

Επαναλαμβανόμενο ενιαίο πρόγραμμα μετεκπαιδευτικών μαθημάτων  
Ελληνικής Μικροβιολογικής Εταιρείας 2012-2013

# Αλγόριθμοι ταυτοποίησης αεροβίων Gram (-) βακτηρίων

Αθηνά Αργυροπούλου

Κλινικός Μικροβιολόγος  
Διευθύντρια  
Μικροβιολογικό Εργαστήριο  
ΓΝΑ «Ο Ευαγγελισμός»



30-10-2012

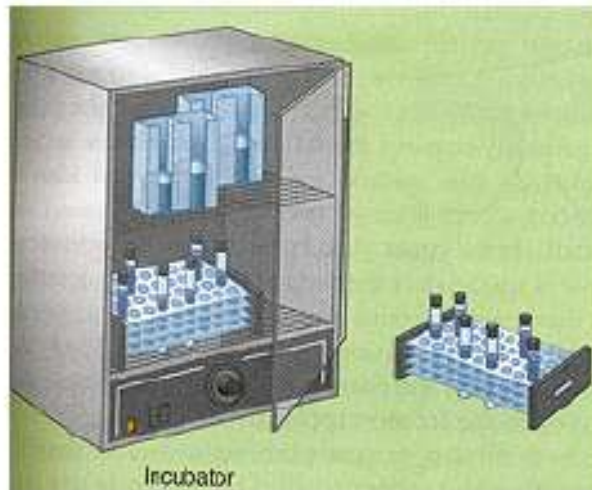


# The Five I's

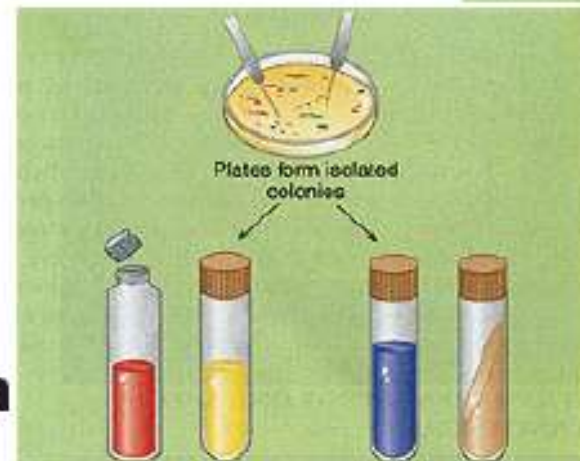
## 1. Inoculation



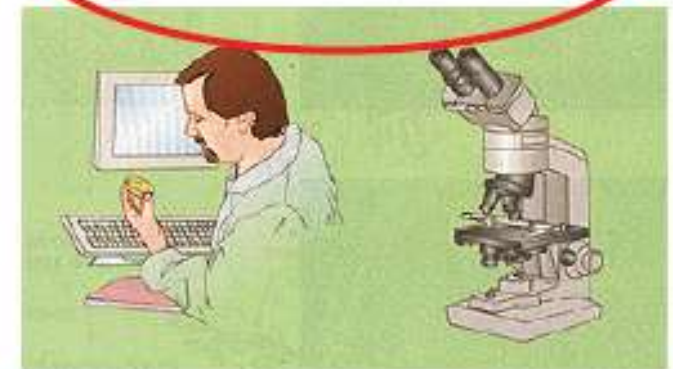
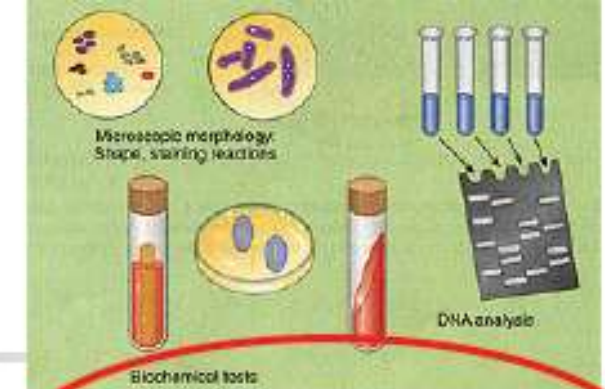
## 2. Incubation



## 3. Isolation



## 5. Identification



## 4. Inspection



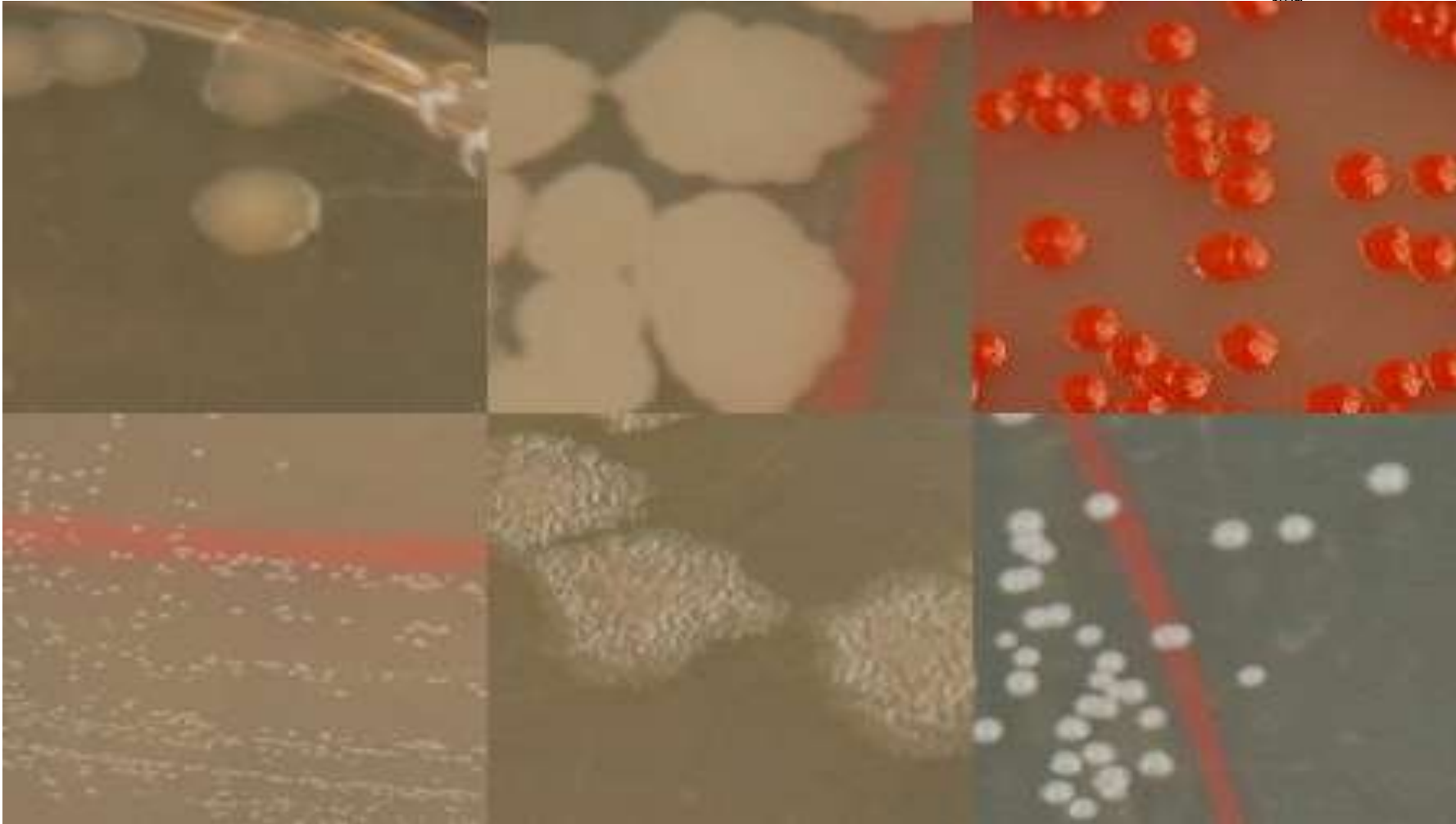
# Ταυτοποίηση βακτηρίων

**Ορισμός:** κατάταξη ενός μικροοργανισμού σε συγκεκριμένο γένος, είδος, ορότυπο, βióτυπο, είδος αντοχής με τη χρησιμοποίηση δοκιμασιών που στηρίζονται σε :

- Μορφολογικά χαρακτηριστικά **Μορφολογία στη χρώση Gram**
- Καλλιεργητικά χαρακτηριστικά (απαραίτητα θρεπτικά υλικά, συνθήκες επώασης, μορφολογία αποικιών)
- Μεταβολικές ιδιότητες (= *διάσπαση υποστρωμάτων, παραγωγή ενζύμων κ.α*) **Βιοχημική ταυτοποίηση**
- Έλεγχος διαφόρων αντιγονικών παραγόντων των μικροοργανισμών, χαρακτηριστικών για κάθε είδος **Ορολογική ταυτοποίηση / τυποποίηση**
- Την ανίχνευση χαρακτηριστικών αλληλουχιών βάσεων στο γενετικό υλικό των μικροοργανισμών με τεχνικές DNA **Μοριακή ταυτοποίηση / τυποποίηση**

# Ταυτοποίηση Βακτηρίων

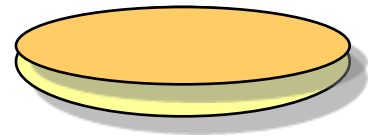
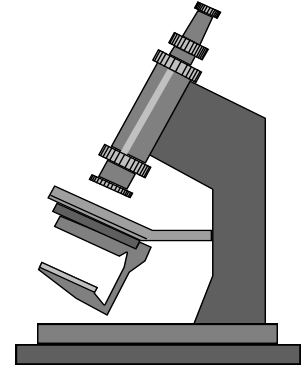
- Μορφολογία αποικιών



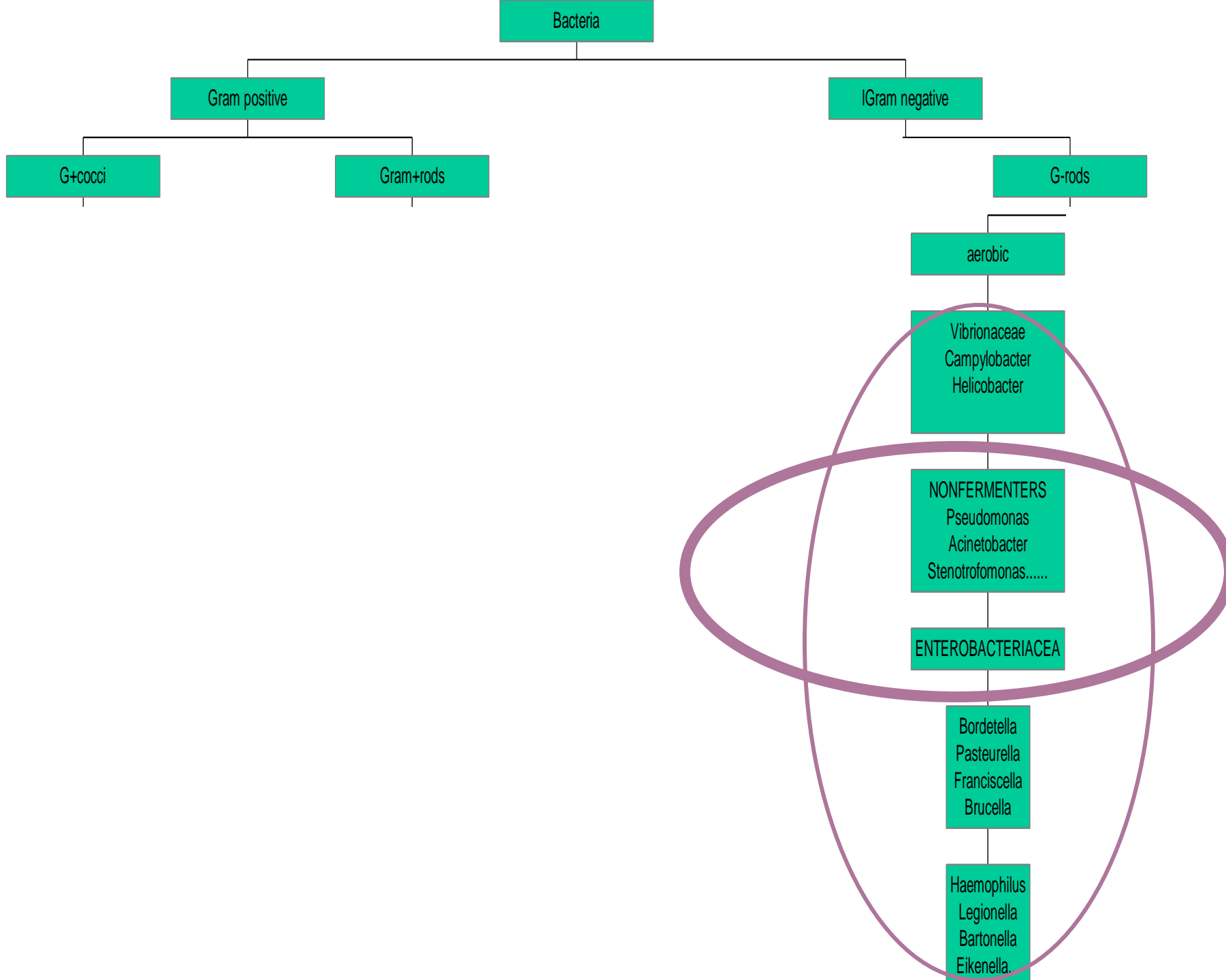
Στη συνέχεια

# Ταυτοποίηση Βακτηρίων

- Μορφολογία αποικιών
- Μικροσκοπική μορφολογία
  - Χρώση Gram (θετικά, αρνητικά)
    - Σχήμα (κόκκος, βακτηρίδιο, κοκκοβακτηρίδιο, σπειρίλιο)
    - Διάταξη (μονήρη, ζεύγη, αλυσίδες, ομάδες)
    - Μέγεθος
- Ανάπτυξη σε εκλεκτικά /διαφοροποιητικά θρεπτικά υλικά
- Συνθήκες ανάπτυξης
  - Αερόβια
  - μικροαερόφιλα
  - αυστηρά αναερόβια
- Αναζήτηση και μελέτη φυσικών/δομικών χαρακτηριστικών (σπόροι, βλεφαρίδες, έλυτρο)
- Ευαισθησία σε αντιβιοτικά
- Βιοχημικές ιδιότητες
- DNA ανάλυση



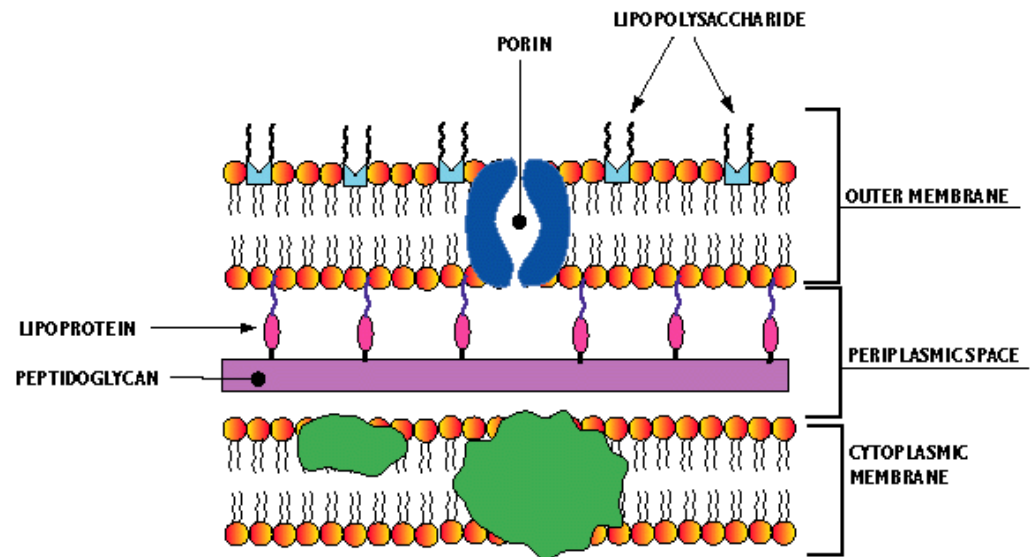




# Αερόβια Gram (-) βακτηρίδια

- Ετερογενής ομάδα
- Πολλές οικογένειες, γένη και είδη
- Πολλά παθογόνα αίτια σοβαρών λοιμώξεων (ενδοτοξίνη)
- Ανάγκη ταχείας και ακριβούς ταυτοποίησης
  - Έγκαιρη και σωστή έναρξη της αντιμικροβιακής αγωγής

- ❖ Εντεροβακτηριακά
- ❖ Αζυμωτικά
- ❖ Ψευδομονάδες

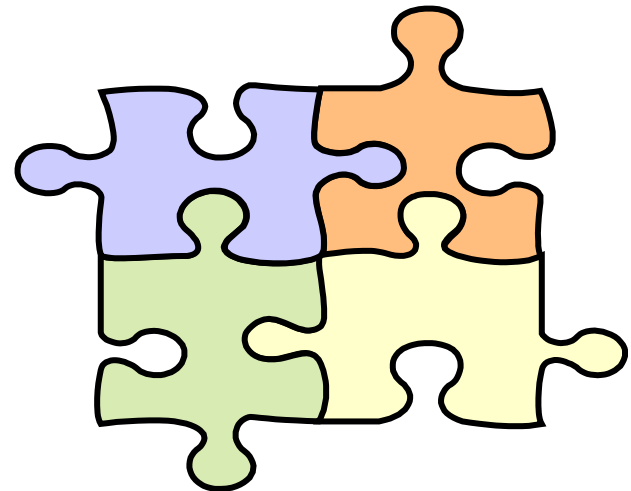


## Πώς γίνεται η ταυτοποίηση;

# Προκαταρκτική ταυτοποίηση

- Μελέτη της μικροβιακής ανάπτυξης στα αρχικά καλλιεργητικά υλικά
- Βασίζεται σε ειδικά και κατάλληλα καλλιεργητικά πρωτόκολλα
  - κλινικό υλικό + κλινικές πληροφορίες
- Σημαντική η συμβολή της άμεσης μικροσκοπικής εξέτασης του υλικού
  - Καταλληλότητα του δείγματος
  - Στοχευμένη αναζήτηση με τροποποίηση του πρωτοκόλλου ή προσθήκη υλικών
- Γίνεται γρήγορα – με την εμφάνιση της πρώτης μικροβιακής ανάπτυξης (18 - 48 ώρες)
- Εκτίμηση του αριθμού των παθογόνων μικροβίων
- Εξάγονται συμπεράσματα για το μικροβιακό γένος
- Κατευθύνει την επιλογή των κατάλληλων δοκιμασιών και τεχνικών που απαιτούνται για την περαιτέρω ταυτοποίηση

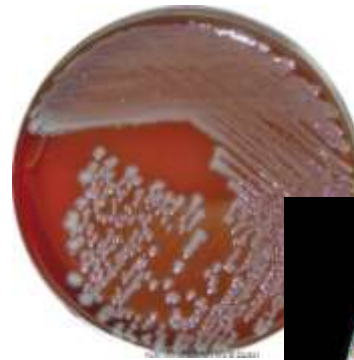
Απαιτεί εμπειρία





# Πρακτικές οδηγίες για την προκαταρκτική ταυτοποίηση

- Παρατήρηση και περιγραφή αποικιών σε κάθε θρεπτικό υλικό
  - πολλές οπτικές γωνίες
  - σωστός φωτισμός
  - χρήση μεγεθυντικού φακού
- Αναζήτηση στοιχείων όπως :
  - Αιμόλυση και είδος αυτής
  - Ερπητισμό των αποικιών
  - Παραγωγή χρωστικής
  - Χαρακτηριστική Οσμή
- Παρατήρηση ανάπτυξης στα θρεπτικά υλικά
  - Ανάπτυξη σε όλα τα υλικά # επιλεκτική ανάπτυξη
  - Ανάπτυξη στα διαφοροποιητικά υλικά



Απόκτηση εμπειρίας

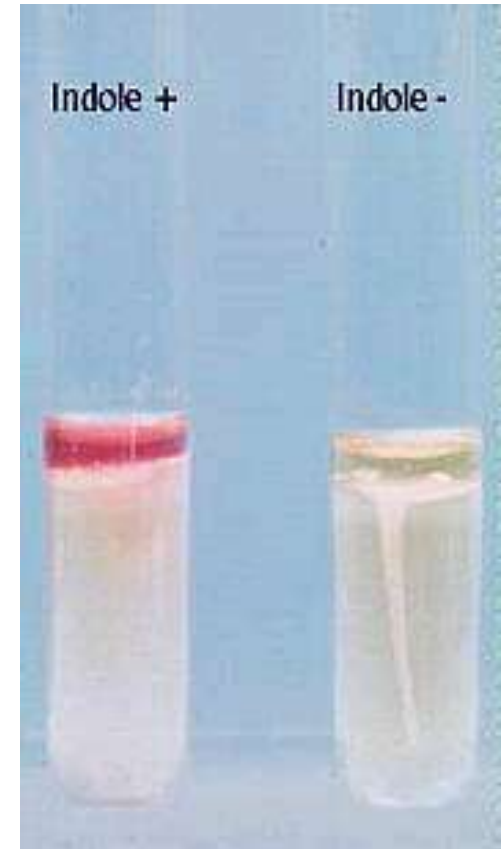
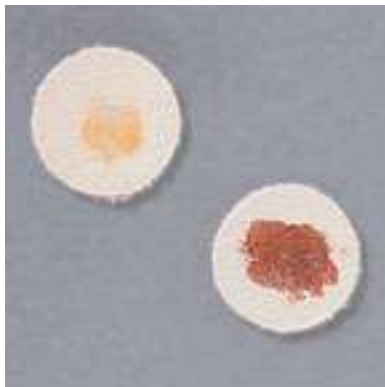


- Χρήση αξιόπιστων και φρέσκων υλικών
- Γνώση ιδιοτήτων θρεπτικών υλικών
- Γνώση βιοχημικών ιδιοτήτων
- Μελέτη απλών αλγορίθμων

Προαπαιτούνται

# Βιοχημικές δοκιμασίες ταχείες / 24ωρες

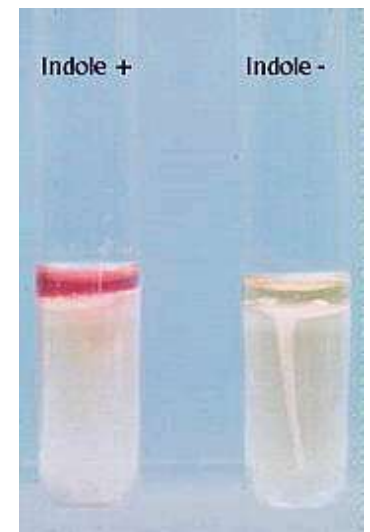
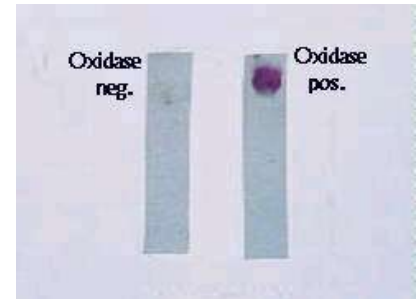
- Καταλάση
- Οξειδάση
- Ινδόλη
- Κιτρικά



Απαιτείται καθαρό καλλιέργημα

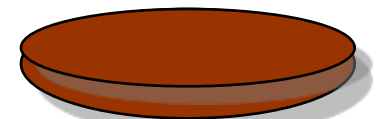
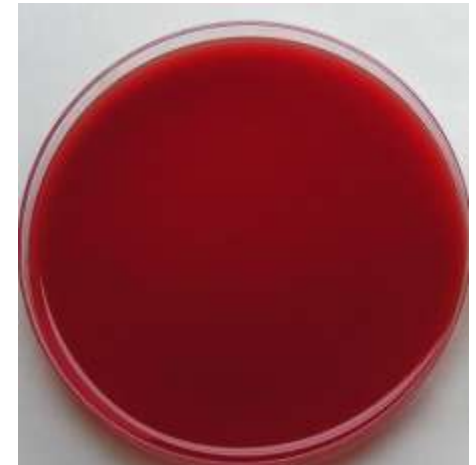
# Προσοχή στις λεπτομέρειες!

- Καταλάση
  - όχι από αιματούχο άγαρ (τα ερυθρά περιέχουν καταλάση)
  - Από φρέσκο καλλιέργημα (γρήγορη απώλεια δραστηριότητας)
- Οξειδάση
  - Προσοχή στο χρόνο ανάγνωσης του αποτελέσματος
  - Θετική ή με καθυστέρημένη εμφάνιση μέχρι το αναγραφόμενο χρονικό όριο
- Ινδόλη
  - Spot test, Kovacs ή Ehrlich's;
  - Απαιτεί μόνο αερόβια επώαση
  - Ιδανικό pH υλικού 7.4 - 7.8. Σε ελάττωση ψευδώς θετικά
- Κιτρικά
  - Σε τυχόν μεταφορά θρεπτικού υλικού ψευδώς θετικά



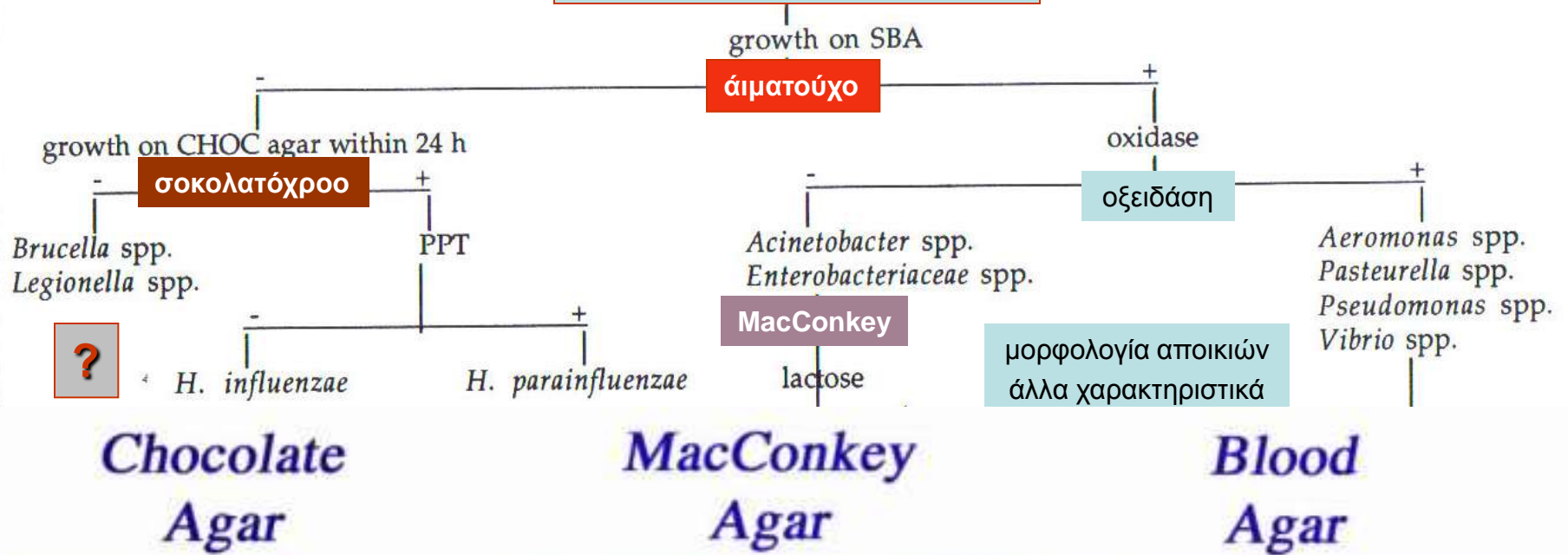
# Απλός αλγόριθμος για Gram (-) βακτηρίδια

- Ένα εμπλουτισμένο θρεπτικό υλικό\*
  - Αιματούχο με ερυθρά προβάτου
- Ένα εκλεκτικό και διαφοροποιητικό υλικό ως προς μια βιοχημική ιδιότητα
  - MacConkey
- Τρείς επιπλέον γρήγορες βιοχημικές δοκιμασίες
- Βάσει ειδικών χαρακτηριστικών ανάπτυξης
- Με εκτίμηση της μορφολογίας των αποικιών
- **Ταυτοποίηση από το πρώτο 24h ανάπτυξης**



\*Προσθήκη Σοκολατόχρους από το πρώτο 24ωρο σε υποψία απαιτητικών

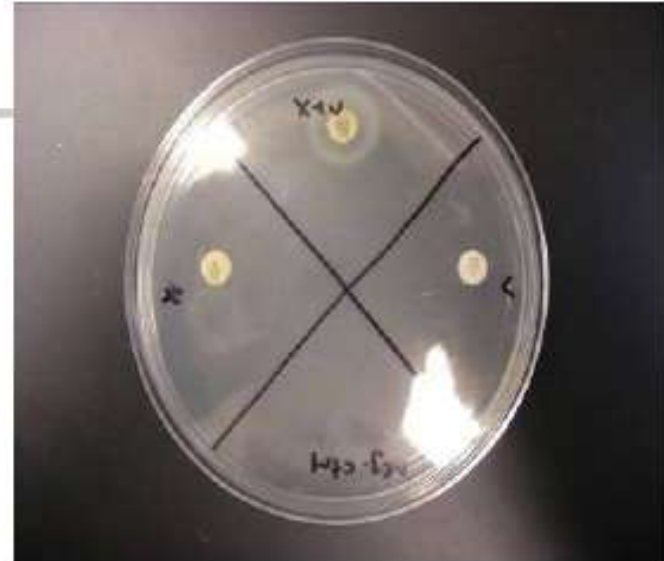
# Gram (-) βακτηρίδια





# Δοκιμασία παραγόντων ανάπτυξης X / V

- Ελέγχουμε την εξάρτηση των αιμοφίλων από τους παράγοντες **X** (protoporphyrin) και **V** (αιμίνη), που βρίσκονται στο αίμα, για να αναπτυχθούν.
- Χρησιμοποιούμε:
  - υλικό χωρίς αίμα και
  - δισκία ποτισμένα με παράγοντες X/V/XV σε απόσταση 3.5 mm,
  - επώαση σε 5% CO<sub>2</sub> 18-24 h
- Ελέγχουμε για ανάπτυξη γύρω από τους δίσκους (εξάρτηση από το συγκεκριμένο παράγοντα)



Είδος	Ανάπτυξη κατά μήκος των ταινιών		
	XV	V	X
<i>H. influenzae</i>	+	-	-
<i>H. aegyptius</i>	+	-	-
<i>H. parainfluenzae</i>	+	+	-
<i>H. parahaemolyticus</i>	+	+	-
<i>H. haemolyticus</i>	+	-	-
<i>H. aphrophilus</i> *	+	-/+	+
<i>H. paraphrophilus</i>	+	+	-



# Βιοχημική Ταυτοποίηση (χεριού) (I)



## Μέθοδος διασταύρωσης αποτελεσμάτων ή σκακιέρα

- Ελέγχεται μεγάλος αριθμός βιοχημικών δοκιμασιών (CDC), πχ για τα εντεροβακτηριακά 47, οι οποίες τα κατατάσσουν σε 28 γένη, 121 είδη και βιοτύπους και πολλά χωρίς όνομα.
- Τα αποτελέσματα των ΒΔ, για τους ενδεικτικούς μικροοργανισμούς είναι αποτυπωμένα σε μεγάλους πίνακες.
- Οριζόντια και κάτω από κάθε δοκιμή αναφέρεται το ποσοστό θετικού αποτελέσματος για κάθε μικροοργανισμό.
- Ανατρέχοντας στους πίνακες αυτούς με τα αποτελέσματα των ΒΔ του άγνωστου μικροοργανισμού τον ταυτοποιούμε.



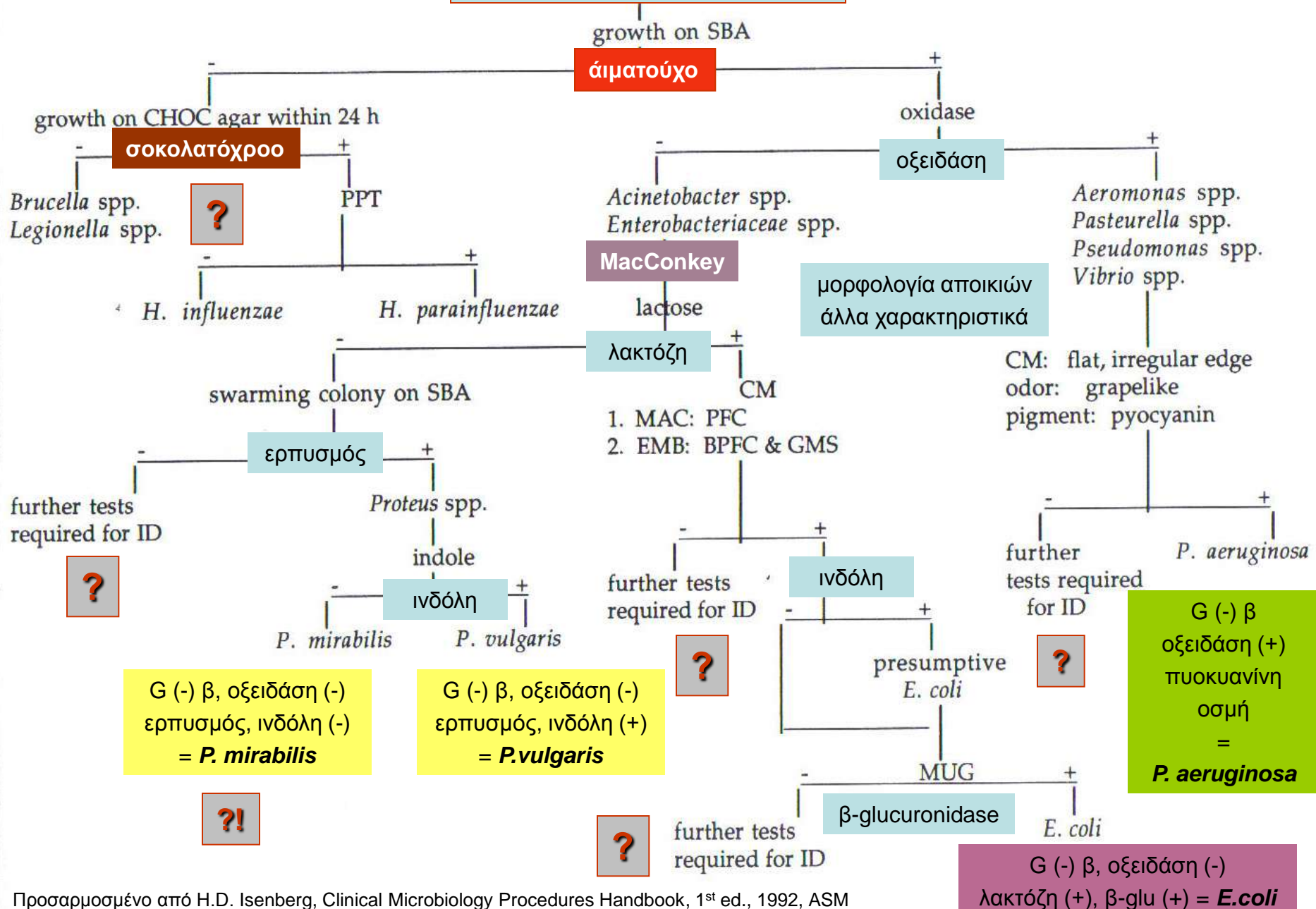
## Βιοχημική Ταυτοποίηση (χεριού) (II)

---

### Μέθοδος διακλαδιζόμενου ή διχοτόμου διαγράμματος ροής

- Μέθοδος απλούστερη
- Ξεκινώντας από τη Gram χρώση(+/-), τη μορφολογία και μία ή δύο χαρακτηριστικές προκαταρκτικές ιδιότητες, πχ οξειδάση (+/-) και ζύμωση της γλυκόζης προχωράμε στην εφαρμογή διαφόρων άλλων ΒΔ και με την αξιολόγηση πάντα του (+/-) αποτελέσματος καταλήγουμε στην τελική ταυτοποίηση των μικροοργανισμών

# Gram (-) βακτηρίδια



# Εντεροβακτηριακά

Πολλά γένη: *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*,  
*Klebsiella*, *Proteus*, *Enterobacter*, *Yersinia*

Ορισμένα στελέχη ευκαιριακά

Ορισμένα στελέχη παθογόνα: *Salmonella*,  
*Shigella*, *Yersinia*, ορισμένα *E. Coli*

Μικρά gram( -)βακτηρίδια  
Χαρακτηριστικές ιδιότητες

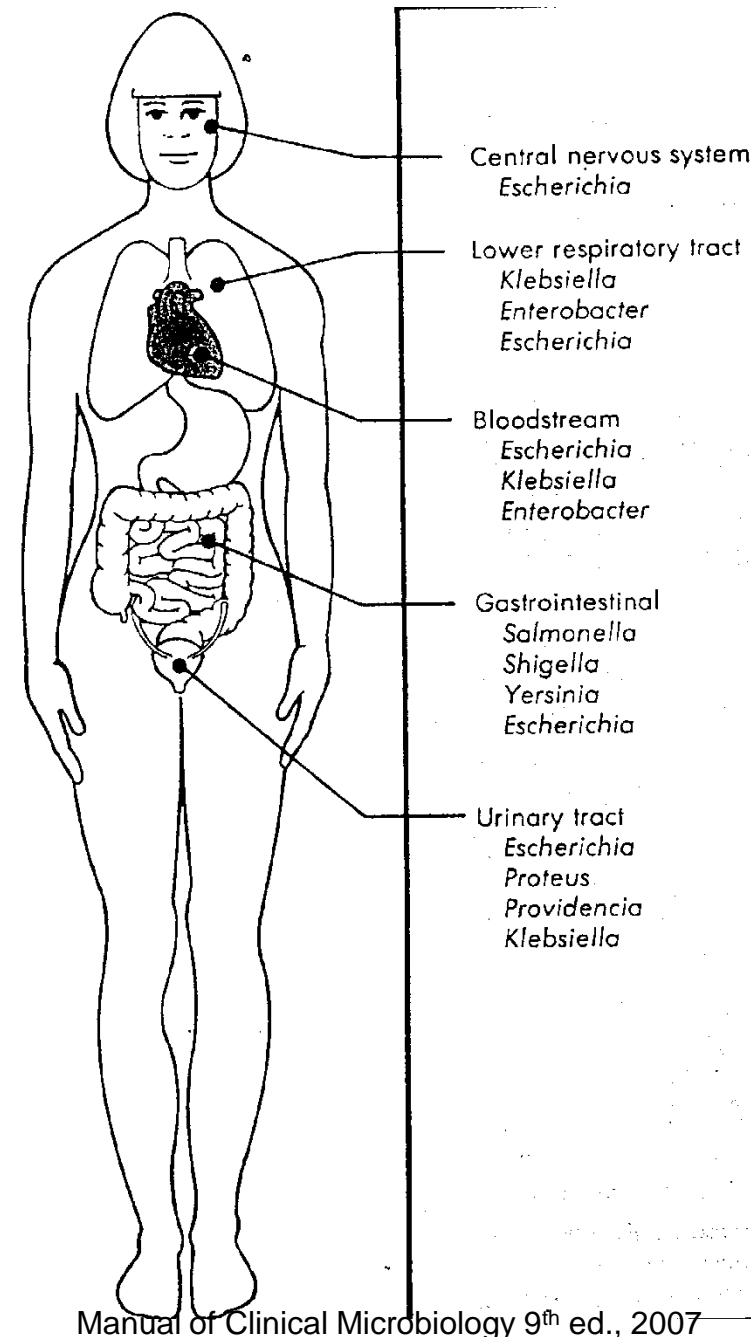
Δυνητικά αναερόβια

Ζυμώνουν την γλυκόζη\*

Οξειδάση αρνητικά\*

Ανάγουν τα νιτρικά σε νιτρώδη

Περισσότερα κινητά (*Shigella* και *Klebsiella* μη κινητά)



\**Plesiomonas shigelloides* 99% Ox (-), 80% Gluc(+), *Serratia fecaria* 8% Ox(-)



# Εντεροβακτηριακά: καλλιέργεια



- Αναπτύσσονται σε
  - Απλά υλικά
    - nutrient agar
  - Εμπλουτισμένα
    - blood agar
  - Εκλεκτικά
    - MacConkey
  - Διαφορο- / διαχωριστικά
    - Desoxycholate Citrate Agar
    - Hektoen Enteric (HE) agar
    - SS agar
    - EMB





# Μορφολογία αποικίας των πλέον κοινών εντεροβακτηριακών σε MacConkey & αιματούχο

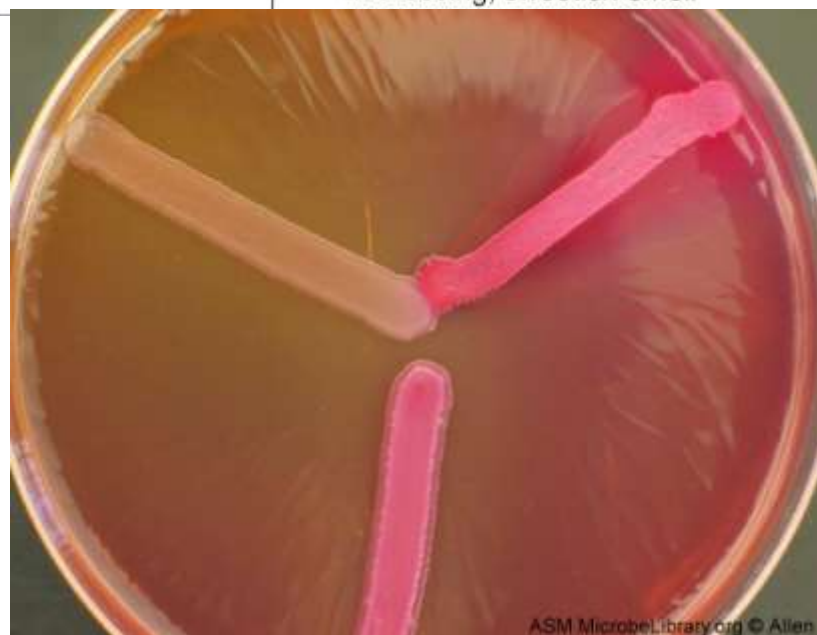
Γένος, είδος	MacConkey	Αιματούχο.
<i>Salmonella, Shigella</i>	άχρωμες, επίπεδες	λείες 2-3mm
<i>E.coli</i> lactose (+)	κόκκινες, ιζήματα χολής	λείες 2-3mm
<i>E. coli</i> lactose (-)	άχρωμες	λείες 2-3mm
<i>Yersinia enterocolitica</i>	άχρωμες <1mm	λείες <1mm
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ρόζ, βλεννώδεις, 3-4μμ	βλεννώδεις 3-4mm
<i>Enterobacter</i>	ρόζ βλεν. όχι όσο Klebs.	λείες 3-4mm
<i>P. vulgaris, P. mirabilis</i>	άχρωμες, επίπεδες 2-3μμ	ερπυσμός
Άλλοι <i>Proteus, Providencia, Morganella</i>	άχρωμες, επίπεδες, δεν ερπύζουν, 2-3μμ	επίπεδες, δεν ερπύζουν, 2-3mm

*Manual of Clinical Microbiology 9th ed., 2007*

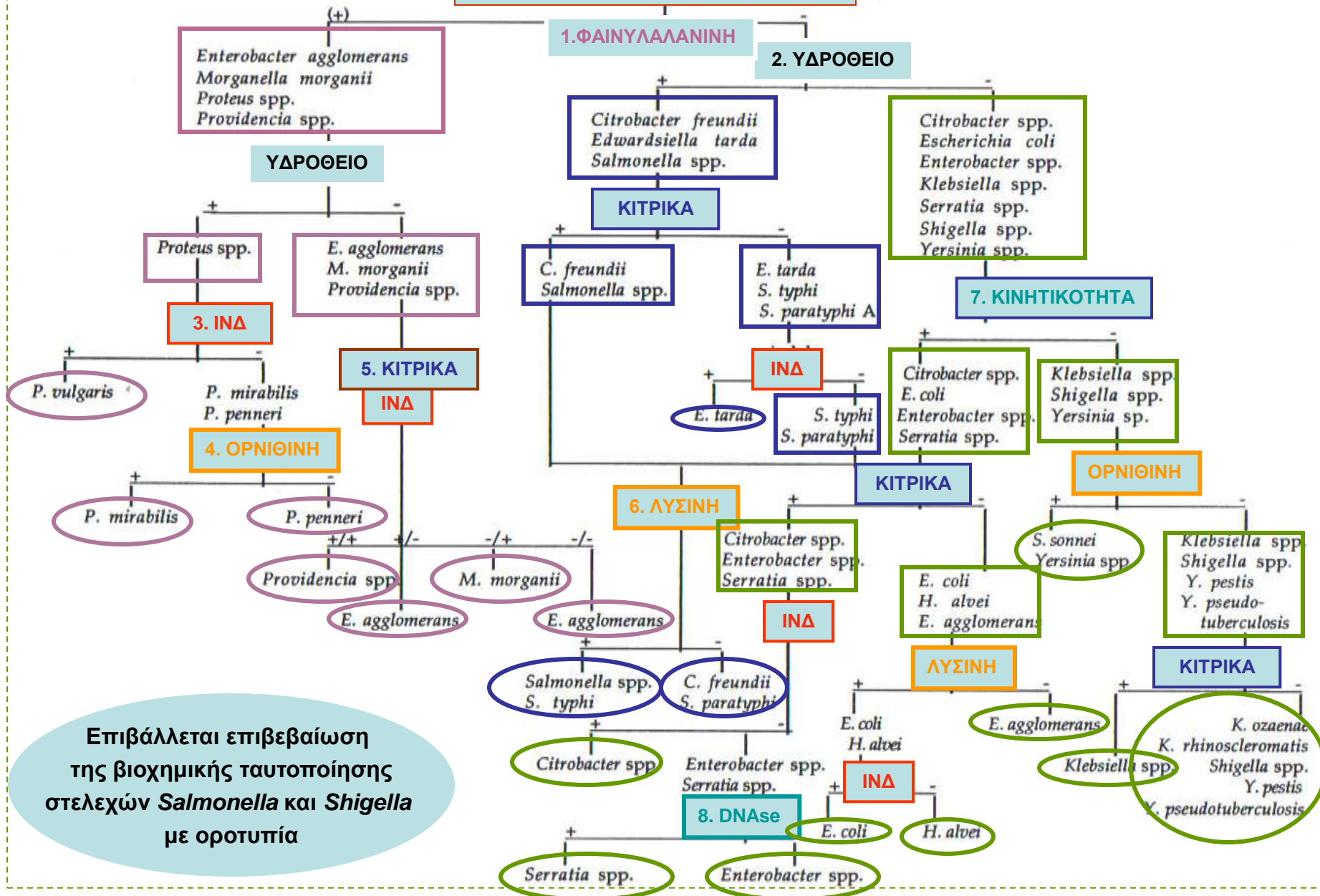


**Table 16–2.** Rapid, presumptive identification of gram-negative enteric bacteria.

Lactose Fermented Rapidly	Lactose Fermented Slowly	Lactose Not Fermented
<p><i>Escherichia coli</i>: metallic sheen on differential media; motile; flat, nonviscous colonies</p> <p><i>Enterobacter aerogenes</i>: raised colonies, no metallic sheen; often motile; more viscous growth</p> <p><i>Klebsiella pneumoniae</i>: very viscous, mucoid growth; nonmotile</p>	<p><i>Edwardsiella</i>, <i>Serratia</i>, <i>Citrobacter</i>, <i>Arizona</i>, <i>Providencia</i>, <i>Erwinia</i></p>	<p><i>Shigella</i> species: nonmotile; no gas from dextrose</p> <p><i>Salmonella</i> species: motile; acid and usually gas from dextrose</p> <p><i>Proteus</i> species: “swarming” on agar; urea rapidly hydrolyzed (smell of ammonia)</p> <p><i>Pseudomonas</i> species (see Chapter 17): soluble pigments, blue-green and fluorescing; sweetish smell</p>



# Εντεροβακτηριακά



# Εντεροβακτηριακά

## 8 Αντιδράσεις

## Ταυτοποίηση σε επίπεδο γένους ή είδους

Επιβάλλεται επιβεβαίωση  
της βιοχημικής ταυτοποίησης  
στελεχών *Salmonella* και *Shigella*  
με οροτυπία

### 1. ΦΑΙΝΥΛΛΑΝΙΝΗ

### 2. ΥΔΡΟΛΥΣΗ ΚΙΤΡΙΚΗΣ

### ΚΙΤΡΙΚΑ

### 3. ΙΝΔ

### 5. ΚΙΤΡΙΚΑ

### ΙΝΔ

### 4. ΟΡΝΙΘΙΝΗ

### 6. ΛΥΣΙΝΗ

### ΙΝΔ

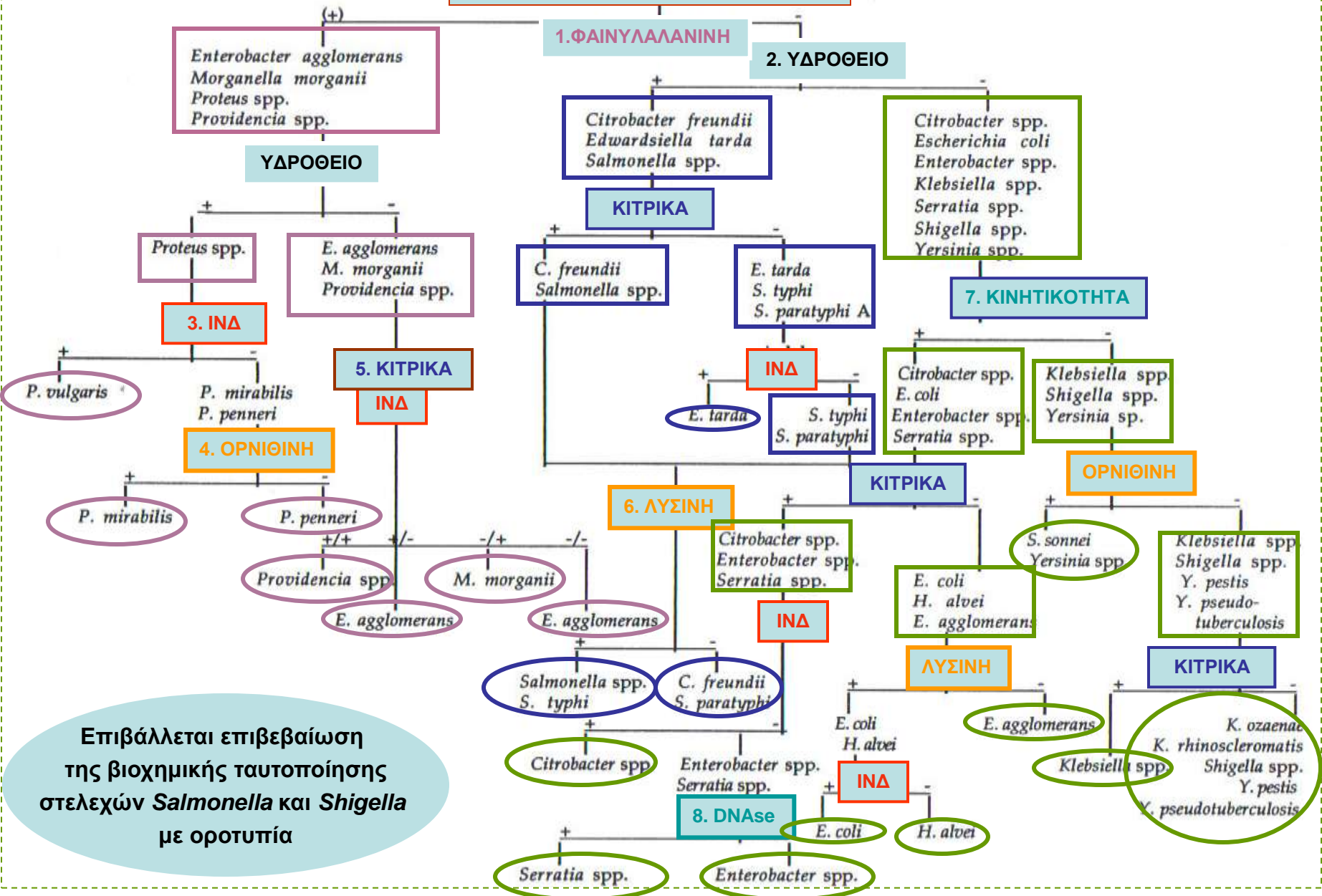
### ΛΥΣΙΝΗ

### ΚΙΤΡΙΚΑ

### 8. DNAse



## Εντεροβακτηριακά



## LISTE DES COLLABORATEURS

ACHARD	Professeur à la Faculté de médecine de Paris, médecin de l'hôpital Beaujon, membre de l'Académie de médecine.
ALGLAVE	Professeur agrégé à la Faculté de médecine de Paris, chirurgien des hôpitaux de Paris.
APERT	Médecin de l'hôpital des Enfants-Malades.
BALTHAZARD	Professeur à la Faculté de médecine de Paris, membre de l'Académie de médecine.
BROCA (André)	Professeur à la Faculté de médecine de Paris, membre de l'Académie de médecine.
CAMUS (Jean)	Professeur agrégé à la Faculté de médecine de Paris, médecin des hôpitaux.
CAMUS (Paul)	Médecin adjoint des Asiles et de Bicêtre.
CARNOT (P.)	Professeur de thérapeutique à la Faculté de médecine de Paris, médecin de l'hôpital Beaujon.
GASTAIGNE	Professeur agrégé à la Faculté de médecine de Paris, médecin de l'hôpital de la Charité.
CHABROL	Chief de clinique de la Faculté de médecine de Paris.
CLAUDE (H.)	Professeur agrégé à la Faculté de médecine de Paris, médecin de l'hôpital Saint-Antoine.
DESGREZ	Professeur à la Faculté de médecine de Paris, membre de l'Académie de médecine.
DESMAREST	Professeur agrégé à la Faculté de médecine de Paris, chirurgien des hôpitaux de Paris.
DOPTER	Professeur à l'École du Val-de-Grâce, membre de l'Académie de médecine.
DUMONT	Interne des hôpitaux de Paris.
DUPRÉ	Professeur à la Faculté de médecine de Paris, médecin de l'École Saint-Antoine, membre de l'Académie de médecine.
FABRE	Professeur à la Faculté de médecine de Lyon.
FAURE (J.-L.)	Professeur à la Faculté de médecine de Paris, chirurgien de l'hôpital Broca.
GARNIER (M.)	Professeur agrégé à la Faculté de médecine de Paris, médecin de l'hôpital Lariboisière.
GILBERT	Professeur à la Faculté de médecine de Paris, médecin de l'Hôtel-Dieu, membre de l'Académie de médecine.
GRÉGOIRE	Professeur agrégé à la Faculté de médecine de Paris, chirurgien des hôpitaux de Paris.
GUIART	Professeur à la Faculté de médecine de Lyon.
JEANSELME	Professeur à la Faculté de médecine de Paris, médecin de l'hôpital Saint-Louis, membre de l'Académie de médecine.
JOMIER	Chief de clinique à la Faculté de médecine de Paris.
JOSUE	Médecin de l'hôpital de la Pitié.
LEGÈNE	Professeur à la Faculté de médecine de Paris, chirurgien des hôpitaux de Paris.
LOEPER	Professeur agrégé à la Faculté de médecine de Paris, médecin de l'hôpital Tenon.
MACAIGNE	Professeur agrégé à la Faculté de médecine de Paris, médecin de l'hôpital Tenon.
MATHIEU	Professeur agrégé à la Faculté de médecine de Paris, chirurgien des hôpitaux de Paris.
OKINCZYC	Professeur agrégé à la Faculté de médecine de Paris, chirurgien des hôpitaux de Paris.
OMBRÉDANNE	Professeur agrégé à la Faculté de médecine de Paris, chirurgien de l'hôpital des Enfants-Malades.
PAILLARD	Ancien interne des hôpitaux de Paris.
PAISSEAU	Médecin des hôpitaux de Paris.
RATHERY	Professeur agrégé à la Faculté de médecine de Paris, médecin de l'hôpital Tenon.
RIBIÈRE	Professeur agrégé à la Faculté de médecine de Paris, médecin de l'hôpital Tenon.
SACQUÉPÉE	Professeur à l'École du Val-de-Grâce.
SAINT GIRON	Chief de laboratoire à la Faculté de médecine de Paris.
SCHWARTZ (A.)	Professeur agrégé à la Faculté de médecine de Paris, chirurgien des hôpitaux de Paris.
SÉBILÉAU	Professeur à la Faculté de médecine de Paris, oto-rhino-laryngologiste de l'hôpital Lariboisière.
SÉZARY	Médecin des hôpitaux de Paris.
SOULIE	Professeur à la Faculté de médecine de Toulouse.
TERRIEN	Professeur agrégé à la Faculté de médecine de Paris, ophtalmologiste de l'hôpital Beaujon.
WIDAL	Professeur à la Faculté de médecine de Paris, médecin de l'hôpital Cochin, membre de l'Institut et de l'Académie de médecine.

## BIBLIOTHÈQUE du DOCTORAT en MÉDECINE

PUBLIÉE SOUS LA DIRECTION DE

A. GILBERT

&

L. FOURNIER

Professeur à la Faculté de médecine de Paris,  
Médecin de l'Hôtel-Dieu,  
Membre de l'Académie de médecine.

Ancien Chef de clinique  
de la Faculté,  
Médecin de l'hôpital Cochin.

## PRÉCIS

DE

# BACTÉRIOLOGIE

PAR

Ch. DOPTER

et

SACQUÉPÉE

PROFESSEURS AU VAL-DE-GRÂCE

DEUXIÈME ÉDITION, ENTIÈREMENT REVISÉE

★ ★

Avec 367 figures noires et coloriées.

PARIS

LIBRAIRIE J.-B. BAILLIÈRE ET FILS

19, RUE HAUTEFEUILLE, 19

1921

Tous droits réservés.



**Tableau indiquant les caractères essentiels du Bacille typhique, du Bacille paratyphique A, du Bacille paratyphique B et du Colibacille.**

*Caractères communs* : Bacilles ou Coccobacilles, ne prenant pas le Gram, non sporulés; se développent en bouillon en donnant un trouble uniforme avec ondes moirées; poussent bien sur la gélatine, sans la liquéfier.

<i>Caractères différentiels.</i>	Bacille typhique.	Bacille paratyphique A.	Bacille paratyphique B	Colibacille.
Mobil. té.	Très mobile; quelques exceptions.	Très mobile.	Très mobile.	Peu mobile, parfois immobile.
Cultivé sur pomme de terre.	Donne culture minime (Cf. <i>trainée de limaçon</i> ).	Culture minime (Cf. <i>Bacille typhique</i> ).	Enduit brun ou jaune, épais; exceptions.	Enduit brun ou jaune, épais.
Cultivé en lait.	Ne modifie pas le milieu.	Ne modifie pas le milieu.	Ne coagule pas; éclaircit tardivement.	Coagule, parfois tardivement.
Cultivé en petit-lait tourné.	Rougit légèrement.	Rougit franchement.	Rougit très vite, puis bleuit ( <i>caméléonage</i> ).	Rougit très fortement.
Cultivé en milieux lactosés.	Ne donne pas de gaz.	Ne donne pas de gaz.	Ne donne pas de gaz.	Dégage des gaz.
Cultivé en milieux glucosés.	Ne donne pas de gaz.	Dégage des gaz.	Dégage des gaz.	Dégage des gaz.
Cultivé sur milieu de Drigalski.	Donne des colonies incolores.	Donne des colonies incolores.	Donne des colonies incolores.	Donne des colonies rouges.
Cultivé sur milieux au rouge neutre.	Ne modifie pas.	Provoque la décoloration et la fluorescence.	Provoque la décoloration et la fluorescence.	Provoque la décoloration et la fluorescence.
Cultivé sur milieux au plomb.	Noircit.	Ne noircit pas.	Noircit.	Ne noircit pas; quelques exceptions.
Formation d'indol.	Ne donne pas d'indol.	Ne donne pas d'indol.	Donne peu (traces) ou pas d'indol.	Donne de l'indol.
A dose limite,				
un Eberth — sérum :	Agglutine.	N'agglutine pas.	N'agglutine pas.	N'agglutine pas.
un Para A — sérum :	N'agglutine pas.	Agglutine.	N'agglutine pas.	N'agglutine pas.
un Para B — sérum :	N'agglutine pas.	N'agglutine pas.	Agglutine; exception : type Gärtner (p. 529).	N'agglutine pas.



Tableau résumant les caractères différentiels des Bacilles dysentériques.

	TYPE SHIGA.	TYPE FLEXNER.	TYPE HISS.	TYPE STRONG.
Production d'indol.....	Pas d'indol.	Indol.	Indol.	Indol.
Lait.....	Pas de coagulation.	Cf. Shiga.	Cf. Shiga.	Cf. Shiga.
Petit-lait tournesolé.....	Rougit faiblement. Redevient améthyste après 24 heures.	Rougit plus que Shiga.	Cf. Flexner.	Cf. Flexner.
Milieux lactosés.....	Pas de fermentation.	Cf. Shiga.	Cf. Shiga.	Cf. Shiga.
Milieux mannités.....	Pas de fermentation.	Fermente (pas de gaz).	Fermente (pas de gaz).	Fermente (pas de gaz).
Milieux maltosés.....	Pas de fermentation.	Fermente (pas de gaz).	Pas de Fermentation.	Pas de Fermentation.
Milieux au neutral-roth.....	Pas de modification.	Cf. Shiga, parfois légère fluorescence.	Cf. Flexner.	Cf. Flexner.
Agglutination avec un Shiga-sérum.....	+	0	0	0
Avec un Flexner-sérum.....	0	+	+	0
Avec un Hiss-sérum.....	0	+	+	0
Avec un Strong-sérum.....	0	0	0	+
Action pathogène expérimentale..	Reproduit la dysenterie expé- rimentale.	Néant.	Néant.	Néant.

**Table 16–4.** Representative antigenic formulas of salmonellae.

O Group	Serotype	Antigenic Formula <sup>1</sup>
D	<i>S typhi</i>	<b>9, 12</b> (Vi):d:—
A	<i>S paratyphi</i> A	<b>1, 2, 12</b> :a—
C <sub>1</sub>	<i>S choleraesuis</i>	<b>6, 7</b> :c:1,5
B	<i>S typhimurium</i>	<b>1, 4, 5, 12</b> :i:1, 2
D	<i>S enteritidis</i>	<b>1, 9, 12</b> :g, m:—

<sup>1</sup>O antigens: boldface numerals.

(Vi): Vi antigen if present.

Phase 1 H antigen: lower-case letter.

Phase 2 H antigen: numeral.

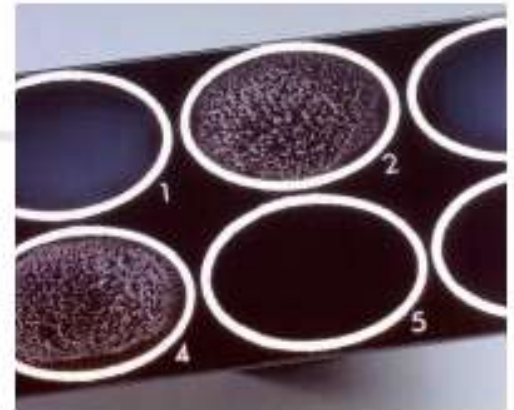
**Table 16–3.** Pathogenic species of shigella.

Present Designation	Group and Type	Mannitol	Ornithine Decarboxylase
<i>S dysenteriae</i>	A	—	—
<i>S flexneri</i>	B	+	—
<i>S boydii</i>	C	+	—
<i>S sonnei</i>	D	+	+



# Ορολογική ταυτοποίηση / Τυποποίηση

Απαιτείται για κλινικούς και  
επιδημιολογικούς κυρίως λόγους:



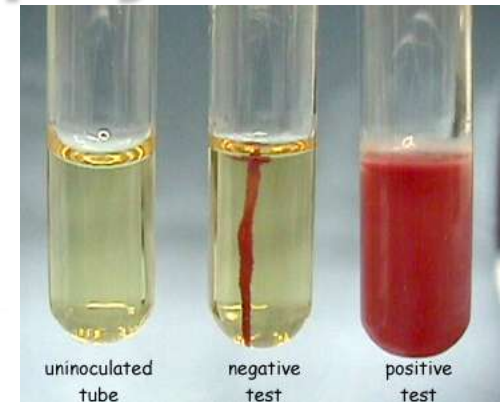
## Συμπλήρωμα της βιοχημικής ταυτοποίησης

- Ομαδοποίηση αιμολυτικών στρεπτοκόκκων (A,B,C,D,F,G)
- Ομαδοποίηση αιμοφίλων (a,b,c,d,e,f)
- Ομαδοποίηση *Salmonella*, *Shigella*, *E. coli*
- Ομαδοποίηση *N. meningitidis* (A,B,C,D,X,Y,Z,W135 )
- Τυποποίηση πνευμονιόκοκκων
- Τυποποίηση βρουκελλών (*B. melitensis*, *B. abortus* )
- Ταυτοποίηση *S.aureus*

1	Indole Production
2	Methyl Red
3	Voges-Proskauer
4	Simmons' Citrate
5	Hydrogen Sulfide
6	Urea Hydrolysis
7	Phenylalanine Deaminase
8	Lysine Decarboxylase
9	Arginine Dihydrolase
10	Ornithine Decarboxylase
11	Motility (36 °C)
12	Gelatin Hydrolysis (22 °C)
13	D-Glucose, Acid
14	D-Glucose, Gas
15	Lactose Fermentation
16	Sucrose Fermentation
17	D-Mannitol Fermentation
18	Dulcitol Fermentation
19	Adonitol Fermentation
20	D-Sorbitol Fermentation
21	L-Arabinose Fermentation
22	Raffinose Fermentation
23	L-Rhamnose Fermentation
24	D-Xylose Fermentation
25	Melibiose Fermentation

## 25 Βιοχημικές Ιδιότητες

*Citrobacter freundii*  
*Enterobacter aerogenes*  
*Escherichia coli*  
*Klebsiella pneumoniae*  
*Klebsiella oxytoca*  
*Morganella morganii*  
*Proteus mirabilis*  
*Salmonella choleraesuis*  
*Salmonella typhi*  
*Salmonella*, most serotypes  
*Serratia marcescens*  
*Shigella sonnei*  
*S dysenteriae*, *S flexneri*, *S boydii*



**Table 16–1.** Examples of biochemical reactions of selected enteric gram-negative rods.<sup>1</sup>

	Indole Production	Methyl Red	Voges-Proskauer	Simmons' Citrate	Hydrogen Sulfide	Urea Hydrolysis	Phenylalanine Deaminase	Lysine Decarboxylase	Arginine Dihydrolase	Ornithine Decarboxylase	Motility (36 °C)	Gelatin Hydrolysis (22 °C)	D-Glucose, Acid	D-Glucose, Gas	Lactose Fermentation	Sucrose Fermentation	D-Mannitol Fermentation	Dulcitol Fermentation	Adonitol Fermentation	D-Sorbitol Fermentation	L-Arabinose Fermentation	Raffinose Fermentation	L-Rhamnose Fermentation	D-Xylose Fermentation	Melibiose Fermentation
<i>Citrobacter freundii</i>	5	100	0	95	80	70	0	0	65	20	95	0	100	95	50	30	99	55	0	98	100	30	99	99	50
<i>Enterobacter aerogenes</i>	0	5	98	95	0	2	0	98	0	98	97	0	100	100	95	100	100	5	98	100	100	96	99	100	99
<i>Escherichia coli</i>	98	99	0	1	1	1	0	90	17	65	95	0	100	95	95	50	98	60	5	94	99	50	80	95	75
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0	10	98	98	0	95	0	98	0	0	0	0	100	97	98	99	99	30	90	99	99	99	99	99	99
<i>Klebsiella oxytoca</i>	99	20	95	95	0	90	1	99	0	0	0	0	100	97	100	100	99	55	99	99	98	100	100	100	99
<i>Morganella morganii</i>	98	97	0	0	5	98	95	0	0	98	95	0	100	90	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Proteus mirabilis</i>	2	97	50	65	98	98	98	0	0	99	95	90	100	96	2	15	0	0	0	0	0	1	1	98	0
<i>Salmonella choleraesuis</i>	0	100	0	25	50	0	0	95	55	100	95	0	100	95	0	0	98	5	0	90	0	1	100	98	45
<i>Salmonella typhi</i>	0	100	0	0	97	0	0	98	3	0	97	0	100	0	1	0	100	0	0	99	2	0	0	82	100
<i>Salmonella</i> , most serotypes	1	100	0	95	95	1	0	98	70	97	95	0	100	96	1	1	100	96	0	95	99	2	95	97	95
<i>Serratia marcescens</i>	1	20	98	98	0	15	0	99	0	99	97	90	100	55	2	99	99	0	40	99	0	2	0	7	0
<i>Shigella sonnei</i>	0	100	0	0	0	0	0	0	2	98	0	0	100	0	2	1	99	0	0	2	95	3	75	2	25
<i>S dysenteriae</i> , <i>S flexneri</i> , <i>S boydii</i>	50	100	0	0	0	0	0	0	5	1	0	0	100	2	0	0	93	2	0	30	60	50	5	2	50

<sup>1</sup> Adapted from Farmer JJ III et al: Biochemical identification of new species and biogroups of Enterobacteriaceae isolated from clinical specimens. J Clin Microbiol 1984;21:46.



# Εμπορικά ταυτοποιητικά αντιδραστήρια

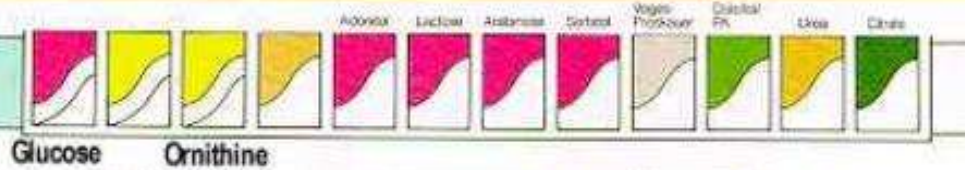


20 Δοκιμασίες

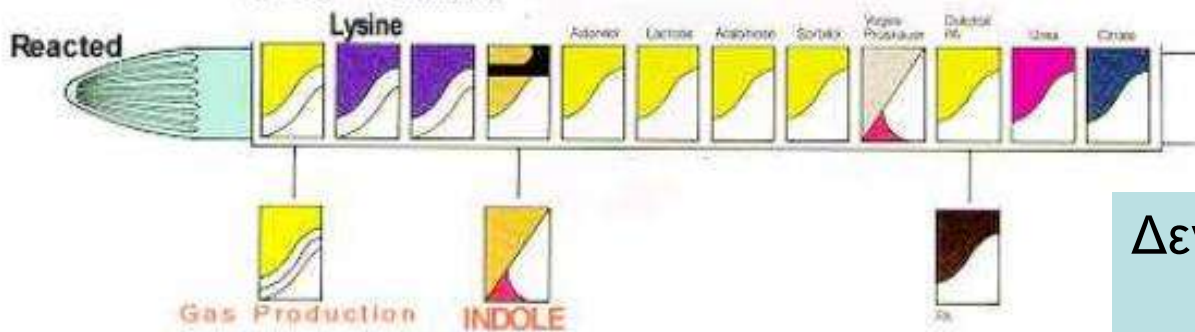
API Strip for *Enterobacteriaceae* ID



Uninoculated



Reacted



Δεν περιλαμβάνονται πάντα  
οι ίδιες δοκιμασίες

16 Δοκιμασίες

Enterotube II Identification Method for Enterobacteriaceae

Υπάρχει αλληλοσυμπλήρωση



api 20E



ONPG ADH LOC ODC CIT H2S URE TDA IND VP



GEL GLU MAN INO SOR PHA SAC MEL AMY ARA

api 20E



ONPG ADH LOC ODC CIT H2S URE TDA IND VP



GEL GLU MAN INO SOR PHA SAC MEL AMY ARA

api 20E



ONPG ADH LOC ODC CIT H2S URE TDA IND VP



GEL GLU MAN INO SOR PHA SAC MEL AMY ARA

8-0-1

KRST 53

5055

# Becton, Dickinson and Company PHOENIX

- Πλήρως αυτοματοποιημένο σύστημα
- Ταυτοποίησης βακτηρίων
- Υπολογισμός ΕΑΠ
- Ανάγνωση αντιδράσεων με χρήση red, green and blue LED and UV



Type: Gram Negative Identification  
 Status: TRANS (02.25)  
 Organism: Rhizobium radiobacter  
 Origin: GN Identification

APPA	-	ADO	+	PyrA	+	lARL	+	dCEL	-	BGAL	+
H2S	-	BNAG	+	AGLTp	-	dGLU	-	GGT	-	OFF	-
BGLU	+	dMAL	-	dMAN	-	dMNE	-	BXYL	-	BAlap	-
ProA	-	LIP	-	PLE	-	TyrA	+	URE	+	dSOR	-
SAC	-	dTAG	-	dTRE	-	CIT	-	MNT	-	5KG	-
lLATk	-	AGLU	+	SUCT	-	NAGA	-	AGAL	-	PHOS	-
GlyA	-	ODC	-	LDC	-	lHISa	-	CMT	-	BGUR	-
O129R	-	GGAA	-	lMLTa	-	ELLM	+	lLATa	-		

Confidence Level: Excellent Identification

Probability Organism  
 99.00 Rhizobium radiobacter



# Αζυμωτικά Gram- Αρνητικά Βακτηρίδια (nonfermenters)

- Ανομοιογενής ομάδα μικροοργανισμών
- Σαπρόφυτα του περιβάλλοντος
- Προκαλούν ευκαιριακές λοιμώξεις
  - Ανοσοκαταστολή
  - Παρουσία Ξένου σώματος
  - Τραυματισμούς
- Προκαλούν νοσοκομειακές λοιμώξεις
  - Αναπνευστήρες, υγρά διάλυσης, καθετήρες
- Οριστική ταυτοποίηση συχνά απαιτεί πολυφασικές μεθόδους
- Προτυπωμένες μέθοδοι ελέγχου της in vitro ευαισθησίας υπάρχουν μόνο για ορισμένα
- Εμφανίζουν φυσική ή επίκτητη αντοχή



# Αζυμωτικά Gram- Αρνητικά Βακτηρίδια

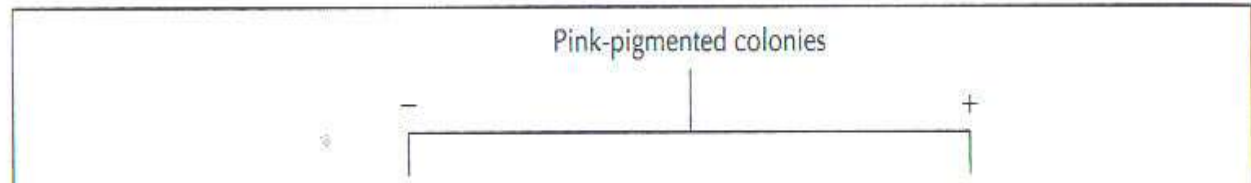
## Ταυτοποίηση

- Απαραίτητη για την επιλογή της κατάλληλης θεραπείας
- Απαραίτητη για επιδημιολογικό έλεγχο
- Εμφανίζει προβλήματα
  - Φαινοτυπικοί χαρακτήρες μικρής διαγνωστικής αξίας
  - Παρεμφερή Βιοχημικά προφίλ
- Για την οριστική ταυτοποίηση συχνά απαιτούνται και μοριακές μέθοδοι
- Επέρχονται συχνές μεταβολές στην ονοματολογία και ταξινόμηση
- Ορισμένα γένη διακρίνονται περαιτέρω σε γονοείδη.
  - 33 γονοείδη *Acinetobacter*

# Γενικά Χαρακτηριστικά Αζυμωτικών

- Ποικίλουν μορφολογικά και βιοχημικά
- Μεγάλη ανάπτυξη στην επιφάνεια του Kligler iron (TSI) χωρίς ανάπτυξη στον πυθμένα ή οξינוποίηση (αρνητική δοκιμασία)
- Τα αζυμωτικά που διασπούν οξειδωτικά (αεροβίως) τους υδατάνθρακες ονομάζονται οξειδωτές (oxidizers) ή σακχαρολυτικά
- Τα αζυμωτικά που ΔΕΝ μπορούν να διασπάσουν τους υδατάνθρακες με ζύμωση ή οξείδωση ονομάζονται βιοχημικά αδρανή (biochemically inert, nonoxidizers) ή ασακχαρολυτικά
- Η οξειδωτικές ή οι ζυμωτικές ιδιότητες ελέγχονται με χρήση OF (oxidative/fermentative) υλικών
- Στα εμπορικά βιοχημικά ταυτοποιητικά κιτ ΔΕΝ θετικοποιούνται στις 24 ώρες

# Αζυμωτικά



1. Οξειδάση-αρνητικά (*Acinetobacter*)
2. Οξειδάση (+), ινδόλη (-), ασακχαρολυτικά αζυμωτικά κοκκοβακτηρίδια
3. Οξειδάση (+), ινδόλη (-), ασακχαρολυτικά βακτηρίδια
4. Οξειδάση (+), ινδόλη (-), σακχαρολυτικά κινητά, αζυμωτικά βακτηρίδια
5. Οξειδάση (+), ινδόλη (-), σακχαρολυτικά ακίνητα, αζυμωτικά κοκκοβακτηρίδια ή βακτηρίδια
6. Halophilic nonfermenters που απαιτούν NaCl
7. Με ρόζ αποικίες
8. Οξειδάση (+), ινδόλη (+), σακχαρολυτικά κινητά ή ακίνητα με παραγωγή κίτρινης αποικίας, αζυμωτικά βακτηρίδια

FIGURE 1 Identification of miscellaneous gram-negative nonfermenters. KIA, Kligler iron agar; TSI, triple sugar iron agar.

8 ομάδες

# Αζυμωτικά

- Χρώση αποικιών
- Οξειδάση
- Παραγωγή H<sub>2</sub>S
- Ανάπτυξη σε NaCl
- Ινδόλη
- Οξειδωση γλυκόζης
- Κινητικότητα
- Μορφολογία

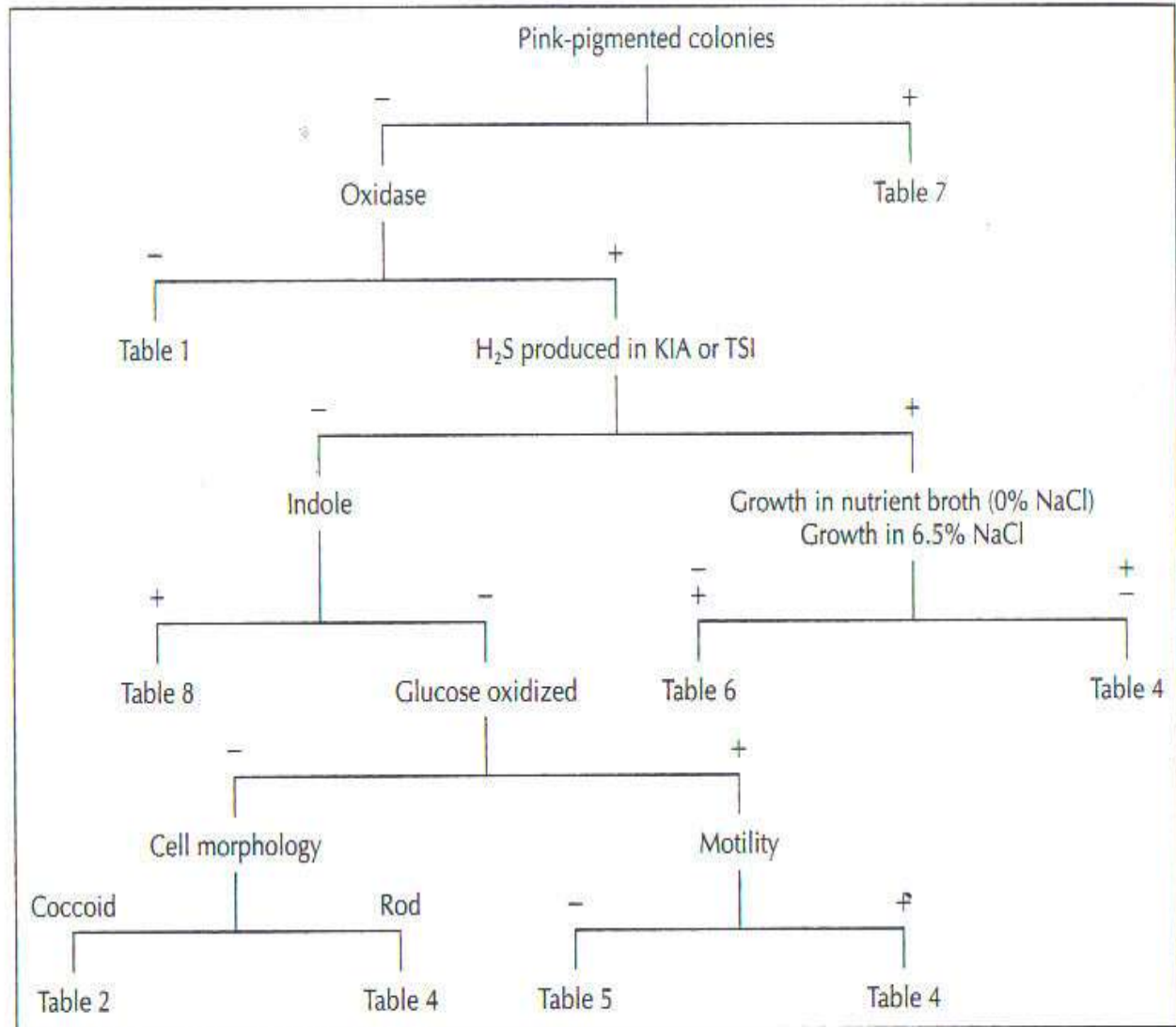


FIGURE 1 Identification of miscellaneous gram-negative nonfermenters. KIA, Kligler iron agar; TSI, triple sugar iron agar.

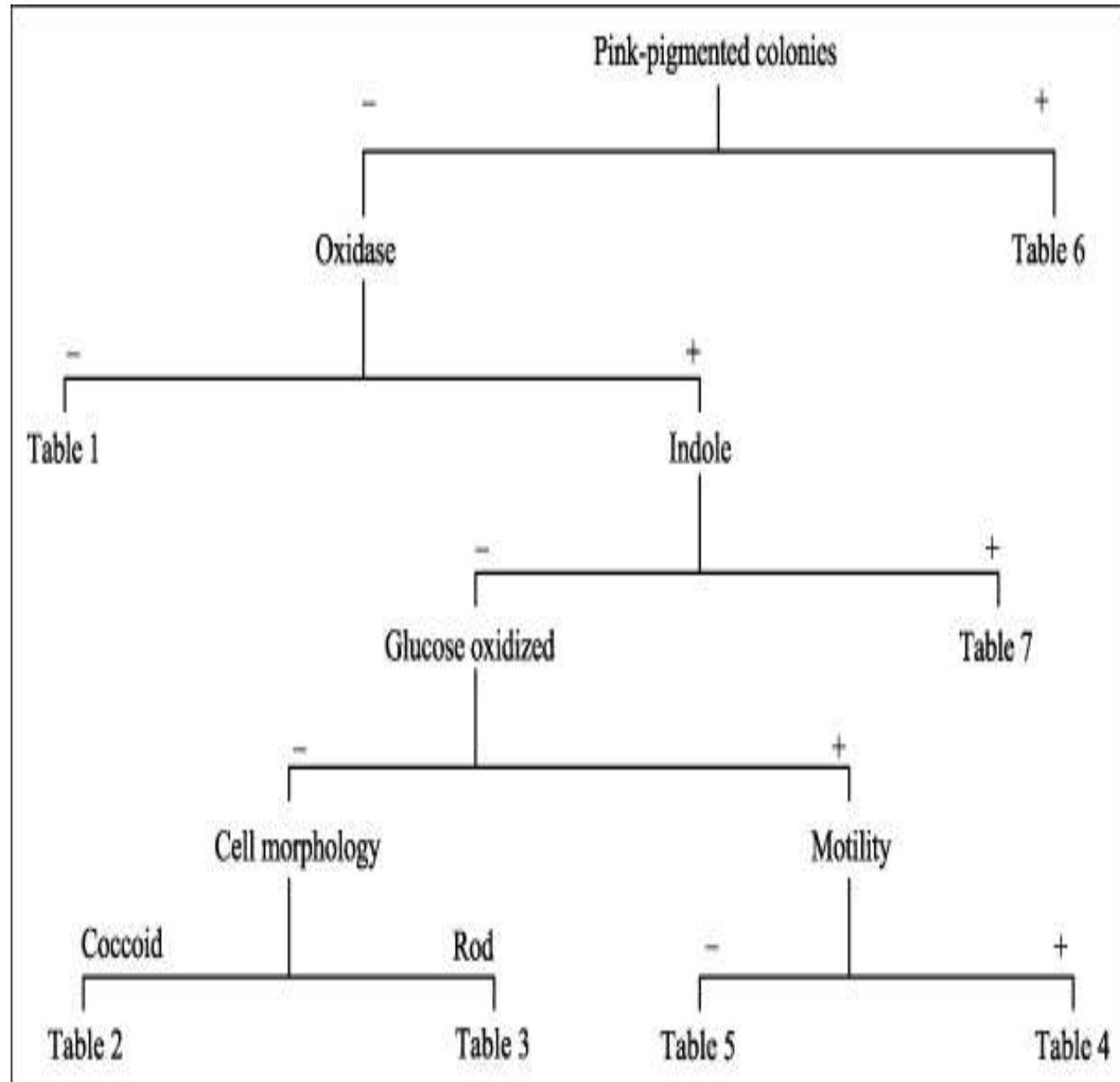
8 ομάδες



# Αζυμωτικά

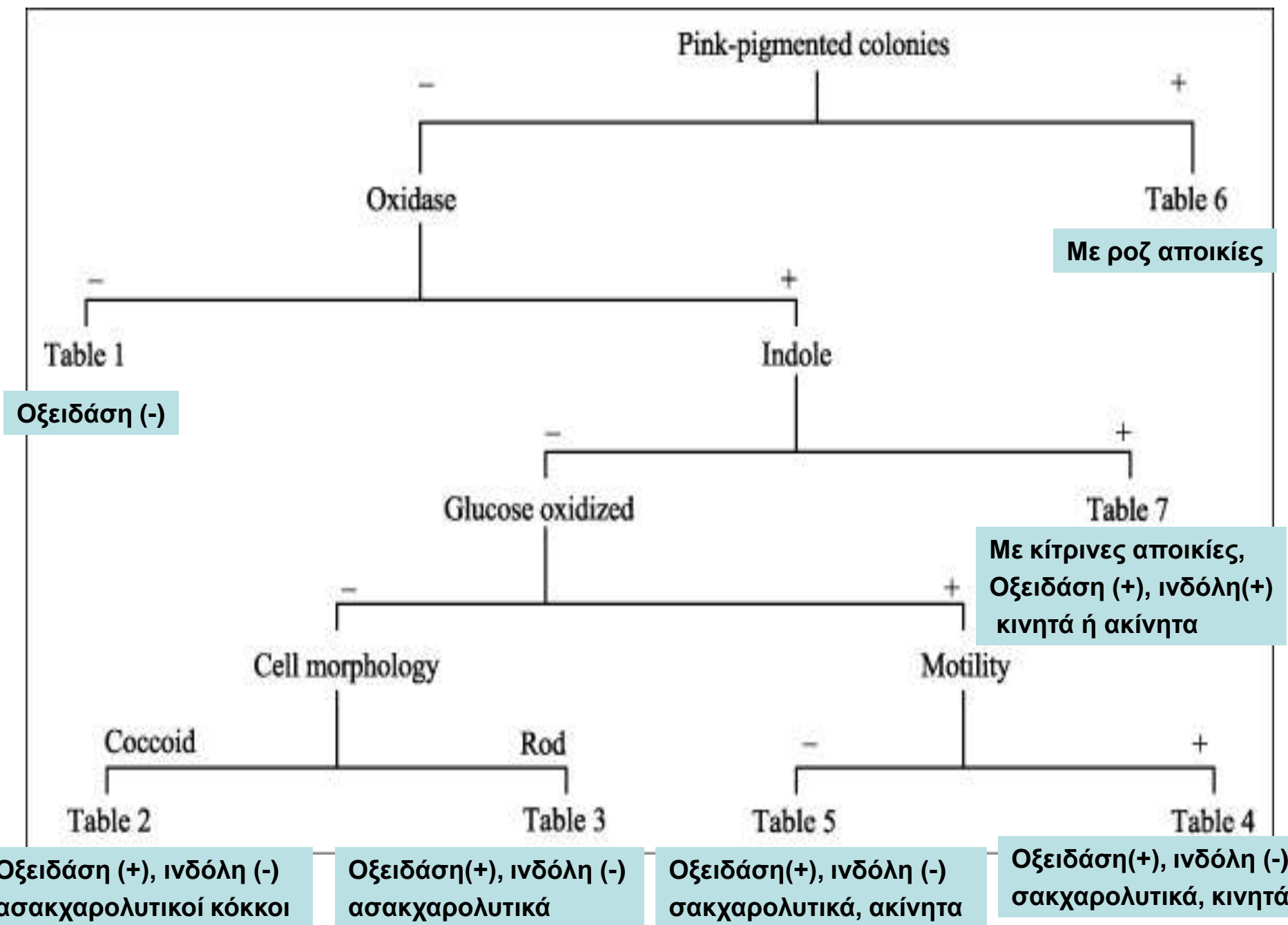
- Χρώση αποικιών
- Οξειδάση
- Ινδόλη
- Οξείδωση γλυκόζης
- Κινητικότητα
- Μορφολογία

7 ομάδες



# 7 ομάδες αζυμωτικών

1. Οξειδάση-αρνητικά
2. Οξειδάση-θετικοί, ινδόλη-αρνητικοί, ασακχαρολυτικοί κόκκοι
3. Οξειδάση-θετικά, ινδόλη-αρνητικά, ασακχαρολυτικά βακτηρίδια
4. Οξειδάση-θετικά, ινδόλη-αρνητικά, σακχαρολυτικά κινητά βακτηρίδια
5. Οξειδάση-θετικά, ινδόλη-αρνητικά, σακχαρολυτικά μη κινητά βακτηρίδια
6. Αζυμωτικά με ροζ αποικίες
7. Αζυμωτικά με κίτρινες αποικίες, οξειδάση-θετικά, ινδόλη-θετικά κινητά ή ακίνητα



Pink-pigmented colonies

Asaia spp  
Methylobacterium spp  
Roseomonas and Azospirillum spp

Table 6

Table

Acinet  
CDC C  
CDC C  
Border  
Genus

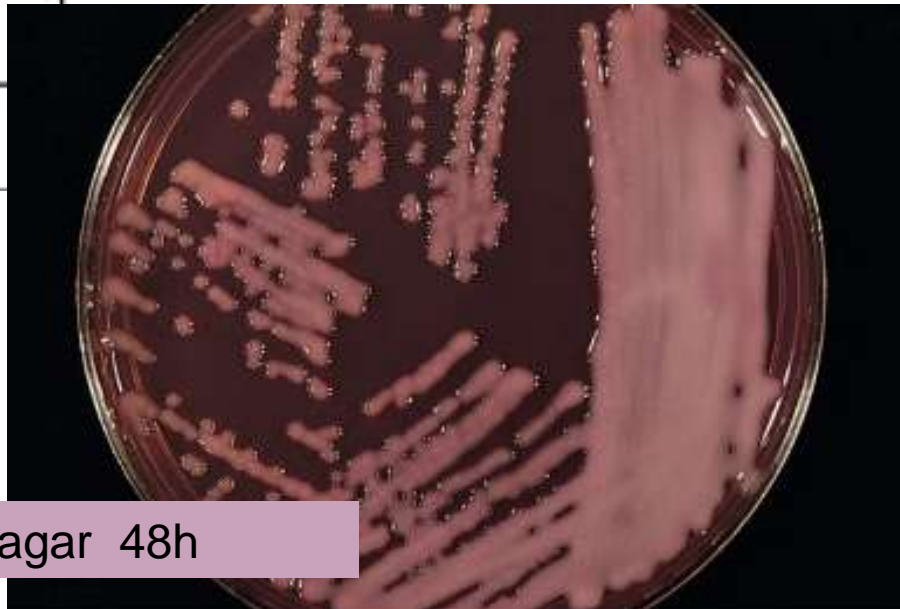


- Sabouraud's Dextrose agar 48h

Cell morphology

Coccioid

Table 2



- MacConkey agar 48h

+

Table 4

Achromobacter xylosoxidans  
Ochrobactrum Species  
and Achromobacter Groups B, E and F  
Rhizobium radiobacter  
Agrobacterium Yellow Group  
CDC Group Ic  
CDC Groups O-1, O-2 and O-3  
Halomonas venusta  
& CDC Halophilic Nonfermenter Group 1  
Herbaspirillum Species 3  
Inquillinus limosus  
Massilia timonae  
OFBA-1, Pseudomonas-Like Group 2  
Sphingomonas spp, Thermophilic Bacteria

Psychrobacter phenylpyruvicus  
Moraxella spp  
Moraxella catarrhalis  
Oligella spp  
Haematobacter spp (proposed)



# Pseudomonas

- Μεγάλο και πολύπλοκο μικροβιακό γένος
- Πολλά είδη κλινικής σημασίας είναι ετερογενή και διακρίνονται σε biovars και genomovars (γονοείδη)
- Genomovar: γενετικά διακριτές ομάδες που επιβάλλουν τη διάκριση τους σε είδη, αλλά στερούνται διακριτικών βιοχημικών χαρακτηριστικών. Καθορίζονται με συνδυασμό μεθόδων (DNA-DNA reassociation experiments, 16S rRNA gene sequencing, chemotaxonomic total fatty acid analysis, total protein pattern analysis)

- Fluorescent Group

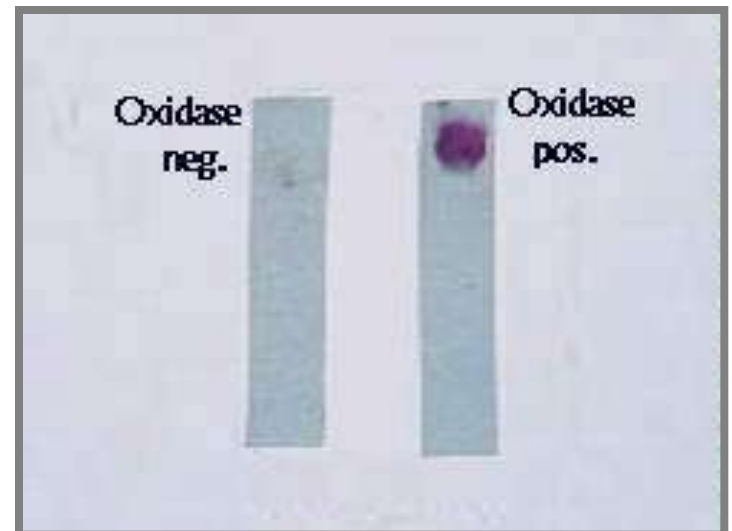
- *P.aeruginosa*
- *P.fluorescens* & *P.putida*
- *P.veronii*, *P.monteilii* & *P.mosselii*

- Nonfluorescent Group

- *P.stutzeri* & *P.mendocina*
- *P.alcaligenes* & *P.pseudoalcaligenes*
- *P.luteola* & *P.oryzihabitans*

# *Pseudomonas aeruginosa*

- Δεν ζυμώνει την γλυκόζη
- Δεν ανάγει τα νιτρικά
- Οξειδάση θετικό
- Αυστηρά αερόβια
- Καταλάση θετικό
- Κινητό βακτηρίδιο

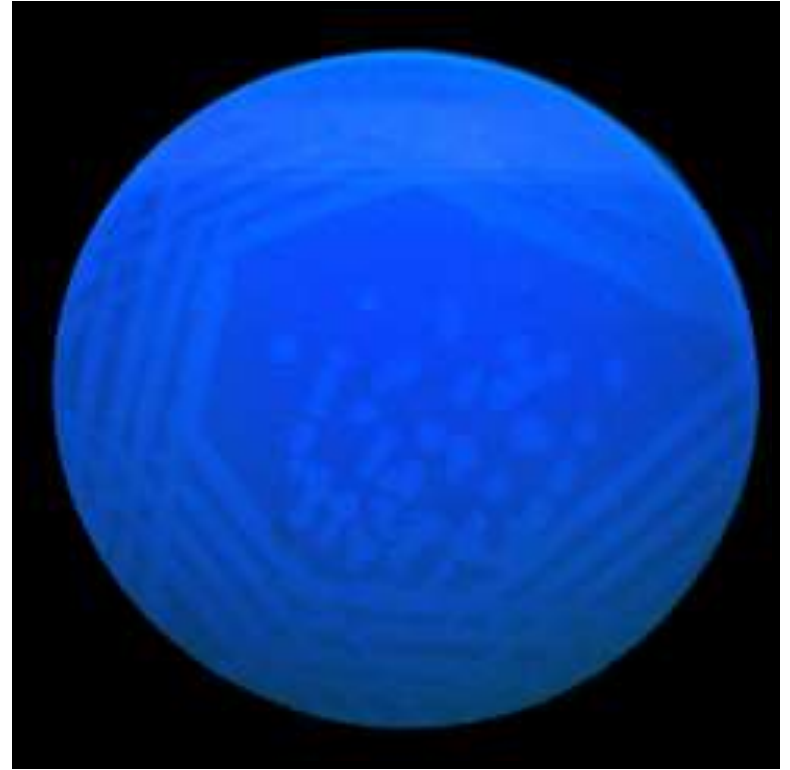


# Ταυτοποιητικά χαρακτηριστικά

- Αιμολυτικές αποικίες
- Παραγωγή χρωστικών (pyocanin, pyoverdinin)
- Χαρακτηριστική «φρουτώδους» οσμή
- Ανάπτυξη σε θερμοκρασία 42°  
(η μόνη από την ομάδα Fluorescent)

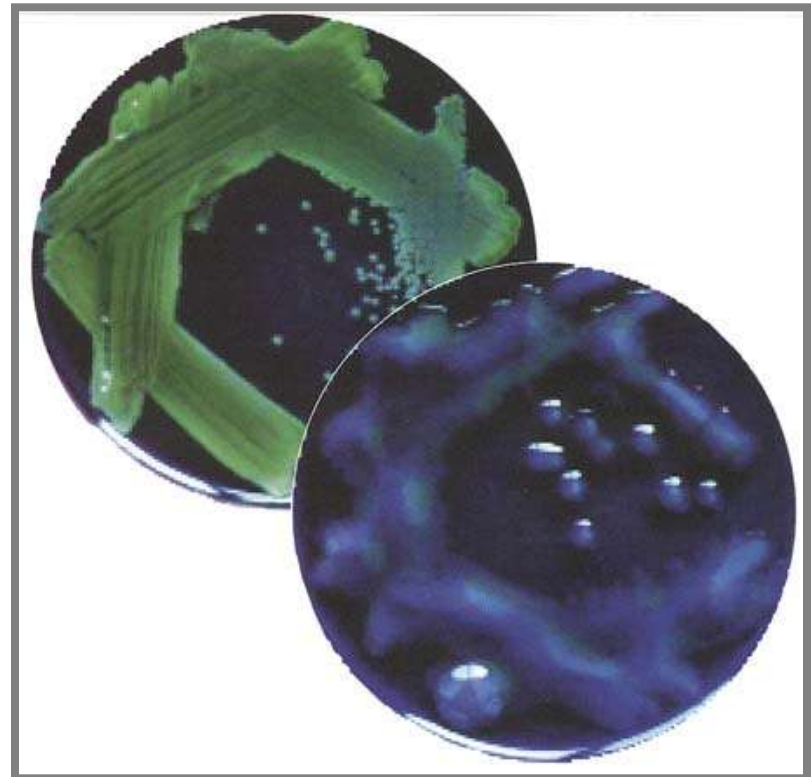
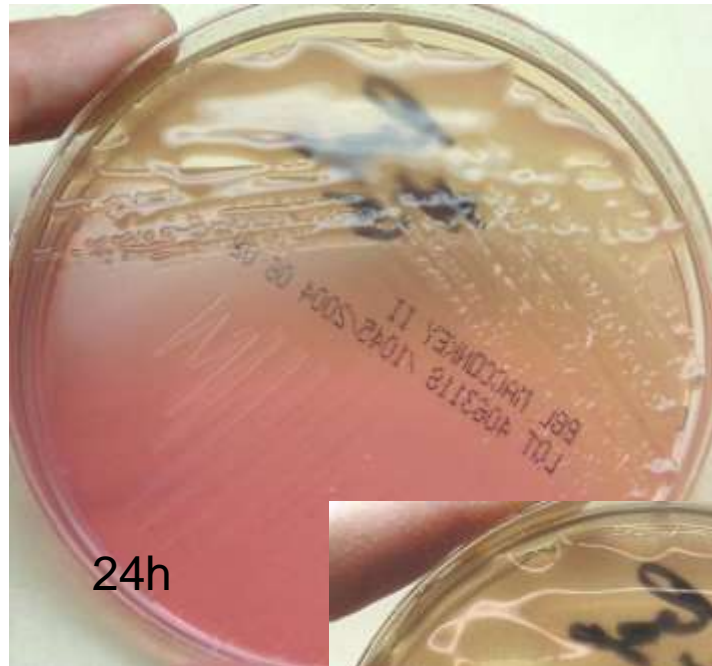


# Φθορίζουσα χρωστική





# Βλεννώδεις αποικίες



Status: TRANS (07.00)  
Organism: Pseudomonas aeruginosa  
Origin: GN Identification

APPA	?	ADO	-	PyrA	-	lARL	-	dCEL	-	BGAL	-
H2S	-	BNAG	-	AGLTp	+	dGLU	+	GGT	+	OFF	-
BGLU	-	dMAL	-	dMAN	+	dMNE	+	BXYL	-	BAlap	+
ProA	+	LIP	+	PLE	-	TyrA	+	URE	-	dSOR	-
SAC	-	dTAG	-	dTRE	-	CIT	+	MNT	+	5KG	-
lLATk	+	AGLU	-	SUCT	+	NAGA	-	AGAL	-	PHOS	+
GlyA	-	ODC	-	LDC	-	lHISa	-	CMT	+	EGUR	-
O129R	+	GGAA	-	lMLTa	+	ELLM	-	lLATa	+		

Confidence Level: Excellent Identification

Probability    Organism  
96.74    Pseudomonas aeruginosa

- Tests contraindicating typical biopattern -  
Pseudomonas aeruginosa  
PHOS (0.05)

# Λοιπές *Pseudomonas*

- Παραγωγή pyoverdinin
  - Fluorescent Group
- Αναγωγή νιτρικών
  - *P.stutzeri*
- Ανάπτυξη σε θερμοκρασία 42°
  - *P.alcaligenes* & *P.pseudoalcaligenes*

```
Status:      TRANS (06.00)
Organism:    Pseudomonas fluorescens
Origin:      GN Identification
```

APPA	-	ADO	-	PyrA	+	lARL	-	dCEL	-	BGAL	-
H2S	-	BNAG	-	AGLTp	-	dGLU	-	GGT	-	OFF	-
BGLU	-	dMAL	-	dMAN	-	dMNE	+	BXYL	-	BAlap	+
ProA	+	LIP	-	PLE	-	TyrA	-	URE	-	dSOR	-
SAC	-	dTAG	-	dTRE	-	CIT	-	MNT	-	5KG	-
lLATk	+	AGLU	-	SUCT	-	NAGA	-	AGAL	-	PHOS	-
GlyA	+	ODC	-	LDC	-	lHISa	-	CMT	-	BGUR	-
O129R	-	GGAA	?	lMLTa	-	ELLM	-	lLATa	-		

```
Confidence Level: Excellent Identification
```

```
Probability  Organism
          99.00  Pseudomonas fluorescens
```

# Burkholderia

- *Burkholderia mallei*
- *Burkholderia pseudomallei*
- *Burkholderia cepacia*

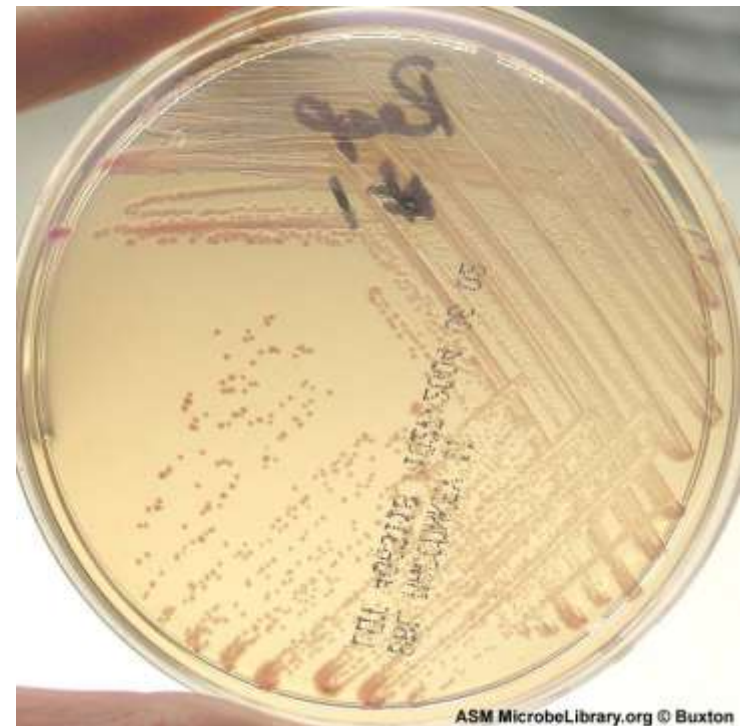




# ***Burkholderia cepacia complex***

- Περιλαμβάνει 9 είδη
- Πρόβλημα η ενδογενής αντοχή στα αντιβιοτικά
- Νοσοκομειακά παθογόνα (αντοχή στα απολυμαντικά)
- Ευκαιριακά παθογόνα κυρίως σε:
  - Χρόνια Κοκκιωματώδη Νόσο
  - Ινοκυστική Νόσο (cepacia syndrome)
- Η ταυτοποίηση του complex προβληματική με τα εμπορικά κιτ
- Η ταυτοποίηση των ειδών μεταξύ τους ιδιαίτερα δύσκολη
- Πολλές φορές απαιτείται γονοτυπική επιβεβαίωση
- Ειδικό κέντρο αναφοράς στις Η.Π.Α «Cystic Fibrosis Referral Center»
- MIC με E test ή μικρομέθοδο αραιώσεων σε ζωμό
- Κριτήρια του CLSI μόνο για ορισμένα αντιβιοτικά

- Καλή ανάπτυξη στα συνήθη θρεπτικά υλικά
- Σε χρήση εκλεκτικών υλικών (BCSA, PC)\* απαιτείται παρατεταμένη επώαση



# *Stenotrophomonas maltophilia*

- Πλέον αποτελεί ανεξάρτητο γένος
- Ευκαιριακό παθογόνο και σε Ινοκυστική Νόσο
- Συχνό αίτιο λοιμώξεων σε τραύματα από αγροτικά μηχανήματα
- Σημαντικό νοσοκομειακό παθογόνο
  - ΜΕΘ - ασθενείς με αναπνευστήρα
- Χαρακτηριστικές βιοχημικές αντιδράσεις:
  - αρνητική οξειδάση,
  - οξείδωση γλυκόζης και μαλτόζης
  - θετική DNase (72h)
- Καλή ταυτοποίηση με API 20NE και τη κάρτα ID-GNB του Vitek-2
- MIC με E test ή μικρομέθοδο αραιώσεων σε ζωμό
- Κριτήρια του CLSI μόνο για ορισμένα αντιβιοτικά

- Αναπτύσσεται καλά στα συνήθη θρεπτικά υλικά
- Η χρήση εκλεκτικών υλικών (VIA, BC + disk imipenem) αυξάνει τα ποσοστά απομόνωσης σε κλινικά και περιβαλλοντικά υλικά



24h



48h



Status: TRANS (04.00)  
 Organism: Stenotrophomonas maltophilia  
 Origin: GN Identification

APPA	+	ADO	-	PyrA	-	lARL	-	dCEL	-	BGAL	-
H2S	-	BNAG	-	AGLTp	-	dGLU	-	GGT	+	OFF	-
BGLU	+	dMAL	-	dMAN	-	dMNE	-	BXYL	-	BAlap	-
ProA	+	LIP	+	PLE	-	TyrA	-	URE	-	dSOR	-
SAC	-	dTAG	-	dTRE	-	CIT	+	MNT	-	5KG	-
lLATk	+	AGLU	+	SUCT	+	NAGA	-	AGAL	-	PHOS	+
GlyA	-	ODC	-	LDC	-	lHISa	-	CMT	-	BGUR	-
O129R	-	GGAA	+	lMLTa	-	ELLM	-	lLATa	-		

Confidence Level: Excellent Identification

Probability	Organism
99.00	Stenotrophomonas maltophilia

# CLSI M100-S15

## M2, disk diffusion and M7, MIC

For Use With M2-A8–Disk Diffusion

Table 1. (Continued)

GROUP A PRIMARY TEST AND REPORT	<i>Acinetobacter</i> spp. <sup>1,k</sup>	<i>Burkholderia cepacia</i> <sup>1,k</sup>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> <sup>1,k</sup>
	Ceftazidime	Trimethoprim- sulfamethoxazole	Trimethoprim- sulfamethoxazole
	Imipenem Meropenem		
	Amikacin Gentamicin Tobramycin	Ceftazidime	Levofloxacin
		Meropenem	Minocycline
		Minocycline	
	Ampicillin-sulbactam Piperacillin-tazobactam Ticarcillin-clavulanate		

**Ευχαριστώ**