

J04 – Biochemická identifikace

Ondřej Zahradníček

K praktickému cvičení pro VLLM0421c

Kontakty na mne:

777 031 969

zahradnicek@fnusa.cz

ICQ 242-234-100





Postavení v systému metod

- Přímé metody (mikrob – část – produkt):
 - Mikroskopie – průkaz ve vzorku i id.
 - Kultivace – průkaz ve vzorku i identifikace
 - **Biochemická identifikace – jen identifikace!**
 - Průkaz antigenu – průkaz ve vzorku i id.
 - Průkaz nukleové kyseliny – zpravidla jen průkaz ve vzorku
 - Pokus na zvířeti – zpravidla průkaz ve vzorku
- Nepřímé metody (protilátky)



Obecný princip


- *I mezi savci jsou rozdíly. Člověk neumí tvořit vitamin C, někteří savci ano*
- Mezi bakteriemi velké rozdíly v produkci různých enzymů. Někdy jsou mezidruhové, avšak jsou i mezi kmeny
- Bakterii předložíme určitý substrát a zkusíme, zda ho bakterie pomocí svého enzymu změní v produkt. Produkt se musí lišit od substrátu skupenstvím či barvou. Neliší-li se, použijeme indikátor

Pro připomenutí...

Jestlipak víte, že jste se s takovým biochemickým testem už vlastně setkali? Že ne? Ale ano, v minulém praktiku. ENDOVA PŮDA v sobě také zahrnuje

biochemický test:
rozlišuje bakterie na ty, které umějí štěpit laktózu, a ty, které to neumějí.





Problémy

- Málokdy pozorujeme, že 100 % či 0 % kmenů určitého druhu tvoří daný enzym
- Častěji je to 90 %, 10 %, 70 %, 30 %...

Pokud např. víme, že Janičkella tvoří lenkulázu v 90 % a Evičkella v 10 %, pak lenkuláza-pozitivní mikrob sice může být typická Janičkella, ale také atypická Evičkella

- Proto lze-li, sledujeme více znaků než 1



Možnosti praktického provedení – 1 (rychlé testy)

- **Katalázový test (Ú2):** velmi jednoduchý, do substrátu (roztok H_2O_2) rozmícháme bakterie. Bublínky = pozitivita
- **Testy s dg. proužky – oxidáza (Ú1),** PYR-test a podobné. Reakční ploškou se dotkneme kolonií. V případě positivity ploška změní barvu. Někdy je nutno několik minut vyčkat (INAC u dg. moraxel), někdy vyčkat a pak ještě přikápnout činidlo (PYR-test).



Možnosti praktického provedení – 2 (inkubace 24 h)

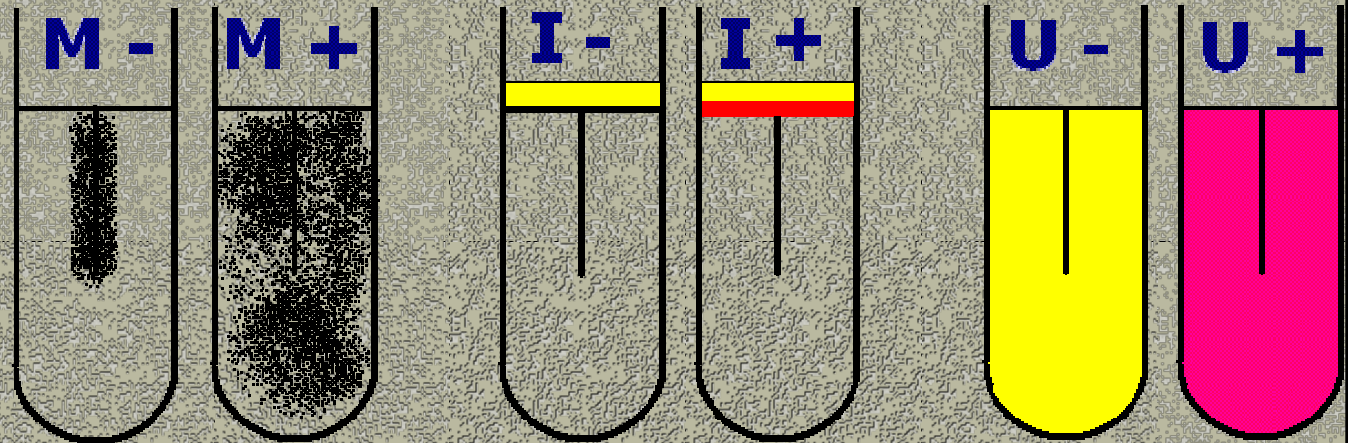
- **Jednoduché zkumavkové testy:** do zkumavky se dá substrát (a indikátor). Pozitivita testu = změna zbarvení (arabinóza). Substrát se může přidat i na proužku (ONPG-test, **Ú3**).
- **Složité zkumavkové testy:** v jedné zkumavce více reakcí, např. zbarvení tekutiny + prstenec + zákal (MIU, **Ú5**). Nebo jsou substráty (více než jeden) v pevné půdě (Hajnova půda **Ú4**).



Ú4 Hajnova půda - princip

- Barva spodní části půdy beze změny: bakterie nefermentuje glukózu (rozdíl tzv. G- neferm. tyčky × enterobakterie)
- Spodní část zčerná – tvorba H_2S
- Půda potrhaná, s bublinkami – tvorba plynu z glukózy
- Dolní část žlutá, horní červená – bakt. fermentuje glukózu, ale ne laktózu
- Půda celá žlutá – fermentuje i laktózu

Ú5 MIU princip



- **M**otility – pohyb. Pohyblivé bakterie rostou nejen kolem vpichu, ale v celém objemu zkumavky.
- **I**ndol (tvorba). U bakterií tvořících indol se po přidání Kovácsova činidla vytvoří červený prstenec na styku činidla a půdy
- **U**rea (močovina). Štěpení močoviny – celý objem půdy zružoví



Hajna + MIU – vyhodnocení (Ú6)

Test	Hajna			MIU		
	Glc	Lac	H ₂ S	Mot	Ind	Ure
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	+
<i>Escherichia coli</i>	+	+	-	+	+	-
<i>Proteus mirabilis</i>	+	-	+	+	-	+
<i>Salmonella enterica</i>	+	-	+	+	-	-
<i>Citrobacter freundii</i>	+	+	(+)	+	-	-



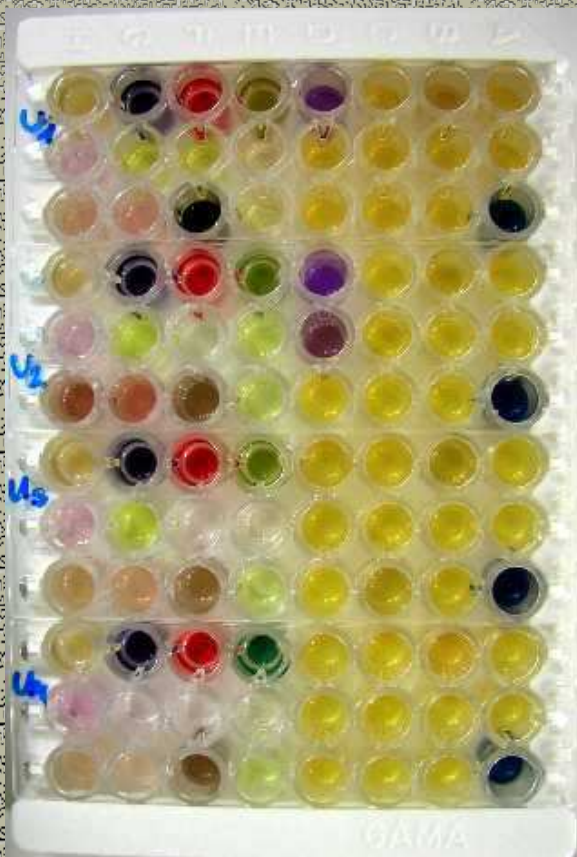
Možnosti praktického provedení – 3 (opět min. 24 h)

- **Miniaturizace sady jednoduchých zkumavkových testů** → testy v důlcích plastových mikrotitračních destiček. Místo každé zkumavky je jeden důlek
- Sady obsahují zpravidla 8 až 32 testů
- **Liší se v technických detailech**. Vždy je však substrát lyofilizovaný, bakterie se nejprve rozmíchá ve FR nebo suspenz. médiu a pak se kape či lije do důlků



- U nás se užívají testy fy Pliva-Lachema Brno (zde NEFERMtest 24)

Různé typy testů v „panelech“



- Ve světě existují různé produkty





Co se po vás chce v Úkolu 7a

- **Nachystejte si destičky**, které jsou vcelku (Enterotest 2). Odhrňte si jeden řádek, ve kterém ještě není tekutina.
- Do jedné **širší zkumavky se zlatým kloboučkem** vyžíhanou kličkou vmíchejte bakterie. Kličku opět vyžíhejte
- **Kapátkem** suspenzi ze zkumavky přeneste do jednoho řádku destičky
- Nyní by se destička dala přes noc do 37 °C (*Ta vaše je jen cvičná, vyhodí se*)

Vyhodnocení testů (Úkol 7b)

- Všechny reakce se odečtou. Někdy též reakce se zbytkem susp. ve zkumavce
- (1) Porovnání s tabulkou: nepraktické.
- (2) Někdy se výsledek zadá do počítače, který „vyplivne“ výsledek.
- (3) Nejčastěji se vypočítá oktálový kód výsledek vyhledá v seznamu kódů.

Test	JAN	LEN	MAG	TOM	PET	KAR	FRA	HAN
Výsl.	+	-	+	+	+	-	-	-
	1	2	4	1	2	1	1	2
Kód		5			3			0



Konkrétně u ENTEROtestu 16

(530 063 = E. coli, 99,89 %, $T_{in} = 1,00$)

Zkum	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
		H	G	F	E	D	C	B	A	H	G	F	E	D	C	B	A
	První řádek panelu								Druhý řádek panelu								
+																	
-																	
F																	
F	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2
	5		3			0			0			6		3			



Charakteristika výsledku

- Ať už v seznamu kódů, nebo ve výstupu počítače, je výsledek charakterizován:
 - **% pravděpodobnosti:** např. že je 90% pravděpodobnost, že kmen opravdu je *Janičkella elegans* a ne něco jiného
 - **Index typičnosti:** míra shody s „ideálním kmenem“ *Janičkella elegans*. Pokud je kmen ideální, je $T_{in} = 1,00$; pokud kmen např. netvoří lenkulázu, ačkoli 90 % janičekel ji tvoří, bude T_{in} nižší než 1,00



Přeji Vám hezký zbytek dne...



Připomínám kabaret
POKUK, nejbližší se
koná 31. března
2006 v 19.30 ve
Vinotéce u Karla na
Starobrněnské 12
v Brně

Téma: „*Praha v Brně*“