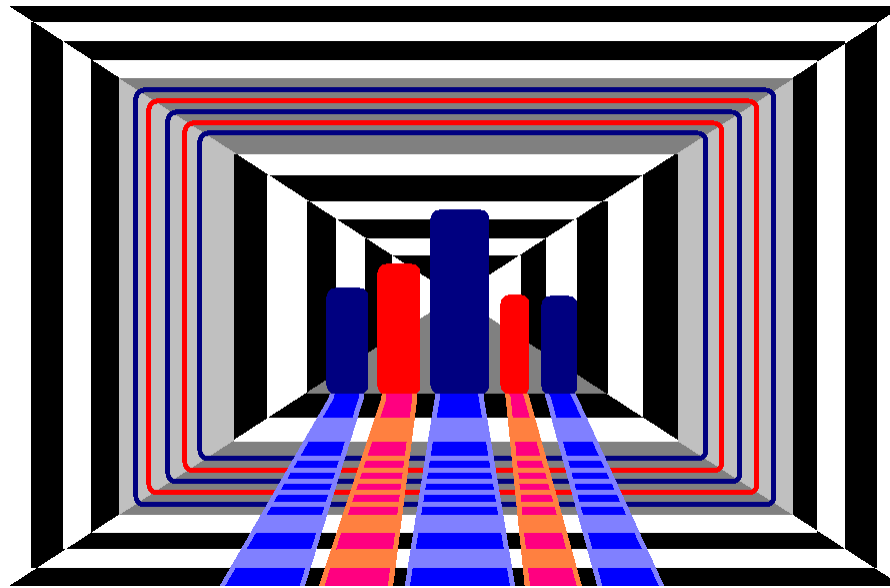


Přehled mikrobiologických vyšetřovacích metod



Mikrobiologie a imunologie

BSKM021p + c + BZMI021p + c *** Týden 2

Ondřej Zahradníček

Obsah prezentace

Úvod: Cíle a základní pojmy

1. Mikroskopie

2. Kultivace

3. Biochemická (a jiná) identifikace kmenů

4. Pokus na zvířeti

5. Průkaz nukleové kyseliny

6. Průkaz antigenu + průkaz protilátky

Závěr: Práce laboratoře v praxi

Úvod: Cíle
a základní
pojmy

Cíle mikrobiologické diagnostiky

1. **Odhalení původce nemoci (patogena)**
2. *Někdy: **zjištění citlivosti patogena** na léky proti němu, takzvané antimikrobiální látky (hlavně u bakterií a kvasinek, nedělá se u parazitů a vláknitých hub, u virů je to ve fázi výzkumu)*
3. *Někdy také: **určení faktorů virulence** (například bakteriálních toxinů – třeba u střevní anaerobní bakterie *Clostridium difficile* je nález toxinu významnější než samotný nález bakterie, která se v malých množstvích vyskytuje i ve střevě zdravých lidí)*

Co je to vzorek

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

- **kusový nebo tekutý materiál ve zkumavce** či jiné nádobce (krev, sérum, moč...)
- **stěr nebo výtěr na vatovém tamponu**, obvykle zanořeném do transportního média.
- jiný typ vzorku: otisk, nátěr na sklíčko apod.

Při diagnostice někdy pracujeme s celým vzorkem. Jindy je nutno nejdříve získat ze vzorku kmen nebo kmeny patogenních mikrobů, a pak pracujeme s těmito kmeny

Co je to kmen

Kmen je čistá kultura („výpěstek“) mikrobů, vzniklá (teoreticky) z jedné buňky. Všechny buňky patřící ke stejnému kmeni mají stejné vlastnosti (kdežto v rámci jednoho druhu můžeme mít různé kmeny, trochu se vlastnostmi lišící)


Kmen nám **nahrazuje jedince** tam, kde s jedincem nemůžeme pracovat (např. metabolismus jedné buňky není reálně možné testovat)

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

Objev Roberta Kocha, že bakterie lze takto pěstovat, měl zásadní význam v dějinách mikrobiologie.

V praxi (vyšetření sputa)

Vzorek sputa → práce se vzorkem (kultivace, mikroskopie, popř. další)



Kmen zlatého stafylokoka → práce s kmenem (bližší určení různými metodami, testování citlivosti na antibiotika)

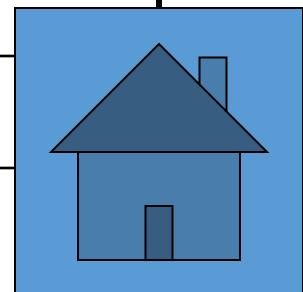
Další kmeny → podle vzhledu patří k běžné mikroflóře, a tak s nimi už dále nepracujeme

Přehled metod

- **Metody přímé:** Hledáme buď celého mikroba, nebo jeho část, anebo jeho produkt (například toxin)
 - **Přímý průkaz ve vzorku** – pracujeme s celým vzorkem
 - **Identifikace kmene** – určení kmene (izolátu) vypěstovaného na pevné půdě
- **Metody nepřímé:** Hledáme stopu, kterou mikrob zanechal v imunitním systému hostitele (většinou protilátka). Protilátka není součástí ani produktem mikroba – je produktem organismu hostitele (makroorganismu).
 - **Výhoda:** protilátka jsou v krvi bez ohledu na to, kde přesně v těle je/byl mikrob (→ nemusíme vědět, kde je)
 - **Nevýhoda (i když ne vždycky):** protilátka zůstávají v těle i poté, co nemoc už odezněla → pozitivita ≠ nemoc

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

Tlačítkem s domečkem se přesunete „domů“, tj. zpět na obsah.

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 (= hostitelského organismu)** – 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), **fázový kontrast** a další fyzikální varianty
 - **Fixované a barvené preparáty**, například:
 - Barvení dle Grama – nejdůležitější bakteriologické
 - Barvení dle Ziehl-Neelsena – např. u bacilů TBC
 - Barvení dle Giemsy – na některé prvoky
 - Fluorescenční barvení

U barvených preparátů se obvykle používá tzv. imersní systém (mezi objektiv a sklíčko se kápne imersní olej)

Gramovo barvení – princip 1

- **Grampozitivní bakterie** mají ve své stěně tlustší vrstvu peptidoglykanu mureinu.
 - Díky tomu se na ně pevněji váže krystalová nebo genciánová violeť...
 - ...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

Jiné bakterie než klasické G+ a G- bakterie:

Mykobakteria jsou acidorezistentní. Jejich stěna je hydrofobní. Nebarví se ani fialově, ani červeně; nebarví se vůbec. Někdy je **označujeme jako „Gramem se nebarvící bakterie:“**

Mykoplasmata nemají buněčnou stěnu vůbec, avšak jejich cytoplasma se barví slabě na červeno. Nicméně jsou mizerně viditelná (také protože jsou velmi malá) a Gramovo barvení se pro ně nepoužívá.

Spirochety mají gramnegativní typ buněčné stěny, ale jsou tak tenké, že jsou špatně vidět a Gramovo barvení se u nich zpravidla také nepoužívá.

Buňky hostitelského organismu se zpravidla barví na růžovo, jádra jsou o něco tmavší. Kvasinky se barví jako grampozitivní bakterie.

Mikroskopie vzorku

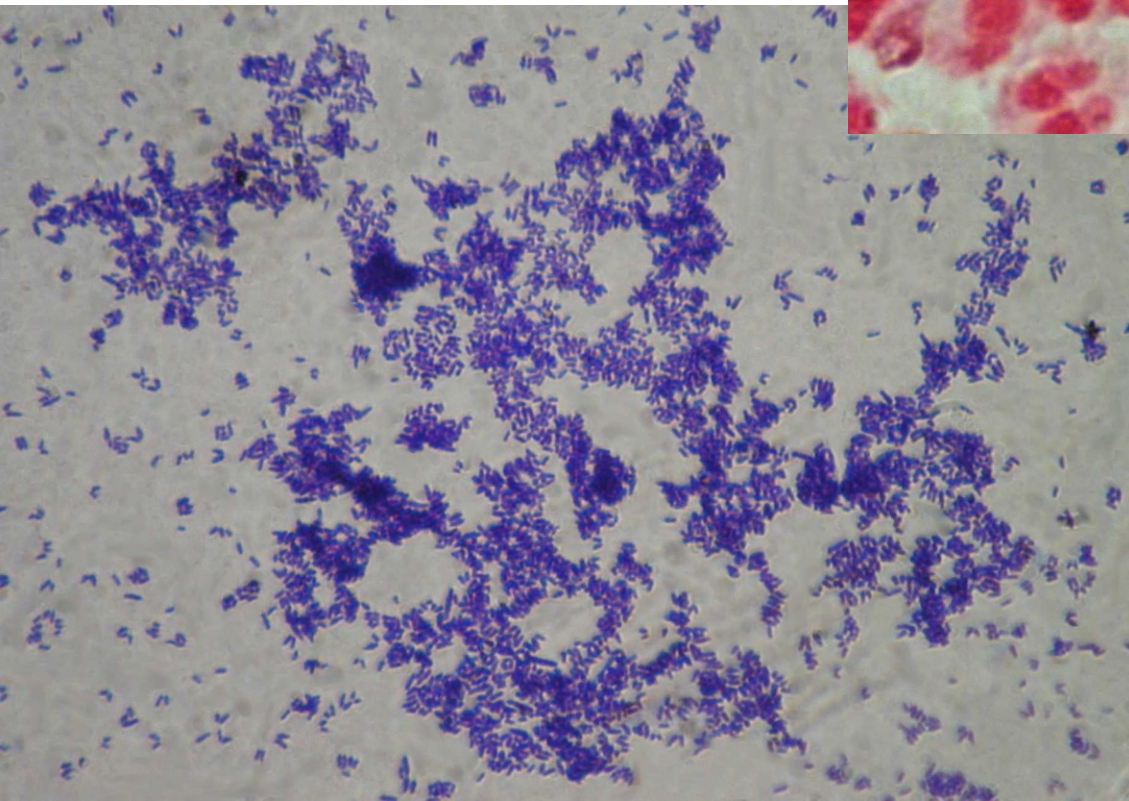
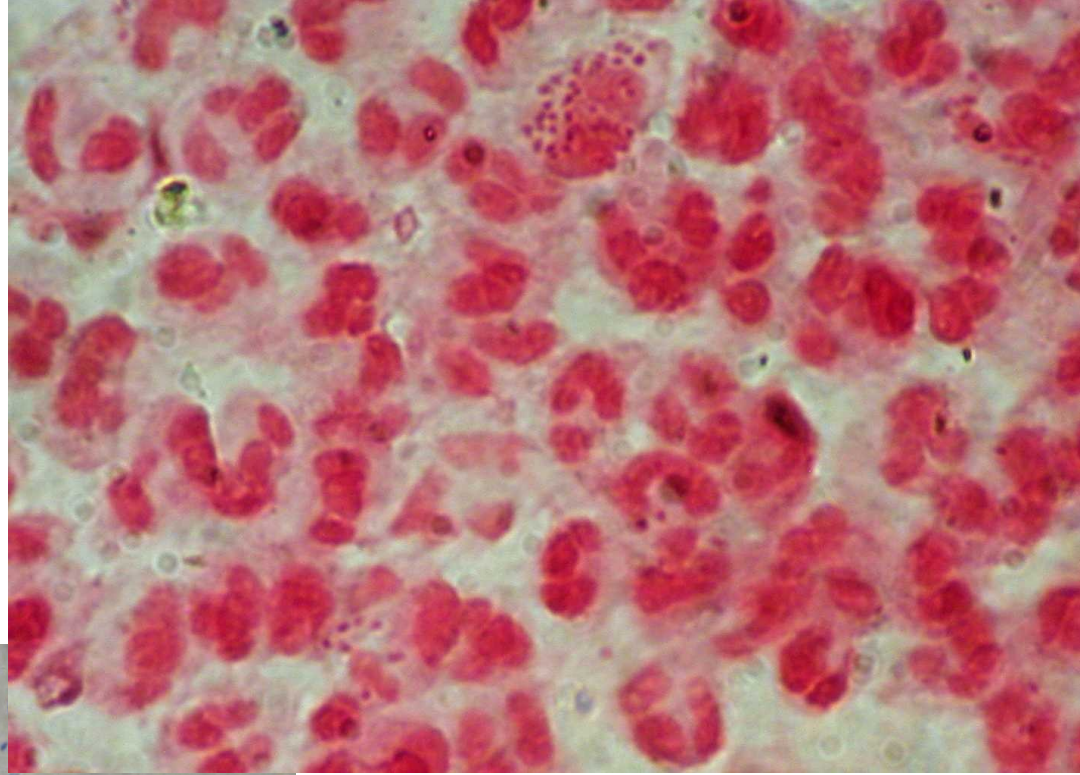
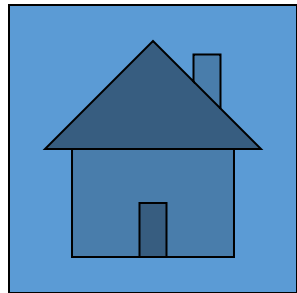


Foto: archiv MÚ

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 **příjemné vnější podmínky** – teplotu, vlhkost apod.
- Některé (teplota) jsou dány **nastavením kultivačního termostatu** (inkubátoru), jiné (procento solí) **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 CO₂.

Připravené kultivační
půdy se uchovávají
v chladničce

Foto: archiv MÚ



Smysl kultivace bakterií

- Proč vlastně v laboratoři bakterie pěstujeme?
Protože je potřebujeme při další diagnostice.

V zásadě jde o tyto věci:

- 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** i v případě, že výchozí byla směs mikrobů – pro tento účel musíme použít pevné půdy, a to ještě je vhodné použít například takzvané selektivní půdy, které některé nežádoucí mikroby potlačí

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 (v tekuté půdě se bakterie pomnožují rychleji než na pevné)
 - základem je zpravidla hovězí vývar a bílkovinný hydrolyzát
 - nejdůležitější je peptonová voda, bujón, VL-bujón, selenitový bujón (selektivně pomnožovací)

Tekuté půdy

Foto: archiv MÚ



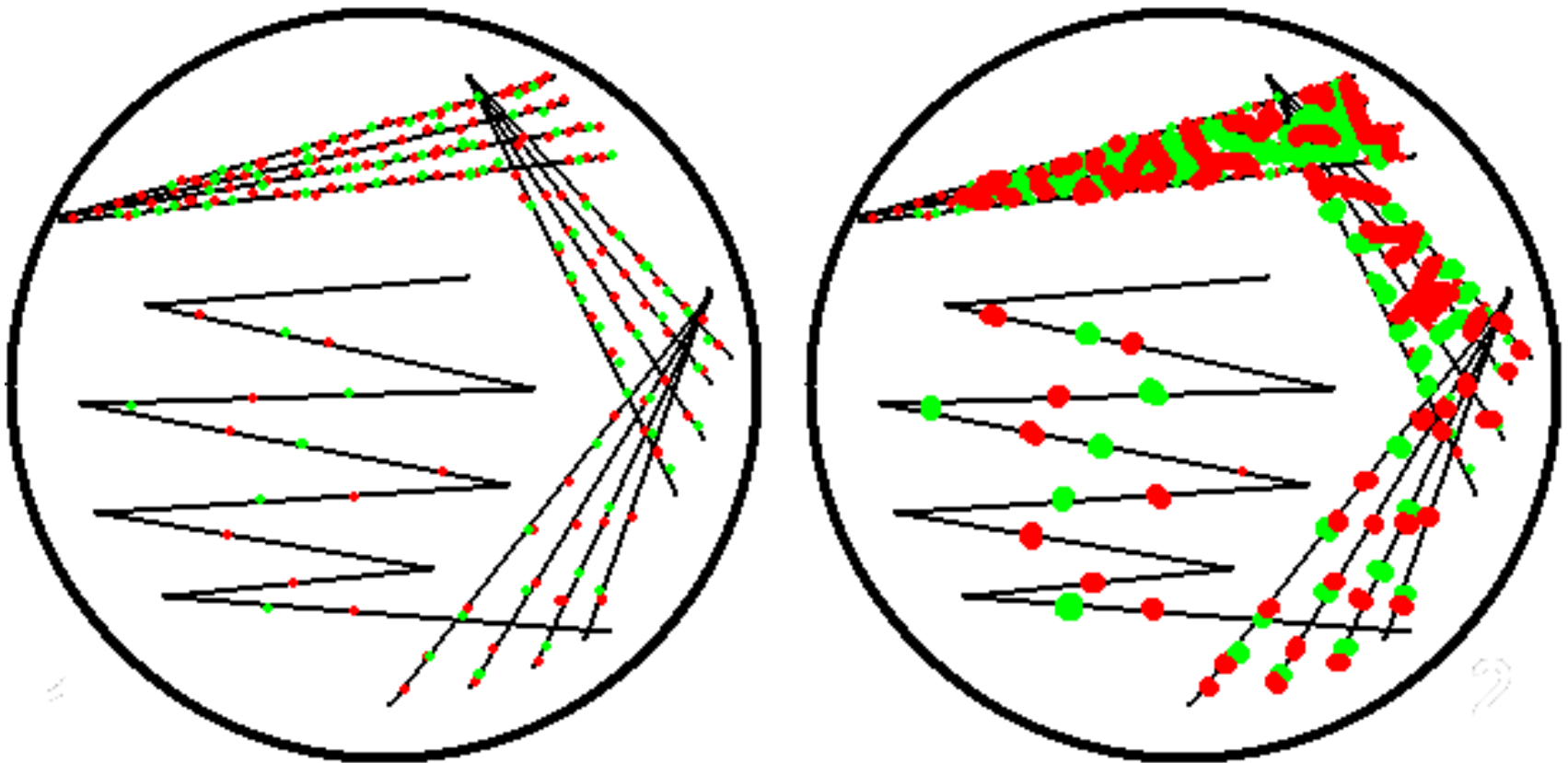
Pevné (agarové) půdy

- 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**.

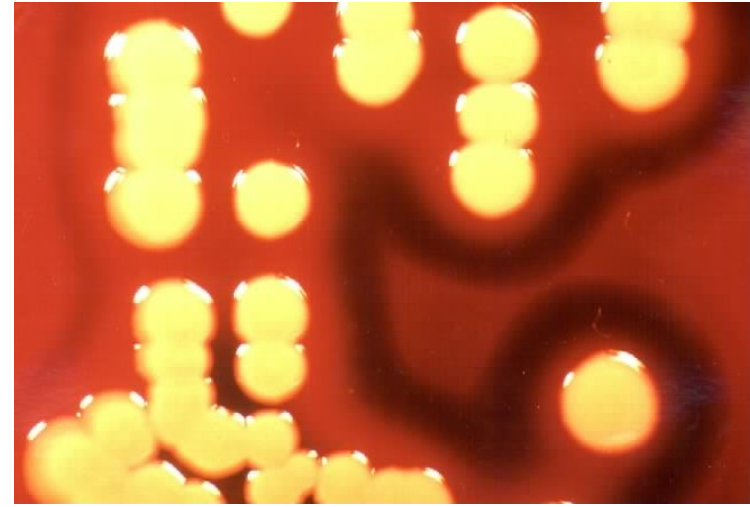
Foto: Mikrobiologický ústav



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



Pojem kolonie

- Kolonie je **útvár 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 „kolonii tvořících jednotek“ (KTJ, anglicky colony forming unit = CFU)
- Popis kolonií má významné místo v diagnostice

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 většina těchto vlastností hodnotit nedá.

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 baktérií (čokoládový agar, což je zahřátý krevní agar)
- **Speciální půdy** – mají své zvláštní určení (MH půda pro testy citlivosti kmene k antibiotikům)

Půdy diagnostické

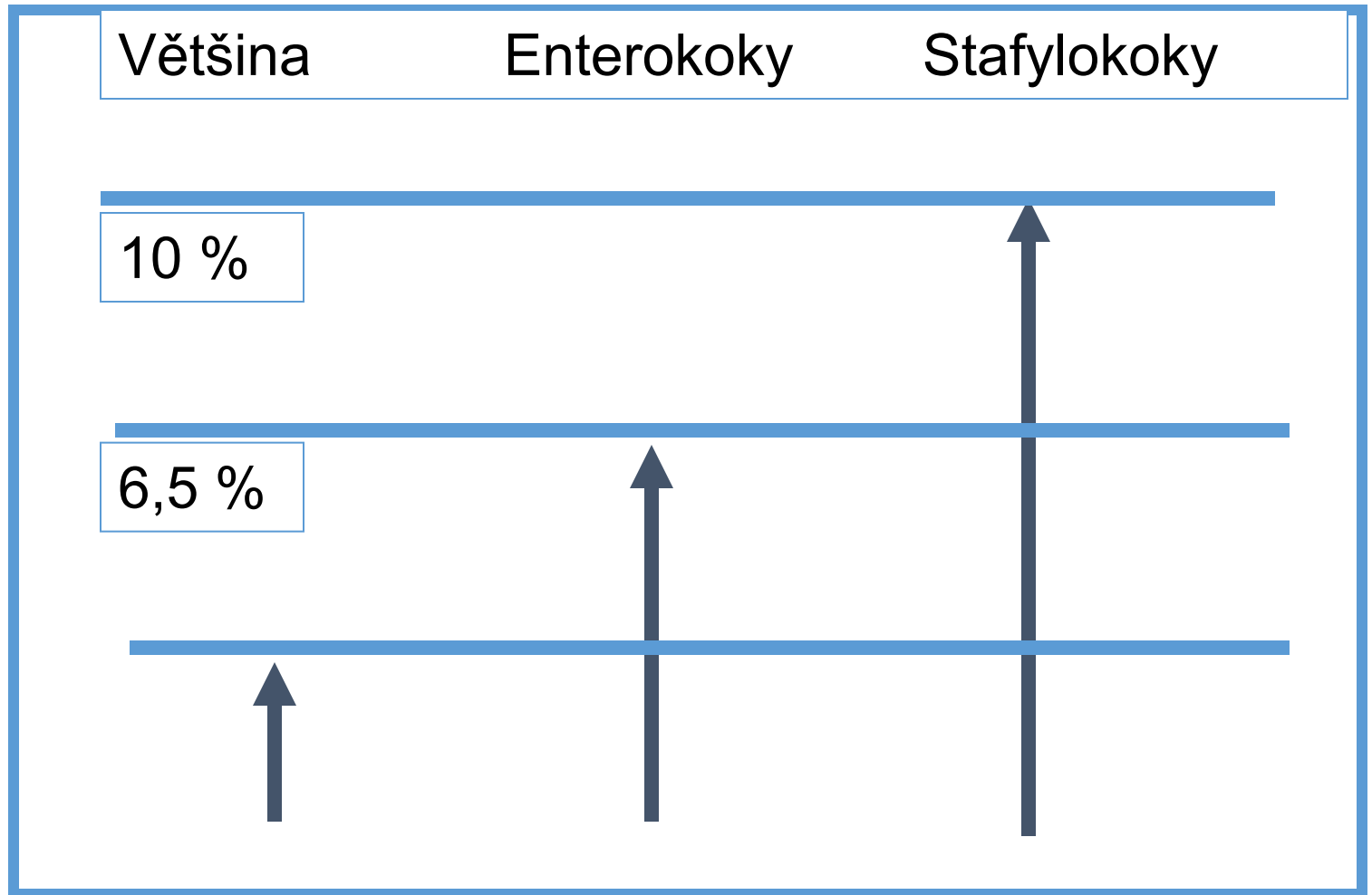
- Nepotlačují růst žádného mikroba
- Zato díky svému složení **rozlišují mikroby podle určité vlastnosti**
- Příkladem je **krevní agar** ke sledování hemolytických vlastností a **VL krevní agar** (podobný, ale na anaeroby)
- Zvláštním případem půdy chromogenní a fluorogenní



Pevné selektivní půdy

- Účelem je **selektovat (vydělít) ze směsi bakterií** pouze určitou skupinu nebo skupiny
- Příkladem je **agar pro stafylokoky s 10 % NaCl**. *(Oproti 0,9 % u běžného agaru. Je logické, že na této půdě rostou právě stafylokoky. Jsou to totiž kožní bakterie, zvyklé na život v kůži, občas i zpocené a slané.)*
- Někdy je selektivnosti dosaženo přidáním antibiotika nebo několika antibiotik. **Sabouraudův agar** je určen pro kvasinky, a proto se do něj zpravidla přidává směs antibiotik, aby na něm nerostly bakterie.

Selektivita hypersolného agaru



Příklad selektivně diagnostické půdy

– Endova půda

Na Endově půdě rostou jen některé gramnegativní tyčinky, G+ bakterie nerostou (selektivní vlastnost)



Endova půda umí také rozlišit bakterie podle toho, jestli dovedou štěpit laktózu, nebo ne (změna zbarvení půdy okolo kolonií – diagnostická vlastnost).

Půdy se používají i k testování citlivosti na antibiotika

- 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

V případě zájmu se více o jednotlivých bakteriologických půdách dozvíte v bonusu.

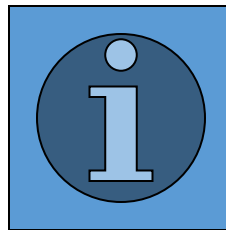


Foto: archiv MÚ

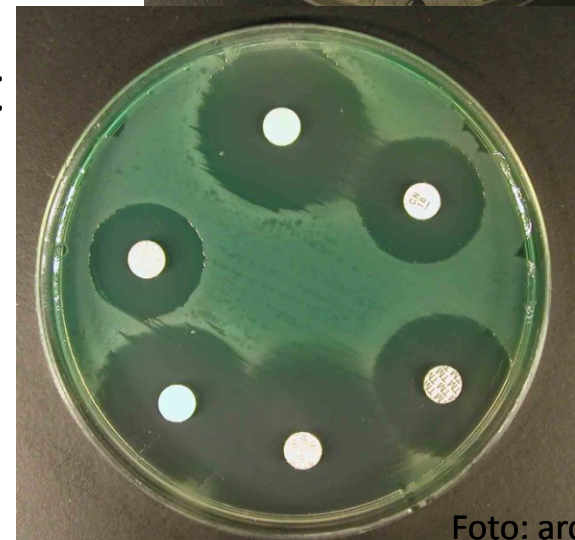
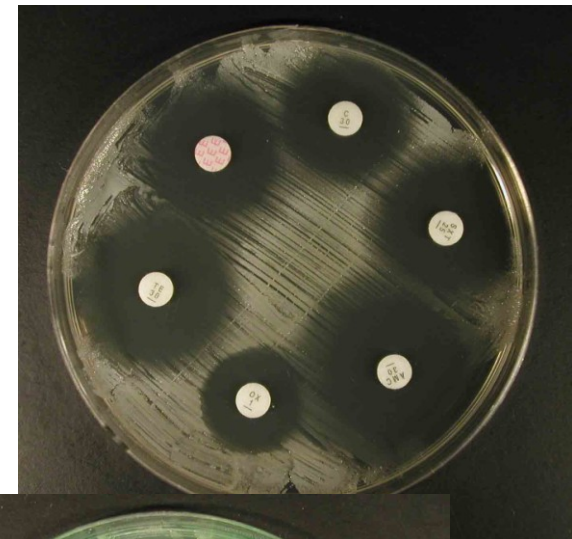
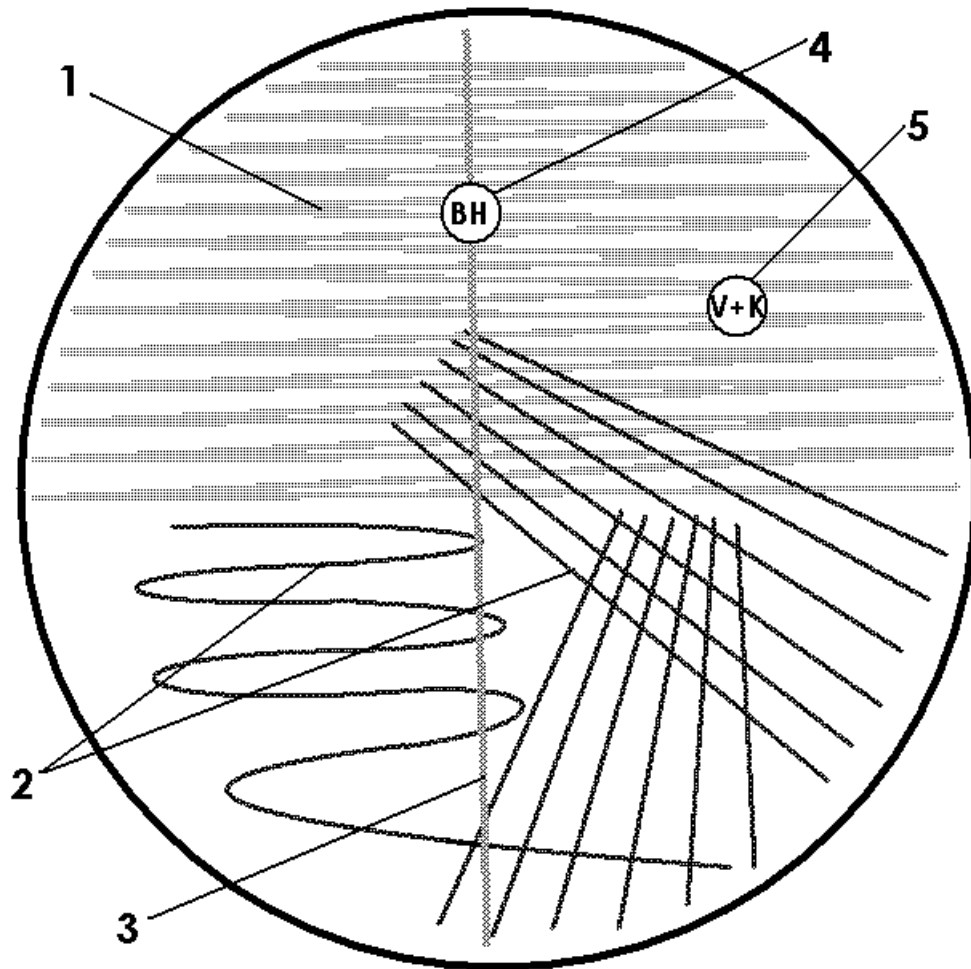


Foto: archiv MÚ

Postup očkování výtěru z krku



1 očkováno vatovým tamponem

2 očkováno kličkou

3 stafylokoková čára (kolem ní rostou hemofily, bez ní by na půdě vůbec nerostly)

4 disk BH (obsahuje bacitracin, který neumožní růst ústních streptokoků a neisserií, takže vyniknou hemofily)

5 disk VK (obsahuje vankomycin a kolistin, opět neumožní růst ústních bakterií, rostou meningokoky a kvasinky)

Na celé naočkované ploše pátráme po streptokokích (bezbarvé) a po stafylokokích (spíše bílé či zlatavé)

Výtěr z krku – reálný výsledek



Foto: archiv MÚ

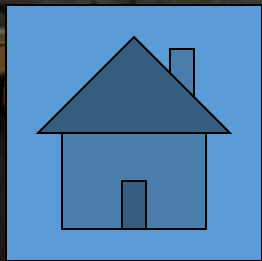
Pěstování anaerobních bakterií

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

- Obecný princip je téměř vždy stejný: Bakterii předložíme určitý **substrát** a zkusíme, zda ho bakterie pomocí svého enzymu změní v **produkt(y)**. Produkt(y) se musí lišit od substrátu **skupenstvím** či **barvou**. Neliší-li se, použijeme **indikátor**
- **Existuje přitom velké množství způsobů technického provedení tohoto typu testů.**
- *I mezi savci jsou rozdíly: člověk neumí tvořit vitamin C, někteří savci ano. Nedisíme se tedy, že existuje tolik rozdílů mezi bakteriemi.*

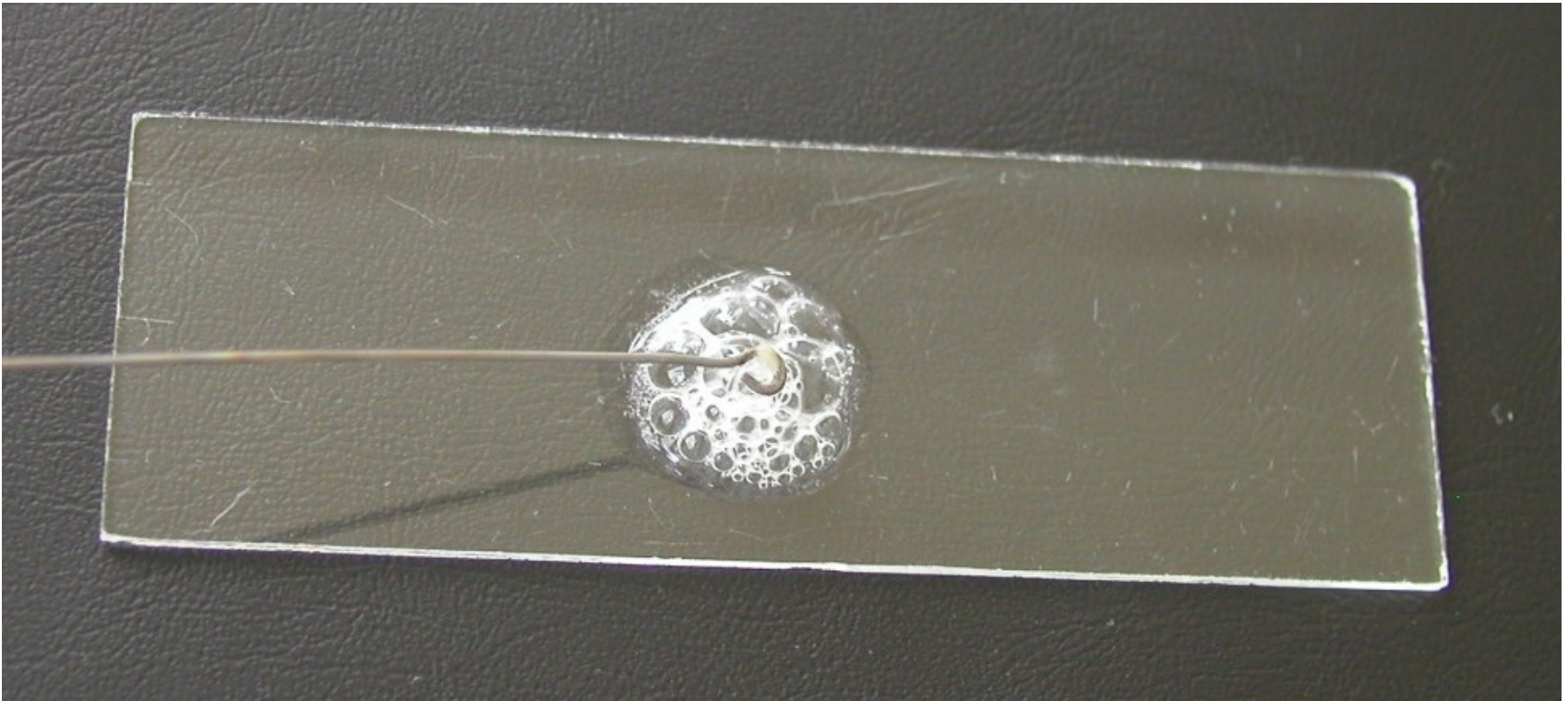
Možnosti praktického provedení

- **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. Švejcárova plotna)

Katalázový test

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

Foto: Mikrobiologický ústav



Příklady dalších testů: oxidázový test (diagnostický proužek)

Foto: Mikrobiologický ústav (Mgr. Petra Šišková)



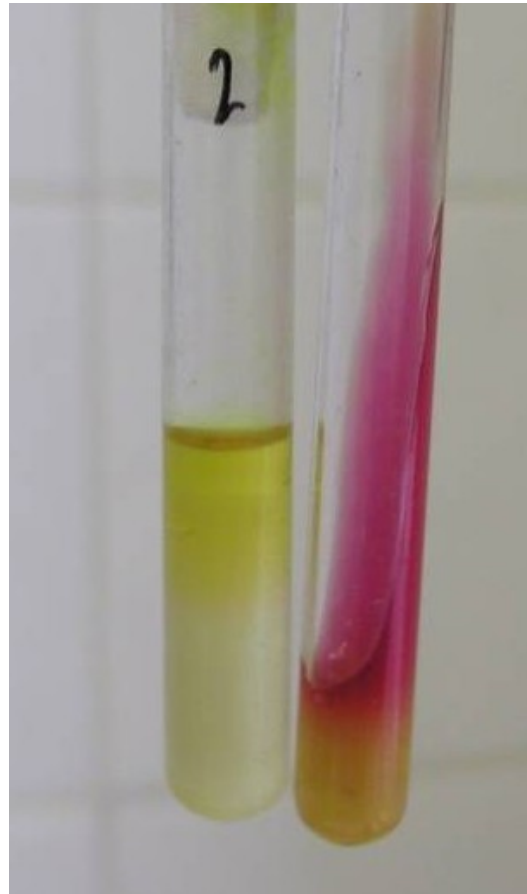
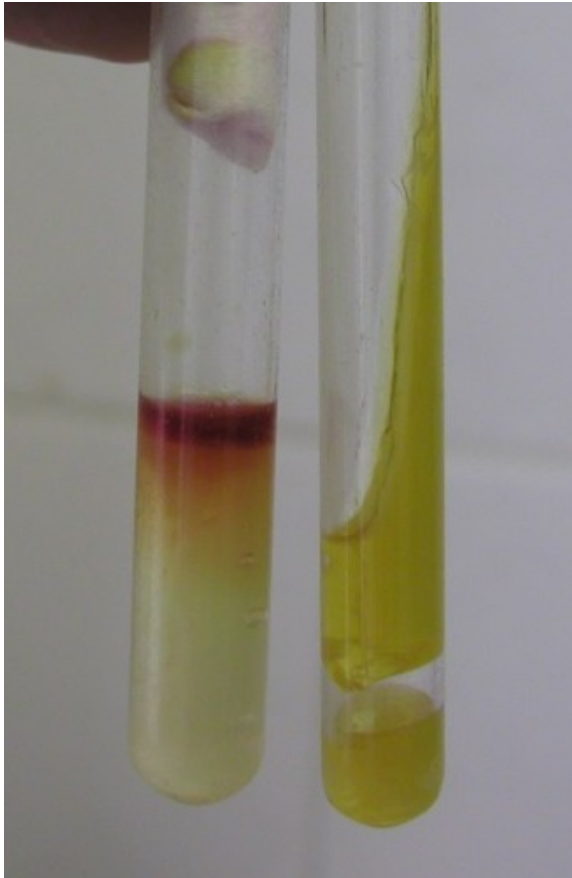
Provedení testu v praxi



Foto: archiv MÚ

...a další testy (zde tzv. MIU a Hajnova půda u dvou různých bakterií

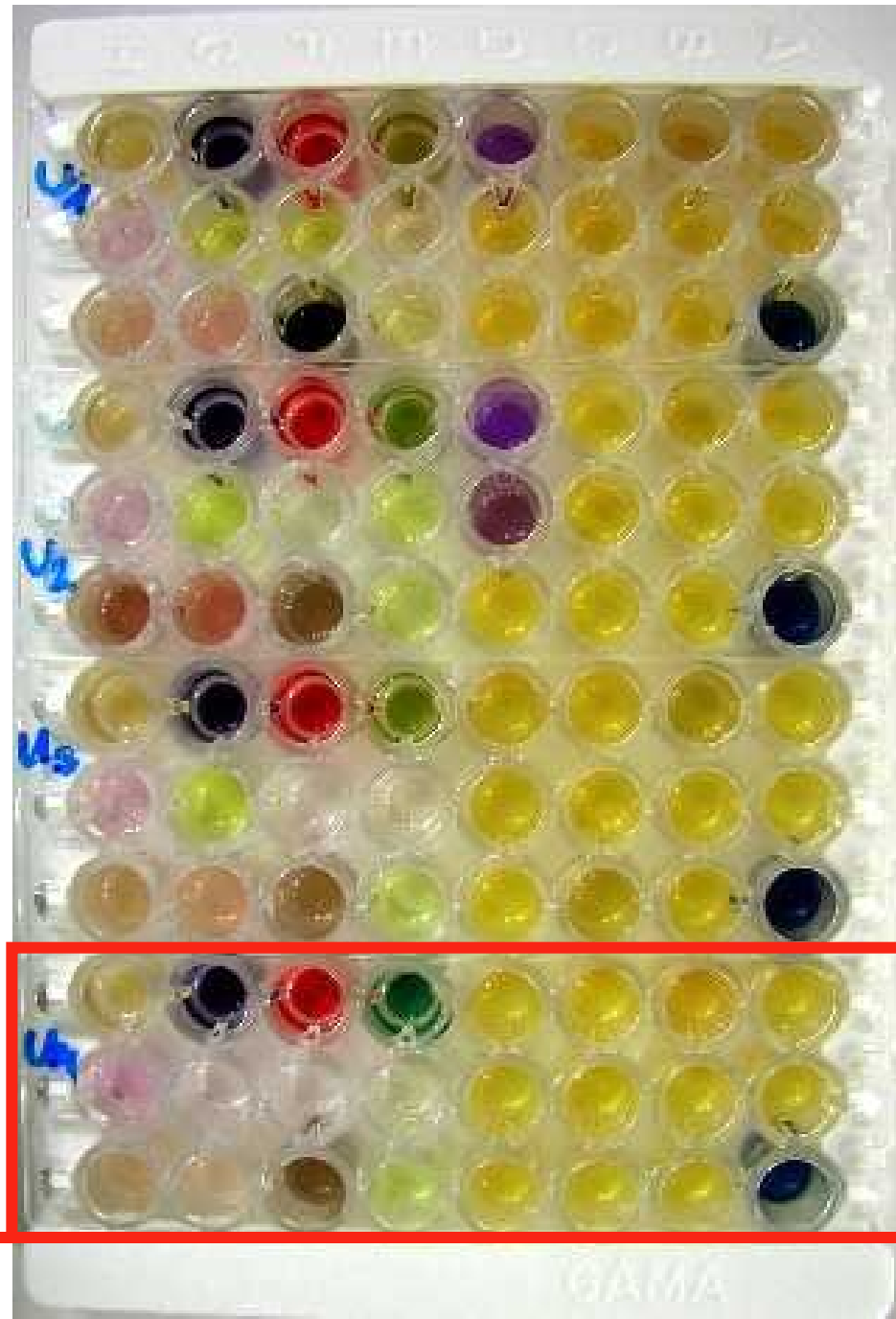
Foto: Mikrobiologický ústav



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 usušený, 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

BBL (Becton Dickinson), Spojené království)



RapID (Remel, Spojené státy)

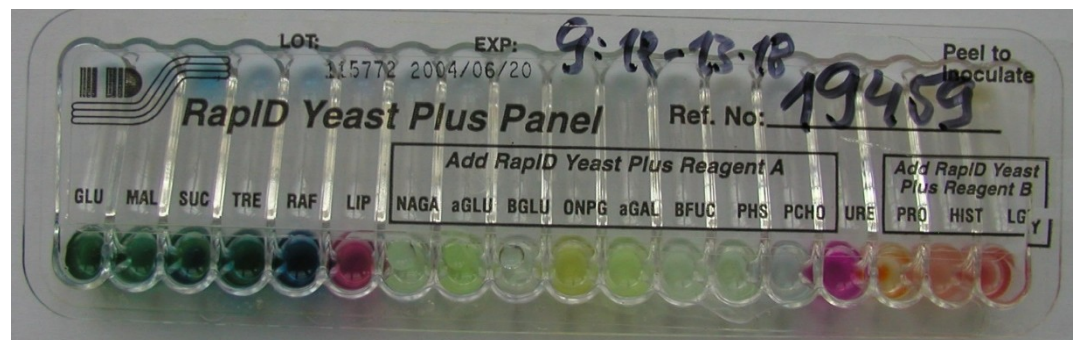
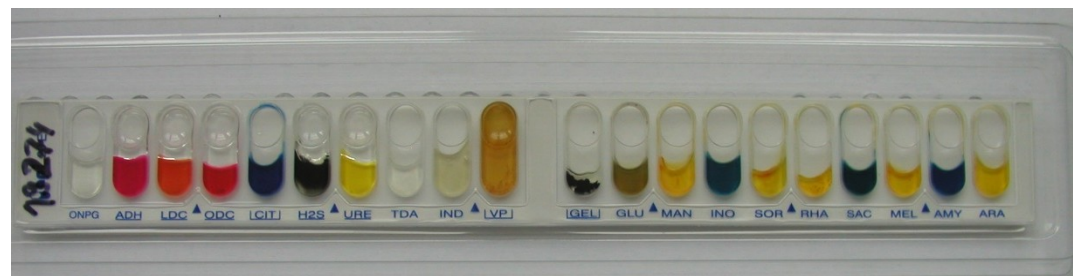


Foto: vše O. Z.

API (BioMérieux, Francie)



Další identifikační metody

- Ne všechny identifikační metody jsou založeny na principu substrát → produkt.
- K identifikaci kmene lze využít například typickou **citlivost na antibiotika, ovlivnění růstu** jedné bakterie druhou, růst při určitých **teplotách**, testování **pohybu** a podobně.
- V poslední době se prosazují nové metody, například **hmotová spektrometrie** typu MALDI-TOF, kde se hodnotí ionty vzniklé z proteinů typických pro jednotlivé druhy bakterií či kvasinek.
- Identifikace **antigenní analýzou kmene** bude probrána dále. Většinou se používá k **vnitrodruhové identifikaci** (např. odlišení tzv. EPEC od běžných *E. coli*)

Například zde se zkoumají i vzájemné interakce (ovlivnění způsobu růstu) dvou různých bakteriálních kmenů

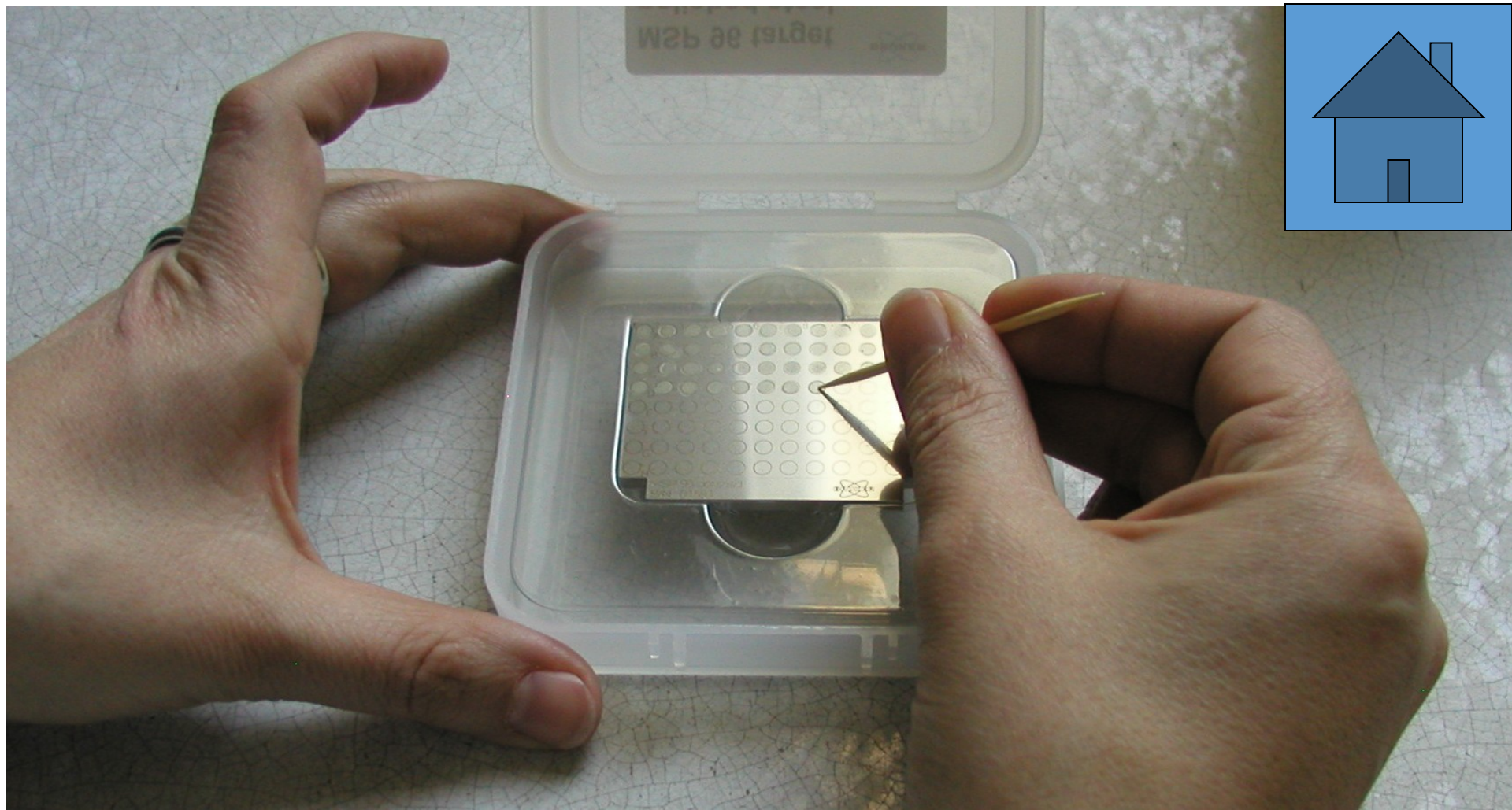


Foto: archiv MÚ

MALDI -TOF

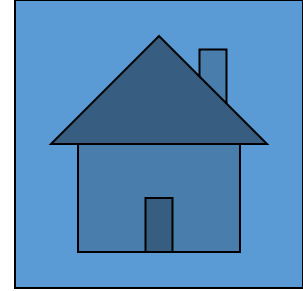


Příprava kmene pro MALDI-TOF



4. Pokus na zvířeti

Pokus na zvířeti



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



Obrázek MUDr. Petra
Ondrovčíka,
Mikrobiologický ústav

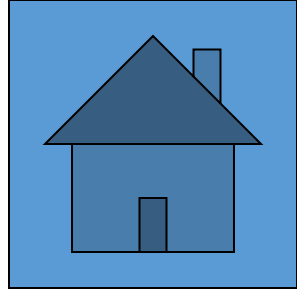
Myš vzteklá

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
antigenu +
průkaz
protilátky

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

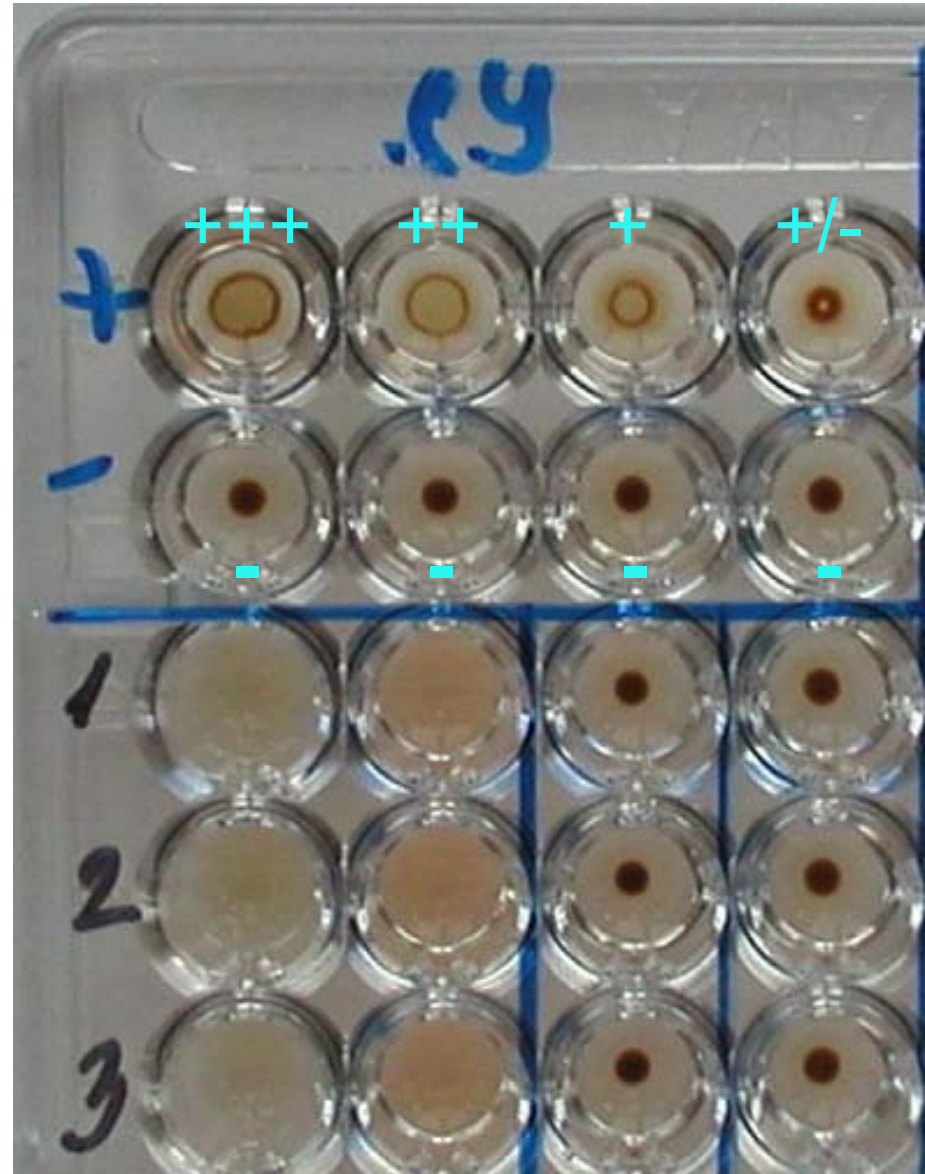
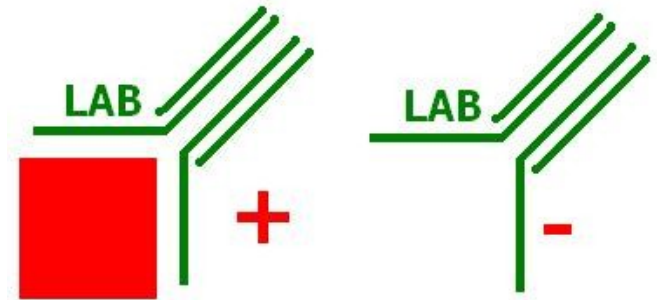


Foto: Mikrobiologický ústav

Protilátku antigenem, nebo antigen protilátkou?

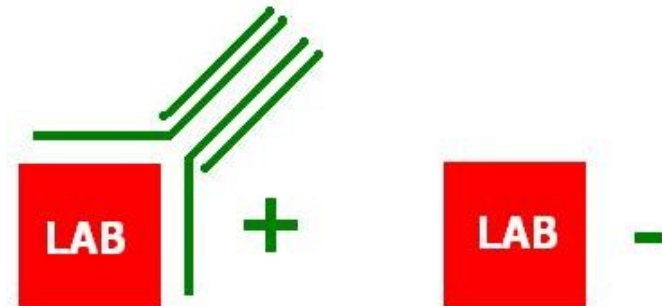
Průkaz antigenu: laboratorní protilátky (zvířecího původu) + vzorek pacienta nebo kmen mikroba.

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



Ukázka serologické reakce ELISA

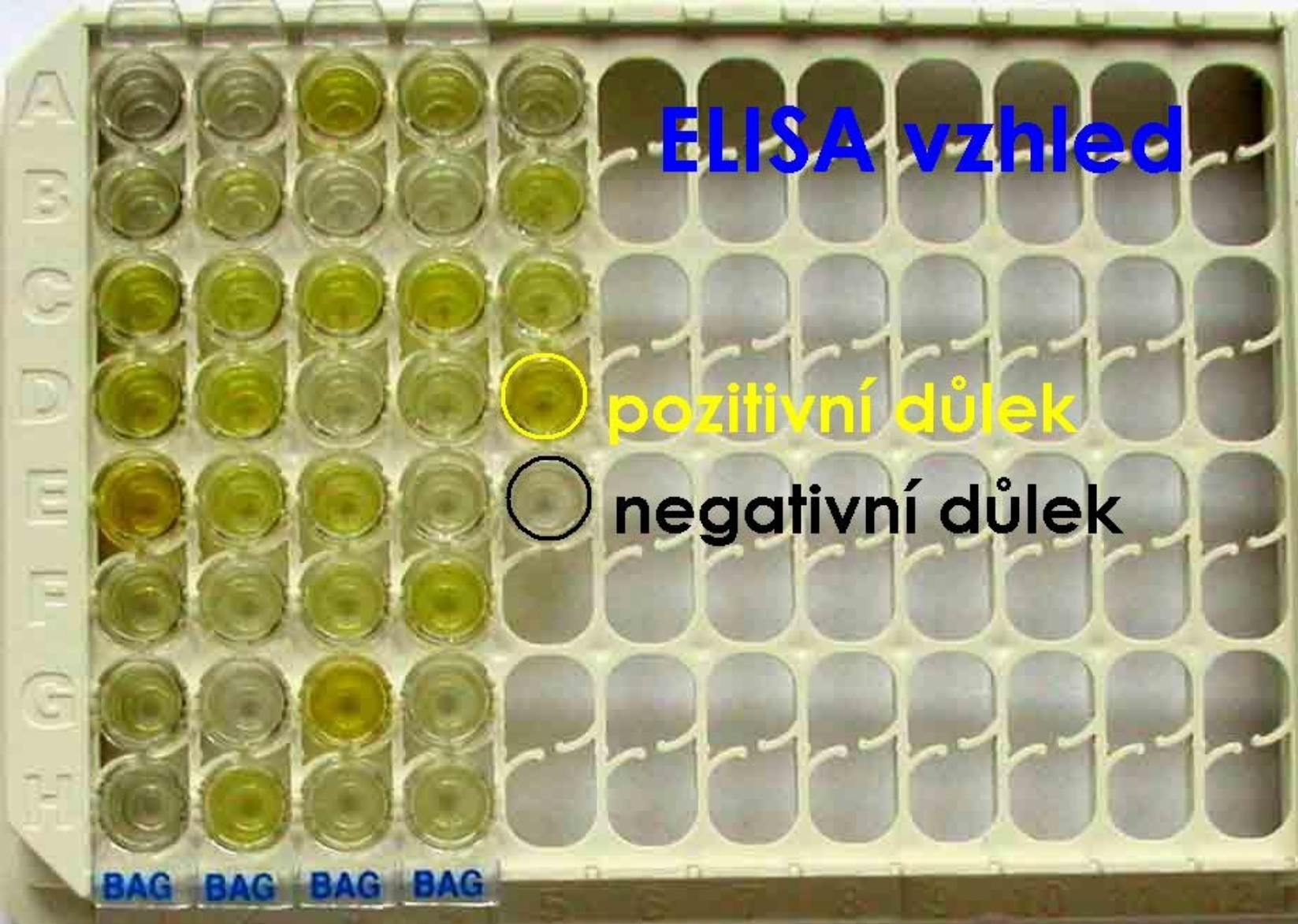


Foto: archiv MÚ

Nespecifické antigeny a heterofilní protilátky

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

Přehled sérologických metod

- **Precipitace (nejstarší a nejjednodušší)**
- **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)

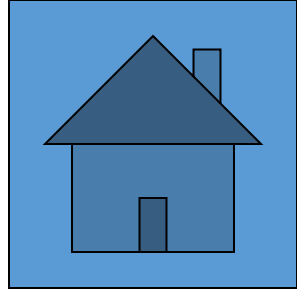
Příklady interpretace serologických reakcí – 1

Těhotná pacientka má IgG protilátky proti toxoplasmóze, IgM je negativní

Znamená to, že toxoplasmózu prodělala (možná i bezpříznakově) a teď už není nemocná, ale je chráněná. Je na tom tedy lépe, než kdyby protilátky neměla

Pacient má protilátky proti klíšťové encefalitidě v prvním vzorku 1 : 10, ve druhém 1 : 160

Pravděpodobně jeho potíže opravdu způsobil daný virus. Vzestup titru je 16x, to je významné (> 4x)



Příklady interpretace serologických reakcí – 2

Ivana má protilátky proti chřipce, v prvním vzorku 1 : 10, ve druhém 1 : 20

Nejspíš je to jen náhoda, Ivana asi chřipku kdysi prodělala, ale nepůjde o akutní stav. Možné je odebrat ještě třetí vzorek

Pacient nemá vůbec žádné protilátky proti borelióze, ačkoli potíže odpovídají této nemoci

Pacient asi má boreliózu, ale ještě se nestihly vytvořit protilátky. Pokud jsou příznaky typické, je třeba ho léčit, a vzorek séra odebrat znovu.

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!!!

KLINICKÉ
PRACOVISŤE

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**)

Konec prezentace

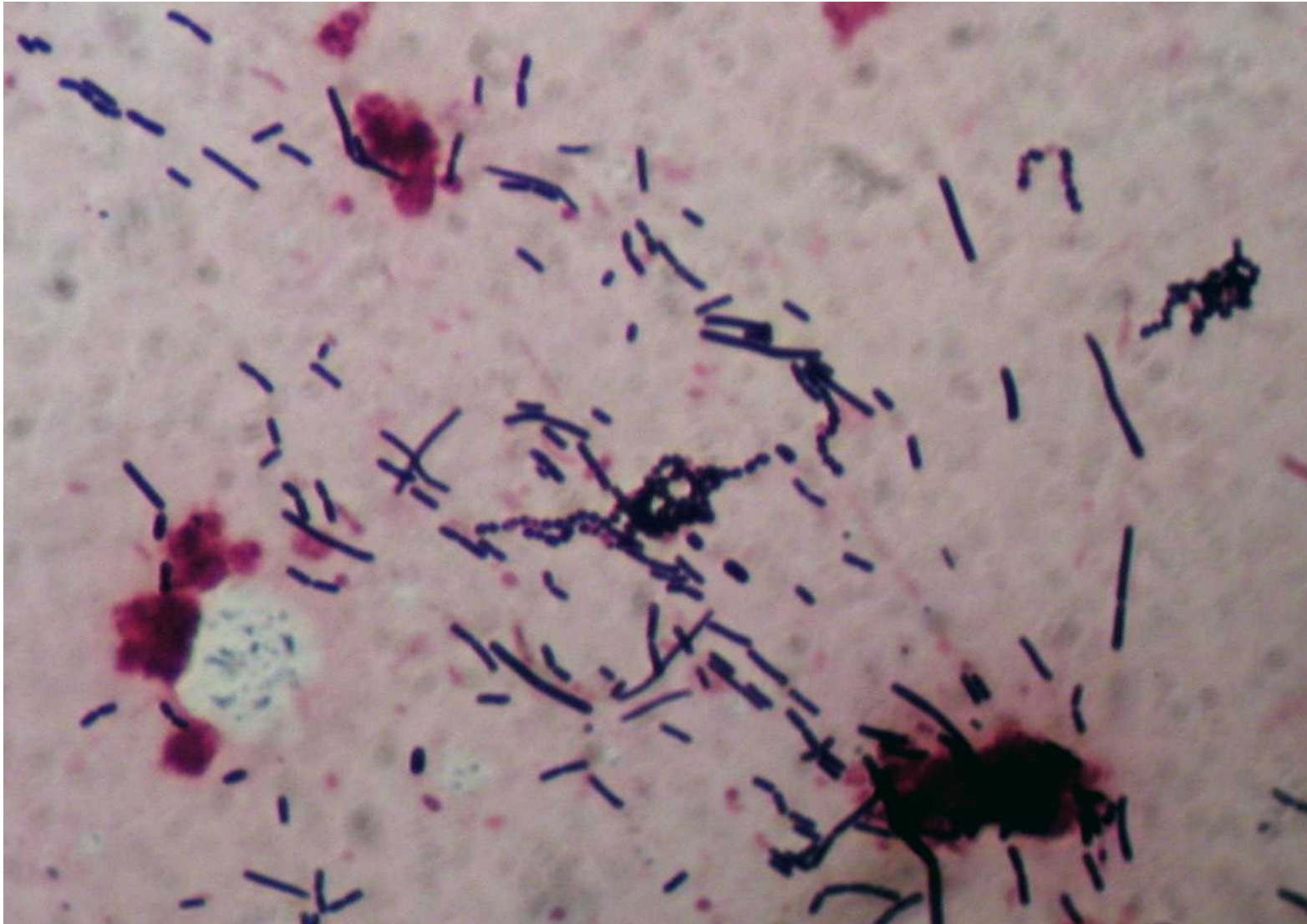
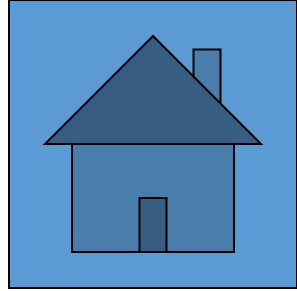
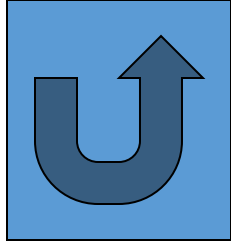


Foto: O. Z.

Přehled půd – první část

Název	Druh	Barva	Typ	Pro
bujon	tekuté půdy	nažloutlá	pomno- žovací	aeroby
VL-bujon				anaeroby
selenitový bujon			selektivně pomnož.	salmonely
Sabourau- dův agar	pevné půdy ve zkumavce	skoro bezbarvá	selektivní*	houby
Löwentein- Jensen		bílá až velmi světle zelená	obohacená	mykobakteria (pův. TBC)
krevní agar	pevné půdy v misce	červená	obohacená diagnostická	většinu bakterií
Endova půda		růžová	selektivně diagnostická	především enterobakterie

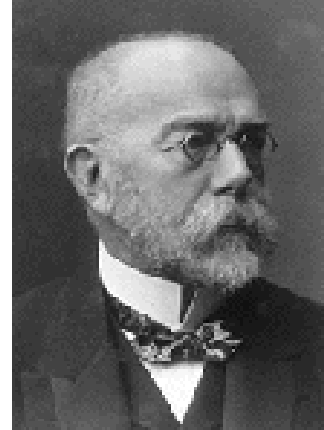
*pouze jsou-li přidána antibiotika



Přehled půd – druhá část

Název	Druh	Barva	Typ	Pro
MH	pevné půdy na Petriho miskách	skoro bezbarvá	speciální	atb citlivost
NaCl		červená -hnědá	selektivní	stafylokoky
VL-agar		červená	jako KA	anaeroby
XLD (a blízký MAL)		oranžová	selektivně diagnostická	salmonely
čokoládový agar		hnědá	obohacená	hemofily, neisserie
Levinthalův agar		nažloutlá	obohacená	hemofily
Slanetz- Bartley		světloune růžová	selektivně diagnostická	enterokoky

Robert Koch



Německý mikrobiolog Robert Koch se narodil 11. prosince 1843 v Clausthal-Zellerfeldu jako jedno z 13 dětí důlního technika. Už v 5 letech ohromil rodiče, když jim oznámil, že se podle novin naučil číst. V roce 1862 odešel Koch na univerzitu do Göttingenu studovat medicínu. Po obdržení doktorátu v roce 1866 odešel na šestiměsíční studium chemie do Berlína. Po období všeobecné praxe se jako dobrovolník přihlásil do služby v ve francouzsko-pruské válce v roce 1870 a od roku 1872 do 1880 ve wollsteinském okresu. Zde uskutečnil své epochální výzkumy, které ho vynesly do čela vědeckých pracovníků. Zabýval se zejména bacilem antraxu, tuberkulózními bacily a choleroým vibriem. Koch byl během života vyznamenám mnoha medailemi a odměněn mnoha cenami, získal také několik čestných doktorátů a stal se čestným občanem několika měst. V roce 1905 obdržel Nobelovu cenu za fyziologii a medicínu. Robert Koch zemřel 27. května 1910 v Baden-Badenu
<http://www.quido.cz/osobnosti/koch.htm>

