

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.

fyzilogie: vztah k O₂, teplota – růst, rezistence, tolerance k NaCl, žlučovým solím, ATB, typ metabolismu, 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 pc!

- **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 popsáných 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)

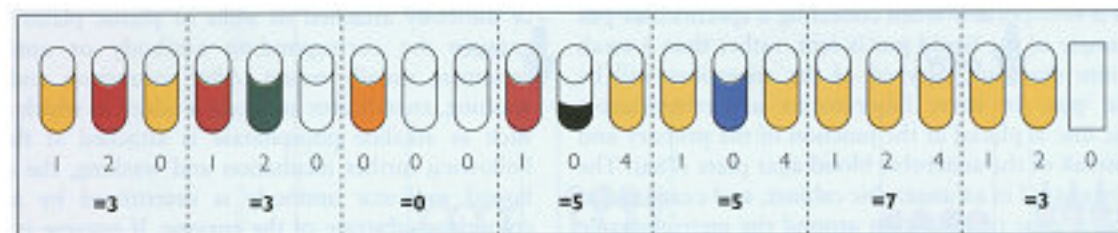
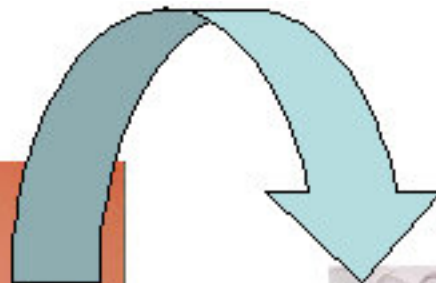
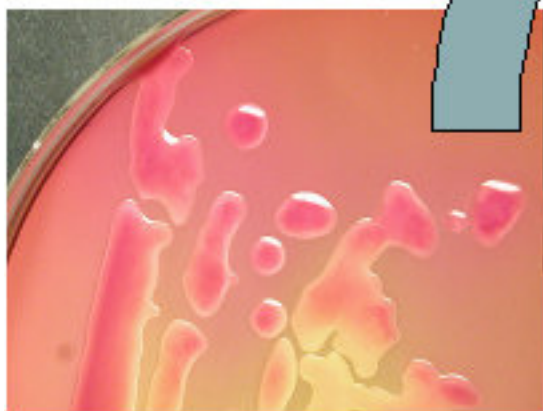
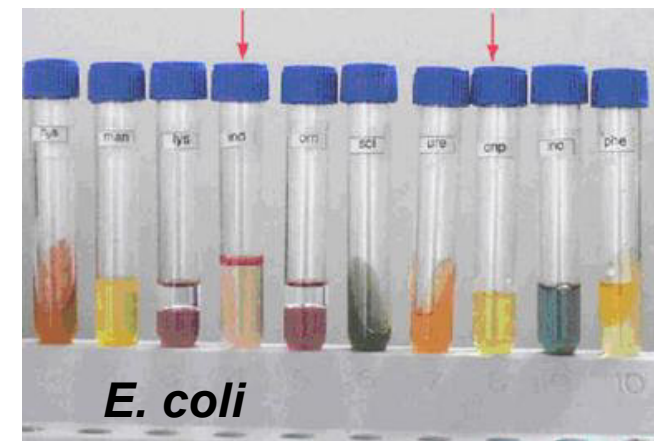
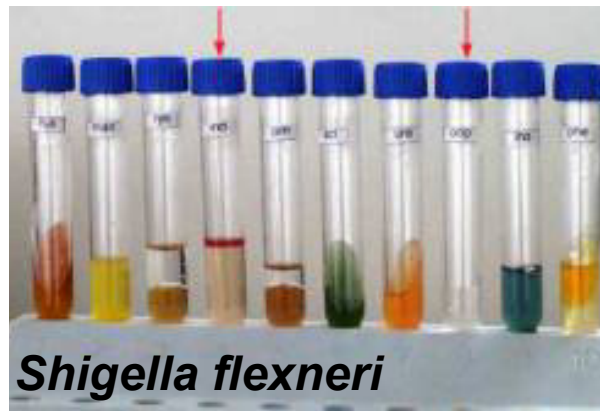
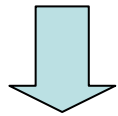
Mikro-LA-Test – vysušená média v destičkách s jamkami, do kterých se kape buněčná suspenze (ENTEROtest, STAPHYtest, ENTERO RAPID, ANAEROtest,...)

Hodnocení – tabulky, index či program TNW

Kontrola kvality – kontrolní kmeny CCM se standardními výsledky



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



Identification profile = 3305573 = *Enterobacter cloacae*

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



(a) All tests: positive



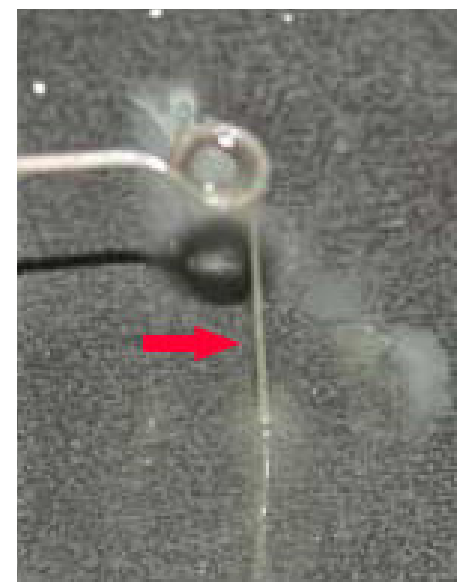
(b) All tests: negative

Čeď *Enterobacteriaceae*

- **G- tyčky, fakultativně anaerobní**
- klinicky významná, početná čeď, cca 65 druhů
- osídľují 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 H₂S, hydrolýza močoviny, KCN test, tvorba indolu...
- selektivní půdy – ENDO a MacKonkey agar, Simmons-citrát agar, Salmonella-Shigella agar, agar s brilantovou zelení
- netvoří spory, chemoautotrofní, mezofilní
- **oxidáza negativní** (kromě rodu *Plesiomonas*); **kataláza pozitivní**
glukózu štěpí za tvorby plynu; redukují nitráty

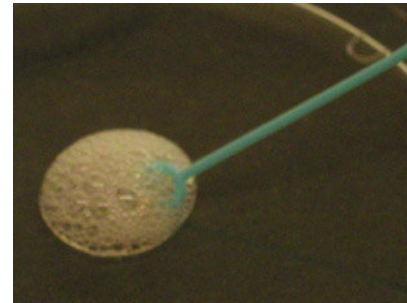
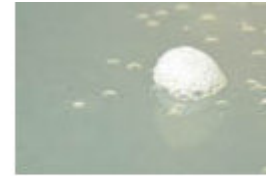
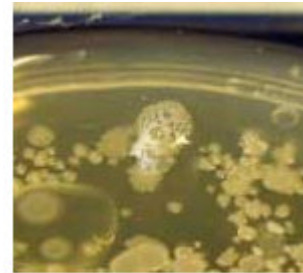
KOH test

- 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

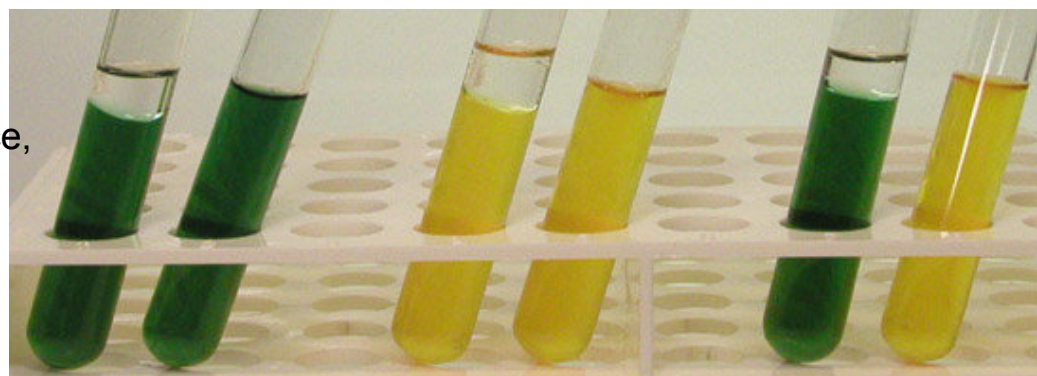


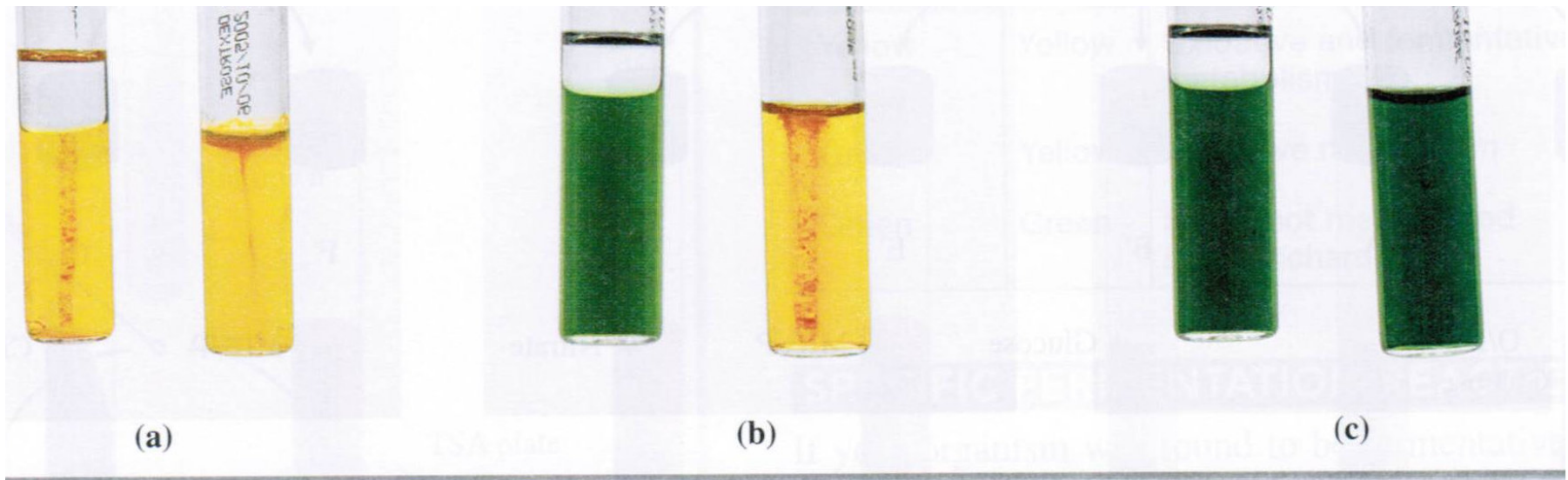
OF test (typ metabolismu glukózy)

- médium s glukózou a acidobazickým indikátorem (bromthymolová modř) → ve vzniklém kyselém prostředí žlutne (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

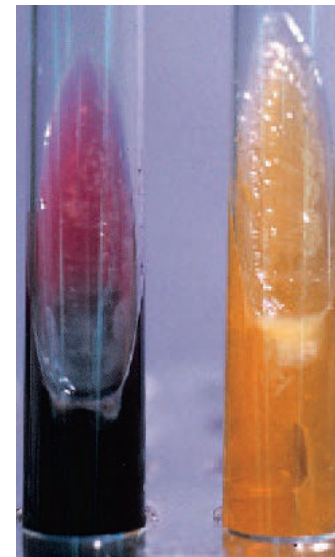
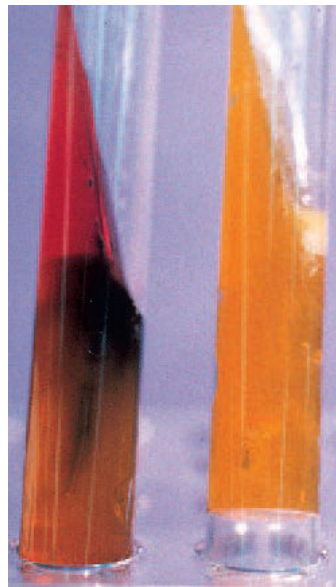
- médium s glukózou a bromthymolovou modří (indikátor pH) plníme do zkumavek, rychle zchladíme a do každé druhé zkumavky přidáme sterilní parafinový olej. Testovaný kmen očkujeme vpichem vždy do dvou zkumavek (s parafinovým olejem a bez).

TSI test (triple sugar iron)

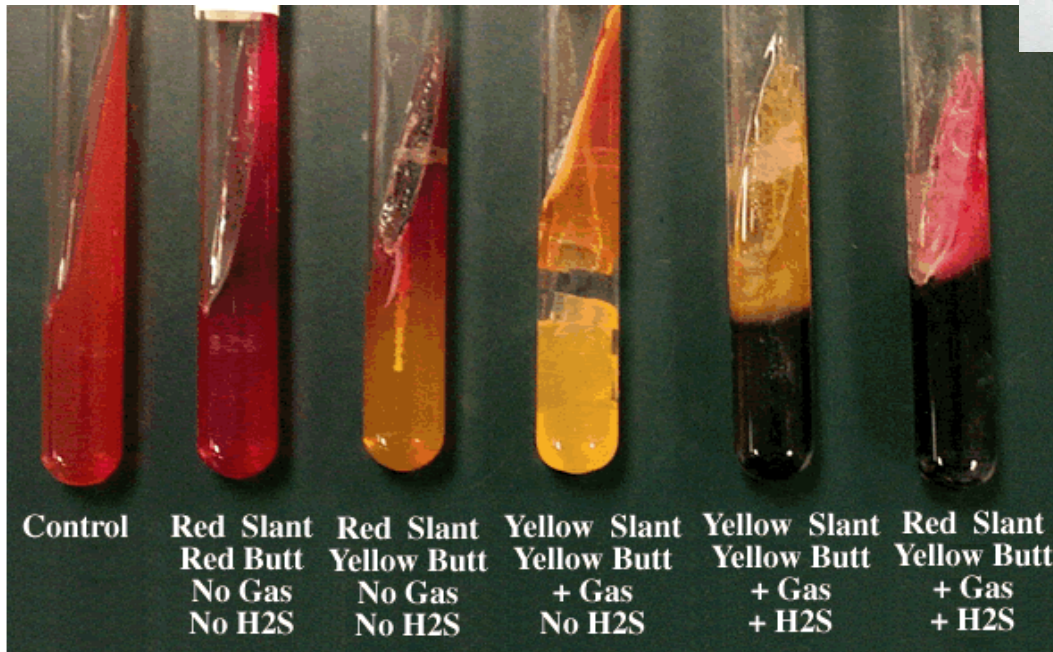
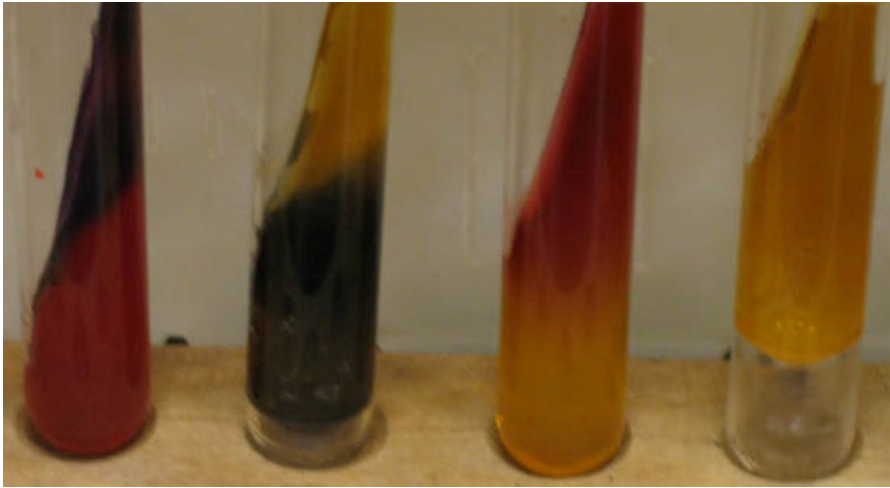
- test na **utilizaci laktózy, glukózy, sacharózy, produkci H₂S** pomocí indikátoru železa podle Hajny
- acidobazický indikátor (bromkrezolová červeň)
- indikátor produkce H₂S (síran železnatý)
- médium je očkováno vpichem a po šikmé ploše i hádkem v 1 zkumavce
- žlutá (pozitivní reakce), černá – H₂S
- produkce plynu – nadzvedlý či potrhaný agar
- glukóza – sloupec; laktóza – šikmá část

The tube on the left has a yellow butt (acid), red slant (alkaline), H₂S production as indicated by blackening of the agar, and no gas reduction.

The tube on the right shows no H₂S formation, a yellow slant (acid), gas production, and an acid butt. Note that the gas on the bottom has lifted the agar.



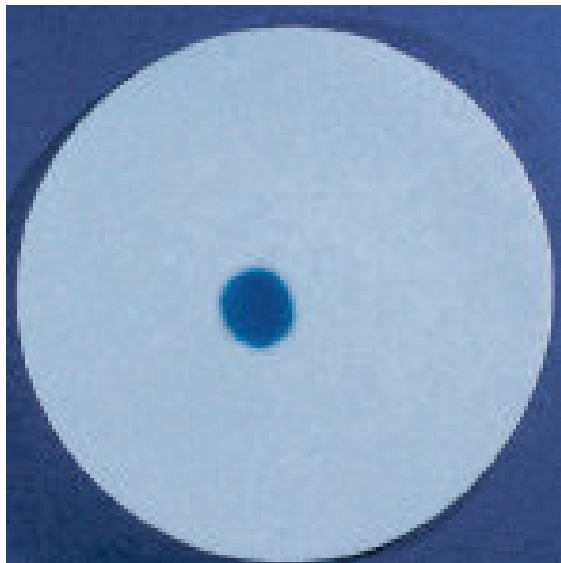
The tube on the left has a red butt (alkaline), red slant (alkaline), and no acid or H₂S production. The tube on the right has a yellow slant (acid), yellow butt (acid), and no gas or H₂S production.



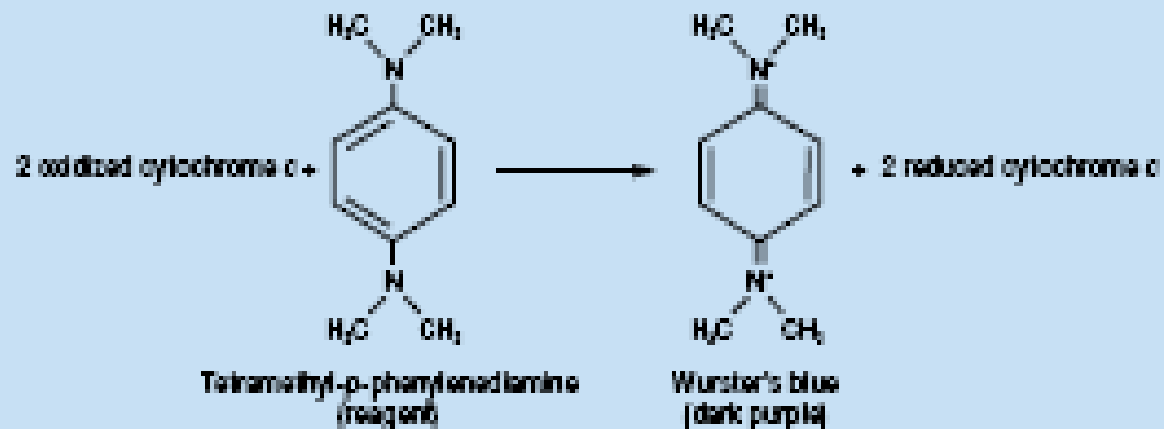
Control	Red Slant	Red Slant	Yellow Slant	Yellow Slant	Red Slant
	Red Butt	Yellow Butt	Yellow Butt	Yellow Butt	Yellow Butt
	No Gas	No Gas	+ Gas	+ Gas	+ Gas
	No H ₂ S	No H ₂ S	No H ₂ S	+ H ₂ S	+ H ₂ S

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*)



Biochemistry on filter paper (disk's test)



Identifikace G- fermentujících tyček pomocí ENTEROtestu

- k identifikaci čeledi *Enterobacteriaceae* (glukózu fermentují, oxi -)
- 16 testů (2x8 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

- H₂S 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

ENTEROtest 16

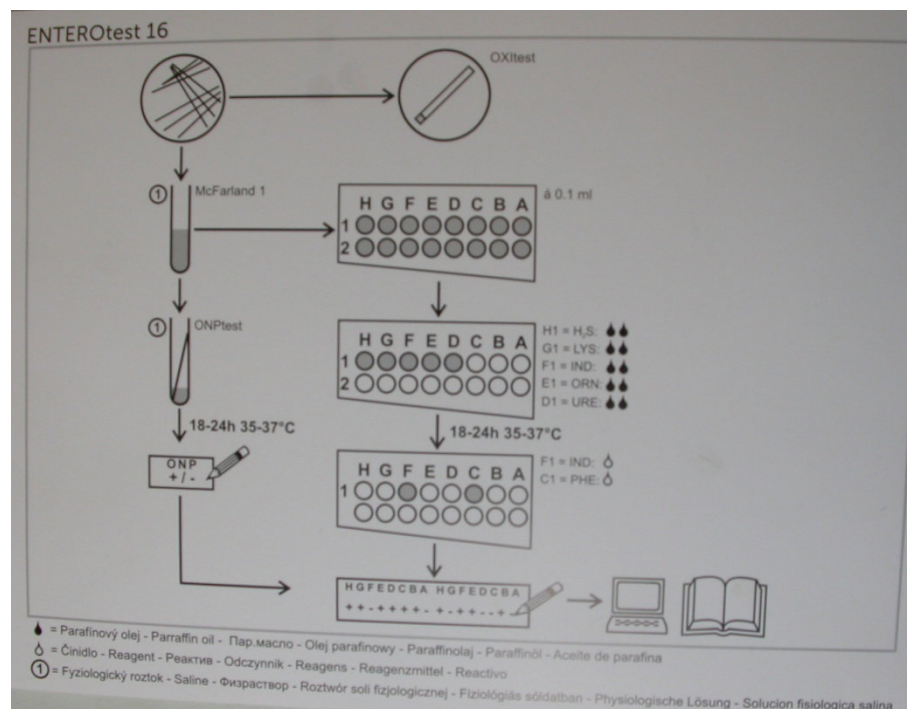
Barevná škála / Farebná stupnica / Colour scale / Цветная шкала / Porównawcza skala barw / Színskála / Farbskala / Escala de colores

1	H	G	F	E	D	C	B	A
	H ₂ S	LYS	IND	ORN	URE	PHE	ESL	SCI
(+)	Black, Grey	Blue, Light Blue	Pink, Light Pink	Blue, Light Blue	Red, Light Red	Black, Brown	Black, Brown	Blue, Light Blue
(-)	White, Light Grey	Yellow, Green	White, Yellow	Yellow, Green	Yellow, Orange	Orange	White, Yellow	Yellow, Green

2	H	G	F	E	D	C	B	A
	MAL	INO	ADO	CEL	SUC	SOR	TRE	MAN
(+)	Blue, Light Blue	Yellow, Green	Yellow, Green	Yellow, Green	Yellow, Green	Yellow, Green	Yellow, Green	Yellow, Green
(-)	Yellow, Green	Green, Light Green	Green, Light Green	Green, Light Green	Green, Light Green	Green, Light Green	Green, Light Green	Green, Light Green

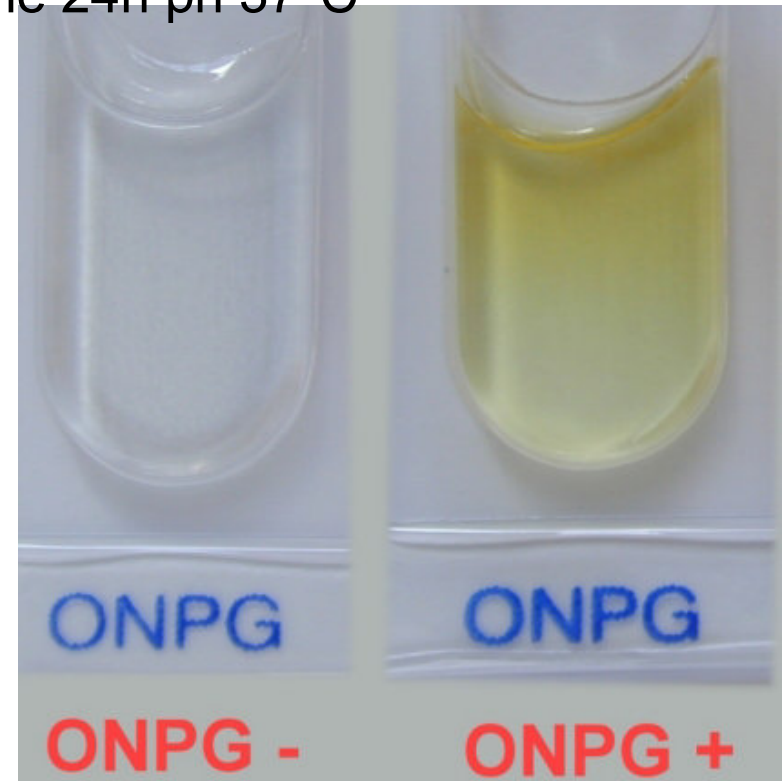
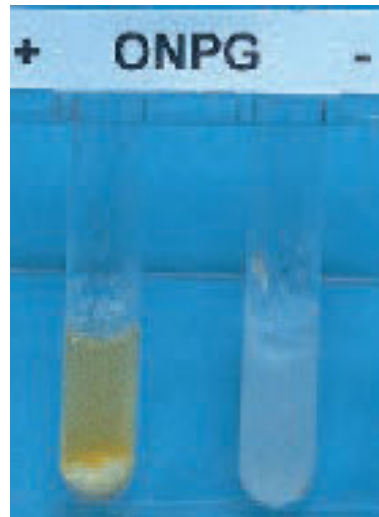
OXItest		ONPtest	
(+)	Blue, Light Blue	(+)	Yellow, Light Yellow
(-)	White, Light Grey	(-)	White, Light Grey

MIKROTEST® BLUE POINT OF QUALITY



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

- **Identifikační skóre** = 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

- **T index** = typičnost identifikovaného kmene vzhledem k vypsánému 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)

