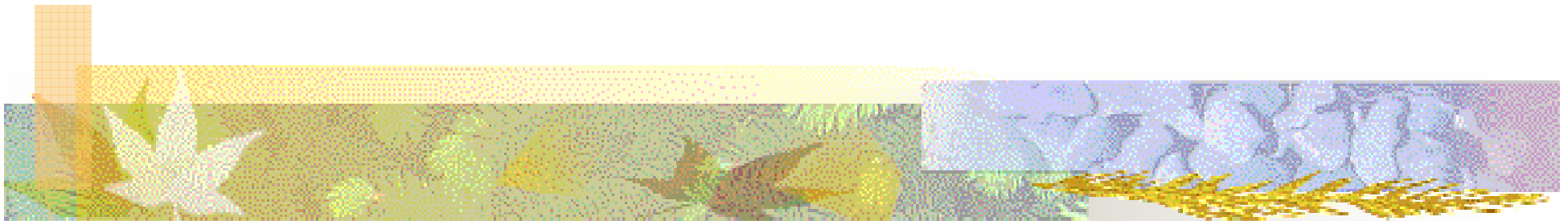


Lékařská mikrobiologie pro ZDRL



Týden 4: Metody identifikace bakterií,
principy biochemické identifikace

Ondřej Zahradníček 777 031 969

zahradnicek@fnusa.cz ICQ 242-234-100

Postavení v systému metod

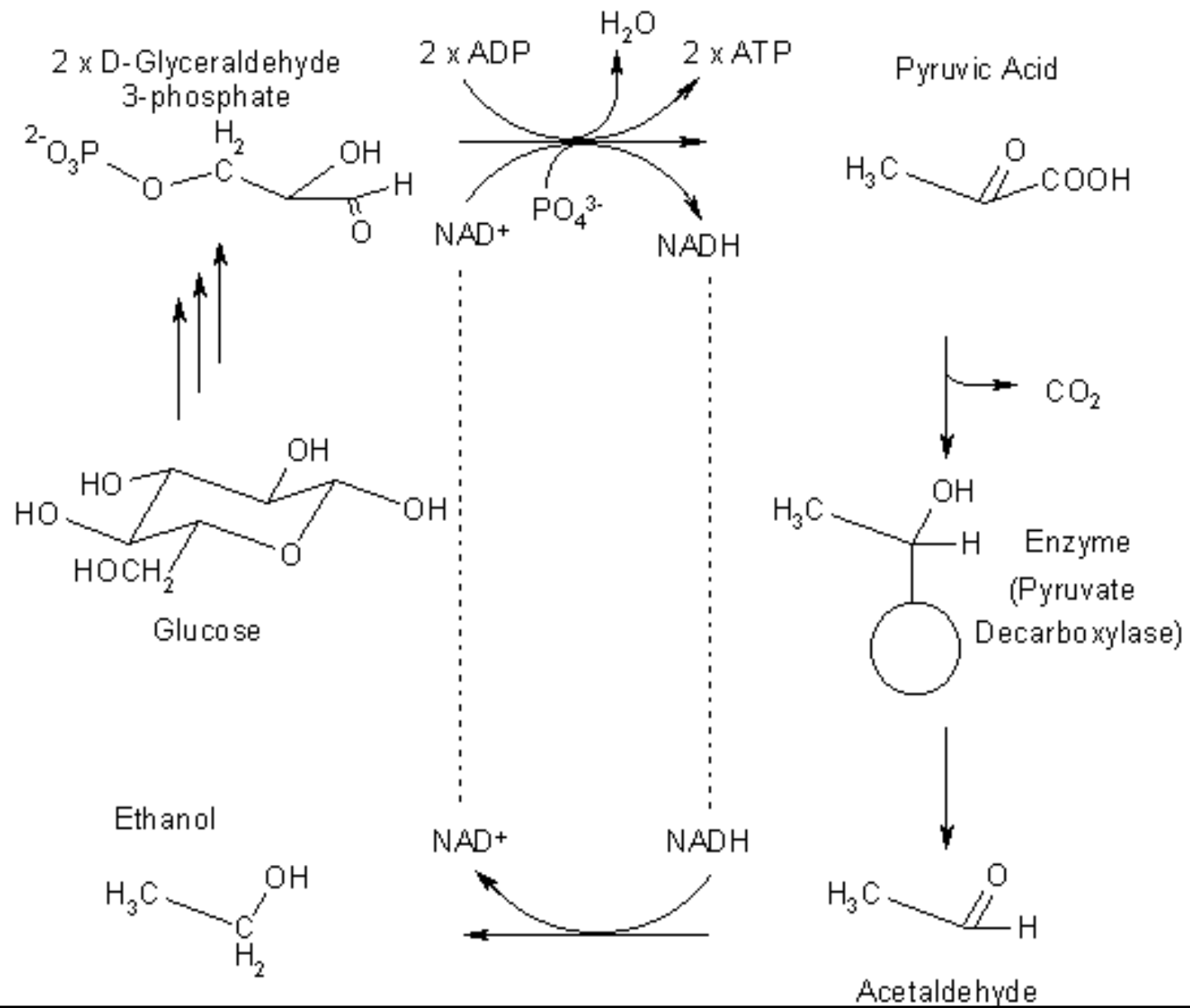
- Přímé metody (mikrob – část – produkt):
 - Mikroskopie – průkaz ve vzorku i id.
 - Kultivace – průkaz ve vzorku i identifikace
 - Biochemická identifikace – jen identifikace!
 - Průkaz antigenu – průkaz ve vzorku i id.
 - Průkaz nukleové kyseliny – zpravidla jen průkaz ve vzorku
 - Pokus na zvířeti – zpravidla průkaz ve vzorku
- Nepřímé metody (protilátky)



Obecný princip I

- Jak jsme si řekli při povídání o fyziologii mikrobů, bakterie mají svůj metabolismus.
- **Průmyslová mikrobiologie** využívá bakteriálního metabolismu (zejména fermentativního katabolismu) k výrobě různých látek, včetně řady potravin
- **Klinická mikrobiologie** využívá vzájemných rozdílů v metabolismu mezi bakteriemi
- Zajímají nás přitom mezidruhové rozdíly. Rozdíly mezi kmeny jsou spíše na obtíž

Etanolová fermentace





Obecný princip II

- *I mezi savci jsou rozdíly. Člověk neumí tvořit vitamin C, někteří savci ano*
- Bakterii předložíme určitý **substrát** a zkoumáme, zda ho bakterie pomocí svého enzymu změní v **produkt**. Produkt se musí lišit od substrátu **skupenstvím** či **barvou**. Neliší-li se, použijeme **indikátor**
- Existuje přitom velké množství způsobů technického provedení tohoto typu testů.

Samozřejmě že...

- je velký rozdíl, jestli bakterie provádějí fermentaci nebo aerobní respiraci
- je rozdíl, jestli bakterie štěpí spíše bílkoviny a aminokyseliny (například rod *Proteus*) nebo spíše cukry (například rod *Klebsiella*)
- často je štěpení určitého substrátu znakem adaptace na určité prostředí (dobře adaptované enterobakterie štěpí laktózu, kterou nacházejí v našem střevě)

Pro připomenutí...

Jestlipak víte, že jste se s takovým biochemickým testem už vlastně setkali? Že ne? Ale ano, u kultivace. ENDOVA PŮDA v sobě zahrnuje biochemický test: rozlišuje bakterie na ty, které umějí štěpit laktózu, a ty, které to neumějí.



Problémy

- Rozdíly jsou i mezi kmeny, nejen mezi druhy
- Málokdy pozorujeme, že 100 % či 0 % kmenů určitého druhu tvoří daný enzym
- Častěji je to 90 %, 10 %, 70 %, 30 %...
- Jak to třeba může vypadat v praxi:

Janičkella tvoří lenkulázu v 90 % případů

Evičkella tvoří lenkulázu v 10 % případů

Lenkuláza-pozitivní mikrob = ???

typická Janičkella ???

atypická Evičkella ???



Problémy – řešení

- Sledujeme-li jen jeden znak, je velká pravděpodobnost, že narazíme na atypický kmen a identifikace bude chybná
- Je však velmi malá pravděpodobnost, že by se kmen choval atypicky např. v deseti různých testech najednou
- Proto čím víc testů, tím větší pravděpodobnost, že se nepleteme

Pravděpodobnost výsledku

- Jak jsme si řekli, čím více testů použijeme, tím máme lepší šanci, že se nepleteme
- Přesto tato šance nikdy není celých 100 %
- Dá se vždy říci například, že náš hypotetický kmen je
 - na 99,3 % *Janičkella elegans*
 - na 0,5 % *Evičkella pulcherrima*
 - na 0,2 % něco úplně jiného
- Je pak na zvážení identifikujícího, zda mu taková míra pravděpodobnosti stačí, nebo provede další rozlišující testy

Nejen procento pravděpodobnosti, ale i index typičnosti kmene

- Ve skutečnosti je výsledek biochemické identifikace zpravidla charakterizován dvěma čísly, nikoli jen jedním:
 - **% pravděpodobnosti:** např. že je 90% pravděpodobnost, že kmen opravdu je *Janičkella elegans* a ne něco jiného
 - **Index typičnosti:** míra shody s „ideálním kmenem“ *Janičkella elegans*. Pokud je kmen ideální, je $T_{in} = 1,00$; pokud kmen např. netvoří lenkulázu, ačkoli 90 % janičekel ji tvoří, bude T_{in} nižší než 1,00

Příklady

- Kmen má identifikaci 99 %, index typičnosti 0,95. Ideální stav, pravděpodobně „je to ono“.
- Kmen má identifikaci 99 %, ale index typičnosti jen 0,63. Může jít o atypický kmen (je dobré zjistit, který test „mluví proti identifikaci), ale také o chybu diagnostiky
- Dva kmeny mají index typičnosti oba 1,00, procento pravděpodobnosti každý 49,5 % (jedno procento zbývá na „jiné“). To znamená, že je to určitě jeden z nich, ale bez rozlišujících testů nezjistíme, který to je.



Možnosti praktického provedení

- Rychlé testy (vteřiny až minuty)
 - Katalázový test
 - Testy s diagnostickými proužky (oxidáza)
- Testy s inkubací (hodiny až dny)
 - Jednoduché zkumavkové testy
 - Složité zkumavkové testy
 - Sady jednoduchých zkumavkových testů
 - Testy v plastové destičce (miniaturizace)
 - Jiné testy (např. Švejcárova plotna)

Katalázový test

- **Katalázový test:** velmi jednoduchý, do substrátu (roztok H_2O_2) rozmícháme bakterie. Bublinky = pozitivita. **Princip:** $2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$

Catalase +



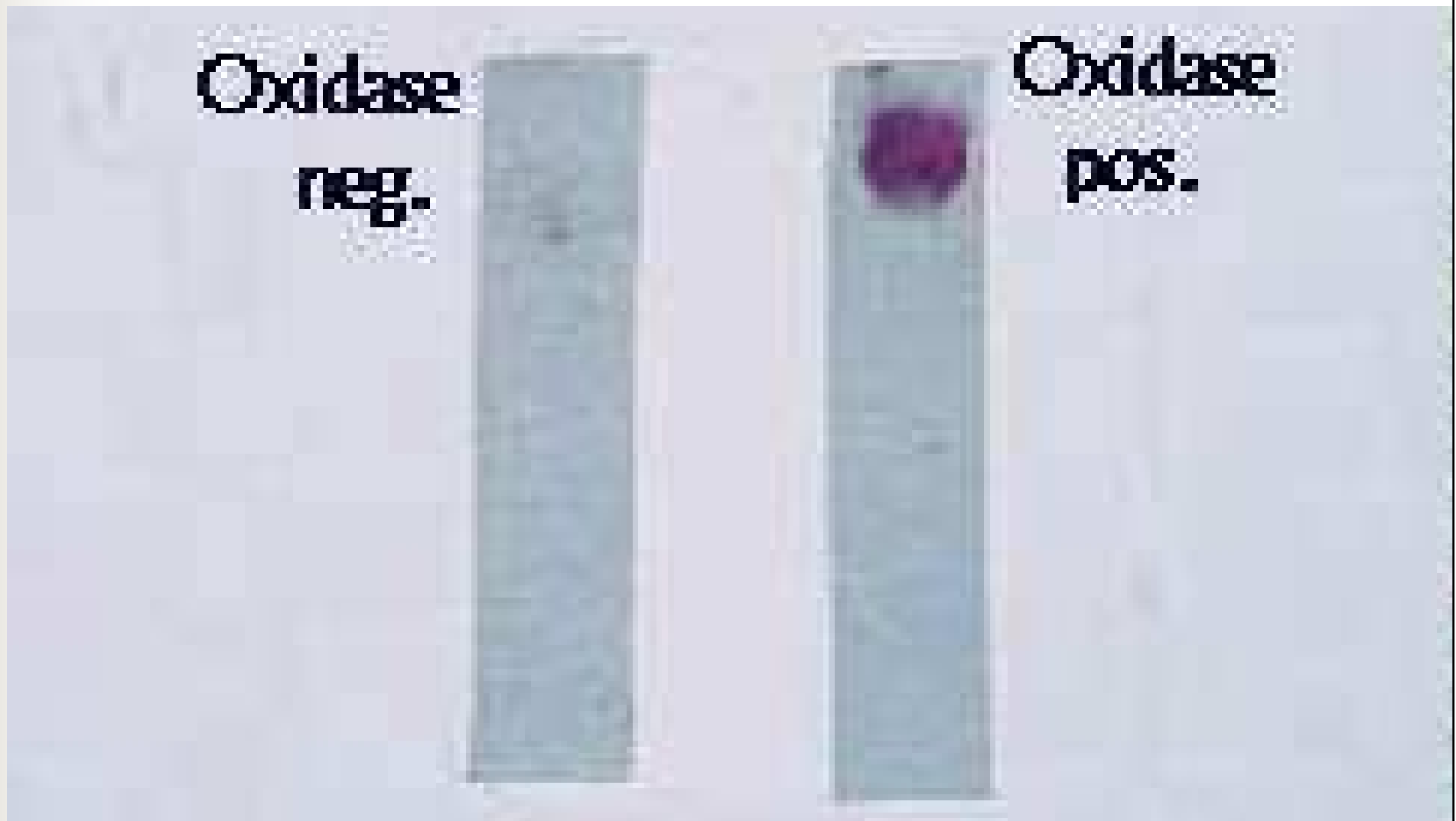
Catalase -



Testy s diagnostickými proužky

- **Testy s dg. proužky** – Reakční ploškou se dotkneme kolonií. V případě positivity ploška změní barvu. Nejběžnější jsou tyto:
 - **oxidáza** – proužek zmodrá
 - **INAC** – proužek po několika minutách zmodrozelena
 - **PYR** – proužek po několika minutách, přikápnutí činidla a další minutě čekání zčervená
 - **betalaktamázový strip** – týká se testování některých faktorů rezistence (viz příště)

Oxidázový test



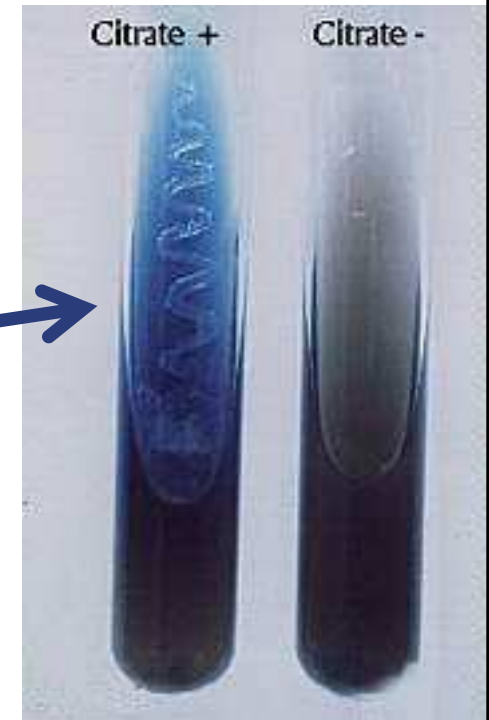


Jednoduché zkumavkové testy

- Mohou probíhat v tekuté fázi, nebo v agaru.
- V obou případech je ve zkumavce substrát, případně také indikátor. Substrát se může přidat i tak, že je substrátem napuštěna reakční ploška proužku (ONPG-test).
- Pozitivita testu = změna zbarvení (v celém objemu, nebo jako prstenec u hladiny)

Příklady jednoduchých zkumavkových testů

- **Arabinóza** – tekutá. Zežloutnutí = pozitivní, zůstane zelená = negativní (pro enterokoky)
- **Simmons citrát** – agarová. Zmodrání = pozitivní, zelená = negativní
- **ONPG a VPT** – s přidáním proužku. U ONPG tekutina zežloutne, u VPT se vytvoří červený prstenec u hladiny



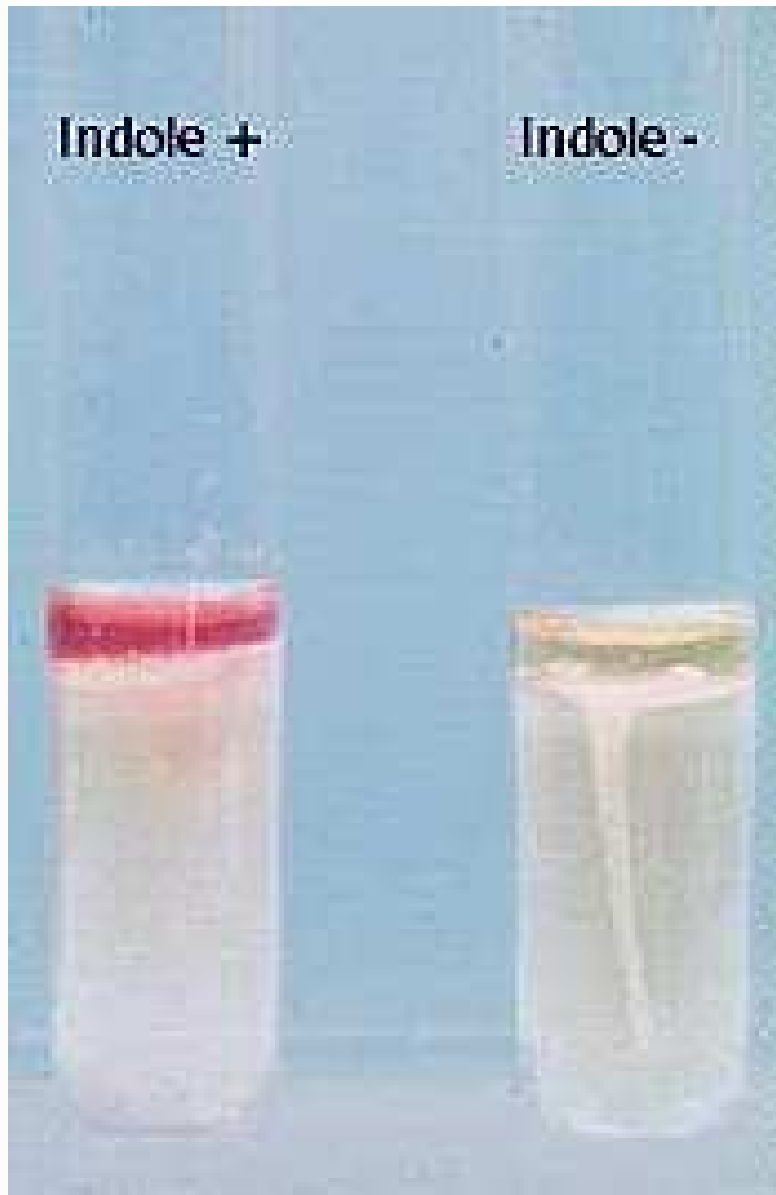
Složité zkumavkové testy

- V jedné zkumavce probíhá více reakcí
- Např. test MIU.
 - M = motility – pohyb (zákal se rozlézá polotekutým agarem, nezůstává jen v místě vpichu)
 - I = indol (pozitivita = červený prstenec)
 - U = urea (štěpení močoviny indikuje zružovnění celé pŕdy)
- Nebo Hajnova pŕda, která detekuje štěpení glukózy, tvorbu plynu z glukózy, štěpení laktózy a tvorbu sirovodíku

MIU by samozřejmě šlo dělat i jako tři jednotlivé testy: pohyb...

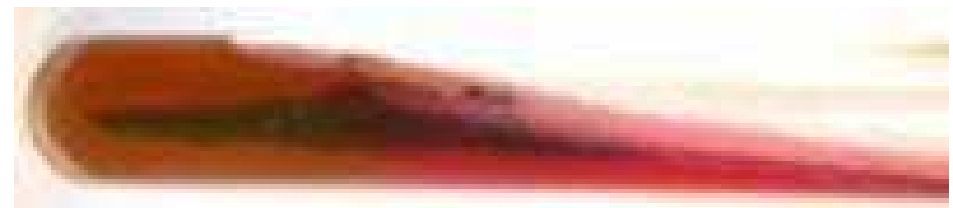
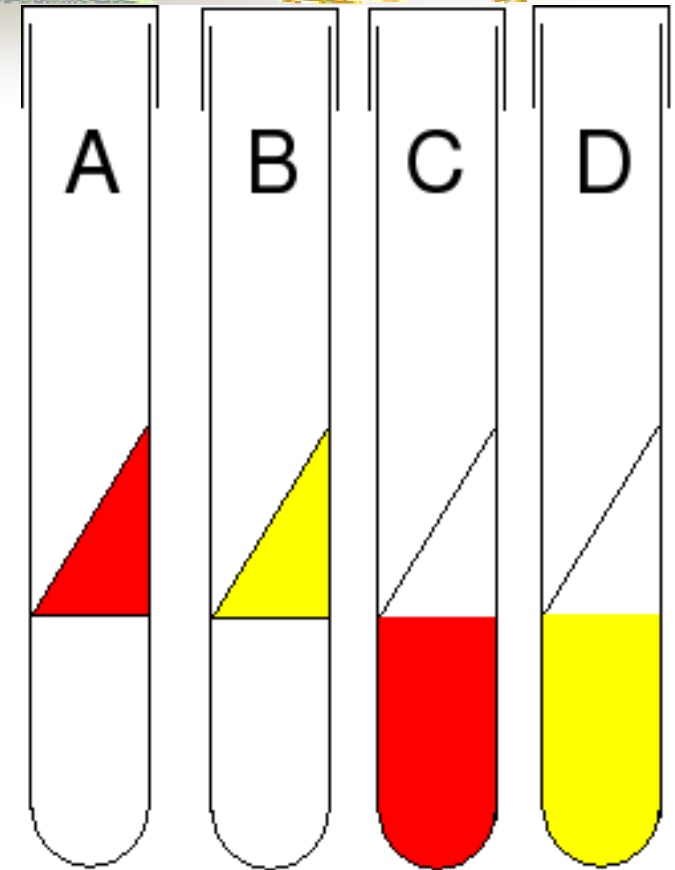


...indol a ureu



Hajnova půda

- Červený vršek – laktóza negativní
- Žlutý vršek – laktóza pozitivní
- Červený spodek – glukóza negativní
- Žlutý spodek – glukóza pozitivní
- Černý spodek – bakterie tvoří sirovodík
- Potrhání půdy či odsunutí nahoru – bakterie tvoří plyny při fermentaci glukózy



Sady zkumavek

- Složitě zkumavkové testy mají své nevýhody. Často při pozitivitě jednoho testu není vidět, zda je pozitivní test jiný. Špatně se automatizují a vyžadují dobře zaškoleného pracovníka
- Jednodušší, i když někdy dražší řešení, je sada několika jednoduchých zkumavkových testů
- Lze ovšem i zkombinovat testy složité a jednoduché (např. Hajna + MIU + Simmons citrát + ornithin dekarboxyláza – v naší labor.)

Miniaturizace: testy v plastových panelech

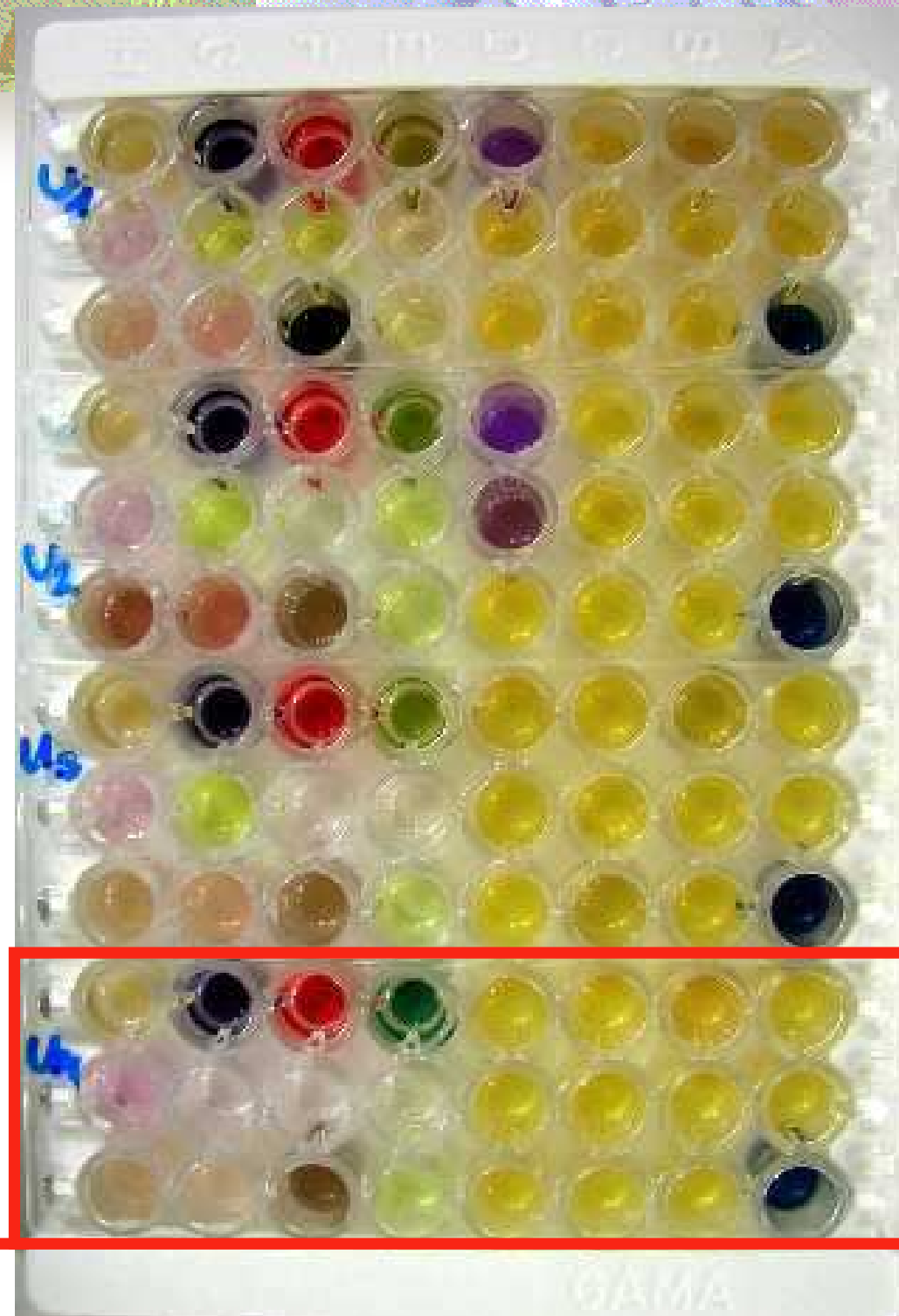
- Miniaturizace sady jednoduchých zkumavkových testů → testy v důlcích plastových mikrotitračních destiček. Místo každé zkumavky je jeden důlek
- Počet testů v sadách kolísá od sedmi (Neisseria Test) až po více než padesát
- Liší se v technických detailech. Vždy je však substrát lyofilizovaný, bakterie se nejprve rozmíchá ve FR nebo suspenzním médiu a pak se kape či lije do důlků



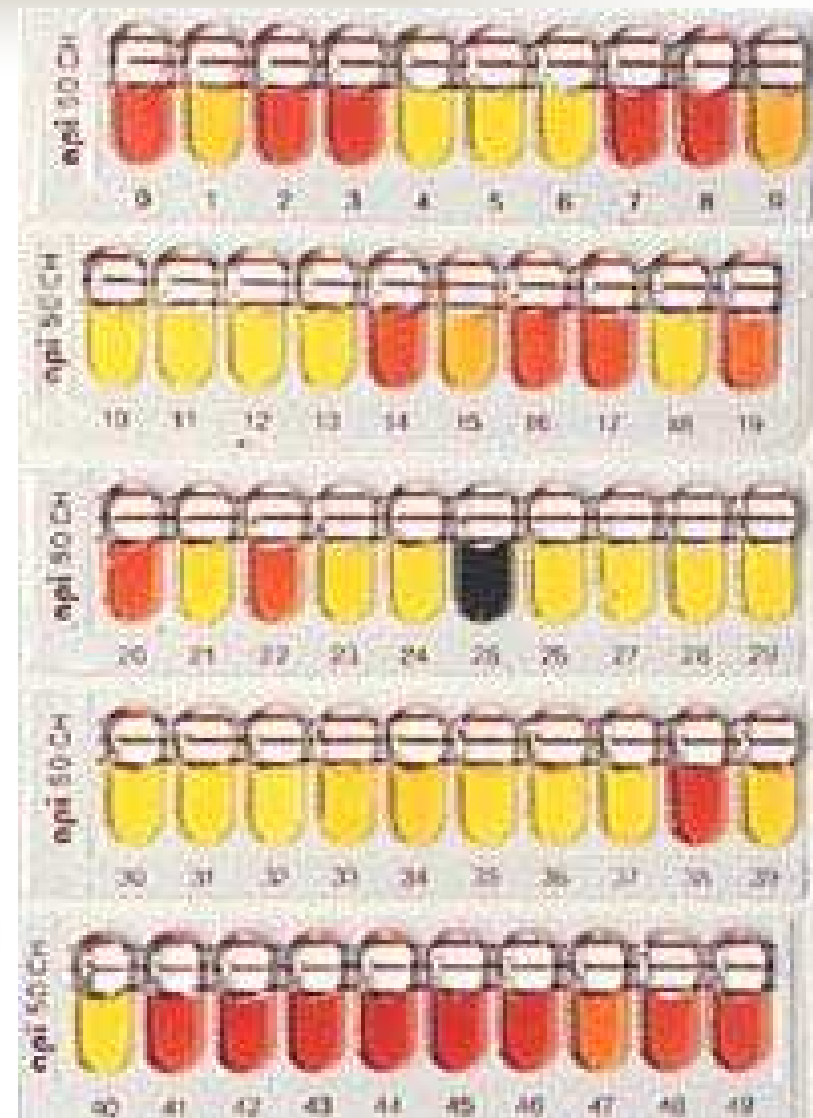
Provedení testů od firmy Pliva Lachema (u nás nejběžnější)

- Výrobce dodává destičky s lyofylizovanými substráty, umístěnými na dně důlků v destičce
- Pracovník připraví suspenzi bakterie ve FR nebo v suspensním médiu
- Do každého důlku se kápne kapka suspenze či dvě kapky
- Zbytek suspenze se často ještě využije jako zkumavkový test s diagnostickým proužkem (ONPG, VPT)
- Destička i zkumavka se inkubuje v termostatu

NEFERMtest 24
Pliva Lachema:
do jednoho rámečku
lze vložit čtyři
trojřádky (čtyři testy,
určení čtyř různých
kmenů)



Zahraníční soupravy





Vyhodnocení destičkových testů

- Z takového testu dostaneme řadu výsledků – většinou ve tvaru „+“ (test pozitivní, substrát štěpen, došlo ke změně) nebo „-“ (test negativní, substrát nebyl štěpen, zbarvení zůstalo původní).
- Příklad: + - + + + - - - - - - - - - + + + +
- Je několik způsobů, jak takovou řadu převést na „čitelný výsledek“

Možné způsoby hodnocení

- Porovnání s tabulkou je možné jen u jednoduchých testů a jasných výsledků.
 - Přepočet na **oktalové kódy** plus vyhledání výsledku v seznamu kódů. Nejběžněji používáno
 - Výsledek se zadá **do počítače**, který „vyplivne“ vyhodnocení. Ne vždy praktické
- Počítačové hodnocení se používá hlavně tehdy, pokud už „čtení“ výsledku probíhá automaticky, např. na spektrofotometru.*

Oktaľové kódy – co to je a proč

- Matematicky vzato je to vlastně převedení dvojkové soustavy (zápis $++--++---$, respektive 110011000) do osmičkové soustavy (zápis 630)
- Z praktických důvodů se zpravidla uvnitř trojice sčítá opačně – normálně by při převodu z dvojkové do osmičkové či desítkové soustavy 1 1 0 měla být šestka a 0 1 1 trojka, v praxi to však počítáme většinou naopak



Oktalové kódy – II

- V praxi se tedy každé trojici výsledků přiřadí číslice od nuly po sedmičku – viz následující obrazovka
- Pokud má test např. 17 reakcí, je na konci místo trojice jen dvojice, v tom případě číslice na konci může být jen 0, 1, 2, 3. Pokud by reakcí bylo 16 (19, 22...) bude na konci nula nebo jednička.

Praktický příklad

- Zaznamenají se pozitivní a negativní výsledky reakcí
- Pod každou trojici se napíše 1 – 2 – 4
- Sečtou se pro každou trojici pouze číslice u „+“, nikoli u „–“ (ty se přeškrtnou)

Test	JAN	LEN	MAG	TOM	PET	KAR	FRA	HAN
Výsl.	+	–	+	+	+	–	–	–
	1	2	4	1	2	4	1	2
Kód	5			3			0	

Přepočítávání trojic

--- 1 2 4		0
+ -- 1 2 4	1	1
- +- 1 2 4	2	2
++ - 1 2 4	1 + 2	3
-- + 1 2 4	4	4
+ - + 1 2 4	1 + 4	5
- + + 1 2 4	2 + 4	6
+++ 1 2 4	1 + 2 + 4	7

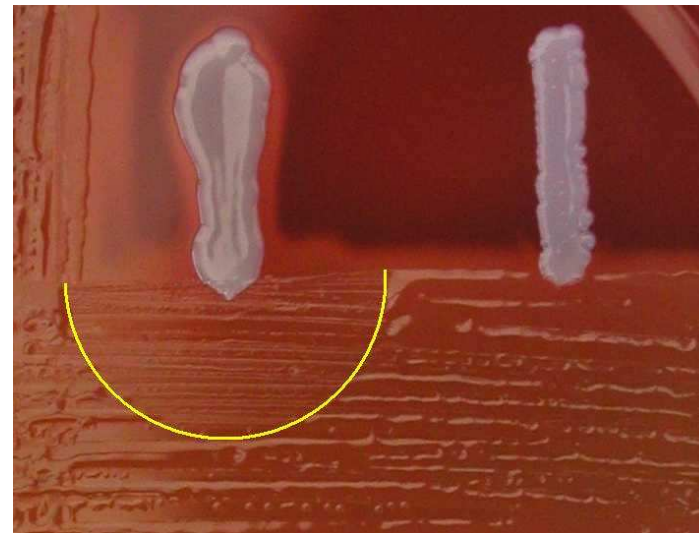
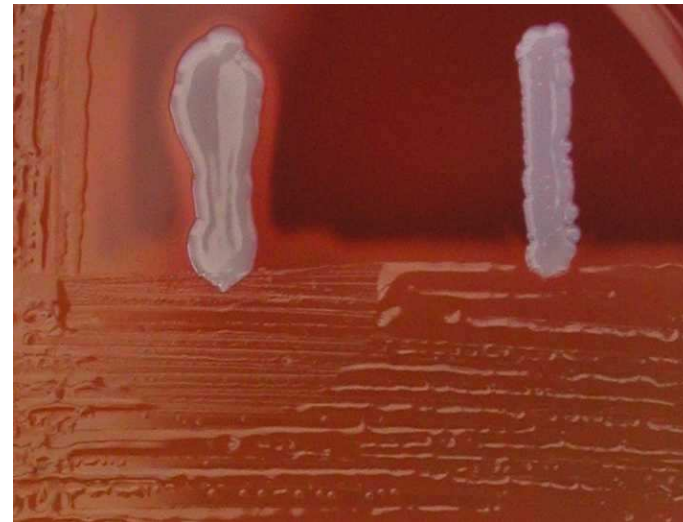
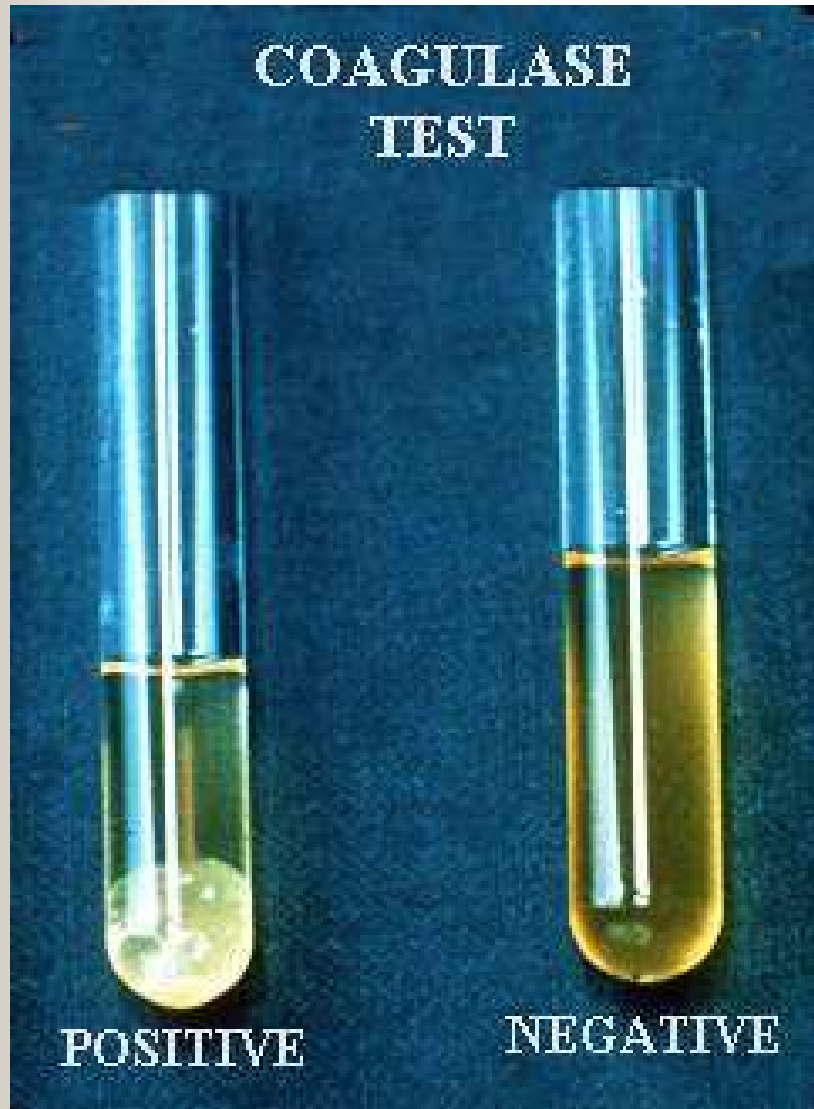
Konkrétně u ENTEROtestu 16 (17 testů) (530 063 = E. coli, 99,89 %, $T_{in}=1,00$)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	
ONPG	H	G	F	E	D	C	B	A	H	G	F	E	D	C	B	A		
	První řádek panelu								Druhý řádek panelu									
+																		
-																		
?																		
?	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	
	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	
	5		3			0			0			6		3				

Jiné identifikační testy

- Kromě testů založených přímo na štěpení substrátu, existují i jiné podobné testy, které zkoumají vybavení bakterií určitými enzymy či faktory virulence. Například:
 - Test schopnosti koagulovat králičí plasmu
 - Test schopnosti aglutinovat králičí plasmu
 - Test schopnosti „odpouzdřit“ opouzdřený kmen (hyaluronidázový test)

Plasmakoaguláza a hyaluronidáza (oba testy se užívají u stafylokoků)





Diagnostické použití antibiotik

- Jednou z možností je také testování in vitro citlivosti na určité antibiotikum v případě, že víme, že kmen X je ve 100 % citlivý a kmen Y je ve 100 % rezistentní. Ovšem ani tady těch „sto procent“ nebývá stoprocentních...
- Příkladem je třeba optochinový test
- Praktické provedení je stejné jako u testů citlivosti na antibiotika, které si probereme příště

Optochinový test negativní a pozitivní



Příště budeme
pokračovat
povídáním o
antibiotikách

