



ΒΑΚΤΗΡΙΟΛΟΓΙΑ

Γεωργίου Οδ. Δημητρακόπουλου
ΚΑΘΗΓΗΤΟΥ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ ΠΑΝΕΠ. ΠΑΤΡΩΝ





1954

ΙΔΡΥΜΑ ΕΥΓΕΝΙΔΟΥ
ΧΡΥΣΟΥΝ ΜΕΤΑΛΛΙΟΝ ΑΚΑΔΗΜΙΑΣ ΑΘΗΝΩΝ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ ΙΔΡΥΜΑΤΟΣ ΕΥΓΕΝΙΔΟΥ

Ο Ευγένιος Ευγενίδης, ο ιδρυτής και χορηγός του «Ιδρύματος Ευγενίδου», πολύ νωρίς προέβλεψε και σχημάτισε την πεποίθηση ότι η άρτια κατάρτιση των τεχνικών μας, σε συνδυασμό με την εθνική αγωγή, θα ήταν αναγκαίος και αποφασιστικός παράγων για την πρόοδο του Έθνους μας.

Την πεποίθησή του αυτή ο Ευγενίδης εκδήλωσε με τη γενναιόφρονα πράξη ευεργεσίας, να κληροδοτήσει σεβαστό ποσό για τη σύσταση Ιδρύματος, που θα είχε ως σκοπό να συμβάλλει στην τεχνική εκπαίδευση των νέων της Ελλάδας.

Έτσι, το Φεβρουάριο του 1956 συστήθηκε το «Ίδρυμα Ευγενίδου», του οποίου τη διοίκηση ανέλαβε η αδελφή του Μαρ. Σίμου, σύμφωνα με την επιθυμία του διαθέτη. Το έργο του Ιδρύματος συνεχίζει από το 1981 ο κ. Νικόλαος Βερνίκος - Ευγενίδης.

Από το 1956 έως σήμερα η συμβολή του Ιδρύματος στην τεχνική εκπαίδευση πραγματοποιείται με διάφορες δραστηριότητες. Όμως απ' αυτές η σημαντικότερη, που κρίθηκε από την αρχή ως πρώτης ανάγκης, είναι η έκδοση βιβλίων για τους μαθητές των Τεχνικών και Επαγγελματικών Σχολών και Λυκείων.

Μέχρι σήμερα, με τη συνεργασία με τα Υπουργεία Εθνικής Παιδείας και Θρησκευμάτων και Εμπορικής Ναυτιλίας, εκδόθηκαν εκατοντάδες τόμοι βιβλίων, που έχουν διατεθεί σε πολλά εκατομμύρια αντίτυπα. Τα βιβλία αυτά κάλυπταν ή καλύπτουν ανάγκες των Κατωτέρων και Μέσων Τεχνικών Σχολών του Υπ. Παιδείας, των Σχολών του Οργανισμού Απασχολήσεως Εργατικού Δυναμικού (ΟΑΕΔ), των Τεχνικών και Επαγγελματικών Λυκείων, των Τεχνικών Επαγγελματικών Σχολών και των Δημοσίων Σχολών Εμπορικού Ναυτικού.

Μοναδική φροντίδα του Ιδρύματος σ' αυτή την εκδοτική του προσπάθεια ήταν και είναι η συγγραφή και έκδοση βιβλίων ποιότητας, από άποψη όχι μόνον επιστημονική, παιδαγωγική και γλωσσική, αλλά και ως προς την εμφάνιση, ώστε το βιβλίο να αγαπηθεί από τους μαθητές.

Για την επιστημονική και παιδαγωγική αρτιότητα των βιβλίων τα κείμενα υποβάλλονται σε πολλές επεξεργασίες και βελτιώνονται πριν από κάθε νέα έκδοση συμπληρούμενα καταλλήλως.

Ιδιαίτερη σημασία απέδωσε το Ίδρυμα από την αρχή στη γλωσσική διατύπωση των βιβλίων, γιατί πιστεύει ότι και τα τεχνικά βιβλία, όταν είναι γραμμένα σε γλώσσα σωστή και ομοίμορφη αλλά και κατάλληλη για τη στάθμη των μαθητών, μπορούν να συμβάλλουν στη γλωσσική κατάρτιση των μαθητών.

Έτσι, με απόφαση που ίσχυσε ήδη από το 1956, όλα τα βιβλία της Βιβλιοθήκης του Τεχνίτη, δηλαδή τα βιβλία για τις τότε Κατώτερες Τεχνικές Σχολές, όπως αργότερα και για τις Σχολές του ΟΑΕΔ, ήταν γραμμένα σε γλώσσα δημοτική, με βάση τη γραμματική του Τριανταφυλλίδη, ενώ όλα τα άλλα βιβλία ήταν γραμμένα στην απλή καθαρεύουσα. Σήμερα ακολουθείται η γραμματική που διδάσκεται στα σχολεία της δευτεροβάθμιας εκπαίδευσης. Η γλωσσική επεξεργασία των βιβλίων ανατίθε-

ται σε φιλόλογους του Ιδρύματος και έτσι εξασφαλίζεται η ενιαία σύνταξη και ορολογία κάθε κατηγορίας βιβλίων.

Η ποιότητα του χαρτιού, το είδος των τυπογραφικών στοιχείων, τα σωστά σχήματα, η καλαίσθητη σελιδοποίηση, το εξώφυλλο και το μέγεθος του βιβλίου, περιλαμβάνονται και αυτά στις φροντίδες του Ιδρύματος και συμβάλλουν στη σωστή «λειτουργικότητα» των βιβλίων.

Το Ίδρυμα θεώρησε ότι είναι υποχρέωσή του, σύμφωνα με το πνεύμα του ιδρυτή του, να θέσει στη διάθεση του Κράτους όλη αυτή την πείρα του των 20 ετών, αναλαμβάνοντας το 1978 και την έκδοση των βιβλίων για τις νέες Τεχνικές Επαγγελματικές Σχολές και τα Τεχνικά και Επαγγελματικά Λύκεια, σύμφωνα πάντοτε με τα εγκεκριμένα Αναλυτικά Προγράμματα του Π.Ι. και του ΥΠΕΠΘ.

ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΕΚΔΟΣΕΩΝ ΙΔΡΥΜΑΤΟΣ ΕΥΓΕΝΙΔΟΥ

Μιχαήλ Αγγελόπουλος, ομ. καθηγητής ΕΜΠ, Πρόεδρος.

Αλέξανδρος Σταυρόπουλος, ομ. καθηγητής Πανεπιστημίου Πειραιώς, Αντιπρόεδρος.

Ιωάννης Τεγόπουλος, καθηγητής ΕΜΠ.

Σταμάτης Παλαιοκρασάς, Ηλεκτρολόγος Μηχανικός, Σύμβουλος Παιδαγωγικού Ινστιτούτου.

Χρήστος Σιγάλας, Δ/ντής Σπ. Δευτ. Εκπαιδύσεως ΥΠΕΠΘ.

Σύμβουλος εκδόσεων του Ιδρύματος **Κ. Α. Μανάφης**, καθηγ. Φιλ. Σχολής Παν/μίου Αθηνών.
Γραμματέας της Επιτροπής, **Γεώργιος Ανδρεάκος**.

Διατελέσαντα μέλη ή σύμβουλοι της Επιτροπής

Γεώργιος Κακριδής (1955-1959) Καθηγητής ΕΜΠ, **Άγγελος Καλογεράς** (1957-1970) Καθηγητής ΕΜΠ, **Δημήτριος Νιάνιαν** (1957-1965) Καθηγητής ΕΜΠ, **Μιχαήλ Σπετσιέρης** (1956-1959), **Νικόλαος Βασιώτης** (1960-1967), **Θεόδωρος Κουζέλης** (1968-1976) Μηχ. Ηλ. ΕΜΠ, **Παναγιώτης Χατζηγιάννου** (1977-1982) Μηχ. Ηλ. ΕΜΠ, **Αλέξανδρος Ι. Παππάς** (1955-1983) Καθηγητής ΕΜΠ, **Χρυσόστομος Καβουνίδης** (1955-1984) Μηχ. Ηλ. ΕΜΠ, **Γεώργιος Ρούσσος** (1970-1987) Χημ.-Μηχ. ΕΜΠ, **Δρ. Θεοδόσιος Παπαθεοδοσίου** (1982-1984) Δ/ντής Σπουδών Δευτεροβάθμιας Εκπαιδύσεως ΥΠΕΠΘ, **Ιγνάτιος Χατζηγευστρατίου** (1985-1988) Μηχανολόγος, Δ/ντής Σπουδών Δευτεροβάθμιας Εκπαιδύσεως ΥΠΕΠΘ, **Γεώργιος Σταματίου** (1988-1990) Ηλεκτρολόγος ΕΜΠ, Δ/ντής Σπουδών Δευτεροβάθμιας Εκπαιδύσεως ΥΠΕΠΘ, **Σωτ. Γκλαβάς** (1989-1993) Φιλολόγος, Δ/ντής Σπουδών Δευτεροβάθμιας Εκπαιδύσεως ΥΠΕΠΘ.



ΒΑΣΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΒΑΚΤΗΡΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΓΕΩΡΓΙΟΥ ΟΔ. ΔΗΜΗΤΡΑΚΟΠΟΥΛΟΥ
ΚΑΘΗΓΗΤΗ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΠΑΝ/ΜΙΟΥ ΠΑΤΡΩΝ



ΑΘΗΝΑ
1997



Α' ΕΚΔΟΣΗ 1980



ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Το βιβλίο αυτό συμπληρώνει το βιβλίο της Μικροβιολογίας που διδάσκεται στη Γ' τάξη του Επαγγελματικού Λυκείου. Έχει γραφεί με βάση το αναλυτικό πρόγραμμα που έχει εκπονήσει το ΚΕΜΕ και περιλαμβάνει τρία κεφάλαια. Στο πρώτο κεφάλαιο αναφέρονται η σύνθεση και η παρασκευή ορισμένων βασικών θρεπτικών υλικών τα οποία χρησιμοποιούνται για την καλλιέργεια και την απομόνωση των βακτηρίων. Στο δεύτερο κεφάλαιο περιγράφονται οι συνηθέστερες μέθοδοι τυποποιήσεως των βακτηρίων και ορισμένες τεχνικές χρήσιμες στην καθημερινή πράξη του κλινικού διαγνωστικού εργαστηρίου. Στο κεφάλαιο αυτό αναφέρονται επίσης πολλά θρεπτικά υλικά τα οποία έχουν σχέση με τις διάφορες μεθόδους τυποποιήσεως. Τέλος το τρίτο κεφάλαιο περιλαμβάνει τις μεθόδους με τις οποίες χρωματίζονται τα κύτταρα, οι σπόροι, οι βλεφαρίδες και το έλυτρο των βακτηρίων.

Το περιεχόμενο αυτού του βιβλίου αποτελεί τήν βάση των εργαστηριακών ασκήσεων των μαθητών και ιδιαίτερα τα κεφάλαια των μεθόδων τυποποιήσεως και χρώσεως των βακτηρίων. Έχει καταβληθεί προσπάθεια να δοθούν με μεγάλη λεπτομέρεια τα στάδια της κάθε μεθόδου, η αρχή στην οποία στηρίζεται και τα αντιδραστήρια και τα θρεπτικά υλικά που χρειάζονται.

Με την καθοδήγηση των διδασκόντων οι μαθητές θα μπορέσουν να αποκτήσουν την εμπειρία της σωστής εκτελέσεως και ορθής ερμηνείας των αποτελεσμάτων των μεθόδων που περιγράφονται. Η σωστή εκτέλεση των μεθόδων τυποποιήσεως και χρώσεως των βακτηρίων και η ορθή ερμηνεία των αποτελεσμάτων αποτελούν απαραίτητα εφόδια για όσους πρόκειται να εργασθούν στο κλινικό διαγνωστικό εργαστήριο και να έχουν την ευθύνη να διαγνώσουν το αίτιο μιας μικροβιακής νόσου.

Το βιβλίο αυτό έχει γραφεί για να διδαχθεί σε συνδυασμό με το βιβλίο της Μικροβιολογίας της Γ' τάξεως. Το βιβλίο της Μικροβιολογίας περιγράφει τις χαρακτηριστικές ιδιότητες των παθογόνων βακτηρίων, ενώ στο βιβλίο αυτό ο μαθητής θα βρει τις μεθόδους που θα του επιτρέψουν να διαπιστώσει αυτές τις ιδιότητες.

Ελπίζω η ύλη του βιβλίου να βοηθήσει το μαθητή και στην εργασία του στο κλινικό διαγνωστικό εργαστήριο.

Τέλος, ευχαριστώ θερμά τη δεσποινίδα Νικολέττα Γ. Μπέλεση για τη συμβολή της σε όλες τις φάσεις της συγγραφής αυτού του βιβλίου.

Ο συγγραφέας

Πάτρα, Νοέμβριος 1979

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ

ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΛΙΚΑ

1.1 Γενικά.

Τα κύρια συστατικά των θρεπτικών υλικών είναι οι πεπτόνες και τα εκχυλίσματα (extracts) και τα εγχύματα (infusions) του κρέατος και διαφόρων άλλων ιστών.

Πολλά υλικά είναι δυνατόν να περιέχουν επίσης εκχυλίσματα ζυμομυκήτων, αίμα, ορό αίματος, ασκιτικό υγρό, λέκιθο του αυγού, σάκχαρα, διάφορα άλατα, διάφορες ουσίες, οι οποίες επιτρέπουν την ανάπτυξη ενός είδους βακτηρίου, ενώ αναστέλλουν την ανάπτυξη άλλων ειδών βακτηρίων, δείκτες του pH, αντιβιοτικές ουσίες και άλλες ουσίες όπως π.χ. DNA, αμινοξέα, βιταμίνες, αλκοόλες, γλυκοσίδες κλη.

Πεπτόνες: Πεπτόνες καλούνται τα προϊόντα της διασπάσεως λευκωματούχων ουσιών φυτικής ή ζωϊκής προελεύσεως. Η διάσπαση των λευκωματούχων ουσιών σε πεπτόνες γίνεται με αραιά οξέα ή αλκάλια και με τα πεπτικά ένζυμα. Οι πεπτόνες είναι άμορφες ουσίες, ευδιάλυτες στο νερό και δεν πήζουν όταν θερμανθούν. Η σύσταση της κάθε πεπτόνης διαφέρει ανάλογα με την λευκωματούχο ουσία από την οποία προέρχεται και ανάλογα με την μέθοδο παραλαβής. Σήμερα φέρονται στο εμπόριο διάφορες πεπτόνες, όπως π.χ. η κοινή πεπτόνη, η τρυπτόζη, η τρυπτόνη, η πρωτεόζη κλπ.

Εκχυλίσματα και εγχύματα κρέατος και άλλων ιστών.

Εκχύλισμα κρέατος ή άλλων ιστών είναι το προϊόν που λαμβάνεται από τον βρασμό του κρέατος ή των άλλων ιστών σε νερό και την συμπύκνωση του ζωμού σε ελαττωμένη πίεση. Πριν από την συμπύκνωση απομακρύνονται από το ζωμό με διήθηση το λίπος και το λεύκωμα που έχει πήξει.

Έγχυμα είναι το προϊόν που λαμβάνεται μετά την έγχυση βρασμένου νερού στο κρέας ή τους άλλους ιστούς. Το προϊόν της εγχύσεως περιέχει συστατικά τα οποία είναι διαλυτά στο νερό.

Στο κεφάλαιο αυτό θα περιγραφεί η σύνθεση ορισμένων θρεπτικών υλικών τα οποία χρησιμοποιούνται πολύ συχνά στο κλινικό διαγνωστικό εργαστήριο. Η σύνθεση ορισμένων άλλων θρεπτικών υλικών αναφέρεται στο κεφάλαιο που περιγράφονται οι δοκιμασίες για την τυποποίηση των βακτηρίων.

1.2 Αιματούχο άγαρ.

Σαν βάση του αιματούχου άγαρ χρησιμοποιείται το υλικό Heart Infusion άγαρ

και προστίθεται αίμα κουνελιού, ίππου ή ανθρώπου σε αναλογία 5%. Το υλικό Heart Infusion agar έχει την ακόλουθη σύνθεση:

Καρδιά βοδιού, έγχυμα από	375 g
Τρυπτόζη	10 g
NaCl	5 g
Άγαρ	15 g
Απεσταγμένο νερό	1000 ml

$$\text{pH} = 6,8$$

Το υλικό αποστειρώνεται στους 121°C επί 15 λεπτά και μετά τοποθετείται σε υδατόλουτρο που έχει θερμοκρασία 45 - 50°C. Όταν η θερμοκρασία του υλικού κατεβεί στους 45 - 50°C προστίθεται το αίμα με άσηπτες συνθήκες και η φιάλη ανακινείται ελαφρά για την ανάμιξη της βάσεως με το αίμα.

1.3 Αλκαλικό πεπτονόχο νερό.

Πεπτόνη	10 g
NaCl	5 g
Απεσταγμένο νερό	1000 ml

Το pH του υλικού ρυθμίζεται στο 8,4 - 8,5 με διάλυμα 1N NaOH και αποστειρώνεται στους 121°C επί 15 λεπτά.

1.4 Αλκαλικός Τελλουριώδης - Ταυροχολικός ζυμός.

Καζεΐνη κατεργασμένη με παγκρεατικά ένζυμα	10 g
NaCl	10 g
Ταυροχολικό Νάτριο	5 g
Ανθρακικό Νάτριο	1 g
Απεσταγμένο νερό	1000 ml

$$\text{pH} = 9,2$$

Το υλικό αποστειρώνεται στους 121°C επί 15 λεπτά και μετά τοποθετείται σε υδατόλουτρο που έχει θερμοκρασία 45 - 50°C. Όταν η θερμοκρασία του υλικού κατεβεί στους 45 - 50°C προστίθεται διάλυμα τελλουριώδους καλίου, το οποίο έχει αποστειρωθεί με διήθηση, σε τελική συγκέντρωση 1:200.000.

1.5 Ζυμός με Σεληνιώδες νάτριο.

Πεπτόνη	5 g
Λακτόζη	4 g
Na ₂ HPO ₄	10 g
Σεληνιώδες νάτριο	4 g
Απεσταγμένο νερό	1000 ml

$$\text{pH} = 7,0$$

Το υλικό δεν χρειάζεται αποστείρωση στο αυτόκλειστο. Αποστειρώνεται σε υδατόλουτρο 100°C επί 10 λεπτά.

1.6 Ζυμός με Τετραθειονικό νάτριο.

Πρωτεόζη	5 g
Χολικά άλατα	1 g
Ανθρακικό ασβέστιο	10 g
Θειοθειικό νάτριο	30 g
Απεσταγμένο νερό	1000 ml

Τα συστατικά διαλύονται στο απεσταγμένο νερό μετά από θέρμανση στους 100°C. Το υλικό τοποθετείται σε υδατόλουτρο που έχει θερμοκρασία 40°C. Όταν η θερμοκρασία του υλικού κατεβεί στους 40°C προστίθενται 20 ml διαλύματος ιωδίου. Το διάλυμα ιωδίου παρασκευάζεται από την προσθήκη 6 g ιωδίου και 5 g ιωδιούχου καλίου σε 20 ml απεσταγμένο νερό. Μετά την προσθήκη του διαλύματος ιωδίου το υλικό δεν θερμαίνεται. Όταν προστεθεί το διάλυμα ιωδίου το υλικό πρέπει να χρησιμοποιηθεί την ίδια ημέρα.

1.7 Θρεπτικό άγαρ.

Εκχύλισμα κρέατος	3 g
Πεπτόνη	5 g
Άγαρ	15 g
Απεσταγμένο νερό	1000 ml

pH = 6,8

Το υλικό αποστειρώνεται στους 121°C επί 15 λεπτά.

1.8 Θρεπτικός ζυμός.

Εκχύλισμα κρέατος	3 g
Πεπτόνη	5 g
Απεσταγμένο νερό	1000 ml

pH = 6,8

Το υλικό αποστειρώνεται στους 121°C επί 15 λεπτά.

1.9 Σοκολατόχροο άγαρ.

Το υλικό έχει την ίδια σύνθεση με το αιματούχο άγαρ. Μετά την προσθήκη του αίματος το υλικό τοποθετείται σε υδατόλουτρο 70 - 80°C για 15 λεπτά ή μέχρι το χρώμα να γίνει σοκολατί - καφέ.

1.10 Υλικό με διπτανθρακικό νάτριο.

Σαν βάση του υλικού με διπτανθρακικό νάτριο χρησιμοποιείται το υλικό Brain -

Heart Infusion άγαρ. Το υλικό Brain Heart Infusion άγαρ έχει την ακόλουθη σύνθεση:

Εγκέφαλος μικρής αγελάδας, έγχυμα από	200 g
Καρδιά βοδιού, έγχυμα από	250 g
Πρωτεόζη	10 g
Γλυκόζη	2 g
NaCl	5 g
Na ₂ HPO ₄	2,5 g
Άγαρ	15 g
Απεσταγμένο νερό	1000 ml

pH = 7,4

Το υλικό αποστειρώνεται στους 121°C επί 15 λεπτά και μετά τοποθετείται σε υδατόλουτρο που έχει θερμοκρασία 45 - 50°C. Όταν η θερμοκρασία του υλικού κατεβεί στους 45 - 50°C προστίθενται 10 ml υδατικού διαλύματος 7% διττανθρακικού νατρίου, το οποίο έχει αποστειρωθεί με διήθηση, στα 90 ml του υλικού της βάσεως. Η φιάλη ανακινείται ελαφρά για την ανάμιξη της βάσεως με το διττανθρακικό νάτριο.

1.11 Υλικό Bordet - Gengou.

Πατάτες, έγχυμα σε μορφή σκόνης	4,5 g
Πρωτεόζη	10 g
NaCl	5,5 g
Άγαρ	15 g

pH = 6,7

Τα συστατικά διαλύονται σε 1000 ml απεσταγμένο νερό που περιέχει 1% γλυκερόλη. Το υλικό αποστειρώνεται στους 121°C επί 15 λεπτά και μετά τοποθετείται σε υδατόλουτρο που έχει θερμοκρασία 45 - 50°C. Όταν η θερμοκρασία του υλικού κατεβεί στους 45 - 50°C προστίθενται 150 - 200 ml αίματος προβάτου ή αλόγου και 800 μονάδες πενικιλίνης. Η φιάλη ανακινείται ελαφρά για την ανάμιξη της βάσεως με το αίμα και την πενικιλίνη.

1.12 Υλικό Brilliant - Green άγαρ.

Πρωτεόζη	10 g
Εκχύλισμα κρέατος	5 g
Λακτόζη	10 g
Σουκρόζη	10 g
NaCl	3 g
K ₂ HPO ₄	2 g
Ερυθρό της φαινόλης	0,08 g
Στίλβον πράσινο (Brilliant Green)	12,5 mg
Άγαρ	12 g
Απεσταγμένο νερό	1000 ml

pH = 6,9

Το υλικό αποστειρώνεται στους 121°C επί 15 λεπτά.

1.13 Υλικό Deoxycholate Citrate άγαρ.

Εκχύλισμα κρέατος	5 g
Πεπτόνη	5 g
Λακτόζη	10 g
Κιτρικό νάτριο	6 g
Κιτρικός σίδηρος	1 g
Θειοθειικό νάτριο	5,4 g
Δεοξυχολικό νάτριο	5 g
Ουδέτερο ερυθρό	0,025 g
Άγαρ	15 g
Απεσταγμένο νερό	1000 ml

pH = 7,3

Τα συστατικά διαλύονται στο νερό μετά από θέρμανση στους 100°C. Το υλικό δεν αποστειρώνεται στο αυτόκλειστο.

1.14 Υλικό Hoyle.

Το υλικό Hoyle χρησιμοποιείται για την απομόνωση του *C. diphtheriae*.

Πεπτόνη	10 g
Εκχύλισμα κρέατος	10 g
NaCl	5 g
Άγαρ	15 g
Απεσταγμένο νερό	1000 ml

pH = 7,8

Το υλικό αποστειρώνεται στους 121°C επί 15 λεπτά και μετά τοποθετείται σε υδατόλουτρο που έχει θερμοκρασία 45 - 50 °C. Όταν η θερμοκρασία κατεβεί στους 45 - 50°C προστίθενται 50 ml αίματος αλόγου και 10 ml διαλύματος 4% τελλουριώδους καλίου. Η φιάλη ανακινείται ελαφρά για την ανάμιξη της βάσεως με το αίμα και το διάλυμα του τελλουριώδους καλίου.

1.15 Υλικό King-Ward και Raney A.

Το υλικό χρησιμεύει για την ανίχνευση της παραγωγής πυοκυανίνης από την *P. aeruginosa*.

Πεπτόνη	20 g
MgCl ₂	1,4 g
K ₃ SO ₄	10 g
Άγαρ	15 g
Γκυκερόλη	10 ml
Απεσταγμένο νερό	1000 ml

pH = 7,2

Το υλικό αποστειρώνεται στους 121°C επί 15 λεπτά.

1.16 Υλικό King-Ward και Raney B.

Το υλικό χρησιμοποιείται για την ανίχνευση της παραγωγής φθοροσεΐνης από την *P. aeruginosa*.

Καζεΐνη κατεργασμένη με παγκρεατικά ένζυμα	10 g
Ιστοί ζώου κατεργασμένοι με πεπτικά ένζυμα	10 g
K_2HPO_4	1,5 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1,5 g
Γλυκερόλη	10 ml
Άγαρ	15 g
Απεσταγμένο νερό	1000 ml

pH = 7,2

Το υλικό αποστειρώνεται στους 121°C επί 15 λεπτά.

1.17 Υλικό Loeffler.

Ορός αίματος ζώου (αλόγου, βοδιού ή προβάτου)	750 ml
Θρεπτικός ζωμός	250 ml
Γλυκόζη	2,5 g

Το υλικό φέρεται έτοιμο για χρήση στο εμπόριο και βρίσκεται σε λοξή θέση μέσα σε σωληνάκια. Παρασκευάζεται στο εργαστήριο αλλά η αποστείρωσή του γίνεται στους 75°C επί 2 ώρες κάθε ημέρα και για 3 διαδοχικά ημέρες. Κατά την αποστείρωση τα σωληνάκια τοποθετούνται σε λοξή θέση έτσι ώστε να γίνεται ταυτόχρονα η στερεοποίηση του υλικού σε λοξή θέση. Τα συστατικά του υλικού είναι δυνατόν να αποστειρωθούν χωριστά, δηλαδή ο θρεπτικός ζωμός με την γλυκόζη να αποστειρωθεί στους 121°C για 15 λεπτά και ο ορός του αίματος του ζώου να αποστειρωθεί με διήθηση. Στην περίπτωση αυτή η στερεοποίηση του υλικού σε λοξή θέση γίνεται στους 75°C επί 2 ώρες.

1.18 Υλικό Löwenstein - Jensen.

KH_2PO_4 άνυδρο	2,4 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,24 g
Κιτρικό Μαγνήσιο	0,6 g
Ασπαράγινη	3,6 g
Γλυκερόλη	12 ml
Πατατάλευρο	30 g
Ομογενοποιημένα αυγά (κρόκος + λευκό)	1000 ml
Πράσινο του μαλαχίτη	0,4 g
Απεσταγμένο νερό	628 ml

Το υλικό φέρεται έτοιμο για χρήση στο εμπόριο και βρίσκεται σε λοξή θέση μέσα σε σωληνάκια που κλείνουν με κοχλιωτό ή ελαστικό πώμα.

1.19 Υλικό Mac Conkey άγαρ.

Πεπτόνη	20 g
Λακτόζη	10 g
Χολικά άλατα	1,5 g
NaCl	5 g
Ουδέτερο ερυθρό	0,03 g
Κρυσταλλικό ιώδες	0,001 g
Άγαρ	15 g
Απεσταγμένο νερό	1000 ml

pH = 7,1

Το υλικό αποστειρώνεται στους 121°C επί 15 λεπτά. Στο υλικό αυτό αναστέλλεται τελείως η ανάπτυξη των Gram θετικών κόκκων.

1.20 Υλικό Mac Conkey ζυμός.

Πεπτόνη	20 g
Λακτόζη	10 g
Χολικά άλατα	5 g
NaCl	5 g
Ουδέτερο ερυθρό	0,075 g
Απεσταγμένο νερό	1000 ml

pH = 7,4

Το υλικό αποστειρώνεται στους 121°C επί 15 λεπτά. Στο σημείο αυτό πρέπει να σημειωθεί ότι το υλικό Mac Conkey άγαρ το οποίο περιέχει τα ίδια συστατικά με τον Mac Conkey ζυμό και άγαρ επιτρέπει σε ορισμένο βαθμό την ανάπτυξη του Σταφυλόκοκκου και του Εντερόκοκκου.

1.21 Υλικό Salmonella - Shigella άγαρ.

Το υλικό αυτό χρησιμεύει για την απομόνωση των Σαλμονελλών και των Σιγκελλών.

Εκχύλισμα κρέατος	5 g
Πρωτεόζη	5 g
Λακτόζη	10 g
Χολικά άλατα	8,5 g
Κιτρικό νάτριο	8,5 g
Θειοθειικό νάτριο	8,5 g
Κιτρικός σίδηρος	1 g
Ουδέτερο ερυθρό	0,025 g
Στίλβον πράσινο	0,330 mg
Άγαρ	14 g
Απεσταγμένο νερό	1000 ml

pH = 7,0

Τα συστατικά του υλικού διαλύονται στο νερό μετά από θέρμανση στους 100°C. Το υλικό δεν αποστειρώνεται στο αυτόκλειστο.

1.22 Υλικό TCBS άγαρ (Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose άγαρ).

Θειοθειικό νάτριο	10 g
Κιτρικό νάτριο	10 g
Χολικά άλατα	5 g
Σουκρόζη	20 g
Καζεΐνη κατεργασμένη με παγκρεατικά ένζυμα	5 g
Ιστίο ζώου κατεργασμένοι με πεπτικά ένζυμα	5 g
Έκχύλισμα ζυμομυκήτων	5 g
NaCl	10 g
Κιτρικός σίδηρος	1 g
Κυανούν της θυμόλης	0,04 g
Κυανούν της βρωμοθυμόλης	0,04 g
Άγαρ	14 g
Απεσταγμένο νερό	1000 ml

pH = 8,6

Τα συστατικά διαλύονται στο νερό μετά από θέρμανση στους 100°C. Το υλικό δεν αποστειρώνεται στο αυτόκλειστο.

1.23 Υλικό Thayer - Martin άγαρ.

Σαν βάση χρησιμοποιείται σοκολατόχροο άγαρ. Μετά την παρασκευή του σοκολατόχρου άγαρ προστίθενται τα ακόλουθα αντιβιοτικά με την αντίστοιχη συγκέντρωση στα 100 ml υλικού: Vancomycin 300 µg, Colistin 750 µg και Nystatin 1250 μονάδες.

1.24 Υλικό TTGA (Taurocholate - Tellurite Gelatin άγαρ) ή υλικό Monsur άγαρ.

Καζεΐνη κατεργασμένη με παγκρεατικά ένζυμα	10 g
NaCl	10 g
Ταυροχολικό νάτριο	5 g
Ανθρακικό νάτριο	1 g
Πηκτή (ζελατίνη)	30 g
Άγαρ	15 g
Απεσταγμένο νερό	1000 ml

pH = 8,5

Το υλικό αποστειρώνεται στους 121°C επί 15 λεπτά και μετά τοποθετείται σε υδατόλουτρο που έχει θερμοκρασία 45 - 50°C. Όταν η θερμοκρασία του υλικού κατεβεί στους 45 - 50°C προστίθεται διάλυμα τελλουριώδους καλίου, το οποίο έχει αποστειρωθεί με διήθηση, σε τελική συγκέντρωση 1:200.000.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ

ΜΕΘΟΔΟΙ ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΕΩΣ ΤΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

Στο Κεφάλαιο αυτό περιγράφονται αναλυτικά οι συνηθέστερες μέθοδοι που χρησιμοποιούνται στο κλινικό - διαγνωστικό εργαστήριο για την τυποποίηση των βακτηρίων καθώς επίσης και ορισμένες βασικές τεχνικές.

2.1 Μέθοδοι τυποποίησης των βακτηρίων.

2.1.1 Αναγωγή των νιτρικών αλάτων.

α) Γενικά.

Η αναγωγή των νιτρικών αλάτων σε νιτρώδη ($\text{NO}_3 \rightarrow \text{NO}_2$) αποτελεί χαρακτηριστική ιδιότητα των βακτηρίων της οικογένειας των Εντεροβακτηριοειδών.

Η δοκιμασία της αναγωγής των νιτρικών αλάτων γίνεται σε θρεπτικό ζωμό ο οποίος περιέχει 0,1% Νιτρικό κάλιο.

KNO_3	1 g
Θρεπτικός ζωμός	1000 ml

Το υλικό μοιράζεται σε σωληνάρια και αποστειρώνεται στους 115°C για 20 λεπτά.

Τα νιτρώδη άλατα τα οποία παράγονται ανιχνεύονται με δύο αντιδραστήρια, το Α και το Β. Το αντιδραστήριο Α είναι διάλυμα 0.6% διμεθυλ-α-ναφθυλαμίνης σε οξεικό οξύ 5N, και το αντιδραστήριο Β είναι διάλυμα 0.8% σουλφανιλικού οξέος σε οξεικό οξύ 5N.

Η παρασκευή των διαλυμάτων γίνεται με τον ακόλουθο τρόπο:

Αντιδραστήριο Α: 0,6% διμεθυλ-α-ναφθυλαμίνη
250 ml απεσταγμένο νερό
100 ml κρυσταλλικό οξεικό οξύ
2,1 ml διμεθυλ-α-ναφθυλαμίνη.

Αντιδραστήριο Β: 0,8% σουλφανιλικό οξύ
250 ml απεσταγμένο νερό
100 ml κρυσταλλικό οξεικό οξύ
2,8 g σουλφανιλικό οξύ.

Η παρουσία νιτρωδών αλάτων στο υλικό διαπιστώνεται από την εμφάνιση κόκκινου χρώματος μετά την προσθήκη ίσων όγκων από τα διαλύματα των αντιδραστηρίων Α και Β.

β) Μέθοδος.

– Το στέλεχος εμβολιάζεται σε ένα σωληνάριο το οποίο περιέχει 5 ml από τον θρεπτικό ζωμό με το KNO_3 και επωάζεται στους 37°C επί 24 ώρες.

– Από την καλλιέργεια του στελέχους στο ζωμό με το KNO_3 1 ml μεταφέρεται σε ένα αποστειρωμένο σωληνάριο.

– Ίσοι όγκοι από το διάλυμα του αντιδραστήριου Α και από το διάλυμα του αντιδραστήριου Β αναμιγνύονται σε ένα σωληνάριο.

Από το μίγμα των διαλυμάτων Α και Β Ο 1 ml ρίπεται στο 1 ml της καλλιέργειας του στελέχους.

– Αν η αντίδραση είναι θετική, δηλαδή το στέλεχος ανάγει τα νιτρικά σε νιτρώδη, εμφανίζεται σε λίγα λεπτά κόκκινο χρώμα.

– Αν η αντίδραση είναι αρνητική το αρχικό σωληνάριο με την καλλιέργεια του στελέχους επωάζεται πάλι στους 37°C .

– Η καλλιέργεια του στελέχους εξετάζεται με τον τρόπο που περιγράφηκε κάθε ημέρα και για πέντε συνολικά ημέρες.

Η αντίδραση θεωρείται αρνητική μόνον αν και την πέμπτη ημέρα δεν εμφανισθεί κόκκινο χρώμα μετά την προσθήκη των αντιδραστηρίων.

γ) Σημείωση.

Πολλές φορές ένας μικροοργανισμός ανάγει τα νιτρικά σε νιτρώδη αλλά η δοκιμασία είναι αρνητική. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι ο μικροοργανισμός έχει προκαλέσει την αναγωγή των νιτρωδών αλάτων σε N_2 με αποτέλεσμα να μην υπάρχουν στα υλικά νιτρώδη άλατα για να ανιχνευθούν με τα αντιδραστήρια Α και Β.

Κατά συνέπεια πρέπει πάντοτε να ελέγχεται αν μία αρνητική αντίδραση νιτρικών αλάτων είναι πραγματικά αρνητική (δηλαδή δεν έχουν αναχθεί τα νιτρικά άλατα σε νιτρώδη) ή είναι ψευδώς αρνητική (δηλαδή δεν υπάρχουν νιτρώδη στο υλικό επειδή έχουν αναχθεί σε N_2).

Ο έλεγχος αυτός γίνεται με τον Ζη, ο οποίος προκαλεί αναγωγή των νιτρικών σε νιτρώδη. Μικρές ποσότητες Ζη (2 – 5 mg) ρίπτονται στο 1 ml της καλλιέργειας του στελέχους, στην οποία έχουν προστεθεί προηγουμένως τα αντιδραστήρια Α και Β, και το σωληνάριο ανακινείται ζωηρά. Αν υπάρχουν νιτρικά άλατα στο υλικό ανάγονται από τον Ζη και εμφανίζεται κόκκινο χρώμα. Αυτό σημαίνει ότι ο μικροοργανισμός δεν έχει προκαλέσει την αναγωγή των νιτρικών, άρα η αντίδραση είναι πραγματικά αρνητική. Αν δεν υπάρχουν νιτρικά άλατα στο υλικό δεν θα εμφανισθεί κόκκινο χρώμα μετά την προσθήκη του Ζη. Αυτό σημαίνει ότι ο μικροοργανισμός έχει προκαλέσει την αναγωγή των νιτρικών σε νιτρώδη και των νιτρωδών σε N_2 , ($\text{NO}_3 \rightarrow \text{NO}_2 \rightarrow \text{N}_2$), άρα η αντίδραση είναι ψευδώς αρνητική.

Συμπερασματικά, αν δεν εμφανισθεί κόκκινο χρώμα μετά την προσθήκη του Ζη η δοκιμασία αναγωγής των νιτρικών πρέπει να θεωρηθεί θετική.

2.1.2 Απαμίνωση της Φαινυλαλανίνης.

α) Γενικά.

Τα στελέχη του γένους *Proteus* προκαλούν απαμίνωση της φαινυλαλανίνης από την οποία παράγεται φαινυλοπυροσταφυλικό οξύ. Η ιδιότητα αυτή είναι χαρακτηριστική για τους Πρωτεΐς και δεν παρατηρείται στα άλλα βακτήρια.

Η δοκιμασία για τον έλεγχο της παραγωγής φαινυλοपुरοσταφυλικού οξέος από την απαμίνωση της φαινυλαλανίνης γίνεται σε υλικό το οποίο έχει την ακόλουθη σύνθεση:

Εκχύλισμα από ζυμομύκητες	3 g
DL-φαινυλαλανίνη	2 g
Na ₂ HPO ₄	1 g
NaCl	5 g
Άγαρ	12 g
Απεσταγμένο νερό	1000 ml

pH = 7,3

Το υλικό μοιράζεται σε σωληνάρια και αποστειρώνεται στους 121°C επί 10 λεπτά. Μετά από την αποστείρωση τα σωληνάρια τοποθετούνται σε λοξή θέση μέχρι να πήξει το υλικό. Λαμβάνεται πρόνοια ώστε η λοξή επιφάνεια του υλικού να είναι μεγάλη.

Αν χρησιμοποιηθεί L-φαινυλαλανίνη αρκεί 1 g στα 1000 ml υλικού.

Η ανίχνευση του φαινυλοपुरοσταφυλικού οξέος γίνεται με υδατικό διάλυμα 10% FeCl₃ (1g FeCl₃ σε 10 ml απεσταγμένου νερού). Ο FeCl₃ αντιδρά με το φαινυλοपुरοσταφυλικό οξύ και σχηματίζεται ένωση η οποία έχει πράσινο χρώμα.

β) Μέθοδος.

– Το στέλεχος εμβολιάζεται στο υλικό με την φαινυλαλανίνη και επωάζεται στους 37°C επί 18 - 24 ώρες.

– Από το διάλυμα του FeCl₃ 0.2 ml ρίπτονται στην καλλιέργεια του στελέχους που έχει αναπτυχθεί στην λοξή επιφάνεια του υλικού.

– Αν το στέλεχος έχει διασπάσει την φαινυλαλανίνη και έχει παραχθεί φαινυλοपुरοσταφυλικό οξύ εμφανίζεται πράσινο χρώμα στη λοξή επιφάνεια του υλικού και στο υγρό που βρίσκεται στον πυθμένα του σωληναρίου.

γ) Σημείωση.

Η παραγωγή φαινυλοपुरοσταφυλικού οξέος από την φαινυλαλανίνη φέρεται διεθνώς με την ονομασία δοκιμασία APP ή PPA από τα αρχικά του φαινυλοपुरοσταφυλικού οξέος (Acid-Phenyl-Pyruvique ή Phenyl-Pyruvate-Acid).

2.1.3 Διάσπαση σακχάρων, αλκοολών και γλυκοσιδών.

α) Γενικά.

Τα βακτήρια διασπούν διάφορα σάκχαρα (υδατάνθρακες), αλκοόλες και γλυκοσίδες. Τα τελικά προϊόντα της διασπάσεως είναι οργανικά οξέα, ενώ μερικές φορές παράγονται και αέρια, όπως υδρογόνο και διοξείδιο του άνθρακα. Οι τρεις αυτές ομάδες των ουσιών φέρονται στην καθημερινή ορολογία του κλινικού εργαστηρίου με την ονομασία «υδατάνθρακες» και η μελέτη της διασπάσεώς τους έχει μεγάλη σημασία στην ταξινόμηση των βακτηρίων.

Η διάσπαση των ουσιών αυτών και η παραγωγή οξέος διαπιστώνεται αν προσ-

τεθεί στο υλικό (στερεό ή υγρό) ένας δείκτης του pH. Η παραγωγή οξέος προκαλεί μεταβολή του pH του υλικού, το οποίο από αλκαλικό γίνεται όξινο. Αποτέλεσμα αυτής της μεταβολής είναι η αλλαγή του χρώματος του δείκτη και κατά συνέπεια του χρώματος του υλικού.

Η μελέτη της παραγωγής αερίου στα υγρά υλικά γίνεται αν στο σωληνάριο του υλικού, το οποίο έχει διαστάσεις 150 x 18 mm, τοποθετηθεί ανεστραμμένο ένα μικρότερο σωληνάριο, το σωληνάριο Durham, το οποίο έχει διαστάσεις 75 x 10 mm. Το αέριο που θα παραχθεί παγιδεύεται μέσα στο ανεστραμμένο σωληνάριο.

Η παραγωγή αερίου σε στερεά υλικά που είναι σε λοξή θέση διαπιστώνεται από την παρουσία φυσαλλίδων ή ρηγμάτων μέσα στο άγαρ.

Οι δοκιμασίες αυτές για τον έλεγχο της παραγωγής αερίου είναι χρήσιμες όταν παράγεται υδρογόνο. Αν το αέριο που παράγεται είναι μόνο CO₂ η ανίχνευσή του είναι δύσκολη με αυτές τις δοκιμασίες επειδή το CO₂ εμφανίζει μεγάλη διαλυτότητα στο νερό και διαχέεται πολύ γρήγορα στον αέρα.

Στη Βακτηριολογία συχνότερα χρησιμοποιούνται τα ακόλουθα σάκχαρα, αλκοόλες και γλυκοσίδες.

1. ΥΔΑΤΑΝΘΡΑΚΕΣ:	Μονοσακχαρίτες:	Αραβινόζη (πεντόζη)
		Ραμνόζη (πεντόζη)
		Ξυλόζη (πεντόζη)
		Γλυκόζη (εξόζη)
		Φρουκτόζη (εξόζη)
	Δισακχαρίτες:	Γαλακτόζη (εξόζη)
		Μαννόζη (εξόζη)
		Λακτόζη
		Σουκρόζη
		Μαλτόζη
Πολυσακχαρίτες:	Τρεαλόζη	
	Μελιβιόζη	
	Σελλοβιόζη	
	Ραφινόζη	
	Άμυλο	
	Ινουλίνη	
		Γλυκογόνο
2. ΑΛΚΟΟΛΕΣ:	Γλυκερόλη	
	Ερυθριτόλη	
	Αδονιτόλη	
	Μαννιτόλη	
	Σορβιτόλη	
	Δουλοσιτόλη	
3. ΓΛΥΚΟΣΙΔΕΣ:	Σαλικίνη	
	Αισκουλίνη	
	Αμυγδαλίνη	

Οι δείκτες του pH που χρησιμοποιούνται στη Βακτηριολογία είναι οι ακόλουθοι:

ΔΕΙΚΤΗΣ	ΣΥΓΚΕΝ- ΤΡΩΣΗ gr %	ΔΙΑΛΥΤΗΣ	ΠΕΡΙΟΧΗ ΕΝΑΛ- ΛΑΓΗΣ ΕΙΣ pH	ΧΡΩΜΑ	
				Όξινο	Αλκαλικό
1. Βρωμοθυμόλης κυανούν	0,04	Νερό	6,0 – 7,6	Κίτρινο	Κυανούν
2. Βρωμοκρεζόλης πορφυρούν	0,04	Νερό	5,2 – 6,8	Κίτρινο	Πορφυρούν
3. Βρωμοκρεζόλης πράσινο	0,04	Νερό	3,8 – 5,4	Κίτρινο	Κυανούν
4. Βρωμοφαινόλης ερυθρό	0,04	Νερό	5,2 – 6,8	Κίτρινο	Ερυθρό
5. Βρωμοφαινόλης κυανούν	0,04	Νερό	3,0 – 4,6	Κίτρινο	Ερυθροϊώδες
6. Θυμόλης κυανούν	0,04	Νερό	8,0 – 9,6	Κίτρινο	Κυανούν
7. Κρεζόλης ερυθρό	0,04	Νερό	7,2 – 8,8	Κίτρινο	Ερυθρό
8. Μεθυλίου ερυθρό	0,02	60% αλκοόλη	4,2 – 6,3	Ερυθροϊώδες	Κίτρινο
9. Ουδέτερο ερυθρό	0,1	70% αλκοόλη	6,8 – 8,0	Ερυθρό	Κίτρινο
10. Φαινόλης ερυθρό	0,04	Νερό	6,8 – 8,4	Κίτρινο	Ερυθρό
11. Φαινολοφθαλείνη	0,05	50% αλκοόλη	8,3 – 10	Άχρουν	Ερυθροϊώδες
12. Χλωροφαινόλης ερυθρό	0,04	Νερό	4,8 – 6,4	Κίτρινο	Πορτοκαλίχρουν

β) Υλικά.

Διάφορα υλικά είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν για τη μελέτη της διασπάσεως των «υδατανθράκων». Στα υλικά αυτά προστίθεται ένας δείκτης του pH και ο «υδατάνθρακας» που πρόκειται να εξετασθεί.

Υλικά που χρησιμοποιούνται συνήθως είναι τα ακόλουθα:

1. Πεπτονούχο νερό (Peptone water).

Πεπτόνη	10 g
NaCl	5 g
Απεσταγμένο νερό	1000 ml
Δείκτης: Ερυθρό της φαινόλης	0,04 g
ή πορφυρούν της βρωμοκρεζόλης	0,04 g
ή κυανούν της βρωμοθυμόλης	0,04 g

Το υλικό αποστειρώνεται στους 115°C επί 20 λεπτά.

2. Υλικό για τη μελέτη της διασπάσεως των υδατανθράκων (Fermentation basal medium)

(NH ₄) ₂ HPO ₄	1 g
KCl	0,2 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,2 g
Εκχύλισμα ζυμομυκήτων	0,2 g
Άγαρ	15 g
Απεσταγμένο νερό	1000 ml
Πορφυρούν της βρωμοκρεζόλης (0,04%)	20 ml

Το υλικό αποστειρώνεται στους 115°C επί 20 λεπτά.

3. Υλικό με δείκτη Andrade.

Εκχύλισμα κρέατος	3 g
Πεπτόνη	10 g
NaCl	5 g
Απεσταγμένο νερό	900 ml

Το υλικό αποστειρώνεται στους 121°C επί 15 λεπτά.

Μετά την αποστείρωση στο υλικό προστίθενται 10 ml από τον δείκτη Andrade ο οποίος έχει προηγουμένως αποστειρωθεί στους 121°C για 20 λεπτά.

Ο δείκτης Andrade αποτελείται από:

Όξινο φουξίνη	0,5 g
Απεσταγμένο νερό	100 ml
NaOH, 1N	16 ml

Σε pH 7 ο δείκτης Andrade είναι άχρους, σε όξινο pH έχει χρώμα ροδόχρουν, ενώ σε αλκαλικό pH έχει ανοικτό κίτρινο χρώμα.

4. Διάλυμα Elrod - Braun.

MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,2 g
CaCl ₂	0,1 g
NaCl	0,2 g
K ₂ HPO ₄	0,2 g
Κυανούν της βρωμοθυμόλης 0,2%	20 ml
Απεσταγμένο νερό	880 ml

Το υλικό αποστειρώνεται με διήθηση μέσα από μικροβιοκρατείς ηθμούς.

Η αποστείρωση των «υδατανθράκων» είναι προτιμότερο να γίνεται με διήθηση μέσα από μικροβιοκρατείς ηθμούς και μετά να προσθέτονται στο αποστειρωμένο υλικό σε τελική συγκέντρωση 0,5 – 1%. Για λόγους ευκολίας είναι δυνατή η αποστείρωση των «υδατανθράκων» μαζί με το υλικό και τον δείκτη στους 115°C για 12 λεπτά. Όταν χρησιμοποιούνται αραβινόζη, ξυλόζη, μαλτόζη και ινουλίνη πρέπει πάντοτε να αποστειρώνονται με διήθηση.

γ) Μέθοδος 1.

– Το στέλεχος που πρόκειται να εξετασθεί καλλιεργείται σε υγρά ή στερεά θρεπτικά υλικά και επωάζεται στους 37°C επί 18 – 24 ώρες.

– Από την 18 – 24ωρη καλλιέργεια του στελέχους γίνεται εμβολιασμός του υλικού με τον «υδατάνθρακα» και επωάζεται στους 37°C.

– Η επώαση διαρκεί συνήθως 1 – 2 ημέρες. Σε ορισμένες περιπτώσεις η επώαση διαρκεί μέχρι 7 ημέρες.

– Η διάσπαση του «υδατάνθρακα» διαπιστώνεται από τη μεταβολή του χρώματος του υλικού που οφείλεται στη παραγωγή οξέος.

δ) Μέθοδος 2.

– Οξειδωτική – Ζυμωτική διάσπαση των υδατανθράκων. Η μέθοδος αυτή εί-

να χρήσιμη για να διαπιστωθεί αν ένας μικροοργανισμός προκαλεί οξείδωση ή ζύμωση ενός υδατάνθρακα.

Το υλικό που χρησιμοποιείται ονομάζεται OF υλικό (Oxidation - Fermentation medium) και περιέχει:

Πεπτόνη	2 g
NaCl	5 g
K ₂ HPO ₄	0,3 g
Κυανούρ της βρωμοθυμόλης	0,03 g
Άγαρ	3 g
Απεσταγμένο νερό	1000 ml

pH = 7,1

Το υλικό αποστειρώνεται στους 121°C επί 15 λεπτά.

Ο υδατάνθρακας που πρόκειται να μελετηθεί αποστειρώνεται με διήθηση και προστίθεται στο υλικό σε τελική συγκέντρωση 1%. Μετά την προσθήκη του υδατάνθρακα το υλικό μοιράζεται σε μικρά σωληνάρια.

– Κάθε στέλεχος εμβολιάζεται σε δύο σωληνάρια. Η επιφάνεια του ενός σωληναρίου καλύπτεται με 25mm στρώματος αποστειρωμένης υγρής παραφίνης για τη δημιουργία αναεροβίων συνθηκών. Τα σωληνάρια επωάζονται στους 37°C για 1-2 ημέρες.

– Η αλλαγή του χρώματος του υλικού μόνο στο σωληνάριο το οποίο είναι χωρίς παραφίνη (αερόβιες συνθήκες) σημαίνει ότι το στέλεχος προκαλεί οξείδωση του υδατάνθρακα.

– Η αλλαγή του χρώματος του υλικού και στα δύο σωληνάρια σημαίνει ότι το στέλεχος προκαλεί ζύμωση του υδατάνθρακα.

– Αν το χρώμα του υλικού δεν αλλάζει και στα δύο σωληνάρια το στέλεχος δεν οξειδώνει και δεν ζυμώνει τον υδατάνθρακα.

2.1.4 Δοκιμασία ερυθρού του μεθυλίου.

α) Γενικά.

Η δοκιμασία ερυθρού του μεθυλίου χρησιμοποιείται για την τυποποίηση των Εντεροβακτηριοειδών και ιδιαίτερα εκείνων τα οποία είναι λακτόζη θετικά.

Με την δοκιμασία αυτή ελέγχεται η ζύμωση της γλυκόζης σε υλικό που περιέχει γλυκόζη και πεπτόνη και η μετατροπή του pH του υλικού από 7,2 σε 4,2 – 6 από τα όξινα προϊόντα της διασπάσεως της γλυκόζης.

Η πτώση του pH του υλικού διαπιστώνεται αν προστεθεί στην καλλιέργεια του μικροβίου ο δείκτης ερυθρό του μεθυλίου. Αν το pH του υλικού είναι 4,2 – 4,5 ο δείκτης παίρνει έντονο κόκκινο χρώμα (αντίδραση θετική). Σε pH μεγαλύτερο από 4,5 και ως 6 ο δείκτης παίρνει πορτοκαλί χρώμα (αντίδραση ασθενώς θετική). Σε pH μεγαλύτερο από 6 ο δείκτης έχει κίτρινο χρώμα και η αντίδραση θεωρείται αρνητική.

Το υλικό για την δοκιμασία του ερυθρού του μεθυλίου έχει την ακόλουθη σύνθεση:

Πεπτόνη	5 g
K ₂ HPO ₄	5 g
Γλυκόζη	5 g
Απεσταγμένο νερό	1000 ml

pH = 7,2

Το υλικό μοιράζεται σε σωληνάρια και αποστειρώνεται στους 115°C επί 15 λεπτά.

Το διάλυμα του δείκτη παρασκευάζεται με τον ακόλουθο τρόπο:

0,1 g ερυθρό του μεθυλίου διαλύεται σε 300 ml αιθυλικής αλκοόλης, και συμπληρώνεται ο όγκος στα 500 ml με απεσταγμένο νερό.

β) Μέθοδος.

- Το στέλεχος εμβολιάζεται σε σωληνάριο που περιέχει 5 ml από το υλικό με την γλυκόζη και την πεπτόνη και επώάζεται στους 37°C επί 48 ώρες.
- Από την καλλιέργεια του μικροβίου 2 ml μεταφέρονται σε ένα αποστειρωμένο σωληνάριο και ρίπτονται πέντε σταγόνες από το διάλυμα του δείκτη.
- Το σωληνάριο ανακινείται ζωηρά και εξετάζεται για την εμφάνιση κόκκινου ή πορτοκαλί χρώματος.
- Αν η αντίδραση είναι αρνητική (χρώμα κίτρινο) το αρχικό σωληνάριο με την καλλιέργεια του μικροβίου επώάζεται στους 37°C για άλλες τρεις ημέρες (συνολικά 5 ημέρες).
- Στην καλλιέργεια ρίπτονται πέντε σταγόνες του διαλύματος του δείκτη, το σωληνάριο ανακινείται ζωηρά και εξετάζεται για την εμφάνιση κόκκινου ή πορτοκαλί χρώματος.

2.1.5 Δοκιμασία της ευαισθησίας στην Βακιτρασίνη.

α) Γενικά.

Τα στελέχη του β - αιμολυτικού στρεπτόκοκκου της ομάδας Α είναι ευαίσθητα σε πολύ μικρή πυκνότητα βακιτρασίνης, ενώ στην ίδια πυκνότητα του αντιβιοτικού οι β - αιμολυτικοί στρεπτόκοκκοι των άλλων ομάδων είναι ανθεκτικοί.

Η δοκιμασία της βακιτρασίνης είναι χρήσιμη για να διαπιστωθεί γρήγορα και με μεγάλη σχετικά ακρίβεια αν ένα στέλεχος β - αιμολυτικού στρεπτόκοκκου ανήκει στην ομάδα Α, στην οποία οφείλονται οι περισσότερες λοιμώξεις από στρεπτόκοκκο.

Κατά την εκτέλεση της δοκιμασίας πρέπει να λαμβάνεται πρόνοια ώστε να χρησιμοποιούνται δίσκοι του αντιβιοτικού οι οποίοι έχουν διάμετρο 6 mm και περιέχουν 0,04 μονάδες βακιτρασίνης. Οι δίσκοι ευαισθησίας του αντιβιοτικού οι οποίοι περιέχουν 10 μονάδες βακιτρασίνης δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται για τον διαχωρισμό των β - αιμολυτικών στρεπτόκοκκων της ομάδας Α από τους β - αιμολυτικούς στρεπτόκοκκους των άλλων ομάδων.

Προτού γίνει η δοκιμασία πρέπει να είναι βέβαιο ότι το στέλεχος είναι β - αιμολυτικός στρεπτόκοκκος για να είναι τα αποτελέσματα αξιόπιστα. Πολλά στελέχη α - αιμολυτικού στρεπτόκοκκου και στελέχη πνευμονιόκοκκου είναι ευαίσθητα στην πυκνότητα αυτή της βακιτρασίνης.

Το στέλεχος που πρόκειται να εξετασθεί πρέπει να είναι σε καθαρή καλλιέργεια.

β) Μέθοδος.

– Δύο ως δέκα αποικίες οι οποίες περιβάλλονται από διαυγή ζώνη αιμολύσεως εμβολιάζονται σε σωληνάριο με 4ml Trypticase Soy ζυμό.

– Το σωληνάριο επωάζεται στους 37°C επί 2 - 5 ώρες μέχρι να εμφανισθεί ελαφρά θολερότητα.

– Με ένα αποστειρωμένο βαμβακοφόρο στυλεό το καλλιέργημα επιστρώνεται στην επιφάνεια ενός τρυβλίου με αιματούχο άγαρ.

– Με αποστειρωμένη λαβίδα τοποθετείται επάνω στο υλικό ένας δίσκος βακτηρασίνης (0,04 μονάδες) και πιέζεται ελαφρά ώστε να έλθει σε πλήρη επαφή με το άγαρ.

– Το τρυβλίο επωάζεται στους 37°C επί 18 - 24 ώρες.

Αναστολή της αναπτύξεως του στελέχους γύρω από τον δίσκο με τη βακτηρασίνη σημαίνει ότι το στέλεχος ανήκει στην ομάδα A. Η διάμετρος της ζώνης αναστολής δεν έχει σημασία για την αξιολόγηση του αποτελέσματος.

Ο τελικός χαρακτηρισμός του στελέχους σαν β - αιμολυτικός στρεπτόκοκκος της ομάδας A (*Str. pyogenes*) πρέπει να βεβαιωθεί στην ορολογική τυποποίηση κατά Lancefield.

γ) Σημείωση.

Το υλικό Trypticase Soy ζυμός έχει την ακόλουθη σύνθεση:

Καζεΐνη κατεργασμένη με παγκρεατικά ένζυμα	17 g
Άλευρο σόγιας κατεργασμένο με παπαΐνη	3 g
NaCl	5 g
K ₂ HPO ₄	2,5 g
Γλυκόζη	2,5 g
Απεσταγμένο νερό	1000 ml

pH = 7,3

Το υλικό αποστειρώνεται στους 121°C επί 15 λεπτά.

2.1.6 Δοκιμασία της ευαισθησίας στην Οπτοχίνη.

α) Γενικά.

Ο πνευμονιόκοκκος είναι ευαίσθητος στην οπτοχίνη (ethylhydrocupreine hydrochloride), ενώ τα περισσότερα στελέχη των α - αιμολυτικών στρεπτοκόκκων είναι ανθεκτικά.

Η δοκιμασία είναι χρήσιμη για να διαπιστωθεί γρήγορα και με μεγάλη ακρίβεια αν ένα στέλεχος το οποίο παράγει α - αιμόλυση είναι πνευμονιόκοκκος ή α - αιμολυτικός στρεπτόκοκκος.

Οι δίσκοι οπτοχίνης έχουν διάμετρο 6 mm και έχουν εμποτισθεί με 5 μg της ουσίας (0,02 ml διαλύματος 1:4000).

Η δοκιμασία πρέπει να εκτελείται με καθαρή καλλιέργεια του μικροβίου.

β) Μέθοδος.

Δύο ως δέκα αποικίες οι οποίες περιβάλλονται από ζώνη με πράσινο χρώμα (α-αιμόλυση) εμβολιάζονται σε σωληνάριο με 4 ml Trypticase Soy ζωμό.

– Το σωληνάριο επωάζεται στους 37°C επί 2 - 5 ώρες μέχρι να εμφανισθεί ελαφρά θολερότητα.

– Με ένα αποστειρωμένο βαμβακοφόρο στυλεό το καλλιέργημα επιστρώνεται στην επιφάνεια ενός τρυβλίου με αιματούχο άγαρ.

– Με αποστειρωμένη λαβίδα τοποθετείται επάνω στο υλικό ένας δίσκος οπτοχίνης (5 μg) και πιέζεται ελαφρά ώστε να έλθει σε πλήρη επαφή με το άγαρ.

– Το τρυβλίο επωάζεται στους 37°C επί 18 - 24 ώρες.

Ζώνη αναστολής της αναπτύξεως του μικροβίου γύρω από τον δίσκο της οπτοχίνης με διάμετρο ίση ή μεγαλύτερη από 18mm (στη διάμετρο αυτή περιλαμβάνεται και ο δίσκος της οπτοχίνης) σημαίνει ότι το στέλεχος είναι πνευμονιόκοκκος.

Στελέχη τα οποία εμφανίζουν ζώνη αναστολής 15 - 18 mm πρέπει να εξετάζονται για την ευαισθησία τους στην επίδραση της χολής (δοκιμασία χολής).

Διάμετρος ζώνης αναστολής μικρότερη από 15mm σημαίνει ότι το στέλεχος δεν είναι πνευμονιόκοκκος.

2.1.7 Δοκιμασία κιτρικών.**α) Γενικά.**

Η δοκιμασία των κιτρικών χρησιμοποιείται για την τυποποίηση των εντεροβακτηριοειδών.

Με την δοκιμασία αυτή ελέγχεται η δυνατότητα αναπτύξεως ενός στελέχους σε συνθετικό θρεπτικό υλικό το οποίον περιέχει ανόργανα άλατα και σαν πηγή άνθρακα το κιτρικό νάτριο.

Η δοκιμασία γίνεται σε υγρά θρεπτικά υλικά, όπως είναι το υλικό του Koser και σε στερεά θρεπτικά υλικά, όπως είναι το υλικό του Simmons.

Το υλικό του Koser έχει την ακόλουθη σύνθεση:

NaCl	5 g
MgSO ₄	0,2 g
NH ₄ H ₂ PO ₄	1 g
K ₂ HPO ₄	1 g
Κιτρικό νάτριο	2 g
Απεσταγμένο νερό	1000 ml

pH = 6,8

Το υλικό μοιράζεται σε σωληνάρια και αποστειρώνεται στους 115°C επί 20 λεπτά.

Το υλικό του Simmons έχει την ίδια σύνθεση και επί πλέον 15 g άγαρ και 0,08 g κυανού της βρωμοθυμόλης. Το υλικό του Simmons μοιράζεται σε σωληνάρια. Μετά την αποστείρωση τα σωληνάρια τοποθετούνται σε λοξή θέση μέχρι να πήξει το υλικό.

β) Μέθοδος.

Το στέλεχος που πρόκειται να εξετασθεί εμβολιάζεται στο υλικό του Koser ή στο υλικό του Simmons και επωάζεται στους 37°C.

– Κάθε μέρα και για πέντε συνολικά ημέρες εξετάζονται τα σωληνάρια για την εμφάνιση θολώσεως.

– Η ανάπτυξη του στελέχους στο υλικό του Simmons μετατρέπει το χρώμα του υλικού σε βαθύ κυανούν.

γ) Σημειώσεις.

– Περισσότερο αξιόπιστα αποτελέσματα λαμβάνονται αν ο εμβολιασμός των υλικών του Koser ή του Simmons γίνεται με εναιώρημα κυττάρων σε αποστειρωμένο φυσιολογικό ορό από 18ωρη καλλιέργεια σε λοξό άγαρ του στελέχους που πρόκειται να εξετασθεί.

– Αν τα αποτελέσματα της δοκιμασίας δεν συμβαδίζουν με τις άλλες ιδιότητες του στελέχους πρέπει η δοκιμασία των κιτρικών να επαναλαμβάνεται στη θερμοκρασία δωματίου. Ορισμένα στελέχη χρησιμοποιούν το κιτρικό νάτριο στη θερμοκρασία του δωματίου, ενώ δίνουν αρνητική την δοκιμασία στους 37°C.

2.1.8 Δοκιμασία Χολής.

α) Γενικά.

Ουσίες οι οποίες ελαττώνουν την επιφανειακή τάση, όπως η χολή και τα χολικά άλατα, ενεργοποιούν τα αυτολυτικά ένζυμα του πνευμονιόκοκκου με αποτέλεσμα την λύση των κυττάρων του. Η ιδιότητα αυτή του πνευμονιόκοκκου είναι χρήσιμη για τον διαχωρισμό του από τους α - αιμολυτικούς στρεπτόκοκκους, οι οποίοι δεν λύνονται από την προσθήκη χολής ή χολικών αλάτων.

β) Μέθοδος.

– Το στέλεχος καλλιεργείται σε ζυμό με γλυκόζη, όπως π.χ. ο ζυμός Todd - Hewitt, και επωάζεται στους 37°C επί 18 - 24 ώρες.

– Το καλλιέργημα στο ζυμό φυγοκεντρείται και απορρίπτεται το υπερκείμενο.

– Το ίζημα των κυττάρων εναιωρείται σε 1 ml αποστειρωμένου φυσιολογικού ορού, pH 7,4 ή σε 1 ml αποστειρωμένου ρυθμιστικού διαλύματος pH 7,4.

– Το εναιώρημα μοιράζεται σε δύο σωληνάρια (0,5 ml καθένα).

– Στο πρώτο σωληνάριο προστίθενται 0,5 ml διαλύματος 10% δεοξυχολικού νατρίου.

– Στο άλλο σωληνάριο προστίθενται 0,5 ml αποστειρωμένου φυσιολογικού ορού.

– Τα σωληνάρια επωάζονται σε υδατόλουτρο 37°C για 15 - 30 λεπτά.

– Αν πρόκειται για πνευμονιόκοκκο στο σωληνάριο με το δεοξυχολικό νάτριο παρατηρείται διαύγαση του καλλιεργήματος, ενώ το άλλο σωληνάριο με τον φυσιολογικό ορό που χρησιμεύει σαν μάρτυρας, παραμένει θολερό.

γ) Σημειώσεις.

– Το pH του εναιωρήματος των κυττάρων στο οποίο θα γίνει η δοκιμασία πρέ-

πει οπωσδήποτε να είναι ελαφρώς αλκαλικό. Σε όξινο pH δεν θα παρατηρηθεί διαύγαση.

– Το διάλυμα 10% δεοξυχολικού νατρίου παρασκευάζεται αν προστεθεί 1 g δεοξυχολικού νατρίου σε 10 ml αποστειρωμένου απεσταγμένου νερού.

– Ο ζυμός Todd - Hewitt έχει την ακόλουθη σύνθεση:

Καρδιά βοδιού, εκχύλισμα από	500 g
Πεπτόνη	20 g
Γλυκόζη	2 g
NaCl	2 g
Na ₂ HPO ₄	0,4 g
NaHCO ₃	2,5 g
Απεσταγμένο νερό	1000 ml

pH = 7,8

Το υλικό αποστειρώνεται στους 121°C επί 15 λεπτά.

2.1.9 Δοκιμασία Voges - Proskauer ή Δοκιμασία παραγωγής ακετυλομεθυλοκαρβινόλης (ακετοΐνης).

α) Γενικά.

Η δοκιμασία Voges - Proskauer χρησιμεύει για την τυποποίηση των εντεροβακτηριοειδών και ιδιαίτερα των λακτόζη θετικών. Η δοκιμασία γίνεται στο ίδιο υλικό το οποίο χρησιμοποιείται και για την δοκιμασία ερυθρού του μεθυλίου.

Με την δοκιμασία Voges - Proskauer ελέγχεται η ζύμωση της γλυκόζης και η παραγωγή ακετυλομεθυλοκαρβινόλης (CH₃ - CHOH - CO - CH₃), η οποία αποτελεί ενδιάμεσο προϊόν της βουτανεδιολικής ζυμώσεως. Σε αλκαλικό pH και με την παρουσία οξυγόνου η ακετυλομεθυλοκαρβινόλη οξειδώνεται στο διακετύλιο (CH₃ - CO - CO - CH₃) το οποίο αντιδρά με την κρεατίνη, η οποία υπάρχει στην πεπτόνη του υλικού, και σχηματίζεται ένωση η οποία έχει κόκκινο χρώμα.

Για την ανίχνευση της ακετυλομεθυλοκαρβινόλης χρησιμοποιούνται δυο διαλύματα, το διάλυμα Α και το διάλυμα Β.

Διάλυμα Α. α - ναφθόλη	5 g
Αιθυλική αλκόολη	100 ml
Διάλυμα Β. ΚΟΗ	40 g
Απεσταγμένο νερό	100 ml

β) Μέθοδος.

– Το στέλεχος εμβολιάζεται σε σωληνάριο το οποίο περιέχει 5 ml από το υλικό με την γλυκόζη και την πεπτόνη και επώαζεται στους 37°C επί 48 ώρες.

– Από την καλλιέργεια του μικροβίου 2 ml μεταφέρονται σε ένα αποστειρωμένο σωληνάριο και ρίπτονται 0,6 ml από το διάλυμα Α (α - ναφθόλη 5%). Το σωληνάριο ανακινείται ζωηρά. Μετά ρίπτονται 0,2 ml από το διάλυμα Β (ΚΟΗ 40%) και πάλι το σωληνάριο ανακινείται ζωηρά.

– Το σωληνάριο αφήνεται σε ηρεμία και μετά από 5 λεπτά, και μέχρι 60 λεπτά, εξετάζεται για την εμφάνιση κόκκινου χρώματος.

– Αν η αντίδραση είναι αρνητική (δηλαδή, δέν εμφανισθεί κόκκινο χρώμα), το αρχικό σωληνάριο με την καλλιέργεια του μικροβίου επωάζεται στους 37°C για άλλες τρεις ημέρες (συνολικά 5 ημέρες).

– Στο καλλιέργημα ρίπνεται 0,6 ml α - ναφθόλης και 0,2 ml KOH, όπως έγινε και στο 48ωρο καλλιέργημα, και εξετάζεται το σωληνάριο για την εμφάνιση κόκκινου χρώματος.

γ) Σημείωση.

– Η εμφάνιση κόκκινου χρώματος σε περίπτωση θετικής αντιδράσεως, είναι δυνατό να επιταχυνθεί αν μετά το διάλυμα του KOH προστεθούν στο καλλιέργημα λίγες σταγόνες από υδατικό διάλυμα 0,3% κρεατίνης.

– Εντεροβακτηριοειδή τα οποία είναι θετικά για την δοκιμασία ερυθρού του μεθυλίου είναι αρνητικά για την δοκιμασία Voges - Proskauer, και αντίστροφα.

2.1.10 Δοκιμασίες αναστολής της αναπτύξεως σε υλικά με χρωστική (βασική φουξίνη, θειονίνη).

α) Γενικά.

Οι δοκιμασίες αναστολής της αναπτύξεως σε υλικά τα οποία περιέχουν τις χρωστικές βασική φουξίνη και θειονίνη αποτελούν δύο από τα τέσσερα κριτήρια για τον διαχωρισμό του γένους *Brucella* σε είδη.

Οι χρωστικές ενσωματώνονται στο υλικό Tryptose άγαρ και χρησιμοποιούνται σε τελική συγκέντρωση 1:100.000. Το υλικό Tryptose άγαρ αποστειρώνεται στους 121°C επί 15 λεπτά και το pH ρυθμίζεται στο 6,6 - 6,8. Από την κάθε χρωστική παρασκευάζεται υδατικό διάλυμα 1% και αποστειρώνεται σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 100°C επί 20 λεπτά. Στα 100 ml Tryptose άγαρ προστίθεται 0,1 ml από το υδατικό διάλυμα της χρωστικής. Το υλικό και το διάλυμα της χρωστικής αναμιγνύονται καλά και μοιράζονται σε αποστειρωμένα τρυβλία. Τα τρυβλία επωάζονται στους 37°C επί 24 ώρες για να στεγνώσουν και πρέπει να χρησιμοποιούνται μέσα σε δύο ημέρες από την ημέρα που θα παρασκευασθούν.

β) Μέθοδος.

– Το στέλεχος που πρόκειται να εξετασθεί εμβολιάζεται σε Trypticase Soy ζωμό ή σε Trypticase Soy άγαρ σε λοξή θέση και επωάζεται στους 37°C για 24 ώρες.

– Από την καλλιέργεια του στελέχους στον ζωμό ή στο άγαρ γίνεται εμβολιασμός ενός τρυβλίου το οποίο περιέχει βασική φουξίνη και ενός άλλου τρυβλίου το οποίο περιέχει την θειονίνη.

– Ο εμβολιασμός του στελέχους γίνεται στην επιφάνεια των τρυβλίων σε ευθεία γραμμή, η οποία αρχίζει από το άκρο του τρυβλίου και φέρεται στο κέντρο. Σε κάθε τρυβλίο μπορούν να εμβολιασθούν τέσσερα στελέχη.

– Τα τρυβλία επωάζονται στους 37°C και σε ατμόσφαιρα 10% CO₂ επί 72 ώρες.

– Τα τρυβλία εξετάζονται για να διαπιστωθεί αν το στέλεχος έχει αναπτυχθεί ή έχει ανασταλεί η ανάπτυξή του από την παρουσία της χρωστικής.

– Σαν μάρτυρες πρέπει να χρησιμοποιούνται γνωστά στελέχη Βρουκελλών.

Η *B. melitensis* αναπτύσσεται στο υλικό που περιέχει βασική φουξίνη και στο υλικό που περιέχει θειονίνη.

Η *B. abortus* αναπτύσσεται στο υλικό που περιέχει βασική φουξίνη, αλλά δεν αναπτύσσεται στο υλικό με θειονίνη.

Η *B. suis* δεν αναπτύσσεται στο υλικό με την βασική φουξίνη, αλλά αναπτύσσεται στο υλικό με την θειονίνη.

γ) Σημείωση.

Το υλικό Tryptose άγαρ έχει την ακόλουθη σύνθεση:

Τρυπτόζη	20 g
Γλυκόζη	1 g
Υδροχλωρική θειαμίνη	0,005 g
NaCl	5 g
Άγαρ	15 g
Απεσταγμένο νερό	1000 ml

— Η δοκιμασία γίνεται και με δίσκους διηθητικού χαρτιού οι οποίοι έχουν εμποτισθεί με τα διαλύματα των χρωστικών.

2.1.11 Έλεγχος της κινητικότητας.

α) Γενικά.

Ο έλεγχος της κινητικότητας ενός βακτηρίου αποτελεί χρήσιμο κριτήριο για την τυποποίησή του. Ο έλεγχος της κινητικότητας γίνεται σε ημίρρευστο θρεπτικό υλικό το οποίο φέρεται σε σωληνάκια. Το ημίρρευστο υλικό περιέχει 0,3 - 0,4% άγαρ και εμβολιάζεται με ευθύ μικροβιολογικό κρίκο.

Το στέλεχος που πρόκειται να εξετασθεί πρέπει να ληφθεί από πρόσφατη (24ωρη) καλλιέργεια σε θρεπτικό ζυμό. Από την καλλιέργεια του στελέχους λαμβάνεται μία σταγόνα με ευθύ μικροβιολογικό κρίκο και εμβολιάζεται κατά μήκος της στήλης του ημίρρευστου υλικού. Αν το στέλεχος είναι ακίνητο η ανάπτυξη του περιορίζεται στην ευθεία γραμμή που έγινε ο εμβολιασμός με αποτέλεσμα να εμφανισθεί θόλωση μόνο σε αυτή την περιοχή του υλικού. Αν το στέλεχος είναι κινητό, τα κύτταρά του κινούνται και πέρα από την ευθεία γραμμή του εμβολιασμού. Στην περίπτωση αυτή η θόλωση από την ανάπτυξη του στελέχους καταλαμβάνει ολόκληρη την στήλη του υλικού.

Ο έλεγχος της κινητικότητας των Εντεροβακτηριοειδών γίνεται σε υλικό που έχει την ακόλουθη σύνθεση:

Πεπτόνη	10 g
Εκχύλισμα κρέατος	3 g
NaCl	5 g
Άγαρ	4 g
Απεσταγμένο νερό	1000 ml

pH = 7,4

Το υλικό μοιράζεται σε σωληνάκια και αποστειρώνεται στους 121°C για 15 λε-

πτά. Κάθε σωληνάριο περιέχει περίπου 8 ml υλικού.

Ο έλεγχος της κινητικότητας των Ψευδομονάδων γίνεται σε υλικό που έχει την ακόλουθη σύνθεση:

Καζείνη κατεργασμένη με παγκρεατικά ένζυμα	10 g
Εκχύλισμα ζυμομυκήτων	3 g
NaCl	5 g
Άγαρ	3 g
Απεσταγμένο νερό	1000 ml

pH = 7,2

Το υλικό μοιράζεται σε σωληνάκια και αποστειρώνεται στους 121°C για 15 λεπτά. Κάθε σωληνάριο περιέχει 3,5 ml υλικού.

β) Μέθοδος.

– Το στέλεχος που πρόκειται να εξετασθεί εμβολιάζεται πρώτα σε θρεπτικό ζωμό και επωάζεται στους 37°C επί 24 ώρες.

– Από την καλλιέργεια του στελέχους στο θρεπτικό ζωμό λαμβάνεται μία σταγόνα με ευθύ μικροβιολογικό κρίκο και εμβολιάζεται κατά μήκος της στήλης του κατάλληλου ημίρρευστου υλικού. Κάθε στέλεχος εμβολιάζεται σε δύο σωληνάκια.

– Το ένα σωληνάριο επωάζεται στους 37°C και το άλλο σωληνάριο επωάζεται στη θερμοκρασία δωματίου (18 - 25°C) επί 24 - 48 ώρες.

– Αν το στέλεχος είναι κινητό εμφανίζεται θόλωση σε ολόκληρη την στήλη του υλικού.

– Η θερμοκρασία επώασης έχει μεγάλη σημασία, επειδή τα πιο πολλά κινητά βακτήρια εμφανίζουν κινητικότητα σε χαμηλές θερμοκρασίες (π.χ. 18 - 25°C) ενώ η κινητικότητά τους είναι περιορισμένη στην άριστη θερμοκρασία αναπτύξεώς τους (π.χ. 37°C). Αυτός είναι ο λόγος για τον οποίο πρέπει πάντοτε να εμβολιάζονται δύο σωληνάκια από τα οποία το ένα επωάζεται στους 37°C και το άλλο στη θερμοκρασία δωματίου.

2.1.12 Καταβολισμός των αμινοξέων ορνιθίνη, λυσίνη και αργινίνη.

α) Γενικά.

Ο καταβολισμός των αμινοξέων ορνιθίνη, λυσίνη και αργινίνη χρησιμοποιείται για την τυποποίηση των βακτηρίων. Η διάσπαση της ορνιθίνης και της λυσίνης γίνεται ενζυματικά με τις αποκαρβοξυλάσες ενώ η διάσπαση της αργινίνης γίνεται με το ενζυματικό σύστημα της διϋδρολάσης.

Κατά την διάσπαση της ορνιθίνης παράγεται CO₂ και μία αμίνη, η πουτρεσκίνη. Κατά την διάσπαση της λυσίνης παράγεται επίσης CO₂ και μία άλλη αμίνη, η καθαβερίνη, ενώ τα προϊόντα της διασπάσεως της αργινίνης είναι η ορνιθίνη, το CO₂ και η αμμωνία.

Η μελέτη της διασπάσεως των αμινοξέων γίνεται σε υλικό το οποίο έχει όξινο pH (6,0). Μετά τον εμβολιασμό με το στέλεχος που πρόκειται να εξετασθεί το υλικό καλύπτεται με μία στιβάδα αποστειρωμένης υγρής παραφίνης η οποία έχει ύψος 5 mm.

Το υλικό στο οποίο ελέγχεται η διάσπαση των αμινοξέων έχει την ακόλουθη σύνθεση:

Πεπτόνη	5 g
Εκχύλισμα κρέατος	5 g
Πυριδοξάλη	5 mg
Γλυκόζη	0,5 g
Πορφυρούν της βρωμοκρεζόλης	0,010 g
Ερυθρό της κρεζόλης	0,005 g
Απεσταγμένο νερό	1000 ml

Το pH του υλικού ρυθμίζεται στο 6,0. Το υλικό μοιράζεται σε 4 ίσα μέρη (από 250 ml το κάθε μέρος). Στο ένα μέρος του υλικού προστίθεται L - ορνιθίνη υδροχλωρική σε τελική συγκέντρωση 1%, στο άλλο L - λυσίνη υδροχλωρική σε τελική συγκέντρωση 1% και στο τρίτο L - αργινίνη υδροχλωρική σε τελική συγκέντρωση 1%. Το τέταρτο μέρος του υλικού χρησιμοποιείται σαν μάρτυρας και δεν περιέχει κανένα από τα αμινοξέα. Όταν χρησιμοποιείται η μορφή DL η τελική συγκέντρωση των αμινοξέων στο υλικό πρέπει να είναι 2%.

Το κάθε μέρος του υλικού μοιράζεται σε σωληνάρια και αποστειρώνεται στους 121°C επί 10 λεπτά.

Λίγες ώρες (6 - 8) ώρες μετά τον εμβολιασμό με το στέλεχος που πρόκειται να εξετασθεί το υλικό και στα 4 σωληνάρια (δηλαδή στο σωληνάριο με την ορνιθίνη, στο σωληνάριο με τη λυσίνη, στο σωληνάριο με την αργινίνη και στο σωληνάριο χωρίς αμινοξύ = μάρτυρας) εμφανίζει έντονο κίτρινο χρώμα που οφείλεται στην παραγωγή οξέος (πτώση του pH) από την διάσπαση της γλυκόζης. Αν το στέλεχος διασπά ένα από τα αμινοξέα (ορνιθίνη, λυσίνη ή αργινίνη) παράγεται αντίστοιχα πουτρεσκίνη, καδαβερίνη ή αμμωνία. Η διάσπαση των αμινοξέων γίνεται μετά από την διάσπαση της γλυκόζης και τα προϊόντα που παράγονται ανεβάζουν πάλι το pH του υλικού με αποτέλεσμα το χρώμα του να μεταβάλλεται από κίτρινο σε ιώδες, ενώ στο σωληνάριο που χρησιμεύει σαν μάρτυρας το χρώμα του υλικού παραμένει κίτρινο.

β) Μέθοδος.

Το στέλεχος που πρόκειται να εξετασθεί εμβολιάζεται στο σωληνάριο με το κατάλληλο αμινοξύ και στο σωληνάριο που χρησιμεύει σαν μάρτυρας. Τα σωληνάρια καλύπτονται με στιβάδα αποστειρωμένης υγρής παραφίνης που έχει ύψος 5 mm και επωάζονται στους 37°C επί 4 ημέρες.

– Τα σωληνάρια εξετάζονται κάθε ημέρα.

– Αν το στέλεχος διασπά το αμινοξύ (θετική αντίδραση) στο αντίστοιχο σωληνάριο παρατηρείται θολερότητα από την ανάπτυξη του στελέχους και το υλικό έχει ιώδες χρώμα.

– Στο σωληνάριο που χρησιμεύει σαν μάρτυρας το χρώμα του υλικού παραμένει κίτρινο από τη διάσπαση της γλυκόζης.

– Αν το στέλεχος δεν διασπά το αμινοξύ (αρνητική αντίδραση) το χρώμα του υλικού στο αντίστοιχο σωληνάριο παραμένει κίτρινο από την διάσπαση της γλυκόζης.

2.1.13 Οξείδωση του γλυκονικού καλίου σε 2-κετο-γλυκονικό κάλιο.

α) Γενικά.

Η οξείδωση του γλυκονικού καλίου σε 2-κετο-γλυκονικό κάλιο αποτελεί χαρακτηριστική ιδιότητα της *Pseudomonas aeruginosa*.

Ο έλεγχος της οξειδώσεως του γλυκονικού καλίου γίνεται σε υλικό το οποίο έχει την ακόλουθη σύνθεση:

KH_2PO_4	5,4 g
KNO_3	2 g
Γλυκονικό κάλιο	20 g
Απεσταγμένο νερό	1000 ml

$$\text{pH} = 6,5$$

Το υλικό αποστειρώνεται με διήθηση μέσα από μικροβιοκρατείς ηθμούς και μοιράζεται σε αποστειρωμένα σωληνάρια.

Η ανίχνευση του 2-κετο-γλυκονικού καλίου γίνεται με το ποιοτικό διάλυμα του Benedict το οποίο αποτελείται από:

Κιτρικό νάτριο	17,3 g
Na_2CO_3	10 g
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1,73 g
Απεσταγμένο νερό	100 ml

Το κιτρικό νάτριο και το Na_2CO_3 διαλύονται σε 60 ml απεσταγμένο νερό. Ο $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ διαλύεται σε 20 ml απεσταγμένο νερό. Το διάλυμα του CuSO_4 προστίθεται στο πρώτο διάλυμα με ταυτόχρονη ανάδευση. Ο όγκος του διαλύματος συμπληρώνεται στα 100 ml με απεσταγμένο νερό.

Η παρουσία 2-κετο-γλυκονικού καλίου στο υλικό έχει σαν αποτέλεσμα την εμφάνιση ιζήματος που έχει πορτοκαλί χρώμα όταν προστεθεί ποσότητα από το διάλυμα του Benedict.

β) Μέθοδος.

– Το στέλεχος που πρόκειται να εξετασθεί εμβολιάζεται στο υλικό με το γλυκονικό κάλιο και επωάζεται στους 37°C επί 18 - 24 ώρες.

– Στα 5 ml της καλλιέργειας του στελέχους στο υλικό με το γλυκονικό κάλιο προστίθεται 1 ml από το ποιοτικό διάλυμα του Benedict.

– Το σωληνάριο ανακινείται για να αναμιχθεί η καλλιέργεια με το διάλυμα και τοποθετείται σε υδατόλουτρο που έχει θερμοκρασία 100°C επί 10 λεπτά.

– Αν το στέλεχος οξειδώνει το γλυκονικό κάλιο σε 2-κετο-γλυκονικό κάλιο (αντίδραση θετική) εμφανίζεται ίζημα που έχει πορτοκαλί χρώμα.

2.1.14 Παραγωγή Δεοξυριβονουκλεάσης.

α) Γενικά.

Το ένζυμο δεοξυριβονουκλεάση (DNase) προκαλεί υδρόλυση του δεοξυριβονουκλεϊνικού οξέος (DNA) σε μονο- και πολυνουκλεοτίδια.

Η παραγωγή δεοξυριβονουκλεάσης αποτελεί χαρακτηριστική ιδιότητα της *Serratia marcescens* η οποία την ξεχωρίζει από όλα τα Εντεροβακτηριοειδή. Το ένζυ-

μο παράγεται επίσης από τον *S. aureus*, από ορισμένα στελέχη του *S. epidermidis* και από τον *Str. pyogenes*.

Χαρακτηριστικό του *S. aureus* είναι η παραγωγή μίας θερμοανθεκτικής επίσης δεοξυριβονουκλεάσης η οποία δεν καταστρέφεται στους 100° C για 15 λεπτά, και η οποία δεν παράγεται από τον *S. epidermidis*. Η παραγωγή της θερμοανθεκτικής δεοξυριβονουκλεάσης από τον *S. aureus* αποτελεί βασικό κριτήριο για τον χαρακτηρισμό του είδους και έχει την ίδια σημασία με την παραγωγή ηηκτάσης, για την τυποποίηση του *S. aureus*.

Η ανίχνευση της παραγωγής DNase γίνεται σε στερεό υλικό το οποίο περιέχει DNA. Αν το στέλεχος παράγει DNase και υδρολύει το DNA, γύρω από την ανάπτυξη του στο υλικό θα παρατηρηθεί διαυγής περιοχή όταν προστεθεί 1N HCl. Αντίθετα, όταν το στέλεχος δεν παράγει DNase το DNA δεν διασπάται και τα άλατά του καθιζάνουν όταν προστεθεί το HCl με αποτέλεσμα την εμφάνιση θολερότητας γύρω από την ανάπτυξη του στελέχους.

Το υλικό που χρησιμοποιείται για τον έλεγχο της παραγωγής δεοξυριβονουκλεάσης έχει την ακόλουθη σύνθεση:

DNA	2 g
Καζεΐνη κατεργασμένη με παγκρεατικά ένζυμα	15 g
Άλευρο σόγιας κατεργασμένο με παπαΐνη	5 g
NaCl	5 g
Άγαρ	15 g
Απεσταγμένο νερό	1000 ml

pH = 7,3

Το υλικό αποστειρώνεται στους 121° C επί 15 λεπτά και μοιράζεται σε αποστειρωμένα τρυβλία.

β) Μέθοδος.

Το στέλεχος εμβολιάζεται στην επιφάνεια του υλικού σε ευθεία γραμμή, η οποία αρχίζει από την περιφέρεια του τρυβλίου και φέρεται στο κέντρο. Σε κάθε τρυβλίο είναι δυνατόν να εμβολιασθούν τέσσερα στελέχη. Το τρυβλίο επωάζεται στους 37° C επί 24 ώρες.

– Η επιφάνεια του υλικού μέσα στο τρυβλίο καλύπτεται με 1 N HCl και ελέγχεται για την εμφάνιση διαυγάσεως γύρω από την περιοχή στην οποία έχει αναπτυχθεί το στέλεχος.

– Αν η αντίδραση είναι θετική (δηλαδή το στέλεχος παράγει DNase) παρατηρείται διαύγηση του υλικού γύρω από την περιοχή στην οποία έχει αναπτυχθεί το στέλεχος.

2.1.15 Παραγωγή Ινδόλης.

α) Γενικά.

Ορισμένα βακτήρια έχουν την ικανότητα να οξειδώνουν το αμινοξύ τρυπτοφάνη με αποτέλεσμα την παραγωγή ινδόλης.

Ο έλεγχος της παραγωγής ινδόλης από την τρυπτοφάνη αποτελεί χρήσιμη μέθοδο για την τυποποίηση των Εντεροβακτηριοειδών.

Για την εκτέλεση της μεθόδου χρειάζονται πεπτονούχο νερό, στο οποίο καλλιεργείται το στέλεχος που πρόκειται να εξετασθεί, και ένα αντιδραστήριο για την ανίχνευση της ινδόλης η οποία παράγεται.

Σαν αντιδραστήρια χρησιμοποιούνται το αντιδραστήριο του Kovacs και το αντιδραστήριο του Ehrlich. Το αντιδραστήριο του Kovacs περιέχει:

π - διμεθυλαμινοβενζαλδεΐδη	5 g
Αμυλική αλκοόλη	75 ml
Πυκνό υδροχλωρικό οξύ	25 ml

Η π - διμεθυλαμινοβενζαλδεΐδη διαλύεται στην αλκοόλη σε υδατόλουτρο που έχει θερμοκρασία 50 - 55° C. Όταν το διάλυμα κρυώσει προστίθεται βραδέως το υδροχλωρικό οξύ. Το αντιδραστήριο έχει ελαφρό κίτρινο χρώμα. Πρέπει να παρασκευάζεται σε μικρές ποσότητες και να διατηρείται στο ψυγείο.

Το αντιδραστήριο του Ehrlich περιέχει:

π - διμεθυλαμινοβενζαλδεΐδη	1 g
Αιθυλική αλκοόλη	95 ml
Πυκνό υδροχλωρικό οξύ	20 ml

Η π - διμεθυλαμινοβενζαλδεΐδη διαλύεται στην αλκοόλη και μετά προστίθεται το υδροχλωρικό οξύ. Το αντιδραστήριο πρέπει να παρασκευάζεται σε μικρές ποσότητες και να διατηρείται στο ψυγείο.

β) Μέθοδος 1.

— Το στέλεχος εμβολιάζεται σε σωληνάριο που περιέχει 5 ml πεπτονούχο νερό (ή πεπτόνη του υλικού πρέπει να είναι πλούσια σε τρυπτοφάνη) και επωάζεται στους 37° C επί 24 ώρες.

— Ένα μέρος της καλλιέργειας του στελέχους στο πεπτονούχο νερό, 1 - 2 ml, μεταφέρεται σε ένα αποστειρωμένο σωληνάριο. Στο καλλιέργημα αυτό ρίπτονται 4 - 5 σταγόνες από το διάλυμα του αντιδραστηρίου του Kovacs.

— Το σωληνάριο ανακινείται ελαφρά και εξετάζεται για την εμφάνιση κόκκινου χρώματος.

— Η εμφάνιση κόκκινου χρώματος σημαίνει ότι το στέλεχος διασπά την τρυπτοφάνη και παράγεται ινδόλη η οποία δίνει κόκκινο χρώμα με το αντιδραστήριο του Kovacs.

— Αν η αντίδραση είναι αρνητική (δηλαδή, δεν εμφανισθεί κόκκινο χρώμα) το αρχικό σωληνάριο με το υπόλοιπο της καλλιέργειας του στελέχους επωάζεται πάλι στους 37° C επί άλλες 24 ώρες.

— Στο καλλιέργημα ρίπτονται 3 - 5 σταγόνες από το διάλυμα του αντιδραστηρίου του Kovacs, το σωληνάριο ανακινείται ελαφρά και εξετάζεται για την εμφάνιση κόκκινου χρώματος.

γ) Μέθοδος 2.

— Το στέλεχος εμβολιάζεται σε πεπτονούχο νερό και επωάζεται στους 37°C για 48 ώρες.

— Στο καλλιέργημα προστίθεται 1 ml ξυλόλης και το σωληνάριο ανακινείται ζωηρά για την εκχύλιση της ινδόλης.

— Το σωληνάριο αφήνεται σε ηρεμία επί 1 - 2 λεπτά ώστε η ξυλόλη να σχηματίσει μία στιβάδα στην επιφάνεια του πεπτονούχου νερού.

– Από το αντιδραστήριο του Ehrlich 0,5 ml επιστιβάζονται στο πεπτονούχο νερό. Το διάλυμα του αντιδραστηρίου σχηματίζει μία στιβάδα ανάμεσα στην επιφάνεια του πεπτονούχου νερού και στην ξυλόλη.

– Αν το στέλεχος διασπά την τρυπτοφάνη η ινδόλη που παράγεται σχηματίζει με το αντιδραστήριο του Ehrlich ένα κόκκινο δακτύλιο ο οποίος εμφανίζεται στην επιφάνεια του πεπτονούχου νερού και κάτω από την στιβάδα της ξυλόλης.

2.1.16 Παραγωγή Καταλάσης.

α) Γενικά.

Η καταλάση είναι ένζυμο το οποίο διασπά το υπεροξείδιο του υδρογόνου σε νερό και οξυγόνο ($2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$). Πολλά είδη βακτηρίων παράγουν καταλάση, αλλά στην καθημερινή πράξη η δοκιμασία παραγωγής καταλάσης χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό των σταφυλοκόκκων (καταλάση θετικοί) από τους στρεπτόκοκκους (καταλάση αρνητικοί).

Η δοκιμασία παραγωγής καταλάσης μετά από θέρμανση των αποικιών στους 68°C επί 20 λεπτά χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό του *M. tuberculosis* και *M. bovis* (καταλάση στους 68°C άρνητικά) από τα άλλα είδη Μυκοβακτηριδίου (καταλάση στους 68°C θετικά).

β) Μέθοδος 1.

– Το στέλεχος που πρόκειται να εξετασθεί καλλιεργείται σε λοξό θρεπτικό άγαρ και επωάζεται στους 37°C επί 18 - 24 ώρες.

– Στο καλλιέργημα του στελέχους προστίθεται 1ml από διάλυμα 3% H_2O_2 .

– Αν το στέλεχος παράγει καταλάση εμφανίζονται φυσαλλίδες οι οποίες οφείλονται στο εκλυόμενο O_2 .

γ) Μέθοδος 2.

– Το στέλεχος που πρόκειται να εξετασθεί καλλιεργείται σε θρεπτικό ζυμό και επωάζεται στους 37°C επί 18 - 24 ώρες.

– Στο καλλιέργημα του στελέχους προστίθεται 1ml από διάλυμα 3% H_2O_2 .

– Αν το στέλεχος παράγει καταλάση εμφανίζονται φυσαλλίδες οι οποίες οφείλονται στο εκλυόμενο O_2 .

δ) Μέθοδος 3.

– Το στέλεχος καλλιεργείται σε τρυβλίο με θρεπτικό άγαρ και επωάζεται στους 37°C επί 18 - 24 ώρες.

– Μία αποικία του στελέχους αναμινύεται με μία σταγόνα από διάλυμα 3% H_2O_2 επάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα.

– Σε θετικό αποτέλεσμα εμφανίζονται φυσαλλίδες.

ε) Σημείωση.

Η δοκιμασία καταλάσης δεν πρέπει να γίνεται με αποικίες οι οποίες έχουν αναπτυχθεί σε αιματούχο άγαρ. Τα ερυθρά αιμοσφαίρια περιέχουν καταλάση και κατά την παραλαβή της αποικίας από το αιματούχο άγαρ είναι δυνατόν να παραληφθούν

και ερυθρά αιμοσφαίρια με αποτέλεσμα η δοκιμασία να δώσει ψευδές θετικό αποτέλεσμα.

στ) Μέθοδος 4. (καταλάση στους 68°C για τα Μυκοβακτηρίδια).

Αντιδραστήρια:

- α) Μίγμα 10% Tween 80 και 30% υπεροξειδίου του υδρογόνου.
 - 10ml Tween 80 αναμιγνύονται με 90ml απεσταγμένου νερού και αποστειρώνονται στους 121°C επί 10 λεπτά.
 - Όταν πρόκειται να χρησιμοποιηθεί το μίγμα 10% Tween 80 - 30% H₂O₂ αναμιγνύονται ίσοι όγκοι 10% Tween 80 με διάλυμα 30% H₂O₂.
- β) Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού οξέος 0.067 M, pH 7. Παρασκευάζεται από την ανάμιξη 61,1ml Na₂HPO₄ (9.47g/l) και 38.9ml KH₂PO₄ (9.07g/l).

Τεχνική.

- Φέρονται 0,5 ml του ρυθμιστικού διαλύματος σε σωληνάριο που κλείνει με βιδωτό πώμα.
- Πέντε ως δέκα αποικίες από καλλιέργεια του στελέχους στο υλικό Löwenstein - Jensen εναιωρούνται στα 0,5 ml του ρυθμιστικού διαλύματος.
- Το σωληνάριο με το εναιώρημα των αποικιών τοποθετείται σε υδατόλουτρο 68°C για 20 λεπτά.
- Το σωληνάριο αφήνεται να κρυώσει στη θερμοκρασία δωματίου.
- Στο σωληνάριο προστίθενται 0,5 ml του μίγματος από ίσους όγκους 10% Tween 80 - 30% υπεροξειδίου του υδρογόνου.
- Αν το στέλεχος παράγει καταλάση μετά από θέρμανση στους 68°C για 20 λεπτά εμφανίζονται φυσαλλίδες.
- Αν δεν εμφανισθούν φυσαλλίδες το σωληνάριο ελέγχεται για 20 λεπτά ακόμα και αν δεν παρατηρηθούν φυσαλλίδες μέσα σε αυτό το διάστημα η δοκιμασία θεωρείται αρνητική.

2.1.17 Παραγωγή Νιασίνης.

α) Γενικά.

Η παραγωγή νιασίνης (νικοτινικού οξέος) αποτελεί χαρακτηριστική ιδιότητα του *Mycobacterium tuberculosis*. Νιασίνη δεν παράγεται από το *M. bovis* και από τα άλλα Μυκοβακτηρίδια.

Σε πολύ σπάνιες περιπτώσεις απομονώνονται στελέχη *M. tuberculosis* τα οποία δεν παράγουν νιασίνη, όπως και στελέχη άλλων Μυκοβακτηριδίων τα οποία είναι νιασίνη - θετικά.

Η νιασίνη ελευθερώνεται από τα κύτταρα του βακτηρίου στο υλικό καλλιέργειας. Αν το υλικό καλλιέργειας είναι στερεό προστίθεται μικρή ποσότητα αποστειρωμένου απεσταγμένου νερού ή φυσιολογικού ορού για την παραλαβή της νιασίνης από το υλικό και την εκτέλεση της δοκιμασίας.

Η ανίχνευση της νιασίνης γίνεται με την προσθήκη διαλύματος ανιλίνης και διαλύματος βρωμιούχου κυανίου. Η παρουσία νιασίνης διαπιστώνεται από την εμφάνιση κίτρινου χρώματος όταν προστεθούν τα διαλύματα της ανιλίνης και του βρωμιούχου κυανίου.

Διάλυμα 4% ανιλίνης.

Παρασκευάζεται από την προσθήκη 4ml ανιλίνης σε 96ml αιθυλικής αλκοόλης.

Το διάλυμα τοποθετείται σε σκοτεινή φιάλη και διατηρείται στο ψυγείο. Είναι διαυγές και άχροο. Αν το διάλυμα γίνει καστανόχροο δεν πρέπει να χρησιμοποιείται.

Διάλυμα 10% βρωμιούχου κυανίου (CNBr).

Ζυγίζεται μικρή ποσότητα βρωμιούχου κυανίου και τοποθετείται σε σκοτεινή φιάλη. Προστίθεται ο κατάλληλος όγκος απεσταγμένου νερού ώστε να παρασκευασθεί διάλυμα 10%. Η φιάλη διατηρείται στο ψυγείο.

– Το CNBr έχει δηλητηριώδη και ερεθιστική οσμή. Πρέπει να λαμβάνεται πρόνοια ώστε να μην εισπνέεται και να μην έρχεται σε επαφή με το δέρμα και τους βλεννογόνους.

β) Μέθοδος.

– Χρησιμοποιείται καλλιέργεια του στελέχους στο υλικό Löwenstein - Jensen, το οποίο βρίσκεται σε λοξή θέση μέσα σε σωληνάριο.

– Στην καλλιέργεια του στελέχους επιστιβάζονται 0,5 ως 1,5 ml αποστειρωμένου απεσταγμένου νερού και το σωληνάριο τοποθετείται στους 37°C για 10-15 λεπτά.

– Δύο σταγόνες (ή 0,5 ml) από το απεσταγμένο νερό, το οποίο έχει προστεθεί στην καλλιέργεια, μεταφέρονται σε ένα μικρό αποστειρωμένο σωληνάριο.

– Στο σωληνάριο προστίθενται πρώτα δύο σταγόνες (ή 0,5 ml) από το διάλυμα 4% της ανιλίνης και μετά δύο σταγόνες (ή 0,5 ml) από το διάλυμα 10% του CNBr.

– Η παρουσία νιασίνης διαπιστώνεται από την εμφάνιση κίτρινου χρώματος (αντίδραση θετική).

2.1.18 Παραγωγή Οξειδάσης.**α) Γενικά.**

Οι Ναϊσσέριες και τα περισσότερα είδη Ψευδομονάδων παράγουν ένα ένζυμο, την οξειδάση, η οποία αντιδρά με ορισμένες αρωματικές αμίνες και σχηματίζονται χρωστικά παράγωγα.

Η ανίχνευση της οξειδάσης γίνεται με το αντιδραστήριο tetra - methyl - p - phenyldiamine dihydrochloride από το οποίο παρασκευάζεται υδατικό διάλυμα 0,5-1%. Το διάλυμα του αντιδραστήριου πρέπει να τοποθετείται σε γιάλινη φιάλη με σκοτεινό χρώμα και να διατηρείται στο ψυγείο (4°C). Το διάλυμα του αντιδραστήριου μπορεί να χρησιμοποιηθεί για μια μόνο εβδομάδα από την ημέρα της παρασκευής του.

Άλλο αντιδραστήριο είναι το di - methyl - p - phenyldiamine - hydrochloride από το οποίο επίσης παρασκευάζεται υδατικό διάλυμα 0,5-1%. Το αντιδραστήριο αυτό πρέπει να παρασκευάζεται λίγο πριν χρησιμοποιηθεί διότι διατηρείται σταθερό μόνο για λίγες ώρες. Είναι περισσότερο τοξικό για τα βακτήρια και λιγότερο ευαίσθητο από το προηγούμενο για την ανίχνευση της οξειδάσης.

Κατά την εκτέλεση της δοκιμασίας πρέπει να λαμβάνεται πρόνοια ώστε τα αντιδραστήρια να μην έρχονται σε επαφή με το δέρμα διότι είναι τοξικά και προκαλούν αλλεργία.

Η δοκιμασία της οξειδάσης για τις Ψευδομονάδες είναι δυνατόν να γίνει και με δύο άλλα αντιδραστήρια, το αντιδραστήριο Α και το αντιδραστήριο Β. Το αντιδραστήριο Α είναι διάλυμα α - ναφθόλης 1% σε αιθυλική αλκοόλη (1g α - ναφθόλης σε 100 ml αιθυλικής αλκοόλης, 95-96°). Το αντιδραστήριο Β είναι διάλυμα p - aminodimethylaniline hydrochloride 1% σε απεσταγμένο νερό (1g p - aminodimethylaniline hydrochloride σε 100 ml απεσταγμένου νερού). Το αντιδραστήριο Β πρέπει να παρασκευάζεται συχνά και να διατηρείται στο ψυγείο.

β) Μέθοδος 1.

— Ένα μικρό κομμάτι διηθητικού χαρτιού τοποθετείται μέσα σε ένα κενό τρυβλίο.

— Το διηθητικό χαρτί εμποτίζεται με 2 - 3 σταγόνες διαλύματος tetra - methyl - p - phenyldiamine dihydrochloride 1%, ή di - methyl - p - phenyldiamine hydrochloride 1%.

— Με αποστειρωμένο κρίκο από πλατίνα ή με αποστειρωμένο σιφώνιο λαμβάνεται μία αποικία και επιστρώνεται στο διηθητικό χαρτί το οποίο έχει εμποτισθεί με το διάλυμα του αντιδραστηρίου.

— Αν το στέλεχος παράγει οξειδάση εμφανίζεται βαθύ ερυθροϊώδες (πορφυρούν) χρώμα μέσα σε 10 sec στο σημείο του διηθητικού χαρτιού που έγινε η επίστρωση της αποικίας.

γ) Σημειώσεις.

— Η μεταφορά της αποικίας δεν πρέπει να γίνεται με κοινό κρίκο διότι και ίχνη σιδήρου ανάγουν το αντιδραστήριο με αποτέλεσμα να παρατηρούνται ψευδή θετικά αποτελέσματα.

— Αν η δοκιμασία γίνει με αποικία η οποία λαμβάνεται από παλιά καλλιέργεια ή από υλικό το οποίο περιέχει σάκχαρο η αντίδραση μπορεί να καθυστερήσει και η εμφάνιση του χρώματος να παρατηρηθεί μετά από 10 sec και ως 60 sec. Στην περίπτωση αυτή η δοκιμασία πρέπει να επαναληφθεί αφού πρώτα το στέλεχος ανακαλλιεργηθεί σε αιματούχο άγαρ και επωασθεί στους 37°C για 18-24 ώρες.

δ) Μέθοδος 2.

— Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται συχνά για τον διαχωρισμό των Εντεροβακτηριοειδών από τις Ψευδομονάδες.

— Το στέλεχος καλλιεργείται σε λοξό θρεπτικό άγαρ και επωάζεται στους 37°C επί 18-24 ώρες.

— Δύο ως τρεις σταγόνες από τα διαλύματα των αντιδραστηρίων Α (α - ναφθόλη) και Β (p - aminodimethylaniline hydrochloride) ρίπτονται διαδοχικά στο καλλιέργημα το οποίο έχει αναπτυχθεί στο λοξό άγαρ.

— Το σωληνάριο ανακινείται ώστε να καλυφθεί ολόκληρη η επιφάνεια του καλλιέργηματος με τα διαλύματα των αντιδραστηρίων.

— Αν το στέλεχος παράγει οξειδάση το καλλιέργημα εμφανίζει κυανούν χρώμα μέσα σε 2 λεπτά από την προσθήκη των αντιδραστηρίων.

- Θετικές αντιδράσεις μετά τα 2 λεπτά δεν πρέπει να λαμβάνονται υπόψη.

ε) Σημειώσεις.

- Η μέθοδος 1 υπερέχει λίγο σε ευαισθησία από τη μέθοδο 2.
- Σαν μάρτυρες πρέπει να χρησιμοποιούνται καλλιέργειες στελεχών *P. aeruginosa* (θετικός μάρτυρας) και *E. coli* (αρνητικός μάρτυρας).

2.1.19 Παραγωγή Πηκτάσης (Coagulase).

α) Γενικά.

Η πηκτάση είναι ένζυμο το οποίο προκαλεί πήξη του πλάσματος του αίματος του ανθρώπου και διαφόρων ζώων. Η δράση της διαφέρει από το φυσιολογικό μηχανισμό της πήξης του αίματος καθόσον δεν απαιτείται η παρουσία ιόντων Ca και των παραγόντων του πλάσματος V και VII. Η πηκτάση διακρίνεται στην εξωκυττάρια ή ελευθέρα και την συνδεδεμένη πηκτάση. Η πρώτη βγαίνει από το μικροβιακό σώμα στο υλικό καλλιέργειας, ενώ η δεύτερη είναι προσκολλημένη στο κυτταρικό τοίχωμα.

Η παραγωγή πηκτάσης αποτελεί το βασικότερο κριτήριο για τον χαρακτηρισμό ενός στελέχους σταφυλόκοκκου σαν *S. aureus*. Όλα τα στελέχη *S. aureus* παράγουν πηκτάση, αν και έχουν περιγραφεί ορισμένα στελέχη *S. aureus* τα οποία ενώ έχουν τις άλλες ιδιότητες του είδους δεν παράγουν το ένζυμο και χαρακτηρίζονται σαν *S. aureus*, πηκτάση αρνητικά στελέχη.

β) Ανίχνευση της εξωκυτταρίου ή ελευθέρως πηκτάσης.

Χρησιμοποιείται πρόσφατο ή λυοφιλοποιημένο πλάσμα ανθρώπου, κουνελιού ή χοίρου.

Το στέλεχος του μικροβίου που πρόκειται να εξετασθεί καλλιεργείται σε υγρά ή στερεά θρεπτικά υλικά, τα οποία δεν πρέπει να περιέχουν σάκχαρα, και επώαζεται επί 18 - 24 ώρες.

γ) Μέθοδος 1.

- Το πλάσμα αραιώνεται με αποστειρωμένο φυσιολογικό ορό (ισότονο διάλυμα NaCl) σε αναλογία 1 : 5.

- Σε ένα αποστειρωμένο σωληνάριο μεταφέρονται 0,5 ml από το αραιωμένο πλάσμα.

- Από την 18 - 24ωρη καλλιέργεια του στελέχους σε ζωμό 0,1 ml μεταφέρεται στο σωληνάριο το οποίο περιέχει το πλάσμα.

- Το σωληνάριο ανακινείται ελαφρά για την ανάμιξη του πλάσματος με το καλλιέργημα του στελέχους και τοποθετείται σε υδατόλουτρο 37°C.

- Μετά από 1, 2, 3 και 4 ώρες το σωληνάριο ελέγχεται για την εμφάνιση πήγματος.

- Η δημιουργία πήγματος, ανεξάρτητα από το μέγεθος που έχει το πήγμα, σημαίνει ότι το στέλεχος παράγει το ένζυμο πηκτάση το οποίο προκαλεί πήξη του πλάσματος.

— Αν το πλάσμα δεν πήξει σε 4 ώρες συνεχίζεται η επώαση του σωληναρίου επί 18 ωρες και ελέγχεται πάλι για την εμφάνιση πήγματος.

δ) Μέθοδος 2.

Στη μέθοδο αυτή χρησιμοποιείται μία αποικία από 18 - 24ωρο καλλιέργεια του στελέχους σε αιματούχο άγαρ.

— Η αποικία εναιωρείται σε 0,5 ml πλάσματος που έχει αραιωθεί με φυσιολογικό ορό σε αναλογία 1 : 5.

— Τα επόμενα στάδια της μεθόδου είναι τα ίδια όπως στη μέθοδο 1.

ε) Ανίχνευση της συνδεδεμένης πηκτάσης.

Πρέπει να χρησιμοποιείται μόνο πρόσφατο πλάσμα ανθρώπου, κουνελιού ή χοίρου.

Το στέλεχος του μικροβίου που πρόκειται να εξετασθεί καλλιεργείται σε στερεό θρεπτικό υλικό, το οποίο δεν περιέχει σάκχαρο, και επωάζεται επί 18 - 24 ώρες.

στ) Μέθοδος.

— Μία σταγόνα φυσιολογικού ορού τοποθετείται σε αντικειμενοφόρο πλάκα.

— Μία αποικία του στελέχους αναμιγνύεται με τη σταγόνα του φυσιολογικού ορού μέχρι να σχηματισθεί ομοιογενές εναιώρημα.

— Στο εναιώρημα προστίθεται μία σταγόνα πλάσματος και ακολουθεί η ανάμιξη τους με τη βοήθεια μικροβιολογικού κρίκου επί 10 sec.

— Αν εμφανισθούν κροκίδες στο διάστημα των 10 sec το στέλεχος παράγει συνδεδεμένη πηκτάση. Η εμφάνιση κροκίδων μετά από το χρονικό διάστημα των 10 sec δεν πρέπει να λαμβάνεται υπόψη και το αποτέλεσμα πρέπει να χαρακτηρίζεται σαν αρνητικό.

ζ) Σημειώσεις.

— Κατά την εκτέλεση των μεθόδων για την ανίχνευση της ελευθέρως ή συνδεδεμένης πηκτάσης πρέπει ταυτόχρονα να ελέγχονται γνωστά στελέχη *S. aureus* και *S. epidermidis* σαν θετικός και αρνητικός μάρτυρας αντίστοιχα.

— Η μέθοδος για την ανίχνευση της συνδεδεμένης πηκτάσης γίνεται εύκολα και χρησιμοποιείται όταν πρόκειται να εξετασθούν ταυτόχρονα πολλά στελέχη σταφυλόκοκκου. Όσα στελέχη παράγουν συνδεδεμένη πηκτάση χαρακτηρίζονται σαν *S. aureus* χωρίς να χρειάζεται να ελεγχθούν για την παραγωγή ελευθέρως πηκτάσης. Αντίθετα, όσα στελέχη είναι αρνητικά για την παραγωγή συνδεδεμένης πηκτάσης πρέπει πάντοτε να ελέγχονται για την παραγωγή ελευθέρως πηκτάσης. Πολλά στελέχη *S. aureus* δεν παράγουν συνδεδεμένη πηκτάση, ενώ παράγουν ελευθέρως πηκτάση. Το αντίθετο είναι πολύ σπάνιο.

— Ορισμένα στελέχη διαφόρων ειδών βακτηρίων (π.χ. *Str. faecalis*, *Str. pyogenes*, *E. coli* και *Serratia marcescens*) προκαλούν πήξη του πλάσματος χωρίς να παράγουν πηκτάση, όπως ο *S. aureus*. Γιαυτό το λόγο και για να αποφεύγονται ψευδή θετικά αποτελέσματα, πριν γίνει η δοκιμασία της πηκτάσης πρέπει πρώτα να ελέγχεται αν το στέλεχος είναι Gram θετικός κόκκος, καταλάση θετικός. Η δοκιμασία

της πηκτάσης γίνεται μόνο αν το στέλεχος είναι Gram θετικός κόκκος και παράγει καταλάση.

— Συνιστάται η χρησιμοποίηση μίγματος πλάσματος που έχει ληφθεί από πολλά άτομα παρά η χρησιμοποίηση πλάσματος από ένα μόνο άτομο. Επίσης είναι καλύτερο να χρησιμοποιείται πλάσμα από αίμα που έχει ληφθεί με το αντιπηκτικό EDTA, παρά με το αντιπηκτικό κιτρικό νάτριο.

2.1.20 Παραγωγή ουρεάσης.

α) Γενικά.

Διάφορα είδη βακτηρίων παράγουν ένα ένζυμο, την ουρεάση, η οποία προκαλεί υδρόλυση της ουρίας. Η δοκιμασία παραγωγής ουρεάσης είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για την τυποποίηση των Πρωτέων. Από τα πέντε είδη Πρωτέως μόνο ο *P. inconstans* (*Providencia*) δεν παράγει ουρεάση και δεν υδρολύει την ουρία.

Η δοκιμασία παραγωγής ουρεάσης είναι δυνατόν να γίνει σε στερεό ή υγρό θρεπτικό υλικό. Το στερεό θρεπτικό υλικό έχει την ακόλουθη σύνθεση:

Πεπτόνη	1 g
Γλυκόζη	1 g
NaCl	5 g
KH ₂ PO ₄	2 g
Ερυθρό της φαινόλης	0,012 g
Άγαρ	12 g
Απεσταγμένο νερό	950 ml

pH = 6,8

Το υλικό αποστειρώνεται στους 115° C επί 15 λεπτά. Μετά την αποστείρωση η φιάλη με το υλικό τοποθετείται σε υδατόλουτρο. Όταν η θερμοκρασία της φιάλης φθάσει τους 50 - 55°C προστίθενται 50 ml υδατικού διαλύματος 40% ουρίας το οποίο έχει αποστειρωθεί με διήθηση. Η φιάλη ανακινείται ελαφρά για την ανάμιξη της ουρίας με το υλικό και το περιεχόμενό της μοιράζεται σε αποστειρωμένα σωληνάκια. Τα σωληνάκια τοποθετούνται σε λοξή θέση μέχρι να πήξει το υλικό.

Το υγρό θρεπτικό υλικό για την δοκιμασία παραγωγής ουρεάσης έχει την ακόλουθη σύνθεση:

Εκχύλισμα ζυμομυκήτων	0,1 g
Ουρία	20 g
KH ₂ PO ₄	9,1 g
Na ₂ HPO ₄	9,5 g
Ερυθρό της φαινόλης	0,01 g
Απεσταγμένο νερό	1000 ml

pH = 6,8

Το υλικό αποστειρώνεται με διήθηση μέσα από μικροβιοκρατείς ηθμούς. Άλλος τρόπος είναι τα συστατικά του υλικού να διαλυθούν σε 900 ml απεσταγμένο νερό και να αποστειρωθούν στους 121°C επί 15 λεπτά και μετά να προστεθούν 100 ml από υδατικό διάλυμα 20% ουρίας το οποίο έχει αποστειρωθεί με διήθηση.

Το υλικό μοιράζεται σε αποστειρωμένα σωληνάκια.

Η ουρεάση προκαλεί υδρόλυση της ουρίας και την παραγωγή διοξειδίου του άνθρακα και αμμωνίας ($\text{NH}_2 - \text{CO} - \text{NH}_2 \rightarrow \text{CO}_2 + \text{NH}_3$). Η αμμωνία που παράγεται μετατρέπεται το pH του υλικού σε αλκαλικό ($\text{pH} \geq 8,4$). Σε pH 8,4 ο δείκτης ερυθρό της φαινόλης έχει κόκκινο χρώμα με αποτέλεσμα και το υλικό να παίρνει κόκκινο χρώμα όταν η αντίδραση είναι θετική, δηλαδή όταν το στέλεχος παράγει ουρεάση.

β) Μέθοδος.

– Το στέλεχος εμβολιάζεται στο στερεό ή υγρό θρεπτικό υλικό με την ουρία και επωάζεται στους 37° C.

– Το σωληνάριο εξετάζεται μετά από 2, 4 και 24 ώρες για την εμφάνιση κόκκινου χρώματος. Η εμφάνιση κόκκινου χρώματος σημαίνει ότι το στέλεχος παράγει ουρεάση.

– Αν η αντίδραση είναι αρνητική το σωληνάριο επωάζεται για 4 συνολικά ημέρες.

– Η δοκιμασία αναφέρεται σαν αρνητική αν και μετά από 4 ημέρες επώσεως στους 37°C δεν εμφανισθεί κόκκινο χρώμα.

γ) Σημειώσεις.

– Το υγρό θρεπτικό υλικό με την ουρία χρησιμοποιείται κυρίως για είδη βακτηρίων τα οποία παράγουν μεγάλα ποσά ουρεάσης, δηλαδή για τους Πρωτεΐς.

– Το στερεό θρεπτικό υλικό με την ουρία χρησιμοποιείται και για είδη βακτηρίων τα οποία παράγουν μικρά ποσά ουρεάσης, όπως π.χ. η *Klebsiella pneumoniae*.

– Οι Πρωτεΐς δίνουν θετική αντίδραση σε λίγες ώρες και το αργότερο μετά από 24 ώρες επώσεως.

2.1.21 Παραγωγή υδροθείου (H_2S).

α) Γενικά.

Πολλά είδη βακτηρίων έχουν την ικανότητα να ανάγουν αμινοξέα τα οποία φέρουν θείο στο μόριό τους (κυστεΐνη) με αποτέλεσμα την παραγωγή υδροθείου. Η διαπίστωση της παραγωγής υδροθείου γίνεται με διάφορες ουσίες - δείκτες, όπως π.χ. ο θειούχος σίδηρος ή ο οξεικός μόλυβδος. Το H_2S που παράγεται αντιδρά με τον σίδηρο (ή τον μόλυβδο) και σχηματίζονται ενώσεις (θειούχος σίδηρος, θειούχος μόλυβδος) οι οποίες έχουν μαύρο χρώμα.

Ο έλεγχος της παραγωγής H_2S από τα Εντεροβακτηριοειδή γίνεται στο υλικό *Kligler*. Το H_2S προέρχεται από την αναγωγή του θειοθειικού νατρίου το οποίο περιέχεται στο υλικό, ενώ σαν ουσία δείκτης χρησιμοποιείται ο θειικός εναμμώνιος σίδηρος. Το H_2S αντιδρά με τον θειικό εναμμώνιο σίδηρο και σχηματίζεται θειούχος σίδηρος ο οποίος έχει μαύρο χρώμα.

Ο έλεγχος της παραγωγής H_2S από τις Βρουκέλλες γίνεται στο υλικό *Tryptose* άγαρ. Στην περίπτωση αυτή το H_2S προέρχεται από την αναγωγή της κυστεΐνης η οποία περιέχεται στην τρυπτόζη, ενώ σαν ουσία δείκτης χρησιμοποιείται ο οξεικός μόλυβδος. Το H_2S που παράγεται αντιδρά με τον οξεικό μόλυβδο και σχηματίζεται θειούχος μόλυβδος ο οποίος έχει μαύρο χρώμα.

Ο οξεικός μόλυβδος είναι δυνατόν να ενσωματωθεί στο υλικό σε τελική συγκέντρωση 0,05% ή να παρασκευασθεί σε διάλυμα 10%. Μία μικρή ταινία διηθητικού χαρτιού εμβαπίζεται στο διάλυμα 10% οξεικού μολύβδου, αφήνεται να στεγνώσει και τοποθετείται στο σωληνάριο το οποίο περιέχει το υλικό Tryptose άγαρ σε λοξή θέση. Η ταινία δεν πρέπει να αγγίζει την επιφάνεια του υλικού στην οποία εμβολιάζεται το στέλεχος. Για τον σκοπό αυτό το ένα άκρο της ταινίας συγκρατείται ανάμεσα στο κάλυμα και την εσωτερική επιφάνεια του ανοικτού άκρου του σωληναρίου, ενώ το υπόλοιπο μέρος της ταινίας αιωρείται μέσα στο σωληνάριο σε μικρή απόσταση από την επιφάνεια του υλικού.

Οι ταινίες διηθητικού χαρτιού που έχουν εμβαπτισθεί σε διάλυμα οξεικού μολύβδου είναι πολύ πιο ευαίσθητες για την ανίχνευση της παραγωγής H_2S από την ενσωμάτωση του οξεικού μολύβδου στο υλικό, ενώ ταυτόχρονα αποφεύγεται η τοξική δράση του οξεικού μολύβδου στα κύτταρα του μικροβίου.

β) Μέθοδος 1.

- Ανίχνευση της παραγωγής υδροθείου από τα Εντεροβακτηριοειδή.
- Το στέλεχος εμβολιάζεται στο υλικό Kligler και επωάζεται στους 37°C επί 24 - 48 ώρες.
- Η εμφάνιση μαύρου χρώματος στην ευθεία στήλη του υλικού σημαίνει ότι το μικρόβιο παράγει H_2S .
- Στο υλικό Kligler ελέγχεται ταυτόχρονα η ζύμωση της γλυκόζης και η παραγωγή αερίου στην ευθεία στήλη του υλικού και η ζύμωση της λακτόζης στη λοξή θέση του υλικού.

γ) Σημείωση.

Το υλικό Kligler έχει την ακόλουθη σύνθεση:

Πεπτόνη	20 g
Εκχύλισμα κρέατος	3 g
Εκχύλισμα ζυμομυκήτων	3 g
Λακτόζη	10 g
Γλυκόζη	1 g
NaCl	5 g
Θειικός εναμμώνιος σίδηρος	0,2 g
Θειοθειικό νάτριο	0,3 g
Άγαρ	12 g
Ερυθρό της φαινόλης	0,025 g
Απεσταγμένο νερό	1000 ml

pH = 7,4

Το υλικό αποστειρώνεται στους 121° C επί 15 λεπτά και μετά διαμοιράζεται σε αποστειρωμένα σωληνάκια. Τα σωληνάκια τοποθετούνται σε λοξή θέση στη θερμοκρασία του δωματίου μέχρι να πήξει το υλικό.

δ) Μέθοδος 2.

- Ανίχνευση της παραγωγής υδροθείου από τις Βρουκέλλες.
- Το στέλεχος εμβολιάζεται σε σωληνάριο το οποίο περιέχει το υλικό Tryptose άγαρ σε λοξή θέση.

– Μέσα στο σωληνάριο τοποθετείται μία μικρή ταινία διηθητικού χαρτιού η οποία έχει εμβαπτισθεί σε διάλυμα 10% οξεικού μολύβδου. Λαμβάνεται πρόνοια ώστε η ταινία να μην αγγίζει την επιφάνεια του υλικού αλλά να αιωρείται μέσα στο σωληνάριο.

– Το σωληνάριο επωάζεται στους 37°C και σε ατμόσφαιρα 10% CO₂ επί 4 ημέρες.

– Το σωληνάριο εξετάζεται κάθε ημέρα για να διαπιστωθεί η ανάπτυξη του στελέχους και η παραγωγή H₂S. Μετά την εξέταση του σωληναρίου και αν δεν έχει παραχθεί H₂S, αφαιρείται η παλιά και τοποθετείται νέα ταινία διηθητικού χαρτιού η οποία έχει εμβαπτισθεί σε διάλυμα 10% οξεικού μολύβδου.

– Αν το στέλεχος παράγει H₂S η ταινία εμφανίζει μαύρο χρώμα.

2.1.22 Ρευστοποίηση της πηκτής.

α) Γενικά.

Η πηκτή (ζελατίνη) είναι προϊόν που λαμβάνεται από τη μερική υδρόλυση του κολλαγόνου του δέρματος, του συνδετικού ιστού και των οστών των ζώων και έχει μικρή θρεπτική αξία για τα βακτήρια.

Το διάλυμα της πηκτής σε νερό έχει την χαρακτηριστική ιδιότητα να πήζει σε θερμοκρασία κάτω από 25°C, ενώ σε θερμοκρασία μεγαλύτερη από τους 25°C είναι σε υγρή κατάσταση.

Ο έλεγχος της ικανότητας ενός στελέχους να ρευστοποιεί την πηκτή αποτελεί μία από τις δοκιμασίες που χρησιμοποιούνται για την τυποποίηση των βακτηρίων, π.χ. ο *Proteus mirabilis* και ο *Proteus vulgaris* ρευστοποιούν την πηκτή, ενώ τα άλλα είδη Πρωτέως δεν έχουν αυτήν την ιδιότητα.

Η δοκιμασία ρευστοποίησης της πηκτής γίνεται σε θρεπτικό ζωμό ο οποίος περιέχει 12% πηκτή.

Θρεπτικός ζωμός	1000 ml
Πηκτή	120 g

Το υλικό μοιράζεται σε σωληνάκια και αποστειρώνεται στους 121°C για 12 λεπτά. Στη θερμοκρασία του δωματίου (< 25°C) το υλικό βρίσκεται σε στερεή κατάσταση.

β) Μέθοδος.

– Το στέλεχος εμβολιάζεται με ευθύ μικροβιολογικό κρίκο στο υλικό με την πηκτή και επωάζεται στους 37°C επί 14 ημέρες.

– Κάθε 2 - 3 ημέρες το σωληνάριο με την καλλιέργεια του στελέχους τοποθετείται στο ψυγείο (4°C) επί 2 ώρες και μετά εξετάζεται για να διαπιστωθεί η ρευστοποίηση της πηκτής.

– Αν το στέλεχος ρευστοποιεί την πηκτή (θετική αντίδραση) το υλικό δεν θα πήξει όταν τοποθετηθεί στο ψυγείο.

– Αν το στέλεχος δεν ρευστοποιεί την πηκτή (αρνητική αντίδραση) το υλικό θα πήξει όταν τοποθετηθεί στο ψυγείο.

– Πάντοτε πρέπει να χρησιμοποιείται σαν μάρτυρας ένα σωληνάριο το οποίο περιέχει το υλικό με την πηκτή αλλά δεν εμβολιάζεται με στέλεχος μικροβίου. Το

υλικό στο σωληνάριο αυτό πρέπει να είναι σε υγρή κατάσταση στους 37°C και να πήξει στη θερμοκρασία του ψυγείου (4°C).

2.1.23 Υδρόλυση της αισκουλίνης σε υλικό με χολή.

α) Γενικά.

Η αισκουλίνη είναι μία γλυκοσίδη. Γλυκοσίδες είναι ενώσεις οι οποίες διασπώνται με φυράματα ή με χημικά μέσα σε ένα ή περισσότερα μόρια σακχάρου (συνήθως γλυκόζης, αλλά και γαλακτόζης, ραμνόζης, μαννόζης, αραβινόζης κλπ.) και σε μια ή περισσότερες ενώσεις της αλειφατικής ή αρωματικής σειράς, οι οποίες γενικά καλούνται άγλυκα.

Το υλικό που χρησιμοποιείται για τον έλεγχο της υδρολύσεως της αισκουλίνης έχει την ακόλουθη σύνθεση:

Εκχύλισμα κρέατος	3 g
Πεπτόνη	5 g
Άγαρ	15 g
Ταυροχολικό νάτριο	40 g
Κιτρικός σίδηρος	0,5 g
Απεσταγμένο νερό	1000 ml

Τα τρία πρώτα συστατικά διαλύονται σε 400 ml απεσταγμένου νερού, το ταυροχολικό νάτριο σε 400 ml και ο κιτρικός σίδηρος σε 150 ml απεσταγμένου νερού. Τα τρία διαλύματα αναμιγνύονται και αποστειρώνονται στους 121°C επί 15 λεπτά. Όταν η θερμοκρασία του υλικού κατεβεί στους 50°C προστίθεται διάλυμα 1 g αισκουλίνης σε 100 ml απεσταγμένου νερού το οποίο έχει προηγουμένως αποστειρωθεί με διήθηση. Το υλικό αναμιγνύεται ελαφρά και μοιράζεται σε σωληνάρια. Τα σωληνάρια τοποθετούνται σε λοξή θέση και αφήνονται στη θερμοκρασία δωματίου μέχρι να πήξει το υλικό.

β) Μέθοδος.

Το στέλεχος που πρόκειται να εξετασθεί εμβολιάζεται σε ένα σωληνάριο με το υλικό και επωάζεται στους 37°C επί 18 - 24 ώρες.

— Αν το αποτέλεσμα είναι θετικό (δηλαδή το στέλεχος υδρολύει την αισκουλίνη στο υλικό με το χολικό άλας) εμφανίζεται μαύρο ίζημα.

— Το μαύρο ίζημα οφείλεται στην υδρόλυση της αισκουλίνης και την παραγωγή ενός αγλύκου, της 6:7 - διϋδροξυκουμαρίνης, η οποία αντιδρά με τον σίδηρο του κιτρικού σιδήρου και σχηματίζεται ένωση η οποία έχει μαύρο χρώμα.

2.2 Τεχνικές.

2.2.1 Μέθοδοι ελέγχου της ευαισθησίας των βακτηρίων στα χημειοθεραπευτικά.

α) Γενικά.

Η απομόνωση των βακτηρίων από κλινικά υλικά, η τυποποίησή τους και ο έλεγ-

χος της ευαισθησίας τους στα χημειοθεραπευτικά αποτελούν το μεγαλύτερο μέρος της εργασίας ενός διαγνωστικού Μικροβιολογικού εργαστηρίου. Κάθε στέλεχος βακτηρίου το οποίο απομονώνεται από μία λοίμωξη πρέπει να ελέγχεται για να διαπιστωθεί η ευαισθησία του στα διάφορα χημειοθεραπευτικά. Η καλή εκτέλεση των μεθόδων ελέγχου της ευαισθησίας στα χημειοθεραπευτικά και η σωστή ερμηνεία των αποτελεσμάτων βοηθούν σημαντικά στην επιτυχή αντιμετώπιση μιας λοιμώξεως.

Με τον όρο **Χημειοθεραπευτικά** ορίζονται ουσίες οι οποίες παρασκευάζονται συνθετικά, καταστρέφουν ή αναστέλλουν την ανάπτυξη των μικροβίων και χορηγούνται στον άνθρωπο ή τα ζώα για την θεραπεία των λοιμώξεων.

Αντιβιοτικά καλούνται ουσίες οι οποίες παράγονται από μικροοργανισμούς και καταστρέφουν ή αναστέλλουν την ανάπτυξη των μικροβίων. Χορηγούνται στον άνθρωπο ή τα ζώα για τη θεραπεία των λοιμώξεων. Η παρασκευή πολλών αντιβιοτικών γίνεται σήμερα συνθετικά και γι' αυτό ο όρος χημειοθεραπευτικά έχει ευρύτερη έννοια και περιλαμβάνει και τα αντιβιοτικά.

Ο έλεγχος της ευαισθησίας στα χημειοθεραπευτικά γίνεται με δύο μεθόδους, τη μέθοδο των **δίσκων** και τη μέθοδο των **αραιώσεων** του χημειοθεραπευτικού σε σωληνάρια.

β) Μέθοδος των δίσκων.

Η μέθοδος των δίσκων είναι απλούστερη από τη μέθοδο των σωληναρίων και χρησιμοποιείται σε μεγαλύτερη κλίμακα στο διαγνωστικό εργαστήριο. Η μέθοδος στηρίζεται στην ακόλουθη αρχή. Καλλιέργεια σε ζυμό του στελέχους που πρόκειται να εξετασθεί, εμβολιάζεται με βαμβακοφόρο στυλεό στην επιφάνεια στερεού θρεπτικού υλικού. Στην επιφάνεια του στερεού θρεπτικού υλικού τοποθετούνται δίσκοι από διηθητικό χαρτί που έχουν διάμετρο 6mm. Ο κάθε δίσκος είναι εμποτισμένος με διαφορετικό χημειοθεραπευτικό. Στο διάστημα της επώασης στους 37°C το στέλεχος αναπτύσσεται και σχηματίζει τάπητα στην επιφάνεια του υλικού. Ταυτόχρονα, διαχέονται από τους δίσκους τα χημειοθεραπευτικά στο θρεπτικό υλικό. Αν το στέλεχος είναι ευαίσθητο σε ένα χημειοθεραπευτικό δεν παρατηρείται ο σχηματισμός τάπητα σε μία περιοχή γύρω από τον δίσκο του συγκεκριμένου χημειοθεραπευτικού. Η περιοχή αυτή στην οποία δεν παρατηρείται ανάπτυξη του στελέχους, είναι κυκλική, έχει κέντρο το δίσκο του χημειοθεραπευτικού και καλείται ζώνη αναστολής. Η διάμετρος της ζώνης αναστολής, στην οποία περιλαμβάνεται και η διάμετρος του δίσκου, είναι ανάλογη με την ευαισθησία του στελέχους στο χημειοθεραπευτικό. Αν το στέλεχος είναι ανθεκτικό σε ένα χημειοθεραπευτικό δεν παρατηρείται ζώνη αναστολής γύρω από τον δίσκο του συγκεκριμένου χημειοθεραπευτικού.

Στο σημείο αυτό πρέπει να τονισθεί ότι για να χαρακτηριστεί ένα στέλεχος ευαίσθητο σε ένα χημειοθεραπευτικό δεν αρκεί μόνον η δημιουργία ζώνης αναστολής αλλά ταυτόχρονα πρέπει η διάμετρος της ζώνης αναστολής να υπερβαίνει ένα ελάχιστο όριο το οποίο είναι χαρακτηριστικό για μια καθορισμένη ποσότητα του κάθε χημειοθεραπευτικού.

Ο χαρακτηρισμός ενός στελέχους σαν ευαίσθητο ή ανθεκτικό στα διάφορα χημειοθεραπευτικά γίνεται με την βοήθεια του πίνακα που ακολουθεί.

Πίνακας για την ερμηνεία των ζωνών αναστολής.

Αντιβιοτικό		Περιεκτικότητα του δίσκου	Διάμετρος της ζώνης αναστολής σε mm	
			Ανθεκτικό	Ευαίσθητο
Ampicillin	Gram- αρνητικά βακτηρίδια και Εντερόκοκκοι. Σταφυλόκοκκοι και άλλα βακτήρια ευαίσθητα στην Πενικιλίνη G Αιμόφιλοι Κολοβακτηρίδιο, Πρωτεΐς P. aeruginosa Σταφυλόκοκκοι Άλλα βακτήρια	10μg	11 ή < 11	14 ή > 14
Bacitracin		10 μονάδες	20 ή < 20	29 ή > 29
Carbenicillin		50μg	19 ή < 19	20 ή > 20
Cephalothin ¹		30μg	8 ή < 8	13 ή > 13
Chloramphenicol		30μg	17 ή < 17	23 ή > 23
Clindamycin ²		2μg	12 ή < 12	15 ή > 15
Colistin		10μg	14 ή < 14	18 ή > 18
Erythromycin		15μg	12 ή < 12	18 ή > 18
Gentamicin		10μg	12 ή < 12	13 ή > 13
Kanamycin		30μg	13 ή < 13	18 ή < 18
Methicillin ³		5μg	9 ή < 9	14 ή > 14
Neomycin		30μg	12 ή < 12	17 ή > 17
Novobiocin		30μg	17 ή < 17	22 ή > 22
Oleandomycin		15μg	11 ή < 11	17 ή > 17
Penicillin G		10 μονάδες	20 ή < 20	29 ή > 29
Polymyxin B		300 μονάδες	11 ή < 11	22 ή > 22
Streptomycin		10μg	8 ή < 8	12 ή > 12
Tetracycline ⁴		30μg	11 ή < 11	15 ή > 15
Vancomycin		30μg	14 ή < 14	19 ή > 19
				9 ή < 9
Χημειοθεραπευτικό				
Nalidixic acid ⁵		30μg	13 ή < 13	19 ή > 19
Nitrofurantoin ⁵		300μg	14 ή < 14	17 ή > 17
Sulfonamides ⁵		250 - 300μg	12 ή < 12	17 ή > 17
Sulfonamide-Trimethoprim ⁵		25μg	10 ή < 10	16 ή > 16

1. Τα ίδια ισχύουν και για τις άλλες κεφαλοσπορίνες, δηλαδή cephaloridine, cephalixin, cephaloglycin.
2. Τά ίδια ισχύουν και για την lincosycin.
3. Τά ίδια ισχύουν και για την cloxacillin, dicloxacillin, oxacillin και nafcillin.
4. Τά ίδια ισχύουν και για όλες τις άλλες τετρακυκλίνες, δηλαδή chlortetracycline, demeclocyclin, doxycycline και oxytetracycline.
5. Χρησιμοποιούνται μόνον σε λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος.

Ο έλεγχος της ευαισθησίας στα χημειοθεραπευτικά γίνεται στο υλικό Mueller - Hinton άγαρ το οποίο έχει την ακόλουθη σύνθεση:

Εκχύλισμα κρέατος	5 g
Καζεΐνη	17.5 g
Άμυλο	1.5 g
Άγαρ	17 g
Απεσταγμένο νερό	1000 ml

pH = 7.4

Το υλικό αποστειρώνεται στους 121°C επί 15' λεπτά και μοιράζεται σε αποστειρωμένα τρυβλία ώστε να σχηματισθεί στιβάδα που να έχει ύψος 5 - 6mm. Τα τρυβλία με το υλικό μπορούν να χρησιμοποιηθούν μέχρι τέσσερις ημέρες από την ημέρα που θα παρασκευασθούν.

Τεχνική.

— Από 24ωρο καλλιέργημα του στελέχους που πρόκειται να εξετασθεί λαμβάνονται 3 - 10 αποικίες και εμβολιάζονται σε σωληνάριο με 4ml Trypticase Soy ζυμό.

— Το σωληνάριο επωάζεται στους 37°C επί 2 - 5 ώρες μέχρι να εμφανισθεί μετρια θολερότητα.

— Η θολερότητα του καλλιεργήματος πρέπει να είναι η ίδια με την θολερότητα ενός διαλύματος που παρασκευάζεται από την προσθήκη 0,5 ml διαλύματος 1% BaCl₂ σε 99,5ml διαλύματος 1% H₂SO₄. Αν η θολερότητα του καλλιεργήματος είναι μεγαλύτερη από την θολερότητα του διαλύματος, το καλλιέργημα αραιώνεται με αποστειρωμένα φυσιολογικό ορό μέχρι να αποκτήσει την ίδια θολερότητα με το διάλυμα.

— Η καλλιέργεια στο ζυμό επιστρώνεται με βαμβακοφόρο στυλεό στην επιφάνεια του τρυβλίου που περιέχει το υλικό Mueller - Hinton άγαρ.

— Μετά από 5 λεπτά τοποθετούνται στην επιφάνεια του υλικού οι δίσκοι ευαισθησίας, δηλαδή οι δίσκοι διηθητικού χαρτιού που ο κάθε ένας είναι εμποτισμένος με διαφορετικό χημειοθεραπευτικό. Η τοποθέτηση των δίσκων γίνεται με λαβίδα η οποία αποστειρώνεται επάνω από φλόγα. Οι δίσκοι πιέζονται ελαφρά με την λαβίδα ώστε να έλθουν σε πλήρη επαφή με το υλικό.

— Τα τρυβλία επωάζονται στους 37°C επί 18 - 24 ώρες.

— Μετράται η διάμετρος της ζώνης αναστολής γύρω από τον κάθε δίσκο και καθορίζεται η ευαισθησία του στελέχους στο κάθε χημειοθεραπευτικό με βάση τον πίνακα για την ερμηνεία των ζωνών αναστολής.

Ανάλογα με το είδος του βακτηρίου που εξετάζεται χρησιμοποιούνται τα ακόλουθα χημειοθεραπευτικά.

<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Εντερόκοκκοι</i>	<i>Εντεροβακτηριοειδή</i>	<i>Ψευδομονάδες</i>
1. Penicillin G	1. Penicillin G	1. Ampicillin	1. Gentamicin
2. Oxacillin ή Methicillin	2. Ampicillin	2. Cephalothin	2. Carbenicillin
3. Cephalothin	3. Cephalothin	3. Kanamycin	3. Polymyxin B
4. Erythromycin	4. Erythromycin	4. Gentamicin	4. Kanamycin ^γ
5. Clindamycin	5. Chloramphenicol ^α	5. Polymyxin B	5. Chloramphenicol ^γ
6. Chloramphenicol ^α	6. Tetracycline ^α	6. Tetracycline	6. Tetracycline ^γ
7. Tetracycline ^α		7. Chloramphenicol	7. Sulfonamides ^{β,γ}
8. Gentamicin ^α		8. Nitrofurantoin ^β	
9. Kanamycin ^α		9. Nalidixic acid ^β	
		10. Sulfonamides ^β	

α. Χρησιμοποιούνται μόνο σε δεύτερη φάση και αν η λοίμωξη δεν έχει υποχωρήσει με τα άλλα χημειοθεραπευτικά.

β. Χρησιμοποιούνται μόνον για στελέχη τα οποία απομονώνονται από λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος.

γ. Χρησιμοποιούνται για στελέχη τα οποία ανήκουν σε διάφορα είδη Ψευδομονάδων εκτός από την *P. aeruginosa*.

γ) Σημείωση.

Οι δίσκοι των χημειοθεραπευτικών φέρονται σήμερα έτοιμοι στο εμπόριο. Οι δίσκοι πρέπει να διατηρούνται σε φιαλίδια μέσα στο ψυγείο (4°C). Δίσκοι οι οποίοι περιέχουν πενικιλλίνες ή κεφαλοσπορίνες πρέπει να διατηρούνται στην κατάψυξη (-14°C). Οι ίδιοι δίσκοι είναι δυνατόν να διατηρηθούν και στη θερμοκρασία του ψυγείου (4°C), αλλά σε αυτήν την περίπτωση χρησιμοποιούνται μόνο για μία εβδομάδα από την ημέρα που θα τοποθετηθούν στο ψυγείο.

δ) Μέθοδος των αραιώσεων του χημειοθεραπευτικού σε σωληνάρια.

Η μέθοδος των αραιώσεων του χημειοθεραπευτικού σε σωληνάρια χρησιμοποιείται για να προσδιορισθεί με ακρίβεια η ελάχιστη πυκνότητα του χημειοθεραπευτικού η οποία αναστέλλει ή φονεύει έναν μικροοργανισμό. Η μικρότερη πυκνότητα του χημειοθεραπευτικού η οποία αναστέλλει την ανάπτυξη ενός μικροοργανισμού καλείται **ελάχιστη ανασταλτική πυκνότητα** ή διεθνώς MIC, από τις λέξεις Minimal Inhibitory Concentration. Η μικρότερη πυκνότητα του χημειοθεραπευτικού η οποία φονεύει έναν μικροοργανισμό καλείται **ελάχιστη βακτηριοκτόνος πυκνότητα** ή διεθνώς MBC από τις λέξεις Minimal Bactericidal Concentration.

Η μέθοδος των αραιώσεων δεν αποτελεί καθημερινή πράξη στο διαγνωστικό εργαστήριο, αλλά χρησιμοποιείται μόνο σε περιπτώσεις στις οποίες πρέπει να υπολογισθεί με ακρίβεια η ελάχιστη ανασταλτική πυκνότητα ενός χημειοθεραπευτικού για ένα συγκεκριμένο βακτήριο.

Τα χημειοθεραπευτικά φέρονται στο εμπόριο σε σωληνάρια με τη μορφή σκόνης. Σε κάθε σωληνάριο χημειοθεραπευτικού αναγράφεται η δραστική ποσότητα του χημειοθεραπευτικού η οποία περιέχεται στο 1mg σκόνης του χημειοθεραπευτικού. Για την παρασκευή του αρχικού διαλύματος του χημειοθεραπευτικού πρέπει να υπολογίζεται η δραστική του ποσότητα. Έτσι π.χ. αν 1 μg σκόνης χημειοθεραπευτικού ισοδυναμεί με 590 μg δραστικής ποσότητας του χημειοθεραπευτικού τότε τα 50 μg της σκόνης ισοδυναμούν με 29.500 μg δραστικής ποσότητας του χημειοθεραπευτικού. Στην περίπτωση αυτή για να παρασκευασθεί διάλυμα χημειοθεραπευτικού σε νερό το οποίο να έχει περιεκτικότητα 1000 μg/ml πρέπει τα 50 μg της σκόνης (δηλαδή τα 29.500 μg δραστικής ποσότητας) να διαλυθούν σε 29.5 ml νερού.

Τα περισσότερα χημειοθεραπευτικά διαλύονται σε αποστειρωμένο απεσταγμένο νερό. Ορισμένα χημειοθεραπευτικά πρέπει πρώτα να διαλυθούν σε ένα άλλο διαλύτη (π.χ. αιθυλική αλκοόλη) και μετά να συμπληρωθεί ο όγκος τους με νερό. Τα αρχικά διαλύματα του χημειοθεραπευτικού παρασκευάζονται συνήθως σε τελική πυκνότητα 1000 μg/ml και διατηρούνται στη κατάψυξη (-20°C μέχρι και -60°C) για αρκετούς μήνες χωρίς να χάνουν την δραστικότητά τους. Από τα αρχικά διαλύματα παρασκευάζονται τα διαλύματα εργασίας του χημειοθεραπευτικού.

Τεχνική.

— Το στέλεχος που πρόκειται να εξετασθεί εμβολιάζεται σε σωληνάριο το οποίο περιέχει 5 ml Trypticase Soy ζωμό και επώαζεται στους 37°C επί 18 - 24 ώρες.

— Το καλλιέργημα στο ζωμό αραιώνεται 1:1000 με Trypticase Soy ζωμό ώστε να περιέχει 10^5 - 10^6 ζωντανά κύτταρα στο 1ml.

– Σε ένα στατώ τοποθετούνται 12 μικρά αποστειρωμένα σωληνάκια. Σε όλα τα σωληνάκια εκτός από το πρώτο μεταφέρεται 1ml Trypticase Soy ζυμός.

– Από το αρχικό διάλυμα του χημειοθεραπευτικού παρασκευάζεται με αραιώση το διάλυμα εργασίας του χημειοθεραπευτικού. Η τελική συγκέντρωση του χημειοθεραπευτικού στο διάλυμα εργασίας πρέπει να είναι διπλάσια από την μεγαλύτερη συγκέντρωση η οποία θα χρησιμοποιηθεί. Συνήθως η μεγαλύτερη συγκέντρωση που χρησιμοποιείται είναι 100 µg/ml. Έτσι π.χ. αν το αρχικό διάλυμα έχει τελική συγκέντρωση 1000 µg/ml, παρασκευάζεται διάλυμα εργασίας το οποίο έχει τελική συγκέντρωση 200 µg/ml.

– Από το διάλυμα εργασίας (200 µg/ml) 2 ml μεταφέρονται στο πρώτο σωληνάριο.

– Με μία αποστειρωμένη πιπέττα 1ml από το αρχικό σωληνάριο μεταφέρεται στο δεύτερο σωληνάριο.

– Με μία άλλη πιπέττα αναμιγνύεται το 1ml του ζυμού με το 1ml του διαλύματος του χημειοθεραπευτικού που μεταφέρθηκε από το πρώτο σωληνάριο. Με την ίδια πιπέττα 1ml από το δεύτερο σωληνάριο μεταφέρεται στο τρίτο σωληνάριο. Η ίδια διαδικασία επαναλαμβάνεται μέχρι το ενδέκατο σωληνάριο, αλλάζοντας κάθε φορά πιπέττα. Όλα τα σωληνάκια στη φάση αυτή έχουν τον ίδιο όγκο, δηλαδή 1 ml εκτός από το ενδέκατο σωληνάριο το οποίο έχει 2 ml.

– Από την καλλιέργεια του στελέχους η οποία έχει αραιωθεί 1:1000 μεταφέρεται 1 ml σε όλα τα σωληνάκια εκτός από το ενδέκατο. Στη φάση αυτή όλα τα σωληνάκια έχουν 2 ml.

– Το ενδέκατο σωληνάριο το οποίο δεν περιέχει καλλιέργημα του μικροβίου χρησιμεύει σαν μάρτυρας του αντιβιοτικού και το δωδέκατο σωληνάριο το οποίο δεν περιέχει αντιβιοτικό χρησιμεύει σαν μάρτυρας του καλλιεργήματος.

– Από την παραπάνω περιγραφή προκύπτει ότι στο πρώτο σωληνάριο περιέχονται 100 µg χημειοθεραπευτικού στο 1 ml, στο δεύτερο 50 µg, στο τρίτο 25 κλπ, μέχρι το δέκατο το οποίο περιέχει 0.19 µg χημειοθεραπευτικού στο 1 ml.

– Τα σωληνάκια επωάζονται στους 37°C επί 18 - 24 ώρες.

– Ελέγχονται τα σωληνάκια για την εμφάνιση θολερότητας. Στο ενδέκατο σωληνάριο, μάρτυρας του χημειοθεραπευτικού, δεν πρέπει να παρατηρηθεί θολερότητα. Στο δωδέκατο σωληνάριο, μάρτυρας του καλλιεργήματος παρατηρείται μεγάλη θολερότητα από την ανάπτυξη του μικροοργανισμού. Ανάλογα με την θολερότητα η οποία παρατηρείται στα υπόλοιπα 10 σωληνάκια βρίσκεται η ελάχιστη ανασταλτική πυκνότητα του χημειοθεραπευτικού για το συγκεκριμένο στέλεχος. Αν π.χ. παρατηρείται θολερότητα στο 10, 9, 8 και 7 σωληνάριο, αλλά δεν παρατηρείται στο 6, 5, 4, 3, 2 και 1 τότε η ελάχιστη ανασταλτική πυκνότητα (MIC) είναι η πυκνότητα του χημειοθεραπευτικού που περιέχεται στο 6 σωληνάριο, δηλαδή 3,12 µg/ml (η μικρότερη πυκνότητα του χημειοθεραπευτικού η οποία αναστέλλει την ανάπτυξη του στελέχους).

– Για να προσδιορισθεί η ελάχιστη βακτηριοκτόνος πυκνότητα (MBC) του χημειοθεραπευτικού για το συγκεκριμένο στέλεχος γίνονται ανακαλλιέργειες σε τρυβλία με Trypticase Soy άγαρ από το σωληνάριο το οποίο περιέχει την ελάχιστη ανασταλτική πυκνότητα (στο παράδειγμα που αναφέρομε το 6 σωληνάριο) και από τα σωληνάκια τα οποία περιέχουν πυκνότητες χημειοθεραπευτικού μεγαλύτερες

από την MIC (στο παράδειγμα που αναφέρομε το 5, 4, 3, 2 και 1 σωληνάριο).

– Τα τρυβλία επωάζονται στους 37°C επί 18 - 24 ώρες.

– Ελέγχονται τα τρυβλία για την ανάπτυξη αποικιών. Ελάχιστη βακτηριοκτόνος πυκνότητα είναι η μικρότερη πυκνότητα του χημειοθεραπευτικού η οποία όταν ανακαλλιεργηθεί στο Trypticase Soy άγαρ δεν θα δώσει ανάπτυξη αποικιών. Στο παράδειγμα που αναφέραμε αν οι ανακαλλιέργειες από τα σωληνάρια 6 και 5 δώσουν ανάπτυξη αποικιών, αλλά οι ανακαλλιέργειες από τα σωληνάρια, 4, 3, 2 και 1 δεν δώσουν ανάπτυξη αποικιών τότε η ελάχιστη βακτηριοκτόνος πυκνότητα του χημειοθεραπευτικού για το συγκεκριμένο στέλεχος είναι η πυκνότητα του χημειοθεραπευτικού που περιέχεται στο 4 σωληνάριο, δηλαδή 12,5 μg/ml (η μικρότερη πυκνότητα του χημειοθεραπευτικού η οποία φονεύει το στέλεχος).

– Πρέπει να σημειωθεί ότι σε ορισμένες περιπτώσεις η MIC είναι η ίδια με την MBC.

2.2.2 Ορολογική τυποποίηση των Βακτηρίων.

α) Γενικά.

Τα στελέχη ορισμένων ειδών βακτηρίων είναι δυνατόν να διακριθούν σε ορολογικούς τύπους ή ορότυπους με βάση την αντιγονική σύσταση του κυτταρικού τους τοιχώματος και την αντιγονική σύσταση των βλεφαρίδων, αν πρόκειται για κινητά βακτήρια.

Η ορολογική τυποποίηση των βακτηρίων γίνεται με τη μέθοδο της συγκολλητινοαντιδράσεως επάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα. Το στέλεχος του μικροβίου που πρόκειται να τυποποιηθεί αναμιγνύεται με γνωστούς διαγνωστικούς συγκολλητικούς ορούς που ο καθένας περιέχει αντισώματα ειδικά για ένα συγκεκριμένο αντιγονικό τύπο κυτταρικού τοιχώματος ή βλεφαρίδων.

Οι διαγνωστικοί συγκολλητικοί οροί παράγονται από την ανοσοποίηση κουνελιών με στελέχη που είναι γνωστή η αντιγονική τους σύσταση. Σήμερα υπάρχουν στο εμπόριο διαγνωστικοί συγκολλητικοί οροί για πολλά είδη βακτηρίων.

Στο διαγνωστικό κλινικό εργαστήριο πολύ συχνή είναι η ορολογική τυποποίηση των Εντεροβακτηριοειδών, και ιδιαίτερα των Σαλμονελλών.

β) Τεχνική.

– Το στέλεχος που πρόκειται να εξετασθεί εμβολιάζεται σε λοξό θρεπτικό άγαρ και επωάζεται στους 37°C επί 18 – 24 ώρες.

– Με μικροβιολογικό κρίκο ένα μέρος της καλλιέργειας στο λοξό θρεπτικό άγαρ μεταφέρεται και εναιωρείται σε 0,5 ml αποστειρωμένου φυσιολογικού ορού. Λαμβάνεται πρόνοια ώστε το εναιώρημα των κυττάρων στον φυσιολογικό ορό να είναι πυκνό.

– Μία σταγόνα από το πυκνό εναιώρημα των κυττάρων τοποθετείται στο ένα άκρο μιας αντικειμενοφόρου πλάκας και μία δεύτερη σταγόνα στο άλλο άκρο της αντικειμενοφόρου πλάκας.

– Στην μία σταγόνα του εναιωρήματος των κυττάρων προστίθεται μία σταγόνα από ένα διαγνωστικό συγκολλητικό ορό και οι δύο σταγόνες αναμιγνύονται με μικροβιολογικό κρίκο.

– Στην άλλη σταγόνα του εναιωρήματος των κυττάρων προστίθεται μία σταγόνα από φυσιολογικό ορό και οι δύο σταγόνες αναμιγνύονται με μικροβιολογικό κρίκο. Κάθε φορά που χρησιμοποιείται ο μικροβιολογικός κρίκος για την ανάμιξη πρέπει να αποστειρώνεται επάνω από φλόγα.

– Η αντικειμενοφόρος πλάκα ανακινείται για λίγα δευτερόλεπτα και ελέγχεται για την εμφάνιση συγκολλησεως (σχηματισμό κροκίδων).

– Αν ο συγκεκριμένος συγκολλητικός ορός περιέχει αντισώματα ειδικά για το στέλεχος που εξετάζεται σχηματίζονται κροκίδες που είναι ορατές με γυμνό μάτι (αντίδραση θετική).

– Αν ο συγκεκριμένος συγκολλητικός ορός δεν περιέχει αντισώματα ειδικά για το στέλεχος που εξετάζεται δεν σχηματίζονται κροκίδες και η αντίδραση χαρακτηρίζεται σαν αρνητική.

– Η σταγόνα του εναιωρήματος των κυττάρων που έχει αναμιχθεί με τον φυσιολογικό ορό χρησιμεύει σαν μάρτυρας και δεν πρέπει να δίνει συγκόλληση.

– Όταν η αντίδραση είναι αρνητική επαναλαμβάνεται η ίδια διαδικασία και με τους άλλους συγκολλητικούς ορούς, οι οποίοι είναι διαθέσιμοι στο εργαστήριο, μέχρι να βρεθεί ο κατάλληλος ορός ο οποίος συγκλλά το στέλεχος.

Το στέλεχος ανήκει σε εκείνο τον ορολογικό τύπο ή ορότυπο του οποίου τα αντισώματα προκαλούν συγκόλληση των κυττάρων του.

2.2.3 Δοκιμασία «εξειδίξεως του ελύτρου».

α) Γενικά.

Ορισμένα είδη βακτηρίων είναι δυνατόν να διακριθούν σε ορολογικούς τύπους ή ορολογικές ομάδες με βάση την αντιγονική σύσταση του ελύτρου το οποίο φέρουν.

Ο *Streptococcus pneumoniae* διακρίνεται σε 84 ορολογικούς τύπους, η *Neisseria meningitidis* σε 4 ορολογικές ομάδες και ο *Haemophilus influenzae* σε 6 ορολογικούς τύπους.

Ο καθορισμός της αντιγονικής συστάσεως του ελύτρου ενός βακτηρίου επιτυγχάνεται με την δοκιμασία «εξειδίξεως του ελύτρου» και χρησιμεύει κυρίως για επιδημιολογικούς σκοπούς.

Σήμερα φέρονται έτοιμοι στο εμπόριο αντιορόι ειδικοί για τον κάθε αντιγονικό τύπο ή αντιγονική ομάδα του ελύτρου των διαφόρων βακτηρίων. Όταν αναμιχθεί εναιώρημα κυττάρων ενός ελυτροφόρου στελέχους με τον ειδικό ορό, δηλαδή με ορό ο οποίος περιέχει αντισώματα εναντίον του ελύτρου του συγκεκριμένου στελέχους, τα αντισώματα ενώνονται με το έλυτρο και σχηματίζεται ίζημα στην περιφέρεια των κυττάρων. Κατά την μικροσκόπηση φαίνεται ότι τα κύτταρα περιβάλλονται από μία στεφάνη η οποία διαχωρίζεται σαφώς από το μικροβιακό σώμα. Αυτό οφείλετε στη διαφορετική διαθλαστική ικανότητα του ιζήματος από την διαθλαστική ικανότητα του εναιωρήματος των κυττάρων. Έτσι στην πραγματικότητα δεν πρόκειται για «εξειδίξη του ελύτρου» αλλά για το σχηματισμό ιζήματος στην περιφέρεια του κυττάρου από την ένωση των ειδικών αντισωμάτων με το έλυτρο.

β) Τεχνική.

– Μία αποικία του στελέχους εναιωρείται σε μία σταγόνα φυσιολογικού ορού

επάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα και αφήνεται να στεγνώσει στη θερμοκρασία δωματίου.

– Με μικροβιολογικό κρίκο που φέρει οπή τοποθετείται μία σταγόνα υδατικού διαλύματος 1% κυανού του μεθυλενίου σε μία καλυπτρίδα.

– Με μικροβιολογικό κρίκο που φέρει οπή τοποθετείται μία σταγόνα αντιορού επάνω στην σταγόνα του εναιωρήματος των κυττάρων της αποικίας που έχει στεγνώσει στην αντικειμενοφόρο πλάκα.

– Ο αντιορός που μένει στον κρίκο αναμιγνύεται με την σταγόνα του κυανού του μεθυλενίου επάνω στην καλυπτρίδα και μετά αναμιγνύεται πάλι με τον αντιορό που έχει τοποθετηθεί στην αντικειμενοφόρο πλάκα.

– Η επιφάνεια της καλυπτρίδας που φέρει το κυανούν του μεθυλενίου τοποθετείται επάνω στο παρασκεύασμα στην αντικειμενοφόρο πλάκα και πιέζεται ελαφρά.

– Μία σταγόνα κεдрέλαιο τοποθετείται στην καλυπτρίδα και το παρασκεύασμα μικροσκοπείται.

– Αν η αντίδραση είναι θετική (δηλαδή, τα αντισώματα του ορού είναι ειδικά για το ελύτρο του στελέχους) τα μικροβιακά κύτταρα περιβάλλονται από μία στεφάνη η οποία διαχωρίζεται σαφώς από το μικροβιακό σώμα, («ξοίδηση του ελύτρου»).

γ) Σημειώσεις.

– Το κυανούν του μεθυλενίου χρησιμοποιείται για να χρωματίσει ελαφρά το οπτικό πεδίο και να γίνει πιο σαφής η αντίδραση.

– Η δοκιμασία είναι δυνατόν να γίνει και με κλινικό υλικό (π.χ. πτύελα ή εγκεφαλονωτιαίο υγρό).

– Η δοκιμασία «ξοιδήσεως του ελύτρου» δεν χρησιμοποιείται για στελέχη *N. meningitidis* τα οποία ανήκουν στην ομάδα Β. Στην περίπτωση αυτή χρησιμοποιείται συγκολλητινοαντίδραση για την ορολογική τυποποίηση του στελέχους.

2.2.4 Ορολογική τυποποίηση των στρεπτοκόκκων κατά Lancefield.

α) Γενικά.

Οι β - αιμολυτικοί στρεπτόκοκκοι διαχωρίζονται σε ορολογικές ομάδες, από Α μέχρι Τ, με βάση το πολυσακχαριδικό αντιγόνο C (Carbohydrate) που βρίσκεται στο κυτταρικό τους τοίχωμα. Ο προσδιορισμός της ορολογικής ομάδας στην οποία ανήκει ένα στέλεχος β - αιμολυτικού στρεπτόκοκκου γίνεται με ιζηματοαντίδραση σε τριχοειδές σωληνάριο και καλείται ορολογική τυποποίηση κατά Lancefield.

Ο προσδιορισμός της ορολογικής ομάδας αποτελεί την μόνη μέθοδο για την τυποποίηση των στελεχών του β - αιμολυτικού στρεπτόκοκκου τα οποία απομονώνονται στο κλινικό εργαστήριο και έχει ιδιαίτερη σημασία για την τυποποίηση με ακρίβεια των β - αιμολυτικών στρεπτοκόκκων της ομάδας Α (*Str. pyogenes*) οι οποίοι αποτελούν το συχνότερο αίτιο των στρεπτοκοκκικών λοιμώξεων.

Για να γίνει η ορολογική τυποποίηση χρειάζονται το πολυσακχαριδικό αντιγόνο C του στελέχους που πρόκειται να τυποποιηθεί και οι οροί οι οποίοι περιέχουν αντισώματα ειδικά για την κάθε ομάδα πολυσακχαριδικού αντιγόνου. Οι οροί φέρον-

ται έτοιμοι στο εμπόριο, ενώ το πολυσακχαριδικό αντιγόνο παραλαμβάνεται με ειδική μέθοδο από τα κύτταρα του στελέχους.

Μέθοδος παραλαβής του πολυσακχαριδικού αντιγόνου.

Χρησιμοποιείται η μέθοδος της εκχυλίσεως του αντιγόνου με διάλυμα οξέος στη θερμοκρασία των 100°C.

– Το στέλεχος εμβολιάζεται σε σωληνάριο που περιέχει 30ml ζυμό Todd - Hewitt και επωάζεται στους 37°C επί 18 – 24 ώρες.

– Η καλλιέργεια του στελέχους στο ζυμό φυγοκεντρείται (1500xg) για 15 λεπτά.

– Μετά την φυγοκέντρηση το υπερκείμενο απορρίπτεται.

– Στο ίζημα των κυττάρων προστίθεται μία σταγόνα από διάλυμα 0,04% του δείκτη ερυθρό της μετακρεζόλης και 0,3 ml από διάλυμα 0,2 N HCl. Το σωληνάριο ανακινείται και το περιεχόμενό του μεταφέρεται σε άλλο μικρό σωληνάριο. Το χρώμα του εναιωρήματος των κυττάρων πρέπει να είναι ροδόχρουν (pH 2 – 2,4).

– Το σωληνάριο τοποθετείται σε υδατόλουτρο το οποίο έχει θερμοκρασία 100°C επί 10 λεπτά και ανακινείται κατά διαστήματα.

– Το σωληνάριο αφήνεται να κρυώσει σε ψυχρό υδατόλουτρο επί 10 λεπτά και μετά φυγοκεντρείται.

– Μετά τη φυγοκέντρηση το υπερκείμενο (εκχύλισμα) μεταφέρεται σε ένα άλλο σωληνάριο ενώ το ίζημα απορρίπτεται.

– Στο σωληνάριο με το εκχύλισμα προστίθενται σταγόνες από διάλυμα 0,2 N NaOH μέχρι να γίνει η αντίδραση του εκχυλίσματος αλκαλική (pH 7,4 – 7,8), δηλαδή μέχρι να λάβει ο δείκτης ελαφρώς ερυθροϊώδες χρώμα.

– Το εκχύλισμα φυγοκεντρείται για να διαυγασθεί και το διαυγές υπερκείμενο που περιέχει το πολυσακχαριδικό αντιγόνο χρησιμοποιείται για την ορολογική τυποποίηση.

β) Τεχνική.

– Ένα τριχοειδές σωληνάριο βυθίζεται σε ένα από τους αντιορούς μέχρι να παραληφθεί ποσότητα η οποία να έχει ύψος 1 cm. Το εξωτερικό μέρος του σωληναρίου καθορίζεται προσεκτικά με βαμβάκι.

– Το τριχοειδές βυθίζεται στο εκχύλισμα του αντιγόνου και παραλαμβάνεται ποσότητα ίση με την ποσότητα του αντιορού. Μεταξύ του αντιορού και του εκχυλίσματος δεν πρέπει να υπάρχει φυσαλίδα αέρα. Το εξωτερικό μέρος του σωληναρίου καθαρίζεται προσεκτικά με βαμβάκι.

– Το κάτω άκρο του τριχοειδούς (με το εκχύλισμα) πιέζεται ελαφρά σε ταινία πλαστελίνης έτσι ώστε ένα μικρό έμβολο πλαστελίνης να κλείσει το κάτω στόμιο του τριχοειδούς.

– Το τριχοειδές αναστρέφεται και το άλλο άκρο του (με τον αντιορό) στηρίζεται σε κάθετη θέση επάνω σε ταινία πλαστελίνης.

– Η ίδια διαδικασία επαναλαμβάνεται σε ξεχωριστά τριχοειδή σωληνάρια με τους άλλους αντιορούς, οι οποίοι είναι διαθέσιμοι στο Εργαστήριο, και το εκχύλισμα του αντιγόνου από το στέλεχος που εξετάζεται.

– Μετά από 10 λεπτά τα τριχοειδή ελέγχονται για την εμφάνιση δακτυλίου στο σημείο επαφής του εκχυλίσματος του αντιγόνου με τον αντιορό.

– Το στέλεχος ανήκει σε εκείνη την ορολογική ομάδα της οποίας ο αντιορός σχηματίζει δακτύλιο με το εκχύλισμα του αντιγόνου.

γ) Σημειώσεις.

– Το εκχύλισμα του αντιγόνου είναι δυνατόν να διατηρηθεί για μία εβδομάδα στο ψυγείο.

– Σε ένα κλινικό εργαστήριο πρέπει να υπάρχουν οι αντιοροί για τις ομάδες A, B, C, D, F και G. Στελέχη αυτών των ομάδων απομονώνονται συχνότερα από λοιμώξεις του ανθρώπου.

– Εκτός από τη μέθοδο της εκχυλίσεως του αντιγόνου με διάλυμα οξέος στη θερμοκρασία των 100°C υπάρχουν και άλλες μέθοδοι για την παραλαβή του αντιγόνου. Η μέθοδος εκχυλίσεως με διάλυμα οξέος δίνει πολύ καλά αποτελέσματα με τις ορολογικές ομάδες οι οποίες απομονώνονται συχνότερα στο κλινικό εργαστήριο.

– Το διάλυμα 0,2 N HCl παρασκευάζεται με 0,85% NaCl.

– Το διάλυμα 0,2 N NaOH παρασκευάζεται με απεσταγμένο νερό.

– Το pH του εκχυλίσματος του αντιγόνου πρέπει να είναι 7,4 – 7,8. Αν το pH είναι μεγαλύτερο παρατηρούνται μη ειδικές διασταυρούμενες αντιδράσεις.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΡΙΤΟ

ΜΕΘΟΔΟΙ ΧΡΩΣΕΩΣ ΤΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ

Στο κεφάλαιο αυτό αναφέρονται μερικές από τις μεθόδους χρώσεως των κυττάρων, των σπόρων, των βλεφαρίδων και του ελύτρου των βακτηρίων.

3.1 Απλή χρώση με κυανούν του μεθυλενίου κατά Loeffler.

Πρόκειται για μία απλή θετική χρώση η οποία χρησιμοποιείται πολύ συχνά στη Βακτηριολογία. Με αυτή τη χρώση χρωματίζονται όλα τα βακτήρια. Αν πρόκειται για σπορογόνο βακτήριο το μικροβιακό σώμα χρωματίζεται κυανούν, ενώ ο σπόρος δεν χρωματίζεται και φαίνεται σαν ένας κενός χώρος μέσα στο χρωματισμένο μικροβιακό κύτταρο.

3.1.1 Χρωστικό διάλυμα.

Στην αρχή παρασκευάζεται κεκορεσμένο διάλυμα της χρωστικής σε απόλυτη αιθυλική αλκοόλη.

Κυανούν του μεθυλενίου	1 g
Αιθυλική αλκοόλη, 95°	100 ml

Από το κεκορεσμένο διάλυμα παρασκευάζεται το υδατικό διάλυμα της χρωστικής το οποίο χρησιμοποιείται για τη χρώση των βακτηρίων.

Υδατικό διάλυμα 1% ΚΟΗ	1 ml
Απεσταγμένο νερό	99 ml
Κεκορεσμένο διάλυμα κυανού του μεθυλενίου σε αιθυλική αλκοόλη	30 ml

Στο 1 ml του διαλύματος του ΚΟΗ προστίθεται το απεσταγμένο νερό και μετά ακολουθεί η προσθήκη του κεκορεσμένου διαλύματος της χρωστικής.

3.1.2 Τεχνική.

Μετά την ετοιμασία του παρασκευάσματος και τη μονιμοποίησή του ακολουθεί η χρώση.

- α) Το παρασκεύασμα καλύπτεται με το υδατικό διάλυμα της χρωστικής και αφήνεται επί 1 λεπτό.
- β) Εκπλύνεται με νερό από τη βρύση.
- γ) Αφήνεται να στεγνώσει ή ξηραίνεται μεταξύ φύλλων διηθητικού χαρτιού και είναι έτοιμο για μικροσκόπηση.

3.1.3 Σημείωση.

Αν το χρωστικό διάλυμα διατηρηθεί για μεγάλο χρονικό διάστημα (μήνες) οξειδώνεται και παίρνει ιώδες χρώμα. Η οξείδωση αυτή καλείται ωρίμανση του διαλύματος. Κατά τη χρώση των Κορυνοβακτηριδίων με το κυανούν του μεθυλενίου το κυτταρόπλασμα χρωματίζεται κυανούν ενώ τα κοκκία της βολουτίνης εμφανίζουν ερυθροϊώδες χρώμα γιαυτό και ονομάζονται αλλόχρωμα ή μεταχρωματικά κοκκία.

3.2 Οξεάντοχες χρώσεις.

Πρόκειται για σύνθετες θετικές χρώσεις οι οποίες χρησιμοποιούνται για το χρωματισμό των οξεάντοχων βακτηρίων, όπως π.χ. των Μυκοβακτηριδίων.

3.2.1 Χρώση κατά Ziehl - Neelsen.

α) Χρωστικές και διαλύματα.

1. Πυκνή φαινικούχος φουξίνη.

Διάλυμα Α

Βασική φουξίνη	10 g
Αιθυλική αλκοόλη, 95°	100 ml

Μετά την ανάμιξη και τη διάλυση της χρωστικής στην αλκοόλη η φιάλη με το διάλυμα Α τοποθετείται στους 37°C επί 24 ώρες.

Διάλυμα Β

Φαινόλη (φαινικό οξύ ή καρβολικό οξύ)	5 g
Απεσταγμένο νερό	100 ml

Από το διάλυμα Α 10 ml μεταφέρονται σε 100 ml από το διάλυμα Β και αναμιγνύονται. Το μίγμα των δύο διαλυμάτων χρησιμοποιείται στη χρώση Ziehl - Neelsen.

2. Κυανούν του μεθυλενίου κατά Loeffler.
 3. Απόλυτη αιθυλική αλκοόλη η οποία περιέχει HCl (όξινη αλκοόλη).
- | | |
|-----------------------|-------|
| Πυκνό HCl | 3 ml |
| Αιθυλική αλκοόλη, 95° | 97 ml |

β) Τεχνική.

Μετά την ετοιμασία του παρασκευάσματος και τη μονιμοποίηση ακολουθεί η χρώση.

α) Το παρασκεύασμα καλύπτεται με το διάλυμα της πυκνής φαινικούχου φουξίνης και η κάτω επιφάνεια της αντικειμενοφόρου πλάκας θερμαίνεται επάνω από φλόγα μέχρι να εμφανισθούν ατμοί. Δεν πρέπει το διάλυμα της χρωστικής να στεγνώσει επάνω στην πλάκα.

β) Το διάλυμα αφήνεται να επιδράσει για 5 λεπτά.

γ) Το παρασκεύασμα εκπλύνεται με νερό της βρύσης.

δ) Το παρασκεύασμα αποχρωματίζεται προσεκτικά με σταγόνες όξινης αλκοόλης. Ο αποχρωματισμός δεν γίνεται σε ένα στάδιο, αλλά μετά την προσθήκη λίγων σταγόνων όξινης αλκοόλης ακολουθεί η έκπλυση με νερό. Η ίδια διαδικασία επαναλαμβάνεται μέχρις ότου εξαφανισθεί το κόκκινο χρώμα του διαλύματος της φαινικούχου φουξίνης από την αντικειμενοφόρο πλάκα.

ε) Εκπλύνεται με νερό από τη βρύση.

στ) Μεταχρωματίζεται με το διάλυμα του κυανού του μεθυλενίου κατά Loeffler το οποίο αφήνεται να δράσει επί 1 λεπτό.

ζ) Εκπλύνεται με νερό της βρύσης και αφήνεται να στεγνώσει. Το παρασκεύασμα δεν πρέπει να ξηραίνεται μεταξύ φύλλων διηθητικού χαρτιού.

Τα οξεάντοχα βακτήρια χρωματίζονται κόκκινα, ενώ τα άλλα βακτήρια και τα κύτταρα (π.χ. επιθηλιακά κύτταρα) χρωματίζονται κυανά.

3.2.2 Χρώση κατά Κίγγουιν.

α) Χρωστικές και διαλύματα.

1. Φαινικούχος φουξίνη κατά Κίγγουιν.

Βασική φουξίνη	4 g
Αιθυλική αλκοόλη, 95°	20 ml
Φαινόλη	8 g
Απεσταγμένο νερό	100 ml

2. Κυανούν του μεθυλενίου κατά Loeffler.

3. Απόλυτη αιθυλική αλκοόλη η οποία περιέχει HCl (όξινη αλκοόλη).

Πυκνό HCl	3 ml
Αιθυλική αλκοόλη, 95°	97 ml

β) Τεχνική.

Μετά την ετοιμασία του παρασκευάσματος και τη μονιμοποίησή του ακολουθεί η χρώση.

α) Το παρασκεύασμα καλύπτεται με το διάλυμα της φαινικούχου φουξίνης και αφήνεται να επιδράσει επί 2 λεπτά (δεν χρειάζεται θέρμανση της αντικειμενοφόρου πλάκας).

β) Εκπλύνεται με νερό της βρύσης.

γ) Τα υπόλοιπα στάδια είναι τα ίδια με τη χρώση κατά Ziehl - Neelsen.

Τα οξεάντοχα βακτήρια χρωματίζονται κόκκινα, ενώ τα άλλα βακτήρια και τα κύτταρα χρωματίζονται κυανά.

3.3 Ειδικές χρώσεις για τα μεταχρωματικά ή αλλόχρωμα κοκκία.

Πρόκειται για σύνθετες θετικές χρώσεις οι οποίες χρησιμοποιούνται κυρίως για το χρωματισμό των Κορυνοβακτηριδίων.

3.3.1 Χρώση κατά Albert.

α) Χρωστικές και διαλύματα.

1. Χρωστικό διάλυμα κατά Albert

Πράσινο του μαλαχίτη	0,2 g
Κυανούν της τολουιδίνης	0,15 g
Αιθυλική αλκοόλη, 95°	2 ml
Κρυσταλλικό οξεικό οξύ	1 ml
Απεσταγμένο νερό	100 ml

Οι χρωστικές (πράσινο του μαλαχίτη και κυανού της τολουιδίνης) διαλύονται στην αιθυλική αλκοόλη. Το οξεικό οξύ αναμιγνύεται με το νερό και το μίγμα προστίθεται στο αλκοολικό διάλυμα των χρωστικών. Το χρωστικό διάλυμα αφήνεται στη θερμοκρασία δωματίου επί 24 ώρες και διηθείται προτού χρησιμοποιηθεί.

2. Διάλυμα Lugol.

Ιώδιο (κρύσταλλοι)	5 g
Ιωδιούχο κάλιο	10 g
Απεσταγμένο νερό	100 ml

Το ιωδιούχο κάλιο προστίθεται στο απεσταγμένο νερό και μετά προστίθενται βραδέως οι κρύσταλλοι του ιωδίου με ταυτόχρονη ανακίνηση της φιάλης μέχρι να διαλυθούν. Το διάλυμα διηθείται και αραιώνεται 1 : 5 με απεσταγμένο νερό προτού χρησιμοποιηθεί.

β) Τεχνική.

Μετά την ετοιμασία του παρασκευάσματος και τη μονιμοποίηση ακολουθεί η χρώση.

α) Το παρασκεύασμα καλύπτεται με το χρωστικό διάλυμα κατά Albert.

β) Το διάλυμα αφήνεται να επιδράσει επί 3 - 5 λεπτά.

γ) Το παρασκεύασμα εκπλύνεται με νερό της βρύσης και ξηραίνεται μεταξύ φύλλων από διηθητικό χαρτί.

δ) Καλύπτεται με το διάλυμα Lugol για 1 λεπτό.

ε) Εκπλύνεται με νερό και αφήνεται να στεγνώσει ή ξηραίνεται μεταξύ φύλλων από διηθητικό χαρτί.

Το κυτταρόπλασμα των Κορυνοβακτηριδίων χρωματίζεται πράσινο, ενώ τα αλλόχρωμα ή μεταχρωματικά κοκκία χρωματίζονται κυανομέλανα.

3.3.2 Χρώση κατά Neisser.

α) Χρωστικές και διαλύματα.

1. Χρωστικό διάλυμα κατά Neisser

Διάλυμα Α	
Κυανού του μεθυλενίου	0,1 g
Αιθυλική αλκοόλη, 95°	5 ml
Κρυσταλλικό οξεικό οξύ	5 ml
Απεσταγμένο νερό	100 ml

Η χρωστική διαλύεται στο νερό, μετά προστίθεται το οξύ και ακολουθεί η προσθήκη της αιθυλικής αλκοόλης.

Διάλυμα Β	
Κρυσταλλικό ιώδες	1 g
Αιθυλική αλκοόλη, 95°	10 ml
Απεσταγμένο νερό	300 ml

Η χρωστική διαλύεται στο μίγμα αιθυλικής αλκοόλης - νερού.

Από το διάλυμα Α 20 ml αναμιγνύονται με 10 ml από το διάλυμα Β, και το μίγμα χρησιμοποιείται για τη χρώση κατά Neisser.

2. Υδατικό διάλυμα 1% χρυσοϊδίνης.

β) Τεχνική.

Μετά την ετοιμασία του παρασκευάσματος και τη μονιμοποίησή του ακολουθεί η χρώση.

α) Το παρασκεύασμα καλύπτεται με το διάλυμα κατά Neisser και αφήνεται να επιδράσει για 10 δευτερόλεπτα.

β) Εκπλύνεται γρήγορα με νερό της βρύσης.

γ) Μεταχρωματίζεται με το διάλυμα της χρυσοϊδίνης για 30· δευτερόλεπτα.

δ) Εκπλύνεται γρήγορα με νερό της βρύσης και αφήνεται να στεγνώσει ή ξηραίνεται μεταξύ φύλλων από διηθητικό χαρτί.

Το κυτταρόπλασμα των Κορυνοβακτηριδίων χρωματίζεται ελαφρά καστανό, ενώ τα αλλόχρωμα ή μεταχρωματικά κοκκία χρωματίζονται κυανομέλανα.

3.4 Χρώσεις για το Τρεπόννημα το ωχρο.

Η χρώση του Τρεπονήματος του ωχρού και γενικότερα των Σπειροχαιτιακών γίνεται με θετικές και αρνητικές χρώσεις. Στην πρώτη περίπτωση χρωματίζεται ο μικροοργανισμός, ενώ στη δεύτερη περίπτωση χρωματίζεται το περιβάλλον του μικροοργανισμού και ο μικροοργανισμός παραμένει άχρος.

3.4.1 Χρώση με εναμμόνιο νιτρικό άργυρο ή χρώση κατά Fontana.

Πρόκειται για θετική χρώση.

α) Χρωστικές και διαλύματα.

1. Πρόστυμμα. Διάλυμα 5% ταννίνης σε 1% φαινόλης.

Φαινόλη	1 g
Απεσταγμένο νερό	100 ml
Ταννίνη	5 g

2. Διάλυμα εναμμόνιου νιτρικού αργύρου.

AgNO ₃	5 g
Απεσταγμένο νερό	100 ml.

Ο AgNO₃ διαλύεται στο απεσταγμένο νερό. Από το διάλυμα 10 ml μεταφέρονται σε ένα σωληνάριο. Στα 90 ml του διαλύματος προστίθενται σταγόνες πυκνού διαλύματος αμμωνίας (Ειδ. βάρος 0,880, 35%) μέχρις ότου σχηματισθεί ίζημα. Εξακολουθεί η προσθήκη σταγόνων διαλύματος αμμωνίας μέχρις ότου το ίζημα επαναδιαλυθεί. Ακολουθεί η προσθήκη σταγόνων διαλύματος νιτρικού αργύρου (από τα 10 ml) μέχρις ότου εμφανισθεί ελαφρά θολερότητα η οποία παραμένει και μετά την ανακίνηση της φιάλης.

β) Τεχνική.

Μετά την ετοιμασία του παρασκευάσματος και τη μονιμοποίησή του ακολουθεί η χρώση.

α) Το παρασκεύασμα καλύπτεται με το διάλυμα του προστύμματος και η κάτω επιφάνεια της αντικειμενοφόρου πλάκας θερμαίνεται επάνω από φλόγα μέχρι να αναδυθούν ατμοί. Μετά την εμφάνιση ατμών αφήνεται το διάλυμα να επιδράσει για 30 δευτερόλεπτα.

β) Εκπλύνεται με νερό της βρύσης.

γ) Καλύπτεται με το διάλυμα του εναμμώνιου νιτρικού αργύρου. Η κάτω επιφάνεια της αντικειμενοφόρου πλάκας θερμαίνεται επάνω από φλόγα μέχρι να εμφανισθούν ατμοί. Μετά την εμφάνιση των ατμών αφήνεται το διάλυμα να επιδράσει επί 30 δευτερόλεπτα.

δ) Εκπλύνεται καλά με νερό βρύσης.

ε) Το παρασκεύασμα αφήνεται να στεγνώσει ή ξηραίνεται μεταξύ φύλλων από διηθητικό χαρτί.

Το Τρεπόννημα το ωχρό χρωματίζεται σκούρο καφέ ή μαύρο, ενώ το υπόστρωμα χρωματίζεται καστανό.

3.4.2 Χρώση με σινική μελάνη.

Πρόκειται για αρνητική χρώση. Η σινική μελάνη φέρεται έτοιμη στο εμπόριο.

α) Τεχνική.

Εξίδρωμα του συφιλιδικού έλκους ή του οπού των λεμφαδένων αναμιγνύεται με μία σταγόνα σινικής μελάνης επάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα. Το παρασκεύασμα καλύπτεται με καλυπτρίδα και μικροσκοπείται. Το Τρεπόννημα το ωχρό δεν χρωματίζεται, ενώ το υπόστρωμα χρωματίζεται μαύρο.

3.5 Χρώσεις για το έλυτρο.

Για το χρωματισμό του ελύτρου των βακτηρίων χρησιμοποιούνται διάφορες ειδικές χρώσεις.

3.5.1 Χρώση κατά Muir.

α) Χρωστικές και διαλύματα.

1. Διάλυμα πυκνής φαινικούχου φουξίνης
2. Αιθυλική αλκοόλη
3. Πρόστυμα του Muir

Υδατικό διάλυμα 7% HgCl ₂	20 ml
Υδατικό διάλυμα 12% στυπτηρίας με κάλιο - Al ₂ (SO ₄) ₃ · K ₂ SO ₄ 24H ₂ O	50 ml
Υδατικό διάλυμα 10% ταννίνης	20 ml
4. Κυανού του μεθυλενίου κατά Loeffler

β) Τεχνική.

Μετά την ετοιμασία του παρασκευάσματος και τη μονιμοποίηση ακολουθεί η χρώση.

α) Το παρασκεύασμα καλύπτεται με το διάλυμα της πυκνής φαινικούχου φουξίνης και η κάτω επιφάνεια της αντικειμενοφόρου πλάκας θερμαίνεται επάνω από φλόγα για 1 λεπτό.

β) Εκπλύνεται γρήγορα με αιθυλική αλκοόλη και αμέσως μετά με νερό βρύσης.

- γ) Καλύπτεται με το διάλυμα του προστύμματος του Muir επί 30 δευτερόλεπτα.
- δ) Εκπλύνεται καλά με νερό και μετά με αιθυλική αλκοόλη μέχρι το παρασκεύασμα να πάρει ελαφρό κόκκινο χρώμα.
- ε) Εκπλύνεται καλά με νερό βρύσης.
- στ) Μεταχρωματίζεται με διάλυμα κυανού του μεθυλενίου κατά Loeffler για 30 δευτερόλεπτα.
- ζ) Εκπλύνεται με νερό βρύσης και αφήνεται να στεγνώσει ή ξηραίνεται μεταξύ φύλλων από διηθητικό χαρτί.
- Τα κύτταρα των βακτηρίων χρωματίζονται κόκκινα, ενώ το έλυτρο χρωματίζεται κυανούν.

3.5.2 Χρώση κατά Hiss.

α) Χρωστικές και διαλύματα.

- | | |
|--|--------|
| 1. Υδατικό διάλυμα 0,3% βασικής φουξίνης | |
| Βασική φουξίνη | 0,3 g |
| Απεσταγμένο νερό | 100 ml |
| 2. Υδατικό διάλυμα 20% $\text{CUSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ | |

β) Τεχνική.

α) Μία σταγόνα εναιωρήματος των κυττάρων του μικροοργανισμού σε φυσιολογικό ορό αναμιγνύεται με μία σταγόνα ορού αίματος επάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα.

β) Το παρασκεύασμα αφήνεται να στεγνώσει και μονιμοποιείται με ελαφρά θέρμανση επάνω από φλόγα.

γ) Καλύπτεται με το διάλυμα της βασικής φουξίνης και η κάτω επιφάνεια της αντικειμενοφόρου πλάκας θερμαίνεται επάνω από φλόγα μέχρι να εμφανισθούν ατμοί.

δ) Εκπλύνεται με το υδατικό διάλυμα του θειικού χαλκού.

ε) Αφήνεται να στεγνώσει ή ξηραίνεται μεταξύ φύλλων από διηθητικό χαρτί.

Τα κύτταρα εμφανίζουν βαθύ ερυθροϊώδες χρώμα, ενώ το έλυτρο χρωματίζεται κυανούν.

3.6 Χρώσεις για τους σπόρους.

Για το χρωματισμό των σπόρων των βακτηρίων χρησιμοποιούνται διάφορες ειδικές χρώσεις.

3.6.1 Χρώση κατά Moeller τροποποιημένη.

α) Χρωστικές και διαλύματα.

1. Διάλυμα πυκνής φαινικούχου φουξίνης
2. Αιθυλική αλκοόλη
3. Διάλυμα κυανού του μεθυλενίου κατά Loeffler

β) Τεχνική.

Μετά την ετοιμασία του παρασκευάσματος και τη μονιμοποίησή του ακολουθεί η χρώση.

α) Το παρασκεύασμα καλύπτεται με το διάλυμα της πυκνής φαινικούχου φουξίνης και η κάτω επιφάνεια της αντικειμενοφόρου πλάκας θερμαίνεται επάνω από τη φλόγα μέχρι να εμφανισθούν ατμοί.

β) Το διάλυμα αφήνεται να επιδράσει επί 5 λεπτά.

γ) Εκπλύνεται με νερό της βρύσης.

δ) Αποχρωματίζεται με την αιθυλική αλκοόλη μέχρι να εξαφανισθεί το κόκκινο χρώμα του διαλύματος της φαινικούχου φουξίνης από την αντικειμενοφόρο πλάκα.

ε) Εκπλύνεται με νερό της βρύσης.

στ) Μεταχρωματίζεται με το διάλυμα του κυανού του μεθυλενίου κατά Loeffler, το οποίο αφήνεται να επιδράσει επί 1-2 λεπτά.

ζ) Εκπλύνεται με νερό βρύσης και αφήνεται να στεγνώσει ή ξηραίνεται μεταξύ φύλλων από διηθητικό χαρτί.

Το μικροβιακό σώμα χρωματίζεται κυανούν, ενώ οι σπόροι χρωματίζονται κόκκινοι.

3.6.2 Χρώση κατά Schaeffer και Fulton.**α) Χρωστικές και διαλύματα.**

1. Υδατικό διάλυμα 5% πράσινου του μαλαχίτη.

Το διάλυμα αφήνεται επί μισή ώρα στη θερμοκρασία δωματίου και διηθείται προτού χρησιμοποιηθεί.

2. Υδατικό διάλυμα 0,5% σαφρανίνης.

β) Τεχνική.

Μετά την ετοιμασία του παρασκευάσματος και τη μονιμοποίησή του ακολουθεί η χρώση.

α) Το παρασκεύασμα καλύπτεται με το διάλυμα του μαλαχίτη και αφήνεται να επιδράσει για 10 λεπτά. Άλλος τρόπος είναι να θερμανθεί η κάτω επιφάνεια της αντικειμενοφόρου πλάκας επάνω από φλόγα επί 1 λεπτό.

β) Εκπλύνεται καλά με νερό βρύσης.

γ) Μεταχρωματίζεται με το διάλυμα της σαφρανίνης επί 30 δευτερόλεπτα.

δ) Εκπλύνεται με νερό βρύσης και αφήνεται να στεγνώσει ή ξηραίνεται μεταξύ φύλλων από διηθητικό χαρτί.

Το μικροβιακό σώμα χρωματίζεται κόκκινο, ενώ οι σπόροι χρωματίζονται πράσινοι.

3.7 Χρώσεις για τις βλεφαρίδες.

Οι ειδικές χρώσεις για τις βλεφαρίδες χρησιμοποιούνται για να διαπιστωθεί η διάταξη των βλεφαρίδων γύρω από μικροβιακό σώμα, αν δηλαδή ένα βακτήριο φέρει βλεφαρίδες γύρω από ολόκληρο το μικροβιακό σώμα ή μόνο στους πόλους.

3.7.1 Χρώση κατά Leifson.

α) Χρωστικές και διαλύματα.

1. Χρωστικό διάλυμα κατά Leifson.

Διάλυμα Α		
NaCl		1,5 g
Απεσταγμένο νερό		100 ml
Διάλυμα Β		
Ταννίνη		3 g
Απεσταγμένο νερό		100 ml
Διάλυμα Γ		
Βασική φουξίνη (ειδική για τη χρώση των βλεφαρίδων)		1,2 g
Αιθυλική αλκοόλη, 95°		100 ml

Η χρωστική προστίθεται στην αιθυλική αλκοόλη και ανακινείται η φιάλη.

Η φιάλη με τη χρωστική και την αλκοόλη αφήνεται τουλάχιστον για 1 ημέρα μέχρι να διαλυθεί τελείως η χρωστική.

Το διάλυμα Α προστίθεται στο διάλυμα Β και το μίγμα των δύο διαλυμάτων προστίθεται στο διάλυμα Γ. Η φιάλη ανακινείται για την καλή ανάμιξη και των τριών διαλυμάτων.

Το χρωστικό διάλυμα είναι σταθερό επί 1 εβδομάδα αν διατηρηθεί στη θερμοκρασία δωματίου, ενώ όταν διατηρηθεί στο ψυγείο (4°C) παραμένει σταθερό για 1-2 μήνες.

2. Φορμόλη.

3. Διάλυμα κυανού του μεθυλενίου κατά Loeffler αραιωμένο 1:5 με απεσταγμένο νερό.

β) Τεχνική.

α) Το στέλεχος που πρόκειται να εξετασθεί καλλιεργείται σε εμπλουτισμένο πεπτονόχο ζωμό, ο οποίος όμως δεν πρέπει να περιέχει σάκχαρο, και επωάζεται στη θερμοκρασία δωματίου (20° - 25°C) επί 18 ώρες.

β) Στα 4 ml της 18ωρης καλλιέργειας του στελέχους προστίθενται 0,25 ml φορμόλης. Μετά την ανάμιξη της καλλιέργειας με τη φορμόλη το σωληνάριο αφήνεται στη θερμοκρασία δωματίου επί 15 λεπτά.

γ) Στο σωληνάριο με την καλλιέργεια του στελέχους και το φορμόλη προστίθενται 4 ml αποστειρωμένο απεσταγμένο νερό. Το περιεχόμενο του σωληναρίου αναμιγνύεται.

δ) Το σωληνάριο φυγόκεντρείται και το υπερκείμενο απορρίπτεται.

ε) Στο ίζημα των κυττάρων προστίθενται 8 ml απεσταγμένο νερό, το σωληνάριο ανακινείται για να εναιωρηθούν τα κύτταρα στο νερό και φυγόκεντρείται.

στ) Το υπερκείμενο απορρίπτεται, στο ίζημα των κυττάρων προστίθενται 2 ml απεσταγμένο νερό και το σωληνάριο ανακινείται για να εναιωρηθούν τα κύτταρα στο νερό.

ζ) Το εναιώρημα των κυττάρων αραιώνεται με απεσταγμένο νερό μέχρι να εμφανισθεί ελαφρά θολερότητα.

η) Μία σταγόνα του εναιωρήματος των κυττάρων τοποθετείται στο ένα άκρο μιας αντικειμενοφόρου πλάκας. Η αντικειμενοφόρος πλάκα κρατιέται σε κεκλιμένη θέση έτσι ώστε η σταγόνα να κυλήσει προς το αντίθετο άκρο της πλάκας.

θ) Η αντικειμενοφόρος πλάκα αφήνεται στη θερμοκρασία δωματίου μέχρι να στεγνώσει το παρασκεύασμα. Το παρασκεύασμα δεν μονιμοποιείται με θέρμανση επάνω από φλόγα.

ι) Από το χρωστικό διάλυμα κατά Leifson λαμβάνεται 1 ml και τοποθετείται στο παρασκεύασμα. Η αντικειμενοφόρος πλάκα κρατιέται σε κεκλιμένη θέση έτσι ώστε να καλυφθεί ολόκληρο το παρασκεύασμα με το χρωστικό διάλυμα.

ια) Το χρωστικό διάλυμα αφήνεται να επιδράσει επί 5 - 15 λεπτά, μέχρι δηλαδή να εξατμισθεί ένα μέρος της αλκοόλης και η χρωστική να σχηματίσει ίζημα επάνω σε ολόκληρη την επιφάνεια της αντικειμενοφόρου πλάκας.

ιβ) Το παρασκεύασμα εκπλύνεται με νερό βρύσης.

ιγ) Αφήνεται να στεγνώσει και μεταχρωματίζεται με αραιωμένο διάλυμα κυανού του μεθυλενίου κατά Loeffler επί 2 λεπτά.

ιδ) Εκπλύνεται με νερό βρύσης και αφήνεται να στεγνώσει στη θερμοκρασία δωματίου.

Οι βλεφαρίδες χρωματίζονται κόκκινες, ενώ τα κύτταρα είναι άχρα ή χρωματίζονται με το αραιωμένο διάλυμα του κυανού του μεθυλενίου κατά Loeffler.

3.7.2 Χρώση κατά Rhodes.

α) Χρωστικές και διαλύματα.

1. Πρόστυμμα κατά Rhodes.

Υδατικό διάλυμα 10% ταννίνης 60 ml

Υδατικό διάλυμα 12% στυπτηρίας με κάλιο -
 $Al_2(SO_4)_3 \cdot K_2SO_4 \cdot 24H_2O$

30 ml

Υδατικό διάλυμα 3.5% ανιλίνης 6 ml

Υδατικό διάλυμα 5% $FeCl_3$ 6 ml

Το διάλυμα της στυπτηρίας προστίθεται στο διάλυμα της ταννίνης και μετά ακολουθεί η προσθήκη του διαλύματος της ανιλίνης. Η φιάλη ανακινείται για να επαναδιαλυθεί το ίζημα που σχηματίζεται. Ακολουθεί η προσθήκη του διαλύματος του $FeCl_3$ και το διάλυμα του προστύμματος αφήνεται στη θερμοκρασία δωματίου επί 10 λεπτά προτού χρησιμοποιηθεί.

2. Διάλυμα εναμμόνιου νιτρικού αργύρου.

β) Τεχνική.

Η καλλιέργεια του στελέχους και η ετοιμασία του παρασκευάσματος είναι τα ίδια όπως και στη χρώση κατά Leifson (α - θ).

ι) Το παρασκεύασμα καλύπτεται με το πρόστυμμα κατά Rhodes επί 3-5 λεπτά.

ια) Εκπλύνεται με νερό βρύσης.

- ιβ) Ένα μέρος του διαλύματος των εναμμώνιου νιτρικού αργύρου θερμαίνεται μέχρι βρασμού και μετά τοποθετείται επάνω στο παρασκεύασμα.
- ιγ) Αφήνεται να επιδράσει επί 3-5 λεπτά.
- ιδ) Εκπλύνεται καλά με νερό βρύσης.
- ιε) Αφήνεται να στεγνώσει στη θερμοκρασία δωματίου.

Η μέθοδος αυτή αποτελεί τροποποίηση της χρώσεως κατά Fontana η οποία χρησιμοποιείται για τα Σπειροχαιτικά.

γ) Σημείωση.

Στη χρώση των βλεφαρίδων έχει μεγάλη σημασία η καθαριότητα των αντικειμενοφόρων πλακών στις οποίες γίνονται τα παρασκευάσματα.

Οι αντικειμενοφόρες πλάκες πρέπει να τοποθετούνται σε διάλυμα 20% νιτρικού αργύρου και σε θερμοκρασία 100°C επί 5-10 λεπτά. Μετά πρέπει να ξεπλένονται πολύ καλά με απεσταγμένο νερό, να αφήνονται να στεγνώσουν και να τοποθετούνται σε κλειστό δοχείο.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ

Θρεπτικά υλικά

1.1	Γενικά	1
1.2	Αιματούχο άγαρ	1
1.3	Αλκαλικό πεπτονούχο νερό	2
1.4	Αλκαλικός Τελλουριώδης Ταυροχολικός ζωμός	2
1.5	Ζωμός με σεληνιώδες νάτριο	2
1.6	Ζωμός με τετραθειονικό νάτριο	3
1.7	Θρεπτικό άγαρ	3
1.8	Θρεπτικός ζωμός	3
1.9	Σοκολατόχροο άγαρ	3
1.10	Υλικό με διτανθρακικό νάτριο	3
1.11	Υλικό Bordet - Gengou	4
1.12	Υλικό Brilliant - Green άγαρ	4
1.13	Υλικό Deoxycholate Citrate άγαρ	5
1.14	Υλικό Hoyle	5
1.15	Υλικό King - Ward και Raney A	5
1.16	Υλικό King - Ward και Raney B	6
1.17	Υλικό Loeffler	6
1.18	Υλικό Löwenstein - Jensen	6
1.19	Υλικό Mac Conkey άγαρ	7
1.20	Υλικό Mac Conkey ζωμός	7
1.21	Υλικό Salmonella - Shigella άγαρ	7
1.22	Υλικό TCBS άγαρ (Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose άγαρ)	8
1.23	Υλικό Thayer - Martin άγαρ	8
1.24	Υλικό TTGA (Taurocholate Tellurite Gelatin άγαρ ή Υλικό Monsur άγαρ)	8

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ

Μέθοδοι τυποποίησης των βακτηρίων και τεχνικές

2.1	Μέθοδοι τυποποίησης των βακτηρίων	9
2.1.1	Αναγωγή των νιτρικών αλάτων	9
	α) Γενικά	
	β) Μέθοδος	
	γ) Σημείωση	

2.1.2	Απαμίνωση της φαινυλαλανίνης	10
	α) Γενικά	
	β) Μέθοδος	
	γ) Σημείωση	
2.1.3	Διάσπαση σακχάρων, αλκοολών και γλυκοσιδών	11
	α) Γενικά	
	β) Υλικά	
	γ) Μέθοδος 1.	
	δ) Μέθοδος 2. Οξειδωτική - Ζυμωτική διάσπαση των υδατανθράκων	
2.1.4	Δοκιμασία ερυθρού του μεθυλίου	15
	α) Γενικά	
	β) Μέθοδος	
2.1.5	Δοκιμασία της ευαισθησίας στη Βακιτρασίνη	16
	α) Γενικά	
	β) Μέθοδος	
	γ) Σημείωση	
2.1.6	Δοκιμασία της ευαισθησίας στην Οπτοχίνη	17
	α) Γενικά	
	β) Μέθοδος	
2.1.7	Δοκιμασία κιτρικών	18
	α) Γενικά	
	β) Μέθοδος	
	γ) Σημειώσεις	
2.1.8	Δοκιμασία χολής	19
	α) Γενικά	
	β) Μέθοδος	
	γ) Σημειώσεις	
2.1.9	Δοκιμασία Voges Proskauer ή Δοκιμασία παραγωγής ακετυλομεθυλοκαρβινόλης (ακετοΐνης)	20
	α) Γενικά	
	β) Μέθοδος	
	γ) Σημείωση	
2.1.10	Δοκιμασίες αναστολής της αναπτύξεως σε υλικά με χρωστική (βασική φουξίνη, θειονίνη)	21
	α) Γενικά	
	β) Μέθοδος	
	γ) Σημείωση	
2.1.11	Έλεγχος της κινητικότητας	22
	α) Γενικά	
	β) Μέθοδος	
2.1.12	Καταβολισμός των αμινοξέων ορνιθίνη, λυσίνη και αργινίνη	23
	α) Γενικά	
	β) Μέθοδος	
2.1.13	Οξείδωση του γλυκονικού καλίου σε 2 - κετογλυκονικό κάλιο	25
	α) Γενικά	
	β) Μέθοδος	
2.1.14	Παραγωγή δεοξυριβονουκλεάσης	25
	α) Γενικά	
	β) Μέθοδος	
2.1.15	Παραγωγή ινδόλης	26
	α) Γενικά	
	β) Μέθοδος 1	
	γ) Μέθοδος 2	

2.1.16 Παραγωγή καταλάσης	28
α) Γενικά	
β) Μέθοδος 1	
γ) Μέθοδος 2	
δ) Μέθοδος 3	
ε) Σημείωση	
στ) Μέθοδος 4 (Κατάλαση στους 68°C για τα Μουκοβακτηρίδια)	
2.1.17 Παραγωγή νιασίνης	29
α) Γενικά	
β) Μέθοδος	
2.1.18 Παραγωγή οξειδάσης	30
α) Γενικά	
β) Μέθοδος 1	
γ) Σημειώσεις	
δ) Μέθοδος 2	
ε) Σημειώσεις	
2.1.19 Παραγωγή πηκτάσης (Coagulase)	32
α) Γενικά	
β) Ανίχνευση της εξωκυτταρίου ή ελευθέρως πηκτάσης	
γ) Μέθοδος 1	
δ) Μέθοδος 2	
ε) Ανίχνευση της συνδεδεμένης πηκτάσης	
στ) Μέθοδος	
ζ) Σημειώσεις	
2.1.20 Παραγωγή ουρεάσης	34
α) Γενικά	
β) Μέθοδος	
γ) Σημειώσεις	
2.1.21 Παραγωγή υδροθείου (H ₂ S)	35
α) Γενικά	
β) Μέθοδος 1. Ανίχνευση της παραγωγής υδροθείου από τα Εντεροβακτηριοειδή	
γ) Σημείωση	
δ) Μέθοδος 2. Ανίχνευση της παραγωγής υδροθείου από τις Βρουκέλλες	
2.1.22 Ρευστοποίηση της πηκτής	37
α) Γενικά	
β) Μέθοδος	
2.1.23 Υδρόλυση της αισκουλίνης σε υλικό με χολή	38
α) Γενικά	
β) Μέθοδος	
2.2 Τεχνικές	38
2.2.1 Μέθοδοι ελέγχου της ευαισθησίας των βακτηρίων στα Χημειοθεραπευτικά	38
α) Γενικά	
β) Μέθοδος των δίσκων	
γ) Σημείωση	
δ) Μέθοδος των αραιώσεων του χημειοθεραπευτικού σε σωληνάρια.	
2.2.2 Ορολογική τυποποίηση των βακτηρίων	44
α) Γενικά	
β) Τεχνική	
2.2.3 Δοκιμασία « Εξειδίκευσης του ελύτρου»	45
α) Γενικά	
β) Τεχνική	
γ) Σημειώσεις	

2.2.4 Ορολογική τυποποίηση των στρεπτοκόκκων κατά Lancefield	46
α) Γενικά	
β) Τεχνική	
γ) Σημειώσεις	

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΡΙΤΟ

Μέθοδοι χρώσεως των βακτηρίων

3.1 Απλή χρώση με κυανού του μεθυλενίου κατά Loeffler	49
3.1.1 Χρωστικό διάλυμα	49
3.1.2 Τεχνική	49
3.1.3 Σημείωση	50
3.2 Οξεάντοχες χρώσεις	50
3.2.1 Χρώση κατά Ziehl - Neelsen	50
α) Χρωστικές και Διαλύματα	
β) Τεχνική	
3.2.2 Χρώση κατά Kinyoun	51
α) Χρωστικές και Διαλύματα	
β) Τεχνική	
3.3 Ειδικές χρώσεις για τα μεταχρωματικά ή αλλόχρωμα κοκκία	51
3.3.1 Χρώση κατά Albert	51
α) Χρωστικές και Διαλύματα	
β) Τεχνική	
3.3.2 Χρώση κατά Neisser	52
α) Χρωστικές και Διαλύματα	
β) Τεχνική	
3.4 Χρώσεις για το Τρεπόννημα το ωχρό	53
3.4.1 Χρώση με εναμμόνιο νιτρικό άργυρο ή χρώση κατά Fontana	53
α) Χρωστικές και Διαλύματα	
β) Τεχνική	
3.4.2 Χρώση με σινική μελάνη	54
α) Τεχνική	
3.5 Χρώσεις για το έλυτρο	54
3.5.1 Χρώση κατά Muir	54
α) Χρωστικές και Διαλύματα	
β) Τεχνική	
3.5.2 Χρώση κατά Hiss	55
α) Χρωστικές και Διαλύματα	
β) Τεχνική	
3.6 Χρώσεις για τους σπόρους	55
3.6.1 Χρώση κατά Moeller τροποποιημένη	55
α) Χρωστικές και διαλύματα	
β) Τεχνική	
3.6.2 Χρώση κατά Schaeffer και Fulton	56
α) Χρωστικές και διαλύματα	
β) Τεχνική	
3.7 Χρώσεις για τις βλεφαρίδες	56
3.7.1 Χρώση κατά Leifson	57
α) Χρωστικές και διαλύματα	
β) Τεχνική	
3.7.2 Χρώση κατά Rhodes	58
α) Χρωστικές και διαλύματα	
β) Τεχνική	
γ) Σημείωση	