

# Lékařská mikrobiologie pro ZDRL

---

Týden 4: Metody identifikace  
bakterií, principy biochemické  
identifikace

Ondřej Zahradníček 777 031 969  
[zahradnicek@fnusa.cz](mailto: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)

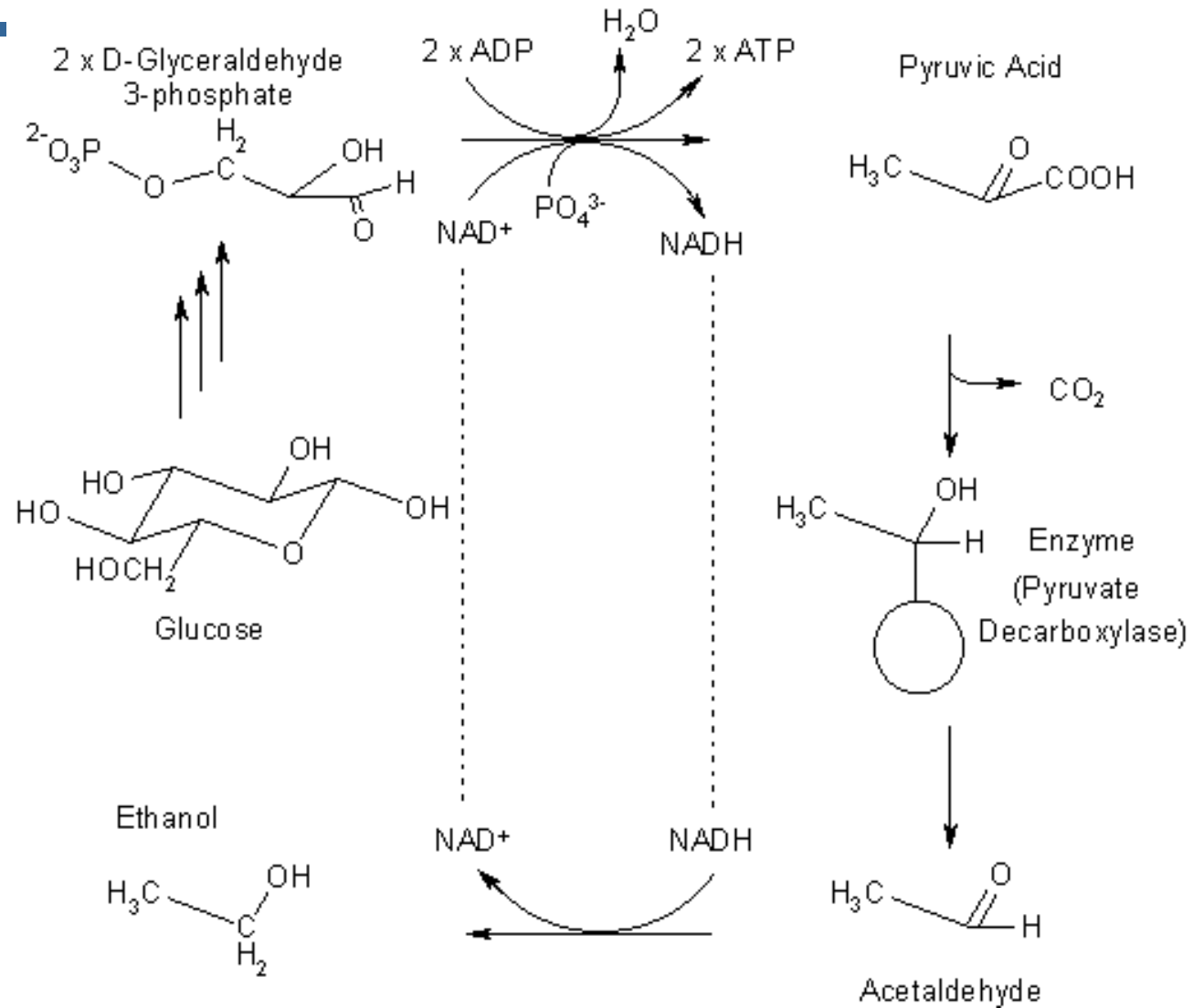
# Obecný princip I

---

- 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

www.kcpc.usyd.edu.au



# 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 % janiček 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.

# Jednotlivé testy, nebo kombinace?

- **Jednotlivý test** lze použít tam, kde potřebujeme vzájemně rozlišit dvě významné skupiny (čeledi, rody...) a kde existuje test, který má jedna skupina téměř ve 100 % pozitivní a druhá téměř ve 100 % negativní
- **Kombinace** jsou vhodné tam, kde testy mají více pravděpodobnostní charakter, a kde potřebujeme rozlišit více než dvě (někdy i desítky) skupin, rodů, druhů apod.

# Pohádka

---

- Byl jednou jeden nemocný student Petr. Měl půjčené nějaké věci od spolužáků, a teď ležel s angínou (způsobenou *Streptococcus pyogenes*) a nemohl jim je vrátit. Poprosil tedy sestru, aby se stavila před praktikem v šatně na mikrobiologii, a spolužákům věci vrátila. Dal jí k tomu příslušné instrukce

# Co řekl Petr Šárce

---

- Protokoly vrátíš Honzovi. Honza má zelené oči, blond vlasy a nosí červenou mikinu.
- Skripta vrátíš Matějovi. Matěj má taky zelené oči, taky blond vlasy, ale nosí modrou mikinu.
- CD s Ewou Farnou vrátíš Liborovi. Libor má blond vlasy a nosí modrou mikinu, ale má modré oči.
- Fotky z kruhovky vrátíš Frantovi. Má modré oči a modrou mikinu, ale hnědé vlasy

# Šárka tedy musí sledovat několik znaků

- Použít jen **jeden znak** (třeba oči) by pomohlo **při rozlišení dvou studentů**, kteří se právě tímto znakem liší.
- Pokud je ale potřeba **rozeznat studenty v rámci celé skupiny**, je nutno většinou kombinovat **více znaků**
- Aby bylo možno rozlišení provést, je nutno předpokládat **stálost výskytu znaků** (Libor si nesmí obléct zelenou mikinu, Franta si nesmí obarvit vlasy na blond



# Identifikační tabulka

Zelené oči	Blond vlasy	Modrá mikina	Identifikace
+	+	-	Honza
+	+	+	Matěj
-	+	+	Libor
-	-	+	Franta

# Kdyby Šárka potkala příšeru...

---

- ...která by byla napůl Honza a napůl Franta, nemohla by studenta identifikovat.
- Stejně je to s bakteriemi. **Abychom mohli identifikovat bakterie, musíme mít izolovaný kmen.**
- *Z tohoto praktika existuje výjimka, o které se dozvíte na jaře až budeme probírat G- tyčinky.*

# 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. Švejcarova plotna)

# Katalázový test

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

[medic.med.uth.tmc.edu/path/oxidase.htm](http://medic.med.uth.tmc.edu/path/oxidase.htm)

Catalase +



Catalase -

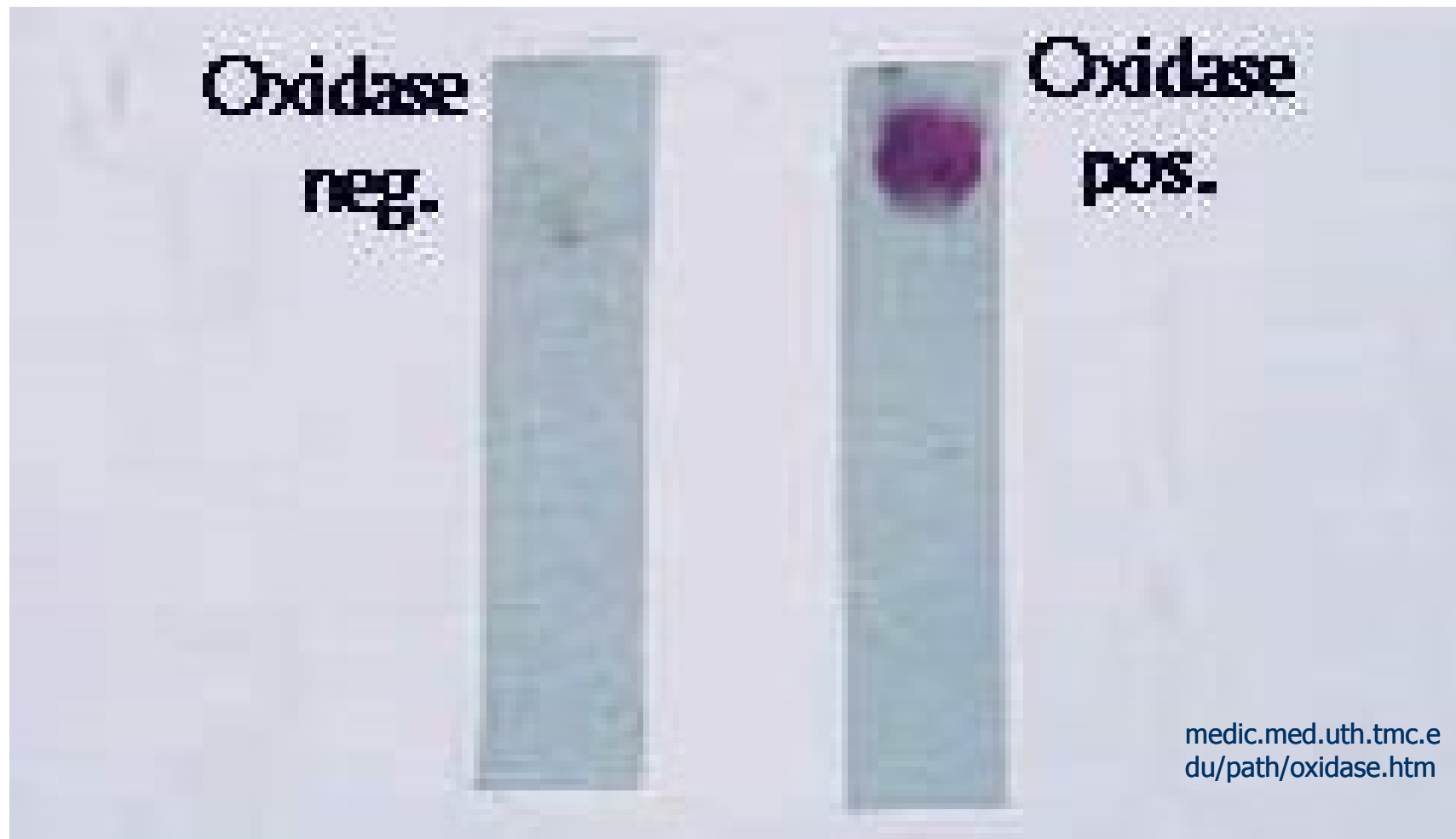


# Testy s diagnostickými proužky

- 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 zmodrozelená
  - PYR – proužek po několika minutách, přikápnutí činidla a další minutě čekání zčervená
  - betalaktamázový strip – týká se testování některých faktorů rezistence (viz příště)

# Oxidázový test

---



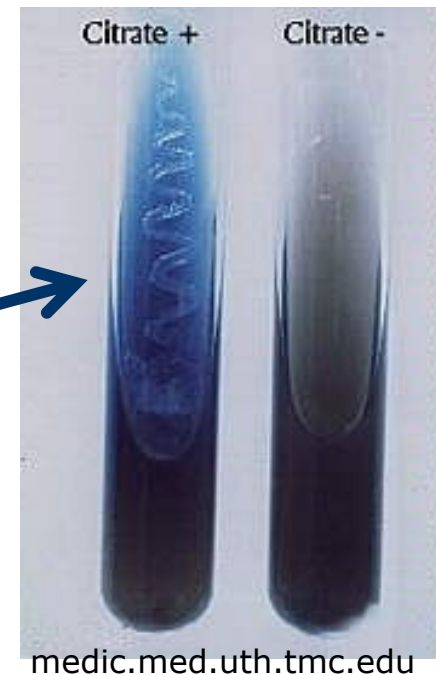
# Jednoduché zkumavkové testy

---

- 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



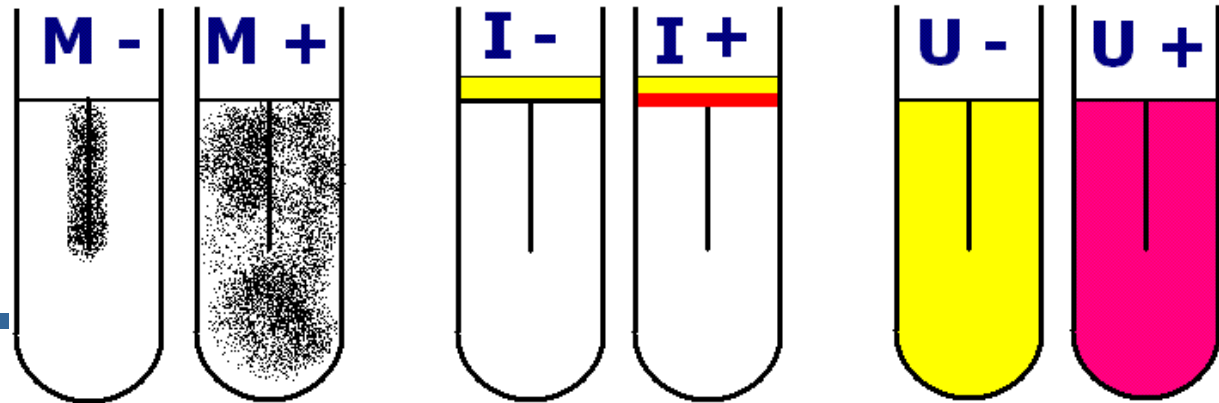


# Složité zkumavkové testy

---

- 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 zružovění celé půdy)
- Nebo Hajnova půda, která detekuje štěpení glukózy, tvorbu plynu z glukózy, štěpení laktózy a tvorbu sirovodíku

# MIU

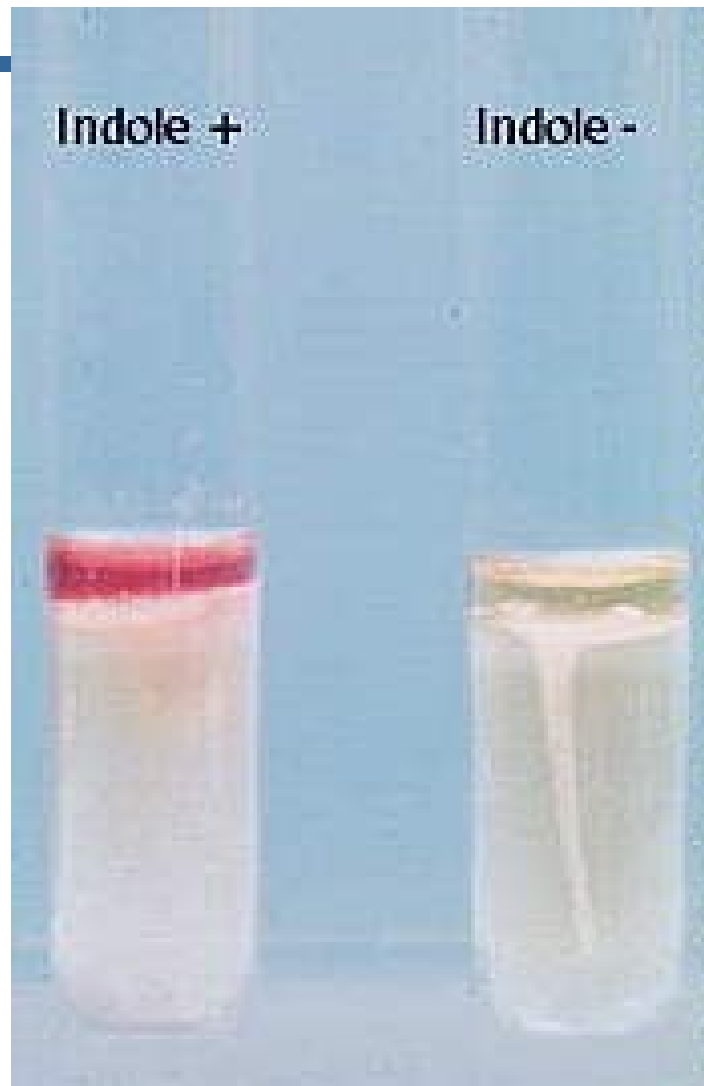


- **M**otility – pohyb. Pohyblivé bakterie rostou nejen kolem vpichu, ale v celém objemu zkumavky.
- **I**ndol (tvorba). U bakterií tvořících indol se po přidání Kovácsova činidla vytvoří červený prstenec na styku činidla a půdy
- **U**rea (močovina). Štěpení močoviny – celý objem půdy zružoví

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

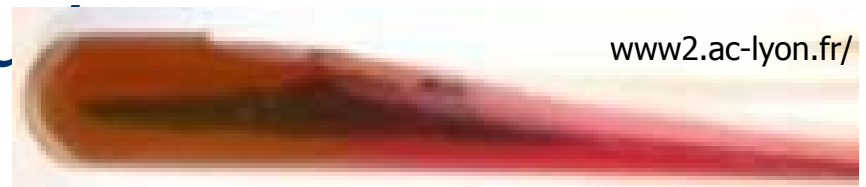
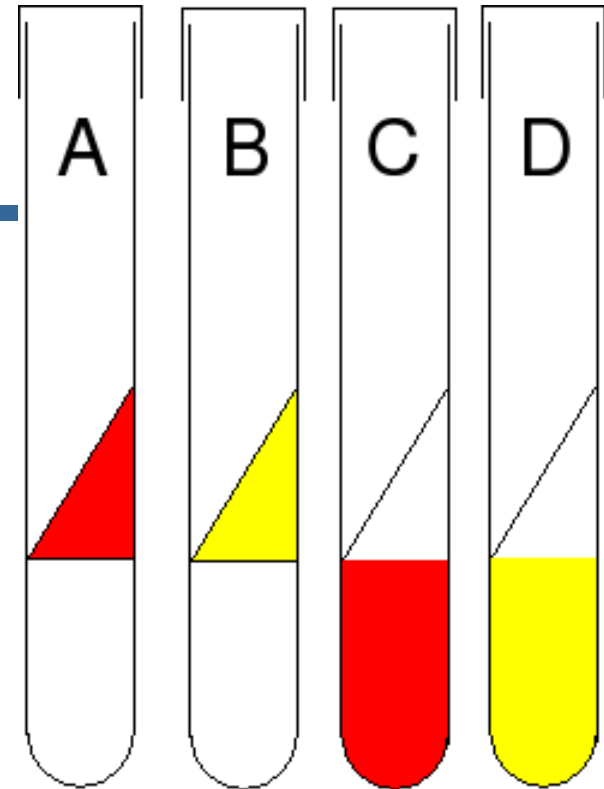


# ...indol a ureu



# 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 při fermentaci glukózy



# Sady zkumavek

---

- Složité 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)

---

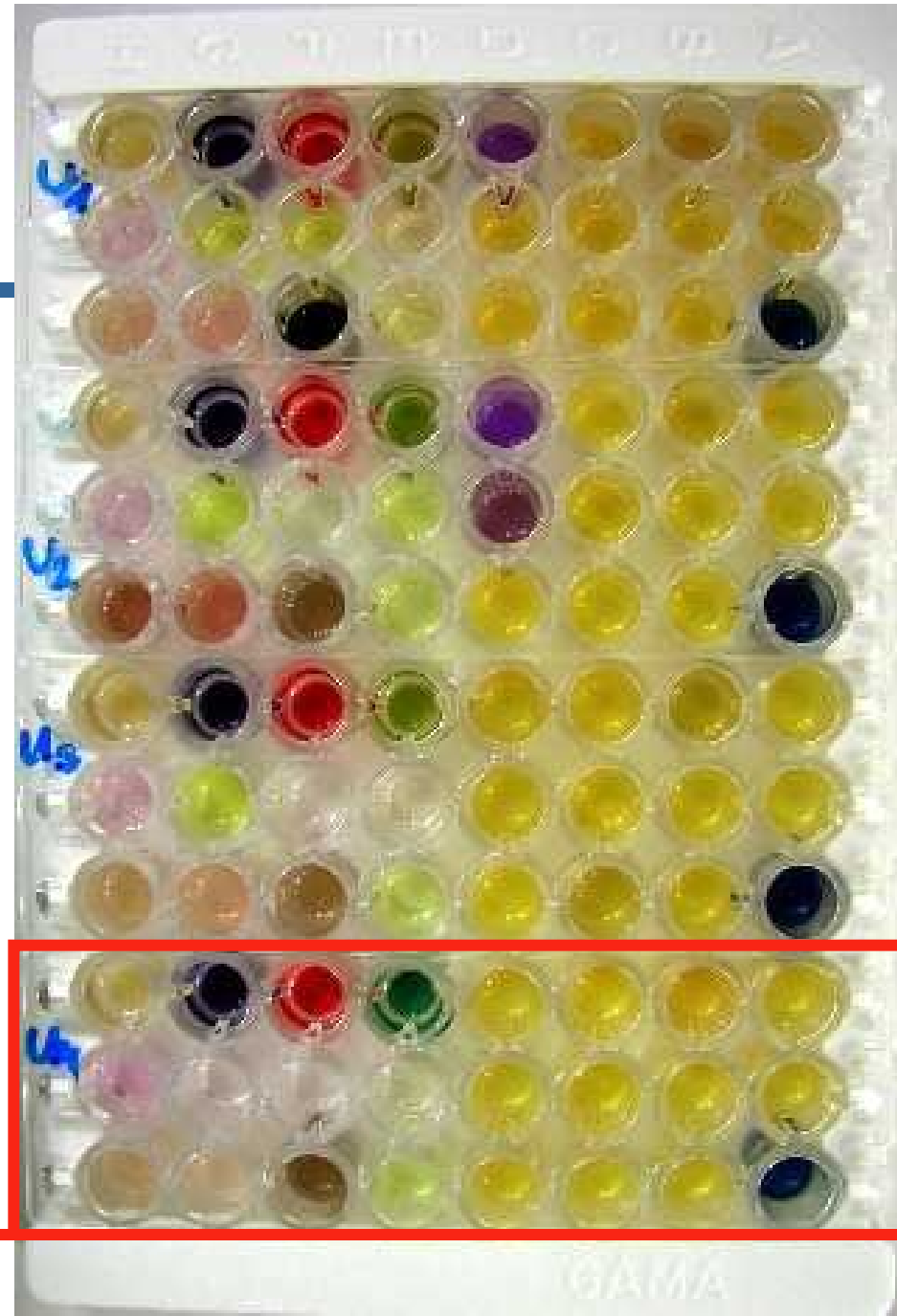
- Výrobce dodává destičky s lyofylizovanými substráty, umístěnými na dně důlků v destičce
- Pracovník připraví suspenzi bakterie ve FR nebo v suspensním médiu
- Do každého důlku se kápne kapka suspenze či dvě kapky
- Zbytek suspenze se často ještě využije jako zkumavkový test s diagnostickým proužkem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

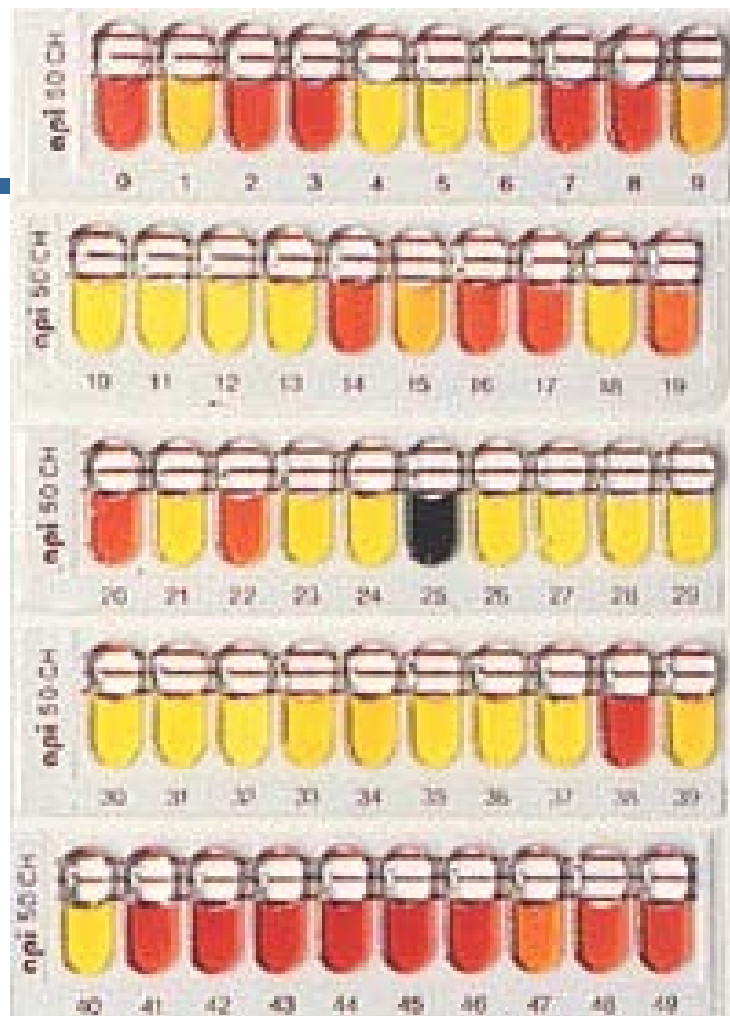


# Zahraníční soupravy

[www.ilexmedical.com/products\\_engl/api.htm](http://www.ilexmedical.com/products_engl/api.htm)



Foto: O. Z.



[www.ilexmedical.com/products\\_engl/api.htm](http://www.ilexmedical.com/products_engl/api.htm)

<http://www.oxid.com/bluePress/uk/en/images/PR020505.jpg>





# 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

# Oktaľové 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	<del>2</del>	4	1	2	<del>4</del>	<del>1</del>	<del>2</del>
Kód	5			3			0	



# Přepočítávání trojic

- - - 1 2 4		<b>0</b>
+ - - <b>1</b> 2 4	1	<b>1</b>
- + - 1 <b>2</b> 4	2	<b>2</b>
+ + - <b>1</b> <b>2</b> 4	1 + 2	<b>3</b>
- - + 1 2 <b>4</b>	4	<b>4</b>
+ - + <b>1</b> 2 <b>4</b>	1 + 4	<b>5</b>
- + + 1 <b>2</b> <b>4</b>	2 + 4	<b>6</b>
+ + + <b>1</b> <b>2</b> <b>4</b>	1 + 2 + 4	<b>7</b>

# Konkrétně u ENTEROtestu16 (17 testů)

(530 063 = E. coli, 99,89 %,  $T_{in}=1,00$ )

	1 ONPG	2 H	3 G	4 F	5 E	6 D	7 C	8 B	9 A	1 0 H	1 1 G	1 2 F	1 3 E	1 4 D	1 5 C	1 6 B	1 7 A
	ONPG	První řádek panelu								Druhý řádek panelu							
+																	
-																	
?																	
?	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
	1	<del>2</del>	4	1	2	<del>4</del>	<del>1</del>	<del>2</del>	<del>4</del>	<del>1</del>	<del>2</del>	<del>4</del>	<del>1</del>	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)

[www.hardydiagnostics.com](http://www.hardydiagnostics.com)

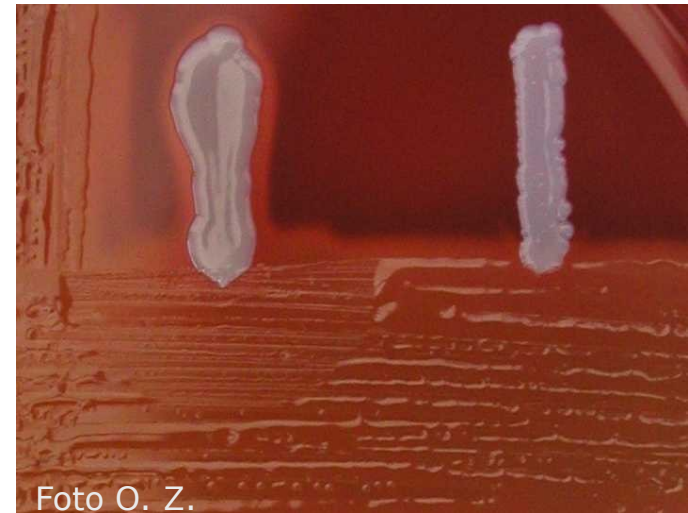
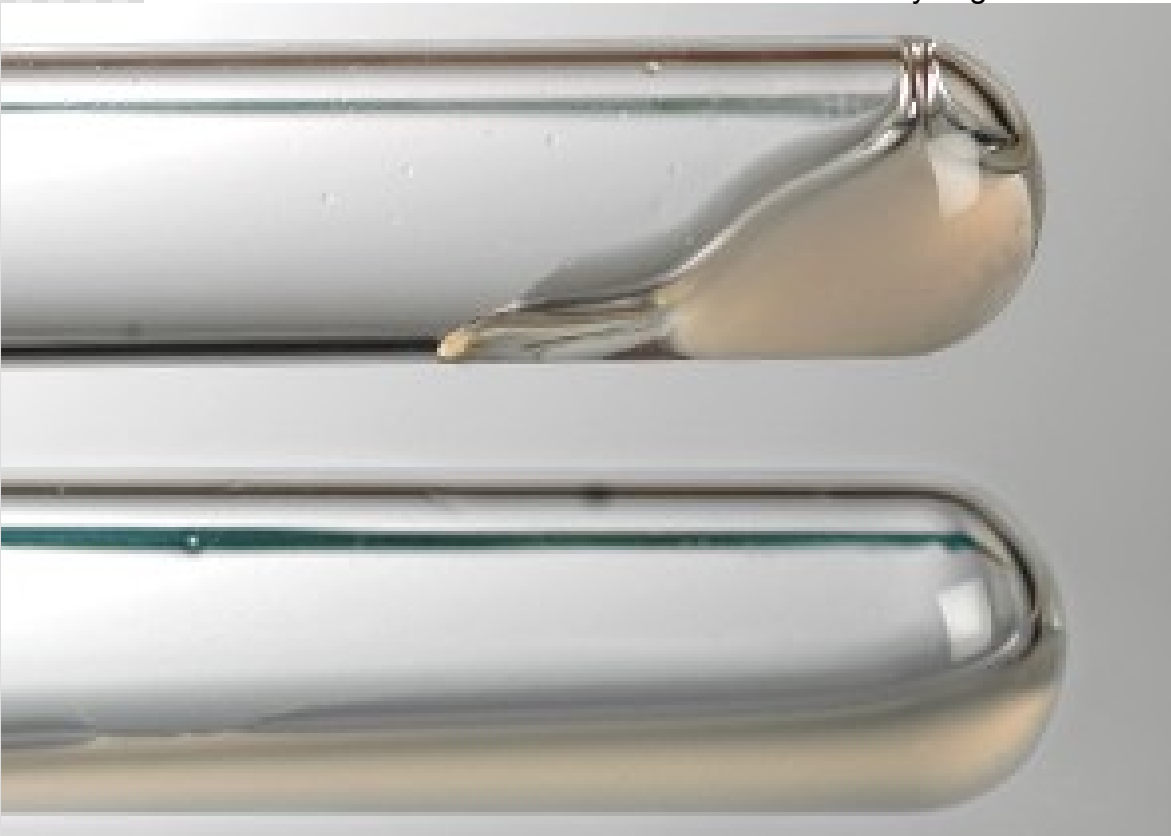


Foto O. Z.

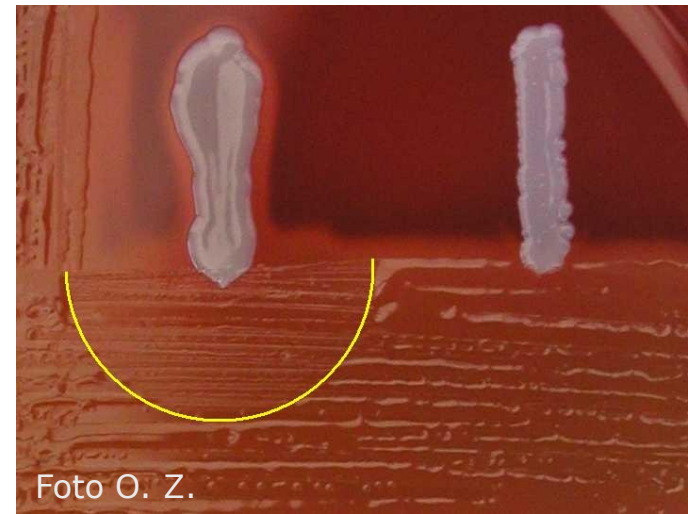


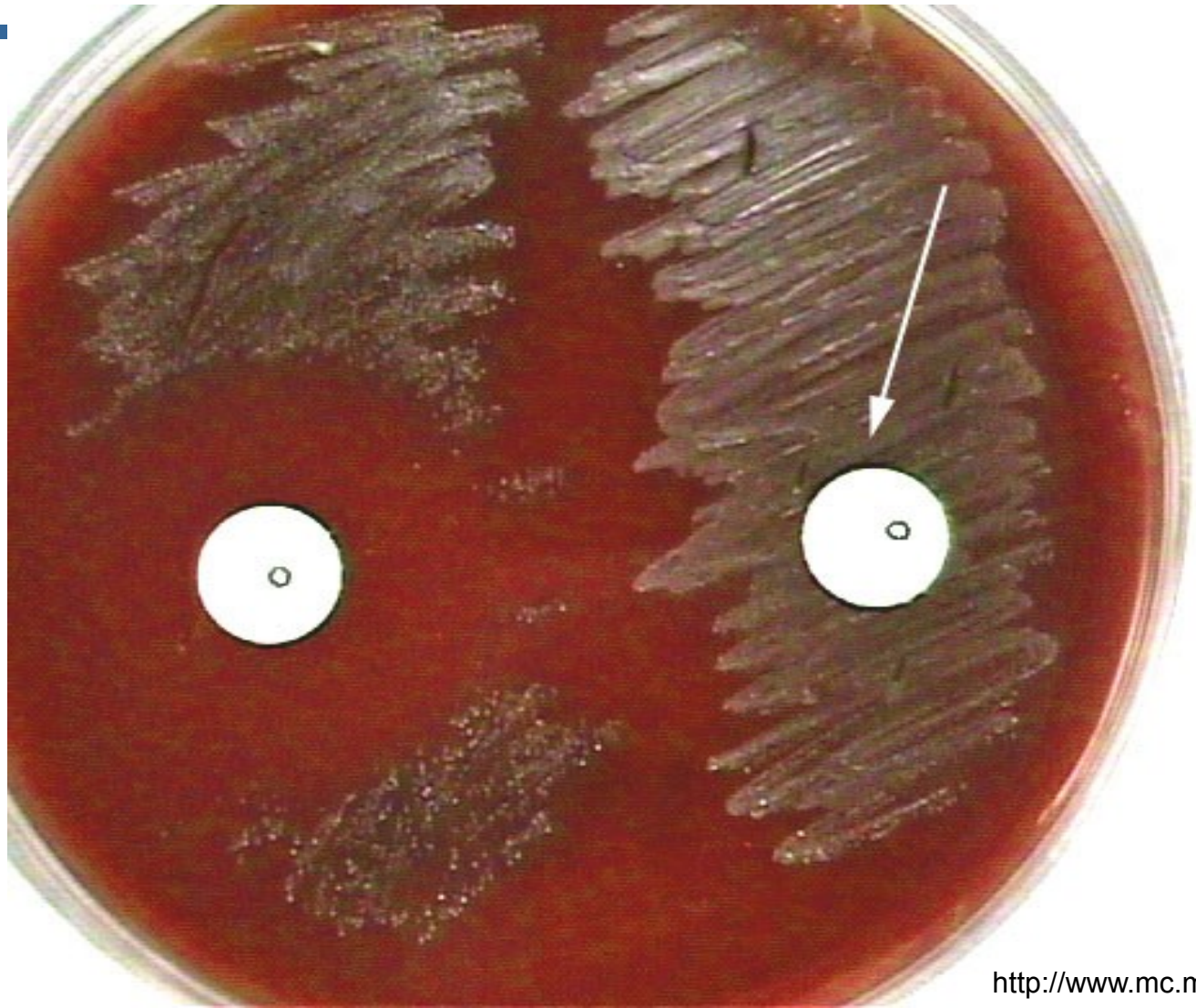
Foto O. Z.

# 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 pozitivní a negativní



Příště budeme

p  
p  
a



obrázek z intranetu FN u sv. Anny v Brně