Identifikace bakterií
(biochemické testy, standardizované identifikační systémy)

Cíl: Identifikace neznámého izolátu

Identifikace MO – stanovení příslušnosti k určité taxonomické skupině
- **čistá kultura!!!!**

morfologie: makro- i mikroskopické znaky, tvar a zbarvení kolonie, charakter růstu, identifikační barvení – Gram, acidorezistence, tvorba spor, přítomnost pouzdra, atd.

fyziologie: vztah k O_2, teplota – růst, rezistence, tolerance k NaCl, žlučovým solím, ATB, typ metabolizmu, atd.

biochemie: zdroje C, redukce nitrátů, tvorba indolu, acetoin, atd.

doplňující testy: elektron. mikroskopie, obsah G+C v DNA, sérotizace, fagotypizace, PCR, ribotypizace, imunochemické reakce, chemická analýza BS, produkce toxinu, patogenity, atd.

! Záleží na sledované skupině – tabulky, klíče, často využití počítače!

- **Druh** = jasně vymezená skupina navzájem příbuzných kmenů, zahrnujících typový kmen

  = sdílí 70% a vyšší DNA-DNA homologii komplementárních párů bazí (DNA reasociace)

  = vykazuje, až na výjimky, shodné fenotypové znaky a současně má některé odlišné znaky od jiných skupin

- Bergey‘s Manual of Systematic Bacteriology – přehled popsaných druhů, jejich vlastností, klíče a tabulky k určování

- **Biochemické identifikační testy**
  - snadno zjistitelné a poměrně stálé vlastnosti (mutace je vzácná)
  - v prostředí mohou být mutanti → % kmenů pozitivních reakcí u kmene

Standardizované testovací systémy

– rychlé zpracování velkého množství vzorků
– odstranění nesrovnalostí individuálními rozdíly v přípravě médií, provedení i hodnocení

→ standard, diagnostické soupravy

reprezentativní soubory biochemických testů

(mikrometody – v 1 soupravě 10-20 testů)

jednoduché, snadná manipulace, tabulka hodnocení; API systém

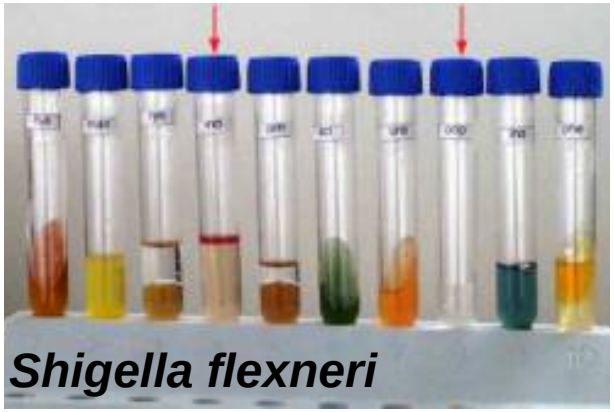
u nás nejvíce od Lachema Brno (ve spolupráci s CCM)

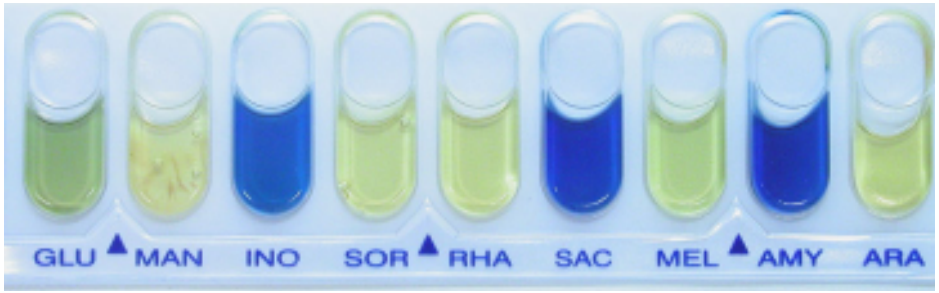
Mikro-LA-Test – vysušená média v destičkách s jamkami, do kterých se kape buněčná suspenze (ENTEROtest, STAPHYtest, ENTERO RAPID, ANAEROtest,…)

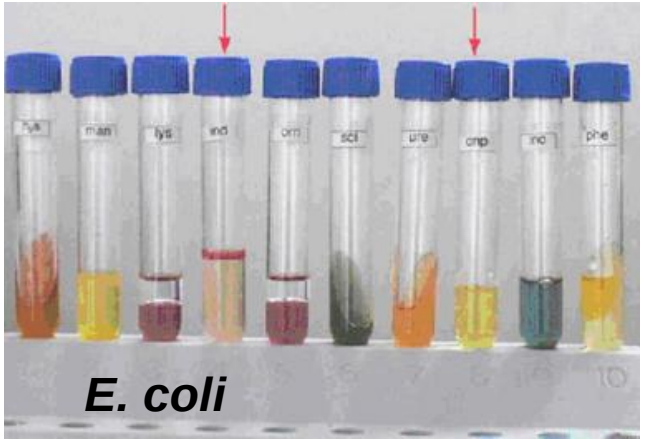
Hodnocení – tabulky, index či program TNW

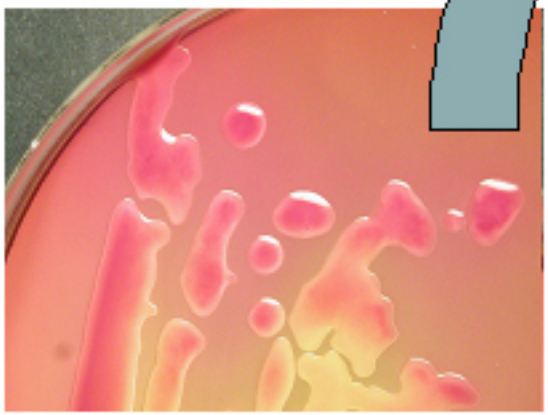
Kontrola kvality – kontrolní kmeny CCM se standardními výsledky

Průkaz glykosidáz v mikrotestu API (u manotolu a sorbitolu je patrná produkce plynu)









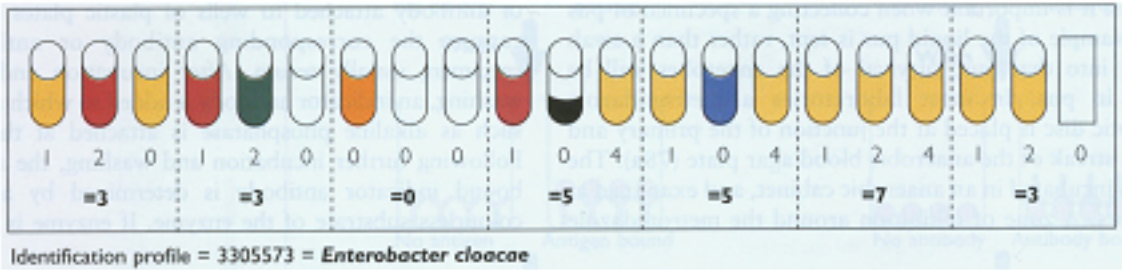


Figure 35.1 The API 20E Manual Biochemical System for Microbial Identification. (a) Positive results. (b) Negative results.

(a) All tests: positive

(b) All tests: negative

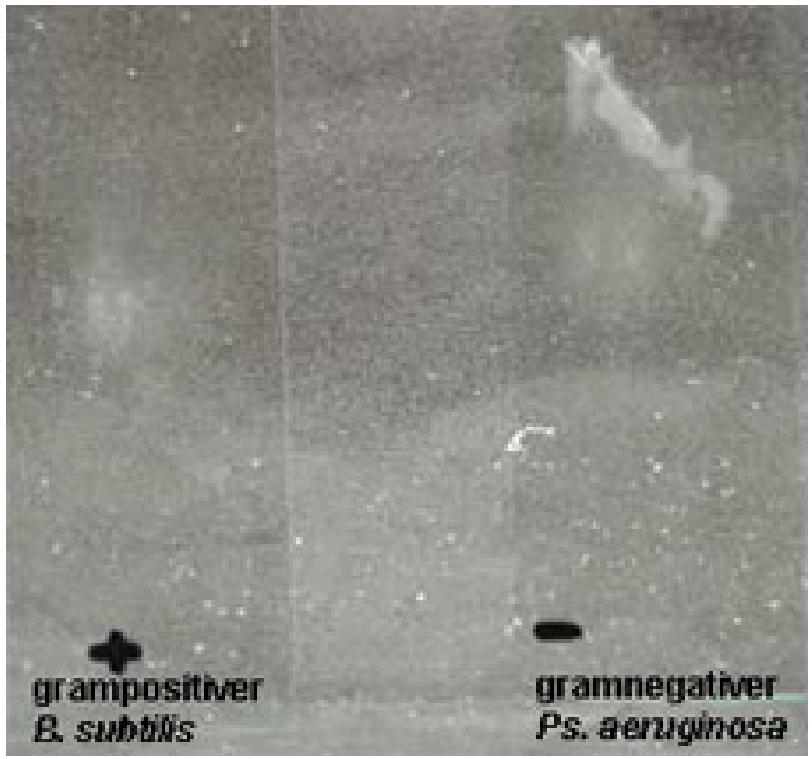
Čeleď *Enterobacteriaceae*

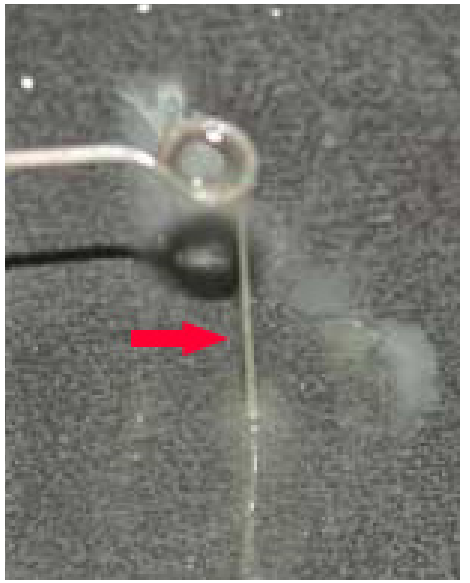
- **G- tyčky, fakultativně anaerobní**
- klinicky významná, početná čeleď, cca 65 druhů
- osídlují střevo, většina nepatogenní, ale i významní patogeni (antropogenní serovary salmonel – Typhi, Paratyphi; *Shigella*, *Yersinia pestis*, některé kmeny *E. coli*)
- rozlišení: kvasné zkoušky, redukce nitrátů, tvorba H_2S, hydrolýza močoviny, KCN test, tvorba indolu…
- selektivní půdy – ENDO a MacKonkey agar, Simmons-citrát agar, Salmonella-Shigella agar, agar s briliantovou zelení
- netvoří spory, chemoautotrofní, mezofilní
- **oxidáza negativní** (kromě rodu *Plesiomonas*); **kataláza pozitivní**

  glukózu štěpí za tvorby plynu; redukují nitráty

KOH test

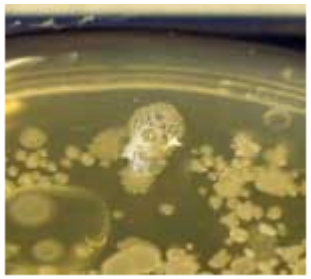
- **určení G+/-**
- do kapky 3% KOH se nanese kličkou kultura
- pokud se za kličkou potáhne sraženina (viskózní suspenze)→ G- došlo k poškození BS a vylití obsahu buňky

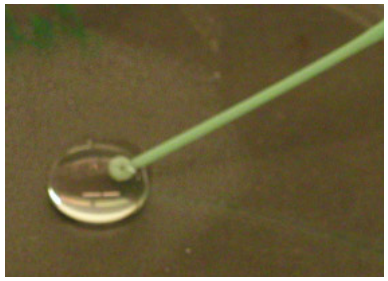


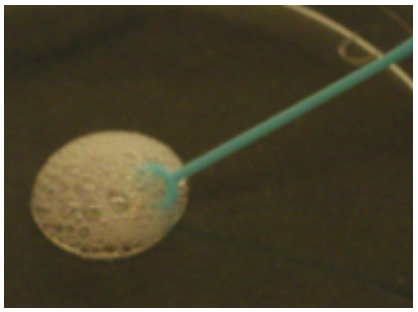


Katalázový test

- kataláza umožňuje rozkládat H_2O_2 na H_2O a molekulární O_2
- do kapky 3% H_2O_2 se nanese kličkou kultura
- pozitivní reakce → uvolňování bublinek







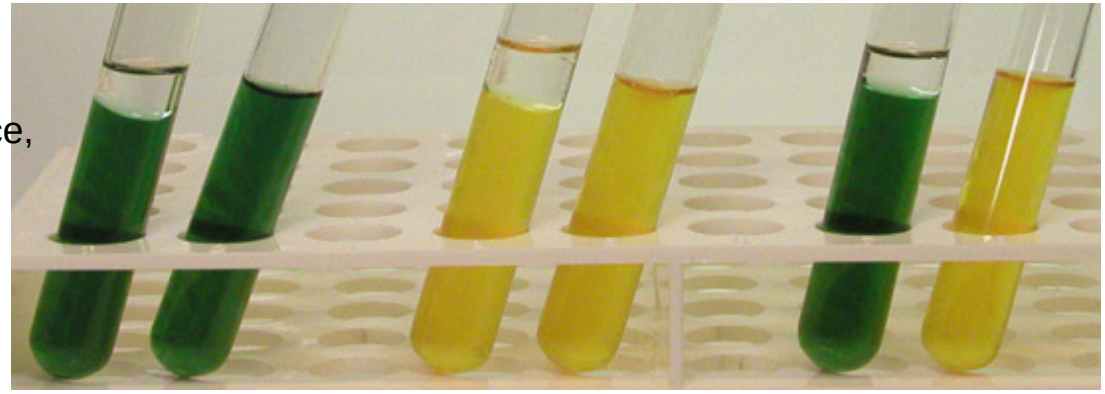
OF test (typ metabolismu glukózy)

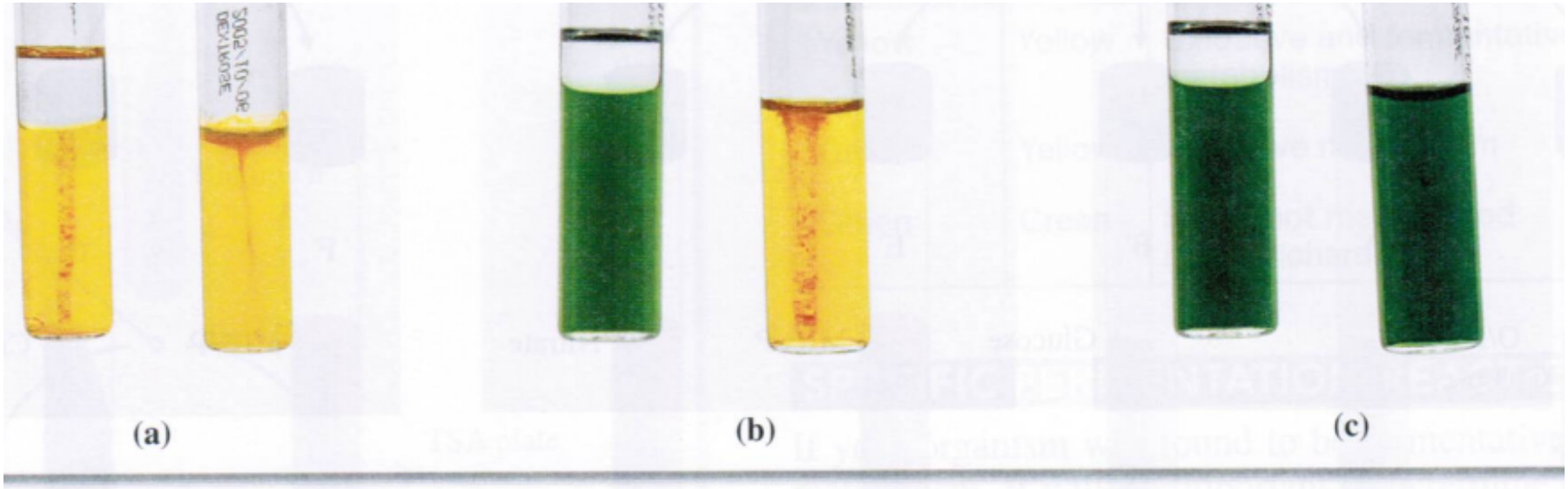
– médium s glukózou a acidobazickým indikátorem (bromthymolová modř) → ve vzniklém kyselém prostředí žloutne (pozitivní reakce); v zásaditém prostředí zmodrá alkalizací; při neutrální reakci zelená
– 2 zkumavky (bez a s parafinem), očkuje se vpichem
– možno odečíst i pohyb bakterií
– nefermentující

pod parafinem modrá či zelená barva

Obr: dvojice zkumavek zleva

- beze změny, oxidace a fermentace, pouze oxidace





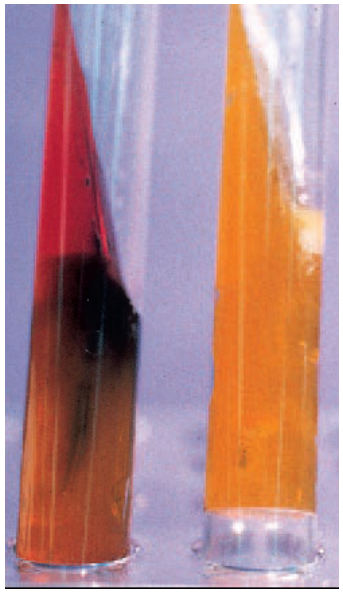
E 41.5 O/F glucose test. (a) Fermentative and oxidative; (b) oxidative; (c) glucose not metabolised
t. © The McGraw-Hill Companies/Auburn University Photographic Services

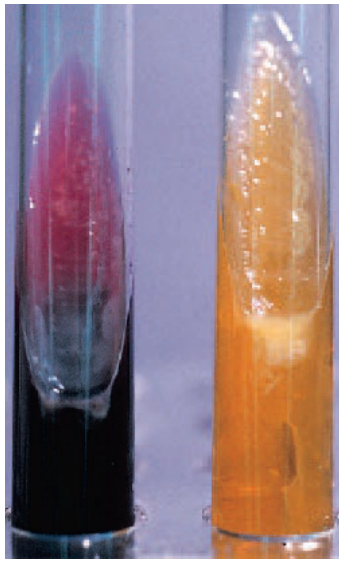
Příprava: Médium s glukózou a bromthymolovou modří (indikátor pH) se plní do zkumavek, rychle se zchladí a do každé druhé zkumavky se přidá sterilní parafinový olej. Testovaný kmen se očkuje vpichem vždy do dvou zkumavek (s parafinovým olejem a bez).

TSI test (tripple sugar iron)

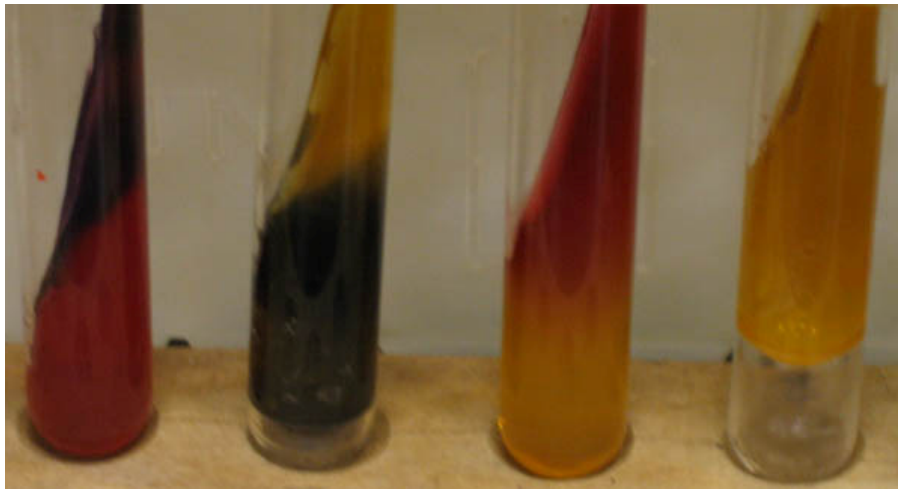
- test na **utilizaci laktózy, glukózy, sacharózy, produkci H_2S** pomocí indikátoru železa podle Hajny
- acidobazický indikátor (bromkrezolová červeň)
- indikátor produkce H_2S (síran železnatý)
- médium je očkováno vpichem a po šikmé ploše i hádkem v 1 zkumavce
- žlutá (pozitivní reakce), černá – H_2S
- produkce plynu – nadzvedlý či potrhaný agar
- glukóza – sloupec; laktóza, sacharóza – šikmá část

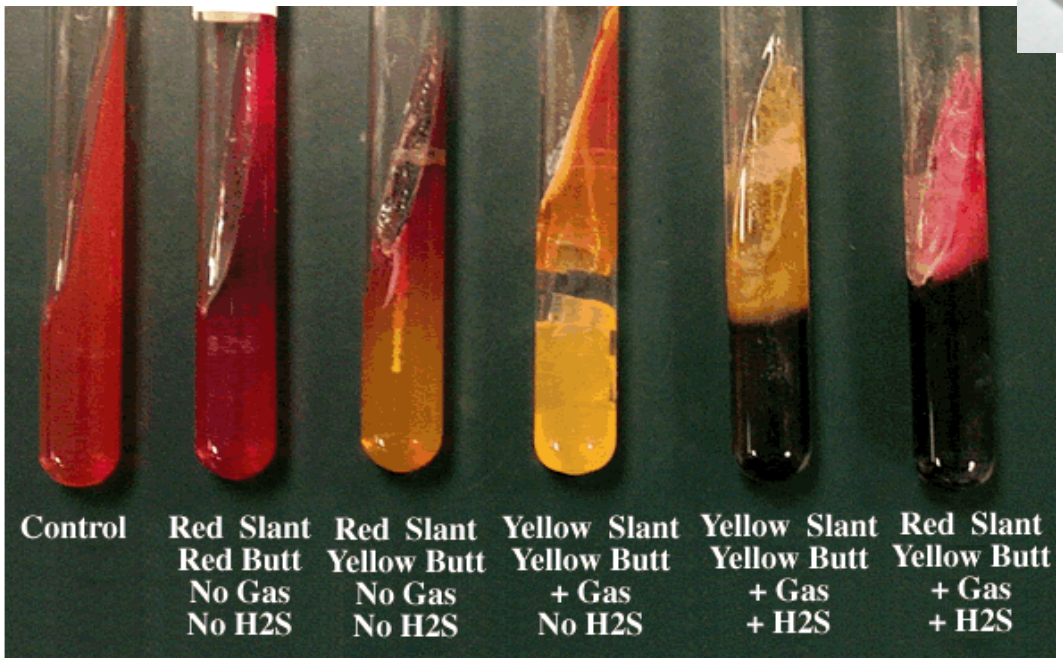
The tube on the left has a yellow butt (acid), red slant (alkaline), H_2S production as indicated by blackening of the agar, and no gas roduction.
The tube on the right shows no H_2S formation, a yellow slant (acid), gas production, and an acid butt. Note that the gas on the bottom has lifted the agar.





The tube on the left has a red butt (alkaline), red slant (alkaline), and no acid or H_2S production. The tube on the right has a yellow slant (acid), yellow butt (acid), and no gas or H_2S production.



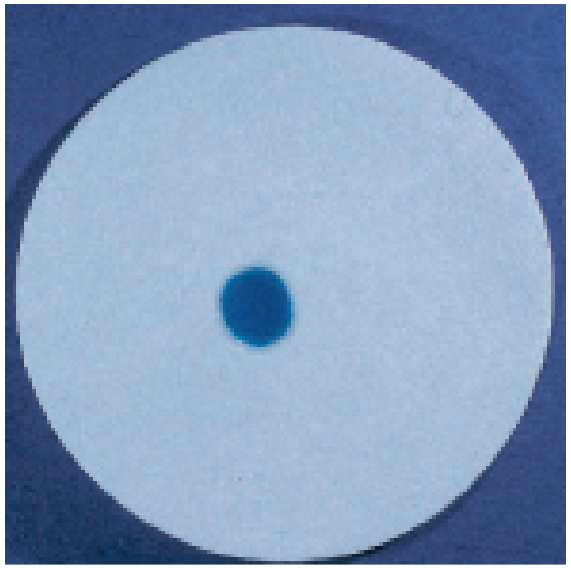

Control
Red Slant
Red Butt
No Gas
No H2S
Red Slant
Yellow Butt
No Gas
No H2S
Yellow Slant
Yellow Butt
+ Gas
No H2S
Yellow Slant
Yellow Butt
+ Gas
+ H2S
Red Slant
Yellow Butt
+ Gas
+ H2S

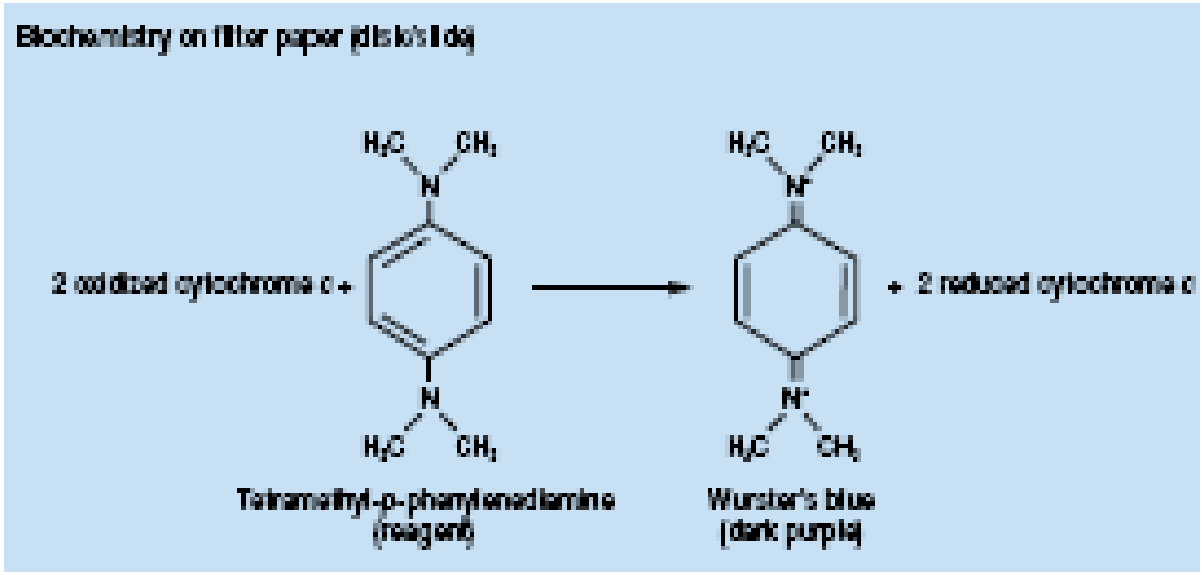
Důkaz produkce oxidázy

- enzym cytochrom oxidáza c
- chromogenní oxidačně-redukční činidlo → oxidací mění barvu (červenofialová)
- papírek zatlačit na kulturu nebo kličkou přenést část kultury
- **pozitivní** – do 30 sec intenzivně **zmodrá**; opožděně pozitivní – do 2 min zmodrá; **negativní** – beze změny i po 2 min

\+ *Pseudomonas aeruginosa, P. putida, P. fluorescens*

– *Enterobacteriaceae (*kromě rodu *Plesiomonas)*



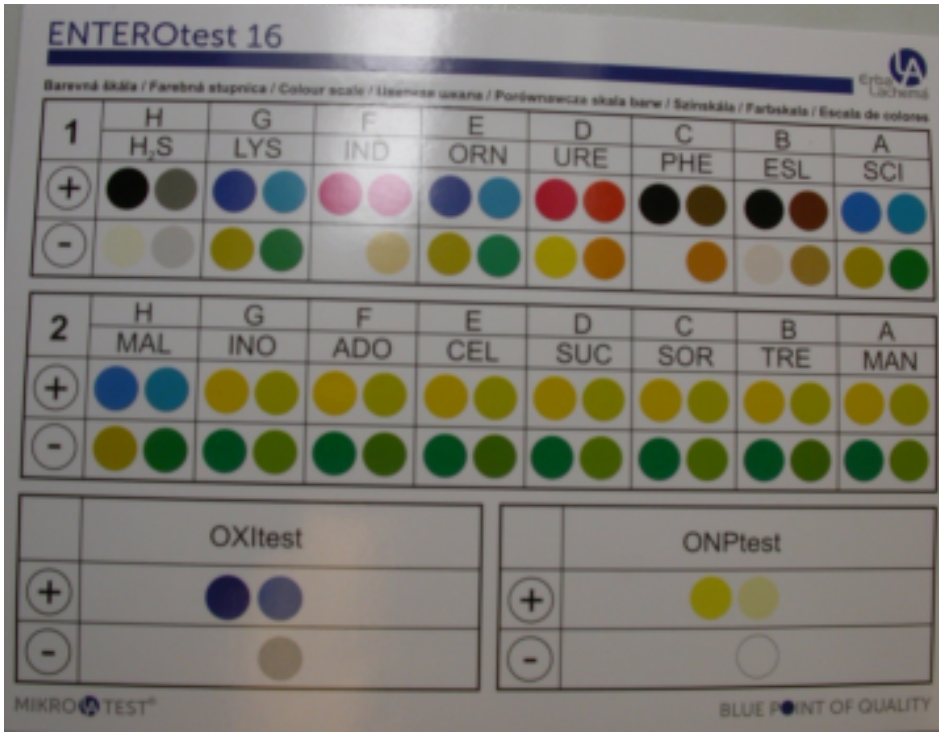


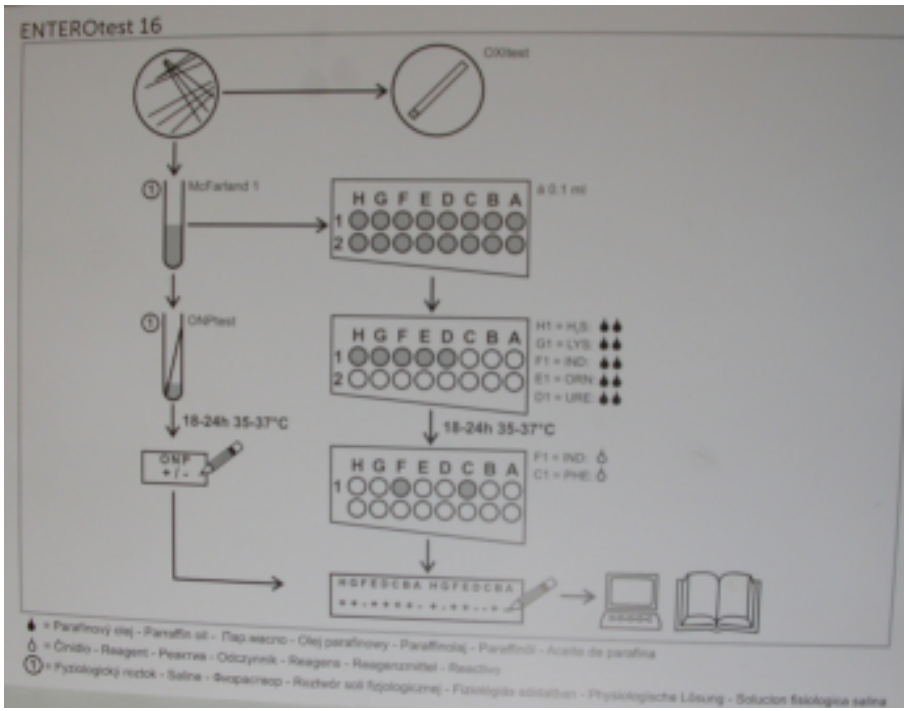
Identifikace G- fermentujících tyček pomocí ENTEROtestu 16

- k identifikaci čeledi *Enterobacteriaceae* (glukózu fermentují, oxi -)
- 16 testů (2 x 8 na destičce)
- **VYBRAT VHODNÝ KMEN**
- 2,5 - 3 ml fyziologického roztoku + buněčná kultura
  → zákal 1 dle stupnice McFarlanda
- POZOR na orientaci destičky
- pipetovat 100 µl suspenze do každé jamky
- anaerobní podmínky (prvních 5) – 2 kapky parafínu
- kultivace 18-24 hod při 37°C

- při hodnocení se zakapávají jamky pro indol a fenylalanin (reakce do 3 min)
- interpretační tabulka, barevná srovnávací stupnice

- H_2S produkce sirovodíku
- LYS dekarboxylace lysinu
- IND produkce indolu
- ORN dekarboxylace ornitinu
- URE rozklad močoviny
- PHE deaminace fenylalaninu
- ESC hydrolýza eskulinu
- SCI utilizace citrátu
- MAL utilizace malonátu
- INO produkce kyseliny z inositolu
- ADO produkce kyseliny z adonitu
- CEL produkce kyseliny z celobiózy
- SUC produkce kyseliny z sacharózy
- SOR produkce kyseliny z sorbitolu
- TRE produkce kyseliny z trehalózy
- MAN produkce kyseliny z mannitolu

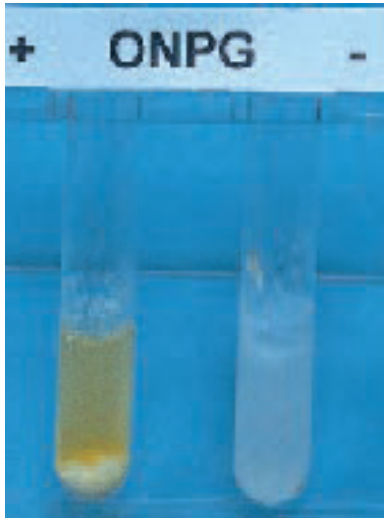


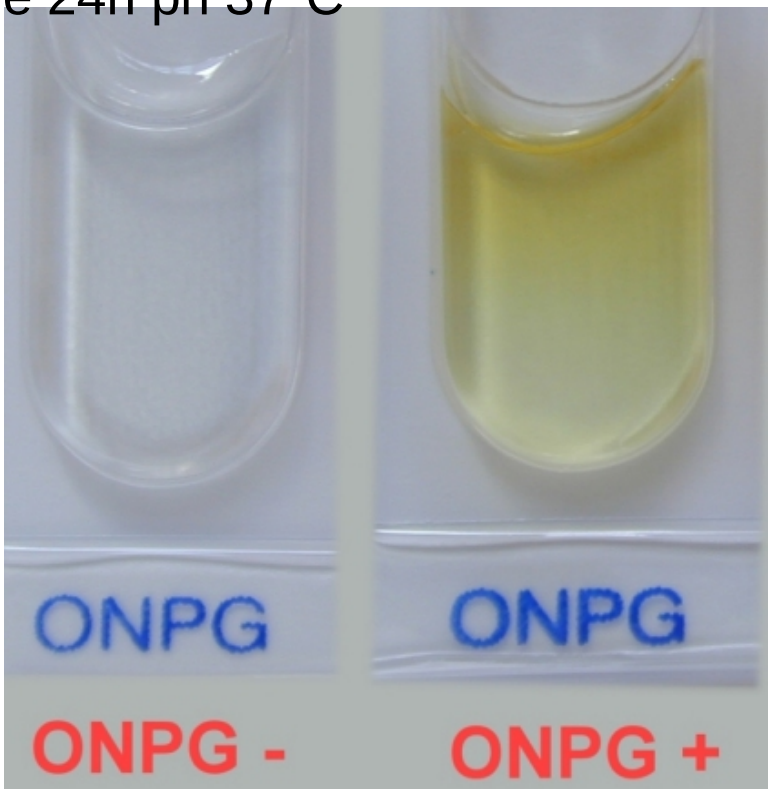


ONPG test

- produkce **β-galaktozidázy**
- bezbarvý o-nitrofenyl-β-D-galaktopyranozid
- **pozitivní reakce** (enzymy schopné štěpit laktózu) – vznik **žlutého** ortho-nitrofenolu

- do zbytku fyziologického roztoku s bakteriální kulturou sterilně vložíme testovací proužek a kultivujeme 24h při 37°C





Program TNW

- **<u>Identifikační skóre</u>** = míra výlučnosti identifikace

  - procento pravděpodobnosti, že kmen přísluší právě k tomuto taxonu /druhu/ a žádnému jinému

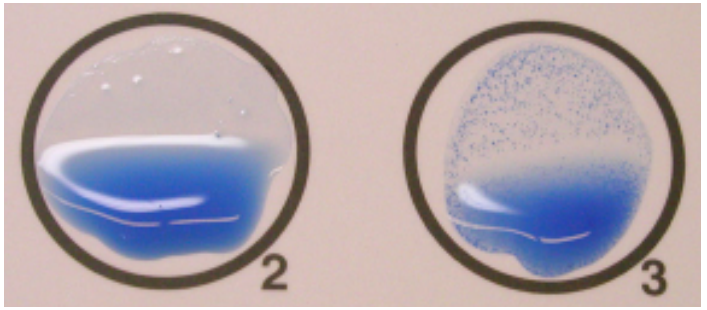
>99	výborné odlišení
96–99	velmi dobré odlišení
90-96	kmen je odlišen
<90	kmen neodlišen

- **<u>T index</u>** = typičnost identifikovaného kmene vzhledem k vypsanému taxonu

  - čím vyšší T index, tím podobnější je daný kmen „ideálu“ daného taxonu

>0,75	typický kmen
0,5-0,75	méně typický kmen
0,25-0,5	netypický kmen
<0,25	zcela netypický kmen

Doplňující testy

Sada latexových reagens pro průkaz somatického antigenu O157 u kultur *E. coli*

Latexová (zprostředkovaná) aglutinace (vpravo pozitivní výsledek)