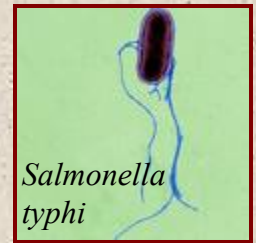
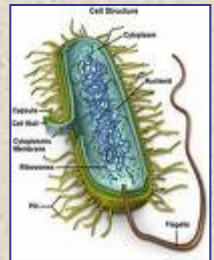
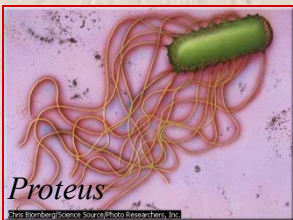


Úvod do identifikace bakterií

Základní biochemické testy Průvodce do cvičení



Identifikační testy

- Zkumavkové



- Mikrotesty – v 1 soupravě je 10-20 biochem. testů
ENTEROtest, 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 lac+koliformní: červené



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

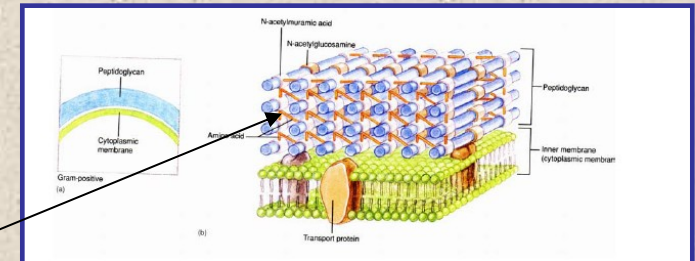
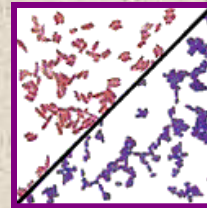
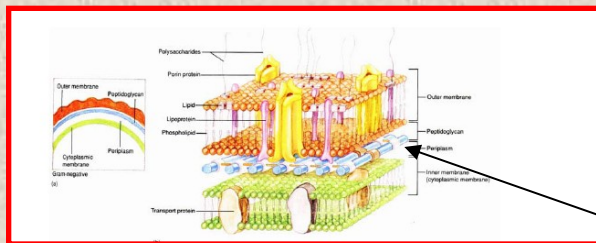
Pozn: Pokud vzorek odebíráme z těchto selektiv/diag. medií, můžeme provést rovnou ENTEROtest

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

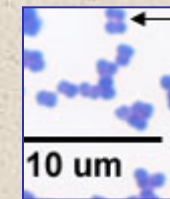
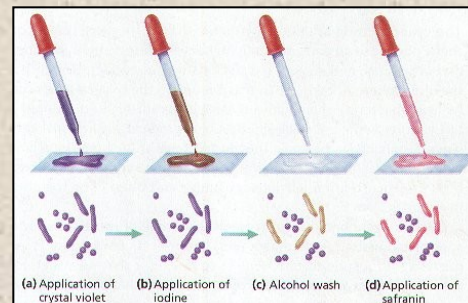
- Následovat budou demonstrační zkumavkové testy, u nichž odečteme výsledky a určíme, které neznámé vzorky fermentují. K tomu poslouží
 - 1) **OF test** (oxidace-fermentace glukózy)
 - 2) **TSI test** (triple sugar, iron)
- U fermentujících buněk provedeme ENTEROtest se standardním zákalem buněk
- a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

G- VS. G+



peptidoglykan

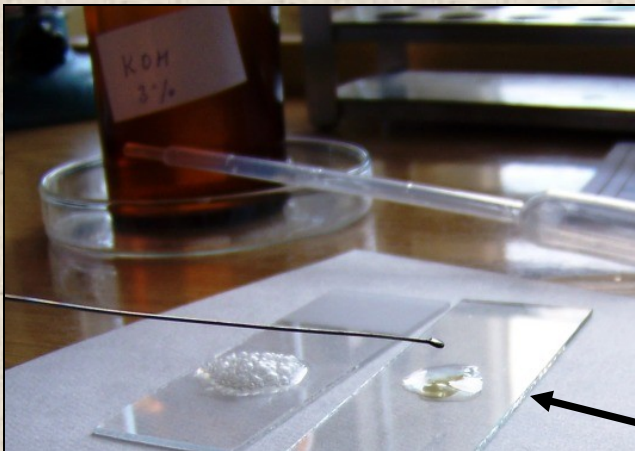
- Můžeme provést **Gramovo barvení**, tím mimo jiné zjistíme i morfologii buňky či morfologii shluků buněk, což jsou další důl.identifikační znaky, které urychlí rozhodování pro další testy



- G-/G+ typ buněčné stěny však určí i rychlejší **KOH test**

1) KOH test

- Na ožihnuté 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:



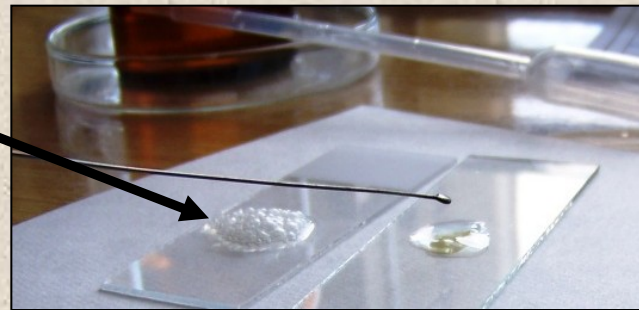
Na sklíčku vpravo KOH test
G- buňky se táhnou za kličkou

Nelze použít u bakterií tvořících sliz

2) Katalázový test

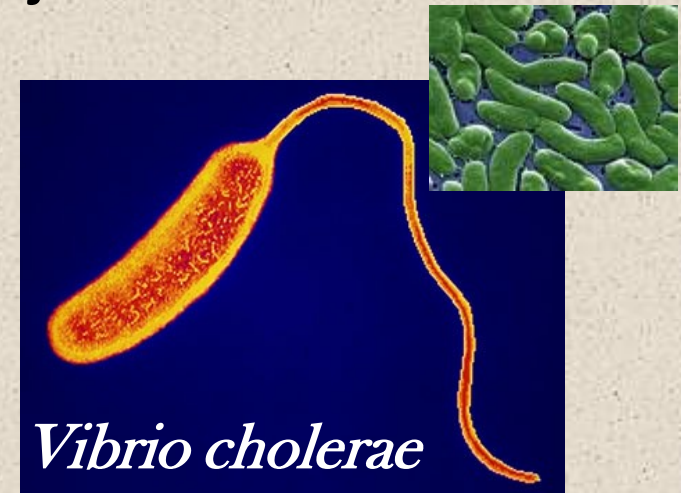
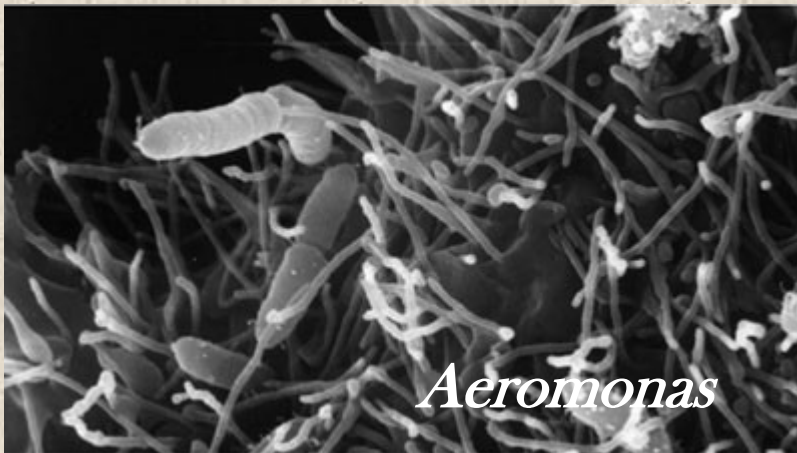
- Rozklad peroxidu vodíku na vodu a kyslík je katalyzován enzymem **katalasou**.
- Přidáme 3% peroxid vodíku k bakteriální kultuře přímo na mediu nebo na nátěr buněk na sklíčku. Pozitivní test se projeví uvolňováním bublinek kyslíku.

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, pouze oxidují, jsou glukóza 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 pokusy, 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 glukózy (aerobní metabol.)/
/fermentaci glukózy (anaerobní met.)

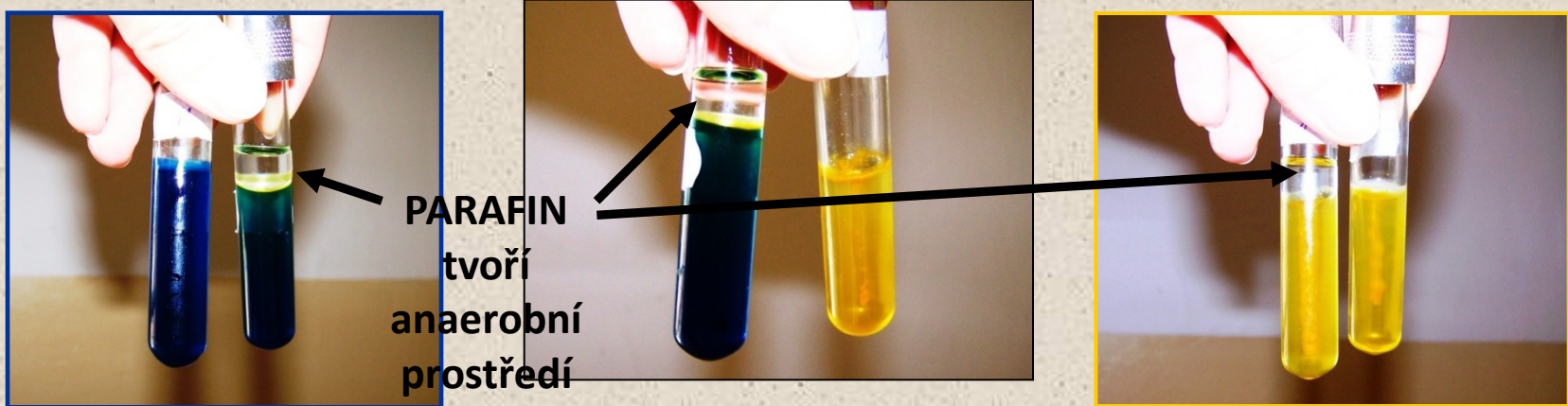


- = **detekce respiračních enzymů**
- používá se medium s glukózou a acidobazickým indikátorem bromthiolorovou modří, která je následně ve vzniklém kyselém prostředí **žlutá**, v zásaditém **modrá** alkalizací a při neutrální reakci **zelená** **Enterobakterie krom pozitivní oxidace (respirace) glukózu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



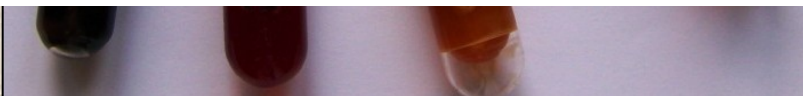
pro důkaz fermentace glukózy

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

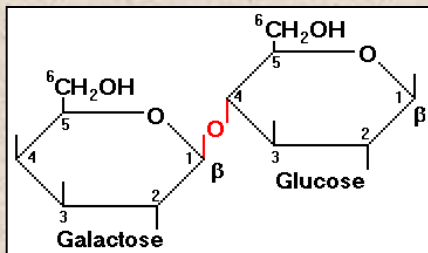
Obě zkumavky žluté
obě jsou pozitivní reakce
neznámý vzorek glukózu
oxiduje i fermentuje
= **enterobakterie**

- 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**.

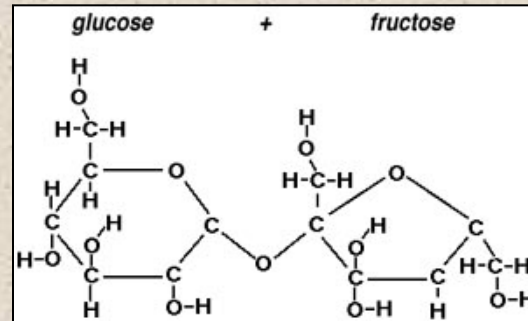


4) TSI test (triple-sugar iron)

- Test na utilizaci tří cukrů - glukózy, laktózy a sacharózy + testování produkce H_2S a ply



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



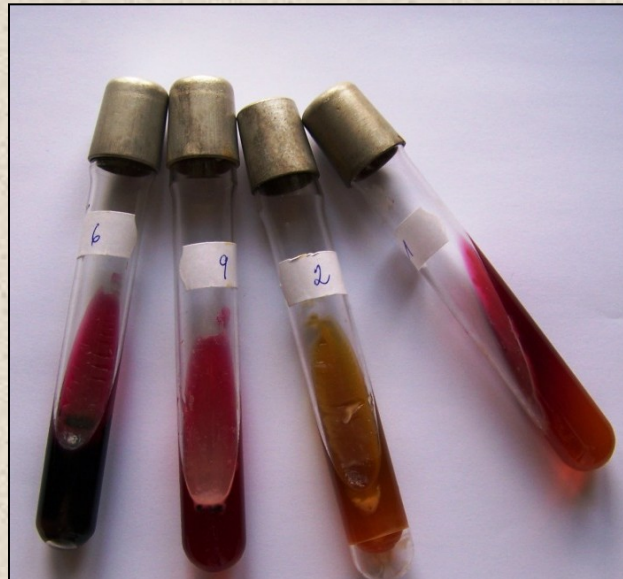
Sacharóza
 α -D-glukopyranosyl- β -D-fruktofuranosid

- 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 zbarvení po kultivaci 24-48h/37°C

Hodnocení TSI

- Sledujeme štěpení glukózy, laktózy, sacharózy; 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

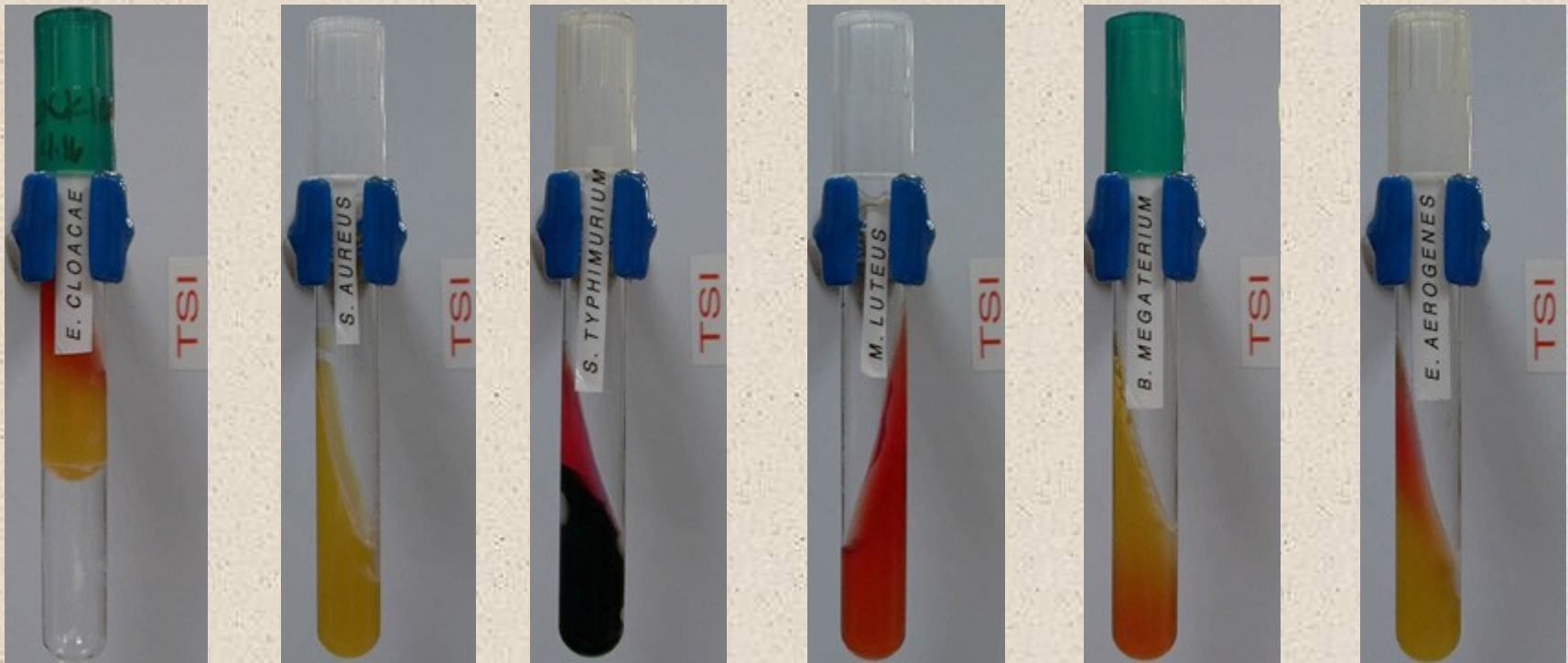
plyn

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 H₂S

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.

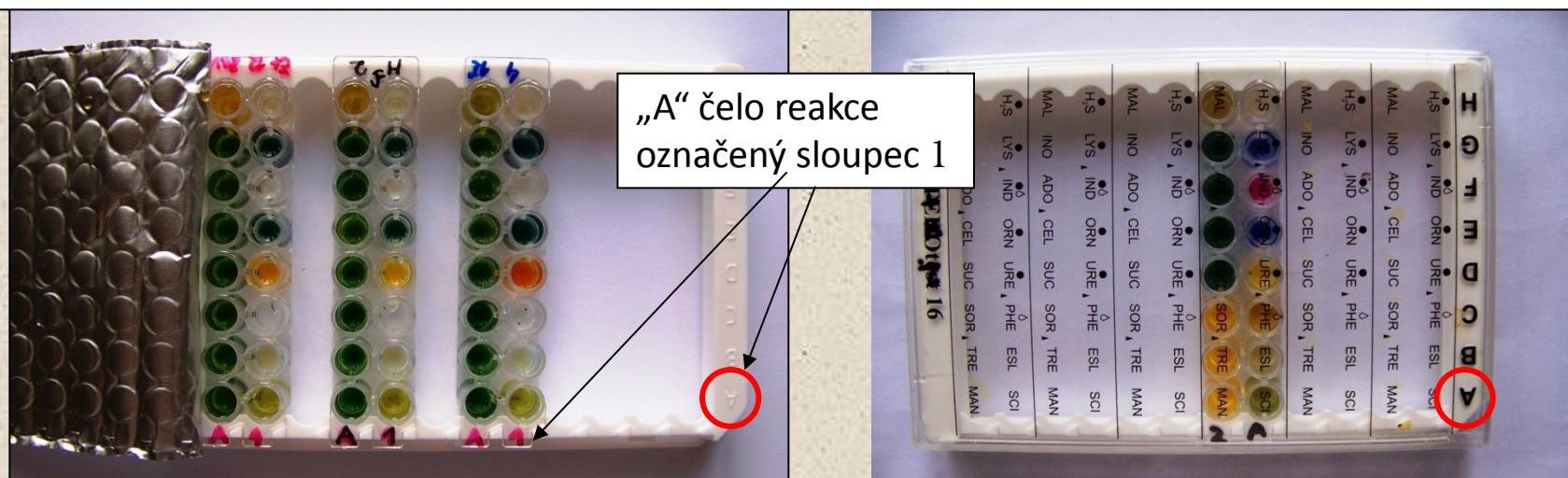
5) Enterotest 16

- 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 stojánu poznáme „A“ čelo reakcí testu.
- destičku ENTEROtestu umístíme podle „A“ čela reakcí do svého stojánu
- naproti druhé čelo testu již můžeme označit svým jménem



- 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))

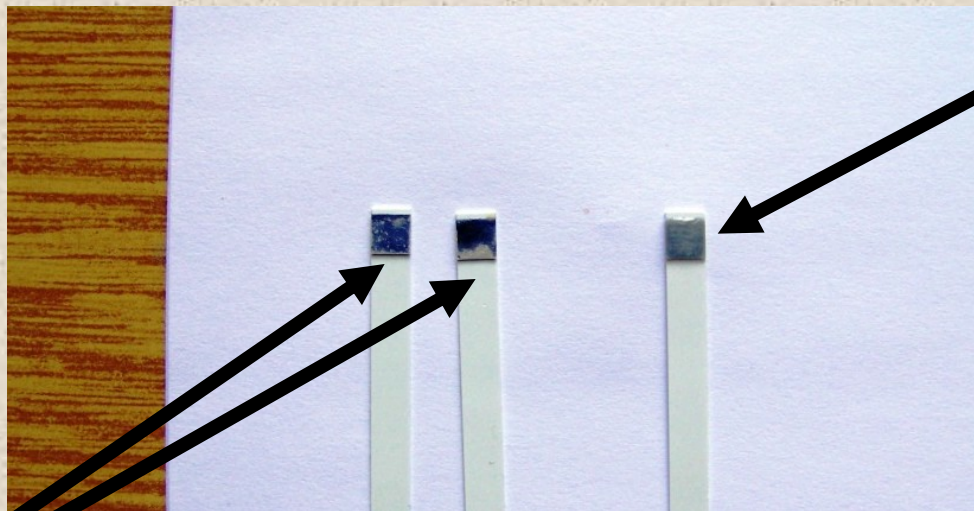
- Nesmí dojít ke kontaminaci sousedních jamek
- Testy se při kultivaci uloží do sáčku aby nevysychaly
- ENTEROtest kultivujeme při 37°C/16-4°h



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

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

- OXI test – enterobakterie jej mají negativní



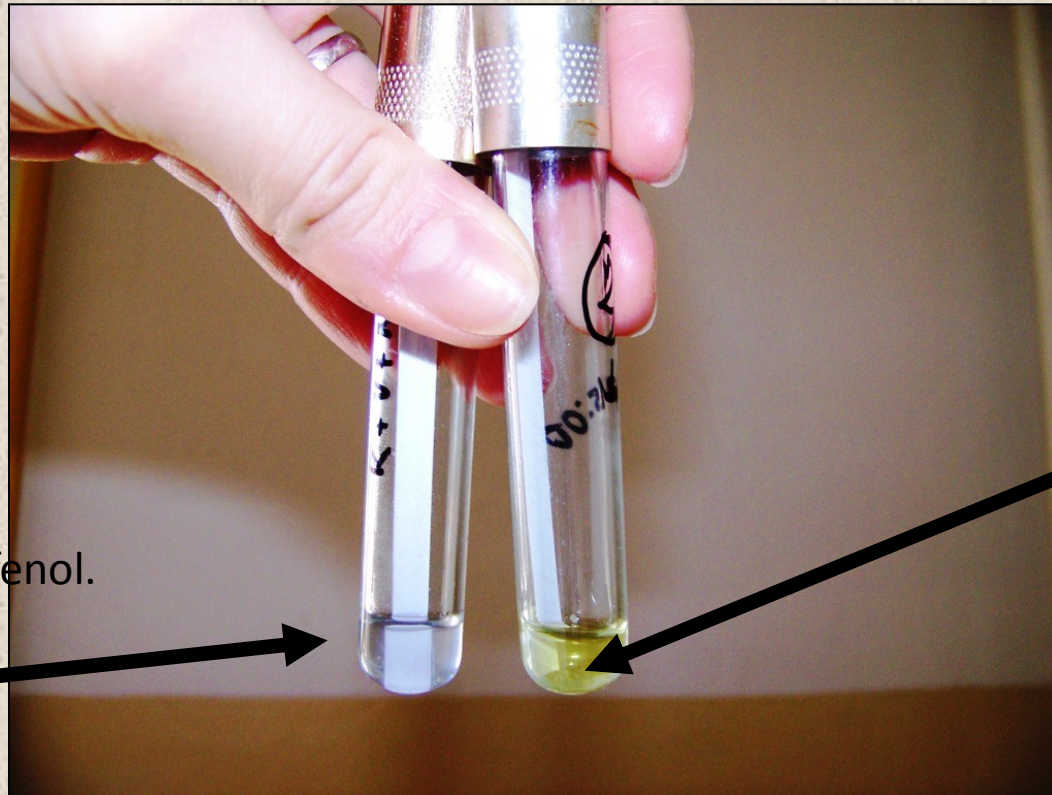
Pozitivní OXI test má tmavě modrou barvu a to do 30 sekund. Do dvou minut zmodrá opožděně pozitivní reakce. Šedá či nazelenalá barva po dvou minutách znamená reakci negativní.

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- β -D-galaktopyranozid, který je v + případě hydrolyzován na žlutý ortho-nitrofenol.

negativní



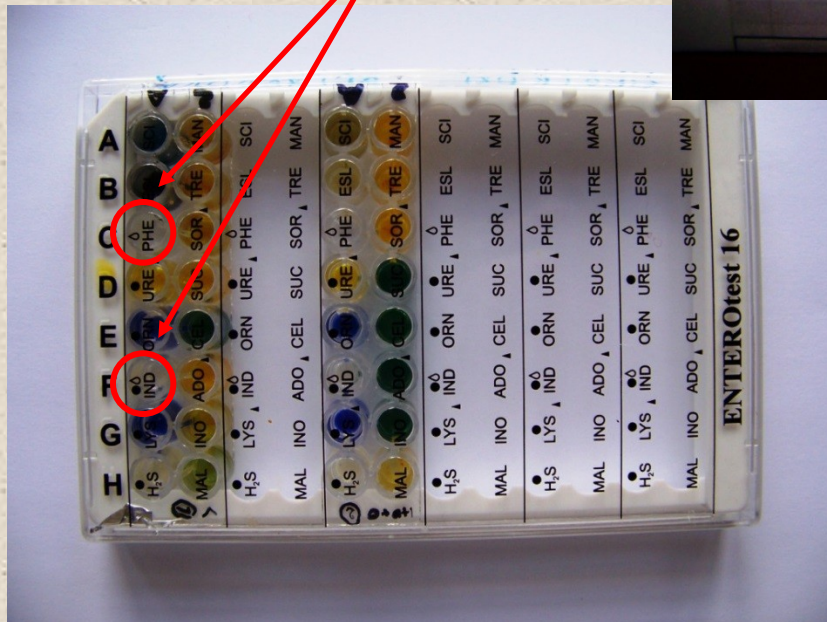
Pozitivní žlutá reakce po 24h kultivaci

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
Řádek 1				
H	Sirovodík	H ₂ 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
Řádek 2				
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
VPTtest	Acetoin	VPT	červená, růžová	bezbarvá, mírně narůžovělá

MIKROTEST®

ENTEROtest 16

Datum/Datum/Date/Дата: Zprac./Sprac./Ref./Испит. 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																
	Řádek/Riadok/Strip/Стрип 1								Řádek/Riadok/Strip/Стрип 2								
Полоска	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	4	1	2	4	1	2	4	1	2
H ₂ S																	
LYS																	
IND																	
ADO																	
ORN																	
URE																	
PHE																	
ESL																	
SCI																	
MAL																	
INO																	
ADO																	
CEL																	
SUC																	
SOR																	
TRE																	
MAN																	

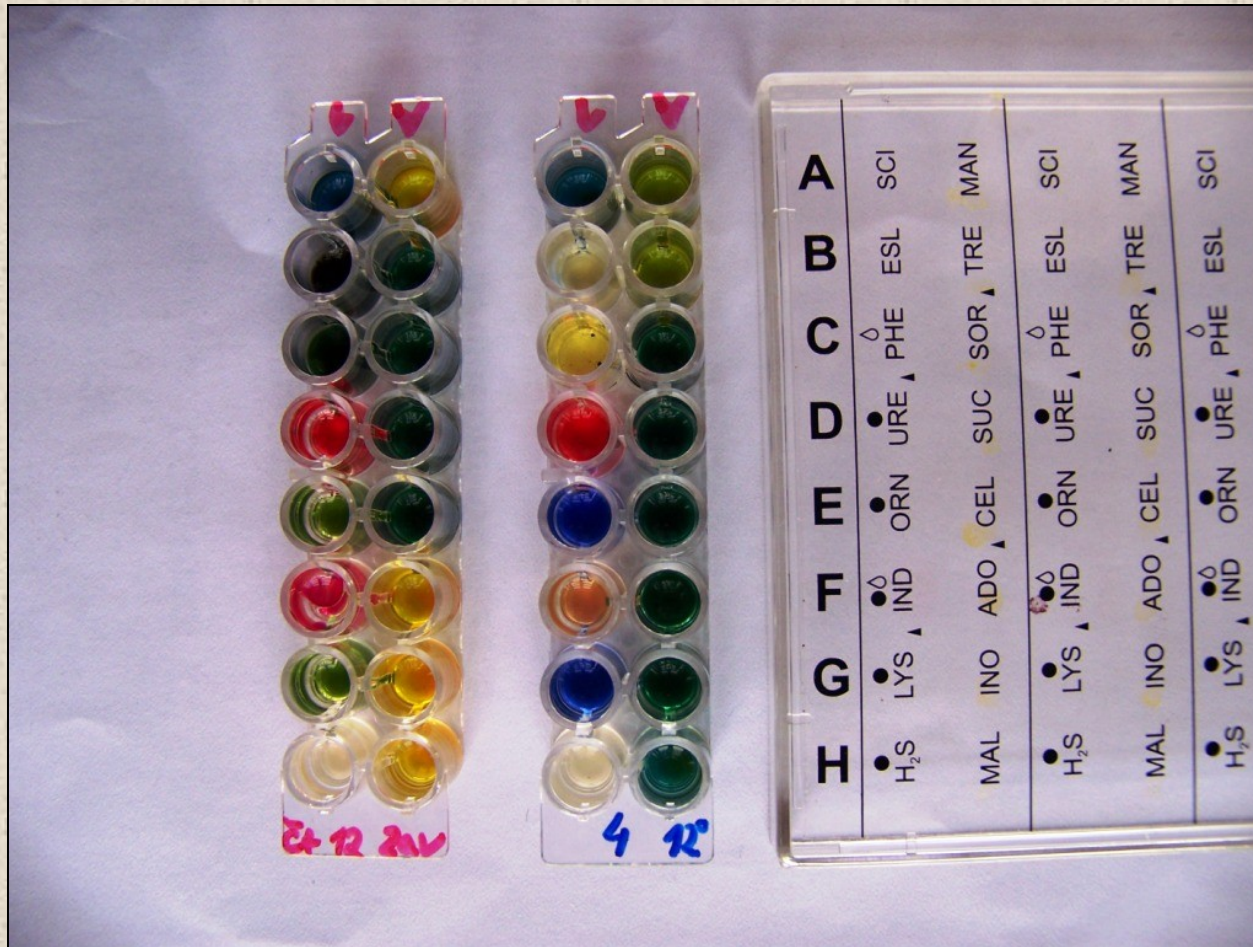
Profil/Профиль/Профиль

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 μm dlouhé a 0,3-1 μm 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), **tvoří katalázu** (kataláza pozitivní) a vždy **štěpí glukózu (i tvorba plynu)**, dále **redukují nitráty** (při fakultativní anaerobióze jsou totiž nitráty akceptorem elektronů)