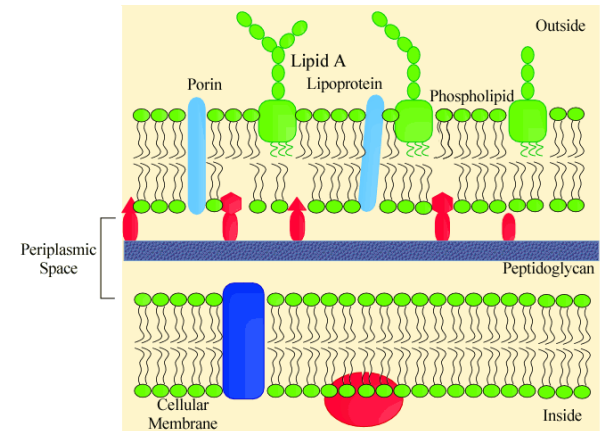


Gram negatif bakterilerin identifikasyonu

Dr Alpay Azap

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi

Klinik Bakteriyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları AD



VOLUME 1

Manual of
**CLINICAL
MICROBIOLOGY**

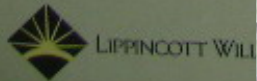
SECOND EDITION

Clinical Microbiology Procedures Handbook

EDITOR IN CHIEF

Henry D. Isenberg

VOLUME 2



Gram negatif bakteriler

- **Enterik bakteriler (Enterobacteriaceae)**
- **Non fermentatif bakteriler**
- Virgül şeklindeki gram negatif basiller: *Campylobacter* spp
- Oksidaz-pozitif fermenterler: *Vibrio* spp.
- Zor üreyen gram negatif basiller: *Haemophilus* spp.
- ANAEROB BAKTERİLER
 - Basiller: *Bacteroides fragilis*, *Fusobacterium necrophorum*
 - Koklar: *Veillonella* spp.

İDENTİFİKASYON YÖNTEMLERİ

- **Konvansiyonel yöntemler**

Gram boyama,

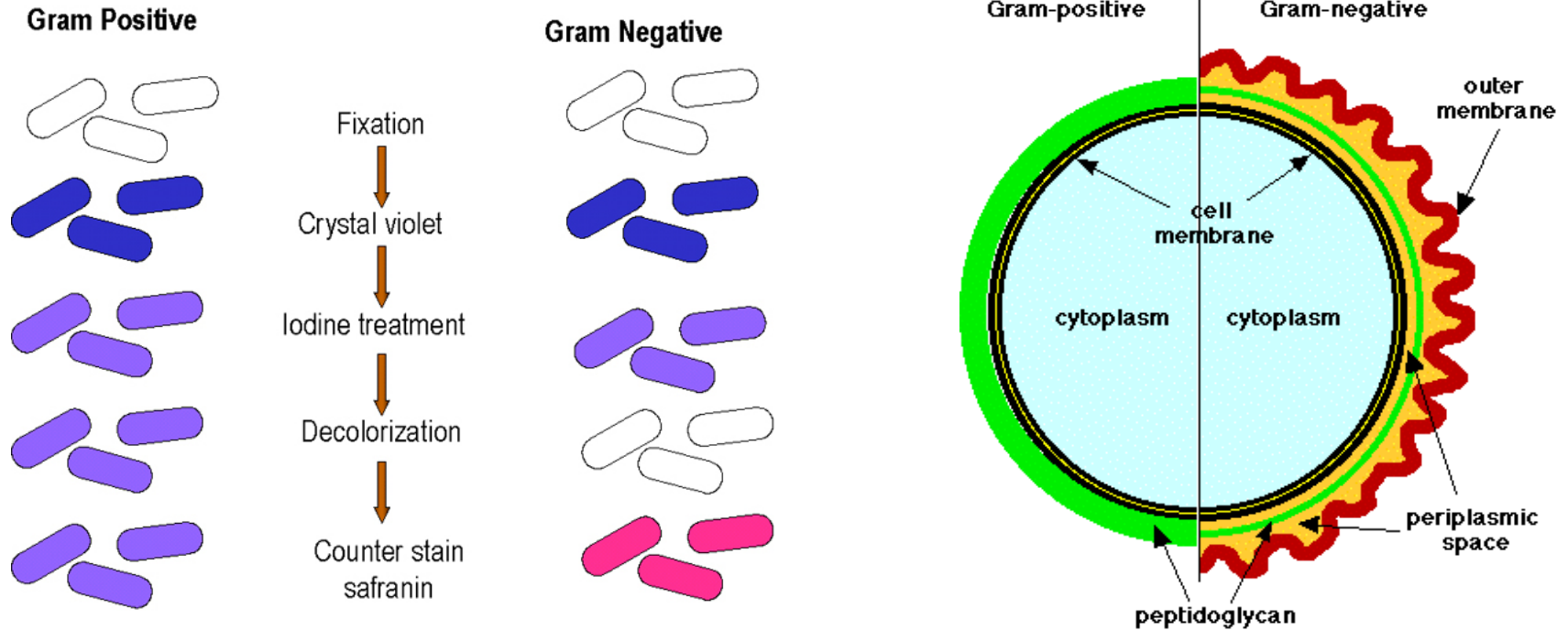
Seçici besiyerleri, oksidaz, “set”..vb

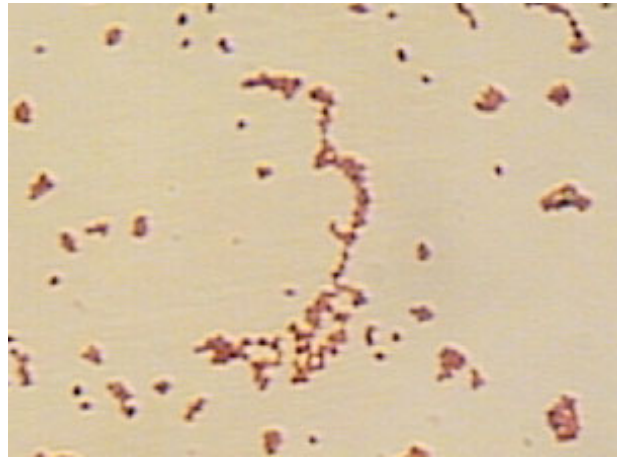
- **Otomatize kitler, sistemler**

BBL Crystal[®], API[®]

Phoenix[®], VİTEK[®], Microscan[®]

GRAM BOYAMA





İdeal Görünüm: 4-6 saat broth içinde üremiş bakteriler.

Eskimiş koloniler,

Dejenere olmakta olan koloniler,

Katı besiyerindeki kolonilerden yapılan boyalar,

Antibiyotik kullanımı Gram incelemeyi etkiler.

Acinetobacter spp. :G (-) kokobasil

G (-) basil, G (-) kok, G (+) kok şeklinde görülebilir.

KOLONİ MORFOLOJİSİ

Form



Circular



Irregular



Filamentous



Rhizoid

Elevation



Raised

Convex

Flat

Umbonate

Crateriform

Margin



Entire



Undulate



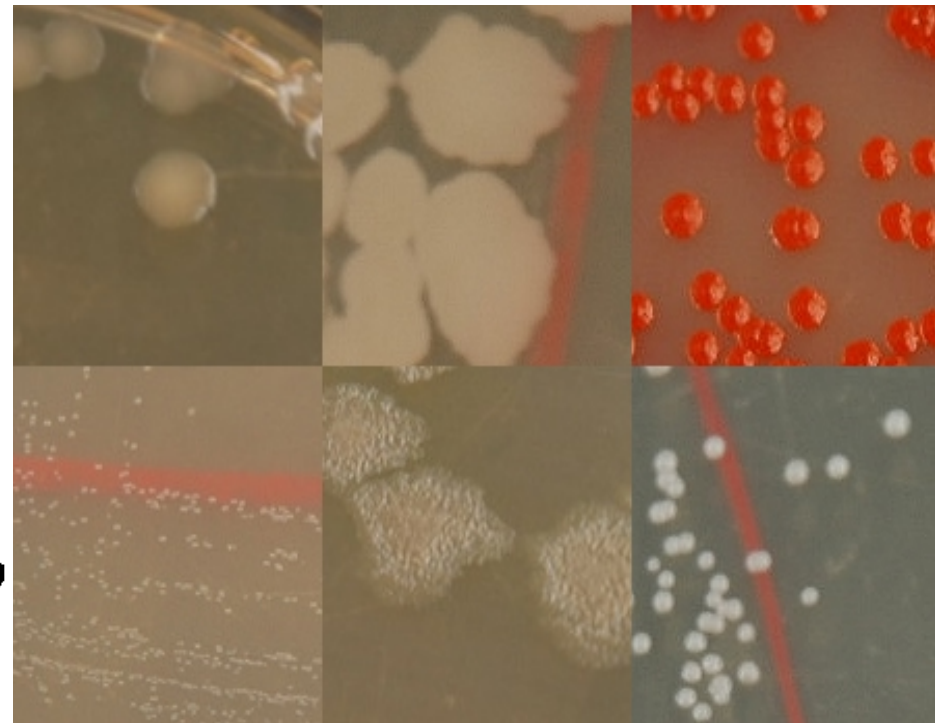
Filiform



Curled



Lobate



BESİ YERLERİ

- Seçici olmayan besiyerleri
Kanlı agar
- Seçici besiyerleri
EMB, MacConkey agar
- Yüksek düzeyde seçici (seçici-ayırt edici) besiyerleri
Salmonella-Shigella (SS) agar
Hektoen enterik agar
Xylose lysine deoxycholate (XLD) agar
- Zenginleştirici besiyerleri
Selenit buyyon
Gram-negatif buyyon

MacConkey Agar:

Laktoz içerir

Safra tuzları ve Kristal viyole seçicilik sağlar

PH indikatörü: Nötral kırmızısı

Laktoz pozitifler: Kırmızı

Laktoz negatifler:renksiz ve/veya saydam



EMB Agar:

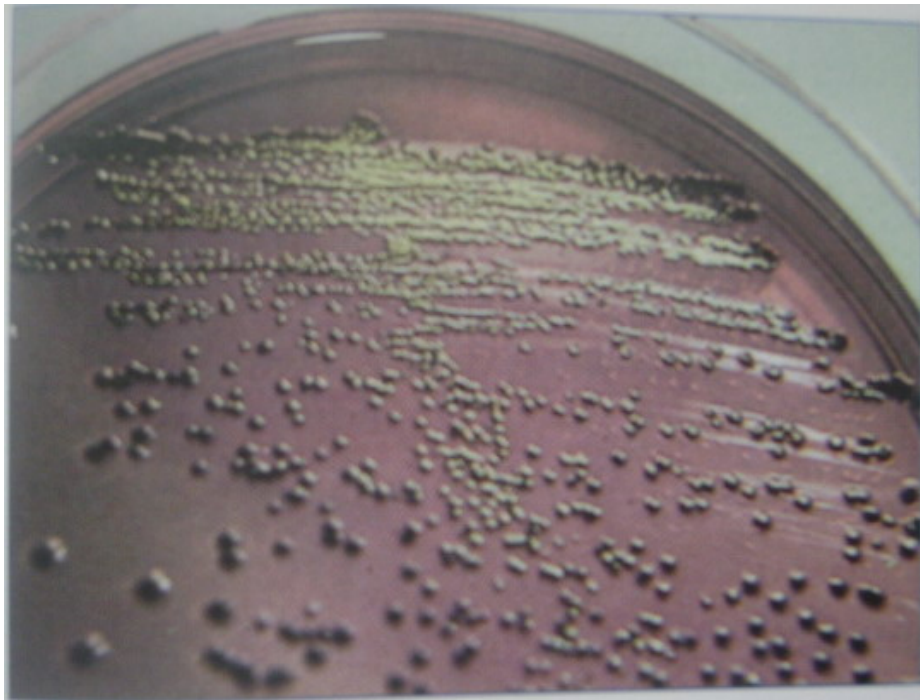
Laktoz +/- Sukroz içerir

Eozin ve metilen mavisi seçiciliği sağlar

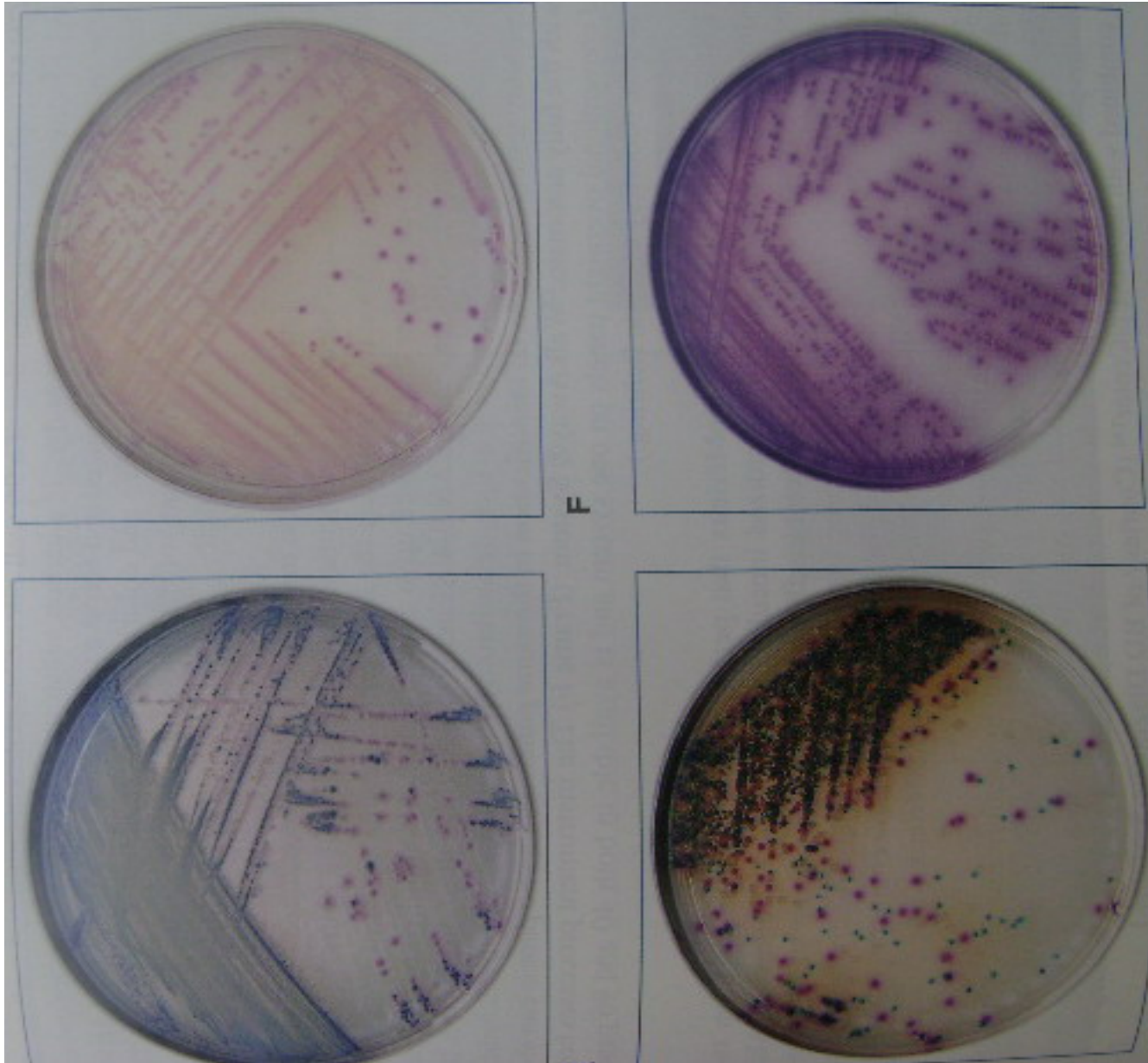
PH indikatörü: Eozin ve Metilen mavisi

Laktoz pozitifler: Mor-Siyah koloniler

Laktoz negatifler: Şeffaf koloniler.



Kromojenik Agarlar:



Metabolik karakteristiklerin değerlendirilmesi için kullanılan testler

- Karbonhidrat kullanımı: Üç şeker besiyeri
- ONPG aktivitesi
- İndol üretimi
- Metil kırmızı sı
- Voges-Proskauer
- Sitrat kullanımı
- Üreaz üretimi
- Lizin, ornitin, arjinin dekarboksilasyonu
- Fenilalanin deaminaz oluşumu
- Hidrojen sülfid oluşumu
- Hareket

LAKTOZ

GLUKOZ

GALAKTOZ

Emden - Meyerhof Yolu

PİRÜVİK ASİT

PROPIYONİK ASİT

BÜTİL ALKOL

LAKTİK ASİT

ETİL ALKOL

ASETOİN

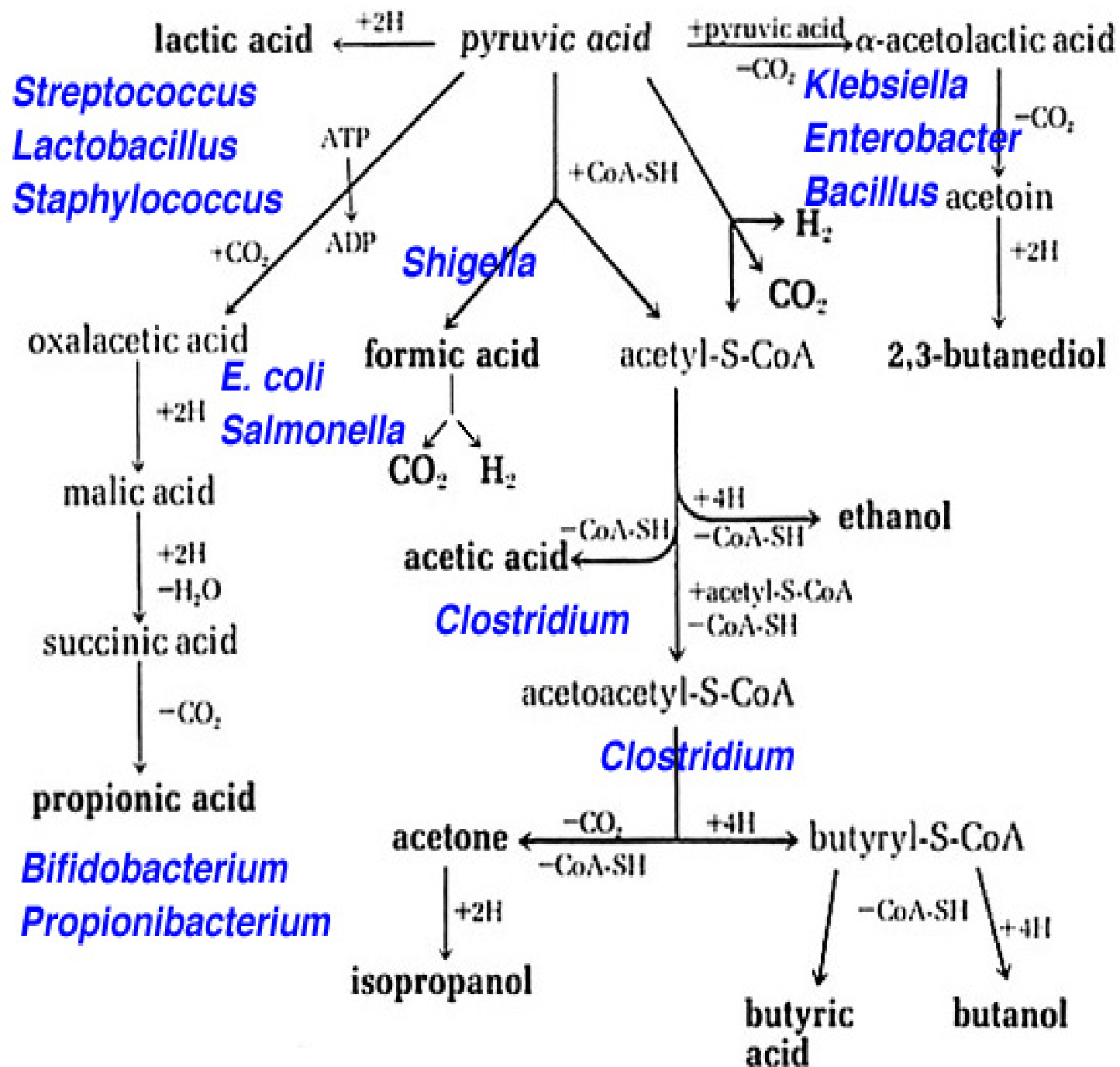
(Voges-Proskauer Testi)

FORMİK ASİT

(Metil kırmızısı testi)

GAZ ($H_2 + CO_2$)

(Durham tüpü)





Krigler Iron Agar (KIA):

Pepton, "beef extract", "yeast extract", Proteoz pepton

Laktoz **10** gram, Glukoz **1** gram !!!

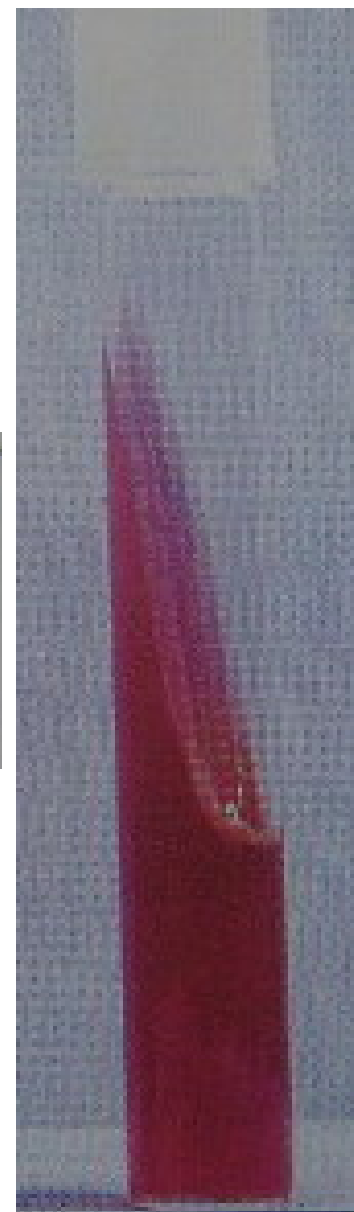
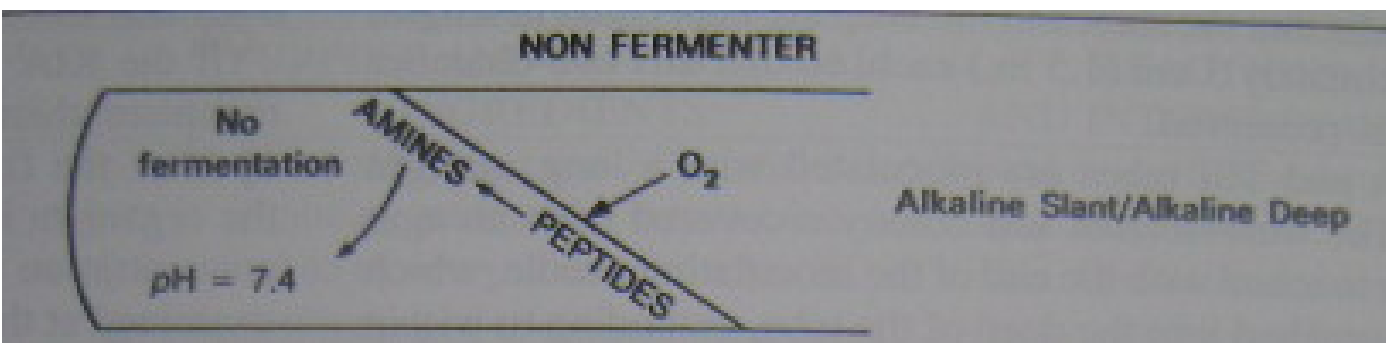
Ferroz sulfat,

NaCl, Na tiyosulfat

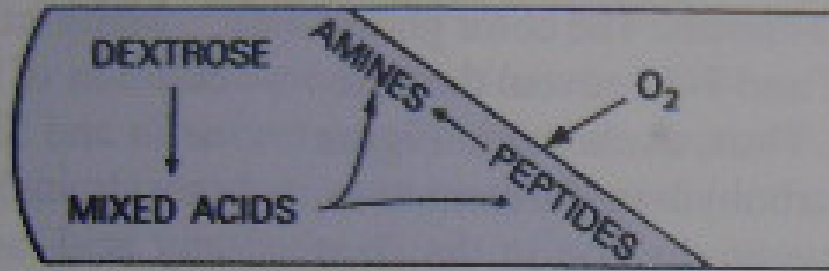
Fenol kırmızısı

PH: 7.4

Three Sugar Iron (TSI) : + **10** gram Sukroz



NON LACTOSE FERMENTER



Acid Slant/Acid Deep
Initial Reaction



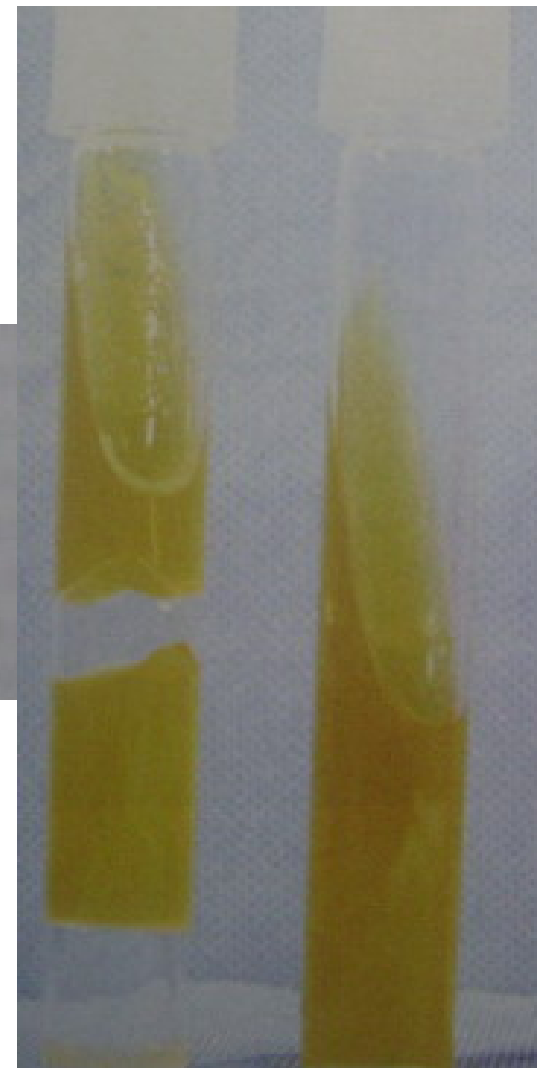
Alkaline Slant/Acid Deep
Delayed Reaction



LACTOSE (SUCROSE) FERMENTER

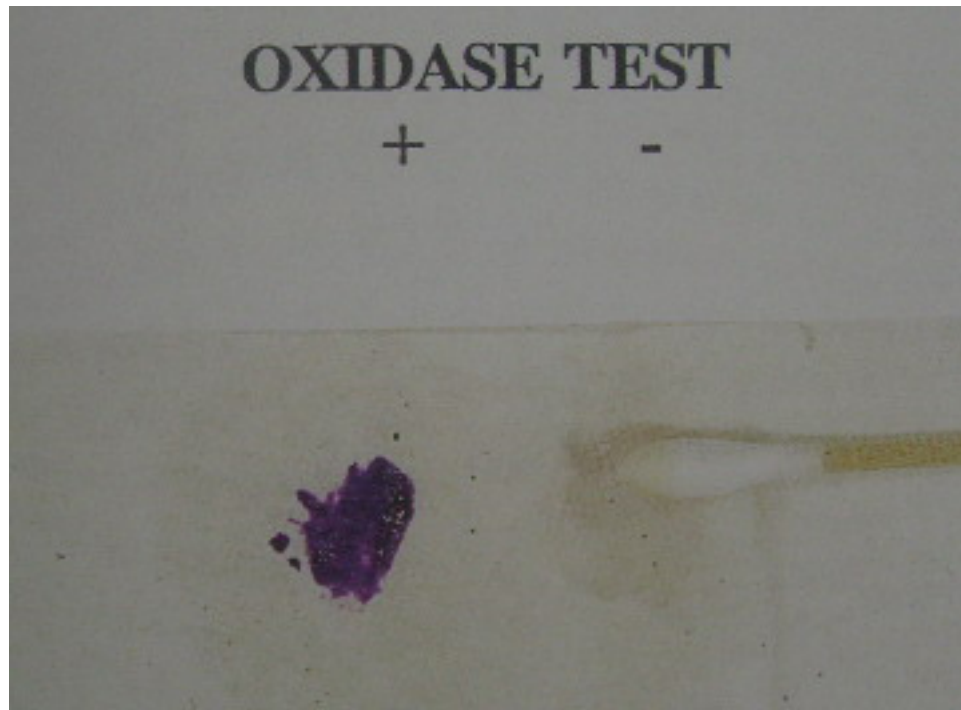


Acid Slant/Acid Deep



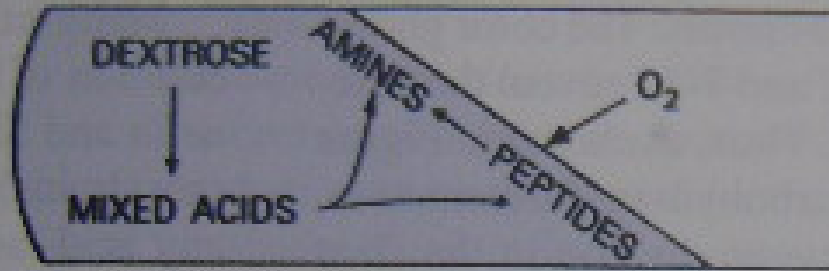
ENTERİK BAKTERİLER

- Oksidaz negatiftirler.
- Glikozu fermente ederler
- Nitratı nitrite çevirirler



Tetrametil-parafenilendiamin dihidroklorid (Kovac's reaktifi)

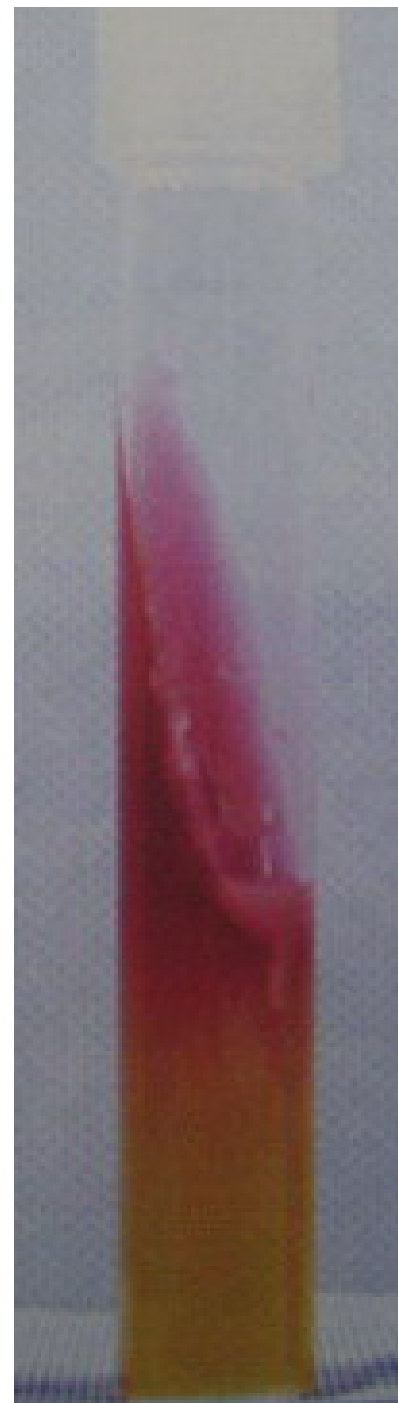
NON LACTOSE FERMENTER



Acid Slant/Acid Deep
Initial Reaction



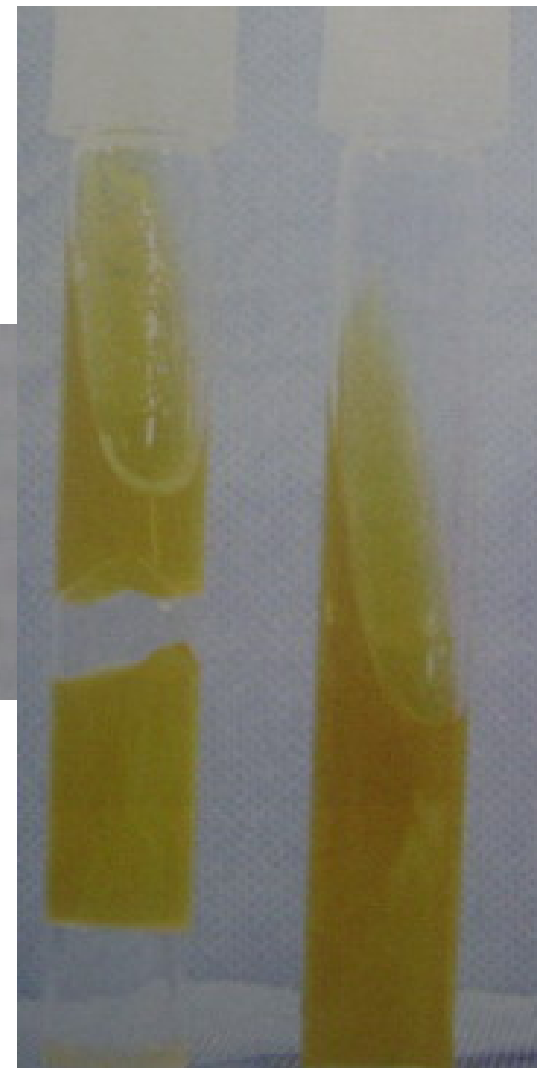
Alkaline Slant/Acid Deep
Delayed Reaction



LACTOSE (SUCROSE) FERMENTER



Acid Slant/Acid Deep



Enterik bakteriler

H₂S pozitif olanlar:

Salmonella spp.

Proteus spp.

Citrobacter spp.

Edwardsiella tarda



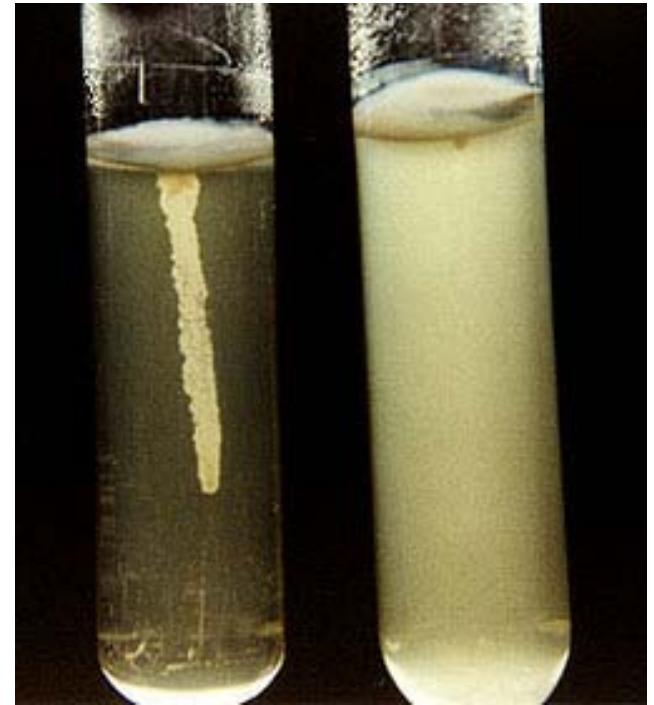
Enterik bakteriler

Hareketsiz olanlar

Klebsiella spp.

Shigella spp.

Yersinia spp. (22°C'de hareketli)



Enterik bakteriler

Üreaz Pozitif Bakteriler:

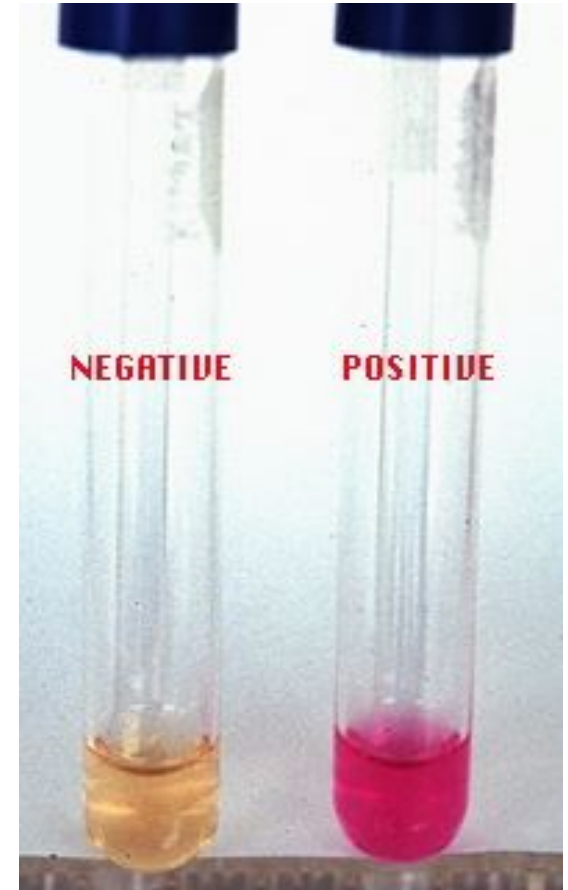
Proteus spp.

Morganella morganii

Providencia spp.

Klebsiella spp.

Citrobacter spp.



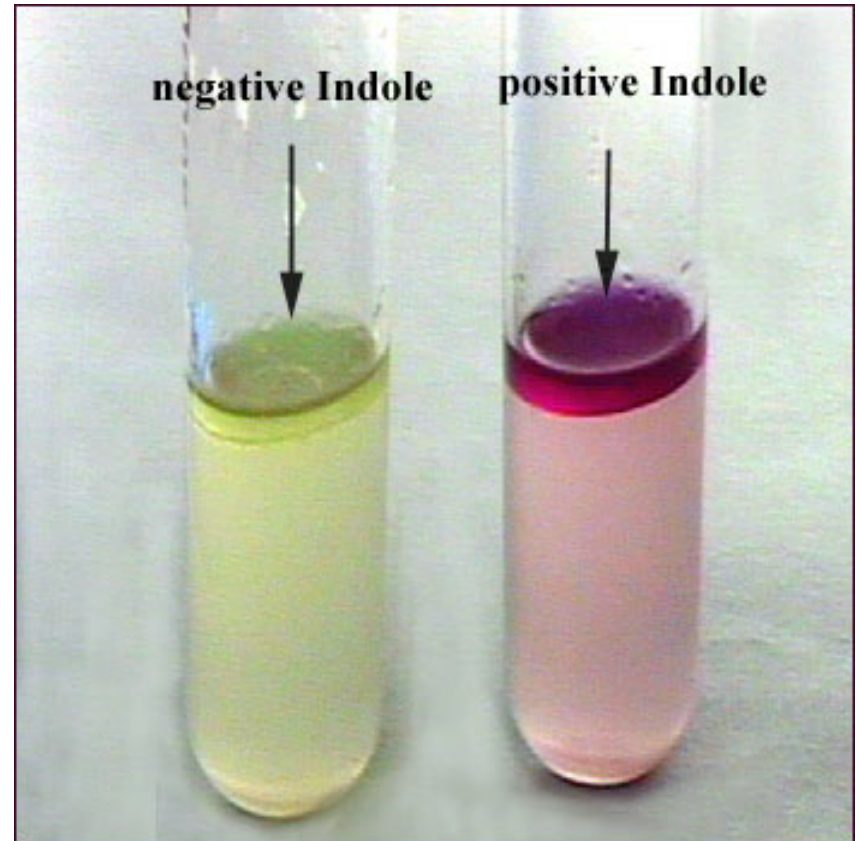
Enterik bakteriler

İndol Testi:

Triptofandan İndol oluşumu.

E. coli: Pozitif

Klebsiella pneumoniae: Negatif



Enterik bakteriler

Sitrat Kullanımı: Olmayanlar

E.coli

Shigella spp.

Edwardsiella tarda

Hafnia alvei

Morganella morganii

Y. enterocolitica

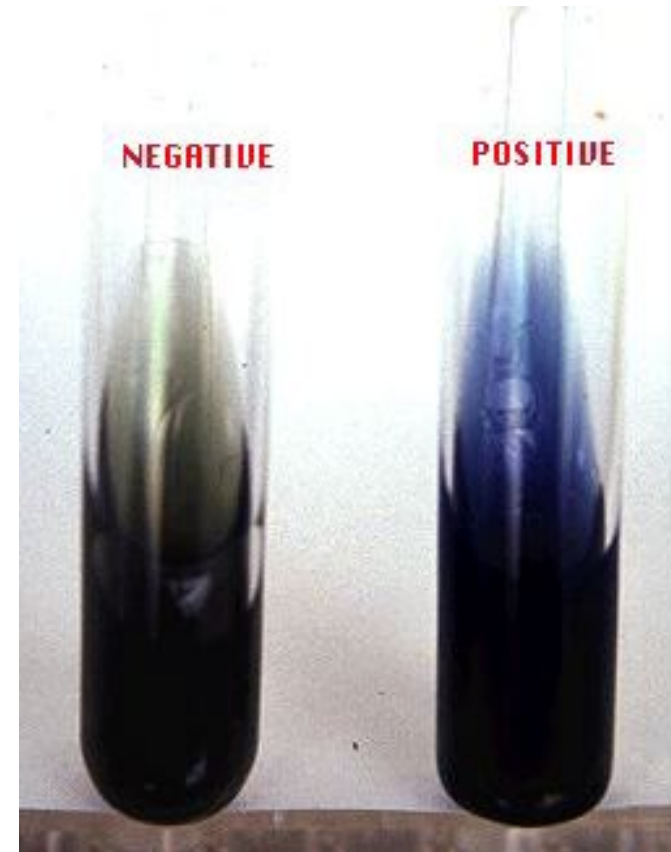


Table 6-6 Key Identification Characteristics for the Most Common Enterobacteriaceae

	K/A	GAS	H ₂ S	MR	VP	IND	CIT	PAD	URE	MOT	LYS	ARG	ORN	ONPG
Tribe I: Escherichieae														
<i>Genus: Escherichia</i>														
<i>E. coli</i>	A/A	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-/+	+/+	+
<i>Genus: Shigella</i>														
Groups A, B, C	A/B/A	-	-	+	-	-/+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. sonnei</i>	A/B/A	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Tribe II: Edwardsiellae														
<i>Genus: Edwardsiella</i>														
<i>E. ictaluri</i>	A/B/A	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-
Tribe III: Salmonellae														
<i>Genus: Salmonella</i>														
	A/B/A	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+/+	+	-
Tribe IV: Citrobacterae														
<i>Genus: Citrobacter</i>														
<i>C. freundii</i>	A/A; A/B/A	+	+	+	-	-	+	-	-/+	+	-	+/+	-/+	+
<i>C. koseri</i>	A/B/A	+	-	+	-	-	+	-	+/+	+	-	+/+	+	+
Tribe V: Klebsielleae														
<i>Genus: Klebsiella</i>														
<i>K. pneumoniae</i>	A/A	++	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+
<i>K. oxytoca</i>	A/A	++	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+
<i>Genus: Enterobacter</i>														
<i>E. aerogenes</i>	A/A	++	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-
<i>E. cloacae</i>	A/A	++	-	-	+	-	+	-	+/+	+	-	+	+	+
<i>Genus: Hafnia</i>														
<i>H. alvei</i>	A/B/A	+	-	-/+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+
<i>Genus: Pantoea</i>														
<i>P. agglomerans</i>	A/A; A/B/A	-/+	-	-/+	-/+	-/+	+/+	-/+	-/+	+	-	-	-	+
<i>Genus: Serratia</i>														
<i>S. marcescens</i>	A/B/A	+	-	-/+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+
Tribe VI: Proteaceae														
<i>Genus: Proteus</i>														
<i>P. vulgaris</i>	A/B/A	-/+	+	+	-	+	-/+	+	++	++	+	-	-	-
<i>P. mirabilis</i>	A/B/A	+	+	+	-/+	-	+/+	+	++	++	+	-	+	-
<i>Genus: Morganella</i>														
<i>M. morganii</i>	A/B/A	+	-	+	-	+	-	+	++	++	+	-	+	-
<i>Genus: Providencia</i>														
<i>P. rettgeri</i>	A/B/A	-	-	+	-	+	+	+	++	++	+	-	-	-
<i>P. stuartii</i>	A/B/A	-	-	+	-	+	+	+	-/+	-/+	-	-	-	-
<i>P. alcalifaciens</i>	A/B/A	+/+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Tribe VII: Yersiniaceae														
<i>Genus: Yersinia</i>														
<i>Y. enterocolitica</i>	A/B/A	-	-	+	-	+/+	-	-	+/+	-/+	-	-	+	+

K/A, Kligg's amino acid; GAS, indole; MR, methyl red; VP, Voges-Proskauer; IND, indole; CIT, citrate; PAD, phenylalanine deaminase; URE, urease; MOT, motility; LYS, lysine; ARG, arginine; ORN, ornithine; ONPG, o-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside; +, strong positive reaction; ++, 90% or more strains positive; +/+, 50-90% of strains positive; -/+ , 50-90% of strains negative; shaded areas indicate test reaction.

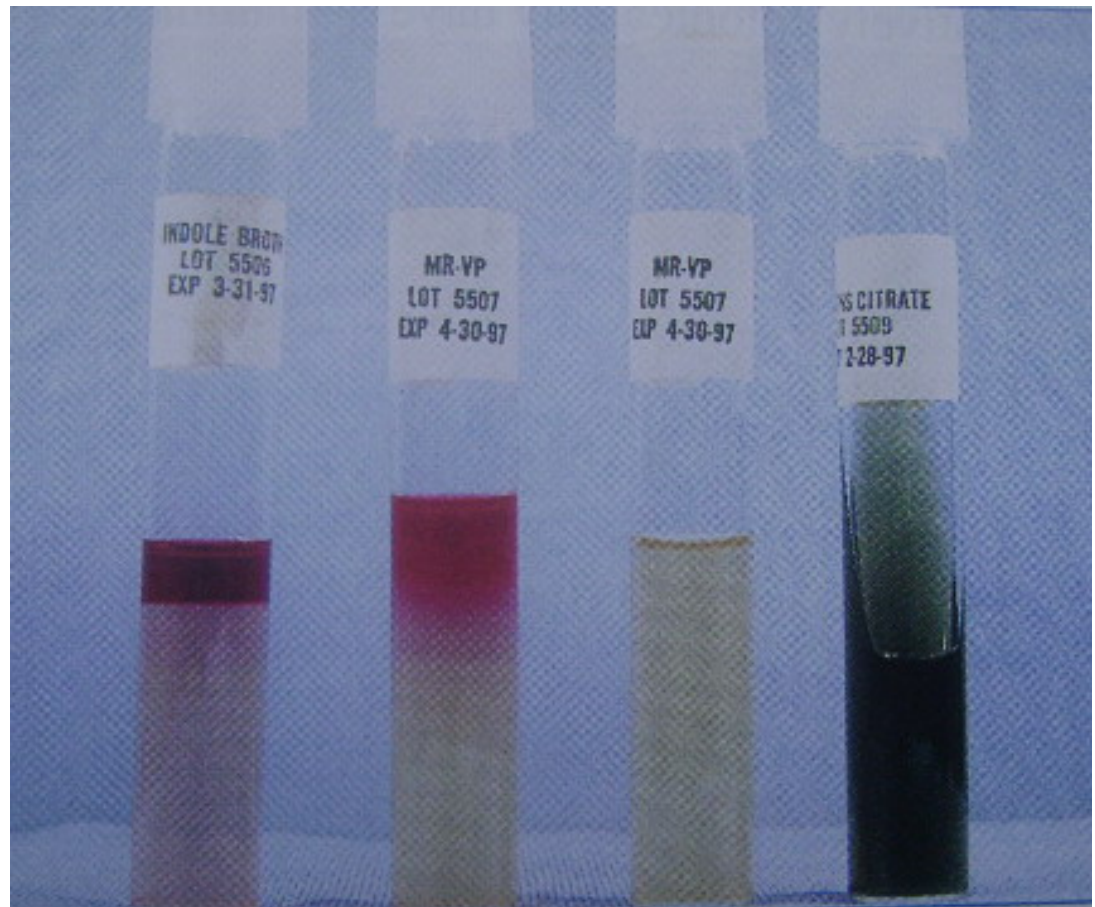
¹ Increasing motility documented on semisolid media.

² Nonmotile at 35°C, motile at 22°C.

BAKTERİ ADI	Üç şeker	Gaz	H ₂ S	İndol	Sitrat	Üreaz	Hareket	Metil red	Lizin	Ornitin
E.coli	A/A	+	--	+	--	--	+	+	+	±
Klebsiella pneumoniae	A/A	+	--	--	+	+	--	--	+	--
Klebsiella oxytoca	A/A	+	--	+	+	+	--	--	+	--
Enterobacter aerogenes	A/A	+	--	--	+	--	+	--	+	+
Enterobacter cloacae	A/A	+	--	--	+	±	+	--	--	+
Shigella sonnei	Alk/A	--	--	--	--	--	--	+	--	+
Shigella spp. (A,B,C Grupları)	Alk/A	--	--	±	--	--	--	+	--	--
Salmonella spp.	Alk/A	+	+	--	+	--	+	+	+	+
Salmonella typhi	Alk/Asit	--	+	--	--	--	+	+	+	--
Salmonella paratyphi A	Alk/A	+	--	--	--	--	+	+	--	+
Citrobacter freundii	A/A Alk/A	+	+	--	+	±	+	+	--	±
Citrobacter koseri	Alk/A	+	--	+	+	±	+	+	--	+
Proteus vulgaris	Alk/A	±	+	+	±	+	+	+	--	--
Proteus mirabilis	Alk/A	+	+	--	±	+	+	+	--	+
Morganella morganii	Alk/A	+	--	+	--	+	+	+	--	+
Serratia marcescens	Alk/A	+	--	--	+	--	+	±	+	+
Hafnia alvei	Alk/A	+	--	--	--	--	+	±	+	+
Pantoea agglomerans	A/A Alk/A	±	--	±	±	±	+	±	--	--
Edwardsiella tarda	Alk/A	+	+	+	--	--	+	+	+	+

Enterik bakteriler

IMViC TESTİ: *E. coli* vs *Enterobacter aerogenes*



ENTERİK BAKTERİLER ve ANTİBİYOGRAM

ESBL üretiminin araştırılması

E.coli

Klebsiella spp.

Kan kültürlerinden izole edilen *Proteus mirabilis*

Sefpodoksim zonu ≤ 17 mm veya	Seftazidim/Seftazidim-
Seftazidim zonu ≤ 22 mm veya	klavulonik asit ve
Aztreonam zonu ≤ 27 mm veya	Sefotaksim/sefotaksim
Sefotaksim zonu ≤ 27 mm veya	klavulonik asit diskleri ile
Seftriakson zonu ≤ 25 mm ise	test edilir

Klavulonik asitli disk çevresindeki zon çapı, diğerinden 5 mm ve daha fazla ise suş “ESBL pozitif” olarak rapor edilir

Enterobacter spp.,

Citrobacter spp.,

Serratia spp. ile gelişen infeskiyonlarda

3. kuşak sefalosporinlerle tedavi sırasında direnç gelişebileceğinden, başlangıçta duyarlı olan suşlar tedavinin 3-4. gününden itibaren dirençli hale gelebilir:

Tedavi sırasında izole edilen suşların antibiyotik duyarlılıklarının mutlaka çalışılması gerekmektedir

Salmonella ssp. ve Shigella spp. suşları

Gaytadan izole edilmişse

Ampisilin

Siprofloksasin

Kotrimoksazol

Gayta dışı materyallerden ise yukarıdakilere ek olarak

Seftriakson

Kloramfenikol

Nalidiksik asit

Salmonella spp. ve *Shigella* spp. suşları;

Birinci ve ikinci kuşak sefalosporinlere

Aminoglikozitlere

in vitro duyarlı görünseler bile klinik olarak etkili değildirler.

DUYARLI OLARAK RAPOR EDİLMEMELİDİR.

NON FERMENTATİF BAKTERİLER

- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Acinetobacter baumannii*
- *Stenotrophomonas maltophilia*
- *Burkholderia cepacia*

Pseudomonas aeruginosa

- Antibiyogram plağında mavi-yeşil (sarı, kahverengi, kırmızı da olabilir) görünüm
- Tipik kokusu vardır (Sabun, üzüm..vb)
- Gram negatif basil
- Oksidaz pozitif
- Hareketli

Acinetobacter baumannii

- Gram negatif kok, kokobasil
- Oksidaz negatif
- Katalaz pozitif
- Hareketsiz
- Penisiline dirençli

Stenotrophomonas maltophilia

- Kanlı agarda yeşil renkli koloniler
- Gram negatif basil
- Oksidaz negatif
- Hareketli
- Tipik “idrar, amonyak” kokusu vardır
- Antibiyogramda

IPM, MEM dirençli SXT duyarlı

Burkholderia cepacia

- EMB'de 2-3 gün içinde ürer, 4-5 gün bekletilen plaklarda koloniler koyu pembe, kırmızı renkte görünebilir
- Gram negatif basil
- Oksidaz pozitif
- Tipik "kir" kokusu vardır

P.aeruginosa antibiyogramı

Seftazidim

Gentamisin

Piperasilin

Amikasin

Aztreonam

Sefoperazon

Sefoperazon sulbaktam

Sefepim

Siprofloksasin

Levofloksasin

İmipenem

Meropenem

Piperasilin-tazobaktam

Tobramisin

Netilmisin

P.aeruginosa suşları tedavi sırasında antibiyotiklere 3-4 gün içinde direnç geliştirebileceğinden tedavi sırasında izole edilen etkenlerin antibiyotik duyarlılıkları tekrar çalışılmalıdır

Acinetobacter spp. için antibiyogram

İmipenem

Meropenem

Amikasin

Gentamisin

Tobramisin

Ampisilin-sulbaktam

Piperasilin-tazobaktam

Tikarsilin-klavulonat

Sefepim

Sefotaksim

Seftriakson

Seftazidim

Siprofloksasin

Levofloksasin

Doksisiklin

Minosiklin

Tetrasiklin

Piperasilin

Trimetoprim-
sulfametoksazol

Stenotrophomonas maltophilia için sadece

Trimetoprim-sulfametoksazol

Levofloksasin

Minosiklin

Burkholderia cepacia suşları için sadece

Seftazidim

Meropenem

Trimetoprim-sulfametoksazol

Minosiklin

Pseudomonas aeruginosa,
Acinetobacter spp.,
Stenotrophomonas maltophilia,
Burkholderia cepacia

dışındaki non-fermentatif bakterilerde antibiyotik duyarlılık sonuçları dilüsyon yöntemi ile belirlenmelidir

