

Lékařská mikrobiologie pro ZDRL

Týden 4: Metody identifikace bakterií, principy biochemické identifikace

Upraveno podle Ondřeje
Zahradníčka

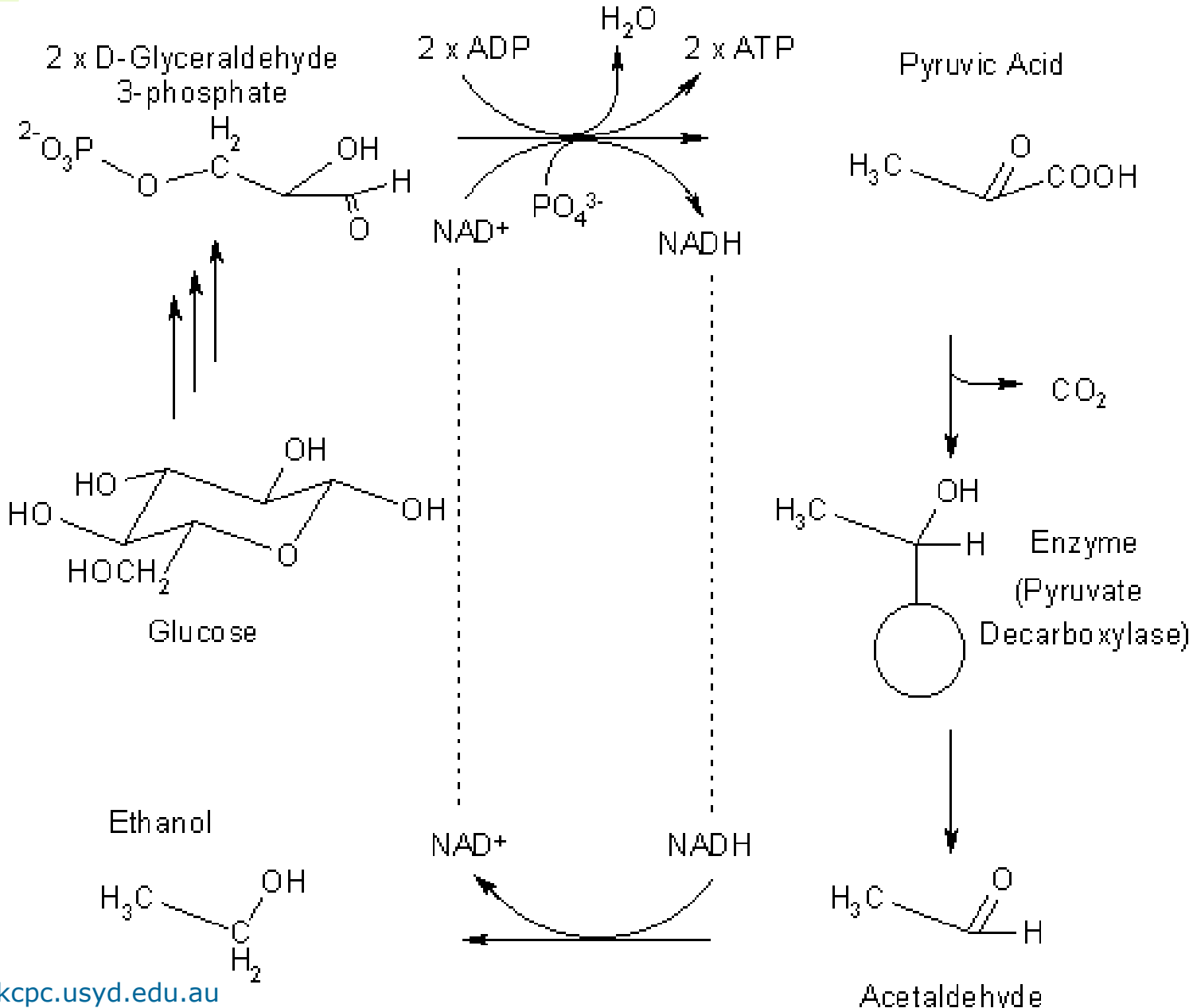
Postavení v systému metod

- **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)**

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 – 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 %**
- 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 *Klebsilla pneumoniae* a ne něco jiného
 - **Index typičnosti:** míra shody s „ideálním kmenem“ *Klebsilla pneumoniae*. Pokud je kmen ideální, je $T_{in} = 1,00$; pokud kmen např. netvoří indol, ačkoli 90 % klebsiel 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.



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)

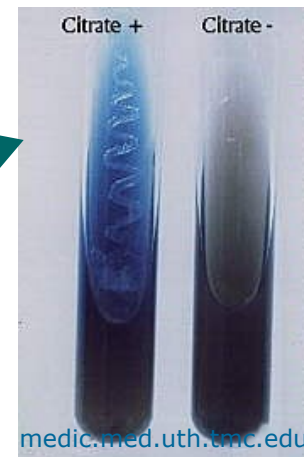
Oxidázový test



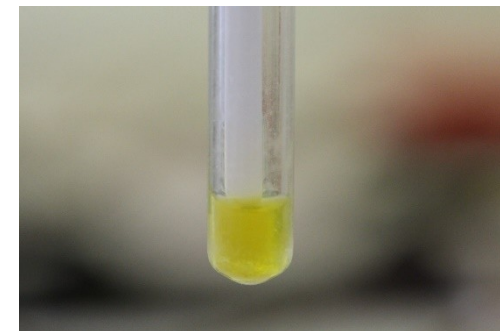
Jednoduché zkumavkové testy

- 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



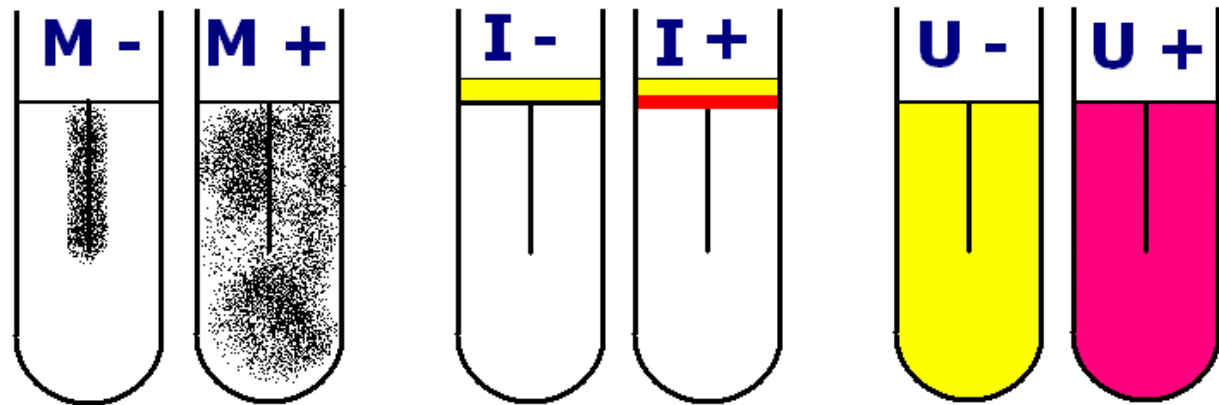
- **Arabinóza** – tekutá.
Zežloutnutí = pozitivní, zůstane zelená = negativní (pro enterokoky)
- **Simmons citrát** – agarová. Zmodrání = pozitivní, zelená = negativní
- **ONPG a VPT** – s přidáním proužku. U ONPG tekutina zežloutne, u VPT se vytvoří červený prstenec u hladiny



Složité zkumavkové testy

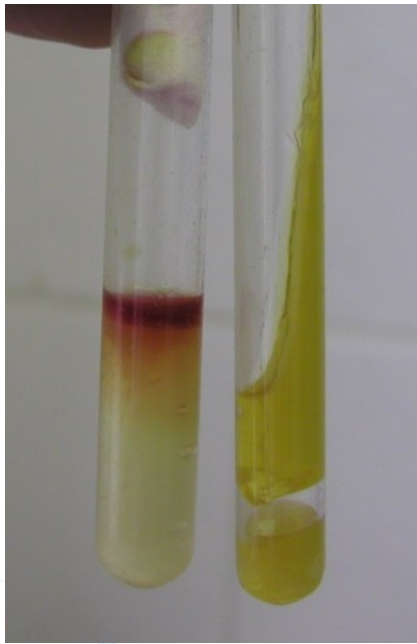
- V jedné zkumavce probíhá více reakcí
- Např. test MIU.
 - **M = motility** – pohyb (zákal se rozlézá polotekutým agarem, nezůstává jen v místě vpichu)
 - **I = indol** (pozitivita = červený prstenec)
 - **U = urea** (štěpení močoviny indikuje zrůžovění celé půdy)
- Nebo Hajnova půda, která detekuje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

MIU

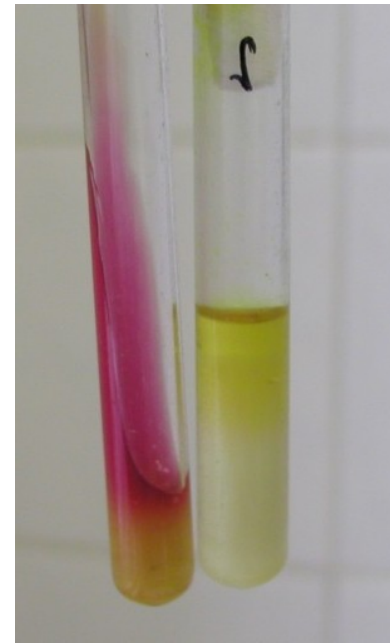


- **M**otility – pohyb. Pohyblivé bakterie rostou nejen kolem vpichu, ale v celém objemu zkumavky.
- **I**ndol (tvorba). U bakterií tvořících indol se po přidání Kovácsova činidla vytvoří červený prstenec na styku činidla a půdy
- **U**rea (močovina). Štěpení močoviny – celý objem půdy zružoví

MIU + Hajnova půda

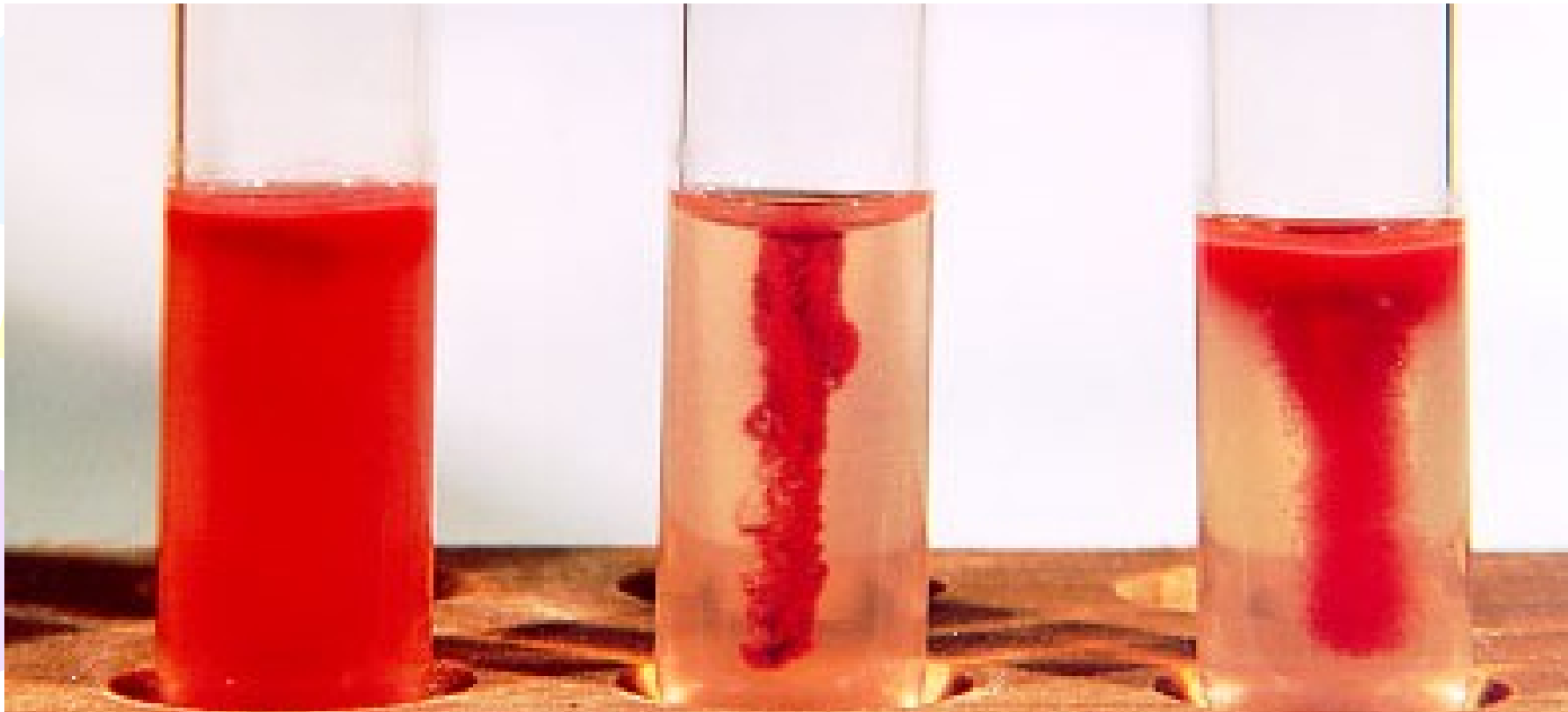


E. coli

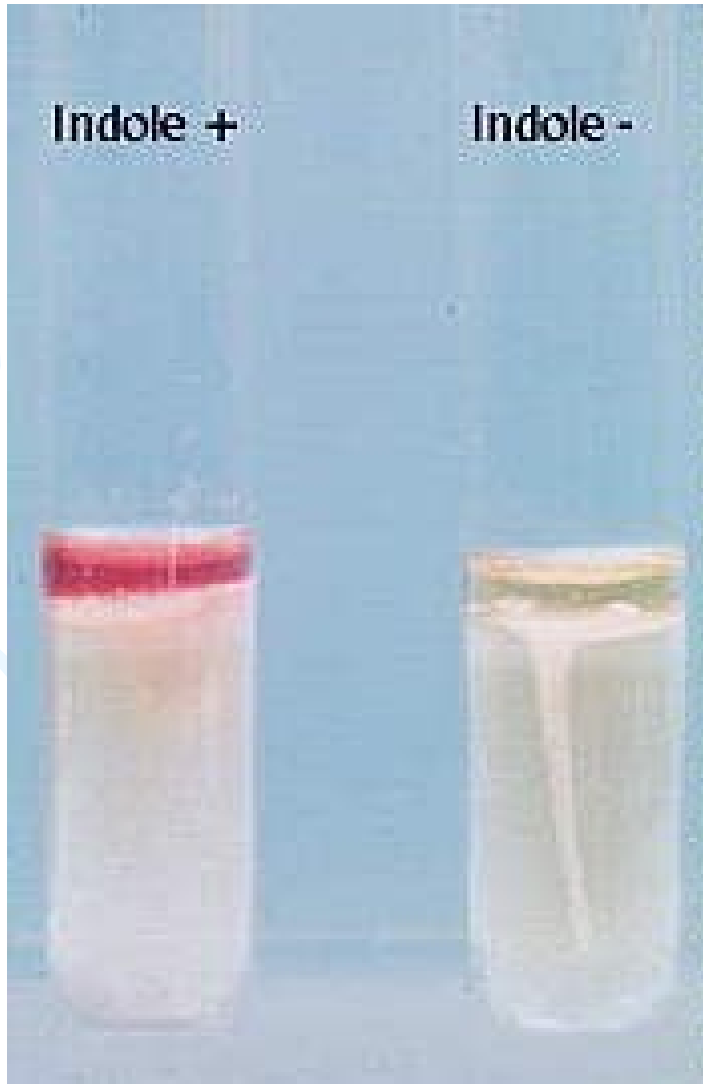


Shigella

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

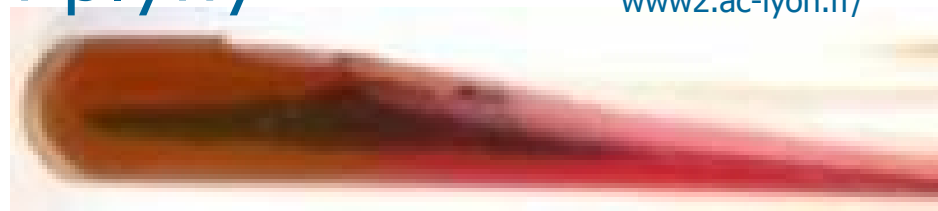
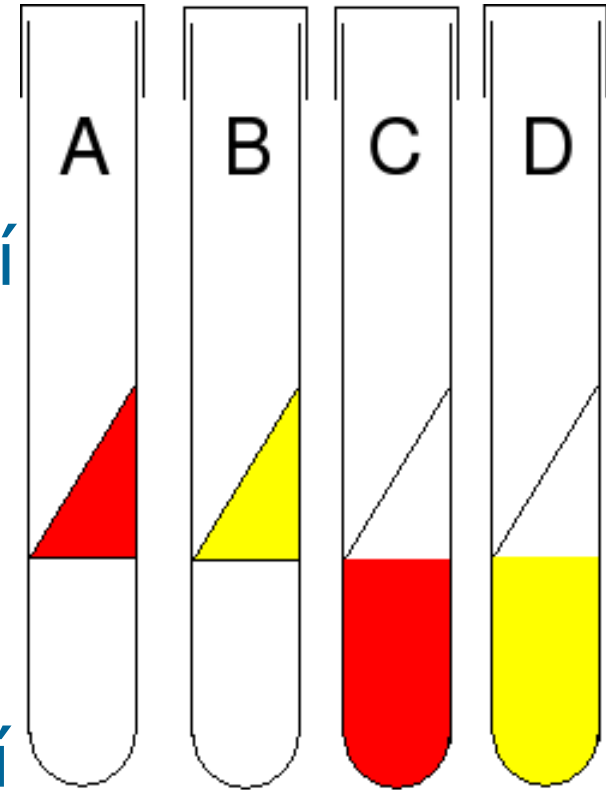


...indol a ureu



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



Hajnova půda



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 je **sada několika jednoduchých zkumavkových testů**
- Lze ovšem i zkombinovat testy složité a jednoduché (např. Hajna + MIU + Simmons citrát + ornithin dekarboxyláza + ureáza)

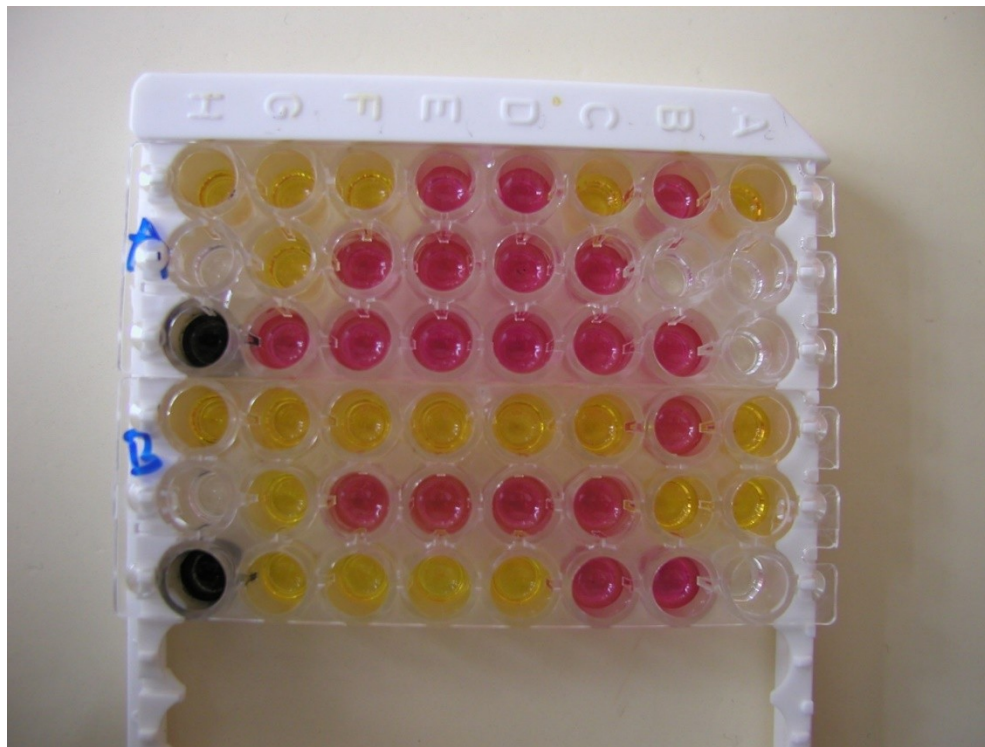
Miniaturizace: testy v plastových panelech

- Miniaturizace sady jednoduchých zkumavkových testů → testy v důlcích plastových mikrotitračních destiček. Místo každé zkumavky je jeden důlek
- Počet testů v sadách kolísá od sedmi (NEISSERIAtest) 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)

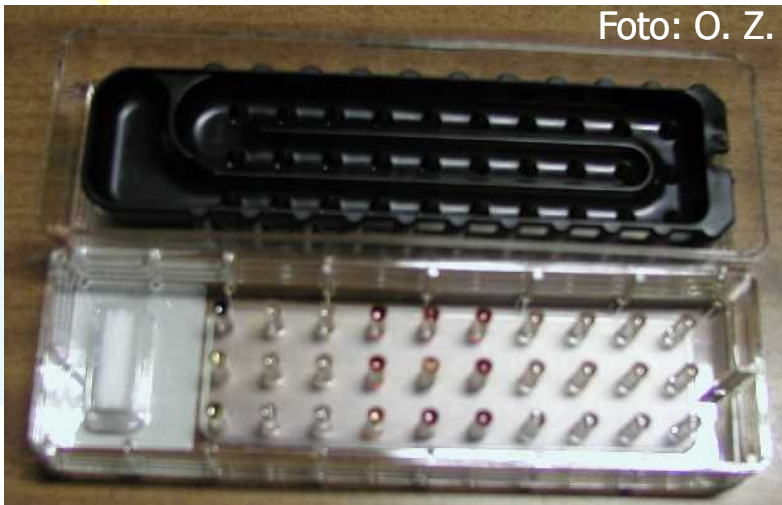
- Výrobce dodává destičky s vysušenými substráty, umístěnými na dně důlků v destičce
- Pracovník připraví suspenzi bakterie ve fyziologickém roztoku nebo v suspenzním médiu
- Do každého důlku se kápne kapka či dvě suspenze
- Zbytek suspenze se u některých testů ještě využije jako zkumavkový test s diagnostickým proužkem (ONPG, VPT), dále se vyočkuje na pevnou pů pro ověření čistoty kultury
- Destička i zkumavka se inkubuje v termostatu

NEFERMtest 24 Pliva Lachema:
do jednoho rámečku lze vložit
čtyři trojřádky

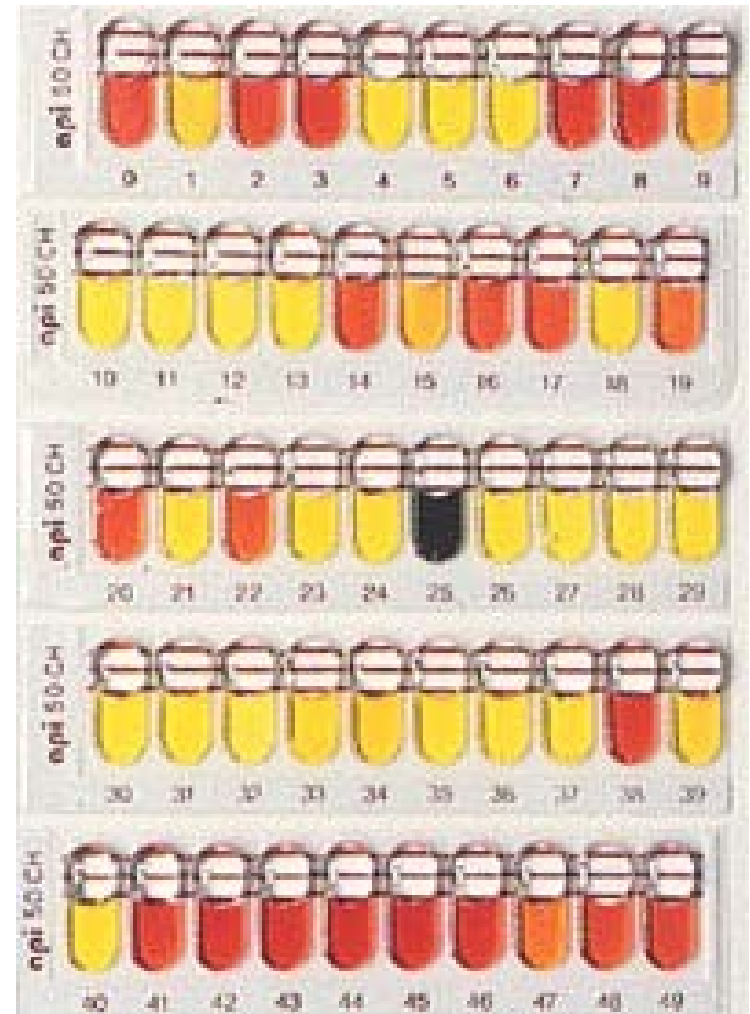


Zahraniční soupravy

www.ilexmedical.com/products_engl/api.htm



<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.

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		

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
	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)

www.hardydiagnostics.com

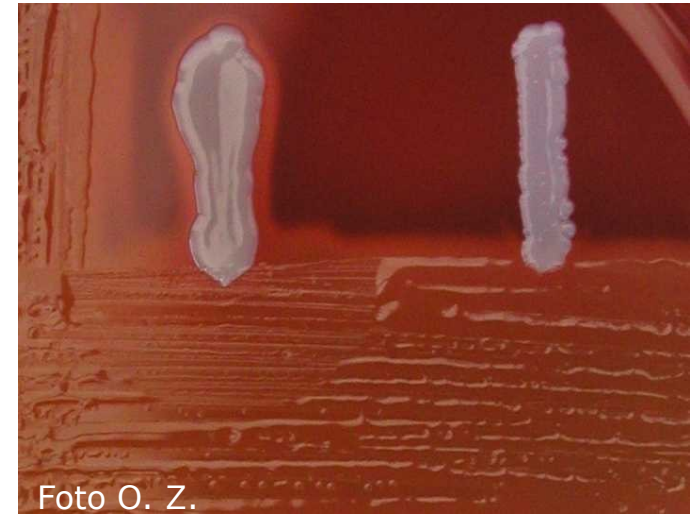
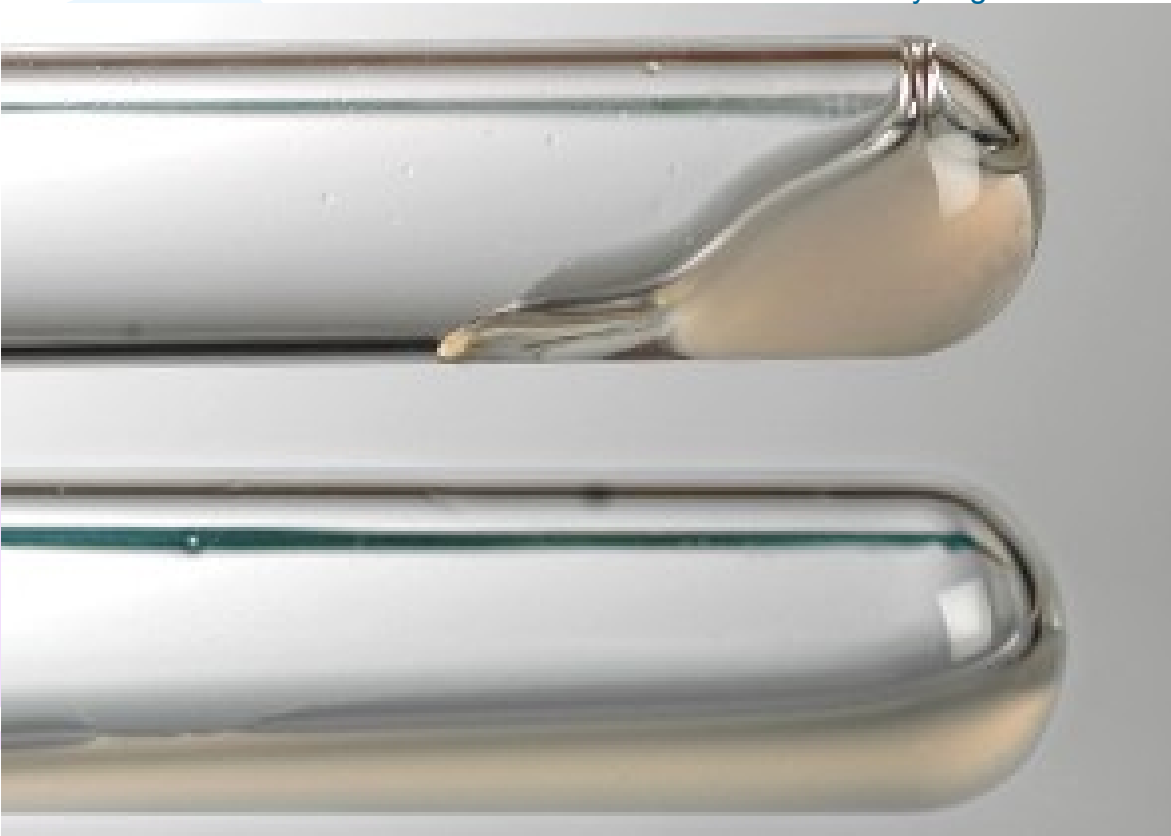


Foto O. Z.

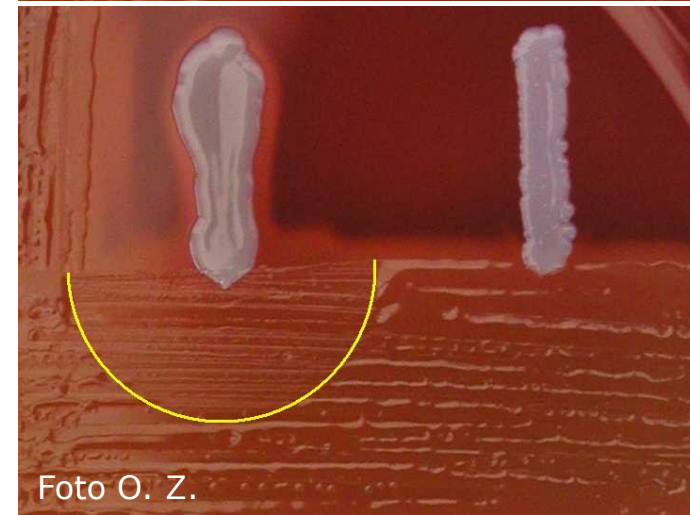
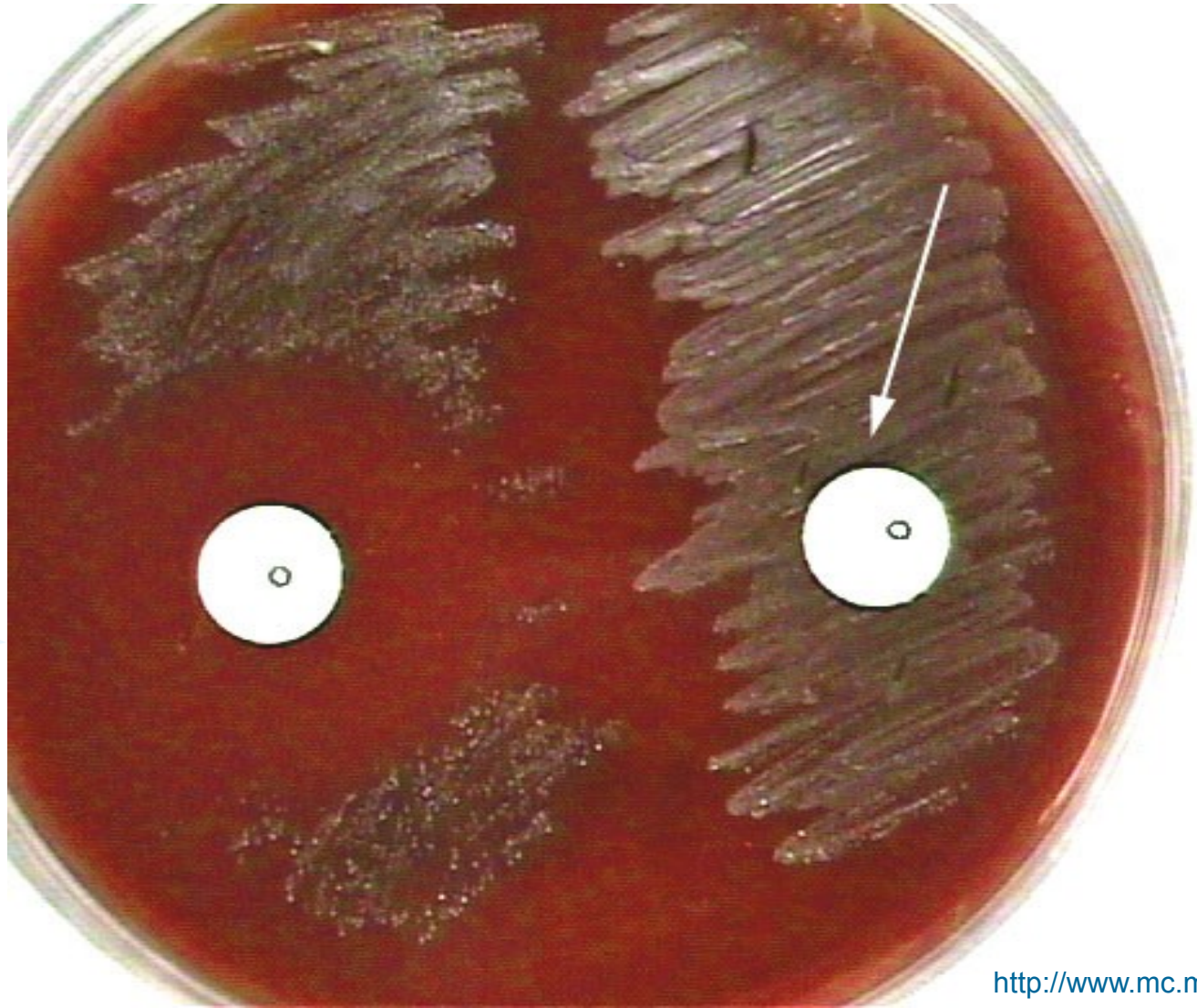


Foto O. Z.

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 „100 %“ 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 - průkaz antigenu

- Využití vazby specifické protilátky

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 nespádno 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

Nová éra diagnostiky



Jiné metody identifikace bakterií - MALDI

- **Hmotnostní spektrometr**

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

Jiné metody identifikace bakterií - MALDI

- **MALDI-TOF MS**

- MALDI je ionizační metoda

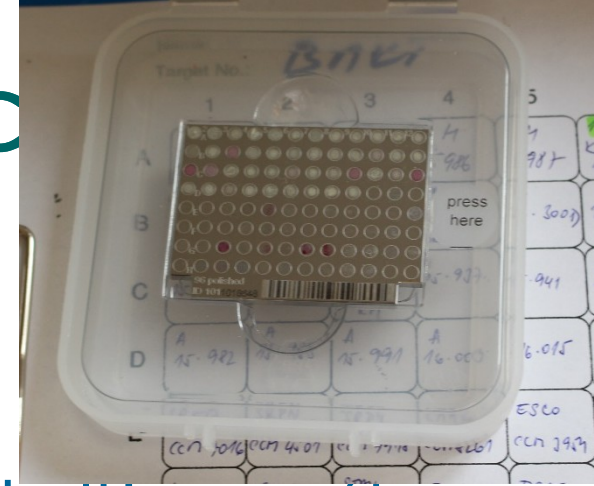
- ke vzorku se přidává krystalizující a světlo-absorbující látka (matrice) - zajistí integritu molekul během analýzy
 - krystaly matrice absorbují energii fotonů z laseru, ionizace velkých molekul je tak šetrná - **molekuly nejsou fragmentovány**

- kombinací MALDI s hmotnostním spektrometrem vznikla metoda pro charakterizaci biopolymerů, biomolekul a makromolekulových komplexů

- proteinů a proteinových komplexů, DNA a RNA, polysacharidů, glykoproteinů a glykolipidů
 - pro rozdělení iontů lze využít různé analyzátory, např. iontová past

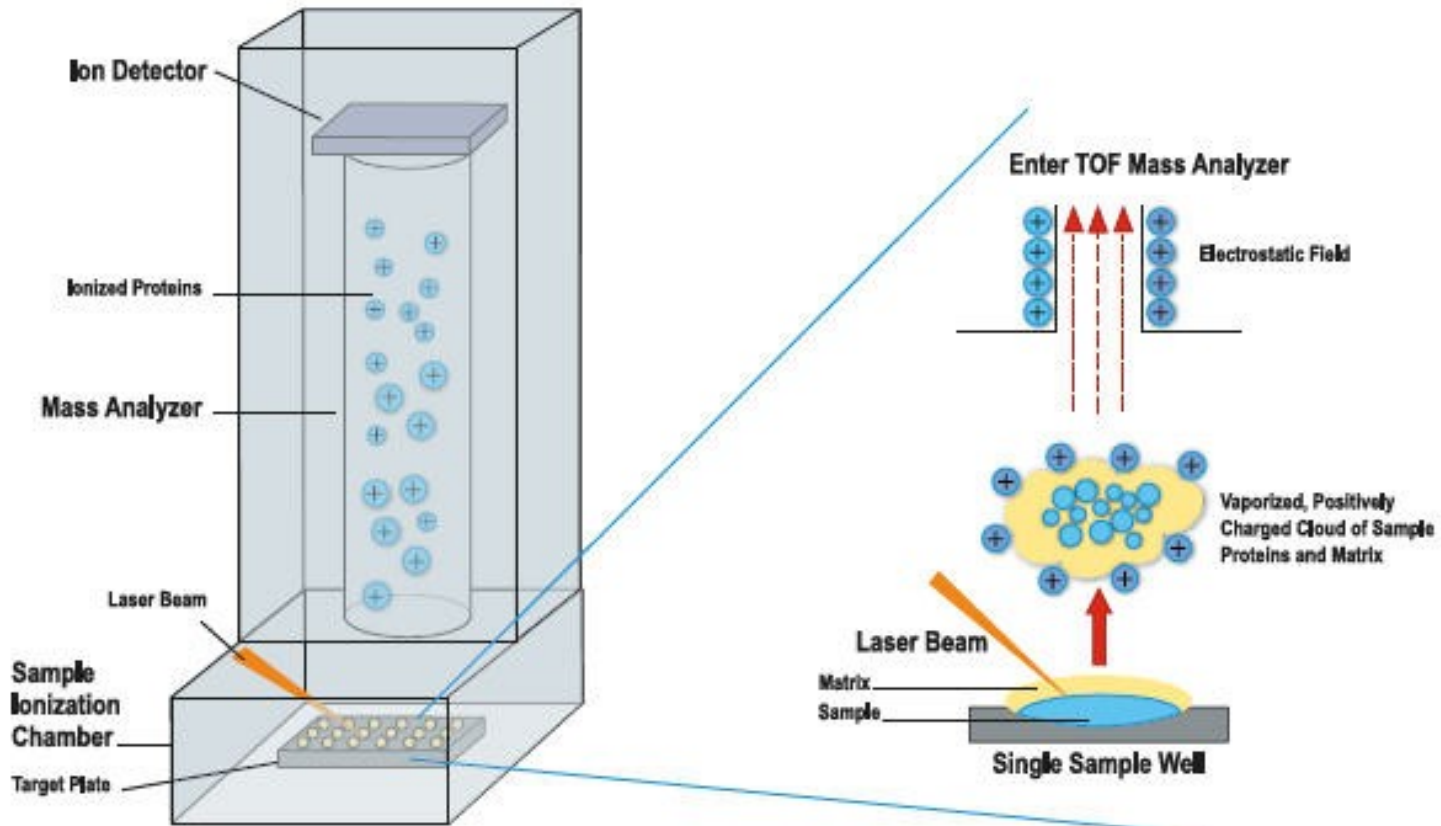
- u MALDI MS se používá průletový analyzátor – time of flight (TOF)

Jiné metody identifikace bakterií - MALDI

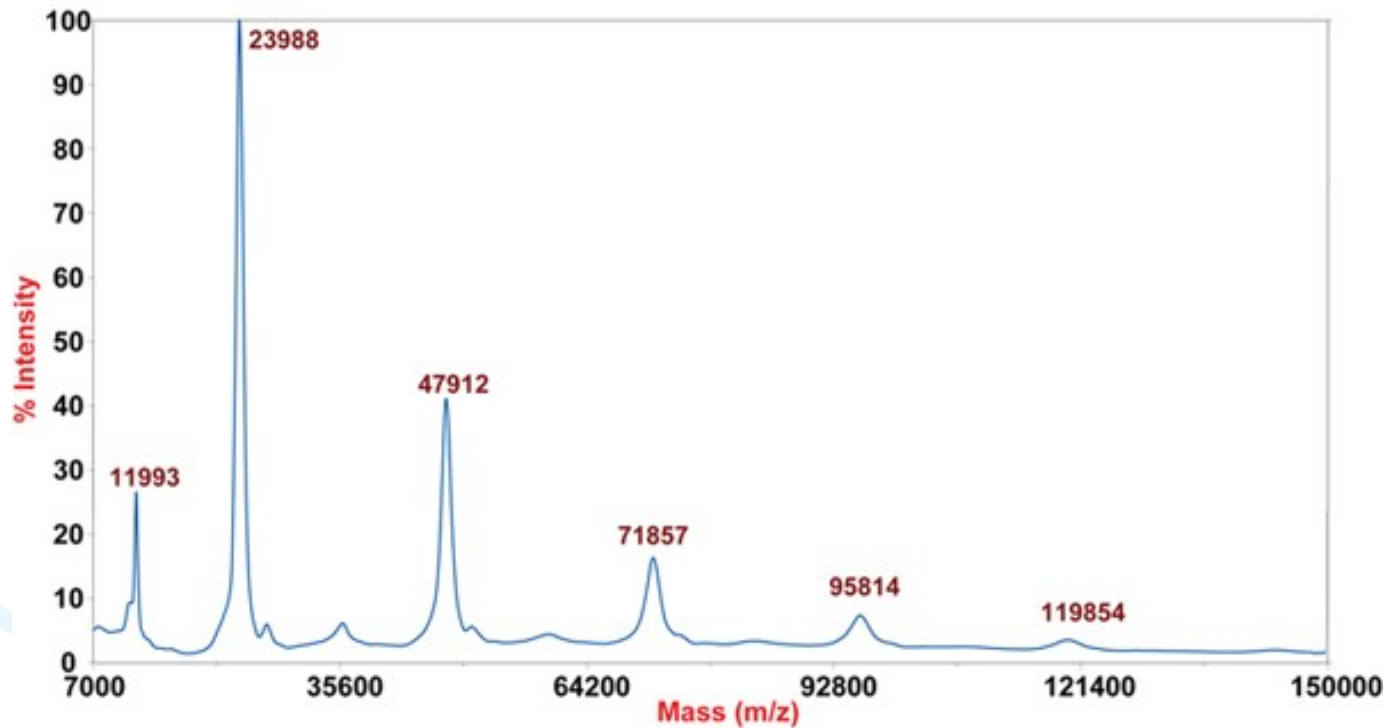


- Celá analýza spočívá v nanesení nakultivovaného mikrobiálního vzorku a matrice na čip – kovová destička.
- Po zaschnutí jsou destičky s bakteriálními vzorky umístěny do přístroje a automaticky zpracovány.
- MS analýza na základě **detekce proteinů** vytvoří charakteristická proteinová spektra (jednotlivé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

MALDI - schéma



MALDI - spektrum



Na shledanou

