

Protokol č. 9

CÍL

Cílem cvičení byla identifikace neznámého kmene bakterií za využití dvou sklíčkových testů (KOH test, katalázový test) a dvou zkumavkových testů (OF test, TSI test). Dále pak identifikace tří kmenů enterobakterií až do druhů pomocí komerčního ENTEROtestu a dvou papírkových testů (oxidázový test, ONPG test).

ÚVOD

Identifikace neznámých vzorků bakterií spočívá nejen v hodnocení morfologie jejich buněk a kolonií a Gramově barvení, ale také ve sledování fyziologických a biochemických vlastností. Jednotlivé vlastnosti, jako například oxidace a fermentace glukózy, štěpení laktózy, produkce indolu či sirovodíku a mnoho dalších, jsou testovány pomocí tzv. biochemických testů. Základem všech je schopnost buněk reagovat na přítomnost konkrétních látek nebo změnu vnějších podmínek určitou detekovatelnou biochemickou reakcí. Tyto testy jsou pak založeny na změně viskozity bakteriální suspenze, změně barvy média či indikátorového činidla nebo třeba na sledování vývoje plynu. Kromě klasických zkumavkových testů se používají papírkové testy a destičkové komerční mikrotesty. Získané údaje jsou zpracovávány podle klíčů a tabulek, často za pomoci počítače. I přesto bývá problémem zařadit vzorky až do druhů, a to v důsledku rostoucího množství mutantů.

Ve cvičení se budeme zabývat identifikací enterobakterií. Enterobakterie jsou velice početná skupina zahrnující asi 65 druhů. Jedná se o gramnegativní nesporeující tyčky, 1-6 μm dlouhé a 0,3-1 μm . Enterobakterie většinou žijí v trávicím traktu obratlovců, a proto využívají fakultativně anaerobní metabolismus a jejich teplotní optimum je 37°C. S velké části jsou komenzálové (přirozená součást střevní mikroflóry), ale existují i patogenní druhy, jako například *Shigella*, *Salmonella* nebo *Yersinia pestis*. Dalšími typickými vlastnostmi enterobakterií je absence enzymu cytochrom c oxidázy a enzymu β -galaktozidázy, přítomnost enzymu katalázy, schopnost redukovat nitráty a vždy využít glukózu. Speciálními diagnostickými půdami pro enterobakterie jsou například Endův agar, MacKonkey agar, Salmonella-Shigella agar nebo agar s brilantovou zelení.

MATERIÁL

- destilovaná voda
- 3% roztok KOH
- 3% roztok peroxidu vodíku
- dvě zkumavky s médiem obsahujícím glukózu a acidobazický indikátor bromthiolovou modř
- dvě zkumavky s médiem obsahujícím glukózu, sacharózu a laktózu a acidobazický indikátor bromkresolovou červeň (jedna z toho zalitá parafinem)
- fyziologický roztok
- sterilní parafinový olej
- činidla pro indol a fenylalanin
- komerční mikrotest – ENTEROtest
- oxidázové a ONPG papírky

POMŮCKY

- podložní sklíčka, kapátko, bakteriologická klička, zkumavky, automatická pipeta a špičky

BAKTERIÁLNÍ KMENY

Escherichia coli CCM 3954

Proteus vulgaris CCM 1956

Providencia rettgeri CCM 5618

POSTUP PRÁCE – METODIKA – VYHODNOCENÍ

BAKTERIÁLNÍ KMEN „3“

➤ **Skličkové testy**

I. KOH test

Postup:

1. Na čisté podložní sklíčko byla nanášena kapka KOH.
2. Bakteriologickou kličkou byla nabrána bakteriální kultura a rozmíchána opatrně v kapce.

Metodika:

KOH test slouží k rychlému rozpoznání, zda se jedná o G^+ nebo G^- bakterie. G^+ bakterie mají díky širší vrstvě peptidoglykanu rigidnější buněčnou stěnu, takže KOH buňku nepoškodí. U G^- bakterií ovšem dojde k poškození stěny a vylití buněčného obsahu, což se projeví jako viskózní suspenze, která se po oddálení táhne za kličkou. Metodu nelze použít u bakterií tvořících sliz.

Vyhodnocení:

Po oddálení kličky od kapky bylo jasně vidět, jak se za ní buněčná suspenze táhne. Neznámý kmen byl tedy gramnegativní – odpovídá enterobakteriím.

II. Katalázový test

Postup:

1. Bakteriologickou kličkou byla nabrána kultura a rozetřena po podložním sklíčku.
2. Na buňky byl kápnut peroxid vodíku.

Metodika:

Katalázový test se využívá k zjištění přítomnosti enzymu katalázy. Některé bakterie mají schopnost redukovat kyslík na peroxid vodíku. Ten je pro ně ale toxický. Obranným mechanismem snižujícím poškození je rozklad peroxidu vodíku na vodu a kyslík katalyzovaný právě enzymem katalázou. Pozitivní test se tedy projeví uvolňováním bublinek kyslíku.

Vyhodnocení:

Ihned po nanášení peroxidu vodíku na rozetřenou kulturu se začal vyvíjet plyn. Neznámý kmen byl kataláza pozitivní – odpovídá enterobakteriím.

- **Zkumavkové testy** – demonstrační testy – kultury byly již vyrostlé; pozorovány byly zkumavky s označením „3“

I. OF test

Teoretický postup:

1. Do dvou zkumavek s vysokou vrstvou polotuhého média byla vpichem očkovaná čistá kultura.
2. Jedna zkumavka byla zalita 1 ml parafínu.
3. Kultivováno 24 hodin při 37°C.

Metodika:

OF test je testem oxidace (aerobní metabolismus) a fermentace (anaerobní metabolismus) glukózy. Používá se médium s glukózou a acidobazický indikátorem bromthiolovou modří. Do média se vpichem očkuje čistá kultura. Bromthiolová modř je ve vzniklém kyselém prostředí žlutá, v zásaditém modrá a v neutrální zelená. Jedna zkumavka se zalévá parafinem = test na fermentaci glukózy a druhá se nechá volně = test na oxidaci glukózy. Pokud médium zůstane modré, není glukóza využívána.

Vyhodnocení:

Obě zkumavky byly žluté. Neznámý kmen dokázal glukózu jak oxidovat, tak fermentovat – odpovídá enterobakteriím, které patří mezi fakultativně anaerobní mikroorganismy.

II. TSI test (triple-sugar iron)

Teoretický postup:

1. Do zkumavky se šikmým agarem byla vpichem i hádkem očkovaná čistá kultura (oba způsoby použity na každou zkumavku).
2. Kultivováno 24 hodin při 37°C.

Metodika:

Pomocí TSI testu můžeme enterobakterie rozurčit do jednotlivých druhů na základě toho, zda využívají pouze glukózu nebo všechny tři cukry – glukózu, sacharózu i laktózu. Médium obsahuje acidobazický indikátor bromkresolovou červeň. Využívají-li bakterie pouze glukózu, médium zežloutne pouze ve sloupci, využívají-li všechny tři cukry, žluté bude i v šikmé části agar. Pomocí síranu železnatého je dále možné indikovat produkci sirovodíku, který některé enterobakterie vytvářejí redukcí sloučenin síry. Reakcí sirovodíku se sulfidem železnatým vzniká nerozpustný černý sulfid železnatý. Také se sleduje přítomnost plynu vznikajícího při kvašení cukrů dole ve sloupci.

Vyhodnocení:

Médium bylo po celé zkumavce zbarveno do žluta, takže naočkovaný kmen utilizoval všechny tři cukry. Viditelné bylo i černé zbarvení média způsobené produkcí sirovodíku. Dole ve zkumavce se vytvářely bublinky jako důsledek kvašení.

Všechny dosavadní testy nasvědčovaly tomu, že neznámým kmenem jsou enterobakterie. Neznámý kmen „3“ byl proto použit pro následující ENTEROtest a papírkové testy.

___BAKTERIÁLNÍ KMENY „2,3,5“___

➤ **Komerční test**

ENTEROtest

Postup:

1. Do zkumavky napipetovány 3 ml fyziologického roztoku.
2. Do roztoku kličkou postupně přidávány buňky z 24 hodinového nárůstu kultury až do zákalu o hodnotě 1 dle stupnice MacFarlanda.
3. Z protřepané suspenze pipetováno po 100 µl do jednotlivých jamek ENTEROtestu.
4. 5 jamek (dle šablony) bylo zakápnuto parafinovým olejem pro vytvoření anaerobních podmínek.
5. Destička zabalena do sáčku (proti vyschnutí) a kultivována 22 hodin při 37°C.

Metodika:

ENTEROtest je komerčně dodávaným testem, který umožňuje nenáročně rozurčit enterobakterie až do druhů. ENTEROtest sestává z 16ti testů (biochemických reakcí) umístěných ve dvou řádcích probíhajících v oddělených jamkách na jedné destičce. Jednotlivé jamky jsou označeny zkratkami charakterizujícími podstatu daného testu. Při ENTEROtestu jsou enterobakterie testovány na:

* produkci sirovodíku (H₂S) * produkci indolu (IND) * dekarboxylaci lysinu (LYS) * dekarboxylaci ornithinu (ORN) * rozklad močoviny (URE) * deaminaci fenylalaninu (PHE) * hydrolýzu eskulinu (ESC) * utilizaci citrátu (SCI) * utilizaci malonátu (MAL) * produkci kyseliny z inositolu (INO) * adonitu (ADO) * cellobiózy (CEL) * sacharózy (SUC) * sorbitolu (SOR) * trehalózy (TRE) a * mannitolu (MAN).

Po patřičné době kultivace se odečítají výsledky reakcí. Nejdříve se zakápnou jamky pro produkci indolu (IND) a deaminaci fenylalaninu (PHE) příslušnými činidly. Tyto reakce se odečítají jako první, protože po třech minutách pozitivní reakce mizí. Dle interpretační tabulky se podle zbarvení vyhodnotí, zda byla daná reakce pozitivní (+) či negativní (-).

MIKROTEST®

3027 3028 3029 3030 3031 3032 3033 3034 3035 3036 3037 3038 3039 3040 3041 3042 3043 3044 3045 3046 3047 3048 3049 3050 3051 3052 3053 3054 3055 3056 3057 3058 3059 3060 3061 3062 3063 3064 3065 3066 3067 3068 3069 3070 3071 3072 3073 3074 3075 3076 3077 3078 3079 3080 3081 3082 3083 3084 3085 3086 3087 3088 3089 3090 3091 3092 3093 3094 3095 3096 3097 3098 3099 3100 3101 3102 3103 3104 3105 3106 3107 3108 3109 3110 3111 3112 3113 3114 3115 3116 3117 3118 3119 3120 3121 3122 3123 3124 3125 3126 3127 3128 3129 3130 3131 3132 3133 3134 3135 3136 3137 3138 3139 3140 3141 3142 3143 3144 3145 3146 3147 3148 3149 3150 3151 3152 3153 3154 3155 3156 3157 3158 3159 3160 3161 3162 3163 3164 3165 3166 3167 3168 3169 3170 3171 3172 3173 3174 3175 3176 3177 3178 3179 3180 3181 3182 3183 3184 3185 3186 3187 3188 3189 3190 3191 3192 3193 3194 3195 3196 3197 3198 3199 3200 3201 3202 3203 3204 3205 3206 3207 3208 3209 3210 3211 3212 3213 3214 3215 3216 3217 3218 3219 3220 3221 3222 3223 3224 3225 3226 3227 3228 3229 3230 3231 3232 3233 3234 3235 3236 3237 3238 3239 3240 3241 3242 3243 3244 3245 3246 3247 3248 3249 3250 3251 3252 3253 3254 3255 3256 3257 3258 3259 3260 3261 3262 3263 3264 3265 3266 3267 3268 3269 3270 3271 3272 3273 3274 3275 3276 3277 3278 3279 3280 3281 3282 3283 3284 3285 3286 3287 3288 3289 3290 3291 3292 3293 3294 3295 3296 3297 3298 3299 3300 3301 3302 3303 3304 3305 3306 3307 3308 3309 3310 3311 3312 3313 3314 3315 3316 3317 3318 3319 3320 3321 3322 3323 3324 3325 3326 3327 3328 3329 3330 3331 3332 3333 3334 3335 3336 3337 3338 3339 3340 3341 3342 3343 3344 3345 3346 3347 3348 3349 3350 3351 3352 3353 3354 3355 3356 3357 3358 3359 3360 3361 3362 3363 3364 3365 3366 3367 3368 3369 3370 3371 3372 3373 3374 3375 3376 3377 3378 3379 3380 3381 3382 3383 3384 3385 3386 3387 3388 3389 3390 3391 3392 3393 3394 3395 3396 3397 3398 3399 3400 3401 3402 3403 3404 3405 3406 3407 3408 3409 3410 3411 3412 3413 3414 3415 3416 3417 3418 3419 3420 3421 3422 3423 3424 3425 3426 3427 3428 3429 3430 3431 3432 3433 3434 3435 3436 3437 3438 3439 3440 3441 3442 3443 3444 3445 3446 3447 3448 3449 3450 3451 3452 3453 3454 3455 3456 3457 3458 3459 3460 3461 3462 3463 3464 3465 3466 3467 3468 3469 3470 3471 3472 3473 3474 3475 3476 3477 3478 3479 3480 3481 3482 3483 3484 3485 3486 3487 3488 3489 3490 3491 3492 3493 3494 3495 3496 3497 3498 3499 3500 3501 3502 3503 3504 3505 3506 3507 3508 3509 3510 3511 3512 3513 3514 3515 3516 3517 3518 3519 3520 3521 3522 3523 3524 3525 3526 3527 3528 3529 3530 3531 3532 3533 3534 3535 3536 3537 3538 3539 3540 3541 3542 3543 3544 3545 3546 3547 3548 3549 3550 3551 3552 3553 3554 3555 3556 3557 3558 3559 3560 3561 3562 3563 3564 3565 3566 3567 3568 3569 3570 3571 3572 3573 3574 3575 3576 3577 3578 3579 3580 3581 3582 3583 3584 3585 3586 3587 3588 3589 3590 3591 3592 3593 3594 3595 3596 3597 3598 3599 3600 3601 3602 3603 3604 3605 3606 3607 3608 3609 3610 3611 3612 3613 3614 3615 3616 3617 3618 3619 3620 3621 3622 3623 3624 3625 3626 3627 3628 3629 3630 3631 3632 3633 3634 3635 3636 3637 3638 3639 3640 3641 3642 3643 3644 3645 3646 3647 3648 3649 3650 3651 3652 3653 3654 3655 3656 3657 3658 3659 3660 3661 3662 3663 3664 3665 3666 3667 3668 3669 3670 3671 3672 3673 3674 3675 3676 3677 3678 3679 3680 3681 3682 3683 3684 3685 3686 3687 3688 3689 3690 3691 3692 3693 3694 3695 3696 3697 3698 3699 3700 3701 3702 3703 3704 3705 3706 3707 3708 3709 3710 3711 3712 3713 3714 3715 3716 3717 3718 3719 3720 3721 3722 3723 3724 3725 3726 3727 3728 3729 3730 3731 3732 3733 3734 3735 3736 3737 3738 3739 3740 3741 3742 3743 3744 3745 3746 3747 3748 3749 3750 3751 3752 3753 3754 3755 3756 3757 3758 3759 3760 3761 3762 3763 3764 3765 3766 3767 3768 3769 3770 3771 3772 3773 3774 3775 3776 3777 3778 3779 3780 3781 3782 3783 3784 3785 3786 3787 3788 3789 3790 3791 3792 3793 3794 3795 3796 3797 3798 3799 3800 3801 3802 3803 3804 3805 3806 3807 3808 3809 3810 3811 3812 3813 3814 3815 3816 3817 3818 3819 3820 3821 3822 3823 3824 3825 3826 3827 3828 3829 3830 3831 3832 3833 3834 3835 3836 3837 3838 3839 3840 3841 3842 3843 3844 3845 3846 3847 3848 3849 3850 3851 3852 3853 3854 3855 3856 3857 3858 3859 3860 3861 3862 3863 3864 3865 3866 3867 3868 3869 3870 3871 3872 3873 3874 3875 3876 3877 3878 3879 3880 3881 3882 3883 3884 3885 3886 3887 3888 3889 3890 3891 3892 3893 3894 3895 3896 3897 3898 3899 3900 3901 3902 3903 3904 3905 3906 3907 3908 3909 3910 3911 3912 3913 3914 3915 3916 3917 3918 3919 3920 3921 3922 3923 3924 3925 3926 3927 3928 3929 3930 3931 3932 3933 3934 3935 3936 3937 3938 3939 3940 3941 3942 3943 3944 3945 3946 3947 3948 3949 3950 3951 3952 3953 3954 3955 3956 3957 3958 3959 3960 3961 3962 3963 3964 3965 3966 3967 3968 3969 3970 3971 3972 3973 3974 3975 3976 3977 3978 3979 3980 3981 3982 3983 3984 3985 3986 3987 3988 3989 3990 3991 3992 3993 3994 3995 3996 3997 3998 3999 4000

INTERPRETACE REAKCÍ

Stoupec	Test	Zkratka testu	Reakce	
			pozitivní	negativní
Rádek 1				
H	Sirovodík	H ₂ S	žemá, tmavě šedá	bezbarvá, náhledá
G	Lysin	LYS	modrá, modrozelená	zelená, žlutozelená
F	Indol	IND	červenofialová, růžová	žlutá
E	Ornithin	ORN	modrá, modrozelená	zelená, žlutozelená
D	Ureáza	URE	červená, oranžovočervená	žlutá, světle oranžová
C	Fenylalanin	PHE	tmavě zelená, zelená	žlutá, žlutohnědá
B	Eskulin	ESL	žemá, tmavě hnědá, tmavě šedá	bezbarvá, náhledá
A	Simmons citrát	SCI	modrá, modrozelená	žlutá, žlutozelená
Rádek 2				
H	Malonát	MAL	modrá, modrozelená	žlutá, žlutozelená
G	Inositol	INO	žlutá, žlutozelená	zelená
F	Adonit	ADO	žlutá, žlutozelená	zelená
E	Celobioza	CEL	žlutá, žlutozelená	zelená
D	Sacharóza	SUC	žlutá, žlutozelená	zelená
C	Sorbitol	SOR	žlutá, žlutozelená	zelená
B	Trehalóza	TRE	žlutá, žlutozelená	zelená
A	Mannitol	MAN	žlutá, žlutozelená	zelená
OXtest	Oxidáza		modrá	bezbarvá
ONPtest	β-galaktosidáza		žlutá, nažloutlá	bezbarvá
COLtest	β-glukonidáza		fluorescence	bezbarvá
VPtest	Aceton		červená, růžová	bezbarvá, mírně nažloutlá

SCHEMA PRACOVNÍHO POSTUPU



MIKROTEST®

ENTEROtest 16

PLIVA-Lachema Diagnostika s.r.o. Karásek 1 621 33 Brno, CZ

Kódy: L, K, M, S, L, O, S, P, No. 100, 1000, 10000, 100000

Průběh: 2

Průběh Strip	ENTEROtest 16															
	Řádek/Riadok/Strip/Степ 1								Řádek/Riadok/Strip/Степ 2							
Průběh	H	G	F	E	D	C	B	A	H	G	F	E	D	C	B	A
Průběh	H ₂ S	LYS	IND	ORN	URE	PHE	ESL	SCI	MAL	INO	ADO	CEL	SUC	SOR	TRE	MAN
OX	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	
ONP	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	
Result	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	

Průběh/Profile/Профиль

Identifikace/Identifikacja/Identification/Идентификация

MIKROTEST®

ENTEROtest 16

PLIVA-Lachema Diagnostika s.r.o. Karásek 1 621 33 Brno, CZ

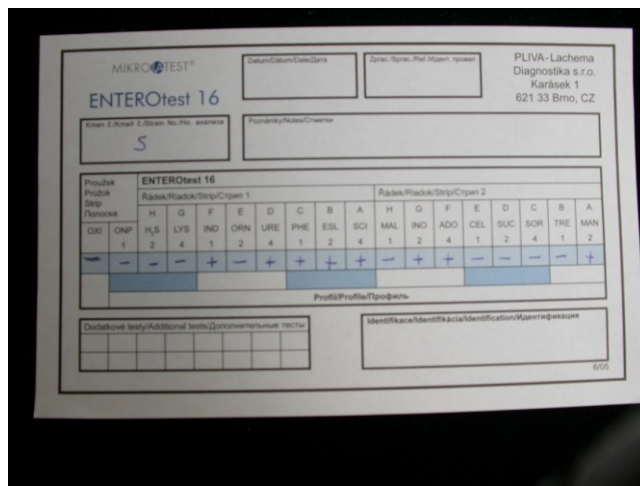
Kódy: L, K, M, S, L, O, S, P, No. 100, 1000, 10000, 100000

Průběh: 3

Průběh Strip	ENTEROtest 16															
	Řádek/Riadok/Strip/Степ 1								Řádek/Riadok/Strip/Степ 2							
Průběh	H	G	F	E	D	C	B	A	H	G	F	E	D	C	B	A
Průběh	H ₂ S	LYS	IND	ORN	URE	PHE	ESL	SCI	MAL	INO	ADO	CEL	SUC	SOR	TRE	MAN
OX	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	
ONP	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	
Result	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	

Průběh/Profile/Профиль

Identifikace/Identifikacja/Identification/Идентификация



Zaznamenaná +/- se zapisují do počítače a zpracovávají TNW programem. Na základě těchto údajů určí program bakteriální druh a pro něj vyhodnotí tzv. id skóre, které v % vyjadřuje, jak moc se zkoumaná kultura podobá svému druhu, a tzv. T index, který říká, jak moc se kultura liší od typické kultury. Typický kmen má T index roven 1, méně typický kmen má T index <1.

Vyhodnocení:

KMEN „2“ vyhodnocen jako *E.coli* – id skóre 91,99%, T index 0,74 => není typický a odlišuje se

KMEN „3“ vyhodnocen jako *Proteus vulgaris* – id skóre 99,46%, T index 1 => typický

KMEN „5“ vyhodnocen jako *Providencia rettgeri* – id skóre 100%, T index 1 => typický

➤ Papírkové testy

I. Oxidázový test

Postup:

1. Papírek byl ponořen do zbytku fyziologického roztoku s kulturou.

Metodika:

Oxidázový test identifikuje organismy, které vytvářejí enzym cytochrom c oxidázu. Tato oxidáza je posledním enzymem dýchacího řetězce a účastní se přenosu elektronů v elektron transportním řetězci aerobní bakterie na kyslík. Předáním elektronů kyslíku dojde k oxidaci cytochromu c a k redukci kyslíku. Oxidázové činidlo obsahuje chromogenní oxidačně-redukční činidlo, které oxidací mění barvu. Je-li obsažen enzym cytochrom c oxidáza, zbarví se papírek do 30ti sekund intenzivně modře (případně opožděně do 2 minut), není-li enzym přítomen, barva papírku se nezmění a papírek zůstane šedý (nebo reakce nastane až po 2 minutách).

Vyhodnocení:

Všechny tři kmény byly oxidáza negativní, papírky nezměnily barvu – odpovídá opravdu enterobakteriím, které nemají enzym cytochrom c oxidázu.

II. ONPG test

Postup:

1. Do zbytku fyziologického roztoku s kulturou byl vložen testovací proužek.
2. Kultivace 22 hodin při 37°C.

Metodika:

Tento test se využívá k důkazu produkce enzymu β -galaktozidázy, která štěpí laktózu. Testovací proužek obsahuje bezbarvý o-nitrofenyl- β -D-glaktopranozid. V případě, že má kmen schopnost štěpit laktózu, tedy je enzym přítomen, je o-nitrofenyl- β -D-glaktopranozid hydrolyzován na žlutý o-nitrofenol. Nemá-li kmen tuto schopnost, papírek se mléčně zakalí.

Vyhodnocení:

Ponoření papírků do všech tří buněčných suspenzí způsobilo jejich mléčné zakalení. Takže ani jeden z testovaných tří kmenů neměl enzym β -galaktozidázu.

ZÁVĚR

V první části cvičení bylo úkolem určit, zda neznámý kmen (s pracovním označením „3“) patří mezi enterobakterie. Pomocí 4 základních testů byly zjištěny následující vlastnosti: kmen je gramnegativní (KOH test), kataláza pozitivní (katalázový test), dokáže oxidovat i fermentovat glukózu (OF test) a využívá všechny tři cukry (TSI test). Z toho vyplývá, že má neznámý kmen širokou vrstvu peptidoglykanu, dokáže rozkládat peroxid vodíku, využít glukózu, laktózu i sacharózu a jde o fakultativně anaerobní organismus. Už teď bylo tedy prokázáno, že neznámým kmenem jsou opravdu enterobakterie.

V druhé části cvičení byl kmen „3“ společně se dvěma dalšími (kmeny „2“ a „5“, také enterobakterie) podrobeny testu na přítomnost enzymu cytochrom c oxidáza (oxidázový test). Ani jeden kmen neměl pozitivní reakci. Důležité bylo si uvědomit, že ačkoli některé bakterie nemají tento enzym, jsou schopny oxidace. Využívají tedy jiná oxidační činidla. Dále se testovala produkce enzymu β -galaktozidázy, která byla ve všech případech také negativní. Bakterie tedy nedokázaly štěpit laktózu. A konečně byl proveden ENTEROtest, kterým se podařilo určit jednotlivé druhy enterobakterií. Nejlepšího výsledku dosáhl kmen „5“, který byl se 100% shodností a T indexem 1 určen jako typická *Providencia Rettgeri*. O něco hůře dopadl kmen „3“, *Proteus vulgaris*, s T indexem 1 a s id skórem 99,46%. Nejméně typickým byl kmen „2“, *E.coli*, s podobností 91,99% a T indexem 0,74.