

Identificarea biochimică a bacterii

Dr. Paul Ingram

Medic pentru boli infec•ioase (RPH) •i
microbiolog (PathWest Laboratories)

Contur

- Testele fenotipice vs genotipice
- Pro și contra testelor biochimice
- Baza testelor biochimice
- Exemple de test biochimic
- Algoritmi de diagnosticare
- Viitorul testelor de identificare biochimică

Metode de identificare a bacteriilor

- Fenotipic

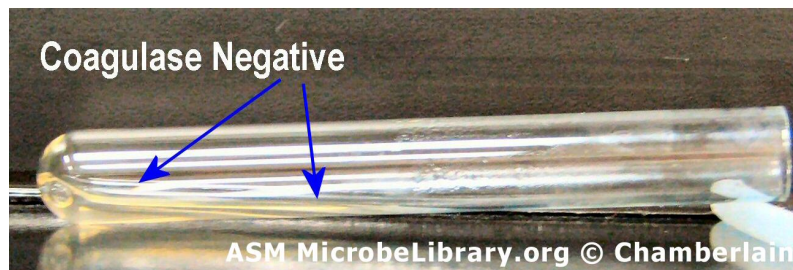
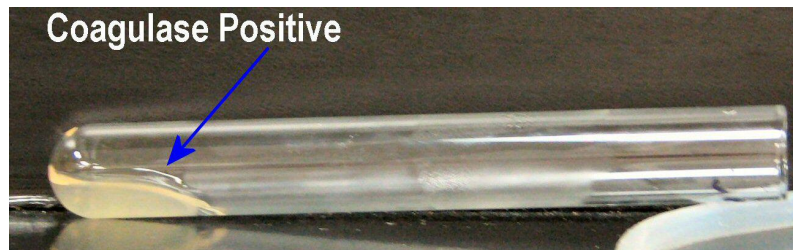
- Detectează proprietățile fizice ale bacteriilor
- Influențat de expresia genică
- Include teste biochimice

- Genotipic

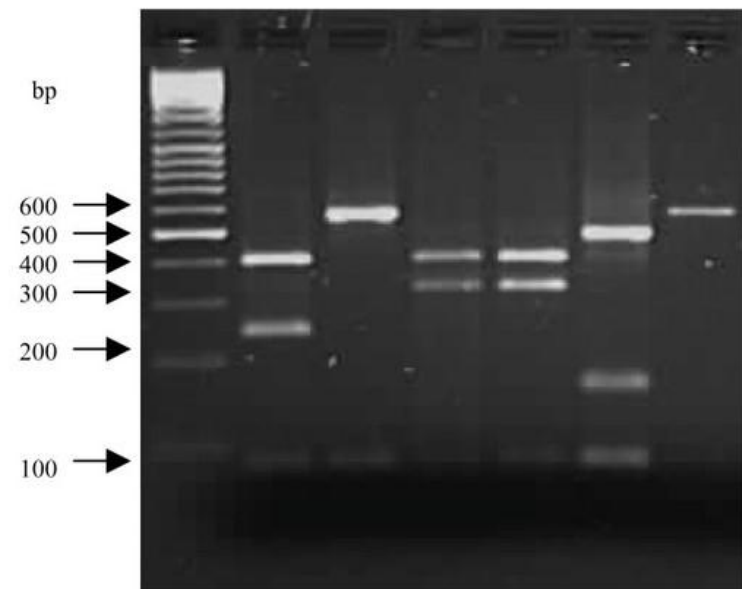
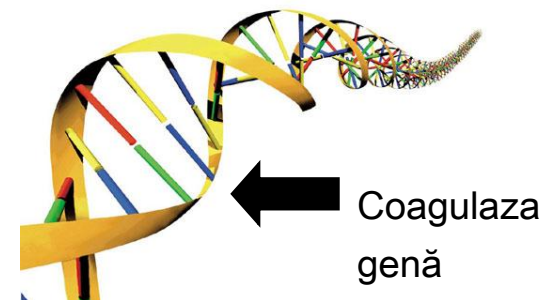
- Detectează codul genetic al bacteriilor (ADN)
- Nu este influențat de expresia genică

De exemplu, coagulaza pentru ID stafilococic

- Test fenotipic



- Test genotipic



ID biochimic:

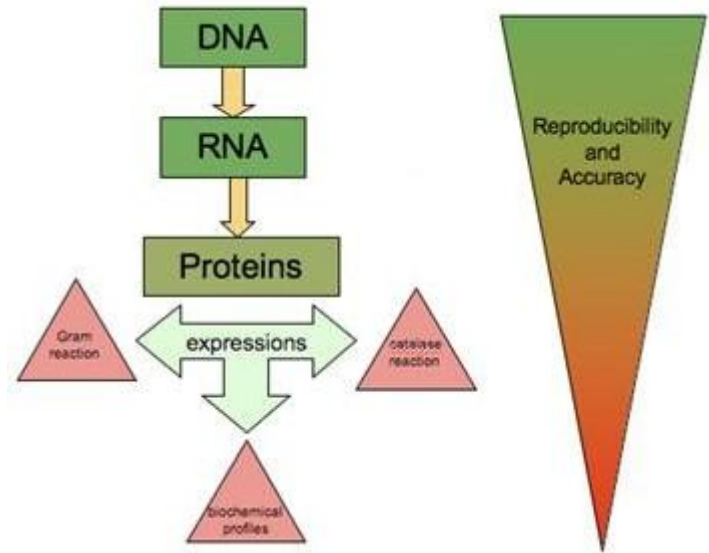
Argumente pro și contra

• Pro

- Ieftin
- Experiență cu utilizarea ++
- Nu necesită expertiză
- TAT potențial rapid (interval: secunde până peste noapte)

• Contra

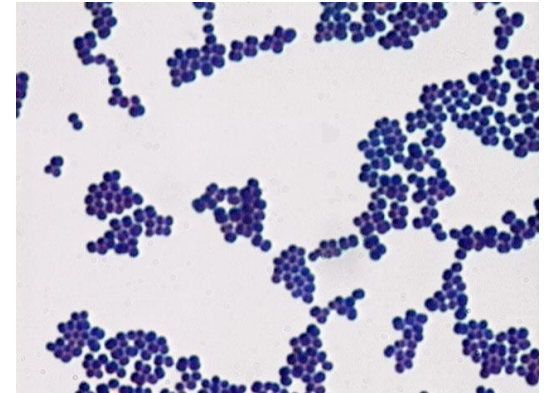
- Riscul de biosecuritate (organisme vii)
- Mai puțin precise, mai puțin discriminatorii
- Fenotipul poate fi instabil
 - De exemplu, inductibil (adică influențat de expresia genelor)
- Nu este posibil dacă organismul este în creștere lentă sau fastidios
- Interpretare subiectivă (mai puțin reproductibilă)



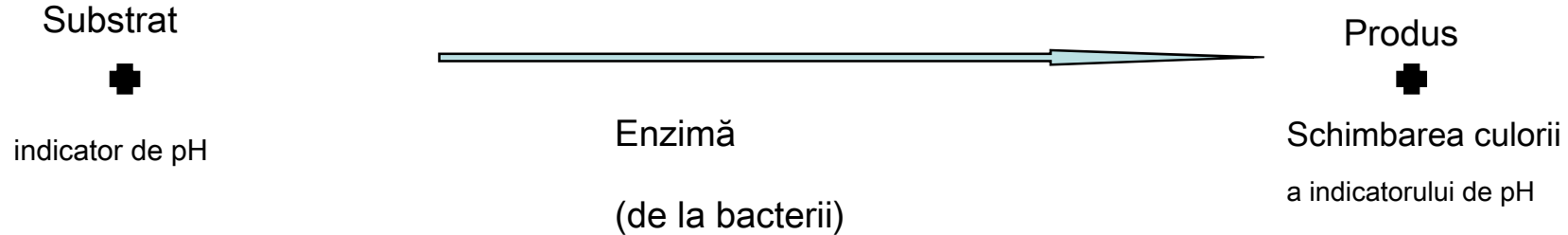
Tipul de identificare fenotipică

- Aspect
 - Macroscopic
 - Microscopic (de exemplu, pata de gram, tija vs coccus)
- Cerința / rata de creștere
 - Mass-media
 - Gazele atmosferice
 - Temperatura
- Miros
- Motilitate
- Hemoliză pe agar de sânge
- **Teste biochimice**

(Vezi prelegerea despre „Caracteristicile culturii pentru bacterii Identificare”)



Baza testelor biochimice



- Caracteristici importante
 - Standardizarea metodei
 - cantitatea standardizată de bacterii utilizate pentru test (= inocul)
 - + ve • i –ve comenzi

indicatori de pH

- Modificările culorilor apar la pH-uri diferite pentru diferiți indicatori

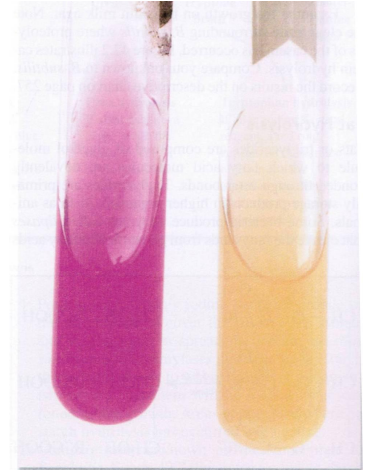


FIGURE 42.4 Urease test. Tube on the left is positive (*Proteus*); tube on the right is negative. © The McGraw-Hill Companies/Auburn University Photographic Service

- **Indicator pH**

domeniul pH-ului Treceți de la acid la alcalin

- Roșu de metil

4-6

roșu până la galben

- Andrade

5-8

roz spre galben

- Albastru bromescol

5-6

galben până la violet

- Roșu fenol

6-8

galben până la roșu

Standardizarea inoculului

- Exemple de fază solidă:

- Dimensiunea buclei (de ex. 1microL, 10microL)

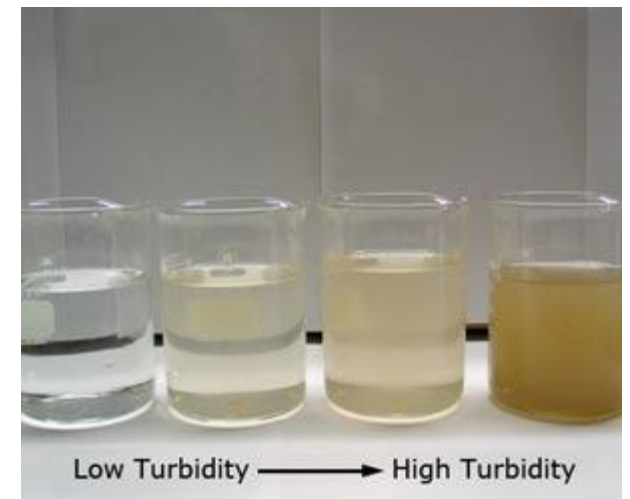
- Exemple de fază lichidă

- Turbiditatea fluidului

- Capacitatea particulelor în suspensie de a refracta și a devia razele de lumină

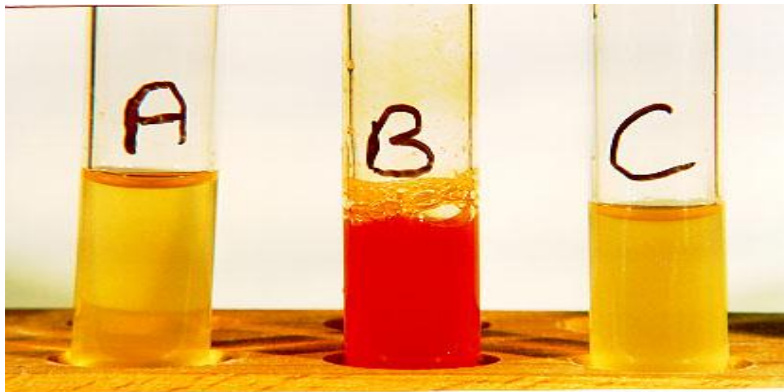
- Densitate optica

- Nefelometrie



Controale pozitive •i negative

- Control pozitiv: bacterii cu rezultatul testului cunoscut + ve
- Control negativ: bacterii cu rezultatul testului cunoscut -ve
- Dacă una sau ambele controale nu reu•esc, testul nu este valid



- am

Control

+ ve

Control

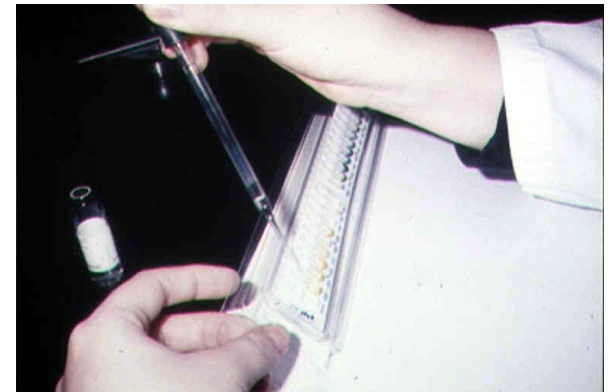
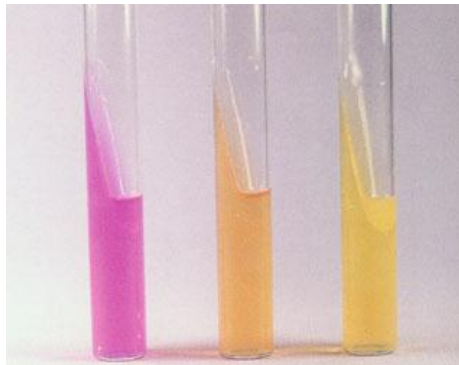
Test

izola



Tipuri de metode de identificare biochimice

- Manual vs automat
 - Sistemele automate au avantajul citirii automate care îmbunătățește viteza, consistența și elimină erorile subiective.
- În casă vs comercial



Exemple de teste biochimice obi•nuite utilizate pentru identificarea gram negativ bacterii

- Urease
- Indol
- Oxidaza
- Fermentarea glucozei
- Fermentarea lactozei
- Nitrat

Urease

- Detectează hidroliza ureei în amoniac de către enzima urează
- Amoniacul determină o creștere a pH-ului care este detectată de indicatorul pH-ului (portocaliu A

roz)

- Urease + ve bacterii:
 - Proteus
 - Klebsiella

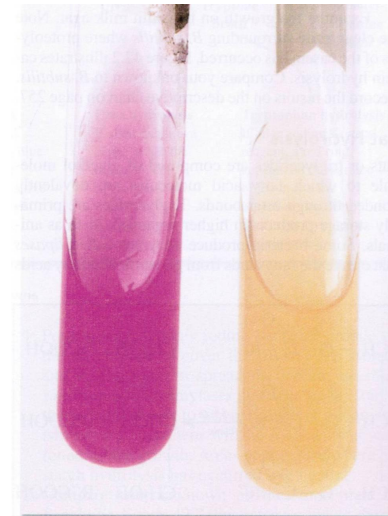


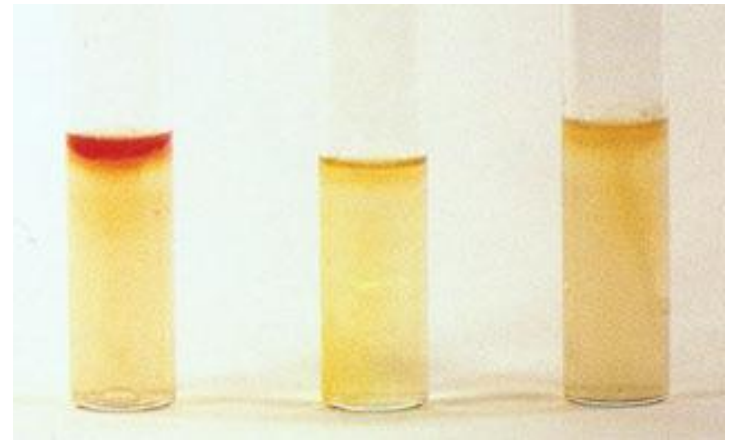
FIGURE 42.4 Urease test. Tube on the left is positive (*Proteus*); tube on the right is negative. © The McGraw-Hill Companies/Auburn University Photographic Service

Indol

- Detectează producția de indol din triptofan, care produce o schimbare de culoare în combinație cu

dimetilaminobenzaldehidă (clar până la roșu)

- Indole + ve bacterii:
 - E coli
 - Citrobacter

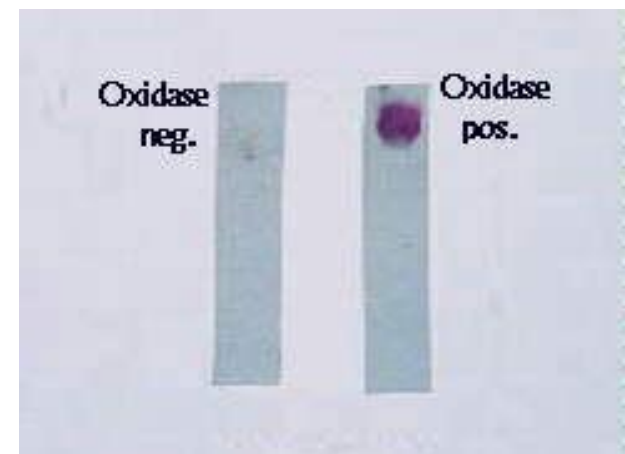


Oxidaza

- Detectează enzima citocrom oxidazei care transformă dimetilfenildiamina în

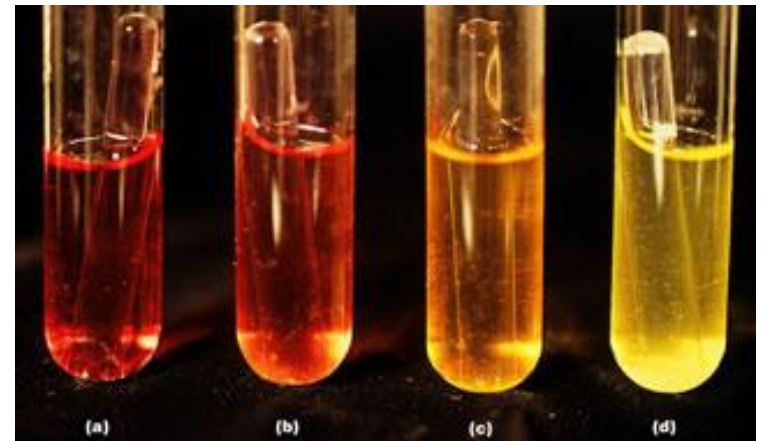
albastru indofenol (clar până la albastru)

- Oxidază + bacterii ve:
 - Pseudomonas
 - Vibrio



Fermentarea glucozei

- Detectează capacitatea bacteriilor de a fermenta glucoza în acid piruvic folosind calea Embden Meyerhof
- Detectat prin indicator de pH roșu fenol (roșu / alcalin până la galben / acid)
- Bacterii care fermentează glucoza:
 - E coli
 - Proteus



Fermentarea lactozei

- Detectează capacitatea bacteriilor de a fermenta lactoza în glucoză apoi în acidul piruvic folosind calea Embden Meyerhof
- Detectat prin indicator de pH ro•u fenol (ro•u / alcalin până la galben / acid)
- Bacterii care fermentează glucoza:
 - E coli
 - Klebsiella



Nitrat

- Detectează enzima nitrat reductază care transformă nitrații în nitriți.
- Nitritul apoi dezvoltat prin adăugarea de naftilamină și acid sulfinic pentru a forma colorant diazoniu (clar până la roșu)
- Nitrat + bacterii ve:
 - E coli
 - Klebsiella



Panta TSI

- Incorporează mai multe substraturi și indicatori de pH într-un tub
- Prin strivirea bacteriilor pe suprafață și înfiptă în medii, sunt generate atât condiții aerobe, cât și anaerobe



API

- Reac•ii biochimice minituarizate în> 20 godeuri
- Durează 2-24 de ore
- Profil de reac•ie („biocod”) comparativ cu o bază de date on-line de> 20000 de izolate
- Test comercial



	Tests	Active ingredients	Reactions/enzymes
1	ONPG	2-nitrophenyl-bD-galactopyranoside	b-galactosidase
2	ADH	L-arginine	Arginine DiHydrolase
3	LDC	L-lysine	Lysine Decarboxylase
4	ODC	L-ornithine	Ornithine Decarboxylase
5	CIT	Trisodium citrate	Citrate utilization
6	H2S	Sodium thiosulphate	H2S production
7	URE	Urea	Urease
8	TDA	L-tryptophane	Tryptophane deaminase
9	IND	L-tryptophane	Indole production
10	VP	Sodium pyruvate	Acetoin production (Voges Proskauer)
11	GEL	Gelatine	Gelatinase
12	GLU	D-glucose	Fermentation/oxidation (Glucose)
13	MAN	D-mannitol	Fermentation/oxidation (Mannitol)
14	INO	Inositol	Fermentation/oxidation (Inositol)
15	SOR	D-sorbitol	Fermentation/oxidation (sorbitol)
16	RHA	L-rhamnose	Fermentation/oxidation (rhamnose)
17	SAC	D-sucrose	Fermentation/oxidation (saccharose)
18	MEL	D-melibiose	Fermentation/oxidation (melibiose)
19	AMY	Amygladin	Fermentation/oxidation (Amygladin)
20	ARA	L-arabinose	Fermentation/oxidation (arabinose)

Sisteme automatizate de identificare biochimică

- Exemple:

- Vitek
- Biolog
- Pheonix
- Autoscan Walkaway



- Capacitate variabilă pentru:

- Numărul de exemplare pe care le pot manipula
- Dimensiunea / extinderea bazei de date comparative
- Interfașarea cu programul de date de laborator
- Întoarce timpul
- Capacitatea de identificare la nivelul speciilor



Algoritmi de diagnosticare pentru bacterii

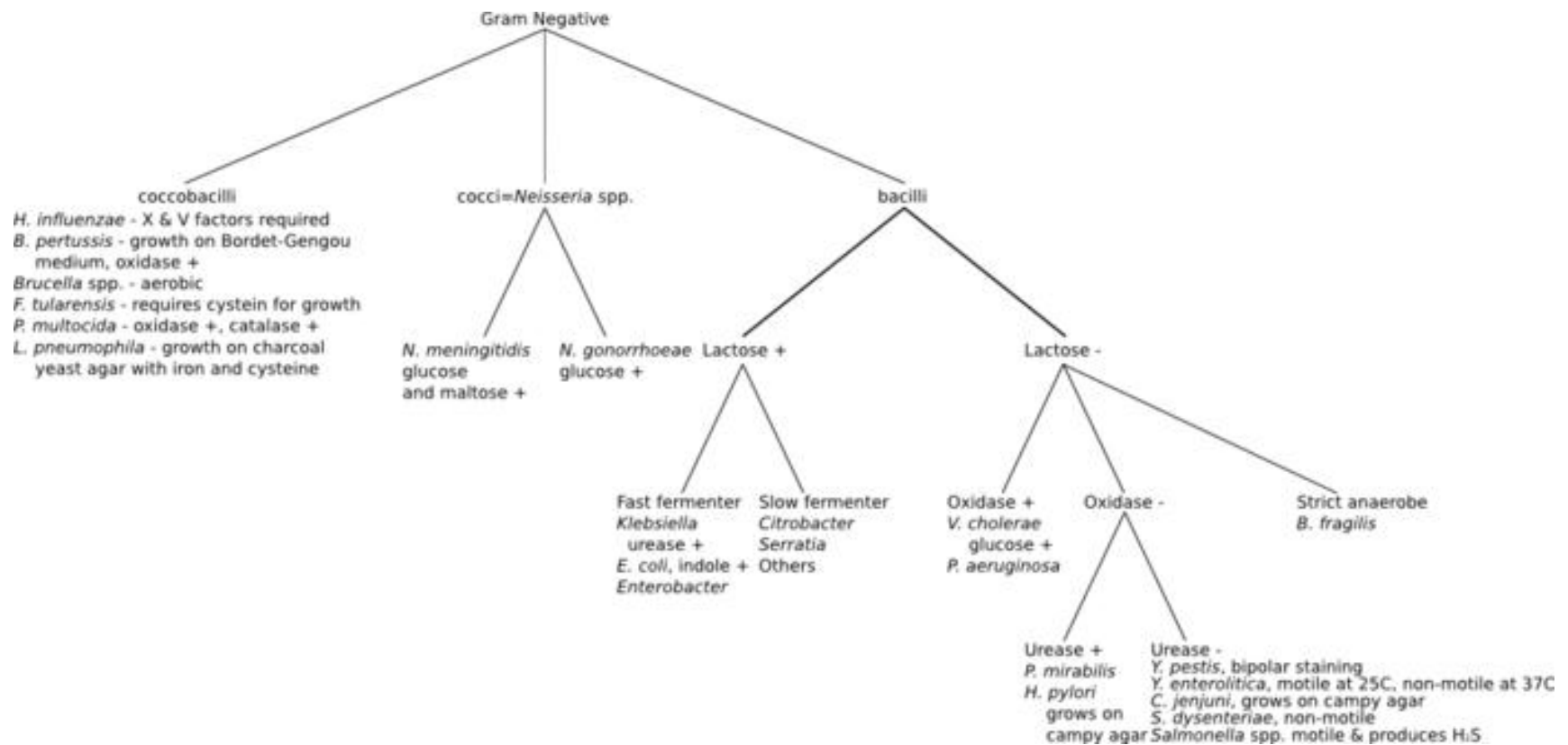
ID

- Testele primare permit identificarea nivelului genului
(enterobacteriaceae, „fermentatori non-glucozici”,
HACEK, etc)
 - Pata Gram
 - Morfologia culturii
 - Teste biochimice de bază
 - De exemplu, teste de oxidază, indol, uree etc.
- Identificarea nivelului de specie necesită teste mai complexe, a doua linie

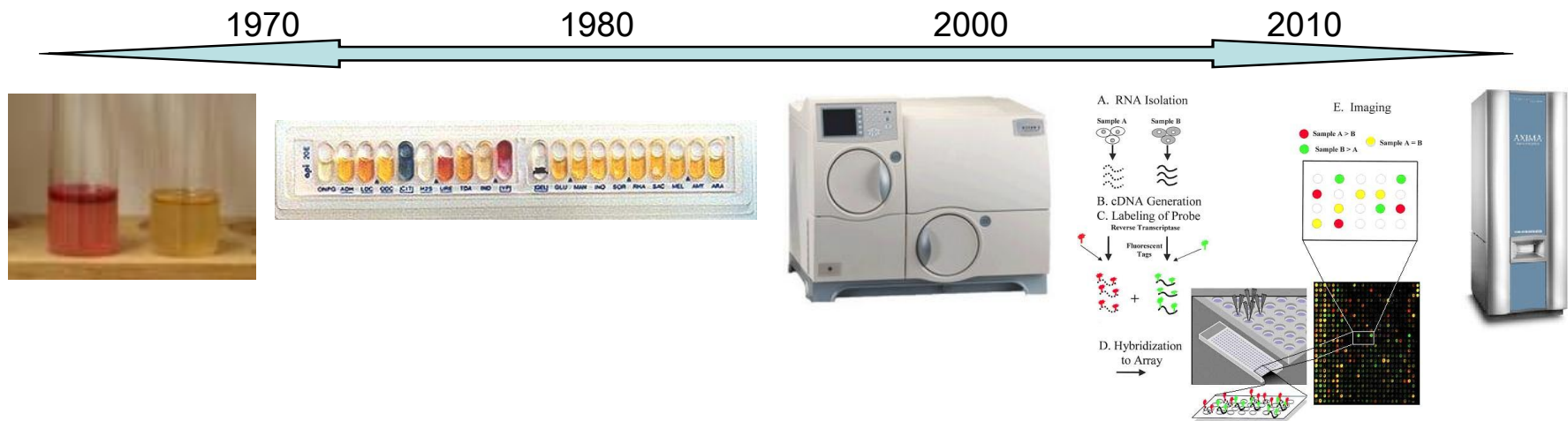
Exemplul 1 al algoritmului de diagnosticare

	Indol	Metil ro•u	Voges Proskauer	Citrat	Urease
E coli	+	+	-	-	-
Enterobacter	-	-	+	+	-
Klebsiella pneumoniae	-	-	+	+	+
Salmonella	-	+	-	+	-
Shigella	-	+	-	-	-
Proteus mirabilis	-	+	-	+ / -	+

Exemplul 2 al algoritmului de diagnosticare



Modificări ale testelor biochimice pentru ID: trecut • i viitor



- Creșterea automată și a minituarizării
- Înlocuit din ce în ce mai mult prin teste genotipice
- Este necesară identificarea: ne-am putea descurca doar cu testarea susceptibilității?

Concluzii

- Testele biochimice rămân esențiale pentru identificarea bacteriilor
- Trebuie să înțeleagă principiile testelor comune / primare
- Testele biochimice au limitări
- În viitor, acestea vor fi din ce în ce mai înlocuite cu teste genotipice