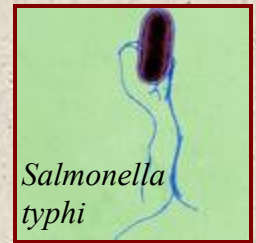
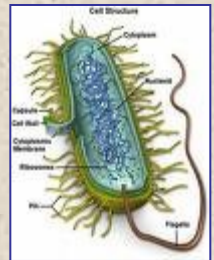
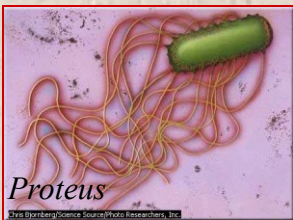


# Úvod do identifikace bakterií

## Základní biochemické testy

## Průvodce po cvičení



*Yersinia pestis*

# Identifikační testy

- Zkumavkové



- Mikrotesty – v 1 soupravě je 10-20 biochem. testů  
**ENTERO**test, STAPHYtest, ANAEROtest ,  
STREPTOtest , NEFERMtest.....



- **Hodnocení:**

identifikační tabulky

TNW program – identifikační skóre (%); T index 0-1



# Dostanete neznámý vzorek.....



- Může být izolátem z prostředí nebo naopak součástí mikroflory teplokrevných živočichů
- Cílovou skupinou našeho cvičení jsou fermentující enterobakterie s fakultativně anaerobním metabolismem (obyvatelé střeva)
- Odliší se od nefermentujících **G- tyček** z prostředí několika jednoduchými testy:  
KAT +, OX -, OF-test: fermentace glukózy +





# *Enterobacteriaceae*



- 65 druhů - **gramnegativních** tyčinek
- Proč fakultativně anaerobní druhy – co je akceptor  $e^-$  ?
- Trávicí trakt
- Přítomnost ve vodě: ukazuje na fekální znečištění
- Většinou nepatogenní
- Patogenní jsou některé druhy:

*Střevní infekce: Salmonella, Shigella a Yersinia*

*Celkové infekce: Yersinia pestis (původce moru) a tzv. antropopatogenní serovary salmonel (serovary Typhi, Paratyphi A, Paratyphi B a Paratyphi C) a některé kmeny E. coli (EPEC, ETEC...)*

# My jsme je již pozorovali...

- Koliformní druhy na Endově agaru, při rozboru vody:

*E. Coli*: kovově lesklé

*Salmonella, Shigella*:

- růžové

Ostatní koliformní: červené



- mFC medium 44°C - červené kolonie  
(štěpící laktózu - modré - fekální koliformní, E. coli)



Pokud vzorek odebíráme z těchto selektivních medií, můžeme provést rovnou ENTEROtest

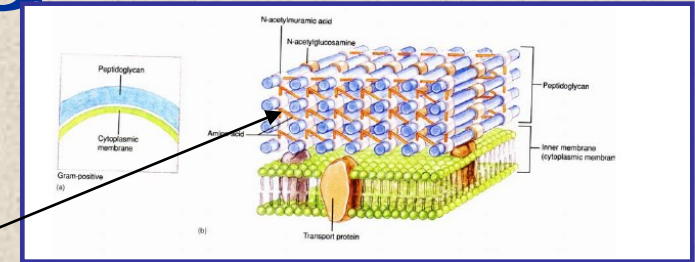
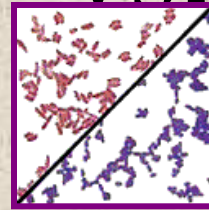
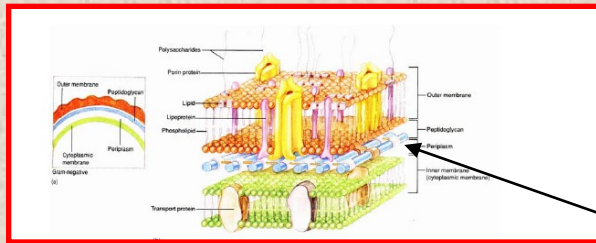
### Postupy ve cvičení:

- Pokud máme vzorek na neselektivním mediu, tedy náš případ, provedeme 2 sklíčkové pokusy:
  - 1) musíme nejprve určit G- typ buněčné stěny (enterobakterie jsou G-)
  - 2) Enterobakterie jsou nadány schopností likvidovat peroxid vodíku - kataláza pozitivní buňky této čeledi pod jeho tíhou šumí



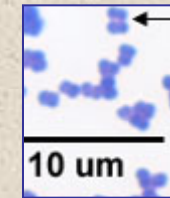
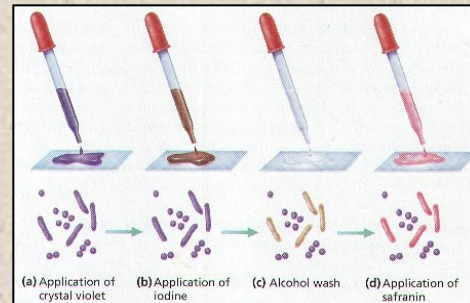
- Následovat budou demonstrační zkumavkové testy, u nichž odečteme výsledky a určíme, které neznámé vzorky fermentují. K tomu poslouží
  - 1) **OF test** (oxidace-fermentace glukózy)
  - 2) **TSI test** (triple sugar, iron)
- U fermentujících buněk provedeme **ENTERO**test se standardním zákalem buněk
- a test na oxidázu - enterob.negativní (**OXI test**)
- a test produkce  $\beta$ -galaktosidázy štěpící laktózu (**ONPG test**)

# G<sup>-</sup> vs. G<sup>+</sup>



peptidoglykan

- Můžeme provést **Gramovo barvení**, tím mimo jiné zjistíme i morfologii buňky či morfologii shluků buněk, což jsou další důl. identifikační znaky, které urychlí rozhodování pro další testy

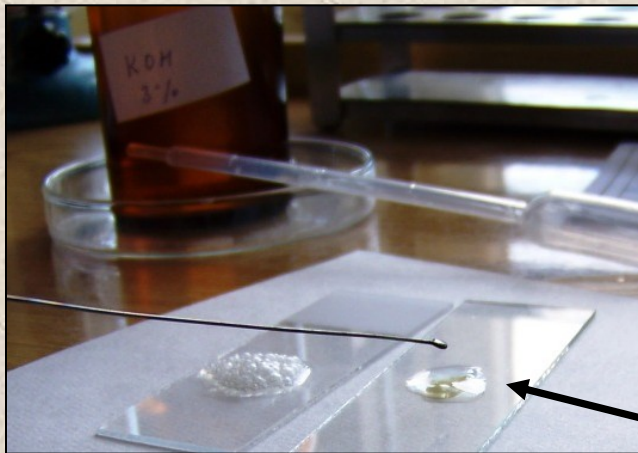


- G<sup>-</sup>/G<sup>+</sup> však určí i rychlejší **KOH test**



# 1) KOH test

- Na ožíhnuté sklíčko kápneme 3% KOH, v místě kapky lehce rozmícháme vyžíhanou kličku s odebraným neznámým vzorkem
- G- buňky mají slabou buněčnou stěnu, která



rychle uvolní obsah buňky  
a za kličkou se táhne  
viskózní suspenze:

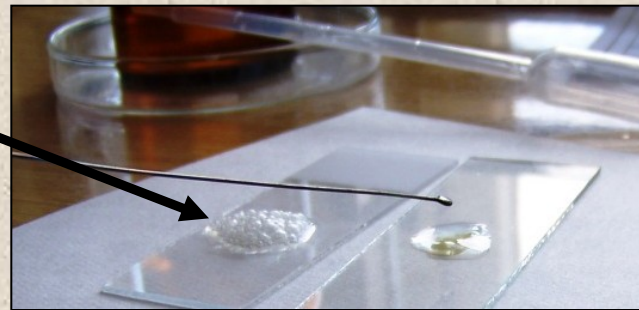
Na sklíčku vpravo KOH test  
G- buňky se táhnou za kličkou

**Nelze použít u bakterií tvořících sliz**

## 2) Katalázový test

- Rozklad peroxidu vodíku na vodu a kyslík je katalyzován enzymem **katalasou**.
- Přidáme 3% peroxid vodíku k bakteriální kultuře přímo na mediu nebo na nátěr buněk na sklíčku. Pozitivní test se projeví uvolňováním bublinek kyslíku.

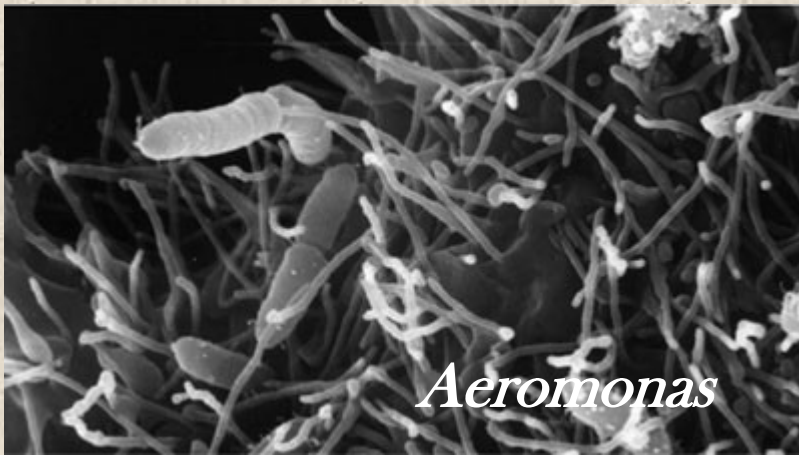
Katalázový test  
na sklíčku vlevo



- Uvnitř velké skupiny G- bakterií můžeme bakterie dále dělit na bakterie fermentující (fakultativně anaerobní metabolismus, který glukózu oxiduje i fermentuje, jako např. naše cílová skupina **enterobakterií**) a bakterie s výhodnějším respiračním metabolismem - nefermentující aerobní vibria, aeromonády, pseudomonády...
- Takové testy pro vzájemné odlišení enterobakterií od Vibrií, aeromonád spočívají v jednoduchých reakcích: test oxidázový, fermentační (OF test)...



- *Vibria* a aeromonády také štěpí glukózu, ale jsou vždy **oxidáza pozitivní** - glukózu tedy nefermentují, jsou nefermentující



- Další skupiny gramnegativních nefermentujících bakterií (mohou to být tyčinky, ale i kokotyčinky či koky) nikdy neštěpí glukózu. Oxidázu mohou mít pozitivní i negativní

Ve cvičení dále následují dva demonstrační pokus, u kterých odečteme fermentaci glukózy a u druhého využití dalších cukrů

Tedy:

1) OF test a 2) TSI test

### 3) OF test

test na oxidaci (aerobní metabol.)/  
/fermentaci (anaerobní met.)



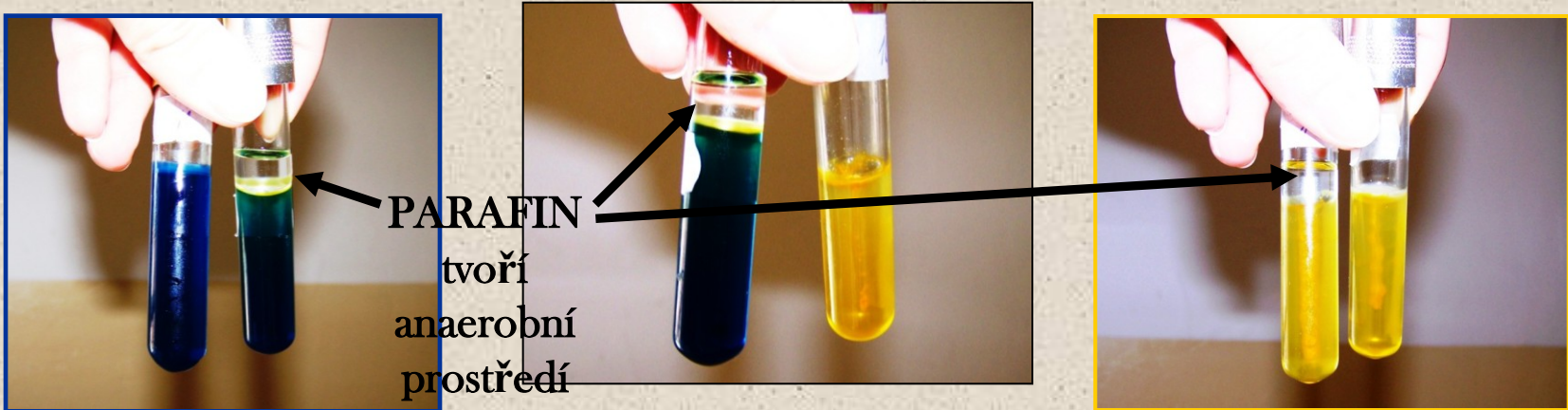
- = detekce respiračních enzymů
- používá se medium s glukózou a acidobazickým indikátorem bromthiolorovou modří, která je následně ve vzniklém kyselém prostředí **žlutá**, v zásaditém **modrá** alkalizací a při neutrální reakci **zelená** **Enterobakterie krom pozitivní oxidace (respirace) glukózu i fermentují!!!**

- k OF testu se využijí vždy dvě zkumavky s vysokou vrstvou polotuhého media
- inokulum čisté kultury se očkuje vpichem
- první se kultivuje aerobně bez parafinu (test oxidace), druhá anaerobně s parafinem (důkaz fermentace)
- odečet po 24h



# OF test - odečet

- Pozitivní reakce oxidace či fermentace **GLUKÓZY** se projeví žlutým zbarvením



pro důkaz fermentace glukózy

Obě zkumavky modré  
obě jsou negativní reakce  
neznámý vzorek glukózu  
ani neoxiduje, ani  
nefermentuje

Zkumavka s parafinem  
vykazuje modrou negativní  
reakci fermentace.  
Neznámý vzorek však  
oxiduje glukózu = žlutá

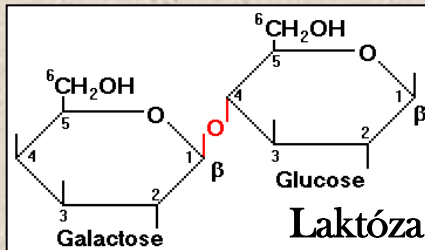
Obě zkumavky žluté  
obě jsou pozitivní reakce  
neznámý vzorek glukózu  
oxiduje i fermentuje  
= **enterobakterie**

- Pokud již tedy víme, že pracujeme s G- buňkou, která je navíc kataláza pozitivní a pod parafínem v OF testu měla pozitivní žlutou reakci, bude to tedy fermentující enterobakterie.
- V OF testu možno odečíst i pohyb buněk - pohyblivé druhy tvoří „oblak“ kolem vpichu
- Zkusíme dále využití tří cukrů - ten dále rozdělí enterobakterie do menších skupin a otestujeme produkci sirovodíku a plynu v tzv TSI testu.

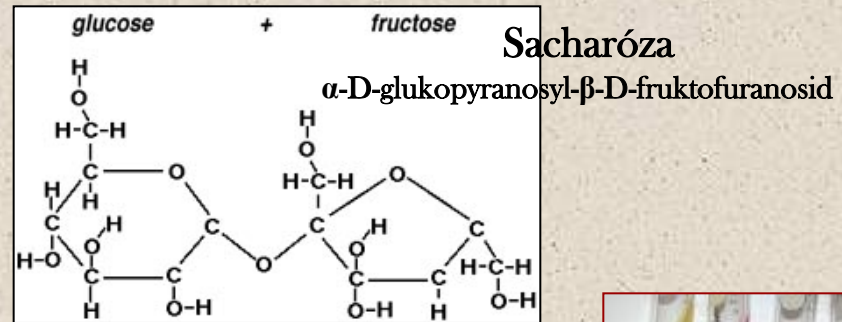


# 4) TSI test (triple-sugar iron)

- Test na utilizaci tří cukrů – glukózy, laktózy a sacharózy + testování produkce  $H_2S$  a plynu



4-*O*-(beta-D-galactopyranosyl)-beta-D-glukopyranóza



- acidobazický indikátor je bromkrezolová červeň
- - indikátor produkce  $H_2S$  je železo

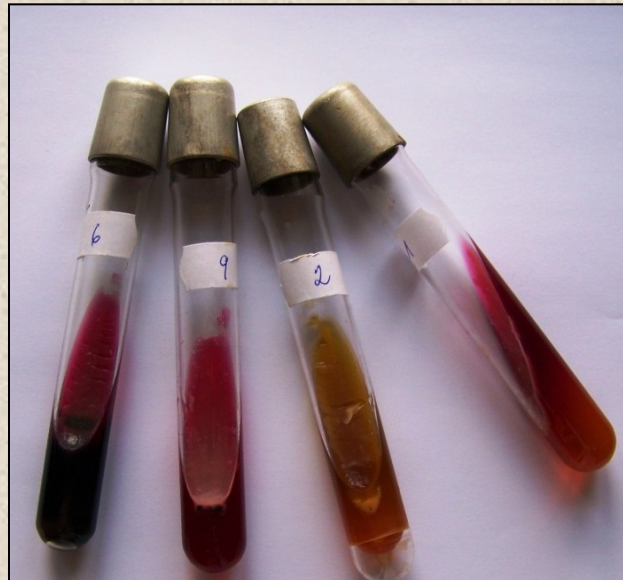


- medium ve zkumavce je očkováno vpichem a vzápětí hádkem po šikmém agaru v jediné zkumavce
- sledujeme zabarvení po kultivaci 24-48h/37°C

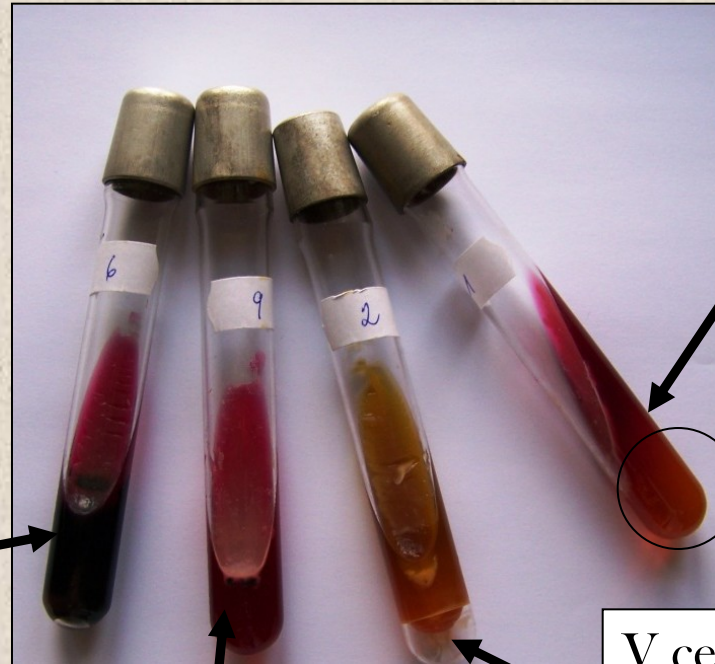


# Hodnocení TSI

- Sledujeme štěpení glukózy, laktózy; plyn
- Některé bakterie uvolňují **sirovodík** z aminokyselin obsahujících síru (cystin, cystein, methionin). Produkce je detekována pomocí síranu železnatého (vytváří se černý sulfid železnatý).



Pozitivní utilizace cukrů: žlutá barva a to: **GLUKÓZA** sledována dole ve sloupci  
**LAKTÓZA** v šikmé horní části agaru  
Fermentace laktózy i sacharózy - celé medium žluté (*E. coli*!)



V této části agaru sledujeme tvorbu sirovodíku, bublinky plynu a fermentaci glukózy

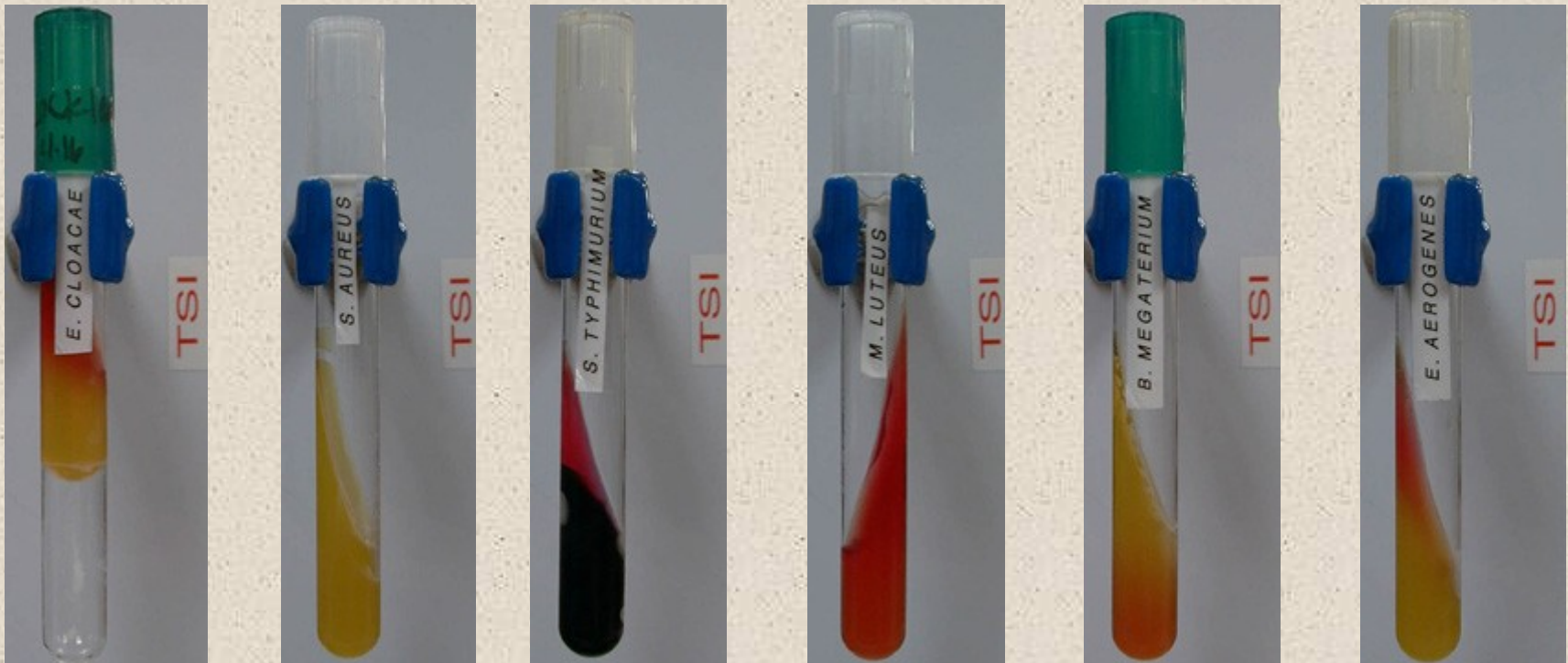
Negativní fermentace

plyn

V této části agaru sledujeme fermentaci glukózy, ne sacharózy a laktózy.

V celé části agaru sledujeme fermentaci laktózy nebo sacharózy nebo obou = celé medium žluté. V této zkumavce lze sledovat i produkci plynu.

# Další příklady růstu na TSI:



*Enterobacter cloacae* - fermentace glukózy, produkce plynu, ne sirovodíku

*Staphylococcus aureus* - kyselá reakce; = fermentace cukrů

*Salmonella typhimurium* fermentace glukózy a produkce plynu a H<sub>2</sub>S

*Micrococcus luteus* využívá pouze pepton media, ne cukry, jen na povrchu agaru

*Bacillus megaterium* fermentace cukrů, ale neroste v anaerobních podmínkách

*Enterobacter aerogenes* fermentace glukózy, katabolismus peptonu



Pro zkvašování cukrů platí následující pravidla:  
pokud kultura nekvasí glukosu, nekvasí ani jiný  
cukr. Kultura fermentující glukosu fermentuje i  
fruktosu a manosu. Fermentuje-li laktosu,  
nefermentuje maltosu a naopak.

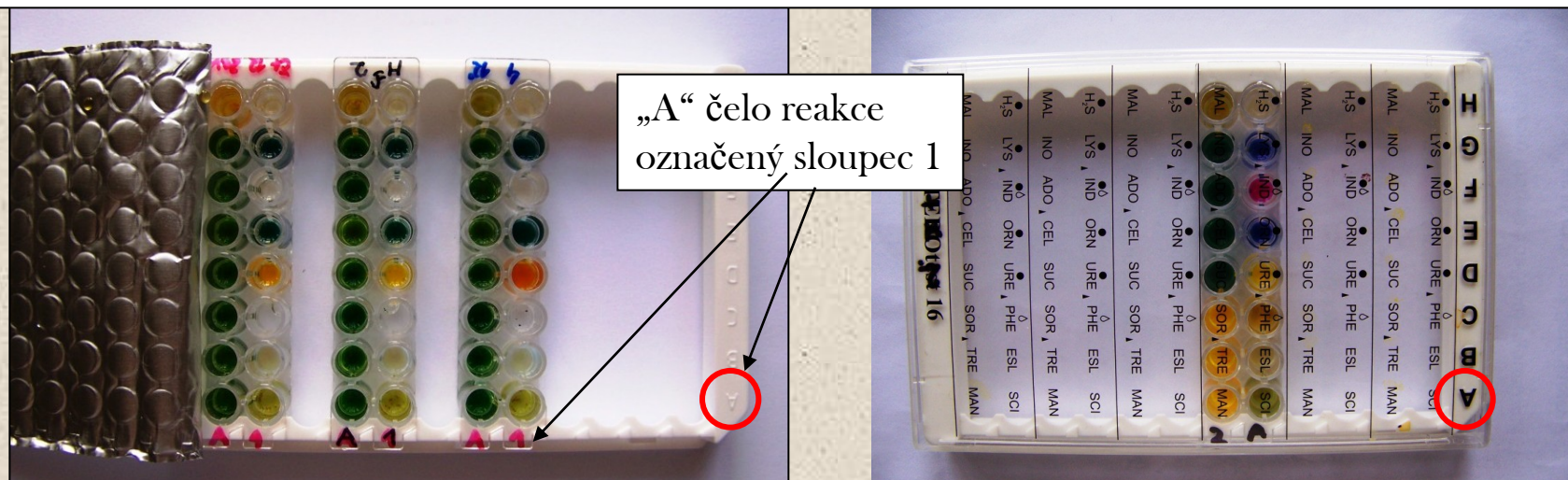
# 5) Enterotest 16

- pro další identifikaci fermentujících
- jamkové testy

- do zkumavky s 2,5 ml fyziologického roztoku vyžíhanou kličkou nabereme neznámý vzorek bakterií a zamícháme, vytvoříme suspenzi buněk o standardním zákalu 1 dle Mac Farlanda



- pořadí testů na 1 destičce ENTEROtestu není samo o sobě nijak značené!!!
- protože každá skupinka pracuje s vlastním testem z originálního balení, musí si před jeho vytažením z balení označit ve dvojici hřebíků na straně A řadu 1, tím po jeho vložení do nového stojánku poznáme „A“ čelo reakcí testu.
- destičku ENTEROtestu umístíme podle „A“ čela reakcí do svého stojánku
- naproti druhé čelo testu již můžeme označit znamením své skupiny



- automatickou pipetou očkujeme 100 mikrolitrů (sterilními špičkami) homogenní suspenze buněk (!!)
- jamky H1 až D1 zakápneme 2 kapkami parafinu (anaerobní reakce- testy pro sirovodík (H), lysin (G), indol (F), ornitin (E) a ureázu (D))



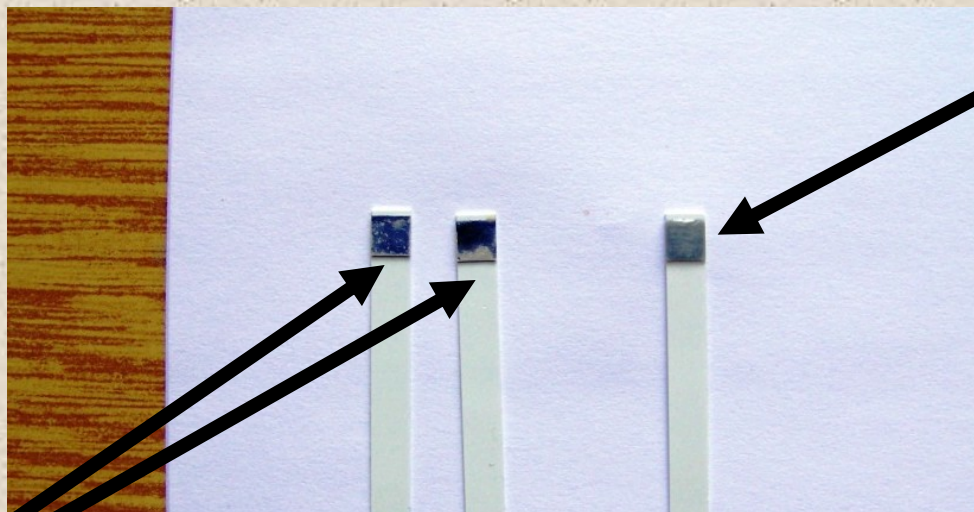
- Nesmí dojít ke kontaminaci sousedních jamek
- Testy se při kultivaci uloží do sáčku aby nevysychaly
- ENTEROtest kultivujeme při 37°C/16-4h



## Papírkové testy: 6) OXI test, 7) ONPG test

- Do zbytku suspenze ve zkumavce sterilně pinzetou namočíme (ožíhnutí hrdla zkumavky) test na oxidázu, papírek vytáhneme
- Poté do zkumavky vložíme papírek ONPG testu a po ožíhnutí hrdla dáme kultivovat spolu s ENTEROtestem

- OXI test – enterobakterie jej mají negativní



Pozitivní OXI test má tmavě modrou barvu a to do 30 sekund. Do dvou minut zmodrá opožděně pozitivní reakce. Šedá či nazelenalá barva po dvou minutách znamená reakci negativní.

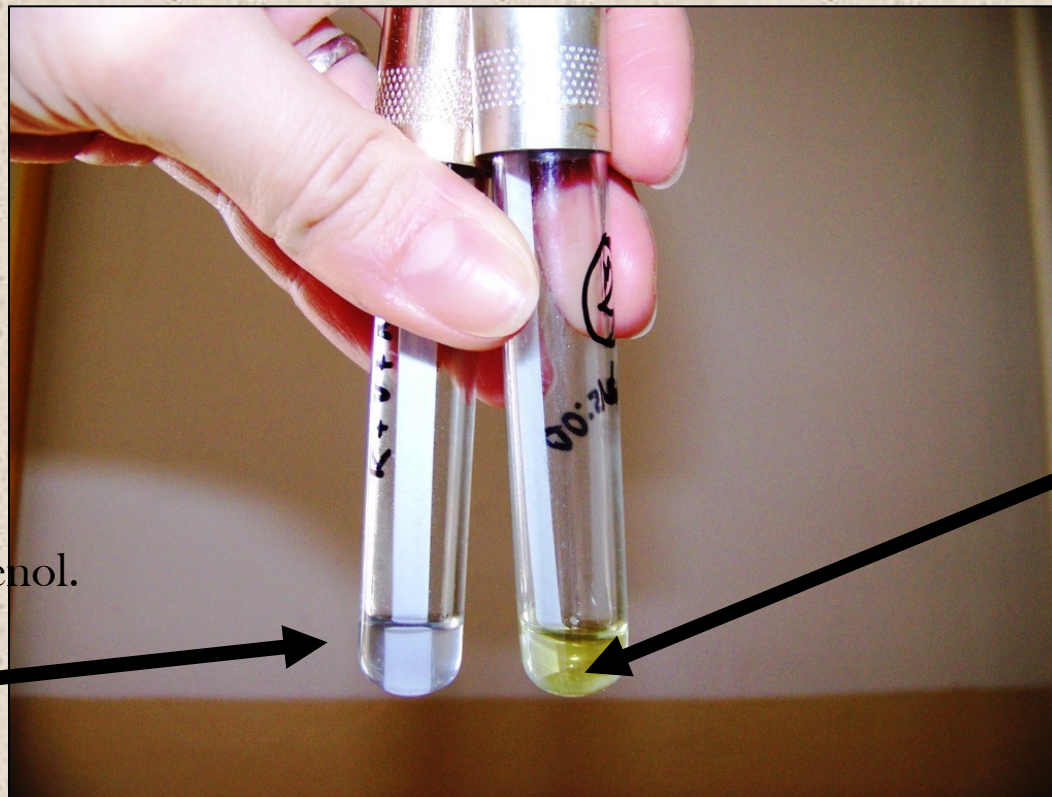
Test identifikuje tvorbu enzymu cytochrom *c* oxidasy (poslední enzym dýchacího řetězce) účastnícího se přenosu elektronů v elektronovém transportním řetězci aerobních bakterií na kyslík (oxidace cytochromu *c* kyslíkem, kyslík je redukován). Oxidasové činidlo obsahuje chromogenní oxidačně-redukční činidlo, které oxidací mění barvu (tmavě červenofialové).



- Pozitivní ONPG reakce je po 4hodinách kultivace žluté zbarvení. Jedná se o test na produkci enzymu betagalaktosidázy, který štěpí laktózu (poznáme již v TSI)

V testu je používán bezbarvý o-nitrofenyl- $\beta$ -D-galaktopyranozid, který je v + případě hydrolyzován na žlutý ortho-nitrofenol.

negativní



Pozitivní žlutá reakce po 24h kultivaci

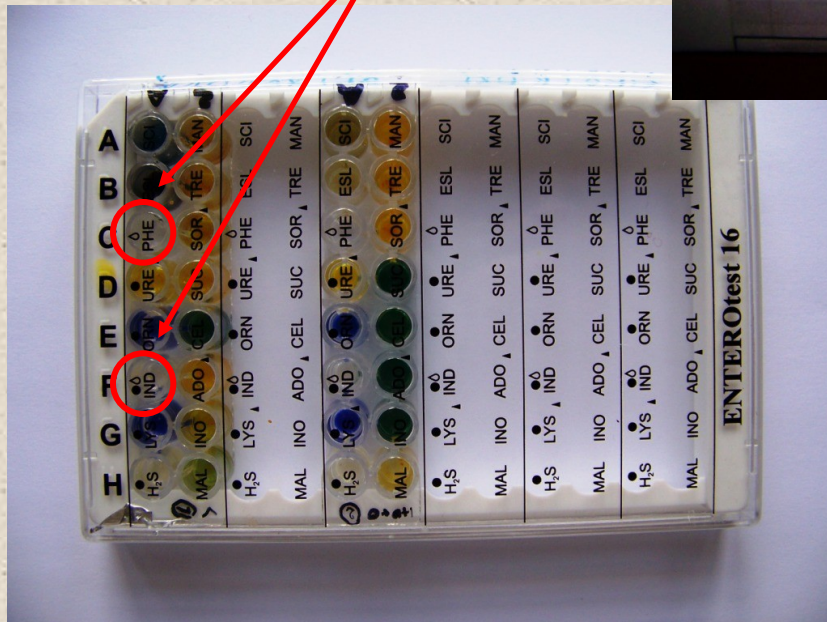


# Hodnocení

- Získané údaje jsou zpracovávány podle klíčů a tabulek, často za pomoci počítače. Protože identifikace je značně náročná, podaří se jen málo typických vzorků zařadit až do druhu přímo v provozních laboratořích. Protože se vyskytují mutanty a jejich procento stoupá v souvislosti se vzrůstajícím znečištěním životního prostředí, přechází se od identifikačních klíčů, které uváděly pouze pozitivní či negativní reakce, k tabulkám, v nichž je uvedeno procento kmenů daného druhu, u nichž je test pozitivní, eventuálně zda výsledek kolísá i u buněk určitého kmene.

# Hodnocení na destičce:

Po kultivaci testu odečítáme pozitivitu či negativitu reakcí podle tabulky interpretace reakcí. Test na indol a fenylalanin se krátce před odečtem zakapává každý svým činidlem.



**INTERPRETACE REAKCÍ**

Sloupec	Test	Zkratka testu	Reakcia	
			pozitivní	negativní
<b>Rádek 1</b>				
H	Sirovodík	H <sub>2</sub> S	černá, tmavě šedá	bezbarvá, naředlá
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	černá, tmavě hnědá, tmavě	bezbarvá, naředlá
A	Simmons citrát	SCI	modrá, modrozelená	žlutá, žlutozelená
<b>Rádek 2</b>				
H	Malonát	MAL	modrá, modrozelená	žlutá, žlutozelená
G	Inositol	INO	žlutá, žlutozelená	zelená
F	Adonitol	ADO	žlutá, žlutozelená	zelená
E	Celobióza	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
OXItest	Oxidáza	OXI	modrá	bezbarvá
ONPtest	β-galaktosidáza	ONP	žlutá, nažloutlá	bezbarvá
COLtest	β-glukoronidáza		fluorescence	nefluoreskuje
VPItest	Acetoin	VPT	červená, růžová	bezbarvá, mírně narůžovělá

MIKROTEST®

**ENTEROtest 16**

Datum/Datum/Date/Дата: \_\_\_\_\_ Zprac./Sprac./Ref.Менет. прован: \_\_\_\_\_

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

Kmen / Kmeň / Strain No./No. анализа: \_\_\_\_\_ Poznámky/Notes/Отметки: \_\_\_\_\_

Proužek Průžok Strip	ENTEROtest 16															
	Rádek/Riadok/Strip/Стрип 1								Rádek/Riadok/Strip/Стрип 2							
Poloska	H	G	F	E	D	C	B	A	H	G	F	E	D	C	B	A
OXI																
ONP	1	2	4	1	2	4	1	2	1	2	4	1	2	4	1	2
H <sub>2</sub> S																
LYS																
IND																
ADO																
ORN																
URE																
PHE																
ESL																
SCI																
MAL																
INO																
ADO																
CEL																
SUC																
SOR																
TRE																
MAN																

Profil/Профиль/Профиль

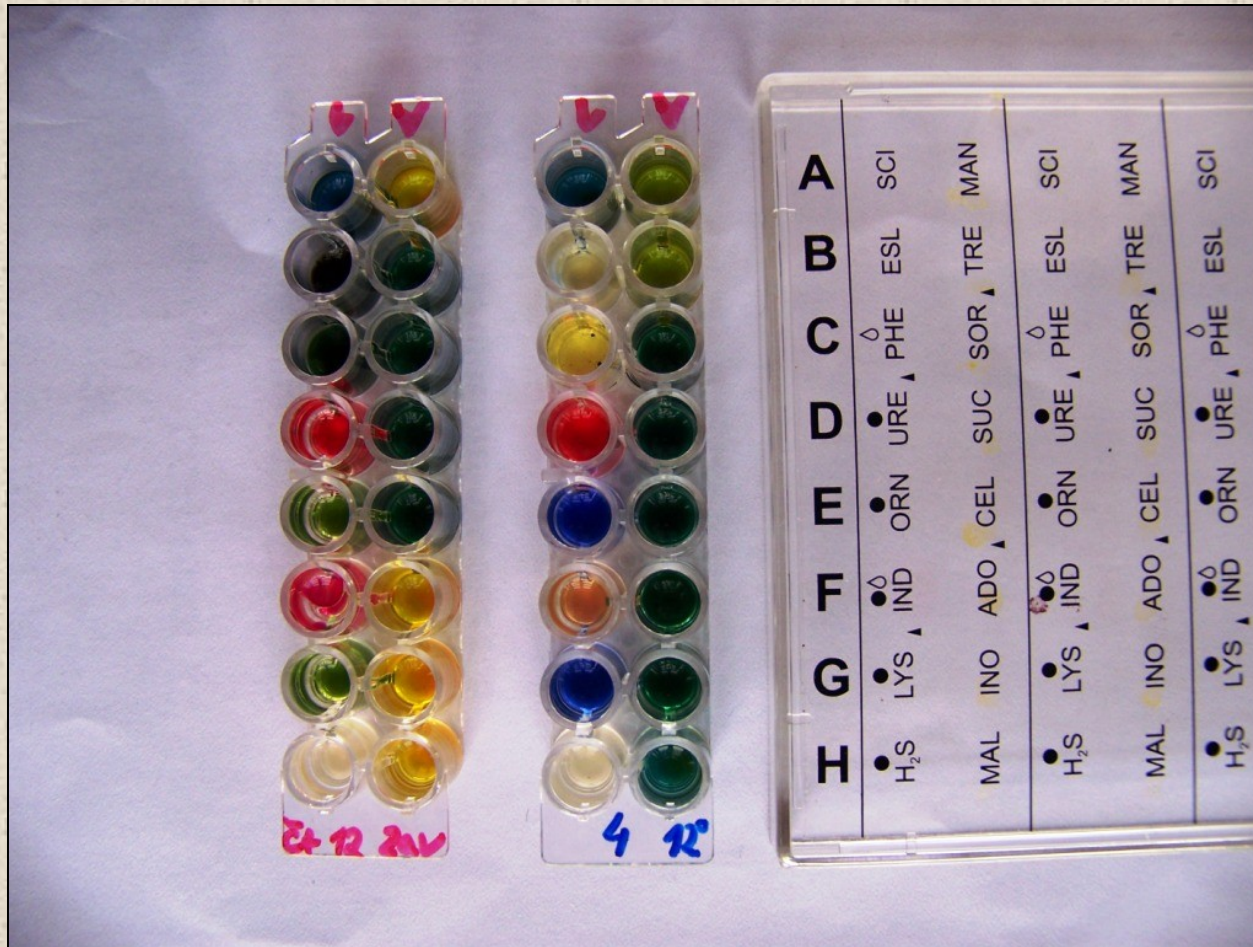
Dodatkové testy/Additional tests/Дополнительные тесты: \_\_\_\_\_

Identifikace/Identifikácia/Identification/Идентификация: \_\_\_\_\_

6/05


Vyplníme + a - výsledky





- Odečítáme ENTEROtest pomocí průhledného víčka, kde je zkratkami zaznačeno pořadí reakcí



- Identifikaci provedeme dle tabulky v návodu testu
- Nebo pomocí programu TNW, který nám po vyplnění +/- k reakcím identifikuje náš kmen, ukáže v % identifikační skóre a T index. Pro typický kmen je T index roven 1. 
- Pro atypický kmen nám test doporučí případné další rozlišující testy či ukáže naše nestandardní výsledky

Jako kontrola kvality použitých chemikálií a kontrola interpretace barevných reakcí se používají tzv.kontrolní kmeny bakterií, které dávají standardní výsledky. Tyto kontrolní kmeny dodává CCM v lyofilizovaném stavu nebo na želatinových discích.

Možné příčiny neidentifikovatelného výsledku:

- kontaminovaná kultura
- malý objem inokula
- kontaminace jamky
- špatné převrstvení parafinem
- atypický kmen

# Shrnutí

- Enterobakterie jsou **gramnegativní tyčinky**, 1-6  $\mu\text{m}$  dlouhé a 0,3-1  $\mu\text{m}$  široké, netvoří spory; pohyblivé druhy mají peritrichální bičíky (*Proteus..*)
- Enterobakterie jsou nenáročné chemoautotrofní bakterie, mezofilní - rostou v rozmezí 18 - 40°C, optimum je 37°C
- Po provedení oxidázového testu jsou enterobakterie oxidáza negativní (s.výjimkou rodu Plesiomonas, který k nim byl nedávno přiřazen), tvorí katalázu (kataláza pozitivní) a vždy štěpí glukózu (i tvorba plynu), dále redukuje nitráty (při fakultativní anaerobióze jsou totiž nitráty akceptorem elektronů)