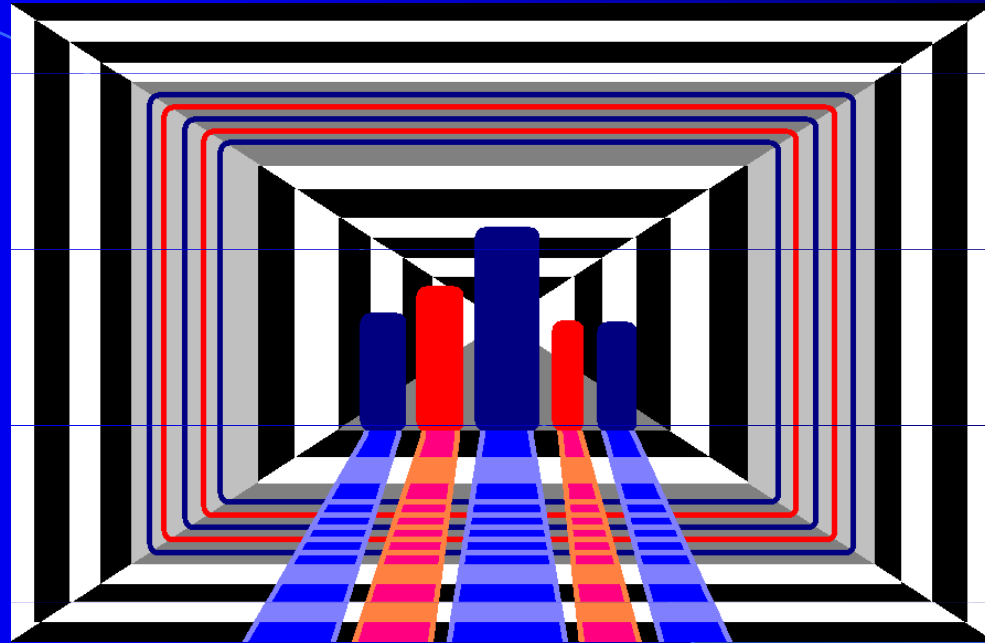


# Přehled mikrobiologických vyšetřovacích metod



Mikrobiologie a imunologie – BSKM021p + c

Týden 2

Ondřej Zahradníček

# Cíle mikrobiologické diagnostiky

Odhalení původce nemoci (patogena)

Někdy: zjištění citlivosti patogena na antimikrobiální látky (*hlavně u bakterií a kvasinek, nedělá se u parazitů a vláknitých hub, u virů je to ve fázi výzkumu*)

Někdy také: určení faktorů virulence

# Co je to vzorek

**Vzorek** je to, co je odebráno pacientovi a přichází na vyšetření do laboratoře:

- **kusový či tekutý materiál ve zkumavce** či jiné nádobce (krev, sérum, moč...)
- **stěr či výtěr na vatovém tamponu**, obvykle zanořeném do transportního média.

Při diagnostice někdy pracujeme s celým vzorkem. Jindy je nutno získat ze vzorku kmen nebo kmeny patogenních mikrobů.

# Co je to kmen

**Kmen** je čistá kultura („výpěstek“) jednoho druhu mikroba

**Kmen získáme jedině kultivací (pěstováním) mikroba na pevné půdě.**

Kochův objev, že bakterie lze takto pěstovat, měl zásadní význam v dějinách mikrobiologie.

# Přehled metod

- **Metody přímé:** Hledáme mikroba, jeho část či jeho produkt
  - Přímý průkaz ve vzorku – pracujeme s celým vzorkem
  - Identifikace kmene – určení vypěstovaného izolátu
- **Metody nepřímé:** Hledáme protilátky. Protilátka není součástí ani produktem mikroba – je produktem makroorganismu

# Přehled metod přímého průkazu

Metoda	Průkaz ve vzorku	Identifikace
Mikroskopie	ano	ano
Kultivace	ano	ano
Biochemická identifikace	ne	ano
Průkaz antigenu	ano	ano
Pokus na zvířeti	ano	v praxi ne
Molekulární metody	ano	v praxi ne*

\*netýká se molekulární epidemiologie – sledování příbuznosti kmenů

# 1. Mikroskopie

# Co vidíme v mikroskopu

- **V případě mikroskopování kmene** vidíme jeden typ mikrobiálních buněk
- **V případě mikroskopování vzorku** můžeme vidět
  - **mikroby** – nemusí tam být žádné, a může tam být i klidně deset druhů
  - **buňky makroorganismu** – nejčastěji epitelie a leukocyty, někdy erytrocyty
  - **jiné struktury**, např. fibrinová vlákna, buněčnou drť (detritus) a podobně



# Typy mikroskopie

- **Elektronová mikroskopie** – u virů; spíše výzkum než při běžném průkazu virů
- **Optická mikroskopie**
  - **Nativní preparát** – na velké a/nebo pohyblivé mikroby
  - **Nativní preparát v zástinu** (hlavně spirochety)
  - **Fixované a barvené preparáty**, například:
    - Barvení dle Grama – nejdůležitější bakteriologické
    - Barvení dle Ziehl-Neelsena – např. u bacilů TBC
    - Barvení dle Giemsy – na některé prvoky

# Gramovo barvení – princip 1

- **Grampozitivní bakterie** mají ve své stěně tlustší vrstvu peptidoglykanu mureinu.
  - Díky tomu se na ně pevněji váže krystalová nebo genciánová violet'...
  - ...a po upevnění této vazby Lugolovým roztokem...
  - ...se neodbarví ani alkoholem.
- **Gramnegativní bakterie** se naopak odbarví alkoholem a dobarví se pak na červeno safraninem.

# Gramovo barvení – princip 2

Chemikálie	Grampozitivní	Gramnegativní
Krystal. violet'	Obarví se fialově	Obarví se fialově
Lugolův roztok	Vazba se upevní	Upevní se méně
Alkohol	Neodbarví se	Odbarví se
Safranin	Zůstanou fialové	Obarví se červeně

Gramem se nebarvící bakterie se neobarví v prvním kroku kvůli absenci buněčné stěny (*Mycoplasma*) nebo proto, že jejich stěna je vysoce hydrofobní (*Mycobacterium*).

**Spirochety** by se barvily gramnegativně, ale jsou velmi tenké, takže i je lze také vlastně považovat za „Gramem se nebarvící“ a Gram se v jejich diagnostice nepoužívá.

# Mikroskopie vzorku

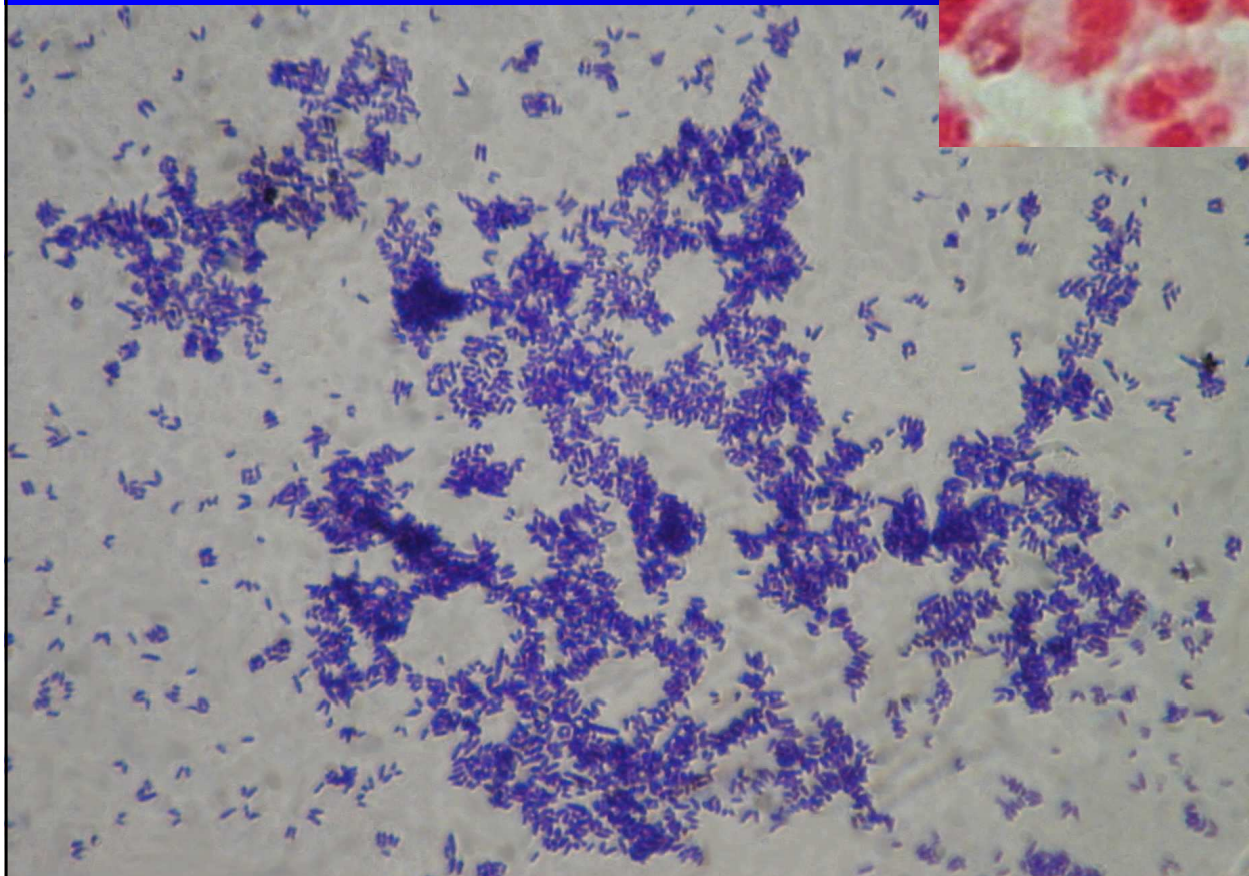
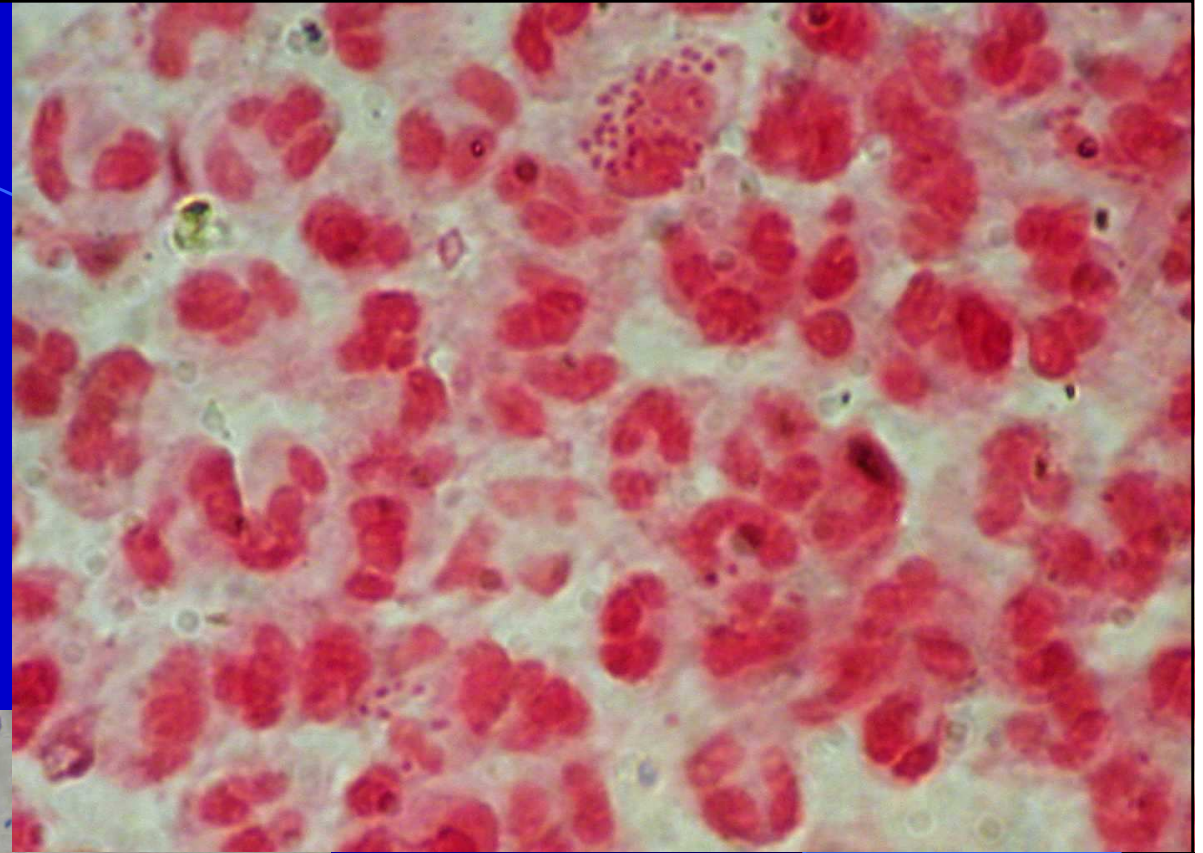


Foto: archiv MÚ

# Mikroskopie kmene

# 2. Kultivace

# Kultivace (pěstování) bakterií *(případně také kvasinek)*

- Bakterie často **pěstujeme na umělých půdách**
- Bakterie na půdu **naočkujeme a poté půdu umístíme do termostatu**, většinou nastaveného na 37 °C (pro bakterie významné pro člověka je to většinou optimální teplota – což má logiku)
- Za 24 (někdy až 48) hodin **půdu vytáhneme a pozorujeme, jak nám bakterie vyrostly**
- **Vláknité houby** se pěstují mnohem déle
- **Viry a paraziti** se většinou vůbec nepěstují

# Kultivace bakterií – podmínky

- Bakteriím musíme připravit **přijatelné vnější podmínky** – teplotu, vlhkost apod.
- Některé jsou dány **nastavením termostatu**, jiné **složením kultivační půdy**
- Používáme **různá kultivační média**, sloužící k určitým účelům
- **Aerobní a fakultativně anaerobní** bakterie můžeme pěstovat za normální atmosféry
- **Striktně anaerobní bakterie** vyžadují atmosféru bez kyslíku. **Kapnofilní** zase zvýšený podíl CO<sub>2</sub>.

Připravené kultivační  
půdy se uchovávají  
v chladničce

Foto: archiv MÚ

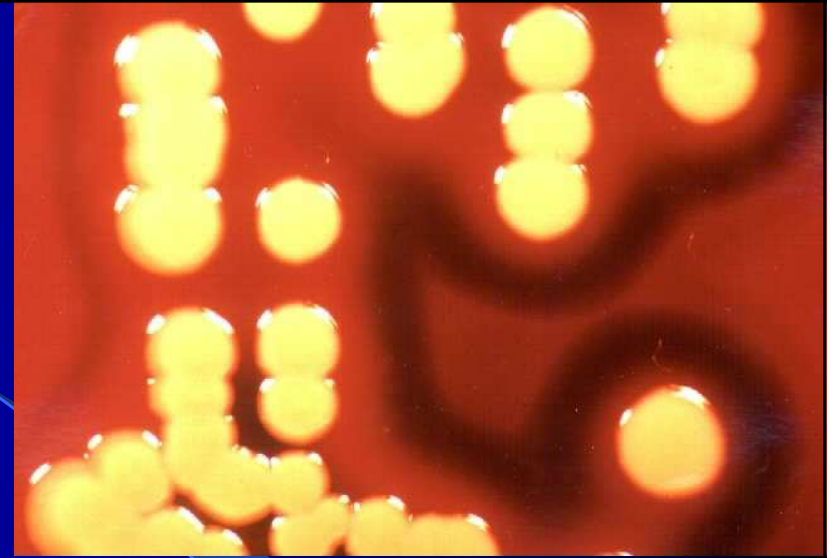




# Smysl kultivace bakterií

- Proč vlastně v laboratoři bakterie pěstujeme?
  - Abychom je **udrželi při životě a pomnožili**. K tomu slouží kultivace na tekutých půdách i na „pevných“ půdách (to jsou půdy, které netečou, jejich základem je většinou agarová řasa)
  - Abychom získali **kmen** – pouze pevné půdy
  - Abychom je vzájemně **odlišili a oddělili** – používají se diagnostické a selektivní půdy, sloužící k identifikaci

# Pojem kolonie



- Kolonie je **útvarem na povrchu pevné půdy**. Pochází z jedné buňky nebo malé skupinky buněk (dvojice, řetízku, shluku)
- Kolonie je tedy vždy tvořena **jedním kmenem**.
- V některých případech můžeme z počtu kolonií **odhadnout počet mikrobů** ve vzorku – nebo přesněji počet „kolonií tvořících jednotek“ (CFU)
- Popis kolonií má významné místo v diagnostice

# Kultivace v praxi

- Vzorek se vloží do **tekuté půdy** nebo nanese **na pevnou půdu**
- U pevné půdy se ho snažíme tzv. **mikrobiologickou kličkou** rozředit, abychom získali **jednotlivé kolonie** a mohli dále pracovat s kmeny mikrobů
- **Tekuté půdy**
  - jsou půdy pomnožovací
  - základem je zpravidla hovězí vývar a bílkovinný hydrolyzát
  - nejdůležitější je peptonová voda, bujón, VL-bujón, selenitový bujón (selektivně pomnožovací)

# Tekuté půdy

Foto: archiv MÚ



# Pevné (agarové) půdy

- Základem je opět masopeptonový bujón, ale navíc obsahují výtažek z agarové řasy. Používala se i želatina, ale neosvědčila se tolik jako agar.
- Abychom využili všech výhod, které pevné půdy nabízejí, musíme vzorek (kultivace vzorek → kmen), ale i kmen (kultivace kmen → kmen) dobře rozočkovat. Klasickým způsobem rozočkování je tzv. **křížový roztěr.**

Foto: [www.medmicro.info](http://www.medmicro.info)

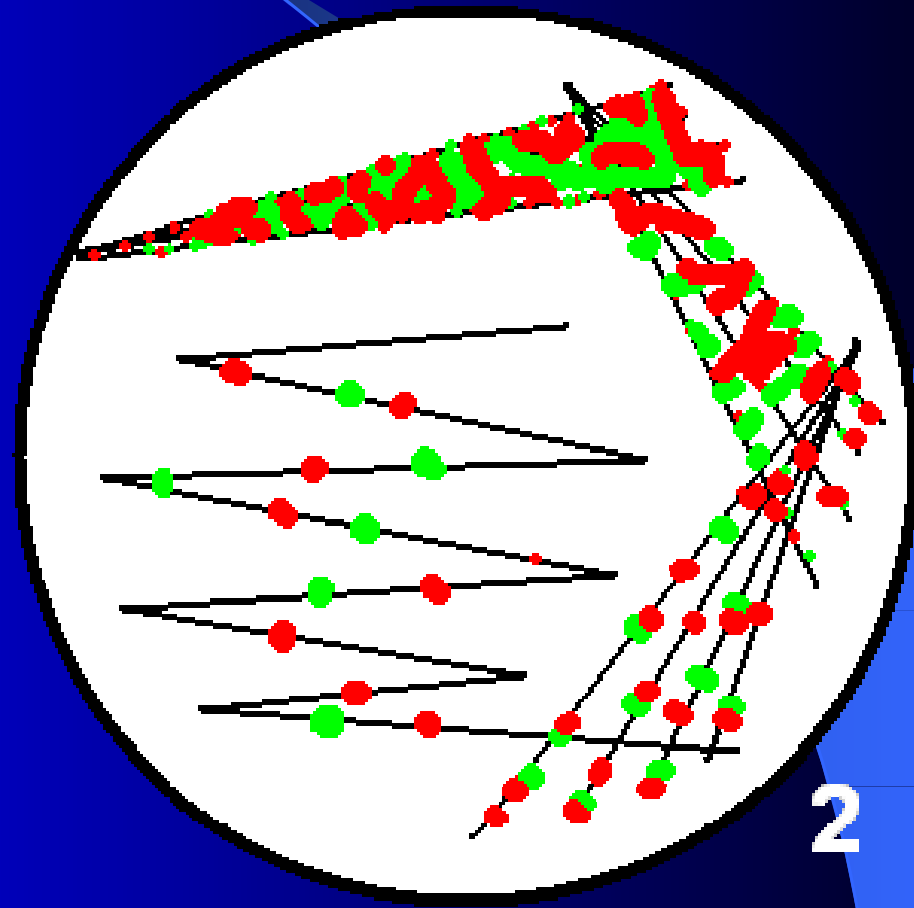
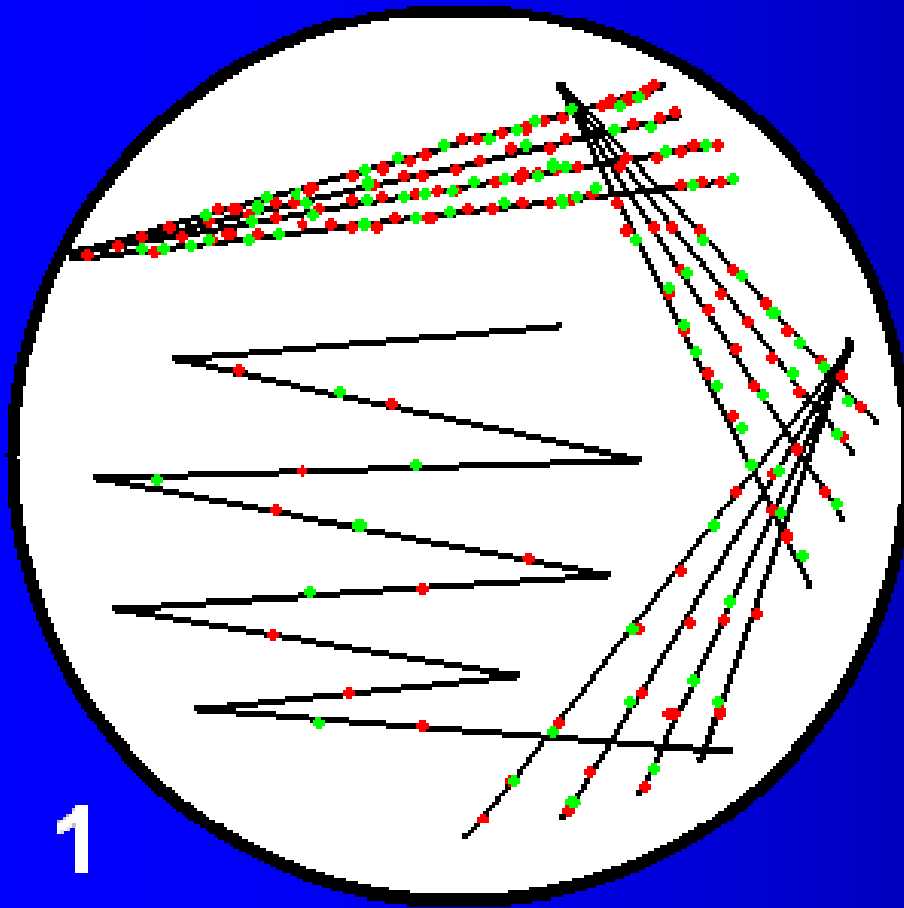


# Co se dá popisovat u kolonií

- Velikost
- Barva
- Tvar (okrouhlý...)
- Profil (vypouklý...)
- Okraje (výběžky..)
- Povrch (hladký, drsný)
- Konzistence (suchá...)
- Průhlednost
- Vůně/zápach
- Okolí kolonie

To vše ale pouze v případě, že se podařilo rozočkováním získat jednotlivé kolonie. Tam, kde je hustý nárůst, se tyto vlastnosti hodnotit nedají.

# V případě směsi vytvoří každá bakterie svoje kolonie (při dobrém rozočkování)



1 – očkování směsi bakterií (naznačeny tečkami), 2 – výsledek kultivace: v prvních úsecích směs, až na konci izolované kolonie

# Pevné půdy





# Existují různé typy pevných půd

- **Diagnostické půdy** – roste "kdeco, ale různě" (krevní agar, VL krevní agar)
  - Chromogenní půdy – zvláštní druh diagnostických půd
- **Selektivní půdy** – roste "jen málo co" (krevní agar s 10 % NaCl pro kultivaci stafylokoků)
- **Selektivně diagnostické půdy** – např. Endova (rostou tam jen některé G– bakterie = selektivita + rozlišení bakterií podle štěpení laktózy = diagnosticita)
- **Obohacené půdy** – k pěstování náročných bakterií (čokoládový agar, což je zahřátý krevní agar)
- **Speciální půdy** – mají své zvláštní určení (MH půda pro testy citlivosti kmene k antibiotikům)

# Půdy diagnostické

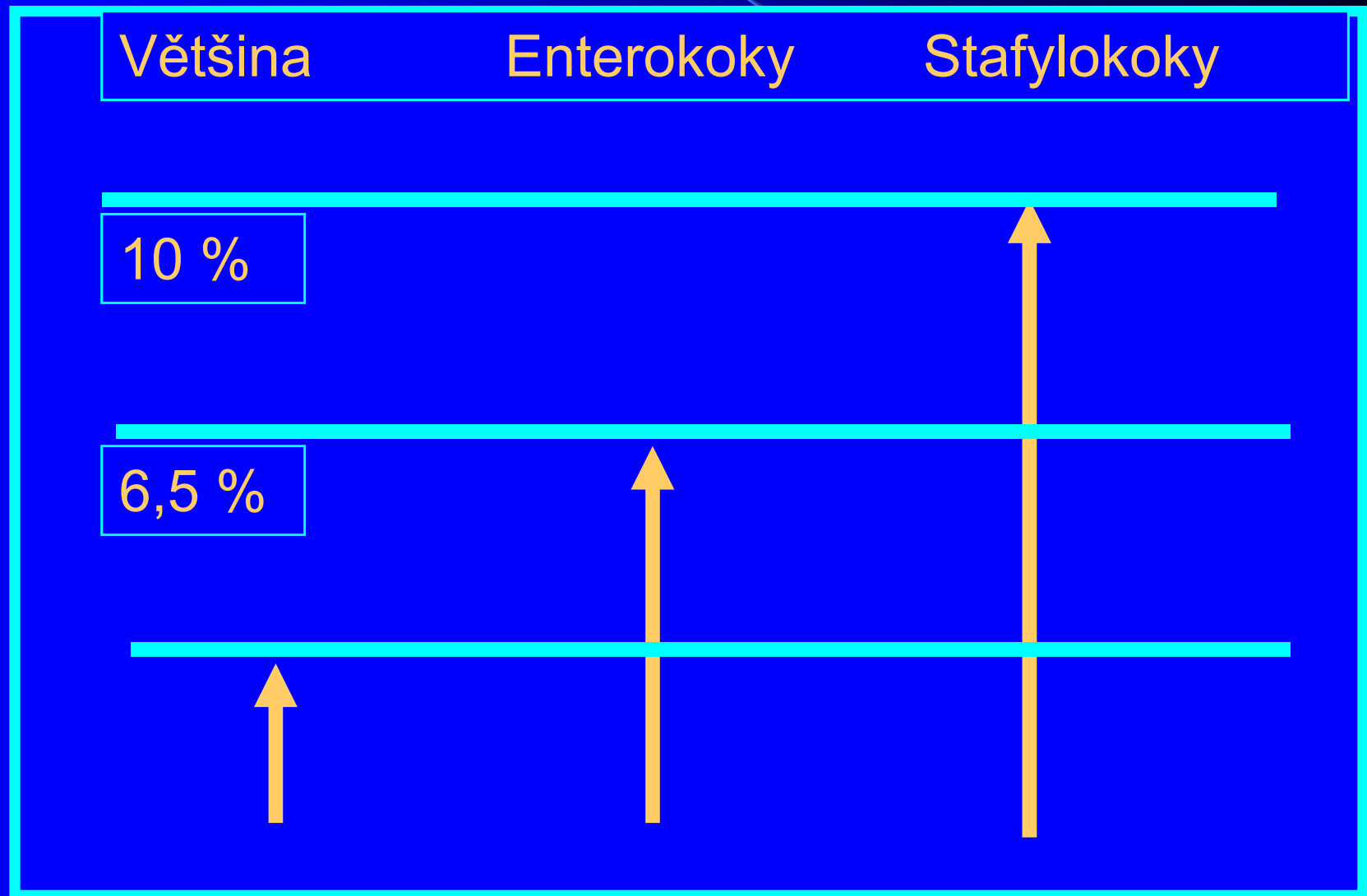
- Nepotlačují růst žádného mikroba
- Zato díky svému složení **rozlišují mikroby podle určité vlastnosti**
- Příkladem je **krevní agar** ke sledování hemolytických vlastností a **VL krevní agar** (podobný, ale na anaeroby)
- Zvláštním případem půdy chromogenní a fluorogenní



# Pevné selektivní půdy

- Účelem je **selektovat (vydělít) ze směsi bakterií** pouze určitou skupinu nebo skupiny
- Příkladem je **agar pro stafylokoky s 10 % NaCl**
- Někdy je selektivnosti dosaženo přidáním antibiotika. **Krevní agar s amikacinem** je selektivní pro streptokoky a enterokoky

# Selektivita hypersolného agaru



# Příklad selektivně diagnostické půdy – Endova půda

Endova půda je selektivní jen pro některé  
gramnegativní tyčinky (selektivní vlastnost)



Foto: archiv MÚ

Endova půda umí  
také rozlišit  
bakterie podle  
toho, jestli  
dovedou štěpit  
laktózu, nebo ne  
(diagnostická  
vlastnost).

# Chromogenní půdy

- Chromogenní půdy obsahují barvivo, na které je navázaný specifický substrát → barevnost se ztrácí, není to už barvivo, ale chromogen
- Bakterie schopná štěpit specifický substrát změní chromogen zpět na původní barvivo



Foto:  
[www.medmicro.info](http://www.medmicro.info)

# Půdy se používají i k testování citlivosti na antibiotika

Foto: archiv MÚ

- V tomto případě se bakterie **naočkují po celé ploše** a na půdu se nakladou kulaté **papírky napuštěné jednotlivými antibiotiky (antibiotické disky)**. Antibiotika difundují agarem. Je-li kmen citlivý, vytvoří se zóna citlivosti.
- Nejčastěji se používá **bezbarvá MH půda**, na které je zároveň dobře vidět i pigmenty bakterií

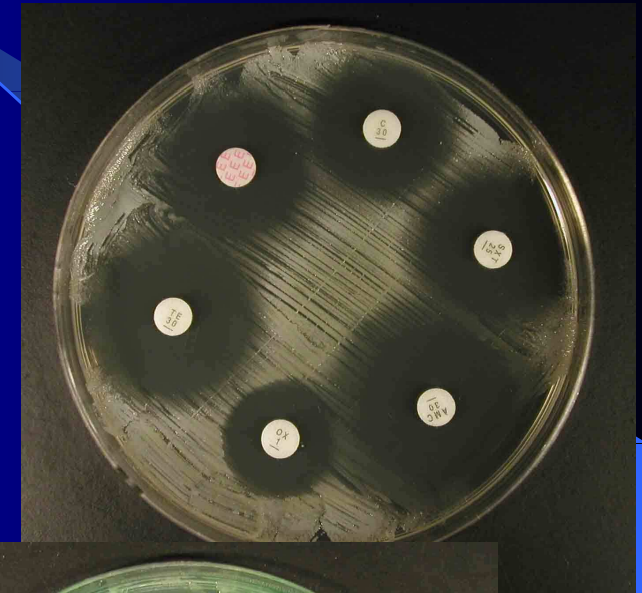
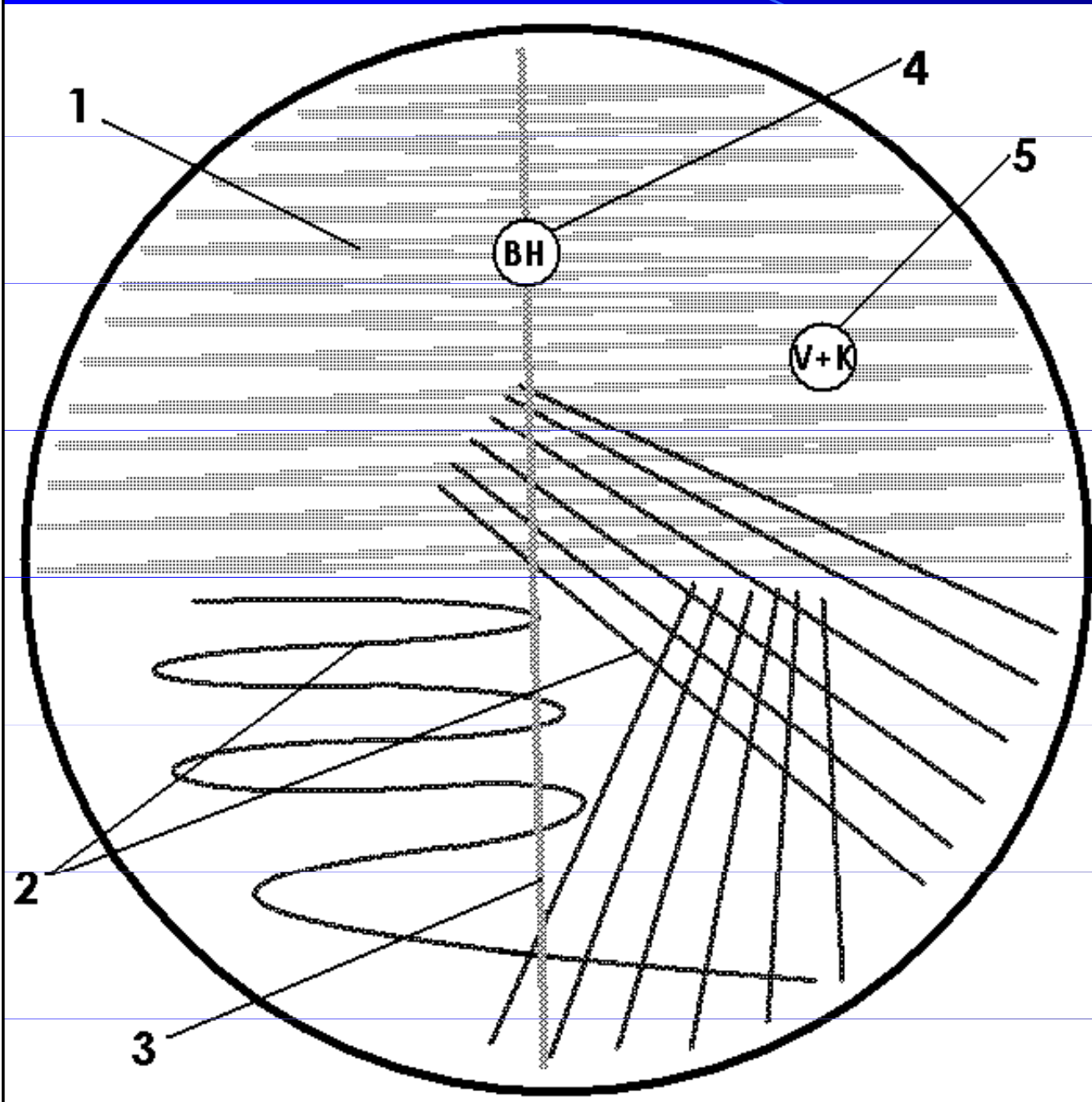


Foto: archiv MÚ

# Postup očkování výtěru z krku



1 očkováno tamponem

2 očkováno kličkou

3 stafylokoková čára

4 disk BH (bacitracin pro hemofily)

5 disk VK (vankomycin a kolistin pro meningokoky)

Na celé naočkované ploše pátráme po streptokokách (bezbarvé) a po stafylokokách (spíše bílé či zlatavé)



# Výtěr z krku – reálný výsledek



Foto: archiv MÚ

# Pěstování anaerobních bakterií

Anaerobní bakterie nesnášejí kyslík. Musíme je tedy pěstovat ve speciální atmosféře bez kyslíku.

Foto: archiv MÚ



Foto: archiv MÚ



# 3. Biochemická (a jiná) identifikace kmenů

# Biochemické identifikační metody

- *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, užijeme **indikátor**
- **Existuje přitom velké množství způsobů technického provedení tohoto typu testů.**

# 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  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 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](http://medic.med.uth.tmc.edu/path/oxidase.htm)

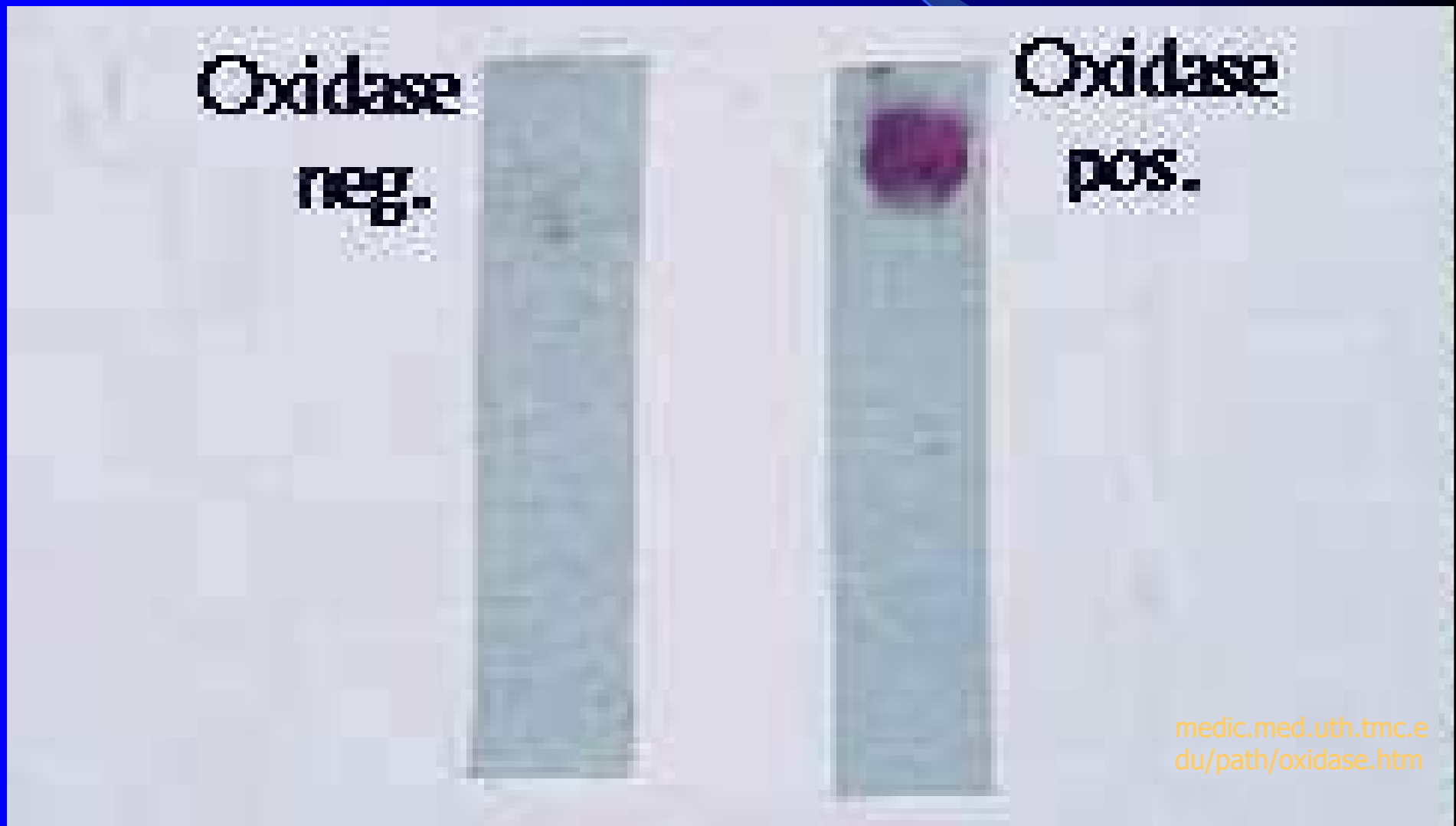
Catalase +



Catalase -



# Příklady dalších testů: oxidázový test (diagnostický proužek)



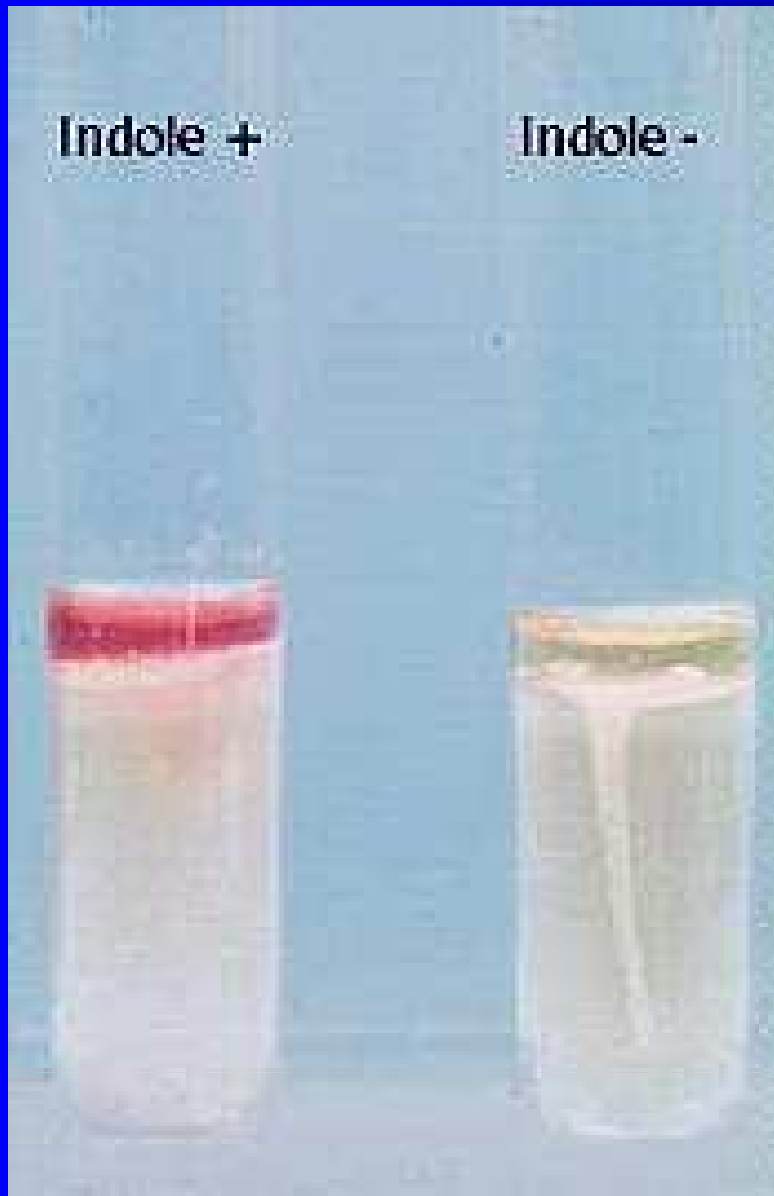
# Provedení testu v praxi



Foto: archiv MÚ



# ...a další testy



# Někdy se zkoumají i vzájemné interakce dvou různých bakteriálních kmenů

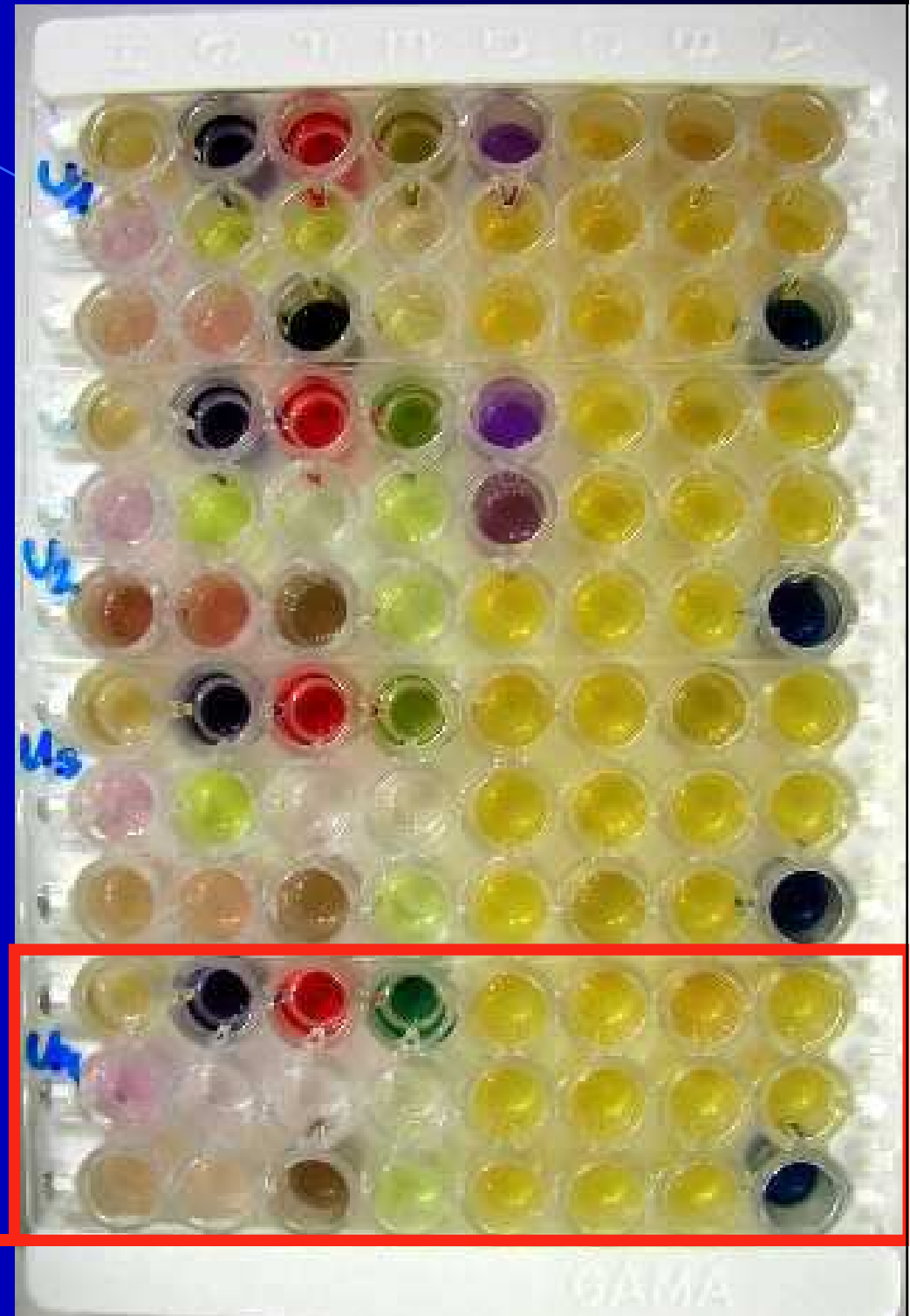


Foto: archiv MÚ

# Moderní biochemické testy zahrnují i desítky reakcí

- Testy se dělají v důlcích plastových mikrotitračních destiček.
- Počet testů v sadách kolísá od sedmi až po více než padesát
- Liší se v technických detailech. Vždy je však substrát lyofilizovaný, bakterie se nejprve rozmíchá ve fyziologickém roztoku nebo suspenzním médiu a pak se kape či lije do důlků

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



# Zahraniční soupravy

[www.ilexmedical.com/products\\_engl/api.htm](http://www.ilexmedical.com/products_engl/api.htm)



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



[www.ilexmedical.com/products\\_engl/api.htm](http://www.ilexmedical.com/products_engl/api.htm)





# 4. Pokus na zvířeti

# Pokus na zvířeti

Pokus na zvířeti býval důležitou součástí diagnostiky v začátcích mikrobiologie. Jsou ale výjimečné případy, kdy se uplatní i dnes.





# 5. Průkaz nukleové kyseliny

# Průkaz nukleové kyseliny

- **metody bez amplifikace nukleové kyseliny** (klasické genové sondy)
- **metody s amplifikací** (namnožením)
  - PCR (polymerázová řetězová reakce)
  - LCR (ligázová řetězová reakce)
- Principiálně se **použití v mikrobiologii neliší od použití jinde** (např. v genetice)
- Nevýhoda – **někdy jsou až příliš citlivé**, takže se prokáže každá molekula DNA, která mohla třeba „přilétnout odněkud zvenčí“. Citlivost se dnes ale dá omezit.

# Praktické poznámky

- Vzorky, které budou zkoumány metodou PCR, se odebírají poněkud jinak, než vzorky ke kultivaci. **Mikrob nemusí nutně přežít**, zato je důležité
  - aby DNA nebyla kontaminovaná nějakou DNA zvenčí
  - aby vzorek neobsahoval nějakou látku, která přivodí tzv. inhibici reakce
- Proto se zpravidla používá **suchý tampon**, nikoli tampon s transportní půdou
- Je nutno **pracovat sterilně**, a je nutno používat **netalkované rukavice** (talek může inhibovat reakci)

6. Průkaz  
antigenů +  
průkaz  
protilátek

# Metody založené na interakci antigen – protilátka

- O **antigenech a protilátkách** bude ještě řeč, až se budou probírat základy imunologie.
- Prozatím si pouze představíme v hrubých rysech **mikrobiální antigen a protilátku proti němu**, abychom si pak ukázali, jak se jejich vzájemná interakce využívá v diagnostice

# Co je to antigen (Ag)

Antigen je **struktura na povrchu mikroba** (ale i třeba pylového zrnka či zvířecího chlupu), které tělo provokuje k tvorbě protilátek

Antigen **se dá prokázat pomocí protilátky**, která se proti němu vytvořila například u zvířete

# Co je to protilátka (Ig = imunoglobulin)

Protilátka je **bílkovina, imunoglobulin, produkt imunitního systému člověka** (nebo zvířete).

Protilátka **se dá prokázat pomocí specifického antigenu**, proti kterému se vytvořila

# Serologické metody (založené na interakci antigen – protilátka)

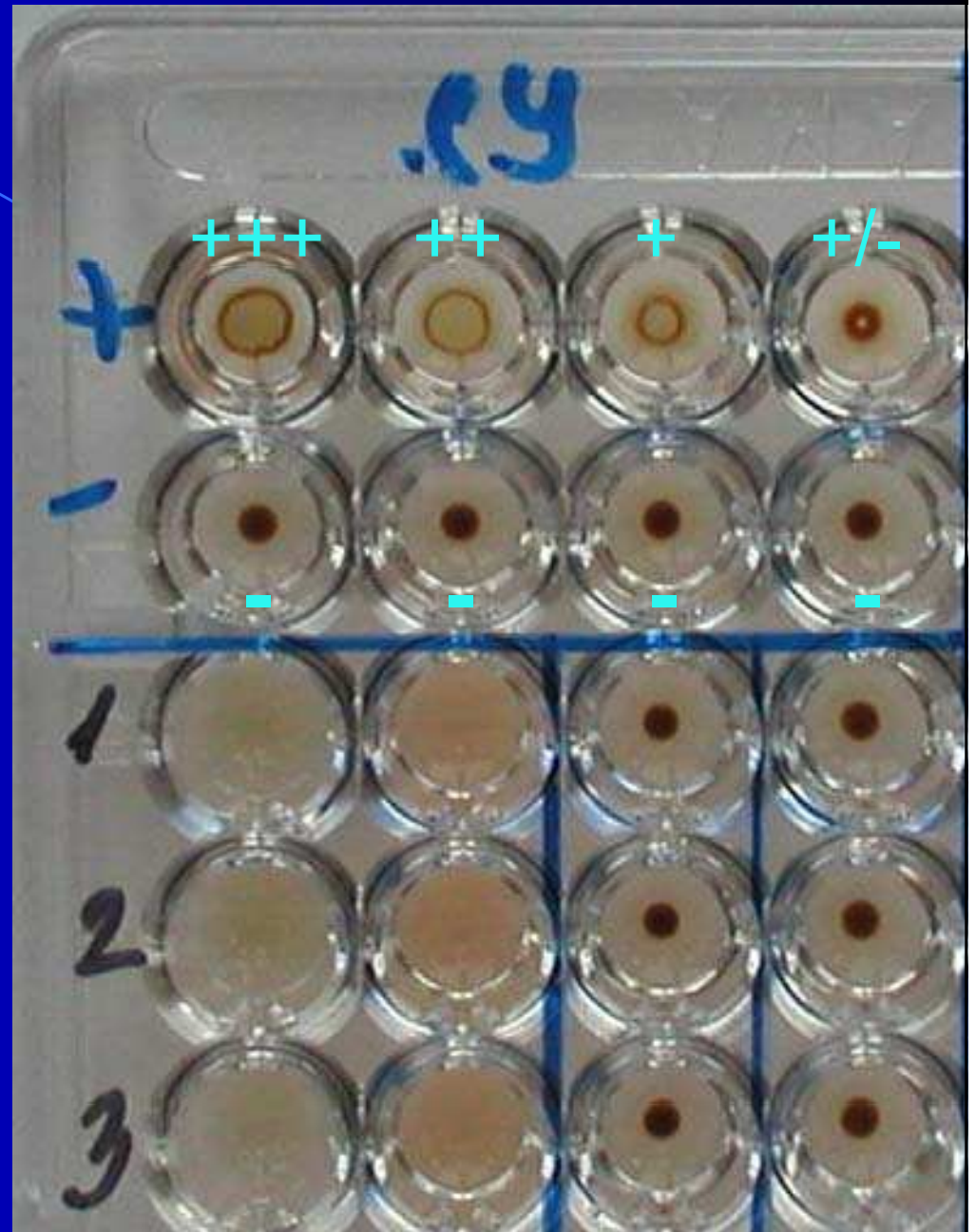
- **pracují s reakcí antigen – protilátka** (za vzniku komplexu); vzájemně se liší způsobem detekce komplexu antigen – protilátka
- **při stejném principu metod se dají využít pro průkaz antigenu** (pomocí zvířecí protilátky) **i pro průkaz protilátky v těle pacienta** (pomocí antigenu mikroba, nebo i celého mikroorganismu)

# Jak si to představit

- Neznámý klíč mohu zkoušet strkat do různých zámků, abych zjistil, ke kterému z nich se hodí: **testuji klíč pomocí různých zámků**
- Neznámý zámek mohu zkoumat tak, že do něj zkouším strkat různé klíče, abych zjistil, který klíč se k němu hodí: **testuji zámek pomocí různých klíčů**
- **Přitom není pochyb, že zámek je něco úplně jiného než klíč!**



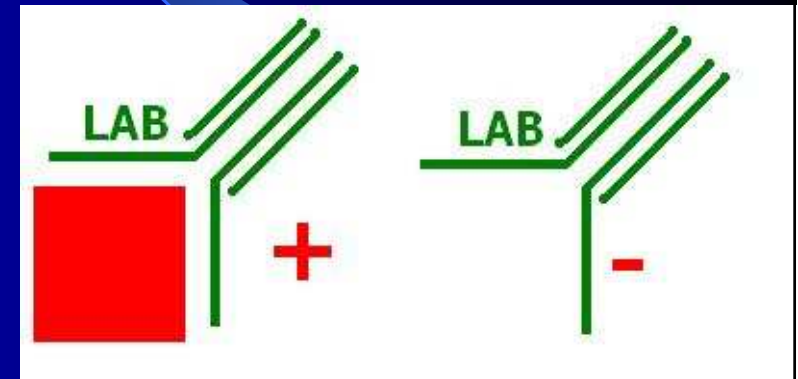
# Serologická reakce v praxi



# Protilátku antigenem, nebo antigen protilátkou?

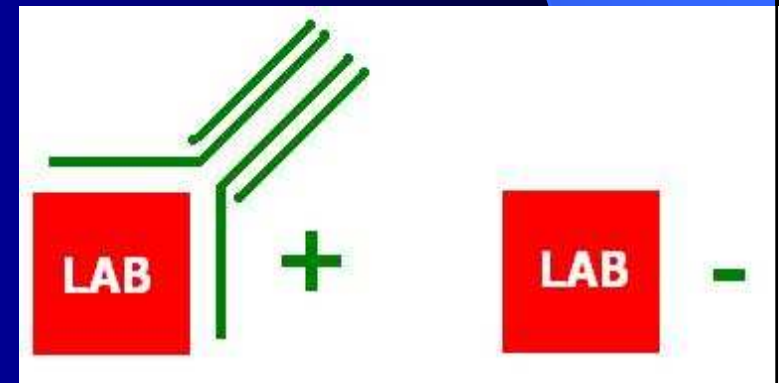
**Průkaz antigenu:** laboratorní protilátky (zvířecího původu) + vzorek pacienta nebo kmen mikroba.

Přímá metoda



**Průkaz protilátky:** laboratorní antigen (mikrobiální) + sérum (výjimečně sliny, likvor) pacienta

Nepřímá metoda



# Různé vzorky

- **Průkaz antigenu ve vzorku** je přímou metodou, stejně jako třeba kultivace či mikroskopie. Jako vzorek tedy použijeme to, v čem předpokládáme nález mikroba: u meningitidy mozkomíšní mok, u střevních nákaz stolici apod. Nebo použijeme kmen, který jsme z takového vzorku izolovali (pak jde o **antigenní analýzu kmene**)
- **Průkaz protilátek** je metodou nepřímou. Až na naprosté výjimky hledáme protilátky v jednom jediném typu vzorku: v séru

# Průkaz antigenu a antigenní analýza

- **V rámci průkazu antigenu** (tedy přímého průkazu) lze tedy dále rozlišit dva podtypy:
  - **Přímý průkaz antigenu ve vzorku**, například ve vzorku mozkomíšního moku
  - **Antigenní analýza (identifikace) kmene**, izolovaného ze vzorku (například kmene meningokoka)
- U **nepřímého průkazu** naopak vždy pracujeme se vzorkem, a to **se vzorkem séra**, jak již bylo uvedeno

# Serologická laboratoř



Foto: archiv MÚ

# Čerstvá, nebo dávno prodělaná nákaza?

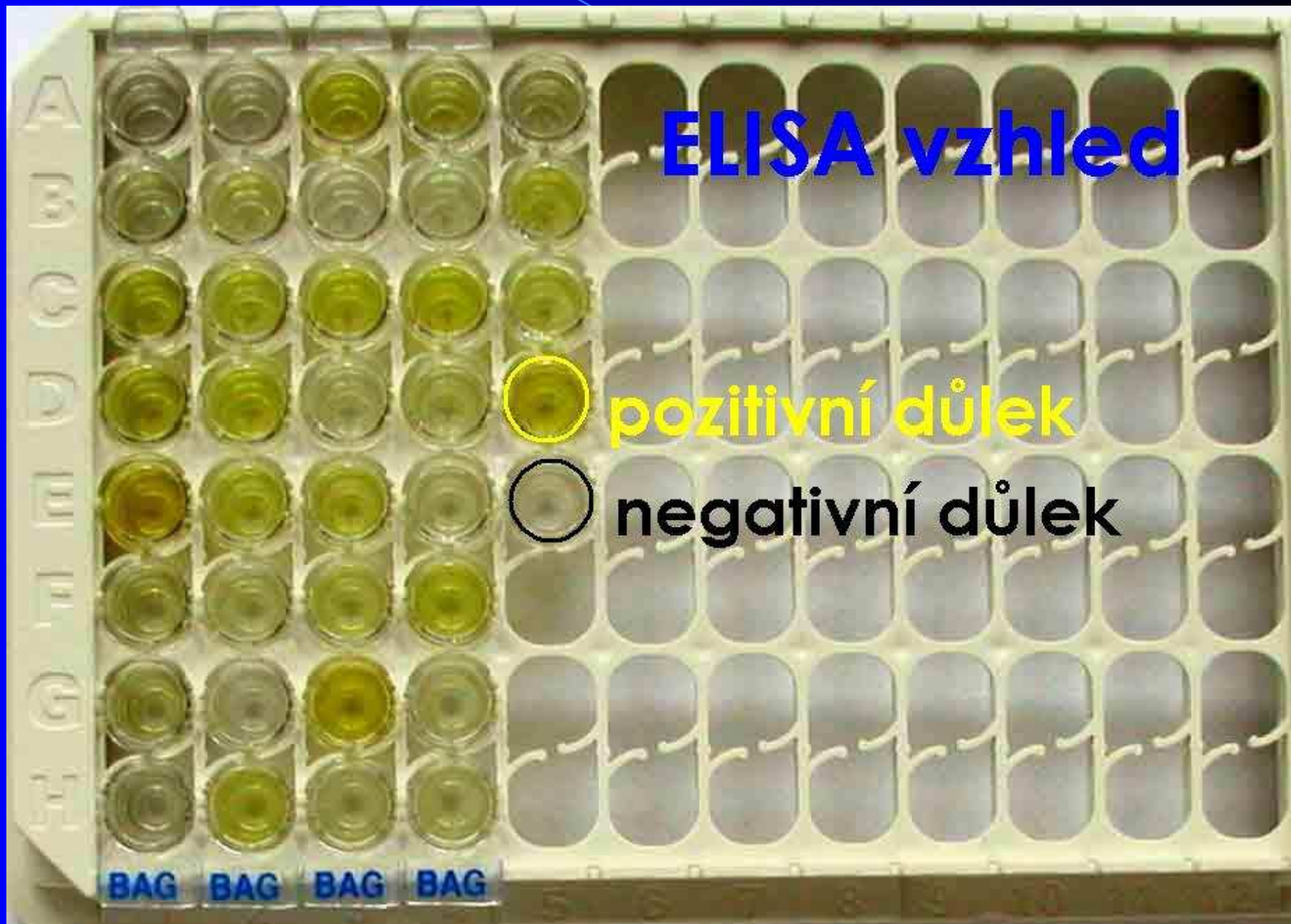
- Po nákaze přetrvávají protilátky dlouhodobě, někdy celoživotně. Samotný nálezn protilátek tedy tolik neznamena. Pro rozlišení čerstvé x dávno prodělané nákazy se používá:
  - **zjištění množství protilátek** (jako tzv. titru) a **změna tohoto množství v čase** (dynamika titru; za významnou se považuje čtyřnásobná změna, anebo tzv. serokonverze = v prvním vzorku ještě protilátky nejsou, ve druhém ano)
  - **rozlišení protilátek třídy IgM a IgG** (jen u některých novějších reakcí je to ovšem možné)
  - **stanovení tzv. avidity** (síly vazby protilátek)

# Průběh protilátkové odpovědi

- **Akutní infekce:** velké množství 1 protilátek, převážně třídy IgM
- **Pacient po prodělané infekci:** malá množství protilátek, hlavně IgG 2 (imunologická paměť)
- **Chronická infekce:** různé možnosti



# Ukázka serologické reakce ELISA





# Nespecifické antigeny a heterofilní protilátky

- **Nespecifický antigen** (Paul-Bunnellova reakce): protilátky reagují s nějakým jiným antigenem než s antigenem mikroba
- **Heterofilní protilátky**: protilátky nejsou namířeny přímo proti mikrobu, ale proti nějaké molekule, která se při infekci tvoří (kardiolipin u syfilis)

# Přehled sérologických metod

- Precipitace
- Aglutinace (a aglutinace na nosičích)
- Komplementfixační reakce (KFR)
- Neutralizace (ASLO, HIT, VNT)
- Reakce se značenými složkami:
  - Imunofluorescence (IMF)
  - Radioimunoanalýza (RIA)
  - Enzymová imunoanalýza (EIA, ELISA)
  - Immunoblotty (= zvláštní případ ELISy)

# Principy jednotlivých metod

- **Aglutinace a precipitace:** komplex Ag – Ig je viditelný. U precipitace se použije samotný Ag, u aglutinace je Ag navázán na částici
- **Komplementfixace:** složitá reakce s využitím jedné složky imunitního systému – komplementu (užívá se morčecí komplement)
- **Neutralizace:** využití přirozené schopnosti protilátek neutralizovat účinek viru či toxinu
- **Reakce se značenými složkami:** postupné navazování na povrch, co se neodplaví, zůstane a je detekováno

# Rozdíl mezi staršími a novějšími metodami

- **Starší metody** (aglutinace, komplementfixace, neutralizace) neumějí rozlišit protilátky třídy IgG a IgM. Proto je tu nutno odebírat dva vzorky séra a sledovat dynamiku titru. Důležité je na žádanku uvést datum prvních příznaků a údaj, zda jde o I. či II. vzorek séra!
- **Novější metody** toto nepotřebují. Titry se nezjišťují, u metody ELISA se zato zjišťují hodnoty absorbance, odpovídající intenzitě reakce (množství molekul, které reagovaly)

# Závěr: Práce laboratoře v praxi

# Práce laboratoře v praxi

- Do laboratoře **přijde vzorek**
- **K nepřímému průkazu** jsou přijímány **vzorky séra** (kde hledáme protilátky)
- **K přímému průkazu** jsou přijímány **vzorky z těch míst na těle, kde předpokládáme infekci**: nejčastější jsou výtěry z krku a nosu, vzorky moče a stolice, ale někdy přijde i třeba kousek srdeční chlopně odebraný při operaci

# Proces mikrobiologického vyšetřování – na všem záleží!!!

LÉKAŘ (KLINIK)

LABORATOŘ

Indikace vyšetření – zda, jaké

Vlastní provedení odběru

Transport materiálu

Rozhodnutí, jak zpracovat

Vlastní zpracování materiálu

Zaslání výsledku

Interpretace v kontextu ostat. výsledků a stavu pacienta (léčit vždy **pacienta**, ne nález)

# Nashledanou příště...

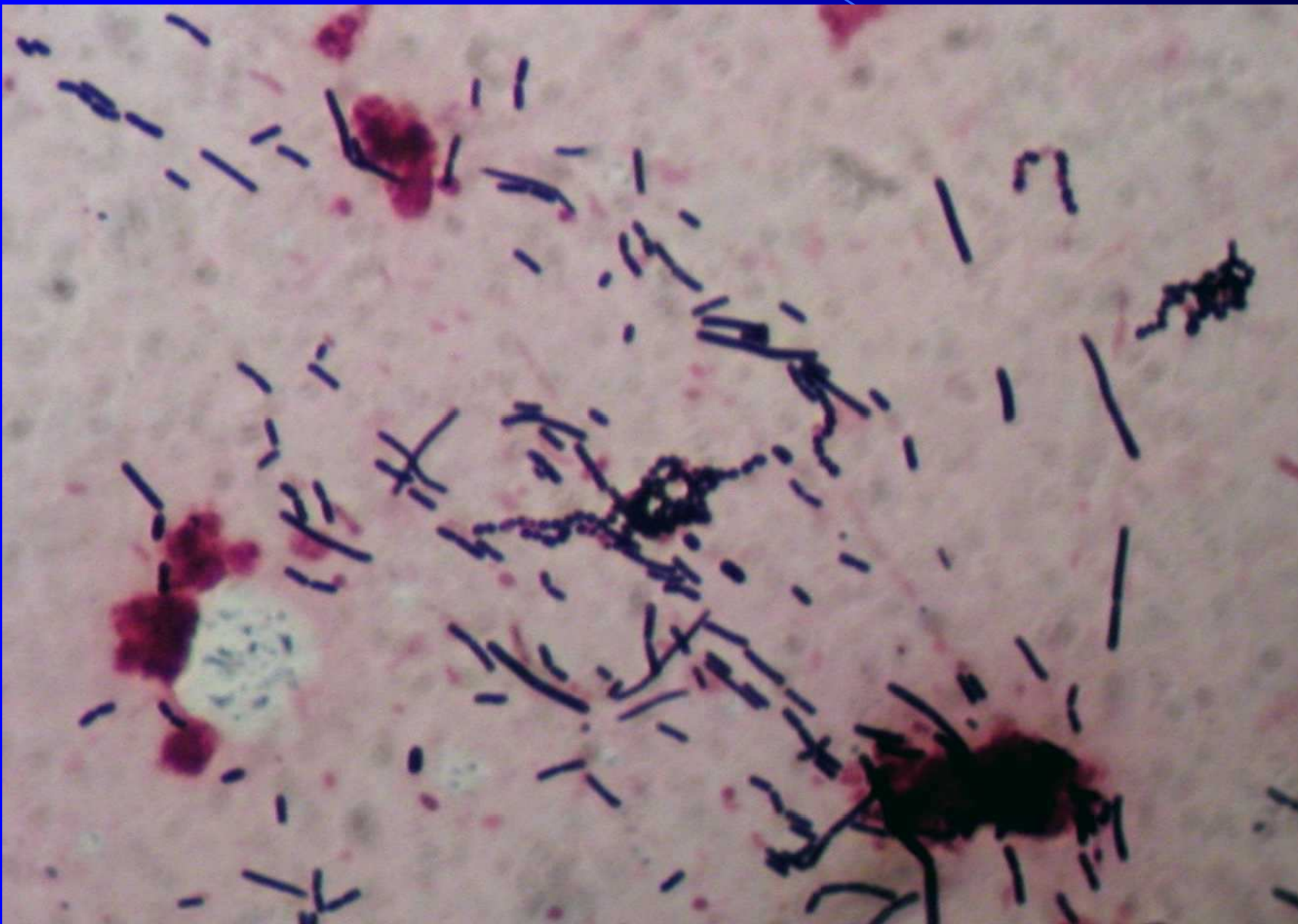


Foto: O. Z.