

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 χρώμα
- Μορφή (κόκκος, ζεύγος, αλυσίδα)
- Μέγεθος
- Διάταξη
- Έλυτρο (ναυτίλο)
- Σπόροι

Φυσιολογικά χαρακτηριστικά

- Αφοροπτικότητα
- Διαπλάση (μεταβολισμός χρώματος)
- Έτοιμοι εμπορικά

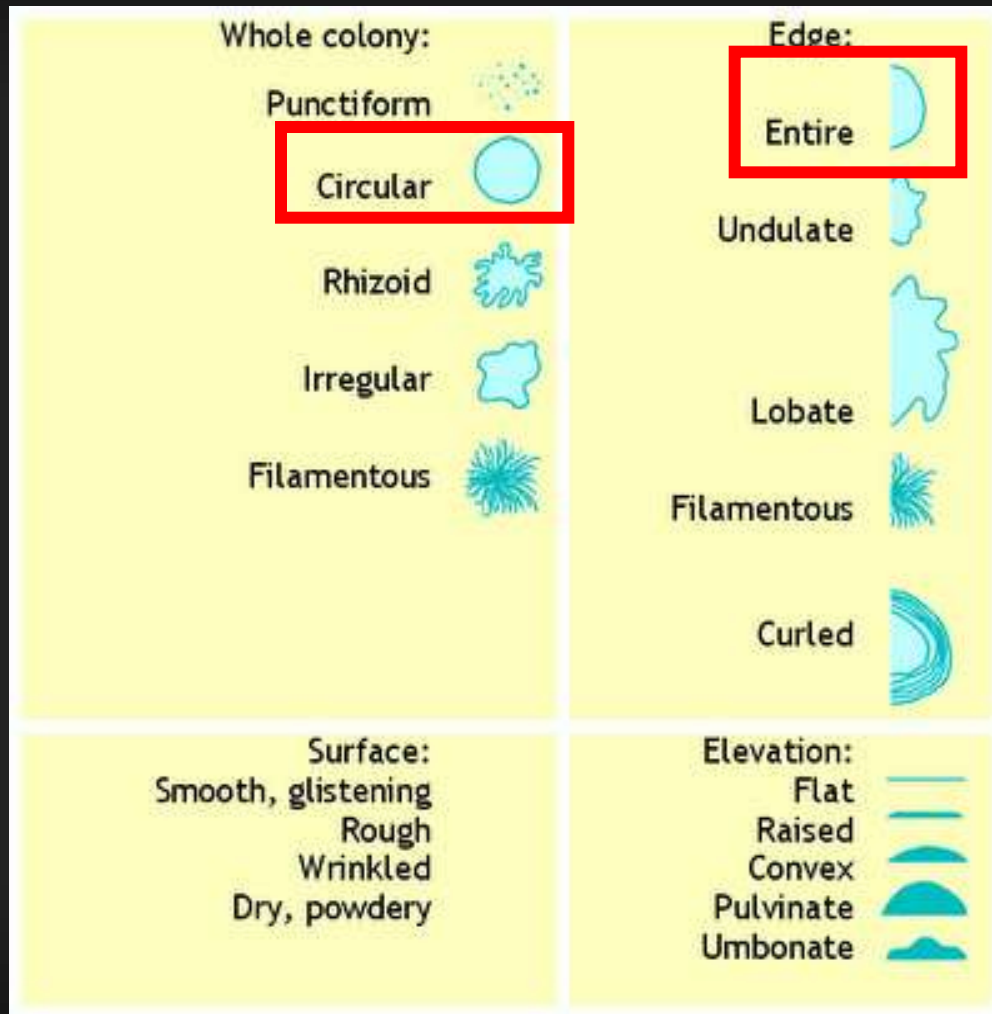
Χημικά χαρακτηριστικά

- 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

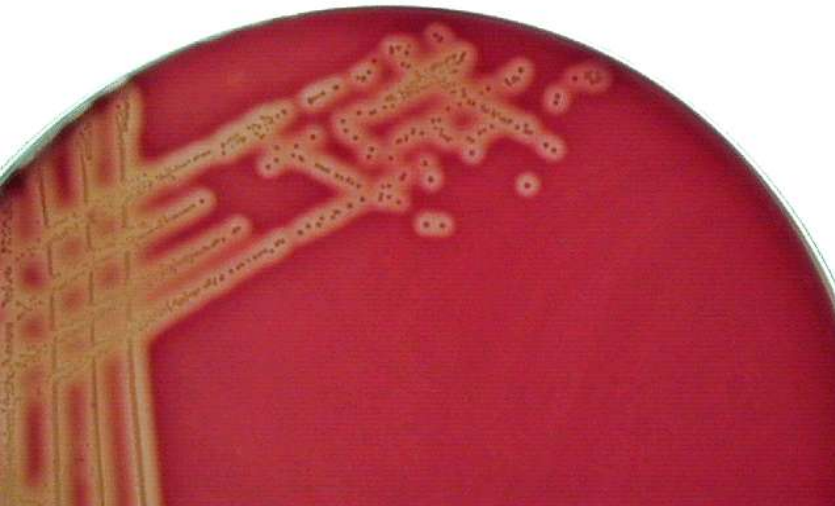
Μορφολογία αποικιών



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

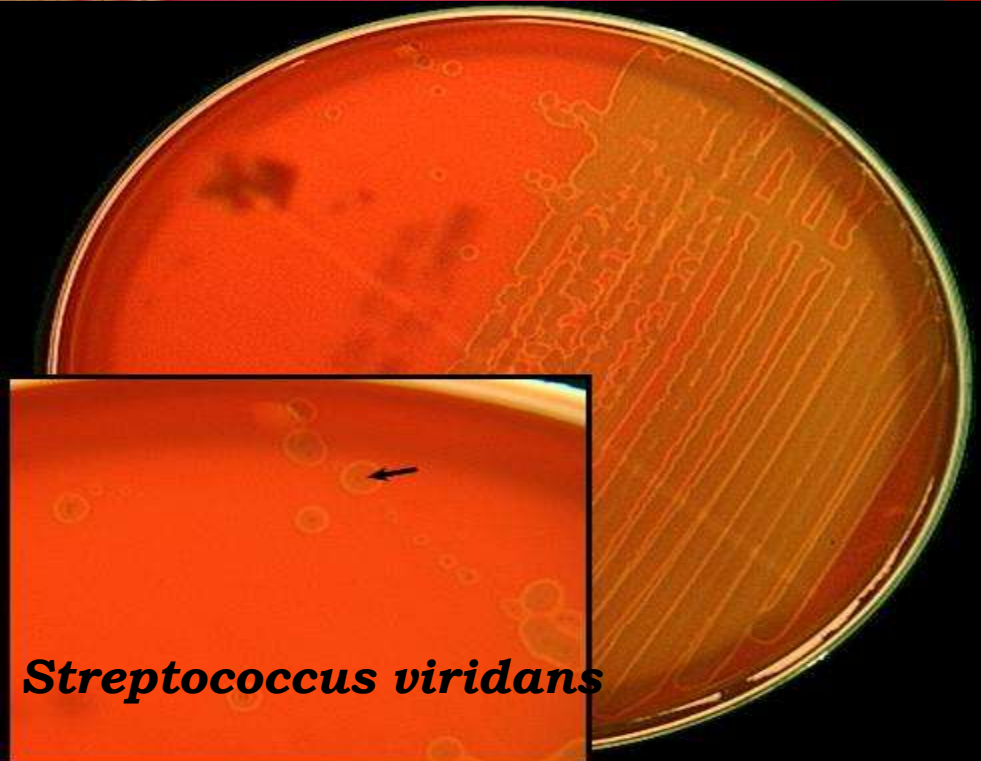


ASM MicrobeLibrary.org © Buxton

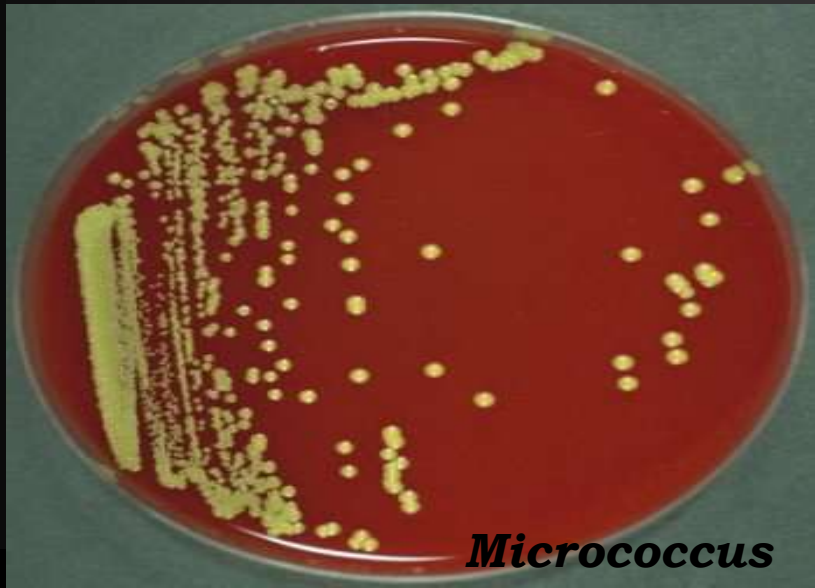
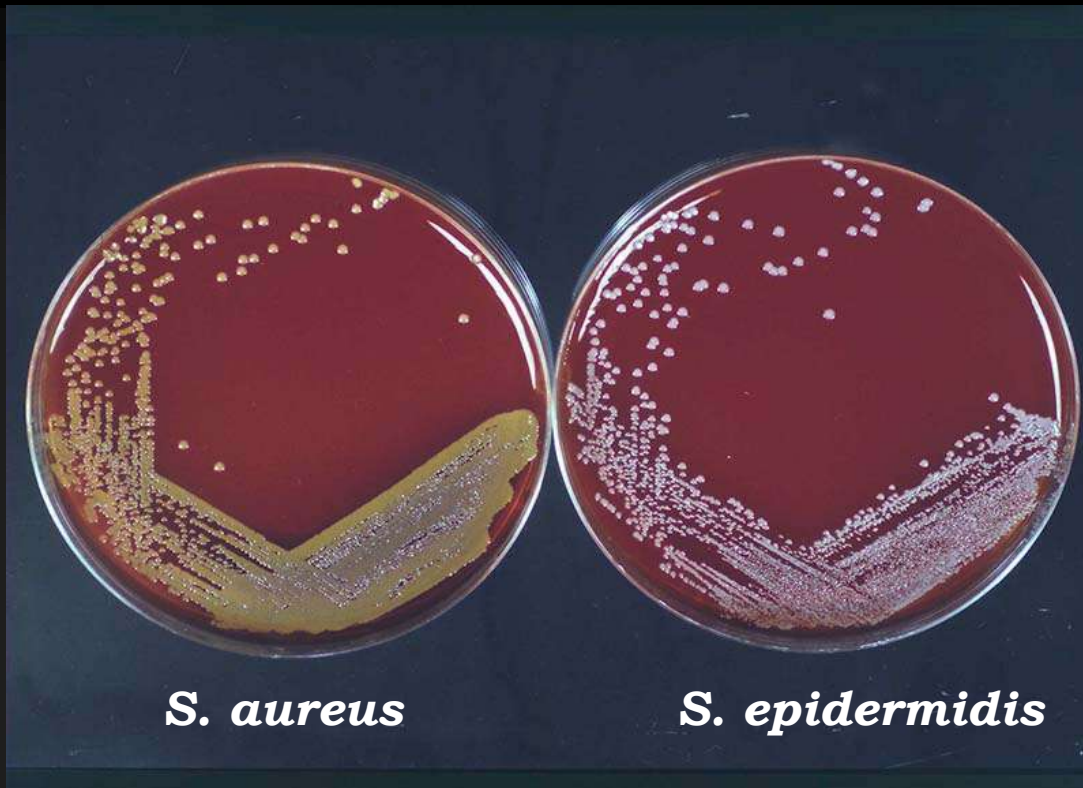
S. pneumoniae



ASM MicrobeLibrary.org © Pritt



Streptococcus viridans

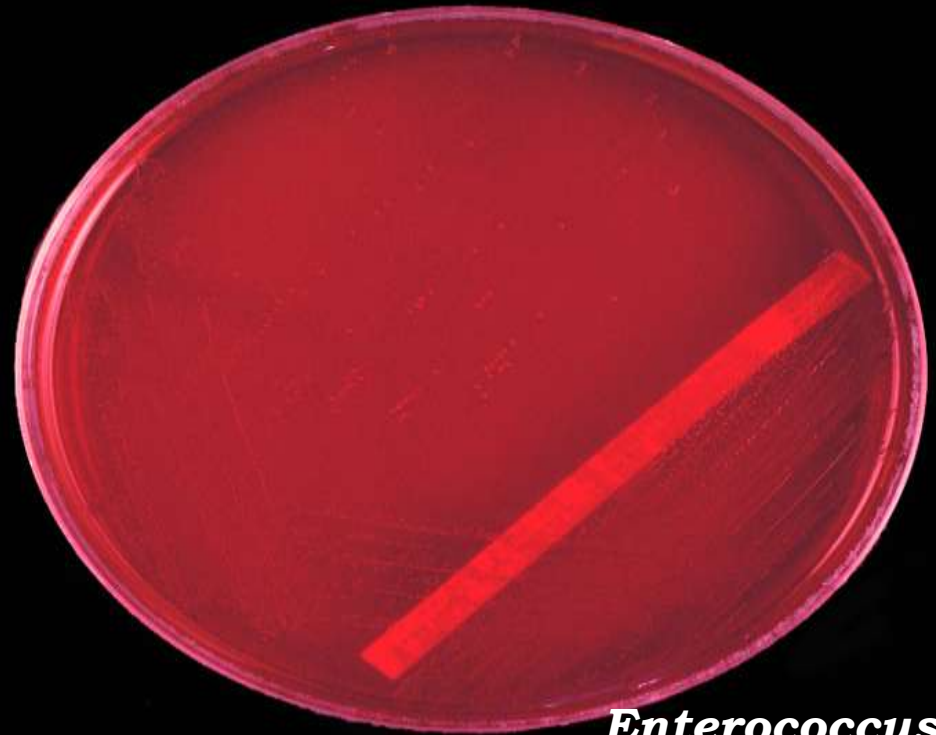
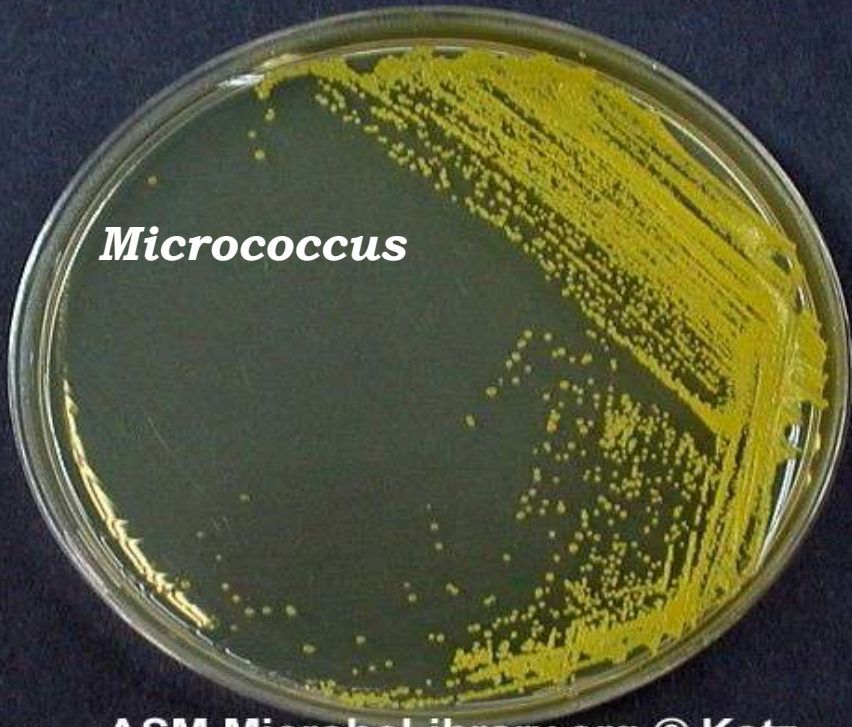


S. aureus



S. epidermidis

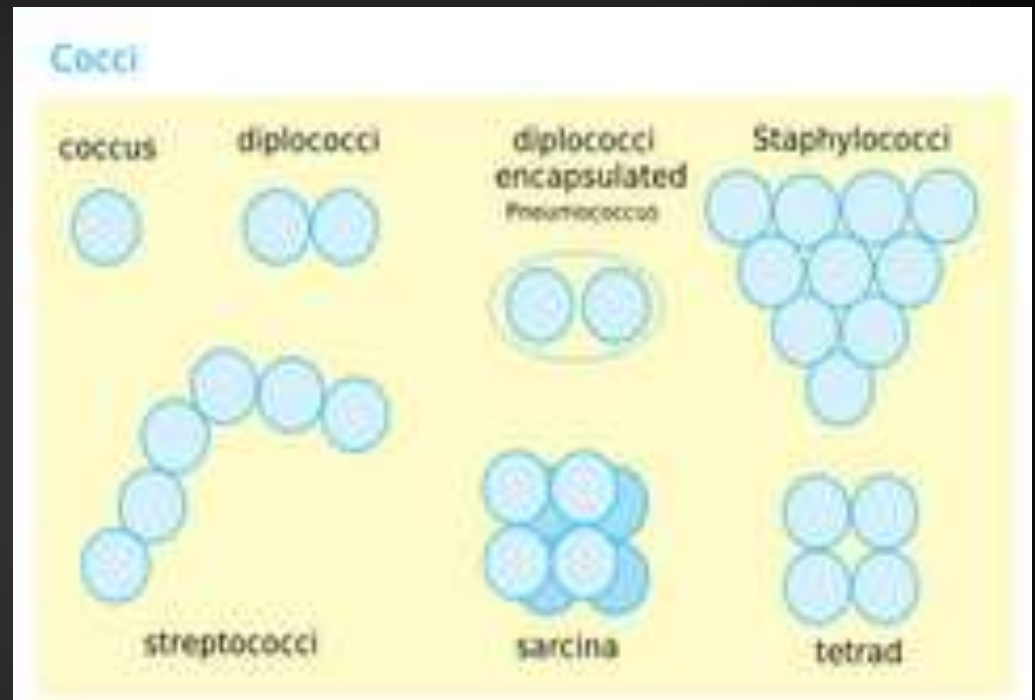
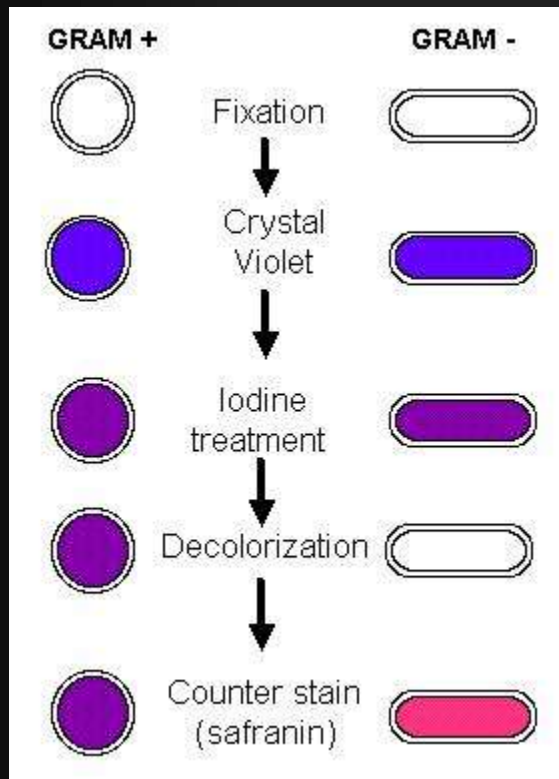
Micrococcus

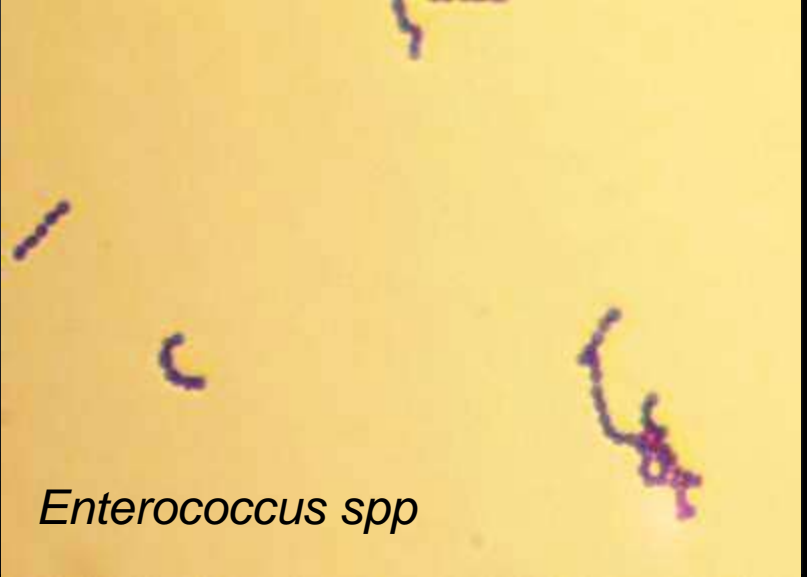
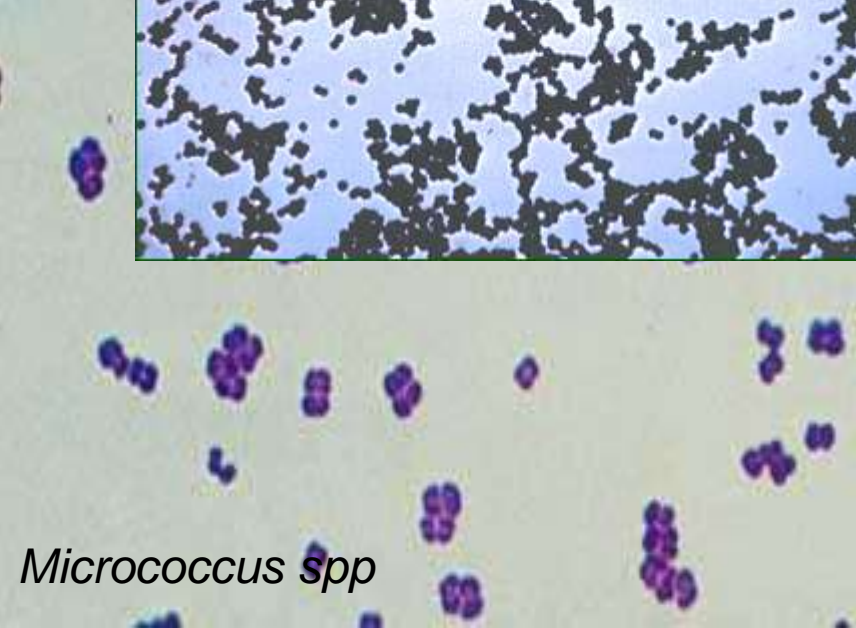
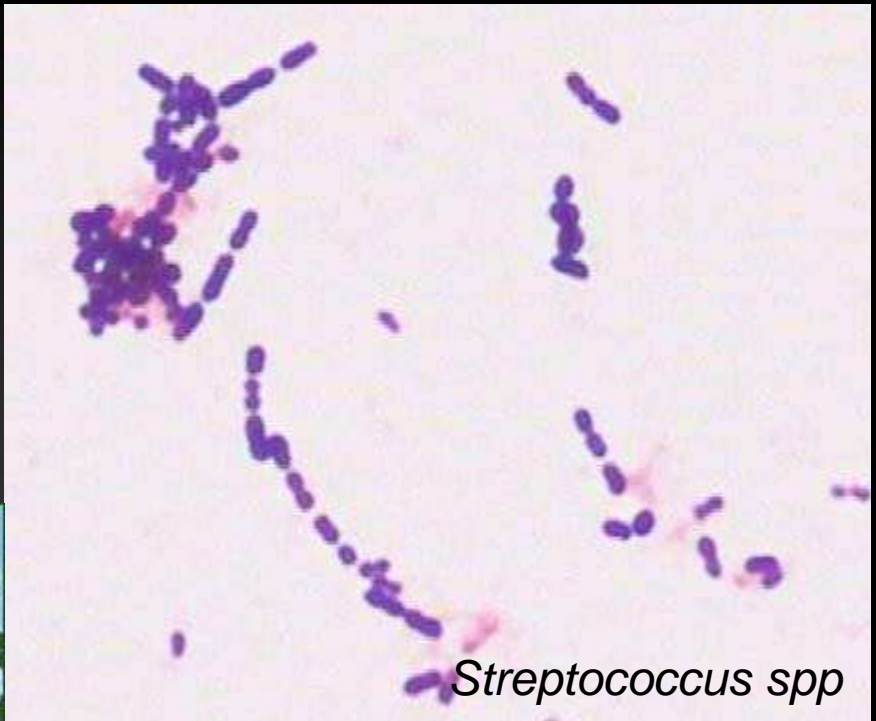
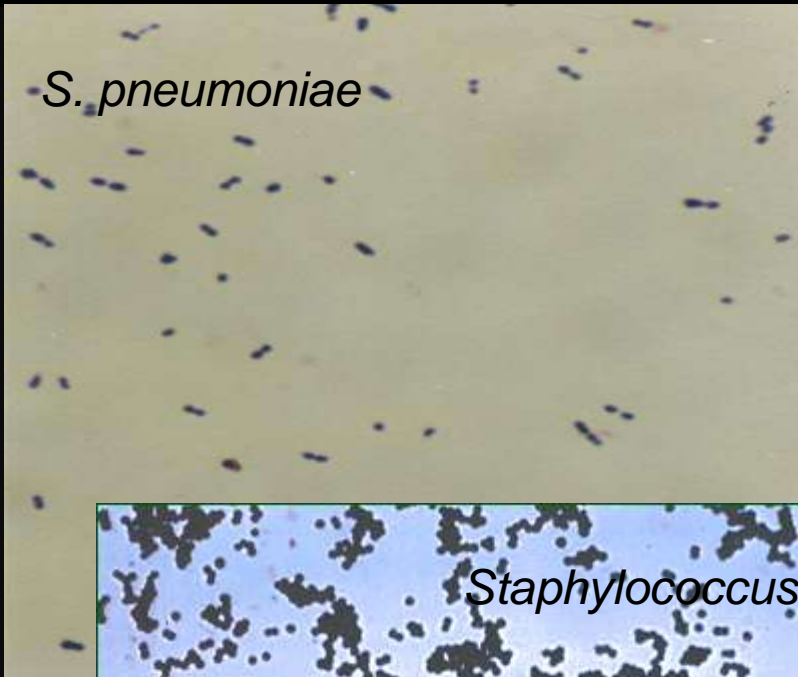


Enterococcus

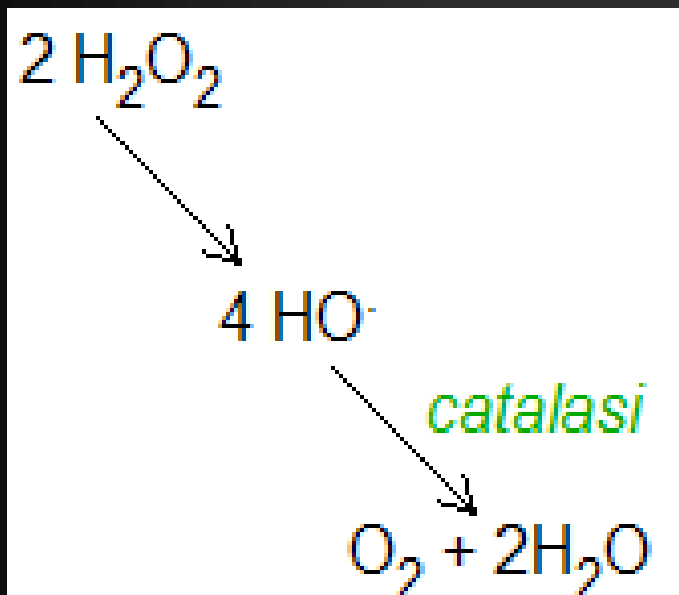
ΒΗΜΑ 2: Gram χρώση

Gram χρώση





ΚΑΤΑΛΑΣΗ



-



+

ΚΑΤΑΛΛΑΣΗ



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

ΚΑΤΑΛΛΑΣΗ



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

Επώαση στους 37° C για 18h ► ζύμωση μαννιτόλης ► παραγωγή οξέος ► αλλαγή χρώματος του υλικού από **κόκκινο** σε **κίτρινο**



S. aureus



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)

(β) **Ελεύθερη**

Μέθοδοι ελέγχου της κοα

(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)

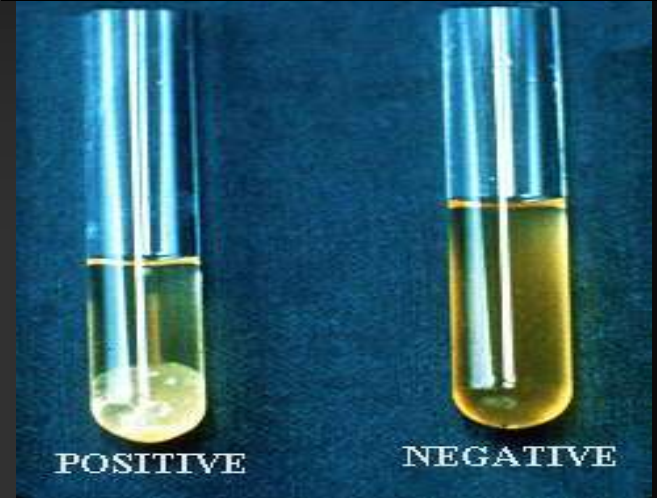
Κοαγκουλάση

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

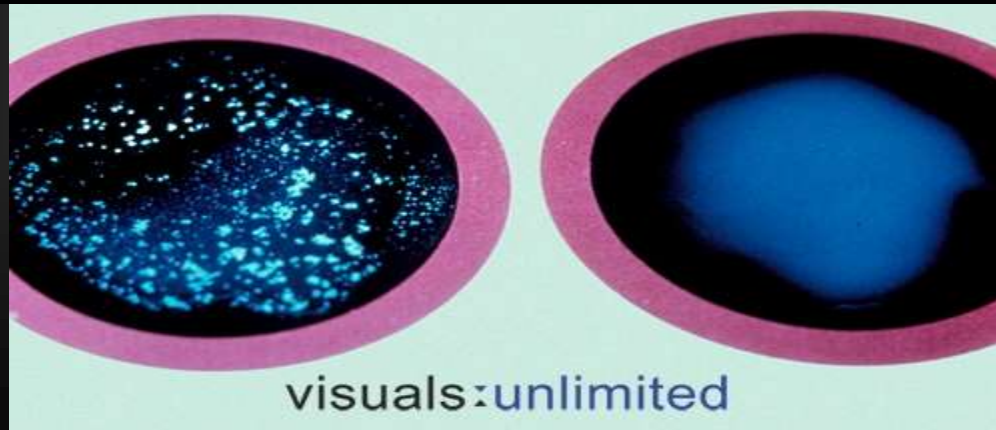
Κοαγκουλάση

Δοκιμασία σε σωληνάριο



Δοκιμασία επί πλακός

Συγκολλητινοαντίδραση σωματιδίων latex



Δοκιμασία δεοξυριβονουκλεάσης (DNASE)

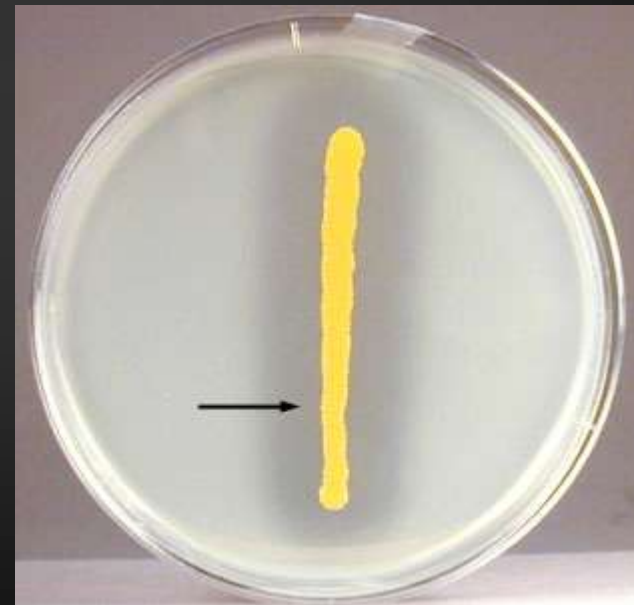
- Ένζυμο που παράγεται από τον *S. aureus* και υδρολύει το DNA

(-)



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 ssp hominis</i>	E	E
<i>S. hominis ssp 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

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

Κατάλαση

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**

ΚΑΤΑΛΛΑΣΗ



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*
spn



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*

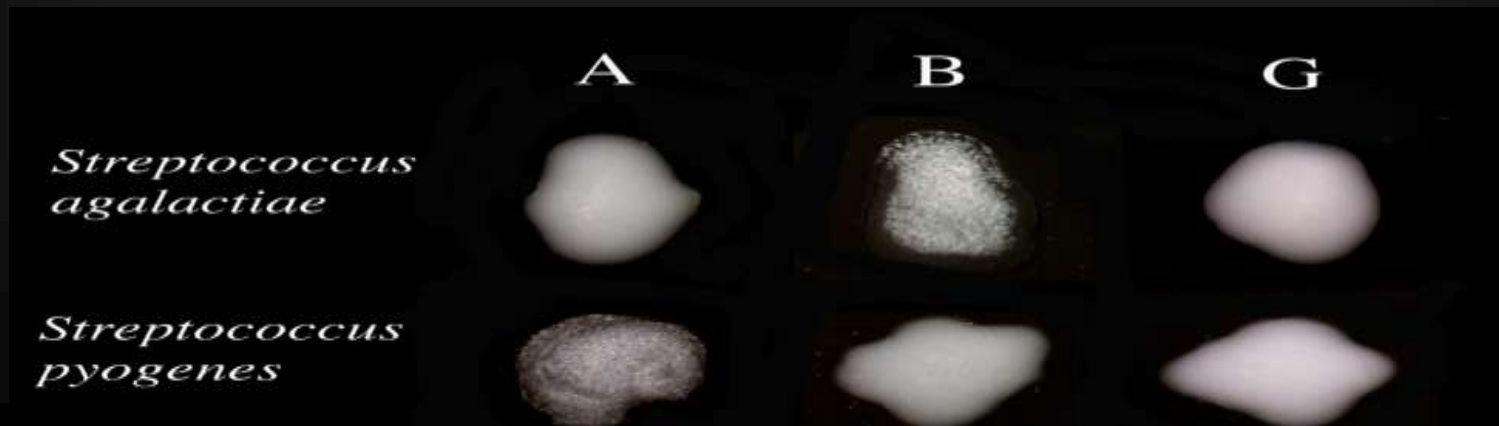
Διαχωρισμός κατά Lancefield σε ομάδες βάσει του πολυσακχαριδικού αντιγόνου ή του λιποτειχοϊκού οξέος του κυτταρικού τοιχώματος (A, B, C, D, F, G)

S. pyogenes ▶ β-αιμολυτικός ▶ ομάδα A

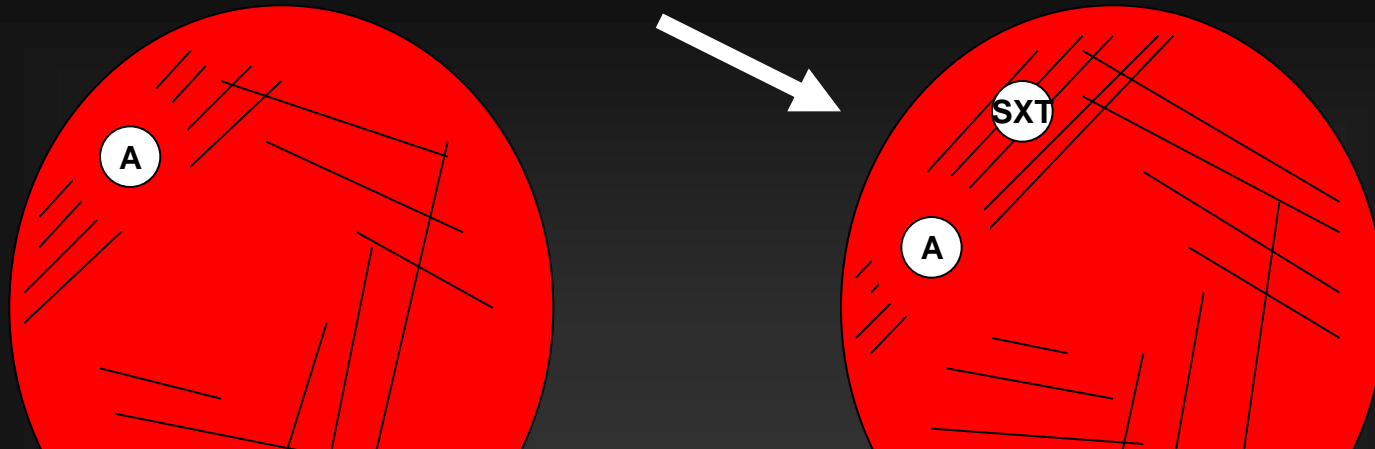
S. agalactiae ▶ β-αιμολυτικός ▶ ομάδα B

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 βέλους

Υδρόλυση ιππουρικού νατρίου



(+)

Streptococcus ομάδος B

Δοκιμασία αμινοπεπτιδάσης της λευκίνης (LAP test)

(+): όλοι οι στρεπτόκοκκοι & εντερόκοκκοι

Δοκιμασία εσκουλίνης

Test

Control



(+)

Enterococcus

Streptococcus ομάδος D

Δοκιμασία πυρρολιδονυλ-αριλαμιδάσης (PYR test)

(+): στρεπτόκοκκοι ομάδος A & εντερόκοκκοι

S. pneumoniae

Ευαισθησία στην

Οι πνευμονι

Πρέπει να μ

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

$< 14\text{mm}$ \blacktriangleright α

Μερικοί προ
εμφανίζουν

Διαλυτότητα

Το δεσοξυχολ
αυτολυτικά έν

(+): *S. pneum*



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

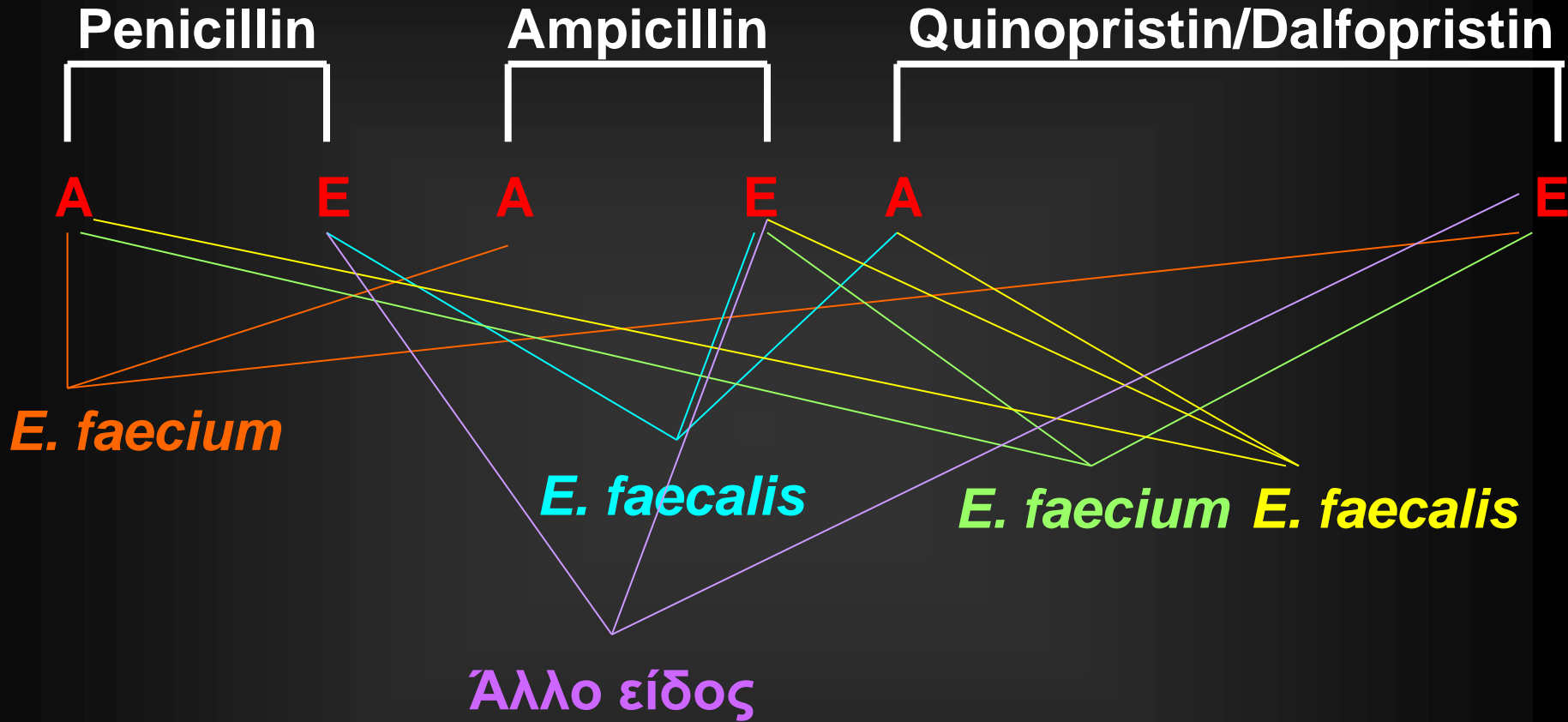
Streptococci

Αντοχή σε όλες τις κεφαλοσπορίνες και την κλινδαμυκίνη

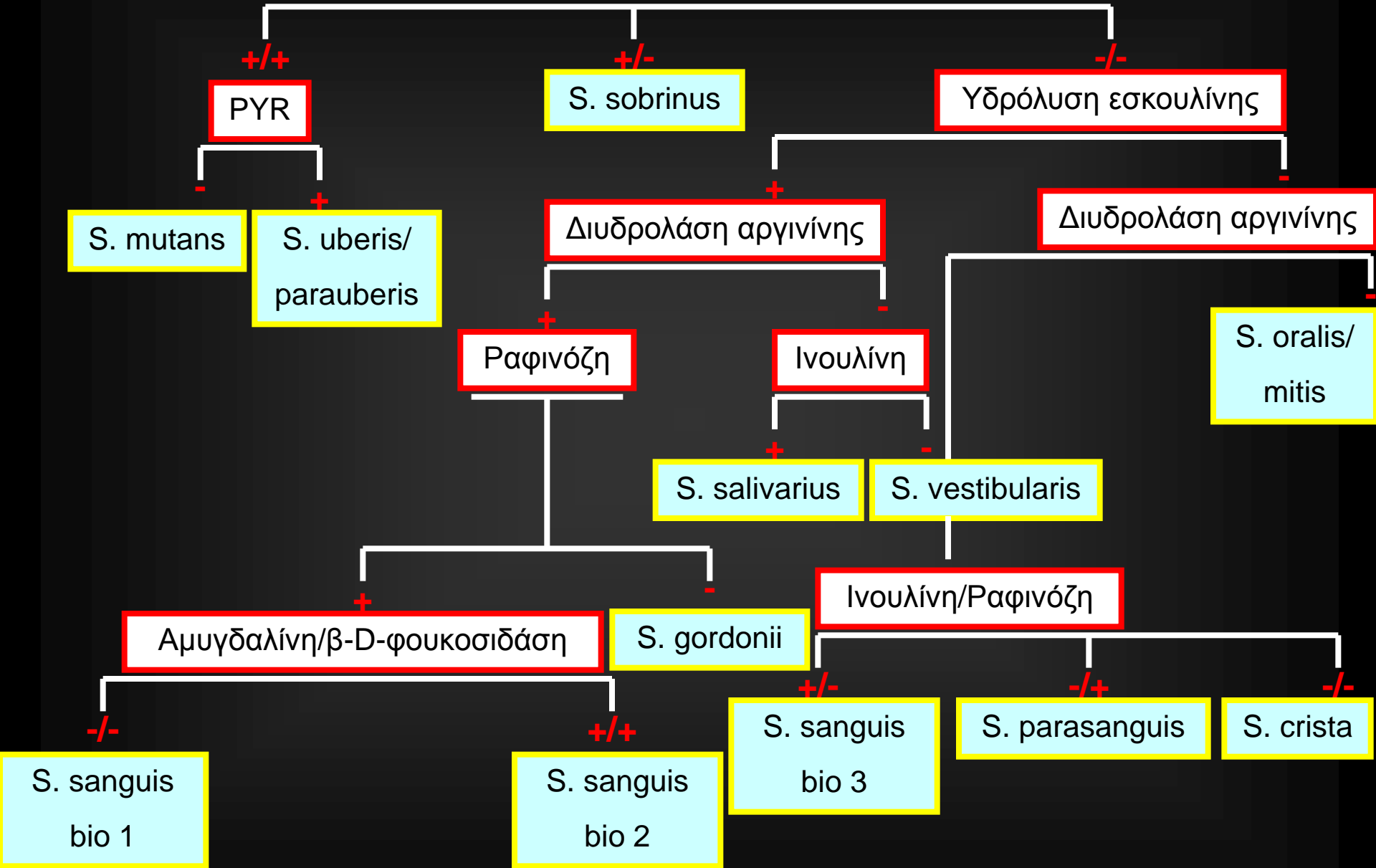


Enterococci

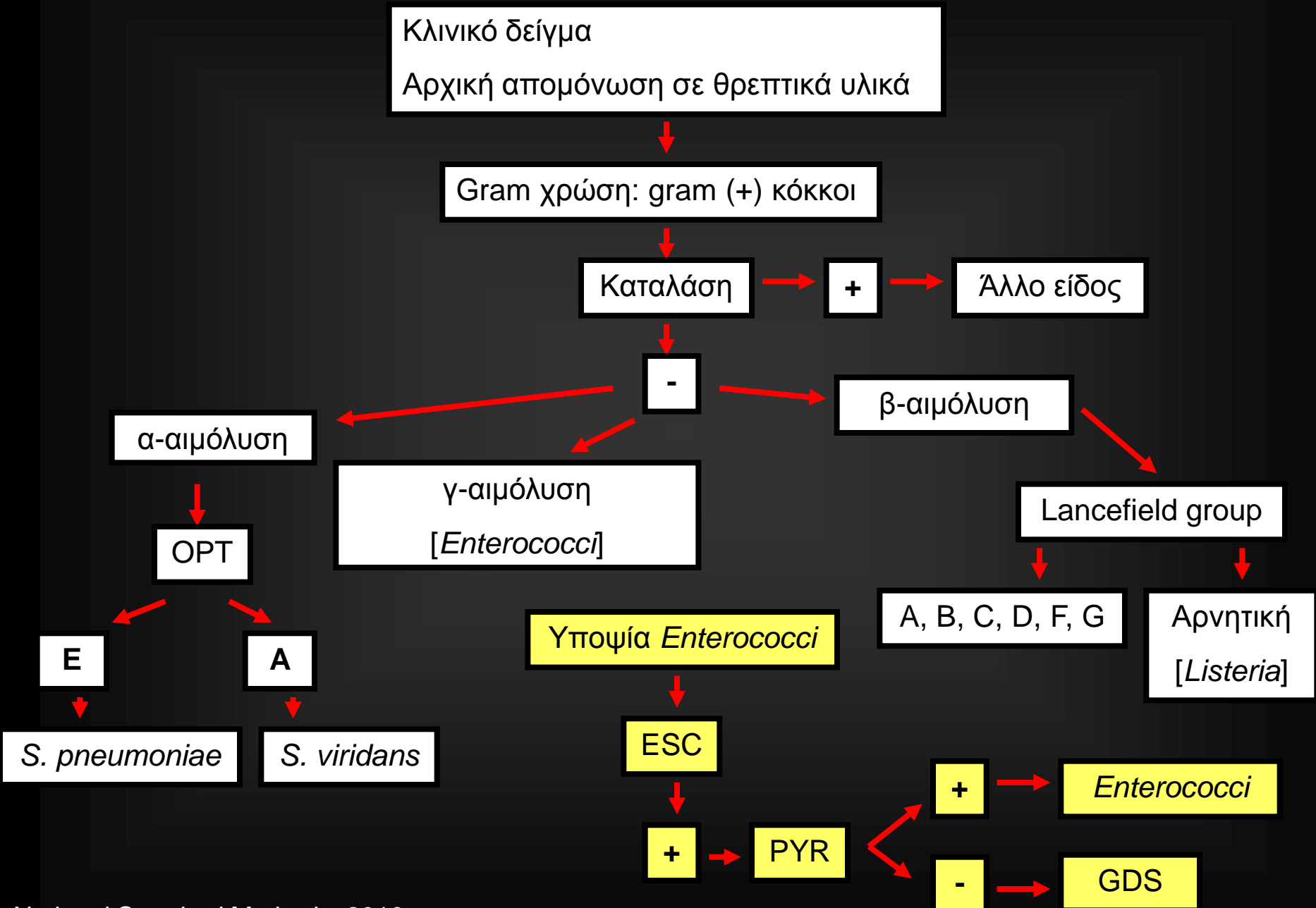
Αντιβιογράμμα - *Enterococci*



Μανιτόλη/Σορβιτόλη



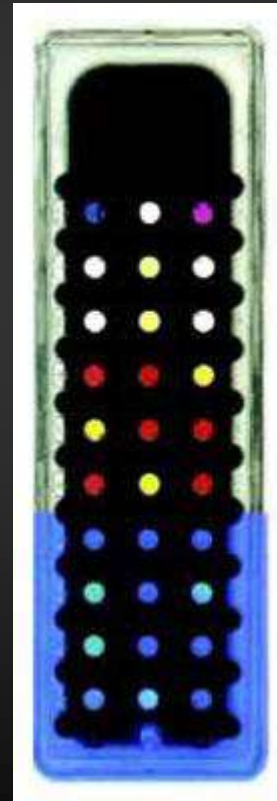
Συμπερασματικά για την ταυτοποίηση των *Streptococci*



Τελική ταυτοποίηση Gram (+) αερόβιων ΚΟΚΚΩΝ

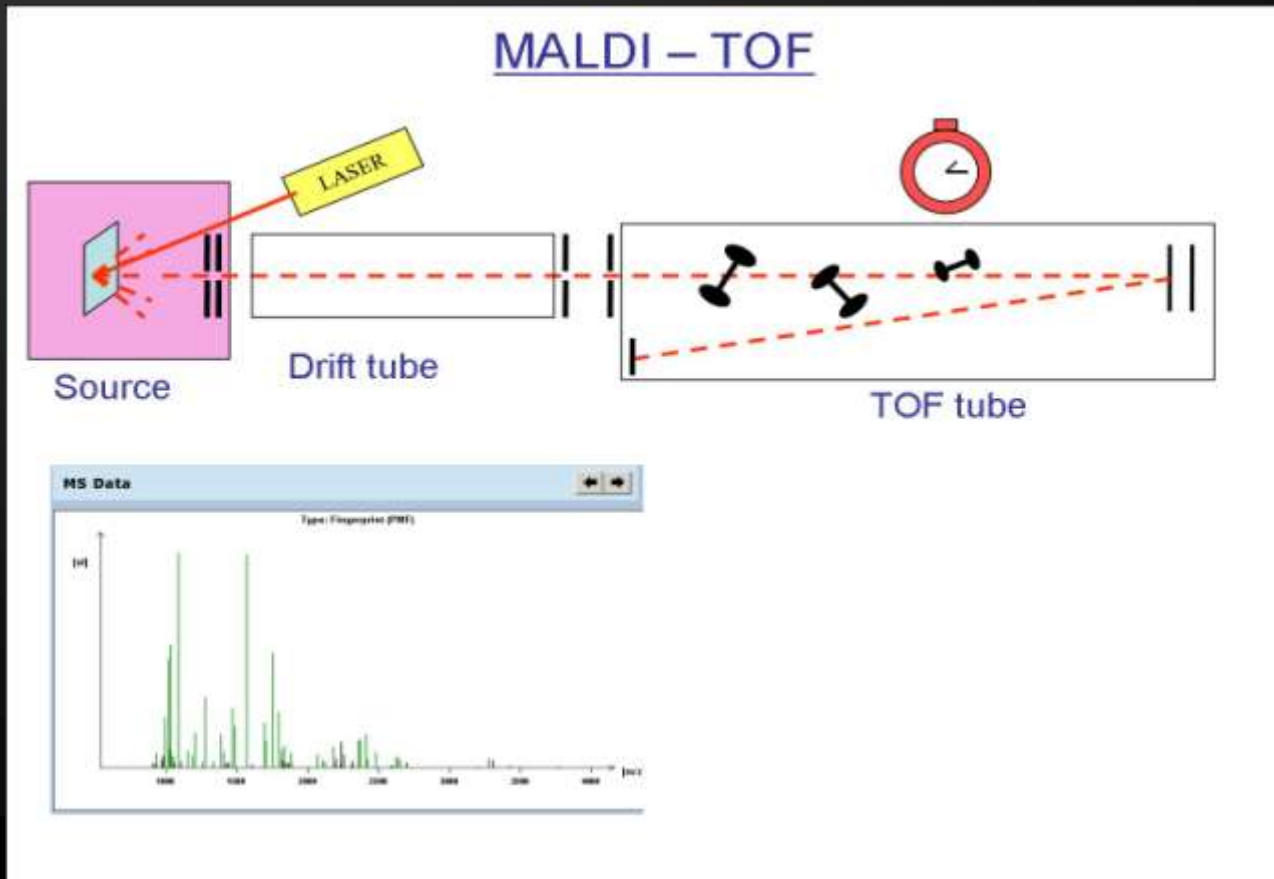
Έτοιμα ταυτοποιητικά συστήματα εμπορίου με τη χρήση ενζυμικών και βιοχημικών δοκιμασιών επί ειδικών υποστρωμάτων

- Αυτόματα
- Ημιαυτόματα
- Χειροκίνητα



Φασματοφωτομετρία μάζας / MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization- Time Of Flight Mass Spectrometry)

Ευαισθησία: 98%
ΑΠΑ: 99,9%



Ευχαριστώ

