

# Gram Pozitif Bakterilerde İdentifikasyon Algoritması

Yrd.Doç.Dr. Murat DİZBAY

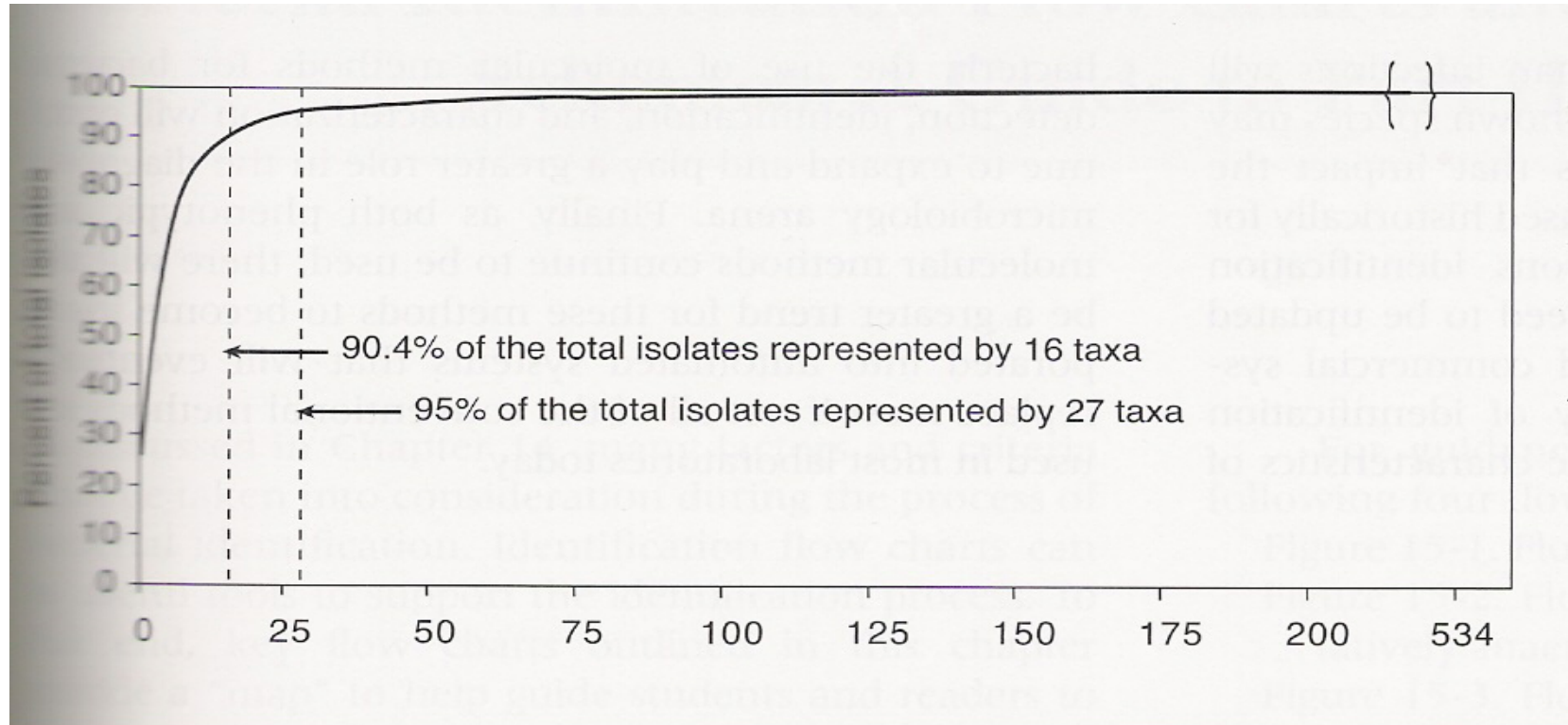
Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi

Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji AD

# Doğru identifikasyonun önemi

- Patojenin klinik öneminin belirlenmesi
- Hasta bakımında hekime yardımcı olma
- Antimikrobiyal direncin saptanması için uygun laboratuvar testinin seçimi
- Uygun antimikrobiyal tedavinin seçimi
- Olağandışı duyarlılık profillerinin belirlenmesi
- Mikroorganizmanın diğer hastalar veya çalışanlar için riskinin belirlenmesi

# TSN Database - USA



# İdentifikasyon şemaları

- Bakteri identifikasyonu için kolaylık sağlar ancak limitasyonu bilinmelidir
- Genel bilgi sağlarlar, detaylar eksiktir
- Bazen pratik kullanım için uygun değildir
- Kriterler şemada yer almak için çok komplike olabilir
- Taksonomideki değişiklikler nedeniyle güncelliğini yitirebilirler
- **Her zaman istisnalar vardır !!!**

# İdentifikasyon şemaları

- Sadece klinik önemi olan izolatların identifikasyonu maliyet ve işgücü açısından önemlidir



# İdentifikasyon şemaları

- Başlıca iki gruba ayrılır:
  - Genotipik özelliklere göre
  - Fenotipik özelliklere göre olanlar
- Bazı şemalar hem genotipik hem de fenotipik özellikleri içerir
- Bazı testler (ör. Gram boyama) bir çok şemanın içinde yer alırken diğer bazı testler tek bir türün ayırımı için kullanılır (ör. *L. pneumophila* için floresan antikor testi)

# Genotipik identifikasyon

- Moleküler teknikler ile bakterinin DNA / RNA analizi yapılır
- Belli mikroorganizmalar için spesifik olan bir gen veya nükleik asit parçası saptanır
- Duyarlılıkları ve özgüllükleri yüksektir
- Teknik sayısı giderek artmaktadır ve gelecekte tanısal mikrobiyolojide daha çok kullanılacaklardır

# Genotipik identifikasyon

## ● Avantajları

- Hızlı (ör. MRSA)
- Antibiyogram gerektirmeyen (ör. Chlamydia) veya uygun yöntemi bulunmayan (ör. Ehrlichia) mo.larda
- Cansız mo.ları saptayabilir
- Kültürde üremeyen mo.lar (Hepatit B, T. whipplei)
- Yavaş üreyenler (bazı funguslar mikobakteri,)
- Kantitasyon (HBV, HCV, CMV)
- Klonalitenin gösterilmesi

## ● Dezavantajları

- Pahalı
- Primerlere bağımlı
- Polimikrobiyal örneklerde yetersiz
- Yanlış pozitiflik



# Fenotipik identifikasyon

- Bakterinin gözlenebilen fiziksel ve metabolik özelliklerine göre yapılır
- En sık kullanılan yöntemlerdir
- Bazı özellikler bakterinin antijenik yapısına bağlıdır
- En sık kullanılan fenotipik özellikler:
  - Mikroskopik morfoloji ve boyanma özellikleri
  - Makroskopik (koloni) morfoloji
  - Üreme için gerekli çevresel gereksinimler
  - Antimikrobiyallere duyarlılık / direnç
  - Nutrisyonel gereksinimler ve metabolik özellikler

# Fenotipik identifikasyon

- Üreme özellikleri, mikroskopik morfoloji ve tek test sonuçları (ör. Katalaz) bakterileri genel gruplara ayırabilir
- Ancak ileri tanımlama için metabolik özelliklerin yer aldığı şemaların kullanılması gereklidir

# Fenotipik identifikasyon

- İdentifikasyon sistemleri genellikle 4 majör komponenti içerirler:
  - Uygun testin ve inokülasyonun seçilmesi
  - Substrat kullanımı veya üreme inhibitörleri ile etkileşim için inkübasyon
  - İnkübasyon sırasında oluşan metabolik aktivitenin belirlenmesi
  - Metabolik profillerin analizi – bilinen bir veri tabanı ile karşılaştırma

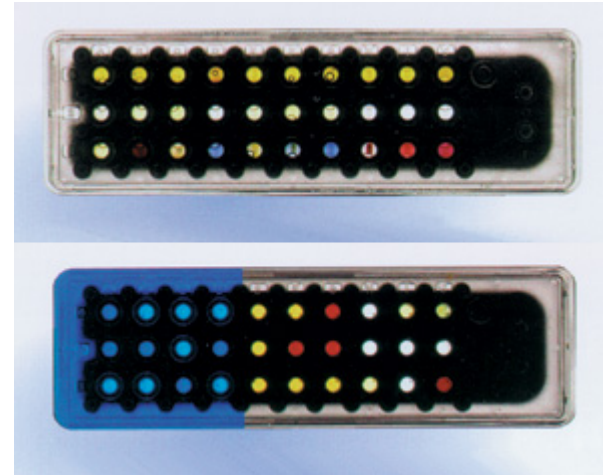
# Fenotipik identifikasyon yöntemleri

- Konvansiyonel yöntemler
- Ticari identifikasyon sistemleri
  - Manual: Crystal Gram-Positive ID, API 20 Strep, RapID STR, API STAPH, API Coryne
  - Otomatize: GPI, Pos ID2, Sensititre AP90
  - Kullanımları kolaydır ve işgücünü azaltır
  - Küçük hacimlidirler
  - Bilgisayar aracılı veri tabanı olanlarda tür identifikasyonu daha kolaydır
  - Test edilen özellikler standart değil
  - Manual sistemlerde yorumlamada hatalar olabilir

# Ticari identifikasyon sistemleri



API sistemleri

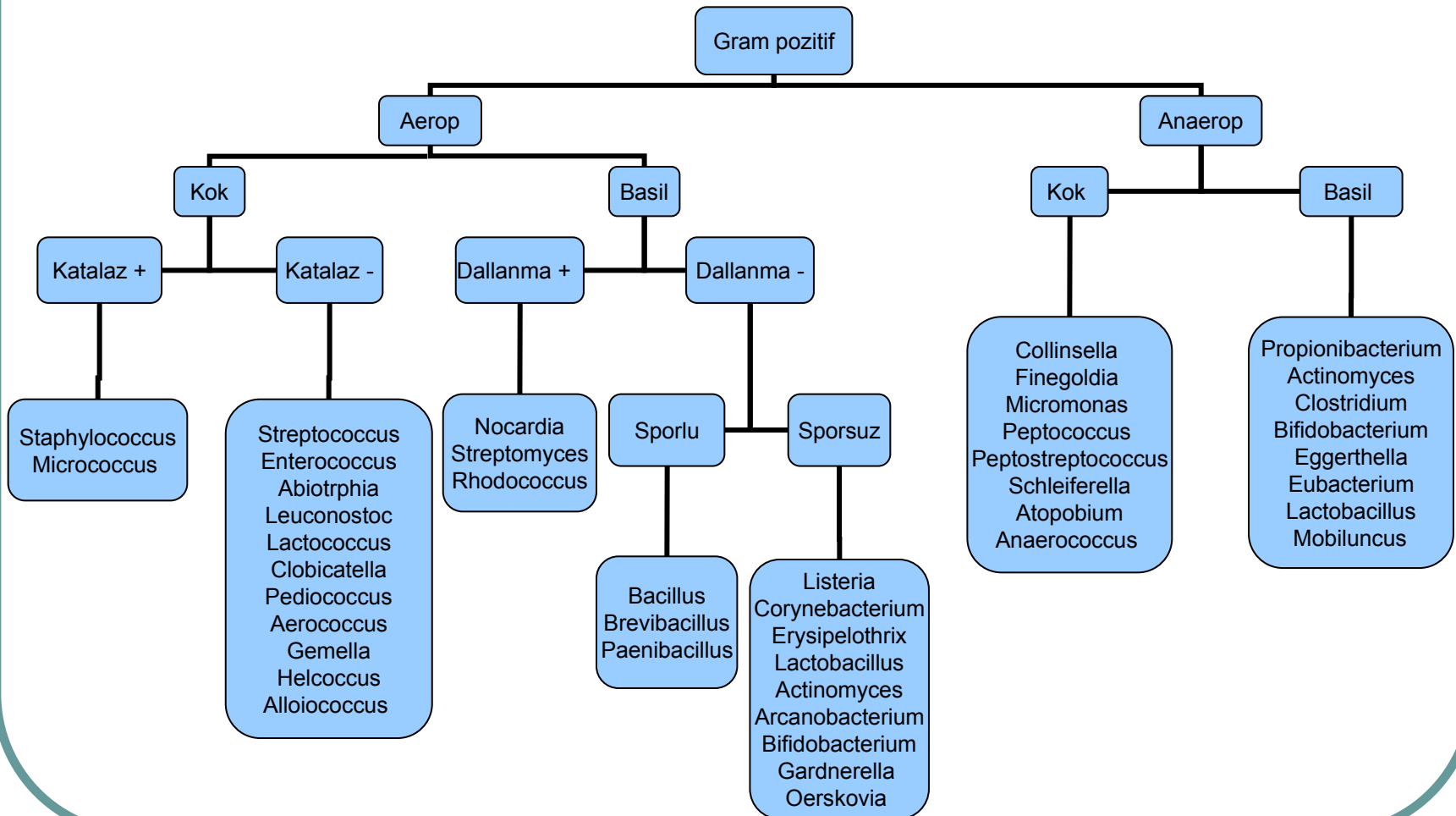


BBL Crystal



RapID STR

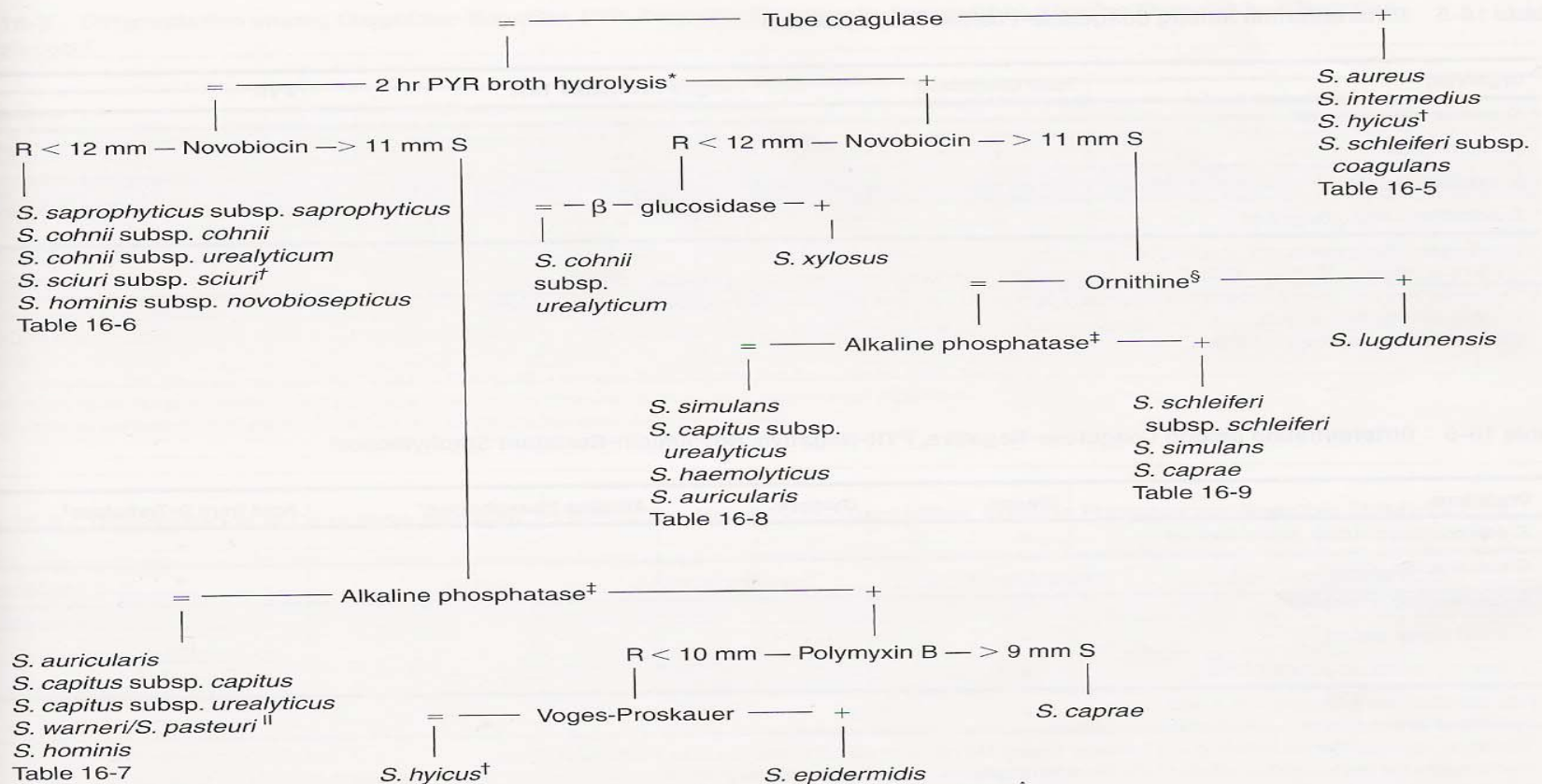
# Gram pozitif bakterilerin identifikasyonu



# Katalaz (+) kokların identifikasyonu

<b>Özellik</b>	<b>Mikrokok</b>	<b>Stafilokok</b>
Üreme hızı	Çok yavaş	Yavaş-hızlı
Glukozdan asit (anaerobik)	-	+
Lysostaphin	R	S
Furazolidone	R	S
Bacitracin	S	R
Modifiye oksidaz	+	-
Glyserolden asit (eritromisinli)	-	+

# Stafilokokların identifikasyonu





# Olgu 1

- Crohn hastalığı öyküsü olan genç bir erkek hasta şikayetlerinin çok artması nedeniyle parenteral nutrisyon ve ağrı kesici tedavisi almakta.
- Hastalığı nedeniyle gelişmesi geri olmakla birlikte okuluna devam ediyor ve sosyal olarak uyumlu
- Bir veterinerin yanında çalışan annesiyle birlikte yaşıyor
- Karında gerginlik ve santral kateter çıkış yerinde ve tünel boyunca olan eritem nedeniyle hastaneye başvuruyor
- Alınan kateter kan ve kateter ucu kültürlerinde gram (+), katalaz (+) kok üremesi var
- Tüp koagülaz testi (+), lam koagülaz testi (-)

# Olgu 1

- Hangi ileri biyokimyasal testleri yapmak isterdiniz?
  - PYR, Beta-galaktozidaz, Voges-Proskauer
  - Bu testler koagülaz (+) stafilokokları ayırır
  - *S. intermedius*, VP (-), PYR (+)
  - Köpeklerde patojendir. Muhtemelen anneden geçiş

# Koagülaz (+) stafilokokların ayırımı

Organizma	Tüp koagülaz	V-P test	PYR
<i>S. aureus</i>	+	+	-
<i>S. intermedius</i>	v	-	+
<i>S. hyicus</i>	v	-	-
<i>S. schleiferi</i>	+	+	+

# Olgu 1

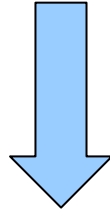
- Kan kültüründe üreyen ve PYR testi pozitif olanlarda başka hangi test mutlaka yapılmalıdır?
  - Ornitin dekarboksilaz testi
  - *S. lugdunensis*'i ayırmada önemli
  - *S. lugdunensis* lam koagülaz (+), tüp kg (-). Tipik beta-hemoliz yapmaz. İnfektif endokarditle ilişkili. Tedavisi uzun ve agresif. ~Yaklaşık yarısı beta-laktamaz (-). Bu sonuç lab. tarafından bildirilmelidir.

# Olgu 1

- Stafilokoklarda beta-laktam ilaçlara direncin en önemli mekanizması?
  - MecA geni varlığında PBP2a'nın sentezlenmesi ve beta-laktam ilaçların bu yeni proteine bağlanamaması
- Metisilin direncini/duyarlılığını en iyi gösteren antimikrobiyal ajan hangisidir?
  - Sefoksitin kendisi stafilokokal bir ajan olmamakla birlikte metisilin direncini en iyi gösteren ajandır.

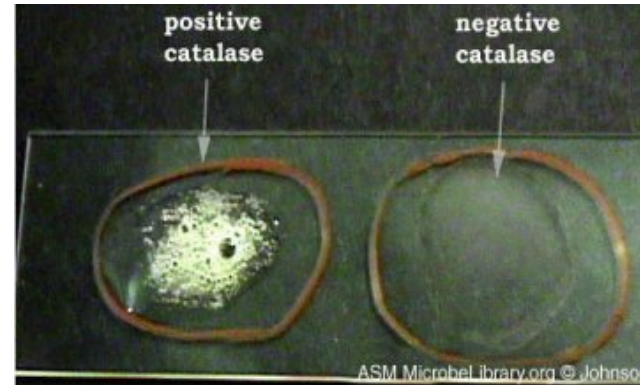
# Koagülaz negatif stafilokokların ayırımı

- PYR, Novobiocin ve Alkalen fosfataz

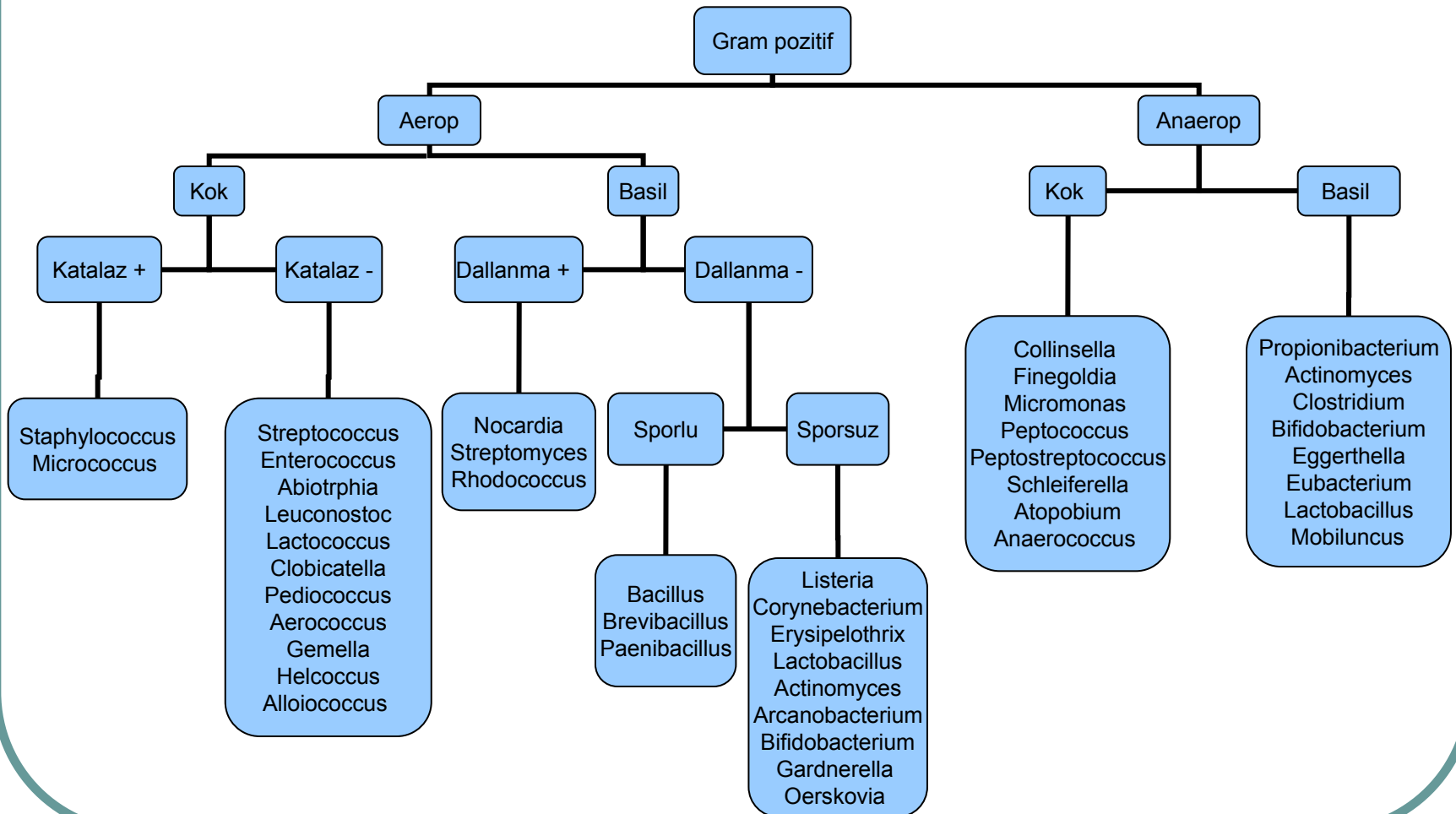


- Üreaz, oksidaz, beta-glukuronidaz, beta-galaktozidaz, anaerobik üreme, D-trehaloz ve mannitolden asit oluşturma ve polimiksin B'ye dirençli olma özelliklerine göre ayırım yapılır

# Koagülaz negatif stafilokokların ayrımı

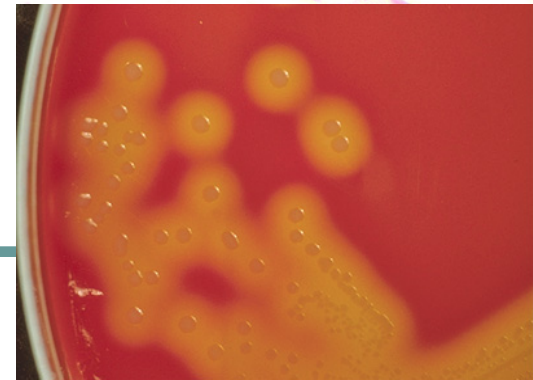
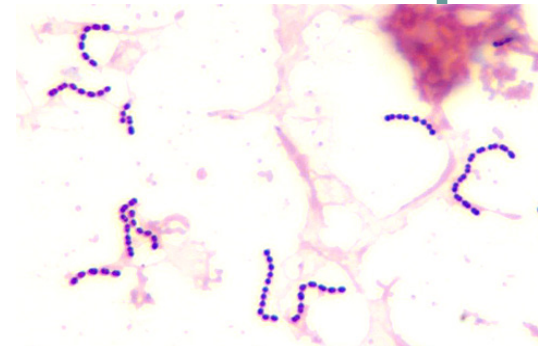


# Katalaz (-) kokların identifikasyonu





- Katalaz (-) kokların identifikasyonu;
  - Gram boyama
  - Besiyerinin seçimi
  - Koloni morfolojisi
  - Hemoliz (alfa, beta, gama)
  - Antijenik ayırım (Lancefield)
    - Serolojik testler → *S. pneumoniae*



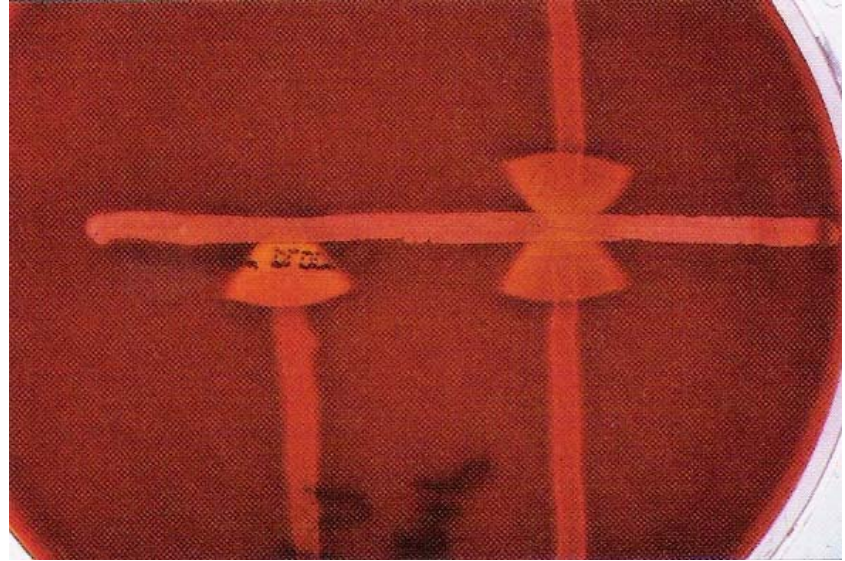
# Bacitracin duyarlılığı

- GABHS (*S. pyogenes*) ayırımında önemli
- Ucuz ve basittir, ancak özgüllüğü yüksek değil
- C ve G grubu streptokokların %10'u, B grubu streptokokların %5'i bacitracine duyarlıdır
- SXT ile birlikte yapılmıca daha özgül. C ve G grubu SXT'ye duyarlı, A ve B grubu dirençli

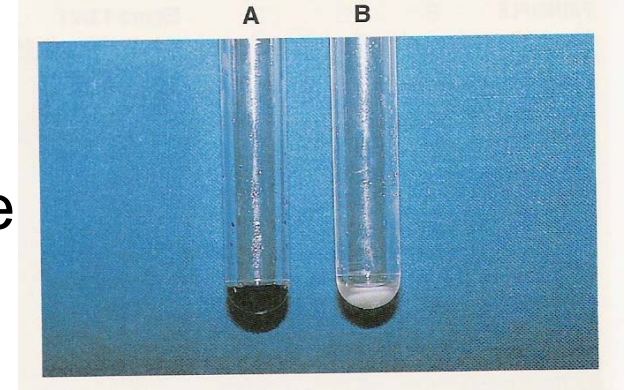


# CAMP testi

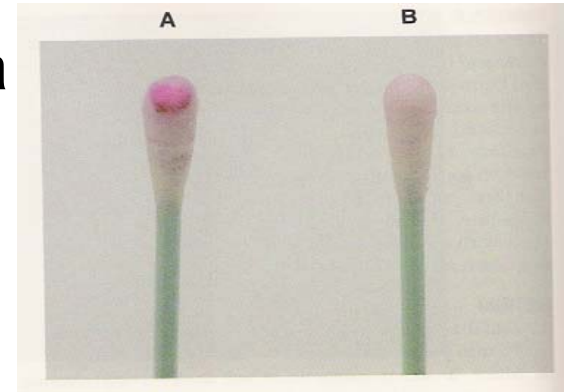
- B grubu streptokoklardan (*S. agalactiae*) salınan CAMP faktör, *S. aureus*'un beta-hemolizini ile sinerjik etki gösterir
- Duyarlılığı yüksektir



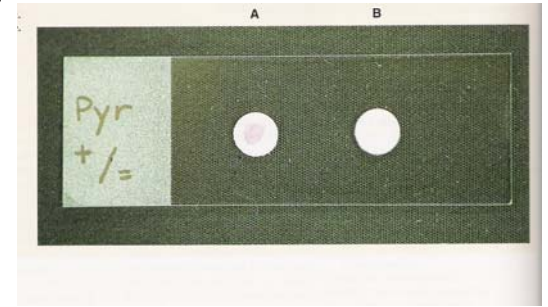
- Sodyum hippürat hidrolizi
  - Grup B streptokoklar hippüratı glisin ve benzoik asite hidrolize ederler



- Lösin aminopeptidaz (LAP) testi
  - Streptokoklar ve enterokoklarda pozitif. Diğer türlerin ayırımında önemli



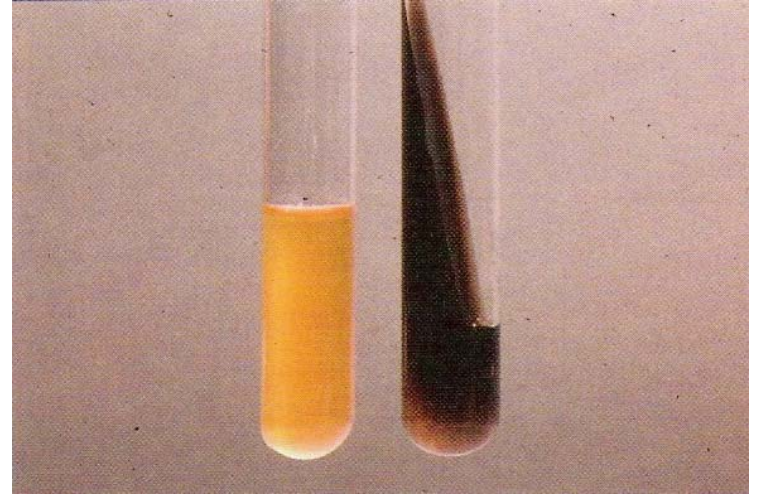
- Pyrrolidonyl arylamidase (PYR)
  - A ve D grubu streptokoklar için ayırıcı
  - Bacitracin ve tuz tolerans testinin yerine geçer



- Optokin duyarlılığı ve Bile-solubility
  - Pnömonokların ayırımı için kullanılmaktadır



- **Safralı-eskülinli agar**
  - Enterokokların ve D grubu streptokokların ayırımında kullanılır



- **%6.5 NaCl – Tuz tolerans testi**
  - Enterokokları Grup D streptokoklardan (*S. bovis* ve *S. equinus*) ayırır

# Streptokokların identifikasyonu

**Table 13-2** Phenotypic Criteria for Presumptive Identification of Clinically Significant Streptococci and Enterococci

ORGANISM	HEMOLYSIS	BACITRACIN	SXT	CAMP TEST	HIPPURATE HYDROLYSIS	LAP	PYR	BILE ESCULIN	GROWTH, 6.5% NaCl BROTH	OPTOCHIN	BILE SOLUBILITY
Group A streptococci	β	S	R	–	–	+	+	–	–	R	–
Group B streptococci	β, none	R	R	+	+	+	–	–	V	R	–
Groups C, F, and G streptococci	β,	V	S	–	–	+	–	–	–	R	–
Group D enterococci	α, β, none	R	R	–	V	+	+	+	+	R	–
Group D streptococci, not enterococci	α, none	R	S	–	–	+	–	+	–	R	–
Viridans streptococci	α, none	V	S	–	V	+	–	V	–	R	–
Pneumococci	α	V	S	–	–	+	–	–	–	S	+

+, positive reaction; –, negative reaction; S, susceptible; R, resistant; SXT, sulfamethoxazole-trimethoprim; LAP, leucine aminopeptidase; PYR, pyrrolidonyl arylamidase.

# Viridans streptokokların identifikasyonu

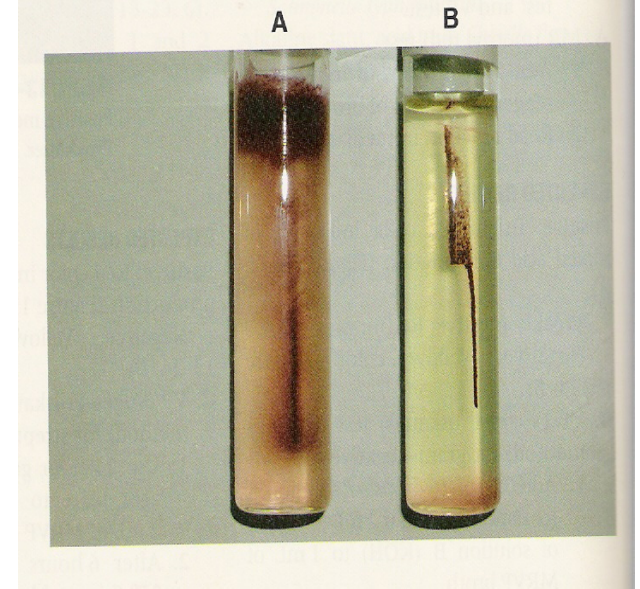
- Alfa-hemoliz / non-hemolitik
- Optokin-R, safrada çözünmezler
- 6 gruba ayrılırlar:
  - Sanguis grup
  - Mitis grup
  - Mutans grup
  - Salivarium grup
  - Anginosus grup
  - Bovis grup
- Arginin dihidrolaz, eskülin hidrolizi, asetonin üretimi (VP test), mannitol ve sorbitolden asit üretimi ve üreaz varlığına göre ayırım yapılır





# Enterokok türlerinin identifikasyonu

- Kanlı agarda alfa-hemolitik / non-hemolitik koloniler
- İdentifikasyon biyokimyasal ve fizyolojik testlere göre yapılır
- %6.5 NaCl'de ürerler ve eskülini hidrolize ederler
- PYR pozitiftir
- Hareket testi → *E. gallinarum* ve *E. casseliflavus*





# Diğer katalaz (-) kokların ayırımı

**Table 13-1** Phenotypic Characteristics for Presumptive Identification of Catalase-Negative, Gram-Positive Cocci

GENUS	GROWTH,	GROWTH,	GRAM STAIN MORPH- OLOGY	HEMO- LYSIS, SBA	CAT	LAP	PYR	SUSCEP- TIBILITY TO VANCO- MYCIN	GAS, MRS BROTH	MOT	GROWTH,	GROWTH, 10°C	GROWTH, 45°C
	35–37°C, CA	35–37°C, SBA									6.5% NaCl BROTH		
<i>Streptococcus</i>	+	+	Chains	α, β, γ	–	+	–	S	–	–	V	–	V
<i>Enterococcus</i>	+	+	Chains	α, γ	–	+	+	S/R	–	V	+	+	+
<i>Abiotrophia</i>	+	–	Chains	α, γ	–	+	+	S	–	–	–	–	V
<i>Granulicatella</i>	+	–	Chains	α, γ	–	+	+	S	–	–	–	–	V
<i>Aerococcus</i>	+	+	Tetrads, clusters	α	–	V	V	S	–	–	+	–	–
<i>Helcococcus</i>	+	+	Tetrads, clusters	γ	–	–	+	S	–	–	+	–	–
<i>Leuconostoc</i>	+	+	Chains	α, γ	–	–	–	R	+	–	V	+	+
<i>Weisella</i>	+	+	Chains	α, γ	–	–	–	R	+	–	+	V	V
<i>Pediococcus</i>	+	+	Tetrads, clusters	α	–	+	–	R	–	–	V	–	+
<i>Tetragenococcus</i>	+	+	Tetrads, clusters	α	–	+	–	S	–	–	+	–	+
<i>Gemella</i>	+	+	Tetrads, clusters, chains	α, γ	–	V	+	S	–	–	–	–	–
<i>Vagococcus</i>	+	+	Chains	α, γ	–	+	+	S	–	+	+	+	–
<i>Alloiococcus</i>	+	+	Clusters, tetrads	α	+	+	+	S	–	–	+	–	–
<i>Globicatella</i>	+	+	Chains	α	–	–	+	S	–	–	+	–	–
<i>Facklamia</i>	+	+	Clusters, chains	α	–	+	+	S	–	–	+	–	–
<i>Dolosigranulum</i>	+	+	Clusters, tetrads	α	–	+	+	S	–	–	+	–	–
<i>Ignavigranum</i>	+	+	Clusters, chains	α	–	+	+	S	–	–	+	–	–
<i>Dolosicoccus</i>	+	+	Chains	α	–	–	+	S	–	–	–	–	–
<i>Eremococcus</i>	+	+	Chains	α	–	–	NA	S	–	–	+ <sup>w</sup>	–	+
<i>Lactococcus</i>	+	+	Chains	α, γ	–	+	+	S	–	–	V	+	V

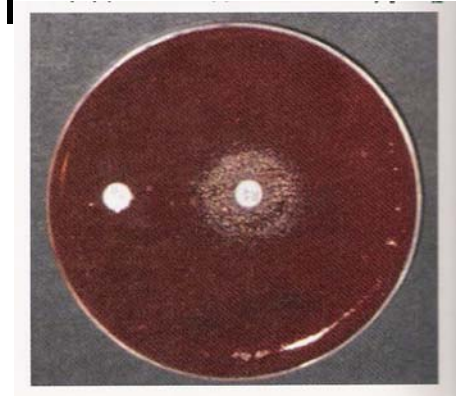
+, positive reaction; –, negative reaction; V, variable reaction; NA, data not available; +<sup>w</sup>, weak positive reaction; CA, chocolate agar; Hemolysis SBA, hemolysis on sheep blood agar; CAT, catalase; LAP, leucine aminopeptidase; PYR, pyrrolidonyl arylamidase; MOT, motility.

# Olgu 2

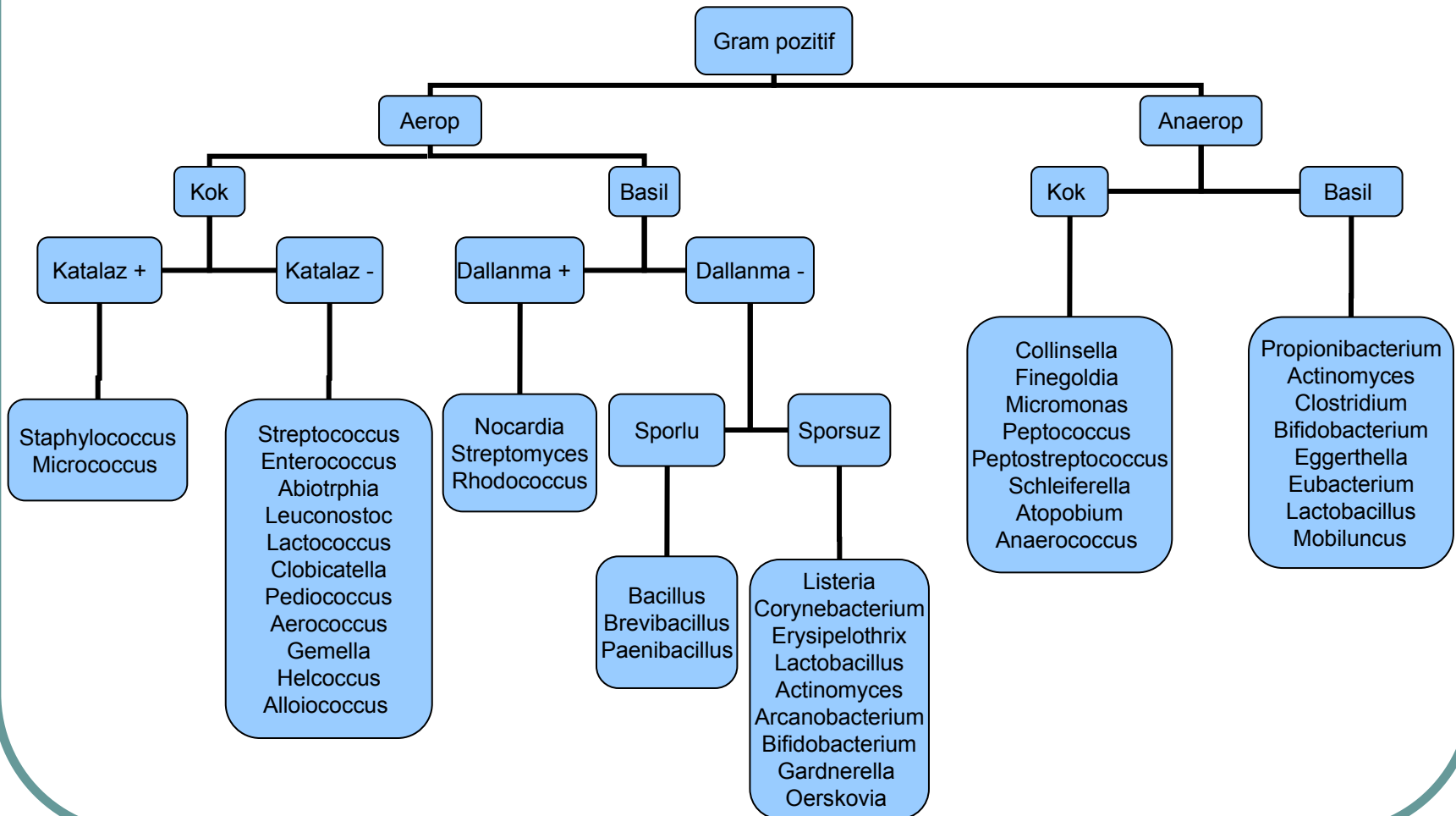
- 76 y, erkek hasta. Aterosklerozu mevcut.
- Abdominal anevrizma nedeniyle perirenal aorta rezeksiyonu.
- Op. sonrası birkaç kez yara enfeksiyonu, eşlik eden bakteremi nedeniyle tedavi edilmiş.
- *P. aeruginosa*, VR *E. faecium* ve *C. glabrata*.
- Son başvuruda kan kültürü sinyal verince yapılan gram boyamada çiftler ve kısa zincirler oluşturan gram (+) koklar görülmüş. Ancak yapılan kültürde üreme olmamış

# Olgu 2

- Bu mikroorganizma ne olabilir ve üretmek için ne yapabiliriz?
  - Vankomisin-bağımlı enterokok
  - VDE → Sadece vankomisin varlığında üreyen enterokok. İlk kez 1994'de tanımlanmıştır. VRE ile aynı risk faktörleri.
  - *E. faecium* ve *E. faecalis* suşlarında

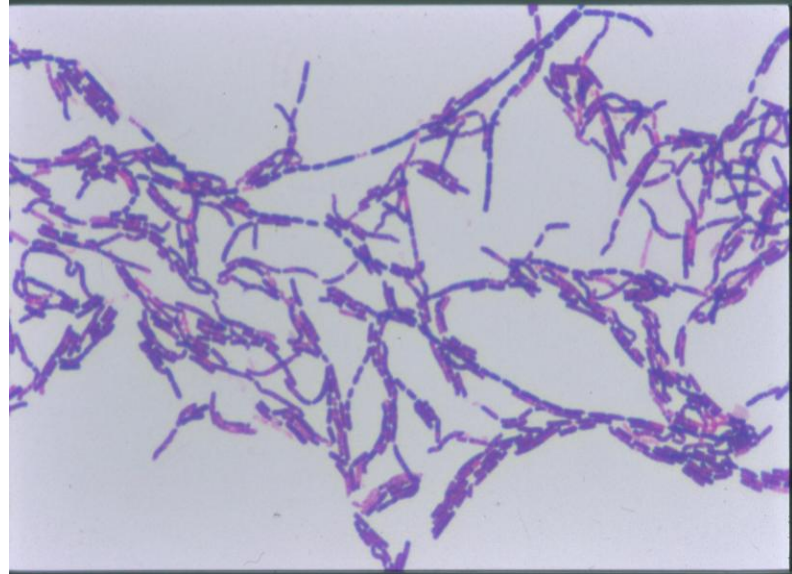


# Gram (+) basillerin identifikasyonu



# Dallanma (-), katalaz (+), spor (+) basiller

- *Bacillus* türleri
  - *B. anthracis*
  - *B. cereus*
  - *B. mycoides*
  - *B. circulans*
  - *B. subtilis*
  - *B. licheniformis*
- *Brevibacillus* türleri
- *Paenibacillus* türleri





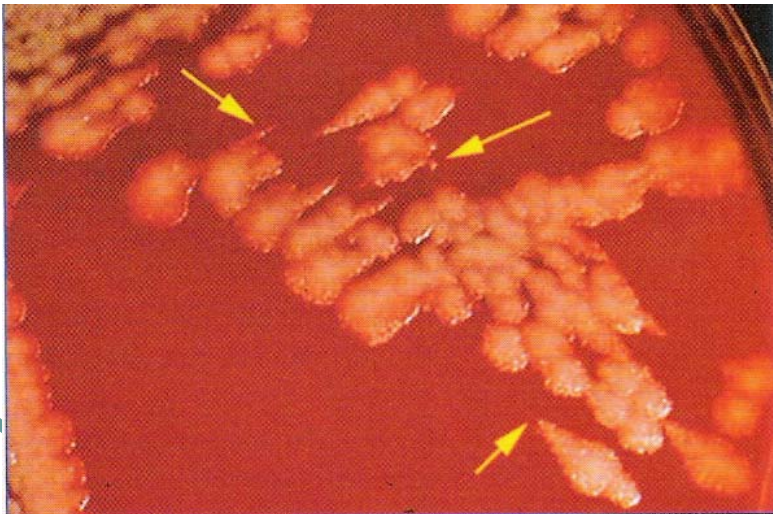
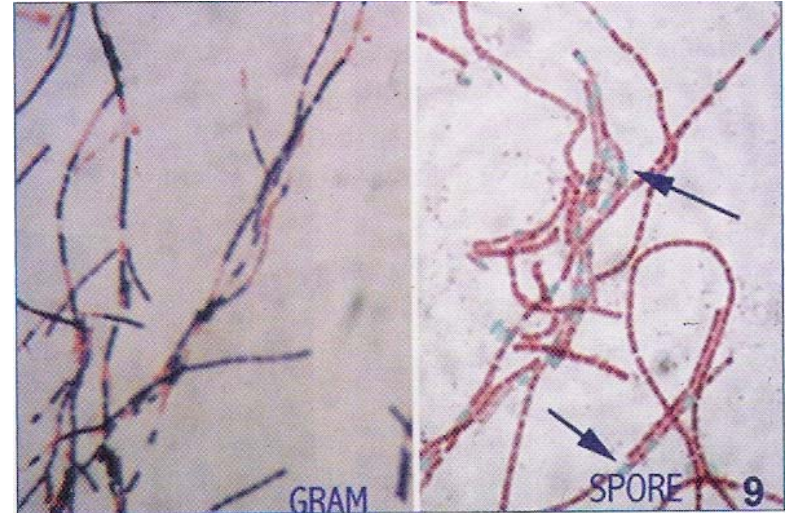
# Bacillus türleri

## Differentiating features of *B. anthracis* and similar *Bacillus* species

<i>Bacillus</i> species	Result		
	Beta-hemolysis	Motility	Capsule
<i>B. anthracis</i>	-	-	+
<i>B. cereus</i> var. <i>mycoides</i>	-	V	-
<i>B. cereus</i>	+	+	-
<i>B. thuringiensis</i>	+	+	-
<i>B. megaterium</i>	-	V	-

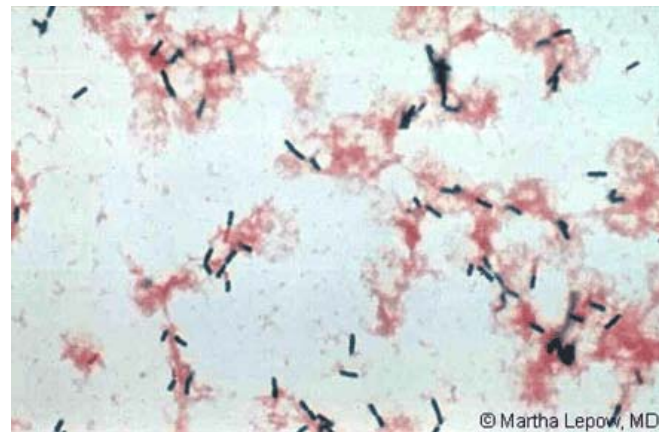
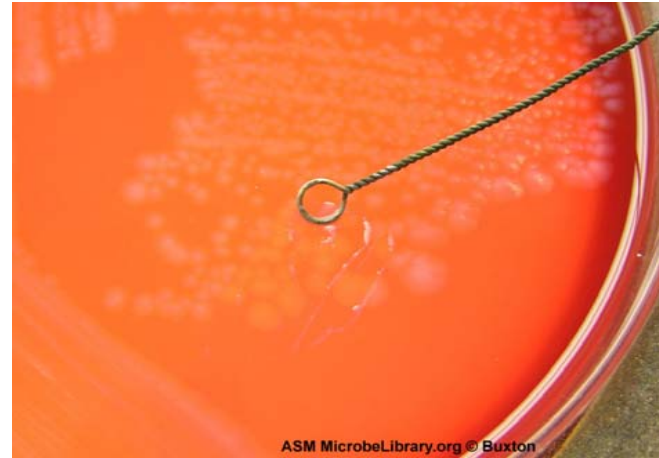
*B. anthracis*, beta-laktamaz üretmez, penisiline duyarlı

# Bacillus türleri



# Dallanma (-), spor (-) basiller

- **Listeria**
- **Corynebacterium**
- *Bifidobacterium*
- *Gardnerella*
- *Oerskovia*
- *Leifsonia*
- *Dermabacter*
- *Actinomyces*
- *Erysipelothrix*
- *Lactobacillus*
- *Actinomadura*
- *Arcanobacterium*



# *Listeria monocytogenes*

- Kısa gram (+) basil, sporsuz, hareketli
- Kanlı agarda;
  - Küçük hemoliz zonu: *L. monocytogenes*, *L. seeligeri*
  - Geniş hemoliz zonu: *L. ivanovi*
  - Hemolizsiz: *L. innocua*
- Katalaz (+), oksidaz (-)
- Eskülini hidrolize eder, VP (+)
- Glukozu fermente eder
- CAMP testi (+)



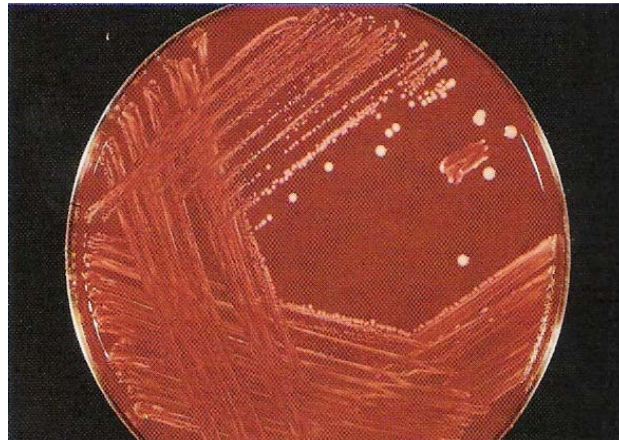
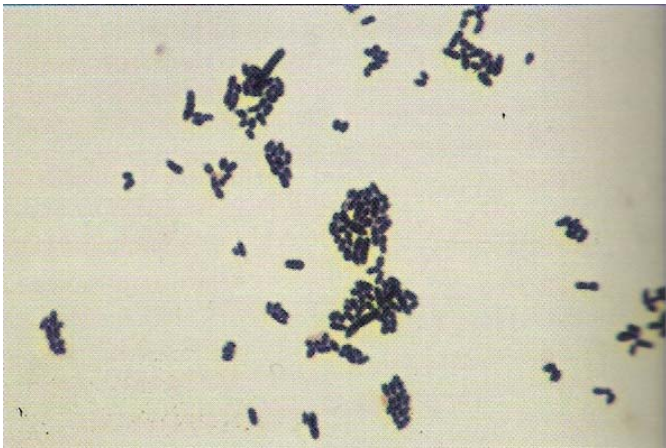
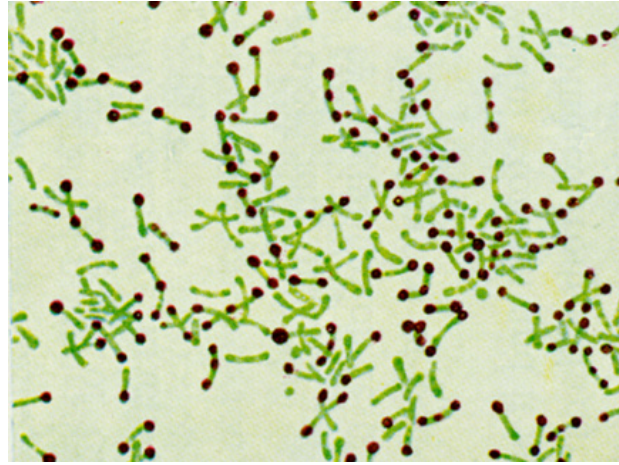
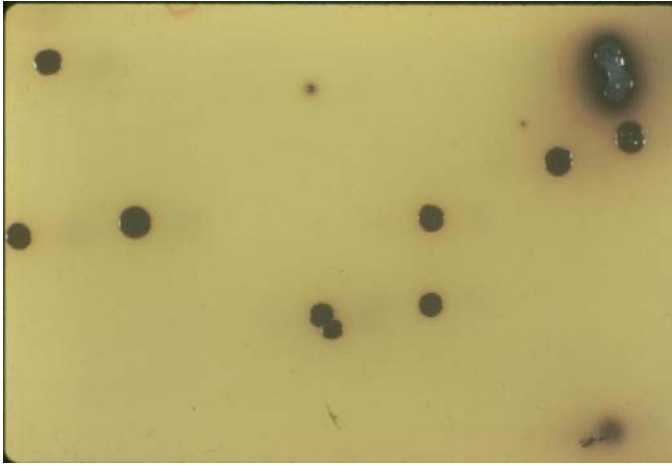
# *Corynebacterium* türleri

- 46 türü var, 30'dan fazlası insanlarda patojen
  - ***Corynebacterium diphtheriae***
  - ***C. jeikeium***
  - *C. urealyticum*
  - *C. striatum*
  - *C. ulcerans*
  - *C. pseudotuberculosis*
  - *C. amycolatum*
  - *C. minutissimum*
  - *C. riegelii*

# *Corynebacterium* türleri

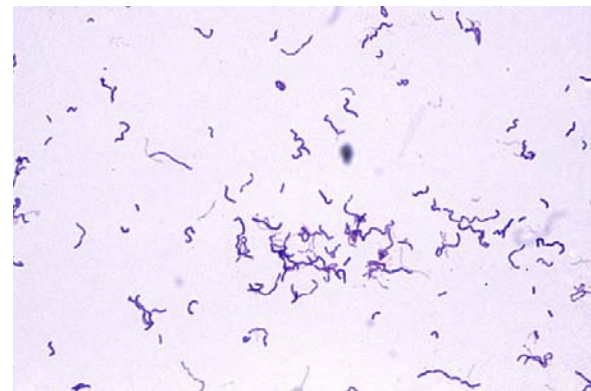
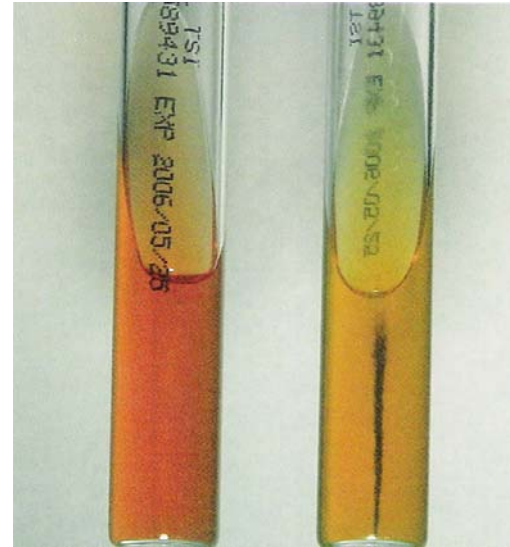
- Gram (+), sporsuz, non-hemolitik
- Gram boyamada kısa zincirler-kümeler  
V, Y, L şeklinde “Çin harfleri”
- Katalaz (+), hareketsiz
- Metilen mavisi → Metakromatik granüller
- *C. diphtheriae* → Sistein-tellüritli agarda siyah koloniler  
→ gravis, intermedius, mitis, belfanti
- Üreaz, nitrat redüksiyonu, propiyonik asit üretimi,  
glukoz, maltoz, sukroz ve mannitolü fermente etme ve  
CAMP testi özelliklerine göre ayırım yapılır

# *Corynebacterium* türleri



# *Erysipelothrix rhusiopathiae*

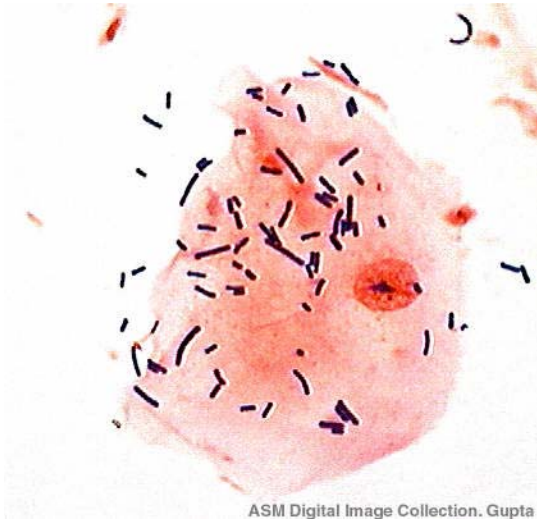
- Zoonotik patojen
- Erizipeloid, bakteremi, endokardit
- Gram (+) kokobasil / filamentöz basil
- Katalaz (-), oksidaz (-), H<sub>2</sub>S (+)
- Alfa / non hemoliz



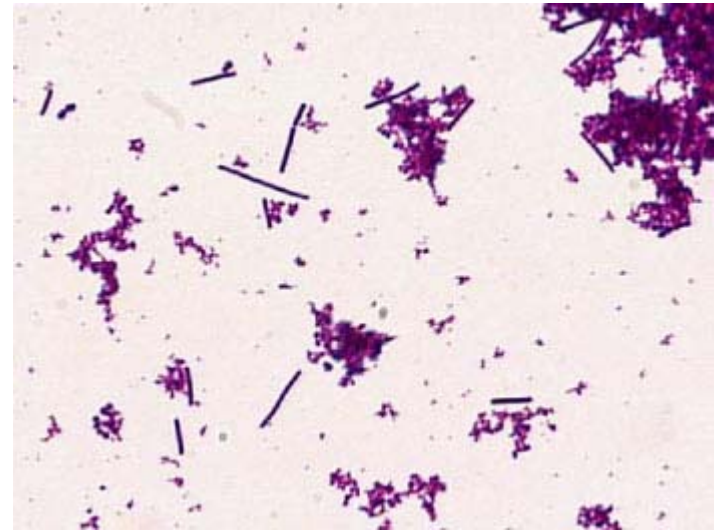


# *Lactobacillus* türleri

- Kanlı agarda küçük alfa-hemolitik koloni
- Katalaz (-), üreaz (-)
- Fermentatif

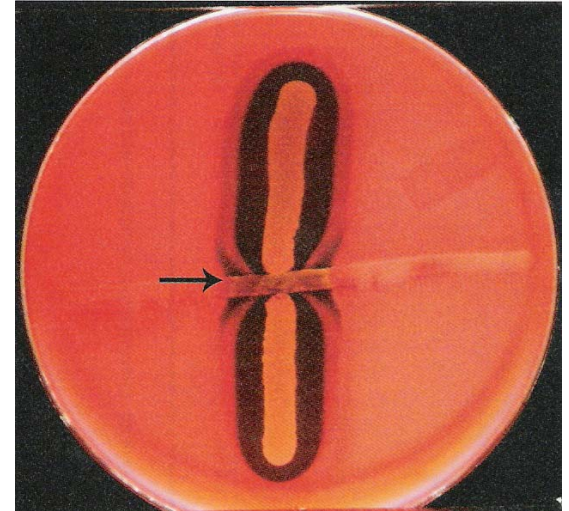


ASM Digital Image Collection. Gupta



# *Arcanobacterium* türleri


- Faranjit, deri-yumuşak doku enfeksiyonu, apse
- Düzensiz, bazen dallanma gösterir
- Kanlı agarda beta-hemoliz
- Katalaz (-), fermentatif
- CAMP testi ters pozitifdir



# Olgu 3

- 27 y, erkek hasta. Pankreas ve böbrek tx.
- 3 ay sonra olası rezeksiyon nedeniyle yatırılıyor.
- 5 gündür olan ateş, bulantı ve baş dönmesi öyküsü var.
- Kreatinin yüksek, idrarda lökosit (+), diğer bulgular normal. Biopside rejeksiyon bulgusu yok.
- Bu dönemde idrarda  $10^5$  koloni gram (+) basil üremesi oluyor. Koloniler katalaz (+) ve beta-hemolitik. Ertesi gün kan kültüründe aynı bakteri üremesi var.

# Olgu 3

- Hangi basit bir testle bu izolatların *Corynebacterium* olmadığını gösterebiliriz?
    - Motilite testi (direk inceleme)
    - Doğrulama için tüp hareket testi uygulandığında şemsiye şeklinde üreme oluyor. Safralı eskülinli agarda üreme (+)
- 
- *Listeria monocytogenes*
  - Hemolitik kolonilerde motilite ve eskülin testi mutlaka yapılmalıdır

# Olgu 3

- İdrarda patojen olan *Corynebacterium*'ları ayırmak için bir test var mıdır? (Tarama testi)
  - Üriner sistemde patojen olan *Corynebacterium* türlerinin hepsi üreaz pozitifdir
    - *C. urealyticum*
    - *C. glucuronolyticum*
    - *C. riegelii*

# Olgu 2

- Gram (+), katalaz (-) kokların hangileri vankomisine dirençlidir ve VRE'den ayrımı nasıl yapılır?
  - Enterokoklar dışında iki genus VA'e dirençli
  - *Leuconostoc*: PYR (-), MRS brothda gaz (+)
  - *Peidococcus*: tetrat-küme şeklinde. PYR (-), MRS brothda gaz (-)
  - *Weissella confusa*, VA dirençli ancak basil şeklinde

# Dallanma (+), gram (+) basil

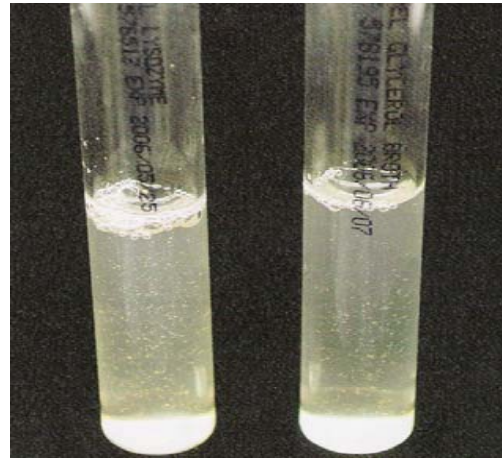
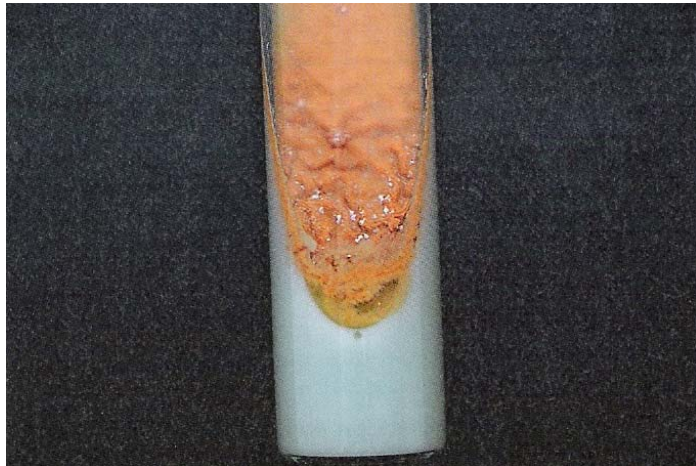
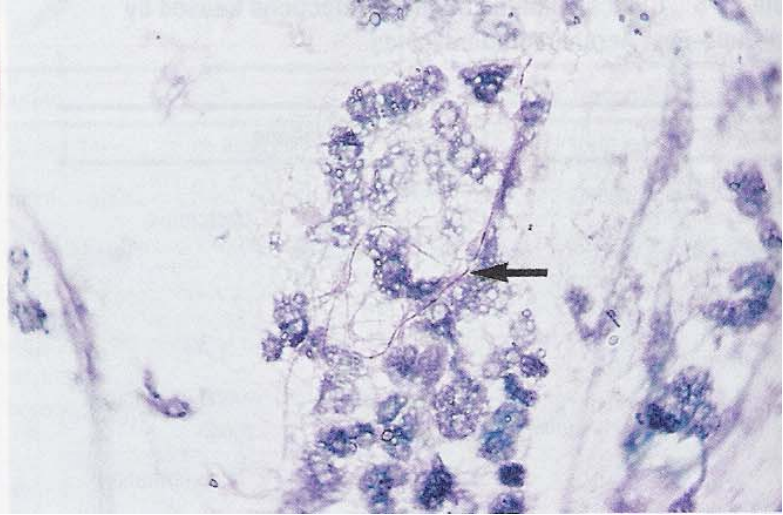
- *Nocardia* türleri
- *Rhodococcus* türleri
- *Gordonia* türleri
- *Tsukamurella* türleri
- *Streptomyces* türleri
- *Actinomadura* türleri
- *Nocardiopsis*
- *Dermatophilus*

# *Nocardia* Türleri

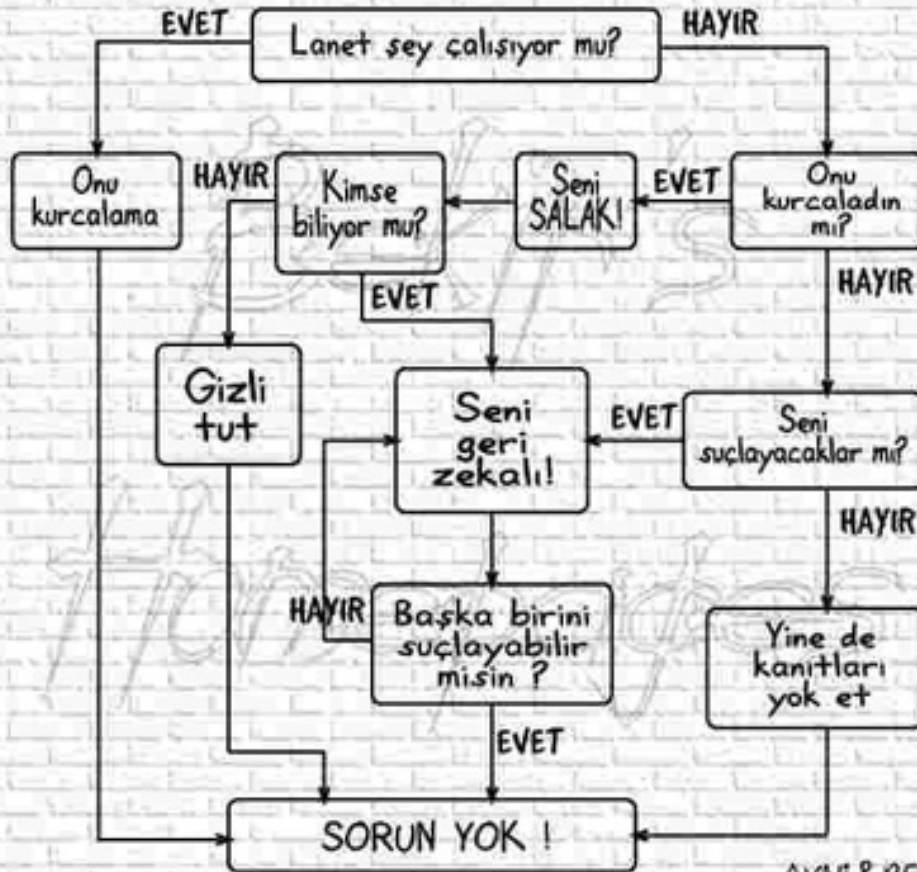
- İnce, filamentöz (fragmante)
- Modifiye asit-fast boyama (+)
- Yavaş ürer
- Lizozime dirençlidir, üreyi hidrolize eder
- Türler arasında ayırım önemlidir
  - Kazein, ksantin ve tirozini hidrolize etme, 45°C'de üreme, ramnozdan asit üretimi, gelatini hidrolize etme, Middlebrook agarda opasite ve antimikrobiyal duyarlılık paterni



# *Nocardia* Türleri



## PROBLEM ÇÖZME ALGORİTMASI



Hayatınızdaki algoritmaların hep doğru sonuçlar vermesi dileğiyle..