



N217019 - Laboratoř hydrobiologie a mikrobiologie

Název úlohy:	Mikrobiální identifikace pomocí MIKRO-LA-TESTu
---------------------	--

Vypracováno v rámci projektu:	Inovace a restrukturalizace předmětu Laboratoř hydrobiologie a mikrobiologie		
PIGA číslo projektu	C_VŠCHT_2015_013	iFIS číslo projektu	217 17 5642
Řešitel	doc. RNDr. Jana Říhová Ambrožová, Ph.D.		
Spoluřešitelé	Ing. Dana Vejmelková, Ph.D. Ing. Vladimíra Škopová		
Rok zpracování:	2015		

Mikrobiální identifikace pomocí MIKRO-LA-TESTu

Oblast použití:

MIKRO-LA-TESTy se používají v klinické i praktické mikrobiologii pro identifikace významných kmenů bakterií. Metody jsou založené na biochemických reakcích testovaných organismů.

Stanovený ukazatel:

V praxi se používají různé sady, známé jsou například následující testy:

- **Identifikace enterobakterií, 16 a 24 biochemických reakcí:** ENTEROtest 16, ENTEROtest 24, (popř. ENTEROtest 24N).
- Stanovení enterobakterií během 4 h ENTERO-Rapid 24.
- Stanovení bakterií rodu *Streptococcus* a *Enterococcus*: STREPTOtest 24.
- Identifikace druhů *Enterococcus*: EN-COCCUStest.
- Pro klinický materiál, enterokoky ENTERO-Screen.
- Stanovení stafylokoků, 16 a 24 biochemických reakcí: STAPHYtest 16, STAPHYtest 24.
- Rutinní identifikace anaerobních bakterií, 23 biochemických reakcí: ANAEROtest 23.
- Pro klinický materiál, určení kvasinek: CANDIDA-Screen, CANDIDAtest 21.
- Gramnegativní nefermentující bakterie: EFERMtest 24.
- Apod.

Podstata zkoušky – ENTEROtest 16:

Na základě biochemických reakcí a vzniklých barevných změn v jamkách testovací destičky se dle diagnostického seznamu identifikuje kmen bakterie izolované z vyrostlé kolonie na kultivačním médiu. V tomto případě je v návodu popsáno přímo stanovení enterobakterií na základě testu ENTEROtest 16.

Přístroje a pomůcky:

- Pipety s možností aplikace objemu 0,1 a 3 ml, jednorázové špičky.
- Bunsenův kahan.
- Mikrotitrační destička ENTEROtest 16.
- Sterilní zkumavky s uzávěrem.
- Termostat vytemperovaný na 36 °C až 38 °C.
- Petriho misky.
- Očkovací kličky.
- Vortex.
- Parafilm, alobal, plastový sáček.
- Diagnostický seznam pro MIKRO-LA-TEST (speciálně ENTEROtest 16).

Chemikálie:

- Používané chemikálie jsou stupně čistoty ch.č. nebo p.a. Voda se používá destilovaná nebo demineralizovaná bez specifických požadavků na jakost.
- Fyziologický roztok (9 g NaCl v 1 000 ml destilované vody) – sterilní.
- Činidlo pro test INDOL.
- Činidlo pro test FENYLALANIN.
- Sterilizovaný parafínový olej. (Činidla a olej jsou součástí dodávané sady.) Lze provádět i doplňkové testy.

Postup zkoušky:

Postup zkoušky je založený na několika stěžejních krocích, které spočívají v přípravě testovaného inokula (kolonie bakterie), přípravě destičky ENTEROtestu 16, následné inokulaci a po 24 h trvajících inkubaci zjištění kmene zkoušené suspektní kolonie.

- **Příprava inokula:** Z 24 h staré kultury bakterií se připraví ve sterilním fyziologickém roztoku suspenze, která se důkladně zhomogenizuje pomocí Vortexu. Alternativně lze připravit inokulum ze suspektní kolonie, rostoucí na agarovém médiu. Kolonie se sterilní kličkou přenesou do zkumavky obsahující (alespoň) 3 ml sterilního fyziologického roztoku a důkladně se promíchá vortexováním.
- **Příprava ENTEROtestu 16:** Z transportní vaničky se odřízne tři strany krycí fólie, která se odklopí a destička se vyjme. Podle toho, kolik bude provedeno stanovení (pro suspenzi, kolonii či kmen), se sejme ochranná hliníková fólie tak, aby pro 1 test (stanovení 1 typu kolonie, suspenze, kmene) byly odkryty dva stripy (dvě řady s jamkami).
- **Inokulace:** Suspenze se před použitím důkladně zhomogenizuje. Do každé jamky, zde 16, se inokuluje 0,1 ml suspenze. Přenesení objemu 0,1 ml do jamky musí být přesné, je důležitá minimalizace přenesení objemu do vedlejší jamky. Po naplnění všech testovaných jamek (biochemických reakcí) se v případě první jamky s testem na sulfan (H_2S), druhé jamky s testem na lysin (LYS), třetí jamky s testem na indol (IND), čtvrté jamky s testem na ornithin (ORN) a páté jamky s testem na ureázu (URE) přidají cca 2 kapky sterilního parafínového oleje (z důvodu zajištění anaerobního prostředí, které je potřeba pro biochemickou identifikaci reakce).
- **Inkubace:** Destička s naočkovanými stripy se přikryje parafilmem a zasune do polyethylenového obalu (sáčku), jehož otevřený konec se zahne pod destičku, čímž se minimalizuje případné vysychání inokula. Inkubace probíhá po dobu 18 až 24 h při teplotě 37 °C.

Vyhodnocení zkoušky:

- Po 18 až 24 h inkubace se z obalu vyndá destička se stripy, odryje se parafilm a opatrně se pak testu jamky IND přidá kapka činidla pro test na indol a do jamky PHE se přidá kapka činidla pro test na fenylalanin. Důležité je dodržet přímou aplikaci do daných jamek a zamezit případné kontaminaci jamek sousedních, která by byla následkem falešně pozitivních nebo negativních reakcí.
- Test na fenylalanin je nutné odečíst, díky rychlé reakci a odeznění signálu, během 2 - 3 min od doby kápnutí činidla.
- Při hodnocení zkoušky ENTEROtest 16 se používá barevná srovnávací stupnice doplněná informací o výsledku testu (pozitivní/negativní), viz informativní obr. 1.

1		H	G	F	E	D	C	B	A
		H ₂ S	LYS	IND	ORN	URE	PHE	ESL	SCI
	⊕	● ●	● ●	● ●	● ●	● ●	● ●	● ●	● ●
	⊖	● ●	● ●	● ●	● ●	● ●	● ●	● ●	● ●
2		H	G	F	E	D	C	B	A
		MAL	INO	ADO	CEL	SUC	SOR	TRE	MAN
	⊕	● ●	● ●	● ●	● ●	● ●	● ●	● ●	● ●
	⊖	● ●	● ●	● ●	● ●	● ●	● ●	● ●	● ●

Obr. 1. Interpretace barevné škály reakcí na destičce ENTEROtestu 16.

Vysvětlivky zkratk testů: H₂S-Sulfan, LYS-Lysin, IND–Indol, ORN–Ornithin, URE-Ureáza, PHE-Fenylalanin, ESL-Eskulin, SCI-Simmons citrát, MAL-Malonát, INO-Inositol, ADO-Adonitol, CEL-Celobióza, SUC-Sacharóza, SOR-Sorbitol, TRE-Trehalóza, MAN-Mannitol.

- Biochemické reakce se postupně hodnotí a porovnávají pomocí barevné škály (pozitivní a negativní reakce, +/-) a následně se záznam +/- převede do formy numerického kódu – profilu (oktalový profil). Dále se pak jednotlivé testy rozdělí do následujících trojic (popř. dvojic) a v každé vytvořené skupině přísluší hodnoty 1, 2 a 4 podle následujícího schématu.

Sloupec H	Sloupec G	Sloupec F	Sloupec E	Sloupec D	Sloupec C	Sloupec B	Sloupec A
H ₂ S	LYS	IND	ORN	URE	PHE	ESL	SCI
2	4	1	2	4	1	2	4
1. SKUPINA		2. SKUPINA			3. SKUPINA		
=		=			=		
MAL	INO	ADO	CEL	SUC	SOR	TRE	MAN
1	2	4	1	2	4	1	2
4. SKUPINA			5. SKUPINA			6. SKUPINA	
=			=			=	

- Pokud je test v jamce pozitivní, pak je konkrétnímu testu přiřazena patřičná hodnota 1, 2 a 4. V případě negativní reakce je vždy zaznamenána 0.
- Hodnoty, které se přiřadily k testům v každé trojici (dvojici) se sečtou. Tím vznikne šestice čísel, která reprezentuje daný profil.
- Podle tohoto šesticiferného číselného kódu se provede identifikace profilu pomocí Diagnostického seznamu.

Uvádění výsledků:

Výsledky se uvádí jako tzv. profil, což je šesticiferné číslo, dále pak procento identifikace a T-index. Taxon s nejvyšší hodnotou procenta identifikace je uveden v seznamu výsledku na prvním místě, procento udává pravděpodobnost odpovídající danému taxonu.

Procento identifikace:

$\geq 99 \%$	kmen je výborně odlišen	$\geq 90 \%$	kmen je odlišen
$\geq 95 \%$	kmen je velmi dobře odlišen	$< 90 \%$	kmen není dostatečně odlišen

T-index udává, do jaké míry daný výsledek odpovídá nejtypičtějšímu výsledku pro daný taxon.

T-index:

$\geq 0,75$	typický kmen	$\geq 0,25$	atypický kmen
$\geq 0,50$	málo typický kmen	$< 0,25$	zcela atypický kmen

Příklad 1 – Postup identifikace mikroorganismu pomocí ENTEROtestu 16

Zadání:

Zjistěte profil suspektní kolonie prostřednictvím ENTEROtestu 16.

Řešení:

- Při přípravě vzorku, ředění a kultivaci se postupuje dle pokynů uvedených v tomto návodu. Po ukončení doby kultivace se přistoupí k vyhodnocení zkoušky.
- Po skončení inkubace ENTEROtestu 16 a přidání činidel do jamky IND (indol) a PHE (fenylalanin) se pomocí barevné škály, uvedené na obr. 1 v tomto návodu, k jednotlivým reakcím zapíše +/- hodnoty.



Barevný výsledek testu jedné suspektní kolonie.

- Hodnoty +/- se následně převedou podle v návodu uvedeném schématu do číselné podoby (1, 2 a 4 za pozitivní reakce) a v případě negativní reakce 0. Po rozdělení do trojic (dvojic) se hodnoty sečtou, čímž vznikne šestciferné číslo.

Sloupec H	Sloupec G	Sloupec F	Sloupec E	Sloupec D	Sloupec C	Sloupec B	Sloupec A
H ₂ S	LYS	IND	ORN	URE	PHE	ESL	SCI
2	4	1	2	4	1	2	4
-	+	-	-	-	-	-	-
1. SKUPINA		2. SKUPINA			3. SKUPINA		
0 + 4 = 4		0 + 0 + 0 = 0			0 + 0 + 0 = 0		
MAL	INO	ADO	CEL	SUC	SOR	TRE	MAN
1	2	4	1	2	4	1	2
4. SKUPINA			5. SKUPINA			6. SKUPINA	
0 + 0 + 0 = 0			0 + 0 + 0 = 0			0 + 2 = 2	

- V tomto případě je diagnostické číslo: **400002**. Pomocí Diagnostického seznamu vychází následující zjištění: ze 73,54 % *Salmonella gallinarum*, ze 7,84 % *Salmonella pullorum* a z 11,82 % *Shigella* sérovar A, B, C. Jedná se o nízké rozlišení. Pro přijatelnou identifikaci by byla potřebná alespoň 90% úspěšnost identifikace.

Podstata zkoušky – ENTEROtest 24:

Na základě biochemických reakcí a vzniklých barevných změn v jamkách testovací destičky se dle diagnostického seznamu identifikuje kmen bakterie izolované z vyrostlé kolonie na kultivačním médiu. V tomto případě je v návodu popsáno přímo stanovení enterobakterií na základě testu ENTEROtest 24.

Přístroje a pomůcky:

- Pipety s možností aplikace objemu 0,1 a 3 ml, jednorázové špičky.
- Bunsenův kahan.
- Mikrotitrační destička ENTEROtest 24.
- Sterilní zkumavky.
- Termostat vytemperovaný na 36 °C až 38 °C.
- Petriho misky.
- Očkovací klíčky.
- Parafilm, alobal, plastový sáček.
- Vortex.
- Diagnostický seznam pro MIKRO-LA-TEST (speciálně ENTEROtest 24).

Chemikálie:

- Používané chemikálie jsou stupně čistoty ch.č. nebo p.a. Voda se používá destilovaná nebo demineralizovaná bez specifických požadavků na jakost.
- Fyziologický roztok (9 g NaCl v 1 000 ml destilované vody) – sterilní.
- Činidlo pro test INDOL.
- Činidlo pro test FENYLALANIN.
- Činidlo pro test na ACETOIN.
- Sterilizovaný parafínový olej. (Činidla a olej jsou součástí dodávané sady.)

Postup zkoušky:

Postup zkoušky je založený na několika stěžejních krocích, které spočívají v přípravě testovaného inokula (kolonie bakterie), přípravě destičky ENTEROtestu 24, následné inokulaci a po 24 h trvajících inkubaci zjištění kmene zkoušené suspektní kolonie.

- **Příprava inokula:** Z 24 h staré kultury bakterií se připraví ve sterilním fyziologickém roztoku suspenze, která se důkladně zhomogenizuje pomocí Vortexu. Alternativně lze připravit inokulum ze suspektní kolonie, rostoucí na agarovém médiu. Kolonie se sterilní klíčkovou přenese do zkumavky obsahující (alespoň) 3 ml sterilního fyziologického roztoku a důkladně se promíchá vortexováním.
- **Příprava ENTEROtestu 24:** Z transportní vaničky se odříznou tři strany krycí fólie, která se odklopí a destička se vyjme. Podle toho, kolik bude provedeno stanovení (pro suspenzi, kolonii či kmen), se sejme ochranná hliníková fólie tak, aby pro 1 test (stanovení 1 typu kolonie, suspenze, kmene) byly odkryty tři stripy (řady s jamkami).
- **Inokulace:** Suspenze se před použitím důkladně zhomogenizuje. Do každé jamky, zde 24, se inokuluje 0,1 ml suspenze. Přenesení objemu 0,1 ml do jamky musí být přesné, je důležitá minimalizace přenesení objemu do vedlejší jamky.

- Po naplnění všech testovaných jamek (biochemických reakcí) se v případě první jamky s testem na indol (IND), druhé jamky s testem na sulfan (H₂S), třetí jamky s testem na lysin (LYS), čtvrté jamky s testem na ornithin (ORN), páté jamky s testem na ureázu (URE) a šesté jamky s testem na arginin (ARG) přidají cca 2 kapky sterilního parafinového oleje (z důvodu zajištění anaerobního prostředí, které je potřeba pro biochemickou identifikaci reakce).
- Inkubace:** Destička s naočkovanými stripy se přikryje parafilmem a zasune do polyethylenového obalu (sáčku), jehož otevřený konec se zahne pod destičku, čímž se minimalizuje případné vysychání inokula. Inkubace probíhá po dobu 18 až 24 h při teplotě 37 °C.

Vyhodnocení zkoušky:

- Po 18 až 24 h inkubace se z obalu vyndá destička se stripy, odkryje se parafilm a opatrně se pak do jamky IND přidá kapka činidla pro test na indol, do jamky PHE se přidá kapka činidla pro test na fenylalanin a do jamky VPT činidlo pro test na acetoin. Důležité je dodržet přímou aplikaci do daných jamek a zamezit případné kontaminaci jamek sousedních, která by byla následkem falešně pozitivních nebo negativních reakcí.
- Test na fenylalanin je nutné odečíst, díky rychlé reakci a odeznění signálu, během 2 - 3 min od doby kápnutí činidla.
- Při hodnocení zkoušky ENTEROtest 24 se používá barevná srovnávací stupnice doplněná informací o výsledku testu (pozitivní/negativní), viz informativní obr. 2.

1		H IND	G H ₂ S	F LYS	E ORN	D URE	C ARG	B SCI	A MAL
	+	● ●	● ●	● ●	● ●	● ●	●	● ●	● ●
	-	●	○	● ●	● ●	● ●	●	● ●	● ●
2		H PHE	G ONP	F INO	E ADO	D CEL	C SUC	B TRE	A MAN
	+	● ●	●	●	●	●	●	●	●
	-	●	○	● ●	● ●	● ●	● ●	● ●	● ●
3		H VPT	G ESL	F SOR	E RHA	D MLB	C RAF	B DLU	A GLU
	+	● ●	● ●	●	●	●	●	●	●
	-	○	○	● ●	● ●	● ●	● ●	● ●	● ●

Obr. 2. Interpretace barevné škály reakcí na destičce ENTEROtestu 24.

Vysvětlivky zkratk testů: IND–Indol, H₂S-Sulfan, LYS-Lysin, ORN–Ornithin, URE-Ureáza, ARG-Arginin, SCI-Simmons citrát, MAL-Malonát, PHE-Fenylalanin, ONP-β-galaktosidáza, INO-Inositol, ADO-Adonitol, CEL-Celobióza, SUC-Sacharóza, SOR-Sorbitol, TRE-Trehalóza, MAN-Mannitol, VPL-Acetoin, ESL-Eskulin, SOR-Sorbitol, RHA-Rhamnóza, MLB-Milibióza, RAF-Raffinóza, DLU-Dulcitol, GLU-Glukóza.

- Biochemické reakce se postupně hodnotí a porovnávají pomocí barevné škály (pozitivní a negativní reakce, +/-) a následně se záznam +/- převede do formy numerického kódu – profilu (oktalový profil). Dále se pak jednotlivé testy rozdělí do následujících trojic a v každé vytvořené skupině přísluší hodnoty 1, 2 a 4 podle následujícího schématu.
- V případě tohoto typu testu se pro sestavení šesticiferného kódu používají výsledky barevných reakcí z jamek ve sloupcích H až C. Jamky ve sloupci A a B jsou určeny pro doplňkové testy.

Sloupec H		Sloupec G		Sloupec F		Sloupec E		Sloupec D		Sloupec C	
IND	1	H ₂ S	1	LYS	1	ORN	1	URE	1	ARG	1
PHE	2	ONP	2	INO	2	ADO	2	CEL	2	SUC	2
VPT	4	ESL	4	SOR	4	RHA	4	MLB	4	RAF	4
1. SKUPINA		2. SKUPINA		3. SKUPINA		4. SKUPINA		5. SKUPINA		6. SKUPINA	
=		=		=		=		=		=	

- Pokud je test v jamce pozitivní, pak je konkrétnímu testu přiřazena patřičná hodnota 1, 2 a 4. V případě negativní reakce je vždy zaznamenána 0.
- Hodnoty, které se přiřadily k testům v každé trojici (dvojici) se sečtou. Tím vznikne šestice čísel, která reprezentuje daný profil.
- Podle tohoto šesticiferného číselného kódu se provede identifikace profilu pomocí Diagnostického seznamu.

Uvádění výsledků:

Výsledky se uvádí jako tzv. profil, což je šesticiferné číslo, dále pak procento identifikace a T-index. Taxon s nejvyšší hodnotou procenta identifikace je uveden v seznamu výsledku na prvním místě, procento udává pravděpodobnost odpovídající danému taxonu.

Procento identifikace:

≥ 99 %	kmen je výborně odlišen	≥ 90 %	kmen je odlišen
≥ 95 %	kmen je velmi dobře odlišen	< 90 %	kmen není dostatečně odlišen

T-index udává, do jaké míry daný výsledek odpovídá nejtypičtějšímu výsledku pro daný taxon.

T-index:

≥ 0,75	typický kmen	≥ 0,25	atypický kmen
≥ 0,50	málo typický kmen	< 0,25	zcela atypický kmen

Příklad 2 – Postup identifikace mikroorganismu pomocí ENTEROtestu 24

Zadání:

Zjistěte profil suspektní kolonie prostřednictvím ENTEROtestu 24.

Řešení:

- Při přípravě vzorku, ředění a kultivaci se postupuje dle pokynů uvedených v tomto návodu. Po ukončení doby kultivace se přistoupí k vyhodnocení zkoušky.
- Po skončení inkubace ENTEROtestu 24 a přidání činidel do jamek IND (indol), PHE (fenylalanin) a VPT (acetoin) se pomocí barevné škály, uvedené na obr. 2 v tomto návodu, k jednotlivým reakcím zapíše +/- hodnoty.



Barevný výsledek testu jedné suspektní kolonie.

- Hodnoty +/- se následně převedou podle v návodu uvedeném schématu do číselné podoby (1, 2 a 4 za pozitivní reakce) a v případě negativní reakce 0. Po rozdělení do trojic se hodnoty sečtou, čímž vznikne šesticiferné číslo.

Sloupec H			Sloupec G			Sloupec F			Sloupec E			Sloupec D			Sloupec C		
IND	1	-	H ₂ S	1	-	LYS	1	+	ORN	1	+	URE	1	+	ARG	1	+
PHE	2	-	ONP	2	-	INO	2	-	ADO	2	+	CEL	2	-	SUC	2	-
VPT	4	-	ESL	4	+	SOR	4	-	RHA	4	+	MLB	4	-	RAF	4	-
1. SKUPINA			2. SKUPINA			3. SKUPINA			4. SKUPINA			5. SKUPINA			6. SKUPINA		
0 + 0 + 0 = 0			0 + 0 + 4 = 4			1 + 0 + 0 = 1			1 + 0 + 4 = 7			1 + 0 + 4 = 1			1 + 0 + 0 = 1		

- V tomto případě je diagnostické číslo: **041711**. Pomocí Diagnostického seznamu vychází následující zjištění: bohužel uvedený kód v daném seznamu není, nejbližší k danému profilu se blíží šesticiferné číslo 041720 *Escherichia fergusonii*.

Použitá literatura:

Říhová Ambrožová, J. 2008. Mikrobiologie v technologii vod. Skriptum VŠCHT Praha, 252 pp., ISBN 978-80-7080-676-0 (2. přepracované vydání), AA 26,32

MIKRO-LA-TEST, Mikrobiální identifikace, Erba Lachema, s.r.o., www.lachema.com (on-line, 30.07.2015)