

Ταυτοποίηση Gram-αρνητικών αναεροβίων βακτηρίων

*Αγγελική Πανταζάτου
Επιμελήτρια Α' ΕΣΥ*

Μικροβιολογικό Εργαστήριο, ΓΝΑ "Λαϊκό"





Ταυτοποίηση Gram-αρνητικών αναεροβίων

Είναι εφικτή η ταυτοποίηση σε επίπεδο είδους;

Είναι κλινικά σημαντική η ταυτοποίηση σε επίπεδο είδους;

Μπορεί ένα κλινικό εργαστήριο χρησιμοποιώντας απλά συστήματα και μεθόδους να φτάνει σε ταυτοποίηση σε επίπεδο είδους;



Gram-αρνητικά αναερόβια

Αναερόβια Gram-αρνητικά βακτήρια ακίνητα

Bacteroides spp. (*fragilis* group και non-*fragilis*),
Prevotella spp., *Porphyromonas* spp., *Fusobacterium* spp.

Αναερόβια Gram-αρνητικά βακτήρια κινητά

Butyrivibrio, *Succinivibrio*, *Campylobacter rectus*,
Seimonas, *Anaerobiospirillum*

Αναερόβιοι Gram-αρνητικοί κόκκοι

Veillonella spp.



Προκαταρτική ταυτοποίηση

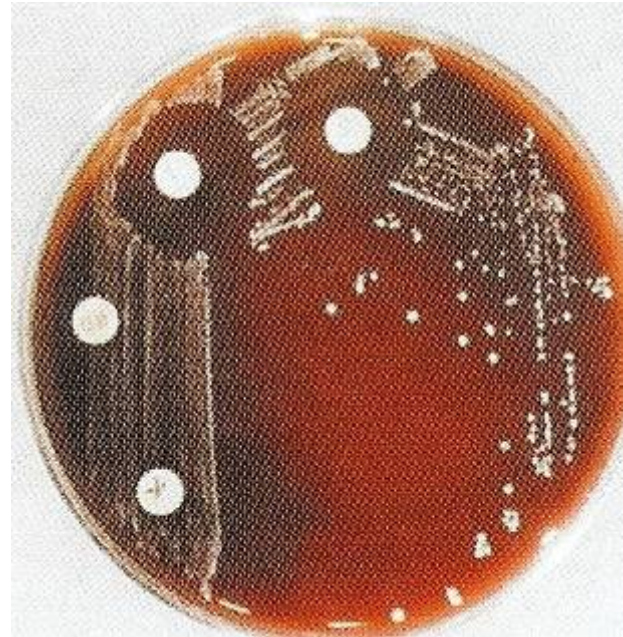
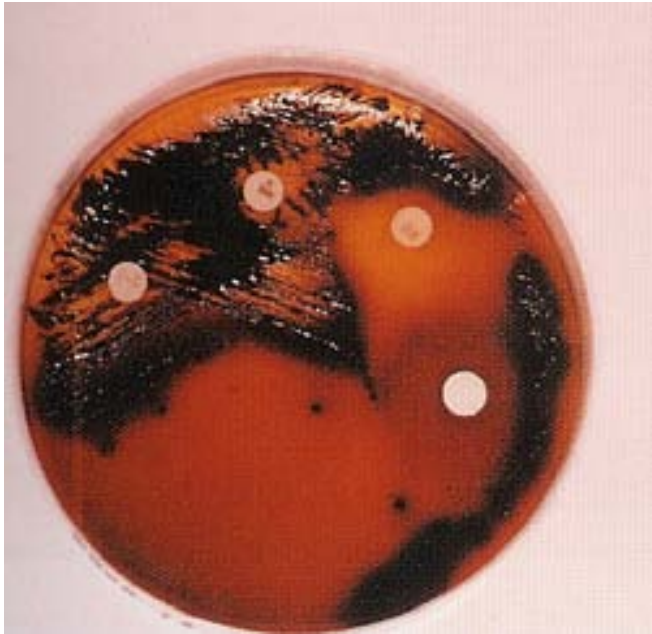
- ✓ Έλεγχος αεροβίωσης
- ✓ Χρώση κατά Gram
- ✓ Μορφολογία αποικιών στην καλλιέργεια
- ✓ Παραγωγή χρωστικής

- ✓ Δισκία ειδικής περιεκτικότητας (Vancomycin 5 μg, Kanamycin 1000 μg, Colistin 10 μg, SPS)
- ✓ Ταχείες δοκιμασίες καταλάσης και ινδόλης
- ✓ Ανάπτυξη παρουσία χολής 20% (Bacteroides Bile Esculin άγαρ)
- ✓ Δοκιμασίες λιπάσης-λεκιθινάσης (ανάπτυξη σε υλικό egg-yolk άγαρ)



Δισκία ειδικής περιεκτικότητας

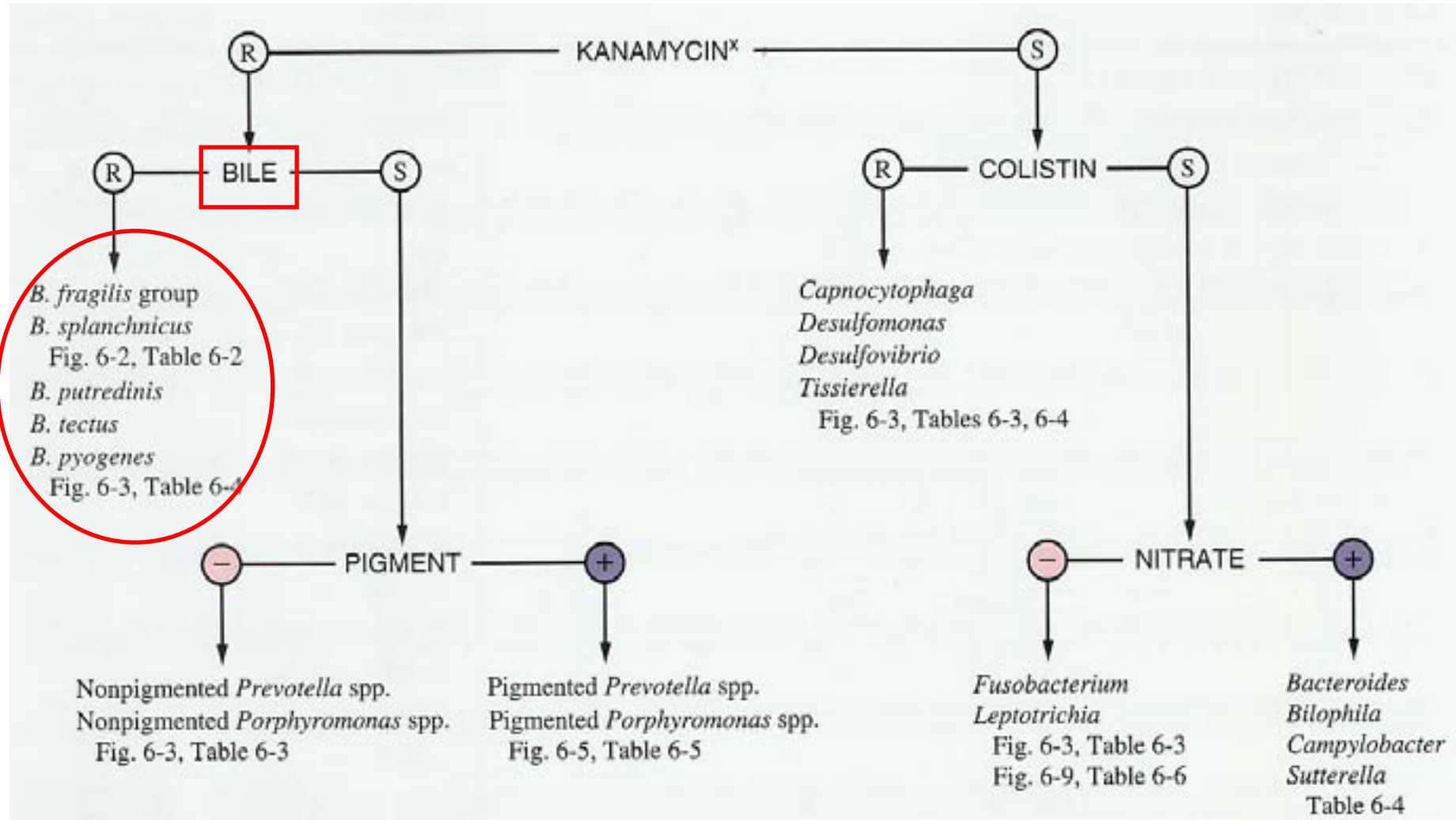
	Van	Kan	Col
<i>Bacteroides fragilis</i> group	A	A	A
<i>Bacteroides ureolyticus</i>	A	E	E
<i>Prevotella</i> spp.	A	A	A/E
<i>Fusobacterium</i> spp.	A	E	E
<i>Porphyromonas</i> spp.	E	A	A
<i>Veillonella</i> spp.	A	E	E



Δισκία ειδικής περιεκτικότητας



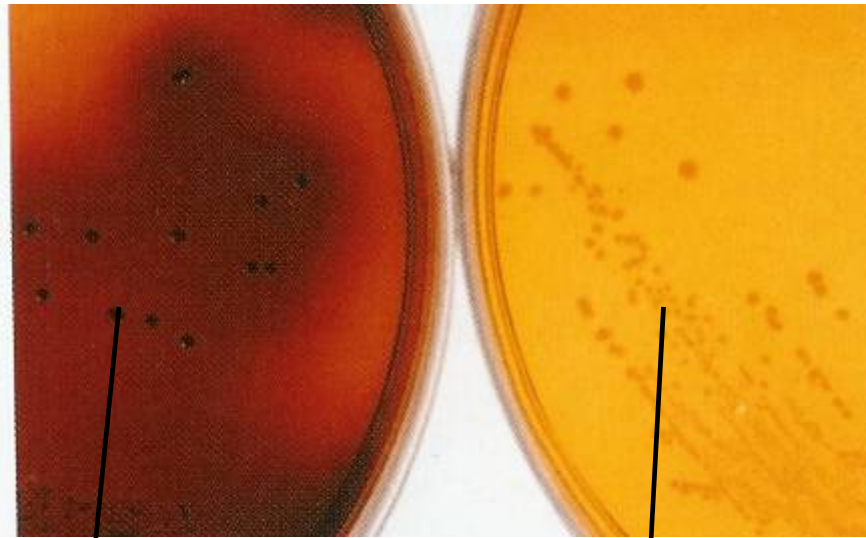
ΣΥΝΟΠΤΙΚΗ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ Gram-αρνητικών



Χαρακτηριστικά των ανθεκτικών στην χολή *Bacteroides* spp. (*B. fragilis* group και *B. splanchnicus*)

Species	Growth in 20% bile	Indole	Catalase	Esculin hydrolysis	Arabinose	Cellobiose	Rhamnose	Salicin	Sucrose	Trehalose	Xylose	Xylan	α-fucosidase
<i>B. caccae</i>	+	-	- ⁺	+	+	+ ⁻	+ ⁻	- ⁺	+	+	+	-	+
<i>B. distasonis</i> ^a	+	-	+ ⁻	+	- ⁺	+	V	+	+	+	+	-	-
<i>B. eggerthii</i>	+	+	-	+	+	- ⁺	+ ⁻	-	-	-	+	+	-
<i>B. fragilis</i>	+	-	+	+	-	+ ⁻	-	-	+	-	+	-	+
<i>B. merdae</i> ^a	+	-	- ⁺	+	- ⁺	V	+	+	+	+	+	-	-
<i>B. ovatus</i>	+	+	+ ⁻	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+ ⁻
<i>B. stercoris</i>	+	+	-	+ ⁻	- ⁺	- ⁺	+	- ⁺	+	-	+	V	V
<i>B. thetaiotaomicron</i>	+	+	+	+	+	+ ⁻	+	- ⁺	+	+	+	-	+
<i>B. uniformis</i>	W ⁺	+	- ⁺	+	+	+	- ⁺	+ ⁻	+	- ^w	+	V	+ ⁻
<i>B. vulgatus</i>	+	-	- ⁺	- ⁺	+	-	+	-	+	-	+	- ⁺	+
<i>B. splanchnicus</i>	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+

Διαφορές στην αντίδραση της εσκουλίνης και την ανάπτυξη στο BBE

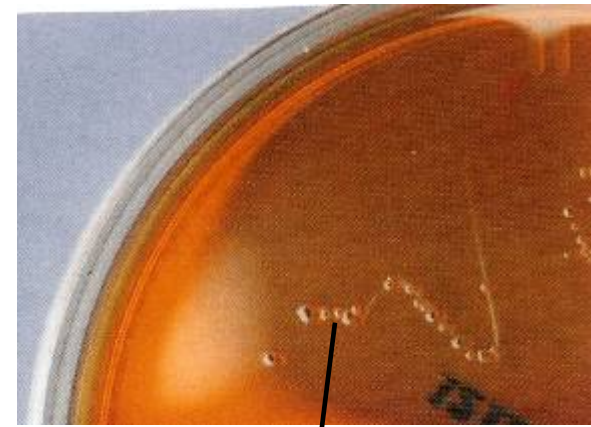


Bacteroides fragilis

- Ανάπτυξη (+)
- Μαύρες αποικίες
- Μαύρισμα του υλικού

Bacteroides vulgatus

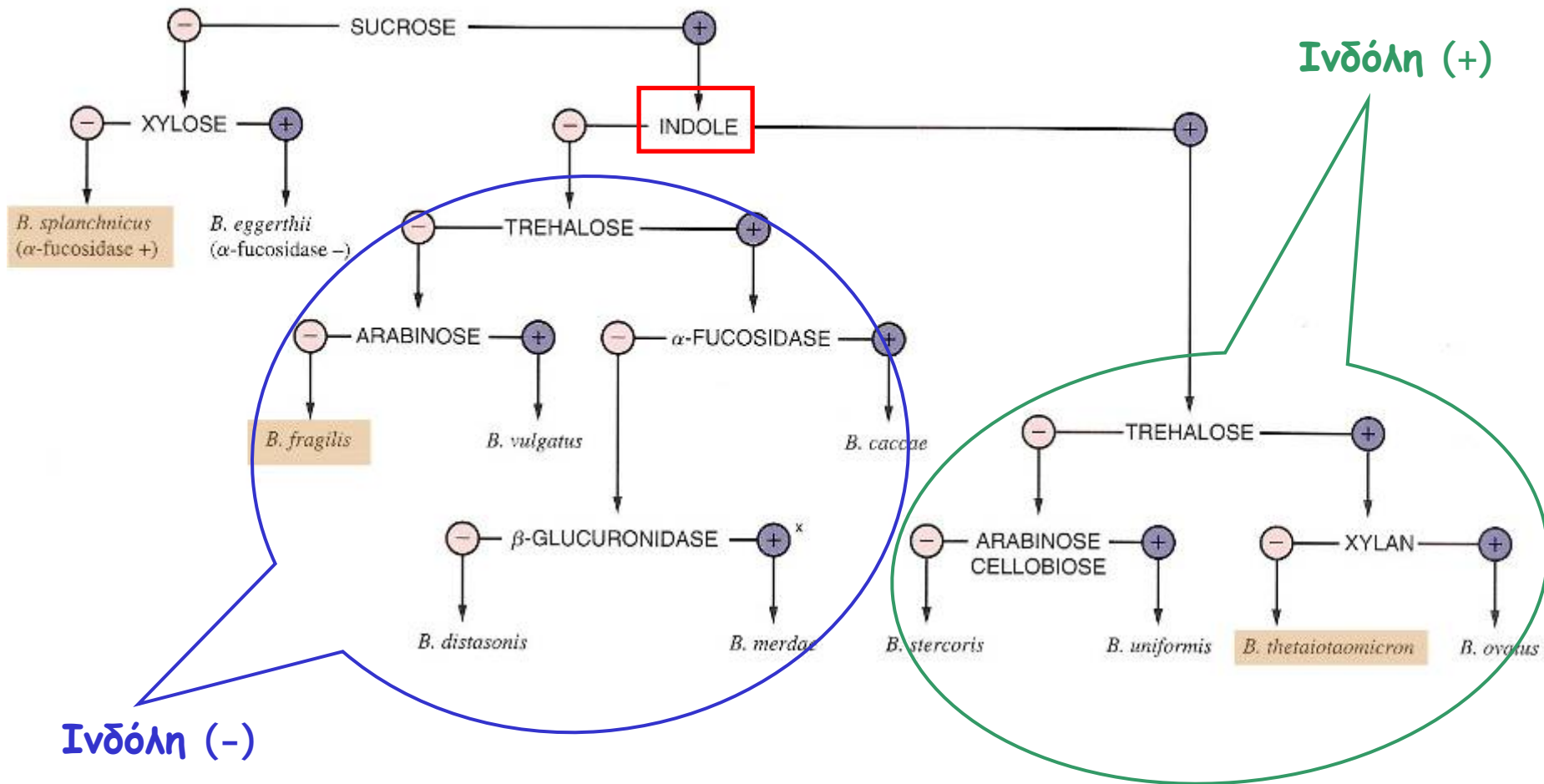
- Ανάπτυξη (+)
- Άχρωμες αποικίες
- Υλικό χωρίς αλλαγή



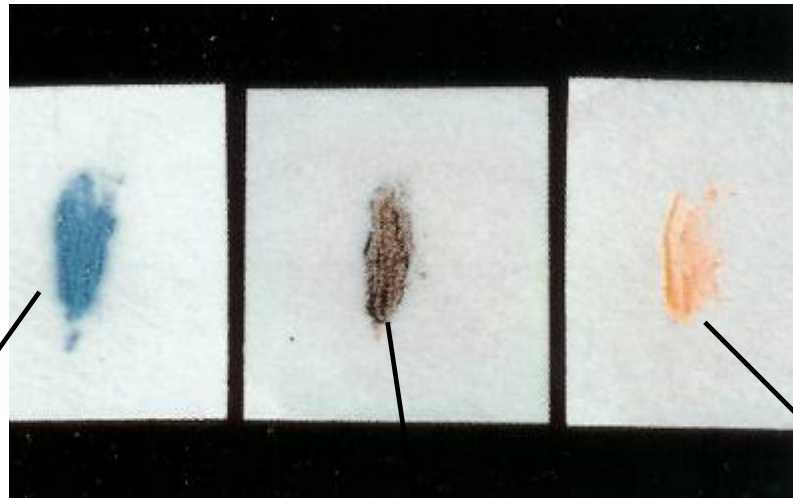
Bilophila wadsworthia

- Ανάπτυξη (+) αργή
- Αποικίες με μαύρο κέντρο
- Μαύρισμα του υλικού

Ταυτοποίηση σε επίπεδο είδους των ανθεκτικών στην χολή *Bacteroides* spp. (*B. fragilis* group και *B. splanchnicus*)



Δοκιμασία ινδόλης σε σταγόνα (spot indole test)



Θετικό αποτέλεσμα
Bacteroides thetaiotaomicron

Θετικό αποτέλεσμα
Prevotella intermedia
Κάλυψη αντίδρασης από
την χρωστική

Αρνητικό αποτέλεσμα
Bacteroides fragilis



Ανθεκτικά στην χολή Gram-αρνητικά

<i>Είδος</i>	Kan	Col	Van	Ind	Nit	Urea
<i>B. fragilis</i>	R	R	R	-	-	-
<i>Bilophila</i>	R	S	R	-	+	+
<i>Sutterella</i>	R	S	R	-	+	-
<i>Tissierella</i>	R	R	R	-	±	-
<i>F. varium</i>	S	S	R	±	-	-



B. fragilis Gram χρώση

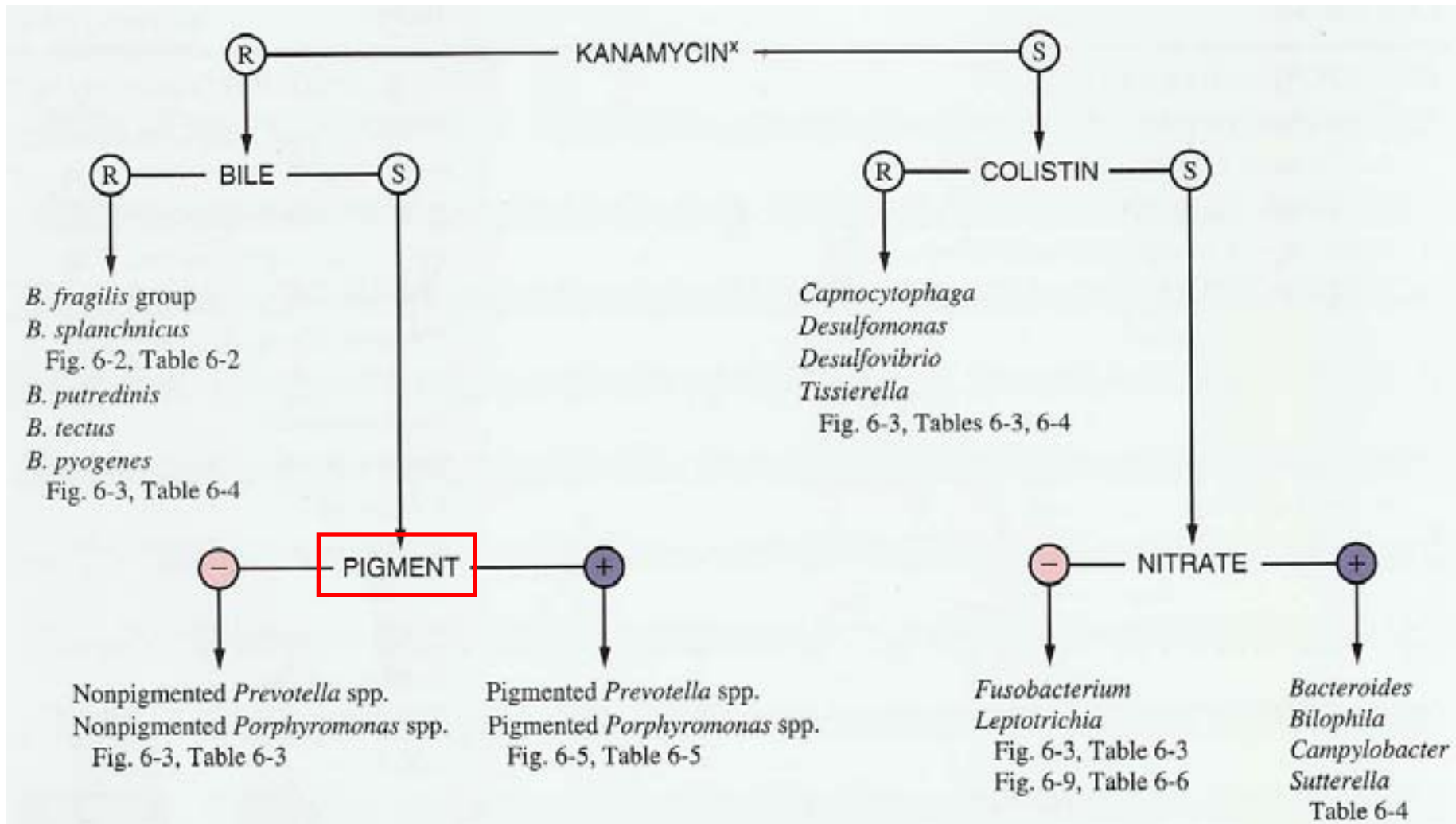


B. fragilis
αιματούχο άγαρ



B. fragilis
προκαταρτική

ΣΥΝΟΠΤΙΚΗ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ Gram-αρνητικών



Συνοπτική ταυτοποίηση των ευαίσθητων στην χολή Gram-αρνητικών βακτηρίων

Μη χρωμογόνα

Χρωμογόνα

Σακχαρολυτικά

Ασακχαρολυτικά

Σακχαρολυτικά

Ασακχαρολυτικά

Prevotella spp.
Selemonas spp.
Capnocytophaga spp.

Bacteroides spp.
Campylobacter spp.
Bilophila, *Sutterella*
Tissierella

Prevotella spp.

Porphyromonas spp.

Χαρακτηριστικά των μη χρωμογόνων σακχαρολυτικών Gram-αρνητικών στελεχών

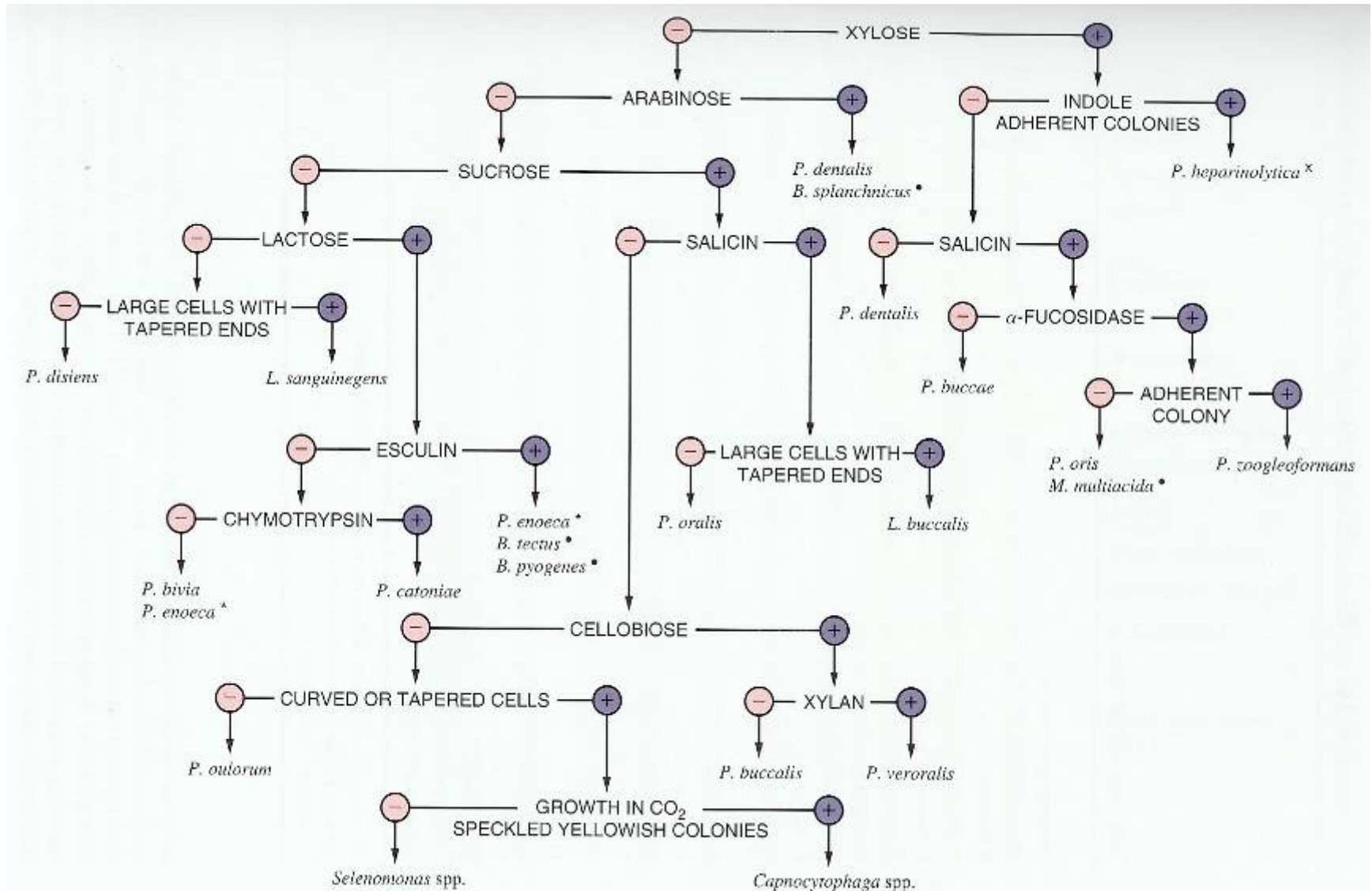
Subgroup and species	Growth in 20% bile	Indole	Esculin hydrolysis	Arabinose	Cellobiose	Glucose	Lactose	Salicin	Sucrose	Xylose	Xylan	α -Fucosidase	ONPG (β -galactosidase)	N-Acetyl- β -glucosaminidase	β -Xylosidase	Fatty acids from PYG
Pentose fermenters																
<i>M. multiacida</i>	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	A,L,S
<i>P. buccae</i>	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+		-	+	-	+	A,S(p,ib,b,iv,l)
<i>P. dentalis</i>	-	-	V	+	+	+	+	-	W	V		-	+	+	V	A,S
<i>P. heparinolytica</i> ^a	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	A,p,S(iv)
<i>P. oris</i>	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	A,S(p,ib,iv)
<i>P. zoogloeiformans</i> ^b	-	-	+	V	+	+	+	V	+	V		+	+	+	+	A,P,S(ib,iv)
Not pentose fermenters																
<i>P. buccalis</i>	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	a,iv,S
<i>P. enoeca</i>	-	-	V	-	-	+	+	-	-	-		+	+	+	-	a,S
<i>P. oralis</i>	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	^b	A,S(l)
<i>P. oulorum</i> ^c	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	A,S
<i>P. veroralis</i>	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	a,S
Proteolytic																
<i>P. bivia</i>	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-		+	+	+	-	A,iv,S(ib)
<i>P. disiens</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-		-	-	-	-	A,S(p,ib,iv)
Other																
<i>Capnocytophaga</i> spp.	-	-	+	-	+	+	V	-	+	-						A,S
<i>Leptotrichia buccalis</i>	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-						L(a,s)
<i>Leptotrichia sanguinegens</i>	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-						L(a)
<i>Selenomonas</i> spp.	-	-	V	-	-	+	V	-	+	-						A,P

^a Produces viscous sediment in broth and colonies usually adhere to agar.

^b Positive by 4-methyl-umbelliferyl substrate.

^c Catalase and lipase positive.

Ταυτοποίηση σε επίπεδο είδους των μη χρωμογόνων σακχαρολυτικών Gram-αρνητικών στελεχών



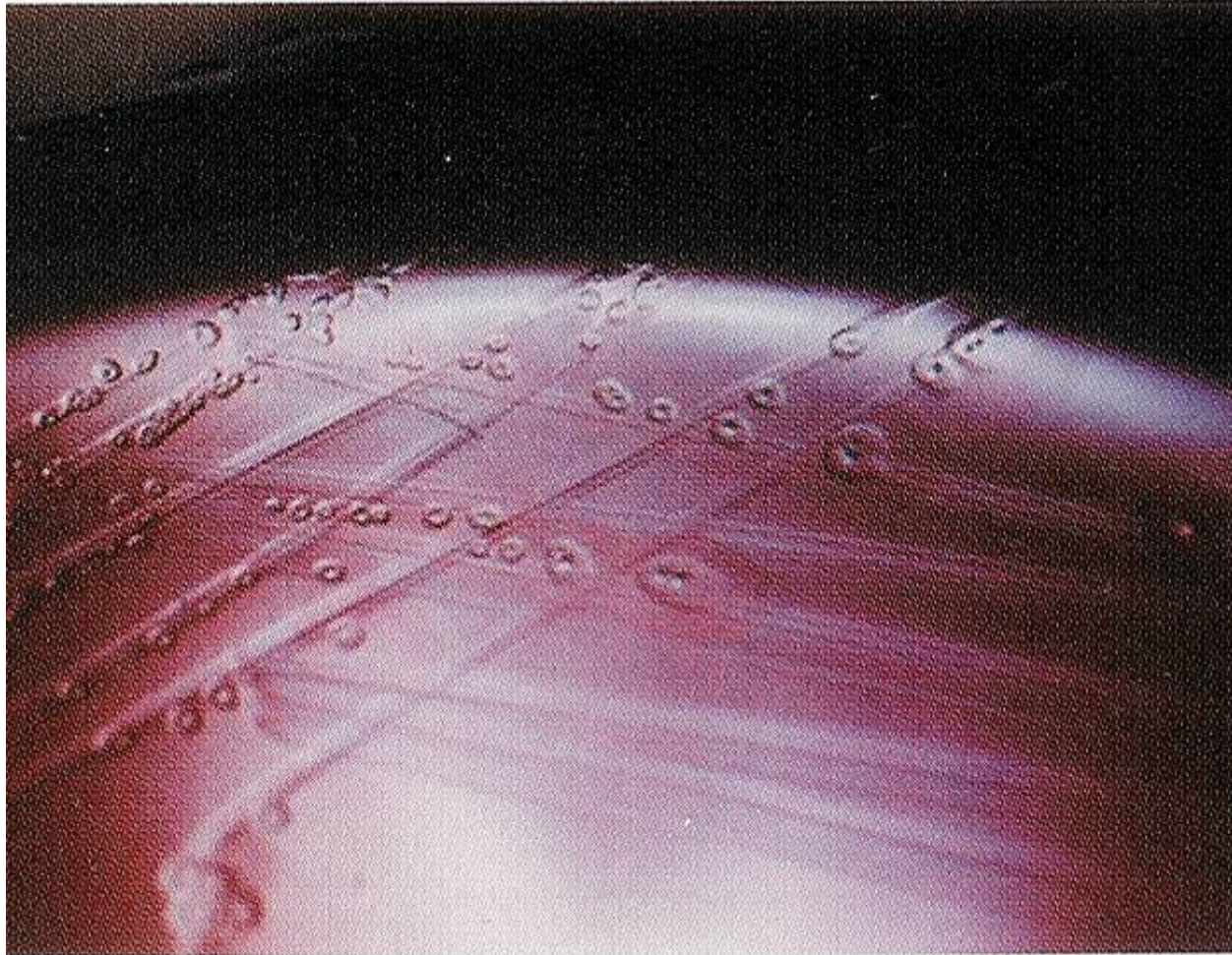


Σακχαρολυτικά μη χρωμογόνα

<i>Είδος</i>	Ινδόλη	Εσκουλίνη	b-NAG	a-fucos	b-xylos	Col
<i>P. buccae</i>	-	+	-	-	+	S
<i>P. oris</i>	-	+	+	+	+	R
<i>P. oralis</i>	-	+	+	+	-	R/s
<i>P. enoeca</i>	-	±	+	+	-	R
<i>P. bivia</i>	-	-	+	+	-	R
<i>P. disiens</i>	-	-	-	-	-	R/s

Χαρακτηριστικά των μη χρωμογόνων ασακχαρολυτικών Gram-αρνητικών στελεχών

Species	Growth in 20% bile	Glucose	Catalase	Indole	Nitrate	Motility	F/F required	Desulfoviridin	Urease	Esculin hydrolysis	Gelatin hydrolysis
<i>Anaerorhabdus furcosus</i>	+ ⁻	W	-	-	-	-	-	-	-	+	- ^w
<i>Bilophila wadsworthia</i> ^a	+	-	+	-	+	-	-	W ⁻	+ ⁻	-	-
<i>Bacteroides capillosus</i>	- ⁺	W ⁻	-	-	-	-	-	-	-	+	- ^w
<i>B. coagulans</i>	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
<i>B. forsythus</i> ^b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>B. putredinis</i>	+ ⁻	-	+ ⁻	+	-	-	-	-	-	-	+
<i>B. pyogenes</i>	+	W	-	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>B. tectus</i>	+	W	-	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>B. ureolyticus</i>	-	-	- ⁺	-	+	-	+	-	+	-	-
<i>Campylobacter</i> spp.	-	-	-	-	+	+ ⁻	+	-	-	-	-
<i>C. gracilis</i>	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
<i>Desulfomonas pigra</i> ^{a, c}	V	-	V	-	- ⁺	-	-	+	- ⁺	-	-
<i>Desulfovibrio</i> spp. ^a	V	-	V	-	V	+	-	+	- ⁺	-	-
<i>Dialister pneumosintes</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	- ^w
<i>Sutterella wadsworthensis</i>	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
<i>Tissierella praeacuta</i>	+	-	-	-	V	+	-	-	-	-	+



B. ureolyticus αιματούχο άγαρ



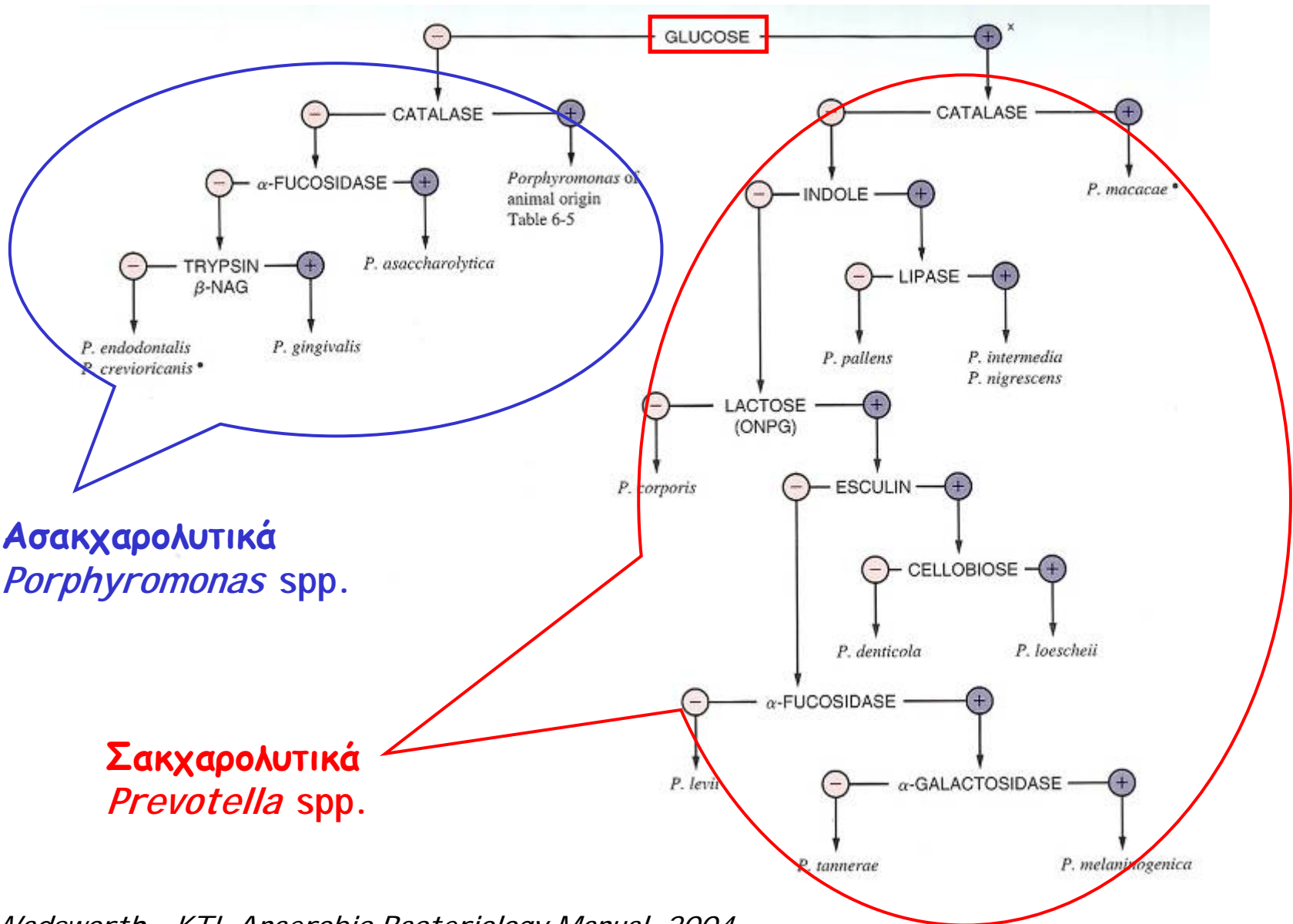
Ασακχαρολυτικά μη χρωμογόνα

<i>Είδος</i>	Χολή	Ουρία	Κιν/τα	Καταλάση
<i>B. capillosus / gracilis</i>	S/R	-	-	-
<i>B. ureolyticus</i>	S	+	-	-
<i>Sutterella</i>	R	-	-	-
<i>Tissierella</i>	R	-	+	-
<i>C. rectus</i>	S	-	+	-

Χαρακτηριστικά των χρωμογόνων Gram-αρνητικών στελεχών (*Prevotella* και *Porphyromonas* spp)

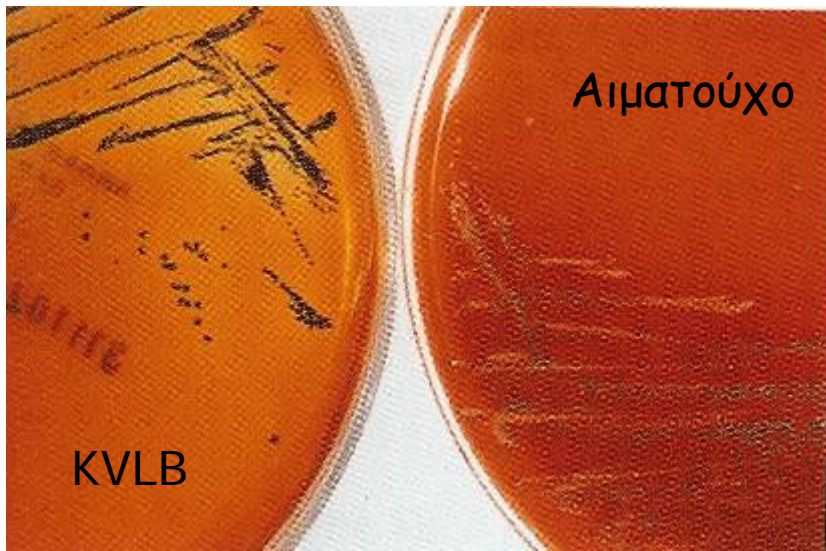
	Indole	Lipase	Catalase	Fermentation of				Esculin hydrolysis	α-Fucosidase ^a	α-Galactosidase ^d	β-Galactosidase ^a	N-Acetyl-β-glucosaminidase ^d	Trypsin ^a	Chymotrypsin ^a
				Glucose	Cellobiose	Lactose	Sucrose							
Porphyromonas:														
Asaccharolytic or weakly saccharolytic														
<i>P. asaccharolytica</i>	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	
<i>P. canoris</i> ^b	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	
<i>P. cangingivalis</i> ^b	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
<i>P. cansulci</i> ^b	+	-	+ ^w	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>P. catoniae</i> ^c	-	-	-	W	-	W	-	+	- ^a	+	+	- ^a	+	
<i>P. circumdentaria</i> ^b	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>P. crevioricantis</i> ^b	+	NA	-	-	-	-	-	-	NA	NA	-	-	NA	
<i>P. endodontalis</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>P. gingivalis</i> ^d	+	-	-	-	-	-	-	-	-	- ^e	+	+	-	
<i>P. gingivicanis</i> ^b	+	NA	+	-	-	-	-	-	NA	NA	-	-	NA	
<i>P. levi</i> ^{b,d}	-	-	-	W	-	W	-	-	-	+	+	-	+	
<i>P. macacae</i> ^d	+	+	+	W	-	W	-	-	+	- ^e	+	+	+	
Prevotella:														
Saccharolytic														
<i>P. corporis</i>	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
<i>P. denticola</i>	-	-	-	+	- ^a	+	+	+	+	+	+	-	-	
<i>P. intermedia</i>	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	
<i>P. loeschei</i>	-	V	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	
<i>P. melaninogenica</i>	-	-	-	+	- ^a	+	+	+	+	+	+	-	-	
<i>P. nigrescens</i> ^f	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	
<i>P. pallens</i>	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	
<i>P. tanneriae</i>	-	-	-	+	-	+	V	-	+	-	+	-	-	

Ταυτοποίηση σε επίπεδο είδους των χρωμογόνων Gram-αρνητικών στελεχών (*Prevotella* και *Porphyromonas* spp)



**Ασακχαρολυτικά
Porphyromonas spp.**

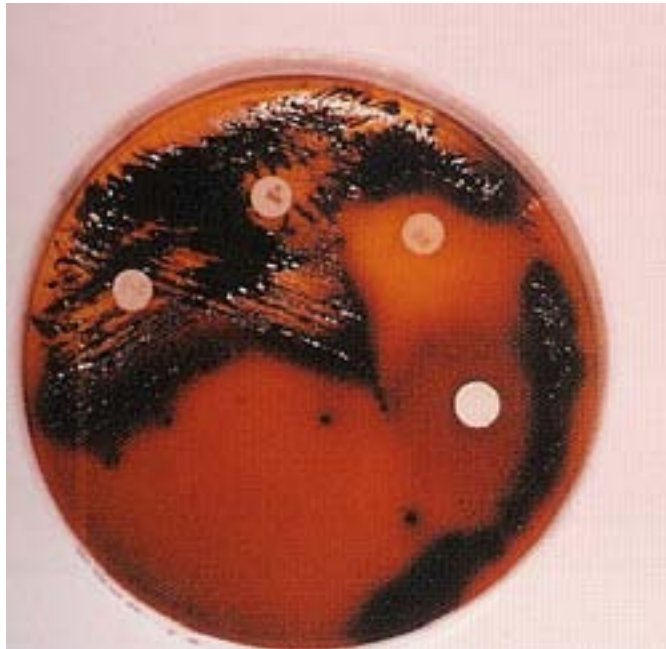
**Σακχαρολυτικά
Prevotella spp.**



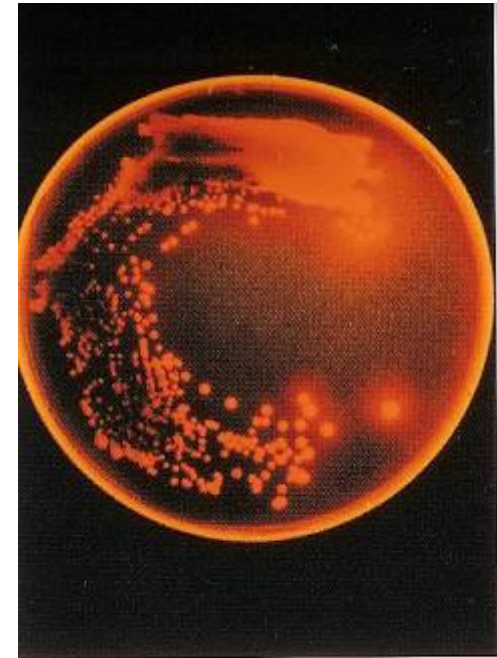
Prevotella spp.

Διαφορά στην παραγωγή χρωστικής ανάλογα το υλικό

Αίμα κονίκλου → γρηγορότερη ανάπτυξη χρωστικής



Prevotella spp. παραγωγή χρωστικής



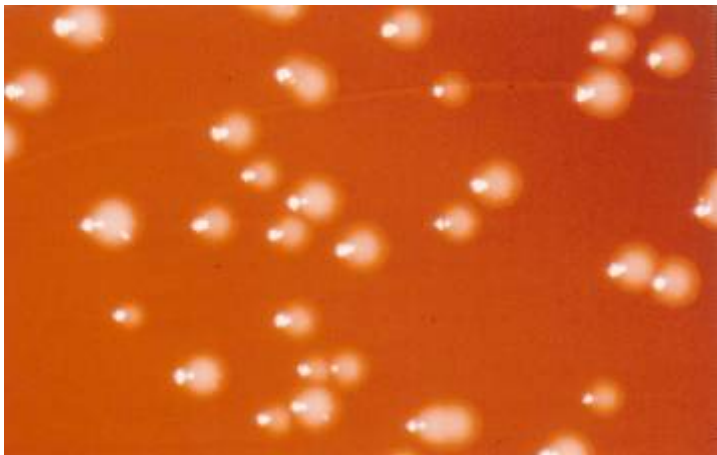
Παραγωγή χρωστικής



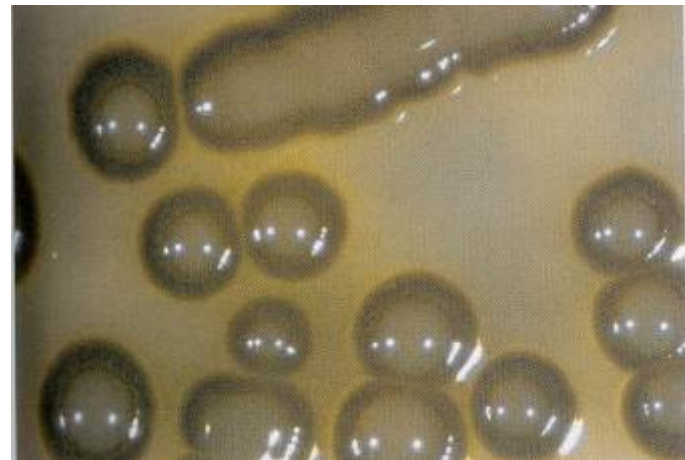
Prevotella dentalis
Παραγωγή χρωστικής (-)
Αποικίες βλεννώδεις σαν σταγόνα



Prevotella pallens
Παραγωγή χρωστικής (±)



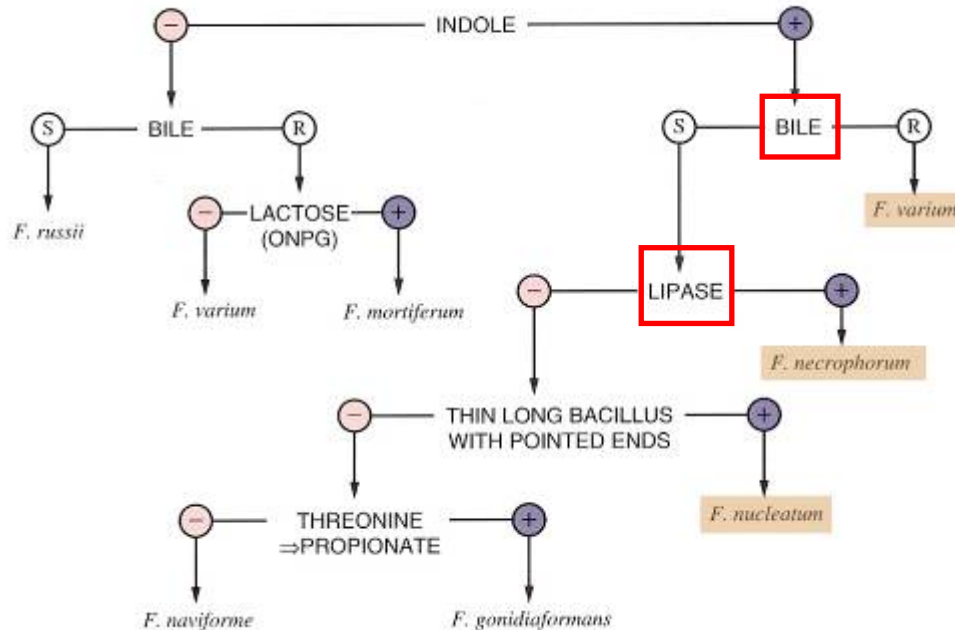
Prevotella catoniae
Παραγωγή χρωστικής (-)



Porphyromonas spp.
Παραγωγή χρωστικής (+)
Αποικίες βλεννώδεις

Χαρακτηριστικά και ταυτοποίηση σε επίπεδο είδους των στελεχών *Fusobacterium* spp

<i>Fusobacterium</i> sp.	Distinctive cellular morphology	Indole	Growth in 20% bile	Lipase	Gas in glucose agar	Glucose	Lactose	Mannose	Esculin hydrolysis	Lactate converted to propionate	Threonine converted to propionate
<i>F. gonidiaformans</i>	Gonidial forms	+	-	-	4 ²	-	-	-	-	-	+
<i>F. mortiferum</i> ^d	Bizarre; round bodies	-	+	-	4	+ ^w	+	+ ^w	-	-	+
<i>F. naviforme</i>	Boat shape	+	-	-	2	w ⁻	-	-	-	-	-
<i>F. necrophorum</i> ^b	Large, pleomorphic	+	- ⁺	+ ⁻	4 ³	- ^w	-	-	-	+	+
<i>F. nucleatum</i> ^f	Slender, pointed ends	+	-	-	2	- ^w	-	-	-	-	+
<i>F. russii</i>	Large, rounded ends	-	-	-	2 ⁻	-	-	-	-	-	-
<i>F. varium</i>	Large, rounded ends	+ ⁻	+	- ⁺	4	w ⁺	-	+ ^w	-	-	+
<i>F. ulcerans</i> ^d	Large, rounded ends	-	+	-	2	+	-	+ ⁻	-	-	+



Λιπάση (-), μη αιμολυτικά στελέχη *F. necrophorum*
 → *F. pseudonecrophorum*
 → *F. varium*

Αντιδράσεις λιπάσης - λεκιθινάσης



Αντίδραση λιπάσης

Η αντίδραση φαίνεται στην επιφάνεια του άγαρ σαν μαργαριταροειδής επίστρωση



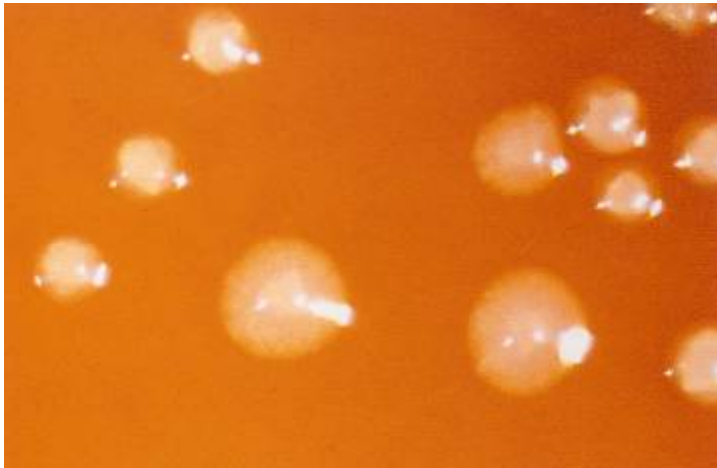
Αντίδραση λεκιθινάσης

Η αντίδραση φαίνεται στο εσωτερικό του άγαρ σαν θόλωση του υλικού

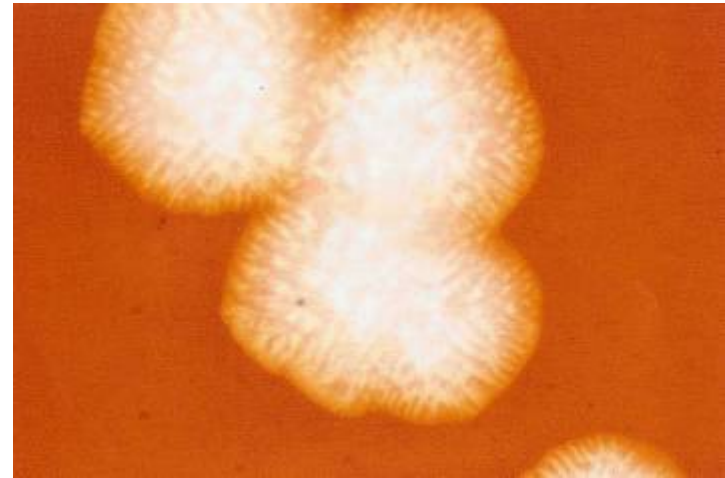


Fusobacterium spp.

Είδος	Ινδόλη	Λιπάση	Εσκουλίνη	Χολή	ONPG
<i>F. nucleatum</i>	+	-	-	S	-
<i>F. necrophorum</i>	+	+	-	S	-
<i>F. varium</i>	+	-	-	R	-
<i>F. mortiferum</i>	-	-	±	R	+



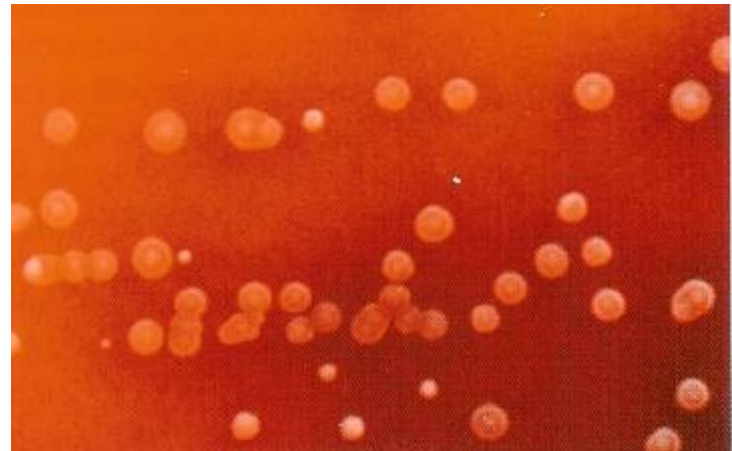
F. nucleatum subsp. *nucleatum*



F. nucleatum subsp. *polymorphum*



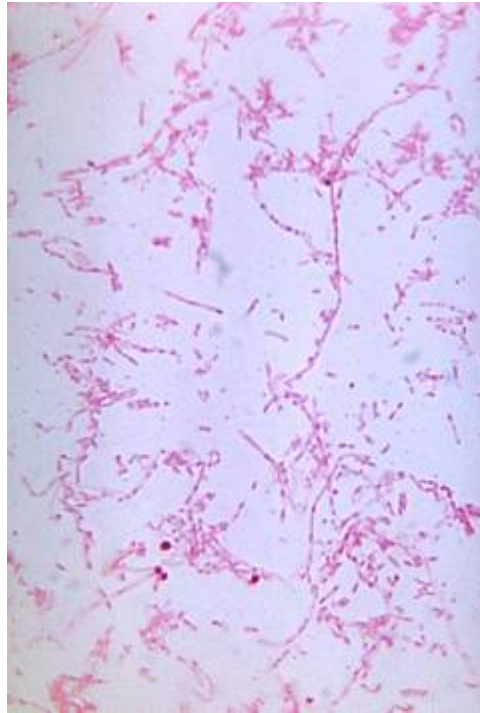
F. nucleatum subsp. *fusiforme*



F. necrophorum



F. nucleatum
Gram χρώση



F. necrophorum
Gram χρώση



F. mortiferum
Gram χρώση



Ταυτοποιητικά συστήματα του εμπορίου

Βιοχημικά σε βυθίσματα (24ωρα)

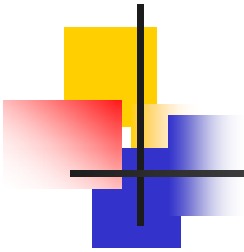
API 20A (bioMerieux) → για σακχαρολυτικά, ταχέως αναπτυσσόμενα (*Bacteroides fragilis* group, *Prevotella* spp.)

Ενζυμικά σε βυθίσματα (2 - 4ωρα)

Rapid ID 32A (bioMerieux), BBL Crystal ANR ID (Becton Dickinson), RapID ANA II (Remel), MicroScan ANA (Microscan)

Μεμονωμένα ενζυμικά δισκία (2 - 24ωρα)

Rosco Diagnostic Tablets (Rosco) → φθηνότερα και ευέλικτα, χρήση όσων απαιτούνται κάθε φορά, προϋποτίθεται εμπειρία.



Συνήθη προβλήματα στα συστήματα του εμπορίου

Πολύ αραιό εναιώρημα

Προετοιμασία εναιωρήματος από παλιό καλλιέργημα

Λάθη και παραλήψεις στην προσθήκη του λαδιού πριν την επώαση ή στην προσθήκη των αντιδραστηρίων πριν την ανάγνωση

Ασθενείς αντιδράσεις (ειδικά όσες απαιτούν UV φως για την ανάγνωση και σύγκριση με τον μάρτυρα)



Συνήθη ταυτοποιητικά λάθη

Bilophila wadsworthia → *Bacteroides ureolyticus* (δεν έγινε δοκιμασία καταλάσης)

Bilophila wadsworthia → *Desulfvibrio* (δεν έγινε δοκιμασία κινητικότητας)

S. wadsworthensis → *Bacteroides gracilis* (δεν έγινε δοκιμασία ανάπτυξης παρουσία χολής)

Bacteroides fragilis ↔ *Prevotella oralis* (δεν έγινε δοκιμασία ανάπτυξης παρουσία χολής)



Συνοπτική καταγραφή δοκιμασιών

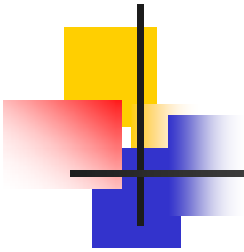
Χαρακτηριστικά αποικιών, παραγωγή χρωστικής, φθορισμός μετά από έκθεση σε UV.

Δισκία ειδικής περιεκτικότητας

Δοκιμασία ανάπτυξης παρουσία χολής

Δοκιμασία λιπάσης (egg yolk agar)

Χαρακτηριστικά ενζυμικών και σακχαρολυτικών αντιδράσεων στα ταυτοποιητικά συστήματα εμπορίου.



Άλλες μέθοδοι ταυτοποίησης Υγρή-αέρια χρωματογραφία

- ◆ Χρωματογραφία λιπαρών και οργανικών μεταβολικών οξέων
 - ✓ Τελικά προϊόντα του μεταβολισμού της γλυκόζης (μικρές αλυσίδες)
 - ✓ Η ποσότητα, το είδος και η αναλογία είναι ειδικά του είδους, κυρίως στους Gram-θετικούς αναερόβιους κόκκους
- ◆ Χρωματογραφία μακρών λιπαρών οξέων της κυτταρικής μεμβράνης (FAME analysis)
 - ✓ Δομικά στοιχεία της κυτταρικής μεμβράνης
 - ✓ Η ποσότητα, το είδος και η αναλογία είναι ειδικά του είδους σε όλα τα αναερόβια



Συμπεράσματα

Η ταυτοποίηση σε επίπεδο είδους, τουλάχιστον για τα σημαντικότερα και συχνότερα απομονούμενα είδη Gram-αρνητικών αναεροβίων, είναι εφικτή στο κλινικό εργαστήριο ενός τριτοβάθμιου νοσοκομείου χρησιμοποιώντας λίγες σχετικά δοκιμασίες

Τα μειονεκτήματα, οι αδυναμίες και οι περιορισμοί των έτοιμων εμπορικών συστημάτων θα πρέπει να είναι γνωστά, έτσι ώστε να αποφεύγονται λάθη ή καθυστερήσεις στην ταυτοποίηση, που μπορεί να οδηγήσουν σε εσφαλμένες επιλογές θεραπείας