

# 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, char. růstu, identifikační barvení – Gram, acidorezistence, tvorba spor, přítomnost pouzdra)

- **fyzilogie** (vztah k O<sub>2</sub>, teplota – růst, rezistence, tolerance k NaCl, žlučovým solím, ATB, typ metabolismu)

- **biochemie** (zdroje C, redukce nitrátů, tvorba indolu, acetoin,...)

- **doplňující testy** – elektron. mikroskopie, obsah G+C v DNA, sérotizace, fagotypizace, PCR, ribotypizace, imunochem. reakce, chem. analýza BS, produkce toxinu, patogenity

! 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)

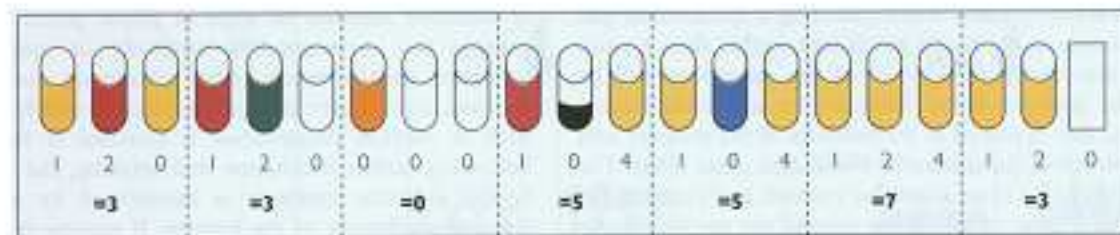
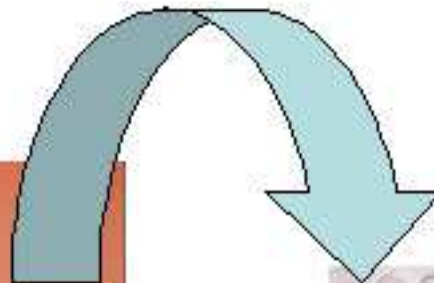
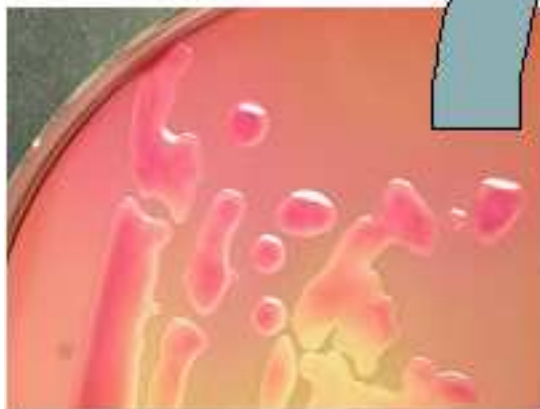
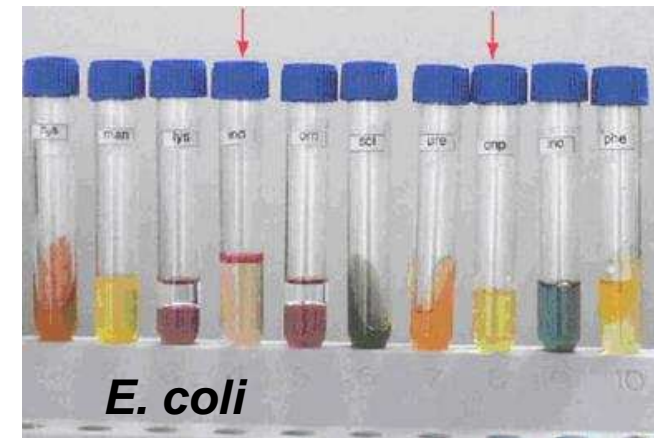
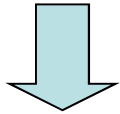
Mikro-LA-Test – vysušená média v destičkách s jamkami, do kterých se kape buněčná suspenze (ENTEROtest, STAPHYtest, ENTERO RAPID, ANAEROtest,...)

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



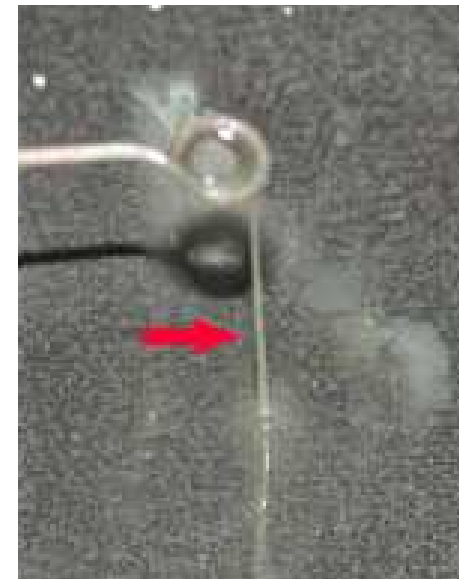
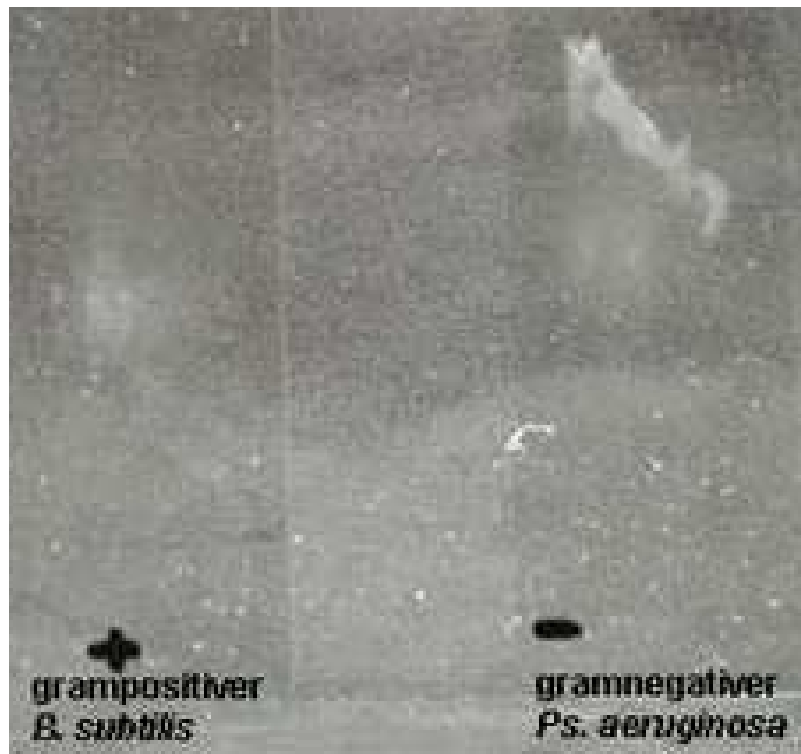
(b) All tests: negative

# 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 H<sub>2</sub>S, 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 – (kromě rodu *Plesiomonas*); kataláza + glukózu štěpí za tvorby plynu; redukují nitráty

# KOH test

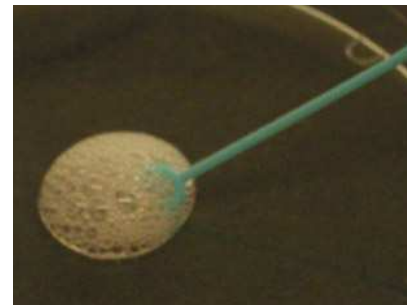
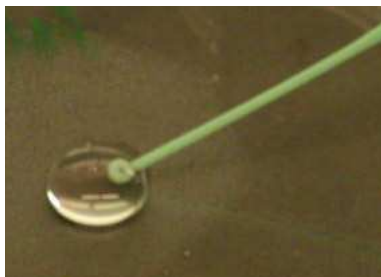
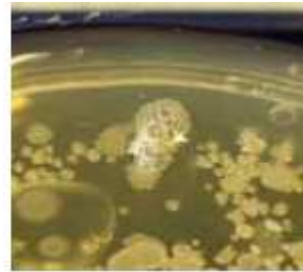
- určení G+/-
- do kapky 3% KOH se nanese kličkou kultura
- pokud se za kličkou potáhne sraženina (viskózní suspenze) → G-  
došlo k poškození BS a vylití obsahu buňky





# Katalázový test

- kataláza umožňuje rozkládat  $\text{H}_2\text{O}_2$  na  $\text{H}_2\text{O}$  a molekulární  $\text{O}_2$
- do kapky 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  se nanese kličkou kultura
- pozitivní reakce → uvolňování bublinek



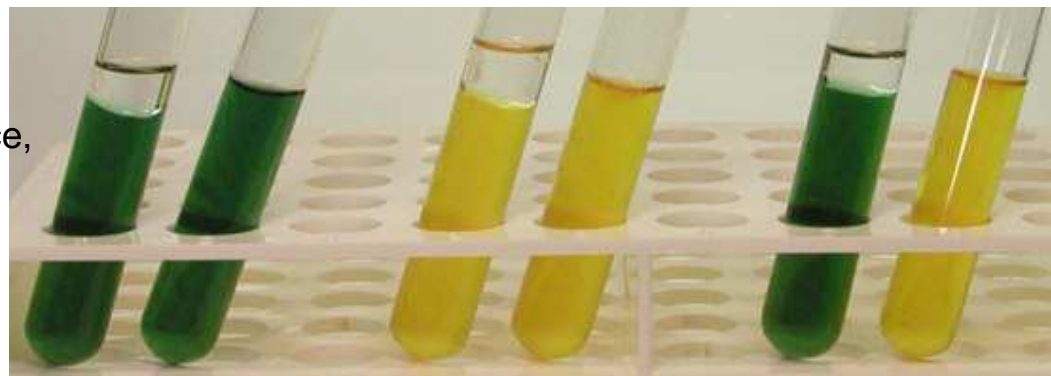


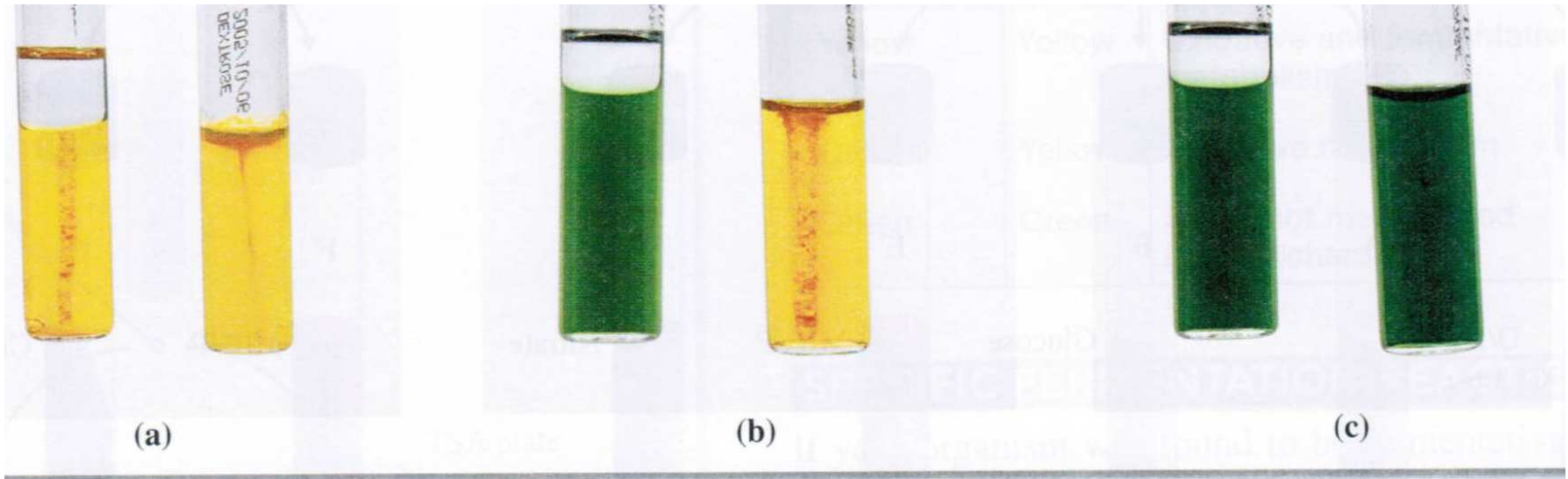
# OF test (typ metabolismu glukózy)

- médium s glukózou a acidobazickým indikátorem (bromthiolová 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

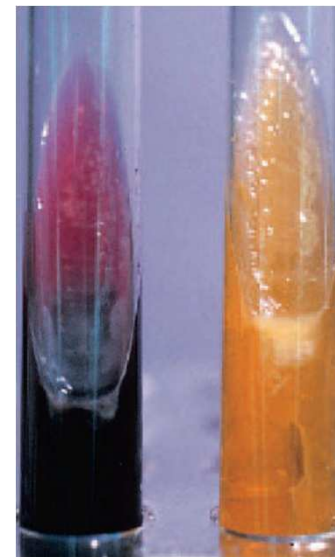
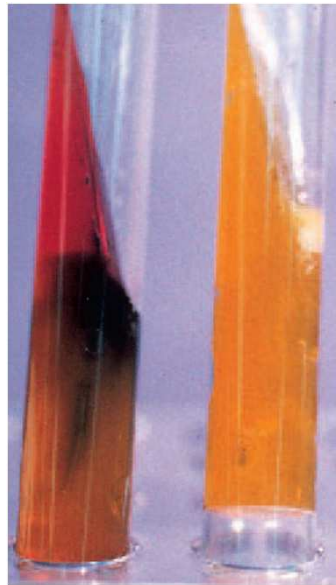
- médium s glukózou a bromthymolovou modří (indikátor pH) plníme do zkumavek, rychle zchladíme a do každé druhé zkumavky přidáme sterilní parafinový olej. Testovaný kmen očkujeme vpichem vždy do dvou zkumavek (s parafinovým olejem a bez).

# TSI test (triple sugar iron)

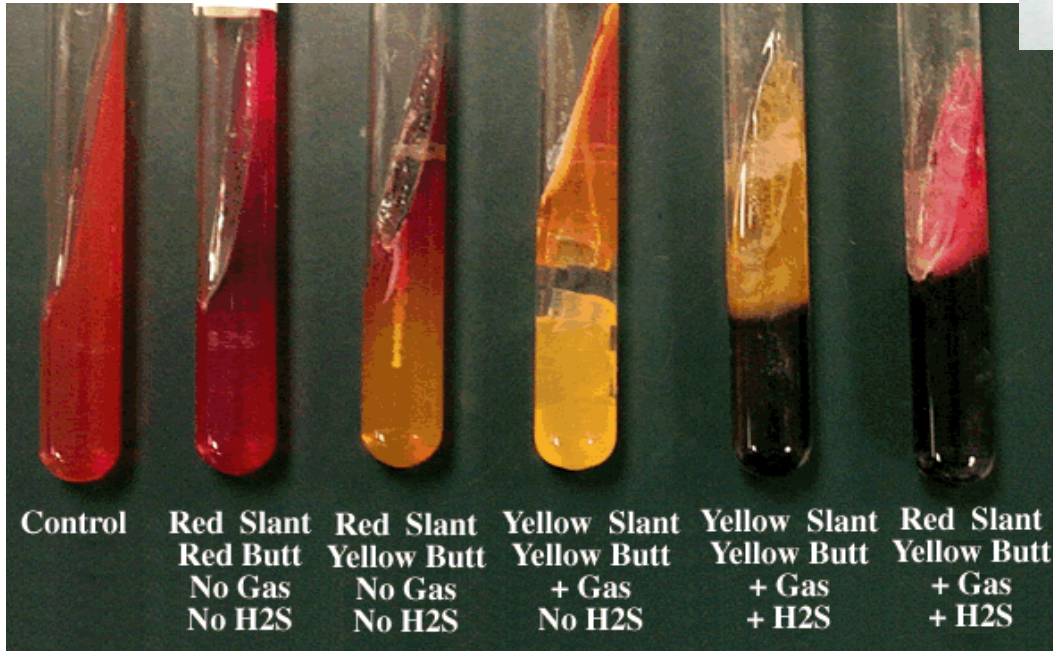
- test na utilizaci laktózy, glukózy, sacharózy, produkci  $H_2S$  pomocí indikátoru železa podle Hajny
- acidobazický indikátor (bromkrezolová červeň)
- indikátor produkce  $H_2S$  (síran železnatý)
- médium je očkováno vpichem a po šikmé ploše i hádkem v 1 zkumavce
- žlutá (pozitivní reakce), černá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

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.



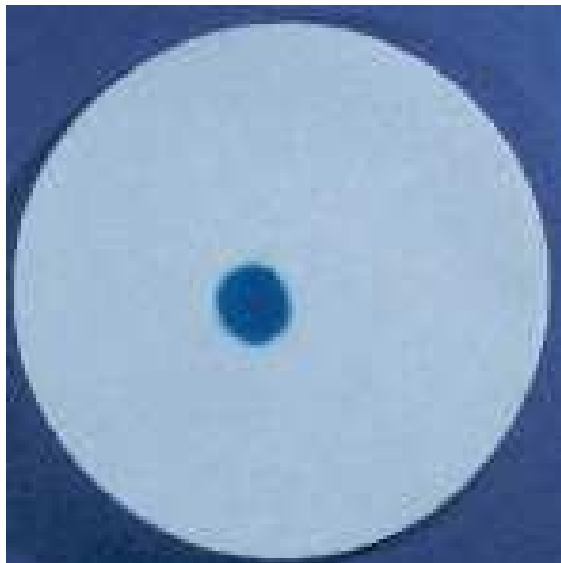
The tube on the left has a red butt (alkaline), red slant (alkaline), and no acid or  $H_2S$  production. The tube on the right has a yellow slant (acid), yellow butt (acid), and no gas or  $H_2S$  production.



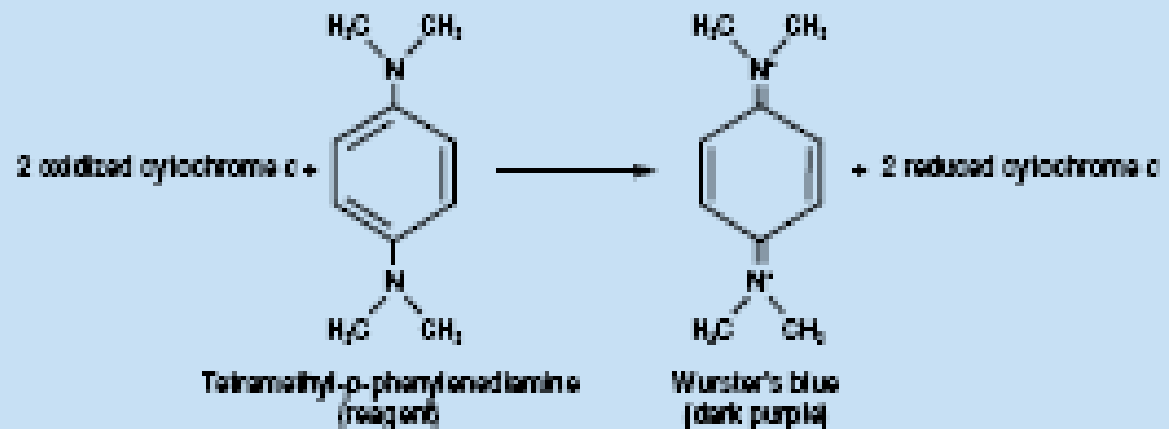
# Důkaz produkce oxidázy



- 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/diff)





# 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

- H<sub>2</sub>S 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 <sub>2</sub> S | LYS              | IND              | ORN              | URE             | PHE          | ESL           | SCI              |
| (+) | Black, Grey      | Blue, Light Blue | Pink, Light Pink | Blue, Light Blue | Red, Orange-Red | Black, Brown | Black, Brown  | Blue, Light Blue |
| (-) | White, Grey      | Yellow, Green    | White, Yellow    | Yellow, Green    | Yellow, Orange  | Orange       | White, Yellow | Yellow, Green    |

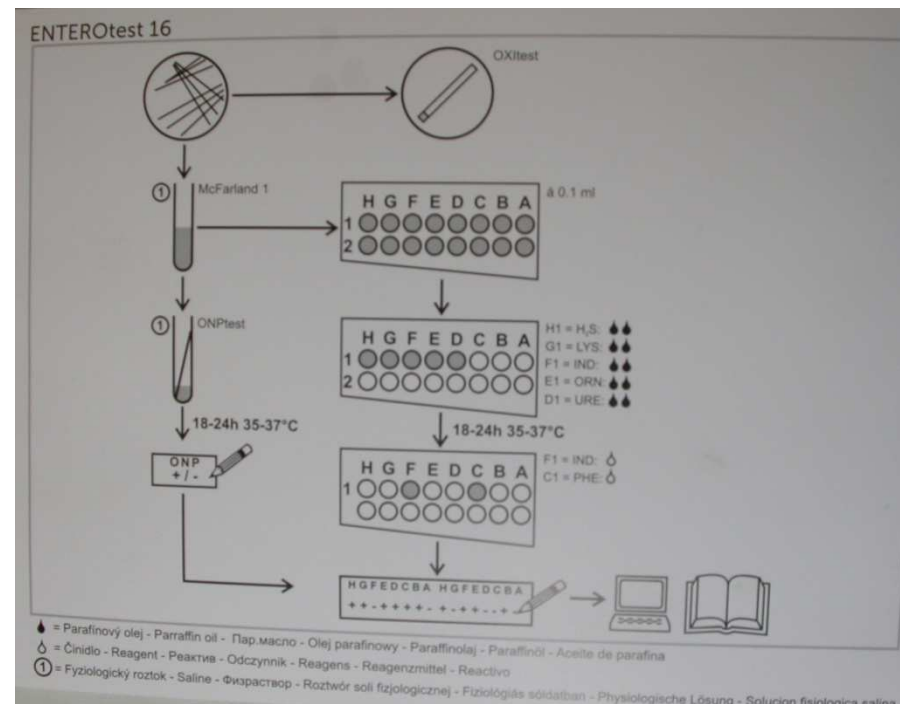
  

| 2   | H                | G                  | F                  | E                  | D                  | C                  | B                  | A                  |
|-----|------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
|     | 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, Grey      | (-)     | White, Grey          |

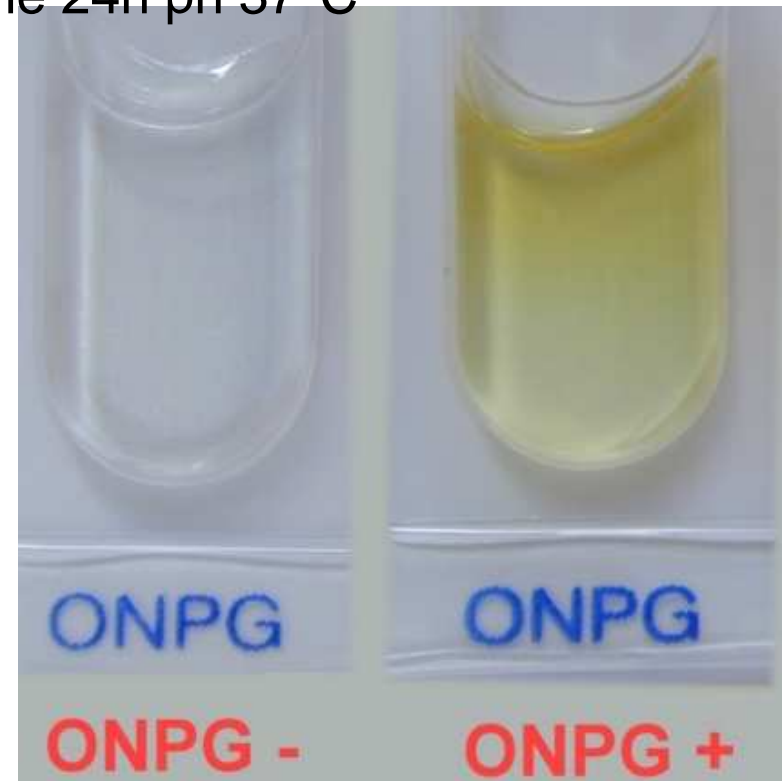
MIKROTEST® BLUE POINT OF QUALITY





# ONPG test

- produkce  $\beta$ -galaktozidázy
- bezbarvý o-nitrofenyl- $\beta$ -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)

