

Metoda: ENTEROtest 24

Student(ka): Lenka Dvořáková

Školitelé: pro praktickou část: úseková laborantka V. Beranová
pro teoretickou část: RNDr. Karel Fajfrlík Ph.D.

Princip: ENTEROtest 24 patří mezi biochemické identifikační testy. Jak už název napovídá, tyto testy prokazují biochemickou aktivitu bakterií jako je přítomnost produktů či metabolitů, které vznikají uvolněním bílkovin, sacharidů nebo přímo enzymy specifickými pro daný druh bakterií. Pozitivitu reakce poznáme barevnou změnou testovacího média díky změně příslušného indikátoru.

Tato souprava obsahuje mikrotitrační destičky s 24 jamkami (3 řádky po 8 jamkách). Na dně každé jamky je jiná půda v suchém stavu, a tak probíhá v každé z nich různá biochemická reakce (díky tomu dokážeme blíže doručit mikroby). Do důlku se přikápnou suspenze bakterie, kterou vytvoříme z čisté 24hodinové kultury testovaného kmene důkladně homogenizované v přibližně 3 ml sterilního fyziologického roztoku. Vzniklý zákal musí odpovídat 1. stupni McFarlandovy zákalové stupnice. Destička se nechá inkubovat do druhého dne a poté se hodnotí barevné změny u jednotlivých testů. Hodnocení můžeme provádět pouhým okem podle barevné škály dodávané se soupravou, kdy negativní reakce je hodnocena znaménkem minus a pozitivní plus, nebo přístrojově (čtecím zařízením na způsob spektrofotometru). Jednotlivé výsledky se zapíše do počítače s diagnostickým softwarem, který v procentech vyhodnotí, o který bakteriální druh se nejspíše jedná. Pokud nemáme k dispozici software, hodnotíme dle tabulek nebo tzv. oktalogového kódu.

Uplatnění metody: Metoda se používá k bližšímu určení mikroba z čisté kultury, konkrétně pro rutinní identifikaci významných druhů střevních bakterií z čeledi Enterobacteriaceae, aeromonád a vibrií.

Úskalí metody: Jde o specifický test, který prokazuje pouze bakterie jmenované výš, takže test nejde dělat na slepo a musíme přibližně vědět co hledáme. Mezi nejčastější příčiny špatné identifikace patří například kontaminace vzorku, špatná hustota nebo objem připravené suspenze, kápnutí činidla do jiného sloupce, atypický kmen nebo druh, jehož údaje nejsou uvedeny v tabulce.

Další úskalí testu je časová náročnost: musíme čekat 24 hodin na čistou kulturu a po provedení testu čekáme opět do dalšího dne.

Přístrojové vybavení: Ke zhotovení suspenze potřebujeme denzitometr (měření zákalu) a třepačku např. Vortex (ke správné homogenizaci) dále potřebujeme termostat pro inkubaci při 37°C. K provedení testu další specifické přístroj nepotřebujeme, ale zlehčí nám práci. K vyhodnocení výsledku (číselného kódu) se používá počítačový software a při hodnocení barevné změny můžeme použít přístroj na principu spektrofotometru.

Odběr a transport: Čistou kulturu zhotovujeme nejčastěji z výtěru z rekta. Používáme černou výtěrovku s transportní půdou. Tampon se zavádí krouživým pohybem přibližně 3 cm hluboko do rekta a zhotoví se výtěr. Transport by se měl provést do 24 hodin při pokojové teplotě.