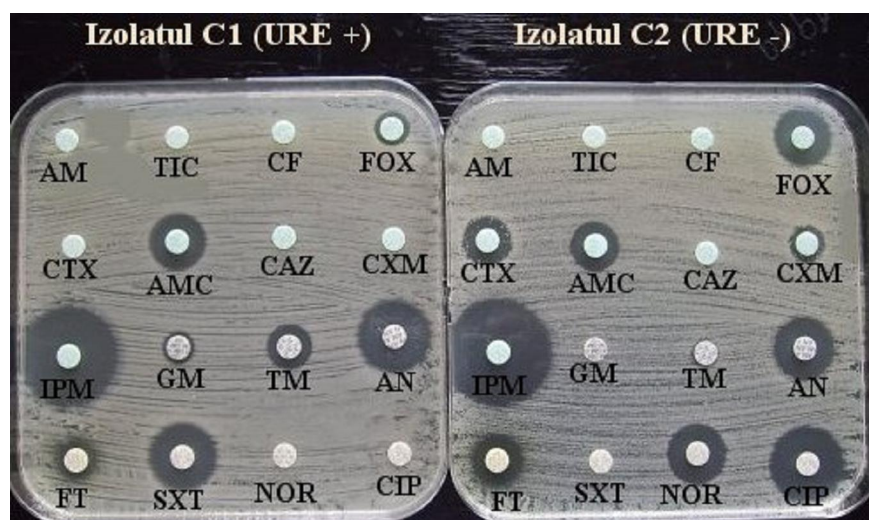


Fig. 5. Antibiogramele izolatelor C1 și C2 (colecție personală): AM – Ampicilină; TIC – Ticarcilină; CF – Cefalotin; FOX – Cefoxitin; CTX – Cefotaxim; AMC – Amoxicilină + Acid clavulanic; CAZ – Ceftazidim; CXM – Cefuroxim; IPM – Imipenem; GM – Gentamicină; TM – Tobramicină; AN – Amikacină; FT – Nitrofurantoin; SXT – Trimethoprim/Sulfamethoxazol; NOR – Norfloxacin; CIP – Ciprofloxacin.

NIT1 și NIT2 – reactivi utilizați pentru evidențierea reducerii nitraților la nitriți

AM – Ampicilină

TIC – Ticarcilină

CF – Cefalotin

FOX – Cefoxitin

CTX – Cefotaxim

CAZ – Ceftazidim

CXM – Cefuroxim

IPM – Imipenem

GM – Gentamicină

TM – Tobramicină

AN – Amikacină

FT – Nitrofurantoină

SXT – Trimetoprim/Sulfametoxazol

NOR – Norfloxacin

CIP – Ciprofloxacin

CRO – Ceftriaxonă

ATM – Aztreonam

IBL – Inhibitori de betalactamază

ΔØ – Diferența diametrelor de inhibiție

Bibliografie

1. Abid F., Boutefnouchet N. – *Klebsiella pneumoniae* productrice de BLSE isolée dans les Hôpitaux de la ville de Annaba – Département de biologie, faculté des sciences, Université de Badji Mokhtar Annaba, 2002.
2. Buiuc D. – Examenul microbiologic al puroiului – Buiuc D., Coman G., Neguț M. – Microbiologie clinică – vol. I, Editura Didactică și Pedagogică, R.A. București, 1998: 207-211.
3. Buiuc D. – Metode speciale de testare a sensibilității unor bacterii. Fenotipuri de rezistență – Buiuc D., Coman G., Neguț M. – Microbiologie clinică – vol. I, Editura Didactică și Pedagogică, R.A. București, 1998: 493-498.
4. Buiuc D., Diagnosticul de laborator al infecțiilor tractusului respirator inferior, Buiuc D., Coman G., Neguț M., Microbiologie clinică, vol. I, Editura Didactică și Pedagogică, R.A. București, 1998: 247-256.
5. Cantón R., Sánchez MA., Loncle-Provot V., et al. – Validation of the Extended Expert System of the Osiris® Video reader to detect susceptibility phenotypes – BioRad, Marnes la Coquette, France, 2005.
6. CLSI/NCCLS document M100-S15 – *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*; Fifteenth Informational Supplement, 2005, Volume 25, Number 1: 34-39.
7. CLSI/NCCLS document M2-A8 – *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests*. Approved Standard – Eight Edition, 2003.
8. Fang CT., Chuang YP., Shun CT., et al. – A Novel Virulence Gene in *Klebsiella pneumoniae* Strains Causing Primary Liver Abscess and Septic Metastatic Complications – JEM, 2004, Volume 199, Number 5: 697-705.
9. Hsueh PR., Wu JJ., Teng LJ., et al. – Primary Liver Abscess Caused by One Clone of *Klebsiella pneumoniae* with Two Colonial Morphotypes and Resistotypes – EID, CDC, 2002, Vol. 8, No. 1.
10. Licker M. – Importanța detectării fenotipurilor de rezistență la antibiotice a germenilor cu potențial nosocomial – Licker M., Moldovan R., Crăciunescu M., et al. – Rezistența la antibiotice, istorie și actualitate – Editura Eurostampa, Timișoara, 2002: 89-100.
11. Moldovan R. – Genul *Klebsiella* – Moldovan R., Licker M., Dan L., et al. – Curs de Microbiologie Medicală – vol. II, Litografia UMF Timișoara, 2005: 92-93.
12. Phillips S. B., Amsterdam D. – API Computer Profiles: Correlation of API 20E with API 10S – J. Clin. Microbiol., 1977. 6, 6, 645-646.
13. Robertson E. A., MacLowry J. D. – Construction of an interpretative Pattern Directory for the API 10 S Kit and Analysis of its Diagnostic Accuracy – J. Clin. Microbiol., 1975. 1, 6: 515-520.
14. Wang JH, Liu YC, Lee SSJ, et al. – Primary Liver Abscess due to *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan – Clin Infect Dis., 1998;26:1434-8.