

Lékařská mikrobiologie pro ZDRL



Týden 7:

A. Pokus na zvířeti

B. Genetické metody v mikrobiologii

Ondřej Zahradníček 777 031 969

zahradnicek@fnusa.cz ICQ 242-234-100



Pro zopakování

- Cílem mikrobiologických metod je zpravidla detekce patogena, popř. určení jeho citlivosti na antimikrobiální látky.
- Patogena určujeme
 - Přímými metodami
 - detekce celého mikroba (jako morfologické či fyziologické jednotky)
 - detekce jeho části (antigenu, DNA)
 - detekce jeho produktu (například toxinu)
 - Nepřímými metodami: detekce protilátek



Přehled metod – opakování

- **Přímé metody** (*práce se vzorkem či kmenem*)
 - Mikroskopie (nativní preparát, barvení...)
 - Kultivace (na tekutých i pevných půdách)
 - Biochemické a podobné identifikační metody
 - Průkaz antigenu (pomocí protilátky)
 - Pokus na zvířeti (izolace, průkaz toxicity)
 - Průkaz nukleové kyseliny
- **Nepřímé metody**
 - Průkaz protilátek (pomocí antigenu)

A. Pokus na zvířeti

- Pokus na zvířeti je jednou z nejstarších metod v mikrobiologii. Byl neocenitelnou pomůckách v dobách, kdy ještě nebylo k dispozici tolik umělých kultivačních médií, o dalších metodách ani nemluvě. Dodnes se používá tam, kde ještě nenašel náhradu





Historický význam pokusu na zvířeti

- V dobách Kocha a Pasteura se zjišťovalo, **který mikrob vlastně souvisí s kterou nemocí**. V této době sehrála pokusná zvířata velice důležitou a nenahraditelnou roli
- Proto také pokus na zvířeti („pokusném hostiteli“) má své významné místo v rámci tak zvaných **Kochových postulátů**.



Kochovy postuláty

- Určitý mikrob je etiologickým agens, pokud
 1. je prokázán ve všech případech choroby a jeho rozložení v těle odpovídá pozorovaným poškozením;
 2. je z hostitele vypěstován a v čisté kultuře udržován po několik generací;
 3. **takto vypěstovaným mikrobem lze napodobit onemocnění na jiném hostiteli;**
 4. **je opět izolován z pokusně infikovaného hostitele.**

Zvíře jako měřítko virulence

- Porovnáváme-li virulenci různých druhů mikroba nebo různých kmenů stejného druhu, potřebujeme tuto **virulenci nějak vyčíslit**.
- K tomuto účelu lze použít například **LD₅₀**. Je to ukazatel virulence kmene: schopnosti usmrtit
- **LD₅₀ = 50% letální dávka**. Je to množství mikroba, které usmrtí přesně 1/2 pokusných zvířat

Poznámka:

Napsáno „50 %“ se čte „padesát procent“

Napsáno „50%“ se čte „padesátiprocentní“



Použití zvířete

- Zvíře tedy můžeme použít
 - jako kultivační médium, zejména tam, kde nelze použít kultivační médium neobsahující živé buňky (viry, rickettsie, chlamydie)
 - jako průkaz patogenního působení určitého kmene mikroba
 - jako průkaz toxicity mikrobiálního toxinu



Etický pohled na pokus na zvířeti

- **Názory na pokusy na zvířatech se různí.**
Mnoho lidí by je chtělo úplně zakázat, většinou však nedovedou říci, jak je nahradit
- Na druhou stranu je **řada případů, kdy pokusy jsou prováděny zbytečně**, to však není ani tak případ zdravotnictví, jako především kosmetického průmyslu
- Legislativa **pokusy na zvířatech povoluje**, vyžaduje však splnění **přísných pravidel**



Etické podmínky pokusu na zvířeti

- Každý chov pokusných zvířat podléhá schválení etické komise. Pro každý typ pokusu (ať už v rámci diagnostiky, nebo výzkumu) musí být schválen **projekt pokusu**.
- V každém případě zvířata musí být chována za **vhodných podmínek** (teplota, vlhkost, kvalita vody, potravy, prostorové podmínky apod.)
- Velmi přísné jsou požadavky na **provedení pokusu** a samozřejmě i **způsob usmrcení**

Vědecké podmínky pokusu na zvířeti

- Má-li být pokus na zvířeti eticky alespoň do jisté míry ospravedlnitelný, **nesmí být zbytečný**, musí mít tedy nějakou **vypovídací hodnotu** o daném případě.
- Snažíme se tedy vždy nalézt u zvířete **typické příznaky dané choroby**. Pokud to lze, prokázujeme také, že zvíře ne onemocní, pokud ho ochráníme specifickým způsobem, například **podáním určité protilátky**.
- Každý pokus na zvířeti musí být pečlivě **doložen a zdokumentován**.

Myš



Velice důležité pokusné zvíře, používané v různých odvětvích mikrobiologie. Ve virologii se často používají sající myšata, na kterých se pěstují viry. Viry totiž nejsme schopni pěstovat na nebuněčných médiích. Myši se používají i v bakteriologii, například při průkazu tetanového toxinu či botulotoxinu je pokus na myši stále metodou volby a není reálně nahraditelný.

Králík

Králík se také používá v řadě testů, zejména při diagnostice syfilis. Zde se používá takzvaný RIT – rabbit infectivity test, test infekčnosti pro králíka. Dříve se používal ještě tzv. Nelsonův test, kde se používal laboratorní kmen původce syfilis pěstovaný na králičích varlatech



Morče

Také morče se v mikrobiologii
uplatňuje poměrně často.
Nejčastěji se to týká
diagnostiky tuberkulózy



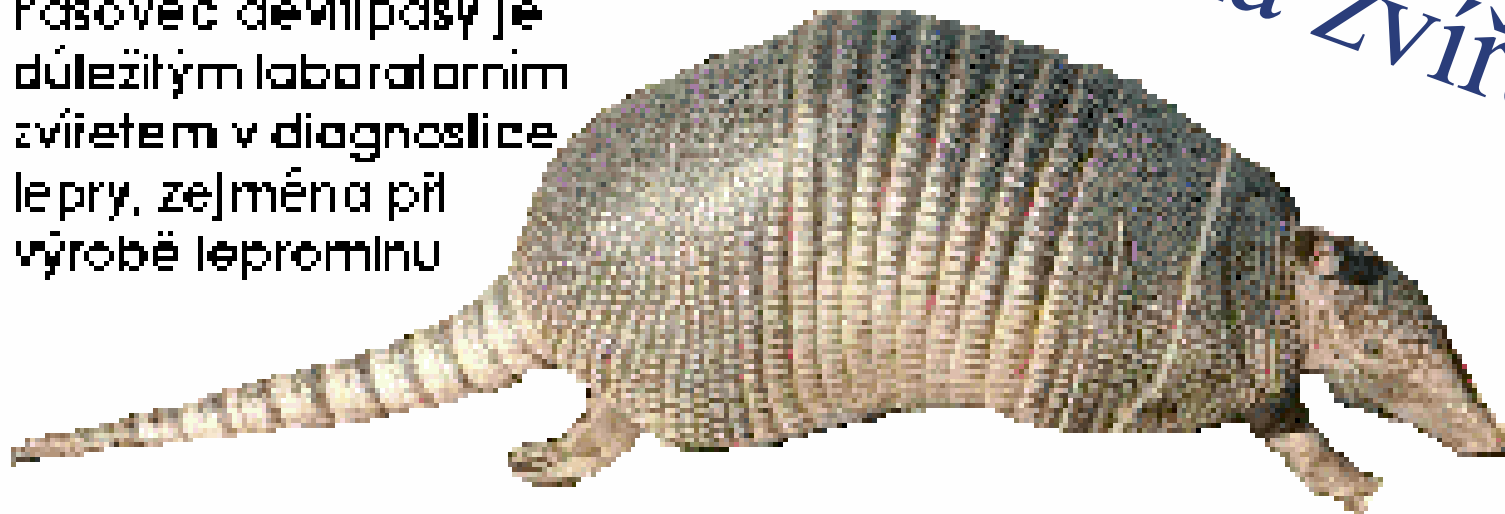
Krysa

V praxi používána poměrně málo, spíše pro experimentální účely než pro praktickou diagnostiku



- V určitých případech je nutno použít **zvláštní zvířata**, protože jiná nelze použít. Tak například pro diagnostiku lepry se v určitých případech používá **pásovec** (na obrázku)
- Mnohá zvířata se také používají jako **zdroj séra** pro sérologické reakce. Zde lze použít např. koňské či kravské sérum.

Pásovec devítipásý je důležitým laboratorním zvířetem v diagnostice lepry, zejména při výrobě leprominu



Jiná zvířata



B. Průkaz nukleové kyseliny

- Stejně jako pokus na zvířeti je to metoda **komplikovaná a nákladná**. Obě metody tedy používáme většinou tam, kde běžně používané metody (mikroskopie, kultivace...) selhávají.
- Na rozdíl od pokusu na zvířeti však jde o metodu **progresivní a velice se rozvíjející**
- Průkaz NA je **možný i z mrtvých buněk**. To je výhodné u choulostivých mikrobů. Podařilo se např. i prokázat NA původce tuberkulózy na kosterních pozůstatcích z XI. století.

Rozdělení metod průkazu NA

- **Metody bez amplifikace** (genetické sondy). Jsou méně citlivé, to je někdy i výhoda
- **Polymerázová řetězová reakce (PCR)** velmi citlivá, stačí i jedna molekula DNA. Lze ovšem uměle citlivost snížit.
- **Ligázová řetězová reakce (LCR)** je velmi podobná (ale zavedla ji jiná firma)
- **Průkaz virové RNA** je možný pomocí upravené PCR



Důležité upozornění

- Nehodláme studenty učit principiální otázky týkající se molekulárních metod. K tomu jsou určeny jiné předměty
- Naším cílem je seznámit studenty s přehledem využitelnosti těchto metod v lékařské mikrobiologii.
- Existuje volitelný předmět VSMB081, který vede as. Růžička, kde lze získat hlubší poznatky o této problematice. (Zatím je jen pro mediky, to však lze jistě změnit)

Použití metod průkazu DNA (RNA) v klinické mikrobiologii

- Tyto metody používáme zpravidla tam, kde mikroskopický a kultivační průkaz je obtížný nebo není vůbec možný
- Nehodí se příliš pro běžné patogeny přítomné všude. Pro svou velkou citlivost by ruče vyčenichaly kdejakou molekulu přilétlou z vnějšího prostředí
- Metody nejsou ani neúčinné, jak si někdo myslí, ani samospasitelné, jak si myslí pro změnu jiní

Základní schéma reakce PCR

- V první fázi je nutno získat izolovanou DNA. Proces je poměrně složitý.
- V druhé fázi probíhá vlastní amplifikace (pokud vzorek obsahuje úsek DNA odpovídající příslušnému primeru)
- Ve třetí fázi probíhá detekce produktu amplifikace
 - Gelovou elektroforézou nebo
 - Metodou ELISA (**≠ serologická ELISA!!!**)

Postup izolace DNA pro PCR

Ke **500 μ l materiálu** (pokud je objem materiálu menší, je nutno doplnit do 500 μ l fyziologickým roztokem) přidat **25 μ l SARKOSYLu**, inkubovat při 56 °C/15 min., v průběhu inkubace občas vortexovat.

Přidat **1,0 ml roztoku G1**, vortexovat, inkubovat při 65°C/10 min, vzorek zchladit na RT.*

Přidat **50 μ l SILICA**, obrácením promíchat (10 min.).**Centrifugovat při 6 000 g/30 sec., supernatant slít.

Přidat **1 ml roztoku G2**, vortexovat, centrifugovat při 6 000 g/30 sec., supernatant slít.

Přidat **1 ml 80% Etanolu**, vortexovat, centrifugovat při 6 000 g/30 sec., supernatant slít.

Přidat **1 ml 80% Etanolu**, vortexovat, centrifugovat při 6 000 g/30 sec., supernatant slít .

Přidat **1 ml Acetonu**, vortexovat, centrifugovat 6 000 g/60 sec., supernatant ihned **opatrně** slít.

Pelet vysušit (max. 2 min.) v otevřené zkumavce.

Přidat **50 μ l roztoku TE** (předehřátého na 56 °C), dobře protřepat.

Eluovat DNA při 56 °C/10 min., krátce vortexovat nebo protřepat.

Centrifugace 10 000- 14 000 g/2 min./RT.

Čirý roztok DNA odebrat ihned po centrifugaci do sterilní mikrozkušavky

Proč je důležitá interní kontrola

- Velmi běžným jevem je, že dochází k tzv. **inhibici reakce**. Inhibice reakce je dána přítomností různých interferujících látek (např. talek z rukavic)
- Proto by měla být pro detekci vždy použita směs, obsahující kromě vzorku a jemu příslušných primerů ještě **kontrolní DNA + primery**. Pozitivita IC je dokladem, že nedošlo k inhibici reakce
- Ovšem pozor: **IC může být negativní u vysoce pozitivních vzorků** (prohraje v kompetici o nukleotidy).

Možné výsledky PCR

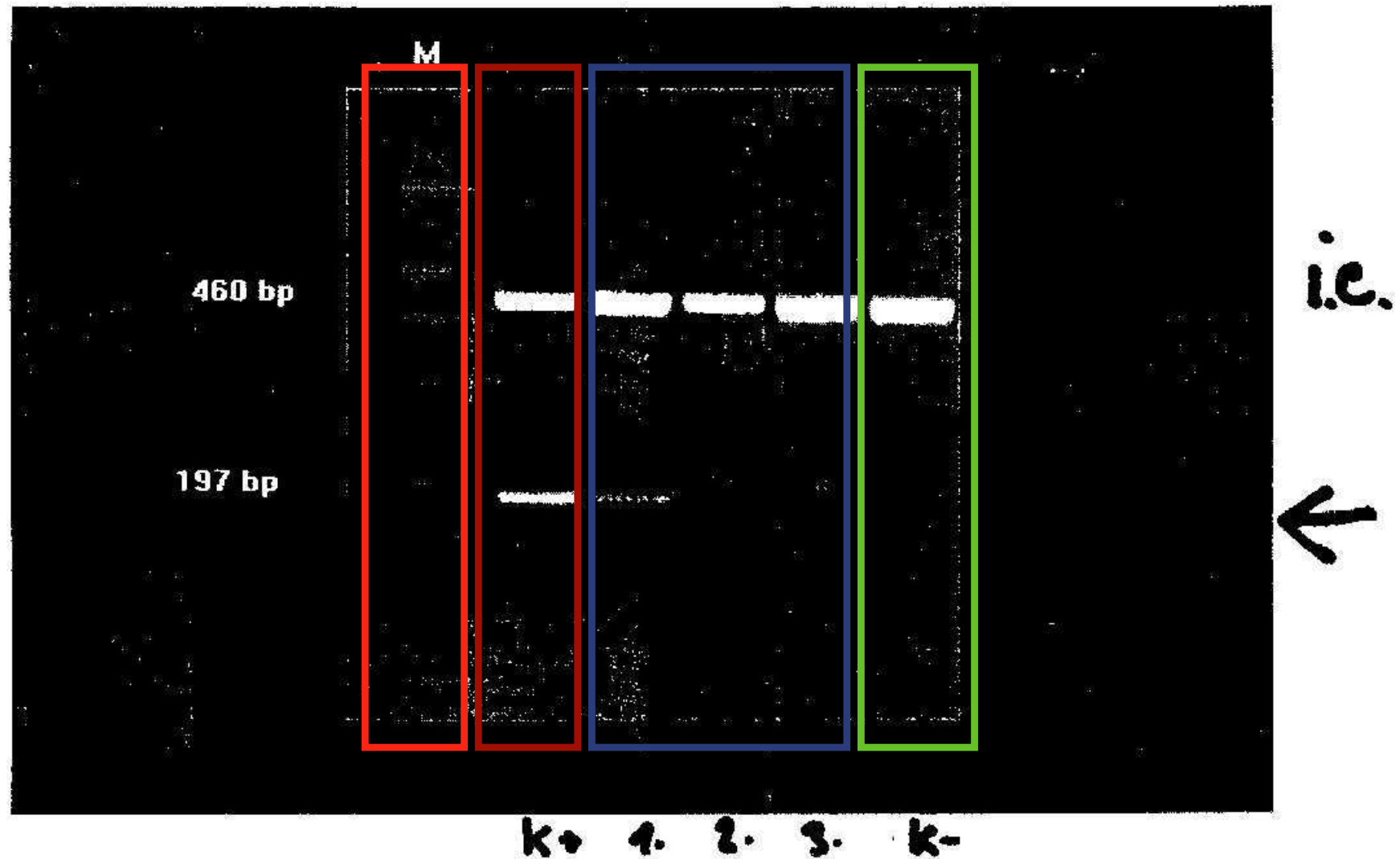
Následující možnosti platí bez ohledu na způsob detekce (gelovou elektroforézou nebo ELISou)

- **Pozitivní výsledek** vzorku svědčí o pozitivitě vzorku. Přitom výsledek IC je zpravidla také pozitivní, ale u silně pozitivních případů nemusí být.
- **Negativní výsledek** vzorku při pozitivním výsledku IC = negativní výsledek reakce
- **Vzorek i IC negativní** = inhibice reakce

Detekce výsledků PCR pomocí gelové elektroforézy

- Gelová elektroforéza je jednou z možností detekce produktu PCR
- Produkty putují gelem od katody směrem k anodě a jsou zviditelněny pomocí UV-transluminátoru
- Každý vzorek obsahuje také interní kontrolu (IC)
- Kromě vzorků je použit také žebříček (ladder) jako měřítko

Ukázka gelu (ladder, pozitivní kontrola, tři vzorky, negativní kontrola)





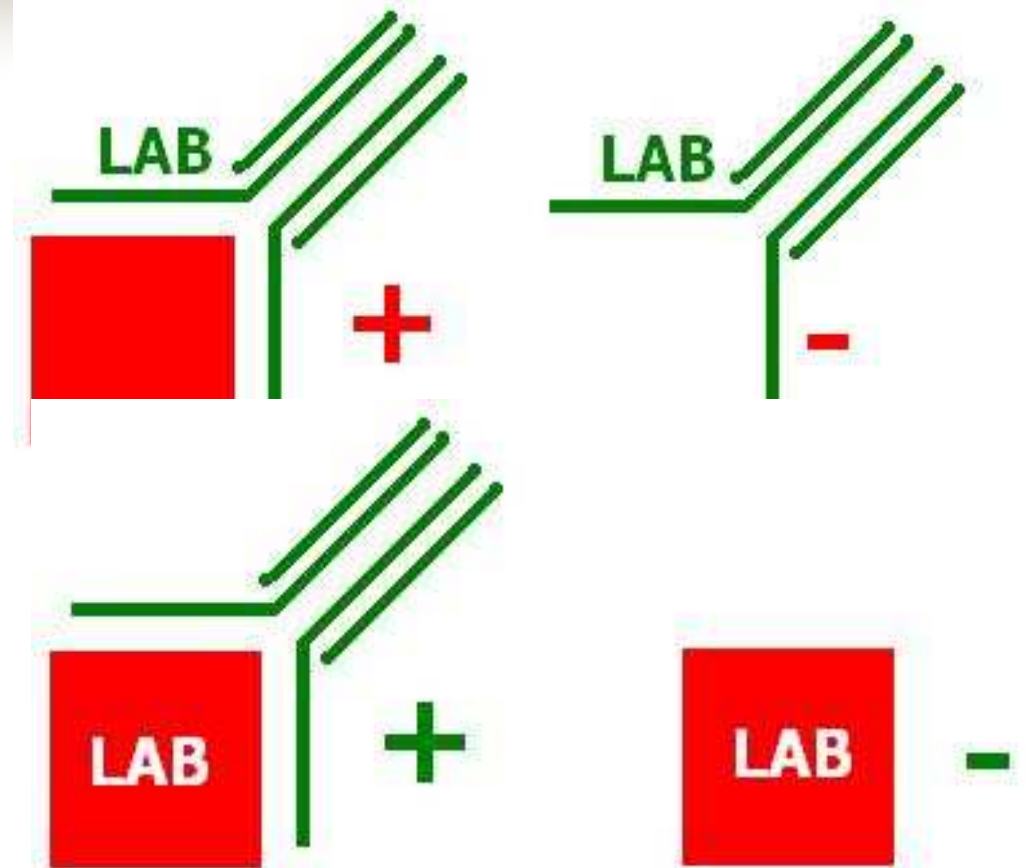
Druhá možnost – ELISA

- V tomto případě se produkt reakce detekuje pomocí reakce ELISA. Vysvětlení principu této reakce je mimo rámec této přednášky.
- Důležité je, že i v tomto případě hraje zásadní roli interní kontrola. Pokud je negativní reakce vzorku i kontroly, jde o inhibici reakce!

Odběr a zasílání vzorku na PCR

- Pokud komunikujeme se zařízením, které hodlá provést odběr vzorku na PCR, je nutno mít na paměti:
 - lze použít **téměř jakýkoli vzorek**, o kterém předpokládáme, že obsahuje mikroorganismy, po nichž pátráme
 - **není nutno zajistit životaschopnost mikrobů** (např. transportní půdou)
 - naopak **je třeba omezit riziko inhibice reakce**
→ nejlepší je suchý tampón nebo holý kusový vzorek bez nějakých úprav

Děkuji za
pozornost



Příště budeme pokračovat povídáním o základech
mikrobiologické imunologie