

# Ταυτοποίηση βακτηρίων: συμβατικές και αυτοματοποιημένες μέθοδοι.



---

**Αναστασία Πάγκαλη**  
**Βιοπαθολόγος - Κλινικός Μικροβιολόγος**



# Ταυτοποίηση βακτηρίων

---

Έχει σαν στόχο την κατάταξη ενός μικροοργανισμού σε συγκεκριμένο γένος, είδος, ορότυπο, βιότυπο και είδος αντοχής



# Ταυτοποίηση βακτηρίων

Χρησιμοποιούνται δοκιμασίες 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**
- *Έλεγχο διαφόρων αντιγονικών παραγόντων, ειδικών για κάθε είδος*  
**Ορολογική ταυτοποίηση / τυποποίηση**
- *Την ανίχνευση χαρακτηριστικών αλληλουχιών βάσεων στο γενετικό υλικό των μικροοργανισμών με τεχνικές DNA*  
**Μοριακή ταυτοποίηση / τυποποίηση**



# Δοκιμασίες χρήσιμες στην ταυτοποίηση

---

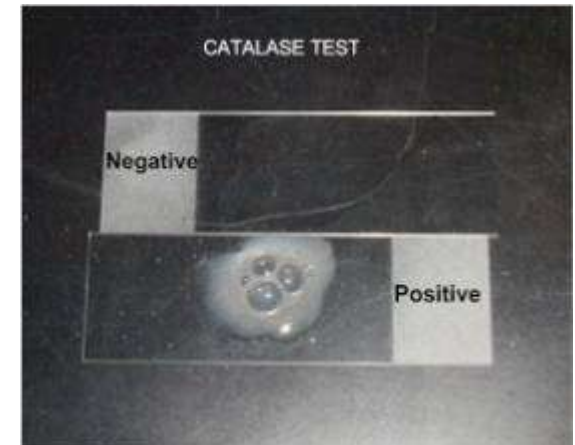
*Πρωταρχικό ρόλο στην ταυτοποίηση παίζει*

**Βιοχημική ταυτοποίηση** στην οποία εκμεταλευόμαστε :

- *τις μεταβολικές ιδιότητες των μικροοργανισμών (ΜΚ)  
όπως η διάσπαση διαφόρων υποστρωμάτων (=απαραίτητες θρεπτικές ουσίες )*
- *παραγωγή ενζύμων  
(=απαραίτητα για τις μεταβολικές αντιδράσεις και τη λειτουργία της αναπνοής)*

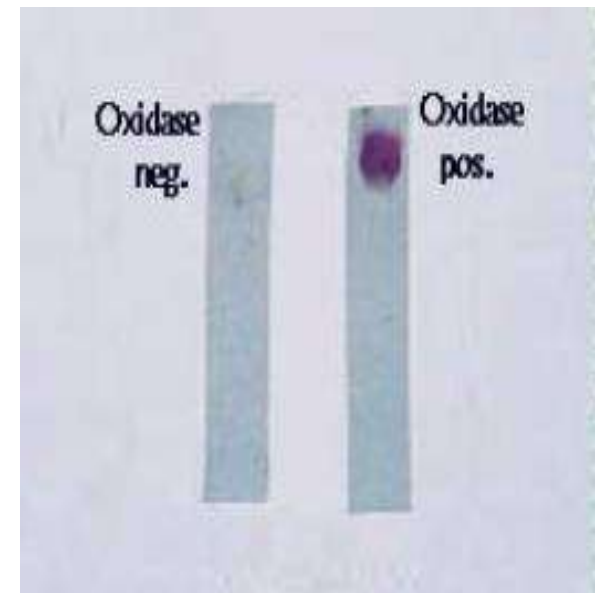
# Δοκιμασία καταλάσης

- Ελέγχει την παρουσία του ενζύμου καταλάση που διασπά το παραγόμενο κατά τη διάσπαση των υδατανθράκων  $H_2O_2$  σε  $H_2O$  και  $[O]$ .
- Χρησιμοποιούμε  $H_2O_2$  3% και μικροβιακό καλλιέργημα σε αντικειμενοφόρο πλάκα
- (+) : παραγωγή φυσαλλίδων



# Δοκιμασία οξειδάσης

- Ελέγχει αν ο (ΜΚ) διαθέτει **το ένζυμο cytochrome oxidase**, απαραίτητο στην **μετατροπή NADH σε NAD+ H<sub>2</sub>O**
- Χρησιμοποιούμε **o-phenylenediamine hydrochloride** σε διάλυμα, δισκία, ταινίες ή ραβδία και φρέσκες αποικίες
- (+) : μπλε χρώμα σε 10'



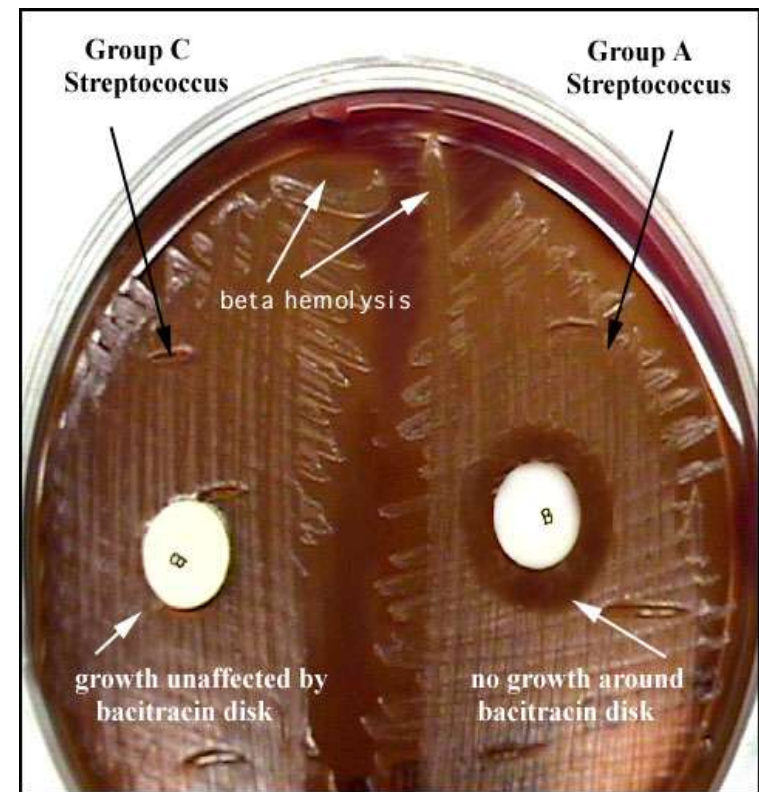
# Δοκιμασία οπτοχίνης

- Ελέγχει την ευαισθησία ενός (ΜΚ) στην **οπτοχίνη** (=ethyl hydrocupreinehydrochloride), που **ενεργοποιεί αυτολυτικά ένζυμα του (ΜΚ)** και προκαλείται λύση του.
- Χρησιμοποιούμε αιματούχο αγαρ, δισκία οπτοχίνης, επώαση σε CO<sub>2</sub> 5% για 24 ώρες
- (+): ζώνη αναστολής => 10 χιλ
- Χρήσιμη στη αδρή διάκριση πνευμονιοκόκκων / α-αιμολυτικών στρεπτοκόκκων.



# Δοκιμασία βακιτρακίνης

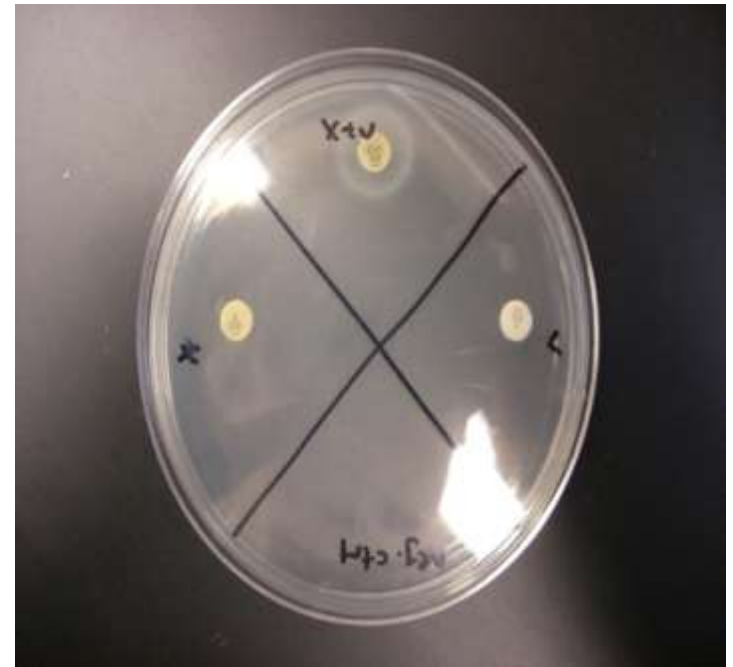
- Ελέγχει την ευαισθησία ενός (ΜΚ) στο αντιβιοτικό βακιτράκινη
- Χρησιμοποιούμε αιματούχο αγαρ, δισκία βακιτρακίνης, επώαση για 24 ώρες.
- (+): αναστολή ανάπτυξης.
- Χρήσιμη στη διάκριση β αιμολυτικού στρεπτοκόκκου ομάδας Α (GAS) από άλλους β-αιμολυτικούς στρεπτοκόκκους.





# Δοκιμασία παραγόντων ανάπτυξης X / V

- Ελέγχουμε την εξάρτηση των αιμοφίλων από τους παράγοντες, **X(=protohorphyrin)** 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 χιλ,
  - \*επίωαση σε 5% CO<sub>2</sub> 18-24
- Ελέγχουμε για ανάπτυξη γύρω από τους δισκούς(= εξάρτηση από τον συγκεκριμένο παράγοντα)



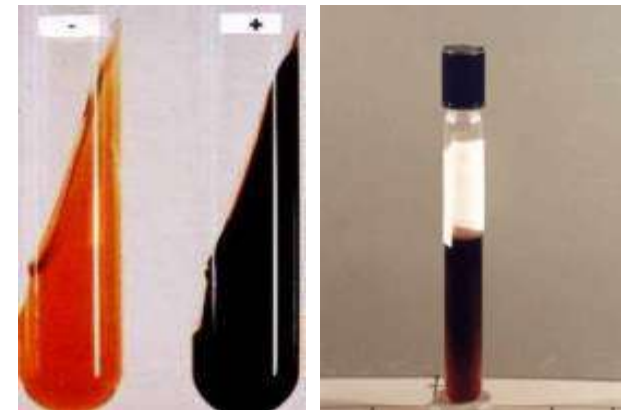
# Δοκιμασία Θερμοευαίσθητης νουκλεάσης (DNAσης)

- Ελέγχει την παρουσία της **εξωκυττάριας DNAσης που υδρολύει, το αδιάλυτο σε HCL DNA, σε διαλυτά ολιγονουκλεοτίδια**
- Χρησιμοποιούμε :
  - \*υλικό με DNA και \*επώαση 18-24
  - \*μετά την επώαση πλημμύρισμα του καλλιεργήματος με 1M (3.6%) HCL
- Ελέγχουμε για διαυγή άλω γύρω από τον θετικό μάρτυρα και το εξεταζόμενο (MK)
- (+): παρουσία διαυγούς άλω
- (*S. aureus, Serratia k.a*)
- (-): απουσία διαυγούς άλω ή άλως < του μάρτυρα (*CNS κ.α*)



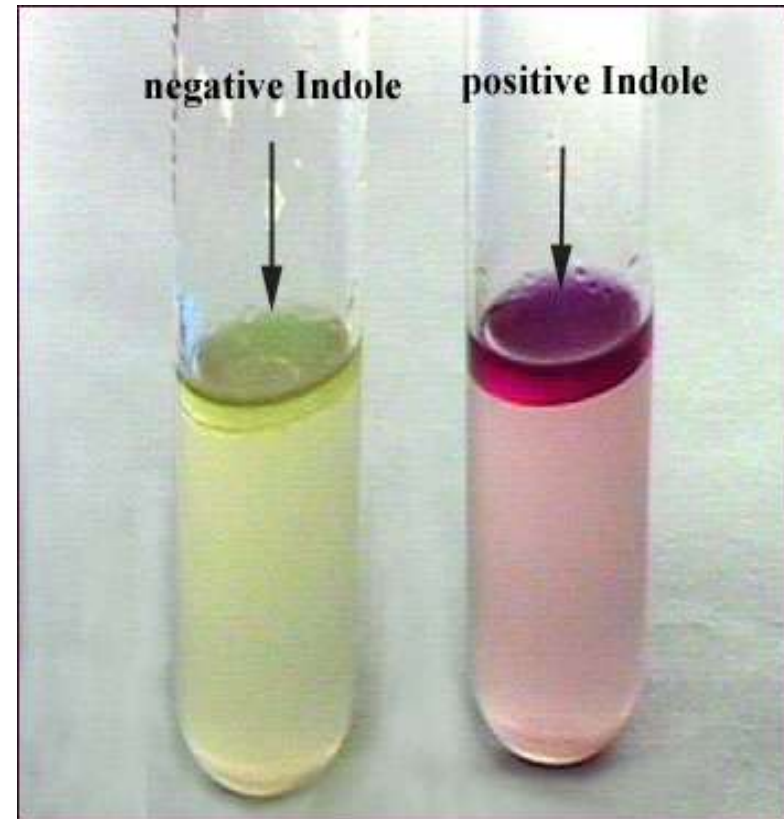
# Δοκιμασία αισκουλίνης

- Ελέγχει την ικανότητα του (ΜΚ) να υδρολύει, παρουσία χολής, την άχρωμη αισκουλίνη σε γλυκόζη και αισκουλετίνη η οποία παρουσία  $Fe^{++}$  παράγει μαύρο σύμπλεγμα.
- Χρησιμοποιούμε:
  - \* άγαρ αισκουλίνης σε τρυβλίο ή σωληνάρια ή ζυμό αισκουλίνης
  - \* επώαση 4-24 ω
- (+): παραγωγή μαύρου χρώματος (πχ εντερόκοκκος )



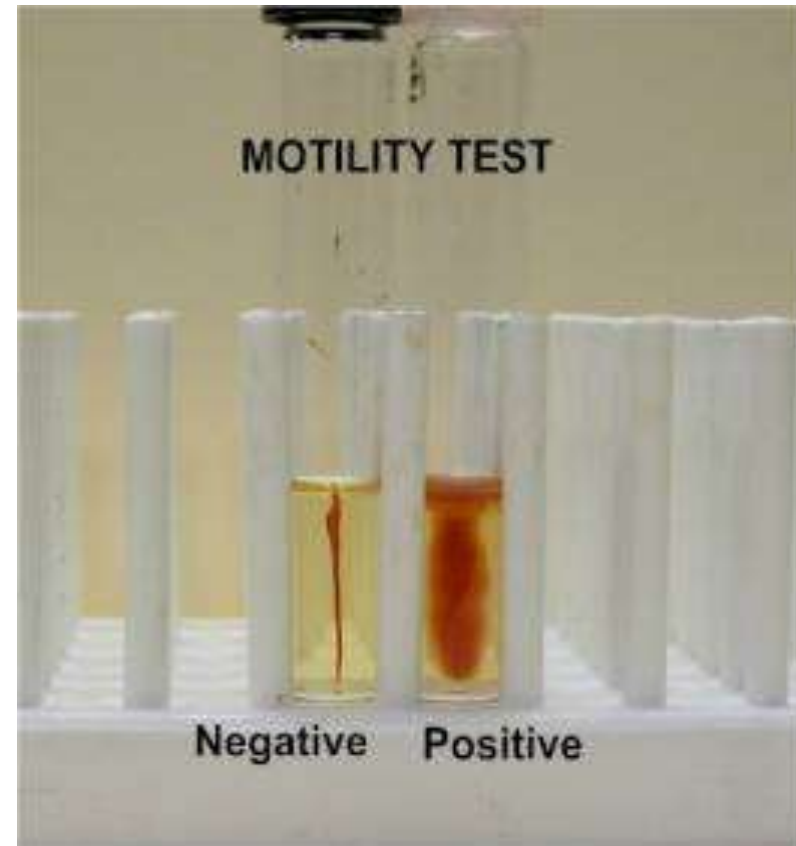
# Δοκιμασία ινδόλης

- Ελέγχει την ικανότητα του (ΜΚ) να παραγει το ένζυμο **τρυπτοφανάση που υδρολύει το αμινοξύ τρυπτοφάνη σε ινδόλη και αλδεύδη**
- Χρησιμοποιούμε :
  - \* πεπτονούχο ζωμό με 1% τρυπτοφάνη
  - \* επώαση 18-24 ω
  - \* αντιδραστήριο Kovacs (p dimethyl amino benzaldehyde, amyl alcohol, HCL)
- (+): ροζ δακτύλιος στην επιφάνεια (πχ *E.coli*)
- (-): άχρωμος δακτύλιος στην επιφάνεια (πχ *Klebsiella spp*)



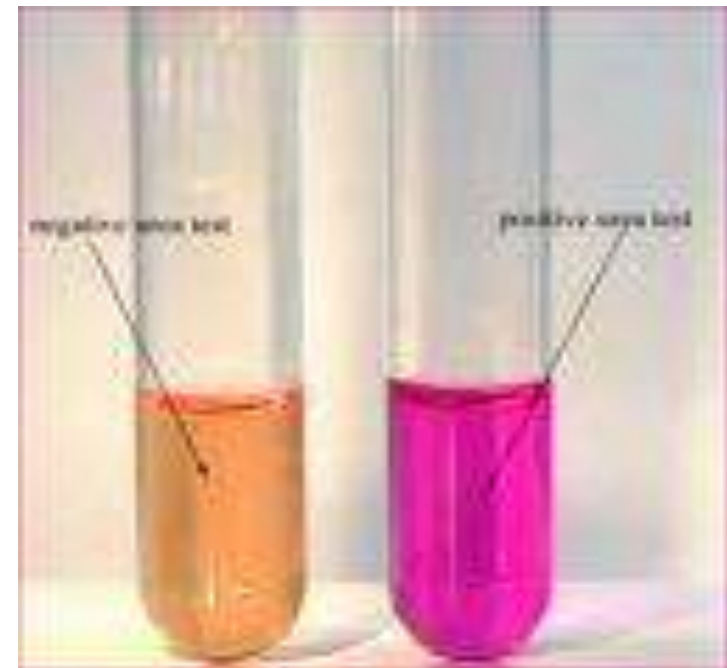
# Δοκιμασία κινητικότητας

- Ελέγχει την **ικανότητα των (ΜΚ)**, κυρίως των βακτηριδίων και σπανίως των κόκκων, **να κινούνται λόγω ύπαρξης μαστιγίων.**
  - Χρησιμοποιούμε:
    - \*ημίρρευστο άγαρ σε σωληνάριο, με ή χωρίς χρωστική.
    - \*εμβολιασμό με βαθειά νύξη
    - \*επώαση 18-24 ω σε 35-37°C
  - (+):διάχυση και θόλωση του υλικού
- 
- Το αποτέλεσμα εξαρτάται και από τις συνθήκες επώασης.  
Πχ *Y. enterocolitica* κινητή σε 20-25°C και ακίνητη σε 30°C



# Δοκιμασία ουρεάσης

- Ελέγχει την **ικανότητα των (ΜΚ) να διασπούν την ουρία σε δύο μόρια αμμωνίας, με το ένζυμο ουρεάση που διαθέτουν**, με αποτέλεσμα την αύξηση του pH του υλικού
- Χρησιμοποιούμε:
  - \*Θρ. ζυμό με ουρία και δείκτη ερυθρό της φαινόλης, σε pH 6.8
  - \*επώαση 18-24 ω σε 35-37°C
- (+):ροζ χρώμα από την αλλαγή του δείκτη με την αύξηση του pH σε 8.4  
Πχ. *Proteus spp*,  
*Helicobacter/campylobacters*



# Δοκιμασία

## κοαγκουλάσης(πηκτάσης)

- Ελέγχει την **ικανότητα των σταφυλοκόκκων να προκαλούν πήξη του πλάσματος με τη βοήθεια του ενζύμου κοαγκουλάση που παράγουν σε δύο μορφές την συνδεδεμένη στο κυτταρικό τοίχωμα (clumping factor) και την ελεύθερη που ελευθερώνεται από το (ΜΚ)**

- Χρησιμοποιούμε:

**\*δοκιμάσια πλακός για τη συνδεδεμένη**

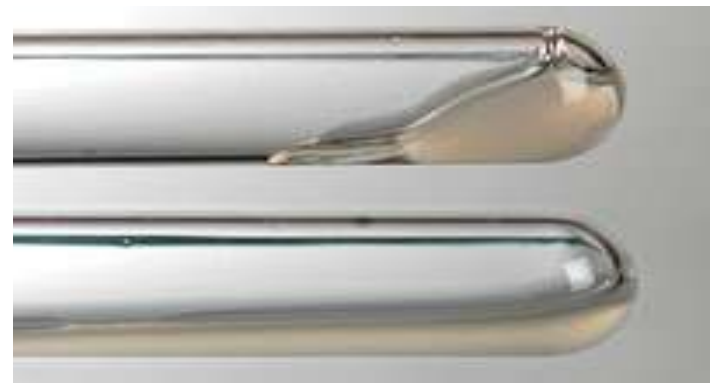
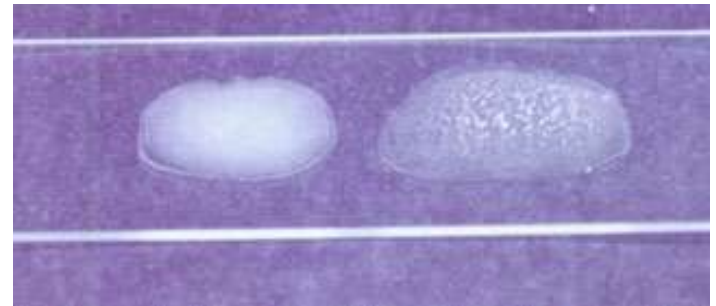
(εναιώρημα σταφυλοκόκκου + αναραίωτο πλάσμα ή αντιδραστήριο με σωματίδια latex)

- (+): παραγωγή κροκίδων

**\*δοκιμασία σωληναρίων για την ελεύθερη**

(εναιώρημα σταφυλοκόκκου + αραιωμένο κατάλληλα πλάσμα ανθρώπου ή εμπορικού σκευάσματος με πλάσμα κονίκλου, επώαση 4 ω)

- (+): παραγωγή πηγματος





# Δοκιμασία O-NPG (o-nitrophenyl-β-galactopyranoside)

- Ελέγχει την παρουσία της β-galactosidase στον (ΜΚ) η οποία μαζί με την περμεάση προκαλεί τη διάσπαση της λακτόζης σε γαλακτόζη και γλυκόζη.

-----

**Περμεάση:** εισάγει τη λακτόζη στο κύτταρο ενώ η γαλακτοσιδάση τη διασπά.

Μερικά (ΜΚ) έχουν μόνο γαλακτοσιδάση και αδυνατούν να διασπάσουν τη λακτόζη(=βραδέως ζυμούνται)

-----

Χρησιμοποιούμε :

\* διάλυμα O-NPG (έχει ίδια δομή με τη γαλακτόζη)

\* επώαση 18-24 ω σε 35-37°C

- (+): κιτρινο χρώμα  
(Πχ βραδέως ζυμούνται την λακτόζη εντεροβακτηριακά , ναισέριες κ.α)







# Άλλες δοκιμασίες

---

- Χρησιμοποίηση υδατανθράκων
- Δοκιμασία οξειδωσης/ζύμωσης γλυκόζης
- Δοκιμασία απαμίνωσης φαινυλαλανίνης
- Δοκιμασία αποκαρβοξυλίωσης λυσίνης
- Δοκιμασία χρησιμοποίησης τριών σακχάρων  
κ.α



# ΣΚΕΠΤΙΚΟ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ

---

Συνδιαζουμε όλα τα χαρακτηριστικά που διαθέτουμε για ένα συγκεκριμένο (ΜΚ) και σταδιακά καταλήγουμε στην ταυτοποίηση του εφαρμόζοντας γνωστούς αλγορίθμους



# Βιοχημική Ταυτοποίηση (χεριού) .(i)

---

## Μέθοδος διασταύρωσης αποτελεσμάτων ή σκακιέρα

- Ελέγχεται μεγάλος αριθμός βιοχημικών δοκιμασιών (ΒΔ) σύμφωνα με το 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.

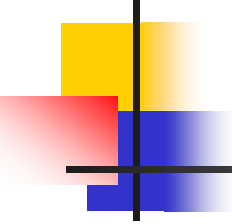
- Μέθοδος απλούστερη

- 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 (+) κόκκοι**

**Αποκλειστικά  
αναερόβιοι**

*Peptostreptococcus*  
*Gemella morbillorum*

**Αερόβιοι/δυσνητικά  
αναερόβιοι**

**Καταλάση (-)**

*Streptococcus*  
*Enterococcus*  
*Aerococcus...*

**Καταλάση (+)**

*Staphylococcus*  
*Micrococcus*  
*Enterococcus*

**Gram (-) βακτηρίδια**

**Κόκκοι/  
Κοκκοβακτηρίδια**

**Βακτηρίδια**

**Αερόβια/  
Δυνητικά αναερόβια**

**Αυστηρά αναερόβια**

**Αερόβια/  
Δυνητικά αναερόβια**

**Αυστηρά αναερόβια**

**Acinetobacter  
Kingella  
Moraxella  
Neisseria**

**Veillonella**

**Επόμενος πίνακας**

**Bacteroides  
Fusobactrrium  
Prevotella  
.....**

Αερόβια /δυσνητικά  
αναερόβια Gram(-)  
βακτηρίδια

Μικρά /πολύμορφα

*Actinobacillus*  
*Bordetella*  
*Brucella**Pasteurella*  
*Haemophilus*  
*Acinetobacter*  
*Bartonella*

Ανισομεγέθη  
αραιοχρωματικά

*Legionella*

Ευθείες πλευρές

Oxidase (+)

*Pseudomonas*  
*Aeromonas*  
*Burkholderia*  
*Flavobacterium*  
*Alcaligenes*

Oxidase (-)

*Enterobacteriaceae*  
*Stenotrophomonas*  
*Acinetobacter*

Καμπυλομορφα

*Campylobacter*  
*Helicobacter*  
*Arcobacter*

# Εμπορικά κωδικοποιημένα Συστήματα ταυτοποίησης (I)

- Χαρακτηριστικά υποστρώματα σε αποξηραμένη μορφή βρίσκονται σε ειδικούς υποδοχείς πάνω σε ταινίες ή πλάκες και προορίζονται για **Gram(+)** και **(-)** αερόβια βακτήρια, **Gram (-)** αζυμωτικά βακτήρια, **Αιμοφίλους / Ναισέριες, Σταφυλοκόκκους και Στρεπτοκόκκους, Κορυνοβακτηρίδια, Βακίλους, Αναερόβια, Μύκητες κ.ά.**
- Τα υποστρώματα ανασυστήνονται με την εφαρμογή του μικροβιακού εναιωρήματος, ορισμένης πυκνότητας της κλίμακας Mac Farmland και εφαρμόζονται αναερόβιες συνθήκες, όπου χρειάζονται.
- Γίνεται επώαση για 18-24 ώρες
- Προστίθενται ή όχι αντιδραστήρια, αξιολογείται η χρωματική μεταβολή και βαθμολογείται το αποτέλεσμα
- Αθροίζεται η βαθμολογία ανά τρεις αντιδράσεις και ο τελικός αριθμός διαβάζεται είτε σε βιβλία είτε σε πρόγραμμα υπολογιστού



# Εμπορικά κωδικοποιημένα Συστήματα ταυτοποίησης (II)

- Η τελική ταυτοποίηση προκύπτει από τη σύγκριση του 'Χ αριθμού' με τους αντίστοιχους της βάσης δεδομένων κάθε συστήματος και την εύρεση του ποσοστού ομοιότητας
- Στο αποτέλεσμα αναφέρονται:
  - ομοιότητα =>90% , τότε η ταυτοποίηση δεν έχει πρόβλημα
  - ομοιότητα περίπου 90%, τότε η ταυτοποίηση μπορεί να ολοκληρωθεί με 1-2 συμπληρωματικές δοκιμασίες
  - ομοιότητα χαμηλή, τότε η ταυτοποίηση απορρίπτεται
  - excellent, very good, acceptable ID.  $\neq 90\%$
  - questionable, doubtful ID. Η ταυτοποίηση επαναλαμβάνεται

# Κωδικοποίηση Συστήματος Ανάγνωσης

- Το αποτέλεσμα των ΒΔ είναι (+) ή (-)
- Ο υπολογιστής στον προγραμματισμό του δέχεται μόνο θετικά ή αρνητικά στοιχεία στο δυαδικό σύστημα αριθμών "1" και "0"
- Τα αποτελέσματα των (ΒΔ) εισάγονται στον υπολογιστή σαν "1"τα (+) και "0" τα(-). πχ 101 010 000 111 111 011 100
- Οι δυαδικοί αριθμοί μετατρέπονται στο οκταδικό σύστημα αριθμών από 0-7. Έτσι έχουμε 5 2 0 7 7 6 1 στο προηγούμενο. Ο αριθμός αυτός είναι ο βιότυπος
- Η ταυτοποίηση με τον τρόπο αυτό εκατομμυρίων στελεχών έχει δημιουργήσει ισχυρές και αξιόπιστες βάσεις δεδομένων οι οποίες πλουτίζονται συνεχώς.

# Εμπορικά Συστήματα ταυτοποίησης (1)

- Έχουν ακρίβεια, μεγάλη διάρκεια ζωής
- Είναι εύκολα στη χρήση
- Δίνουν ξεκάθαρα αποτελέσματα **ΑΡΚΕΙ ΝΑ ΕΜΒΟΛΙΑΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΚΑΘΑΡΟ ΚΑΙ ΦΡΕΣΚΟ ΚΑΛΛΙΕΡΓΗΜΑ**
- Σε οποιοδήποτε αμφιβολία επανελέγχουμε τις εκτιμήσεις μας και ανατρέχουμε στις σημειώσεις των συστημάτων.

# Εμπορικά Συστήματα ταυτοποίησης (2)

- **API - bioMerieux**  
[20 και 32 δοκιμασιών, διάφορα είδη ]



- **BBL Crystal - Becton Dickinson**



# Εμπορικά Συστήματα ταυτοποίησης (3)

- Micro ID - Remel



- Sensitetre systems



- Και άλλα...

# Ημιαυτόματα και

# Αυτόματα ταυτοποιητικά Συστήματα

- Αποτελούνται από το **όργανο εμβολιασμού**, το **όργανο επώασης** και τον **υπολογιστή** για την εισαγωγή των δημογραφικών στοιχείων του ασθενούς και την ανάγνωση των αποτελεσμάτων
- **Χρησιμοποιούν μεγάλο αριθμό υποστρωμάτων**, έως και 96, κλεισμένα σε κάρτες ( Vitek ) ή πλάκες ( Phoenix , Microscan ), τα οποία αποτελούν τα Panels των διαφόρων συστημάτων
- **Ο εμβολιασμός** γίνεται εύκολα και προτυπωμένα, με μικρή ανθρώπινη παρέμβαση
- **Κατά την επώαση γίνεται συνεχής παρακολούθηση της αντίδρασης** η οποία είναι χρωματομετρική ή φθοριομετρική
- Όπου χρειάζεται γίνεται αυτόματα **προσθήκη αντιδραστηρίων**
- **Το τελικό αποτέλεσμα δίνεται σε 2-12 ώρες**

# Εμπορικά Συστήματα αυτόματης ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ

- **Vitek System**  
*- bioMerieux Vitek Inc*



- **Phoenix System**  
*- Becton Dickinson*



# Εμπορικά Συστήματα αυτόματης ταυτοποίησης

- Microscan Walkaway System - *Dade*



- Sensititre autoidentification System







# Ορολογική ταυτοποίηση / Τυποποίηση (I)

---

Απαιτείται για κλινικούς και επιδημιολογικούς κυρίως λόγους:

## 1. 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 πνευμονιοκόκκων
- Τυποποίηση βρουκελλών (*melitensis*, *abortus* )
- Ταυτοποίηση *S.aureus*



# Ορολογική ταυτοποίηση/Τυποποίηση (II)

---

## 2. Γρήγορη ταυτοποίηση σε κλινικά δείγματα

- Μηνιγγιτιδογόνα βακτήρια σε ΕΝΥ
- Πνευμονιόκοκκος σε αίμα ,πλευριτικό υγρό κ.ά
- Στρεπτόκοκκος ομάδας Α σε φαρυγγικό επίχρισμα

---

Αναπνευστικοί ιοί ( γριπης,RSV, adeno) σε ρινικό έκπλυμα

---

**ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΝΤΑΙ**

- . Αντιοροί,
- . Αντιδραστήρια latex
- . Ανοσοχρωματογραφία



# Μοριακή ταυτοποίηση / τυποποίηση

---

*Ανιχνεύονται χαρακτηριστικές αλληλουχίες βάσεων στο γενετικό υλικό των μικροοργανισμών με τεχνικές DNA*

1. Μοριακές τεχνικές ταυτοποίησης
2. Μοριακές τεχνικές τυποποίησης



# Μοριακές τεχνικές ταυτοποίησης

---

- **PCR** (Polymerase Chain Reaction =αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης)
- **Real Time PCR** (=αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου)
- **Υβριδισμός**

Για το κλινικό εργαστήριο θεωρείται απαραίτητη σαν ελάχιστη δυνατότητα η PCR για τον προσδιορισμό του 16S RNA των βακτηρίων.



# Μοριακές τεχνικές τυποποίησης

---

## Προσδιορίζεται ο γονότυπος

- PFGE (=Ηλεκτροφόρηση σε παλλομενο ηλεκτρικό πεδίο)
- PCR ( AFLP, RAPD, AP-PCR, DAF)
  
- Sequencing
  - MLST (Multi Locus Sequencing Typing )
  - VNTR ( Variable Number Tandem Repeat Analysis)
  - MLVA (Multi Locus Variable of Tandem Repeat Analysis)
- Ριβοτυπία



# Πλεονεκτήματα των μοριακών τεχνικών έναντι των κλασσικών τεχνικών

---

- Αξιόπιστη ταυτοποίηση του βακτηρίου τόσο σε επίπεδο γένους και είδους
- Ανίχνευση γονιδίων αντοχής
- Ταχύτητα στην ανίχνευση του αιτιολογικού παράγοντα της λοίμωξης
- Σημαντική βοήθεια στη διερεύνηση των ενδονοσοκομειακών λοιμώξεων



# Αξιολόγηση αποτελέσματος Μοριακών Τεχνικών

---

- Απαιτείται εμπειρία
  - Πρέπει να συνδυάζονται με τα αποτελέσματα των συμβατικών μεθόδων
  - Απαραίτητη η επικοινωνία με τους κλινικούς ιατρούς
- 

[www.ekmed.gr](http://www.ekmed.gr) : Ημερίδα 24/01/2009

*" Μοριακές τεχνικές στην Κλινική Μικροβιολογία"*

Εφαρμοσμένη Κλινική Μικροβιολογία και Εργαστηριακή Διαγνωστική  
2009 : τόμος 14, Τεύχος 2