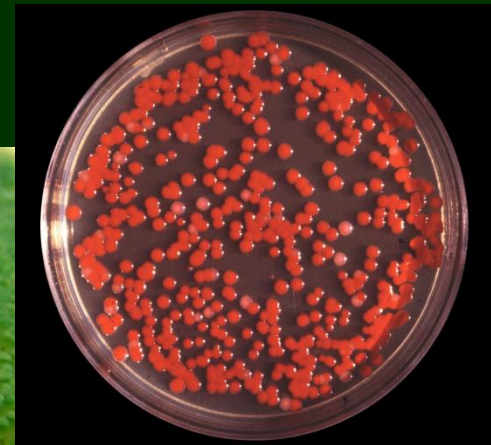
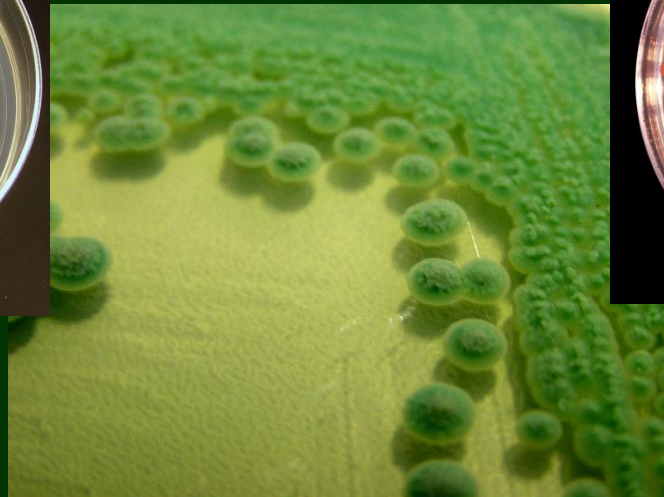
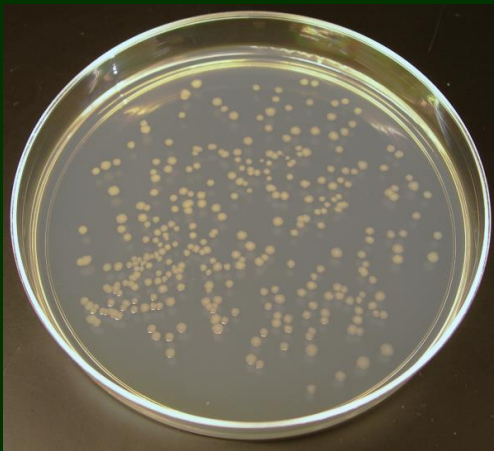


Téma 02_Kultivační a biochemické metody v bakteriologii



Financováno
Evropskou unií
NextGenerationEU



NÁRODNÍ
PLÁN OBNOVY

MŠMT
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

Pracovní pomůcky v mikrobiologii (bakteriologii)

Mikrobiologické sklo

- speciální sklo, které se liší od chemického nejen tvarem nádob, ale i jakostí
- odolnost vůči vysokým teplotám (horkovzdušná sterilizace)
- odolnost vůči působení chemických látek (v médiích, produkty kultivace mikroorganismů)
- nesmí docházet k vylouhování chemických složek, které by ovlivnily růst organismů
- silnostěnné sklo, hrdla nádob jsou rovná, tupá
- stále častěji plasty

Kultivační nádoby

- biologické zkumavky: silnostěnné s rovnými okraji, užívají se pro kultivace ve všech typech půd, udržování kultur, biochemické testy. Uzavírány kovovými zátkami nebo zátkami z buničité vaty, dnes už často plastové
- baňky: Erlenmayerovy, případně varné, zátkování podobné jako zkumavky, vhodné jak pro aerobní kultivace, tak pro přípravu živných půd
- Durhamova plynovka: ke stanovení plynu při kultivaci v tekutých půdách
- Rouxovy, Frenbachovy, Vinogradského nádoby: pro nahromadění většího množství kultury za aerobních podmínek
- promývací (provzdušňovací) lahve: submerzní kultivace mikroorganismů (třepání, provzdušňování)
- pipety: skleněné/plastové na konci uzavřené vatovou zátkou, pro pipetování kultur automatické pipety nebo nástavce pro skleněné

- mikroskopická skla: uchováváme v 96% etOH, odmašťujeme kys. chromsírovou, před použitím sterilizace ožhnutím.
- Petriho misky (často i plastové): různá velikost v bakteriologii nejčastěji průměr 100 mm, někdy vnitřní prostor členěn přepážkami pro několik kultivačních médií vedle sebe. Misky vhodné pro krátkodobou kultivaci – vysychání.

Použité nádoby: nádoby i s kulturou nejdříve autokládujeme (30 min, tlak 0,1 MPa), obsah za horka vylijeme a umýváme obvyklým způsobem. Použité skleněné pipety odkládáme do nádoby s 2% ajatinem, odmastit chromsírovou směsí

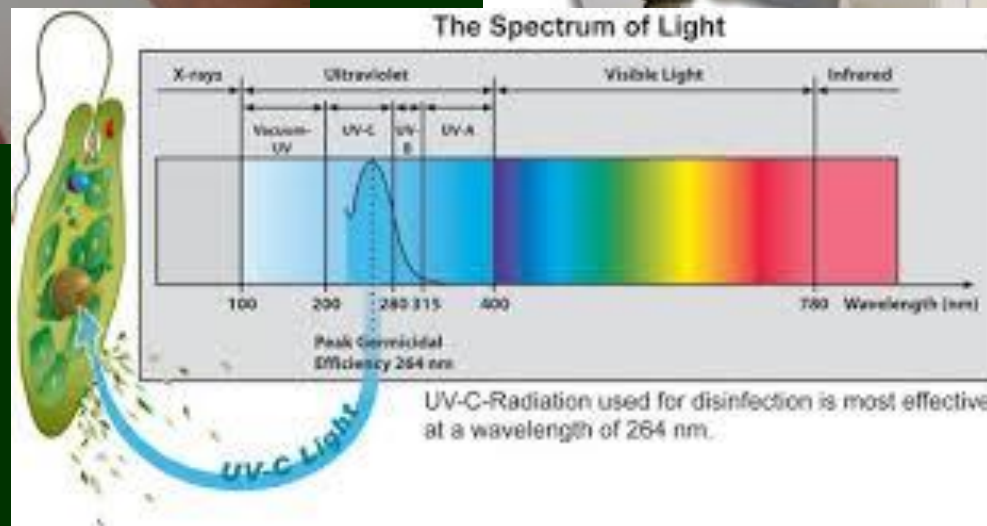
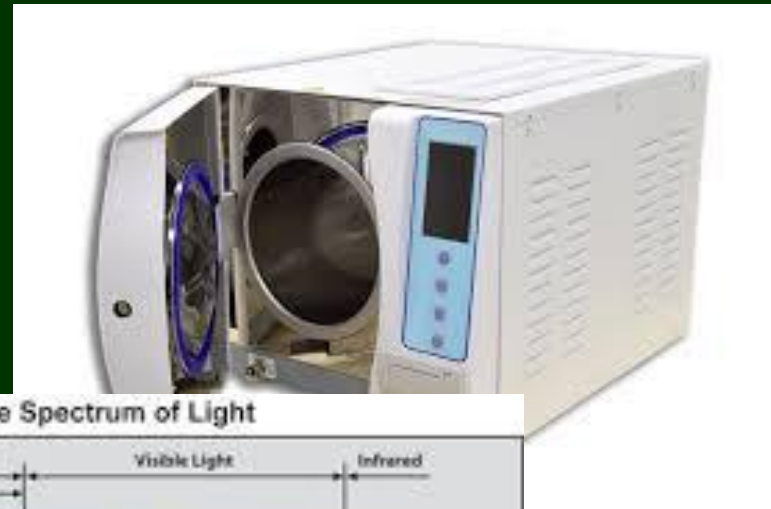
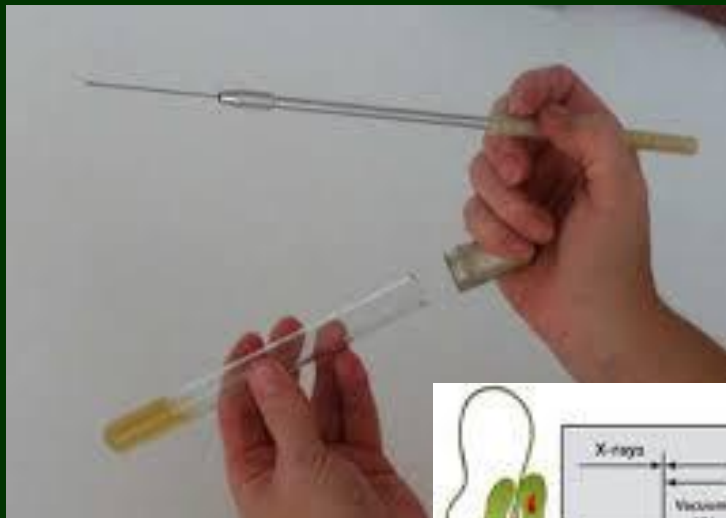
Preparační a očkovací pomůcky: pro očkování a přípravu preparátů používáme bakteriologické kličky nebo jehly z chromniklového nebo platinového drátu, příp. jednorázové, ocelové preparační jehly, tyčinky, Pasteurovy pipety, lancety, pinzety a skalpely. Práce v očkovacích boxech nebo flow-boxech

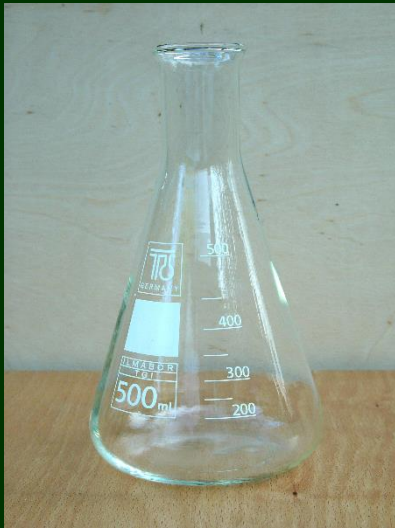
Kultivační zařízení: Pro kultivaci stacionárních kultur jsou využívány termostaty, příp. termostatované boxy, aerobní kultivace v tekutých půdách na třepacích zařízeních. K nezbytnému vybavení patří mikroskop.

Sterilizace skla a pomůcek: Horkovzdušné sterilizátory. Suché teplo má nižší ster. účinky než teplo vlhké, proto užívat vysokých teplot (160-180°C)/2 h. Ster. nádoby předem zabezpečit před kontaminací vatovými uzávěry, misky balit do Al folií, skleněné pipety do kovových pouzder.

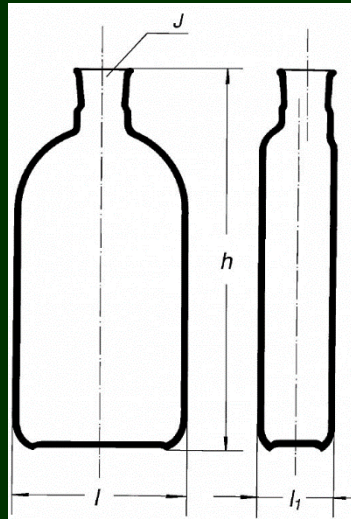
Očkovací pomůcky, pinzety, mikroskopická skla sterilizujeme ožeháváním v plameni kahanu těsně před použitím, zchlazujeme na nezaočkované půdě, ve sterilní vodě nebo okraji kultury. Ihned po zaočkování opět ožehneme, abychom organismy z kultury nerozptylovali do prostředí

Vzduch a pracovní plochy očkovacích boxů sterilizujeme germicidními lampami, tj. UV zářením. Během práce sterilizujeme prac. plochy chemicky – ajatin, persteril, chronan...



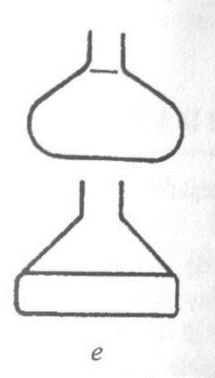


Erlenmayerova
baňka

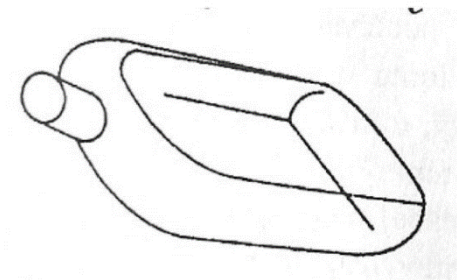


Rouxova kultivační
nádoba

4. Fernbachovy baňky a Rouxovy láhve se používají při kultivaci, kde se vyžaduje velký povrch substrátu



Fernbachova baňka



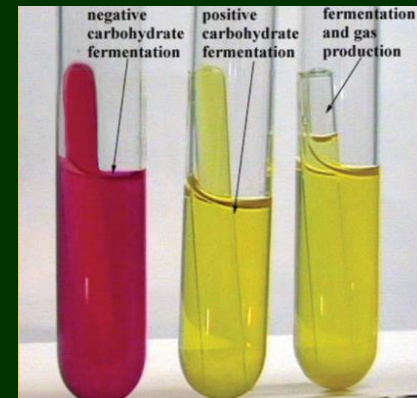
Rouxova láhev



Petriho misky



Provdušňovací lahev



Durhamova plynovka

Základy identifikace bakterií

- stanovení příslušnosti studovaného kmene k určité taxonomické skupině.
- základní taxonomickou jednotkou je druh, přehled popsáných druhů a jejich vlastností, klíče a tabulky k určování jednotlivých rodů udává Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, mezinárodní publikace vycházející ve stále dopňovaných a rozšiřovaných vydáních
- **identifikace je možná tehdy, pracujeme-li s čistou kulturou (ověření Gramovým barvením nebo křížovým roztěrem).**
- při identifikaci sledujeme několik skupin vlastností:
 1. **Morfologické vlastnosti:** makroskopické i mikroskopické, tvar a zbarvení kolonií, charakter růstu, různá identifikační barvení (Gramovo, acidorezistentní), tvorba spor, přítomnost pouzdra, bičíků atd.
 2. **Fyziologické vlastnosti:** vztah ke kyslíku, teplotní rozmezí pro růst, rezistence k teplotě, tolerance k NaCl, citlivost ke žlučovým solím, na antibiotika, typ metabolismu (fermentativní, aerobně nebo anaerobně respirační)
 3. **Biochemické vlastnosti:** využívání zdrojů uhlíku, redukce nitrátů, tvorba indolu, acetonu atd.
 4. **Doplňující testy:** elektronová mikroskopie, stanovení obsahu G+C v DNA, sérotypizace, fagotypizace, chemická analýza buněčné stěny, PCR, ribotypizace, důkaz produkce toxinů, důkaz patogenity atd.

- Výběr vhodných testů závisí na charakteristických znacích sledované skupiny. **Zařazení sledovaného kmene do určité skupiny, na základě morfologických a fyziologických vlastostí, je vždy prvním krokem.**
- Na jeho základě navrhujeme **další testy – série biochemických testů a testy doplňující** (sérotypizace, důkaz produkce toxinů nebo patogenity u materiálu izolovaného z infekčních procesů, mol-biol metody při popisu nového druhu, chemická analýza BS atd.).
- **Získané údaje jsou zpracovávány podle klíčů a tabulek, často za pomoci počítačových algoritmů. Protože identifikace je značně náročná, podaří se jen málo typických vzorků zařadit až do druhu přímo v provozních laboratořích.**
- specializované testy často v národních referenčních laboratořích (NRL)

Identifikace bakterií

MORFOLOGICKÉ VLASTNOSTI orientační

mikroskopické (tvar buněk,
pohyblivost, bičíky)
makroskopické (tvar a vlastnosti
kolonií)

FYZIOLOGICKÉ VLASTNOSTI zařazení do rodu a druhu

teplota, tolerance solí, antibiotik,
typ metabolismu (fermentativní,
aerobně nebo anaerobně
respirační)

BIOCHEMICKÉ VLASTNOSTI zařazení do rodu a druhu

využívání zdrojů uhlíku, redukce
nitrátů, tvorba indolu, acetonu atd.

DOPLŇUJÍCÍ TESTY subtypizace

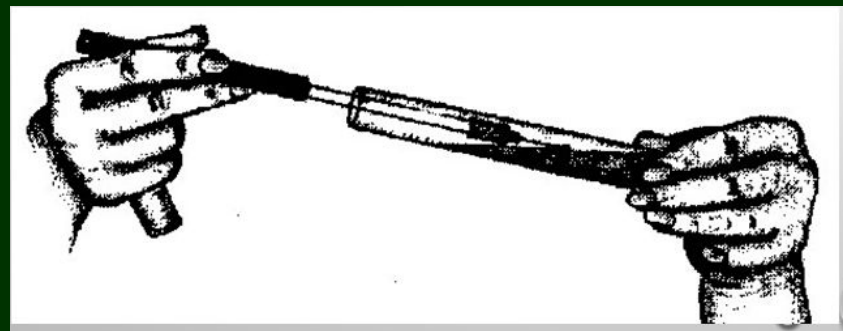
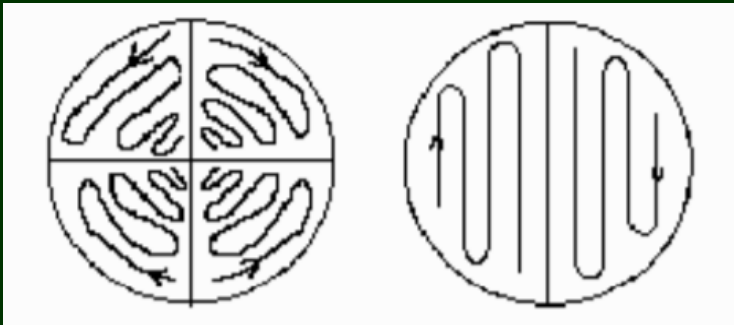
EM, PCR, RFLP, ribotypizace,
serotypizace, fagotypizace,
bakteriociny

Izolace bakterií (a kvasinek)

- vzorky často obsahují mnoho druhů organismů
- pro diagnostické účely je třeba rozdělit jednotlivé mikroorganismy vyskytující se v přirozeném prostředí (vzorku) a sledovat (určovat) samostatně jednotlivé druhy
- to je nutné pro určení, že určitý mikroorganismus zodpovídá za probíhající onemocnění člověka/zvířete, nebo pro určení jeho významu v biotopu nebo za jeho zodpovědnost za probíhající biochemickou reakci atd.
- Kultury: mikroorganismy pěstované v lab. podmínkách na živných půdách
- **Čisté kultury**: kultury jednoho druhu
- **Smíšené kultury**: společenstva (v přirozeném prostředí)
- **Technické kultury**: smíšené kultury pro pokusné nebo provozní účely (biol. čištění odpadních vod atd.)

Očkování mikroorganismů

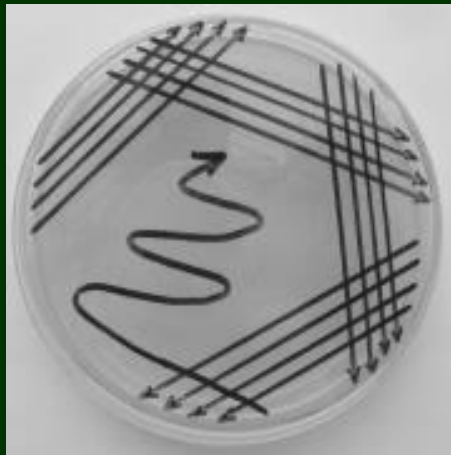
- přenesení z uchovávacího média nebo ze vzorku do čerstvého živného prostředí
- striktně aseptická práce
- očkování z tuhých médií/vzorků bakteriologickou kličkou (na bakteriologické plotny, na šikmý agar, do tekutého média)



- očkování z tekutých médií kličkou (**do očka**) nebo skleněnými nebo automatickými pipetami (do tekutého média, na tuhé médium)
- na tuhé médium: napipetovaný objem roztřeme po povrchu agaru **hokejkou**, nebo se inokulum pepetuje k vytemperovanému médiu ve zkumavkách (**řídský agar**), ten se vylévá na povrch pevného agaru.

Křížový roztěr

- postupné vyředování původního vzorku tak, aby na konci vyrůstaly na tuhém médiu jednotlivé kolonie bakterií.
- kolonie: potomstvo jedné původní buňky, klon.
- celý postup je nutno provádět přísně sterilně, misku otevíráme co nejméně a kličku před odložením znovu žiháme v plameni.
- klička se žihá až do oranžova, před odběrem nutno vychladit, aby nedošlo k usmrcení organismů.
- hodnocení: barva, tvar, profil a okraje kolonií, čistota kultury



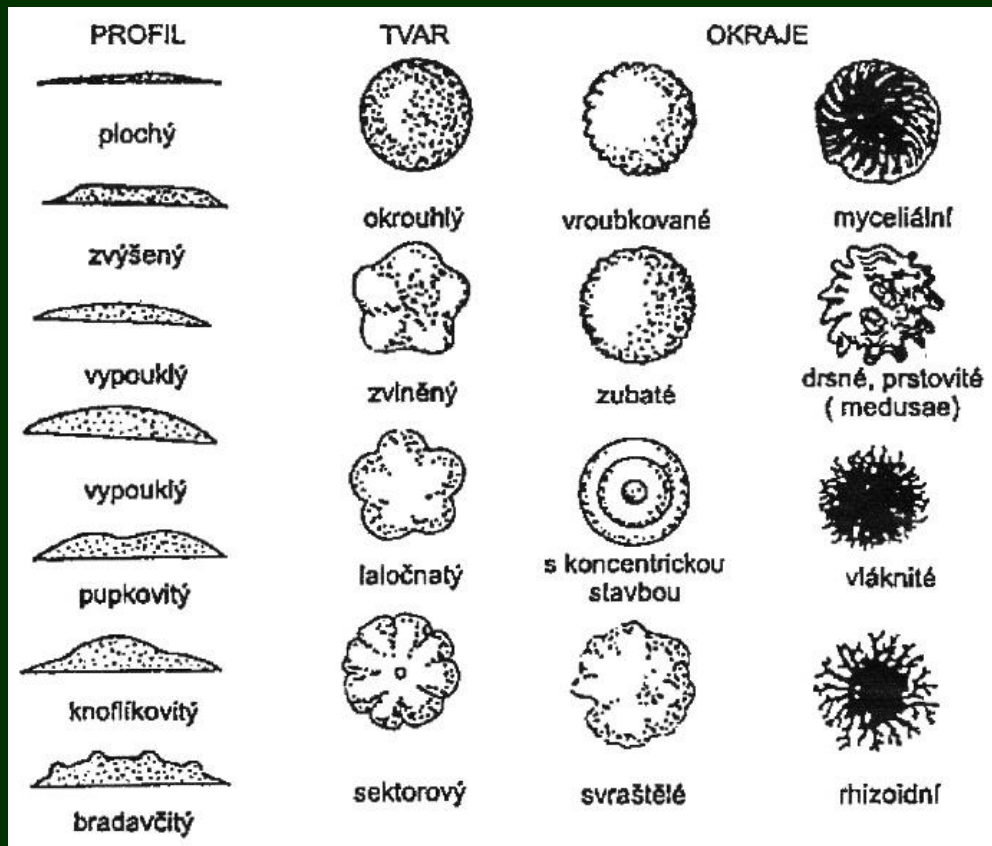
Bakteriální kolonie – morfologické studie

Velikost – průměr v mm, velmi malé kolonie jsou tečkovité

Povrch – hladký, někdy žilkovaný, hrubý, zvrásněný, matný, lesklý

Barva – závislost na pigmentu, dále opaleskní, zakalený, průsvitný...

Textura nebo konzistence – suchý, vlhký, mukoidní, viskózní, máslový



Colony Morphology: Describing Bacterial Colonies

Frequently during the semester you will need to describe bacterial (or fungal) growth observed on slants or Petri plates. It will be useful to learn the terminology used for describing common colony types. The following outline will be helpful for verbally communicating the appearance of observed colonial growth.

- 1. Form** – The form refers to the shape of the colony. These forms represent the most common colony shapes you are likely to encounter.



CIRCULAR



IRREGULAR



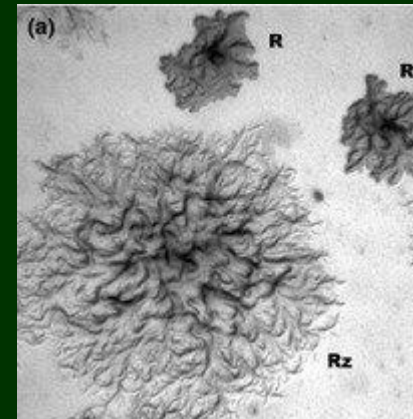
FILAMENTOUS



RHIZOID

- 1a. Size** – The size of the colony can be a useful characteristic for identification. The diameter of a representative colony may be measured. Tiny colonies are referred to as **punctiform**.
- 1b. Surface** – Bacterial colonies are frequently shiny and smooth in appearance. Other surface descriptions might be: **veined, rough, dull, wrinkled (or shriveled), glistening**.
- 1c. Texture** – Several terms that may be appropriate for describing the texture or consistency of bacterial growth are: **dry, moist, mucoid, brittle, viscous, butyrous (buttery)**.
- 1d. Color** – It is important to describe the color or pigment of the colony. Also include descriptive terms for any other relevant optical characteristics such as: **opaque, cloudy, translucent, iridescent**.

Morfologické studie bakteriálních kolonií



Flavobacterium columnare strain B245 rhizoid colony (Rz), irregular rough starving colonies (R)



Bacillus mycoides filamentous colony

2. Elevation – This describes the "side view" of a colony. These are the most common.



FLAT



RAISED



UMBONATE
(having a knobby protuberance)



CRATERIFORM



CONVEX



PULVINATE
(cushion-shaped)

3. Margin – The margin or edge of a colony (or any growth) may be an important characteristic in identifying an organisms. Several examples are shown below.



ENTIRE



UNDULATE
(wavy)



LOBATE



CURLED



FILIFORM
(filamentous)



Mycobacterium smegmatis – kolonie s panožkovitými okraji

Kolonie mikroorganismů

bakterie



Bacillus subtilis(3)



Proteus vulgaris(4)



Staphylococcus aureus(5)



Streptococcus pyogenes(8)

kvasinky



Candida Albicans is a type of yeast that can grow on the surface of skin(7)

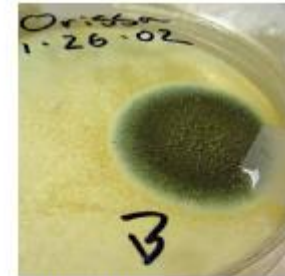


Round yeast colonies(8)

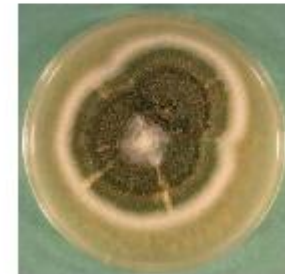


Pink yeast colonies(9)

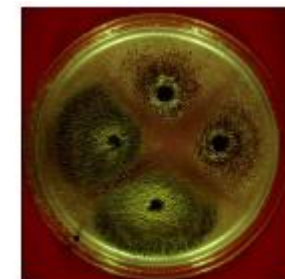
plísně a jiné houby



Green Mold (*Trichoderma harzianum*)(10)



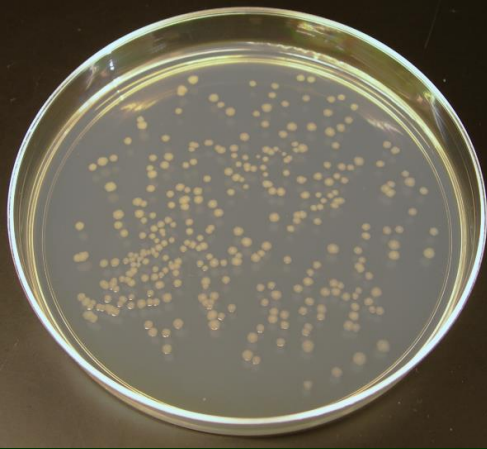
Black Mold (*Aspergillus niger*)(11)



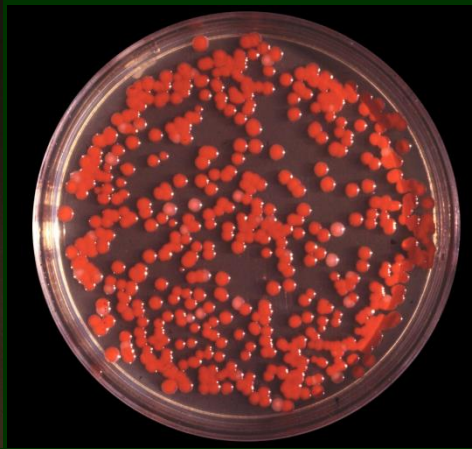
Aspergillus(12)



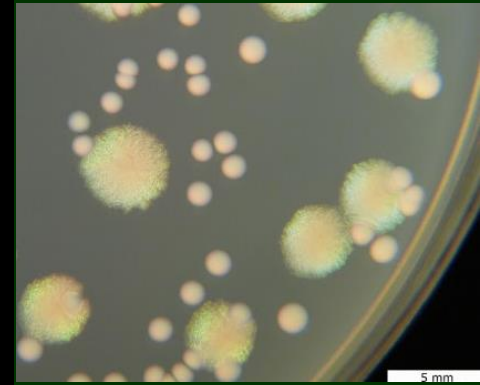
S. aureus



E. coli



S. marcescens
red pigment
prodigiosin



P. aeruginosa
irregular



B. subtilis
filamentous



B. anthracis
filamentous



M. tuberculosis
irregular

Mikroskopická identifikace mikroorganismů

- některé morfologické znaky mikroorganismů je třeba posuzovat v mikroskopickém preparátu
- **nativní preparát:** posouzení skutečného tvaru živé buňky, pohybu bakterií atd. Vývoj a růst mikroorganismů pozorujeme v tzv. vlhké komůrce, kde jsou buňky umístěny ve visuté kapce
- **vitálně barvený preparát:** pro diferencované vybarvení některých buněčných struktur nebo k rozlišení živých a mrtvých buněk
- **negativně barvené preparáty:** mezistupeň mezi vitálními a fixovanými preparáty – pozorování nezbarvených buněk na kontrastním pozadí
- **fixované a barvené preparáty:** lepší rozlišení jednotlivých typů bezbarvých bakteriálních buněk, jejichž tvar a struktura jsou bez předchozího barvení v optickém mikroskopu málo zřetelné

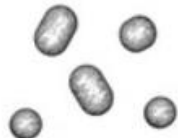
Morfologie bakteriálních buněk



COCCI



OVOID COCCI



COCOBACILLI



BACILLI(RODS)



LONG RODS



VIBRIOS



DIPHTHEROIDS



SPIRILLI



FILAMENTS



SPIROCHETES

velikost: 0.3 – 10 μm

Koky

G+: Micrococcus, Staphylococcus, Streptococcus, Enterococcus, Lactococcus

G-: Neisseria a Azotobacter

Kokobacily

Chlamydia trachomatis, Haemophilus influenzae, Gardnerella vaginalis a Coxiella burnetii.

Aggregatibacter actinomycetemcomitans (G-, původce zubního plaku)

Bordetella pertussis (G-, původce černého kašle)

Yersinia pestis (mor), Brucella (brucelóza), Haemophilus ducreyi (G-, původce pohlavně přenášené nemoci měkký vřed).

Tyčky (bacily)

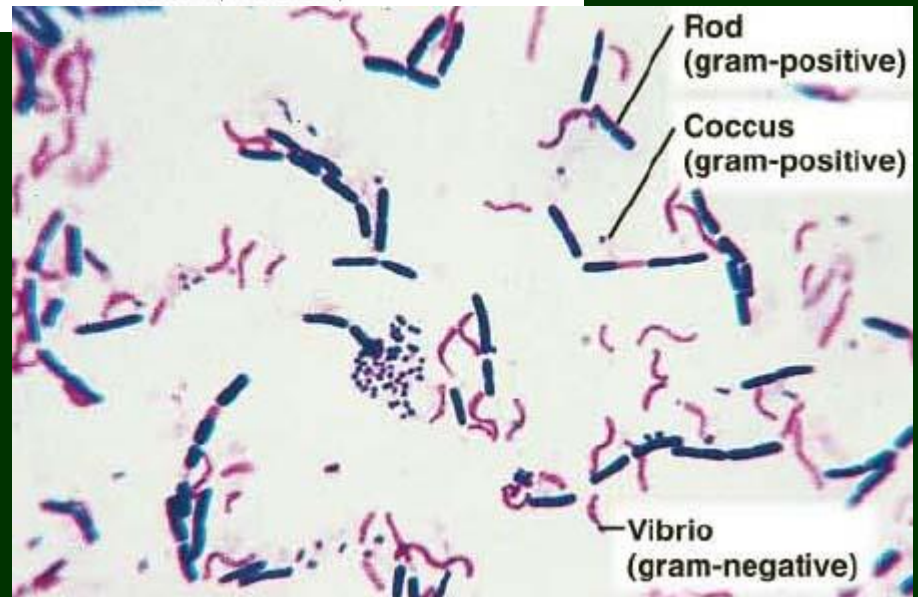
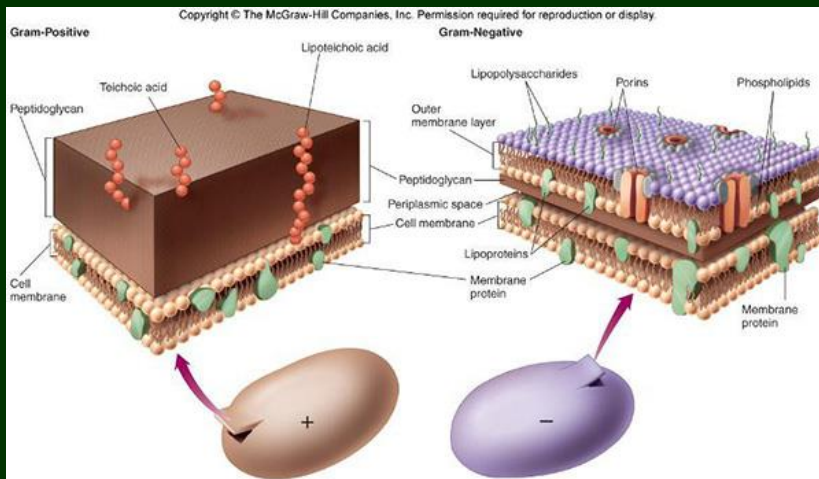
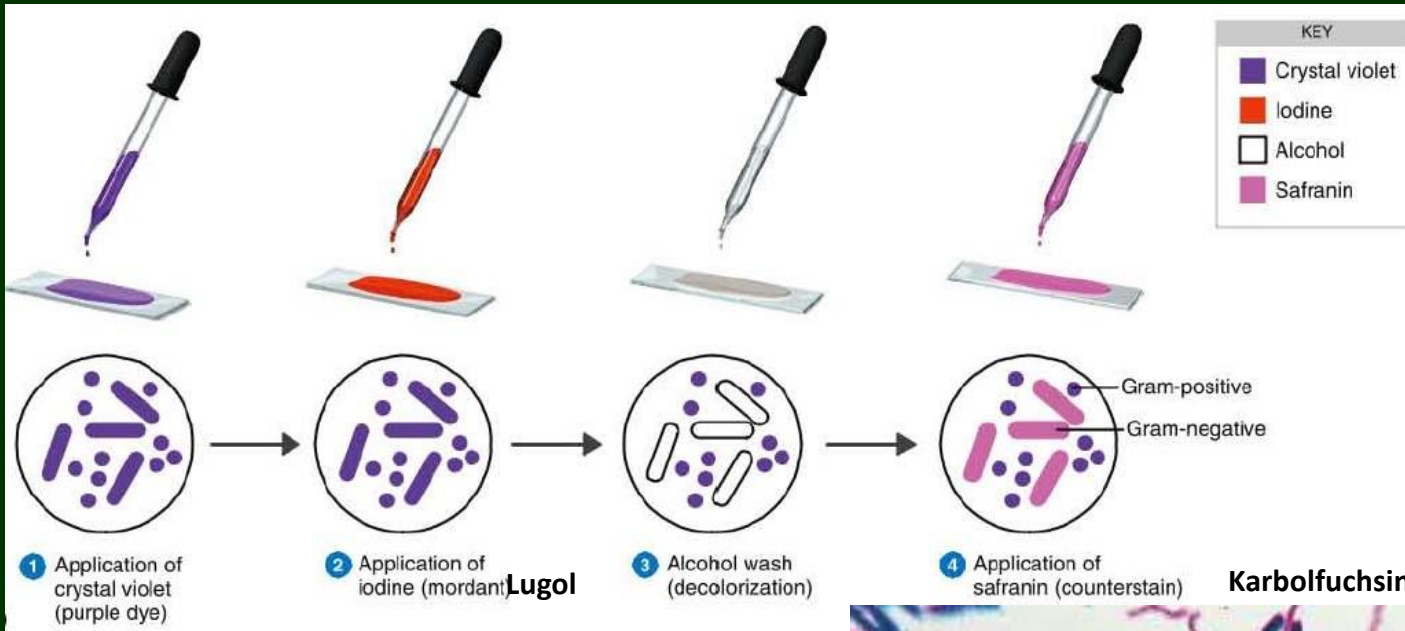
Kmen Firmicutes (rody Bacillus, Clostridium), dále Escherichia coli

Zakřivené, rohlíčkovité tyčky (rod Vibrio), hrubé spirály (Spirilla)

Spirochety

Borellia, Leptospira, Treponema

Barvení podle Grama



Grampozitivní bakterie mají stěnu tvořenou peptidoglykanem a polysacharidy, kterými prochází kyselina teichoová. Při barvení se krystalová violeť dostává do buněk a tvoří s Luglovým roztokem modrou komplexní barvu. Alkohol není schopný prostoupit buněčnou stěnou a rozpustit komplex. Dobarvení safraninem dodá bakteriím tmavě fialovou barvu.

G+ koky: Staphylococcus, Streptococcus, Enterococcus;

G+ bacily: Corynebacterium, Clostridium, Listeria, Bacillus.

Gramnegativní bakterie mají stěnu tvořenou tenkou vrstvou peptidoglykanu a vrstvou lipopolysacharidu. Při stejném postupu dochází ve třetím kroku k vyplavení komplexu alkoholem a k odbarvení. Safranin dobarví bakterie červeně.

G– koky: Neisseria;

G– kokobacily: Haemophilus influenzae, Bordetella pertussis, Legionella, Brucella, atd.

G– bacily: Klebsiella, E.

coli, Enterobacter, Citrobacter, Serratia, Vibrio, Pseudomonas, Proteus, Helicobacter pylori, Yersinia, Campylobacter, Salmonella, Bacillus fragilis, atd.

Lugolův roztok: vodný roztok elementárního jodu a jodidu draselného

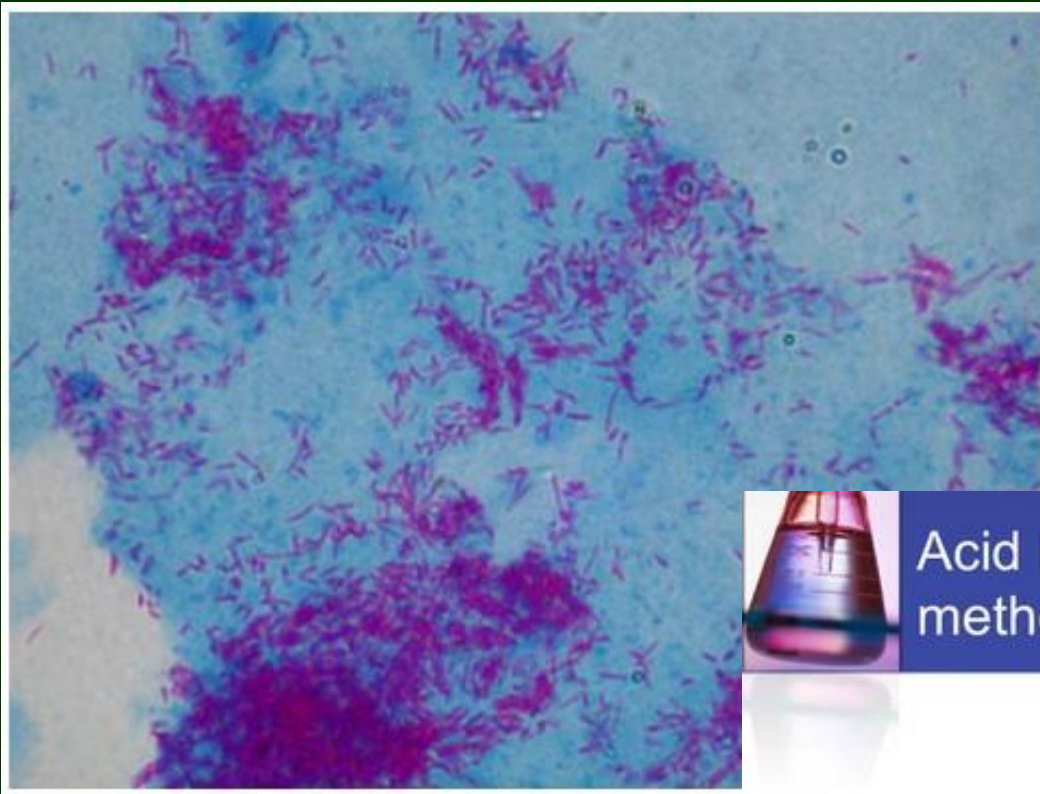
Ziehl–Neelsen stain (acid fast staining)

The Ziehl–Neelsen stain, also known as the acid-fast stain, was first described by two German doctors: the bacteriologist Franz Ziehl (1859–1926) and the pathologist Friedrich Neelsen (1854–1898).

It is a special bacteriological stain used to identify acid-fast organisms, mainly Mycobacteria. Mycobacterium tuberculosis is the most important of this group because it is responsible for tuberculosis .

Acid fast organisms like Mycobacterium contain large amounts of lipid substances within their cell walls called **mycolic acids**. These acids resist staining by ordinary methods such as a Gram stain. It can also be used to stain a few other bacteria, such as Nocardia. The reagents used are Ziehl–Neelsen **carbol fuchsin, acid alcohol, and methylene blue**. Acid-fast bacilli will be bright red after staining.

Initially, Carbol Fuchsin stains every cell. When they are destained with acid-alcohol, only non-acid-fast bacteria get destained since they do not have a thick, waxy lipid layer like acid-fast bacteria. When counter stain is applied, non-acid-fast bacteria pick it up and become blue when viewed under the microscope. Acid-fast bacteria retain Carbol Fuchsin so they appear red.



Acid fast stained mycobacteria



Acid Fast Stain (aka Ziehl-Neelsen method)

Acid-Fast



Heat + Fuchsin

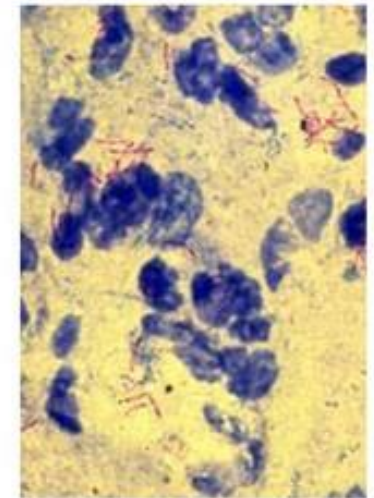


Acid alcohol



Methylene blue

Non-AF



*Mycobacterium
Tuberculosis*

Kvantitativní hodnocení mikrobiálních kultur

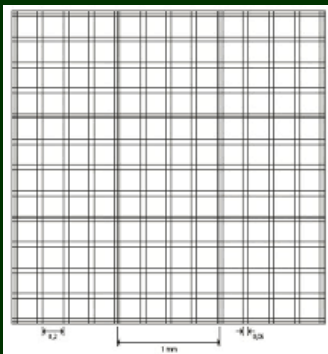
- stanovení počtu mikrobiálních buněk nebo celkové biomasy
- stanovení v daném objemu, přepočet na 1 mL původního vzorku
- pro sledování růstu, množení, hodnocení podílu jednotlivých skupin mikroorganismů na celkovém zastoupení mikroorganismů

- Metody přímé – mikroskopické: počítání buněk v mikroskopickém preparátu
- Metody nepřímé – kultivační: celkový počet životaschopných buněk počítáním kolonií na agarových plotnách (zde i nefelometrické metody)

- Přímé: výhoda rychlost, určíme živé i mrtvé buňky
- Nepřímé: nákladnější, časově náročnější, poskytují však obraz o skutečném fyziologickém stavu kultury

Přímé stanovení počtu buněk mikroskopickým počítáním

- suspenze o vhodné hustotě
- preparáty bez úpravy nebo upravované – fixované, barvené
- nezbarvené buňky např. pod fázovým kontrastem
- počítací komůrky: Thomova, Bürkerova, Vošahlíkova
- komůrky složeny ze silného podložního skla s vylitou sítí čtverečků a krycího skla, které se pokládá na boční lišty, čímž vzniká mezi sklíčky prostor o přesně definované hloubce
- není-li komůrka, lze počítat v zorném poli a přepočítat na plochu krycího skla, pracujeme se známým objemem suspenze
- Bürkerova komůrka: plošky o obsahu $1/25$ a $1/400$ mm², hloubka prostoru mezi sklíčky 0,1 mm (tedy objemy $1/125$ nebo $1/4000$ mm³)



Hodnocení:

Výpočet: malý čtvereček - plocha $1/400$ mm², objem nad 1 ploškou $1/4000$ mm³, počet vyhodnocených plošek - 80, zjištěný celkový počet buněk - 800, ředění suspenze - 10x. Počet buněk v 1ml původní suspenze = $800/80 \cdot 4000 \cdot 10 = 400000 = 4 \cdot 10^5$ buněk. Pokud se použije vitálního testu, hodnotí se kromě celkového počtu buněk ještě počet mrtvých buněk a stanoví se procento mrtvých buněk v suspenzi.

Na fixovaných a barvených preparátech

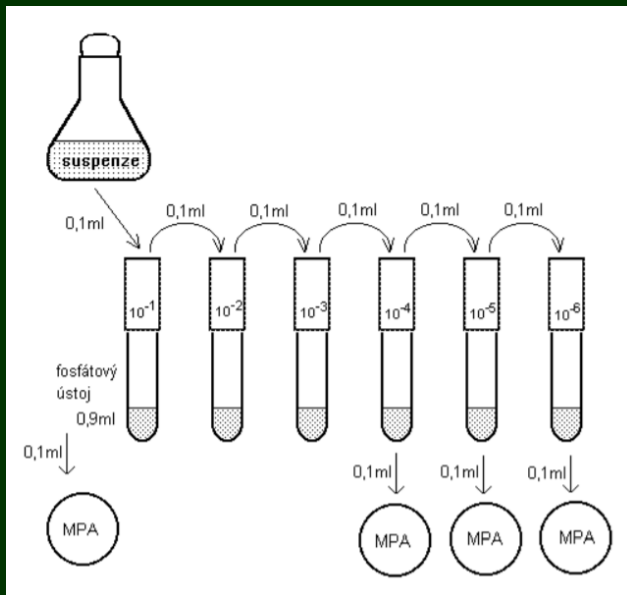
- pro uchování jako dokladový materiál
- podložní skla, na spodní straně rydlem nebo fixou označenu přesně definovanou plochu
- na plochu nanést známý objem suspenze, rozetřít, usušit, fixovat a barvit
- barvení: např. safraninem, erythrosinem, karbolfuchsinem
- počítat buňky min. v 10 zorných polích

Na membránových filtrech

- použití tam, kde lze oddělit mikroby od ostatní biomasy a kde je třeba zakoncentrovat jejich buňky z větších objemů (v praxi hlavně rozbory vody)
- filtrace na sterilních filtrech, barvení karbolerythrosinem, vymytí přebytečného barviva
- vysušený filtr přenést do kaptky imerzního oleje na podložním skle, další kapku nanést na membránu a preparát uzavřít krycím sklem
- počítat imerzním objektivem a buď okulárem s vloženou měřicí sítčkou nebo v zorných polích

Nepřímé stanovení počtu buněk – kultivační stanovení počtu životaschopných buněk

- kultivace a počítání kolonií vyrostlých na agarových plotnách
- empirický předpoklad: z 1 životaschopné buňky vyrůstá 1 kolonie
- životaschopnost: schopnost buňky vytvářet na agarovém médiu viditelné makroskopické kolonie
- zaočkování inokula do agarového media: 1) očkování inokula na plotnu a rozetření hokejkou, nebo 2) zalití inokula (1 mL) vytemperovaným agarem a důkladně rozmíchat. Druhá metoda i pro stanovení anaerobů (kultivace pod parafinem).
- suspenzi před očkováním ředit, aby vyrostly na tuhém médiu jednotlivé kolonie, které se nepřekrývají okraji, obvykle desítkové ředění



Hodnocení:

K hodnocení vybereme nejvhodnější ředění (20 - 200 kolonií na misce) a spočítáme počet kolonií na všech miskách tohoto ředění. Počítané kolonie si označíme na spodní stranu misky fixou. Ze získaných hodnot spočítáme průměr, číslo vynásobíme ředěním a 10ti (pipetovali jsme 0,1ml na misku).

Př.: Průměr ze 3 misek je 75, ředění 10^{-5} , dostaneme potom $75 \cdot 10^5 \cdot 10 = 7,5 \cdot 10^7$ CFU/ml. Počet buněk se uvádí jako **CFU = colony forming units** v 1ml, protože ne vždy reprezentuje 1 kolonie 1 buňku, některé buňky jsou dočasně spojeny a vyrůstá z nich pak 1 kolonie.

Nefelometrické stanovení počtu buněk

- metoda založena na zjištění aktuální hustoty buněk nefelometrem
- rozptyl světla v zakalené kapalině závisí na jeho vlnové délce, optických vlastnostech kapaliny i vlastnostech rozptýlených částic
- metodu lze použít v kombinaci s mikroskopickou nebo kultivační metodou stanovení počtu buněk a pouze v určitém koncentračním rozmezí suspendovaných částic (při příliš vysokých koncentracích buněk je světlo absorbovááno okolní kapalinou, takže hodnoty neodpovídají skutečnosti)
- sestrojí se kalibrační křivka – závislost optické denzity (OD) na počtu buněk při vhodné vlnové délce (např. 620 nm).
- k tomu se použije řada ředění vzorku v použití rozpouštědla, médiu nebo roztoku.
- u každého ředění změříme optickou denzitu a stanovíme počet buněk mikroskopicky nebo kultivačně

K teorii nefelometrie

Nefelometrie (také tyndallometrie) je fyzikálně chemická analytická metoda pro měření koncentrace koloidních disperzí. Při stálé koncentraci je možné měřit i velikost koloidních částic. Je založena na měření intenzity rozptylu světla a absorpce světla.[1]

Při této metodě se využívá speciálních optických vlastností koloidních disperzí. Světlo procházející v určitém směru do koloidů způsobuje kolmo na tento směr opalescenci, která je způsobena rozptylem světla na koloidních částicích. Tento úkaz se nazývá Tyndallův jev.

Při průchodu světelných paprsků kapalinou, která obsahuje jemně rozptýlené nerozpuštěné částice (suspenze, koloidní disperze), dochází k rozptylu světla do všech směrů a intenzita procházejícího světla se zmenšuje v závislosti na koncentraci suspendovaných částic.

Do vzorku vniká primární světlo a měří se intenzita sekundárního světla, které se odráží od částic v určitém úhlu ke směru, kterým do vzorku primární světlo vniklo. Koncentraci suspendovaných částic lze zjišťovat dvojím způsobem:

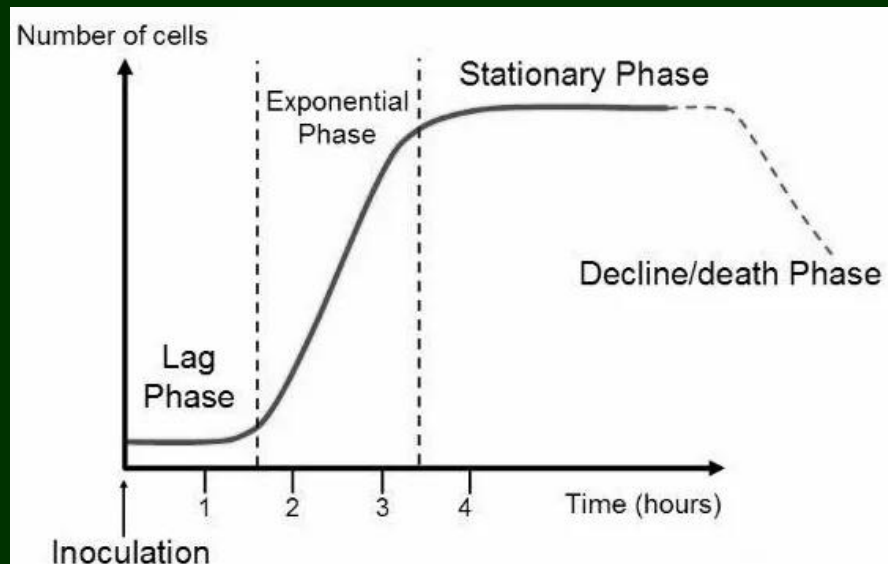
- měřením světelného toku, který je částicemi odrážen kolmo nebo pod určitým úhlem na směr dopadajícího paprsku. Tento způsob měření se označuje jako nefelometrie.
- měřením světelného toku po průchodu prostředím ve směru dopadajícího světelného toku ze zdroje. Tento způsob měření se označuje jako turbidimetrie.

Měřením intenzity difúzně rozptýleného světla na dispergovaných částicích se zabývá nefelometrie. Rozptýlené světlo vychází z roztoku všemi směry (tzv. Tyndalovo světlo) a měří se pod úhlem, který je odlišný od směru dopadajícího záření. Konvenční nefelometry používají jako světelných zdrojů žárovku s halogenovou atmosférou nebo xenonovou výbojku. Optika těchto přístrojů obsahuje navíc interferenční filtr, neboť světelný zdroj poskytuje polychromatické světlo. Detektor je nastaven pod úhlem 70 až 90°, protože stupeň směrovosti světla z konvenčního zdroje je nízký. Laserový nefelometr používá jako světelného zdroje helium-neonového laseru. Tento zdroj monochromatického světla je mimořádně intenzivní a má vysoký stupeň směrovosti. Laserový paprsek prochází přes kyvetu s měřeným roztokem a rozptýlené světlo se sleduje detektorem nastaveným pod úhlem 5 až 35° (fotonkou nebo fotonásobičem).

Živná média

Mikroorganismy jsou v laboratořích uchovávány na sterilních živných půdách. Složení musí vyhovovat všem požadavkům daného organismu na výživu, pH, osmotické poměry a další fyzikálně chemické podmínky. Připravovaná živná média musí být izotonická a musí obsahovat zdroj C a N (v konc. a formě dostupné pro daný organismus), růstové faktory a vodu.

Optimální živné prostředí by v průběhu kultivace nemělo měnit svoje fyzikální a chemické vlastnosti, to je však možno splnit pouze při **kontinuální kultivaci**. Během **stacionární kultivace** se složení výrazně mění – vyčerpávání živin a hromadění metabolitů.



Příprava živných půd:

- voda: vodovodní (pro půdy z přírodního materiálu), destilovaná (syntetická média), ve spec. případech (stanovení vitaminů, aminokyselin atd.) redestilovaná nebo deionizovaná voda
- ztužené půdy: agar 1,5 – 3%
- agar je přírodní polysacharid (lineární polymer galaktózy) s vysokou gelující schopností, vyrábí se z mořských řas Floridae a Gelidium.
- většina médií je dodávána kompletně v práškové podobě, nutno rozpustit, upravit pH a sterilizovat
- úprava pH: 1N NaOH nebo 1N HCl, bakterie: pH 7 – 7,3, kvasinky a houby pH 4,5 – 6,0. Sterilizací klesne pH o 0,1 až 0,3.
- **sterilizace médií: autoklávování při přetlaku 0,1 – 0,15 MPa, což odpovídá teplotě 121 – 128 °C. Doba závisí na objemu a viskozitě půdy (20 min pro zkumavky a malé objemy, 30 – 60 min pro objem 3 l).**
- !!!! roztoky cukrů sterilizujeme filtrací a přidáváme do sterilního média
- frakcionovaná sterilizace: media zahříváme v proudící páře (20 – 30 min na teplotu 99 – 100 °C, postup opakujeme ve 3 po sobě následujících dnech. Pro média poškozující se tlakovou sterilizací (mléko, želatinová media)

Rozlévání půd a jejich uchovávání

Tekuté a ztekucené půdy plníme do sterilních baněk nebo zkumavek s vatovou nebo kovovou zátkou. Nepotřísnit okraje nádob ani zátky!!! Kontaminace!!!

Půdy sterilizujeme ihned po rozplnění

Z pevného média ve zkumavkách připravujeme šikmé agary tak, že vysterilizovanou půdu necháme utuhnout v šikmé poloze

Bakteriologické plotny lijeme do sterilních Petriho misek asepticky až po sterilizaci půd. Rozlévání provádíme v předem vydezinfikovaných boxech, misky plníme do výšky 3 -4 mm, pro kvantitativní analýzy pipetujeme 15 – 20 mL media na misku (100 mm). Necháme tuhnout ve vodorovné poloze, po utužení obvykle inkubujeme 2 – 3 dny v obrácené poloze, při teplotě, jež bude použita pro kultivaci. Tím dojde k vhodnému předsušení půdy, nutnému k povrchovému očkování. Během inkubace se projeví i případná kontaminace.

Uchovávat v temném, bezprašném, suchém a pokud možno chladném prostředí. Pro dlouhodobější uchovávání lépe chladnička.

Podle složení:

1. **Syntetická prostředí:** jejich složení je předem definováno. Většinou jde o organické roztoky, zdrojem C obvykle glukosa, zdrojem N $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ nebo NH_4Cl . Dodávají se některé aminokyseliny, vitaminy, růstové faktory.
2. **Přirozená živná prostředí:** tvořena složkami získávanými po kyselé nebo enzymatické hydrolýze kaseinu, fermentativní hydrolýze masa (masový výtažek), autolýzou nebo hydrolýzou pekařského droždí (extrakt z kvasinek), působením žaludečních šťáv na rostlinné a živočišné bílkoviny (pepton).

Z hlediska růstu mikroorganismů (a též pro diagnostiku):

1. **Půdy univerzální:** složením vyhovují požadavkům na výživu širokého spektra organismů (např. masopeptonový bujón, sladinový agar atd.).
2. **Půdy selektivní:** složení zvýhodňuje růst jednoho druhu nebo skupiny organismů. Růst ostatní mikroflóry je brzděn (Ashbyho agar, Staphylococcus medium)
3. **Půdy selektivně diagnostické:** na nich roste jen velmi malá skupina organismů, která se projeví charakteristickou biochemickou reakcí (Endova půda)

Ashbyho agar – bezdusíkaté médium, rostou na něm jen organizmy schopné fixace vzdušného dusíku

Ashby's Mannitol Agar is used for the cultivation of the Azotobacter species that can use mannitol and atmospheric nitrogen as a source of carbon and nitrogen, respectively. Besides having the ability to fix atmospheric nitrogen, Azotobacter can also synthesize biologically active substances which improve seed germination and plant growth.

Selective media allow the growth of certain type of organisms, while inhibiting the growth of other organisms. Selective inhibition of some types of microorganisms can be studied by adding certain **dyes, antibiotics, salts or specific inhibitors** that will affect the metabolism or enzymatic systems of the organisms. For example, media containing **potassium tellurite, sodium azide or thallium acetate** at different concentrations of 0.1 - 0.5 g/l will inhibit the growth of all Gram-negative bacteria. Media supplemented with the antibiotic **penicillin** concentration 5-50 units/ml or **crystal violet** 2 mg/l inhibit the growth of Gram-positive bacteria. Tellurite agar, is used to select for Gram-positive organisms, and nutrient agar supplemented with the antibiotic penicillin can be used to select for the growth of Gram negative organisms.

Differential media are widely used for differentiating closely related organisms or groups of organisms. Because of the presence of certain dyes or chemicals in the media, the organisms will produce certain **characteristic changes or growth patterns that are used for identification or differentiation of microorganism.**

Enriched media are media that have been supplemented with highly nutritious materials such as blood, serum or yeast extract for the purpose of cultivating fastidious organisms.

Selektivní součást některých půd jsou např. **barviva, antibiotika, soli**, jejichž toxicita se využívá pro eliminaci některých skupin:

Barviva

- krystalová violeť v Gassnerově půdě
- metylenová modř v Levinově půdě
- bazický fuchsin v Endově půdě (všechny tři eliminace G+)
- bengálská červeň, krystalová violeť (eliminace mikromycet)

Penicilin (suprese G+), soli (suprese G-)

Telurid draselný

Azid sodný

Acetát thallia

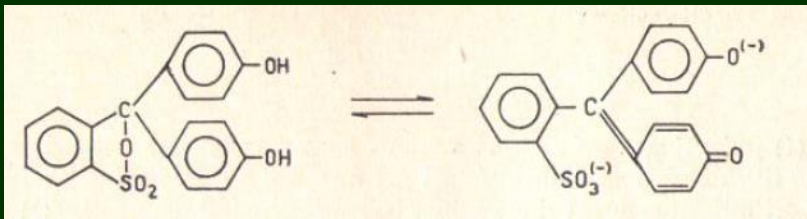
Diferenciace založena na:

- fermentaci sacharidů
- utilizaci peptonu
- permeabilizaci membrány u G-
- produkce H₂S
- hemolýza

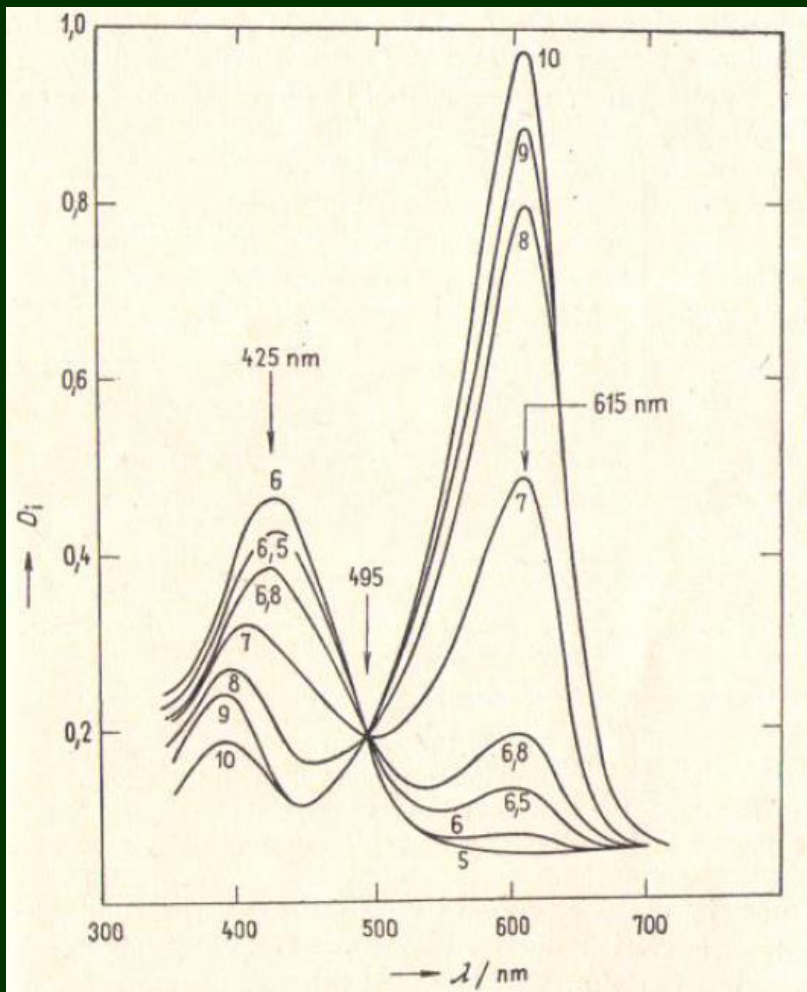
Obohacení půd pro růst náročných organismů

- erytrocyty, hemin, NAD...

Proč se mění barva pH indikátorů?



fenolová červeň



pH pod 7: zbarven žlutě (absorbce v modré části spektra – 425 nm)

pH nad 7: zbarven červeno-fialově (absorbce v žluté a žlutozelené oblasti – 615 nm)

Media	Classification	Selective and Differential agents	Type of organisms isolated
Mannitol salt agar (MSA)	Selective and differential	7.5% NaCl and mannitol for isolation and identification of most <i>S.aureus</i> strains	Staphylococci and Micrococci
MacConkey's Agar	Selective and differential	Lactose, bile salts, neutral red, and crystal violet	Gram-negative enteric bacilli
Eosin methylene blue agar(EMB)	Selective and differential	Lactose, eosin Y, and methylene blue	Gram-negative enteric bacilli
Phenylethyl Alcohol Agar (PEA)	Selective	Phenylethyl alcohol (inhibits gram negatives)	Gram-positive bacteria
Hektoen Enteric Agar (HE)	Selective and differential	Lactose, sucrose, bile salts, ferric ammonium sulfate, sodium thiosulfate, bromthymol blue, acid fuchsin	Salmonella and Shigella species (enteric pathogens)
Blood Agar	Enriched and differential	5% defibrinated sheep blood	Almost all bacteria; differential for hemolytic organisms
Chocolate Agar	Enriched	1% hemoglobin and supplements	Most fastidious pathogens such as Neisseria and Haemophilus

Mannitol salt agar (MSA)

- Mannitol salt agar is both a selective and differential media used for the isolation of pathogenic *Staphylococci* from mixed cultures.
- On MSA, only pathogenic *Staphylococcus aureus* produces small colonies surrounded by yellow zones. The reason for this color change is that *S. aureus* have the ability to ferment the mannitol, producing an acid, which, in turn, changes the indicator color from red to yellow. The growth of other types of bacteria is usually inhibited. This growth differentiates *S.aureus* from *S.epidermidis*, which forms colonies with red zones or both zones.



Figure1 : Mannitol Salt Agar



S. aureus



S. epidermidis

MSA

Obsahuje vysokou koncentraci (asi 7,5–10%) soli (NaCl), takže inhibuje většinu gramnegativních a některých grampozitivních bakterií.

Indikátor je fenolová červeň.

Přežívají hlavně rody *Staphylococcus* a *Micrococcaceae* (G+, kataláza+).

Je diferenciální půdou pro stafylokoky.

S. aureus fermentuje manitol – produkce kyseliny – změna indikátoru na žlutý (žluté kolonie nebo médium kolem nich)

S. epidermidis – nefermentuje manitol, kolonie zůstávají červené.

Mikrokoky tvoří také červené kolonie (spolu se stafylokoky tvoří přirozenou mikrofloru kůže a sliznic, avšak jen zřídka působí infekce).

Ostatní bakterie jsou inhibovány

MacConkey's agar (MAC)

- MacConkey's Agar is both a selective and differential media; it is **selective for Gram negative bacteria and can differentiate those bacteria that have the ability to ferment lactose**
- Neutral red pH indicator - Stains microbes fermenting lactose (hot pink in acid pH, rose in neutral pH, brown in alkaline pH)
- By **utilizing the available lactose** in the medium, Lac⁺ (lactose fermenting) bacteria such as *Escherichia coli*, *Enterobacter* and *Klebsiella* will **produce acid** in the medium, which lowers the pH of the agar below 6.8 and results in the appearance of **red or pink colonies**. Non-lactose fermenting bacteria such as, *Proteus species*, *Salmonella*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Shigella* cannot utilize lactose in the medium, and will use peptone instead. This results in the formation of ammonia, which raises the pH of the agar, and leads to the formation of white or colorless colonies in the plate.



Figure2 : MacConkey's Agar

Figure 13: MacConkey's agar with lactose fermenters (left) and non-lactose fermenters (right)

MAC

Založena na fermentaci laktozy

Selektivní médium pro G- enterické bakterie a diferenciacní pro Lac+

Kromě laktozy obsahuje také pepton

Dále obsahuje krystalovou violet (potlačuje G+)

Neutrální červeň: indikátor pH – kyselé, neutrální (růžová), alkalické (hnědá)

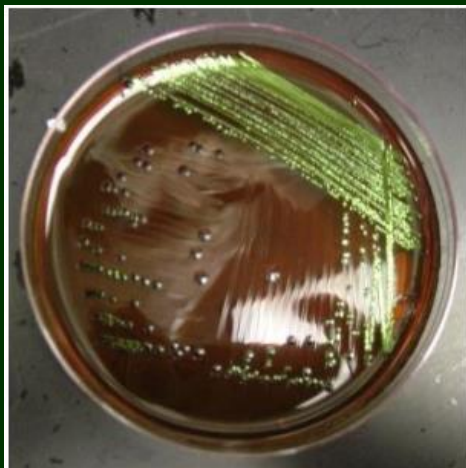
Lac+ (laktosa-fermentující: E.coli, Enterobacter, Klebisella) produkce kyselin z laktozy – červené, růžové kolonie

Lac- (laktosa-nefermentující: Proteus, Salmonella, Pseudomonas, Shigella)

utilizace peptonu namísto laktozy – tvorba amoniaku – zvýšení pH – hnědé kolonie

Eosin methylene blue agar (EMB), Endo agar

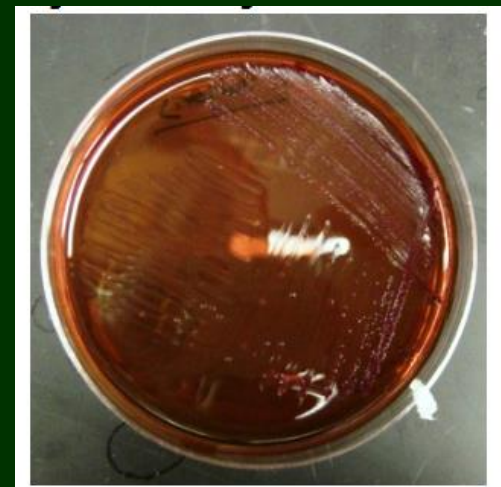
- Eosin methylene blue agar (EMB) is both a selective and differential medium used for the **detection and isolation of Gram-negative intestinal pathogens**.
- **Acid production from lactose fermentation** causes precipitation of the dyes on the surface of the colony resulting in different colors.
- **Large amounts of acid** - green metallic sheen
- **Small amounts of acid** - pink
- **No fermentation** - colorless
- Enterobacter aerogenes produces large colonies which are pink-to-buff around dark centers. Escherichia coli produce small, dark colonies with a green metallic sheen. Pseudomonas, Proteus, Salmonella and Shigella sp produces colorless colonies because it does not ferment lactose.



E. coli



Enterobacter aerogenes



Proteus vulgaris

EMB

Podobné předchozímu

Obsahuje pepton, laktózu, eosin a methylenovou modř

Selektivní pro G- enterické bakterie, diferenciacní pro Lac+

G+ nerostou

Produkce kyseliny z laktosy způsobuje precipitaci barviv na povrchu kolonií, což vede ke změnám barvy.

E.coli - rychlá metabolizace laktosy, velké množství kyseliny, zelené/tmavé kolonie s kov. leskem

Enterobacter – pomalejší fermentace, méně kyseliny, růžové kolonie s tmavými středy

Pseudomonas, Proteus, Salmonella, Shigella bezbarvé kolonie, protože jsou Lac- (protože využívají pepton, vzniká amoniak (alkalizace), bezbarvé kolonie (v půdě není indikátor alkalického pH)

Je velmi podobná agaru MacConkey.

Každá laboratoř rozhodne, zda pracuje s jedním nebo druhým, protože plní stejnou funkci, i když jsou biochemicky odlišné.

Podobná je Gassnerova půda

s obsahem metachrome yellow – suprese G+

lac+ ... modré kolonie (kyselost, změna barvy indikátoru)

lac- ... žluté kolonie nebo žluté pozadí

Phenylethyl alcohol agar (PEA)

- Phenylethyl Alcohol (PEA) Agar with or without 5% sheep blood is a selective medium for the **isolation of gram-positive organisms**, particularly gram-positive cocci, from specimens of mixed gram-positive and gram-negative flora.
- **Phenylethyl alcohol** – Inhibits the growth of Gram negatives since it selectively and reversibly inhibits DNA synthesis, thus selecting for Gram positives.

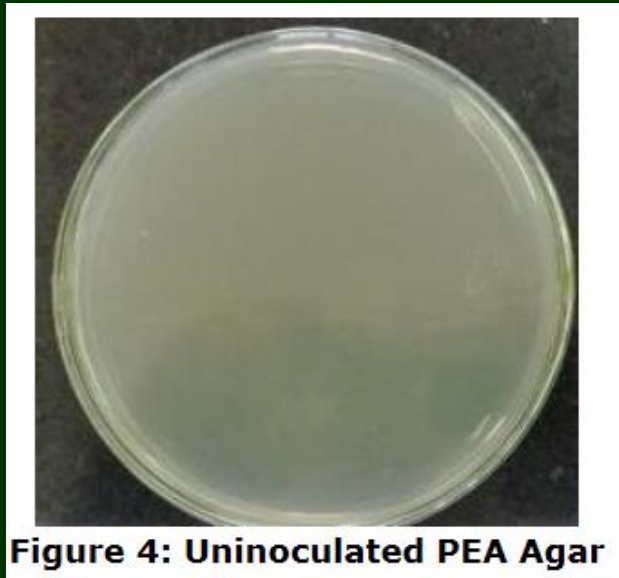
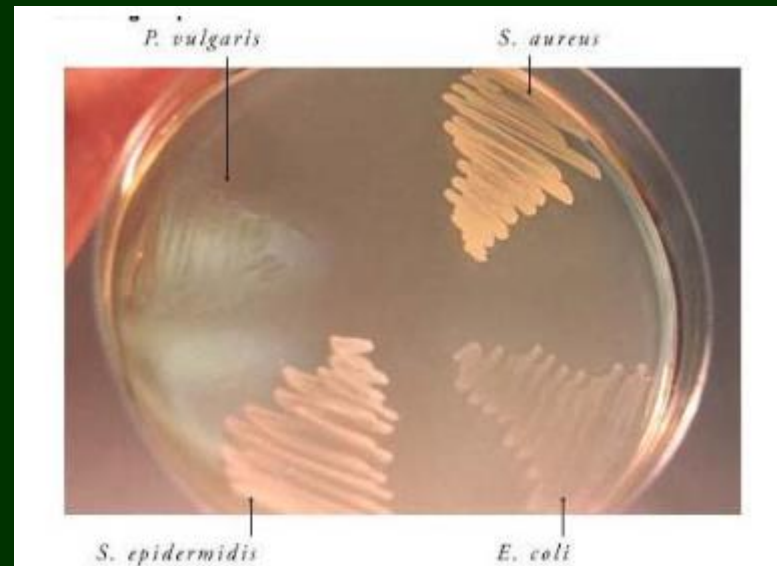


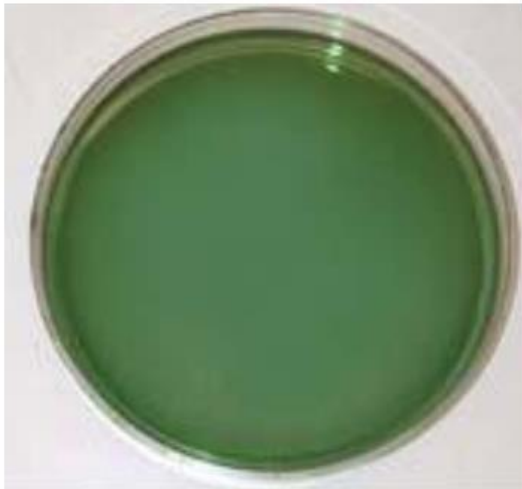
Figure 4: Uninoculated PEA Agar



PEA alters the membrane permeability, of Gram-negative bacteria allowing influx of otherwise blocked molecules. This results in leakage of large amounts of cellular potassium that ultimately results in disruption or inhibition of DNA synthesis of Gram-negative bacteria.

Hektoen Enteric Agar (HE)

- Hektoen Enteric (HE) Agar is a moderately selective medium used in qualitative procedures for the isolation and cultivation of **gram-negative enteric microorganisms**, especially *Shigella* and *Salmonella* from a variety of clinical and nonclinical specimens
- **Coliforms** capable of overcoming the moderately inhibitory qualities of the media will develop into **orange or salmon-pink colonies** in the presence of the bromthymol blue indicator. *Shigella* species develop into **green-colored colonies** with darker blue-green centers. *Salmonella* species appear as **blue-green colonies** with or without black centers. **Producers of H₂S** will form **black-centered colonies** in the presence of the ferric ammonium citrate indicator.



Shigella flexneri



Salmonella typhimurium

Figure 5: Uninoculated Hektoen Enteric Agar plate

HE

Je mírně selektivní médium pro izolaci a kultivaci G- enterálních bakterií hlavně pro Shigella a Salmonella

Obsahuje laktosu (nebo jiný cukr, který neutilizují shigely nebo salmonely), pepton (ten naopak utilizují shigely nebo salmonely), síran železito-amonný, bromthymolovou modř, kyselý fuchsin

Koliformní bakterie odolávající mírně inhibujícím vlastnostem média budou mít oranžové až růžové kolonie v přítomnosti bromtymolové modři (indikátor utilizace laktose). To proto, že utilizují sacharidy a vytvářejí kyselé prostředí

Shigella má zelené kolonie

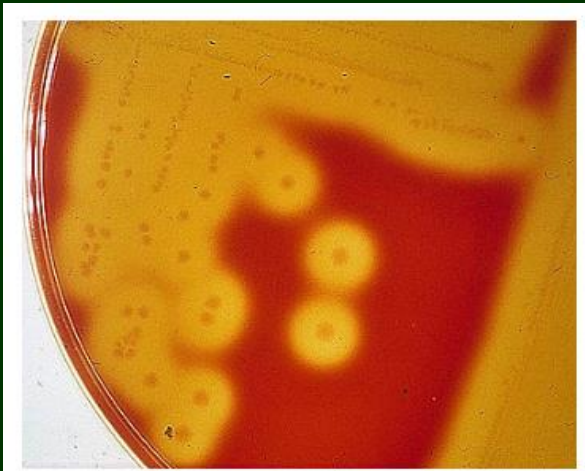
Salmonella má modro-zelené kolonie s tmavým středem.

Obojí neokyselují (naopak alkalizují médium, spotřebovávají pepton)

Bakterie produkující sirovodík mají kolonie s tmavým středem v přítomnosti síranu (citrátu) železito-amonného – precipitát barviv přítomnosti H₂S

Blood agar

- Blood agar is both **differential and enriched** medium. The blood that is incorporated into this medium is an enrichment ingredient for the cultivation of fastidious organisms such as the *Streptococcus* species.
- A number of streptococcal species produce substances that destroy red blood cells; that is, they cause lysis of the red cell wall with subsequent release of hemoglobin. Such substances are referred to as **hemolysins**. The activity of streptococcal hemolysins also known as streptolysins can be readily observed when the organisms are growing on a blood agar plate.



Streptococcus pyogenes
– beta hemolysis



Streptococcus pneumoniae
– alpha hemolysis



Streptococcus salivarius
– gamma hemolysis

Typy hemolýzy:

Alfa

Pokud je přítomna alfa hemolýza (α -hemolýza), je agar pod kolonií tmavý a nazelenalý. *Streptococcus pneumoniae* a skupina orálních streptokoků (*Streptococcus viridans* atd.) vykazují alfa hemolýzu. Toto se někdy nazývá zelená hemolýza kvůli změně barvy na agaru. Dalšími synonymními pojmy jsou neúplná hemolýza a částečná hemolýza. Alfa hemolýza je způsobena peroxidem vodíku produkovaným bakterií, který oxiduje hemoglobin a produkuje zelený oxidovaný derivát methemoglobin 3+ místo 2+.

Beta

Beta hemolýza (β -hemolýza), někdy nazývaná úplná hemolýza, je úplná lýza červených krvinek v médiích kolem a pod koloniemi: oblast se jeví zesvětlená (žlutá) a průhledná. Streptolysin, exotoxin, je enzym produkovaný bakteriemi, který způsobuje úplnou lýzu červených krvinek. Existují dva typy streptolysinu

Gama

Pokud organismus neindukuje hemolýzu, agar pod kolonií a kolem něj se nezmění a organismus se nazývá nehemolytický nebo se říká, že vykazuje gama hemolýzu (γ -hemolýza). *Enterococcus faecalis* (dříve nazývaný „skupina D Strep“), *Staphylococcus saprophyticus* a *Staphylococcus epidermidis* vykazují gama hemolýzu.

Chocolate agar

- Fastidious organisms such as *Haemophilus* and *Neisseria* require specially enriched culture media and microaerophilic incubation conditions. “Chocolate” agar is commonly used for primary isolation of *Haemophilus* from clinical specimens. This medium contains **hemoglobin** derived from bovine red blood cells as well as other enrichment growth factors. Chocolate agar may be made selective for *Haemophilus* species by the addition of bacitracin.
- Two special growth factors, called X and V, are required by some *Haemophilus* species. **The X factor is hemin**, a heat-stable derivative of hemoglobin. **The red blood cells in chocolate agar have been heated until they are lysed, producing the characteristic brown color of this medium.**



Figure 7 :Uninoculated Chocolate Agar Plate



Figure 22:*Haemophilus influenzae*

Čokoládový agar

Čokoládový agar je modifikace krevního agaru, vyrábí se přidáním krve do horkého agaru. Tepelnou lýzou se z krvinek uvolní některé růstové faktory jako hemin a NAD, proto je CHOC vhodný pro kultivačně náročné bakterie, jako jsou například rody *Haemophilus* či *Neisseria*.

Může být selektivní pro druhy rodu *Haemophilus* přidavkem bacitracinu. Narozdíl od KA na něm neprobíhá hemolýza.

Kultivace anaerobních bakterií

G- tyčky: Bacteroides, Prevotella, Fusobacterium, Porphyromonas

G- koky: Veillonella

G+ sporulující tyčky: Clostridium

G+ nesporulující tyčky: Actinomyces, Propionibacterium, Bifidobacterium, Eubacterium, Lactobacillus

G+ koky: Peptostreptococcus, Peptococcus

Striktní anaeroby: růst na pevných půdách do 0,5% kyslíku

„Umírněné“ anaeroby: do 2 až 8% kyslíku

Anaerobní kultivace: 10% CO₂, 80% N₂, 10% H₂

Použití anaerobního boxu nebo anaerostatu

Kultivace 48 h a více

Obohacený krevní agar (VL agar, Wilkins Chalgren agar, Schaedler anaerobní bujon),

Anaerobní hemokultury



Anaerobní box

Anaerostat



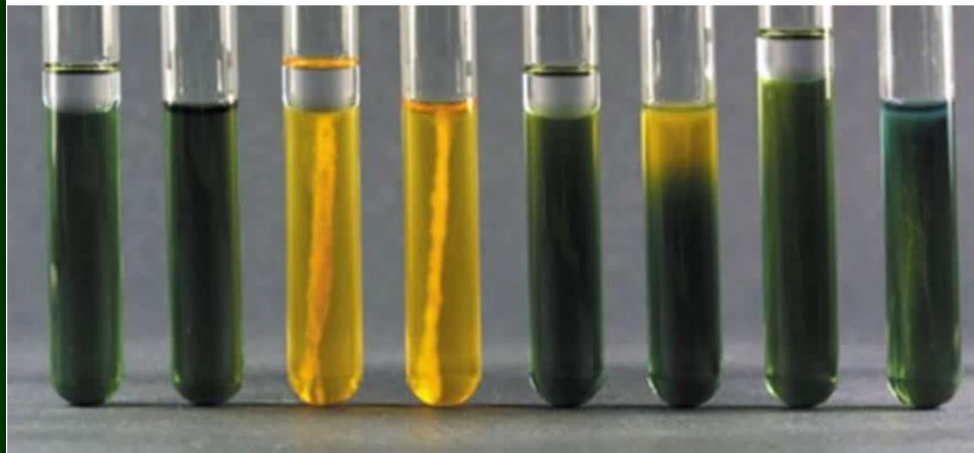
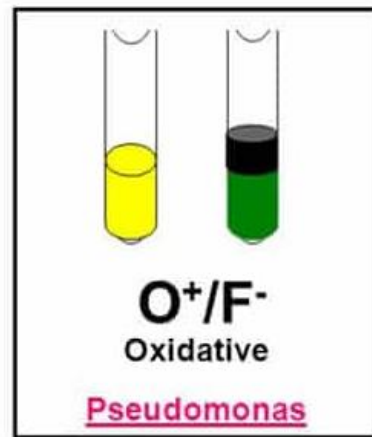
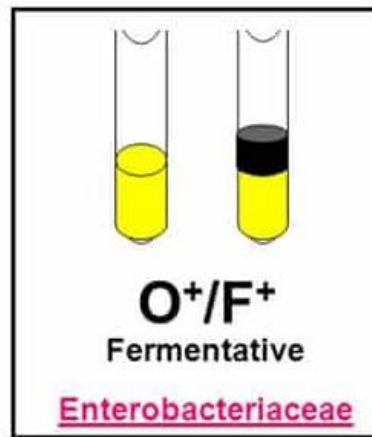
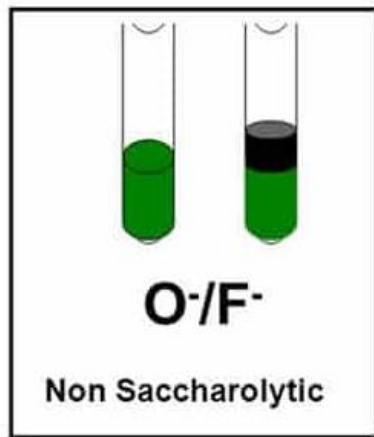
Biochemické identifikační testy

- Jako identifikační biochemické znaky slouží ty vlastnosti, které jsou snadno zjistitelné a poměrně stálé, tzn. že výskyt mutantů, které ztratily tuto vlastnost, je poměrně vzácný. Přesto se však tyto mutanty vyskytují a jejich procento stoupá v souvislosti se vzrůstajícím znečištěním ŽP.
- Proto se dnes přechází 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 zde výsledek kolísá i u buněk určitého kmene.
- **Pro průkaz biochemické aktivity bakterií byla vyvinuta celá řada různých biochemických identifikačních testů, kterými detekujeme přítomnost produktů či metabolitů vznikajících užitím sacharidů, bílkovin či dalších látek nebo přímo vybrané enzymy, specifické pro daný druh bakterií.**
- **Diagnostika pozitivní biochemické reakce je založena na změně barvy testovacího média, ke které dochází změnou příslušného indikátoru.**
- V dnešní době se nejčastěji využívají standardní komerční testy, a to ve formě diagnostických proužků (stripů) pro jednotlivé reakce (např. OXItest, VPtest, ONPtest) nebo diagnostických souprav určených pro diagnostiku zvolené skupiny bakterií (ENTEROtest, EN-COCCUStest, STAPHYtest, atd.).

Oxidačně-fermentační test

Princip: tvorba kyselin za aerobních podmínek růstu (indikátor **bromothymolová modř**)

Využití: *Micrococcus* (kyselina pouze aerobně) od *Staphylococcus* (kyselina anaerobně),
Pseudomonas (aerobně) od enterobakterií (anaerobně)



Control

E. coli

Pseudomonas

Alcaligenes

Hugh and Leifson's medium:

Peptone 2.0gm/L, Sodium chloride 5.0gm/L, Dipotassium phosphate 0.30gm/L, **Glucose (Dextrose)** 10.0gm/L, Bromothymol blue 0.030gm/L, Agar 3.0gm/L, Final pH (at 25°C) 7.1±0.2

Oxidačně fermentační test

Princip: tvorba kyselin za aerobních/anaerobních podmínek

Fermentace: anaerobní glykolýza, vznikají org. kyseliny, CO₂, etanol atd.

Oxidativní utilizace (aer. respirace): rozklad glukosy až na CO₂ a H₂O.

Indikátor: bromothymolová modř (okyselením se mění na žlutou)

Využití: Micrococcus (kyselina pouze aerobně) od Staphylococcus (kyselina anaerobně),

Pseudomonas (aerobně) od enterobakterií (anaerobně)

Používají se dvě zkumavky: jedna převrstvená minerálním olejem nebo parafinem (anaerobní prostředí), druhá otevřená (aerobní prostředí).

Utilizace tryptonu: - alkalická reakce: tmavě modrá/zelená barva

Utilizace glukosy: - produkce kyseliny: žlutá

Oxidativní utilizace (negativní fermentace) povede ke vzniku kyseliny (žlutá barva) pouze v otevřené zkumavce. Aerobní nefermentující druhy, např. Pseudomonas.

Fermentativní i oxidativní utilizace povede k produkci kyseliny (žlutá) v obou – otevřené i zavřené zkumavce. Fakultativně anaerobní mikroorganismy, např. E. coli.

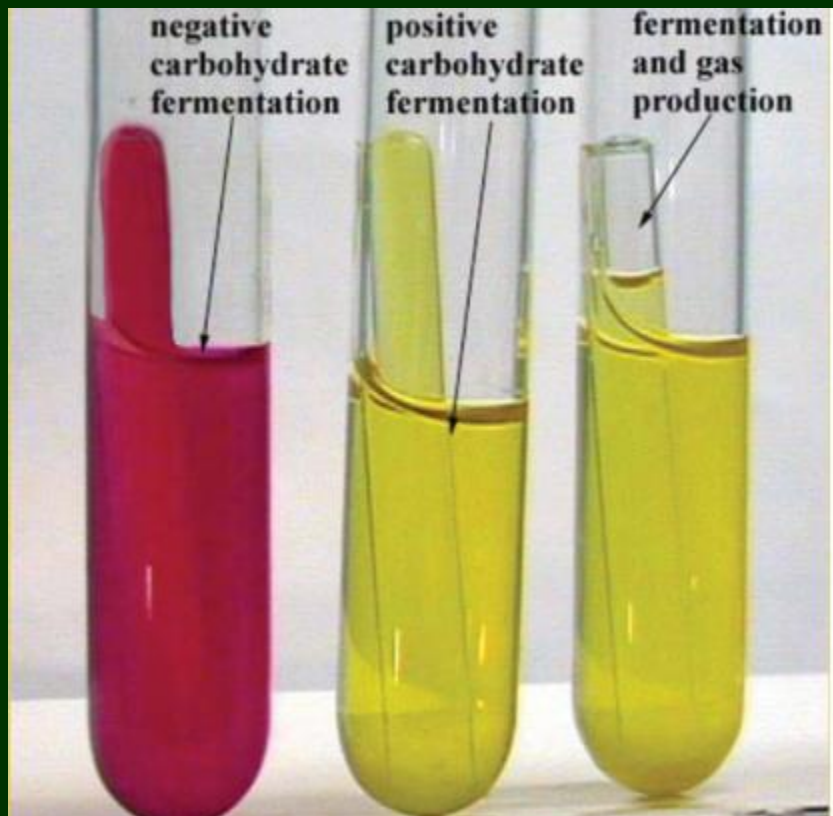
Fermentativní utilizace pouze v zavřené zkumavce: pravá fermentace (obligátní anaerobové)

Asacharolytické organismy (negativní oxidace i fermentace): žádná kyselá reakce

Fermentace cukrů

Tvorba kyseliny a/nebo plynu během fermentativního růstu na cukru (fenolová červeň, Durhamova zkumavka)

Rozlišení enerobakterií



Carbohydrate Fermentation Broth
trypticase, Sodium chloride, and Phenol red

Fermentační médium složeno ze zdroje uhlíku (glucose, sucrose, or cellulose) a pH indikátoru (fenolová červeň).

Při fermentaci vznikají organické kyseliny (Lactic acid, formic acid, or acetic acid) - změna pH na 6.8 a barvy indikátoru na žlutou.

Produkce plynu, jímání do Durhamovy zkumavky.

Bakterie využívající pepton produkují alkalické produkty – není změna barvy.

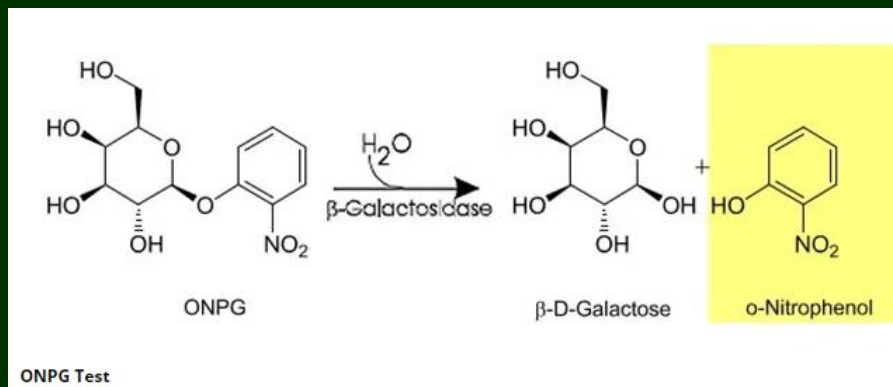
	Rozlišení nejdůležitějších bakterií						
	glukóza	laktóza	sacharóza	manitol	urea	sirovodík	indol
Escherichia Coli	+p	+	+,-	+	-	-	+
Citrobacter freundii	+p	+,-	-,+	+	-	+	-
Klebsiella pneumoniae	+p	+	+	+	+	-	-
Enterobacter aerogenes	+p	+	+	+	-	-	-
Proteus mirabilis	+p	-	v	-	+	+	-
Proteus vulgaris	+p	-	+	-	+	+	+
Morganella morganii	+p,+	-	-	-	+	-	+
Providentia rettregi	+p,+	-	v	+,-	+	-	+
Salmonella typhi	+	-	-	+	-	+	-
ostatní salmonely	+p	-	-	+	-	+	-
Shigella	+	-	-	+,-	-	-	+,-
Serratia	+p	-	+	+	v	-	-
Yersenia enterocolitica	+	-	+	+	+	-	-

- fermentace s tvorbou plynu...+p
- fermentace bez tvorby plynu...+
- negativní reakce...-
- rozličné výsledky...v

Beta-galakosidáza

Hydrolýza o-nitrofenyl-beta-galaktosidu za tvorby nitrofenolu (žlutý)

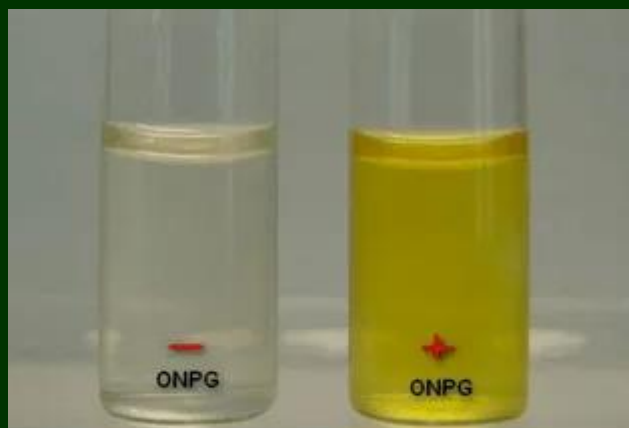
Citrobacter (+) od *Salmonella* (-), identifikace některých druhů *Shigella* a *Pseudomonas*



Medium: Sodium phosphate buffer,
1 M, pH 7.0

O-Nitrophenyl- β -D-
galactopyranoside (ONPG), 0.75 M
Physiologic saline

Toulene



Proteus vulgaris (Left): ONPG Negative
Escherichia coli (Right): ONPG Positive

O-Nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (ONPG) is structurally similar to lactose (i.e. ONPG is an analog of lactose), except that orthonitrophenyl has been substituted for glucose.

Lactose fermenter (ONPG Positive): *E.coli*, *Klebsiella spp*, *Enterobacter spp* produce **β -galactosidase**

Non lactose fermenter (ONPG Negative): *Salmonella spp*; *Shigella spp*; *Proteus spp*; *Providencia spp* and *Morganella spp* do not produce **β -galactosidase** so can not ferment lactose.

Podobné EMB půdě (Endo agaru)

Test na beta-galaktozidázu

Hydrolýza o-nitrofenyl-beta-galaktozidu za tvorby žlutého nitrofenolu

Tato látka je podobná lakose (analog lakosy).

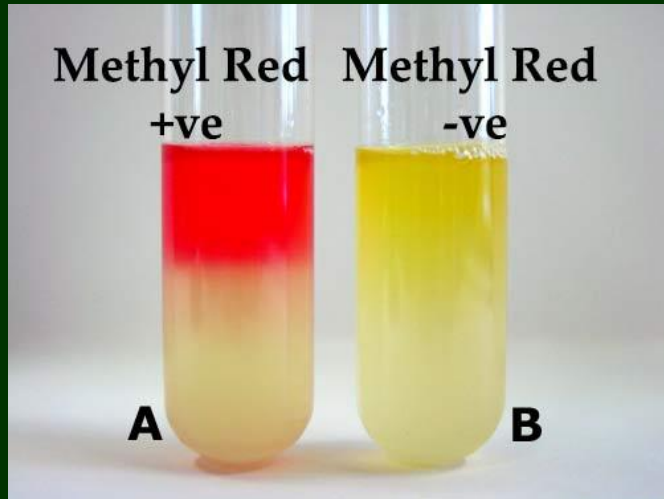
Odštěpení ortonitrofenylové skupiny beta-galaktosidásou

Test pro odlišení laktosa-fermentujících (lac+) a laktosa-nefermentujících (lac-) organismů

Podobné EMB půdě, Endo agaru.

Methylčerveňový test

Tvorba většího množství kyseliny z glukosy, pH klesá pod 4.3 (indikátor je **methylčerveň**)
Escherichia (+) od *Enterobacter* a *Klebsiella* (-)



MRVP broth (pH 6.9)

Ingredients per liter of deionized water:

buffered peptone= 7.0 gm

glucose= 5.0 gm

dipotassium phosphate= 5.0 gm

Some bacteria have the ability to utilize glucose and convert it to a stable acid like lactic acid, acetic acid or formic acid as the end product.

These bacteria initially metabolise **glucose to pyruvic acid**, which is further metabolized through the '**mixed acid pathway**' to produce the **stable acid**. The type of acid produced differs from species to species and depends on the specific enzymatic pathways present in the bacteria. The acid so produced decreases the pH to 4.5 or below, which is indicated by a change in the colour of methyl red from **yellow to red**.

Test využívající methylovou červeně

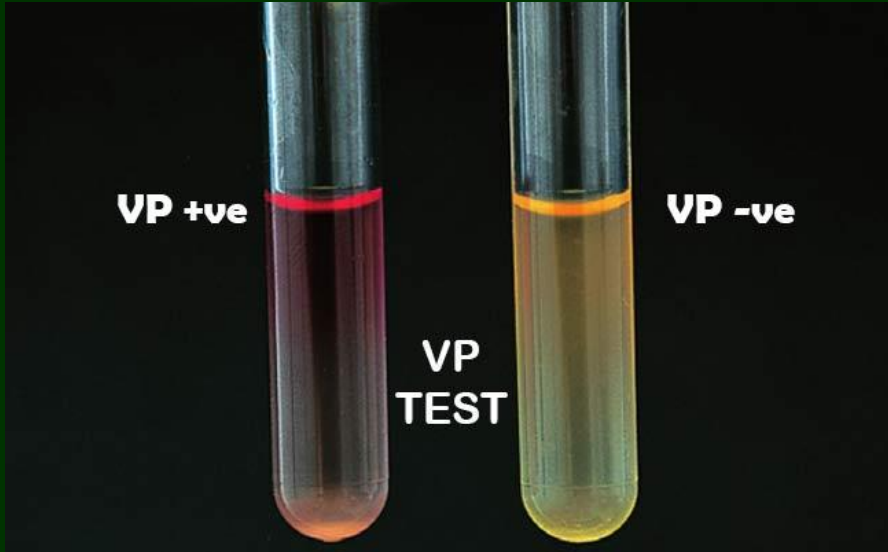
Tento test detekuje produkci velkého množství kyseliny při fermentaci glukosy, pH tu klesá až k 4.5, což mění barvu indikátoru (methylové červeně) ze žluté na červenou.

Tento test je analogií předchozího, opět podobné EMB půdě (Endo agaru)

Voges-Proskauer test

Tvorba acetoinu fermentací cukru

Klebsiella a *Enterobacter* (+) od *Escherichia* (-)



VP broth (pH 6.9)

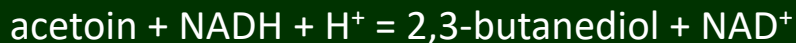
Ingredients per liter of deionized water:

buffered peptone= 7.0 gm

glucose= 5.0 gm

dipotassium phosphate= 5.0 gm

The Voges-Proskauer (VP) test is used to determine if an organism produces **acetylmethyl carbinol** from glucose fermentation. If present, **acetylmethyl carbinol** is converted to **diacetyl** in the presence of α - **naphthol**, strong alkali (**40% KOH**), and atmospheric oxygen. The α - **naphthol** was not part of the original procedure but was found to act as a color intensifier by Barritt and must be added first. The **diacetyl** and **guanidine**-containing compounds found in the **peptones** of the broth then condense to form a **pinkish red polymer**.



Voges-Proskauerův test

Tvorba acetoinu (ne acetonu!!!) fermentací cukru
je to komplementární test k předchozímu (vychází naopak).

Prokazuje produkci **acetylmethyl carbinolu** (acetoinu) při fermentaci glukosy. Jestliže k němu dochází, acetoin je konvertován na diacetylovou formu v přítomnosti alfa-naftolu (přídavek do média). Tento spolu s dalšími látkami v peptonu (součást média) pak **kondenzuje v růžovo červený polymer**.

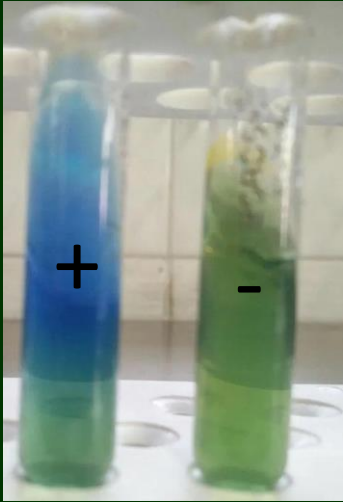
Positivní reakce: růžovo-červené barvivo na povrchu/hladině
Viridans group streptococci (kromě *Streptococcus vestibularis*), *Listeria*,
Enterobacter, *Klebsiella*, *Serratia marcescens*, *Hafnia alvei*, *Vibrio eltor*, *Vibrio alginolyticus*, etc.

Negativní reakce: nevytvoří se růžovo-červené barvivo
Streptococcus mitis, *Citrobacter* sp., *Shigella*, *Yersinia*, *Edwardsiella*, *Salmonella*,
Vibrio furnissii, *Vibrio fluvialis*, *Vibrio vulnificus*, and *Vibrio parahaemolyticus* etc.

Využití citrátu (Simmonsův test)

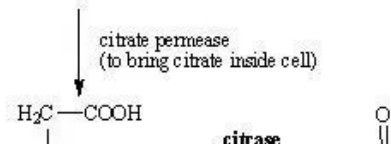
Využití citrátu jako jediného zdroje uhlíku, výsledkem je alkalizace média (bromthymolová modř)

Klebsiella – *Enterobacter* (+) od *Escherichia* (-)



Citrate = oxaloacetate + acetate

oxaloacetate = pyruvate + CO₂



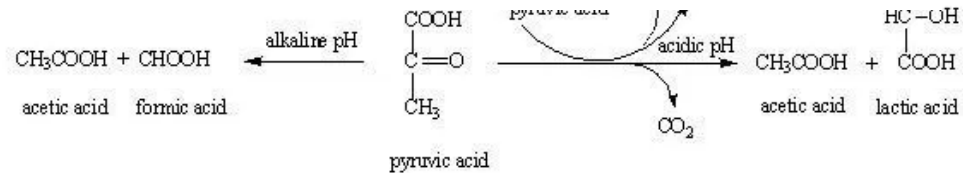
A. Under alkaline conditions, pyruvate is metabolized to acetate and formate.

pyruvate = acetate + formate

B. At pH 7.0 and below, lactate and acetoin are also produced.

pyruvate = acetate + lactate + CO₂

pyruvate = acetoin + CO₂



Citrate utilization test

Further metabolic breakdown is **dependent upon the pH of the medium.**

A. Under alkaline conditions, pyruvate is metabolized to acetate and formate.

pyruvate = acetate + formate

B. At pH 7.0 and below, lactate and acetoin are also produced.

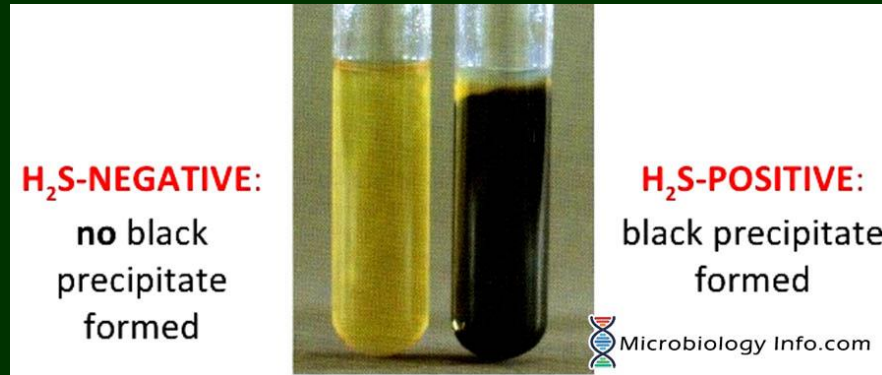
pyruvate = acetate + lactate + CO₂

pyruvate = acetoin + CO₂

Tvorba sirovodíku

Tvorba sirovodíku rozkladem aminokyselin obsahujících síru nebo redukcí thiosíranu, detekce tvorbou černého sulfidu železnatého

Identifikace *Salmonella*, *Proteus*



SIM Agar

Pancreatic digest of casein 20.0g, Peptic digest of animal tissue 6.1g, Agar 3.5g, Fe(NH₄)₂(SO₄)₂·6H₂O 0.2g, Na₂S₂O₃·5H₂O 0.2g, pH 7.3 ± 0.2 at 25°C

Organisms which produce the enzyme thiosulfate reductase can reduce sulfur to hydrogen sulfide gas. This happens when the strain either degrades the amino acid cysteine during protein degradation, or when anaerobic respiration shuttles the electrons to sulfur instead of to oxygen. In the SIM tubes, the medium contains casein and animal proteins as amino acid sources, sodium thiosulfate as a source of sulfur and ferrous ammonium sulfate as the H₂S indicator. Cysteine is a sulfur containing amino acid present in the SIM medium.

The enzymes cysteine desulfurase and thiosulfate reductase catalyze hydrolysis reactions that produce H₂S. This gas combines with the ferrous ammonium sulfate forming an insoluble, black ferrous sulfide precipitate. The black color thus acts as an indicator for the presence of hydrogen sulfide.

In the laboratory, a fresh culture of the organism is inoculated with a single stab using straight needle through the center of the medium. Following incubation, the tube is observed for H₂S production (blackening of the medium).

Tvorba sirovodíku

Některé mikroorganismy mají schopnost **redukovat** síru obsahující látky na H_2S . Mnohé metody používané k detekci sirovodíku produkovaného mikroorganismy se liší ve zdrojích síry a solí kovů používaných pro indikaci sirovodíku – vždy tedy používáme sloučeniny železa a síry pro detekci sirovodíku.

Sirovodík je produkován bakteriemi redukcí aminokyselin obsahujících síru – cisteinu, methioninu nebo redukcí anorganických látek obsahujících síru jako thiosulfáty, sulfáty, sulfidy během degradace proteinů nebo při anaerobní respiraci a přenosu e^- na síru místo na kyslík.

V tomto testu sirovodík (plyn) reaguje se sloučeninami železa a tvoří tmavý precipitát sulfidu železitého. Tmavá barva je indikátorem sirovodíku.

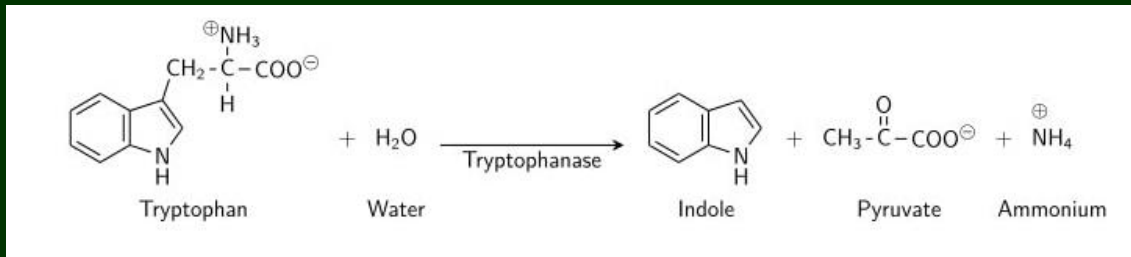
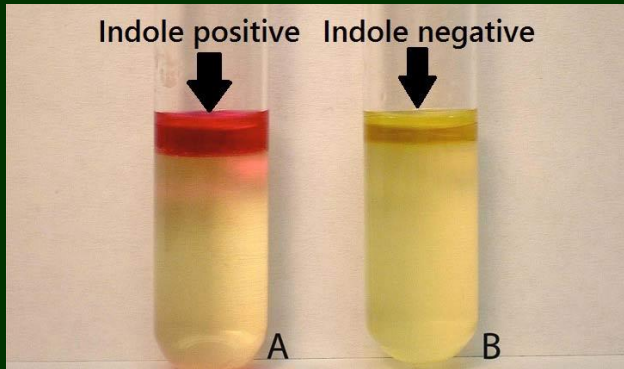
Používá se pro detekci sirovodíku produkujících bakterií: Salmonella, Proteus

Obdoba HE agaru

Indolový test

Přeměna tryptofanu na indol (detekce Kovaczovým činidlem)

Escherichia (+) od *Enterobacter*, *Salmonella* (-), *Preteus vulgaris* (+) od *P. mirabilis* (-)



Tryptophan is an amino acid that can undergo deamination and hydrolysis by bacteria that express tryptophanase enzyme. **Indole** is generated by reductive **deamination** from **tryptophan** via the intermediate molecule **indolepyruvic acid**. **Tryptophanase** catalyzes the deamination reaction, during which the **amine (-NH₂)** group of the **tryptophan** molecule is removed. Final products of the reaction are **indole**, **pyruvic acid**, **ammonium (NH₄⁺)** and **energy**. **Pyridoxal phosphate** is required as a coenzyme.

When **indole** is combined with **Kovac's Reagent** (which contains hydrochloric acid and p-dimethylaminobenzaldehyde in amyl alcohol) the solution turns from yellow to **cherry red**. Because amyl alcohol is not water soluble, the red coloration will form in an **oily layer at the top of the broth**.

Indolový test

Přeměna tryptofanu na indol (detekce Kovaczovým činidlem)

Kovaczovo činidlo: obsahuje HCl a p-dimethylaminobenzaldehyd v amylalkoholu

Escherichia (+) od *Enterobacter*, *Salmonella (-)*, *Preteus vulgaris (+)* od *P. mirabilis (-)*

Tryptofan je aminokyselina, která je deaminována a hydrolyzována bakteriemi exprimujícími **tryptofanázu**. Indol je tvořen reduktivní deaminací (odštěpením $-NH_2$) z tryptofanu přes meziproduct indolpyruvát. Produktem reakce je indol, pyruvát a amoniový kation. Jako kofaktor je využíván pyridoxal fosfát.

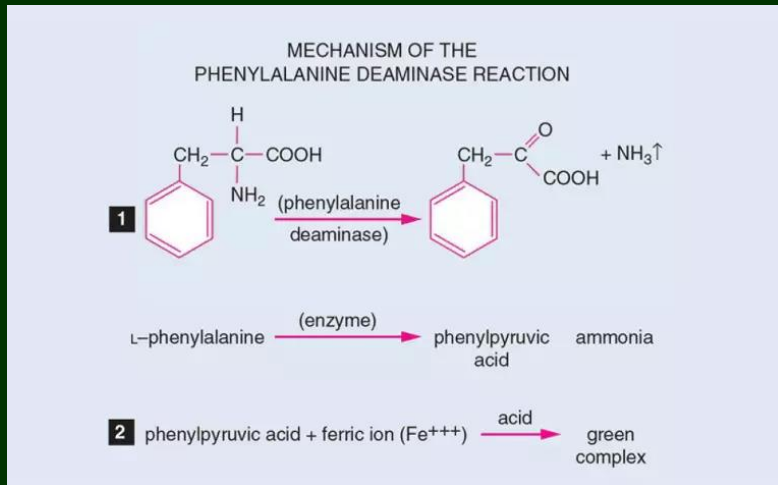
Když vzniká indol v prostředí Kovaczova činidla, roztok mění barvu ze žluté na třešňově červenou.

Protože amylalkohol v Kovaczově činidle není rozpustný ve vodě, změna barvy probíhá v olejové vrstvě na hladině média.

Fenylalanindeaminasa

Deaminace za tvorby fenylpyruvátu, který reaguje s Fe^{3+}
Charakterizace rodu *Proteus*

Phenylalanine deaminase test also known as phenylpyruvic acid (PPA) test is used to test the ability of an organism to produce enzyme deaminase. This enzyme removes the amine group from the amino acid phenylalanine and produces phenylpyruvic acid (PPA) and ammonia i.e. oxidative deamination of phenylalanine. Phenylpyruvic acid reacts with ferric iron (10% ferric chloride is added in the medium) producing a visible green color.



Results

- 1. Positive test:** Production of green colour (Phenylpyruvic acid thus formed reacts with ferric chloride producing a green colored compound thus turning the medium dark green). *Proteus sp.*, *Morganella sp.*, *Providencia sp* give positive PPA test.
- 2. Negative:** No colour change (medium remains straw/yellow color; no PPA to react with ferric chloride).



Test na fenylalanindeaminázu

Deaminace fenylalaninu za tvorby fenylpyruvátu, která reaguje s Fe^{3+}

Charakterizace rodu *Proteus*

Je to test na produkci enzymů deamináz.

Odnětí NH_2 skupiny z fenylalaninu za vzniku fenylpyruvátu a amonného kationtu, jedná se tedy o oxidativní deaminaci fenylalaninu.

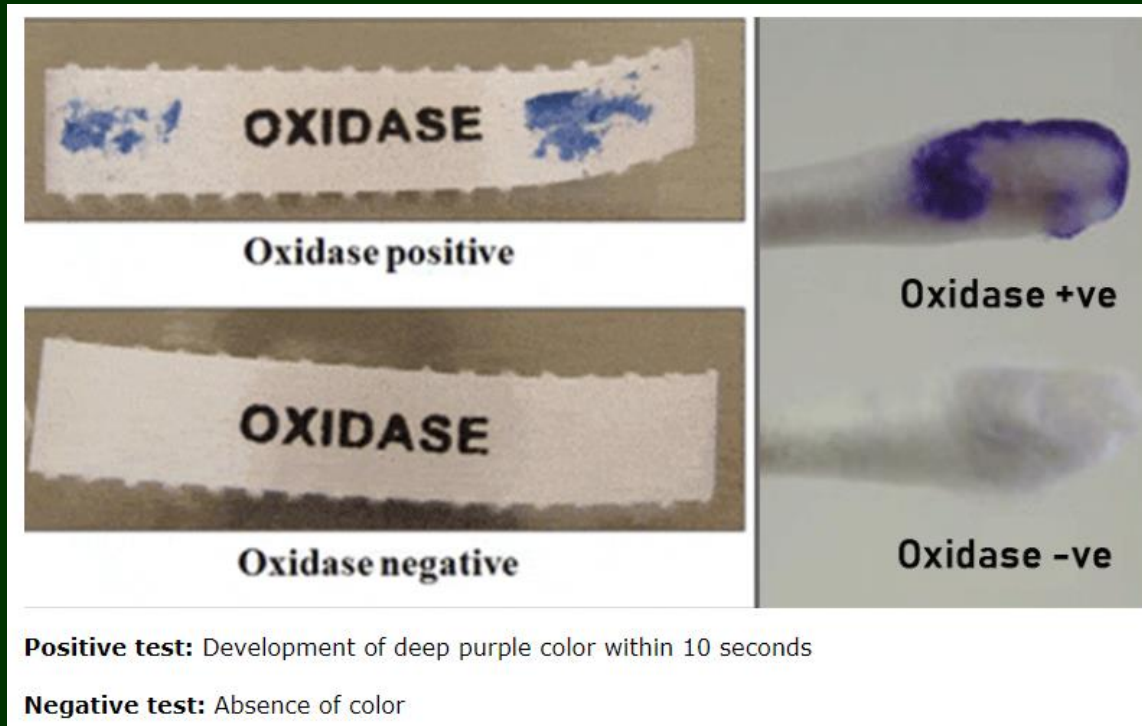
Pyruvát následně reaguje s Fe^{3+} ionty – přídavek 10% $FeCl_3$ do média), přičemž se tvoří zelené barvivo.

Pozitivně reaguje *Proteus* sp., *Morganella* sp., *Providencia* sp.

Oxidasový test

Oxidace alternativních akceptorů elektronů cytochromem c (přítomnost c oxidasy)

Pseudomonas (+) od *Enterobacteriaceae* (-)

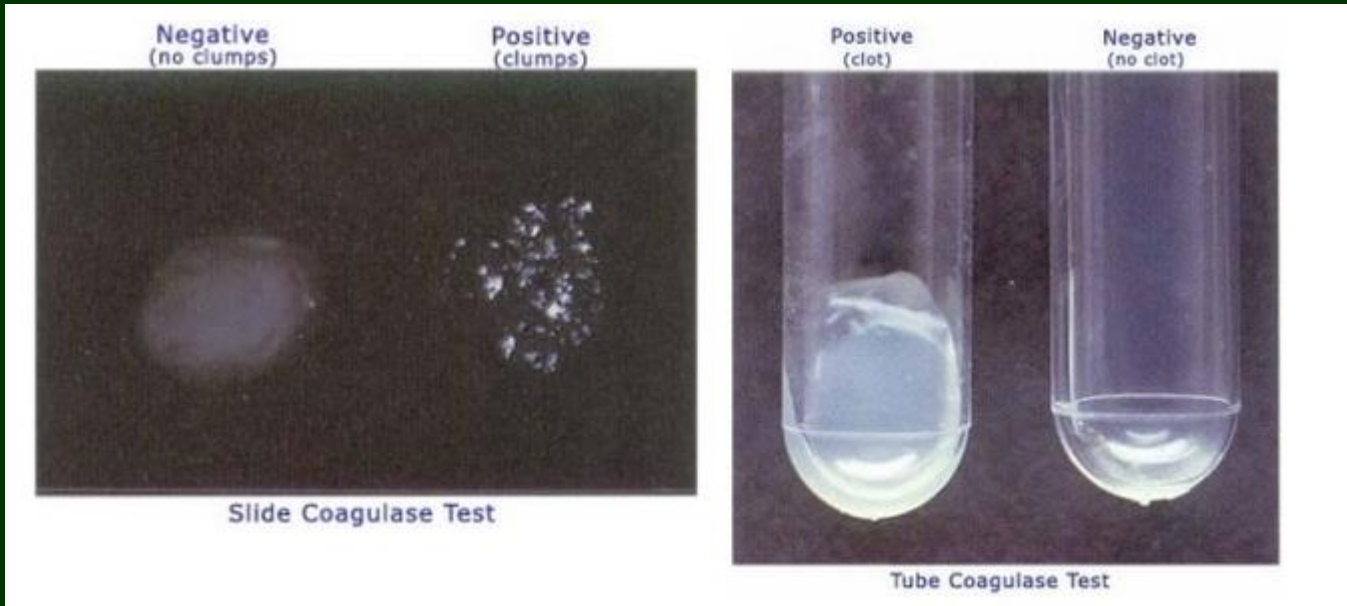


The oxidase test is designed for specifically detecting the presence of the terminal enzyme system in aerobic respiration called cytochrome C oxidase or cytochrome a₃. Cytochrome C oxidase is the terminal or last H₂ electron acceptor in aerobic respiratory mechanism which is composed of a number of enzymes which alternatively oxidize and reduce each other by donating or accepting electrons derived from H₂.

Koagulasa

Strážení krevní plasmy

S. aureus (+) od *S. epidermidis* (-)



Coagulase test is used to differentiate *Staphylococcus aureus* (positive) which produce the enzyme coagulase, from *S. epidermis* and *S. saprophyticus* (negative) which do not produce coagulase.

i.e Coagulase Negative *Staphylococcus* (CONS).

Principle of Coagulase Test

Coagulase is an enzyme-like protein and causes plasma to clot by converting fibrinogen to fibrin. *Staphylococcus aureus* produces two forms of coagulase: bound and free.

Test na koagulázu

Strážení krevní plasmy

S. aureus (+) od *S. epidermidis* (-)

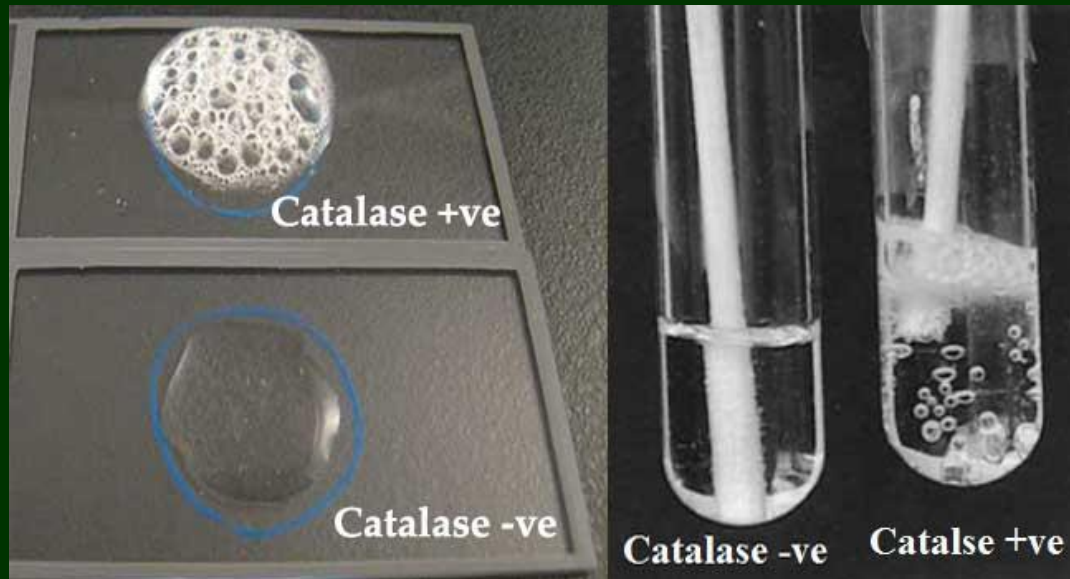
Slouží k rozlišení *S. aureus* (pozitivní, produkující koagulázu) od *S. epidermidis* a *S. saprophyticus* (negativní, neprodukující). Hovoříme pak o koaguláza pozitivních a negativních stafylokocích.

Koaguláza způsobuje srážení plasmy konverzí fibrinogenu na fibrin.

Produkce katalasy

Rozklad peroxidu vodíku katalasou

Bacillus (+) od *Clostridium* (-), *Streptococcus* (-) od *Micrococcus* a *Staphylococcus* (+)



The enzyme catalase mediates the breakdown of hydrogen peroxide into oxygen and water. The presence of the enzyme in a bacterial isolate is evident when a small inoculum is introduced into hydrogen peroxide, and the rapid elaboration of oxygen bubbles occurs. The lack of catalase is evident by a lack of or weak bubble production. The culture should not be more than 24 hours old.

Bacteria thereby protect themselves from the lethal effect of Hydrogen peroxide which is accumulated as an end product of aerobic carbohydrate metabolism.

Rozklad peroxidu vodíku katalasou

Bacillus (+) od *Clostridium (-)*, *Streptococcus (-)* od *Micrococcus* a *Staphylococcus (+)*

Kataláza rozkládá peroxid vodíku na kyslík a vodu. Rozklad je potřebný, protože peroxid vzniká jako toxický produkt při **aerobním** metabolismu cukrů.

Test probíhá tak, že přeneseme malé množství bakt. izolátu (kultury) do roztoku peroxidu vodíku, přičemž se začnou uvolňovat bubliny kyslíku. Nepřítomnost katalázy: pouze mírná nebo žádná produkce bublin.

Zkapalňování želatiny

Zkapalnění želatiny proteasami

Identifikace *Serratia*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Clostridium*

Hydrolyza škrobu

Detekce rozkladu pomocí jodu

Identifikace *Bacillus*

Ureasa

Štěpení močoviny na amoniak a CO₂ (alkalizace)

Klebsiella (+) od *Escherichia* (-), *Proteus* (+) od *Providencia* (-), identifikace *Helicobacter pylori* (+)

Lysin-, ornitin- a arginindekarboxylasa

Dekarboxylace aminokyselin za tvorby CO₂ a aminu (alkalizace média)

Enterobakterie

Redukce dusičnanů

Dusičnan jako alternativní akceptor elektronů, redukce na dusitan nebo dusík

Identifikace enterobakterií (obvykle +)

Využití standardizovaných testovacích systémů

- urychlení zpracování velkého množství identifikovaného materiálu a odstranění nesrovnalostí v určování (rozdíly v přípravě médií, provedení/hodnocení testů...), jsou vyráběny standardizované diagnostické soupravy.
 - reprezentativní soubory biochemických testů:
 1. používají mikrometody, šetří materiál, energie
 2. v jedné diagn. soupravě je 10 – 20 testů (i víc)
 3. testy jednoduché, snadno proveditelné
 4. přiložené diagnostické tabulky k urychlení interpretace výsledků
 5. dodávající firmy zaručují možnost konzultací sporných výsledků
 6. dlouhá skladovací lhůta
 - soupravy biochem. obsahují vysušená média v mikrotitračních deskách, do kterých se kapou suspenze test. bakterií.
 - soupravy (Lachema Brno):
 - ENTEROtest a ENTEROrapid (Enterobacteriaceae)
 - ANAEROtest (anaeroby)
 - STAPHYtest (stafylokoky a mikrokoky)
 - STREPTOtest (streptokoky a enterokoky)
 - NEFERMtest (G- nefermentující tyčky)
- Pro vyhodnocení: diferenční tabulky nebo vhodný software (např. TKW)

Pro vyhodnocení lze využít program TNW, který u vybraného výsledku vypočte identifikační skóre a T index. Identifikační skóre je míra výlučnosti identifikace, procento pravděpodobnosti, že kmen náleží právě k tomuto taxonu (druhu) a žádnému jinému: > 99 % je výborné odlišení; 96-99 % značí velmi dobré odlišení; 90-96 % kmen je odlišen a < 90 % značí neodlišený kmen. T index určuje typičnost identifikovaného kmene vzhledem k vypsánému taxonu. Čím vyšší T index, tím podobnější je daný kmen obecné charakteristice daného taxonu: > 75 typický kmen; 0,5-7,75 méně typický kmen; 0,25-0,5 netypický kmen; < 0,25 zcela netypický kmen. Pro atypický kmen program TNW doporučí další rozlišující testy, případně ukáže nestandardní výsledky.

Interpretace reakcí:

Sloupec	Test	Zkrat. testu	Reakce	
			pozitivní	negativní
1. řádek stripu (1., 4., 7., 10. řádek destičky)				
H	Ureáza	URE	červená, červenooranžová	žlutá, světle oranžová
G	Arginin	ARG	fialová, tmavěmodrá	zelená
F	Ornithin	ORN	modrá, modrozelená	žlutozelená, zelená
E	Lysin	LYS	modrá, modrozelená	žlutozelená, zelená
D	Sirovodík	H ₂ S	černá, tmavě šedá	bezbarvá, naředlá
C	Simmons citrát	SCI	modrá, modrozelená	žlutozelená, zelená
B	Malonát	MAL	modrá, modrozelená	žlutozelená, zelená
A	β - Galaktosidáza	ONP	žlutá, nažloutlá	bezbarvá
2. řádek stripu (2., 5., 8., 11. řádek destičky)				
H	Salicin	SAL	žlutá, žlutozelená	zelená
G	Sorbitol	SOR	žlutá, žlutozelená	zelená
F	Melibióza	MLB	žlutá, žlutozelená	zelená
E	Cellobióza	CEL	žlutá, žlutozelená	zelená
D	Laktóza	LAC	žlutá, žlutozelená	zelená
C	Trehalóza	TRE	žlutá, žlutozelená	zelená
B	Mannitol	MAN	žlutá, žlutozelená	zelená
A	β - Glukuronidáza	GLR	žlutá, nažloutlá	bezbarvá
3. řádek stripu (3., 6., 9., 12. řádek destičky)				
H	Dulcitol	DUL	žlutá, žlutozelená	zelená
G	Adonitol	ADO	žlutá, žlutozelená	zelená
F	Arabitol	ART	žlutá, žlutozelená	zelená
E	Sacharóza	SUC	žlutá, žlutozelená	zelená
D	Inositol	INO	žlutá, žlutozelená	zelená
C	Raffinóza	RAF	žlutá, žlutozelená	zelená
B	Esculin	ESL	černá, tmavě hnědá	bezbarvá, světle hnědá
A	β - Xylosidasa	bXY	žlutá, nažloutlá	bezbarvá

Identifikace	IND	H URE	G ARG	F ORN	E LYS	D H ₂ S	C SCI	B MAL	A ONP	H SAL	G SOR	F MLB	E CEL	D LAC	C TRE	B MAN	A GLR	H DUL	G ADO	F ART	E SUC	D INO	C RAF	B ESL	A bXY
<i>Aeromonas caviae</i>	+	-	+	-	(-)	-	d	-	+	(+)	(-)	-	(+)	d	+	+	d	-	-	-	+	-	-	(+)	d
<i>Aeromonas enteropelogenes</i>	+	-	+	-	+	-	d	-	(+)	-	-	(-)	+	d	(+)	(+)	d	-	-	-	-	-	-	-	d
<i>Aeromonas hydrophila</i>	+	-	(+)	-	d	-	d	-	+	d	d	-	d	d	+	+	d	-	-	(-)	+	-	-	(+)	d
<i>Aeromonas ichthiosmia</i>	+	-	+	-	d	-	(-)	-	(+)	-	-	(-)	d	-	(+)	(+)	d	-	-	-	+	-	-	-	d
<i>Aeromonas jandaei</i>	+	-	+	-	(+)	-	(+)	-	+	-	-	d	-	d	+	+	d	-	-	-	-	-	-	-	d
<i>Aeromonas schubertii</i>	-	-	d	-	(+)	-	d	-	(+)	-	-	-	-	-	+	-	d	-	-	-	-	-	-	-	d
<i>Aeromonas sobria</i>	+	-	+	-	d	-	d	-	+	(-)	(-)	-	d	d	+	+	d	-	-	-	+	-	-	(-)	d
<i>Aeromonas trota</i>	+	-	+	-	(+)	-	+	-	+	-	-	(-)	+	d	+	(+)	d	-	-	-	d	-	-	-	d
<i>Aeromonas veronii</i>	+	-	-	(+)	(+)	-	+	-	(+)	+	-	-	d	-	+	+	d	-	-	-	+	-	-	d	d
<i>Budvicia aquatica</i>	-	d	-	-	-	(+)	-	-	(+)	-	-	-	-	(+)	-	d	-	-	-	d	-	-	-	-	(-)
<i>Buttiauxella agrestis</i>	-	-	-	+	-	-	d	d	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	d
<i>Buttiauxella brennerae</i>	-	-	-	d	-	-	-	+	+	+	-	+	+	d	+	+	-	-	d	d	-	-	+	+	(-)
<i>Buttiauxella ferrugutiae</i>	-	-	-	(+)	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	(-)
<i>Buttiauxella gaviniae</i>	-	-	d	-	-	-	d	+	+	+	-	-	+	d	+	+	-	-	-	d	-	-	-	+	(-)
<i>Buttiauxella izardii</i>	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	d	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	d	+	(-)
<i>Buttiauxella noackiae</i>	d	-	d	-	d	-	d	(+)	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	(-)
<i>Buttiauxella warmboldiae</i>	-	-	-	-	-	-	d	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	d	-	+	(-)
<i>Cedecea davisae</i>	-	-	d	+	-	-	+	(+)	(+)	+	-	-	+	(-)	+	+	-	-	-	+	+	-	(-)	d	(-)
<i>Cedecea lapagei</i>	-	-	(+)	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	d	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	(-)
<i>Cedecea neteri</i>	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	d	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	(-)
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	(+)	(+)	(+)	(+)	-	-	+	-	(+)	d	+	(-)	+	d	+	+	-	-	-	-	(-)	-	-	(-)	d
<i>Citrobacter braakii</i>	d	d	d	(+)	-	d	d	-	(+)	-	+	(+)	d	(+)	+	+	-	d	-	-	(-)	-	(-)	-	-
<i>Citrobacter farmeri</i>	+	d	(+)	+	-	-	(-)	-	+	(-)	+	+	+	(-)	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-
<i>Citrobacter freundii</i>	d	d	d	-	-	d	(+)	(-)	(+)	-	+	+	d	d	+	+	-	(-)	-	-	(+)	-	d	-	-
<i>Citrobacter gillienii</i>	-	-	d	-	-	d	d	+	d	-	+	d	d	d	+	+	-	-	-	-	d	-	-	-	d
<i>Citrobacter koseri</i>	+	d	(+)	+	-	-	+	(+)	+	(-)	(+)	-	(+)	d	+	+	-	d	(+)	+	d	-	-	-	-
<i>Citrobacter murliniae</i>	+	d	d	-	-	d	(+)	-	+	d	+	d	+	d	+	+	-	+	-	-	d	-	d	-	d

Testy citlivosti na antibiotika

Disková difuzní metoda

Stanoví citlivost nebo resistenci podle toho, zda vyšetřovaná bakterie na agarové půdě vytvoří nebo nevytvoří přípustnou inhibiční zónu kolem disku s určitou koncentrací antibiotika po předepsané době inkubace

Půdy: Mueller Hinton agar (MHA) – nejpoužívanější, **nízký obsah antagonistů antibiotik**, MHA+5% ovčí krve – pro náročnější bakterie (pneumokoky, streptokoky, meningokoky)

Obohacené půdy pro některé náročnější bakterie – hemofily

Antibiotické disky:

Sestavy antibiotik podle vyšetřované bakterie (doporučené sestavy – NRL pro antibiotika)

Základní a rozšířené řady

Sestavy antibiotik podle klinického materiálu

Terapeutické disky, diagnostické disky

Disková difuzní metoda

Inkubace 18 -24 h při 36 °C

Aerobní, anaerobní, mikroaerofilní (5% CO₂) prostředí

Hodnocení inhibiční zóny – porovnání s hraničními hodnotami pro citlivé kmeny

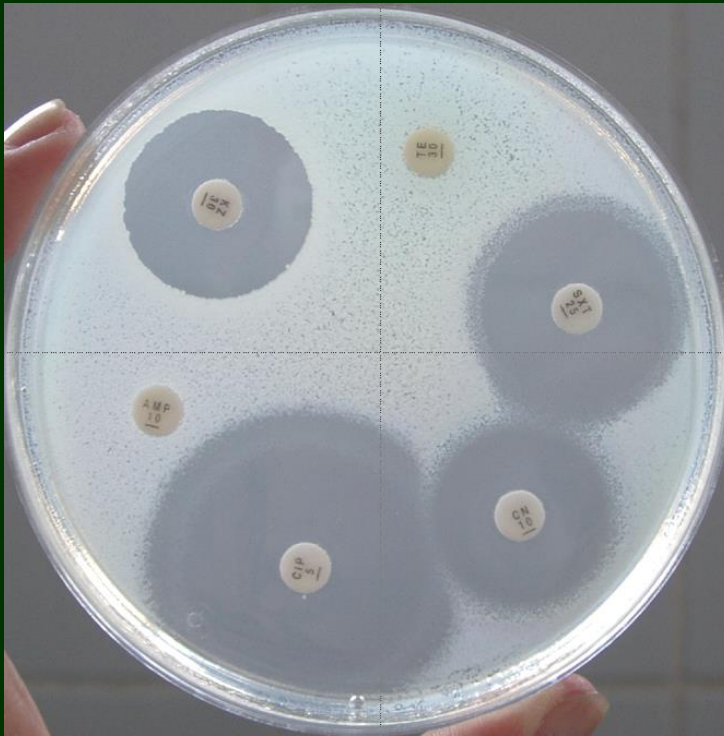
Kvalitativní i kvantitativní hodnocení

U některých kmenů nestačí, nutno vyšetřit MIC nebo MBC

MIC = minimální inhibiční koncentrace (nejnižší koncentrace antibiotika, která je schopna zastavit růst bakterie)

MBC = nejnižší koncentrace antibiotika schopna usmrtit bakterie (bakteriocidní)

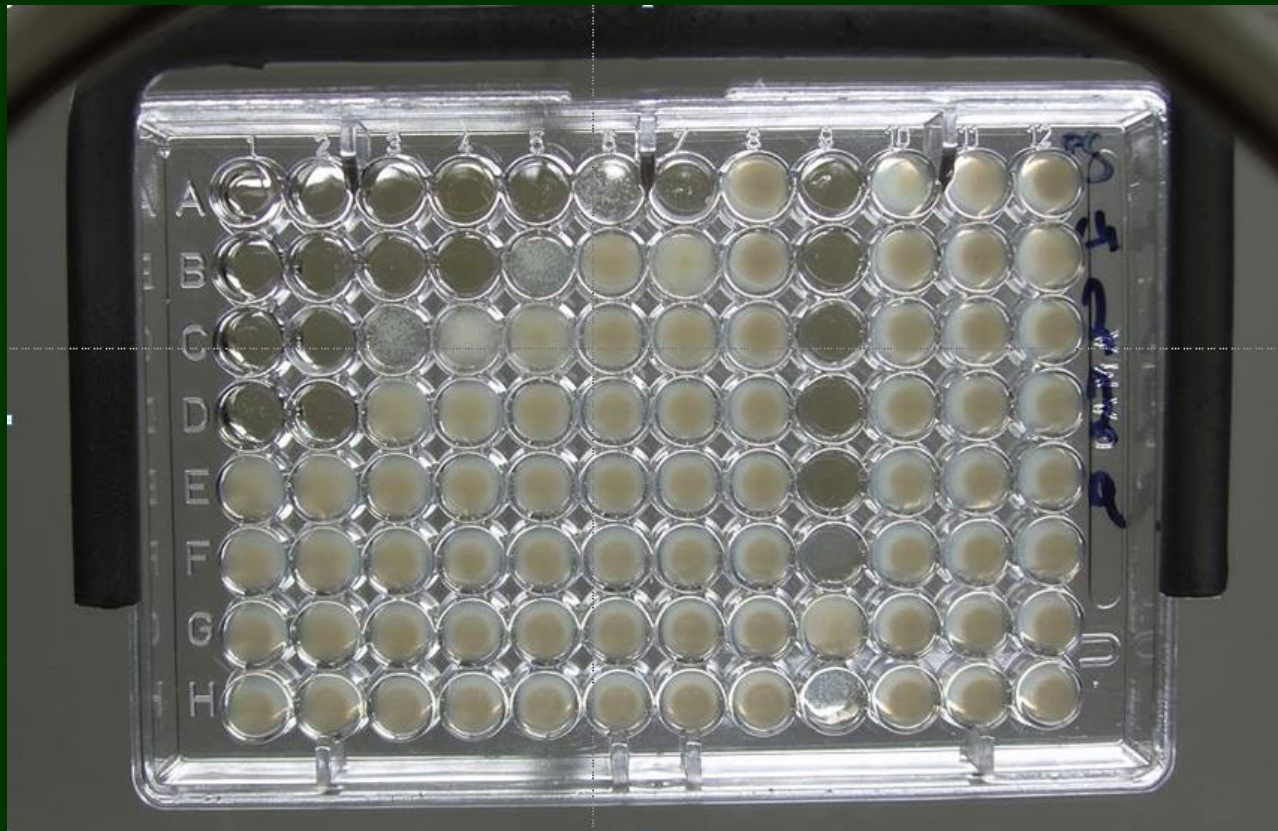
Disková difuzní metoda



Diluční mikrometoda

Hodnotí se MIC v jamkách mikrotitrační destičky, které obsahují zvolené koncentrace antibiotik v bujónu

MIC = první nezkalená jamka mikrotitrační destičky



E test (antimikrobiální gradientová metoda)

Plastový proužek napuštěný antibiotikem ve stoupající koncentraci MIC se odečítá v místě, kde inhibiční zóna protíná proužek



1. Sestava pro Gram negativní tyčinky

AMP	Ampicilin	COT	Kotrimoxazol
AIN	Amoxicilin / Kyselina klavulonová	AO	Kyselina oxolinová
CEC	Cefaclor	OFL	Ofloxacin
CRX	Cefuroxim	GEN	Gentamicin
TET	Tetracyklin		

2. Sestava pro Gram negativní tyčinky rozšířená

CMP	Chloramfenikol	IMI	Imipenem
CTZ	Ceftazidim	COL	Kolistin
CTX	Cefotaxim	AMI	Amikacin

3. Sestava pro nefermentující tyčinky

GEN	Gentamicin	COL	Kolistin
AMI	Amikacin	CTZ	Ceftazidim
CIP	Ciprofloxacin	IMI	Imipenem
COT	Kotrimoxazol	AMS	Ampicilin/sulbactam

4. Sestava pro hemofily

AMP	Ampicilin	CRX	Cefuroxim
AIN	Amoxicilin / Kyselina klavulonová	AZI	Azithromycin
TET	Tetracyklin	CMP	Chloramfenikol
COT	Kotrimoxazol		

5. Sestava pro branhamelly

AMP	Ampicilin	ERY	Erythromycin
AIN	Amoxicilin / Kyselina klavulonová	COT	Kotrimoxazol
CRX	Cefuroxim	TET	Tetracyklin

6. Sestava pro streptokoky

PNC	Penicilin	ERY	Erythromycin
AMP	Ampicilin	CLI	Klindamycin
TET	Tetracyklin	COT	Kotrimoxazol
CEC	Cefaclor		

7. Sestava pro enterokoky

AMP	Ampicilin	VAN	Vankomycin
TET	Tetracyklin	ERY	Erythromycin
GEN	Gentamicin	CMP	Chloramfenikol

Sestava je doplněna u případů možných urogenitálních infekcí: FUR, nitrofurantoin, CIP, ciprofloxacin

8. Sestava pro stafylokoky

OXA	Oxacilin	ERY	Erythromycin
FOX	Cefoxitin (pouze diagnostický disk)	CLI	Klindamycin
AIN	Amoxicilin / Kyselina klavulonová	COT	Kotrimoxazol
CEC	Cefaclor	VAN	Vankomycin
TET	Tetracyklin		

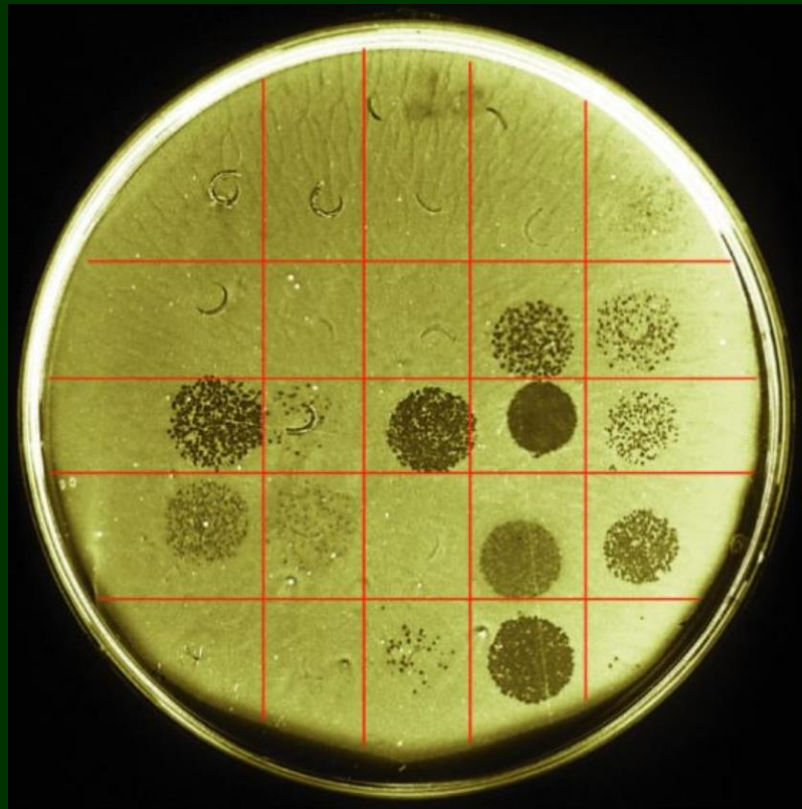
9. Sestava pro pneumokoky

PNC	Penicilin	CLI	Klindamycin
AMO	Amoxicilin	COT	Kotrimoxazol
CEC	Cefaclor	TET	Tetracyklin
ERY	Erythromycin		

Diagnostické metody založené na bakteriofágách

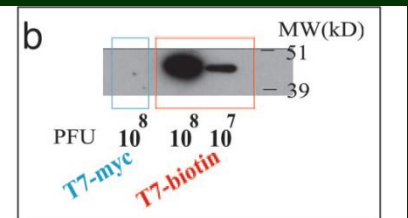
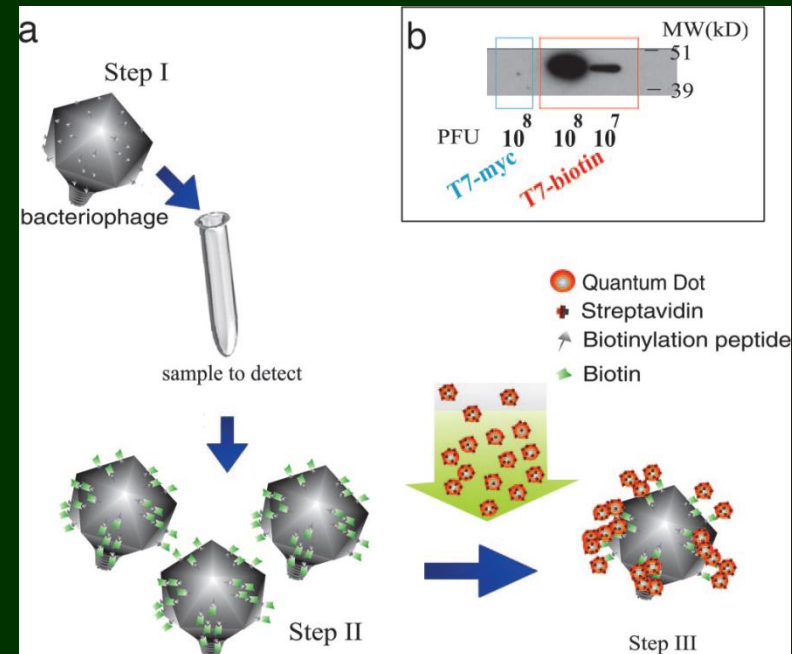
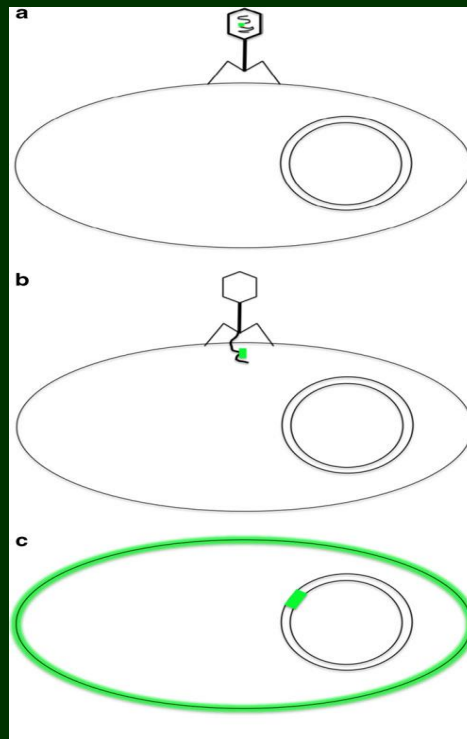
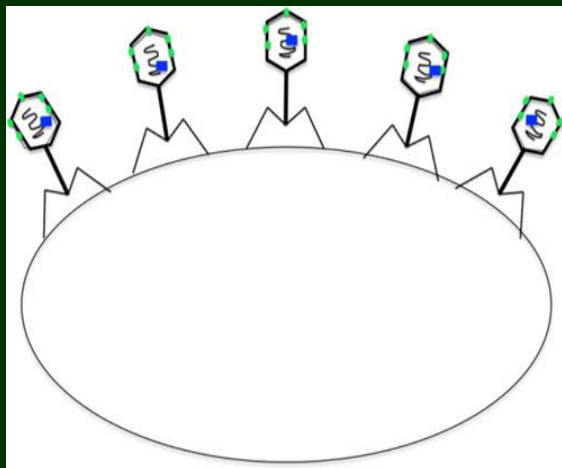
Fagotypizace

- typizace bakterií na základě citlivosti k různým bakteriofágům
- zařazení do tzv. fagotypu: skupina kmenů citlivých k určitému fágu/skupině fágů
- polyvalentní fág 812 a jeho mutanty v rozmezí hostitele (Staphylococcus)
- typizační sada pro koaguláza-negativní kmeny stafylokoků (fágy Ph- a U- série)



Detekční systémy založené na chemicky/geneticky upravených bakteriofágách

- **Bakteriofágy s fluorescenčně značenou DNA** (po adsorpci, injekci udílí buňce fluorescenční fenotyp)
- **Fluorescenčně značené fágové komponenty** (endolyzin, bičková vlákna, kapsidy)
- **Fágem integrované reportérské geny** (mění fenotyp infikované bakterie)
 1. kolorimetrické: lacZ gen – štěpení o-nitrofenyl-beta-galaktozidu na žlutý o-nitrofenol
 2. fluorescentní: gen pro GFP
 3. bioluminiscentní: luciferázové reportérské geny (bakteriální lux, světluškový luc)
- **Fágy s navázanými kvantovými tečkami** (quantum dots)



Co to jsou kvantové tečky (quantum dots, QDs)?

Jedná se o polovodičové částice o velikosti několika nm, které mají optické a elektronické vlastnosti odlišné od makroskopických částic z důvodu zákonů kvantové mechaniky. Při excitaci např. UV světlem přechází elektrony kvantové tečky z valenčního pásma na vodivostní pásmo. Excitovaný elektron se pak vrací zpět do valenčního pásma, přičemž uvolňuje energii vyzářením světla.

QDs se někdy označují jako umělé atomy, protože se vyznačují diskrétními elektronovými stavy a pásmy jako přirozené atomy nebo molekuly. Také elektronové vlnové funkce QDs připomínají vlnové funkce reálných atomů.

QDs mají vlastnosti na pomezí makroskopických polovodičových částic a diskrétních atomů nebo molekul. Jejich optoelektronické vlastnosti se mění jako funkce velikosti a tvaru. Větší QDs 5-6 nm emitují delší vlnové délky (oranžová – červená). Menší QDs 2-3 nm emitují kratší vlnové délky (modrá – zelená).

Fluorescenčně značené fágy pro monitoring přirozených populací mořských bakterií

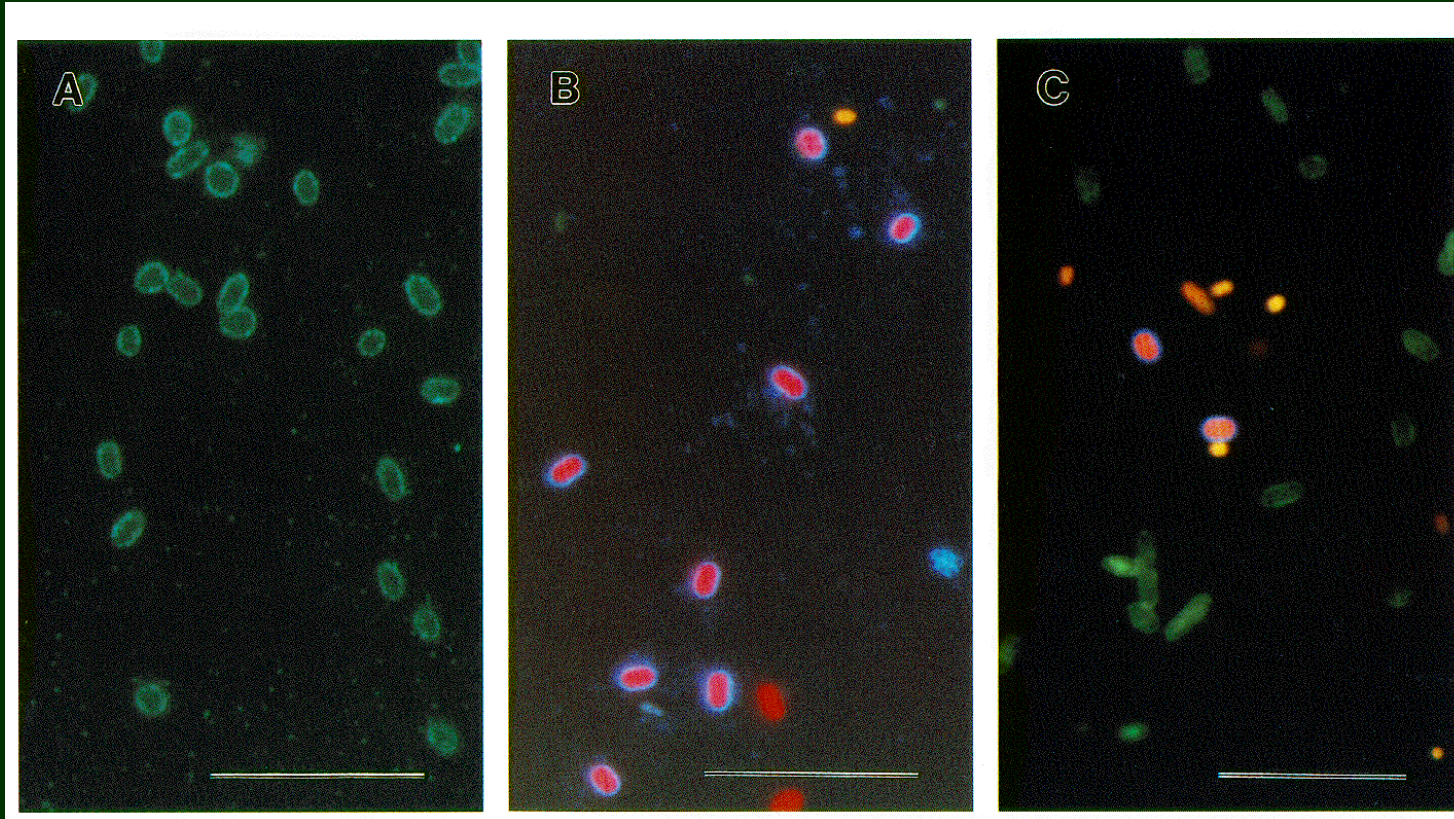
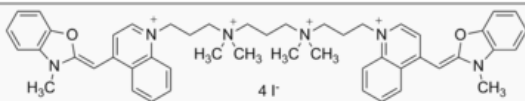


FIG. 1. Bacteria tagged with FLVPs. (A) Marine heterotrophic bacterial strain PWH3a tagged with phage isolate PWH3a-P1, which was fluorescently labeled with POPO-1 (blue fluorescence). (B) A natural marine bacterial community which includes cyanobacteria of the genus *Synechococcus* (red autofluorescence) as well as marine *Synechococcus* sp. isolate BBC1. *Synechococcus* isolate BBC1 has been tagged with the POPO-1-labeled cyanophage S-BIS1 (blue fluorescent halo). (C) A natural marine bacterial community to which *Synechococcus* sp. isolate BBC1 and a heterotrophic bacterium (isolate PWH3a) have been added. BBC1 has been tagged with the cyanophage S-BIS1 (blue fluorescent halo), and PWH3a has been tagged with phage isolate PWH3a-P1, which was fluorescently labeled with YOYO-1 (green fluorescence). The samples were viewed by epifluorescence microscopy with a blue (A) or violet (B and C) filter set, as described in the text. Pictures were taken at $\times 1,000$ magnification (10- to 30-s exposures; Kodachrome 400 film). Scale bars, 10 μm .

YOYO-1



Bakteriofágy s navázanými kvantovými tečkami pro vysoce citlivou detekci bakterií

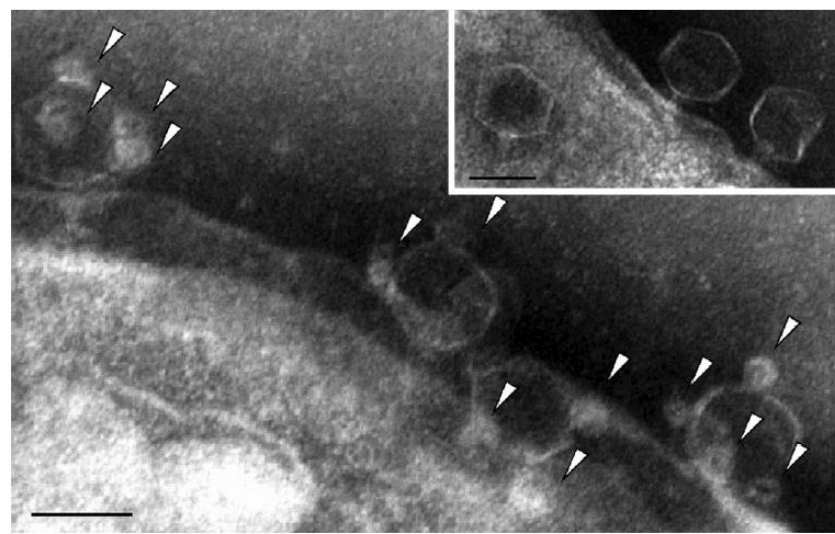


Fig. 2. T7-bio phage bound to streptavidin-functionalized QDs. TEM images of phage or phage–QD targeted bacteria are shown. The arrowheads point to QDs conjugated to the phage head. (*Inset*) Control T7-myc phage that are not biotinylated and therefore have no conjugated QDs. (Scale bars: 50 nm.)

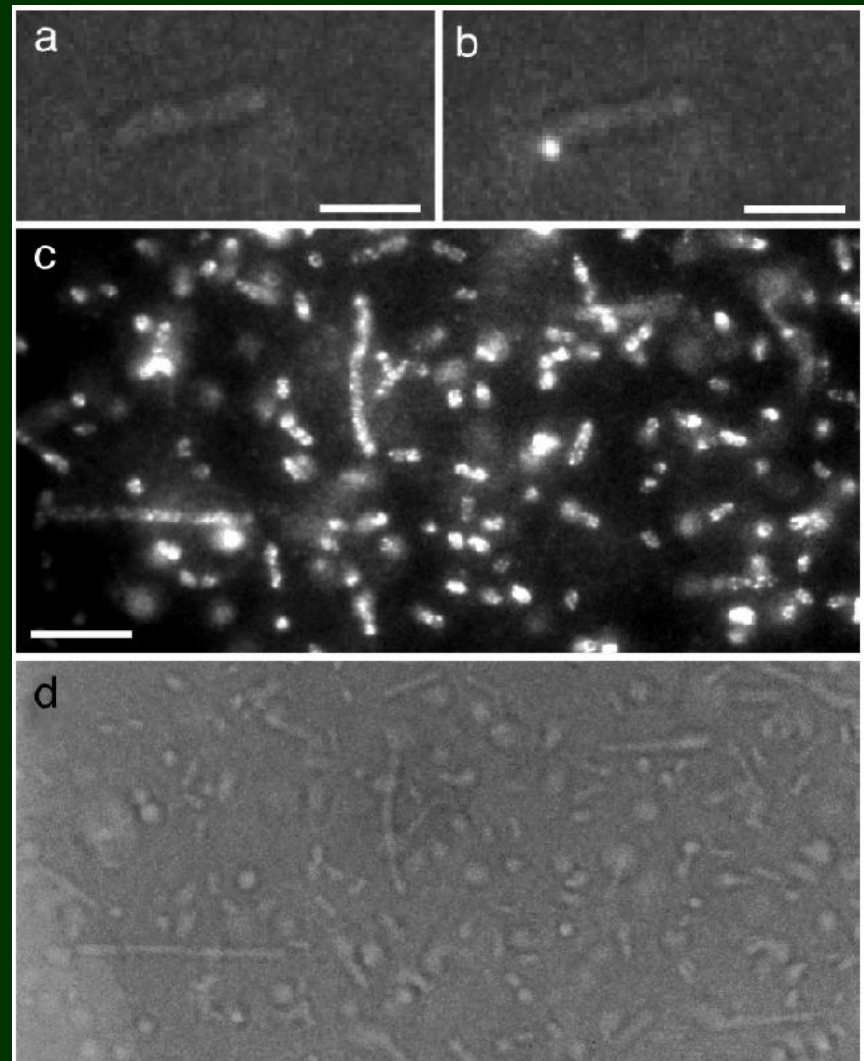


Fig. 4. Fluorescence microscope images of phage–QD complexes bound to cells. (*a* and *b*) A typical picture of *E. coli* cells exposed at low multiplicity to QD-tagged biotinylated phage. The field was simultaneously illuminated with a low-intensity white light source and a fluorescence excitation (447 ± 15 nm). The images are of two different quantized blinking states of a single QD: off (*a*) and on (*b*). (*c*) Fluorescence micrograph of cells with 100-fold excess of biotinylated phage. (*d*) Bright-field transmission micrograph of the same sample area obtained immediately after capturing the image in *c*. Note that some cells are immobilized on a substrate, but some are mobile in solution, resulting in out-of-focus fluorescence images when the focus is maintained on the cells on a substrate surface. [Scale bars: $1 \mu\text{m}$ (*a* and *b*) and $2 \mu\text{m}$ (*c* and *d*).]

Fluorescenčně značené fágy (P22) pro detekci bakteriálních druhů (Salmonella)

TABLE I. Properties of the nucleic acid stains.^{32,33}

Stain	λ_{Ex}	λ_{Em}	Enhancement factor ^a	Quantum yield	Binding properties ^b
DAPI	358	461	20	—	Semi-permeant; AT selective; binds to dsDNA
SYBR gold	300, 495	537	>1000	0.6–0.7	Permeant; binds to RNA, ssDNA, and dsDNA
Ethidium bromide	518	605	20–30	0.15	Impermeant; binds to RNA, ssRNA, sdDNA, trDNA
YOYO-1	491	509	100–1000	0.52	Impermeant; binds to ssDNA and dsDNA

^a Fluorescence enhancement of stain after binding to the nucleic acid.

^b ss = single stranded, ds = double stranded, ts = triple stranded; AT = adenine-thymine.

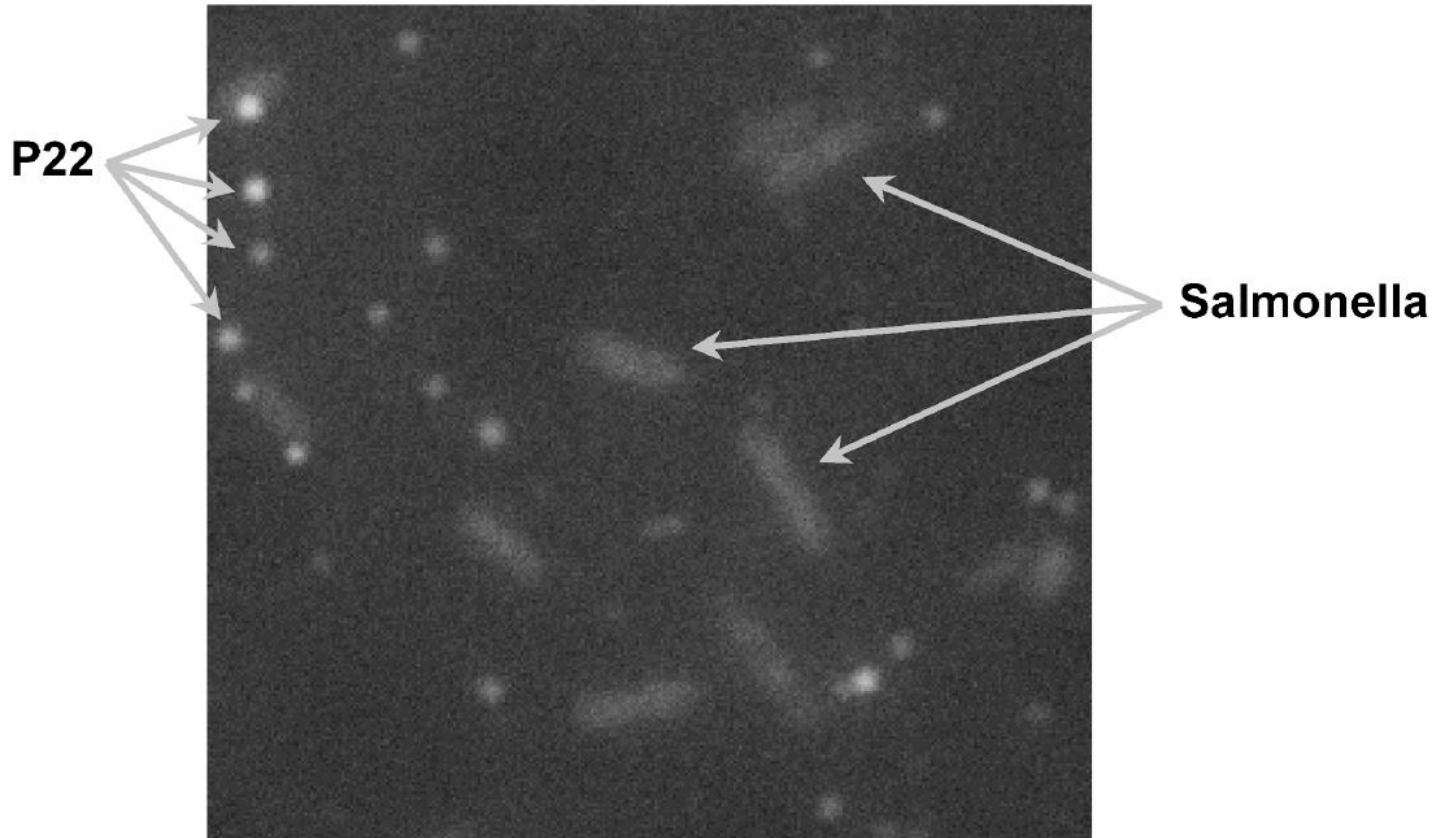


FIG. 2. SYBR gold image of *Salmonella typhimurium* LT2 (rod shapes) and phage P22 (bright spots). Magnification = 1000 \times .

Table 1 Phage-based assays for the detection of foodborne pathogens

Targeted pathogen	Phage (host range)	Sample matrix	Detection scheme	Detection limit	Response time
<i>Escherichia coli</i>	λ (broad)	Iceberg lettuce	Reporter gene (<i>lacI</i> and <i>lacR</i>)	1 CFU mL ⁻¹	10.3 h
	λ Charon 30 (broad)	Sterile milk	Reporter gene (<i>lacAB</i>)	10 cells mL ⁻¹	1.5 h
<i>E. coli</i> O157:H7	CSLO157 (narrow)	Ground beef	Phage-mediated cell lysis	<10 cells 25 g ⁻¹	10 h
	LG1 (broad)	Ground beef	Labeling of phage DNA (YOYO-1 fluorescent dye)	2 CFU g ⁻¹	6 h
	LG1 (broad)	Raw milk	Labeling of phage DNA (YOYO-1 fluorescent dye)	10 CFU mL ⁻¹	10 h
	LG1 (broad)	Ground beef	Phage amplification	2 CFU 25 g ⁻¹	23 h
	PP01 (narrow)	Apple juice	Reporter gene (<i>lacI</i> and <i>lacR</i>)	1 CFU mL ⁻¹	22 h
	PP01 (narrow)	Spinach rinsate	Reporter gene (<i>lacI</i> and <i>lacR</i>)	1 CFU mL ⁻¹	6 h
	T4 (broad)	Beef sirloin tip	Reporter gene (<i>lacZ</i> , colorimetric substrate)	10 ³ CFU 100 cm ⁻²	12 h
	T4 (broad)	Beef sirloin tip	Reporter gene (<i>lacZ</i> , luminescent substrate)	100 CFU 100 cm ⁻²	10 h
Enteric indicator bacteria	Cocktail of 3 phages, including λ Charon 30 (broad)	Swine carcasses and slaughterhouse surfaces	Reporter gene (<i>lacAB</i>)	10 cells cm ⁻² or g ⁻¹	5 h
<i>Listeria monocytogenes</i>	AS11 (broad)	Shrimp, milk, cottage cheese, cabbage, lettuce	Reporter gene (<i>lacAB</i>)	1 CFU g ⁻¹	20 h
	AS11 (broad)	Liverwurst, soft cheese	Reporter gene (<i>lacAB</i>)	10 CFU g ⁻¹	20 h
	AS11 (broad)	Hard cheese, ground meat	Reporter gene (<i>lacAB</i>)	1-10 CFU g ⁻¹	44 h
	AS11 (broad)	Chocolate pudding, Ricotta cheese	Reporter gene (<i>lacAB</i>)	0.1 CFU g ⁻¹	20 h
	CBD-118 (narrow)	Turkey breast and ground meat	Phage components (cell wall binding domains)	1 CFU g ⁻¹	6 h
	CBD-118 (narrow)	Salmon, cheese, iceberg lettuce, milk	Phage components (cell wall binding domains)	10 CFU g ⁻¹	6 h
	CBD-118 (narrow)	Raw milk	Phage components (cell wall binding domains)	10 ² CFU mL ⁻¹	50 h
	CBD-500 (narrow)	Soft cheese	Phage components (cell wall binding domains)	1 CFU g ⁻¹	6 h
	CBD-500 (narrow)	Iceberg lettuce, cheese, salmon, milk	Phage components (cell wall binding domains)	10 CFU g ⁻¹	6 h
	CBD-500 (narrow)	Turkey breast, ground meat	Phage components (cell wall binding domains)	100 CFU g ⁻¹	6 h
<i>Salmonella</i>	Felix-01	Milk	Phage amplification	<5 cells mL ⁻¹	24 h
	P22 (narrow)	Chicken breast	Phage amplification	10 ⁴ CFU g ⁻¹	3-4 h
	P22 (narrow)	Milk and eggs	Reporter gene (<i>inaW</i>)	10 cells mL ⁻¹	2 h
	SJ2 (narrow)	Milk powder, chicken rinses, ground beef	Phage amplification	3 CFU 25 g ⁻¹ or 25 mL ⁻¹	20 h

Využití značených bakteriofágů pro detekci patogenů v potravinách

Využití značených bakteriofágů pro detekci patogenů ve vodě

Table 2 Phage-based assays for the detection of pathogens in processed waters and wastewaters

Targeted pathogen	Phage (host range)	Sample matrix	Detection scheme	Detection limit	Response time	References
<i>E. coli</i>	IP008e-/2xGFP (narrow)	Sewage	Reporter gene (GFP)	NR	6 h	[17]
	IP052e-/2xGFP (narrow)	Sewage	Reporter gene (GFP)	NR	6 h	[17]
	T4 (broad)	Canal water	Labeling of phage DNA (DAPI fluorescent dye)	NR	30 min	[8, 113]
	T4 (broad)	Mineral water	Biosensor (electrochemical impedance sensing)	10^4 CFU mL ⁻¹	1 h	[81, 113]
	T4e- (narrow)	Sewage	Reporter gene (GFP)	NR	1 h	[16, 79]
<i>E. coli</i> O157:H7	PhiX174 (broad)	River water	Phage-mediated cell lysis	6×10^5 CFU mL ⁻¹	2 h	[80, 114]
	PP01 (narrow)	Tap water	Reporter gene (<i>luxI</i> and <i>luxR</i>)	1 CFU mL ⁻¹	12.5 h	[63]
<i>Micrococcus phosphovorius</i>	ΦMP1 (narrow)	Activated sludge	Labeling of phage DNA (SYBR Green fluorescent dye)	$\sim 10^2$ cells mL ⁻¹	25 min	[82]
	ΦMP2 (narrow)	Activated sludge	Labeling of phage DNA (SYBR Green fluorescent dye)	$\sim 10^2$ cells mL ⁻¹	25 min	[82]
<i>Bacillus anthracis</i>	JRB7 (narrow)	Distilled water	Phage-display biosensor (magnetoelastic)	10^3 CFU mL ⁻¹	20 min	[83]
	JRB7 (narrow)	Distilled water	Phage immobilization	10^4 spores mL ⁻¹	1 h	[85]
<i>B. anthracis</i> and <i>Salmonella</i> Typhimurium (simultaneous detection)	JRB7 (for <i>B. anthracis</i>) and E2 (for <i>Salmonella</i> Typhimurium) (narrow)	Distilled water	Phage-display biosensor (magnetoelastic)	5×10^3 CFU mL ⁻¹	~ 1 min	[84]

Využití značených bakteriofágů pro diagnostiku bakterií v klinických vzorcích

Table 3 Phage-based assays for epidemiological and clinical diagnostics

Targeted pathogen	Phage (host range)	Sample matrix	Method	Detection limit	Response time
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	phAE142	Sputum	Reporter gene (<i>luc</i>)	10^3 CFU mL ⁻¹	1-2 weeks
	D29 (FASTPlaque™) (narrow)	Sputum	Phage amplification	100-300 cells mL ⁻¹	48 h
	D29 (FASTPlaque-Response™) (narrow)	Sputum	Phage amplification	Antibiotic resistance profiling	48 h
<i>Yersinia pestis</i>	Proprietary (KeyPath™)	Blood	Phage amplification	Antibiotic resistance profiling	5.5 h
	ΦA1122	Blood	Phage amplification	10^6 CFU mL ⁻¹	5 h
	ΦA1122	Serum	Reporter gene (<i>luxAB</i>)	10^6 CFU mL ⁻¹	<30 min
<i>Staphylococcus aureus</i>	Proprietary	Blood	Phage amplification	10 CFU mL ⁻¹	5.5 h
	Phage-displayed peptide	Blood	Phage display and quantum dots	10^3 CFU mL ⁻¹	NR
<i>E. coli</i>	λ Charon 30	Urine	Reporter gene (<i>lux</i>)	10-100 cells mL ⁻¹	1 h