KLASIFIKACE A IDENTIFIKACE BAKTERIÍ

Úvod

- Taxonomie
  - Věda o klasifikaci, identifikaci a nomenklatuře organismů
  - Dva podobory
    - Identifikace
    - Nomenklatura
- Účelem klasifikace je uspořádání organismů do příbuzných skupin s cílem poskytnout jednoduchou identifikaci organismu
  - Tradičně na základě fenotypu
  - Nejnovější klasifikační schéma je založeno na evoluční příbuznosti

Klasická taxonomie

- Klasická bakteriální taxonomie se opírá o fenotypickou analýzu
  - Morfologie
    - Tvar, velikost, Gramovo barvení, uspořádání bičíků
  - Pohyblivost
  - Výživa a fyziologie
    - Mechanismus uchování energie, vztah ke kyslíku, teplotě, pH, tolerance k solím, využití zdrojů uhlíku, dusíku a síry
  - Ostatní faktory
    - Pigmenty, inkluze, složení mastných kyselin, patogenita, citlivost k antibiotikům

Molekulární taxonomie

- Nejnovější metody klasifikace jsou založeny na porovnání informací obsažených v DNA
  - Fylogenetický klasifikační systém
- Rozdíly v sekvenci bazí jsou ukazatelem počtu mutací, které nastaly od doby, kdy se dva organismy odklonily od společného předka

Porovnání složení DNA bazí

- Analýza celkového složení DNA
  - Obsah GC (22-78%)
  - Pokud se liší několika procenty, nemohou být organismy příbuzné
  - Je možné různé uspořádání bazí (organismy nejsou příbuzné)
  - Rozdíly v obsahu GC uvnitř rodu (*Bacillus, Pseudomonas*) povedou v budoucnosti pravděpodobně k zařazení k jinému rodu
- Analýza sekvence bazí
  - Použití metody **hybridizace** nukleových kyselin
    - Denaturace DNA a hybridizace jednovláknové DNA z různých organismů
    - Dojde k různému stupni renaturace na základě podobnosti
    - Ten lze stanovit měřením termální stability nebo na základě značení
  - Využití genomových sekvencí v databázích

Učebnice Madigan a kol., obr. 14.20, str. 387

Porovnání složení aminokyselin v proteinu

- Protein je kódován genem
- Složení proteinu je obrazem sekvence DNA
- Porovnává pouze zlomek celkové genetické informace
  - V určitý okamžik je exprimován pouze omezený počet genů
  - Exprese za určitých podmínek

Porovnání sekvence bazí v 16S ribosomální RNA

- Součást malé podjednotky ribozomu, 1500 nukleotidů
- Změny v sekvenci nukleotidů ribozomu jsou limitované
- Je možné sledovat příbuznost i u organismů, u kterých to není stanovitelné hybridizací
- rRNA obsahuje krátké sekvence unikátní pro skupiny mikroorganismů
  - Signaturní sekvence
  - Např. signaturní sekvence specifické pro bakterie, archea nebo eukaryota
- Ribotypizace
  - Geny kódující 16S rRNA organismu jsou naštípány restrikčními enzymy, fragmenty jsou separovány a hybridizovány s rRNA próbou
  - Unikátní restrikční profily pro jednotlivé organismy
- Organismy lišící se o více než 3% by měly být řazeny do jiného druhu
- V současnosti nejpoužívanější metoda

Taxonomické kategorie

- Taxony
  - Klasifikační skupiny („úrovně“)
    - Doména
    - Říše (není mikrobiology užíváno)
    - Kmen
    - Třída
    - Řád
    - Čeleď
    - Rod
    - Druh

Definice druhu

- Základní jednotka taxonomie
- Mikrobiální druh
  - Soubor mikrobiálních kmenů, které sdílejí mnoho společných vlastností a zároveň se signifikantně liší od ostatních skupin kmenů
- Kmen
  - Populace mikroorganismů, která pochází z jednoho jedince čisté kultury
  - Různé kmeny reprezentují genetickou variabilitu uvnitř druhu

Doména

- *Archaea*
- *Bacteria*
- *Eucarya*

Archaea

- 2 kmeny
  - *Crenarchaeota*
  - *Euryarchaeota*

Bacteria

- Doposud popsáno 29 kmenů
  - Bergey´s Manual of Systematic Bacteriology, 2nd ed.

Eucarya

- Taxonomie eukaryot není ustálena
- 4 říše (1977)
  - *Protista*
    - Prvoci, řasy
  - *Fungi*
    - Vláknité houby, kvasinky, houby
  - *Animalia*
  - *Plantae*
- V současné době 5 říší
  - Nové členění Protista na Protozoa a Chromista

Učebnice Madigan a kol., obr. 14.16, str. 382

Univerzální fylogenetický strom založený na porovnání sekvencí 16S (18S) ribosomální RNA

Bergeyho manuál

- Bergey´s Manual of Determinative Bacteriology
  - 1. vydání 1927
  - Bakterie řazeny v 9 skupinách na základě fenotypu
    - Mikroskopické a fyziologické charakteristiky
  - V současné době 9. vydání
  - Slouží primárně pro identifikaci bakterií
  - Nereflektuje fylogenetickou klasifikaci

Bergeyho manuál

- Bergey´s Manual of Systematic Bacteriology, First Edition
  - 1984
  - Podrobnější, ale stále primárně založena na fenotypu
- Bergey´s Manual of Systematic Bacteriology, Second Edition
  - Od r. 2001
  - Popisuje hlavní vlastnosti všech známých prokaryot
  - Zahrnuje poznatky získané ze sekvenování ribosomální RNA a genomických studií kombinované s fenotypickými informacemi
  - 5 svazků

The Prokaryotes

- Druhá významná referenční příručka prokaryotické diverzity

Sbírky mikroorganismů

- Katalogizace a uložení mikroorganismů
- Mikroorganismy uloženy jako živé kultury
  - Lyofilizace
  - Uložení za velmi nízkých teplot
- Distribuce na vyžádání

- ATCC (American Type Culture Collection)
- JCM (Japan Collection of Microorganisms)
- PCC (Pasteur Culture Collection)
- CCM (Česká sbírka mikroorganismů)
- a další

Metody identifikace bakterií

- Hlavní metodické přístupy
  - Přímé metody
  - Kultivační metody
  - Detekce vedlejších produktů metabolismu
  - Imunologické techniky
  - Molekulárně biologické techniky
  - Proteomické techniky
- Význam
  - Pro identifikaci patogenních mikroorganismů
  - Pro studium biodiverzity mikroorganismů

Metody identifikace bakterií

- Při identifikaci je primární metodou mikroskopické zkoumání
  - Přímá metoda
  - Tvar, Gramova reakce a pohyblivost
- Využití znalosti přirozeného prostředí mikroorganismu
  - Kultivační metody
  - Určení fyziologických charakteristik
- Další identifikace na základě biochemických testů
  - Kultivační metody
  - Určení rodu a druhu mikroorganismu
- Genetické, imunologické a proteomické techniky
  - K určení kmenů jednotlivých druhů
  - Rychlé metody identifikace mikroorganismů
    - Identifikace možná i bez použití předchozích metod

Přímé metody

- Vzhled kolonie
- Mikroskopické zkoumání vzorku bez kultivace organismu
  - Přímé sledování na sklíčku
    - Tvar, uspořádání buněk, přítomnost a uspořádání bičíků, inkluze, spory
  - Barvení podle Grama a barvení fuchsinem
  - Speciální barvicí techniky
    - Včetně genetického barvení
- Dle vzhledu nelze řadu organismů odlišit

Kvantifikace mikroorganismů v mikrobiálním společenstvu

- Využití fluorescenčního značení
  - DAPI (4´,6-diamido-2-fenylindol)
    - Nukleové kyseliny
    - Nespecifické
      - Celkový počet organismů
      - Podobná morfologie neznamená stejný mikroorganismus
  - Zelené a červené fluorescenční barvivo
    - Zelené barvivo proniká do všech buněk, červené pouze do mrtvých (narušená cytoplasmatická membrána)
    - Odlišení živých a mrtvých buněk
    - Pro většinu přirozených prostředí nevhodné (vysoké pozadí)
  - Fluorescenční protilátky
  - Zelený fluorescenční protein (GFP)
    - Pro sledování mikroorganismu vneseného do prostředí

Kultivační metody

- Vzorek je kultivován na sérii různých médií
  - Vybrána podle příznaků nemoci, výskytu
  - Využití obohacovacích, selektivních a diagnostických médií
- Organismy které narostou na agarových médiích jsou izolovány a kultivovány v čisté kultuře pro další identifikaci
- Růstové požadavky
  - Požadavky na výživu (zdroje energie, C, N, S; růstové faktory)
  - Požadavky na kyslík
- Rod a druh většiny bakterií způsobujících nemoci je možno určit pomocí biochemických testů
  - Založeny na přítomnosti určitých enzymů
  - Diagnostické kity
  - Stanovení skupin bakterií na selektivně diagnostických médiích

Biochemické identifikační testy 1

- Oxidačně-fermentační test (OF test)
  - *Princip:* Tvorba kyseliny za aerobních podmínek růstu (indikátor)
  - *Využití: Micrococcus* (kyselina pouze aerobně) od *Staphylococcus* (kyselina anaerobně), *Pseudomonas* (aerobně) od enterobakterií (anaerobně)
- Fermentace cukrů
  - Tvorba kyseliny a/nebo plynu během fermentativního růstu na cukru (fenolová červeň, Durhamova zkumavka)
  - Rozlišení enterobakterií
- β-galaktosidasa (ONPG test)
  - Hydrolýza *o*-nitrofenyl-β-galaktosidu za tvorby nitrofenolu (žlutý)
  - *Citrobacter* (+) od *Salmonella* (-), identifikace některých druhů *Shigella* a *Pseudomonas*
- Metylčerveňový test
  - Tvorba většího množství kyseliny z glukosy, pH klesá pod 4.3 (indikátor)
  - *Escherichia* (+) od *Enterobacter* a *Klebsiella* (-)
- Voges-Proskaureův test
  - Tvorba acetoinu fermentací cukru
  - *Klebsiella* a *Enterobacter* (+) od *Escherichia* (-)

Biochemické identifikační testy 2

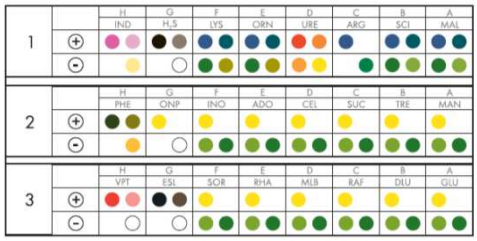
- Využití citrátu (Simmonsův test)
  - Využití citrátu jako jediného zdroje uhlíku, výsledkem je alkalizace média (bromthymolová modř)
  - *Klebsiella-Enterobacter* (+) od *Escherichia* (-)
- Zkapalňování želatiny
  - Zkapalnění želatiny proteasami
  - Identifikace *Serratia*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Clostridium*
- Hydrolýza škrobu
  - Detekce rozkladu pomocí jodu
  - Identifikace *Bacillus*
- Tvorba sirovodíku
  - Tvorba sirovodíku rozkladem aminokyselin obsahujících síru nebo redukcí thiosíranu; detekce tvorbou černého sulfidu železnatého
  - Identifikace *Salmonella*, *Proteus*
- Indolový test
  - Přeměna tryptofanu na indol (detekce Kovaczovým činidlem)
  - *Escherichia* (+) od *Enterobacter*, *Salmonella* (-), *Proteus vulgaris* (+) od *P. mirabilis* (-)

Biochemické identifikační testy 3

- Fenylalanindeaminasa
  - Deaminace za tvorby kyseliny fenylpyrohroznové, která reaguje s Fe^{3+}
  - Charakterizace rodu *Proteus*
- Ureasa
  - Štěpení močoviny na amoniak a CO_2 (alkalizace)
  - *Klebsiella* (+) od *Escherichia* (-), *Proteus* (+) od *Providencia* (-), identifikace *Helicobacter pylori* (+)
- Lysin-, ornitin- a arginindekarboxylasa
  - Dekarboxylace aminokyselin za tvorby CO_2 a aminu (alkalizace média)
  - Enterobakterie
- Koagulasa
  - Srážení krevní plasmy
  - *S. aureus* (+) od *S. epidermidis* (-)

Biochemické identifikační testy 4

- Oxidasový test
  - Oxidace alternativních akceptorů elektronů cytochromem *c* (přítomnost cytochrom *c* oxidasy)
  - *Pseudomonas* (+) od *Enterobacteriaceae* (-)
- Produkce katalasy
  - Rozklad peroxidu vodíku katalasou
  - *Bacillus* (+) od *Clostridium* (-), *Streptococcus* (-) od *Micrococcus* a *Staphylococcus* (+)
- Redukce dusičnanů
  - Dusičnan jako alternativní akceptor elektronů, redukce na dusitan nebo dusík
  - Identifikace enterobakterií (obvykle +)



ENTEROtest 24

Detekce produktů metabolismu

- Pro pomalu rostoucí organismy
  - Produkt lze detekovat mnohem rychleji než růst
- Pomocí radioaktivně značených látek nebo biochemických testů
- Radioaktivně značená glukosa na ^{14}C, degradace na $^{14}CO_2$
- *Mycobaterium tuberculosis* – roste velice pomalu, degradace mastných kyselin, uvolňování CO_2
- *Clostridium difficile* – infekce střev, anaerob, při růstu uvolňuje krátké řetězce mastných kyselin, které jsou specifické pro tento organismus

Imunologické techniky

- Potvrzení přítomnosti patogenního organismu bez jeho kultivace
- Využití vazby specifické protilátky k molekule patogenu (antigen)
- Různé typy testů

Molekulární techniky

- Analýza DNA
- Hybridizace nukleových kyselin
  - Určení přítomnosti (specifické) sekvence nukleové kyseliny
  - DNA nebo RNA próby
    - Kusy nukleových kyselin značených radioaktivními izotopy (např. ^{32}P), enzymaticky nebo fluorescenčně
    - Komplementární próba hybridizuje s DNA sekvencemi studovaného organismu
- Porovnání štěpení DNA (plasmidů) restrikčními enzymy
  - Určení příbuznosti organismů
- Užitečné v případě nesnadno kultivovatelných organismů a organismů produkujících toxin (produkt genu kódujícího syntézu toxinu)

Molekulární techniky v analýze mikrobiálních společenstev

- Metoda FISH
  - Fluorescenční hybridizace *in situ*
  - Próby značené fluorescenční značkou
    - Fylogenetické značení
      - 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
      - Možná kombinace s konfokálním mikroskopem
      - Využití i pro detekci patogenů v potravinách a klinických vzorcích
    - Barvení chromozomů
      - Analýza specifických genů v mikroflóře přírodního vzorku
      - Próby hybridizují s DNA
    - FISH s *in situ* reverzní transkripcí
      - Stanovení exprese genu v buňkách přítomných v přírodním vzorku
      - Próby hybridizují s mRNA, reverzní transkripcí se vytvoří DNA, ta se amplifikuje pomocí PCR a nechá se reagovat s fluorescenční próbou
  - Spojení s mikroskopickým pozorováním

Identifikace nekultivovatelných organismů

- Metoda PCR
- Využití genů specifických pro daný organismus
  - Zařazení mezi bakterie, archea nebo eukaryota
  - Určení fylogenetické příbuznosti (16S, 18S rRNA)
  - Určení specifického organismu nebo metabolicky příbuzné skupiny (metabolické geny)
- Identifikace neznámého organismu
  - Amplifikace sekvence mezi dvěma specifickými sekvencemi
  - Izolace pomocí elektroforézy a stanovení sekvence nukleotidů
  - Porovnání se sekvencí známého organismu
- PCR technologie může být použita pro detekci přítomnosti organismu nebo virové částice v jakémkoli prostředí
- Využití i pro identifikaci kultivovatelných organismů bez jejich izolace z prostředí

Metagenomika

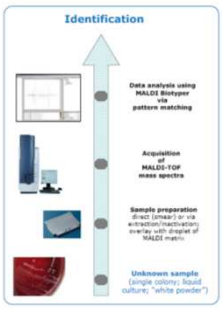
- Enviromentální genomika
- Genomika
  - Mapování, sekvenování a analýza jednotlivých genomů
- Metagenomika
  - Shotgun sekvenování celkové DNA přítomné v prostředí
  - Metagenom
    - Všechny geny mikrobiální komunity v daném prostředí
- Studium mikrobiální diversity v daném prostředí bez izolace a kultivace jednotlivých druhů

Učebnice Madigan a kol., obr. 22.16, str. 665

Genetická analýza mikrobiální komunity

Identifikace mikroorganismů metodou MALDI-TOF

- MALDI-TOF
  - Analytická metoda založená na hmotnostní spektrometrii
  - Vhodná k analýze proteinů
- Proteinové profilování
- Měření hojně zastoupených proteinů, včetně ribozomálních
- Ribozomální proteiny nejsou významně ovlivněny růstovými podmínkami
- Nevyžaduje předběžné testy
  - Rychlá metoda



Zdroj: Bruker Daltonics, MALDI Biotyper