

3

ΜΕΡΟΣ ΤΡΙΤΟ

ΜΕΘΟΔΟΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ

1.1. Δοκιμασία καταλάσης

I. Γενικά

Η καταλάση είναι ένζυμο το οποίο διασπά το υπεροξείδιο του υδρογόνου σε νερό και οξυγόνο ($2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$). Η δοκιμασία παραγωγής καταλάσης χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό των Σταφυλόκοκκων (θετικοί) από τους Στρεπτόκοκκους (αρνητικοί).

II. Μέθοδος

Το αντιδραστήριο είναι το οξυζενέ, δηλαδή διάλυμα υπεροξειδίου του υδρογόνου 3%, πρόσφατα παρασκευασμένο. Η δοκιμασία γίνεται πάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα.

- Αφού βάλουμε μια σταγόνα οξυζενέ στην αντικειμενοφόρο πλάκα, μεταφέρουμε με τον κρίκο μια αποικία από το στέλεχος που εξετάζουμε και αναμειγνύουμε. Σε θετικό αποτέλεσμα προκαλείται άμεση έκλυση φυσαλίδων αερίου οξυγόνου.
- Μπορούμε επίσης να προσθέσουμε κατευθείαν στο καλλιέργημα του βακτηρίου, σε υγρό ή στερεό θρεπτικό υλικό, 1ml περίπου οξυζενέ. Σε θετικό αποτέλεσμα θα έχουμε παραγωγή φυσαλίδων αερίου οξυγόνου.
- Εάν το θρεπτικό υλικό που αναπτύχθηκε το βακτήριο είναι αιματούχο άγαρ, υπάρχει πιθανότητα ψευδούς θετικού αποτελέσματος, επειδή τα ερυθρά αιμοσφαίρια στο αιματούχο άγαρ περιέχουν καταλάση.

Παράδειγμα θετικής δοκιμασίας είναι οι Σταφυλόκοκκοι, ενώ αρνητικής οι Εντερόκοκκοι.

1.2. Δοκιμασία παραγωγής κοαγκουλάσης (πηκτάσης)

I. Γενικά

Η κοαγκουλάση είναι ένζυμο το οποίο προκαλεί πήξη του πλάσματος του ανθρώπου και διαφόρων ζώων. Η κοαγκουλάση διακρίνεται σε εξωκυτάρια ή ελεύθερη και συνδεδεμένη. Η ελεύθερη κοαγκουλάση βγαίνει από το μικροβιακό σώμα στο υλικό της καλλιέργειας. Η συνδεδεμένη κοαγκουλάση είναι προσκολλημένη στο κυτταρικό τοίχωμα του βακτηρίου.

Το βασικότερο κριτήριο, για να χαρακτηριστεί ένα στέλεχος *Staphylococcus aureus*, είναι η παραγωγή κοαγκουλάσης.

A. Ανίχνευση εξωκυττάριας ή ελεύθερης κοαγκουλάσης

Χρησιμοποιείται πρόσφατο πλάσμα από τα δείγματα αίματος του εργαστηρίου ή από φιάλες αιμοδοσίας. Καλό είναι να χρησιμοποιείται μείγμα πλάσματος από διάφορα δείγματα τα οποία έχουν ληφθεί με το αντιπηκτικό EDTA.

Μέθοδος

- Αραιώνουμε το πλάσμα με αποστειρωμένο φυσιολογικό ορό σε αναλογία 1:5.
- Σε αποστειρωμένο σωληνάριο μεταφέρουμε 0,5 ml του αραιωμένου πλάσματος.
- Από 24ωρη καλλιέργεια βακτηρίου σε ζωμό ή σε αιματούχο άγαρ μεταφέρουμε μερικές σταγόνες υγρού καλλιεργήματος ή μια αποικία στο σωληνάριο που περιέχει το αραιωμένο πλάσμα.
- Το σωληνάριο ανακινείται, ώστε να γίνει ανάμειξη του πλάσματος με το εξεταζόμενο στέλεχος και τοποθετείται σε υδατόλουτρο 37°C.
- Ελέγχουμε ανά ώρα και επί 3-6 ώρες για την εμφάνιση πήγματος.
- Σε θετική αντίδραση θα παρατηρήσουμε στο περιεχόμενο του σωληναρίου τη δημιουργία πήγματος.
- Εάν δε δημιουργηθεί πήγμα, συνεχίζεται η επώαση για 18 ώρες και ελέγχουμε ξανά.

B. Ανίχνευση συνδεδεμένης κοαγκουλάσης

Μέθοδος

- Επάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα παρασκευάζουμε πυκνό εναιώρημα του βακτηρίου σε μια σταγόνα φυσιολογικού ορού ή απεσταγμένου νερού.

- Προσθέτουμε στο εναιώρημα μια σταγόνα πλάσματος και αναμειγνύουμε με τον κρίκο για 10sec.
- Εάν στο εναιώρημα εμφανιστούν κροκίδες μέσα στα 10sec, το αποτέλεσμα είναι θετικό. Εάν οι κροκίδες εμφανιστούν σε μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, το αποτέλεσμα είναι αρνητικό.

Η μέθοδος για την ανίχνευση της συνδεδεμένης κοαγκουλάσης είναι εύκολη και γρήγορη. Προτιμούμε να ελέγχουμε πρώτα για την παραγωγή συνδεδεμένης κοαγκουλάσης και εάν έχουμε αρνητικό αποτέλεσμα, τότε να εφαρμόζουμε τη μέθοδο για την ανίχνευση ελεύθερης κοαγκουλάσης.

Πριν γίνει η δοκιμασία παραγωγής κοαγκουλάσης πρέπει να ελέγχουμε εάν το στέλεχος του βακτηρίου είναι Gram θετικός κόκκος που παράγει καταλάση. Επειδή ορισμένα βακτήρια (π.χ. β-αιμολυτικός Στρεπτόκοκκος της Α ομάδας, *Escherichia coli* κ.ά.) προκαλούν πήξη του πλάσματος, χωρίς να παράγουν κοαγκουλάση, η δοκιμασία γίνεται, μόνο εάν το στέλεχος είναι Gram θετικός κόκκος και παράγει καταλάση.

1.3. Δοκιμασία παραγωγής δεοξυριβονουκλεάσης

1. Γενικά

Ορισμένα βακτήρια παράγουν το ένζυμο δεοξυριβονουκλεάση (Dnase) που διασπά το DNA.

Η ανίχνευση της παραγωγής Dnase γίνεται σε στερεό υλικό το οποίο περιέχει DNA. Εάν το στέλεχος του βακτηρίου παράγει Dnase, γύρω από την ανάπτυξή του στο υλικό θα παρατηρηθεί διαυγής ζώνη, εάν προστεθεί 1N HCl. Εάν η αντίδραση είναι αρνητική, το υλικό θα θολώσει.

Χαρακτηριστικό του *Staphylococcus aureus* είναι η παραγωγή μιας θερμοανθεκτικής δεοξυριβονουκλεάσης η οποία δεν καταστρέφεται στους 100°C για 15 λεπτά. Αυτή η ιδιότητα του *Staphylococcus aureus* έχει την ίδια σημασία με την παραγωγή κοαγκουλάσης για την ταυτοποίησή του.

Το θρεπτικό υλικό το οποίο περιέχει DNA υπάρχει έτοιμο στο εμπόριο. Αποστειρώνεται σε θερμοκρασία 121°C, για 15min, και δια-

μοιράζεται σε τρυβλία.

II. Μέθοδος

- Το βακτήριο το οποίο εξετάζεται εμβολιάζεται στην επιφάνεια του υλικού σε ευθεία γραμμή, η οποία αρχίζει από την περιφέρεια του τρυβλίου και κατευθύνεται προς το κέντρο. Σε κάθε τρυβλίο μπορούν να εμβολιαστούν τέσσερα διαφορετικά στελέχη.
- Το τρυβλίο επωάζεται σε θερμοκρασία 37°C, για 24 ώρες, αερόβια.
- Η επιφάνεια του υλικού καλύπτεται με 1N HCl και γίνεται έλεγχος αν εμφανίζεται διαυγής ζώνη γύρω από το σημείο ανάπτυξης του βακτηρίου, οπότε η δοκιμασία θεωρείται θετική.

1.4. Δοκιμασία ευαισθησίας στη βακιτρασίνη

I. Γενικά

Η δοκιμασία της βακιτρασίνης είναι χρήσιμη, για να διαπιστωθεί γρήγορα και με μεγάλη ακρίβεια εάν ένα στέλεχος β-αιμολυτικού Στρεπτόκοκκου ανήκει στην ομάδα Α, καθώς μόνο τα στελέχη της ομάδας Α είναι ευαίσθητα σε πολύ μικρή ποσότητα του αντιβιοτικού αυτού.

Κατά την εκτέλεση της δοκιμασίας πρέπει να χρησιμοποιούμε δισκία βακιτρασίνης των 0,04 μονάδων και όχι των 10.

Πριν γίνει η δοκιμασία, πρέπει να είναι βέβαιο ότι πρόκειται για β-αιμολυτικό Στρεπτόκοκκο, διότι πολλά στελέχη του α-αιμολυτικού Στρεπτόκοκκου είναι ευαίσθητα σε αυτήν την πυκνότητα της βακιτρασίνης.

II. Μέθοδος

- Με ευθύ κρίκο λαμβάνονται από καθαρή καλλιέργεια του βακτηρίου σε αιματούχο άγαρ αποικίες που περιβάλλονται από διαυγή ζώνη αιμόλυσης και εμβολιάζονται στη μισή επιφάνεια ενός αιματούχου άγαρ.
- Με αποστειρωμένη λαβίδα τοποθετείται πάνω στο υλικό ένα

δισκίο 0,04 μονάδων βακιτρασίνης και πιέζεται ελαφρά, ώστε να έλθει σε επαφή με το άγαρ.

- Το τρυβλίο επωάζεται σε θερμοκρασία 37°C, για 24 ώρες, αερόβια.
- Ελέγχεται η ανάπτυξη του στελέχους. Αν υπάρχει αναστολή της ανάπτυξής του γύρω από το δισκίο της βακιτρασίνης, σημαίνει ότι το στέλεχος ανήκει στην ομάδα Α. Το μέγεθος της ζώνης αναστολής δεν έχει σημασία για την αξιολόγηση του αποτελέσματος.

Άλλη μέθοδος είναι να παρασκευαστεί πρώτα μικροβιακό εναιώρημα εμβολιάζοντας σε 4 ml ζωμού τρυπτικάσης-σόγιας μερικές αποικίες του στελέχους. Επωάζονται σε θερμοκρασία 37°C, για 2-5 ώρες, αερόβια, και επιστρώνεται το καλλιέργημα σε αιματούχο άγαρ με αποστειρωμένο βαμβakoφόρο στείλεό. Τα επόμενα στάδια είναι όμοια με αυτά της προηγούμενης μεθόδου.

1.5. Δοκιμασία ευαισθησίας στην οπτοχίνη

I. Γενικά

Η ανάπτυξη του *Streptococcus pneumoniae* αναστέλλεται από την οπτοχίνη. Η οπτοχίνη είναι συνθετικό απολυμαντικό και υπάρχει στο εμπόριο με τη μορφή δισκίων διηθητικού χαρτιού.

Η δοκιμασία της ευαισθησίας στην οπτοχίνη είναι χρήσιμη, για να διαπιστωθεί γρήγορα και με μεγάλη ακρίβεια εάν ένα στέλεχος το οποίο παράγει α-αιμόλυση είναι *Streptococcus pneumoniae* ή α-αιμολυτικός *Στρεπτόκοκκος*. Τα περισσότερα στελέχη των α-αιμολυτικών *Στρεπτόκοκκων* είναι ανθεκτικά σε αυτήν.

II. Μέθοδος

- Από καθαρή καλλιέργεια του βακτηρίου σε αιματούχο άγαρ λαμβάνονται με ευθύ κρίκο αποικίες που περιβάλλονται από πράσινη ζώνη αιμόλυσης και εμβολιάζονται στη μισή επιφάνεια ενός αιματούχου άγαρ.
- Με αποστειρωμένη λαβίδα τοποθετείται πάνω στο υλικό ένα δισκίο οπτοχίνης και πιέζεται ελαφρά, ώστε να έλθει σε επαφή

με το άγαρ.

- Το τρυβλίο επωάζεται σε θερμοκρασία 37°C, για 24 ώρες, αερόβια.
- Την επόμενη ημέρα ελέγχεται η διάμετρος της ζώνης αναστολής της ανάπτυξης του βακτηρίου γύρω από το δισκίο της οπτοκίνης. Ζώνη αναστολής με διάμετρο:
 1. Μεγαλύτερη από 18mm σημαίνει ότι το στέλεχος είναι *Streptococcus pneumoniae*.
 2. Μικρότερη των 18mm και μεγαλύτερη των 15mm σημαίνει ότι πρέπει να εξετάζεται η ευαισθησία του στελέχους στην επίδραση της χολής.
 3. Μικρότερη από 15mm σημαίνει ότι το στέλεχος δεν είναι *Streptococcus pneumoniae*.

Άλλη μέθοδος είναι να παρασκευαστεί πρώτα μικροβιακό εναιώρημα εμβολιάζοντας σε 4 ml ζωμού τρυπτικάς-σόγιας μερικές αποικίες του στελέχους. Επωάζονται σε θερμοκρασία 37°C, για 2-5 ώρες, αερόβια, και επιστρώνεται το καλλιέργημα σε αιματούχο άγαρ με αποστειρωμένο βαμβακοφόρο στείλεό. Τα επόμενα στάδια είναι όμοια με αυτά της προηγούμενης μεθόδου.

1.6. Δοκιμασία χολής

I. Γενικά

Ουσίες όπως η χολή και τα χολικά άλατα ενεργοποιούν τα αυτολυτικά ένζυμα με αποτέλεσμα τη λύση των κυττάρων του *Streptococcus pneumoniae*. Η ιδιότητά του αυτή τον διαχωρίζει από τους α-αιμολυτικούς Στρεπτόκοκκους, οι οποίοι δεν κυτταρολύονται από την προσθήκη χολής ή χολικών αλάτων.

II. Μέθοδος

- Από καθαρή καλλιέργεια βακτηρίου σε αιματούχο άγαρ λαμβάνονται μερικές αποικίες με πράσινη ζώνη αιμόλυσης και εμβολιάζονται σε 1 ml θρεπτικού ζωμού.
- Το μικροβιακό εναιώρημα επωάζεται για λίγες ώρες, μέχρι να

θολώσει.

- 0,5ml μικροβιακού εναιωρήματος τοποθετείται σε ένα σωληνάριο που το ονομάζουμε εξεταστέο. Το υπόλοιπο 0,5ml του μικροβιακού εναιωρήματος τοποθετείται σε δεύτερο σωληνάριο που το χρησιμοποιούμε ως μάρτυρα.
- Στο εξεταστέο σωληνάριο προστίθεται 0,5ml δεοξυχολικού νατρίου 10% και στο σωληνάριο-μάρτυρα 0,5ml φυσιολογικού ορού.
- Ελέγχεται η διαύγεια του μικροβιακού εναιωρήματος. Εάν το στέλεχος είναι *Streptococcus pneumoniae*, το εξεταστέο σωληνάριο θα γίνει σχεδόν αμέσως διαυγές ή μετά από αερόβια επώαση 2-3 ωρών, σε θερμοκρασία 37°C. Το σωληνάριο-μάρτυρας θα παραμείνει θολερό.

Το διάλυμα δεοξυχολικού νατρίου 10% παρασκευάζεται, εάν προστεθεί 1gr δεοξυχολικού νατρίου σε 10ml αποστειρωμένου απεσταγμένου νερού.

1.7. Υδρόλυση της εσουλίνης σε υλικό με χολή

I. Γενικά

Βασική χαρακτηριστική ιδιότητα των Εντεροκόκκων είναι ότι υδrolύουν την εσουλίνη σε υλικό με χολή.

Το υλικό το οποίο χρησιμοποιείται για τη δοκιμασία υπάρχει έτοιμο στο εμπόριο. Μετά την αποστείρωση το θρεπτικό υλικό τοποθετείται σε σωληνάρια, σε λοξή θέση, και αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου, μέχρι να πήξει.

II. Μέθοδος

- Με ευθύ κρίκο εμβολιάζεται το στέλεχος σε ένα σωληνάριο με το υλικό και επωάζεται σε θερμοκρασία 37°C, για 24 ώρες, αερόβια.
- Σε θετικό αποτέλεσμα εμφανίζεται μαύρο χρώμα στην περιοχή που αναπτύχθηκε το βακτήριο.

1.8. Δοκιμασία οξειδάσης

I. Γενικά

Η οξειδάση είναι ένζυμο το οποίο παράγουν κυρίως οι Ναϊσ-σέριες και οι Ψευδομονάδες. Το αντιδραστήριο είναι διάλυμα παραφαινυλενοδιαμίνης 1%. Πρέπει να είναι άχρωμο ή ελαφρά ιώδες και φυλάσσεται σε σκοτεινόχρωμο φιαλίδιο. Είναι άχρηστο, εάν πάρει βαθύ ιώδες χρώμα.

II. Μέθοδος

Πάνω στις ύποπτες αποικίες προστίθεται μια σταγόνα από το αντιδραστήριο και περιμένουμε για 10 sec. Εάν το βακτήριο παράγει οξειδάση, η αποικία παίρνει ένα βαθύ ιώδες χρώμα.

Αντί του αντιδραστήριου χρησιμοποιούνται δισκία εμποτισμένα με το αντιδραστήριο. Το δισκίο τοποθετείται στην ανακαλλιέργεια του βακτηρίου που εξετάζεται. Σε περίπτωση θετικού αποτελέσματος, σε 10-20 sec, οι αποικίες γύρω από το δισκίο παίρνουν βαθύ ιώδες χρώμα.

1.9. Δοκιμασία αναγωγής των νιτρικών αλάτων σε νιτρώδη

I. Γενικά

Η αναγωγή των νιτρικών αλάτων σε νιτρώδη είναι χαρακτηριστική ιδιότητα των Εντεροβακτηριακών. Η δοκιμασία αναγωγής γίνεται σε θρεπτικό ζωμό που περιέχει KNO_3 0,1 % (1000ml θρεπτικός ζωμός +1gr KNO_3). Το υλικό μοιράζεται σε σωληνάρια και αποστειρώνεται στους 115°C για 20min. Η ανίχνευση των νιτρωδών αλάτων γίνεται με τα αντιδραστήρια Α και Β.

- Το αντιδραστήριο Α είναι διάλυμα διμεθυλ-α ναφθυλαμίνης 0,6% σε οξικό οξύ 5N (1000ml οξικό οξύ+6gr διμεθυλ-α ναφθυλαμίνη).
- Το αντιδραστήριο Β είναι διάλυμα σουλφανιλικού οξέος 0,8% σε οξικό οξύ 5N (1000ml οξικό οξύ+8gr σουλφανιλικό οξύ).

Τα νιτρώδη άλατα αντιδρούν μετά την προσθήκη ίσων όγκων από τα αντιδραστήρια Α και Β και εμφανίζεται κόκκινο χρώμα.

II. Μέθοδος

- Το στέλεχος του βακτηρίου που εξετάζεται εμβολιάζεται με κρίκο στο θρεπτικό ζωμό που περιέχει το νιτρικό κάλιο (KNO_3).
- Επωάζεται σε θερμοκρασία 37°C , για 24 ώρες, αερόβια.
- Την επόμενη ημέρα προστίθενται ίσες ποσότητες από τα δύο αντιδραστήρια.
- Αν το στέλεχος ανάγει τα νιτρικά άλατα σε νιτρώδη, εμφανίζεται κόκκινο χρώμα σε 1-2min και η αντίδραση θεωρείται θετική. Αν δεν εμφανιστεί κόκκινο χρώμα, η αντίδραση θεωρείται αρνητική.

Παράδειγμα θετικής δοκιμασίας είναι η *Escherichia coli*.

1.10. Δοκιμασία παραγωγής ινδόλης

I. Γενικά

Ο έλεγχος της παραγωγής ινδόλης από την οξείδωση της τρυπτοφάνης αποτελεί βασική δοκιμασία για την ταυτοποίηση κυρίως των Εντεροβακτηριακών. Ορισμένα βακτήρια οξειδώνουν την τρυπτοφάνη με την παρουσία οξυγόνου σε ένα μόριο ινδόλης. Χρησιμοποιείται το αντιδραστήριο του Κονας και ως θρεπτικό υλικό πεπτονούχος ζωμός. Το υλικό μοιράζεται ανά 5ml σε σωληνάρια και αποστειρώνεται στους 121°C για 15min. Το αντιδραστήριο του Κονας υπάρχει έτοιμο στο εμπόριο.

II. Μέθοδος

- Το στέλεχος του βακτηρίου που εξετάζεται εμβολιάζεται στον πεπτονούχο ζωμό.
- Επωάζεται σε θερμοκρασία 37°C , για 24 ώρες, αερόβια.
- Την επόμενη ημέρα προστίθενται 4-5 σταγόνες από το αντιδραστήριο Κονας.
- Αν εμφανιστεί κόκκινο χρώμα, σημαίνει ότι το στέλεχος διασπά την τρυπτοφάνη και παράγει ινδόλη (ινδόλη + αντιδραστήριο Κονας = κόκκινο χρώμα) και η αντίδραση θεωρείται θετική. Αν δεν εμφανιστεί κόκκινο χρώμα, η αντίδραση θεωρείται αρνητική.

ρείται αρνητική.

Παράδειγμα θετικής δοκιμασίας είναι η *Escherichia coli*, ενώ αρνητικής η *Klebsiella pneumoniae*.

1.11. Δοκιμασία ερυθρού του μεθυλίου (Methyl Red)

I. Γενικά

Η δοκιμασία ερυθρού του μεθυλίου είναι βασική δοκιμασία για την ταυτοποίηση των Εντεροβακτηριακών, κυρίως αυτών που διασπούν τη λακτόζη. Με τη δοκιμασία ελέγχουμε τη ζύμωση της γλυκόζης σε υλικό που περιέχει γλυκόζη και πεπτόνη και τη μετατροπή του pH του υλικού σε όξινο, από τα όξινα προϊόντα της διάσπασης της γλυκόζης. Για τη δοκιμασία χρησιμοποιούνται:

- Το ειδικό θρεπτικό υλικό Clark και Lubs, που μοιράζεται ανά 5ml σε σωληνάρια και αποστειρώνεται στους 115°C για 15min.
- Ο δείκτης ερυθρού του μεθυλίου: Διαλύεται 0,1gr ερυθρού του μεθυλίου σε 300ml αιθυλικής αλκοόλης και συμπληρώνεται μέχρι 500ml με απεσταγμένο νερό.

Το διάλυμα του δείκτη διατηρείται στο ψυγείο.

II. Μέθοδος

- Το στέλεχος του βακτηρίου που εξετάζεται εμβολιάζεται στο ειδικό θρεπτικό υλικό Clark και Lubs.
- Επωάζεται σε θερμοκρασία 37°C, για 24 ώρες, αερόβια.
- Την επόμενη ημέρα προστίθενται 4-5 σταγόνες του αντιδραστήριου ερυθρού του μεθυλίου.
- Αν εμφανιστεί ζωηρό κόκκινο χρώμα σε όλο το υλικό, η αντίδραση θεωρείται θετική. Αν το χρώμα του υλικού είναι κίτρινο, η αντίδραση θεωρείται αρνητική.

Παράδειγμα θετικής δοκιμασίας είναι η *Escherichia coli*, ενώ αρνητικής η *Klebsiella pneumoniae*.

1.12. Δοκιμασία παραγωγής ακετυλομεθυλοκαρβινόλης (Voges-Proskauer)

I. Γενικά

Η δοκιμασία Voges-Proskauer είναι βασική δοκιμασία για την ταυτοποίηση των Εντεροβακτηριακών, κυρίως αυτών που διασπούν τη λακτόζη. Τα βακτήρια αυτά σχηματίζουν ακετυλομεθυλοκαρβινόλη από τη διάσπαση της γλυκόζης. Για τη δοκιμασία χρησιμοποιούνται:

- Το ειδικό θρεπτικό υλικό Clark και Lubs, που μοιράζεται ανά 5ml σε σωληνάρια και αποστειρώνεται στους 115^o C για 15min.
- Το αντιδραστήριο A, που είναι διάλυμα α-ναφθόλης 5% (5gr α-ναφθόλη + 100ml αιθυλική αλκοόλη).
- Το αντιδραστήριο B, που είναι διάλυμα KOH 40 % (40gr KOH + 100ml απεσταγμένο νερό).

Τα αντιδραστήρια διατηρούνται σε ψυγείο.

II. Μέθοδος

- Το στέλεχος του βακτηρίου που εξετάζεται εμβολιάζεται στο ειδικό θρεπτικό υλικό Clark και Lubs.
- Επωάζεται σε θερμοκρασία 37^oC, για 24 ώρες, αερόβια.
- Την επόμενη ημέρα προστίθενται ίσες ποσότητες από τα διαλύματα, KOH 40% και α-ναφθόλη 5% του αντιδραστηρίου Voges-Proskauer.
- Αν εμφανιστεί κόκκινο χρώμα στην επιφάνεια του υλικού, σημαίνει ότι το στέλεχος παράγει ακετυλο-μεθυλο-καρβινόλη από τη διάσπαση της γλυκόζης και η αντίδραση θεωρείται θετική. Αν δεν εμφανιστεί κόκκινο χρώμα, η αντίδραση είναι αρνητική και το σωληνάριο επωάζεται μέχρι πέντε συνολικά ημέρες.

Παράδειγμα θετικής δοκιμασίας είναι η *Klebsiella pneumoniae*, ενώ αρνητικής η *Escherichia coli*.

1.13. Δοκιμασία των κιτρικών (Citrate)

I. Γενικά

Η δοκιμασία των κιτρικών είναι χρήσιμη για την ταυτοποίηση κυρίως των Εντεροβακτηριακών. Ορισμένα βακτήρια μπορούν να πολλαπλασιάζονται σε συνθετικά θρεπτικά υλικά τα οποία περιέχουν ως μόνη πηγή άνθρακα το κιτρικό νάτριο. Η δοκιμασία του κιτρικού νατρίου γίνεται σε στερεά θρεπτικά υλικά, όπως το υλικό Simmons ή σε υγρά θρεπτικά υλικά, όπως το υλικό του Koser. Το στερεό θρεπτικό υλικό Simmons μοιράζεται ανά 5ml σε σωληνάρια και αποστειρώνεται στους 115°C για 20min. Μετά την αποστείρωση τα σωληνάρια τοποθετούνται σε λοξή θέση και σε θερμοκρασία δωματίου, μέχρι να πήξει το υλικό. Η λοξή επιφάνεια πρέπει να είναι μεγάλη. Το υγρό θρεπτικό υλικό Koser έχει την ίδια σύνθεση με το στερεό υλικό Simmons, δεν περιέχει όμως άγαρ και το δείκτη κυανό της βρωμοθυμόλης.

II. Μέθοδος

- Το στέλεχος του βακτηρίου που εξετάζεται εμβολιάζεται στα συνθετικά υλικά Simmons ή Koser.
- Επωάζεται σε θερμοκρασία 37°C, για 24-48 ώρες, αερόβια.
- Μετά τις 48 ώρες, αν το στέλεχος του βακτηρίου αναπτυχθεί στο υλικό Simmons, παρατηρείται αλλαγή στο χρώμα του υλικού, το οποίο από πράσινο γίνεται βαθύ κυανό. Στο υλικό Koser η ανάπτυξη του βακτηρίου φαίνεται από τη θόλωση του υλικού. Αν δεν αναπτυχθεί το βακτήριο, δεν παρατηρείται αλλαγή του χρώματος του υλικού Simmons ούτε θόλωση στο υλικό Koser και η αντίδραση θεωρείται αρνητική. Σε αρνητική αντίδραση η επώαση των υλικών συνεχίζεται για τέσσερις συνολικά ημέρες.

Παράδειγμα θετικής δοκιμασίας είναι η *Klebsiella pneumoniae*, ενώ αρνητικής η *Escherichia coli*.

1.14. Δοκιμασία παραγωγής υδρόθειου (H_2S)

I. Γενικά

Η δοκιμασία για τον έλεγχο της παραγωγής υδρόθειου γίνεται κυρίως για την ταυτοποίηση των Εντεροβακτηριακών και των Βρουκελλών. Ορισμένα από τα είδη τους μπορούν να ανάγουν αμινοξέα τα οποία φέρουν θείο στο μόριό τους (π.χ. κυστεΐνη) και να παράγουν υδρόθειο. Υδρόθειο παράγεται επίσης από την αναγωγή ανόργανων ουσιών οι οποίες φέρουν θείο στο μόριό τους (π.χ.θειοθειικό ή υποθειώδες νάτριο).

Η παραγωγή του υδρόθειου διαπιστώνεται από ουσίες-δείκτες, όπως ο θειικός εναμμώνιος σίδηρος, ο οξικός μόλυβδος κ.ά. Το υδρόθειο που παράγεται αντιδρά με το σίδηρο ή το μόλυβδο και σχηματίζονται θειούχες ενώσεις οι οποίες έχουν μαύρο χρώμα. Ο έλεγχος παραγωγής υδρόθειου από τα Εντεροβακτηριακά γίνεται στο υλικό Kligler και από τις Βρουκέλλες στο υλικό Tryptose άγαρ. Το υλικό Kligler μοιράζεται ανά 7 ml σε σωληνάρια και αποστειρώνεται στους $121^{\circ}C$ για 15min. Μετά την αποστείρωση τα σωληνάρια τοποθετούνται σε λοξή θέση, μέχρι να πήξει το υλικό. Φροντίζουμε η ευθεία στήλη στο υλικό να είναι αρκετά μεγάλη.

II. Μέθοδος

A. Παραγωγή υδρόθειου από Εντεροβακτηριακά στο υλικό Kligler

- Το στέλεχος του βακτηρίου που εξετάζεται εμβολιάζεται με ευθύ κρίκο στην ευθεία στήλη του υλικού και στη συνέχεια στη λοξή επιφάνεια.
- Επωάζεται σε θερμοκρασία $37^{\circ}C$, για 24 ώρες, αερόβια.
- Μετά από 24 ώρες, αν εμφανιστεί μαύρο χρώμα στην ευθεία στήλη του υλικού, σημαίνει ότι το στέλεχος του βακτηρίου παράγει υδρόθειο και η αντίδραση θεωρείται θετική.
- Στο υλικό Kligler ελέγχουμε ταυτόχρονα τη ζύμωση της γλυκόζης με ή χωρίς παραγωγή αερίου και τη ζύμωση της λακτόζης:
 1. Αν το στέλεχος του βακτηρίου ζυμώνει τη γλυκόζη, το χρώμα του υλικού στην ευθεία στήλη μετατρέπεται σε κίτρινο από την αλλαγή του χρώματος του δείκτη ερυθρού της φαινόλης.

2. Αν η ζύμωση της γλυκόζης προκαλεί και παραγωγή αερίου, στην ευθεία στήλη του υλικού παρατηρούνται μια ή περισσότερες φυσαλίδες αέρα, ενώ σε μερικές περιπτώσεις από τη μεγάλη ποσότητα των αερίων μετακινείται το υλικό προς τα επάνω.
3. Αν το στέλεχος του βακτηρίου ζυμώνει τη λακτόζη, παρατηρείται αλλαγή στο χρώμα του δείκτη από κόκκινο σε κίτρινο και στη λοξή επιφάνεια του υλικού. Η ζύμωση της λακτόζης γίνεται στην ευθεία στήλη του υλικού, όπως και της γλυκόζης, αλλά τα όξινα προϊόντα που παράγονται είναι περισσότερα σε σχέση με εκείνα που παρατηρούνται κατά τη ζύμωση της γλυκόζης και διαχέονται σε όλο το υλικό, με αποτέλεσμα να αλλάζει το χρώμα του δείκτη και στη λοξή επιφάνεια του υλικού.

Β. Παραγωγή υδρόθειου από Βρουκέλλες στο υλικό Tryptose άγαρ.

Η παραγωγή υδρόθειου από την αναγωγή του αμινοξέος κυστεΐνη γίνεται στο υλικό Tryptose άγαρ και ο δείκτης του pH είναι ταινία διηθητικού χαρτιού, εμποτισμένη με διάλυμα οξικού μολύβδου 10 %.

- Το στέλεχος του βακτηρίου που εξετάζεται εμβολιάζεται σε σωληνάριο που έχει υλικό Tryptose άγαρ σε λοξή θέση. Μια ταινία διηθητικού χαρτιού, εμποτισμένη με διάλυμα οξικού μολύβδου 10%, συγκρατείται με το ένα της άκρο στο στόμιο του σωληναρίου και το άλλο άκρο αιωρείται μέσα στο σωληνάριο και σε μικρή απόσταση από τη λοξή επιφάνεια του υλικού.
- Το σωληνάριο επωάζεται αερόβια, σε θερμοκρασία 37°C και σε ατμόσφαιρα CO₂ 10% για 4 συνολικά ημέρες.
- Εξετάζεται καθημερινά για την παραγωγή υδρόθειου. Αν το στέλεχος παράγει υδρόθειο, η ταινία μαυρίζει από την αντίδραση του αερίου με τον οξικό μόλυβδο και το σχηματισμό θειούχου μολύβδου. Τότε η αντίδραση θεωρείται θετική. Η αλλαγή της ταινίας γίνεται καθημερινά. Η δοκιμασία θεωρείται αρνητική, αν δεν εμφανιστεί μαύρο χρώμα και μετά την τέταρτη ημέρα επώασης.

Παράδειγμα θετικής δοκιμασίας είναι ο *Proteus Vulgaris*, ενώ αρνητικής η *Shigella sonnei*.

1.15. Δοκιμασία καταβολισμού των αμινοξέων ορνιθίνης, λυσίνης και αργινίνης

I. Γενικά

Ο καταβολισμός των αμινοξέων αποτελεί βασική δοκιμασία για την ταυτοποίηση των βακτηρίων και κυρίως των ειδών των Εντεροβακτηριακών. Η διάσπαση των αμινοξέων γίνεται με ειδικά ένζυμα. Από τη διάσπαση της ορνιθίνης παράγεται CO_2 και πουτρεσκίνη. Από τη διάσπαση της λυσίνης παράγεται CO_2 και καδαβερίνη, ενώ από τη διάσπαση της αργινίνης παράγεται ορνιθίνη, CO_2 και αμμωνία.

Το υλικό Möller, με το οποίο μελετάμε τη διάσπαση των αμινοξέων, έχει όξινο pH. Το ειδικό αυτό υλικό μοιράζεται σε τέσσερα ίσα μέρη (από 250ml κάθε μέρος). Στο ένα μέρος του υλικού προστίθεται υδροχλωρική L-ορνιθίνη σε τελική συγκέντρωση 1% (2,5gr στα 250ml του υλικού), στο δεύτερο μέρος προστίθεται υδροχλωρική L-λυσίνη σε τελική συγκέντρωση 1% και στο τρίτο μέρος υδροχλωρική L-αργινίνη σε τελική συγκέντρωση 1%. Το τέταρτο μέρος του υλικού δεν περιέχει αμινοξύ και χρησιμεύει ως μάρτυρας. Το pH του υλικού είναι όξινο ($\text{pH} = 6.0$). Πρέπει να ρυθμίζεται το pH που περιέχει ορνιθίνη. Η ρύθμιση γίνεται με διάλυμα 10N NaOH (1ml διαλύματος 10N NaOH στα 250ml υλικού Möller που περιέχει ορνιθίνη 1%). Το κάθε μέρος του υλικού μοιράζεται ανά 5ml σε βιδωτά σωληνάρια και αποστειρώνεται στους 121°C για 10min. Το υλικό φυλάσσεται στους 4°C - 10°C .

II. Μέθοδος

- Το στέλεχος του βακτηρίου που εξετάζεται εμβολιάζεται στο σωληνάριο με το κατάλληλο αμινοξύ και στο σωληνάριο που χρησιμεύει ως μάρτυρας (δεν έχει αμινοξύ). Τα σωληνάρια καλύπτονται με 2-3ml υγρής αποστειρωμένης παραφίνης.
- Τα σωληνάρια επωάζονται σε θερμοκρασία 37°C , για 24 ώρες έως τέσσερις ημέρες, αερόβια, και εξετάζονται καθημερινά.
- Αν το στέλεχος του βακτηρίου διασπά το αμινοξύ, στο αντίστοιχο σωληνάριο το υλικό έχει ιώδες χρώμα και η αντίδρα-

ση θεωρείται θετική. Στο σωληνάριο που χρησιμεύει ως μάρτυρας το υλικό έχει κίτρινο χρώμα από τη διάσπαση της γλυκόζης. Αν το στέλεχος δε διασπά το αμινοξύ, το χρώμα του υλικού είναι κίτρινο από τη διάσπαση της γλυκόζης και η αντίδραση θεωρείται αρνητική.

1.16. Δοκιμασία παραγωγής ουρεάσης

1. Γενικά

Η δοκιμασία παραγωγής ουρεάσης χρησιμοποιείται κυρίως για την ταυτοποίηση των Εντεροβακτηριακών, αλλά είναι χρήσιμη και για την ταυτοποίηση των στελεχών των Βρουκελλών και της Μπορντετέλλας. Ορισμένα από τα είδη τους παράγουν ένα ένζυμο, την ουρεάση, η οποία υδρολύει την ουρία και ελευθερώνει αμμωνία. Η αμμωνία μετατρέπει το pH του υλικού σε αλκαλικό και αλλάζει το χρώμα του δείκτη και του υλικού σε κόκκινο. Η δοκιμασία της ουρεάσης γίνεται σε στερεό και υγρό θρεπτικό υλικό.

Το στερεό θρεπτικό υλικό αποστειρώνεται σε θερμοκρασία 115°C για 15min. Μετά την αποστείρωση η φιάλη με το υλικό μπαίνει σε υδατόλουτρο στους 45°-50°C. Όταν η θερμοκρασία της φιάλης είναι 45°-50°C, προστίθενται 50ml υδατικού διαλύματος ουρίας 40%, το οποίο προηγουμένως έχει αποστειρωθεί με διήθηση. Η φιάλη ανακινείται, για να αναμειχθεί η ουρία με το υλικό και μοιράζεται ανά 3ml σε αποστειρωμένα σωληνάρια, που τοποθετούνται σε λοξή θέση, μέχρι να πήξει το υλικό.

Τα συστατικά του υγρού θρεπτικού υλικού διαλύονται σε 900ml απεσταγμένου νερού και αποστειρώνονται σε θερμοκρασία 121°C για 15min. Στη συνέχεια προστίθενται 100ml υδατικού διαλύματος ουρίας 20%, το οποίο έχει αποστειρωθεί με διήθηση. Το υλικό μοιράζεται ανά 3ml σε αποστειρωμένα σωληνάρια.

II. Μέθοδος

A. Παραγωγή ουρεάσης σε στερεό θρεπτικό υλικό.

- Το στέλεχος του βακτηρίου που εξετάζεται εμβολιάζεται στη λοξή επιφάνεια του στερεού θρεπτικού υλικού. Η ευθεία στήλη δεν εμβολιάζεται και χρησιμεύει ως μάρτυρας της αλλαγής του χρώματος του υλικού.
- Το σωληνάριο επωάζεται στους 37⁰ C, για 24 ώρες, αερόβια.
- Την επόμενη ημέρα αν εμφανιστεί κόκκινο χρώμα στη λοξή επιφάνεια του υλικού, σημαίνει ότι το στέλεχος παράγει ουρεάση και η αντίδραση θεωρείται θετική.

Παράδειγμα θετικής δοκιμασίας είναι ο *Proteus Vulgaris*, ενώ αρνητικής η *Escherichia coli*.

B. Παραγωγή ουρεάσης σε υγρό θρεπτικό υλικό.

- Το στέλεχος του βακτηρίου που εξετάζεται εμβολιάζεται στο υγρό υλικό και το σωληνάριο ανακινείται, για να ομογενοποιηθεί το εναιώρημα των κυτάρων.
- Το σωληνάριο επωάζεται σε θερμοκρασία 37⁰ C, για 24 ώρες, αερόβια.
- Την επόμενη ημέρα αν εμφανιστεί κόκκινο χρώμα σε όλο το ύψος του υλικού, σημαίνει ότι το στέλεχος παράγει ουρεάση και η αντίδραση θεωρείται θετική.
- Αν η αντίδραση είναι αρνητική, η επώαση παρατείνεται για 48 ώρες. Το υγρό θρεπτικό υλικό χρησιμοποιείται μόνο για τους Πρωτεΐς.

1.17. Δοκιμασία απαμίνωσης της φαινυλαλανίνης (PPA)**I. Γενικά**

Η παραγωγή φαινυλο-πυροσταφυλικού οξέος από την οξειδωτική απαμίνωση της φαινυλαλανίνης είναι χαρακτηριστική ιδιότητα των Πρωτέων. Η ανίχνευση του οξέος γίνεται με υδατικό διάλυμα FeCl₃ 10% (χλωριούχου σιδήρου). Ο FeCl₃ αντιδρά με το φαινυλο-πυροσταφυλικό οξύ και σχηματίζει ένωση που έχει χρώμα πράσινο.

Το κατάλληλο θρεπτικό υλικό μοιράζεται ανά 5ml σε σωληνάρια

και αποστειρώνεται σε θερμοκρασία 121°C για 15min. Μετά την αποστείρωση τα σωληνάρια τοποθετούνται σε λοξή θέση, μέχρι να πήξει το υλικό. Προσέχουμε η λοξή επιφάνεια να είναι μεγάλη.

Το αντιδραστήριο είναι διάλυμα FeCl_3 10%. ($10\text{grFeCl}_3 + 100\text{ml}$ απεσταγμένο νερό) και διατηρείται στο ψυγείο σε σκοτεινή φιάλη.

II. Μέθοδος

- Το στέλεχος του βακτηρίου που εξετάζεται εμβολιάζεται σε όλη τη λοξή επιφάνεια του θρεπτικού υλικού.
- Επώζεται σε θερμοκρασία 37°C , για 24 ώρες, αερόβια.
- Την επόμενη ημέρα προστίθενται σταγόνες από το διάλυμα του FeCl_3 . Αν εμφανιστεί πράσινο χρώμα στη λοξή επιφάνεια του υλικού, σημαίνει ότι το στέλεχος προκαλεί απαμίνωση της φαινυλαανίνης και παράγεται φαινυλο-πυροσταφυλικό οξύ, οπότε η αντίδραση θεωρείται θετική.

Παράδειγμα θετικής δοκιμασίας είναι οι Πρωτεΐς, ενώ αρνητικής η *Escherichia coli*.

1.18. Δοκιμασία ρευστοποίησης της πηκτής

I. Γενικά

Ο έλεγχος της ικανότητας ενός βακτηρίου να ρευστοποιεί την πηκτή είναι μια δοκιμασία που χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση Gram θετικών και Gram αρνητικών βακτηρίων. Ορισμένα είδη βακτηρίων παράγουν ένζυμα (ζελατινάσες) που διασπούν την πηκτή, με αποτέλεσμα να ρευστοποιείται το διάλυμα, το οποίο παραμένει σε υγρή κατάσταση και δεν πήζει ούτε στη θερμοκρασία του ψυγείου (4°C).

Το θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιείται είναι πηκτή και θρεπτικός ζωμός (12gr πηκτή+ 1000ml ζωμός). Το υλικό μοιράζεται ανά 5ml σε σωληνάρια και αποστειρώνεται σε θερμοκρασία 121°C για 12min. Στη θερμοκρασία δωματίου είναι σε στερεή κατάσταση.

II. Μέθοδος

- Το στέλεχος του βακτηρίου που εξετάζεται εμβολιάζεται με ευθύ κρίκο στο σωληνάριο που περιέχει πηκτή και θρεπτικό ζωμό.
- Επωάζεται σε θερμοκρασία 37⁰ C, για 14 ημέρες, αερόβια.
- Κάθε 2-3 ημέρες το σωληνάριο τοποθετείται στο ψυγείο (4⁰C) για δύο ώρες και εξετάζεται, για να διαπιστώσουμε τη ρευστοποίηση της πηκτής. Αν το στέλεχος παράγει ένζυμα που διασπούν την πηκτή, το υλικό δε θα πήξει, όταν μπει στο ψυγείο (αντίδραση θετική). Αν το στέλεχος δε ρευστοποιεί την πηκτή, το υλικό, όταν μπει στο ψυγείο, θα πήξει (αντίδραση αρνητική). Πάντα πρέπει να χρησιμοποιείται ως μάρτυρας σωληνάριο που έχει πηκτή χωρίς στέλεχος βακτηρίου. Στο σωληνάριο αυτό το υλικό πρέπει να είναι σε υγρή κατάσταση σε θερμοκρασία 37⁰C και να πήξει στο ψυγείο στους 4⁰C.

1.19. Δοκιμασία ελέγχου κινητικότητας**I. Γενικά**

Ο έλεγχος της κινητικότητας χρησιμεύει για την ταυτοποίηση ενός βακτηρίου και γίνεται σε σωληνάριο που περιέχει ημίρρευστο θρεπτικό υλικό. Συνήθως τα βακτήρια εμφανίζουν κινητικότητα σε θερμοκρασία μικρότερη των 37⁰C. Επομένως ο έλεγχος της κινητικότητας πρέπει πάντα να γίνεται σε δύο σωληνάρια από τα οποία το ένα επωάζεται στους 37⁰C και το άλλο σε θερμοκρασία δωματίου. Το κατάλληλο θρεπτικό υλικό μοιράζεται σε σωληνάρια και αποστειρώνεται στους 121⁰C για 15min.

II. Μέθοδος

- Το στέλεχος του βακτηρίου εμβολιάζεται σε θρεπτικό ζωμό και επωάζεται σε θερμοκρασία 37⁰C, για 24 ώρες, αερόβια.
- Από την καλλιέργεια του στελέχους στο θρεπτικό ζωμό λαμβάνεται μια σταγόνα με ευθύ κρίκο και εμβολιάζεται κατά μήκος της στήλης του ημίρρευστου υλικού. Εμβολιάζονται δύο σωληνάρια.

- Το ένα σωληνάριο επωάζεται σε θερμοκρασία 37°C, για 24 ώρες, και το άλλο σε θερμοκρασία δωματίου για 5 ημέρες.
- Αν το στέλεχος είναι κινητό, τα κύτταρά του κινούνται και πέρα από την ευθεία γραμμή του εμβολιασμού και η θόλωση καταλαμβάνει όλη τη στήλη του υλικού. Αν το στέλεχος είναι ακίνητο, αναπτύσσεται μόνο στην ευθεία γραμμή του εμβολιασμού και η θόλωση παρατηρείται μόνο σε αυτήν την περιοχή του υλικού.

1.20. Δοκιμασία διάσπασης των σακχάρων

1. Γενικά

Η μελέτη διάσπασης των σακχάρων είναι σημαντική δοκιμασία για την ταυτοποίηση των βακτηρίων. Στο εργαστήριο η διάσπαση των ουσιών αυτών και η παραγωγή οξέος διαπιστώνεται, αν προσθέσουμε στο στερεό ή υγρό υλικό ένα δείκτη του pH. Η παραγωγή οξέος μετατρέπει το αλκαλικό pH σε όξινο, με αποτέλεσμα να αλλάζει το χρώμα του δείκτη και του υλικού.

Η μελέτη της παραγωγής αερίου από τη διάσπαση των σακχάρων γίνεται σε υγρά ή στερεά θρεπτικά υλικά. Η παραγωγή αερίου στα υγρά διαπιστώνεται, αν στο σωληνάριο του υλικού βάλουμε μικρό ανεστραμμένο σωληνάριο. Το αέριο που θα παραχθεί παγιδεύεται στο ανεστραμμένο σωληνάριο. Η παραγωγή αερίου σε στερεά υλικά που είναι σε λοξή θέση διαπιστώνεται από τις φυσαλίδες ή τα ρήγματα μέσα στο άγαρ.

Τα Gram αρνητικά βακτήρια διακρίνονται σε εκείνα που ζυμώνουν τη γλυκόζη, όπως τα Εντεροβακτηριακά, και σε εκείνα που προκαλούν οξείδωση της γλυκόζης, όπως οι Ψευδομονάδες. Η ζύμωση της γλυκόζης γίνεται κάτω από αναερόβιες συνθήκες και τα τελικά προϊόντα είναι πολύ όξινα. Η οξείδωση γίνεται κάτω από αερόβιες συνθήκες και τα τελικά προϊόντα είναι CO₂ και νερό, ενώ τα ενδιάμεσα προϊόντα μεταβολισμού ελαττώνουν την οξύτητα στο υλικό της καλλιέργειας.

Η οξειδωτική και ζυμωτική διάσπαση των σακχάρων ελέγχεται με

τη δοκιμή παραγωγής οξέος και αερίου σε σακχαρούχα και πεπτονούχα υλικά που περιέχουν δείκτη του pH, όπως το υλικό Oxidation Fermentation medium (O/F). Το ειδικό αυτό υλικό αποστειρώνεται στους 121^o C, για 15min. Το σάκχαρο που θα μελετηθεί αποστειρώνεται με διήθηση και προστίθεται στο υλικό σε τελική συγκέντρωση 1%. Στη συνέχεια το υλικό μοιράζεται σε μικρά σωληνάκια.

II. Μέθοδος

- Το στέλεχος του βακτηρίου που εξετάζεται εμβολιάζεται σε δύο σωληνάκια. Η επιφάνεια του ενός σωληναρίου καλύπτεται με 25mm στρώματος αποστειρωμένης, υγρής παραφίνης για τη δημιουργία αναερόβιων συνθηκών.
- Τα σωληνάκια επάζονται σε θερμοκρασία 37^o C, για 1-2 ημέρες, αερόβια.
- Η αλλαγή στο χρώμα του υλικού μόνο στο σωληνάριο που είναι χωρίς παραφίνη σημαίνει ότι το στέλεχος προκαλεί οξείδωση του σακχάρου. Η αλλαγή στο χρώμα του υλικού και στα δύο σωληνάκια σημαίνει ότι το στέλεχος προκαλεί ζύμωση του σακχάρου. Αν δεν παρατηρείται αλλαγή στο χρώμα του υλικού των δύο σωληναρίων, το στέλεχος δεν οξειδώνει και δε ζυμώνει το σάκχαρο.

Παράδειγμα θετικής δοκιμασίας οξείδωσης: *Pseudomonas aeruginosa*.

Παράδειγμα θετικής δοκιμασίας ζύμωσης: *Escherichia coli*.

1.21. Ταυτοποίηση βακτηρίων με API 20 E

I. Γενικά

Το API 20 E είναι ένα σύστημα έτοιμων, προπαρασκευασμένων αντιδραστηρίων-υλικών σε πλαστικά πλακίδια με ειδικές θέσεις (20 μικροσωληνάκια και το καθένα από αυτά αποτελείται από ένα σωληνάριο και ένα φρεάτιο) για κάθε υλικό με το οποίο ελέγχονται 22 βιοχημικές ιδιότητες. Με το API 20 E ταυτοποιούνται σχεδόν πλήρως 27 Gram αρνητικά Εντεροβακτηριακά και άλλα 23 Gram αρνητικά βακτήρια, που απομονώνονται από τις καλλιέργειες των κλινι-

κών δειγμάτων. Τα αντιδραστήρια που πρέπει να έχει το εργαστήριο και τα οποία μπορούμε να προμηθευτούμε μαζί με τις ταινίες είναι:

- Διάλυμα FeCl_3 10%.
- Αντιδραστήριο ινδόλης Κοναcs.
- Αντιδραστήριο οξειδάσης.
- Αντιδραστήρια αναγωγής νιτρικών αλάτων.
- Αντιδραστήρια Voges-Proskauer.
- Όλα τα υλικά του API, αποστειρωμένο απεσταγμένο νερό και παραφινέλαιο.

II. Μέθοδος

Η δοκιμή θα γίνει από καθαρή καλλιέργεια του βακτηρίου.

- Κάνουμε εναιώρημα μιας αποικίας σε 3ml αποστειρωμένο απεσταγμένο νερό.
- Ανοίγουμε ένα API set και βάζουμε στον πάγκο το δισκάκι του, στο οποίο σημειώνουμε το νούμερο της καλλιέργειας. Ρίχνουμε 3ml απεσταγμένο νερό, για να διατηρείται υγρή η ατμόσφαιρα κατά τη διάρκεια της επώασης.
- Βάζουμε στο δισκάκι την πλάκα API 20 E με τα αντιδραστήρια.
- Με σύριγγα ή πιπέτα Pasteur αναρροφούμε το μικροβιακό εναιώρημα και γεμίζουμε μόνο τα σωληνάρια. Στις θέσεις κιτρικών, Voges-Proskauer και Gel γεμίζουμε και το σωληνάριο και το φρεάτιο με εναιώρημα βακτηρίου, ενώ στις θέσεις ADH, LDC, ODC, H_2S και URE γεμίζουμε τα σωληνάρια με



Εικόνα 1.1: API 20 E

μικροβιακό εναιώρημα και τα φρεάτια με υγρή αποστειρωμένη παραφίνη για δημιουργία αναερόβιων συνθηκών.

- Σκεπάζουμε το δισκάκι με το κάλυμμά του και επωάζουμε για 24 ώρες, σε θερμοκρασία 37°C, αερόβια.
- Την επόμενη ημέρα διαβάζουμε και σημειώνουμε στο ειδικό έντυπο πρώτα τις άμεσες αντιδράσεις και μετά αυτές που χρειάζεται να προσθέσουμε αντιδραστήρια.
- Οι άμεσες αντιδράσεις διαβάζονται από το χρώμα που θα εμφανίσουν (πίνακας 1.1).

	Θετική	Αρνητική
ONPG	Κίτρινο	Άχρωμο
ADH	Κόκκινο ή πορτοκαλί	Κίτρινο
LDC	Κόκκινο ή πορτοκαλί	Κίτρινο
ODC	Κόκκινο ή πορτοκαλί	Κίτρινο
LCITI	Μπλε	Πράσινο
H₂S	Μαύρο ίζημα	Όχι μαύρο ίζημα
URE	Κόκκινο	Κίτρινο
GEL	Διάχυση πύγματος	Όχι πύγμα
Σάκχαρα	Κίτρινο	Μπλε - πράσινο

Πίνακας 1.1: Χρώματα των άμεσων αντιδράσεων του API 20 E

Οι αντιδράσεις στις οποίες χρειάζεται να προσθέσουμε αντιδραστήριο είναι οι εξής:

1. Στη θέση της ινδόλης προσθέτουμε μια σταγόνα από το αντιδραστήριο Kovacs και διαβάζουμε μέσα σε 2min. Αν η αντίδραση είναι θετική, εμφανίζεται κόκκινος δακτύλιος.
2. Στη θέση της τρυπτοφάνης προσθέτουμε μια σταγόνα διαλύματος FeCl₃ 10%. Αν η αντίδραση είναι θετική, εμφανίζεται καστανό χρώμα, ενώ, αν είναι αρνητική, κίτρινο.
3. Στη θέση Voges-Proskauer προσθέτουμε μια σταγόνα από τα δύο διαλύματα και περιμένουμε 10min περίπου. Αν η αντίδραση είναι θετική, έχουμε κόκκινο χρώμα, ενώ, αν είναι αρνητική, το υλικό παραμένει άχρωμο.
4. Για τη δοκιμή οξειδάσης προσθέτουμε μια σταγόνα του αντι-

δραστηρίου της οξειδάσης στη θέση ONPG ή του H_2S , εφόσον οι αντιδράσεις αυτές είναι αρνητικές. Αν η αντίδραση είναι θετική, θα εμφανιστεί βαθύ ιώδες χρώμα. Περιμένουμε 20min, πριν θεωρήσουμε την αντίδραση αρνητική.

5. Στη θέση της γλυκόζης, μετά την ανάγνωση της αντίδρασής της, προσθέτουμε δύο σταγόνες από κάθε αντιδραστήριο για την αναγωγή των νιτρικών αλάτων σε νιτρώδη. Αν η αντίδραση είναι θετική, εμφανίζεται κόκκινο χρώμα μετά από 2-3min.
6. Οι θετικές και αρνητικές δοκιμές βαθμολογούνται ανά τριάδα, σύμφωνα με τις έντυπες οδηγίες, με αριθμό από 0-9. Έτσι παράγονται επταψήφιοι αριθμοί. Με τον ειδικό κατάλογο αριθμητικής ταξινόμησης βρίσκεται το είδος του βακτηρίου.



Εικόνα 1.2: API 20 E *Escherichia coli*

1.22. Δοκιμή εξάρτησης από τους Χ και V παράγοντες (*Haemophilus influenzae*)

Σε τρυβλίο με άγαρ χωρίς τους παράγοντες Χ και V, όπως το TSA άγαρ, εμβολιάζουμε το βακτήριο που εξετάζουμε. Το βακτήριο έχει καλλιεργηθεί σε ζωμό Lewinthal και όχι πάνω σε σοκολατόχρωμο άγαρ, για να αποφύγουμε τη μεταφορά του Χ παράγοντα.

Πάνω στο τρυβλίο βάζουμε δισκία (ή ταινίες διηθητικού χαρτιού) εμποτισμένα ένα με τον παράγοντα Χ, ένα άλλο με τον παράγοντα V και ένα τρίτο με τους δύο παράγοντες μαζί.

Το τρυβλίο επωάζεται αερόβια, για 24-48 ώρες, σε θερμοκρασία 37°C. Το βακτήριο, εφόσον είναι *Haemophilus influenzae*, θα αναπτυχθεί μόνο γύρω από το ΧV δισκίο, γιατί έχει ανάγκη και τους δύο παράγοντες.

1.23. Δοκιμασία εξοιδήσεως του ελύτρου

1. Γενικά

Ο *Streptococcus Pneumoniae*, η *Neisseriae meningitidis* και ο *Haemophilus influenzae* διακρίνονται σε ορολογικούς τύπους με βάση την αντιγονική σύσταση του ελύτρου. Η ορολογική τυποποίηση γίνεται με τη δοκιμασία εξοιδήσεως του ελύτρου με τους ειδικούς αντιορούς.

Όταν αναμειχθεί εναιώρημα κυτάρων ενός ελυτροφόρου στελέχους με τον ειδικό αντιορό (τον ορό που περιέχει αντισώματα εναντίον του ελύτρου του συγκεκριμένου στελέχους), τα αντισώματα ενώνονται με το έλυτρο και σχηματίζουν ίζημα στην περιφέρεια των κυτάρων.

Κατά τη μικροσκοπική εξέταση φαίνεται ότι τα κύτταρα περιβάλλονται από μια στεφάνη η οποία διαχωρίζεται πλήρως από το σώμα του βακτηρίου. Αυτό οφείλεται στη διαφορετική διαθλαστικότητα που έχει το ίζημα σε σχέση με το εναιώρημα των κυτάρων. Στην πραγματικότητα δεν πρόκειται για εξοίδηση του ελύτρου, αλλά για ίζημα που σχηματίζεται στην περιφέρεια του κυττάρου από την ένωση του ελύτρου με τα ειδικά αντισώματα.

II. Μέθοδος

- Παρασκευάζουμε εναιώρημα μιας αποικίας του στελέχους του βακτηρίου σε μια σταγόνα φυσιολογικού ορού πάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα και την αφήνουμε να στεγνώσει.
- Με κρίκο που έχει οπή βάζουμε μια σταγόνα υδατικού διαλύματος με κυανό του μεθυλενίου 1% σε μια καλυπτρίδα.
- Στη συνέχεια τοποθετούμε μια σταγόνα ειδικού αντιορού στην αντικειμενοφόρο πλάκα που έχει το εναιώρημα του βακτηρίου.
- Τον αντιορό που μένει στον κρίκο τον αναμειγνύουμε με τη σταγόνα του κυανού του μεθυλενίου πάνω στην καλυπτρίδα και μετά με τον αντιορό που είναι στην πλάκα.
- Καλύπτουμε το παρασκεύασμα με την καλυπτρίδα που έχει το κυανό του μεθυλενίου, βάζουμε κεδρέλαιο και μικροσκοπούμε.
- Αν η αντίδραση είναι θετική, δηλαδή τα αντισώματα είναι ειδικά για τα αντιγόνα του ελύτρου, τα κύτταρα του βακτηρίου περιβάλλονται από μια στεφάνη η οποία διαχωρίζεται πλήρως από το σώμα του βακτηρίου.