



دانشگاه اصفهان

دانشکده علوم و فناوری های زیستی، گروه زیست شناسی سلولی مولکولی و میکروبیولوژی،
آزمایشگاه میکروبیولوژی



آزمایشگاه باکتری شناسی ۱

1

انجام آزمون های بیوشیمیایی جهت شناسایی ائروکوک

استرپتوکوک های گروه D و انتروکوک ها

بسیاری از گونه های سابق استرپتوکوک های گروه D امروزه دوباره طبقه بندی شده اند و در جنس انتروکوک (Enterococcus) قرار گرفته اند به عنوان مثال استرپتوکوکوس فکالیس به انتروکوکوس فکالیس (Enterococcus faecalis) تغییر یافت. سایر گونه های باقی مانده عبارتند از استرپتوکوک بوویس (Streptococcus bovis) و استرپتوکوک اکوئینوس (Streptococcus equinus) گونه های انتروکوک ممکن است آلفا، بتا یا غیر همولیتیک باشند.

برای تشخیص انتروکوک ها از استرپتوکوکهای گروه D لانسفیلد از تست مقاومت به نمک ۶/۵٪ استفاده می شود. انتروکوک ها می توانند در محیط نوترینت براث حاوی ۶/۵٪ نمک کدورت ایجاد کنند. همچنین انتروکوکها PYR مثبت وهیدرولیز بایل- اسکولین مثبت هستند

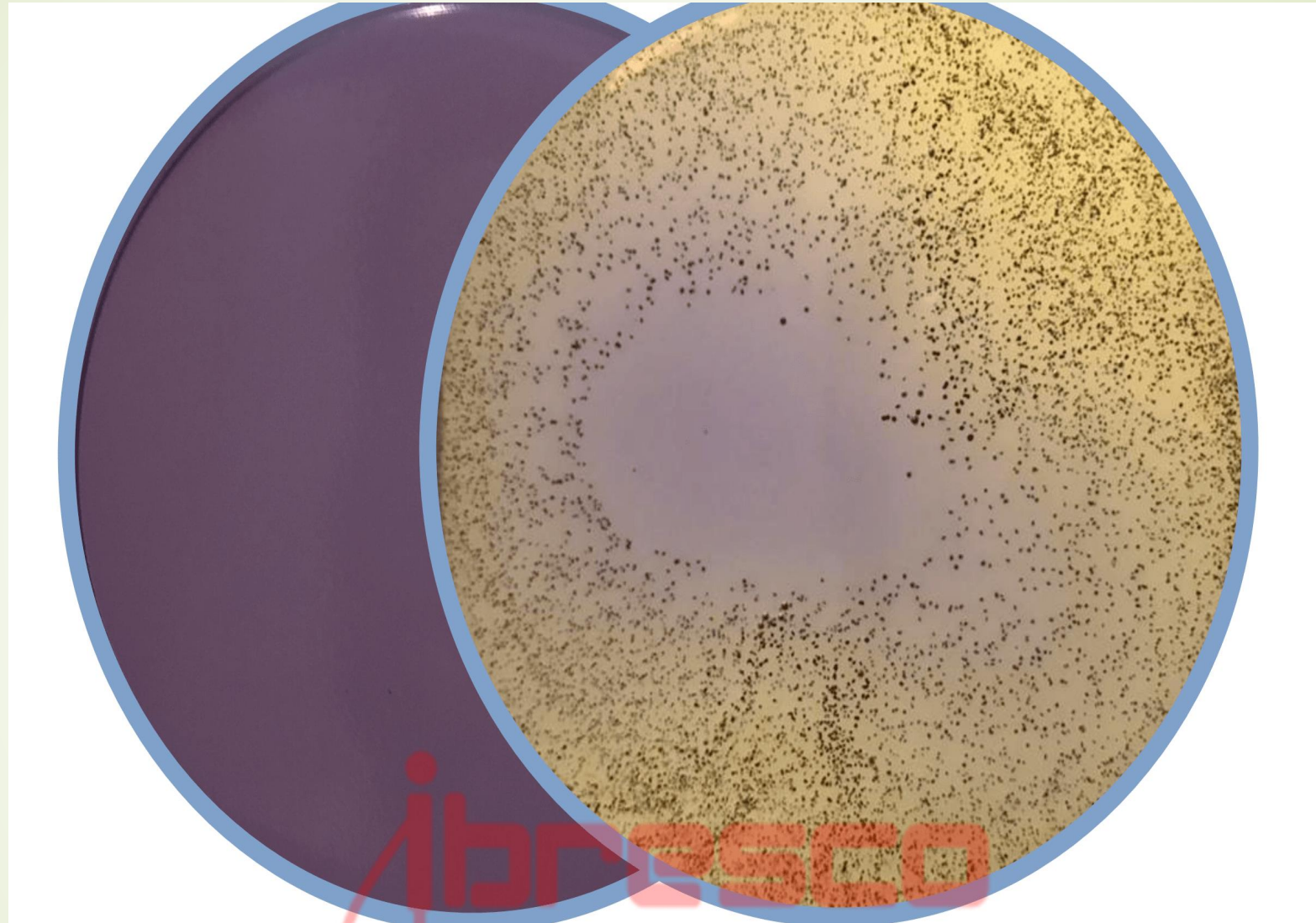
KF streptococcus Agar

این محیط برای بازیابی بهتر و شمارش استرپتوکوک های مدفوعی در آب های سطحی به کار می رود.

در این محیط سدیم آزاید عامل انتخابی مالتوز و لاکتوز منابع کربنی و بروموکروزول ارغوانی به عنوان اندیکاتور به کار رفته است.

همچنین در این محیط یک اندیکاتور ردوکس به نام ۲ و ۳ و ۵ تری فنیل تترازولیوم کلراید (TTC) به صورت محلول ۱ درصد به کار رفته است. این ماده در حالت اکسید بی رنگ است اما توسط سلولهای میکروبی فعال از نظر رشد به حالت احیا در آمده و در نتیجه با تبدیل شدن به فورمازان (formazan) به رنگ قرمز در می آید زمانی که TTC احیا شود قادر نیست توسط اکسیژن هوا دوباره اکسید شود.

انتروکوک ها در این محیط به رنگ صورتی تا قرمز در می آیند.



تهیه کننده: سهیلا عباسی

Introduction

- Evolved from intestinal commensal to 2nd most common nosocomial pathogen.
- Common species
 - *Enterococcus faecalis*
 - *Enterococcus faecium*
 - *E gallinarum*
 - *E casseliflavus*
 - *E durans*
 - *E avium*
 - *E hirae*

Enterococcus

- Gram positive cocci, non motile, non sporing
- Catalase Negative
- Previously classified as group D streptococci
- Natural inhabitants of GIT
- Distinct features
 - Ability to grow at 10°C and 45°C
 - Ability to grow in 6.5%NaCl
 - Ability to grow at 9.6pH
 - Ability to hydrolyze esculin in 40% bile
 - Ability to process pyrrolidonyl arylamidase (PYR)

Classification (based on phenotypic characters in clinical isolates)

Group 1	Group 3	Group 5
<i>E. avium</i> <i>E. gilvus</i> <i>E. malodartus</i> <i>E. pallens</i> <i>E. pseudoavium</i> <i>E. raffinosus</i> <i>E. sacchrolyticus</i>	<i>E. dispar</i> <i>E. durans</i> <i>E. hirae</i> <i>E. ratti</i> <i>E. villorum</i>	<i>E. columbae</i> <i>E. canis</i> <i>E. moraviensis</i>
Group 2	Group 4	
<i>E. fecalis</i> <i>E. fecium</i> <i>E. casseliflavus</i> <i>E. gallinarum</i> <i>E. mundtii</i> <i>E. hemoperoxidus</i> Enterococcus sp	<i>E. asini</i> <i>E. cecorum</i> <i>E. sulfures</i> <i>E. phoeniculicola</i> Enterococcus sp	

Koneman textbook of diagnostic microbiology

Clinical relevance

- Complicated UTI
- Bacteremia
- Endocarditis
- Intra abdominal & pelvic infection
- Wound and soft tissue infection
- Neonatal sepsis
- Meningitis (rarely)



Introduction - *Enterococci*

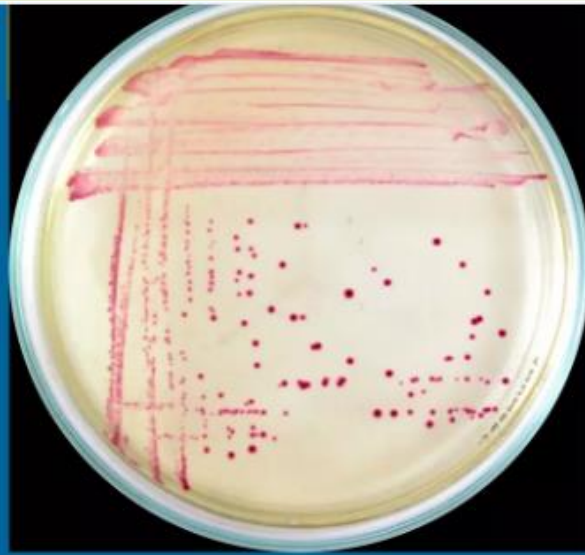
- The 3rd cause of nosocomial infections.
- Involved in over 800,000 infections per year in the USA in 2004
- Gram(+), Cocci.
- Survive in 6.5% NaCl and at a pH of 9.6
- Most capable of growing from 10 ° to 45 ° C range;
- Survive at 60° C for 30 minutes
- There are 23 species of *Enterococci*.
- Two that account for the majority of human infections are: *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*.
- Part of the normal bowel flora.



Resistance potential of *Enterococci*

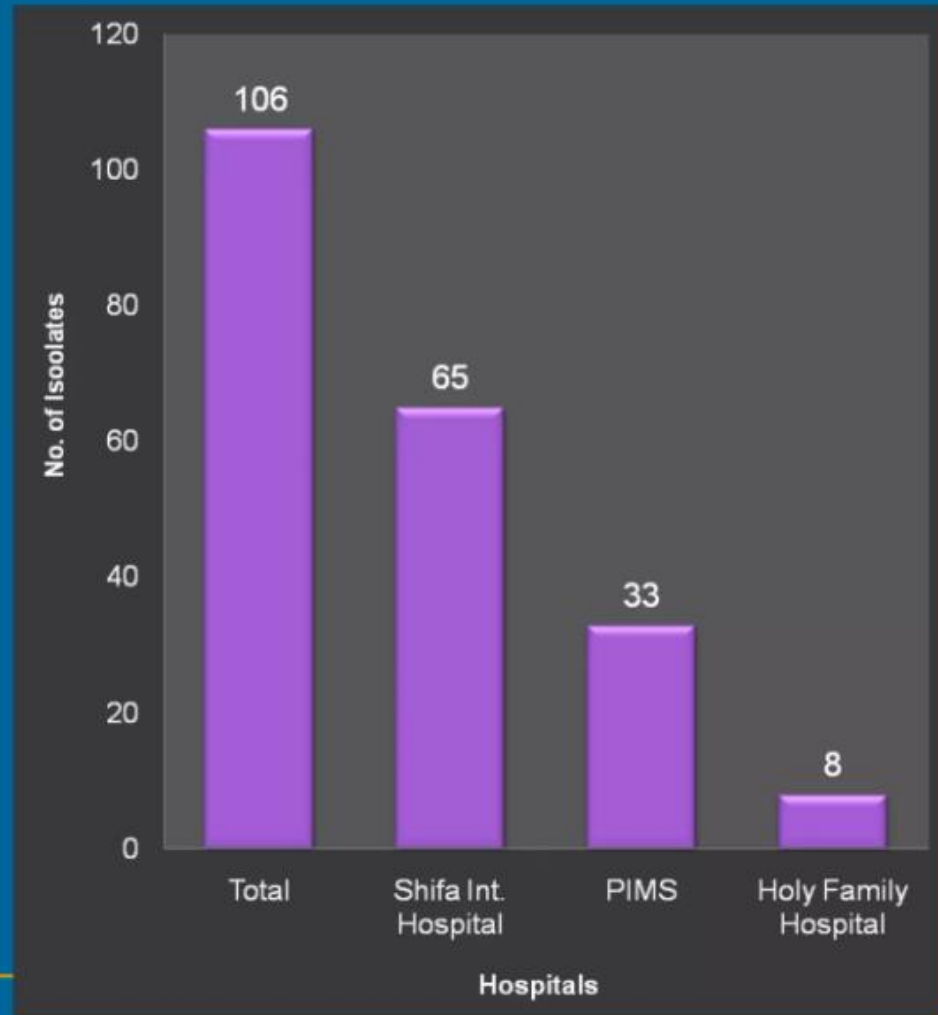
11

- Innately resistant to most antibiotics including:
 - Cephalosporins, Penicillins, Clindamycin and Trimethoprim
- Can also acquire, accumulate and transfer genetic elements e.g. (plasmids, and transposons) using conjugation
- Acquire Resistance
 - Macrolides
 - Tetracycline
 - Lincosamides
 - Chloramphenicol
 - Aminoglycosides
 - Penicillin (without beta-lactamase)
 - Penicillin (with beta-lactamase)
 - Vancomycin
 - Quinolones



Colonies of *Enterococci* on Chromocult® Enterococci agar.

Identification of *Enterococci*



Distribution of *Enterococci* isolated from different hospitals.²¹

Introduction - *Nosocomial Infections*

- Nosocomial infections pose a continuing challenge
- Defined as an infection which develops 48 hours after hospital admission or within 48 hours
- 1.7 million infections and 99,000 deaths annually
- Organisms of current concern
 - Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*,
 - Glycopeptide-intermediate and resistant *S aureus*,
 - Vancomycin-resistant *enterococci*, and
 - Multidrugresistant Gram-negative bacteria

The Natural habitat

Normal components of the flora of:

- Intestinal tract
- Oral cavity
- Vaginal canal of humans and animals

Morphology

- ❑ **Gram-positive cocci** (0.5 and 1.25 micrometers in diameter)
- ❑ **usually occur in pairs or short chains**
- ❑ **Non-capsulate**
- ❑ **Non-motile.**

General properties:

- ❑ production of gas from glucose (most enterococci are negative)
- ❑ Have ability to grow at both 45°C and 10°C temperatures).
- ❑ Can grow on media containing Bile aesculin,

Medically Important species

- At least 12 different species have been associated with various illnesses
- *Enterococcus faecalis* and *E. faecium* — have emerged as a major cause of nosocomial infections

Culture & characteristics:

□ Enterococci are aerobic organisms capable of growing over a wide temperature range, 10–45 °C

□ On blood agar, Enterococci are mainly nonhaemolytic but some strains show alpha or beta-haemolysis

ON MacConkey & CLED

Ferments lactose, producing small dark-red magenta colonies on MacConkey agar

small yellow colonies on CLED (cysteine lactose electrolyte-deficient) agar

- ❑ *Enterococcus* species are also able to grow in the presence of 6.5% sodium chloride and 40% bile.
- ❑ When grown on media containing aesculin, enterococci hydrolyze the aesculin, producing black colonies.



تهیه کننده: سهیلا عباسی

Virulence Factor

- ❑ Polysaccharides on the surface of enterococci represent an effective way to prevent phagocytosis.
- ❑ Secreted factors (cytolysin/hemolysin, gelatinase and serine protease)
- ❑ cell surface-located proteins or adhesins (Esp) and the adhesin of collagen Adhesins (Acm and SagA)

Pathogeicity:



Enterococcus faecalis, causing about 95% of enterococcal infections including infections of the

- Urinary tract infection**
- Biliary tract, ulcers (e.g. bed sores)**
- Wounds (particularly abdominal)**
- Occasionally endocarditis or meningitis**

Laboratory diagnosis

- specimens:
- Collection of Spacimen
- Direct Exam
- Culture
- Identificaion
- Serology
- Molecular characterization

Biochemical Tests

- Catalase* negative
- Ferment lactose (also mannitol and other sugars)
- Hydrolyze aesculin
- Reduce litmus milk

Biochemical identification of species



Tubes showing the result of Sugar fermentation by *Enterococci*

	<i>grow on 0.4% telluride</i>	reduce tetrazolium to formazan	sorbitol	glycerol,	D-tagatose	<i>L-arabinose</i>	melibiose
<i>E. faecalis</i>	yes	Yes	Acid	Acid	Acid	No Acid	No Acid
<i>E. faecium</i>	No	No	No Acid	No Acid	No Acid	Acid	Acid

Presumptive identification of Streptococci & Enterococci

Organism	Hemolysis	Bacitracin	SXT	Camp	Hippurate	Lap	PYR	Bile esculin	6.5%NaCl	Optochin	Bile solubility
Group A streptococci	β	S	R	-	-	+	+	-	-	R	-
Group B streptococci	β , none	R	R	+	+	+	-	-	V	R	-
Group C,G & F streptococci	β	V	S	-	-	+	-	-	-	R	-
Group D Enterococci	α , β , none	R	R	-	V	+	+	+	+	R	-
Other Group D streptococci	α , none	R	S	-	-	+	-	+	-	R	-
Viridans streptococci	α , none	V	S	-	V	+	-	V	-	R	-
Pneumococci	α	V	S	-	-	+	-	-	-	S	+

Species	6.5%NaCl	10°C	45°C	LAP	PYR	ADH	HIP	GLUCOSE	MANNITOL	SORBOSE	ARABINOS E	SORBITOL	RAFFINOSE	SUCROSE	PYRUVATE	MGP
E.fecalis	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-
E.fecium	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	V	V	+	-	-
E.casseliflavus	+	NA	+	+	+	+	-	+	+	-	+	V	+	+	V	+
E.gallinarum	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+
E.durans	+	NA	+	+	+	+	V	+	-	-	-	-	-	-	-	-
E.hirae	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-
E.avium	+	NA	+	+	+	-	V	+	+	+	+	+	-	+	+	V

LAP-leucine aminopeptidase, PYR- pyrrolidonyl arylamidase, ADH- arginine dihydrolase, HIP – hippurate, MGP- methyl α -D-glucopyranoside

تهیه کننده: سهیلا عباسی

Lancefield Grouping

- ❑ Enterococci possess Lancefield Group D antigen (as also some streptococci).
- ❑ The Group D antigen of enterococci is unlike that of other Lancefield groups.
- ❑ It is not extracted by traditional acid extraction techniques. Enzyme techniques based on Maxted's enzyme are required.

THANK YOU FOR ATTENTION



تهیه کننده: سهیلا عباسی