

Αλγόριθμοι για την ταυτοποίηση των αερόβιων Gram-θετικών κόκκων

Μαρία Ορφανίδου
Βιοπαθολόγος
Επιμελήτρια Β΄

Μικροβιολογικό εργαστήριο Γ.Ν.Α. «Γ. Γεννηματάς»



ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΩΝ ΜΑΘΗΜΑΤΩΝ
ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΕΤΑΙΡΕΙΑΣ
2009 – 2011

Ταυτοποίηση των βακτηρίων

Ο προσδιορισμός ενός ελάχιστου αριθμού ιδιοτήτων, ώστε να τοποθετήσουμε μια άγνωστη καλλιέργεια στην κατάλληλη θέση του συστήματος ταξινόμησης και να την αναγνωρίσουμε

Ταυτοποίηση των βακτηρίων

3 ομάδες ιδιοτήτων:

Μορφολογικά χαρακτηριστικά

- Gram χρώση [Gram (-), Gram (+)]
- Μορφή (κόκκος, ραβδίο, σπείρα)
- Μέγεθος
- Διάταξη
- Έλυτρο (ναι, όχι)
- Σπόροι

Ταυτοποίηση των βακτηρίων

3 ομάδες ιδιοτήτων:

Μορφολογικά χαρακτηριστικά

- Gram χρώση
- Μορφή (κόκκοι)
- Μέγεθος
- Διάταξη
- Έλυτρο (ναί)
- Σπόροι

Φυσιολογικά χαρακτηριστικά

- Αφορούν παραγωγή ενζύμων
- Διαπιστώνονται με διαφοροποιητικά υλικά (μεταβολή της τιμής του pH → αλλαγή χρώματος)
- Έτοιμα ταυτοποιητικά συστήματα εμπορίου

Ταυτοποίηση των βακτηρίων

3 ομάδες ιδιοτήτων:

Μορφολογικά χαρακτηριστικά

- Gram χρώση
- Μορφή (κόκκοι)
- Μέγεθος
- Διάταξη
- Έλυτρο (ναί)
- Σπόροι

Φυσιολογικά χαρακτηριστικά

- Αφορο
- Διαπι
- (μεταβ
- χρώμα
- Έτοιμ

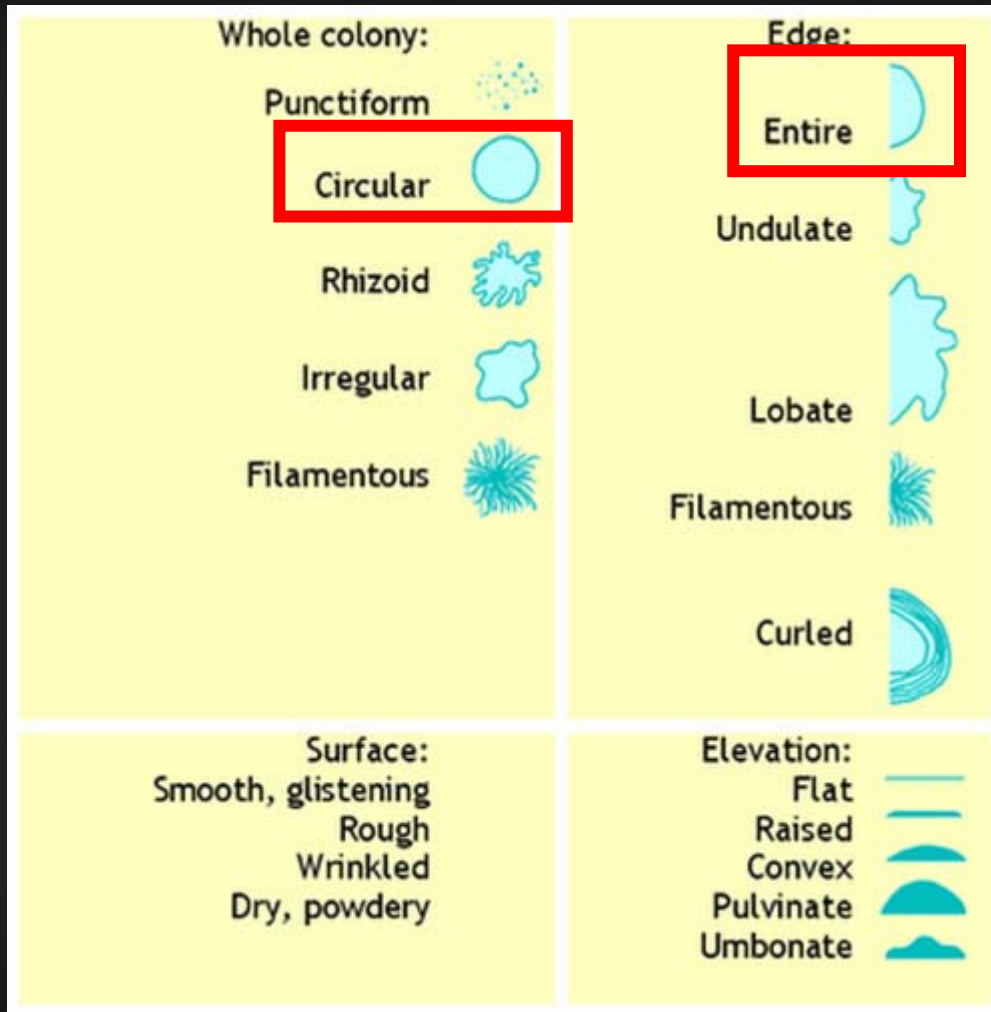
Χημικά χαρακτηριστικά

- Δομή του DNA
- Δομή της μουρεΐνης του κυτταρικού τοιχώματος
- Δομή των αντιγόνων → ανιχνεύονται με αντισώματα (π.χ. πολυσακχαρίτες του κυτταρικού τοιχώματος ή της κάψας)

**Αλγόριθμοι για την ταυτοποίηση
των αερόβιων Gram-θετικών
κόκκων**

ΒΗΜΑ 1: Μορφολογία αποικιών

Μορφολογία αποικιών



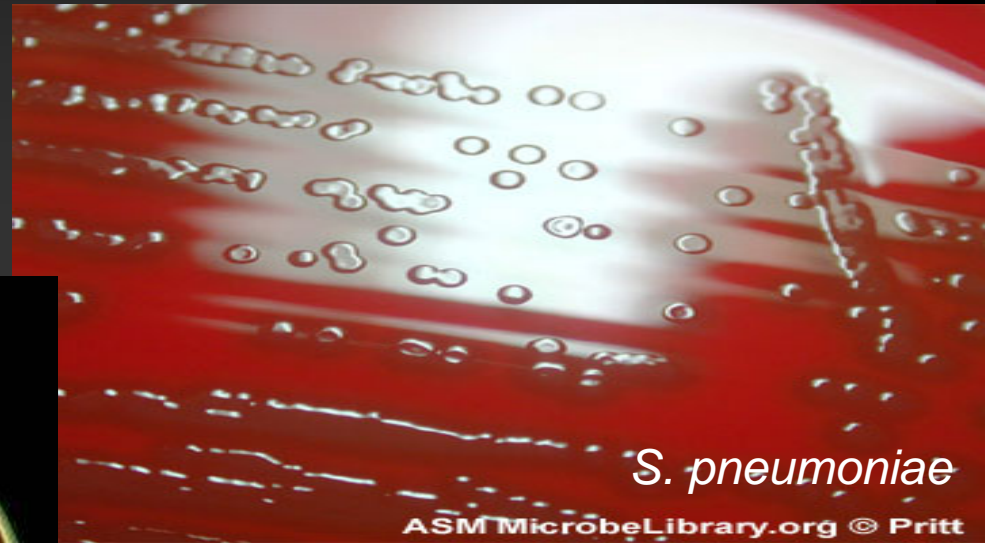
Μορφολογία αποικιών

Μικρόβια	Αιματούχο άγαρ	MacConkey No2 άγαρ
<i>Staphylococcus aureus</i>	Μεγάλες, χρυσές, β-αιμολυτικές	Μεγάλες, χρυσές
CNS	Μεγάλες, άσπρες	Μεγάλες, ροζ
<i>Streptococci viridans</i>	Μικρές, α-αιμολυτικές (πράσινη αιμόλυση)	Δεν αναπτύσσονται
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Μικρές, β-αιμολυτικές (διαυγής κυκλική ζώνη αιμόλυσης)	Δεν αναπτύσσονται
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Μικρές, με κεντρική κοίλανση, α-αιμολυτικές	Δεν αναπτύσσονται
<i>Enterococci</i>	Μικρές, μερικές β-αιμολυτικές	Μικρές, μπορντώ

S. pyogenes

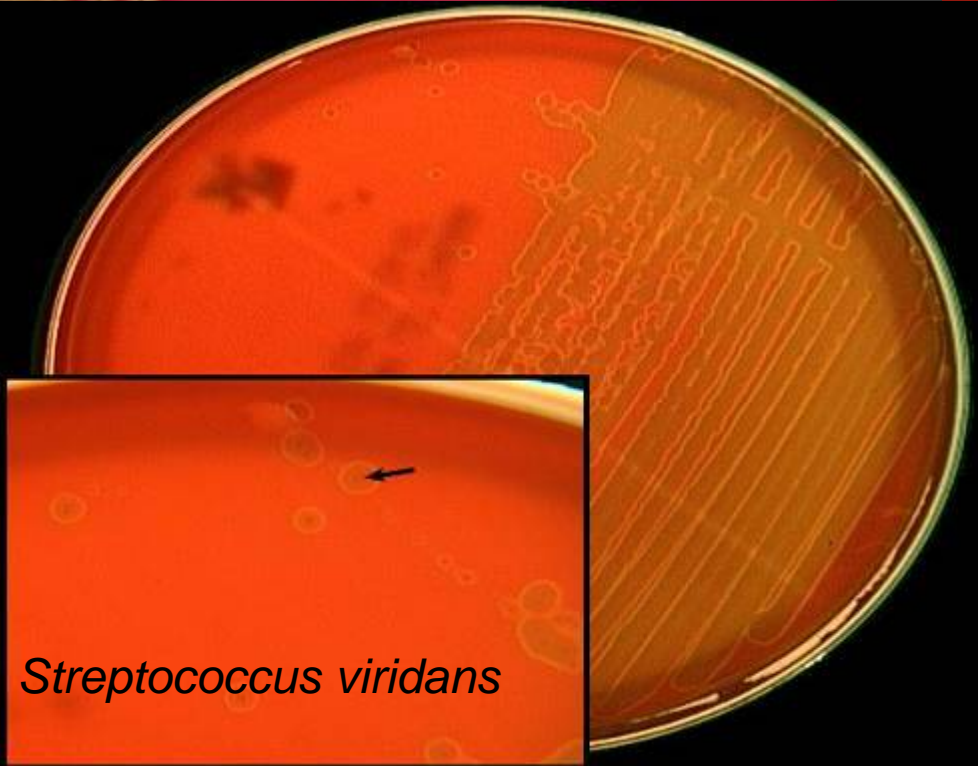


S. pneumoniae



S. pneumoniae

ASM MicrobeLibrary.org © Pritt



Streptococcus viridans

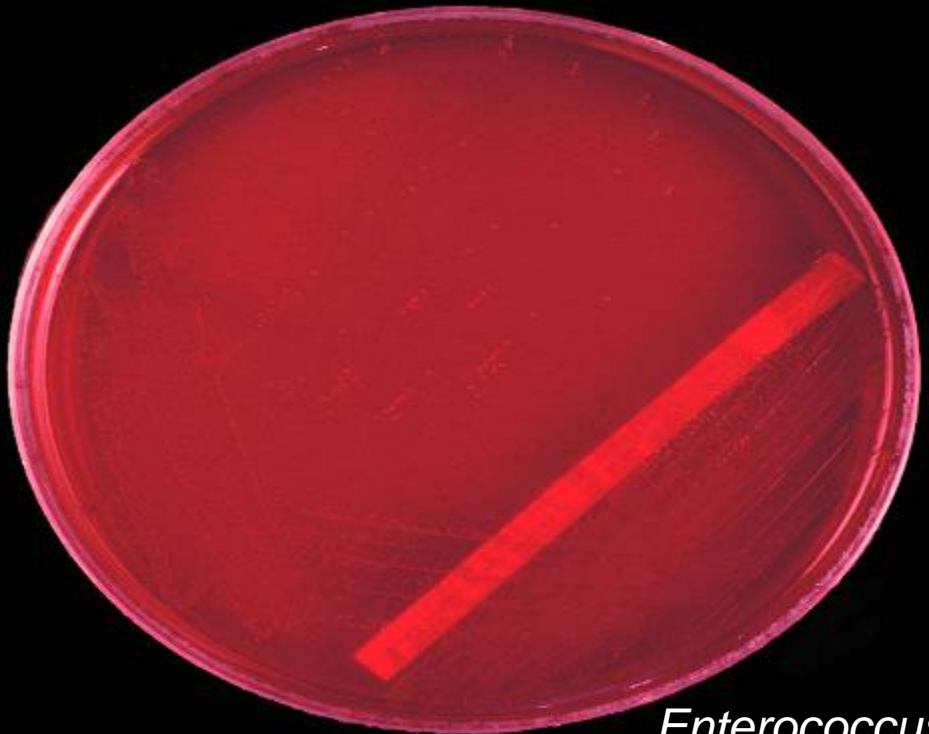


S. aureus



S. epidermidis

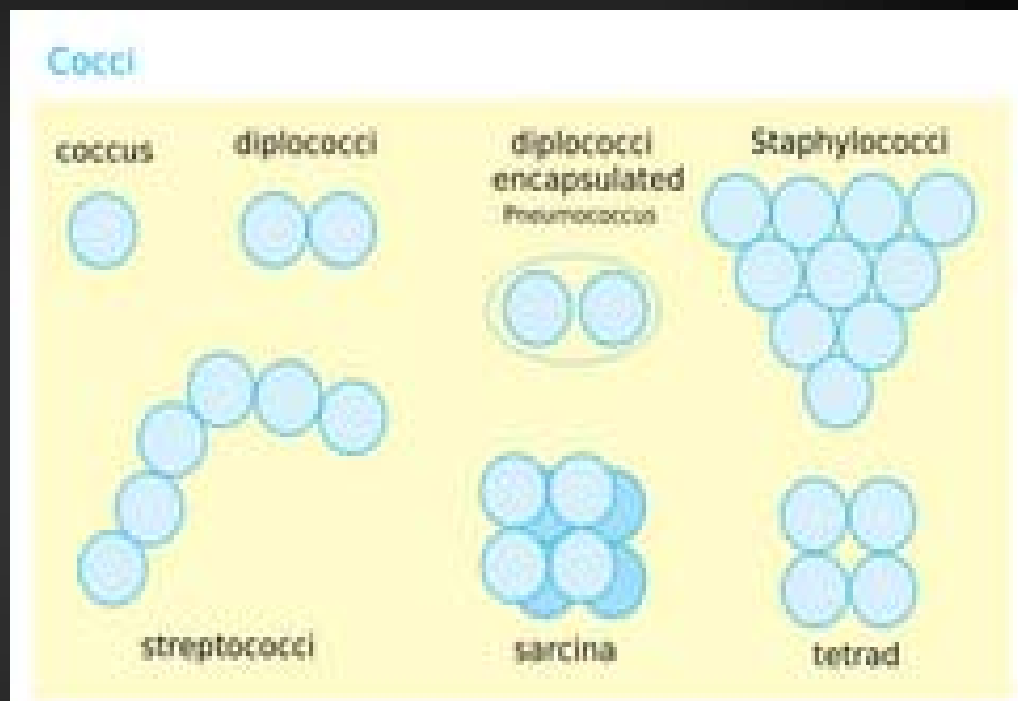
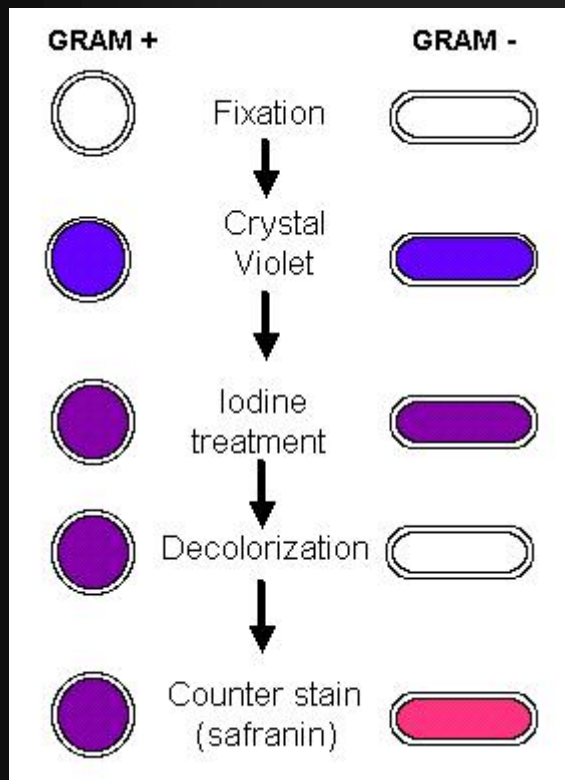
Micrococcus

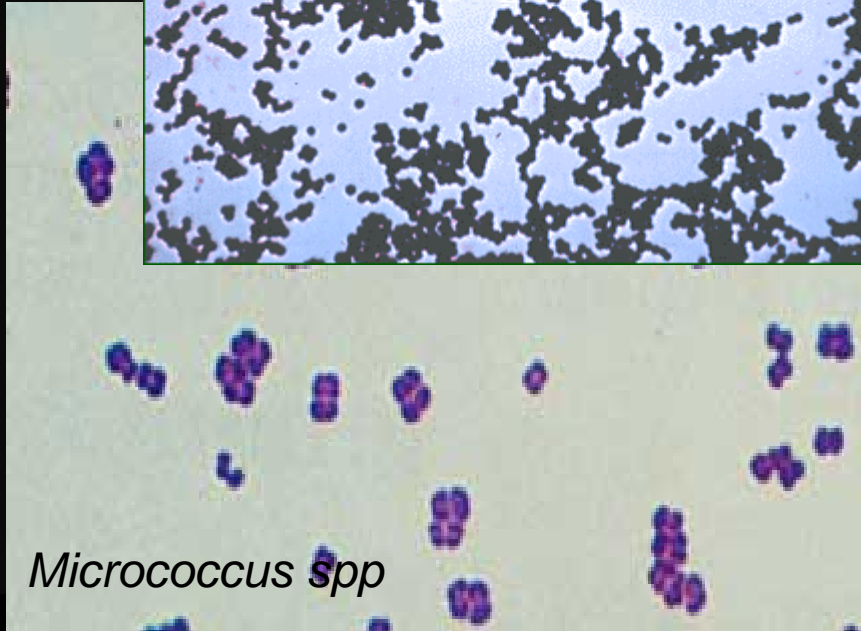
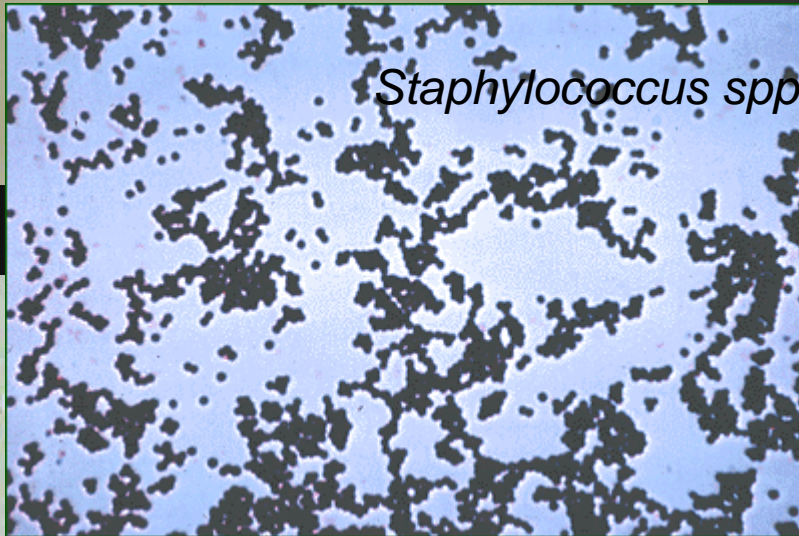
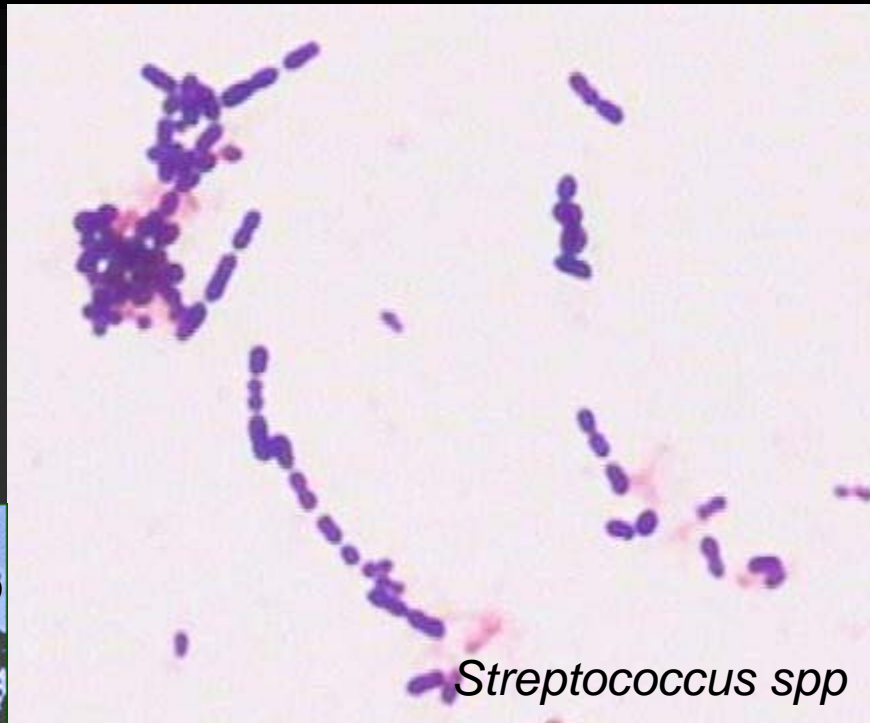
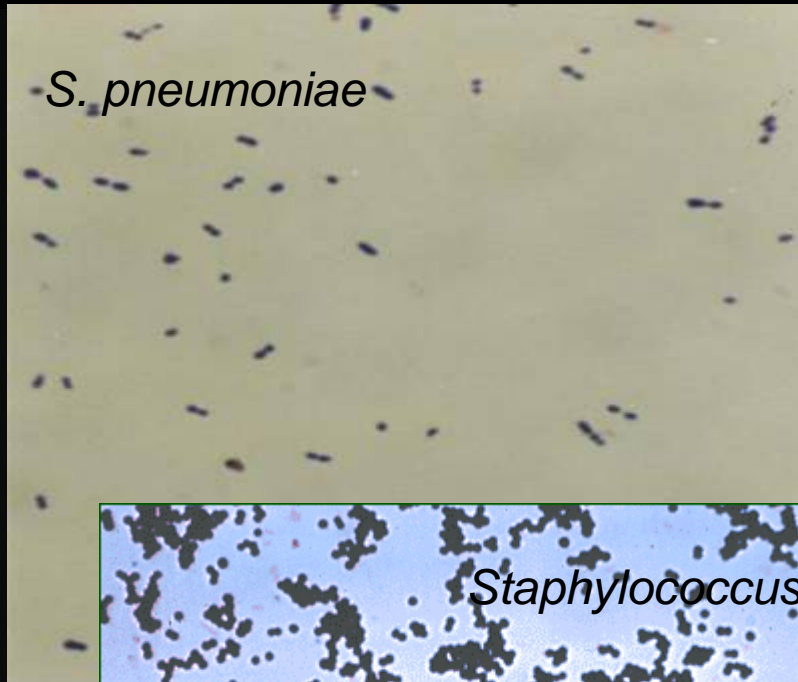


Enterococcus

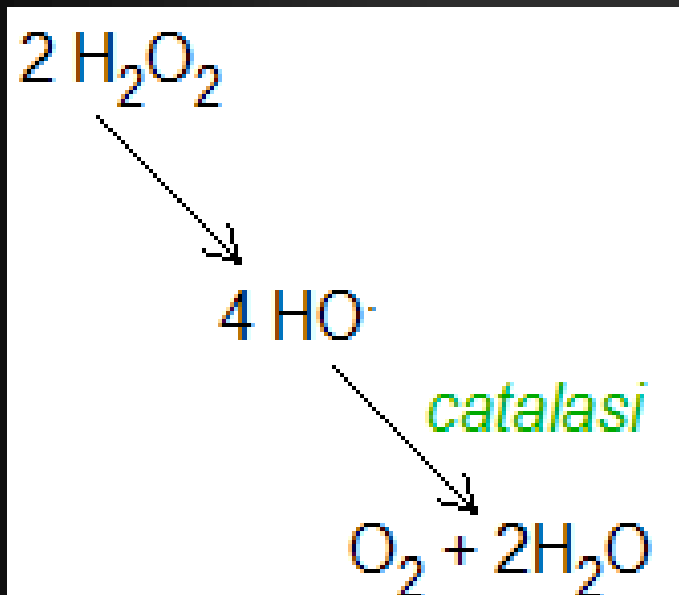
ΒΗΜΑ 2: Gram χρώση

Gram χρώση

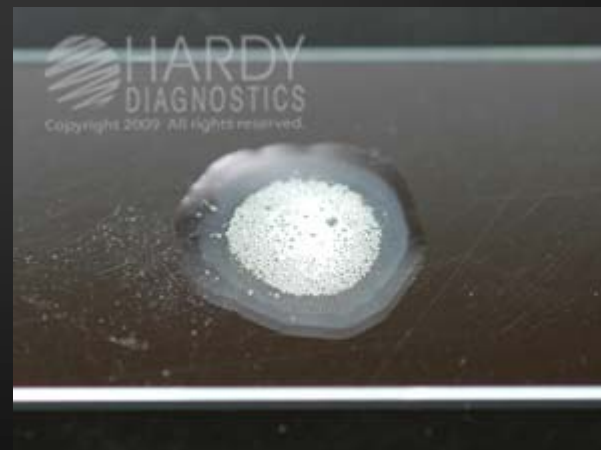




ΚΑΤΑΛΑΣΗ



-



+

ΚΑΤΑΛΑΣΗ



Staphylococcus

Micrococcus

[Rothia (Stomatococcus)]

Alloicoccus

Streptococcus

Enterococcus

Aerococcus

Gemella

Pediococcus

Leuconostoc

Lactococcus

Καταλάση (+)

Ανάπτυξη σε NaCl 6,5%

ναι

όχι

Bacitracin 0,04 U

Rothia

Furazolidone 100μg

E

A

A

E

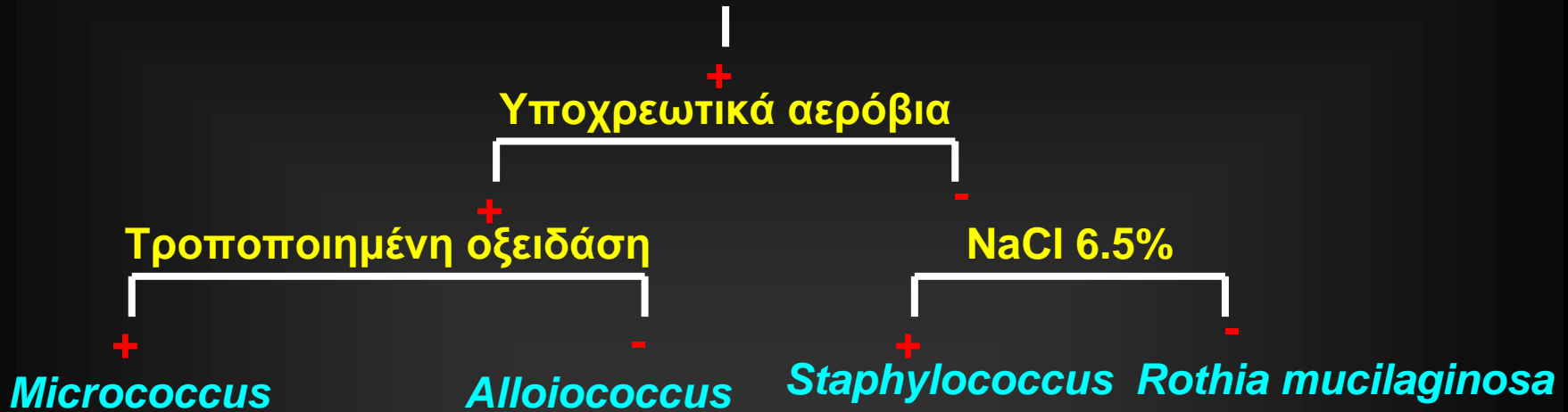
Micrococcus

Staphylococcus

Micrococcus

Staphylococcus

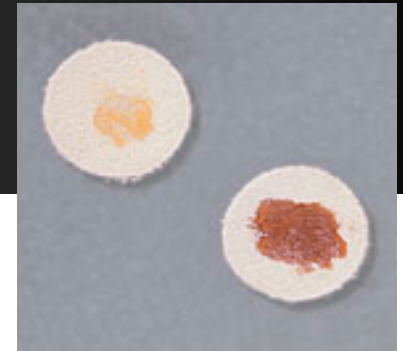
ΚΑΤΑΛΑΣΗ



Τροποποιημένη οξειδάση:

Διαθέσιμη στο εμπόριο (Remel, Microdase Test Disk)

Δίσκοι από διηθητικό χαρτί, εμποτισμένοι με αντιδραστήριο οξειδάσης (tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride) σε DMSO (dimethyl sulfoxide)



Mannitol άγαρ

Εκλεκτικό υλικό με μαννιτόλη – NaCl 6.5% - ερυθρό της φαινόλης

Ζύμωση της μαννιτόλης



S. aureus

Όχι ζύμωση της μαννιτόλης



S. epidermidis

Κοαγκουλάση (Coagulase)

Είναι μία πρωτεΐνη που βοηθά στη μετατροπή του ινωδογόνου σε ινώδες
Χρησιμοποιείται για τη διαφοροδιάγνωση του *S. aureus* από τους CNS

Δύο μορφές:

(α) **Συνδεδεμένη** (clumping factor) με το κυτταρικό τοίχωμα

(β) **Ελεύθερη**

Μέθοδοι ελέγχου της κοαγκουλάσης

(α) **Δοκιμασία σε σωληνάριο** ► ελεύθερη κοαγκουλάση

(β) **Δοκιμασία επί πλακός** ► συνδεδεμένη κοαγκουλάση

(γ) **Συγκολλητινοαντίδραση σωματιδίων latex** ► πρωτεΐνη A *S. aureus*

Κοαγκουλάση (Coagulase)

Είναι μία πρωτεΐνη που βοηθά στη μετατροπή του ινωδογόνου σε ινώδες
Χρησιμοποιείται για τη διαφοροδιάγνωση του *S. aureus* από τους CNS

Δύο μορφές:

(α) Συνδεδεμένη (clumping factor)

(β) Ελεύθερη

Μέθοδοι ελέγχου της κοαγκουλάσης

(α) Δοκιμασία σε σωληνάριο ► ελεύθερη κοαγκουλάση

(β) Δοκιμασία επί πλακός ► συνδεδεμένη κοαγκουλάση

(γ) Συγκολλητινοαντίδραση σωματιδίων latex ► πρωτεΐνη A *S. aureus*

- Πλάσμα να προέρχεται από σωληνάριο με EDTA
- Κιτρικούχο αντιπηκτικό δεν πρέπει να χρησιμοποιείται
- Οργανισμοί που χρησιμοποιούν τα κιτρικά, και έχουν λανθασμένα θεωρηθεί ως σταφυλόκοκκοι, μπορεί να δώσουν + αντίδραση (εντερόκοκκοι)

Κοαγκουλάση

Είδος	Δοκιμασία σε σωληνάριο	Δοκιμασία επί πλακός
<i>S. aureus</i>	+	+
<i>S. schleiferi ssp coagulans</i>	+	-
<i>S. schleiferi ssp schleiferi</i>	-	+
<i>S. lugdunensis</i>	-	(+)
<i>S. intermedius</i> *	+	d
<i>S. hyicus</i> *	d	+
<i>S. delphini</i> *	+	-

*: σπάνια σε κλινικά δείγματα, **d**: 11-89% των στελεχών θετικά, **(+)**: αργή θετική αντίδραση

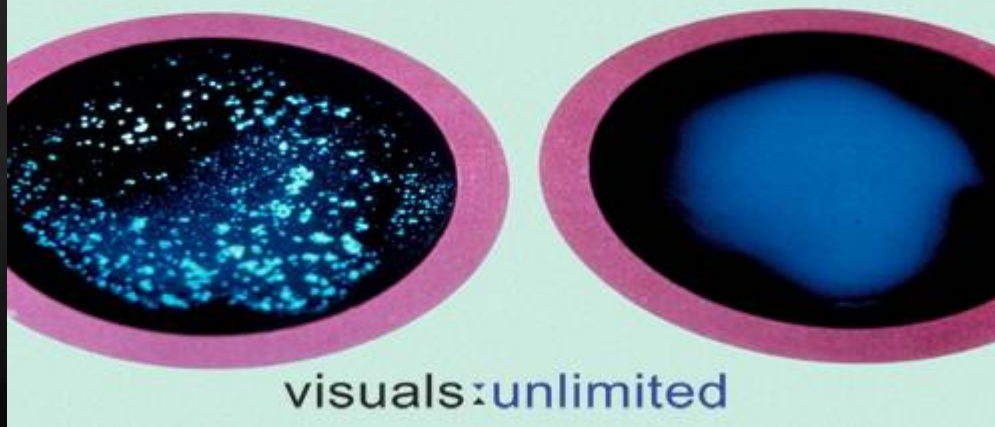
Κοαγκουλάση



Δοκιμασία επί πλακός



Συγκολλητινοαντίδραση σωματιδίων latex



Δοκιμασία δεοξυριβονουκλεάσης (DNASE)

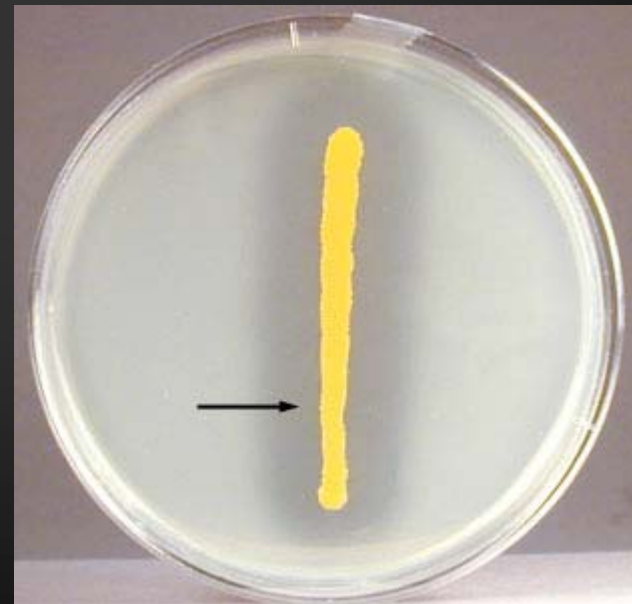
- Ένζυμο που παράγεται από τον *S. aureus* και υδρολύει το DNA

(-)



S. epidermidis

(+)



S. aureus

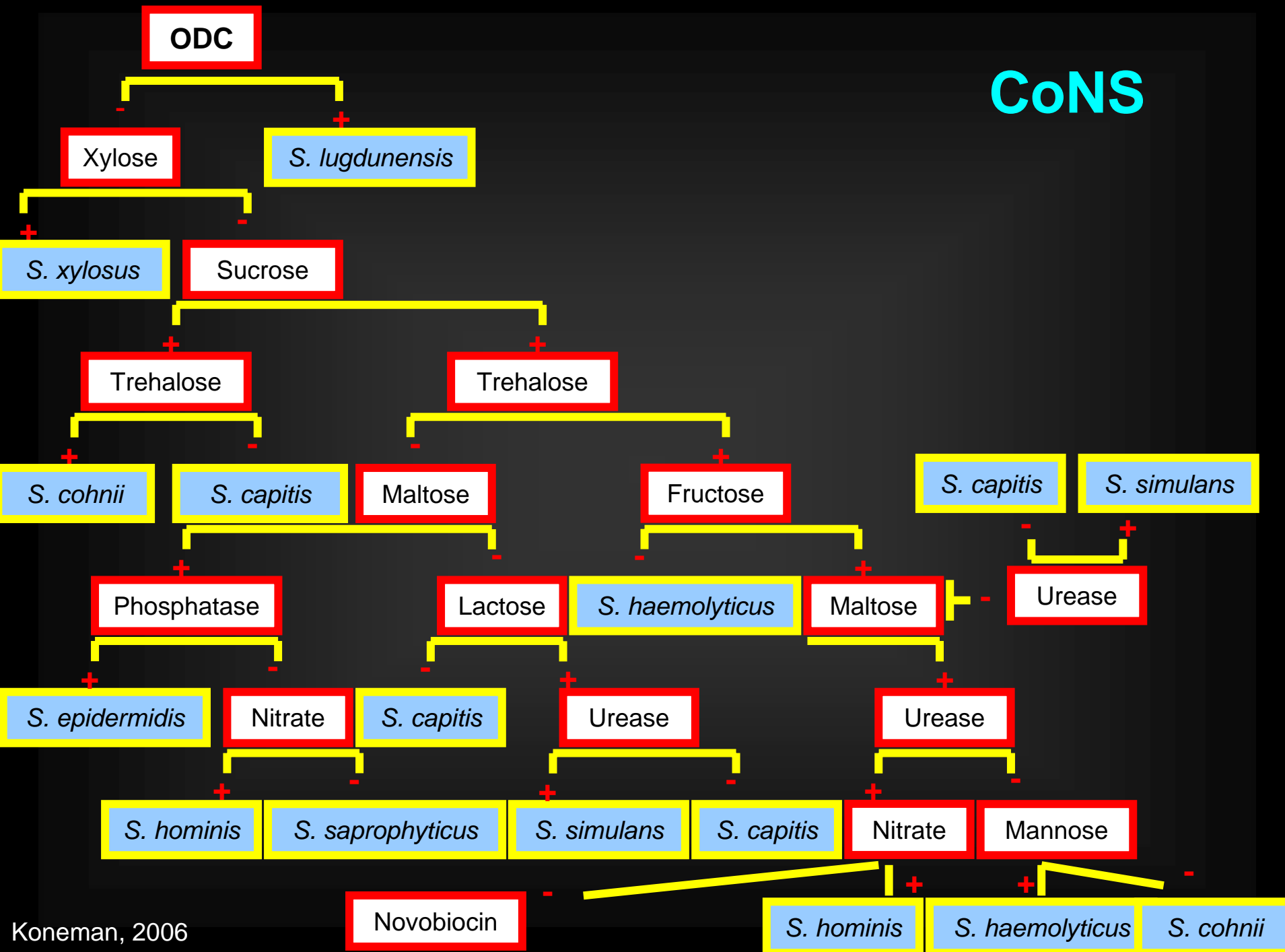
Είδος

Novobiocin

Polymyxin

<i>S. aureus</i>	E	A
<i>S. epidermidis</i>	E	A
<i>S. saprophyticus</i>	A	E
<i>S. haemolyticus</i>	E	E
<i>S. warneri</i>	E	E
<i>S. hominis</i> ssp <i>hominis</i>	E	E
<i>S. hominis</i> ssp <i>novobiosepticus</i>	A	NA
<i>S. lugdunensis</i>	E	E/A
<i>S. schleiferi</i>	E	E
<i>S. cohnii</i>	A	E
<i>S. intermedius</i>	E	E
<i>S. sciuri</i>	A	E

CoNS



Συμπερασματικά για την ταυτοποίηση των Staphylococci

Κλινικό δείγμα

Αρχική απομόνωση σε θρεπτικά υλικά

Ματ, κρεμώδεις, άσπρες, κίτρινες ή πορτοκαλί αποικίες σε αιματούχο άγαρ

Gram χρώση: gram (+) κόκκοι

Καταλάση

Αρνητική: άλλα βακτήρια

Θετική

Θετική:
Micrococcus spp

Τροποποιημένη οξειδάση

Αρνητική:
Staphylococcus spp

Clumping factor, DNase

Κογκουλάση σε σωληνάριο:
Αρνητική ► πιθανόν **CoNS**

Αρνητική

Θετική

Κογκουλάση σε σωληνάριο:
θετική ► πιθανόν **S. aureus**

ΚΑΤΑΛΑΣΗ



Staphylococcus

Micrococcus

[Rothia (Stomatococcus)]

Alloicoccus

Streptococcus

Enterococcus

Aerococcus

Gemella

Pediococcus

Leuconostoc

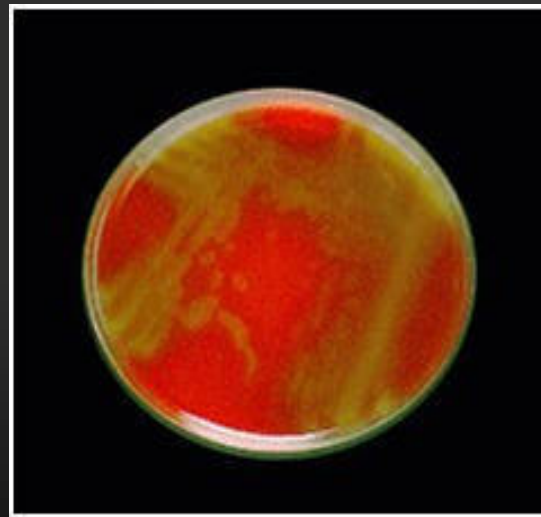
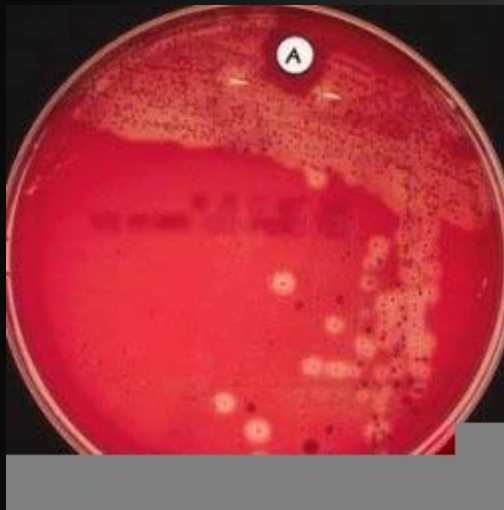
Lactococcus

Αιμόλυση σε αιματούχο άγαρ

β-αιμόλυση ▶ πλήρης ▶ *S. pyogenes*

α-αιμόλυση ▶ μερική ▶ *Streptococcus viridans*

γ-αιμόλυση ▶ απουσία αιμόλυσης ▶ *Enterococcus spp*



Αιμόλυση σε αιματούχο άγαρ

β-αιμόλυση ▶ πλήρης ▶ *S. pyogenes*

α-αιμόλυση ▶ μερική ▶ *Streptococcus viridans*

γ-αιμόλυση ▶ απουσία αιμόλυσης ▶ *Enterococcus spp*



Καταλάση (-)

Μορφολογία στη Gram χρώση

Σε αλυσίδες

Streptococcus

Enterococcus

Abiotrophia

Granulicatella

Leuconostoc

Weisella

Vagococcus

Globicatella

Dolosicoccus

Eremococcus

Lactococcus

Σε τετράδες/ομάδες

Aerococcus

Helcococcus

Pediococcus

Tetragenococcus

[*Gemella*]

Dolosigranulum

Διπλόκοκκοι/ λογχοειδείς

S. pneumoniae

Μορφολογία αποικιών

Μικρόβια	Αιματούχο άγαρ	MacConkey No2 άγαρ
<i>Staphylococcus aureus</i>	Μεγάλες, χρυσές, β-αιμολυτικές	Μεγάλες, χρυσές
CNS	Μεγάλες, άσπρες	Μεγάλες, ροζ
<i>Streptococci viridans</i>	Μικρές, α-αιμολυτικές (πράσινη αιμόλυση)	Δεν αναπτύσσονται
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Μικρές, β-αιμολυτικές (διαυγής κυκλική ζώνη αιμόλυσης)	Δεν αναπτύσσονται
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Μικρές, με κεντρική κοίλανση, α-αιμολυτικές	Δεν αναπτύσσονται
<i>Enterococci</i>	Μικρές, μερικές β-αιμολυτικές	Μικρές, μπορντώ

Gram: σε τετράδες/ομάδες

Είδος	Αιμόλυση	PYR	Vanco	NaCl 6.5%	10°C	45°C
<i>Aerococcus</i>	α	V	E	+	-	-
<i>Pediococcus</i>	α	-	A	V	-	+
<i>Gemella</i>	α, γ	+	E	-	-	-

Gram: σε αλυσίδες

Είδος	Αιμόλυση	PYR	Vanco	NaCl 6.5%	10°C	45°C
<i>Streptococcus</i>	α, β, γ	-	E	V	-	V
<i>Enterococcus</i>	α, γ	+	E/A	+	+	+
<i>Leuconostoc</i>	α, γ	-	A	V	+	+

Ταξινόμηση των *Streptococcus*

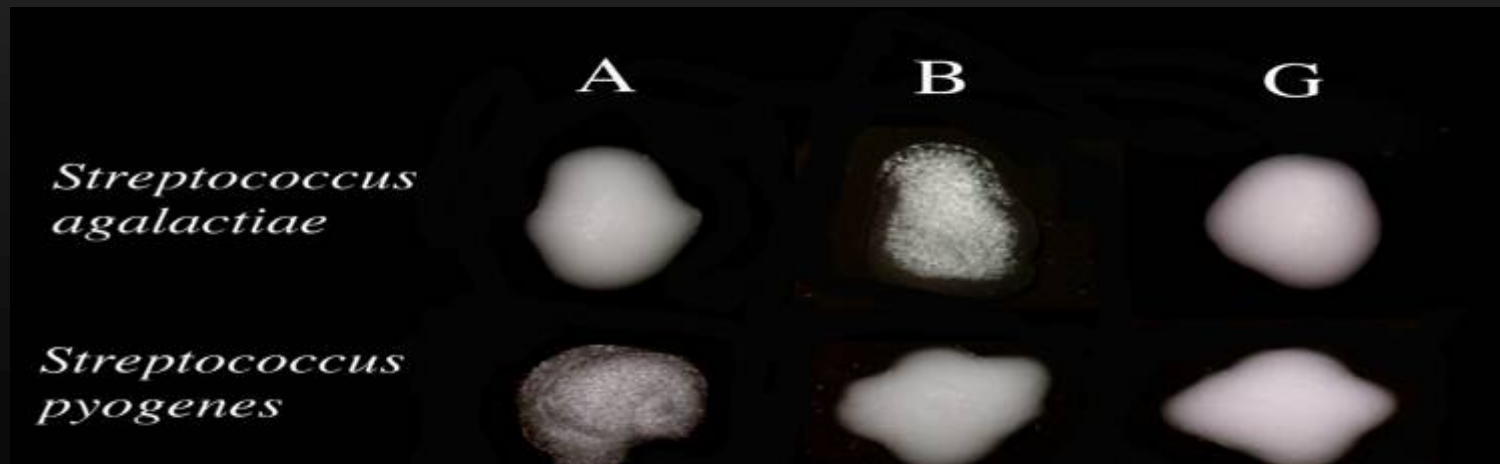
Διαχωρισμός κατά Lancefield σε ομάδες βάσει του πολυσακχαριδικού αντιγόνου ή του λιποτεichoϊκού οξέος του κυτταρικού τοιχώματος (A, B, C, D, F, G)

S. pyogenes ▶ β-αιμολυτικός ▶ ομάδα A

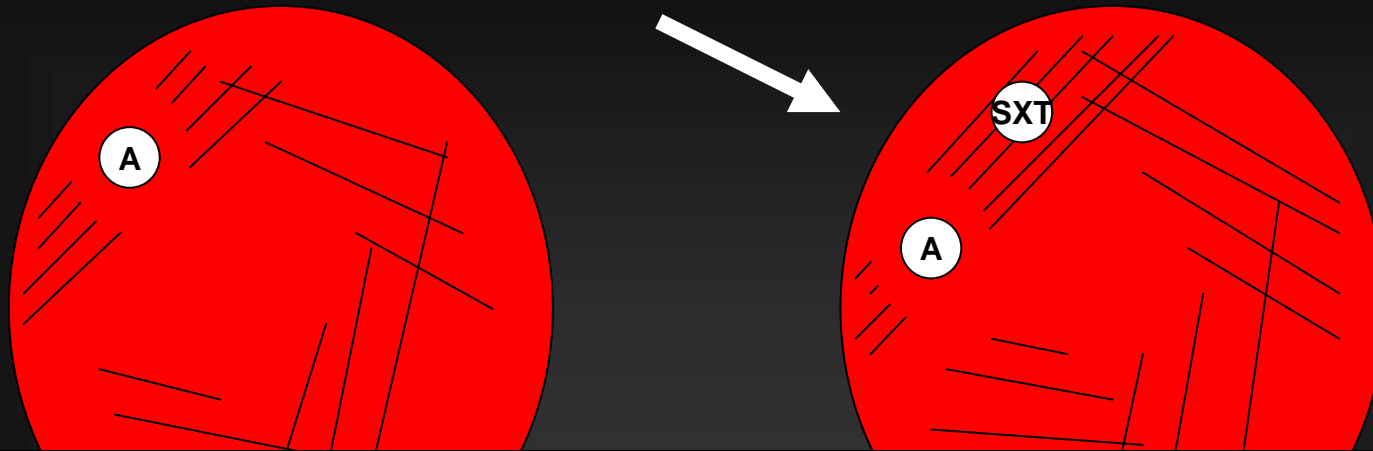
S. agalactiae ▶ β-αιμολυτικός ▶ ομάδα B

S. dysgalactiae ▶ α-αιμολυτικός ▶ ομάδα C

Enterococci & *S. bovis* ▶ ομάδα D



Streptococcus ομάδος A



- Οι στρεπτόκοκκοι ομάδος C & G είναι ευαίσθητοι στην Co-trimoxazole, ενώ οι στρεπτόκοκκοι ομάδος A & B είναι ανθεκτικοί
- Οποιαδήποτε ζώνη αναστολής γύρω από το δισκίο θεωρείται θετική

Ευαισθησία στη Bacitracin 0.04 U

- Οι β-αιμολυτικοί GAS είναι ευαίσθητοι στη Bacitracin 0.04 U
- Οποιαδήποτε ζώνη αναστολής γύρω από το δισκίο θεωρείται θετική
- ~10% των GCS & GGS και ~5% της GBS είναι ευαίσθητοι

Δοκιμασία CAMP (CAMP test)



- Ταυτοποίηση GBS
- Χρησιμοποιείται στέλεχος *S. aureus* που παράγει β-αιμολυσίνη
- Οι GBS παράγουν μία πρωτεΐνη (CAMP factor) που αντιδρά με την αιμολυσίνη του *S. aureus* ► διεύρυνση της ζώνης αιμόλυσης δίκην τόξου

Υδρόλυση ιππουρικού νατρίου



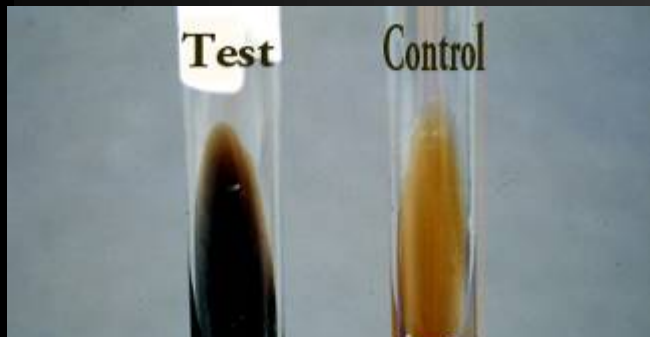
(+)

Streptococcus ομάδος Β

Δοκιμασία αμινοπεπτιδάσης της λευκίνης (LAP test)

(+): όλοι οι στρεπτόκοκκοι & εντερόκοκκοι

Δοκιμασία εσκουλίνης



(+)

Enterococcus

Streptococcus ομάδος D

Δοκιμασία πυρρολιδονυλ-αριλαμιδάσης (PYR test)

(+): στρεπτόκοκκοι ομάδος Α & εντερόκοκκοι

S. pneumoniae

Ευαισθησία στην Optochin (OPT)

Οι πνευμονιόκοκκοι είναι ευαίσθητοι στην OPT

Πρέπει να μετριέται η διάμετρος αναστολής

E: $\geq 14\text{mm}$

$< 14\text{mm}$ ► συμπληρωματικές εξετάσεις

Μερικοί πρασινίζοντες στρεπτόκοκκοι & αερόκοκκοι εμφανίζουν μικρή ζώνη αναστολής

Διαλυτότητα χολής

Το δεσοξυχολικό που χρησιμοποιείται ενεργοποιεί τα αυτολυτικά ένζυμα

(+): *S. pneumoniae*

S. pneumoniae

Ευαισθησία στην Optochin (OPT)

Οι πνευμονι

Πρέπει να μ

E: $\geq 14\text{mm}$

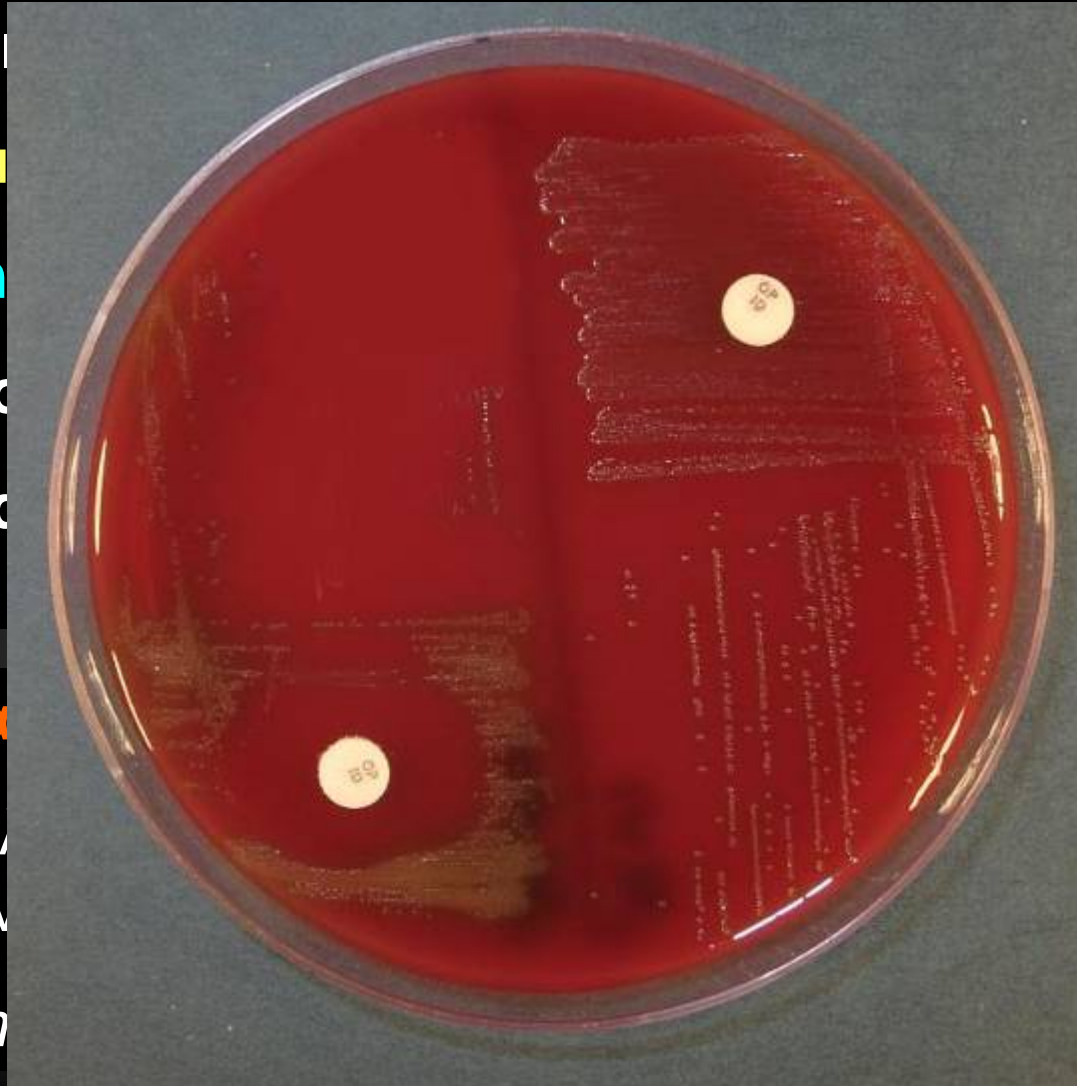
$< 14\text{mm}$ ►

Μερικοί προ
εμφανίζουν

Διαλυτότητα

Το δεσοξυχο
αυτολυτικά έν

(+): *S. pneum*



ΟΚΚΟΙ

τα

S. pneumoniae

Ευαισθησία στην

Οι πνευμονι

Πρέπει να μ

E: $\geq 14\text{mm}$

$< 14\text{mm}$ ►

Μερικοί προ
εμφανίζουν

Διαλυτότητα

Το δεσοξυχο
αυτολυτικά έν

(+): *S. pneum*



ΟΚΚΟΙ

τα

Φαινοτυπικά κριτήρια για την ταυτοποίηση των κλινικώς σημαντικών *Streptococci*

Είδος	Αιμόλυση	Bα	SXT	CAMP	HIP	LAP	PYR	ESC	NaCl 6.5%	OPT	Διαλυτότητα χολής
GAS	β	E	A	-	-	+	+	-	-	A	-
GBS	β, γ	A	A	+	+	+	-	-	V	A	-
GC-F-GS	β	V	E	-	-	+	-	-	-	A	-
Enterococci	α,β,γ	A	A	-	V	+	+	+	+	A	-
GDS	α, γ	A	E	-	-	+	-	+	-	A	-
Viridans	α, γ	V	E	-	V	+	-	V	-	A	-
Pneumococci	α	V	E	-	-	+	-	-	-	E	+

Φαινοτυπικά κριτήρια για την ταυτοποίηση των κλινικώς σημαντικών *Enterococci*

Είδος	ESC	LAP	PYR	Κινητικότητα	Χρωστική	HIP
<i>E. faecalis</i>	+	+	+	-	-	+
<i>E. faecium</i>	+	+	+	-	-	-
<i>E. casseliflavus</i>	+	+	+	+	+	-
<i>E. gallinarum</i>	+	+	+	+	-	+

Αντιβιογράμμα

Ανάπτυξη σε Mueller-Hinton

Χωρίς προσθήκη αίματος

Με προσθήκη αίματος

Enterococci

Enterococci

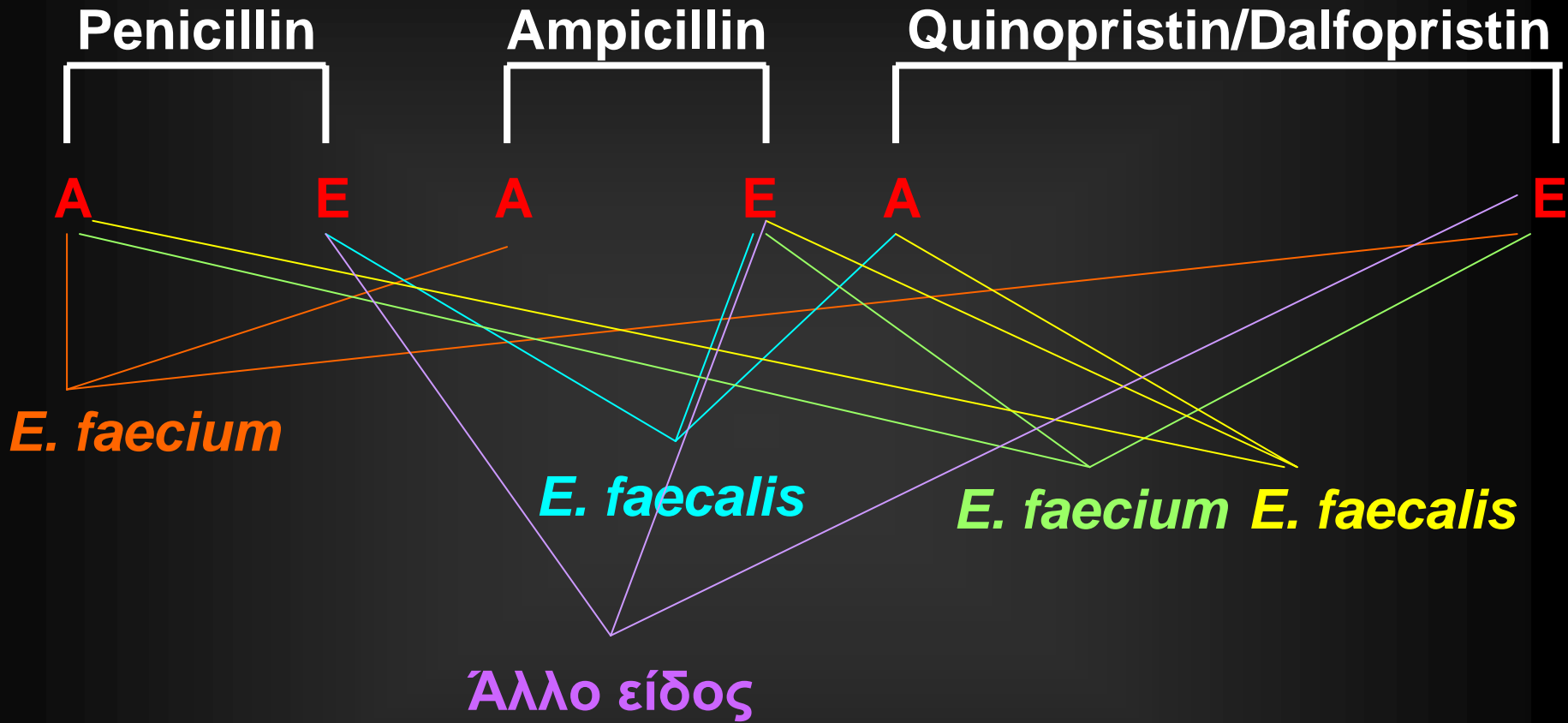
Streptococci

Αντοχή σε όλες τις κεφαλοσπορίνες και την κλινδαμυκίνη

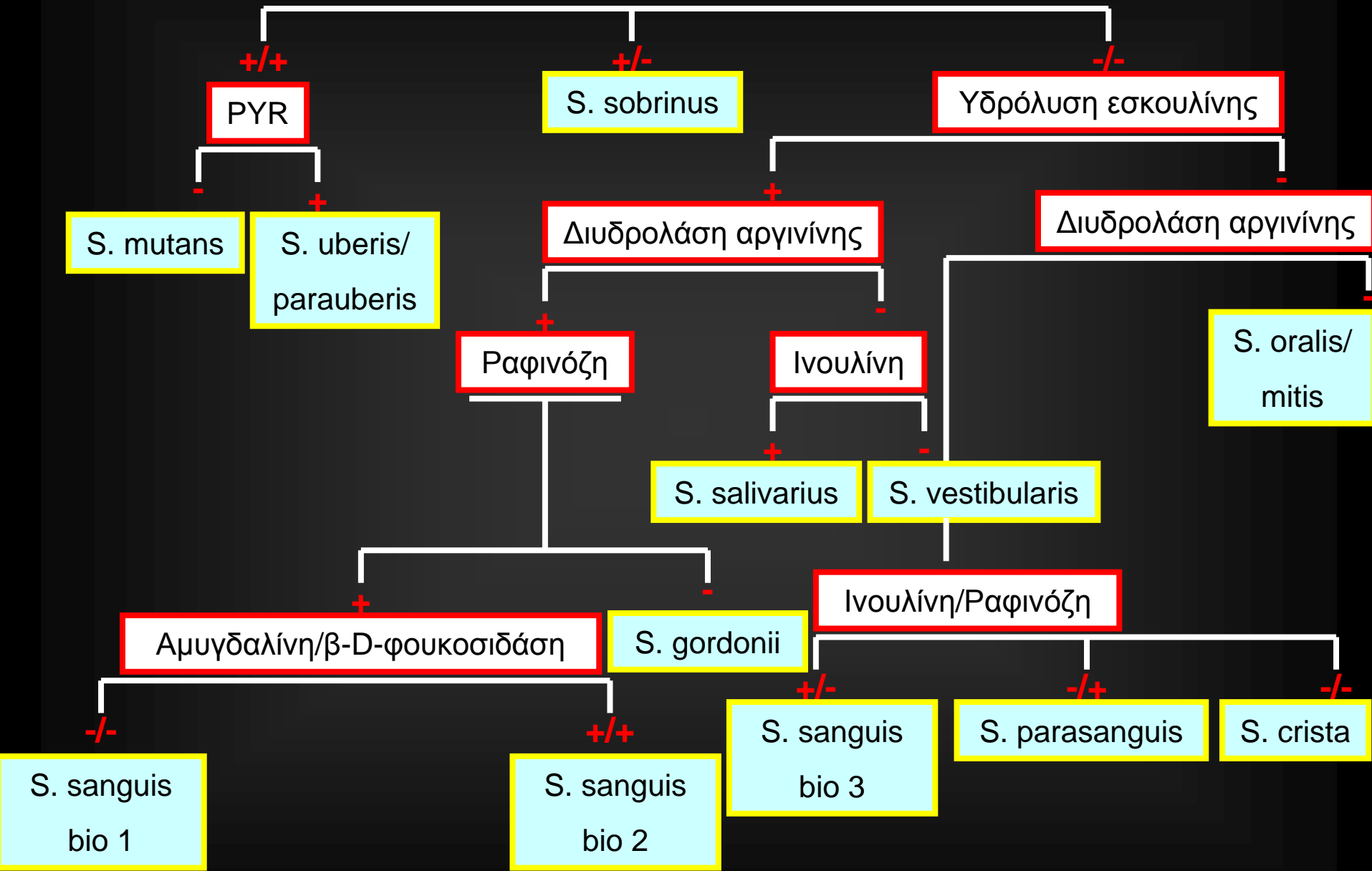


Enterococci

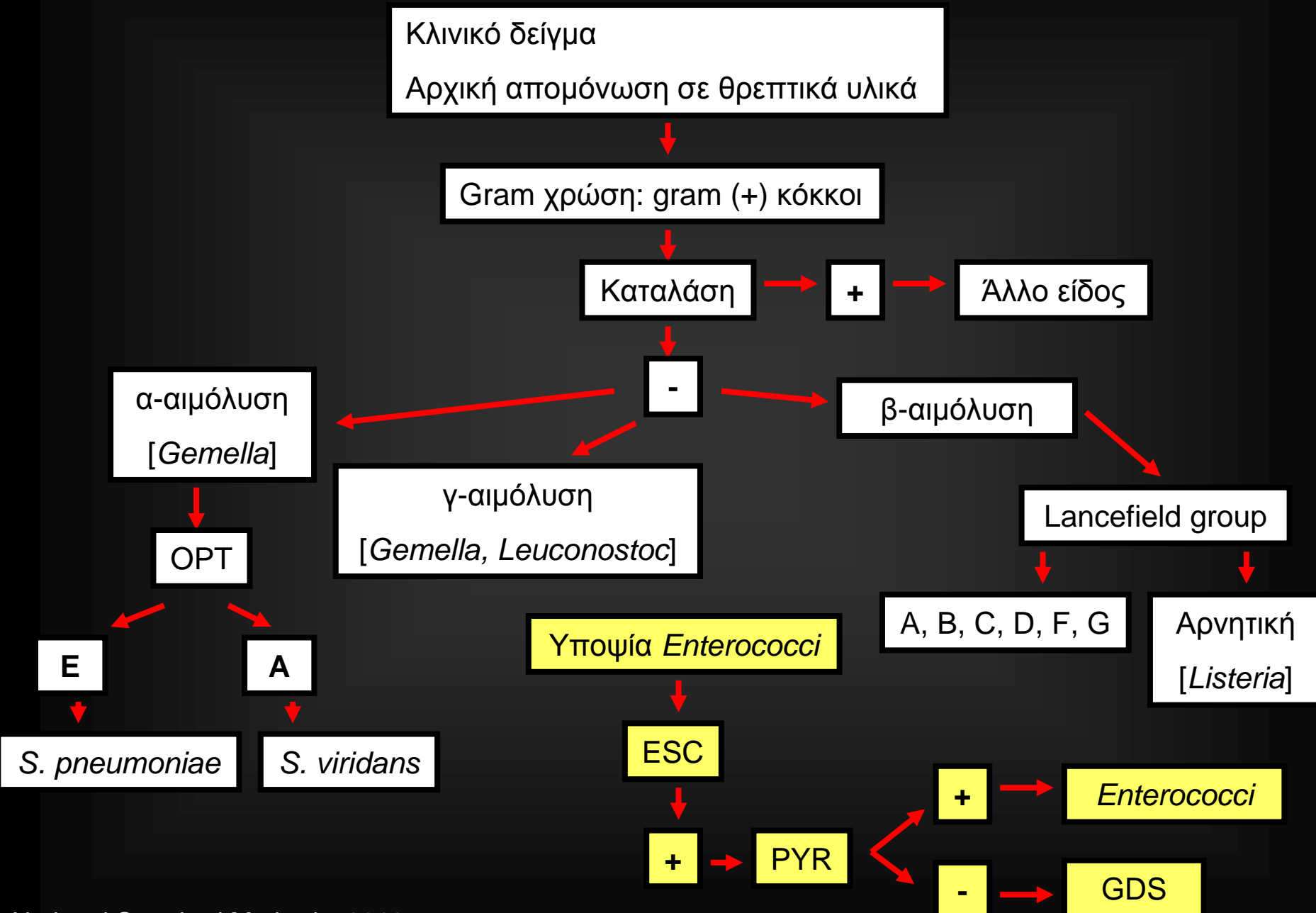
Αντιβιογράμμα - *Enterococci*



Μανιτόλη/Σορβιτόλη



Συμπερασματικά για την ταυτοποίηση των *Streptococci*



Τελική ταυτοποίηση Gram (+) αερόβιων ΚΟΚΚΩΝ

Έτοιμα ταυτοποιητικά συστήματα εμπορίου με τη χρήση ενζυμικών και βιοχημικών δοκιμασιών επί ειδικών υποστρωμάτων

- Αυτόματα
- Ημιαυτόματα
- Χειροκίνητα

