

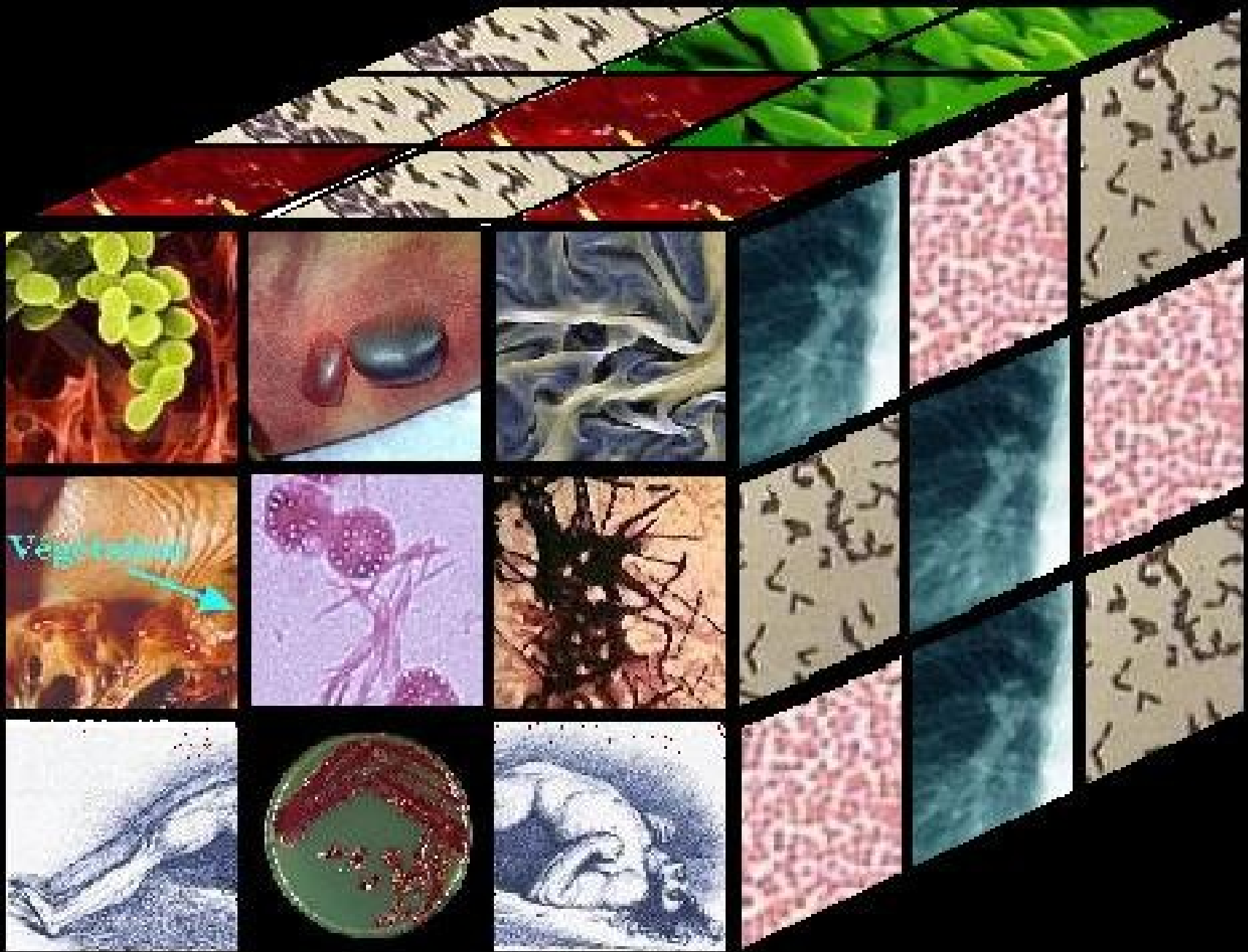
Úvod do klinické mikrobiologie – studijní materiál k předmětu (5)

MUDr. Ondřej Zahradníček
Mikrobiologický ústav lékařské fakulty
Masarykovy univerzity v Brně
a Fakultní nemocnice u svaté Anny
v Brně



Přehled témat

- 1. Mikroby obecně a mikroby lidského těla, vlastnosti mikrobů
- 2. Přehled některých významných bakterií lidského těla
- 3. Přehled některých významných virů lidského těla
- 4. Práce mikrobiologické laboratoře
- **5. Stručný přehled metod diagnostiky mikrobů**



The background features several large, overlapping, semi-transparent swirls in shades of green, purple, and blue. Interspersed among these swirls are numerous small, yellow, starburst-like shapes, some of which are larger and more prominent, creating a vibrant and dynamic visual effect.

5. Stručný přehled metod diagnostiky mikrobů

Přehled metod v mikrobiologii

- **Metody přímé: ve vzorku hledáme mikroba.** Budťo hledáme mikroba celého (třeba v mikroskopu), nebo jeho **část** (například jeho DNA) **či jeho produkt** (například nějaký bakteriální jed – toxin). Přímé metody si můžeme dále rozdělit na:
 - **přímý průkaz ve vzorku** – pracujeme s celým vzorkem (močí, krví, výtěrem z krku a podobně)
 - **identifikaci kmene** – kultivací jsme získali kmen, a teď už místo s celým vzorkem pracujeme jen s tímto kmenem, většinou se ho snažíme určit
- **Metody nepřímé: hledáme (většinou) protilátky.** Jak již bylo řečeno, protilátka není součástí ani produktem mikroba – je produktem makroorganismu, odezvou na činnost mikroba

Přehled metod přímého průkazu

Metoda	Hodí se k průkazu v celém vzorku?	Hodí se k určení čistého kmene?
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*

Přehled metod přímého průkazu – II

Tabulka na předchozím obrázku zahrnovala především metody, kterými dokážeme **najít a určit mikroby** (tedy splnění hlavního cíle – **najít mikrobiálního původce nemoci**).

Připomeňme si ale, že práce laboratoře může mít (někdy) i další cíle:

- určit **vybavenost mikroba** tzv. **faktorem virulence**
- určit **citlivost příslušného mikroba na antimikrobiální látky** (antibiotika, u kvasinek antimykotika a podobně)

I pro tyto cíle samozřejmě existují metody.

V našem „úvodu“ se ale lehce zmíníme jen o tom určování citlivosti na antimikrobiální látky

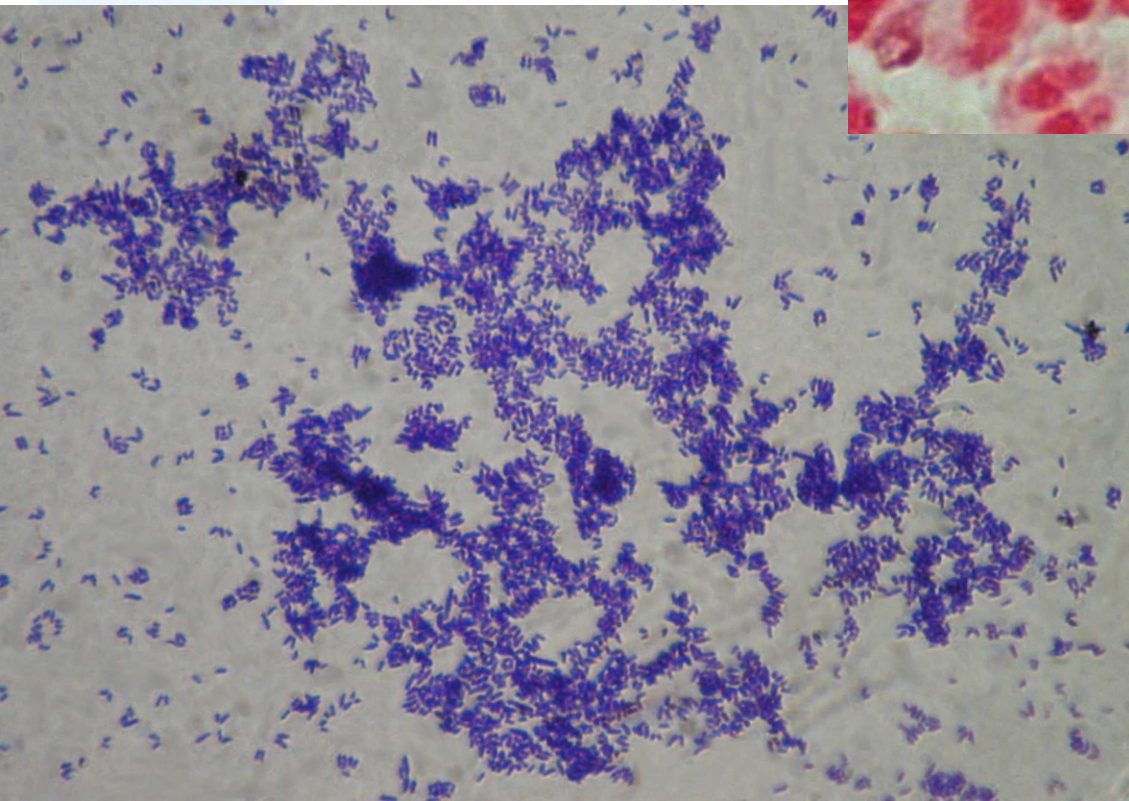
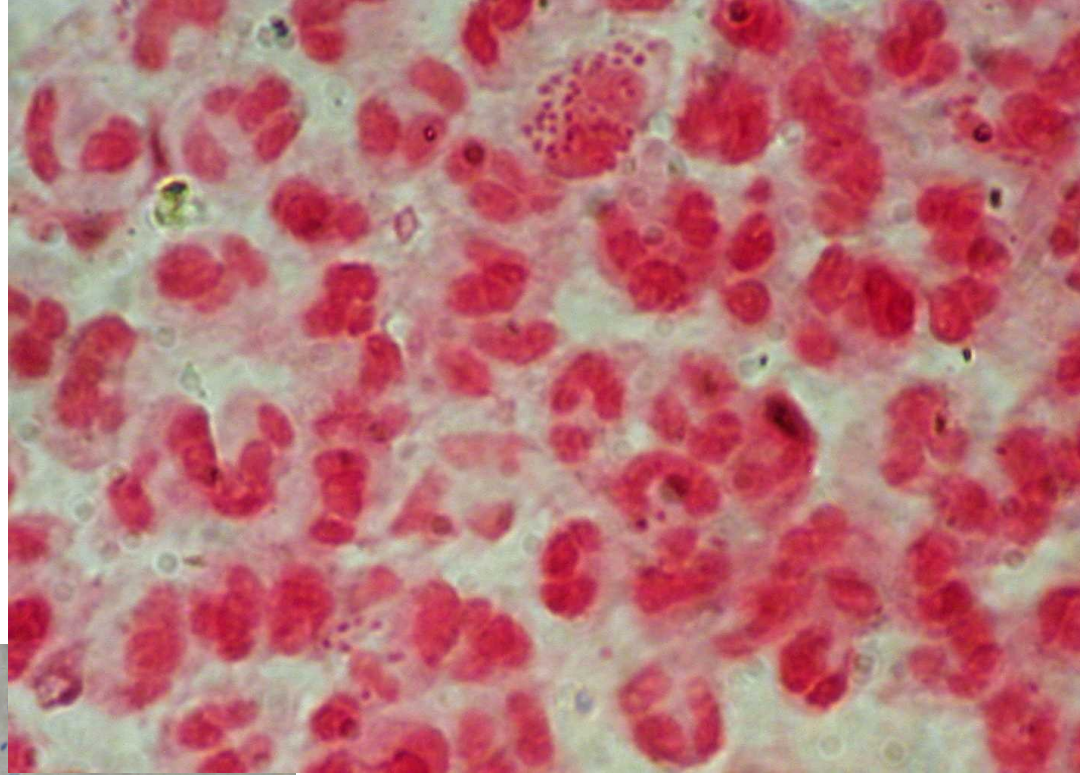
Mikroskopie

- Nejčastěji se využívá **optická mikroskopie**. **Elektronová mikroskopie** se využívá u virů, ale i tam spíše ve výzkumu než v běžné praxi.
- Pomocí mikroskopie vidíme **tvary a uspořádání mikrobů** (jak o tom byla řeč v první části), případně i jejich strukturu
- Někdy se používají **nativní** (nebarvené) **preparáty**, častěji je potřeba mikroby zvýraznit určitým barvením
- Důležité je vědět, že mikrobiolog **neprohlíží vždy jen mikroby**. Pokud mu například přijde třeba vzorek sputa (= chrchle) nebo hnisu, vidí kromě mikrobů také pacientovy bílé krvinky, a i jejich nález (množství apod.) je důležitý.

Přehled metod optické mikroskopie v mikrobiologii

- **Nativní preparát** – hodí se hlavně na velké mikroby (parazity, houby) a pohyblivé bakterie.
- Zvláštním případem je **nativní preparát v zástinu** (speciální způsob osvětlení preparátu, využívá se hlavně u spirochét), případně takzvaný **fázový kontrast**
- **Fixované a barvené preparáty** – nejčastěji se používá
 - **barvení podle Grama** (na většinu bakterií)
 - **barvení podle Giemsy** (na některé prvoky)
 - **barvení podle Ziehl Neelsena** (na původce tuberkulózy, ale i na exotické prvoky)
 - a spousta dalších

Mikroskopie
vzorku →
a kmene ↓



Kultivace (pěstování) bakterií a hub

- Zatímco mikroskopie je „nejklasičtější“ mikrobiologická metoda, **kultivace (pěstování) je dnes metodou nejčastější**, co se týče diagnostiky bakterií, kvasinek a plísní
- Pěstovat se dají i některé viry a paraziti, ale u těch je to dost komplikované a nedělá se to moc často.
- V dalším textu se tedy soustředíme na **pěstování bakterií, případně kvasinek**

Kultivace (pěstování) bakterií (případně také kvasinek)

Některé mikroby (zejména vláknité houby, tedy plísně) nám snadno vyrostou i na „přirozených půdách“ (jako je chleba nebo sýr) aniž bychom chtěli. Z různých důvodů ale raději používáme složením definované **umělé půdy** tekuté nebo ztužené přidávkem agaru

- 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 i více) hodin **půdu vytáhneme a pozorujeme, jak nám bakterie vyrostly**
- **Některé houby** se pěstují mnohem déle
- **Viry a paraziti** se většinou vůbec nepěstují

Kultivace bakterií – podmínky

- Jak již bylo řečeno v první části, bakteriím musíme připravit **příjemné vnější podmínky** – teplotu, vlhkost apod. U běžných bakterií z lidského těla jsou to zpravidla podmínky, jaké jsou i v tomto těle.
- Některé z těchto podmínek zajistíme **nastavením termostatu**, jiné **použitím kultivační půdy o určitém složení (obsahu solí, pH a podobně)**
- Používáme tedy **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.

Půdy připravené k použití

Připravené
kultivační půdy se
uchovávají
v chladničce



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 **útvár na povrchu pevné půdy**, většinou viditelný pouhým okem. Zatímco rozměry mikrobů počítáme v mikrometrech, rozměry kolonií v milimetrech. Jedna kolonie pochází z jedné buňky nebo malé skupinky buněk (dvojice, řetízku, shluku)
- V některých případech můžeme z počtu kolonií **odhadnout počet mikrobů** ve vzorku – nebo přesněji počet „kolonii 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** (uvidíte ji v „Mikrobiologii a imunologii“) 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 (to je něco jako tekuté polévkové koření)
 - mezi nejdůležitější tekuté půdy v klinické mikrobiologii patří peptonová voda, bujón, VL-bujón, selenitový bujón (selektivně pomnožovací)

Tekuté půdy



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. I agar má ale **konzistenci želé**.
- 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**.

Na začátku (na obrázku je to vpravo dole) kolonie splývají a špatně by se hodnotily. Díky postupnému „ředění“ ale na konci roztěru (vpravo nahoře) vidíme jednotlivé kolonie.

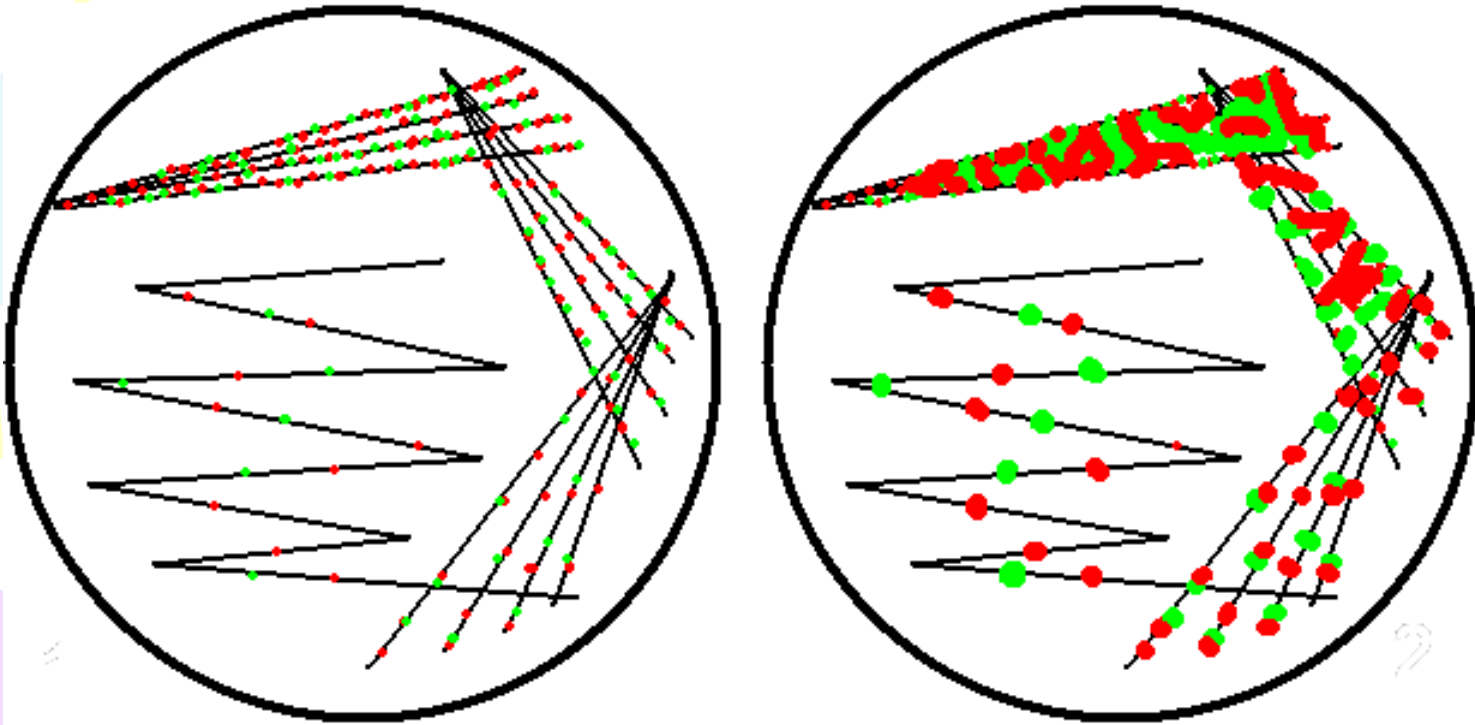


Co se dá popisovat u kolonií

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

To vše ale platí 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

- **Selektivní půdy** – jsou vymyšlené tak, aby na nich většina mikrobů nerostla (cílem je ze směsi různých mikrobů „vytáhnout“ jen něco)
- **Diagnostické půdy** – na těch sice roste skoro všechno, ale vzájemně se to dá poznat (jedna bakterie má třeba tmavé kolonie, druhá světlé)
- **Selektivně diagnostické půdy** – kombinují obě předchozí vlastnosti
- **Obohacené půdy** – obsahují oproti jiným půdám navíc různé živiny a růstové faktory, slouží k pěstování náročných bakterií (takových, které by na jiné půdě nevyrostly)
- **Speciální půdy** – mají své zvláštní určení (třeba testování citlivosti kmene k antibiotikům nebo určování faktorů virulence)

Pevné selektivní půdy

- Účelem je **selektovat (vydělít) ze směsi bakterií** pouze určitou skupinu nebo skupiny (a potlačit všechny ostatní)
- Příkladem je **agar pro stafylokoky s 10 % chloridu sodného**. Obsahuje desetkrát víc soli než většina ostatních půd. Stafylokoky to zvládnou – vždyť normálně žijí na kůži (i zpcené) a jsou adaptované na to, aby zvládaly i velká množství soli.
- Někdy také dosahujeme selektivnosti dosaženo přidáním **antibiotika**, které působí na mnoho mikrobů, ale ne na všechny (= selektuje ty, které antibiotiku odolávají)

Půdy diagnostické

- Nepotlačují růst žádného mikroba
- Zato díky svému složení **rozlišují mikroby podle určité vlastnosti**
- Příkladem je **krevní agar** ke sledování takzvaných hemolytických vlastností. Některé bakterie rozkládají červené krvinky úplně, jiné částečně, další vůbec, případně mění červené krevní barvivo na zelené.



Příklad selektivně diagnostické pŕdy – Endova pŕda

Endova pŕda selektuje jen některé gramnegativní tyčinky (ostatní bakterie na ní nerostou – jde tedy o **selektivní vlastnost**)

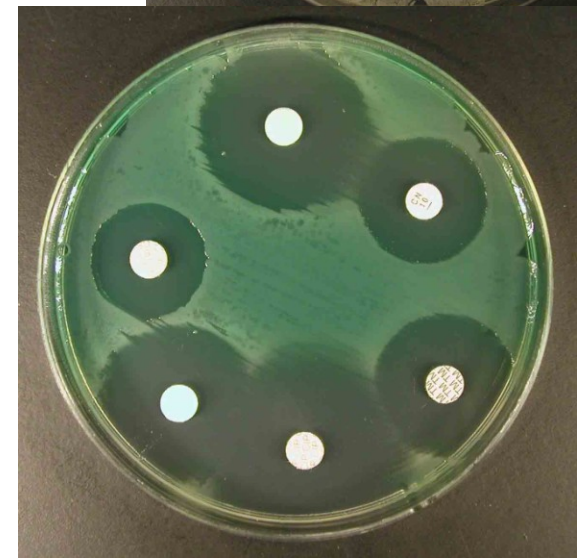
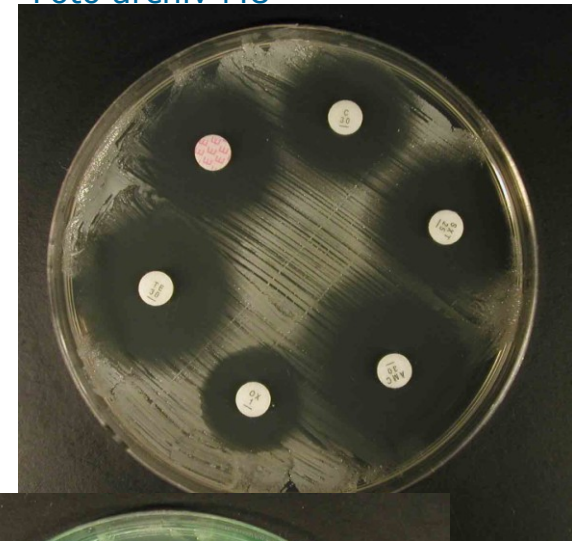
Endova pŕda umí také rozlišit bakterie podle toho, jestli dovedou štěpit mléčný cukr laktózu, nebo ne (to je **diagnostická vlastnost**).



Foto archiv MÚ

Půdy se používají i k testování citlivosti na antibiotika

Foto archiv MÚ



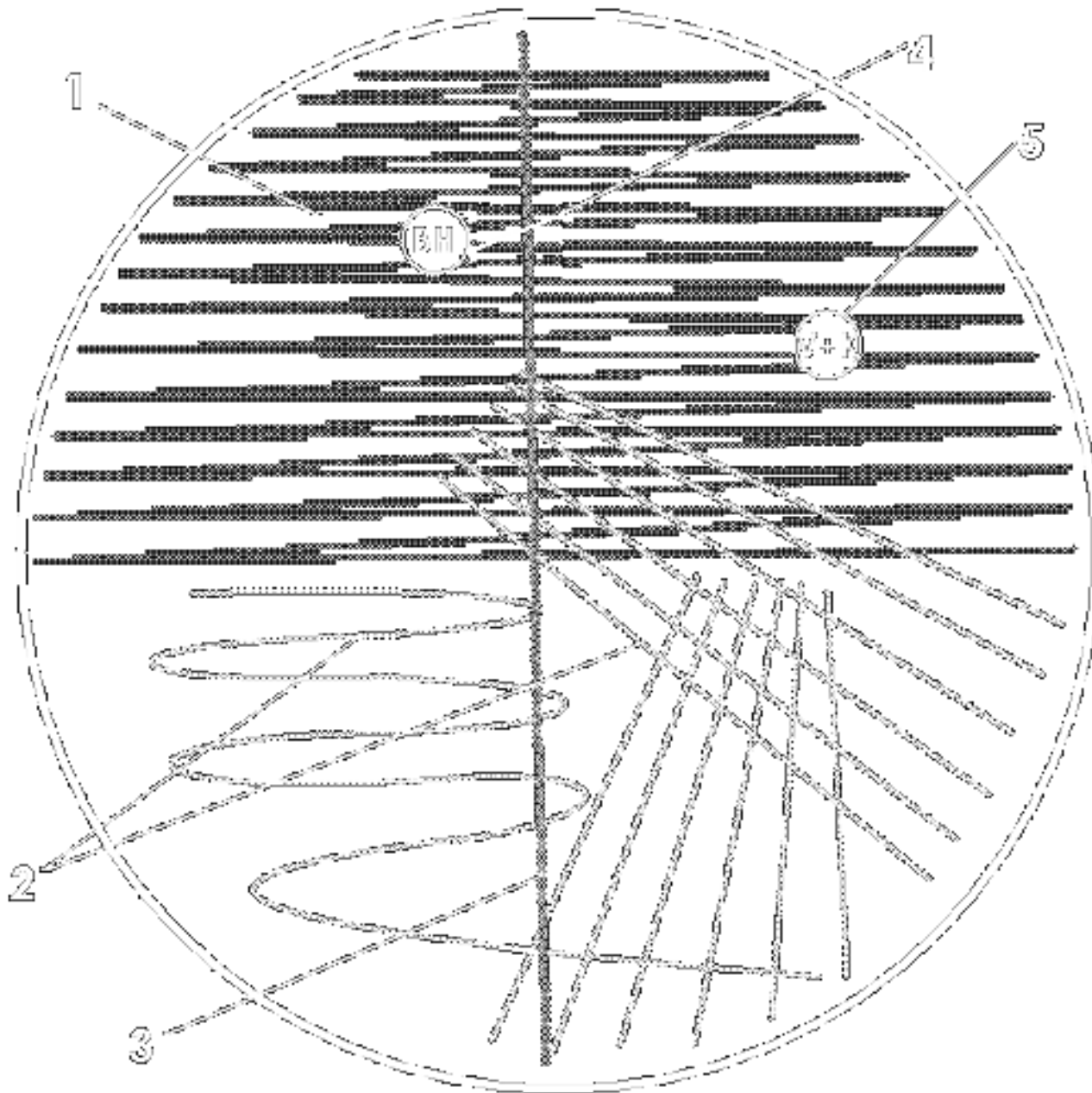
- V tomto případě se bakterie **naočkují po celé ploše** a na půdu se nakladou kulaté **papírky napuštěné jednotlivými antibiotiky (antibiotické disky)**. Antibiotika prostupují agarem. Je-li kmen na antibiotikum citlivý, vytvoří se zóna citlivosti. Malá nebo žádná zóna znamená, že je necitlivý
- Nejčastěji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

Používání kultivačních půd v praxi

V praxi se někdy místo celé půdy použije jen **polovina** nebo **čtvrtina** misky (z ekonomických důvodů). Jindy se na misku kladou **antibiotické disky** podobně jako na předchozím obrázku, ovšem cílem tentokrát není zjistit citlivost na dané antibiotikum, ale potlačit některé mikroby (ty, na které antibiotikum účinkuje) a zachytit jiné, které by ve směsi mohly uniknout pozornosti.

Někdy se také na půdu očkují **čáry jiných mikrobů** a sleduje se, co udělá „testovaný“ mikrob v blízkosti „testovacího“. Na následujícím obrázku vidíte dlouhou bělavou čáru – to je testovací kmen zlatého stafylokoka.

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 streptokokích (bezbarvé) a po stafylokokích (spíše bílé či zlatavé)

ro příklad)

Výtěr z krku – reálný výsledek



Pěstování anaerobních bakterií

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



Biochemické a podobné identifikační metody

- Pokud jsme kultivací získali kmen bakterie či kvasinky, musíme jej určit. Někdy nestačí vyzkoušet několik půd a dívat se na to, jak na nich vypadají kolonie. Používají se proto tzv. **identifikační metody**
- Nejběžnější metoda je **biochemická**. Bakteriím dáváme různé substráty a díváme se, jestli substrát byl nebo nebyl bakterií využit a rozštěpen na produkty.

Na čem jsou založeny biochemické metody?

- Mikrobiologové dávno vybádali, že jednotlivé rody a druhy bakterií se **liší svojí biochemickou aktivitou**
- Jedna třeba umí tvořit aldehydy z laktózy, druhá to neumí. Jedna dokáže vytvářet sirovodík, jiná ne. Toho využíváme při jejich určování
- *I mezi savci jsou podobné rozdíly v detailech metabolismu. Člověk třeba neumí tvořit vitamin C, někteří jiní savci ano*

Biochemické identifikační metody

- Bakterii tedy předložíme určitý **substrát (substráty)** a zkusíme, zda ho/je bakterie pomocí svého enzymu změní na **produkt (produkty)**. Produkt (aspoň jeden) se musí lišit od substrátu **skupenstvím** nebo **barvou**. Pokud se neliší (a nebylo by tedy poznat, že se reakce odehrála), použijeme **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 H_2O_2) rozmícháme bakterie. Bublinky = pozitivita.

Princip: $2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$

medic.med.uth.tmc.edu/path/oxidase.htm

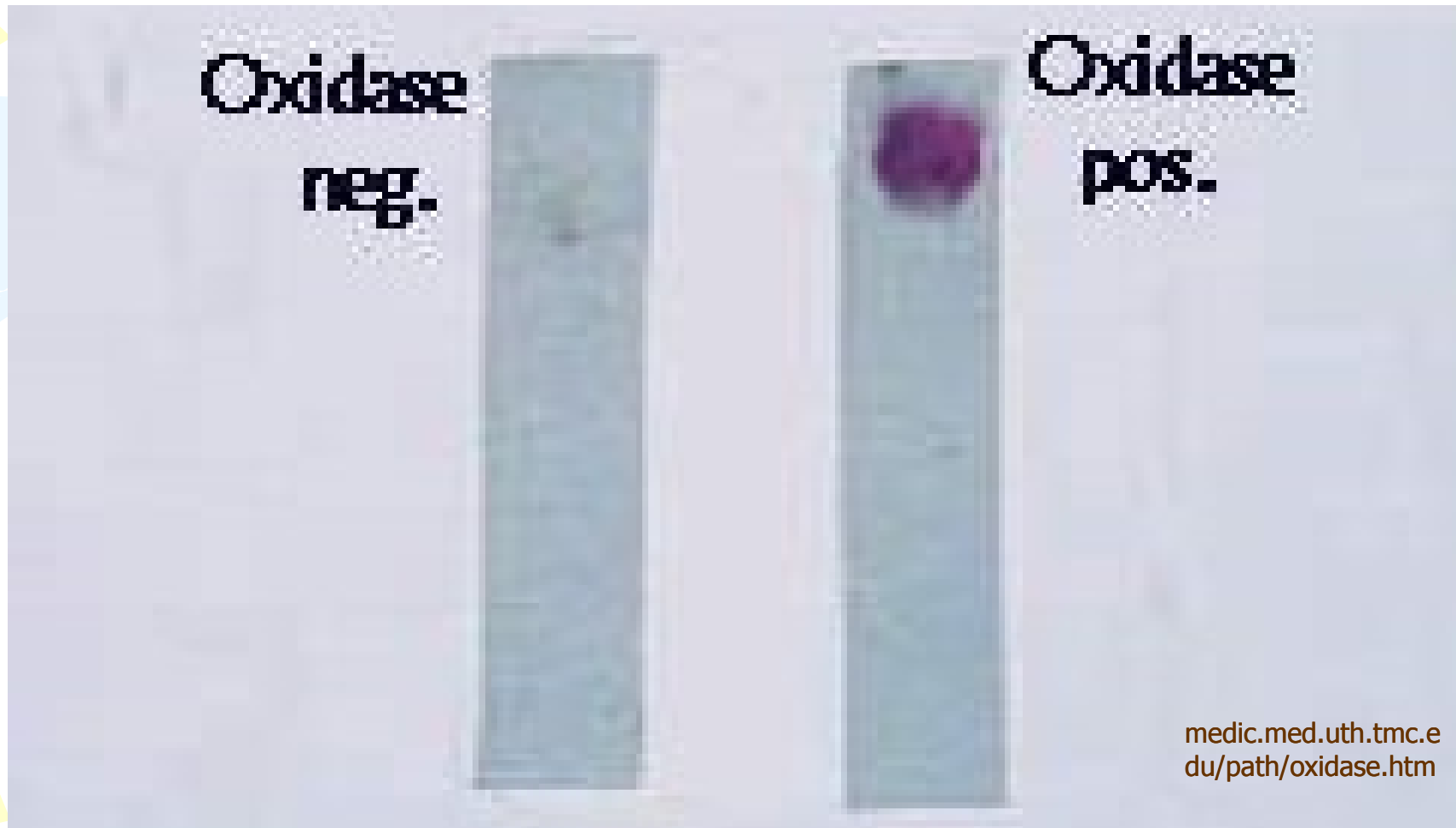
Catalase +



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

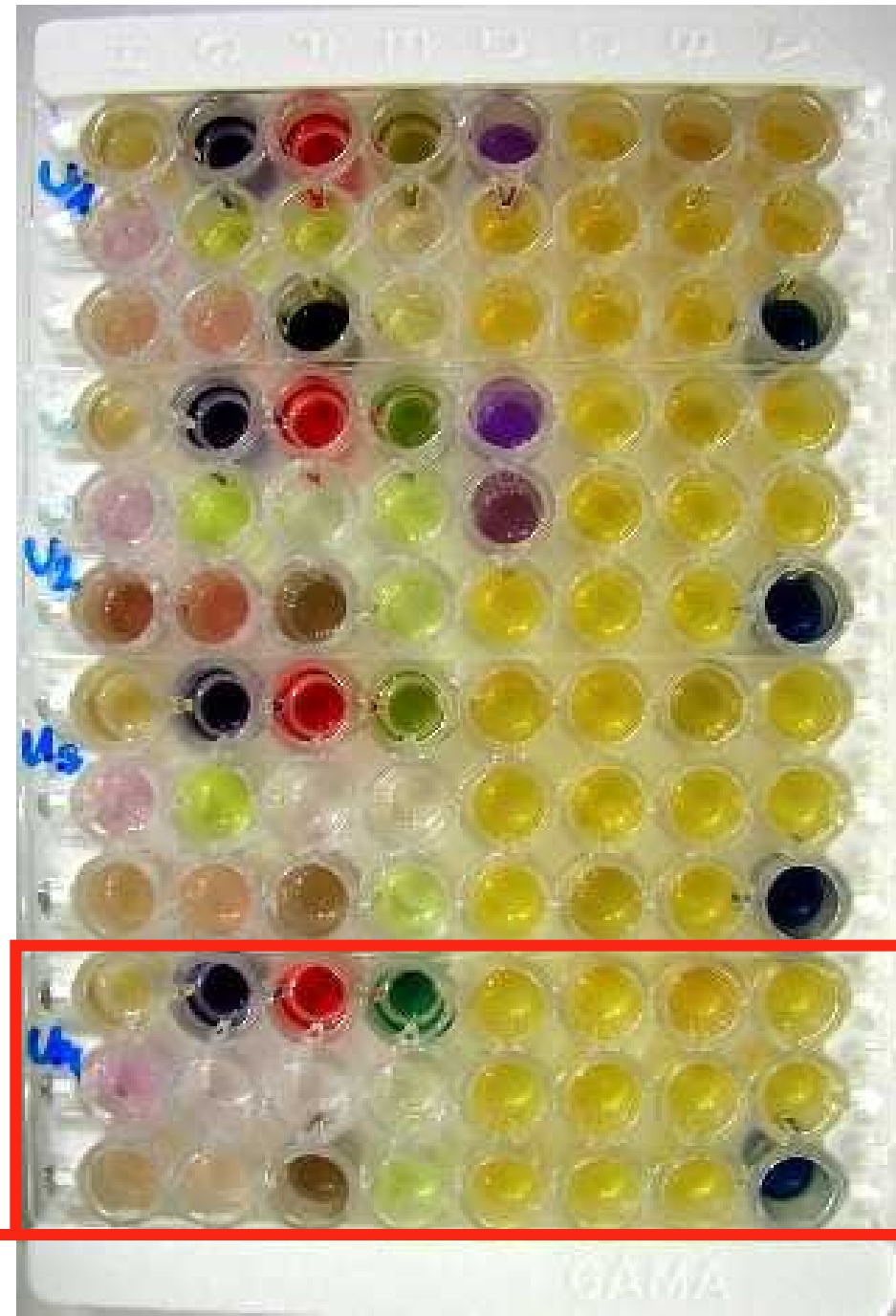


Foto: archiv MÚ

Moderní biochemické testy zahrnují i desítky reakcí

- Testy se dělají v **důlcích plastových mikrotitračních destiček**. Dodávají je různé firmy, české i zahraniční.
- Počet testů v sadách kolísá od zhruba **sedmi až po více než padesát**
- Liší se v technických detailech. Vždy je však substrát vysušený (většinou na dně důlku), bakterie se nejprve rozmíchá ve fyziologickém roztoku nebo jiné tekutině a pak se vzniklá směs kape či lije do důlků

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



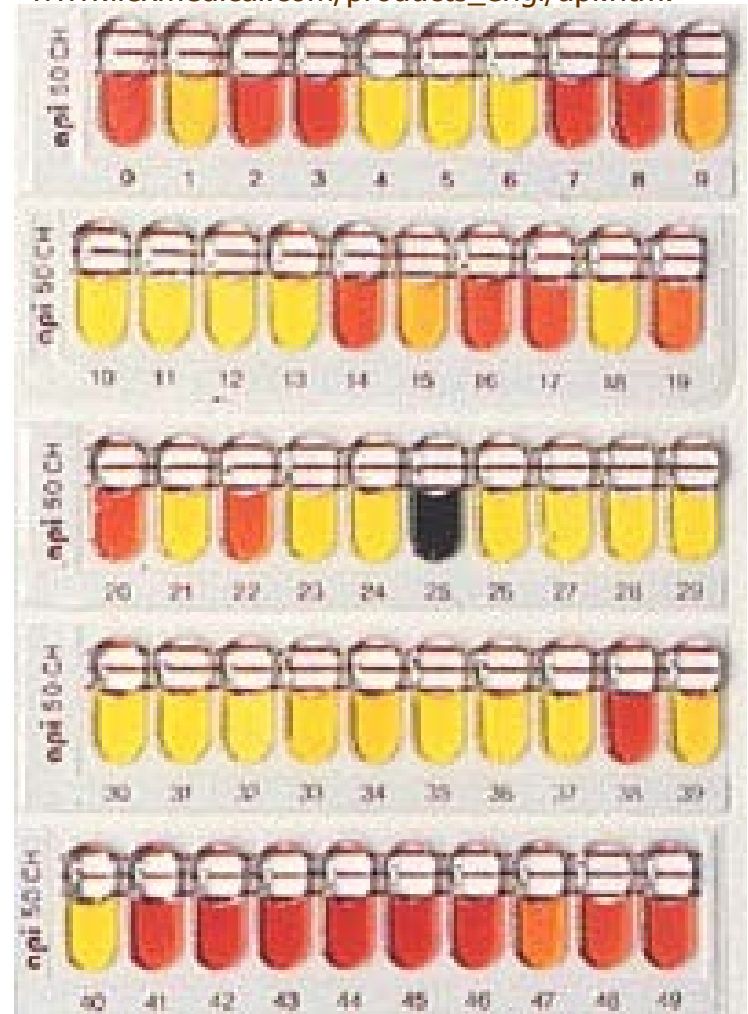
Zahraniční soupravy

Foto: archiv MÚ



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

www.ilexmedical.com/products_engl/api.htm

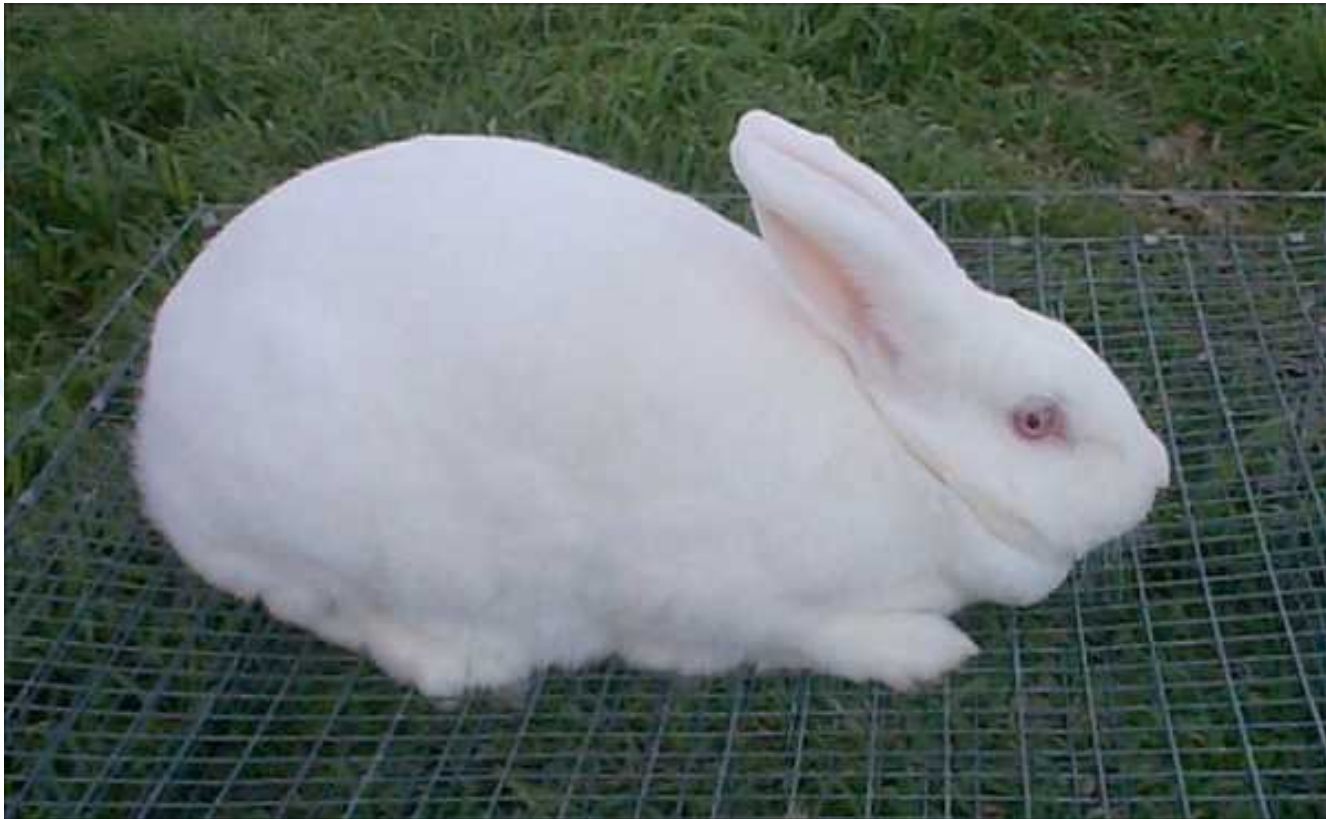


www.ilexmedical.com/products_engl/api.htm



Pokus na zvířeti

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



Průkaz nukleové kyseliny

- Metody, kterými prokazujeme nukleovou kyselinu, jsou vlastně genetické metody v širším slova smyslu. Z hlediska metody samotné je **vlastně úplně jedno, jestli prokazuje DNA bakterie nebo člověka** (takže jsou to vlastně stejné metody, které se používají při určování otcovství nebo některých dědičných chorob)
- Nevýhoda – **někdy jsou až příliš citlivé**, takže se prokáže každá molekula DNA, která mohla třeba „přilétnout odněkud zvenčí“. Citlivost se dnes ale dá omezit.

Reakce založené na reakci „antigen protilátka“

Pro připomenutí z minulé části: Co je to antigen? Antigen je **struktura na povrchu** (například) **mikroba**, která tělo provokuje k tvorbě protilátek

- A co teď pro nás bude důležité: **Antigen reaguje s protilátkou, která se proti němu vytvořila**; reakce (vznik takzvaného „komplexu“) je buď přímo vidět, nebo ji můžeme nějakým způsobem detekovat.
- Platí tedy, že antigen **se dá prokázat pomocí protilátky**, která se proti němu vytvořila například u zvířete

Podobně to ovšem platí i pro protilátku:

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

Nesmíme ale zapomínat na to, že protilátka není žádná část mikroba. Je to **bílkovina, imunoglobulin, produkt imunitního systému člověka (nebo zvířete)**.

Reakce „antigen – protilátka“ se tedy dají využít ke dvěma různým věcem: k průkazu antigenu (který patří do **přímého průkazu**) a k průkazu protilátky (ten patří do **průkazu nepřímého**)

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)

Využití k průkazu antigenu

V tomto případě postupujeme následovně

- použijeme **vzorek**, který jsme získali **od pacienta** a ve kterém hledáme bakterii,
- případně místo vzorku použijeme už čistý **kmen bakterie z toho vzorku**, který ještě nemáme přesně určený
- s tímto vzorkem nebo kmenem smícháme **laboratorní protilátku proti danému antigenu** (dříve se tyto protilátky získávaly od zvířat, dnes máme jiné způsoby, jak je získat)
- sledujeme, **jestli vznikne tzv. komplex**

Využití k průkazu protilátky

I když princip je stejný, postupujeme jinak:

- použijeme **laboratorní kmen určité bakterie** (chceme-li prokázat protilátky proti yersiniím, vezmeme yersinii, případně její vyčištěné antigeny)
- s tímto kmenem nyní smícháme sérum vyšetřovaného pacienta, ve kterém předpokládáme protilátky
- v pozitivním případě (= pacient opravdu protilátky má) opět vznikne komplex

Prokazování komplexu antigen-protilátka

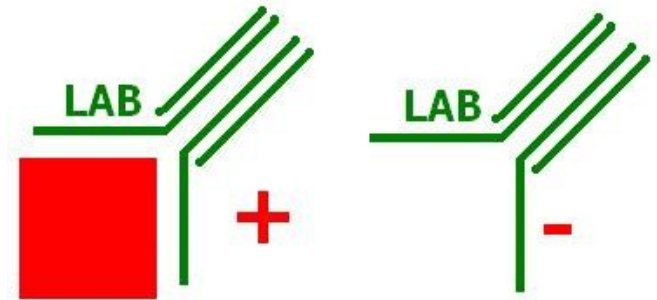
Reakce antigenu s protilátkou je někdy přímo viditelná (v dosud bezbarvé směsi se třeba najednou „udělají chuchvalce“)

Pokud reakce přímo viditelná není, musíme podniknout něco proto, abychom ji „**zviditelnili**“. Někdy je to velmi složité. Podle toho, jak reakci zviditelníme, existují různé typy těchto metod (například neutralizace, KFR, ELISA, Western blotting, imunofluorescence a podobně)

Ještě jednou přehledně:

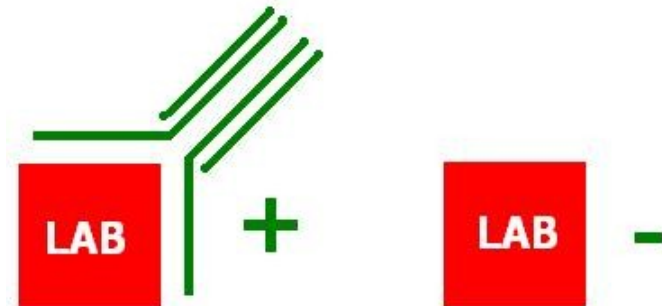
- **Průkaz antigenu:** laboratorní protilátky (třeba zvířecí) + vzorek pacienta nebo kmen mikroba.

Přímá metoda



- **Průkaz protilátky:** laboratorní antigen (mikrobiální) + sérum pacienta

Nepřímá metoda



Příklad serologické reakce v praxi

V tomto konkrétním případě by vysrážení přímo vidět nebylo, ale do reakce jsme přidali červené krvinky. Nahoře (pozitivní reakce) se za přítomnosti antigenu i protilátky vysrážely, dole (antigen je přítomen, ale protilátka chybí) nevysrážené krvinky klesly na dno a udělaly „tečku“.



Foto: archiv MÚ

Serologická laboratoř



Foto: archiv MÚ

Nemá protilátky jen proto, že nemoc prodělal kdysi dávno?

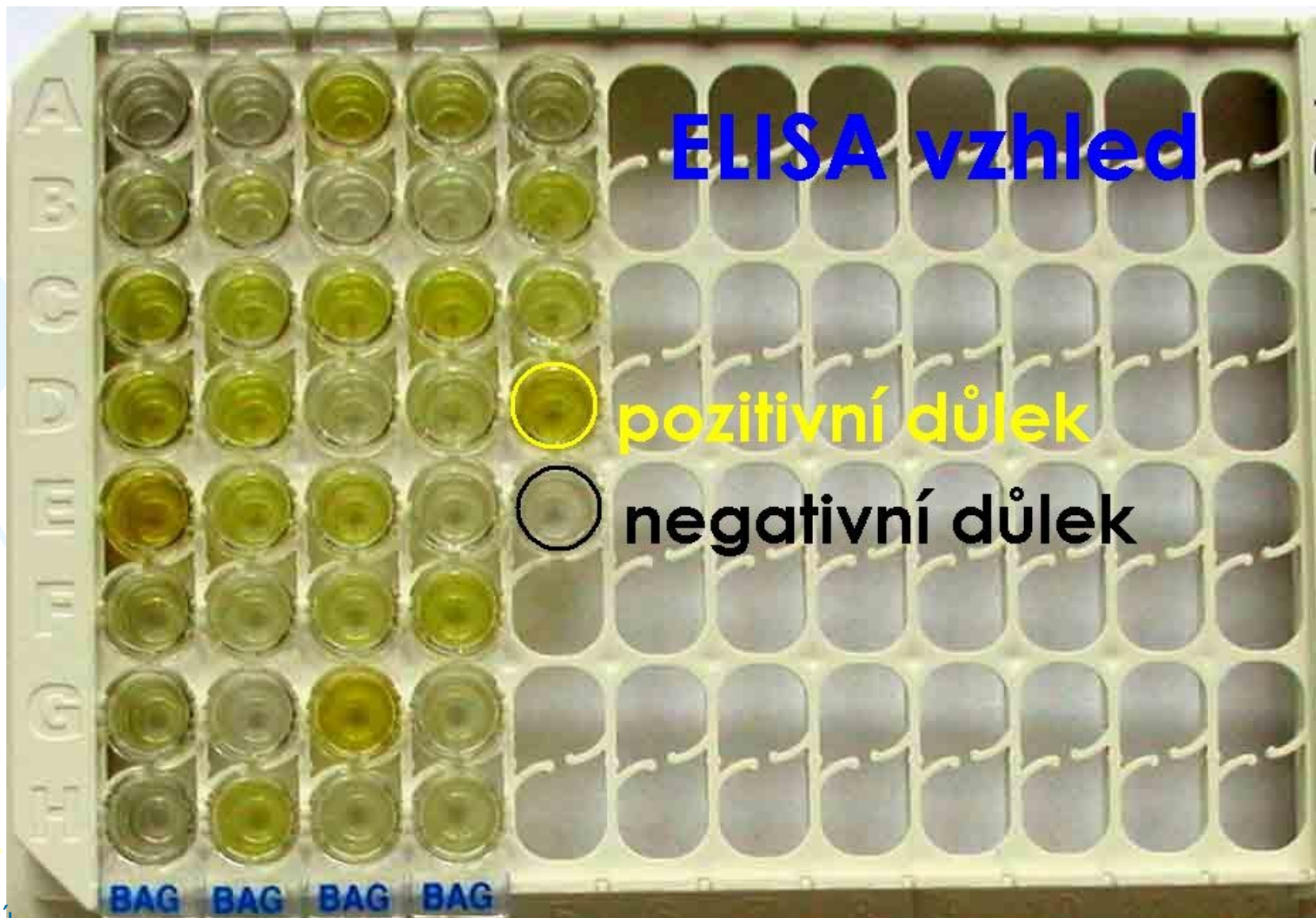
- Po nákaze protilátky **přetrvávají dlouhodobě, někdy celoživotně**. Samotný nálezn protilátek tedy neznamená, že dotyčný je nemocný teď.
- Pokud to tedy jde, **používáme raději přímý průkaz nežli nepřímý**. Přesto máme určité možnosti, jak i z nepřímého průkazu **zjistit, jestli je ten člověk nemocný teď, nebo jestli byl nemocný kdysi dávno**.
- Používá se například zjišťování **množství protilátek**, zajímá nás, jestli jich **přibývá nebo ubývá**, a také určujeme jejich takzvanou **třídu** (nejvýznamnější jsou tzv. IgM a IgG)

Průběh protilátkové odpovědi

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



Ukázka jiné serologické reakce (ELISA)



Procvičovací otázky

1. Které je nejběžnější bakteriologické barvení?
2. Mezi jaké půdy patří masopeptonový bujón a VL-bujón?
3. Jaký způsob očkování mikrobů na kultivační půdu volíme, abychom izolovali kolonie?
4. Co je účelem selektivní půdy?
5. Co se chceme dozvědět, když bakterii předložíme určitý substrát?
6. Ve vzorku mozkomíšního moku chceme prokázat antigen meningokoka. S čím vzorek smícháme?
7. V séru chceme prokázat protilátky proti boréliím. S čím vzorek séra smícháme?
8. Proč prokázané protilátky nedokazují, že pacient je nemocný?

Odpovědi na procvičovací otázky

1. Gramovo barvení
2. Tekuté pomnožovací půdy
3. Takzvaný křížový roztěr
4. Potlačit růst většiny mikrobů a selektovat ze směsi jen určité mikroby
5. Chceme zjistit, zda bakterie substrát přemění na určitý produkt
6. S protilátkami proti meningokokovi
7. S bakterií (borrelií) nebo jejími antigeny
8. Protože může jít o nemoc prodělanou dávno

Konec tématu a celého cyklu

- V případě problémů pište:
- e-mail:
zahradnicek@fnusa.cz
- nebo e-mail na IS I

