

Všeobecná mikrobiológia – praktické cvičenie 10.

Testy na skúmanie biochemických a metabolických aktivít baktérií

Cieľ – konečná identifikácia baktérie

Spôsob - subkultiváciou primárnej izolácie na sérii testovacích diagnostických médií

Tekuté pôdy s cukrom a indikátorom, tuhé pôdy s cukrom a indikátorom, tuhé pôdy s indikátorom a priloženým diskom so substrátom(cukrom), mikrometódy – tekuté pôdy s cukrom a indikátorom v mikroplatničke

Algoritmus – súbor najvhodnejších postupov

Téma : Biochemické vlastnosti mikroorganizmov – identifikácia baktérií

1. Demonstrácia najčastejšie sledovaných biochemických vlastností na Endovej pôde, DC agare a na pôde s manitolom: *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella typhi*, *Shigella dysenteriae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*.

Endova pôda:

DC agar:

Manit slaný:

Enterobaktérie dobre rastú na neselektívnych pôdach. Selektívne a diagnostické médiá sa používajú na diferenciálnu diagnostiku v rámci druhu aj rodu (Endova pôda, Deoxycholát-citrátový agar, Hajnova pôda, enterotesty – súbor biochemický testov).

Endova pôda je selektívna pôda pre enterobaktérie. Selektivita agaru je vytvorená kombináciou siričitanu a bázického fuchsínu, ktoré potláčajú rast grampozitívnych mikroorganizmov. Koliformné baktérie skvasujúce laktózu tvoria na Endovej pôde ružovo-červené až silno červené vypuklé kolónie, v niektorých prípadoch s kovovým leskom (*E. coli*). Rovnako sa sfarbuje médium okolo kolónií. Mikroorganizmy, ktoré laktózu nefermentujú sú bezfarebné, dobre pozorovateľné oproti ružovému pozadiu pôdy.

Deoxycholát-citrátový agar (DCagar) slúži na izoláciu patogénnych črevných enterobaktérií a vzájomné rozlišovanie salmonel a šigel. Selektivita je dosiahnutá pridaním deoxycholanu sodného a citronanov, ktoré inhibujú rast grampozitívnych baktérií. Enterobaktérie sú diferencované na základe skvasovania laktózy v pôde. Tvorba kyseliny je indikovaná neutrálnou červeňou a vznikom červeno sfarbených kolónií. Niektoré kmene salmonel a proteusov (H₂S pozitívne) tvoria na tejto pôde šedé až čierne stredy – pozitívna tvorba sírovodíka. Rast *E. coli* je na tejto pôde čiastočne potlačený, ale niektoré vitálnejšie kmene môžu rásť ako sýtoružové až červené kolónie.

Odlíšenie *S.aureus* a *S.epidermidis* - podľa makroskopického vzhľadu kolónií na krvnom agare

Stafylokoky dobre rastú na krvnom agare. Kolónie sú dobre viditeľné po 24 hodinách kultivácie.

S. aureus vytvára obvykle vypuklé žlté kolónie (niekedy môžu byť šedo pigmentované) mazľavej konzistencie, obklopené širokou zónou β -hemolýzy. Hemolýza na krvnom agare vzniká ako dôsledok produkcie cytotoxínov, najmä alfa toxínu. *S. epidermidis* rastie v bielych kolóniách, bez viditeľnej hemolýzy.

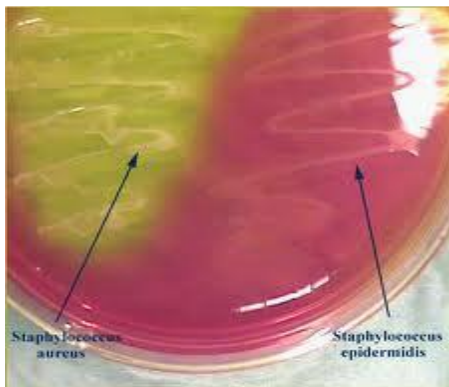


Manit – slaný agar (MSA) - Odlíšenie *S.aureus* a *S.epidermidis* podľa biochemických vlastností

S. aureus a *S. epidermidis* je možné odlíšiť na základe fermentácie manitolu. Na tento dôkaz sa používa pôda manit - slaný agar (MSA). MSA je selektívne diagnostická pôda, ktorá obsahuje vysokú koncentráciu NaCl (7,5% - 10%), manitol a fenolovú červenú ako indikátor zmeny pH pôdy. Zvýšená koncentrácia soli inhibuje rast iných mikroorganizmov, zatiaľ čo stafylokoky takúto koncentráciu soli tolerujú a dobre rastú. Hoci obidva, *Staphylococcus epidermidis* aj *Staphylococcus aureus* tolerujú vysoké koncentrácie soli v MSA a sú schopné rásť, len *S. aureus* fermentuje manitol, čo spôsobí pokles pH kultivačného média (pH sterilnej pôdy je 7.4). Fenolová červená je višňovočervená pri pH 8,5; žltočervená v rozmedzí 6,9 až 8,5; a jasno žltá pri pH 6,9 a nižšom.

Ak dôjde k fermentácii manitolu, zmení sa farba pôdy z červenej na žltú – *S. aureus*.

Ak mikroorganizmus nefermentuje manitol, farba pôdy ostáva červená – *S. epidermidis*.



3. Demonštrácia očkovania tuhých a tekutých pôd na dôkaz biochemických vlastností.

Hajnova pôda:



Hajnova pôda je šikmo naliata, tuhá pôda červenej farby, určená na stanovenie niektorých biochemických vlastností enterobaktérií. Pôdu očkujeme kľučkou, naočkujeme vždy iba jednu izolovanú kolóniu. Obsahuje cukry, soli železa a farebný indikátor (fenolová červeň). Pri skvasovaní cukrov dôjde k poklesu pH a k zmene farby pôdy z červenej na žltú, baktérie tvoriace sírovodík spôsobia čierne zafarbenie dolnej časti pôdy. Baktérie, ktoré tvoria plyn, spôsobia trhliny v pôde, prípadne dôjde k vytlačeniu celej pôdy nahor.

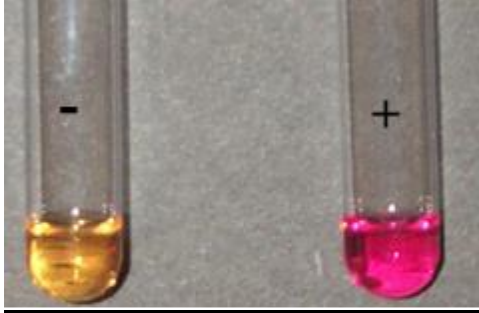
Tvorba Indolu



Indol vzniká z tryptofánu, ktorý je súčasťou Hottingerovho bujónu. Vyšetrovaná kultúra sa naočkuje do diagnostickej pôdy, po inkubácii sa pridá Ehrlichovo alebo Kovacsovo činidlo (paradimethylaminobenzaldehyd). Pozitívny výsledok (tvorba indolu) sa prejaví ako červený prstenec na rozhraní tekutín. **Proteus vulgaris má pozitívnu tvorbu indolu.**

Biochemické vlastnosti *Helicobacter pylori*.

Dôkaz produkcie ureázy - do skúmavky s pevnou pôdou s 2% močovinou a s farebným indikátorom (fenolová červeň) vpichom naočkujeme vyšetrovaný kmeň. Pozitívny výsledok (produkcia ureázy) sa prejaví ružovým zafarbením pôdy pôdy. ***Helicobacter pylori* má pozitívnu ureázovú aktivitu.**



Súpravy Mikro-La-Test - princíp

Na dôkaz biochemickej aktivity baktérií sa používajú biochemické identifikačné testy, ktorými zisťujeme prítomnosť produktov alebo metabolitov vznikajúcich utilizáciou sacharidov, bielkovín alebo iných látok. Diagnostika pozitívnej biochemickej reakcie je založená na zmene farby testovacieho média. Sú dostupné štandardné komerčné testy a súpravy (ENTEROTEST).

Stoupec Column	Zkratka Code	Reakce Reaction			
		Pozitivní Positive		Negativní Negative	
Řádek 1 - Row 1					
H	H ₂ S	●	●	○	○
G	LYS	●	●	●	●
F	IND	●	●	○	○
E	ORN	●	●	●	●
D	URE	●	●	●	●
C	PHE	●	○	○	○
B	ESL	●	●	○	○
A	SCI	●	●	●	●
Řádek 2 - Row 2					
H	HAL	●	●	●	●
G	INO	●	○	○	○
F	ADO	●	○	○	○
E	CEL	●	○	○	○
D	SUC	●	○	○	○
C	SOR	●	○	○	○
B	TRE	●	○	○	○
A	MAN	●	○	○	○
OXItest	OXI	●	○	○	○
ONPtest	ONP	●	●	○	○



Diagnostická súprava ENTEROtest je určená na definitívnu identifikáciu baktérií z čeľade *Enterobacteriaceae* a *Vibrionaceae* do 24 hodín. Súprava obsahuje súbor biochemických testov umiestnených v jamkách delenej mikrotitračnej doštičky. Suspenzia testovaného kmeňa sa pridá do každej jamky, inkubuje sa do druhého dňa. Pozitívne a negatívne reakcie sa odčítavajú na základe farebných zmien v jednotlivých jamkách a zaznamenávajú sa do protokolu.

MIKRO-LA-TEST®

ENTEROtest 16

Datum/Datum/Date/Дата

Zprac./Sprac./Ref./Изобр. номер

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

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

Poznámky/Notes/Отметки

Průžek Prúžok Strip Полоска		ENTEROtest 16 Řádek/Riadok/Strip/Строчка 1										Řádek/Riadok/Strip/Строчка 2						
OXI	ONP	H	G	F	E	D	C	B	A	H	G	F	E	D	C	B	A	
		HS	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

Na základe kombinácie pozitívnych a negatívnych výsledkov biochemických testov sa určí číselná kombinácia, pomocou ktorej identifikujeme testovanú baktériu.

Zdroje:

Kompaníková Jana, Elena Nováková, Martina Neuschlová: Mikrobiológia nielen pre medikov - Protokoly na praktické cvičenia - všeobecná mikrobiológia. Multimediálna podpora výučby klinických a zdravotníckych disciplín :: Portál Jesseniovej lekárskej fakulty Univerzity Komenského [online] , [cit. 21. 04. 2020]. Dostupný z WWW: <https://portal.jfmed.uniba.sk//clanky.php?aid=242>. ISSN 1337-7396.

Kompaníková Jana, Elena Nováková, Martina Neuschlová: Mikrobiológia nielen pre medikov - 2. upravené a doplnené vydanie. Multimediálna podpora výučby klinických a zdravotníckych disciplín :: Portál Jesseniovej lekárskej fakulty Univerzity Komenského [online] , [cit. 21. 04. 2020]. Dostupný z WWW: <https://portal.jfmed.uniba.sk//clanky.php?aid=398>. ISSN 1337-7396.