

Wizualny podręcznik testów biochemicznych i podłoży hodowlanych

Praktyczny przewodnik do interpretacji
testów biochemicznych i podłoży hodowlanych

Dla studentów mikrobiologii, analityki medycznej
i kierunków biologicznych



Prawa autorskie i informacja edukacyjna

Wiedza odpowiedzialnie.
Dla lepszej praktyki laboratoryjnej.



Wszelkie prawa zastrzeżone.

Ta publikacja, łącznie z jej treścią, grafikami, układem i opracowaniem, jest chroniona prawem autorskim.



Publikacja przeznaczona do użytku edukacyjnego.

Materiał został przygotowany w celach dydaktycznych i wspiera naukę interpretacji testów biochemicznych i podłoży hodowlanych.



Żadna część tej publikacji nie może być kopiowana, powielana ani rozpowszechniana bez zgody autora,

z wyjątkiem dozwolonego użytku edukacyjnego.



Ważna informacja

- Materiał wspiera naukę interpretacji testów biochemicznych i podłoży hodowlanych.
- Nie zastępuje instrukcji laboratoryjnych, lokalnych procedur, zasad bezpieczeństwa ani nadzoru prowadzącego.
- Wyniki należy interpretować w kontekście materiału, czasu inkubacji i kontroli jakości.



Dla studentów mikrobiologii, analityki medycznej i kierunków biologicznych.

Publikacja została opracowana z myślą o osobach poszerzających wiedzę z zakresu mikrobiologii i diagnostyki laboratoryjnej.

Spis treści

- 00 Okładka
- 01 Prawa autorskie i informacja edukacyjna
- 02 Spis treści
- 03 Wprowadzenie

Moduł 01 — Podstawy interpretacji testów

- 04 Podstrona modułu
- 05 Czym są testy biochemiczne?
- 06 Jak odczytywać wynik dodatni i ujemny?
- 07 Kontrole, warunki badania i najczęstsze błędy
- 08 Od próbki do profilu identyfikacyjnego
- 09 Mapa reakcji biochemicznych

Moduł 02 — Testy enzymatyczne i szybkie

- 10 Test katalazowy
- 11 Test oksydazowy
- 12 Test koagulazowy
- 13 Test ureazowy
- 14 Test indolowy
- 15 Test DNazowy
- 16 Test PYR
- 17 Test CAMP
- 19 Porównanie testów szybkich

Moduł 03 — Testy metaboliczne i różnicujące

- 20 Test wykorzystania cytrynianu
- 21 Test z czerwienią metylową — MR
- 22 Test Vogesa-Proskauera — VP
- 23 Test redukcji azotanów
- 24 Podłoże TSI — Triple Sugar Iron Agar
- 25 Fermentacja węglowodanów
- 26 Testy dekarboksylaz aminokwasów
- 27 Ocena ruchliwości
- 28 Profil różnicujący Enterobacterales
- 29

Moduł 04 — Podłoża hodowlane

- 30 Jak rozumieć rodzaje podłoży?
- 31 Agar z krwią
- 32 Agar czekoladowy
- 33 Agar MacConkeya
- 34 Agar z mannitolem i solą
- 35 Podłoże CLED
- 36 Agar Sabourauda
- 37 Agar Mueller-Hintona
- 38 Wielka tabela porównawcza podłoży

Moduł 05 — Integracja i praktyczne różnicowanie

- 40 Ziarniaki Gram-dodatnie — ścieżka różnicowania
- 41 Pałeczki Gram-ujemne — ścieżka różnicowania
- 42 Oksydazo-dodatnie i oksydazo-ujemne bakterie Gram-ujemne
- 43 Różnicowanie Enterobacterales krok po kroku
- 44 Jak łączyć wygląd kolonii z testami biochemicznymi?
- 45 Przypadek treningowy 01 — analiza profilu wyników
- 46 Przypadek treningowy 02 — analiza profilu wyników
- 47 Wielka mapa identyfikacyjna
- 49 Lista kontrolna interpretacji i końcowa powtórka

Wprowadzenie

Ten podręcznik powstał, aby w przystępny i praktyczny sposób przedstawić interpretację testów biochemicznych i podłoży hodowlanych wykorzystywanych w diagnostyce mikrobiologicznej.

1 Cel podręcznika

- zrozumienie zasad interpretacji testów biochemicznych
- rozpoznawanie wyników dodatnich i ujemnych
- łączenie testów z różnicowaniem drobnoustrojów
- szybkie powtórki przed zajęciami i egzaminem



2 Jak korzystać z materiału

- 1 sprawdź nazwę testu
- 2 poznaj zasadę reakcji
- 3 porównaj wynik dodatni i ujemny
- 4 połącz wynik z identyfikacją drobnoustroju



3 Legenda oznaczeń

DODATNI ✓

UJEMNY ✗

Zasada / informacja

Zapamiętaj

Porównanie / podsumowanie



Kolor nigdy nie jest jedynym wskaźnikiem wyniku — zawsze sprawdzaj opis obserwacji.

Moduł 01

Podstawy interpretacji testów

Ten moduł wprowadza podstawowe zasady odczytu i interpretacji reakcji biochemicznych oraz pokazuje, jak przejść od obserwacji do profilu identyfikacyjnego.

- 05 | Czym są testy biochemiczne?
- 06 | Jak odczytywać wynik dodatni i ujemny?
- 07 | Kontrole, warunki badania i najczęstsze błędy
- 08 | Od próbki do profilu identyfikacyjnego
- 09 | Mapa reakcji biochemicznych



Czym są testy biochemiczne?

Testy biochemiczne to proste, ale bardzo przydatne narzędzia laboratoryjne, które pozwalają ocenić cechy metaboliczne drobnoustrojów i wykorzystać je w procesie identyfikacji.



Definicja

Testy biochemiczne oceniają aktywność enzymatyczną i metaboliczną drobnoustrojów.



Co mogą wykrywać?

- obecność enzymu
- wykorzystanie substratu
- wytwarzanie kwasu lub gazu
- redukcję wybranych związków



Po co się je wykonuje?

- różnicowanie podobnych mikroorganizmów
- potwierdzanie cech identyfikacyjnych
- tworzenie profilu identyfikacyjnego



Schemat działania testu biochemicznego



drobnoustrój



reakcja



obserwacja



interpretacja



identyfikacja



Jak odczytywać wynik dodatni i ujemny?

Wynik testu biochemicznego wskazuje na obecność lub brak określonej cechy metabolicznej u badanego drobnoustroju. Poniżej przedstawiono typowe różnice w wyglądzie reakcji.

DODATNI ✓

UJEMNY ✗

zmiana barwy



Widoczna zmiana barwy podłoża (np. z czerwonej na żółtą, z bezbarwnej na różową).



Brak zmiany barwy – podłoże pozostaje w kolorze wyjściowym (np. czerwone, niebieskie, bezbarwne).

pęcherzyki / gaz



Widoczne pęcherzyki gazu w podłożu, czasem z uniesieniem słupka w rurce Durhama.



Brak pęcherzyków gazu – podłoże bez przebarwień i bez wypełnienia rurki Durhama.

skrzeplina lub halo



Obecna skrzeplina (np. w teście na koagulację) lub wyraźne halo/obwódka (np. w teście na lipazę).



Brak skrzepliny – podłoże pozostaje płynne, brak widocznego halo wokół kolonii lub na podłożu.

wzrost / brak wzrostu



Widoczny wzrost mikroorganizmów (w postaci kolonii, zmętnienia lub warstwy na podłożu).



Brak wzrostu – podłoże pozostaje jałowe, bez kolonii i zmętnienia.



Zawsze interpretuj wynik zgodnie z zasadą konkretnego testu.

Rodzaj testu, skład podłoża, czas inkubacji oraz warunki hodowli mają kluczowe znaczenie dla prawidłowej interpretacji wyniku.



Ten sam kolor nie oznacza tego samego wyniku we wszystkich testach.

Wpływ na interpretację ma specyfika danego testu, np. odczynnik użyty w teście, pH podłoża czy badana cecha metaboliczna. Zawsze sprawdź opis testu w instrukcji lub literaturze.

Kontrole, warunki badania i najczęstsze błędy

Wiarygodne wyniki zaczynają się od dobrych praktyk.

1 Kontrole

+

kontrola dodatnia
potwierdza, że test działa

-

kontrola ujemna
pomaga wykluczyć wynik fałszywy



2 Warunki badania



świeża hodowla
zwykle 18–24 h, odpowiedni
wzrost na właściwym podłożu



właściwy odczynnik
sprawdzona jakość,
nieprzeterminowany



czas odczytu
zgodny z instrukcją danego
testu (np. 5–60 min)



temperatura
najczęściej 35–37°C,
zgodnie z procedurą



prawidłowa ilość materiału
odpowiednia gęstość zawiesiny
lub ilość inokulum

3 Najczęstsze błędy

Błąd	Konsekwencja / na co zwrócić uwagę
! zbyt stara hodowla	może dawać słabe, opóźnione lub fałszywe reakcje
! odczyt po niewłaściwym czasie	wynik może być nieprawidłowy (np. fałszywie dodatni lub fałszywie ujemny)
! zanieczyszczenie materiału	ryzyko uzyskania wyniku trudnego do interpretacji
! brak kontroli	brak pewności, czy test i odczynniki działały prawidłowo
! błędna interpretacja koloru	może prowadzić do niewłaściwej identyfikacji – porównuj z wzorcem i odczytuj w odpowiednim świetle

Od próbki do profilu identyfikacyjnego

Kolejne etapy pracy w diagnostyce mikrobiologicznej – od materiału klinicznego do rozpoznania drobnoustroju na podstawie cech fenotypowych.

1



Próbka

Pobranie odpowiedniego materiału klinicznego (z zachowaniem zasad aseptyki).

2



Posiew

Naniesienie próbki na odpowiednie podłoże hodowlane i inkubacja.

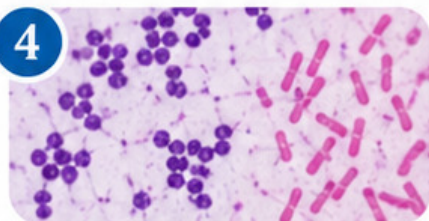
3



Ocena kolonii

Analiza wyglądu kolonii (wielkość, kształt, barwa, połysk, hemoliza).

4



Barwienie Grama

Określenie przynależności do bakterii Gram-dodatnich lub Gram-ujemnych oraz wstępna ocena morfologii.

5



Dobór testów

Wybór odpowiednich testów biochemicznych na podstawie wstępnych cech drobnoustroju.

6



Odczyt wyników

Interpretacja dodatnich i ujemnych reakcji w testach biochemicznych.

7

Test	Wynik
Katalaza	+
Oksydaza	-
Ureaza	-
Indol	+
Cytrynian	-

Profil identyfikacyjny

Zestawienie wyników w spójny profil biochemiczny drobnoustroju.

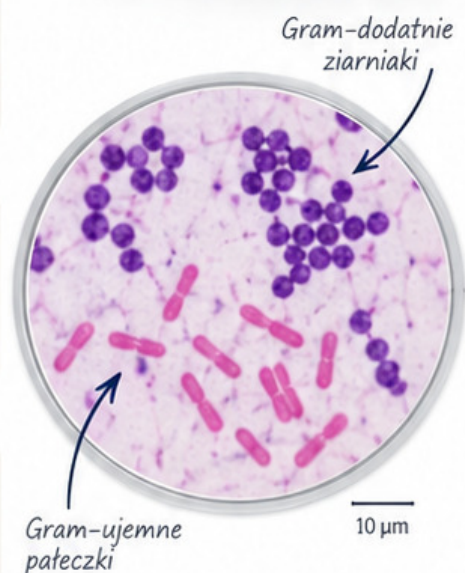
8

Escherichia coli

- ✓ Gram-ujemne pałeczki
- ✓ Katalaza +
- ✓ Oksydaza -
- ✓ Ureaza -
- ✓ Indol +

Różnicowanie drobnoustroju

Porównanie profilu z kluczami identyfikacyjnymi i określenie najbardziej prawdopodobnego gatunku.



Mapa reakcji biochemicznych



Zapamiętaj!

Testy biochemiczne pozwalają wykryć aktywność enzymów i określić szlaki metaboliczne drobnoustrojów. Wyniki testów tworzą profil, który pomaga w identyfikacji bakterii.



Testy enzymatyczne

Wykrywają aktywność określonych enzymów.

- katalaza** rozkład H_2O_2 (wydzielanie O_2)
- oksydaza** obecność cytochromu c-oksydazy
- koagulaza** koagulacja osocza (*S. aureus*)
- ureaza** rozkład mocznika do NH_3
- DNaza** hydroliza DNA
- PYR** aktywność pyrrolidonylarylamidazy



Testy metaboliczne

Ocena przemian metabolicznych drobnoustrojów.

- cytrynian** wykorzystanie cytrynianu jako jedyne źródła węgla
- MR** produkcja stabilnych kwasów (fermentacja glukozy)
- VP** produkcja acetoiny (szlak 2,3-butanodiolowy)
- redukcja azotanów** redukcja NO_3^- do NO_2^- , N_2 lub NH_3
- TSI** fermentacja glukozy/laktozy/sacharozy, produkcja gazu i H_2S
- fermentacja węglowodanów** ocena zdolności do fermentacji cukrów
- dekarboksylazy** odszczepienie CO_2 z aminokwasów (np. lizyna, ornityna, arginina)

Reakcje biochemiczne

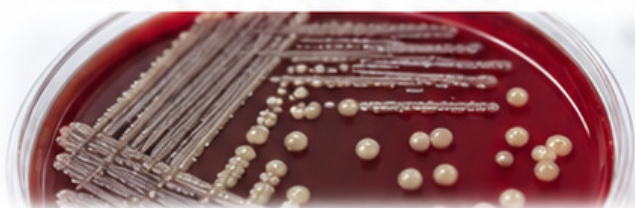
Zestaw reakcji pozwalających ocenić właściwości enzymatyczne, metaboliczne i fenotypowe drobnoustrojów.



Ocena cech dodatkowych

Analiza innych cech fenotypowych i hodowlanych.

- ruchliwość** zdolność do aktywnego ruchu (np. w miękkim agarze)
- wygląd kolonii** wielkość, kształt, barwa, powierzchnia, brzegi
- hemoliza** rozkład krwinek na agarze z krwią (α , β , γ)
- wzrost na podłożu** ocena tolerancji i wymagań pokarmowych (np. sól, pH, selektywność)



Zastosowanie

Wykorzystanie wyników testów w identyfikacji bakterii.

- różnicowanie Gram-dodatnich** np. katalaza, koagulaza, PYR
- różnicowanie Gram-ujemnych** np. oksydaza, TSI, cytrynian
- profil Enterobacterales** zestaw testów metabolicznych do identyfikacji rodzajów i gatunków



Cel

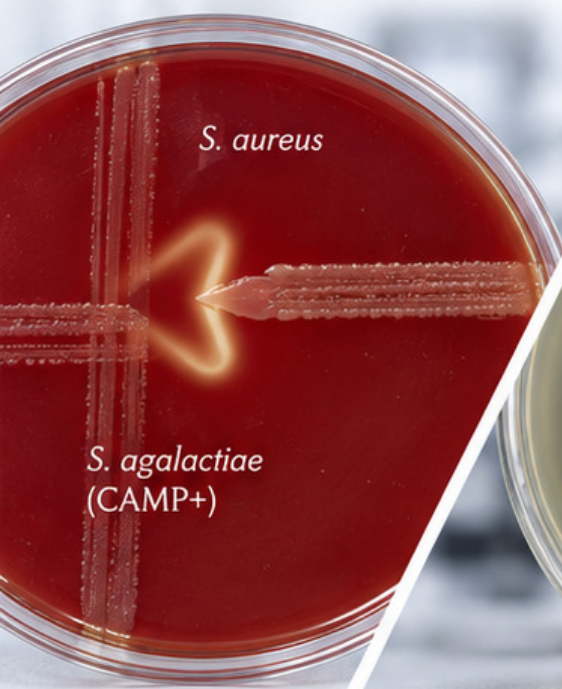
Zastosowanie odpowiedniego zestawu testów pozwala krok po kroku zawęzić możliwe warianty i postawić dokładniejszą diagnozę mikrobiologiczną.

Moduł 02

Testy enzymatyczne i szybkie

Ten moduł prezentuje najczęściej stosowane szybkie testy wykorzystywane w identyfikacji bakterii oraz pokazuje, jak rozpoznawać wynik dodatni i ujemny.

- 11 | Test katalazowy
- 12 | Test oksydazowy
- 13 | Test koagulazowy
- 14 | Test ureazowy
- 15 | Test indolowy
- 16 | Test DNazowy
- 17 | Test PYR
- 18 | Test CAMP
- 19 | Porównanie testów szybkich



Test katalazowy

Szybki test wykrywający obecność enzymu katalazy poprzez rozkład nadtlenku wodoru z wydzielaniem tlenu.

1 Zasada

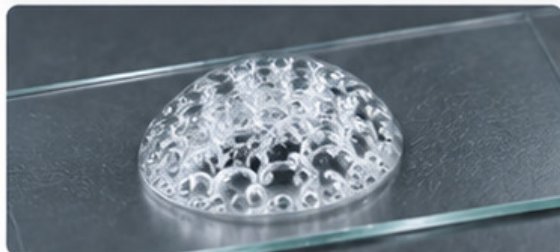
Katalaza rozkłada H_2O_2 do H_2O i O_2 . Wynikiem dodatnim są widoczne pęcherzyki gazu.

2 Jak wykonać?

- kolonię nanieś na szkiełko
- dodaj kroplę 3% H_2O_2
- obserwuj reakcję natychmiast

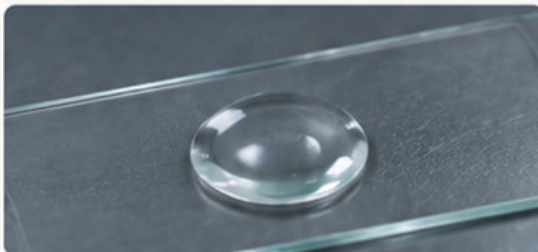
3 Wynik

DODATNI ✓



natychmiastowe pęcherzyki /
musowanie

UJEMNY ✗



brak pęcherzyków lub
reakcja śladowa

4 Znaczenie

- Staphylococcus spp. zwykle +
- Streptococcus spp. zwykle –
- pomaga w różnicowaniu ziarniaków Gram-dodatnich

5 Uwaga



Nie pobieraj kolonii bezpośrednio z agaru z krwią, ponieważ krwinki mogą dawać wynik fałszywie dodatni.

Test oksydazowy

Test służy do wykrywania obecności cytochromu c oksydazy w komórce bakteryjnej.



Zasada

Po kontakcie z odczynnikiem oksydazowym bakterie oksydazo-dodatnie wytwarzają ciemnofioletowe zabarwienie.



Jak wykonać?

- 1 na bibułę lub dysk nanieś badaną kolonię
- 2 użyj drewnianego patyczka lub plastikowej wymazówki
- 3 odczytaj wynik w ciągu 10–30 sekund



Wynik

DODATNI ✓



pojawia się fioletowe / ciemnofioletowe zabarwienie

UJEMNY ✗



brak zabarwienia lub zmiana dopiero po długim czasie



Znaczenie

- *Pseudomonas* spp. zwykle +
- *Neisseria* spp. zwykle +
- *Enterobacterales* zwykle –



Uwaga

Późne przebarwienie nie powinno być interpretowane jako wynik dodatni.



Test koagulazowy

Koagulaza pomaga różnicować wybrane gatunki rodzaju *Staphylococcus*.



Zasada

Test wykrywa zdolność drobnoustroju do wytwarzania koagulazy. Enzym ten jest związany ze zdolnością do wywoływania reakcji prowadzącej do powstania skrzepu w odpowiednim układzie testowym.



Główne zastosowanie

Klasyczne zastosowanie: różnicowanie *Staphylococcus aureus* od wielu gronkowców koagulazo-ujemnych.



Wynik

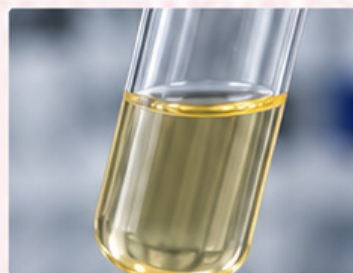
DODATNI ✓



obecny skrzep /
reakcja koagulacyjna

KOAGULAZA (+)

UJEMNY ✗



brak skrzepu /
brak reakcji
koagulacyjnej

KOAGULAZA (-)



Porównanie

- *Staphylococcus aureus*
Katalaza: + | Koagulaza: +
- *Staphylococcus epidermidis*
Katalaza: + | Koagulaza: -



Koagulaza związana i wolna

- niektóre metody wykrywają reakcję związaną z powierzchnią komórki
- inne oceniają aktywność prowadzącą do powstawania skrzepu
- wynik interpretuj zgodnie z zastosowaną metodą

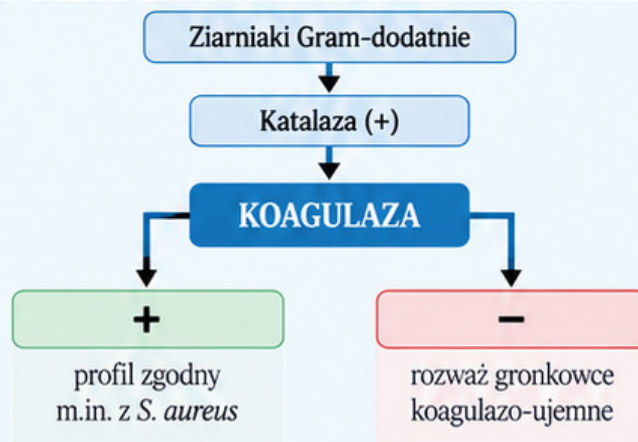


Pułapka

Nie każdy gronkowiec koagulazo-dodatni powinien być identyfikowany wyłącznie na podstawie tego jednego testu.



Schemat różnicowania



Zapamiętaj

Katalaza kieruje do gronkowców. Koagulaza pomaga dalej zawęzić identyfikację.



Test ureazowy

Test ocenia zdolność bakterii do rozkładu mocznika dzięki obecności ureazy.

1 Zasada



Ureaza rozkłada mocznik do amoniaku, co zwiększa pH i powoduje zmianę barwy wskaźnika.

2 Podłoże / odczyn



Najczęściej wykorzystuje się podłoże Christensena.

3 Wynik

DODATNI ✓



podłoże staje się różowe / fuksjowe

UJEMNY ✗



brak zmiany barwy — podłoże pozostaje żółtawe lub jasne

4 Znaczenie



- *Proteus* spp. zwykle silnie +
- *Klebsiella* spp. często +
- *Escherichia coli* zwykle –

5 Uwaga



Zawsze porównuj wynik z kontrolą i odczytuj go w zalecanym czasie inkubacji.



Test indolowy

Test pozwala ocenić, czy bakteria rozkłada tryptofan z wytworzeniem indolu.



Zasada

Po inkubacji dodaje się odczynnik Kovacsa lub Ehrlicha. Obecność indolu daje czerwony pierścień w górnej warstwie.



Wynik

DODATNI ✓



czerwony /
czerwono-różowy
pierścień
na powierzchni

UJEMNY ✗



brak czerwonego
pierścienia —
warstwa pozostaje
żółta lub jasna



Znaczenie

- *Escherichia coli* zwykle +
- *Proteus vulgaris* zwykle +
- *Klebsiella pneumoniae* zwykle –



Jak interpretować?

- oceń tylko górną warstwę po dodaniu odczynnika
- porównaj z kontrolą
- nie mieszaj próbki po dodaniu odczynnika



Uwaga

Najważniejszą obserwacją jest kolor pierścienia na powierzchni, a nie całej objętości podłoża.

Test DNazowy

Test służy do wykrywania zdolności bakterii do hydrolizy DNA dzięki obecności deoksyrybonukleazy.



Zasada

Bakterie produkujące DNazę rozkładają DNA w podłożu, co tworzy strefę przejaśnienia lub odbarwienia wokół wzrostu.



Podłoże

Wykorzystuje się agar DNase, czasem z dodatkiem wskaźnika barwnego.



Wynik

DODATNI ✓



widoczne halo /
strefa przejaśnienia
wokół kolonii

UJEMNY ✗



brak strefy
wokół wzrostu



Znaczenie

- *Staphylococcus aureus* często +
- wiele gronkowców koagulazo-ujemnych zwykle –



Uwaga

Oceniamy strefę wokół kolonii,
a nie sam kolor wzrostu.

Test PYR

Test wykrywa aktywność enzymu pyrrolidonylarylamidazy i jest użyteczny w szybkiej identyfikacji wybranych bakterii Gram-dodatnich.



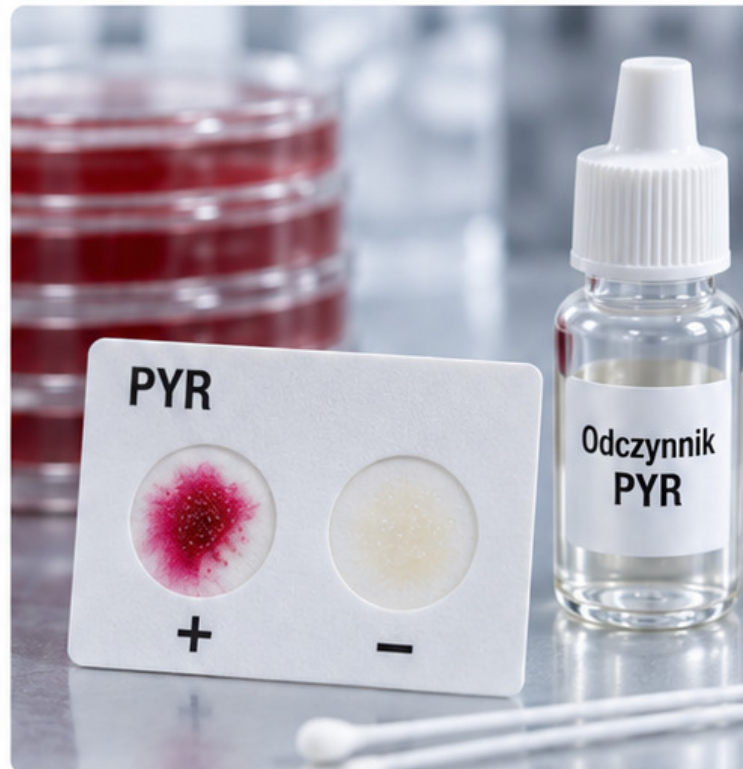
Zasada

Po hydrolizie substratu i dodaniu odczynnika wynik dodatni przyjmuje czerwone lub wiśniowoczerwone zabarwienie.



Jak wykonać?

- 1 na dysk lub podłoże PYR nanieś badaną kolonię
- 2 dodaj odpowiedni odczynnik
- 3 odczytaj wynik po krótkim czasie



Wynik

DODATNI ✓



czerwone /
wiśniowoczerwone
zabarwienie

UJEMNY ✗



brak czerwonej
barwy — wynik
żółtawy lub
bezbarny



Znaczenie

- *Enterococcus* spp. zwykle +
- *Streptococcus pyogenes* zwykle +
- większość innych paciorkowców zwykle –



Uwaga



Zbyt późny odczyt może utrudnić interpretację.

Test CAMP

Test CAMP pomaga wykryć czynnik CAMP poprzez nasilenie hemolizy w obecności szczepu wskaźnikowego *Staphylococcus aureus*.



Zasada

Na agarze z krwią szczep badany wysiewa się prostopadle do linii *S. aureus*. Dodatni wynik daje strzałkowate nasilenie hemolizy.



Jak wykonać?

- na agarze z krwią wysiej linię *S. aureus*
- badany szczep wysiej prostopadle
- pozostaw niewielki odstęp między liniami



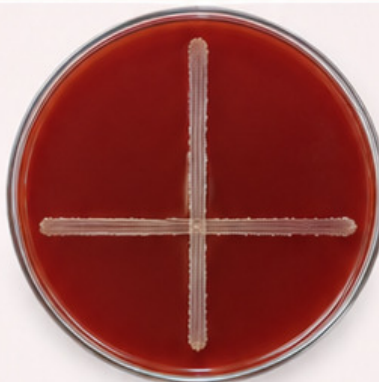
Wynik

DODATNI ✓



strzałkowata
strefa nasilonej
hemolizy

UJEMNY ✗



brak
charakterystycznej
strefy



Znaczenie

- *Streptococcus agalactiae* zwykle +
- pomaga w różnicowaniu paciorkowców β -hemolizujących



Uwaga

Linie nie powinny się stykać,
ponieważ utrudnia to ocenę reakcji.

8 testów — jedna mapa do szybkiej powtórki

Nie zapamiętuj testów osobno. Porównuj: co wykrywają, jak wyglądają i do czego służą.



Test	Co wykrywa?	Typowy sygnał wyniku dodatniego	Przykład zastosowania
Katalazowy	katalazę	pęcherzyki	<i>Staphylococcus</i> vs <i>Streptococcus</i>
Oksydazowy	oksydazę cytochromową	szybka charakterystyczna barwa	<i>Enterobacterales</i> vs część bakterii oksydazo-dodatnich
Koagulazowy	koagulazę	reakcja koagulacyjna / skrzep	różnicowanie gronkowców
Ureazowy	ureazę	alkalizacja i zmiana barwy	różnicowanie bakterii ureazo-dodatnich
Indolowy	produkcję indolu z tryptofanu	charakterystyczna reakcja barwna	różnicowanie <i>Enterobacterales</i>
DNazowy	hydrolizę DNA	strefa reakcji wokół wzrostu	wspomaganie różnicowania gronkowców
PYR	określoną aktywność enzymatyczną	charakterystyczne zabarwienie	różnicowanie wybranych paciorkowców i enterokoków
CAMP	synergistyczną reakcję hemolityczną	wzmocniona hemoliza	m.in. <i>S. agalactiae</i>



Jak myśleć podczas egzaminu?

- 1 Jeśli widzisz pęcherzyki: pomyśl o katalazie.
- 2 Jeśli widzisz szybkie fioletowe zabarwienie: pomyśl o oksydazie.
- 3 Jeśli widzisz skrzep: pomyśl o koagulazie.
- 4 Jeśli podłoże silnie alkalinizuje się: pomyśl o ureazie.
- 5 Jeśli widzisz charakterystyczny pierścień reakcyjny: pomyśl o indolu.
- 6 Jeśli pojawia się strefa wokół kolonii: sprawdź, jakiego testu i podłoża dotyczy reakcja.



Nie pomył

KATALAZA — pęcherzyki

≠ KOAGULAZA — reakcja koagulacyjna

≠ CAMP — wzmocniona hemoliza

≠ DNaza — strefa hydrolizy DNA



SPRAWDŹ SIĘ

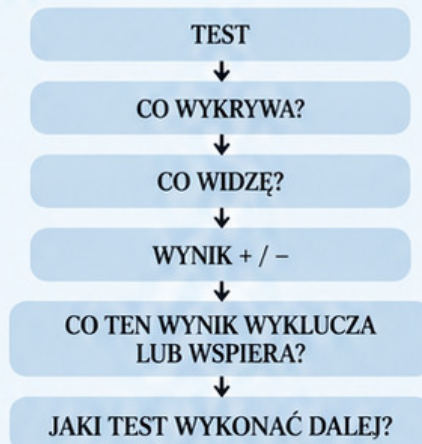
Izolat: ziarniaki Gram-dodatnie. Katalaza dodatnia. Jaki test może być logicznym kolejnym krokiem przy podejrzeniu gronkowców?

Odpowiedź:

Koagulaza — jako jeden z klasycznych testów dalszego różnicowania.



Wielka mapa końcowa



Podsumowanie modułu

Po tym module powinieneś już rozumieć, że test nie jest pojedynczym faktem do zapamiętania. Jest kolejnym pytaniem w procesie różnicowania mikroorganizmu.

➤ **Dalej:** testy metaboliczne i różnicujące — jak bakterie wykorzystują substraty i jakie produkty metabolizmu pozwalają je od siebie odróżnić. **MODUŁ 03 →**

MODUŁ 03

Testy metaboliczne i różnicujące

Jak bakterie wykorzystują substraty i jakie produkty metabolizmu pomagają w identyfikacji.

Ten moduł pomaga zrozumieć zasady działania testów metabolicznych wykorzystywanych w mikrobiologicznej diagnostyce do różnicowania bakterii. Przedstawia najczęściej stosowane testy, ich interpretację oraz znaczenie w identyfikacji drobnoustrojów.

- 21** | Test wykorzystania cytrynianu
- 22** | Test z czerwienią metylową — MR
- 23** | Test Vogesa-Proskauera — VP
- 24** | Test redukcji azotanów
- 25** | Podłoże TSI
- 26** | Fermentacja węglowodanów
- 27** | Testy dekarboksylaz aminokwasów
- 28** | Ocena ruchliwości
- 29** | Profil różnicujący *Enterobacterales*



03

Test wykorzystania cytrynianu

Czy drobnoustrój potrafi wykorzystać cytrynian jako jedyne źródło węgla?



Co wykrywa test?

Test ocenia zdolność drobnoustroju do wykorzystania cytrynianu jako jedyne źródła węgla. W trakcie wzrostu często dochodzi do alkalizacji podłoża, co powoduje zmianę barwy wskaźnika.



Podłoże

Stosuje się podłoże Simmons, zawierające cytrynian sodu jako jedyne źródło węgla, sole mineralne i wskaźnik pH (błękit bromotymolowy).



Wynik

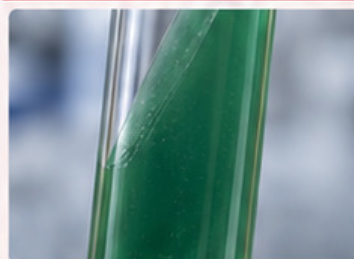
DODATNI ✓



Widoczny wzrost i niebieska barwa podłoża.

CYTRYNIAN (+)

UJEMNY ✗



Brak wzrostu. Podłoże pozostaje zielone.

CYTRYNIAN (-)



Znaczenie

- *Klebsiella* spp. często +
- *Enterobacter* spp. często +
- *Escherichia coli* zwykle –



Mini logika

Pałeczka Gram-ujemna



CYTRYNIAN



+ lub –

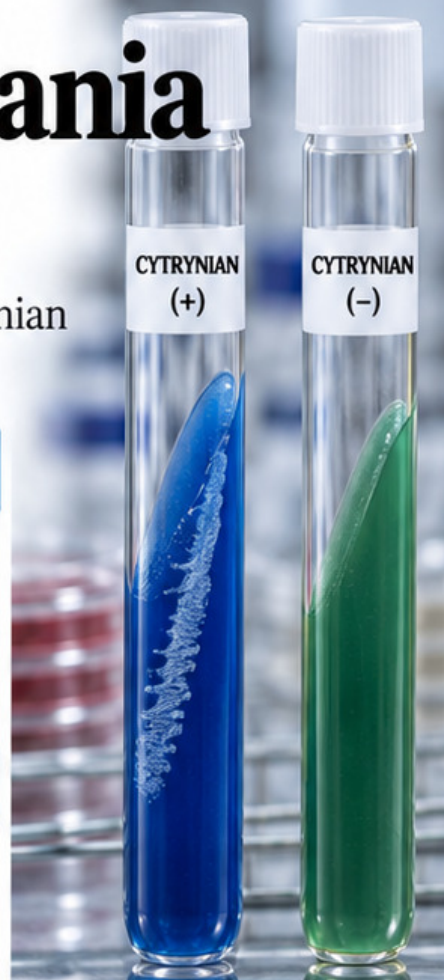
Cytrynian
(jedyne źródło węgla)



Alkalizacja
podłoża



Niebieski
wynik dodatni



Pamiętaj

Barwy podłoża nie należy interpretować bez oceny wzrostu. Tylko obecność wzrostu wraz z niebieską barwą świadczy o wyniku dodatnim.

Test z czerwienią metylową — MR

Trwałe kwaśne produkty fermentacji glukozy dają czerwony wynik.



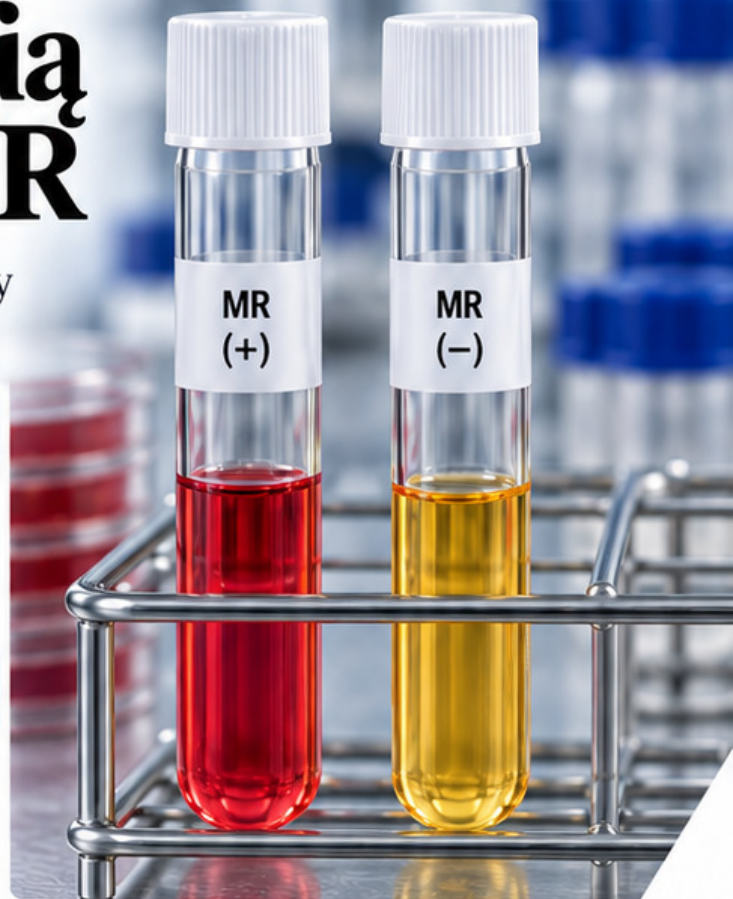
Co wykrywa test?

Test z czerwienią metylową (MR) ocenia, czy bakterie wytwarzają trwałe, kwaśne produkty końcowe fermentacji glukozy.



Zasada

Po inkubacji do hodowli bakteryjnej dodaje się odczynnik z czerwienią metylową. W środowisku kwaśnym wskaźnik przyjmuje barwę czerwoną.



Wynik

DODATNI ✓



trwała kwaśna fermentacja glukozy

MR (+)

UJEMNY ✗



brak profilu mieszanej fermentacji kwasowej

MR (-)



Znaczenie

- *Escherichia coli* zwykle +
- *Enterobacter* spp. często –
- *Klebsiella* spp. często –



MR vs VP

Test MR często daje wynik przeciwny do testu VP u niektórych bakterii, co stanowi element klasycznych profili identyfikacyjnych (np. enterobakterii).



Pamiętaj

Oceniaj barwę w odpowiednim czasie inkubacji i zawsze porównuj z kontrolą (jałowym podłożem z odczynnikiem).

Test Vogesa-Proskauera – VP

Acetoina ujawnia szlak 2,3-butanodiolowy.



Co wykrywa test?

Test Vogesa-Proskauera (VP) wykrywa acetoina powstającą w wyniku metabolizmu glukozy w szlaku 2,3-butanodiolowym.



Zasada

Po inkubacji do hodowli dodaje się odpowiednie odczynniki (α -naftol i KOH). W obecności acetoiny zachodzi reakcja, w wyniku której rozwija się charakterystyczne zabarwienie.



Wynik

DODATNI ✓



Po dodaniu odczynników w górnej części podłoża pojawia się czerwone lub różowoczerwone zabarwienie.

VP (+)

UJEMNY ✗



Brak charakterystycznego czerwonego zabarwienia. Podłoże pozostaje żółte, miedziane lub klarowne.

VP (-)



Znaczenie

- *Enterobacter* spp. często +
- *Klebsiella* spp. często +
- *Escherichia coli* zwykle –



Uwaga

Słabe, późno pojawiające się miedziane zabarwienie nie powinno być interpretowane jako wynik dodatni.



MR i VP

Testy MR i VP pozwalają różnicować drobnoustroje utilizingujące glukozę różnymi szlakami.

MR (+) VP (-)

- fermentacja mieszana (z wytworzeniem kwasów)
- np. *Escherichia coli*

MR (-) VP (+)

- szlak 2,3-butanodiolowy (z wytworzeniem acetoiny)
- np. *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp.

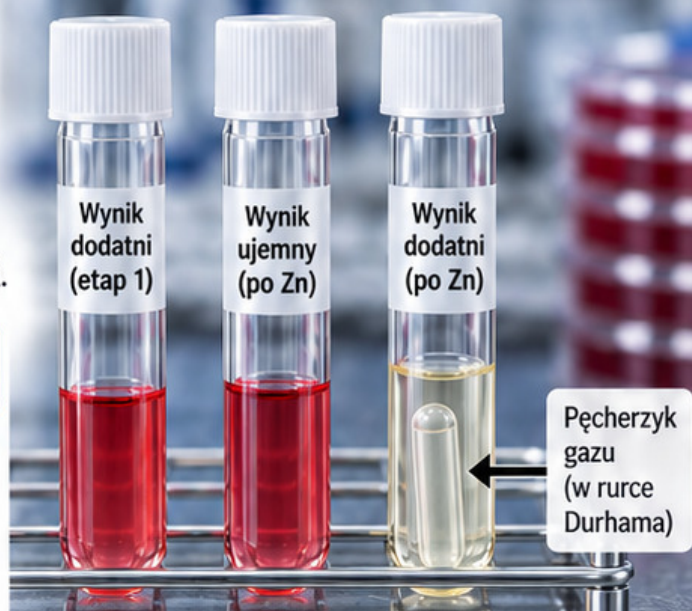
Test redukcji azotanów

Brak barwy po pierwszym etapie nie kończy interpretacji.



Co wykrywa test?

Test wykrywa zdolność mikroorganizmów do redukcji azotanów (NO_3^-) do azotynów (NO_2^-) lub dalszych produktów, takich jak tlenek azotu (NO), podtlenek azotu (N_2O), azot cząsteczkowy (N_2) lub amoniak (NH_3).



Logika testu



Przykładowe wyniki



Barwa czerwona
(po odczynnikach A i B)
— wynik dodatni
po etapie 1



Brak barwy
(po odczynnikach A i B)
— przejdź do etapu 2



DODATNI ✓

Azotany zostały zredukowane dalej do produktów końcowych, np. N_2 , N_2O lub NH_3 . Obecność pęcherzyka gazu w rurce Durhama może potwierdzać zaawansowaną redukcję.



Zapamiętaj

Brak barwy może oznaczać dwa różne wyniki — zawsze dokończ algorytm.

Podłoże TSI

Jedno podłoże, kilka informacji: cukry, gaz i H₂S.

Podłoże TSI (*Triple Sugar Iron Agar*) pozwala jednocześnie ocenić fermentację trzech cukrów (glukozy, laktozy i/lub sacharozy), produkcję gazu oraz wytwarzanie siarkowodoru (H₂S).



Co ocenia TSI?

- 1 Fermentację glukozy (0,1%).
- 2 Fermentację laktozy (1%) i/lub sacharozy (1%).
- 3 Produkcję gazu (pęknięcia, uniesienie podłoża).
- 4 Wytwarzanie siarkowodoru (H₂S).



Elementy probówki TSI



Skos (slant)

Mniej tlenu – środowisko tlenowe, ocena wykorzystania laktozy/sacharozy.

Słupek (butt)

Więcej tlenu – środowisko beztlenowe, ocena fermentacji glukozy.



Najważniejsze układy

A/A



Żółty skos, żółty słupek.

Fermentację glukozy oraz laktozy i/lub sacharozy.

Przykład:

Escherichia coli,
Klebsiella pneumoniae

K/A



Czerwony skos, żółty słupek.

Fermentacja tylko glukozy.

Przykład:

Salmonella spp.,
Shigella spp.

K/K lub K/NC



Czerwony skos, czerwony słupek (brak zmiany).

Brak fermentacji cukrów (ujemny).

Przykład:

Pseudomonas aeruginosa,
Alcaligenes spp.

H₂S / gaz



Czarny osad (H₂S) oraz/lub pęknięcia, uniesienie podłoża (gaz).

Wytwarzanie siarkowodoru i/lub gazu.

Przykład:

Salmonella Typhi (H₂S+),
Citrobacter spp.



Jak czytać wynik?

- 1 Oceń kolor skosu.
- 2 Oceń kolor słupka.
- 3 Sprawdź, czy występuje czarny osad (H₂S).
- 4 Zwróć uwagę na pęknięcia lub uniesienie (gaz).
- 5 Zinterpretuj cały układ, a nie pojedynczy kolor.



Zapamiętaj

TSI należy odczytywać **jako wzór kolorów i dodatkowych cech (oznaki gazu i H₂S), nie jako pojedynczą barwę.**

Fermentacja węglowodanów

Zmiana barwy i gaz pokazują, czy bakteria fermentuje dany cukier.



Co ocenia test?

Test ocenia, czy dany węglowodan jest fermentowany przez badaną bakterię oraz czy w wyniku fermentacji powstaje kwas i/lub gaz.



Przykłady wyników

DODATNI ✓ — kwas



Zmiana barwy podłoża wskazuje na produkcję kwasu.

DODATNI ✓ — kwas + gaz



Zmiana barwy podłoża oraz obecność pęcherzyka gazu w rurce Durham.

UJEMNY ✗



Brak charakterystycznej reakcji kwasowej i brak gazu w rurce Durham.



Przykłady badanych węglowodanów

- glukoza
- laktoza
- sacharoza
- mannitol



Znaczenie

Wzorce fermentacji węglowodanów pomagają w różnicowaniu spokrewnionych mikroorganizmów.



Zapamiętaj

Dokładne barwy zależą od rodzaju podłoża, dlatego każdy wynik należy odczytywać na podstawie opisu obserwacji **wraz z kolorem**, a nie wyłącznie koloru.

Testy dekarboksylaz aminokwasów

Lizyna, ornityna i arginina pomagają różnicować podobne bakterie.



Co oceniają?

Testy dekarboksylaz aminokwasów oceniają zdolność bakterii do dekarboksylacji wybranych aminokwasów (lizyny, ornityny lub argininy) z wytworzeniem amin. W podłożu obecna jest glukoza, która ulega fermentacji, powodując wstępne zakwaszenie (żółta barwa). Jeżeli dana dekarboksylaza jest obecna, powstają zasadowe aminy i pH ponownie rośnie (fioletowa barwa).

glukoza



wstępne
zakwaszenie
(pH ↓)



jeżeli obecna
dekarboksylaza,
pH ponownie rośnie
(pH ↑)



Wynik i zastosowanie

Lizyna (LDC)



Ujemny
(pH kwaśne)

Dodatni
(pH zasadowe)

Test lizynowej dekarboksylazy (LDC) pomaga różnicować wiele gatunków z rodziny *Enterobacterales*, np. rozróżnianie *Escherichia coli* (–) od *Klebsiella* spp. (+).

Ornityna (ODC)



Ujemny
(pH kwaśne)

Dodatni
(pH zasadowe)

Test ornitynowej dekarboksylazy (ODC) wykorzystuje się m.in. do różnicowania rodzajów w obrębie *Enterobacterales*, np. odróżniania *Enterobacter* spp. (+) od *Klebsiella* spp. (–).

Arginina (ADC)



Ujemny
(pH kwaśne)

Dodatni
(pH zasadowe)

Test argininowej dekarboksylazy (ADC) jest przydatny m.in. w różnicowaniu niektórych gatunków, np. *Proteus* spp. (+) od większości innych *Enterobacterales* (–).



Znaczenie

Reakcje dekarboksylacji aminokwasów są cenną cechą wykorzystywaną w różnicowaniu bakterii z rzędu *Enterobacterales*, szczególnie w połączeniu z innymi testami biochemicznymi.



Pamiętaj

Prawidłowa interpretacja wyników zależy od odpowiednich warunków inkubacji i użytego systemu testowego. Testy dekarboksylaz prowadzi się zwykle w warunkach beztlenowych, z warstwą oleju mineralnego (nakładką), która zapobiega ponownemu zakwaszeniu podłoża.

Ocena ruchliwości

Sposób rozprzestrzeniania wzrostu w miękkim agarze pokazuje, czy bakteria jest ruchliwa.



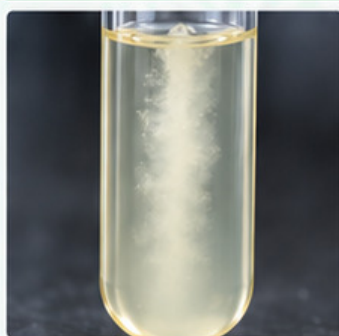
Co oceniamy?

Zdolność bakterii do poruszania się, czyli oddalania od miejsca wkłucia w miękkim agarze (półpłynnym podłożu).



Wynik

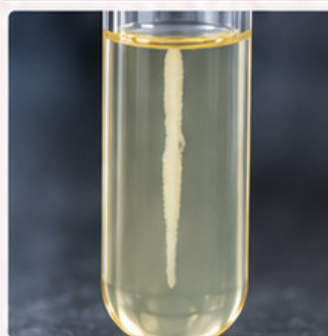
DODATNI ✓



Wzrost rozprzestrzenia się od linii wkłucia, ma charakter mglisty (dyfuzyjny).

RUCHLIWOŚĆ (+)

UJEMNY ✗



Wzrost ogranicza się do linii wkłucia, brak rozprzestrzeniania się w podłożu.

RUCHLIWOŚĆ (-)



Znaczenie

Cecha pomocna w różnicowaniu pałeczek Gram-ujemnych.

Przykłady:

- *Escherichia coli* — często ruchliwa
- *Klebsiella* spp. — często nieruchliwe
- *Shigella* spp. — zwykle nieruchliwe



Schemat postępowania

Pałeczka Gram-ujemna



Ruchliwość
(w miękkim agarze)



Dalsze różnicowanie
(np. testy biochemiczne)



Uwaga

Zbyt silny wzrost lub nieprawidłowa technika wkłucia mogą utrudniać interpretację wyniku.

Profil różnicujący Enterobacterales

Nie patrz na jeden test — patrz na wzór wyników.



Porównanie wybranych gatunków Enterobacterales

Gatunek	Laktoza (na agarze MacConkeya)	Indol	MR	VP	Cytrynian	Ureaza	Ruchliwość	H ₂ S / TSI
<i>Escherichia coli</i>	+	+	+	–	–	–	+	–
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	–	–	+	+	–	–	–
<i>Proteus mirabilis</i>	–	–	+	–	–	+	+	–
<i>Enterobacter cloacae</i>	+ / –	–	–	+	+	–	+	–
<i>Salmonella</i> spp.	–	–	+	–	+	–	+	+
<i>Shigella</i> spp.	–	–	+	–	–	–	–	–



Jak czytać profil?

Gram-ujemna pałeczka
(z obrazu mikroskopowego)



Zestaw testów biochemicznych
(np. indol, MR, VP, cytrynian, ureaza, TSI)



Profil wyników
(wzór + / –)



Zawężenie identyfikacji
(do najbardziej prawdopodobnych gatunków)



Wskazówki do interpretacji

- Patrz na cały wzór wyników, a nie na pojedynczy test.
- Uwzględniaj morfologię kolonii, np. na agarze MacConkeya (laktoza +/-).
- Testy uzupełniają się — np. indol i ureaza często rozdzielają podobne gatunki.
- Niektóre cechy (np. ruchliwość, H₂S) są szczególnie pomocne w różnicowaniu rodzajów.
- W praktyce identyfikację potwierdza się testami dodatkowymi lub metodami automatycznymi.



Nie identyfikuj po jednym teście

Jeden wynik (np. indol +) nie pozwala na pewną identyfikację gatunku. Różne bakterie mogą dawać ten sam wynik w pojedynczym teście. Zawsze analizuj kilka cech jednocześnie.



Sprawdź się

Izolat: pałeczka Gram-ujemna, indol +, MR +, VP –, cytrynian –.
Z jakim klasycznym profilem kojarzy się taki układ?



Odpowiedź

Najczęściej kojarzy się z profilem zgodnym m.in. z *Escherichia coli*.

MODUŁ 04

Podłoża hodowlane

To, gdzie bakteria rośnie i jak zmienia wygląd podłoża, daje pierwsze ważne wskazówki diagnostyczne.

Ten moduł pokazuje, jak interpretować najważniejsze podłoża stosowane w mikrobiologii. Łączy typ podłoża, charakter wzrostu, wygląd kolonii i praktyczne znaczenie diagnostyczne w jedną uporządkowaną całość.



W tym module:

- 31** | Jak rozumieć rodzaje podłoży?
- 32** | Agar z krwią
- 33** | Agar czekoladowy
- 34** | Agar MacConkeya
- 35** | Agar z mannitolem i solą
- 36** | Podłoże CLED
- 37** | Agar Sabourauda
- 38** | Agar Mueller-Hintona
- 39** | Wielka tabela porównawcza podłoży



Cele modułu:

- rozpoznawać podstawowe typy podłoży;
- łączyć wygląd kolonii z funkcją podłoża;
- rozumieć znaczenie wzrostu wybiórczego i różnicującego;
- szybko porównywać klasyczne podłoża laboratoryjne.



Agar z krwią



Agar czekoladowy



Agar MacConkeya



Agar z mannitolem i solą



Podłoże CLED



Agar Sabourauda



Agar Mueller-Hintona

Jak rozumieć rodzaje podłoży?

Nie każde podłoże odpowiada na to samo pytanie diagnostyczne.



Po co są różne podłoża?

Różne podłoża pomagają nam wykryć wzrost drobnoustrojów, ułatwić rozwój bardziej wymagających organizmów, wyselekcjonować niektóre drobnoustroje lub pokazać różnice metaboliczne między nimi. Dzięki temu możemy szybciej i dokładniej odpowiedzieć na konkretne pytanie diagnostyczne.



Agar z krwią



Główne rodzaje podłoży

Podłoże podstawowe



Wspiera ogólny wzrost wielu bakterii.

Podłoże wzbogacone



Ułatwia wzrost bardziej wymagających drobnoustrojów.

Podłoże wybiórcze



Hamuje jedne grupy i sprzyja innym.

Podłoże różnicujące



Pokazuje różnice widoczne w kolonii lub podłożu.

Podłoże wybiórczo-różnicujące



Łączy selekcję z możliwością odróżniania wyników.



Przykłady podłoży

Agar z krwią



wzbogacone / różnicujące

Agar czekoladowy



wzbogacone

MacConkey



wybiórczo-różnicujące

MSA



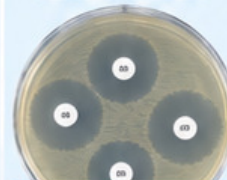
wybiórczo-różnicujące

CLED



różnicujące

Mueller-Hinton



do lekowrażliwości



Jak czytać podłoże?

Czy jest wzrost?



Jaki jest typ podłoża?



Jak wyglądają kolonie?



Czy podłoże zmieniło wygląd?



Jaki to ma sens diagnostyczny?



Pamiętaj

Najpierw rozpoznaj funkcję podłoża, dopiero potem interpretuj wygląd kolonii.

Agar z krwią

Jedno z najważniejszych podłoży do obserwacji wzrostu i hemolizy.



Agar z krwią



Co to za podłoże?

Agar wzbogacony krwią (najczęściej krwią owiec), należący do podłoży wzbogaconych. Umożliwia wzrost szerokiego spektrum bakterii i służy do obserwacji zjawiska hemolizy.



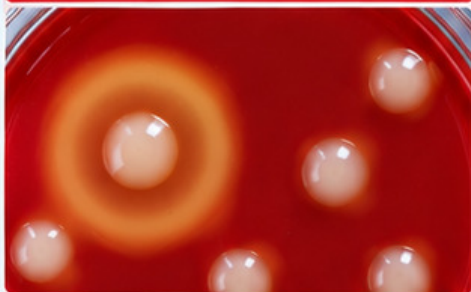
Co oceniamy?

- wzrost bakterii,
- wygląd kolonii,
- obecność hemolizy.



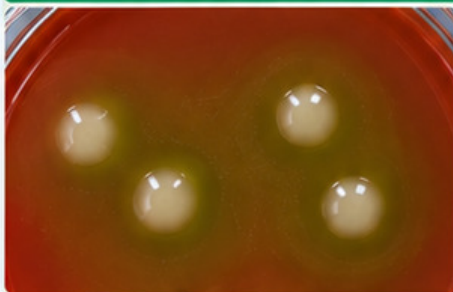
Rodzaje hemolizy

β -hemoliza



Wyraźna strefa całkowitego przejaśnienia wokół kolonii.

α -hemoliza



Zielonkawe, częściowe przeobrażenie podłoża wokół kolonii.

γ -hemoliza



Brak widocznej hemolizy wokół kolonii.



Przykłady

- *Streptococcus pyogenes* — często β
- *Streptococcus pneumoniae* — klasycznie α
- *Enterococcus* spp. — często γ



Pamiętaj

Hemoliza jest ważną wskazówką, ale nie stanowi samodzielnego pełnego rozpoznania.



Na zapamiętanie

Na agarze z krwią patrz jednocześnie na wzrost kolonii i strefę wokół nich.

Agar czekoladowy

Podłoże wzbogacone dla bardziej wymagających drobnoustrojów.



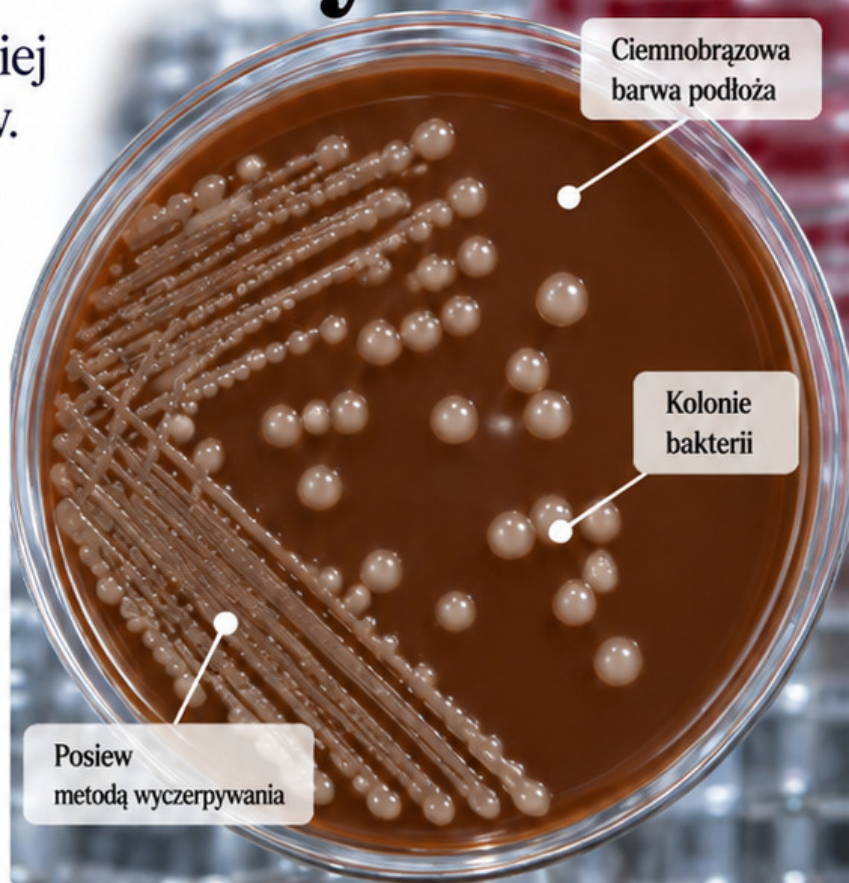
Co to za podłoże?

Agar czekoladowy to podłoże odżywcze przygotowane z ogrzewanej krwi, która ulega hemolizie, co uwalnia czynniki wzrostu niezbędne dla bardziej wymagających drobnoustrojów. Charakteryzuje się ciemno brązową barwą.



Dlaczego jest ważny?

Jest przydatny, gdy bakterie potrzebują dodatkowych czynników wzrostu, takich jak czynniki X (hemina) i V (NAD).



Co warto zapamiętać?



Wzbogacone

Sprzyja wzrostowi wymagających bakterii.



Nie służy do oceny hemolizy

Ogrzewanie krwi zmienia cechy podłoża.



Przydatne przykłady

Haemophilus spp.,
Neisseria spp.



Skąd nazwa?

Kolor podłoża przypomina czekoladę, ale podłoże nie zawiera czekolady.



Wskazówka praktyczna

Jeśli na agarze z krwią wzrost jest słaby lub trudny, agar czekoladowy może wspierać wzrost bardziej wymagających drobnoustrojów.



Pamiętaj

Kolor podłoża nie jest wynikiem dodatnim ani ujemnym — liczy się wzrost i kontekst diagnostyczny.

Agar MacConkeya

Selekcja pałeczek Gram-ujemnych i różnicowanie fermentacji laktozy.



Agar MacConkeya



Co to podłoże pokazuje?

Agar MacConkeya to podłoże selektywno-różnicujące dla pałeczek Gram-ujemnych. Zawiera sole żółciowe i fiolet krystaliczny, które hamują wzrost wielu bakterii Gram-dodatnich, a jednocześnie umożliwia ocenę fermentacji laktozy dzięki obecności laktozy i wskaźnika pH (czerwień neutralna).



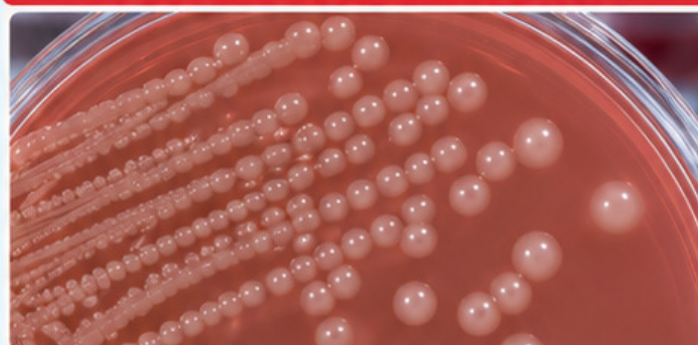
Wynik

Fermentacja laktozy (+)



Różowe / malinowe kolonie, często zabarwienie otoczenia.

Fermentacja laktozy (-)



Kolonie blade, bezbarwne lub jasne.

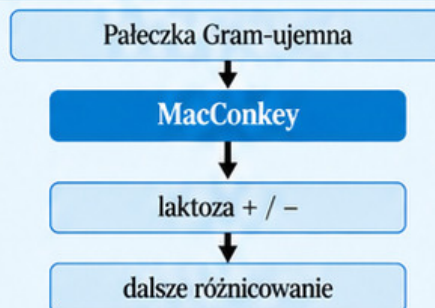


Przykłady

<i>Escherichia coli</i>		zwykle laktoza (+)
<i>Klebsiella</i> spp.		zwykle laktoza (+)
<i>Salmonella</i> spp.		zwykle laktoza (-)
<i>Shigella</i> spp.		zwykle laktoza (-)



Mini logika



Pamiętaj

Brak koloru dodatniego nie oznacza braku wzrostu — najpierw oceń, czy kolonie w ogóle są obecne.



Zapamiętaj

Na MacConkeyu patrz na dwie rzeczy: kto rośnie i czy fermentuje laktozę.

Agar z mannitolem i solą

Wysokie stężenie soli wybiera gronkowce, a mannitol pomaga je różnicować.



Dlaczego to podłoże jest szczególne?

Wysokie stężenie soli (7,5% NaCl) wybiera drobnoustroje odporne na zasolenie, przede wszystkim gronkowce (*Staphylococcus* spp.). Większość innych bakterii jest zahamowana.



Co oceniamy?

- 1 Czy drobnoustrój rośnie w obecności soli.
- 2 Czy fermentuje mannitol.



Wyniki na podłożu MSA

Mannitol (+) ✓



Żółte podłoże

Fermentacja mannitolu powoduje zakwaszenie podłoża i zmianę barwy wskaźnika na żółtą. Wokół kolonii (lub na całej płytce) widoczne żółte zabarwienie.

Mannitol (-) ✗



Brak żółknięcia

Drobnoustrój nie fermentuje mannitolu. Podłoże pozostaje różowe / czerwone (wygląd zależy od szczepu i czasu inkubacji).



Przykłady

Staphylococcus aureus

— często wzrost +, mannitol (+)



Staphylococcus epidermidis

— wzrost +, mannitol (-)



Nie pomył

Wzrost na podłożu i fermentacja mannitolu to nie to samo. Możliwy jest wzrost bez żółtej reakcji.



Pamiętaj

Najpierw oceń wzrost, potem barwę podłoża wokół kolonii.



Agar z mannitolem i solą

Podłoże CLED

Klasyczne podłoże do diagnostyki moczu i różnicowania fermentacji laktozy.



Co oznacza CLED?

Cystine-Lactose-Electrolyte-Deficient.



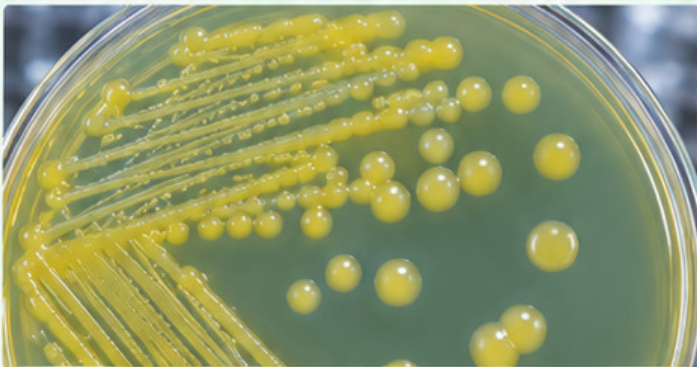
Dlaczego jest użyteczne?

- Wspomaga wzrost wielu patogenów układu moczowego.
- Umożliwia różnicowanie fermentacji laktozy.
- Pomaga ograniczyć rojenie *Proteus*, co ułatwia ocenę innych kolonii.



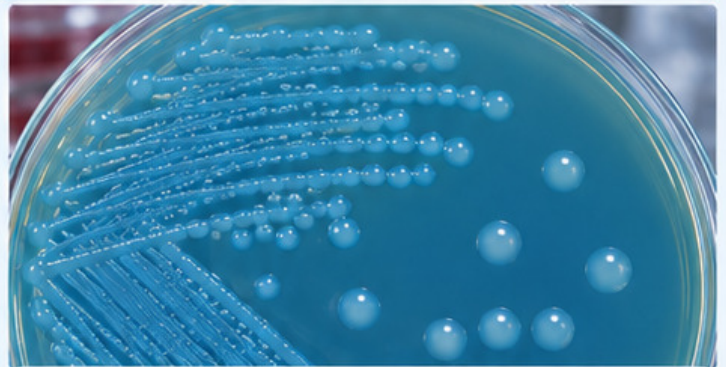
Różnicowanie fermentacji laktozy na podłożu CLED

Laktoza (+) ✓



Żółte kolonie (żółtawy obraz podłoża)
— fermentacja laktozy.

Laktoza (-) —



Kolonie niebieskie / zielonkawe
lub bez żółtego obrazu
— brak fermentacji laktozy.



Przykłady

- *Escherichia coli* — często laktoza (+)
- *Proteus* spp. — zwykle laktoza (-)
- *Pseudomonas* spp. — zwykle laktoza (-)



Wskazówka praktyczna

Ograniczenie rojenia *Proteus* ułatwia ocenę innych kolonii w posiewie moczu.



Pamiętaj

Na CLED liczy się jednocześnie:
liczba kolonii, ich typ i reakcja fermentacyjna.

Agar Sabourauda

Podłoże najczęściej kojarzone z hodowlą grzybów.



Co to za podłoże?

Kwaśne podłoże, powszechnie stosowane do hodowli grzybów, szczególnie drożdży i pleśni.



Co obserwujemy?

Obecność wzrostu oraz typ kolonii. Drożdże tworzą zwykle gładkie, kremowe kolonie, natomiast pleśnie – puszyste, włókniste, o promienistym wyglądzie.



Przykłady wzrostu na agarze Sabourauda

Drożdże



Kolonie gładkie, kremowe, wilgotne.

Przykład: *Candida* spp.

Pleśnie



Kolonie puszyste, włókniste, promieniste.

Przykład: *Aspergillus* / *Penicillium*.



Dlaczego działa?

Kwaśniejsze środowisko sprzyja izolacji grzybów i ogranicza część niepożądanego wzrostu bakteryjnego.



Pamiętaj

Wygląd kolonii sugeruje grupę drobnoustrojów, ale nie zastępuje dalszej identyfikacji.

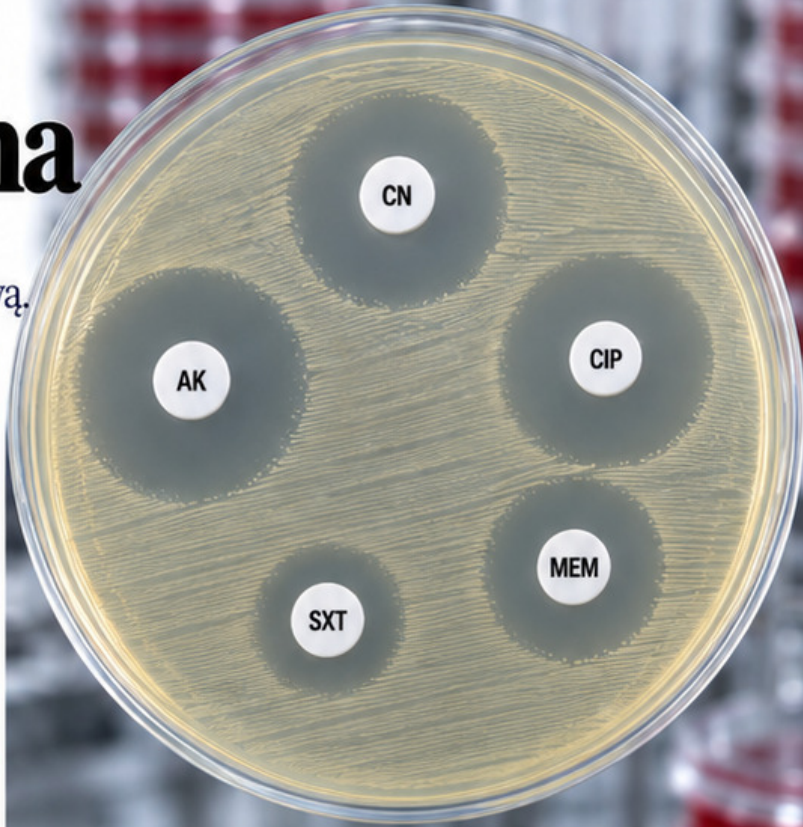


Na Sabourauda...

Patrz przede wszystkim na typ wzrostu: drożdżowy czy pleśniowy.

Agar Mueller-Hintona

Standardowe podłoże do oceny lekowrażliwości metodą dyfuzyjno-krażkową.



Agar Mueller-Hintona z krążkami antybiotykowymi



Do czego służy?

Agar Mueller-Hintona to standardowe podłoże do wykonywania testów lekowrażliwości bakterii metodą dyfuzyjno-krażkową (Kirby-Bauer), umożliwiające ocenę aktywności antybiotyków w warunkach standaryzowanych.



Co obserwujemy?

Po inkubacji widoczny jest równomierny wzrost bakterii na całej powierzchni podłoża oraz wyraźne, przejaśnione strefy zahamowania wzrostu wokół krążków z antybiotykiem.



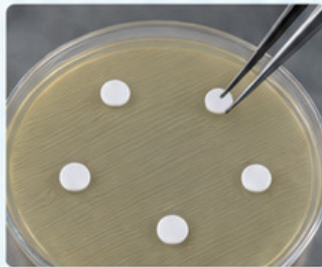
Jak czytać wynik?

1 Posiej równomiernie



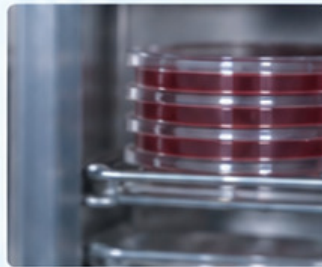
Zawiesinę bakterii rozprowadź równomiernie na całej powierzchni podłoża (tzw. „lawn”).

2 Umieść krążki antybiotykowe



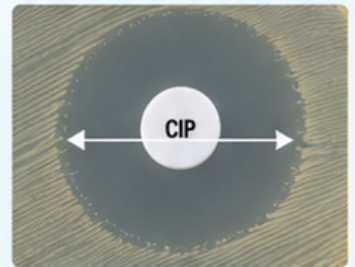
Za pomocą jałowej pęsety umieść krążki z antybiotykiem na powierzchni podłoża w odpowiednich odstępach.

3 Inkubuj



Inkubuj płytkę zwykle w 35–37°C przez 16–18 godzin (w warunkach tlenowych).

4 Oceń średnicę stref zahamowania



Zmierz średnicę stref zahamowania wzrostu (w mm) i porównaj z obowiązującymi kryteriami interpretacyjnymi (np. EUCAST, CLSI).



Pamiętaj

Większa strefa zahamowania nie zawsze oznacza automatycznie „najlepszy lek” bez odniesienia do kryteriów interpretacyjnych.



Wskazówka praktyczna

Mueller-Hinton ocenia wrażliwość, a nie identyfikuje gatunku.



Zapamiętaj

Patrz na strefę wokół krążka, nie na sam krążek.

Wielka tabela porównawcza podłoży

Nie pytaj tylko: 'na czym rośnie?'.

Pytaj: 'co dane podłoże pozwala mi zobaczyć?'.



Podłoże	Typ / funkcja	Co pomaga ocenić?	Charakterystyczny obraz	Klasyczne zastosowanie
Agar z krwią	wzbogacone / różnicujące (hemoliza)	wzrost bakterii i typ hemolizy	α – częściowa β – całkowita γ – brak hemolizy	ogólna mikrobiologia (bakterie Gram-dodatnie i Gram-ujemne)
Agar czekoladowy	wzbogacone	wzrost bakterii wymagających	brązowe podłoże i dobry wzrost drobnych kolonii	<i>Haemophilus</i> spp. <i>Neisseria</i> spp.
Agar MacConkeya	wybiórczo-różnicujące	Gram-ujemne pałeczki i fermentacja laktozy	kolonie różowe (laktoza +) lub blade (laktoza –)	<i>Enterobacterales</i> (np. <i>Escherichia</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Enterobacter</i>)
Agar z mannitołem i solą (MSA)	wybiórczo-różnicujące	wzrost w wysokim stężeniu soli (NaCl) i fermentacja mannitolu	żółte kolonie / żółte podłoże (mannitol +) lub czerwone/różowe (mannitol –)	gronkowce (np. <i>Staphylococcus aureus</i>)
Podłoże CLED	różnicujące	fermentacja laktozy i wzrost w posiewach moczu	żółte kolonie (laktoza +) lub niebieskie (laktoza –)	diagnostyka zakażeń układu moczowego
Agar Sabourauda	grzybicze (wybiórcze)	wzrost drożdży i pleśni	gładkie, kremowe kolonie drożdży lub puszyste, filamentowe pleśnie	mykologia (np. <i>Candida</i> spp., <i>Aspergillus</i> spp.)
Agar Mueller-Hintona	standardowe do lekowrażliwości	ocena wrażliwości na antybiotyki	krażki z antybiotykami i strefy zahamowania (wyraźne halo)	antybiogram (metoda dyfuzyjno-krażkowa, np. Kirby–Bauer)



3 zasady interpretacji

1

Najpierw funkcja podłoża

Zastanów się, czy podłoże jest wzbogacone, wybiórcze, różnicujące czy służy do lekowrażliwości.

2

Potem obraz wzrostu

Oceń liczbę, morfologię i barwę kolonii oraz ewentualną zmianę barwy podłoża.

3

Na końcu znaczenie diagnostyczne

Połącz obserwacje z kontekstem klinicznym i w razie potrzeby wykonaj dodatkowe testy biochemiczne.



Nie identyfikuj po jednym obrazie

Jedno podłoże rzadko daje pełną identyfikację gatunku. Ten sam obraz kolonii może dotyczyć różnych drobnoustrojów. Zawsze analizuj kilka cech jednocześnie i korzystaj z dodatkowych testów.



Schemat postępowania



MODUŁ 05

Od wyniku do różnicowania

Połącz morfologię, podłoża i testy biochemiczne w jedną logiczną ścieżkę.

Ten moduł pomaga połączyć wiedzę z poprzednich stron. Pokazuje, jak krok po kroku przejść od obserwacji do wstępnej identyfikacji, łącząc wygląd kolonii, wyniki testów biochemicznych i logiczne wnioskowanie.



W tym module:

- 41 | Ziarniaki Gram-dodatnie — ścieżka różnicowania
- 42 | Pałeczki Gram-ujemne — ścieżka różnicowania
- 43 | Oksydaza-dodatnie i oksydaza-ujemne bakterie Gram-ujemne
- 44 | Różnicowanie Enterobacterales krok po kroku
- 45 | Jak łączyć wygląd kolonii z testami biochemicznymi?
- 46 | Przypadek treningowy 01 — analiza profilu wyników
- 47 | Przypadek treningowy 02 — analiza profilu wyników
- 48 | Wielka mapa identyfikacyjna
- 49 | Lista kontrolna interpretacji i końcowa powtórka



Cele modułu:

- łączyć wyniki z kilku etapów badania;
- tworzyć proste ścieżki różnicujące;
- rozumieć, dlaczego kolejność testów ma znaczenie;
- interpretować profile ziarniaków Gram-dodatnich;
- interpretować profile pałeczek Gram-ujemnych;
- rozróżniać podstawowe grupy Enterobacterales;
- analizować wygląd kolonii razem z wynikiem testu;
- rozwiązywać krótkie przypadki treningowe;
- korzystać z końcowej mapy identyfikacyjnej jako narzędzia do szybkich powtórek.



Kluczowa idea

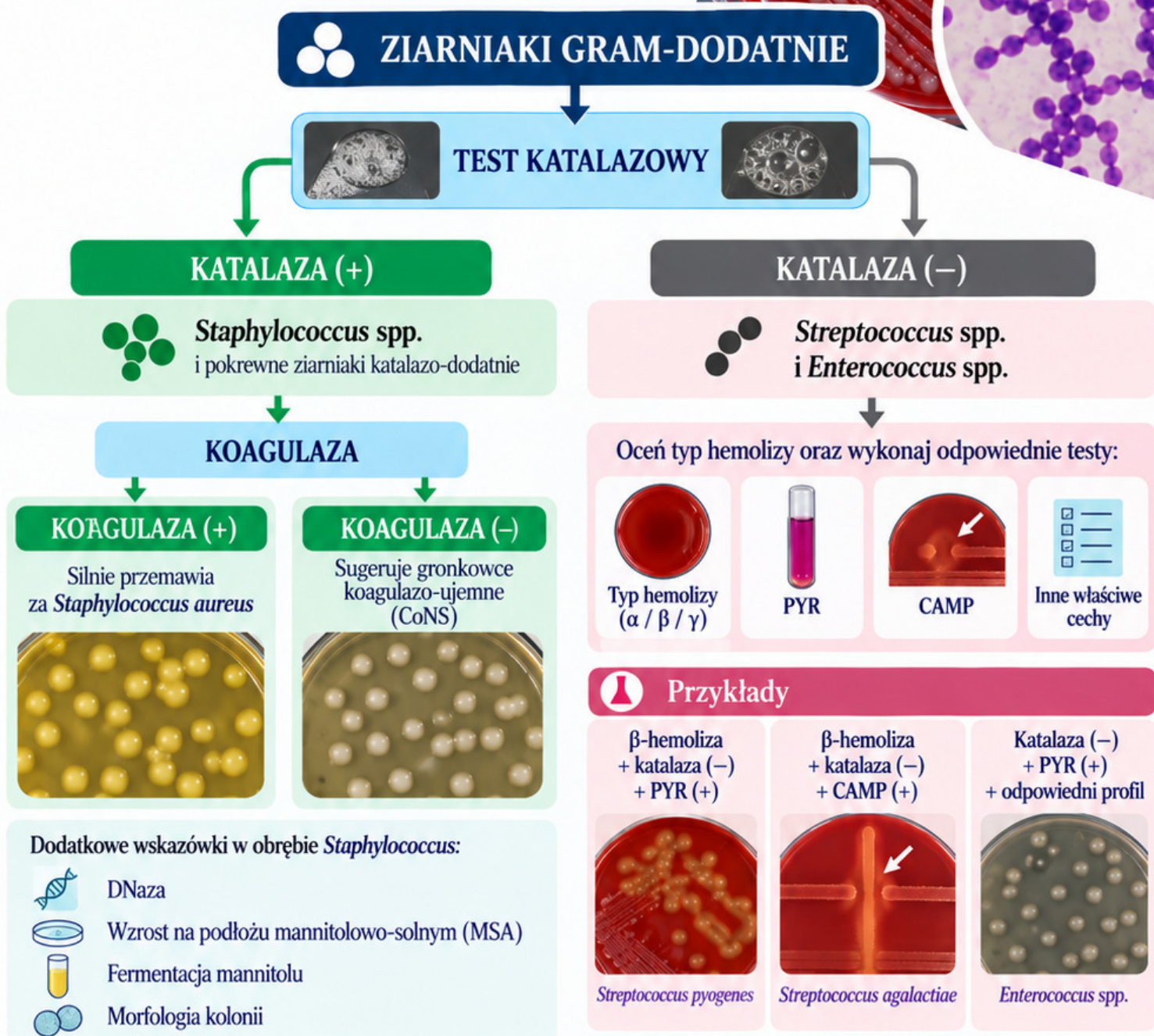


W tym module nie uczysz się nowych testów. Uczysz się podejmować decyzje na podstawie wyników, które już znasz.

Ziarniaki Gram-dodatnie

— od katalazy do właściwej grupy

Pierwszy ważny podział: katalaza dodatnia czy katalaza ujemna?



Co warto zapamiętać?

Gram-dodatni ziarniak → katalaza →
→ kolejny test zgodny z uzyskaną gałęzią.



Pamiętaj

Każde rozgałęzienie zawęża możliwości.
Ostateczna identyfikacja wymaga pełnego zestawu danych.

Pałeczki Gram-ujemne — zacznij od szerokiego podziału

Nie pytaj od razu „co to za bakteria?”.
Najpierw ustal grupę.



PAŁECZKI GRAM-UJEMNE
WZROST + MORFOLOGIA + OKSYDAZA



OKSYDAZA

OKSYDAZA (–)

Enterobacterales

Sprawdź: fermentację laktozy, indol, cytrynian, ureazę, TSI, H₂S, ruchliwość.

MacConkey:
laktoza



LAKTOZA (+/–)
(sprawdź)

Indol



(+/–)

Cytrynian



(+/–)

Ureaza



(+/–)

TSI / H₂S



(+/–)

Ruchliwość



(+/–)

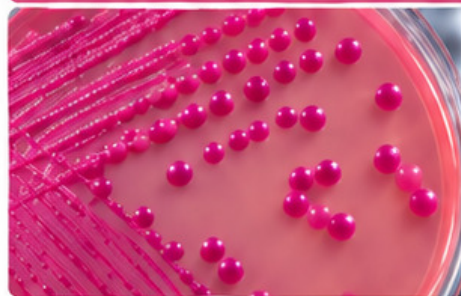
OKSYDAZA (+)

inne Gram-ujemne

- *Pseudomonas* spp.
- *Vibrio* spp.
- *Aeromonas* spp.
- inne pałeczki Gram-ujemne oksydaza-dodatnie

Wybór dalszych testów zależy od morfologii, środowiska wzrostu, charakteru kolonii i innych danych (klinicznych, epidemiologicznych).

MacConkey — LAKTOZA (+)



Najczęściej pałeczki Gram-ujemne fermentujące laktozę, np.:

- *Escherichia coli*
- *Klebsiella* spp.
- *Enterobacter* spp.

MacConkey — LAKTOZA (–)



Najczęściej, m.in.:

- *Salmonella* spp.
- *Shigella* spp.
- *Proteus* spp.
- inne pałeczki Gram-ujemne niefermentujące laktozy



Duża mapa identyfikacji — 4 kroki

GRAM-UJEMNA
PAŁECZKA



OKSYDAZA



MACCONKEY /
LAKTOZA



PROFIL
BIOCHEMICZNY



Nie pomył

- Laktoza (–) nie oznacza automatycznie *Salmonella*.
- Oksydaza (+) nie oznacza automatycznie *Pseudomonas*.



Najważniejsze

Najpierw szeroka grupa. Potem metabolizm. Na końcu profil.

Oksydaza – jedno szybkie rozgałęzienie, dwie różne ścieżki

Test oksydazowy to jeden z najszybszych sposobów wstępnego uporządkowania bakterii Gram-ujemnych.

Test oksydazowy



OKSYDAZA — UJEMNY (–)



Typowe skojarzenie: Enterobacterales

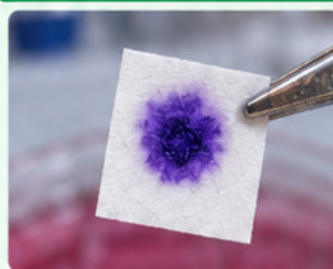
- pałeczki Gram-ujemne,
- oksydaza ujemna,
- fermentacja glukozy,
- dalsze różnicowanie na podstawie profilu metabolicznego.

Kolejne pytania w algorytmie:

Czy fermentuje laktozę? → Jaki jest wynik indolu? → Cytrynian? → Ureaza? → TSI / H₂S? → Ruchliwość?



OKSYDAZA — DODATNI (+)



Przykłady bakterii oksydazo-dodatnich:

- *Pseudomonas* spp.
- *Vibrio* spp.
- *Aeromonas* spp.
- i inne bakterie Gram-ujemne oksydazo-dodatnie.

Kolejne pytania w algorytmie:

- Czy fermentuje glukozę?
- Czy metabolizm jest fermentacyjny czy oksydacyjny?
- Jak wygląda wzrost na podłożach hodowlanych?
- Czy kolonie mają charakterystyczne cechy?
- Jakie wyniki dają odpowiednie testy uzupełniające?

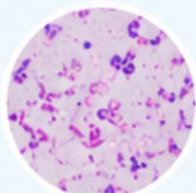


Porównanie kluczowych informacji

Cecha	Oksydaza (–)	Oksydaza (+)
Klasyczne skojarzenie	<i>Enterobacterales</i>	<i>Pseudomonas</i> , <i>Vibrio</i> , <i>Aeromonas</i> i inne bakterie oksydazo-dodatnie
Wartość testu	Szybko zawęży możliwe opcje i kieruje na typowy algorytm dla <i>Enterobacterales</i> .	Szybko wskazuje, że nie jest to typowy przedstawiciel <i>Enterobacterales</i> i kieruje na inny algorytm.
Czy wynik identyfikuje gatunek?	Nie.	Nie.



Przykładowy izolat A (oksydaza –)

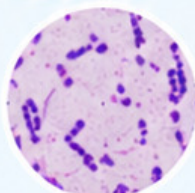


- Pałeczka Gram-ujemna.
- Oksydaza: ujemna (–).
- Laktoza: dodatnia (+).

→ Myślimy o laktozofermentującej pałeczce Gram-ujemnej z profilem zgodnym z *Enterobacterales*.



Przykładowy izolat B (oksydaza +)



- Pałeczka Gram-ujemna.
- Oksydaza: dodatnia (+).
- Brak klasycznej interpretacji laktozy dla *Enterobacterales*.

→ Kierujemy się do innej grupy bakterii (np. *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Aeromonas*) i stosujemy inny algorytm różnicowania.



NAJWAŻNIEJSZY NAWYK

„Jakie możliwości właśnie stały się mniej prawdopodobne, a jakie bardziej prawdopodobne?”

Enterobacterales – algorytm krok po kroku

Zamiast zapamiętywać siedem bakterii, przechodź przez kolejne pytania.

Agar MacConkeya

ENTEROBACTERALES

KROK 1

Czy fermentuje laktozę?

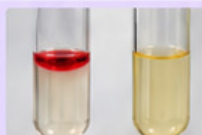
LAKTOZA (+)

Rozważ:
Escherichia coli
Klebsiella spp.
Enterobacter spp.



KROK 2A INDOL

Czy wytwarza indol?



Indol (+) Indol (-)

Indol (+)

Najczęściej
Escherichia coli
(w typowym profilu).

E. coli

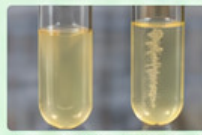
Indol (-)

Najczęściej
Klebsiella pneumoniae
lub *Enterobacter* spp.

K. pneumoniae /
Enterobacter spp.

KROK 3A RUCHLIWOŚĆ

Czy jest ruchliwa?



Ruchliwość (-) Ruchliwość (+)

Ruchliwość (-)

Wspiera
Klebsiella pneumoniae
(w połączeniu z indol -).

K. pneumoniae

Ruchliwość (+)

Może wspierać
Enterobacter spp.
lub *E. coli*
(w zależności od pozostałych
wyników).

Enterobacter spp. /
E. coli

LAKTOZA (-)

Rozważ:
Salmonella spp.
Shigella spp.
Proteus spp.



KROK 2B UREAZA

Czy wytwarza ureazę?



Ureaza (-) Ureaza (+)

Ureaza (+)

Silnie dodatnia
najczęściej wskazuje
na *Proteus* spp.

Proteus spp.

Ureaza (-)

Przejdź do Kroku 3B
(ocena H₂S i ruchliwości).

-

KROK 3B H₂S + RUCHLIWOŚĆ

Czy wytwarza H₂S i czy jest ruchliwa?



H₂S (+) H₂S (-)

H₂S (+) + ruchliwość (+)

Najczęściej odpowiada
Salmonella spp.

Salmonella spp.

H₂S (-) + ruchliwość (-)

Najczęściej odpowiada
Shigella spp.

Shigella spp.



IMViC jako szybkie wsparcie

Escherichia coli

I	M	V	C
+	+	-	-

Enterobacter / *Klebsiella*
(w klasycznym profilu edukacyjnym)

I	M	V	C
-	-	+	+

I = indol | M = MR | V = VP | C = cytrynian



Ważne

Schemat ma charakter dydaktyczny.
W rzeczywistej identyfikacji mogą występować
wyjątki, wyniki atypowe oraz konieczność
uwzględnienia dodatkowych testów i danych
(morfologia kolonii, mikroskopia, serotypizacja itp.).



Najważniejsze

Laktoza → indol / ureaza → H₂S → ruchliwość → pełny profil.

Kolonia daje wskazówkę. Test mówi, co ta wskazówka może oznaczać.

Najlepsza interpretacja powstaje wtedy, gdy obraz i biochemia opowiadają tę samą historię.

1 Co widzisz na płytce?



2 Co mówi podłoże?



Agar MacConkeya

- czy bakteria rośnie?
- czy fermentuje laktozę?



Agar z krwią

- czy występuje hemoliza?



Mannitol + sól

- czy bakteria toleruje warunki?
- czy fermentuje mannitol?

3 Co mówi biochemia?



katalaza



oksydaza



koagulaza



indol



ureaza



cytrynian



TSI



ruchliwość



WYGLĄD
KOLONII



PODŁOŻE



BIOCHEMIA



PROFIL

Przykłady interpretacji

A		MacConkey różowe kolonie (laktoza +)	→			• indol (+) • cytrynian (–) • ureaza (–)	→	Profil zgodny z: <i>Escherichia coli</i>
B		Mannitol + sól wzrost, żółta reakcja (mannitol +)	→			• katalaza (+) • koagulaza (+) • mannitol (+)	→	Profil zgodny z: <i>Staphylococcus aureus</i>
C		Agar z krwią β-hemoliza	→			• katalaza (–) • CAMP (+)	→	Profil zgodny z: <i>Streptococcus agalactiae</i>



Pamiętaj!

Morfologia kolonii nigdy nie może być jedynym kryterium identyfikacji. Zawsze łącz obraz z wynikami testów biochemicznych.

Przypadek 01

— ziarniaki Gram-dodatnie

Nie zgaduj. Przechodź przez wyniki po kolei.



Dane wyjściowe

- Barwienie Grama: ziarniaki Gram-dodatnie
- Agar z krwią: wyraźna β -hemoliza
- Katalaza: UJEMNA (-)
- CAMP: DODATNI (+)

Barwienie Grama
(ziarniaki Gram-dodatnie)

Agar z krwią
(β -hemoliza)

Test CAMP
(dodatni)



Pytania i odpowiedzi

1

Co oznacza wynik katalazy (-)?



Katalaza (-) kieruje uwagę między innymi w stronę paciorkowców i enterokoków, a nie typowych gronkowców.

2

Co mówi nam β -hemoliza?



Pokazuje wyraźną aktywność hemolityczną, ale sama nie identyfikuje gatunku.

3

Który wynik jest najbardziej pomocny?

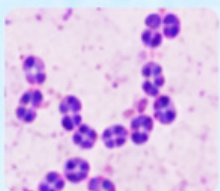


Test CAMP (+) jest kluczowy. W połączeniu z ziarniakami Gram-dodatnimi, katalazą (-) i β -hemolizą profil klasycznie wskazuje na *Streptococcus agalactiae*.



Mapa rozumowania — krok po kroku

GRAM (+)
ZIARNIAKI



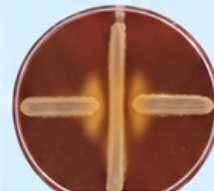
KATALAZA
(-)



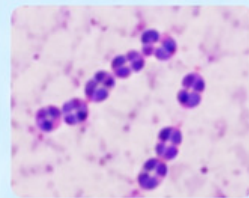
β -HEMOLIZA



CAMP
(+)



S. agalactiae



Co byłoby inaczej?

Gdyby zamiast tego wynik PYR był dodatni (PYR +), należałoby rozważyć m.in. *Streptococcus pyogenes* lub *Enterococcus* spp. — w zależności od pozostałych elementów profilu.

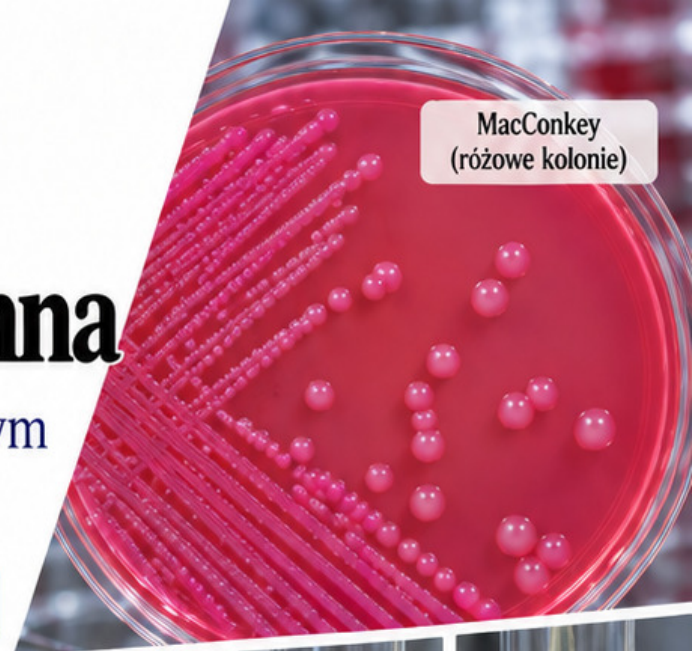


Najważniejsza lekcja:

Nie zaczynaj od nazwy organizmu.
Zacznij od pierwszego wyniku i eliminuj kolejne możliwości.

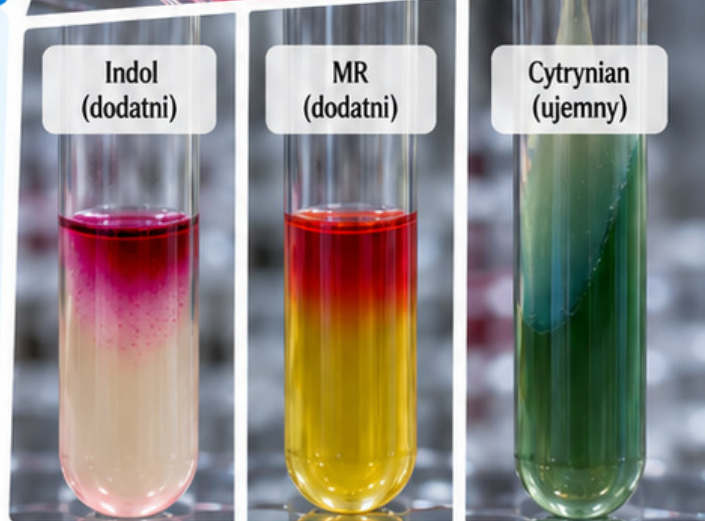
Przypadek 02 — pałeczka Gram-ujemna

Zbuduj profil zamiast polegać na jednym „charakterystycznym” wyniku.

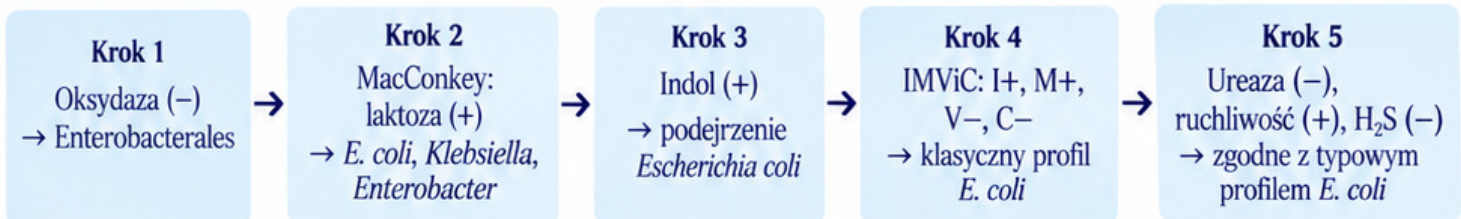


Dane wyjściowe

- Barwienie Grama: pałeczki Gram-ujemne
- Oksydaza: **UJEMNA (-)**
- MacConkey: różowe kolonie
- Indol: **DODATNI (+)**
- MR: **DODATNI (+)**
- VP: **UJEMNY (-)**
- Cytrynian: **UJEMNY (-)**
- Ureaza: **UJEMNA (-)**
- Ruchliwość: **DODATNIA (+)**
- H₂S: **UJEMNY (-)**



Krok po kroku — analiza wyników



Najbardziej prawdopodobny klasyczny profil:

Escherichia coli



Ważne:

To ćwiczenie uczy rozpoznawania profilu.
W rzeczywistej diagnostyce identyfikacja musi zostać potwierdzona metodami właściwymi dla danego laboratorium.



Pytanie do analizy:

Które dwa wyniki najszybciej odróżniłyby ten profil od typowej *Klebsiella pneumoniae*?

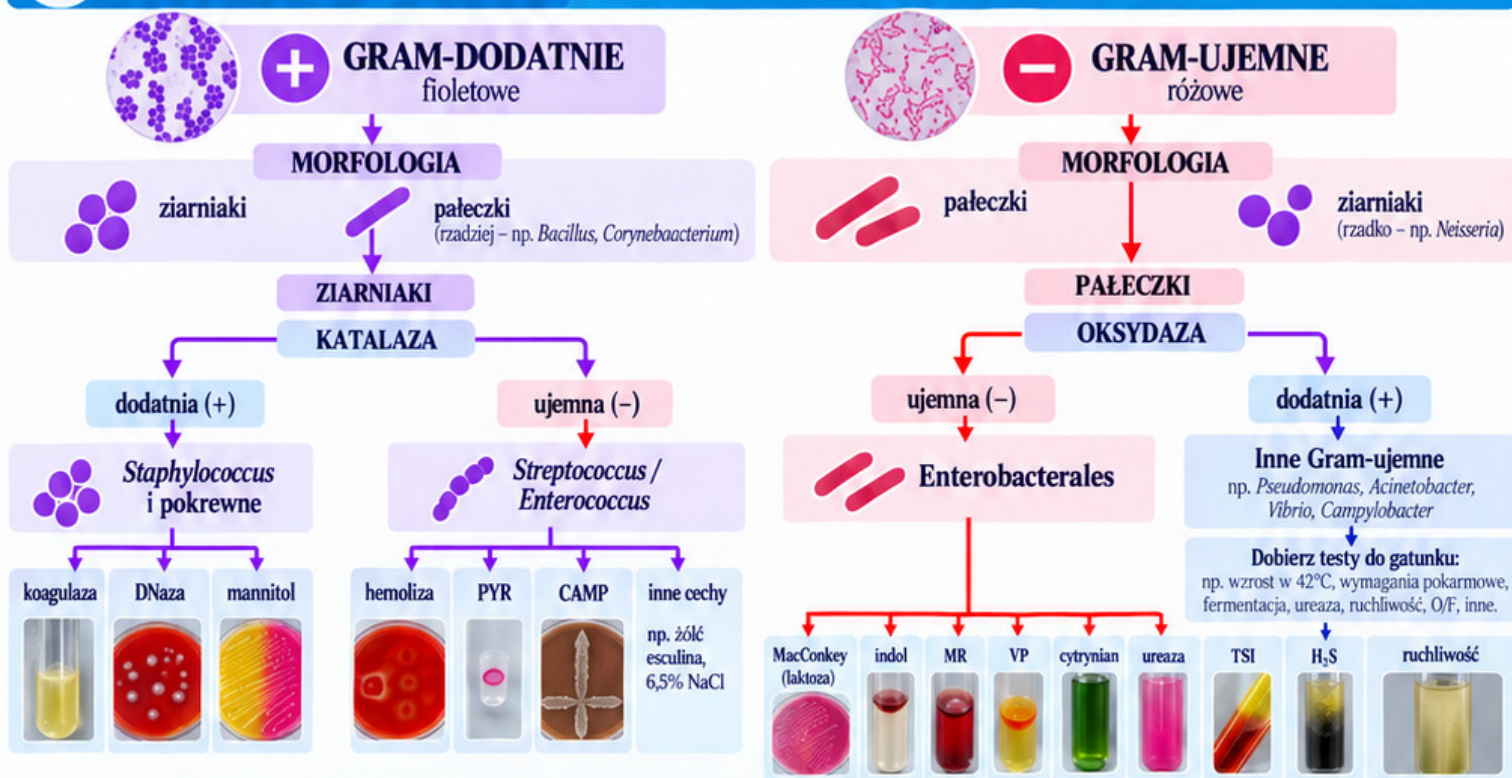
Odpowiedź:

Indol oraz ruchliwość —
przy uwzględnieniu pełnego profilu.

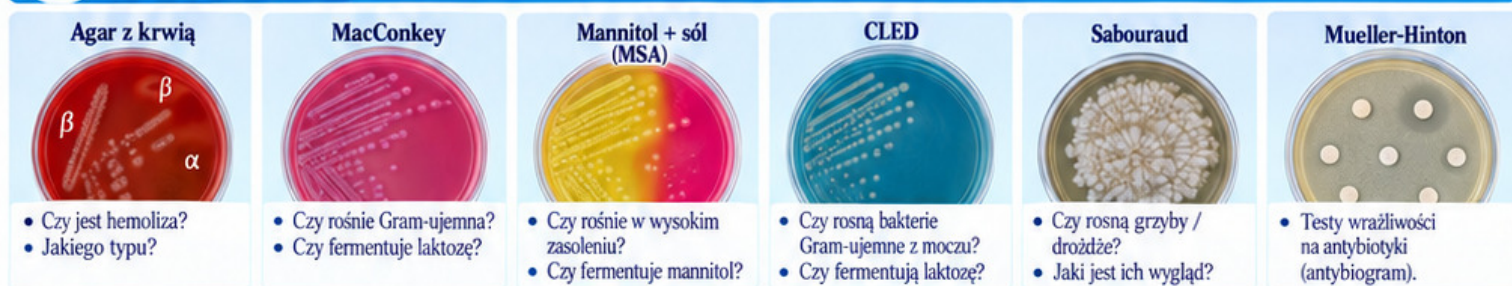
Wielka mapa identyfikacyjna

Cały podręcznik na jednej stronie

1 BARWIENIE GRAMA → Punkt wyjścia do identyfikacji – określ Gram i kieruj się dalej.



2 PODŁOŻE Wybierz odpowiednie podłoże w zależności od pytania diagnostycznego.



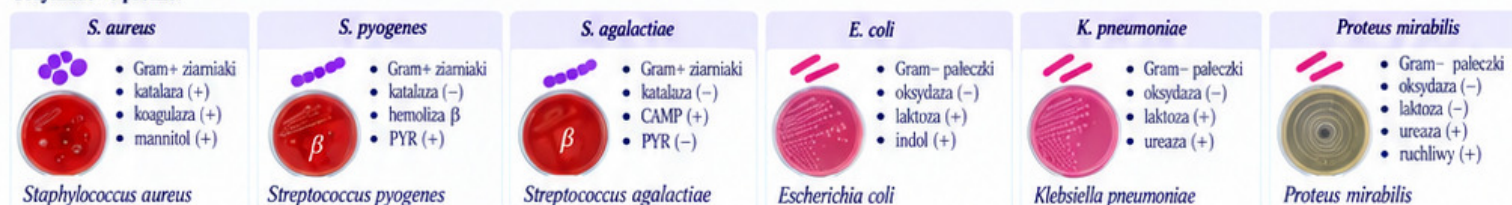
3 TEST Najważniejsze testy używane w identyfikacji.



4 PROFIL Połącz wyniki w logiczną całość i porównaj ze wzorami. To prowadzi do różnicowania.



Przykładowe profile:



Zanim nazwiesz mikroorganizm — sprawdź te 10 punktów

Ostatnia strona ma stać się twoją rutyną interpretacyjną.

1 Czy wiem, jaki materiał analizuję?

- ☐ Czy znam źródło materiału (np. krew, mocz, wymaz)?
- ☐ Czy uwzględniłem miejsce pobrania i kontekst kliniczny?
- ☐ Czy wiem, czego mogę oczekiwać w tym materiale?

2 Czy barwienie Grama jest zgodne z dalszym profilem?

- ☐ Czy morfologia i układ komórek pasują do wyniku?
- ☐ Czy wynik Grama nie stoi w sprzeczności z kolejnymi testami?

3 Czy hodowla wygląda na czystą?

- ☐ Czy obserwuję jeden typ kolonii?
- ☐ Czy nie ma cech zanieczyszczenia (różne kolonie)?
- ☐ Czy w razie wątpliwości powtarzam posiew?

4 Co pokazuje podłoże?

- ☐ Czy rośnie?
- ☐ Jak rośnie (wielkość, kształt, kolor, połysk, brzeg)?
- ☐ Czy zmienia otoczenie (np. barwę podłoża, hemolizę, wydzielanie gazu)?

5 Czy test był ważny?

- ☐ Czy zastosowałem odpowiednią kontrolę?
- ☐ Czy odczyt wykonałem w zalecany czas?
- ☐ Czy użyłem właściwego odczynnika?
- ☐ Czy warunki inkubacji były prawidłowe?
- ☐ Czy postąpiłem zgodnie z metodą?

6 Co naprawdę wykrywa ten test?

- ☐ Czy wiem, jaką cechę biologiczną wykrywa test (np. enzym, zdolność metaboliczną)?
- ☐ Czy rozumiem, że to nie „kolor = bakteria”, lecz reakcja = cecha biologiczna?
- ☐ Czy znam ograniczenia tego testu?

7 Czy wynik jest dodatni, ujemny czy niejednoznaczny?

- ☐ Czy potrafię jednoznacznie ocenić wynik?
- ☐ Czy biorę pod uwagę wyniki graniczne i nietypowe reakcje?

8 Jak ten wynik zmienia listę możliwości?

- ☐ Co staje się bardziej prawdopodobne?
- ☐ Co staje się mniej prawdopodobne?
- ☐ Czy eliminuję niepasujące opcje?

9 Czy kolejny test ma sens?

- ☐ Czy kolejny test odpowiada na realne pytanie interpretacyjne?
- ☐ Czy pomoże on zawęzić listę możliwości?

10 Czy cały profil jest spójny?

- ☐ Czy wyniki z podłoża, morfologii i testów biochemicznych są ze sobą zgodne?
- ☐ Czy wszystkie wyniki opowiadają tę samą historię?
- ☐ Czy mogę uzasadnić końcową interpretację?

Mapa myślowa interpretacji



5 ZASAD, KTÓRE WARTO ZAPAMIĘTAĆ

- 1 Jeden test rzadko wystarcza.
- 2 Wynik dodatni oznacza obecność wykrywanej reakcji — nie „dobry wynik”.
- 3 Kolor ma znaczenie tylko wtedy, gdy rozumiesz, dlaczego się zmienia.
- 4 Podłoże, morfologia i biochemia powinny być interpretowane razem.
- 5 Najlepsi studenci nie zapamiętują większej liczby kolorów — rozpoznają wzorce.

Cykl interpretacji



Jeśli potrafisz odpowiedzieć na trzy pytania, potrafisz zinterpretować większość podstawowych testów:

CO WYKRYWAM? | CO WIDZĘ? | CO TEN WYNIK ZMIENIA W RÓŻNICOWANIU?