

Pátráme po mikrobech
Díl IV.
Biochemická identifikace

Ondřej Zahradníček

K praktickému cvičení pro VLLM0421c

Kontakty na mne:

777 031 969

zahradnicek@fnusa.cz

ICQ 242-234-100

Co už víme

- Mikroby můžeme rozlišovat **mikroskopicky**. Poznáme tím jejich velikost, tvar a případně i typ buněčné stěny (u Gramova barvení)
- Mikroby můžeme také rozlišovat **kultivačně**. Zatímco tekuté půdy slouží hlavně k pomnožení, pevné půdy pomohou při identifikaci a především na pevných půdách vidíme izolované kmeny

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 ve 4. praktiku podzimního semestru*

Postavení v systému metod

- Přímé metody (mikrob – část – produkt):
 - Mikroskopie – průkaz ve vzorku i identifikace
 - 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

- Bakterie mají svůj **specifický 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

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 pulcherima*
 - 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. Švejcarova plotna)

Katalázový test

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

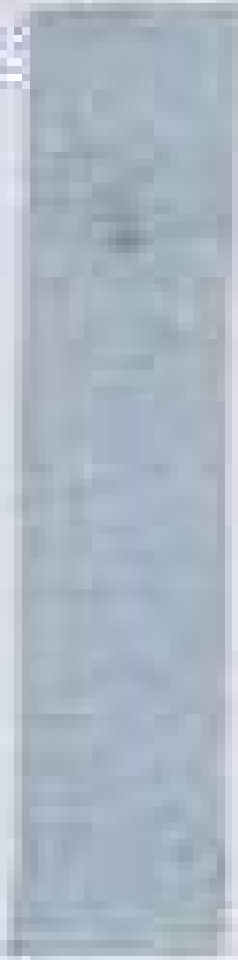


Testy s diagnostickými proužky

- **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 za dva týdny)

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. 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



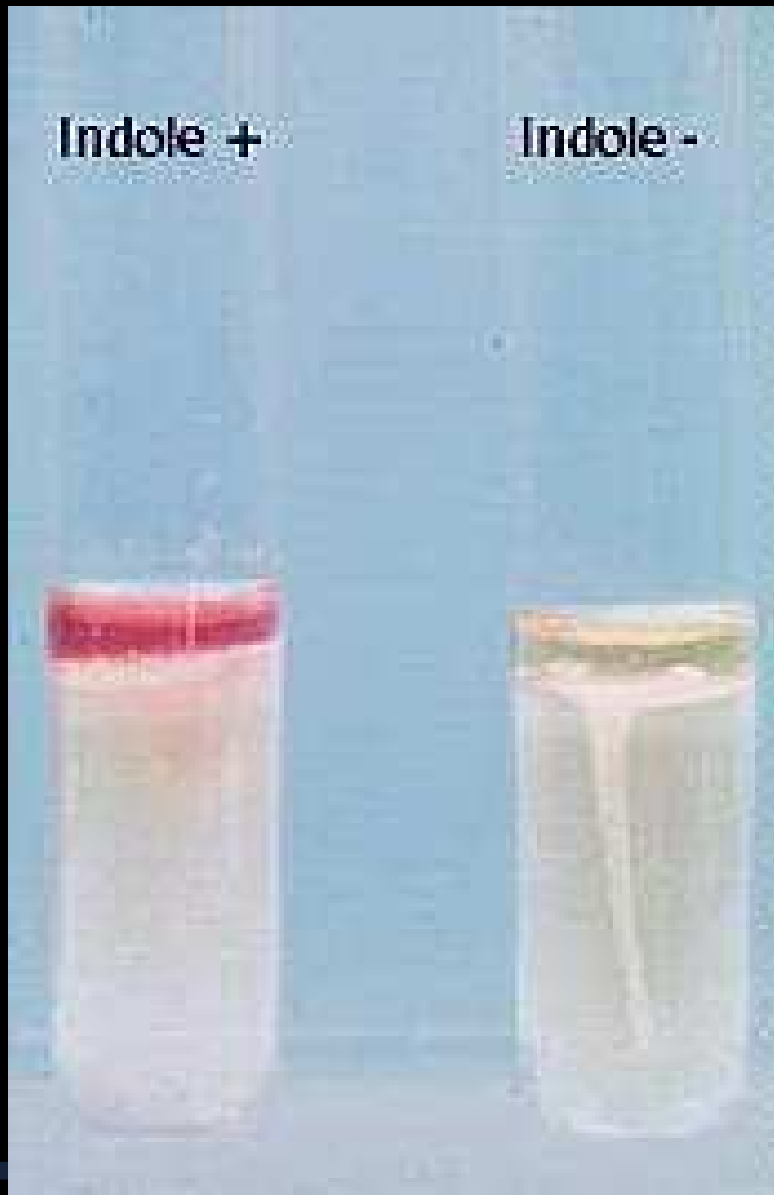
Složité zkumavkové testy

- 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 půdy)
- Nebo **Hajnova půda**, 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



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 + ornitin dekarboxyláza – v naší laboratoři)*

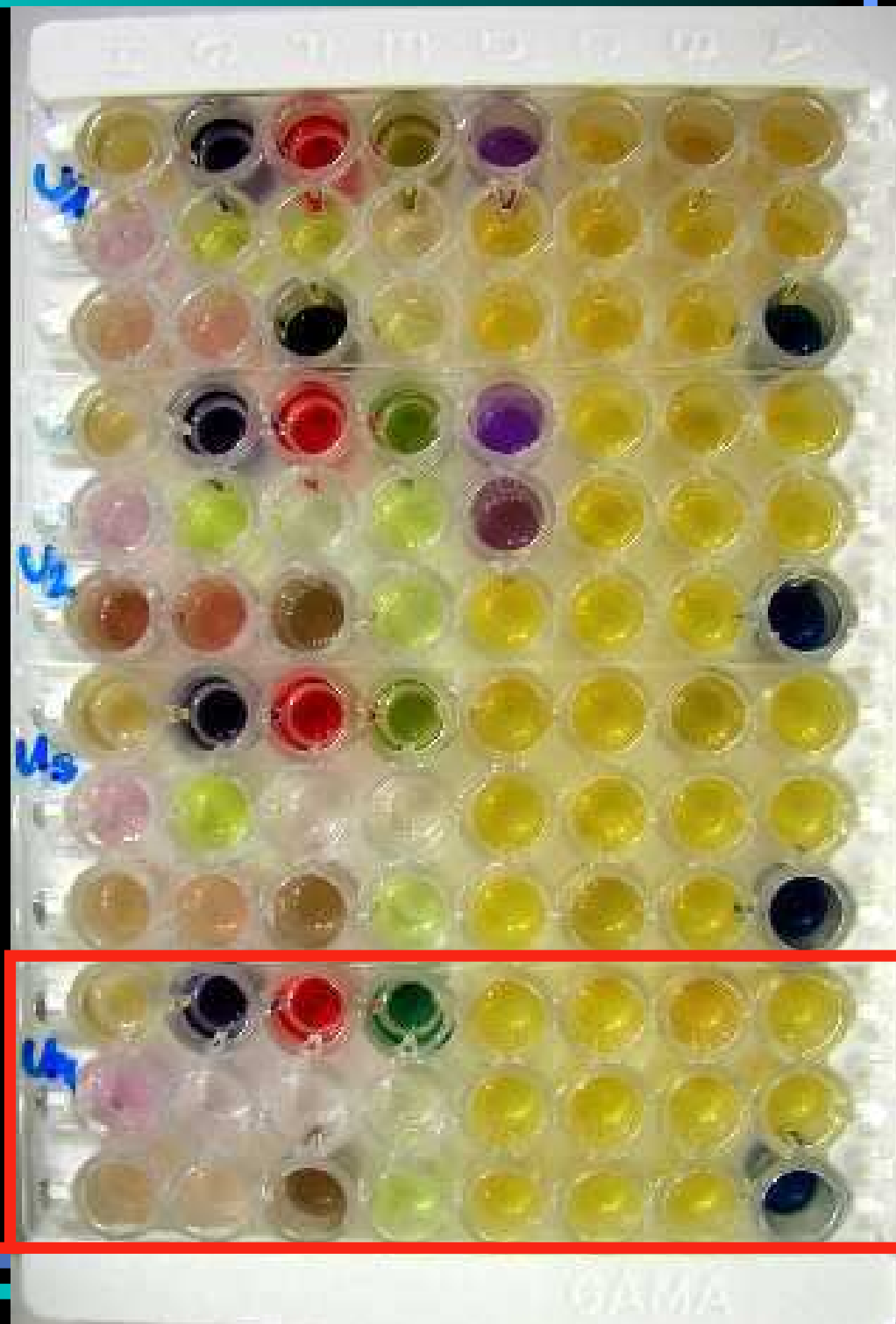
Miniaturizace: testy v plastových panelech

- 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) 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)

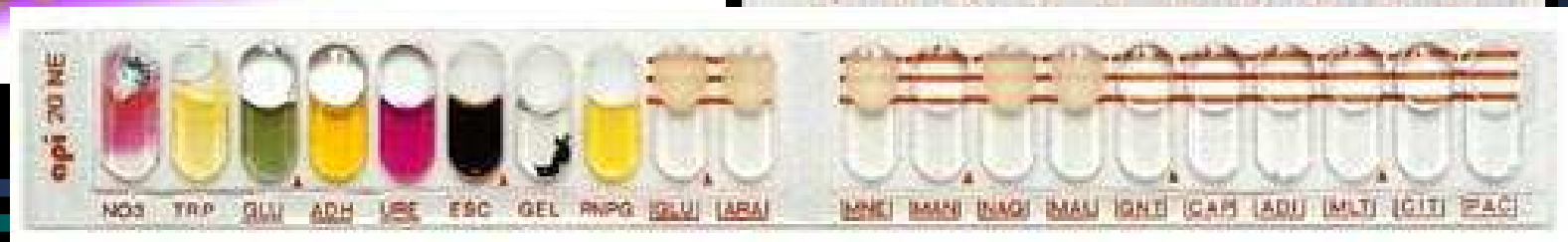
- Výrobce dodává destičky s lyofilizovanými substráty, umístěnými na dně důlků v destičce
- Pracovník připraví suspenzi bakterie ve FR nebo v suspenzním médiu
- Do každého důlku se kápne kapka suspenze či dvě kapky
- Zbytek suspenze se často ještě využije jako zkumavkový test s diagnostickým proužkem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



Zahraniční soupravy

(princip stejný, drobné rozdíly v konkrétním praktickém provedení)





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, 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)

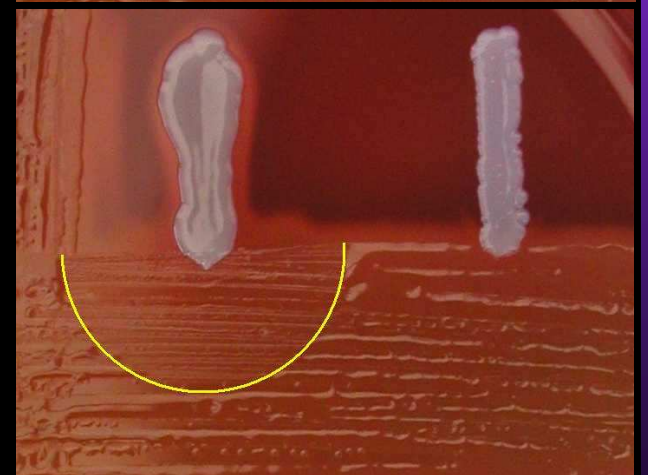
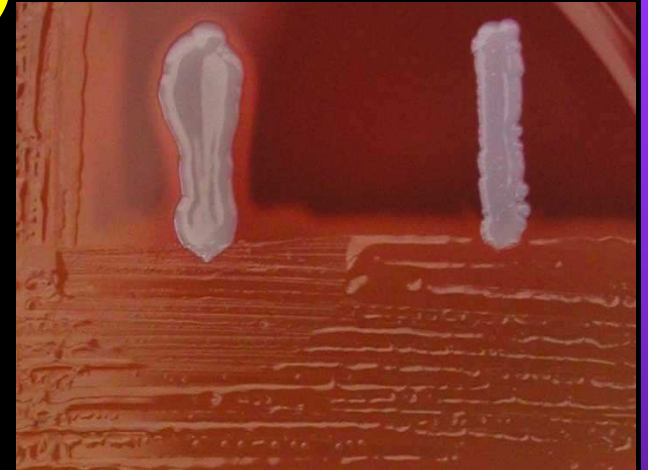
tohle ještě uvidíte u úkolu číslo 7

	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)
 - Testování pohyblivosti, to už jsme měli

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 za dva týdny

Optochinový test negativní a pozitivní



A nyní se pustíme do práce

Úkol 1 a úkol 2

- **Katalázový test (Ú2):** velmi jednoduchý, do substrátu (roztok H_2O_2) rozmícháme bakterie. Bublinky = pozitivita
- **Testy s dg. proužky** – oxidáza (Ú1), PYR-test a podobné. Reakční ploškou se dotkneme kolonií. V případě positivity ploška změní barvu. Někdy je nutno několik minut vyčkat (INAC u dg. moraxel), někdy vyčkat a pak ještě přikápnout činidlo (PYR-test).

Úkoly 3, 4 a 5

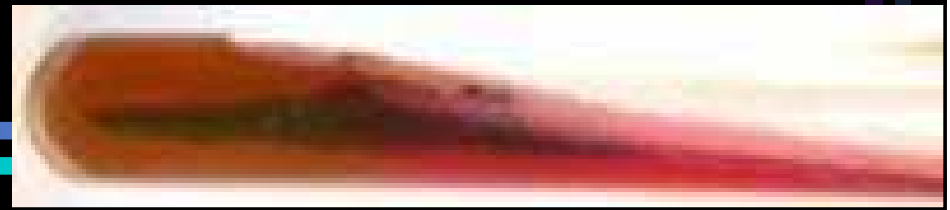
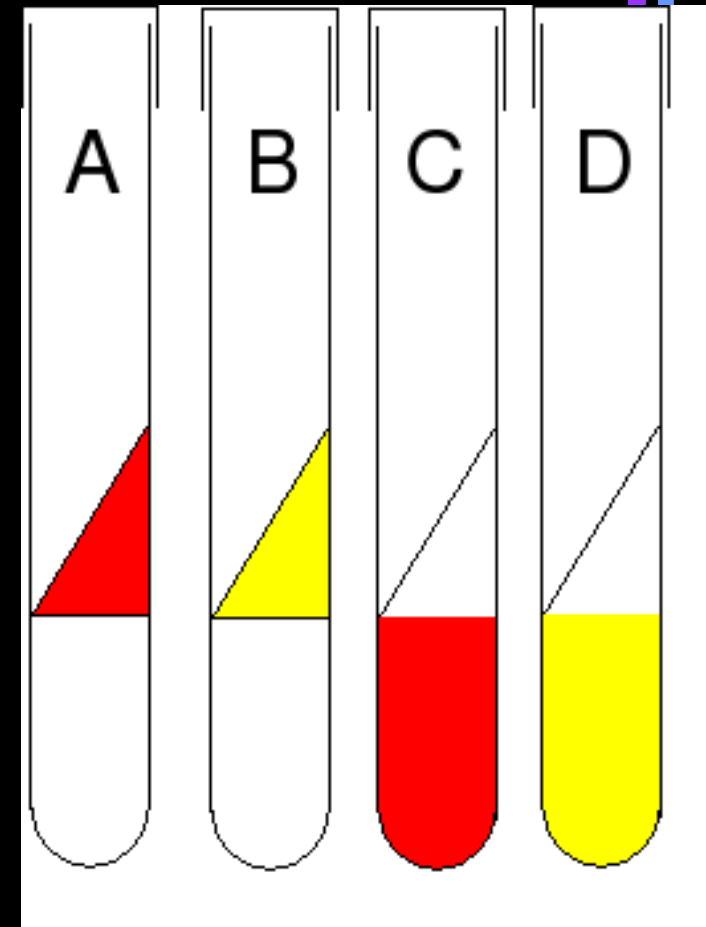
- ONPG, úkol 3: Příklad jednoduchého zkumavkového testu. Na proužku je přidán substrát. **Zežloutnutí tekutiny znamená pozitivitu testu.**
- Hajna, úkol 4: Složitý zkumavkový test na agarové půdě, viz další obrazovka
- MIU, úkol 5: Složitý zkumavkový test, kde se používá polotekutý agar. Přesný popis na ještě další obrazovce

Ú4 Hajnova půda – princip

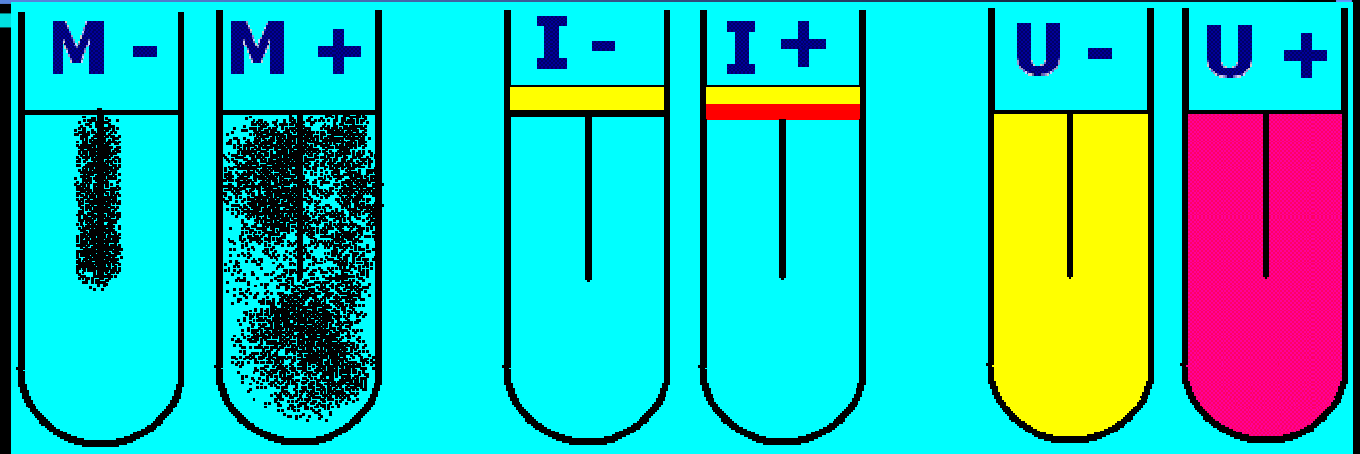
- Barva spodní části půdy beze změny: bakterie nefermentuje glukózu (rozdíl tzv. G- nefermentující tyčky × enterobakterie)
- Spodní část zčerná – tvorba H_2S
- Půda potrhaná, s bublinkami – tvorba plynu z glukózy
- Dolní část žlutá, horní červená – bakterie fermentuje glukózu, ale ne laktózu
- Půda celá žlutá – fermentuje i laktózu

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



Ú5 MIU princip (opakování)



- **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

Úkol 6: shrnutí úkolů 3 až 5

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

Co se po vás chce v Úkolu 7a

- **Nachystejte si destičky**, které jsou v celku (Enterotest 2). Odhrňte si jeden řádek, ve kterém ještě není tekutina.
- Do jedné **širší zkumavky se zlatým kloboučkem** vyžíhanou kličkou vmíchejte bakterie. Kličku opět vyžíhejte
- **Kapátkem** suspenzi ze zkumavky přeneste do jednoho řádku destičky
- Nyní by se destička dala přes noc do 37 °C
(Ta vaše je jen cvičná, vyhodí se)

Úkol 7b – vyhodnocení ENTEROtestu 16

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

podobně vyhodnoťte i ostatní tři kmeny

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

Charakteristika výsledku – opakování

- Ať už v seznamu kódů, nebo ve výstupu počítače, je výsledek charakterizován:
 - % 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

Přeji Vám
hezký zbytek
dne...

