

Lékařská mikrobiologie pro ZDRL

Týden 4: Metody identifikace bakterií, principy biochemické identifikace

Upraveno podle Ondřeje
Zahradníčka

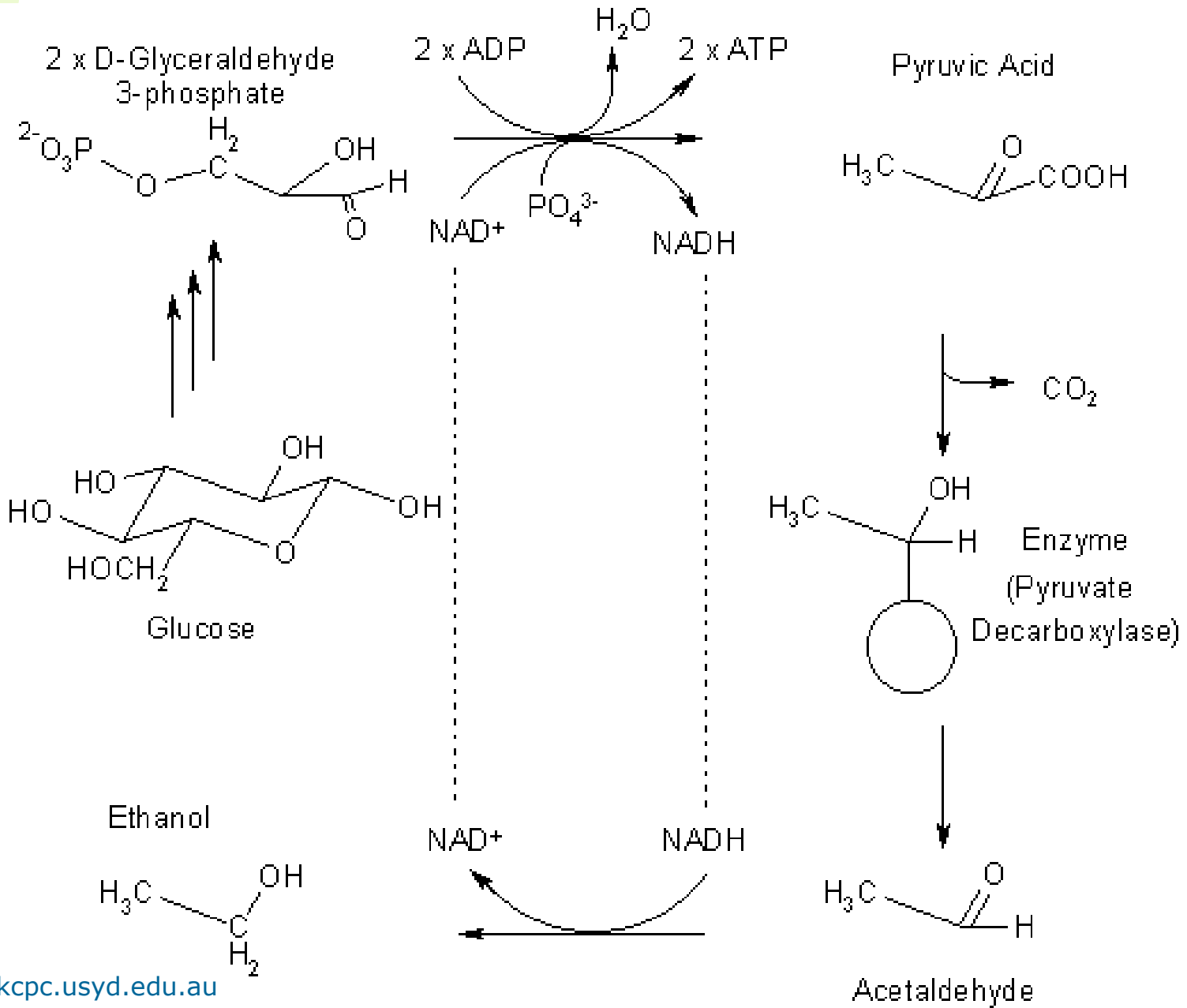
Postavení v systému metod

- **Přímé metody (prokážeme mikroba – jeho část – jeho 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)**

Biochemická identifikace obecný princip I

- bakteriální mají svůj metabolismus.
- **Průmyslová mikrobiologie** využívá bakteriálního metabolismu (zejména fermentativního katabolismu) k výrobě různých látek, včetně řady potravin
- **Taxonomie** 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:
 - Klebsiella pneumoniae* štěpí ureu v 90 % případů**
 - Enterobacter cloacea* štěpí ureu v 10 % případů**
 - Maltózu využívající mikrob = ???**
 - typická ***Klebsiella pneumoniae* ???**
 - atypický ***Enterobacter cloacea* ???**

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 **naš hypotetický kmen je**
 - **na 99,3 % *Klebsiella pneumoniae***
 - **na 0,5 % *Enterobacter cloacea***
 - **na 0,2 % něco úplně jiného**
- Je pak na zvážení identifikujícího, zda mu taková míra pravděpodobnosti stačí, **nebo zda 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 *Klebsiella pneumoniae* a ne něco jiného
 - **Index typičnosti:** míra shody s „ideálním kmenem“ *Klebsiella pneumoniae*. 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.
- Kombinace využívání substrátů je typická pro určitý bakteriální druh – biochemický profil

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**.
- „Flashku“ 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**
- **identifikace bakterií**
identifikace bakterií
- 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.*

Klasická identifikace bakterií

- K identifikaci mikroorganismů se využívají biochemické testy
- Obecně je rozdělit do 3 kategorií:
 - Přeměny sacharidů
 - Přeměny dusíkatých látek
 - Ostatní testy



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 H_2O_2) rozmícháme bakterie. Bublinky = pozitivita. **Princip:**
 $2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$

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

Oxidase
neg.



Oxidase
pos.

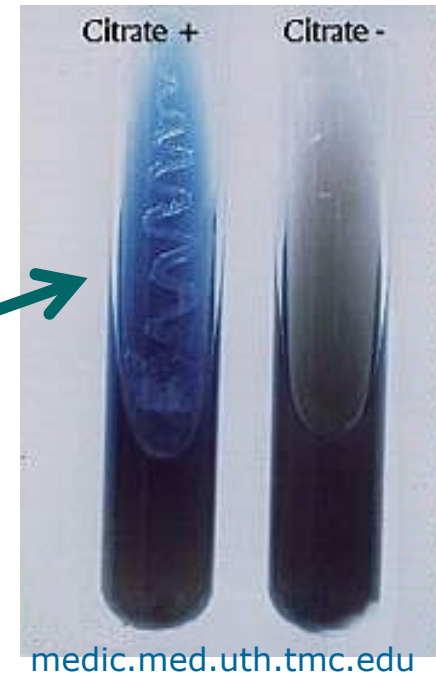


Jednoduché zkumavkové testy

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

Příklady jednoduchých zkumavkových testů

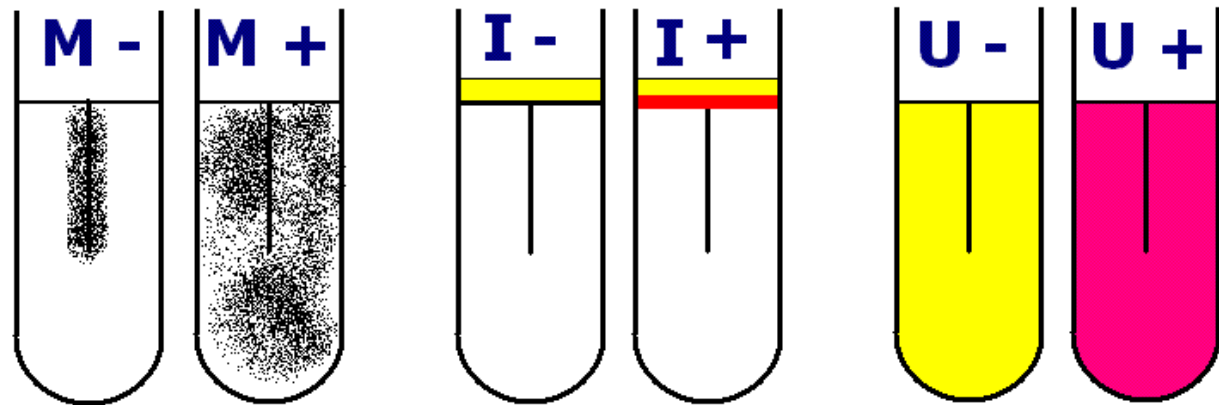
- **Arabinóza** – tekutá. Zežloutnutí = pozitivní, zůstane zelená = negativní (pro enterokoky)
- **Simmons citrát** – agarová. Zmodrání = pozitivní, zelená = negativní – využívání citrátu
- **ONPG a VPT** – s přidáním proužku. U ONPG (β -galaktosidáza) tekutina zežloutne, u VPT se vytvoří červený prstenec u hladiny
- **VTP (Voges – Proskauerův test)** - tvorba acetoinu



Složité zkumavkové testy

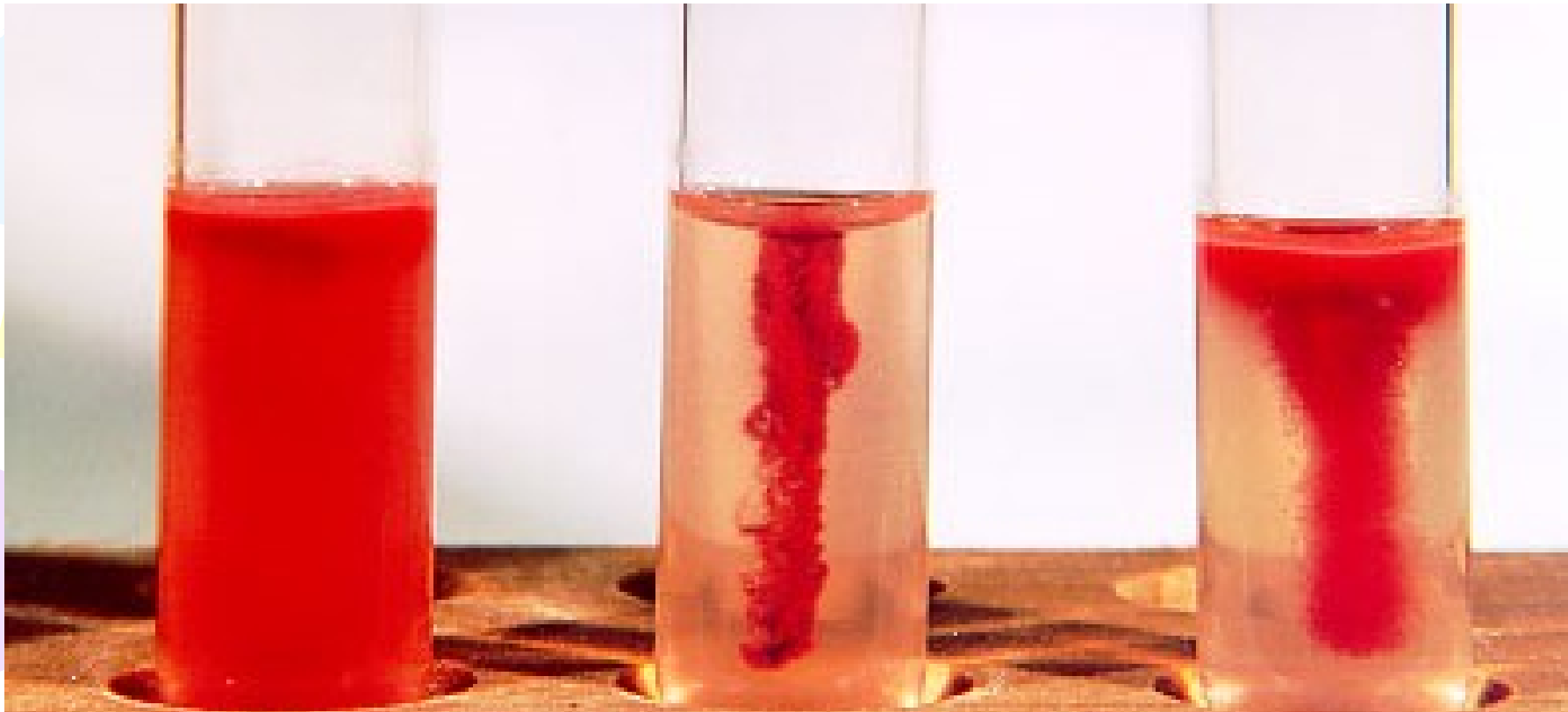
- V jedné zkumavce probíhá více reakcí
- Např. test MIU.
 - **M = motility** – pohyb (zákal se rozlézá polotekutým agarem, nezůstává jen v místě vpichu)
 - **I = indol** (pozitivita = červený prstenec)
 - **U = urea** (štěpení močoviny indikuje zrůžovění celé půdy)
- Nebo Hajnova půda, která detekuje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

MIU

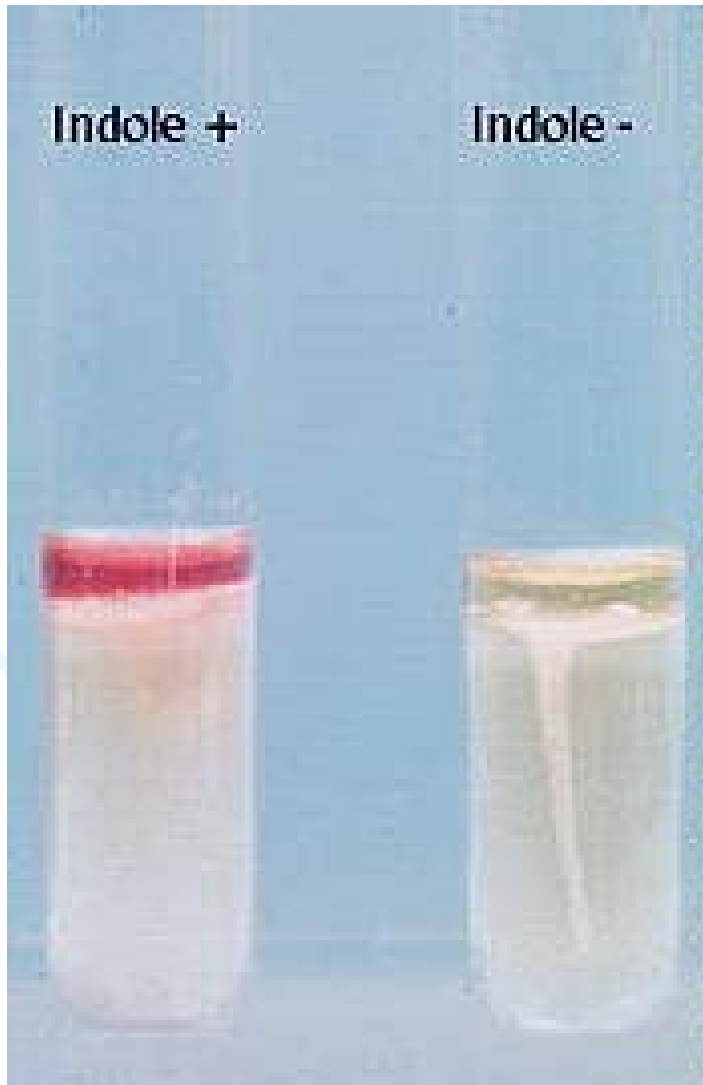


- **M**otility – pohyb. Pohyblivé bakterie rostou nejen kolem vpichu, ale v celém objemu zkumavky.
- **I**ndol (tvorba). U bakterií tvořících indol se po přidání Kovácsova činidla vytvoří červený prstenec na styku činidla a půdy
- **U**rea (močovina). Štěpení močoviny – celý objem půdy zružoví

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

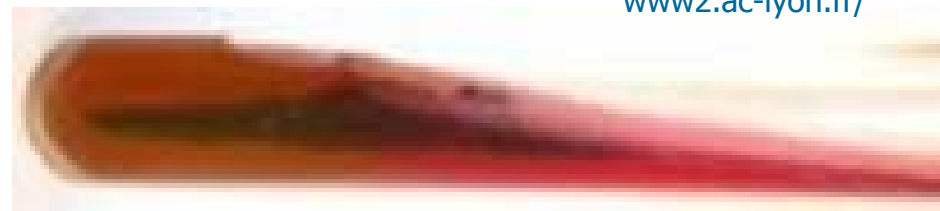
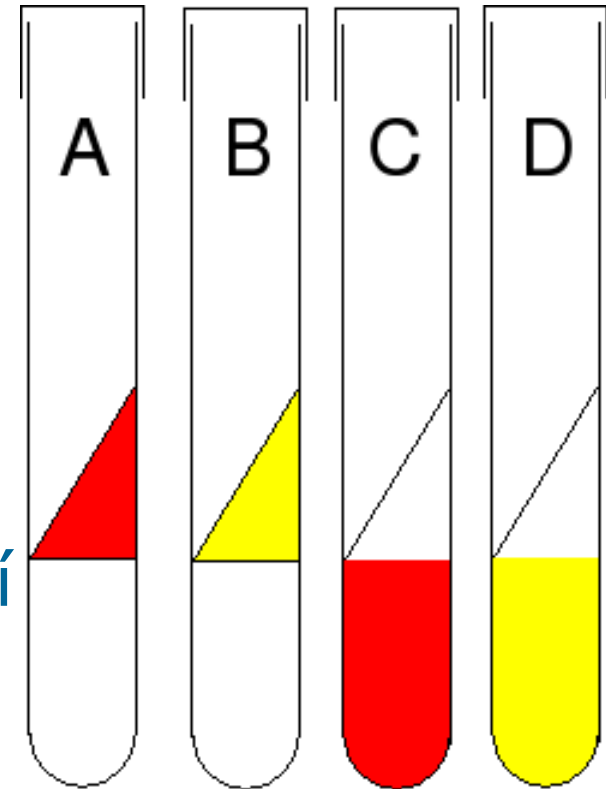


...indol a ureu



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 plyny při fermentaci glukózy
- Podobný účel půda TSI



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 + ureáza – používáno v naší laboratoři)

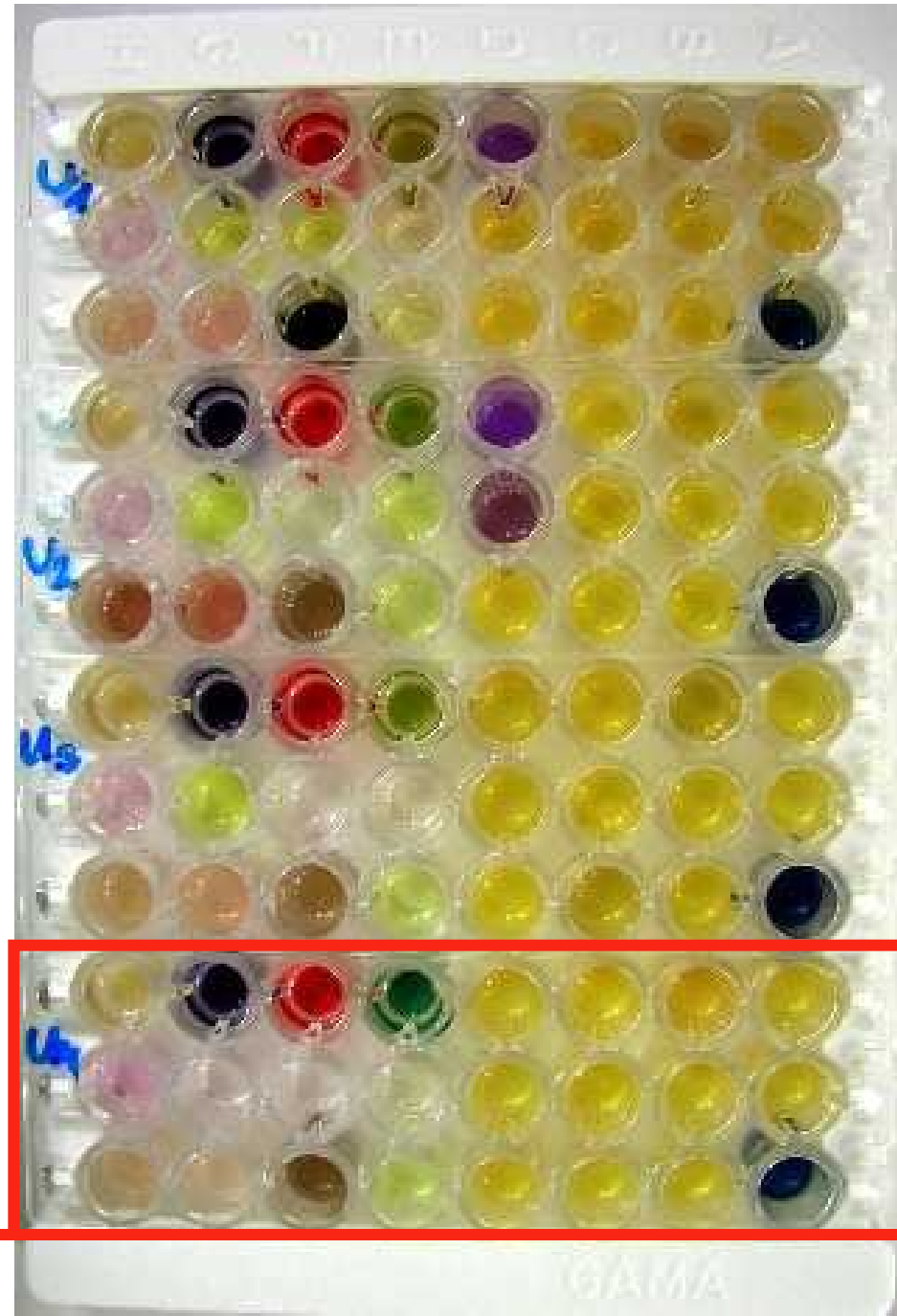
Miniaturizace: testy v plastových panelech

- 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) po víc než padesát
- Liší se v technických detailech. Vždy je však substrát vysušený, bakterie se nejprve rozmíchá ve fyziologickém roztoku nebo suspenzním médiu a pak se kape či lije do důlků

Provedení testů od firmy Erba Lachema (u nás nejběžnější)

- Výrobce dodává destičky s vysušenými substráty, umístěnými na dně důlků v destičce
- Pracovník připraví suspenzi bakterie ve FR nebo v suspensním médiu
- Do každého důlku se napipetuje 100 μ l suspenze
- Zbytek suspenze se u některých testů ještě využije jako zkumavkový test s diagnostickým proužkem (ONPG, VPT)
- Destička i zkumavka se inkubuje v termostatu při 37 °C

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



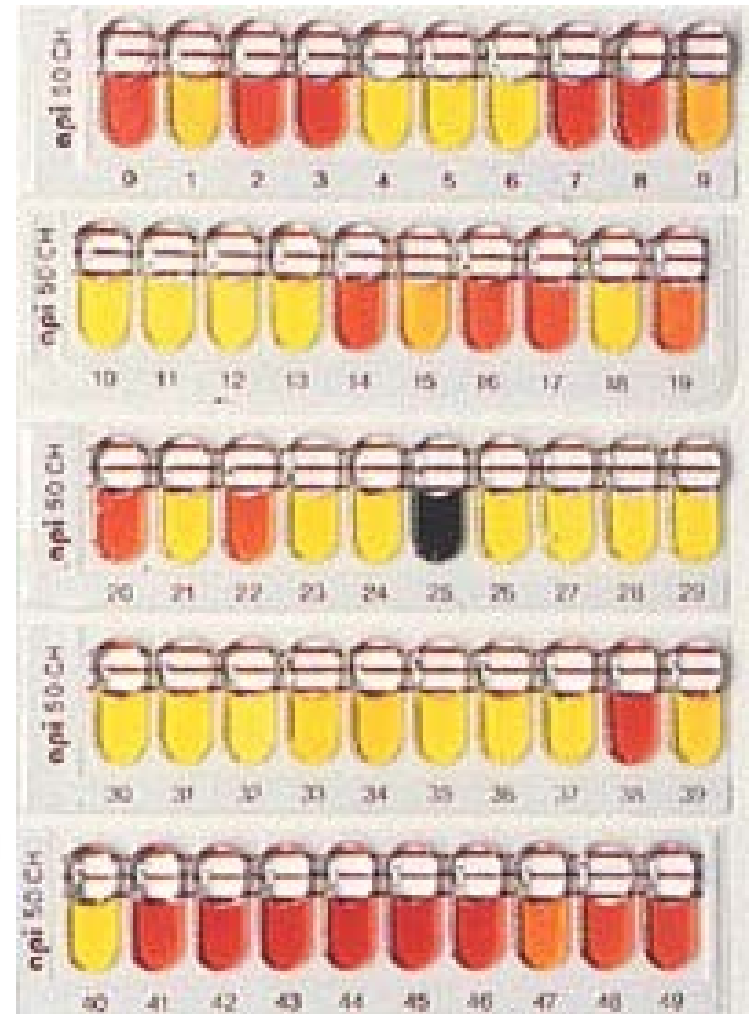
Zahraniční soupravy

www.ilexmedical.com/products_engl/api.htm



Foto: O. Z.

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



www.ilexmedical.com/products_engl/api.htm





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

Oktaalové kódy – II

- V praxi se tedy každé trojici výsledků přiřadí číslice od nuly po sedmičku – viz následující obrazovka
- Pokud má test např. 17 reakcí (*třeba velmi běžný ENTEROtest 16 k určování enterobakterií má 16 důlků + ONPG ve zbytku suspenze*), 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 ENTEROtestu16 (17 testů)

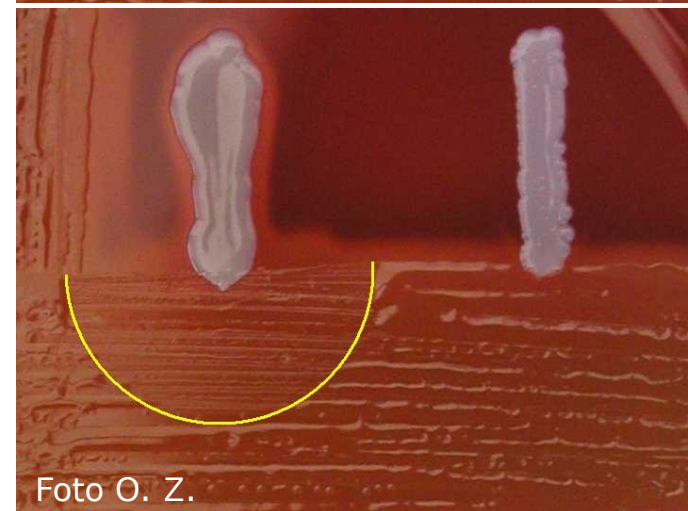
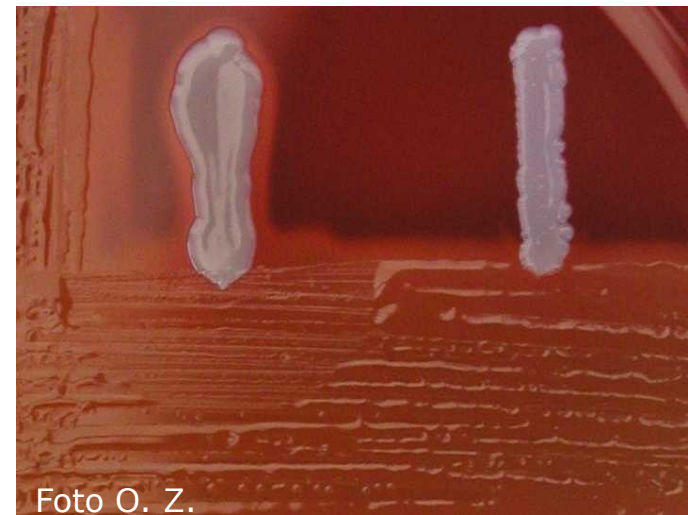
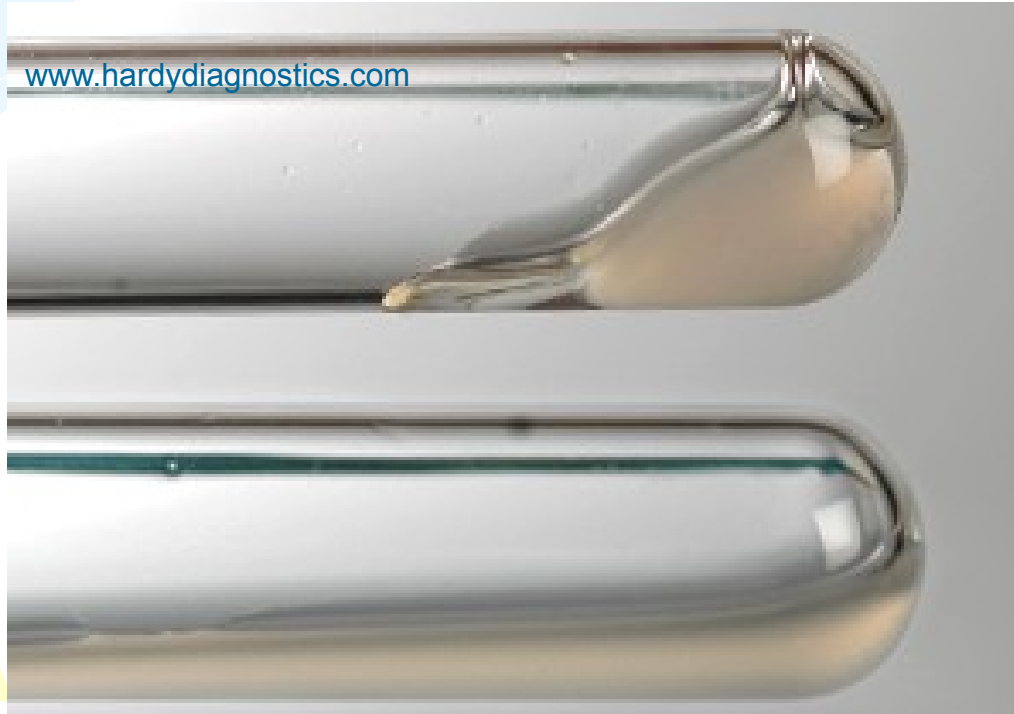
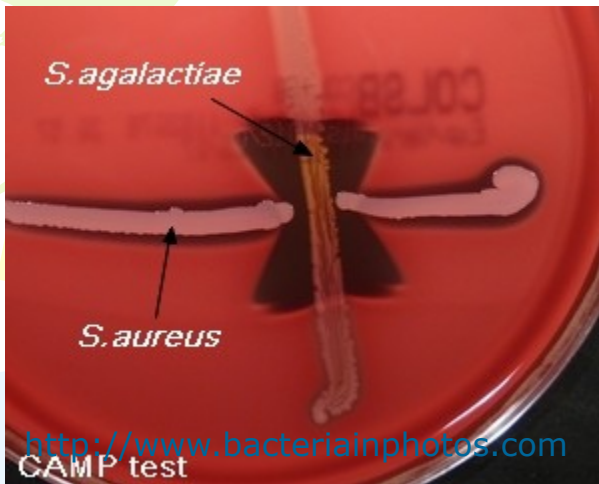
(530 063 = E. coli, 99,89 %, $T_{in}=1,00$)

	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	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)
 - Hemolytické interakce – CAMP test

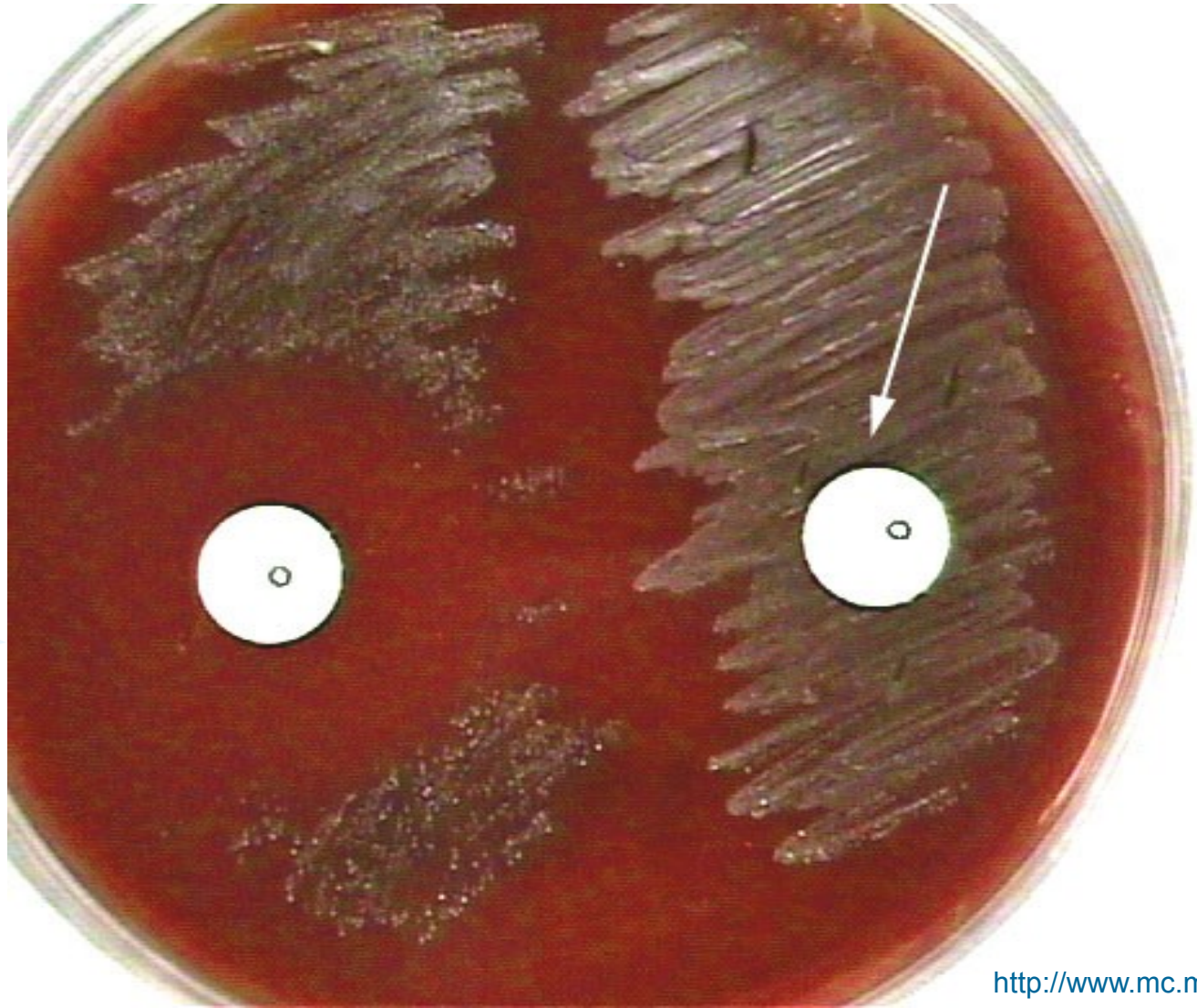
Jiné identifikační testy



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



Jiné metody identifikace bakterií

• **Hmotnostní spektrometr**

- Hmotnostní spektrometr (MS) je analytický nástroj pro stanovení hmotností atomů, molekul a molekulových fragmentů. Princip MS spočívá v převedení pevné fáze do fáze plynné ionizací
- Vzniklé ionty jsou elektricky (nebo magneticky) separovány v hmotnostním analyzátoru na základě poměru hmotnosti k náboji
- Detektor zachycuje signály iontů uvolněných z analyzátoru

Jiné metody identifikace bakterií

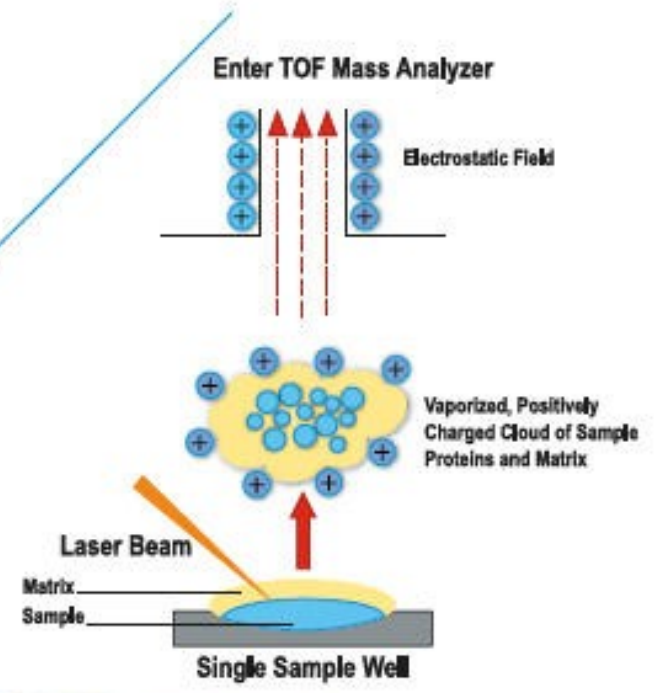
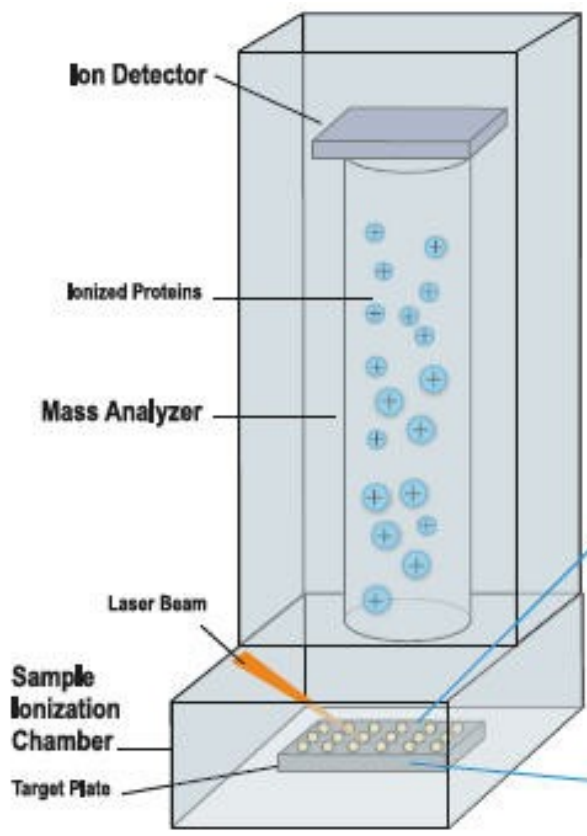
- **MALDI-TOF MS**

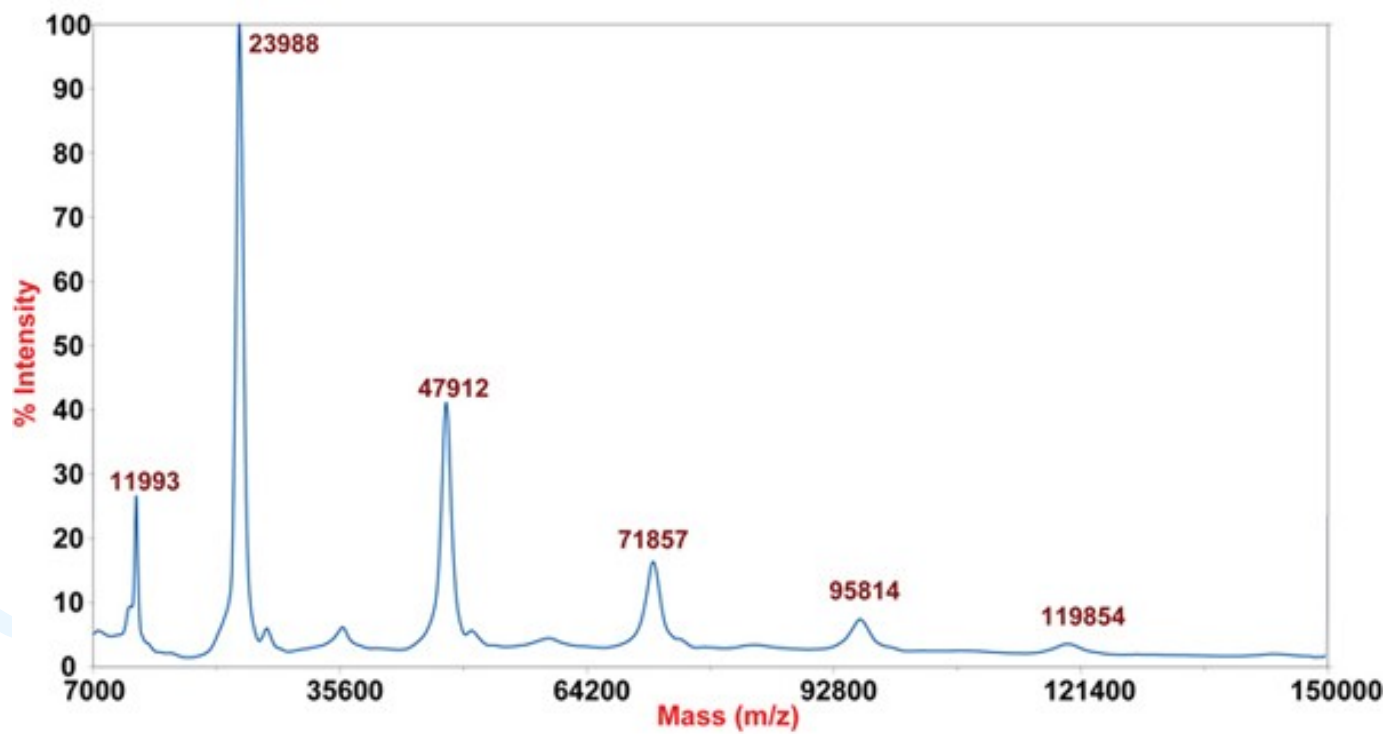
- Nejmodernější metoda identifikace
- MALDI je ionizační metoda, založená na aplikaci krystalizující a světlo-absorbující matricové složky ke vzorku.
- Matrice zajistí ochranu integrity molekul během analýzy.
 - Krystaly matrice absorbují energii fotonů z laseru a dochází „šetrné“ ionizace velkých molekul.
- Molekuly během procesu nejsou fragmentovány
- Kombinací MALDI metody s hmotnostním spektrometrem vznikla široce využívaná technika pro charakterizaci biopolymerů, biomolekul a makromolekulových komplexů, tedy proteinů a proteinových komplexů, DNA a RNA, polysacharidů, glykoproteinů a glykolipidů
- Pro rozdělení iontů lze využít různé analyzátory, např. iontová past
- MALDI MS jsou konstruovány s průletovým analyzátozem time-of-flight (TOF)

Jiné metody identifikace bakterií

- Celá analýza spočívá v nanesení nakultivovaného mikrobiálního vzorku a matrice na čip.
- Po zaschnutí jsou čipy s bakteriálními vzorky umístěny do přístroje a automaticky zpracovány.
- MS analýza na základě **detekce proteinů** vytvoří charakteristická proteinová spektra (jednotlivé vrcholy odpovídají svou velikostí a intenzitou proteinům uvolňovaným během analýzy)
- Zpracování vzorku odebraného z narostlé kultury trvá přibližně 6 minut







Jiné metody identifikace bakterií - průkaz antigenu

- Imunologické metody
- Využití vazby specifické protilátky
- Rychlý průkaz ve vzorku bez skultivace
- *Clostridium difficile* ve stolici

Jiné metody identifikace bakterií - molekulární techniky

- Analýza DNA
 - Hybridizace nukleových kyselin
 - Určení přítomnosti (specifické) sekvence nukleové kyseliny
 - Komplementární próba hybridizuje s DNA sekvencemi studovaného organismu
- Porovnání štěpení DNA (plasmidů) restričními enzymy
 - Určení příbuznosti organismů
 - Užitečné v případě nesnadno kultivovatelných organismů a organismů produkujících toxin (produkt genu kódujícího

Jiné metody identifikace bakterií - molekulární techniky

- Metoda FISH

- Fluorescenční hybridizace *in situ*
- Próby značené fluorescenční značkou
- Próby komplementární k 16S nebo 18S rRNA
- Specifita závislá na sekvenci próby
- Skupina organismů, určitý organismus
- Využití různých fluorescenčních barviv pro současnou analýzu více organismů
- Využití i pro detekci patogenů v potravinách a klinických vzorcích

Jiné metody identifikace bakterií - molekulární techniky

- Metoda PCR
 - využití genů specifických pro daný organismus
 - identifikace neznámého organismu
 - využití pro identifikaci obtížně kultivovatelných mikroorganismů

**Příště budeme
pok
pov
ant**



obrázek z intranetu FN u sv. Anny v Brně