

# 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

---

Χρώση κατά Gram

Μορφολογία αποικιών στην καλλιέργεια

Παραγωγή χρωστικής

Δισκία ειδικής περιεκτικότητας (Vancomycin 5 µg,  
Kanamycin 1000 µg, Colistin 10 µg)

Ανάπτυξη παρουσία χολής 20% (Bacteroides Bile  
Esculin άγαρ)

Δοκιμασία καταλάσης

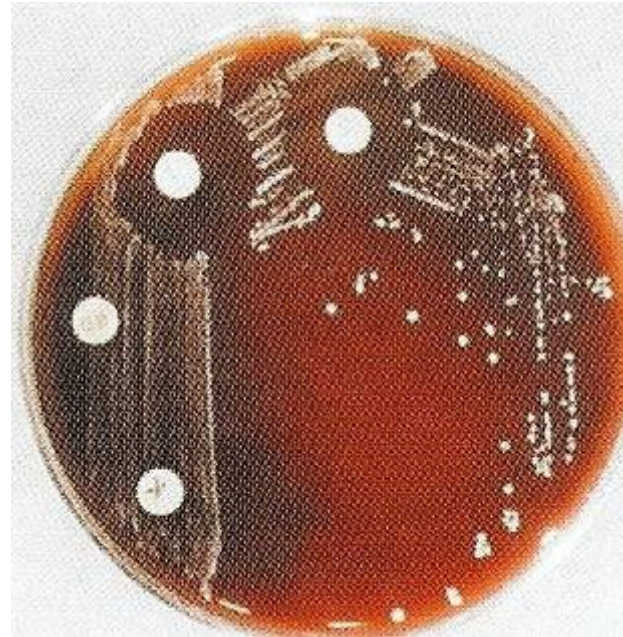
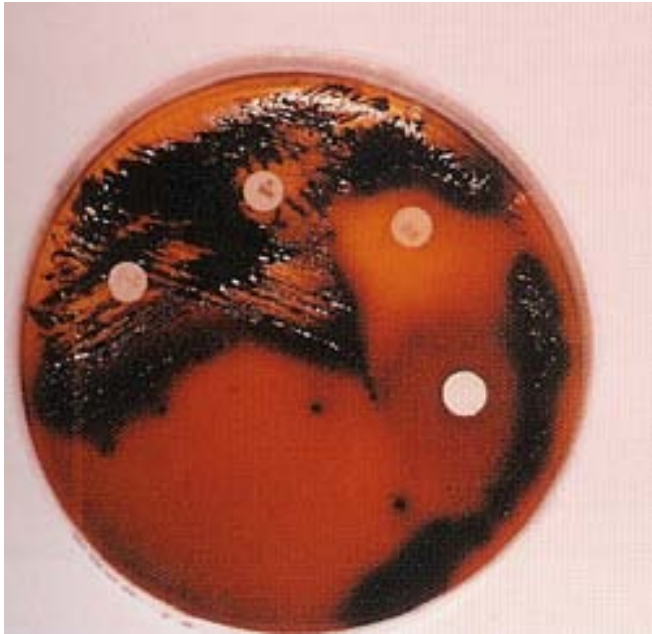
Δοκιμασία ινδόλης



## Δισκία ειδικής περιεκτικότητας

---

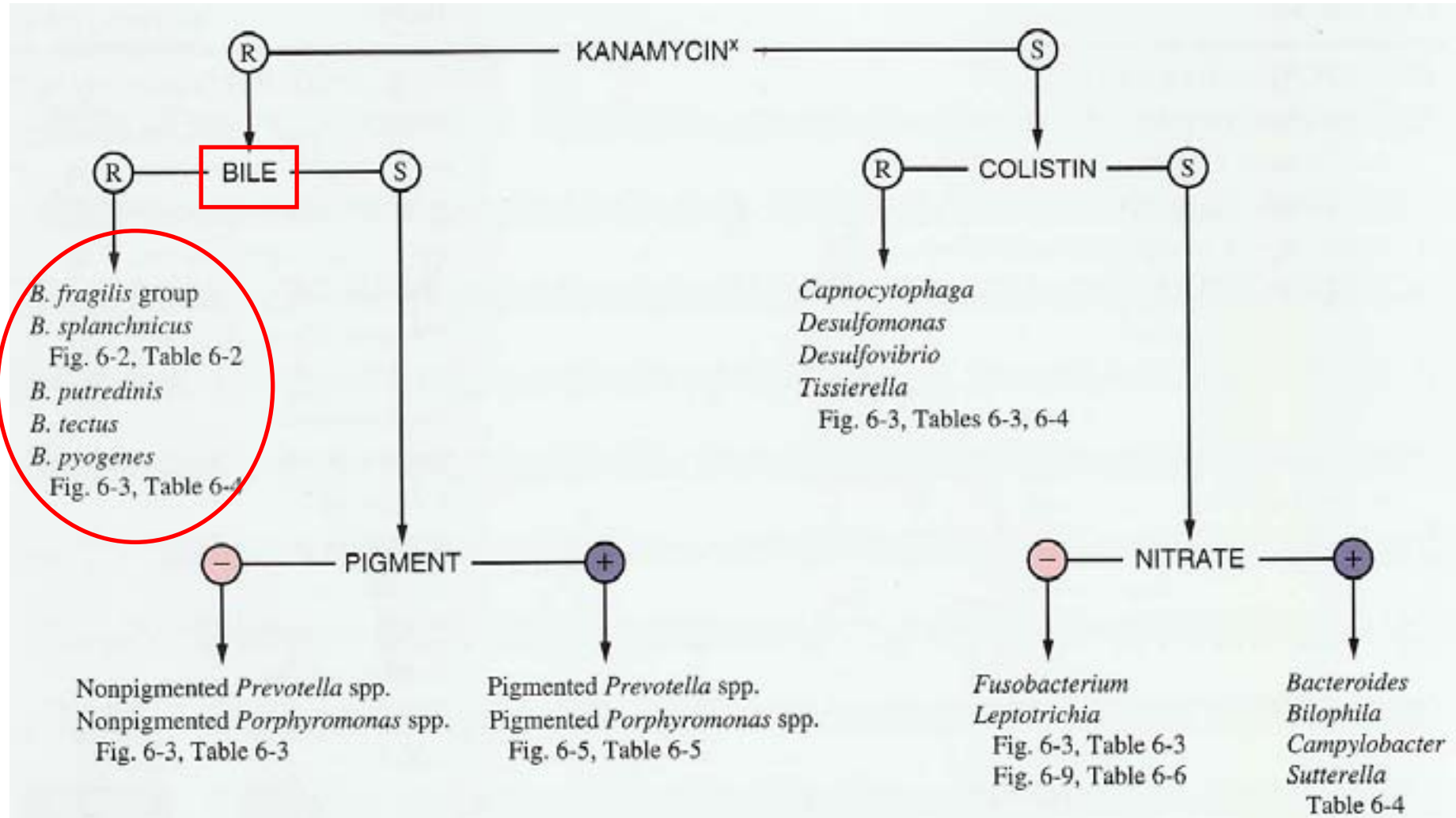
	Van	Kan	Col
<i>Bacteroides fragilis</i> group	A	A	A
<i>Bacteroides ureolyticus</i>	A	E	E
<i>Prevotella</i> spp.	A	A	A/E
<i>Fusobacterium</i> spp.	A	E	E
<i>Porphyromonas</i> spp.	E	A	A
<i>Veillonella</i> spp.	A	E	E



*Δισκία ειδικής περιεκτικότητας*



# ΣΥΝΟΠΤΙΚΗ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ Gram-αρνητικών

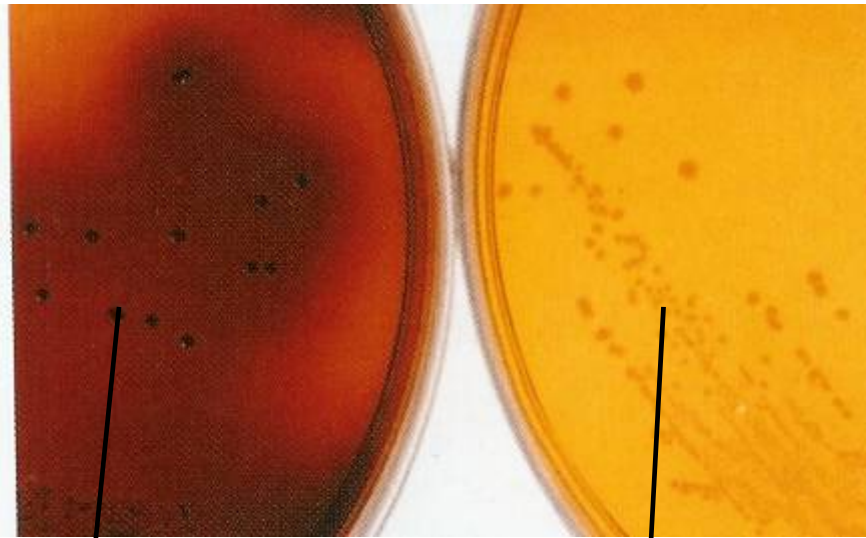


## Χαρακτηριστικά των ανθεκτικών στην χολή *Bacteroides* spp. (*B. fragilis* group και *B. splanchnicus*)

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



# Διαφορές στην αντίδραση της εσκουλίνης και την ανάπτυξη στο BBE



## *Bacteroides fragilis*

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

## *Bacteroides vulgatus*

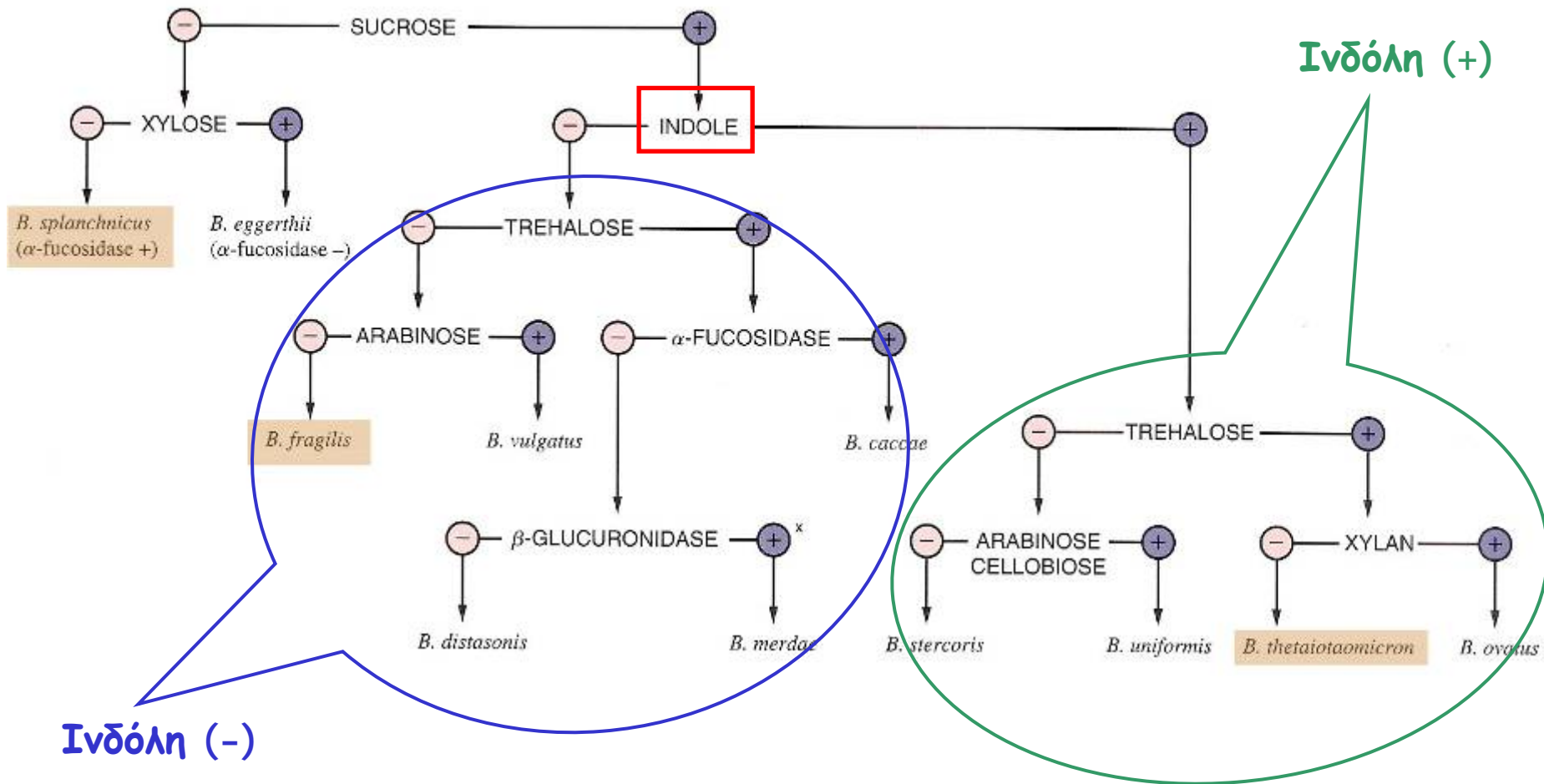
- Ανάπτυξη (+)
- Άχρωμες αποικίες
- Υλικό χωρίς αλλαγή



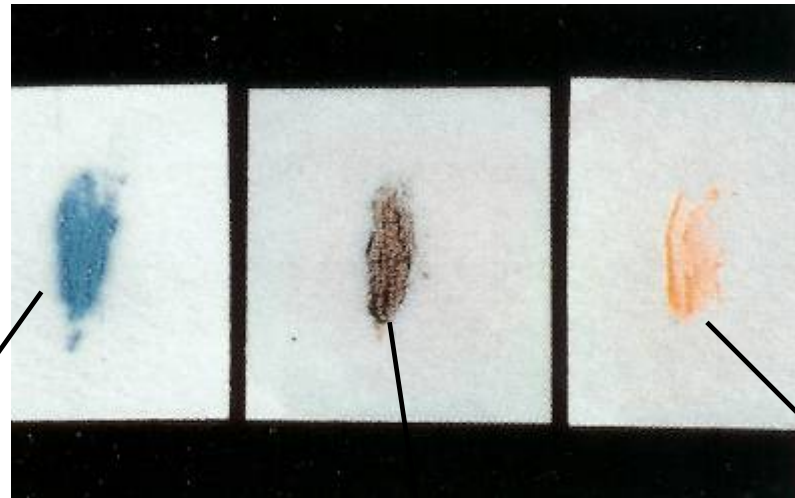
## *Bilophila wadsworthia*

- 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*

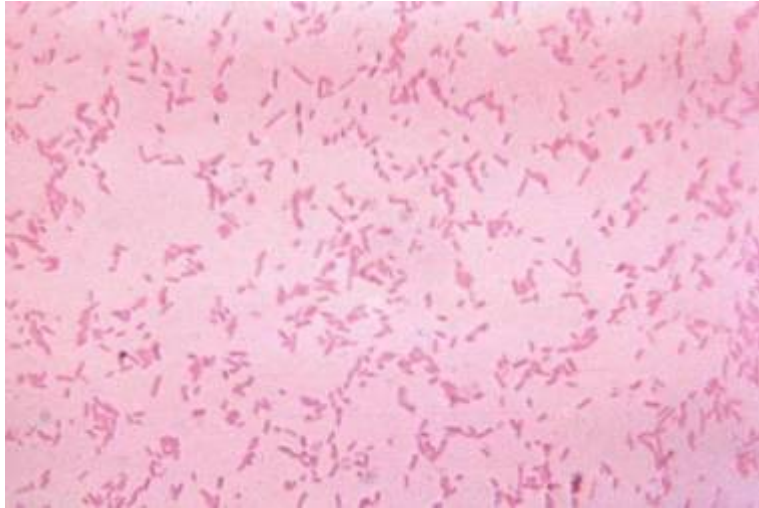
Θετικό αποτέλεσμα  
*Prevotella intermedia*  
Κάλυψη αντίδρασης από  
την χρωστική

Αρνητικό αποτέλεσμα  
*Bacteroides fragilis*

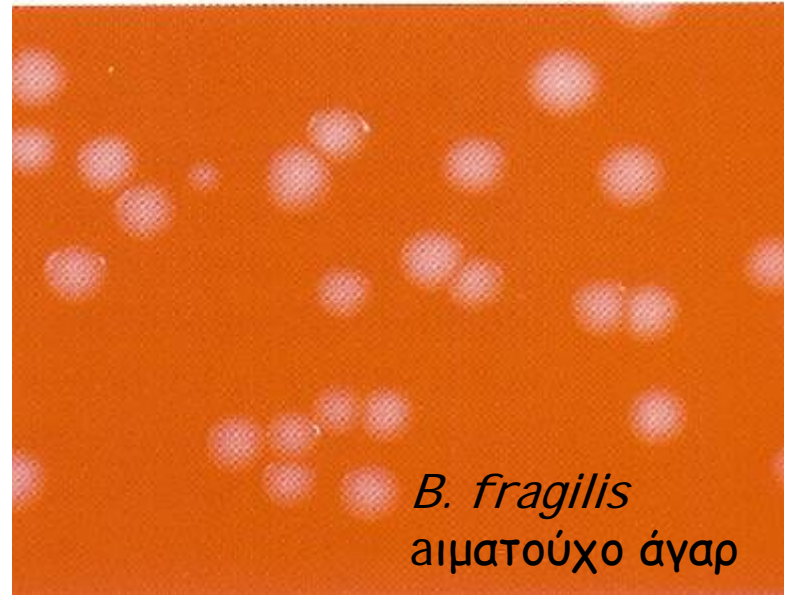


## Ανθεκτικά στην χολή Gram-αρνητικά

<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

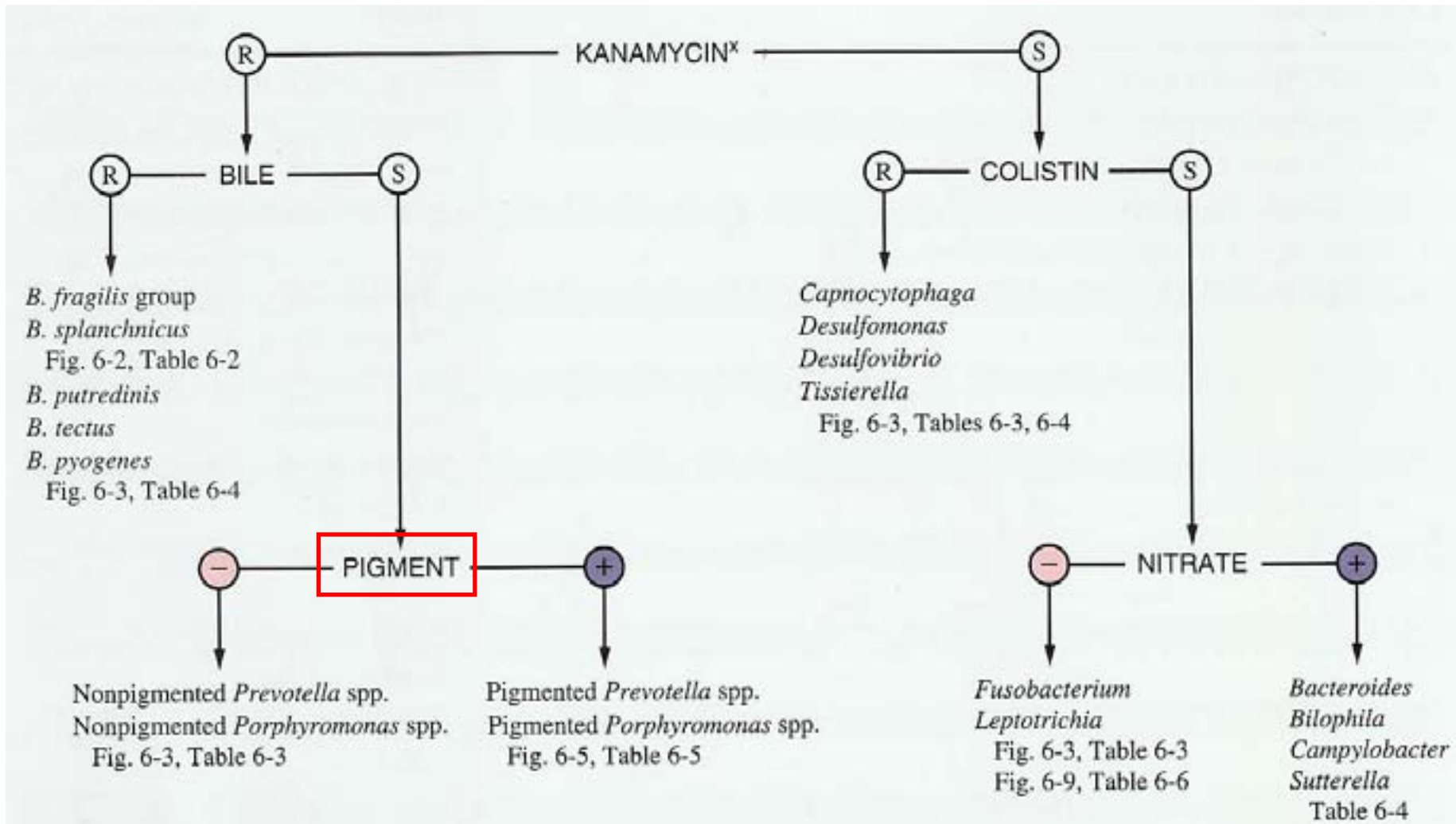


*B. fragilis*  
αιματούχο άγαρ



*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	$\alpha$ -Fucosidase	ONPG ( $\beta$ -galactosidase)	N-Acetyl- $\beta$ -glucosaminidase	$\beta$ -Xylosidase	Fatty acids from PYG
<b>Pentose fermenters</b>																
<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> <sup>a</sup>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	A,p,S(iv)
<i>P. oris</i>	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	A,S(p,ib,iv)
<i>P. zoogloeiformans</i> <sup>b</sup>	-	-	+	V	+	+	+	V	+	V		+	+	+	+	A,P,S(ib,iv)
<b>Not pentose fermenters</b>																
<i>P. buccalis</i>	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	a,iv,S
<i>P. enoeca</i>	-	-	V	-	-	+	+	-	-	-		+	+	+	-	a,S
<i>P. oralis</i>	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	<sup>c</sup>	A,S(l)
<i>P. odorum</i> <sup>c</sup>	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	A,S
<i>P. veroralis</i>	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	a,S
<b>Proteolytic</b>																
<i>P. bivia</i>	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-		+	+	+	-	A,iv,S(ib)
<i>P. dixiens</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-		-	-	-	-	A,S(p,ib,iv)
<b>Other</b>																
<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

<sup>a</sup> Produces viscous sediment in broth and colonies usually adhere to agar.

<sup>b</sup> Positive by 4-methyl-umbelliferyl substrate.

<sup>c</sup> Catalase and lipase positive.





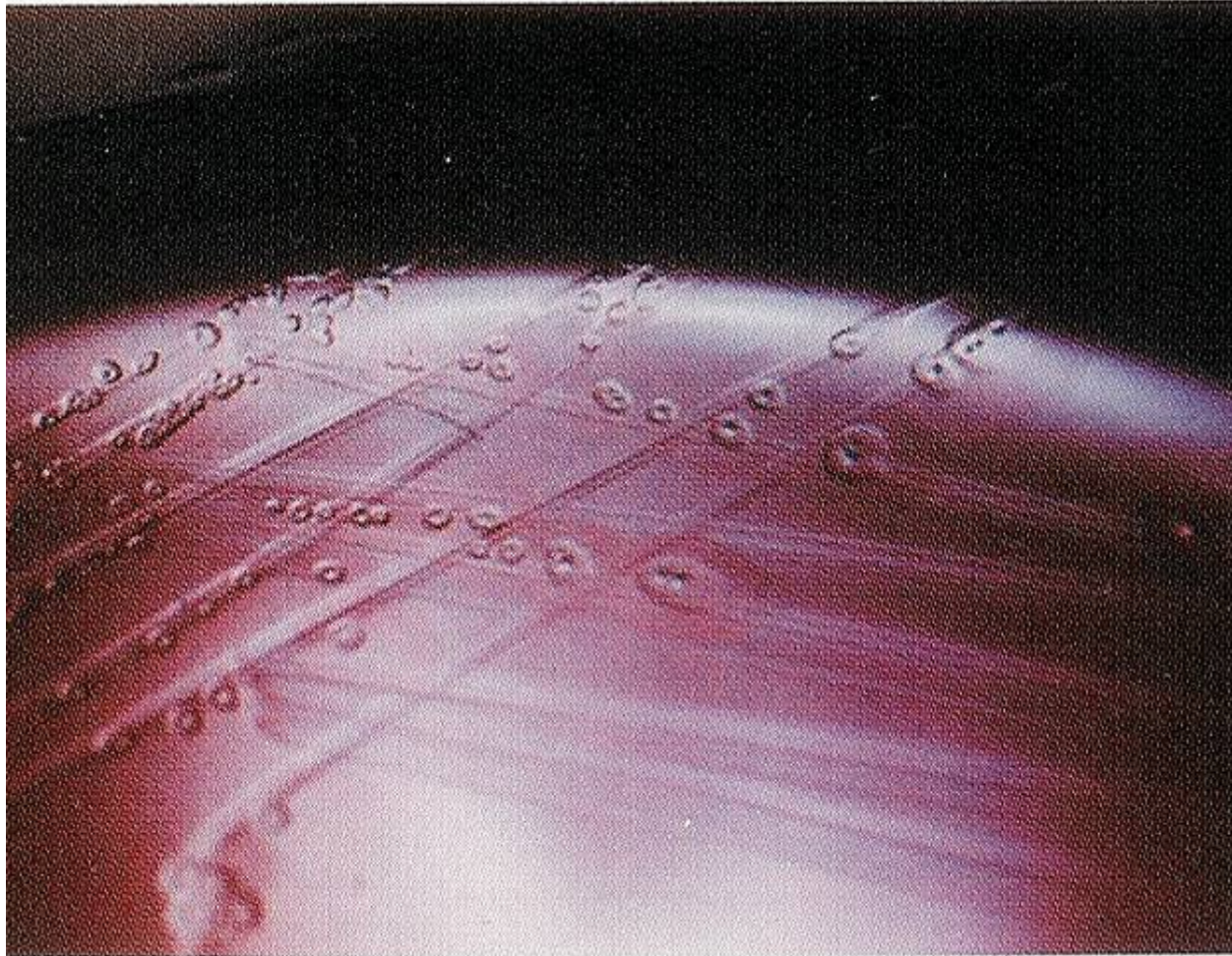


## Σακχαρολυτικά μη χρωμογόνα

<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>	+ <sup>-</sup>	W	-	-	-	-	-	-	-	+	- <sup>w</sup>
<i>Bilophila wadsworthia</i> <sup>a</sup>	+	-	+	-	+	-	-	W <sup>-</sup>	+ <sup>-</sup>	-	-
<i>Bacteroides capillosus</i>	- <sup>+</sup>	W <sup>-</sup>	-	-	-	-	-	-	-	+	- <sup>w</sup>
<i>B. coagulans</i>	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
<i>B. forsythus</i> <sup>b</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>B. putredinis</i>	+ <sup>-</sup>	-	+ <sup>-</sup>	+	-	-	-	-	-	-	+
<i>B. pyogenes</i>	+	W	-	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>B. tectus</i>	+	W	-	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>B. ureolyticus</i>	-	-	- <sup>+</sup>	-	+	-	+	-	+	-	-
<i>Campylobacter</i> spp.	-	-	-	-	+	+ <sup>-</sup>	+	-	-	-	-
<i>C. gracilis</i>	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
<i>Desulfomonas pigra</i> <sup>a, c</sup>	V	-	V	-	- <sup>+</sup>	-	-	+	- <sup>+</sup>	-	-
<i>Desulfovibrio</i> spp. <sup>a</sup>	V	-	V	-	V	+	-	+	- <sup>+</sup>	-	-
<i>Dialister pneumosintes</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	- <sup>w</sup>
<i>Sutterella wadsworthensis</i>	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
<i>Tissierella praeacuta</i>	+	-	-	-	V	+	-	-	-	-	+



*B. ureolyticus* αιματούχο άγαρ



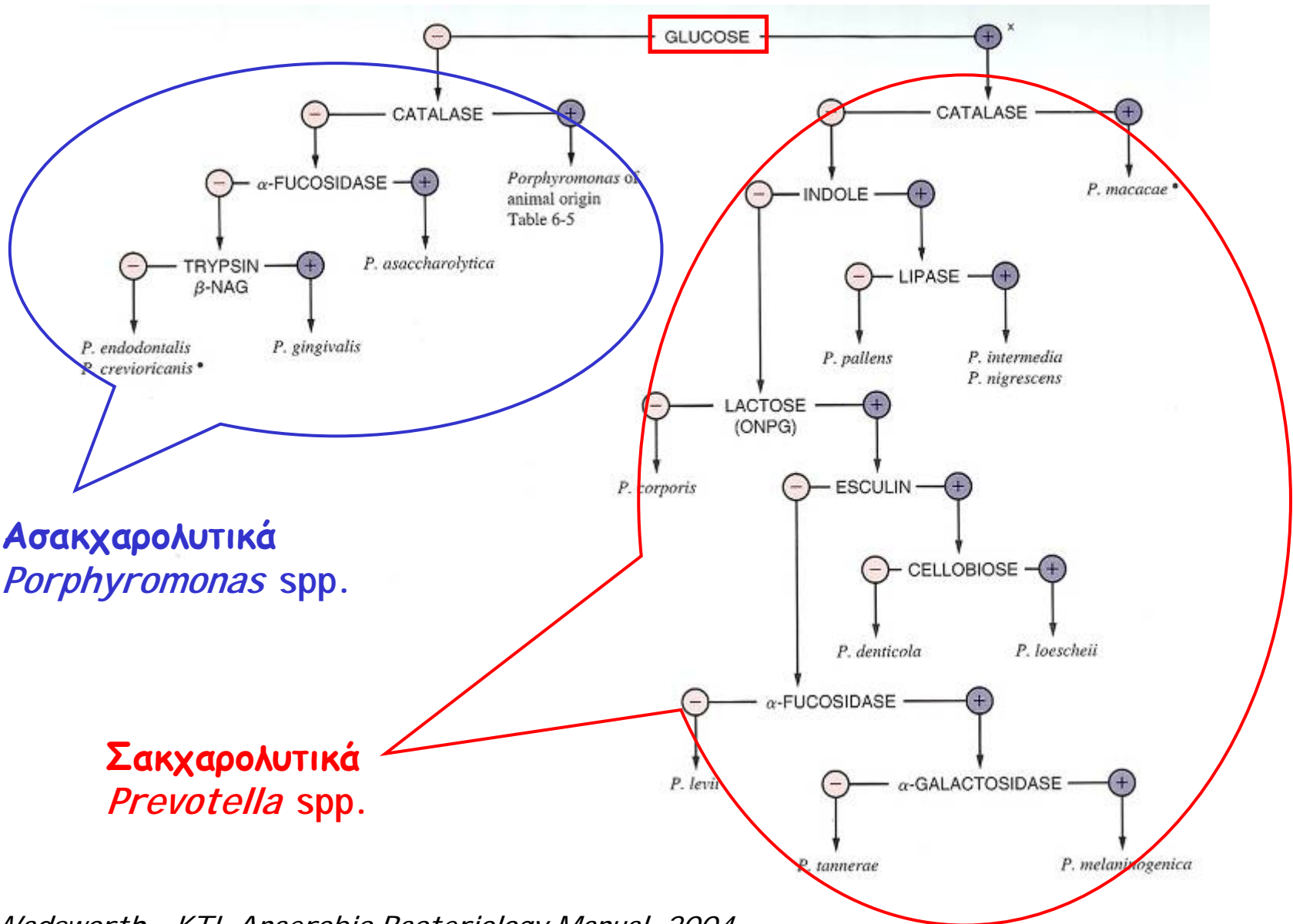
## Ασακχαρολυτικά μη χρωμογόνα

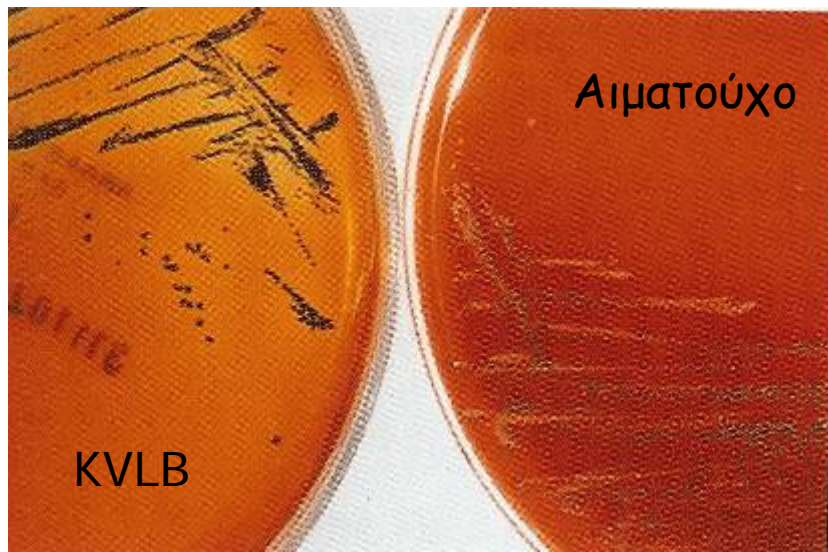
<i>Είδος</i>	Χολή	Ουρία	Κιν/τα	Καταλάση
<i>B. capillosus / gracilis</i>	S/R	-	-	-
<i>B. ureolyticus</i>	S	+	-	-
<i>Sutterella</i>	R	-	-	-
<i>Tissierella</i>	R	-	+	-
<i>C. rectus</i>	S	-	+	-

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

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

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

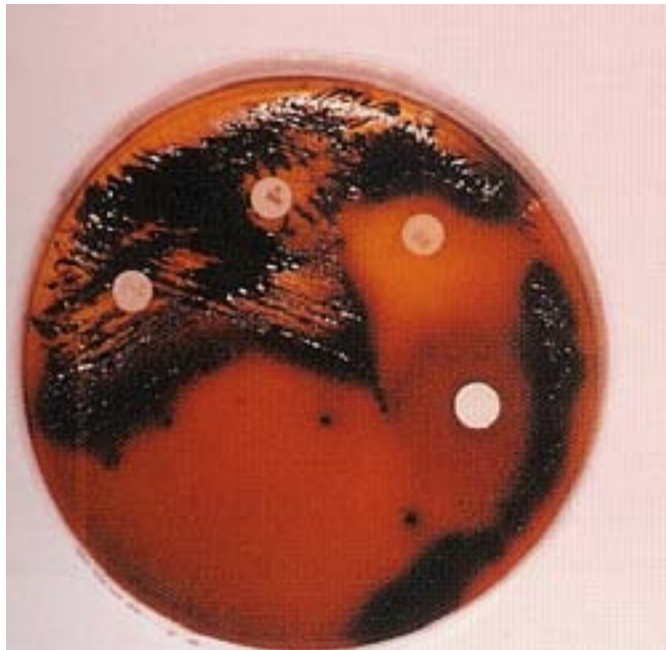




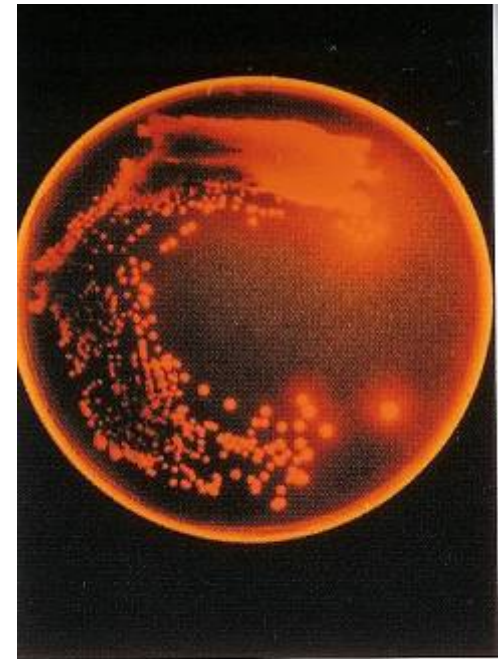
*Prevotella* spp.

Διαφορά στην παραγωγή χρωστικής ανάλογα το υλικό

Αίμα κονίκλου → γρηγορότερη ανάπτυξη χρωστικής



*Prevotella* spp. παραγωγή χρωστικής



Παραγωγή χρωστικής

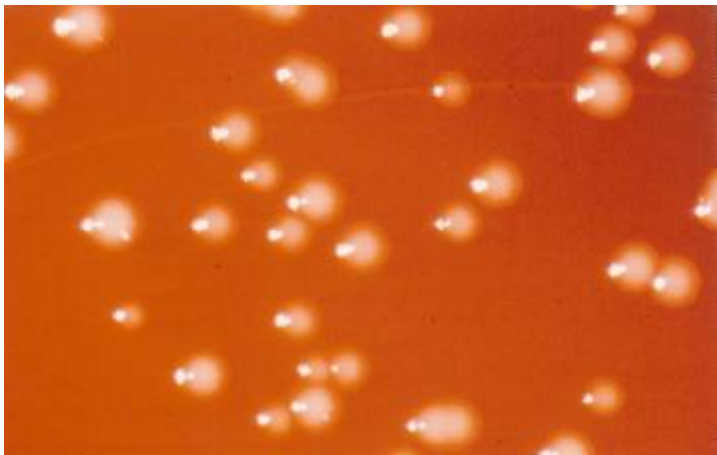




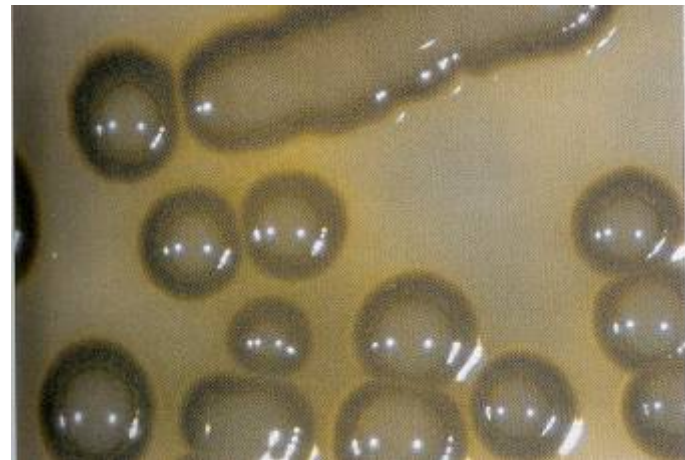
*Prevotella dentalis*  
Παραγωγή χρωστικής (-)  
Αποικίες βλεννώδεις σαν σταγόνα



*Prevotella pallens*  
Παραγωγή χρωστικής ( $\pm$ )



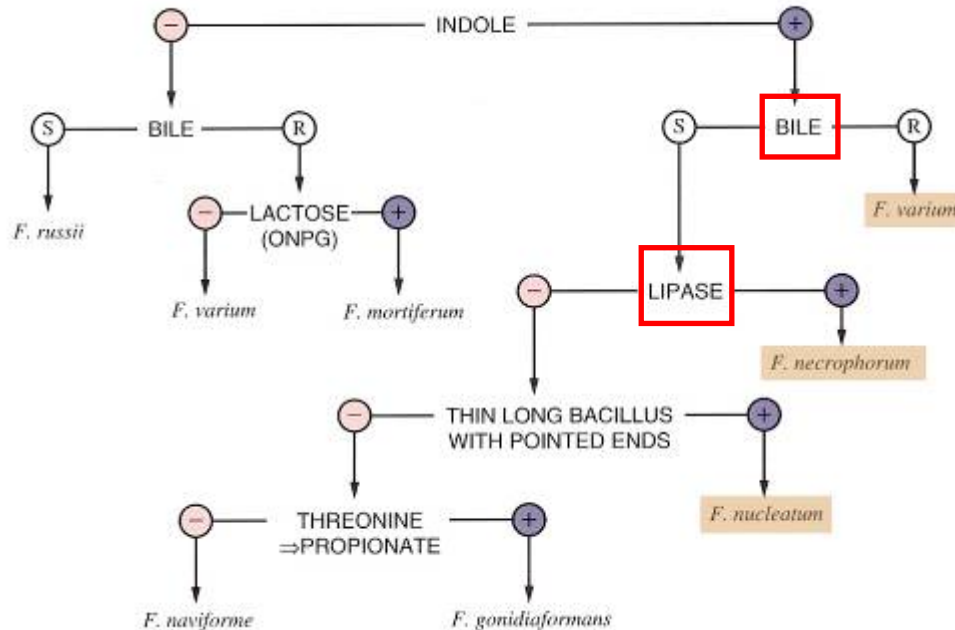
*Prevotella catoniae*  
Παραγωγή χρωστικής (-)



*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 <sup>2</sup>	-	-	-	-	-	+
<i>F. mortiferum</i> <sup>a</sup>	Bizarre; round bodies	-	+	-	4	+ <sup>w</sup>	+	+ <sup>w</sup>	-	-	+
<i>F. naviforme</i>	Boat shape	+	-	-	2	w <sup>-</sup>	-	-	-	-	-
<i>F. necrophorum</i> <sup>b</sup>	Large, pleomorphic	+	- <sup>+</sup>	+ <sup>-</sup>	4 <sup>2</sup>	- <sup>w</sup>	-	-	-	+	+
<i>F. nucleatum</i> <sup>c</sup>	Slender, pointed ends	+	-	-	2	- <sup>w</sup>	-	-	-	-	+
<i>F. russii</i>	Large, rounded ends	-	-	-	2 <sup>-</sup>	-	-	-	-	-	-
<i>F. varium</i>	Large, rounded ends	+ <sup>-</sup>	+	- <sup>+</sup>	4	w <sup>+</sup>	-	+ <sup>w</sup>	-	-	+
<i>F. ulcerans</i> <sup>d</sup>	Large, rounded ends	-	+	-	2	+	-	+ <sup>-</sup>	-	-	+



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

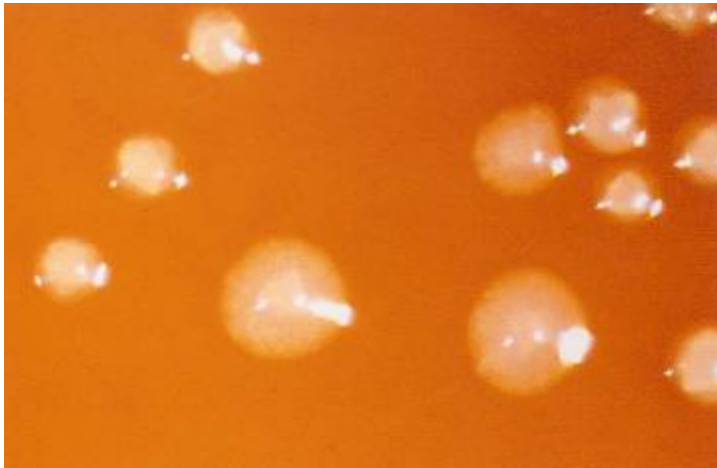
Η αντίδραση φαίνεται στο εσωτερικό του άγαρ σαν θόλωση του υλικού



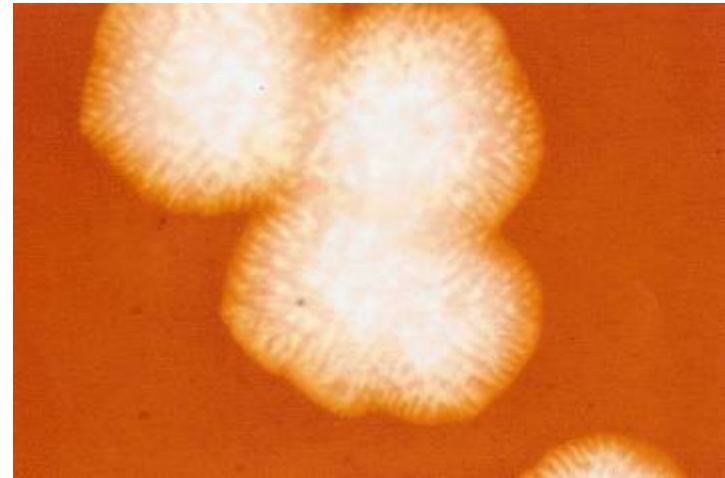
## *Fusobacterium* spp.

---

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	+



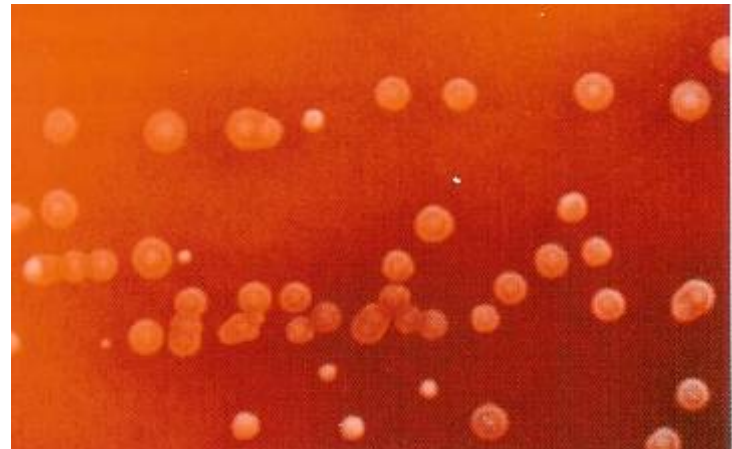
*F. nucleatum* subsp. *nucleatum*



*F. nucleatum* subsp. *polymorphum*



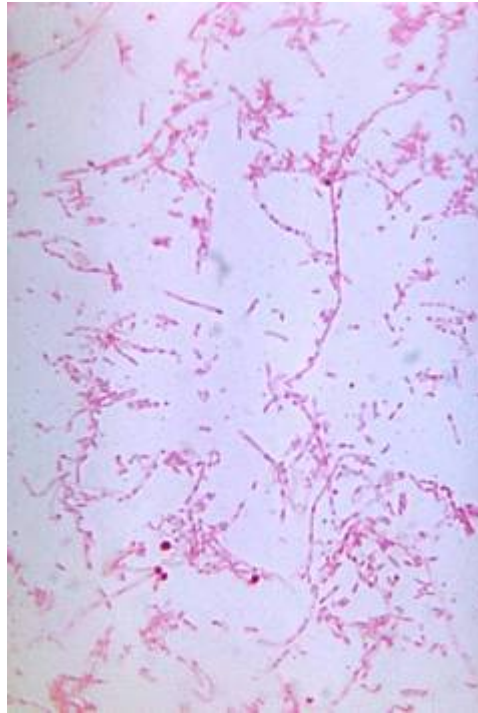
*F. nucleatum* subsp. *fusiforme*



*F. necrophorum*



*F. nucleatum*  
Gram χρώση,  
μονιμοποίηση με  
θέρμανση



*F. necrophorum*  
Gram χρώση,  
μονιμοποίηση με  
θέρμανση



*F. mortiferum*  
Gram χρώση,  
μονιμοποίηση με  
αιθανόλη



# Ταυτοποιητικά συστήματα του εμπορίου

---

## Βιοχημικά σε βυθίσματα (24ωρα)

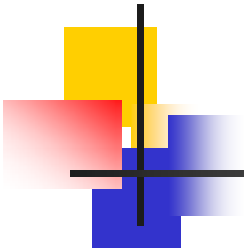
API 20A (bioMerieux) → για σακχαρολυτικά, ταχέως αναπτυσσόμενα (*Bacteroides fragilis* group, *Prevotella* spp.)

## 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

---

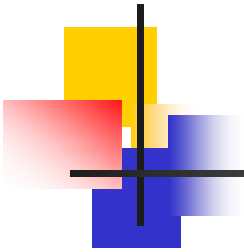
Χαρακτηριστικά αποικιών, παραγωγή χρωστικής, φθορισμός μετά από έκθεση σε UV.

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