Identifikace bakterií

Identifikace

- Identifikace mikroorganismů = **stanovení příslušnosti k určité taxonomické skupině**
- Je potřebné mít čistou kulturu

Hodnotíme:

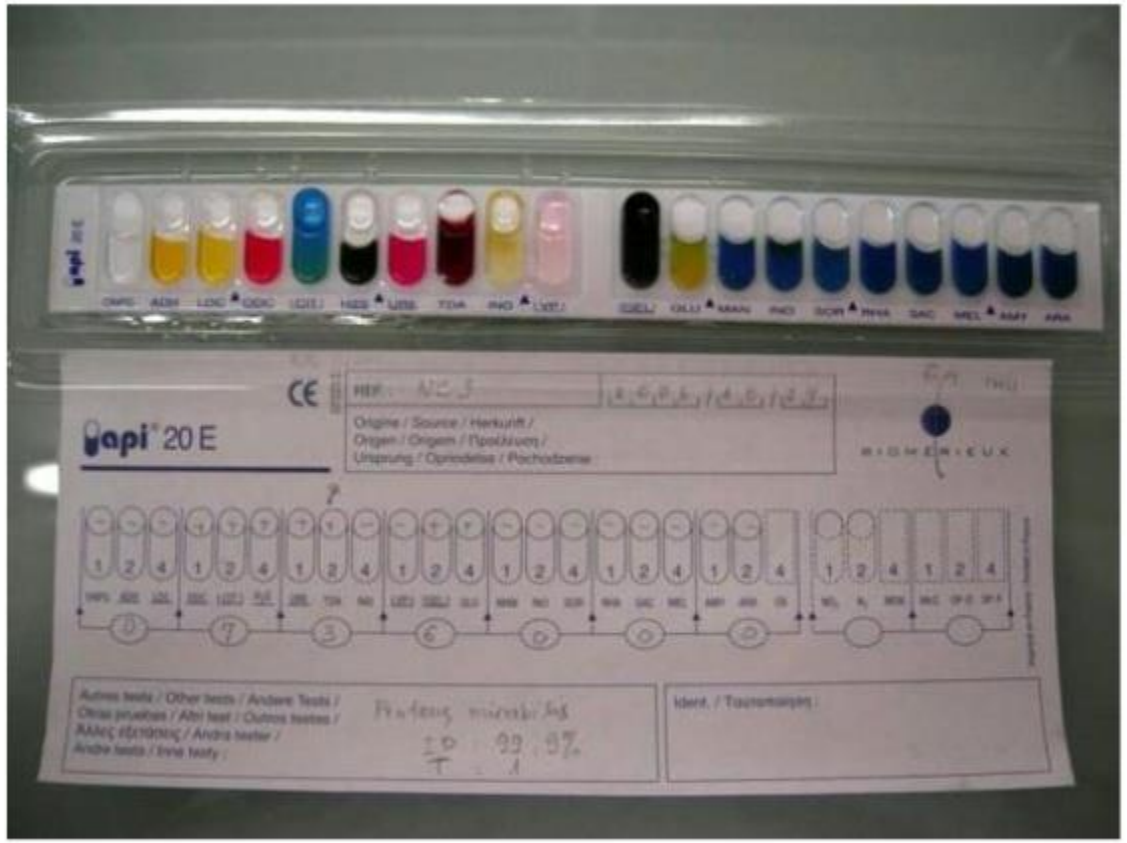
- **Morfologii** (makroskopické znaky - tvar a zbarvení kolonie, mikroskopické – barvení, Gram, acidorezistence, pouzdra, spory…)
- **Fyziologii** (vztah ke kyslíku, k NaCl, ATB, teplota růstu, rezistence, typ metabolizmu)
- **Biochemii** (zdroj C, redukce nitrátů, tvorba indolu…)
- **Doplňující testy** (molekulární diagnostika – PCR, sekvenace, ribotypizace, obsah G+C v DNA; serotypizace, imunochemické reakce, chemická analýza buňkové stěny, patogenita)

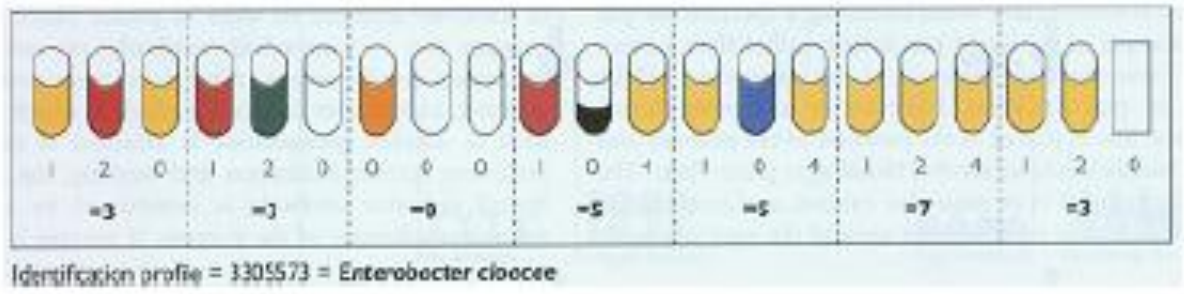
Standardizované testovací systémy

- Rychlé zpracování velkého množství vzorků
- Odstranění individuálních rozdílů v přípravě, provedení i hodnocení

- **API systém**
- Mikro-LA-Test – **ENTEROtest, STAPHYtest, ANAEROtest** - destičky s jamkami kam se kape buněčná suspenze
- Hodnocení – tabulky či počítačový program

API test



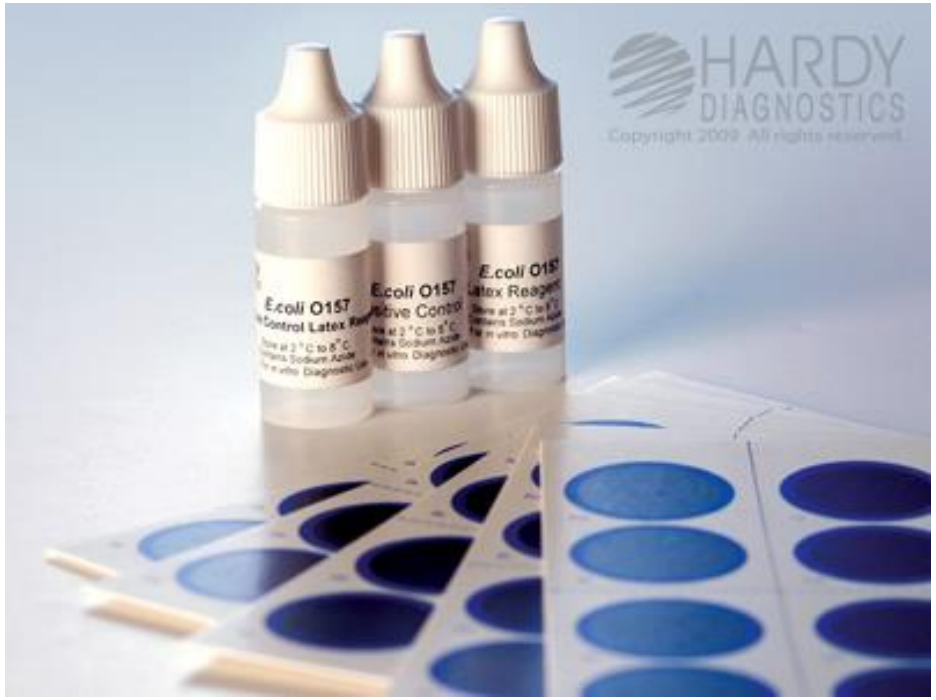


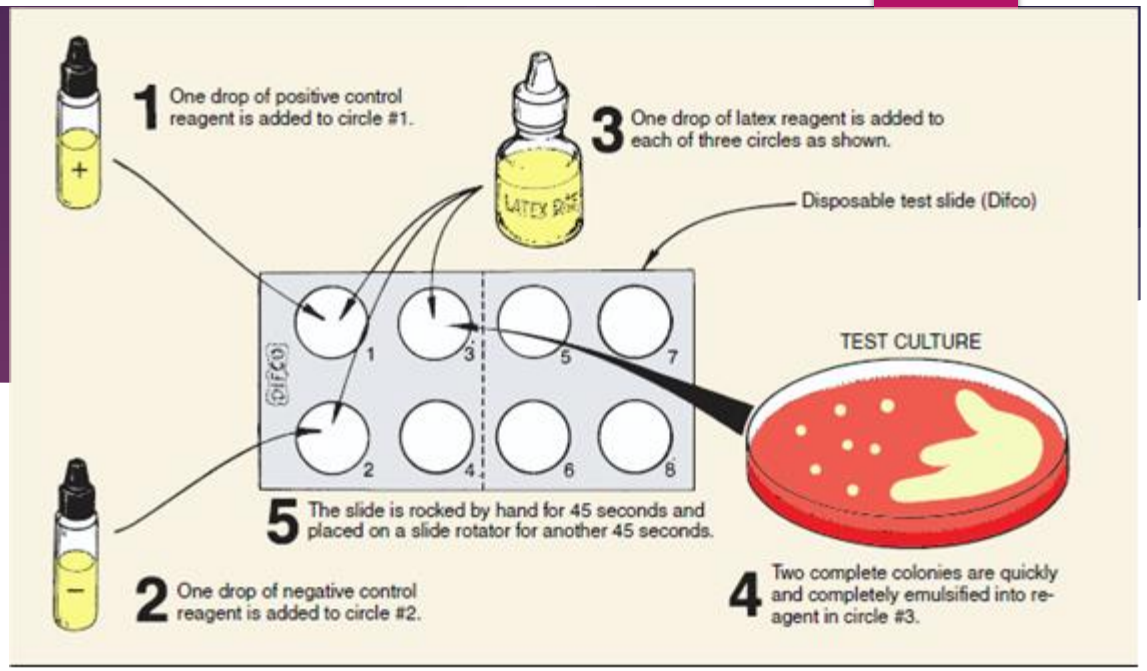
STAPHYtest24

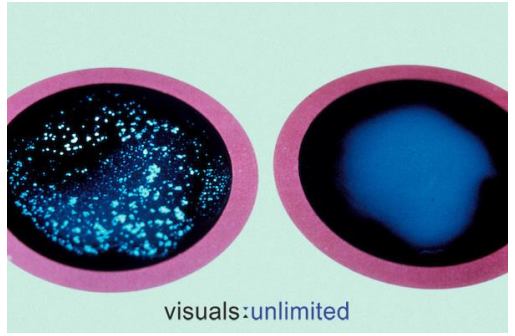
		H	G	F	E	D	C	B	A
1		URE	ARG	ORN	bGA	GLR	bGL	PHS	ESL
	⊕								
	⊖								
2		NAG	GAL	SUC	TRE	MAN	MLT	XYL	MNS
	⊕								
	⊖								
3		LAC	SOR	RIB	FRU	CEL	ARA	RAF	XOL
	⊕								
	⊖								

RIDACOM

Latexová aglutinace







Enterobacteriaceae

- Gramnegativní tyčky
- Fakultativně anaerobní, chemoautotrofní, mezofilní,
- **Oxidáza negativní** (výjimka *Plesiomonas*), **kataláza pozitivní**, **glukózu štěpí** za tvorby plynu, redukují nitráty
- Většina žije v trávícím traktu obratlovců - **součást mikroflóry**
- **Klinicky významná skupina**, někteří nepatogenní, někteří jsou **původci závažných onemocnění**
- *Yersinia pestis, Salmonella* (serovary Typhi, Paratyphi), *E. coli*
- Jejich přítomnost ve vodě znamená **fekální znečištění**

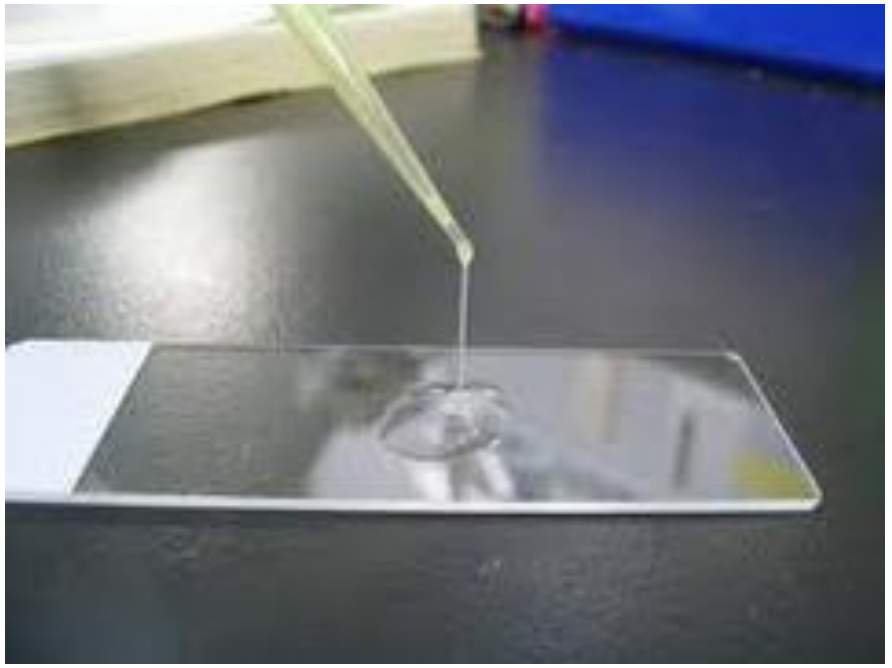
Průkaz enterobakterií

- **1. Odlišení G+ a G-** (Gramovo barvení, **KOH test (+)**)
- **2. Kataláza (+)**
- **3. Oxidáza (-)**
- **4. Využívání cukrů, produkce H_2S a plynů (TSI + Hajn) (+)**
- **4. Štěpení glukózy** aerobně (oxidace) **(+)** a anaerobně (fermentace) **(+)** (**OF test**)
- **5. ENTEROtest** + **ONPG test**

- Diagnostické půdy: **Endo, MacKonkey**, Desoxychlolát-citrátový, Salmonella-Shigella, Simons-citrát agar

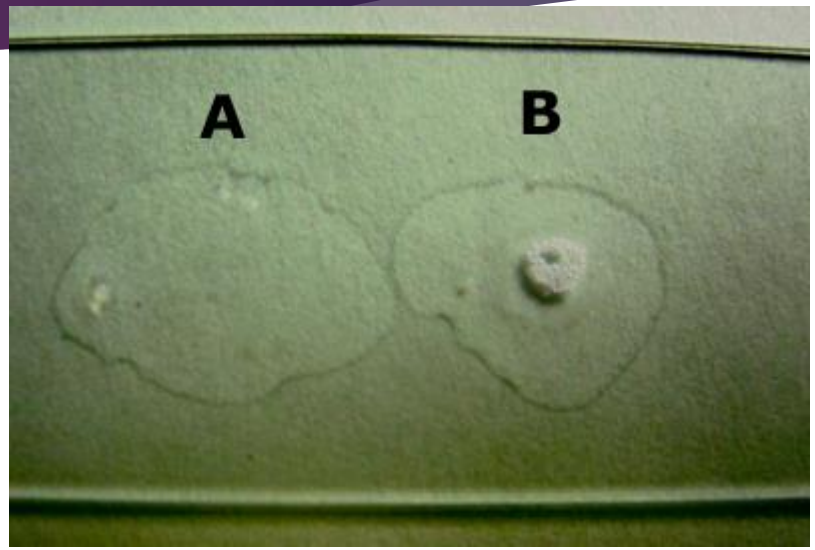
KOH test

- **Odliší G+ a G- bakterie**
- Kapka 3% KOH na sklíčko
- V kapce se kličkou rozmíchá kultura
- U **G-** se poškodí stěna a vylije se obsah buňky, teda suspenze bude viskózní, **bude se bude táhnout za kličkou**
- U G+ se suspenze **netáhne** za kličkou

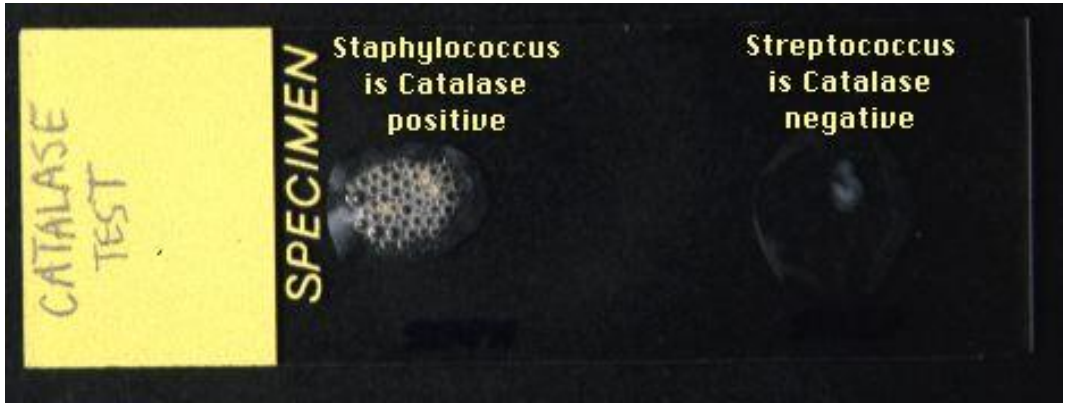


- Enterobakterie +

Katalázový test



- Rozliší bakterie mající **enzym katalázu**
- Kataláza rozkládá peroxid vodíku na vodu a kyslík
- Na sklíčko s kulturou se kápne 3% peroxid
- Pozitivní kataláza = uvolňují se bublinky kyslíku, **šumí to**



- Enterobakterie +

Papírkový oxidázový test

- Identifikuje MO, které vytvářejí **enzym cytochrom c oxidáza**
- Na papírky se kličkou nanese 24h kultura / papírek se přitlačí na kulturu v misce / ponoří se do tekuté kultury
- Papírek zmodrá **do 30 s** = **pozitivní** reakce
- Papírek zmodrá **do 2 min** = opožděně **pozitivní**
- Papírek **beze změny** = **negativní**

- Enterobakterie –

TSI test (triple-sugar iron) s indikátorem železa podle Hajny

- Test na utilizaci **laktózy, glukózy, sacharózy, produkci H_2S a plynů**
- Do tuhého média ve zkumavce se **vpíchne** kultura a vzápětí se **naočkuje hádkem** na šikmou plochu
- Po 24-48h/37°C sledujeme změny

- **Žlutá celá půda** = kultura zkvašuje laktózu a sacharózu (nahoře) i glukózu (dole)
- **Žlutá** horní **šikmá** plocha a **červený spodek** = zkvašuje L, ne G
- **Všechno** zůstane **červené** = nevyužívá ani L ani G
- **Médium zčerná** = produkce sirovodíku
- **Bublinky** = produkce plynu kvašením

- Enterobakterie: cukry +, sirovodík +, plyn +

OF test – test na oxidaci/fermentaci

- Detekce respiračních enzymů, detekce přítomnosti oxidázy
- **2 zkumavky** s polotuhým médiem a acidobazickým indikátorem (bromthiolová modř) **v kyselém prostředí žlutne**, v zásaditém modrá a v neutrálním zelená
- Vpichem se naočkuje kultura
- **Jedna zkumavka se kultivuje aerobně, druhá anaerobně** (zakápnuta parafinem), odečet po 24h

OF test

- **Pozitivní reakce = žlutá barva, negativní =modrá/zelená**
- **Obě zkumavky žluté** = pozitivní oxidace (aerobní štěpení) i fermentace = fakultativní anaerob, možná enterobakterie
- **Aerobní zkumavka pozitivní (žlutá), anaerobní negativní (modrá)** = jen aerobní druh, nefermentující, např. *Aeromonas, Vibrio, Pseudomonas* (když je vidět pohyb)
- **Obě zkumavky negativní (modré)** = glukózu nefermentuje ani aerobně neštěpí *Alcaligenes* (ox+), *Agrobacterium* (ox-)

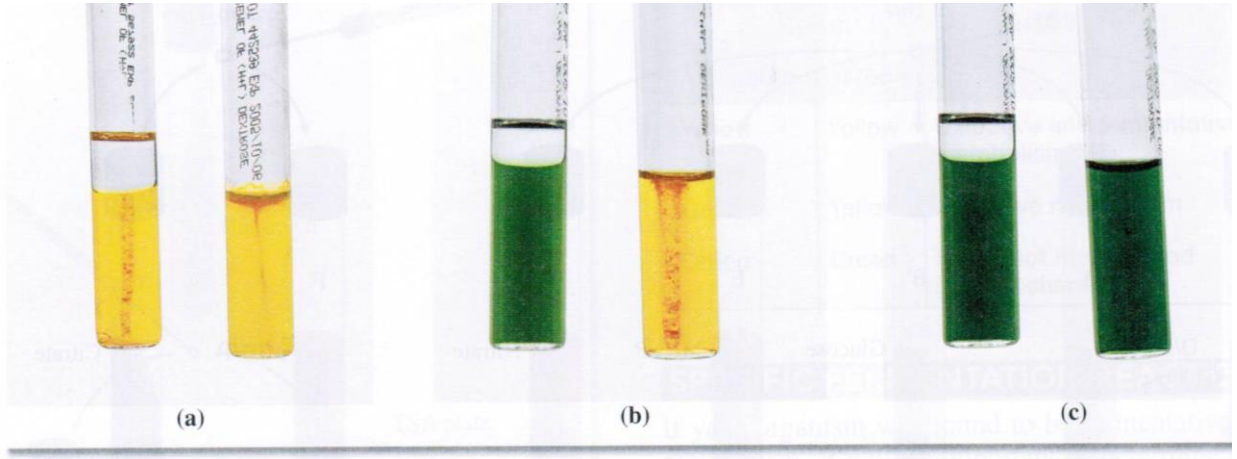
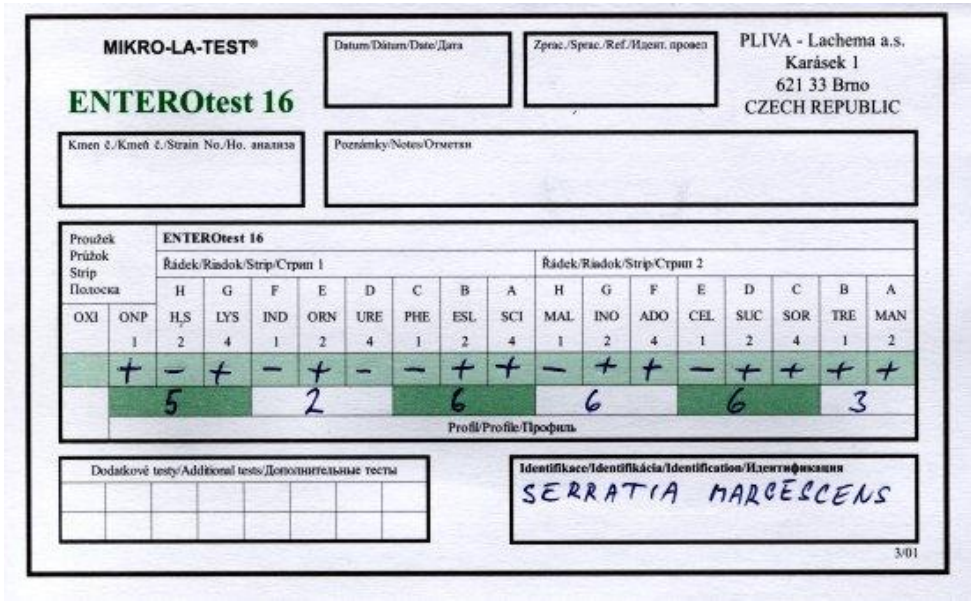


FIGURE 41.5 O/F glucose test. (a) Fermentative and oxidative; (b) oxidative; (c) glucose not metabolised or inert. © The McGraw-Hill Companies/Auburn University Photographic Services

Enterotest

- Pro identifikaci **fermentujících bakterií z čeledi *Enterobacteriaceae***
- **Komerční systém jamkových testů**
- 16 testů (2 řady po 8), + zkumavkový test na β-galaktozidázu (ONPG)


MIKRO-LA-TEST®

ENTEROtest 16

Datum/Dátum/Date/Дата

Zprac./Sprac./Ref./Идент. провел

PLIVA - Lachema a.s.
Karásek 1
621 33 Brno
CZECH REPUBLIC

Kmen č./Kmeň č./Strain No./Но. анализа

Poznámky/Notes/Отметки

Proužek / Prúžok / Strip / Полоска	ENTEROtest 16															
	Řádek/Riadok/Strip/Strip 1								Řádek/Riadok/Strip/Strip 2							
	H	G	F	E	D	C	B	A	H	G	F	E	D	C	B	A
OXI	ONP	H2S	LYS	IND	ORN	URE	PHE	ESL	SCI	MAL	INO	ADO	CEL	SUC	SOR	TRE	MAN
	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2
	+	−	+	−	+	−	−	+	+	−	+	+	−	+	+	+	+
		5			2			6			6			6			3

Profil/Profile/Профиль

Dodatkové testy/Additional tests/Дополнительные тесты

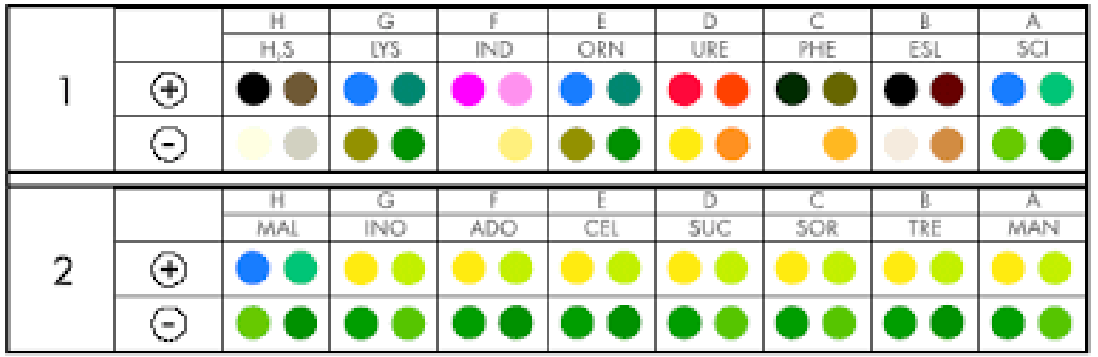
Identifikace/Identifikácia/Identification/Идентификация

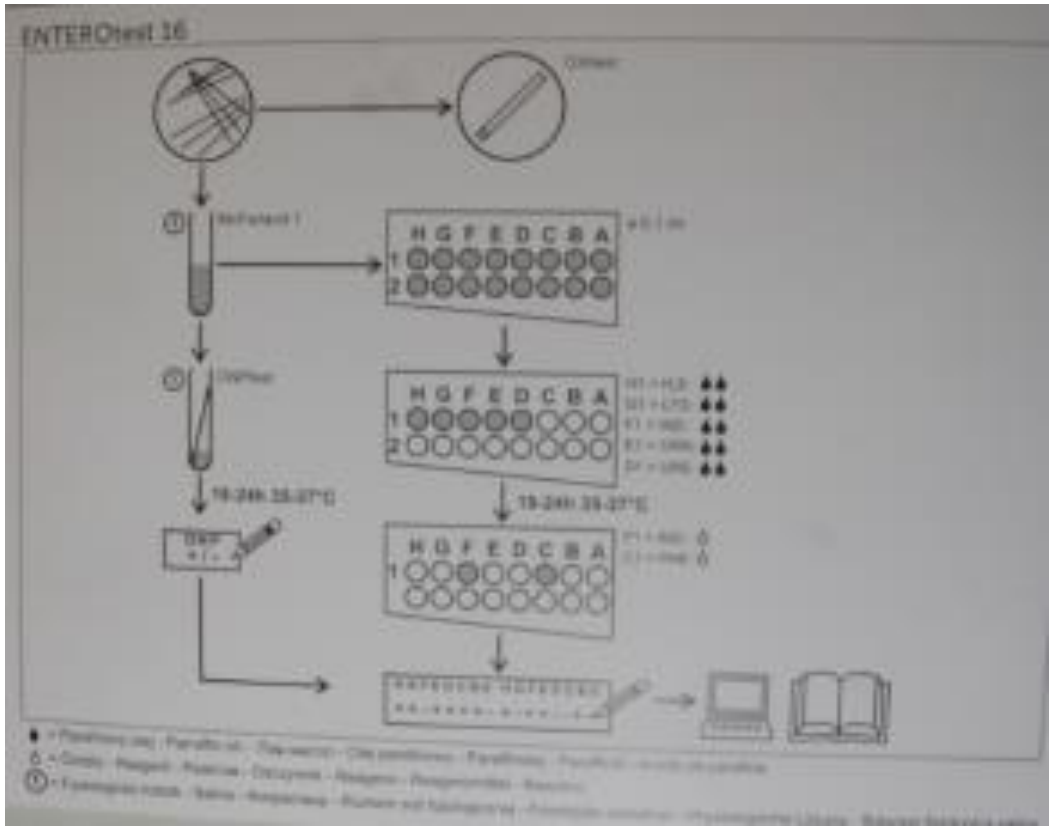
SERRATIA MARCESCENS

3/01

Testy v jamkách:

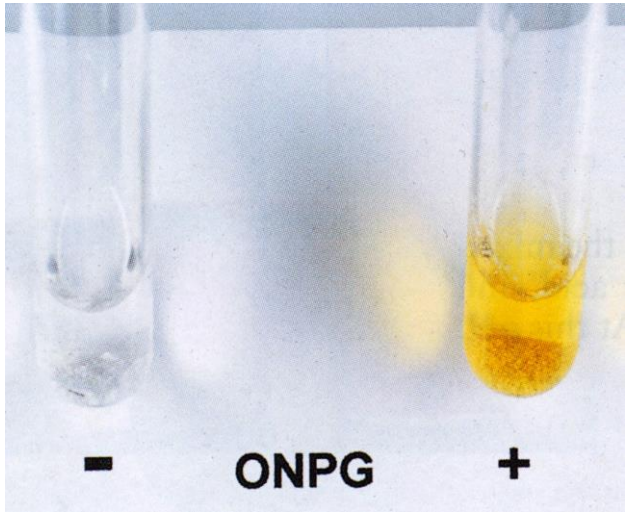
- (H_2S) produkce sirovodíku
- LYS dekarboxylace lysinu
- IND produkce indolu
- ORN dekarboxylace ornithinu
- URE rozklad močoviny
- PHE deaminace fenylalaninu
- ESC hydrolýza eskulinu
- SCI utilizace citrátu
- MAL utilizace malonátu
- INO produkce kyseliny z inositolu
- ADO produkce kyseliny z adonitu
- CEL produkce kyseliny z celobiózy
- SUC produkce kyseliny z sacharózy
- SOR produkce kyseliny z sorbitolu
- TRE trehalózy
- MAN mannitolu





Enterotest

- Z 24h kultury se připraví **3 ml** suspenze buněk ve fyz. roztoku se zákalem 1 podle stupnice MacFarlanda
- Destička se dá na výšku, odřízne se fólie a napíší se na ní čísla kmenů
- Suspenze se důkladně přetřepe a pipetuje se z ní **100 µl** do každé jamky
- Prvních 5 jamek zakápnout parafinem – aby testy mohli probíhat anaerobně (H1, G1, F1, E1, D1)
- Destička se uloží do sáčku a kultivuje se 18-24h/37°C + zkumavkový ONPG test

Papírkový ONPG test

- Důkaz **produkce β-galaktozidázy** – štěpí laktózu
- Bezbarvý substrát (o-nitrofenyl-β-D-galaktopyranozid) v případě + reakce **zežloutne** (ortho-nitrofenol)
- Do zbytku fyziologického roztoku s kulturou se vloží testovací proužek na ONPG test, kultivace 24h/37°C se vyhodnotí zežloutnutí