

576.851.47/.49.093.4.07

ZKUŠENOSTI S DIAGNOSTICKÝM SYSTÉMEM ENTEROTUBE ROCHE V BIOCHEMICKÉ DIFERENCIACI GRAMNEGATIVNÍCH TYČINEK Z ČELEDI ENTEROBACTERIACEAE

M. HEJZLAR¹, V. SEDMIDUBSKÝ¹, L. ŠTASTNÁ², T. PELLAR², J. ŠILAROVÁ²,
J. ŠTEFCOVÁ¹, V. ŠIMERKOVÁ¹, A. ŠIMOVÁ¹, J. VLTAVSKÁ¹, V. JEŘÁBKOVÁ¹

Vojenský ústav hygieny, epidemiologie a mikrobiologie, Praha

(přednosta: MUDr. V. Kotlář, CSc.)

Ústav lékařské mikrobiologie lékařské fakulty hygienické Karlovy university v Praze

(přednosta: doc. MUDr. O. Emberger, CSc.)

Úvod

Exaktní diagnostika v klinické bakteriologické laboratoři se v současné době opírá především o řadu diferenciálních biochemických testů, a to v první řadě při bližším určování enterobakteriaceí, v druhé řadě ostatních aerobních fermentujících tyčinek. Ve většině laboratoří u nás i jinde ve světě je precizní určování zaměřeno především na izoláty ze závažných klinických onemocnění. Není možné provádět biochemickou typizaci v plném rozsahu — protože exaktní práce by vyžadovala izolaci více kolonií z jedné plotny a při denní potřebě určit 40—50 izolátů (což je velmi střídmý odhad), to znamená stovky operací, což bez speciálních systémů, mechanizace, popřípadě částečné automatizace, není reálné. V ČSSR jsou dobře známy různé systémy tzv. „krátkých biochemických řad“, jako byla začátkem padesátých let ve Voj. zdrav. listech popsaná diferenciální plotna Knox-Švejcarova, různé jedno- i dvou- zkumavkové systémy, za-

hrnující 3—8 individuálních biochemických testů, známá půda podle Hajny, TSI, Roussellův agar aj. Systém Enterotube Roche představuje poloválcovitou plastickou trubicí obsahující osm oddělených komůrek. Celou trubicí prochází inokulační jehla a na obou koncích plastické trubice jsou konce jehly uzavřeny šroubovými hlavicemi odlišné barvy. Celý systém je uvnitř sterilní a obsahuje média umožňující odečítat 11 standardních biochemických testů, konkrétně: zkvašování glukózy, tvorbu plynu, dekarboxylaci lysinu a ornithinu, produkci sirovořidku, indolu, utilizaci laktózy, dulcitolu, produkci fenylalaninindesaminázy, štěpení urey a utilizaci citrátu. Inokulovaný systém se inkubuje 18—20 hodin při 36—37 °C. Přítomnost barevných indikátorů velmi usnadňuje odečítání. Po prvním odečtení je možné pokračovat v inkubaci do 72 hodin a znovu 1 až 2krát odečítat. Systém Enterotube velmi usnadňuje identifikaci velkých počtů suspektních kolonií, standardizuje a významně urychluje práci. Umožňuje rovněž přístrojové vyhodnocování

výsledků biochemických testů. Naším cílem bylo jeho přezkoušení v praxi a porovnání s konvenčními u nás používanými postupy.

Materiál a metody

Provádění a hodnocení biochemických reakcí

Soupravy Enterotube Roche dodány péčí ZS MNO. Jedním z distributorů je Hoffmann-La Roche Co., Jacquingasse 16-18, A-1030 Wien, Österreich. Do srovnávací studie jsme vzali 500 kusů plastických trubic, které byly do vlastního použití uchovávány v lednici při 4 °C. Soupravy Enterotube jsou zpravidla baleny po 5 nebo 5 × 5 kusech a mají přiloženou perfektní dokumentaci, kde postup zpracování je vyjádřen slovem i obrazem (barevně). Které reakce systém Enterotube zahrnuje, uvedli jsme již v úvodu. Očkování je velmi jednoduché. S obou konců trubice Enterotube opatrně odšroubujeme uzávěry, držadlo (smyčkový), konec inokulační jehly vezmeme do pravé ruky, v levé ruce otevřenou Petriho misku s diagnostickou půdou. Inokulačním koncem jehly se dotkneme a zarotujeme ve vybrané kolonii, kterou chceme izolovat. Poté odložíme Petriho misku, levou rukou přidržíme válec Enterotube, inokulační jehlu pravou rukou protáhneme po celé délce válce až na konec oddílu s glukózou a poté opatrně zasuneme zpět do poloviny oddílu označeného H₂S — Indol. Poté inokulační jehlu ve vyznačeném místě lehkým tlakem palce pravé ruky snadno odlomíme a přebytečný konec inokulační jehly použijeme k propíchnutí okének na boku prvních 4 komůrek (reakce probíhající za přístupu vzdušného kyslíku). Nakonec zašroubujeme oba konce trubice odloženými uzávěry, zkontrolujeme, zda je trubice na bočním štítku správně popsána (označení vzorku materiálu) a dáme inkubovat. Bližší detaily je možné vyčíst z návodu, který je přiložen ke každé sadě Enterotube trubic.

Systém Enterotube jsme vyhodnocovali jednak konvenčně, jednak pomocí číselného kódu. Hodnotili jsme procento spolehlivých, dubiozních a nespolehlivých výsledků. Dále jsme provedli srovnání s konvenční a osvědčenou „střední“ biochemickou řadou, sestavenou svého času profesorem Sedlákem: glukóza, lysin, ornithin, sirovočík, indol, laktóza, dulcitol, urea, citrát, fenylalanin, mannitol, arginin, KCN, MRT, VP. Hodnocení bylo prováděno nezávisle na dvou pracovištích za přibližně stejných podmínek a na denním klinickém materiálu s dohodnutým výběrem.

Vyhodnocovaný materiál

Izolace kolonií jsme prováděli z běžných diagnostických půd Endo, DC-agar, Salmonella-Shigella agar, C L E D — a to po předchozím výběru z denně dodávaného materiálu klinických vzorků. Testování bylo provedeno v období leden—květen 1979 ve vinohradské a

střešovické nemocnici v Praze. Po předběžném výběru kmenů jednotlivých rodů provedeno očíslování materiálu a vlastní vyšetřování na běžně připravovaných biochemických řadách a v Enterotube probíhala tak, jako by bylo pracováno s neznámým vzorkem.

Zhodnocení výsledků číselným kódem

Systém Enterotube umožňuje číselné zakódování výsledků, přičemž číselná hodnota jednotlivých testů odpovídá jejich validitě. Čím je test diferenciálně diagnosticky významnější a čím je spolehlivější, tím vyšší má číselnou hodnotu a naopak. Sumace číselných výsledků jednotlivých testů umožňuje určitou kategorizaci jednotlivých bakteriálních rodů a species, čtyřčíselná formule validních reakcí pak umožňuje další specifikaci. Výhoda číselného hodnocení spočívá jednak v tom, že určitou část reakcí může spolehlivě odečíst i velmi málo zkušený pracovník, jednak v možnosti použít malého stolního kalkulátoru k rychlému třídění spolehlivých a nespolehlivých výsledků.

Komparace systému Enterotube s klasickými testy

Sestava klasických biochemických testů byla uvedena již dříve. Jejich podrobnější popis je zbytečný, protože jsou zevrubně popsány v monografiích profesora Sedláka a Rašky z padesátých let a jsou v ČSSR běžně známé. Účelem srovnání bylo posouzení spolehlivosti systému Enterotube.

Výsledky

Zpracování výsledků biochemických testů v systému Enterotube číselným kódem je velmi jednoduché. Firma přibaluje k rourkám předtisknuté protokoly, u nichž jsou jednotlivé reakce popsány slovně i příslušným číselným kódem. Prostým sečtením pozitivních reakcí dostaneme tzv. sumární kód, který nám jednotlivé species uvnitř čeledi Enterobacteriaceae rozdělí do menších podskupin (které nejsou v relaci s jednotlivými podčeleděmi nebo rody). Určení jednotlivých species pak podává čtyřčíselný kód validních reakcí. Přehled kódů i pozitivních validních reakcí podává tabulka č. 1. Ukazuje zřetelně slabinu systému v tom smyslu, že nedovede rozlišit mezi *Klebsiella rhinoscleromatis*, *Klebsiella ozaenae*, *Shigella sonnei* a *Enterobacter agglomerans* navzájem. Na druhé straně však každý zkušený bakteriolog ví, že rozpoznání *Shigella sonnei* a *Klebsiella* spp. kolonií je většinou dobře možné již z diagnostické plotny. Bez automatického vyhodnocování číselných kódů počítačem nepotřebujeme ovšem kódování a vystačíme s klasickými způsoby.

Identifikační schopnost systému Enterotube podává přehledně tabulka č. 2. Pokud se opíráme pouze o číselný kód, pak s menšími vý-

Tab. 1

Číselné kódování biochemických reakcí u enterobakterií v systému ENTEROTUBE Roche

Mikroorganismus	Sumární kód	Formule validních reakcí	Přehled pozitivních validních reakcí										
			GL	PL	LY	OR	H ₂ S	IN	LA	DU	PA	UR	CI
Klebsiella rhinoscler.	2	2 0 0 0	+										
Klebsiella ozaenae	2	2 0 0 0	+										
Shigella spp. (sonnei, flex.)	2 (6)	2 0 0 0 4	+					●					
Enterobacter agglom. (AN)	2 (3)	2 0 0 0 (1)	+									●	
Yersinia pseudotuberc.	4	2 0 0 2	+									+	
Enterobacter agglom (OX)	4	2 0 2 0	+	●					+				
Serratia rubidae	5	2 0 2 1	+						+				+
Citrobacter freundii	5 (6)	3 1 0 1 1	+	+			+		●				+
Serratia liquefaciens	5 (9)	2 2 0 1	+		●	+							+
Yersinia enterocolitica	6	2 2 0 2	+			+						+	
Enterobacter cloacae	6 (10)	3 2 0 1 2 3	+	+		+			●			●	+
Serratia marcescens	9	2 6 0 1	+		+	+						+	
Enterobacter hafniae	9	3 6 0 0	+	+	+	+							
Citrobacter diversus	10	3 2 4 1	+	+		+		+					
Providencia stuartii	11	2 0 4 5	+					+			+		+
Providencia alcalifac.	11	2 0 4 5	+					+			+		+
Proteus mirabilis	11	2 3 0 6	+			+	+				+	+	
Arizona sp.	11 (13)	3 7 0 1 2	+	+	+	+	+		●				+
Klebsiella pneumoniae	12	3 4 2 3	+	+	+				+			+	
Enterobacter aerogenes	12	3 6 2 1	+	+	+	+			+				+
Salmonella spp.	12	3 7 1 1	+	+	+	+	+			+			+
Proteus rettgeri	13 (11)	2 0 4 7 (5)	+					+			+	+	+
Proteus vulgaris	13	2 1 4 6	+				+	+			+	+	
Proteus morganii	14	2 2 4 4	+			+		+			+		
Edwardsiella sp.	14	3 7 4 0	+	+	+	+	+	+					
Escherichia coli	15	3 6 6 0	+	+	+	+		+	+				

Poznámka: GL = glukóza, PL = plyn, LY = lysin, OR = ornithin, IN = indol, LA = laktóza, DU = dulcitol, PA = fenylalanindesamináza, UR = ureáza, CI = citrát (Simmons).

Tab. 2

Identifikační schopnost systému Enterotube v diagnostice nejčastěji se vyskytujících druhů enterobakterií. Hodnocení prováděno číselným kódem (sumární kód, validní reakce)

Mikroorganismus	Počet test. kmenů	Procento určených kmenů	
		spolehlivě	nespolehlivě
Escherichia coli	100	74	26
Enterobacter aerogenes	50	80	20
Enterobacter agglomerans	25	56	44
Enterobacter cloacae	25	76	24
Proteus mirabilis	50	90	10
Proteus vulgaris	25	76	24
Proteus morgani	25	68	32
Klebsiella pneumoniae	50	74	26
Salmonella spp.	50	78	22
Shigella sonnei	25	68	32
Shigella flexneri	25	92	8
Citrobacter freundii	50	70	30

jímkami nemůžeme spolehlivě určit 1/4 až 1/3 testovaných kmenů (z čeledi Enterobacteriaceae). Vysokou spolehlivost určení jsme dostali u kmenů Proteus mirabilis, Shigella flexneri, naproti tomu nízkou u kmenů Shigella sonnei a zvláště Enterobacter agglomerans.

Při běžném způsobem prováděném odečítání se identifikační schopnost systému Enterotube poněkud zvyšuje, což je nesporně způsobeno přidáním subjektivního prvku — zkušeností odečítajícího bakteriologa. Kolem 80 a více procent spolehlivých určení jsme docílili u E. coli, Enterobacter aerogenes, Proteus mirabilis, Salmonella spp., Shigella flexneri. Obtížně diagnostikovatelné zůstaly kmeny Enterobacter agglomerans a Shigella sonnei. Přehledně je situace dokumentována v tabulce č. 3.

Další způsob hodnocení systému Enterotube spočíval v paralelním jeho srovnání s konvenčně prováděnými testy. Jak dokládá tabulka č. 4, naprosté shody bylo docíleno v něco více než 50 % případů, u třetiny kmenů byly zjištěny diskrepance v jednom testu (zpravidla nevalidním), jen u 13,5 % byl výrazný nesouhlas. Svědčí to pro relativně dobrou kvalitu Enterotube.

Pokud se týče hodnoty jednotlivých biochemických testů v systému Enterotube, **glukóza** funguje perfektně, ale je nutno dát pozor na inokulaci tohoto koncového políčka, které je v podstatě očkováno již zbytkem inokula a navíc u starších souprav dochází k sesychání a rozšíření očkovacího kanálku. Při nepozornosti během inokulace může pak dojít k následnému falešně negativnímu testu. Tvorba **plynu** z glukózy je dobře prokazatelná, jen u skupiny Proteus-Providencia a serratií nebývá produkce plynu patrná za 24 hodin. **Lysin** funguje vcelku dobře, ale má tendenci ke

Tab. 3

Identifikační schopnost systému Enterotube v diagnostice nejčastěji se vyskytujících druhů enterobakterií. Hodnocení prováděno běžným vizuálním odečítáním (bez kódu)

Mikroorganismus	Počet test. kmenů	Stupeň přesnosti určení		
		spolehlivě	málo spolehlivě	nedostatečně
Escherichia coli	100	82	8	10
Enterobacter aerog.	50	82	2	16
Enterobacter agglom.	25	56	16	28
Enterobacter cloacae	25	76	4	20
Proteus mirabilis	50	88	2	10
Proteus vulgaris	25	72	8	20
Proteus morgani	25	72	4	24
Klebsiella pneumon.	50	74	12	14
Salmonella spp.	50	78	4	18
Shigella sonnei	25	68	4	28
Shigella flexneri	25	88	0	12
Citrobacter freundii	50	72	4	24

Poznámka: stupeň přesnosti určení byl definován:

spolehlivě = všechny validní testy pozitivní, rovněž další;

málo spolehlivě = 1-2 testy atypické;

nedostatečně = nejméně 1 validní test atypický, zpravidla i některá další reakce.

Tab. 4

Srovnání systému Enterotube Roche s klasickou biochemickou řadou na 200 vybraných kmenech

Souhlasný výsledek ve všech testech	52 %
Diskrepance v 1 testu*	34,5 %
Diskrepance ve dvou testech (příp. více)**	13,5 %

Poznámka: * v převážné většině v nevalidním testu,

** nesouhlas v 1 validním a v 1 (i více) nevalidních testech

zvrtné reakci při delší inkubaci, zvláště při inkubaci za pokojové teploty. **Ornithin** je stabilnější než předchozí. Obě dekarboxylázy jsou dosti často v diskrepanci s klasicky prováděnými zkumavkovými testy. Relativně málo se osvědčil lysin jako diferenační test salmonel a citrobakterů, museli jsme si vypomáhat KCN testem. **Sirovodík** funguje spolehlivě, ale u slabých producentů má reakce tendenci vymizet po 18–20 hodinách, zvláště při pokojové tep-

lotě. **Indol** je spolehlivý. **Laktóza** — její indikátor má nevýrazně červenou barvu, takže lze někdy těžko postihnout hranici mezi pozitivitou a negativitou. **Dulcitol** odpovídá plně klasickému testu. **Fenylalanin-desamináza** reaguje spolehlivě, při slabším testu stačí prodloužit inkubaci při pokojové teplotě o 4–6 hodin. **Ureáza** je spolehlivá, někdy je třeba prodloužit inkubaci, zvl. u enterobakterů. **Citrát** se zdál být méně citlivý než běžně používaná zkumavková modifikace. V některých případech byl na Enterotube test negativní ještě po pěti dnech inkubace, zatímco ve zkumavkovém testu byl citrobakter pozitivní již za 16–20 hodin. Podle našeho názoru je málo spolehlivý pro diferenciaci proteových kmenů na jednotlivé biotypy.

Diskuse

Systém Enterotube byl vyvinut firmou Roche začátkem sedmdesátých let. První varianta měla řadu nedostatků a byla proto značně modifikována. K revidované variantě (která byla předmětem také našeho přezkoušení) se vyjádřil již v roce 1973 Tomfohrde se spolupracovníky. Uvádí, že revidovaná varianta je přijatelnou alternativou konvenčních identifikačních testů. Dále uvádí, že jde-li o podezření na příslušnost rodu *Solmonella*, *Shigella* či *Arizona* — je nutné provádět orientační serotypizaci (Tomfohrde a sp. 1973). S tímto názorem nesouhlasíme, protože orientační serotypizační testy je možno provádět přímo z kolonií narostlých na diagnostických půdách — aniž bychom čekali na výsledky reakcí v systému Enterotube. Leers a Arthurs přezkoušeli systém Enterotube na 500 klinických izolátech, především z čeledi Enterobacteriaceae. Současně použili konvenční testy a zjistili, že z 500 izolátů 462 bylo správně identifikováno za 24 hodin bez dalších doplňujících biochemických testů, které u zbylých izolátů pomohly s výjimkou tří kmenů, které zůstaly neurčeny. Procento korelace mezi Enterotube a klasickými biochemickými testy překračovalo 90 %. Autoři upozorňují na obtíže při odečítání dulcitolové reakce (Leers a Arthurs 1973). Naše zkušenosti vynucují větší kritičnost, ale shodujeme se s autory v tom, že snadnost a rychlost inokulace je velkou předností systému Enterotube a že většinu reakcí lze odečítat nejpozději za 24 hodin.

Wüst a Kayser zkoušeli 410 izolátů (z toho 23 sbírkových kmenů) v systému Enterotube a konvenčních testech. Upozorňují na větší spolehlivost při použití numerického kódu ve

srovnání s běžným odečítáním. Rovněž se zmiňují o malé spolehlivosti Enterotube při identifikaci gramnegativních tyčinek mimo čeleď Enterobacteriaceae (Wüst a Kayser 1974). Dobrou výkonnost systému Enterotube potvrzuje Moussa (1973).

Systém numerického kódování se opírá o práci Dita (1972) a diferenciální biochemická tabulka je plně odvozena z práce Ewingovy (1972).

Systém Enterotube je nesporně výhodný při zpracování velkých kvant izolací, zvláště v epidemiích. Urychluje, ekonomizuje a standardizuje práci. Pro běžnou praxi v diagnostických laboratořích v ČSSR je málo vhodný — především pro vysoké devizové náklady.

Souhrn

V kooperaci dvou mikrobiologických pracovišť zkoušen identifikační systém Enterotube Roche, umožňující simultánní provedení jedenácti biochemických reakcí. Na 500 kmenech různých rodů čeledi Enterobacteriaceae prokázána spolehlivost identifikace zhruba v 75 %. Systém Enterotube byl ve více než 85 % v dobré shodě s běžně prováděnými zkumavkovými testy. Jednoduché číselné kódování umožňuje podle potřeby rychlé automatické vyhodnocování reakcí pomocí stolního počítače. Systém Enterotube Roche je velmi vhodný pro zpracování velkého kvanta podezřelých kolonií, především v epidemiích. Vynikající služby by mohl vykonávat při práci v pojezdových laboratořích. Pro běžnou laboratorní praxi ve stabilních laboratořích není nutný, zvláště pro svoji značnou nákladnost.

Literatura

1. Edwards, P. R. - Ewing, W. H.: Identification of Enterobacteriaceae. Minneapolis U.S.A., Burgess Publishing Co., 3rd ed. 1972.
2. Leers, W. D. - Arthurs, K.: Routine identification of Enterobacteriaceae with the new improved enterotube. Can. J. Publ. Hlth., 64, 1973, 6, s. 584–587.
3. Moussa, R. S.: Evaluation of the API, the Patho-Tec and the improved Enterotube system for identification of Enterobacteriaceae. Abstr. form Symposium on Rapid Methods and Automation in Microbiology in La Tour-de-Peilz, 4.–8. VI. 1973.
4. Tomfohrde, K. M. - Rhoden, D. L. - Smith, P. B. - Ballows, A.: Evaluation of the redesignated Enterotube — a system for the identification of Enterobacteriaceae. Appl. Microbiol. 25, 1973, 2, s. 301–304.
5. Wüst, J. - Kayser, F. H.: Evaluation of the redesignated Enterotube and its interpretation systems. Pathologia Microbiol. 40, 1974, 6, s. 316–325.