

# Téma 2 Přehled mikrobiologických vyšetřovacích metod

## 2.1 Cíle a základní rozdělení mikrobiologických metod. Pojmy kmen a vzorek

### 2.1.1 Cíle mikrobiologické diagnostiky

Mikrobiologická diagnostika (tedy práce laboratoře klinické mikrobiologie) směřuje k:

- **odhalení původce nemoci.** Skutečného původce je přitom často potřeba odlišit od **běžné flóry** – tedy mikrobů (hlavně bakterií), které se v některých tělních dutinách vyskytují normálně, od **náhodného nálezu**, který se např. do úst zatoulal s potravou, a také od **kontaminace**, tedy od mikrobů, které se do vzorku přilepily omylem cestou
- někdy také: **určení "in vitro" citlivosti na antimikrobiální látky**
- někdy také **určení faktorů virulence**, neboť samotný nález mikroba je nevýznamný, ale důležitý je např. nález jeho toxinu, nebo důkaz, že jde o opouzdřený kmen

### 2.1.2 Pojmy vzorek a kmen

#### 2.1.2.1 Vzorek

**Vzorek** je (v klinické mikrobiologii) to, co je odebráno pacientovi a přichází k vyšetření do laboratoře. Nejčastěji se do laboratoře posílá

- **kusový či tekutý materiál** ve zkumavce či jiné nádobce (krev, sérum, moč, mozkomíšní mok, sputum, šupiny, odštěpek kosti, stolice, kousek nehtu...)
- **stěr či výtěr** (z nejrůznějších tělních povrchů a otvorů) na vatovém tamponu, obvykle zanořeném do transportního média.

Odběrům vzorků se věnuje kapitola 13.

#### 2.1.2.2 Kmen

**Kmen** je čistá kultura („výpěstek“) jednoho druhu mikroba (obvykle bakterie nebo mikroskopické houby). Je to soubor jedinců, kteří mají stejné vlastnosti a zřejmě pocházejí z jediné buňky.

Mikrobiolog nemá možnost pracovat s **jedincem** jak jako zoolog či botanik: jedinec (jednotlivá bakterie či kvasinka) je příliš malý. Práce s kmenem mikrobiologům práci s jedincem nahrazuje. Zjišťovat například biochemické vlastnosti či tvorbu pigmentu u jedné buňky by bylo extrémně náročné. Použije-li se místo toho kmen, je to mnohem jednodušší

Kmen získáme ze vzorku kultivací na pevné půdě (s podmínkou správného rozočkování) – proto má tato metoda výsadní postavení zejména v diagnostice bakterií.

### 2.1.3 Přehled metod

Metody, kterými určujeme mikroby, si můžeme rozdělit na:

#### 2.1.3.1 Metody přímé

Pomocí těchto metod **hledáme mikroba jako takového, jeho součást nebo jeho produkt** ve vzorku pacienta. Můžeme si je dále rozdělit:

**2.1.3.1.1 Přímý průkaz ve vzorku.** V tomto případě pracujeme s celým vzorkem. Je potřeba vzít v úvahu, že vzorek zpravidla obsahuje buňky makroorganismu a že předem nevíme, kolik různých druhů mikrobů je ve vzorku obsaženo – nemusí tam být žádné, ale může jich být v extrémních případech i několik desítek. Taková situace samozřejmě znemožňuje použití některých diagnostických metod. Můžeme to přirovnat k tomu, že dveře od posluchárny také těžko může využít kriminalista k hledání otisku prstů jednoho studenta.

**2.1.3.1.2 Práce s kmenem.** V řadě případů nelze pracovat s celým vzorkem – potřebujeme získat **kmen**. Pokud máme k dispozici kmen a určujeme jeho vlastnosti, hovoříme o **identifikaci kmene**

mikroba. Některé metody identifikace jsou tytéž, které se používají i k přímému průkazu ve vzorku (např. mikroskopovat se dá jak celý vzorek, tak i kmen). Jiné metody se naopak používají pouze k identifikaci, avšak nikoli k přímé práci se vzorkem (příkladem je biochemická identifikace, která se dá uplatnit pouze máme-li k dispozici čistou kulturu mikroba, tedy kmen).

### 2.1.3.2 Metody nepřímé

Těmito metodami **hledáme odezvu imunitního systému pacienta na mikroba**. V naprosté většině případů hledáme **protilátky**. Rozdíl je v tom, že protilátka není součástí ani produktem mikroba – je produktem makroorganismu, i když by bez podráždění daným mikroblem (resp. jeho antigenem) nevznikla. Nevýhodou nepřímých metod je, že nejsou důkazem toho, že je mikrob v těle právě přítomen – svědčí jen o tom, že se s ním tělo někdy setkalo (anebo se setkalo s očkovací látkou, která obsahovala části těla toho mikroba).

Kromě průkazu protilátek patří do nepřímého průkazu také průkaz buněčné imunity (např. u tuberkulózy).

## 2.2 Metody přímého průkazu mikrobů (přehled a charakteristika)

Název metody	K průkazu ve vzorku	K identifikaci kmene
Mikroskopie	ano	ano
Kultivace (pěstování na půdách)	ano	ano
Biochemické a jim podobné identifikační metody	ne	ano
Pokus na zvířeti	ano	lze použít, ale nedělá se to
Průkaz antigenu/antigenní analýza	ano	ano
Průkaz nukleové kyseliny	ano	lze použít, běžně se nedělá

### 2.2.1 Mikroskopie

#### 2.2.1.1 Nativní preparát

Nejjednodušší druh mikroskopie: mikroby se pozorují neobarvené, jen rozmíchané v kapce fyziologického roztoku a přikryté krycím sklíčkem. Nativní preparát se hodí na mikroby (baktérie, prvoky), kteří se **pohybují**, nebo jsou **velké**.

#### 2.2.1.2 Mikroskopie v zástinu

Je to zvláštní druh nativního preparátu, světlo na preparát dopadá zešikma.

#### 2.2.1.3 Barvené preparáty

Preparáty, které mají být nějak obarvené, musí být nejprve **vysušeny** a poté **zfixovány**. Poté se barví. Mikrobiologové provádějí nejčastěji **Gramovo barvení**. Rozliší baktérie podle typu **buněčné stěny** na tzv. grampozitivní a gramnegativní; špatně nebo vůbec se obarví bakterie, které buněčnou stěnu nemají nebo mají stěnu zvláštního. Schéma Gramova barvení uvádí následující tabulka:

Chemikálie	Čas (s)	Jak reaguje grampozitivní bakterie	Jak reaguje gramnegativní bakterie
Violeť	20–30	Obarví se na fialovo	Obarví se na fialovo
Lugolův r.	20–30	Upevní se vazba barviva na stěnu	Vazba barviva na stěnu se neupevní
Alkohol	15–20	Neodbarví se	Odbarví se
Safranin	60–120	Nanejvýš trochu změnění odstín	Obarví se na červeno

Výsledkem tedy je, že grampozitivní bakterie jsou modrofialové, gramnegativní červené a Gramem se nebarví bakterie se vůbec neobarví.

Pokud Gramovo barvení použijeme k obarvení vzorku, vidíme i leukocyty, epitellie a další útvary.

Cytoplazma těchto buněk se zpravidla barví červeně, jádra červenofialově nebo fialově.

Různá **speciální barvení** se používají např. na tuberkulózu, na plísňe, některé parazity apod.

Ke speciálním účelům se používá **fluorescenční barvení**.

#### 2.2.1.4 Interpretace mikroskopie

Použijeme-li mikroskopii jako **přímý průkaz**, nevidíme jenom mikroby samotné, ale také různé jiné věci, například epiteliu a leukocyty makroorganismu. Jejich přítomnost a vzájemný poměr má velký význam při hodnocení nálezu. Samozřejmě, je-li mikroskopie použita k **identifikaci**, vidíme už jenom buňky příslušného mikroba.

#### 2.2.1.5 Elektronová mikroskopie

se používá u virů, ale nehodí se k rutinní diagnostice, spíše k výzkumu.

### 2.2.2 Kultivace

Je to vlastně **pěstování mikrobů**. U virů se používá pro tuto metodu pojem *izolace*.

#### 2.2.2.1 Základní pojmy

**Kultivace** se v praxi zpravidla provádí na umělých půdách. Většinou se při kultivaci mikroby rozmnoží. Mikroskopie je sice nejklasičtější mikrobiologickou metodou, avšak kultivace je zdaleka nejdůležitější (alespoň v případě bakterií a kvasinkovitých hub). Její význam spočívá především v tom, že umožňuje ze **vzorku** (obsahujícího často směs mikrobů a téměř vždy buňky pacienta) izolovat čistý **kmen** ve formě tzv. **kolonií**. To ovšem platí jen pro tzv. **pevné půdy**. Důležité jsou ale i **půdy tekuté**, sloužící zejména k pomnožení mikrobů tam, kde jich bylo získáno málo.

**Kmen**, jak již bylo řečeno, je populace mikrobů, vzešlá z jedné buňky, bez ohledu na momentální konkrétní formu. Všichni jedinci v rámci kmene mají stejné vlastnosti.

**Kolonie** je označení konkrétního útvaru, který bakterie a kvasinky vytvářejí při kultivaci na pevných půdách. Teoreticky (a někdy i prakticky) je to potomstvo jedné jediné buňky, uchycené na povrchu pevné půdy. U většiny mikrobů vyroste za den. Pokud odtud mikroba přemístíme, přestává být kolonií, zůstává však kmenem.

**Kultivační podmínky** zahrnují teplotu, vlhkost, složení atmosféry a podobně. Zpravidla se laboratoř snaží vytvořit mikrobům podmínky blízké těm, které jsou v organismu.

#### 2.2.2.2 Tekuté půdy

jsou půdy sloužící především k pomnožení bakterií z málo početných vzorků. Nejdůležitější z nich je **masopeptonový bujón**.

#### 2.2.2.3 Pevné (většinou agarové) půdy

Jsou to půdy, jejichž základem je zpravidla **živný agar** – to je bujón, do kterého je přidán výtažek agarové řasy. Tím se stane, že z tekutiny se stane hmota připomínající pudink nebo želatinu. Na agarových půdách bakterie (a také kvasinky) tvoří kopečky, kterým říkáme **kolonie**. Každý druh bakterie tvoří na konkrétní půdě specifické kolonie charakteristické velikosti, barvy, tvaru apod., což velmi usnadňuje diagnostiku.

Jedna kolonie zpravidla vyrůstá z jedné bakterie, nanejvýš z jedné dvojice, jednoho řetězku, jednoho shluku. (Používá se tu anglický termín **CFU** = colony forming unit = jednotka tvořící kolonii). Z toho také logicky vyplývá, že pokud na agarovou půdu naočkujeme směs dvou bakterií, a pokud tato směs není příliš hustá, vytvoří každý z těchto druhů své vlastní charakteristické kolonie. Ty pak můžeme přeočkovat (= odebrat a nechat znovu kultivovat) a různými metodami identifikovat.

U kolonií se dají popisovat různé znaky – velikost, barva, tvar, zápach a podobně.

Nejdůležitější půda je **krevní agar** (živný agar s přídavkem ovčích červených krvinek), používá se ale i několik desítek dalších půd.

#### 2.2.2.4 Jak se kultivuje na pevných půdách

Na povrch půdy **naneseme část vzorku** nebo několik kolonií z předchozí kultivace.

Bakteriologickou klíčkou toto místo **"roztaháme" (rozředíme) po celé misce**.

Nyní misku **umístíme do termostatu**, většinou při 37 °C (lékařsky významným bakteriím tato teplota zpravidla vyhovuje). Většinou kultivujeme 16–28 hodin (tedy do druhého dne), někdy ale déle (dva, tři i více dní). Po vyjmutí vidíme na misce kolonie, které můžeme popisovat nebo s nimi provádět další identifikační pokusy.

## 2.2.3 Biochemická identifikace

je založena na skutečnosti, že každý druh bakterie produkuje jinou sestavu enzymů

### 2.2.3.1 Princip biochemických identifikačních testů

je tedy takový, že bakteriím je předložen **substrát** (substráty). Pokud bakterie produkuje **enzym** (enzymy), dojde k přeměně substrátu (substrátů) na **produkt** (produkty). V případě, že se produkt(y) liší od substrátu(-ů) barvou, skupenstvím apod., můžeme změnu přímo pozorovat. Pokud změna není viditelná, musí být v reakci přítomen **indikátor**. Nelze-li indikátor mít v reakci od začátku (třeba proto, že by v jeho přítomnosti proběhla špatně nebo neproběhla vůbec), přidává se až po proběhlé reakci ve formě **čínidla**.

Používají se různé testy. Některé trvají řádově vteřiny až minuty, jiné hodiny až dny. Nejjednodušší je tzv. **katalázová reakce** založená na průkazu enzymu katalázy (štěpí peroxid vodíku). Jinak se často používají reakce, které testují štěpení různých **cukrů**.

## 2.2.4 Pokus na zvířeti

Pokus na zvířeti býval důležitou součástí diagnostiky v začátcích mikrobiologie. Šlo tehdy i o to, prokázat, zda příslušný mikrob vůbec je původcem nemoci – naočkoval se tedy pokusnému zvířeti a čekalo se, zda také u zvířete propuknou příznaky podobné těm u pacienta. Dnes je výjimečný. Nejčastěji se používají **myši, morčata, potkani, králíci**. Význam pokusu na zvířeti klesá s rozvojem modernějších metod i s tím, jak si lidé stále více uvědomují, jak je jeho využívání eticky problematické.

## 2.2.5 Průkaz antigenu

Jedná se o metodu přímého průkazu, avšak způsob provedení je až na technické detaily v podstatě shodný s nepřímým průkazem (průkazem protilátek) – v obou případech se hovoří o tzv. sérologických reakcích. Ty budou proto probrány v další části diagnostiky.

## 2.2.6 Průkaz nukleové kyseliny

Dělí se na **metody bez amplifikace** (klasické genové sondy) a **metody s amplifikací (namnožením) určité sekvence nukleové kyseliny**. Nejpoužívanější je dnes **polymerázová řetězová reakce (PCR)**. Podrobnější popis zde neuvádíme, neboť metoda se široce využívá i mimo mikrobiologii a naleznete ji tedy v jiných předmětech.

## 2.3 Metody nepřímého průkazu mikrobů (přehled a charakteristika)

### 2.3.1 Základní pojmy

**Poznámka:** Kromě metod nepřímého průkazu v tomto textu naleznete z praktických důvodů i jednu z přímých metod – průkaz antigenu, respektive antigenní analýzu.

Tyto takzvané **sérologické metody** jsou metody pracující s reakcí **antigen – protilátka** (za vzniku komplexu). V užším slova smyslu se někdy za sérologické považují pouze ty reakce, kde se jako vzorek používá sérum, popřípadě reakce, kde se hledá protilátka.

Jednotlivé sérologické metody se od sebe liší pouze způsobem, jak je detekován komplex antigenu s protilátkou. Všechny se však dají použít ke všem účelům, dále uvedeným:

#### 2.3.1.1 Průkaz antigenu pomocí protilátky

Použije se laboratorní protilátka (ze séra pokusného zvířete) a smíchá se

- buďto **se vzorkem pacienta**, ve kterém hledáme antigen – jde o **přímý průkaz antigenu**
- nebo **s kmenem**, vypěstovaným z pacientova vzorku – jde o **identifikaci kmene (antigenní analýzu kmene)** – většinou k určení antigenního typu (serotypu) bakterie

#### 2.3.1.2 Průkaz protilátky pomocí antigenu

Použije se **laboratorní antigen** a smíchá se s **pacientovým sérem** (protilátky hledáme v séru)

### 2.3.1.3 Ve všech případech platí, že:

- pokud vznikl komplex antigen-protilátka, je reakce pozitivní
- pokud komplex nevznikl, je reakce negativní (něco v ní chybí; to, co dodala laboratoř, určitě nechybí, chybí tedy to, co „měl dodat pacientův vzorek“)

### 2.3.2 Přehled sérologických metod

- Precipitace
- Aglutinace
- Komplementfixační reakce (KFR)
- Neutralizace
- Reakce se značenými složkami:
  - Imunofluorescence (IMF)
  - Radioimunoanalýza (RIA)
  - Enzymová imunoanalýza (EIA, ELISA)
  - Imunoblotty

Jednotlivé metody se od sebe liší především **způsobem, jak prokazujeme, zda vznikl komplex antigenu s protilátkou**. U nejjednodušších metod je komplex přímo viditelný, u jiných se musí přidávat mnoho různých složek.

### 2.3.3 Jak zjistit u nepřímého průkazu, jestli se jedná o probíhající infekci, nebo o infekci, které proběhla dříve?

Zatímco přímý průkaz (včetně průkazu antigenu a antigení analýzy!) vždy dokazuje přítomnost mikroba, u nepřímého průkazu tomu tak není. **Přítomnost protilátek pouze svědčí o tom, že se organismus někdy s mikroblem setkal**. Přesto je možné aspoň s určitou pravděpodobností říci, jestli se o čerstvou infekci jedná, nebo jestli jsou protilátky nalezené v séru pacienta jen následkem infekce překonané dříve. Je potřeba využít některého z následujících tří způsobů:

**Zištěujeme, jaké je množství protilátek v séru a jestli se mění.** Využívá se toho, že v akutní fázi infekce množství protilátek prudce stoupá, pak zase klesá, a nakonec se udržuje na stálé, nízké hladině. Sleduje se hlavně **změna množství protilátek během dvou či tří týdnů**. Pokud během se během této doby titr zvýší aspoň čtyřikrát (= o dvě ředění, například z 20 na 80), jde velmi pravděpodobně o akutní infekci. Pouhé dvojnásobné zvýšení (= o jedno ředění) může být náhodné.

**Zištěujeme, k jaké třídě patří nalezené protilátky** – to ovšem umožňují pouze reakce se značenými složkami. Převaha třídy IgM nad třídou IgG svědčí pro akutní infekci

**Zištěujeme tzv. aviditu**, to je síla vazby protilátky na antigen