



# Biochemické metody

Lékařská mikrobiologie – cvičení, jarní semestr 2017  
Mikrobiologický ústav LF MU

# Osnova

---

- ▶ Opakování
- ▶ Biochemické metody s použitím substrátu
  - Rychlé metody
  - Kultivační metody
  - Acidobazické indikátory
- ▶ Biochemické metody bez použití substrátu
- ▶ Úkoly



# Přehled identifikačních metod

---

- ▶ **Přímé metody** (hledáme mikroba, jeho část nebo produkt):
  - Mikroskopie: průkaz ve vzorku i identifikace
  - Kultivace: průkaz ve vzorku i identifikace
  - Biochemie: pouze identifikace
  - Průkaz antigenu : průkaz ve vzorku i identifikace
  - Průkaz nukleové kyseliny: pouze průkaz ve vzorku
  - Pokusy na zvířeti: pouze průkaz ve vzorku
- ▶ **Nepřímé metody** – protilátky



# Obsah

## Obecný princip biochemických testů

---

- ▶ Specifický metabolismus bakterií → **užití rozdílů v metabolismu k vzájemnému odlišování.**
- ▶ Pátráme hlavně po mezidruhových rozdílech.
- ▶ Zkoukáme tedy to, zdali bakterie pomocí svých **specifických enzymů štěpí substrát** (cukry, aminokyseliny, ...) **v produkty**. Výsledný produkt (alespoň jeden) se změní v barvě či skupenství. Pokud se neliší, je nutné použít **indikátor** (přítomen od začátku reakce nebo přidán na závěr testu).
- ▶ Zpravidla sledujeme více než jeden znak → nutné zhodnocení % **pravděpodobnosti** a **indexu typičnosti** ( $T_{in} = 1 \rightarrow$  shoda s ideální kmenem).



## % pravděpodobnosti, index typičnosti ( $T_{in}$ )

- ▶ **99 %,  $T_{in} = 0,95$  → ideální stav**
- ▶ **99 %,  $T_{in} = 0,63$  → atypický kmen (pak je nutno identifikovat, ve kterém znaku „vybočuje z normálu“) nebo chyba diagnostiky**
- ▶ **49,5 %,  $T_{in} = 1,00$  → test je typický pro dva taxony, které je nutné dále rozlišit pomocí jiného testu**

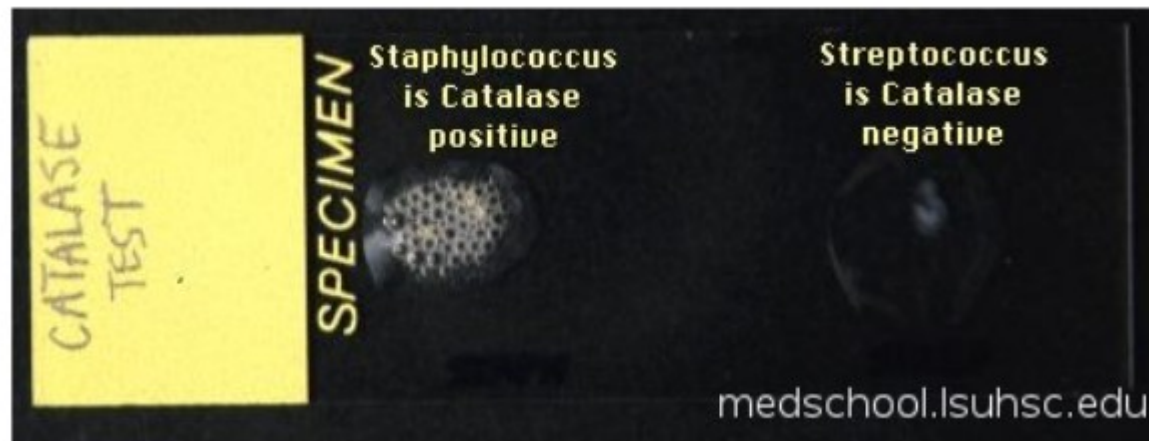


# Rychlé biochemické testy

---

## ► Katalázový test:

- **Kataláza** = antioxidační enzym, který chrání buňku před oxidačním stresem
- **Provedení:** do substrátu (peroxid vodíku) rozmícháme vyžíhanou kličkou bakterie
- **Pozitivita:** viditelné bublinky, šumění



# Testy s diagnostickými proužky

## ▶ **Oxidázový test (cytochromoxidázový test)**

- ▶ **Princip:** využití cytochromu c oxidázy pro produkci energie.
- ▶ Oxidáza-pozitivní bakterie využívají cytochrom c oxidázu → jako terminální akceptor elektronů pro produkci energie využívají kyslík.
- ▶ Oxidáza-negativní bakterie využívají pro produkci energie jiné cytochromy nebo nepoužívají kyslík pro produkci energie vůbec.



# Testy s diagnostickými proužky (2)

---

## ▶ **PYR test**

- Enzym pyrása (pyrrolidonyl arylamidáza)
- K odlišení *S. pyogenes* od ostatních  $\beta$ -hemolytických streptokoků

## ▶ **INAC test (indoxyl-acetátový test)**

- K odlišení *M. catarrhalis* od *N. meningitidis* a *N. gonorrhoeae*

## ▶ **Proužky pro detekci běžných $\beta$ -laktamáz**





# Jednoduché zkumavkové testy

---

## ► **Přednostně dochází k metabolizování cukrů před AMK:**

- Cukry → organické kyseliny → pH klesá
- AMK → deaminace → vznik amoniaku → pH roste
- Metabolizování komplexního média: pH nejdříve klesá a pak opět roste.

## ► **Acidobazické indikátory** (fenolová červeň, bromthymolová modř):

- Detekce změn v pH v průběhu růstu mikrobů
- Detekce utilizace konkrétního substrátu



# Jednoduché zkumavkové testy (2)

---

## Několik možných provedení:

- ▶ **Substrát ropuzštěný v tekutině** → přimícháme testovaný kmen → změna zbarvení v celém objemu nebo v prstenci u hladiny.
  - **Arabinózový test:** k rozlišení *E. faecalis* (negativní reakce – zelená) a *E. faecium* (pozitivní reakce – žlutá)
- ▶ **Kmen rozmíchaný v tekutině** → přidáme proužek napuštěný substrátem.
  - **VPT test:** detekce tvorby acetoinu (pozitivní – červená)
  - **ONPG test:** pro detekci  $\beta$ -galaktosidázy; rozlišení rodů *Citrobacter* (pozitivní – žlutá) a *Salmonella* (negativní – bezbarvá)



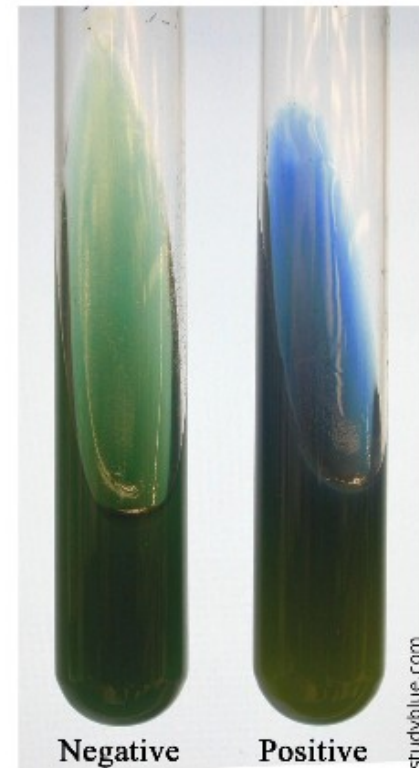
# Jednoduché zkumavkové testy (3)

---

## Několik možných provedení:

- ▶ **Agar obsahující substrát:**

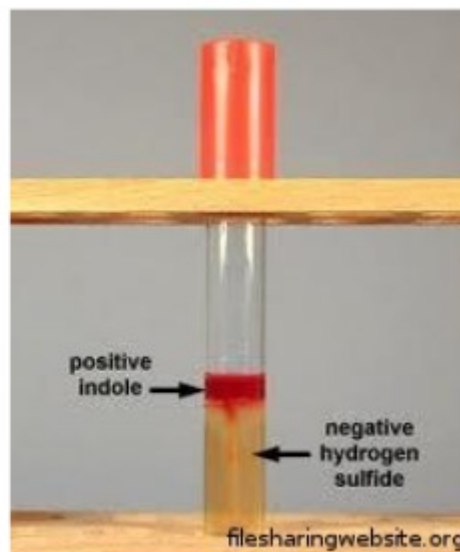
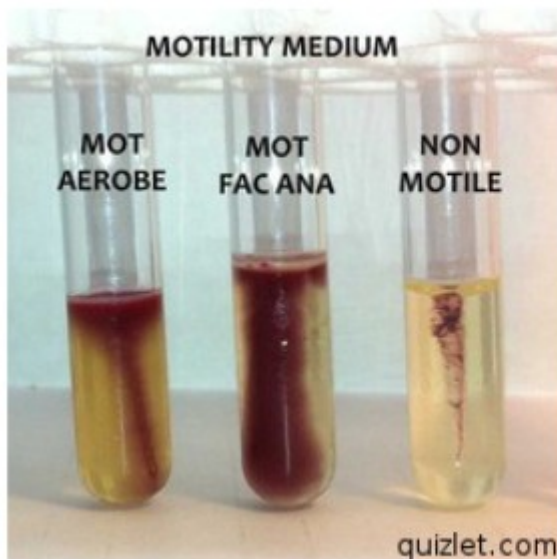
- ▶ **Citrát dle Simmonse** pro detekci růstu bakterií na citrátu jako jediném zdroji uhlíku; rozlišení *Enterobacter aerogenes* (pozitivní – modrá) a *E. coli* (negativní – tmavě zelená).



# Složité zkumavkové testy

## ► Test MIU (Motility, Indol, Urea)

- **Pohyb** – pohyblivé bakterie rostou do okolí vpichu, nepohyblivé podél vpichu
- **Tvorba indolu** – po přidání Kovácsova činidla se vytvoří červený prstenec
- **Štěpení urey** – půda se zbarví fialově

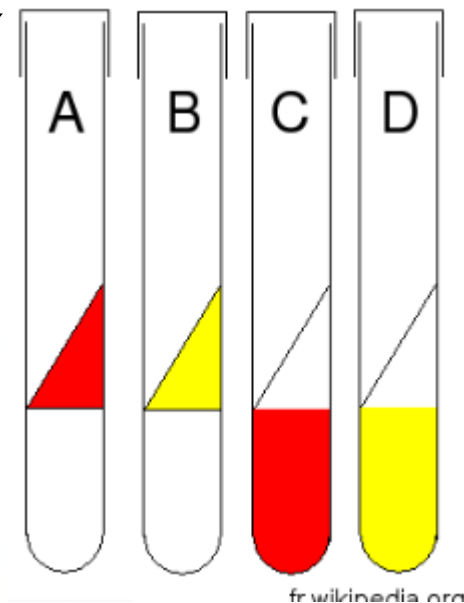


# Složité zkumavkové testy (2)

## ► Hajnova půda

- **Štěpení laktózy** (A – negativní, B – pozitivní)
- **Štěpení glukózy** (C – negativní, D – pozitivní)
- **Produkce  $H_2S$**  – pozitivní – zčernání půdy
- **Tvorba plynu** – pozitivní – potrhaná půda, bublinky, půda vysunuta nahoru

Očkuje se vpichem a hádke



# Vyhodnocení Hajnovy půdy + MIU

---

Test	Hajna			MIU		
Reakce	Glc	Lac	H <sub>2</sub> S	Mot	Ind	Ure
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	+
<i>Escherichia coli</i>	+	+	-	+	+	-
<i>Proteus mirabilis</i>	+	-	+	+	-	+
<i>Salmonella enterica</i>	+	-	+	+/-	-	-
<i>Citrobacter freundii</i>	+	+/-	(+)	+	-	-



# Testy v plastových panelech

---

- ▶ **Miniaturizované zkumavkové testy**
- ▶ **Destičky s lyofilizovanými susbtráty** → přidání suspenze bakterií ve fyziologickém roztoku nebo v dodaném suspenzním médiu.
- ▶ Zbytek bakteriální suspenze je použit u zkumavkových testů (VPT, ONPG).
- ▶ U nás nejčastěji od firmy **Erba Lachema** (STAPHYtest 16, STREPTOtest 16, ENTEROtest 16, NEFERMtest 24,...).



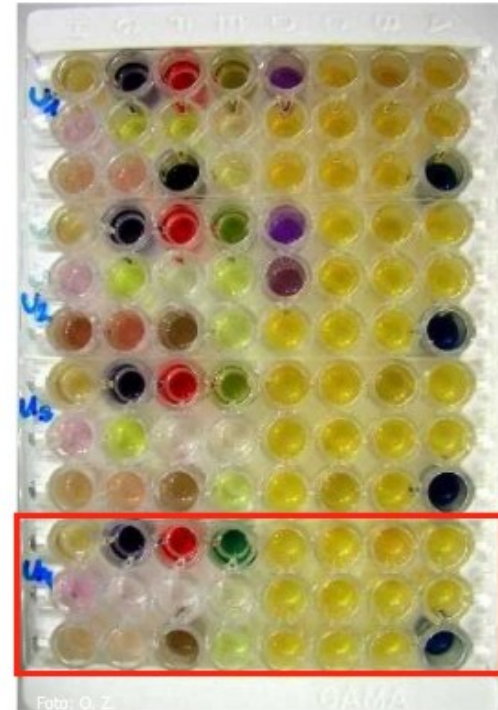
# Testy v plastových panelech (2)

- ▶ **NEFERMtest 24** (Erba Lachema)

Tři řádky po osmi jamkách

- ▶ **API 20 E** (bioMérieux)

Princip stejný, odlišné provedení





# Vyhodnocení destičkových testů

- ▶ **Oktalové kódy:** tvoří se podle pozitivních a negativních výsledků
- ▶ Kód se vyhledává v kódové knize nebo softwaru.

MICROBACT™

IDENTIFICATION KITS

MICROBACT™ GNB 12A/B/E, 24E

Result / Resultado / Ergebnis / Résultat / Risultato / Resultat / Resultat / Resultado / Αποτέλεσμα
- + +
4 2 1
Sum / Suma / Summe / Somme / Somma / Sum / Summa / Soma / Απολογισ

			GNB 24E											GNB 12B												
			GNB 12A / 12E																							
Oxidase	Motility	Nitrate	Lysine	Ornithine	H <sub>2</sub> S	Glucose	Mannitol	Xylose	ONPG	Indole	Urease	V-P	Citrate	TDA	Gelatin	Malonate	Inositol	Sorbitol	Rhamnose	Sucrose	Lactose	Arabinose	Adonitol	Raffinose	Salicin	Arginine
-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-
4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1
			6			7			6			0				0		6		6		0				

Identification / Identificación /  
Identifikation / Identification /  
Identifikations / Identifikation /  
Identificação /  
Τυποποίηση

*E. coli*

resource.unisa.edu.au

# Úkol 1: Katalázová reakce

---

- ▶ Vyžíhanou kličkou naneste kolonie testovaných kmenů na čisté podložní sklo
- ▶ Přikápněte 3 %  $\text{H}_2\text{O}_2$
- ▶ Sledujeme bublinky značící pozitivitu.



## Úkol 2: Oxidázový test

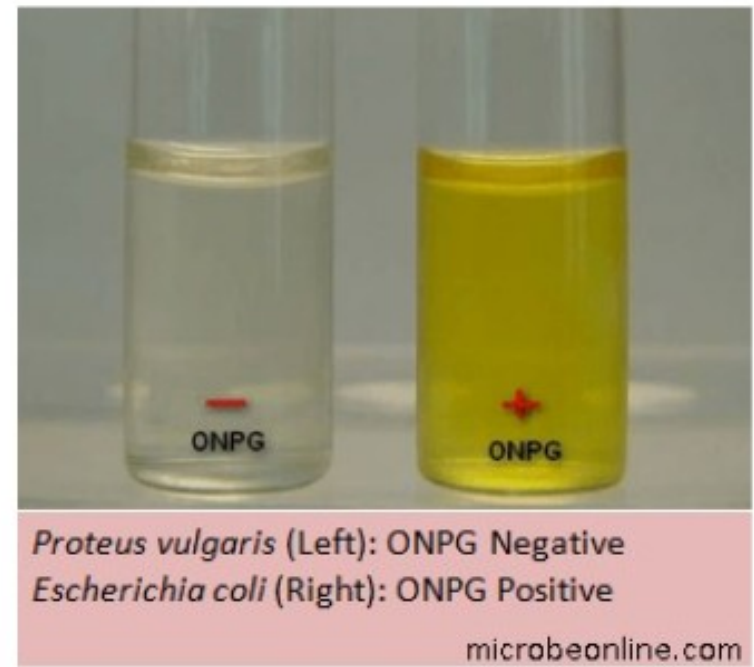
---

- ▶ Filtrační papírek na diagnostickém proužku napuštěný reagens přitiskneme na kolonie testovaného kmene.
- ▶ Proužek položíme do víčka Petriho misky koloniemi nahoru.
- ▶ **Pozitivní:** do 30 sekund modré zbarvení
- ▶ **Opožděně pozitivní:** do 2 minut modré zbarvení
- ▶ **Negativní:** beze změny nebo Zmodránění po více než 2 minutách



## Úkol 3: ONPG test pro detekci $\beta$ -galaktosidázy

- ▶ Filtrační papírek na diagnostickém proužku s reagens vložíme do suspenze připravené z kultury testovaného kmene.
- ▶ Inkubace v termostatu, odečet reakce po 4 hodinách
- ▶ **Pozitivní:** zežloutnutí suspenze
- ▶ **Negativní:** beze změny

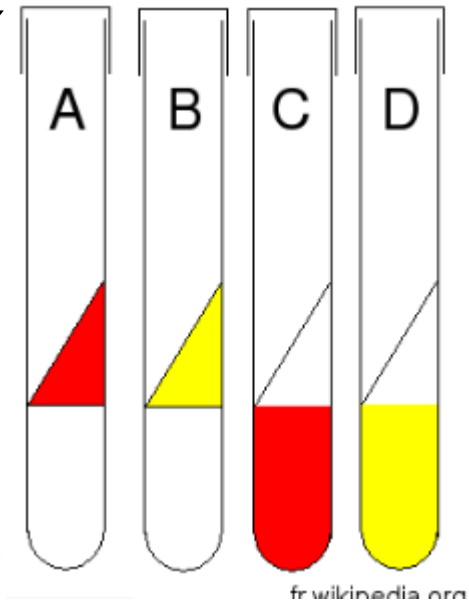


# Úkol 4: Hajnova půda

## ▶ Hajnova půda

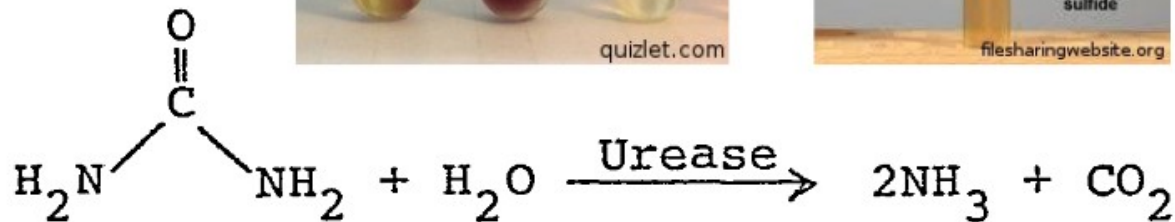
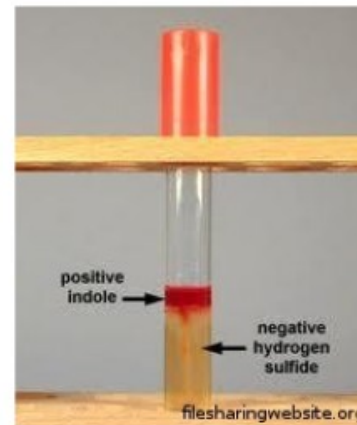
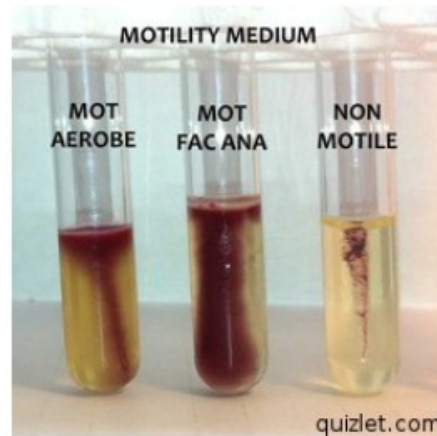
- **Štěpení laktózy** (A – negativní, B – pozitivní)
- **Štěpení glukózy** (C – negativní, D – pozitivní)
- **Produkce  $H_2S$**  – pozitivní – zčernání půdy
- **Tvorba plynu** – pozitivní – potrhaná půda, bublinky, půda vysunuta nahoru

Očkuje se vpichem a hádke



# Úkol 5: MIU

- ▶ **Pohyb:** pohyblivé bakterie rostou do okolí vpichu, nepohyblivé podél
- ▶ **Tvorba indolu:** pozitivní – červený prstenec
- ▶ **Štěpení urey:** pozitivní – půda se zbarví fialově



## Úkol 6: Vyhodnocení Hajnovy pŕdy + MIU

Test	Hajna			MIU		
Reakce	Glc	Lac	H <sub>2</sub> S	Mot	Ind	Ure
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	+
<i>Escherichia coli</i>	+	+	-	+	+	-
<i>Proteus mirabilis</i>	+	-	+	+	-	+
<i>Salmonella enterica</i>	+	-	+	+/-	-	-
<i>Citrobacter freundii</i>	+	+/-	(+)	+	-	-



## Úkol 7a: Provedení biochemického identifikačního mikrotestu

---

- ▶ Nachystejte si destičky
- ▶ Odhrňte řádek, ve kterém ještě není tekutina.
- ▶ Do jedné širší zkumavky se zlatým kloboučkem vmíchejte vyžíhanou kličkou bakterie.
- ▶ Kličku vyžíhejte.
- ▶ Kapátkem suspenzi naočkujte do všech jamek.
- ▶ Inkubace destičky přes noc při 37 °C.





# Úkol 7b: Vyhodnoce ENTEROtestu

	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	<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	

- ▶ Kmen 530 063 = *E.coli*; 99,89 %,  $T_{in} = 1,00$

## Úkol 8: Chromogenní půda

---

- ▶ Pokuste se identifikovat kmeny rostoucí na chromogenních půdách na základě referenčních kmenů na bočním stole nebo na tabuli.



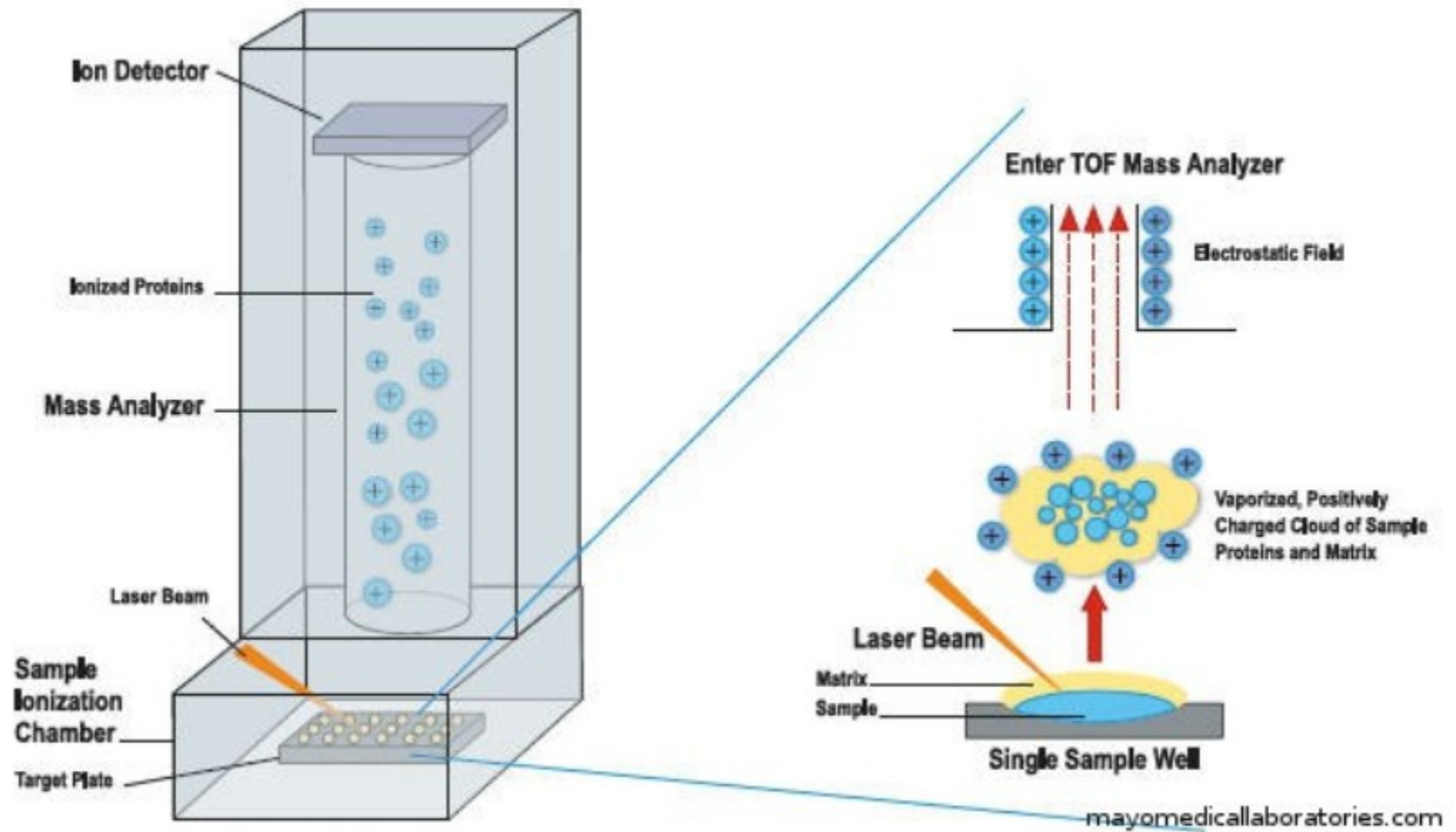
# MALDI-TOF

---

- ▶ Metoda molekulární biologie založená na principu rozdělení nabitých částic podle jejich molekulových hmotností v elektrickém/magnetickém poli.
  - ▶ Díky matici lze analyzovat i velké biomolekuly (při přímé ionizaci vzorku laserem dochází ke štěpení molekul nežádoucím způsobem).
  - ▶ Směs vzorku a matrice je ionizována laserem ionty → analyzované látky jsou urychleny silným elektrickým polem → vstupují do trubice detektoru měření doby letu částice → výpočet poměru molekulové hmotnosti a náboje částice.
  - ▶ Hmotnostní spektrum se poté porovnává se známými profily uloženými v databázi.
- 



# MALDI-TOF (2)



## Úkol 9a: MALDI-TOF

---

- ▶ Spočítejte počet kmenů z jednodenního reportu dle úrovně identifikace.
- ▶ Počítejte pouze první, nejlepší shodu.



## Úkol 9b: Identifikace špatně určené kmene

---

- ▶ Pokuste se najít důvod špatné identifikace kmene.
- ▶ Navrhněte lepší způsob.



## Po tomto cvičení byste měli umět

---

- ▶ Znát smysl použití biochemických metod v mikrobiologii.
- ▶ Popsat princip a umět vyhodnotit základní mikrobiologické biochemické testy.

