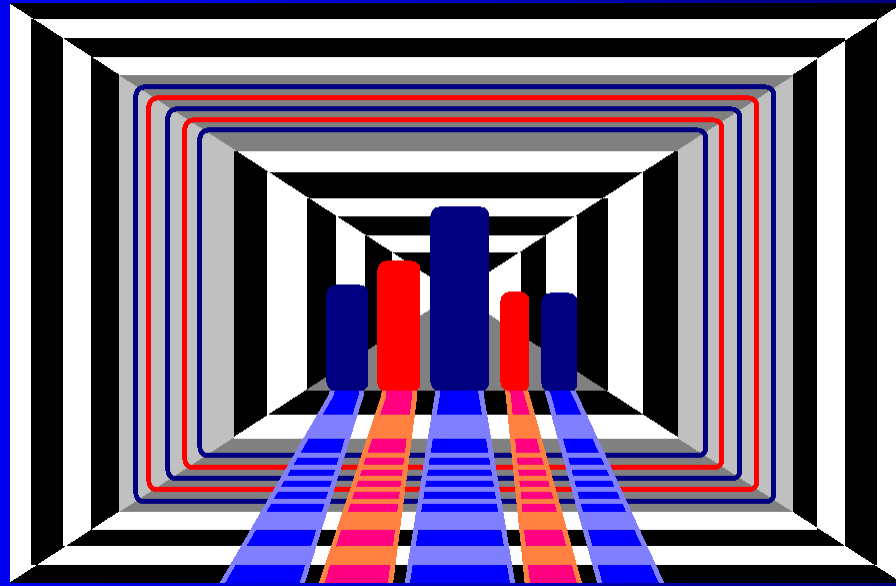


Přehled mikrobiologických vyšetřovacích metod



Orální mikrobiologie – BHOM011s

Týden 2

Ondřej Zahradníček

O co se snaží laboratoř klinické mikrobiologie

- 1. Odhalit původce nemoci (patogena** – ne tedy jakéhokoli mikroba náhodou přítomného v těle)
- 2. Někdy také: zjitit citlivost patogena** na antimikrobiální látky (*dělá se u bakterií a kvasinek, nedělá se u parazitů a vláknitých hub, u virů je to zatím ve fázi výzkumu*)
- 3. Někdy také: určení faktorů virulence** (např. u střevní anaerobní bakterie *Clostridium difficile* je nález bakteriálního toxinu (jedu) důležitější než samotný nález bakterie, která se v malých množstvích vyskytuje i ve střevě zdravých lidí a nemusí nutně škodit)

Co potřebuje mikrobiologická laboratoř, aby mohla tyto cíle plnit?

- Ve většině případů pro zjištění patogena, jeho faktorů virulence a citlivosti na antimikrobiální látky, není potřebná přítomnost celého živého pacienta. Stačí, když se pacientovi odebere tzv. **klinický vzorek**
- **Vzorek obecně** je cokoli, co přichází do jakékoli laboratoře k vyšetření (například vzorek horniny, vzorek pitné vody, vzorek etanolu vyšetřovaného na přítomnost metanolu...) – v klinické mikrobiologii ale tyto vzorky nepřípadají většinou v úvahu, a proto se většinou pojem **vzorek** ztotožňuje s pojmem **klinický vzorek**

Co může sloužit jako klinický vzorek

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

- **kusový či tekutý materiál ve zkumavce** či jiné nádobce (krev, sérum, moč, hnis...)
- **stěr či výtěr na vatovém tamponu**, obvykle zanořeném do transportního média
- **občas i něco jiného** (otisk tkáně, nátěr na sklíčko)

Typický je případ, kdy jako vzorek použito něco, co by mohlo/mělo obsahovat hledané patogeny (u močové infekce moč, u angíny výtěr z krku a podobně). Toto neplatí u tzv. nepřímého průkazu, o kterém bude řeč dále

Typické vzorky v orální mikrobiologii

- Typickým vzorkem v orální mikrobiologii je **výtěr z dutiny ústní**, zpravidla zanořený do transportní půdy, aby hledané mikroby neuhynuly
- Je také možno posílat různé **otisky a nátěry na sklíčka**, a v případě hnisavých ložisek z okolí ústní dutiny také přímo **hnis** z těchto ložisek

Pracuje mikrobiolog přímo se vzorkem?

- V některých případech opravdu mikrobiolog může pracovat s **celým vzorkem**. Vzorek vhodným způsobem zpracuje a pozoruje v mikroskopu, hledá v něm tzv. mikrobiální antigeny nebo nukleovou kyselinu, nebo ho umístí na kultivační půdu k pěstování mikrobů
- Jindy je nejprve nutno ze vzorku (který obsahuje i pacientovy buňky a mikrobů tam může být víc najednou) izolovat **čistou kulturu jediného mikroba** (většinou bakterie nebo kvasinky) – takové čisté kultuře říkáme **kmen**

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.

Kochův objev, 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

**česky chrchel*

Přehled metod

- **Metody přímé:** Hledáme mikroba, jeho část či jeho produkt
 - **Přímý průkaz ve vzorku** – pracujeme s celým klinickým vzorkem
 - **Identifikace kmene** – určení kmene (izolátu) vypěstovaného na pevné půdě
- **Metody nepřímé:** Hledáme výsledky imunitní reakce pacientova těla, většinou **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**

*a další podobné identifikační metody

**netýká se molekulární epidemiologie – sledování příbuznosti kmenů

1. Mikroskopie

Co vidíme v mikroskopu

- **V případě mikroskopování kmene** vidíme jeden typ mikrobiálních buněk (například samé fialové kuličky nebo červené čárky)
- **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 a další buňky
 - **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 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

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.

Mikroskopie vzorku

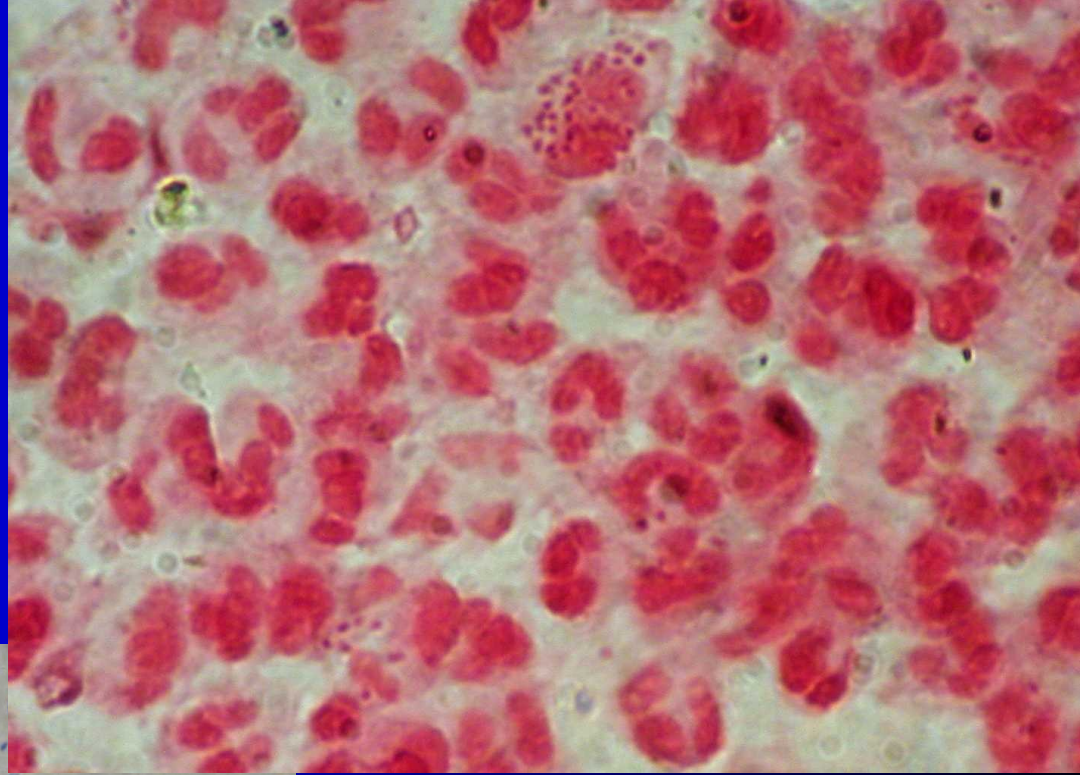
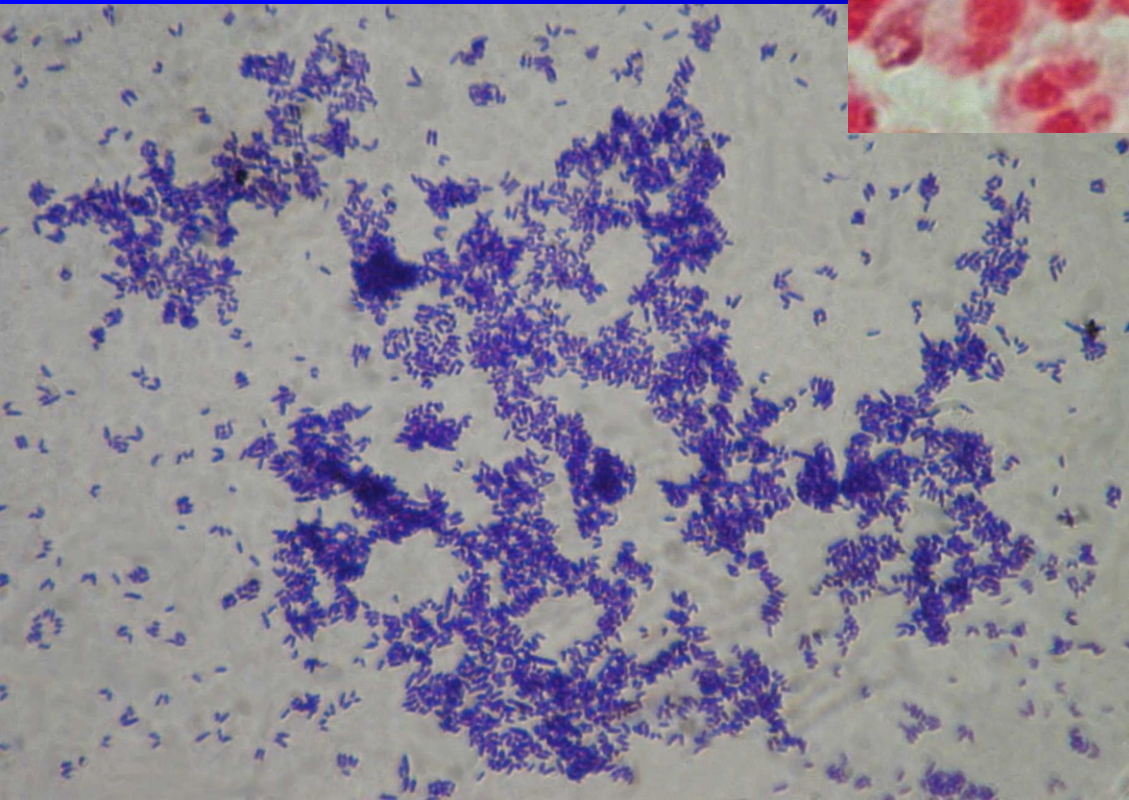


Foto: archiv MÚ



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 (teplota) jsou dány **nastavením termostatu**, 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?
 - 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

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** (co je to kolonie – viz dále) 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

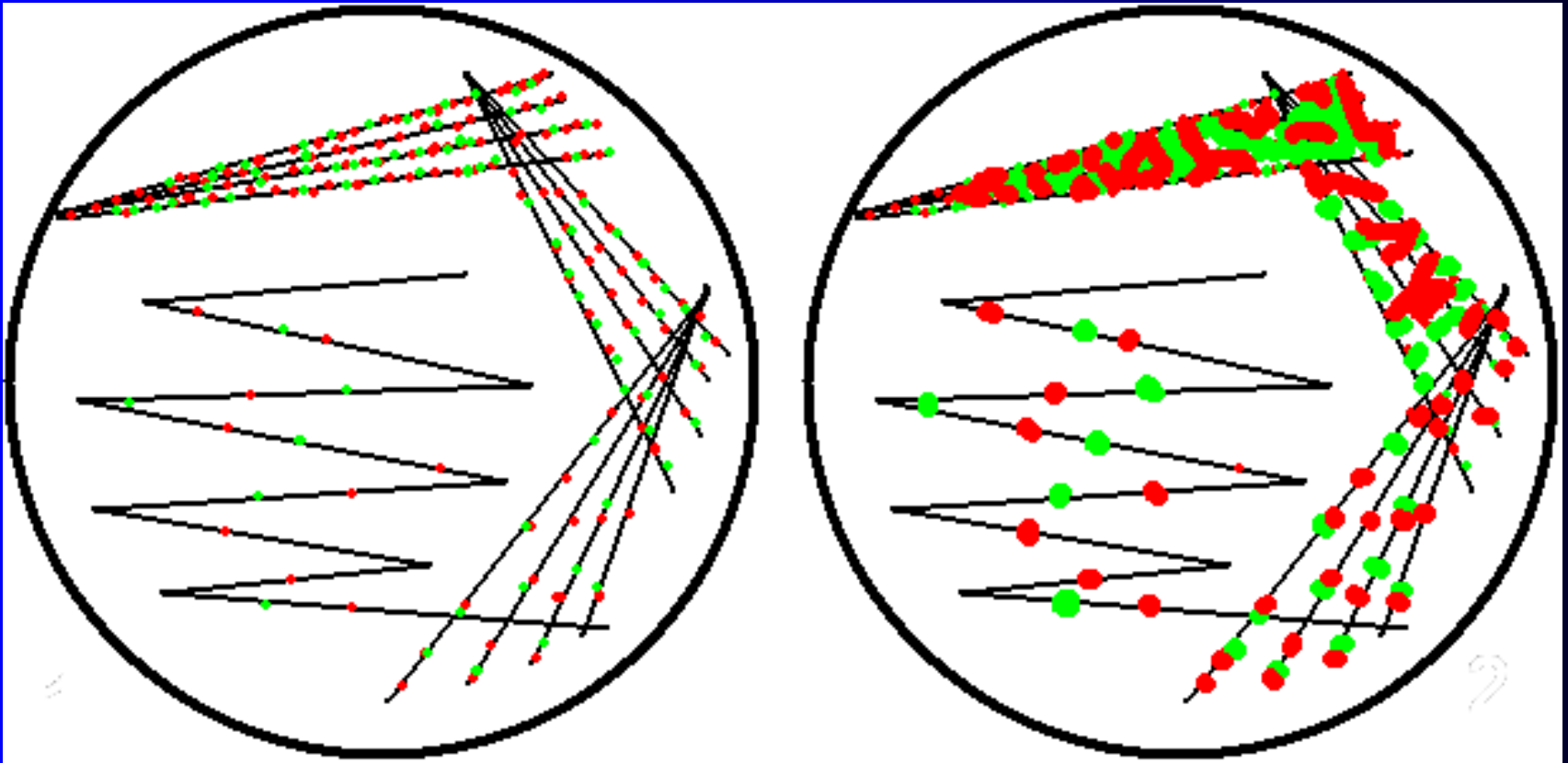
- Základem je opět masopeptonový bujón, ale navíc obsahují výtažek z agarové řasy. Používala se i želatina, ale neosvědčila se tolik jako agar.

- 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.**

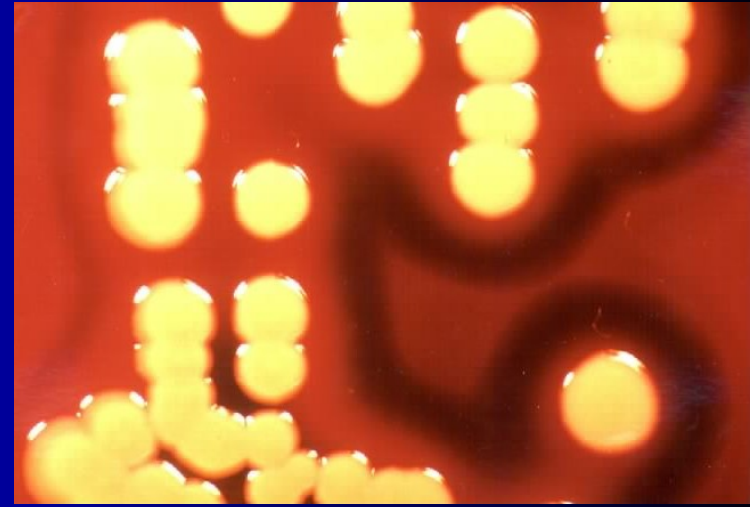
Foto: www.medmicro.info



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 útvar 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

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 = diagnostická)
- **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

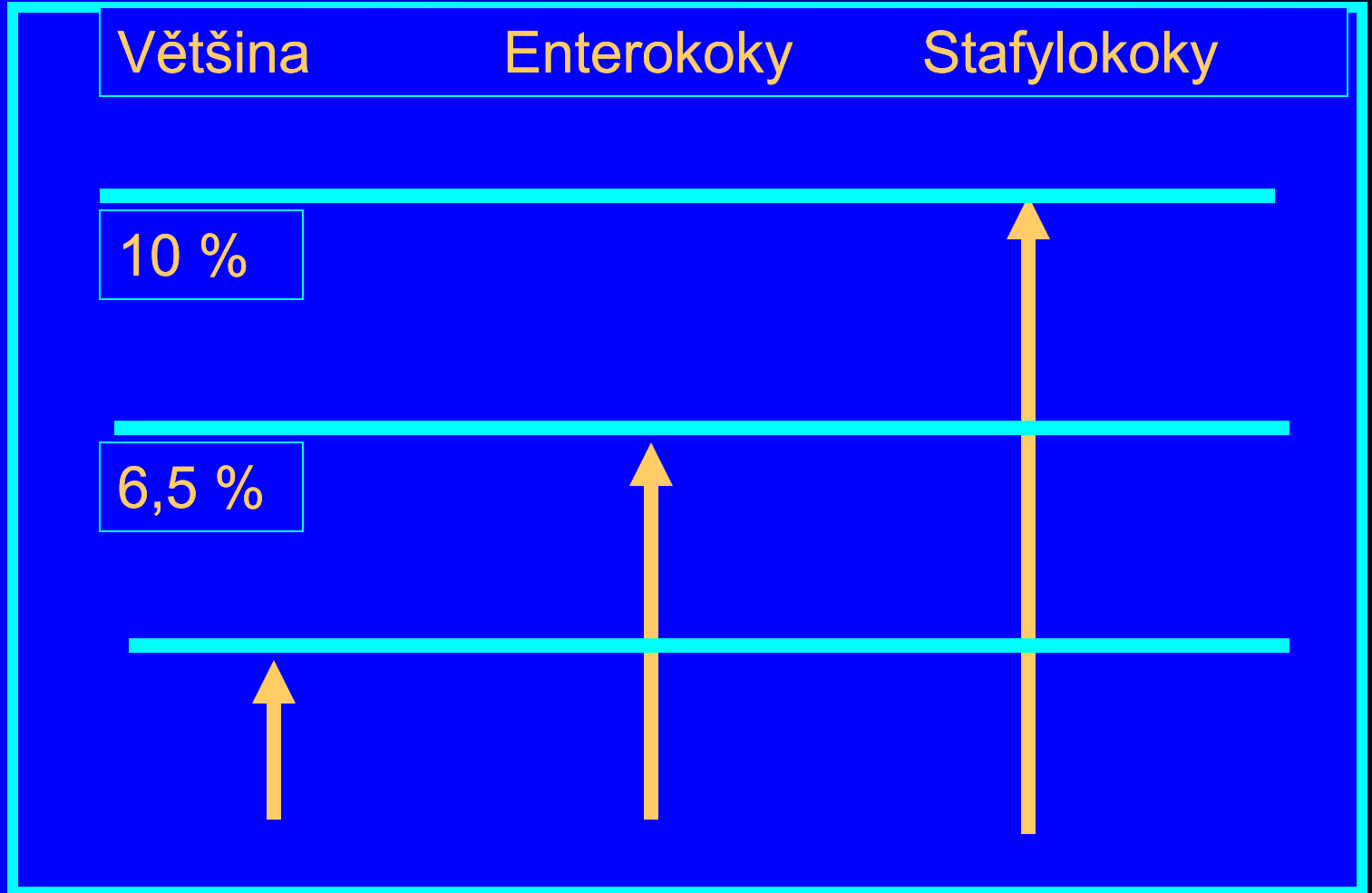
- Nepotlačují růst žádného mikroba
- Zato díky svému složení **rozlišují mikroby podle určité vlastnosti**
- Příkladem je **krevní agar** ke sledování hemolytických vlastností a **VL krevní agar** (podobný, ale na anaeroby)
- Zvláštním případem půdy chromogenní a fluorogenní



Pevné selektivní půdy

- Účelem je **selektovat (vydělít) ze směsi bakterií** pouze určitou skupinu nebo skupiny
- Příkladem je **agar pro stafylokoky s 10 % NaCl**. *(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. **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)



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

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

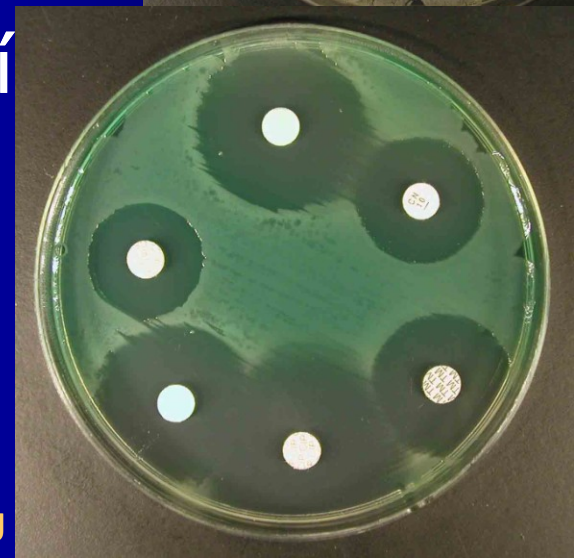
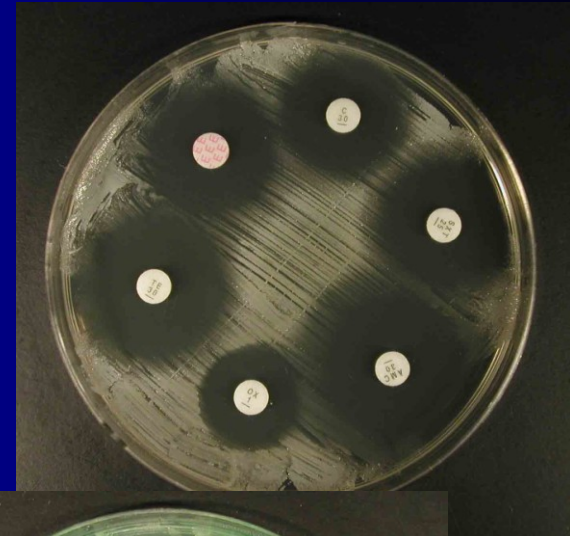
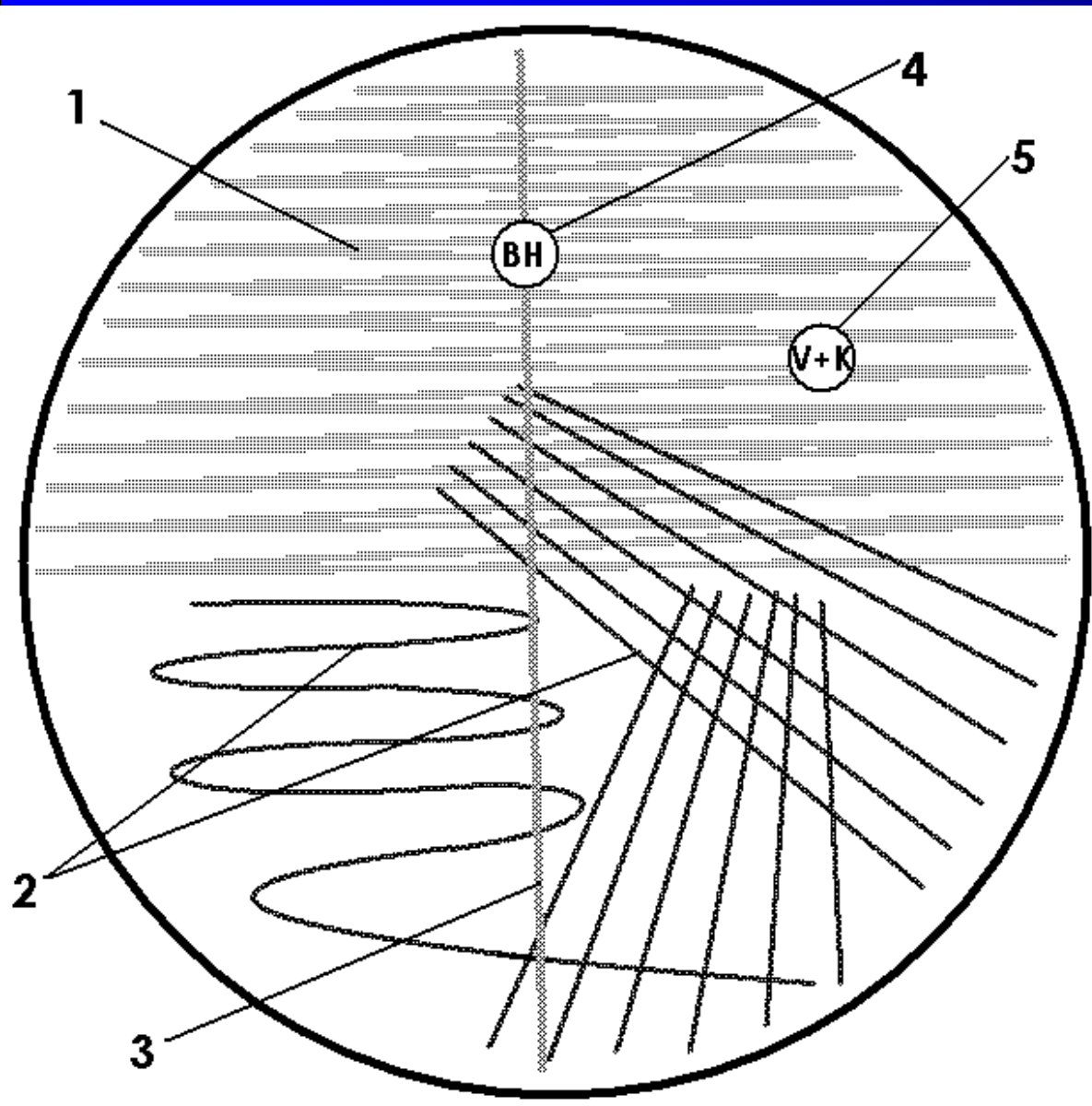


Foto: archiv MÚ

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

- Obecný princip je téměř vždy stejný: Bakterii předložíme určitý **substrát** a zkoumáme, 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. 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

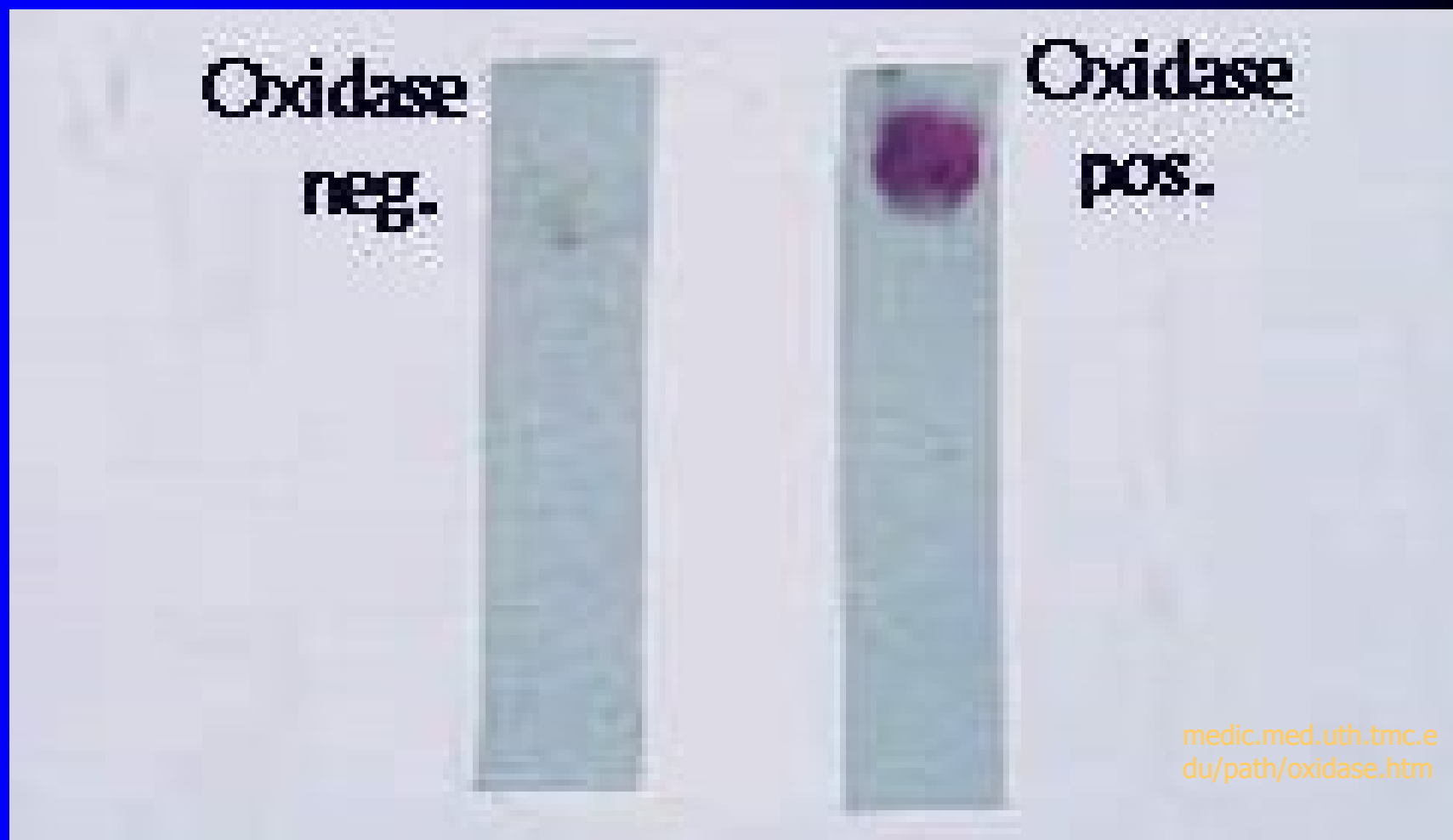
Catalase +



Catalase -



Příklady dalších testů: oxidázový test (diagnostický proužek)

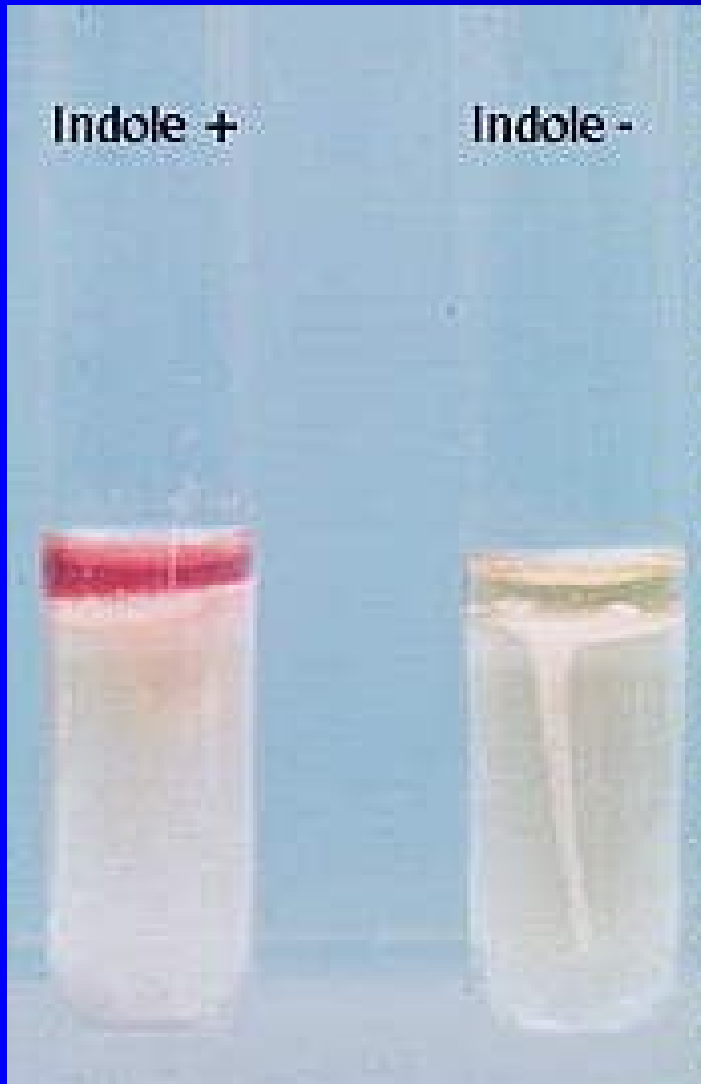


Provedení testu v praxi



Foto: archiv MÚ

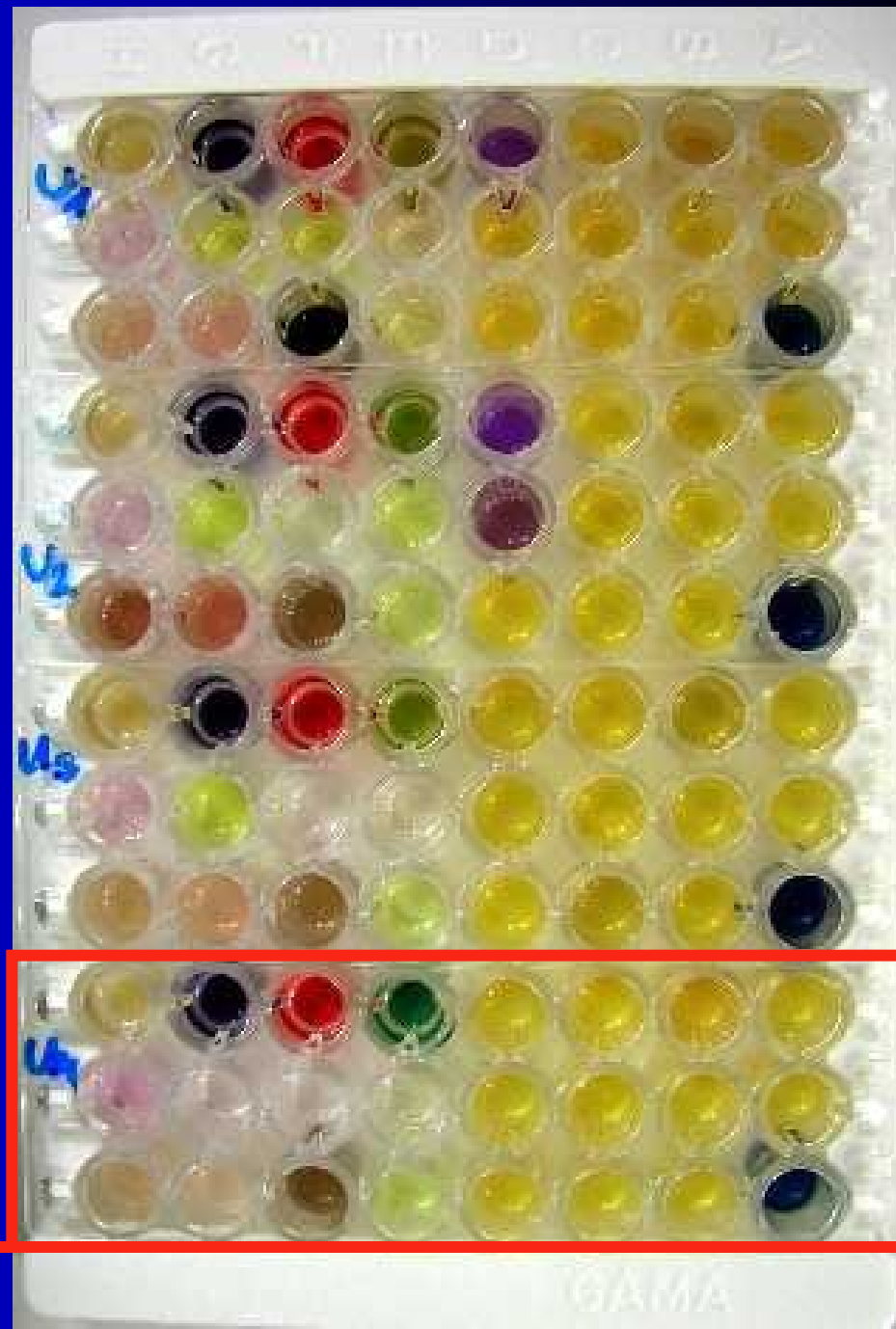
...a další testy



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 nebo lyofilizovaný, bakterie se nejprve rozmíchá ve fyziologickém roztoku nebo suspenzním médiu a pak se kape či lije do důlků – tím okamžikem začne reakce

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

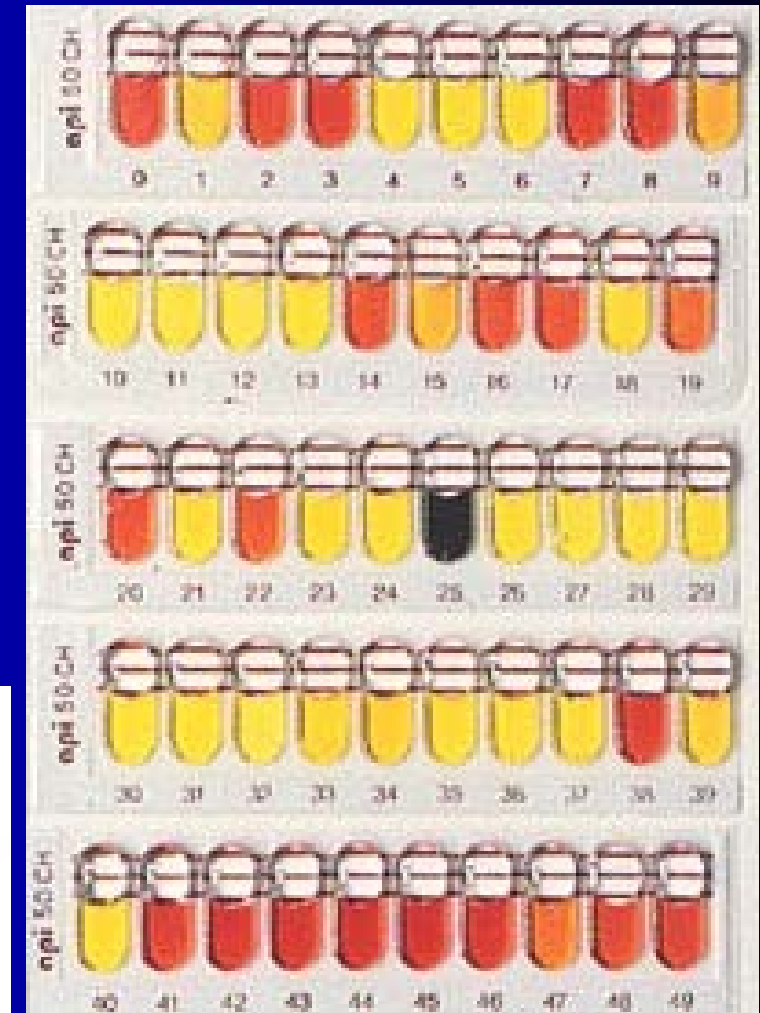


Zahraniční soupravy

www.ilexmedical.com/products_engl/api.htm



Foto: O. Z.



www.ilexmedical.com/products_engl/api.htm

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





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

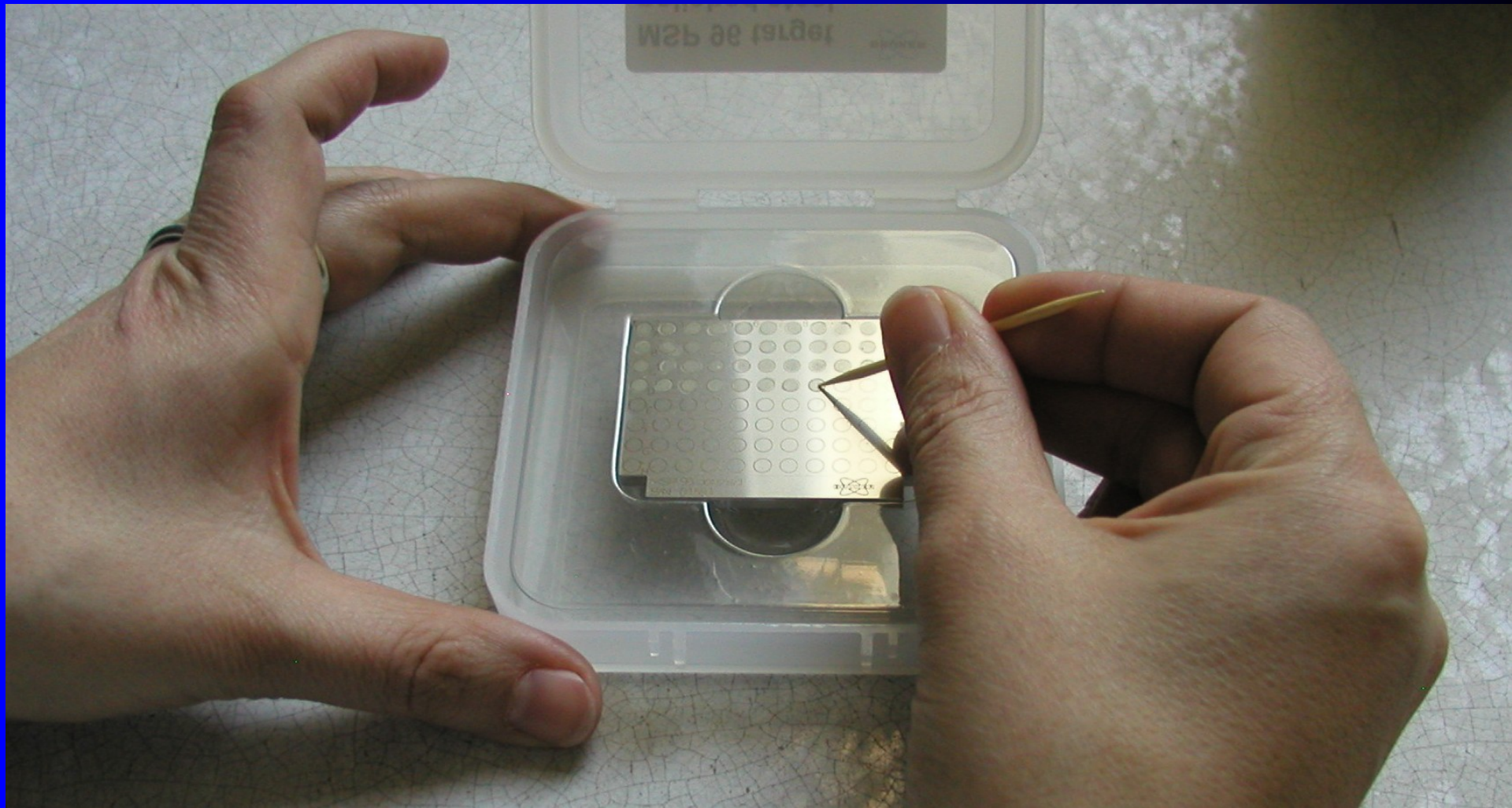


Foto: archiv MÚ

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.



5. Průkaz nukleové kyseliny

Průkaz nukleové kyseliny

- **metody bez amplifikace nukleové kyseliny** (např. 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

Antigen a protilátka

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**)

Ještě jednou – co je to tedy antigen
a co je to protilátka:

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

Protilátka je **bílkovina** (gamaglobulin, imunoglobulin), která **vznikla v hostitelském organismu**, který byl „drážděn“ antigenem

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

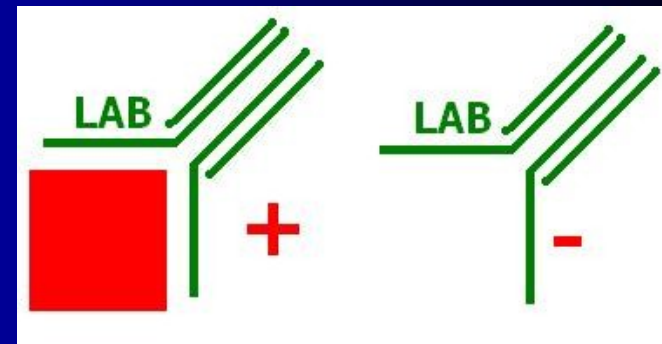
Jak si to představit

- 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!**

Protilátku antigenem, nebo antigen protilátkou?

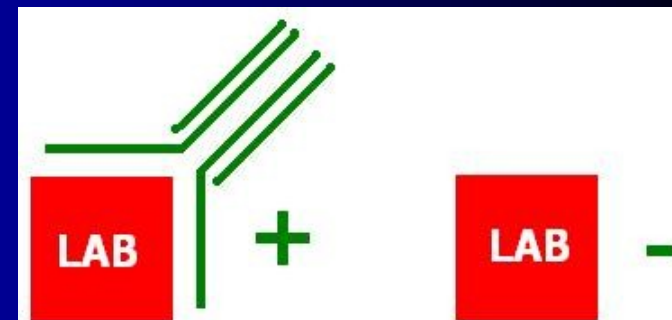
Průkaz antigenu: laboratorní protilátky (zvířecího původu) + vzorek pacienta nebo kmen mikroba.

Přímá metoda



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

Nepřímá metoda



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)

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

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

Nemá protilátky jen proto, že nemoc prodělal kdysi dávno?

- Po nákaze protilátky **přetrvávají dlouhodobě, někdy celoživotně**. Samotný nález protilátek tedy neznamena, 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)

Čerstvá, nebo dávno prodělaná nákaza?

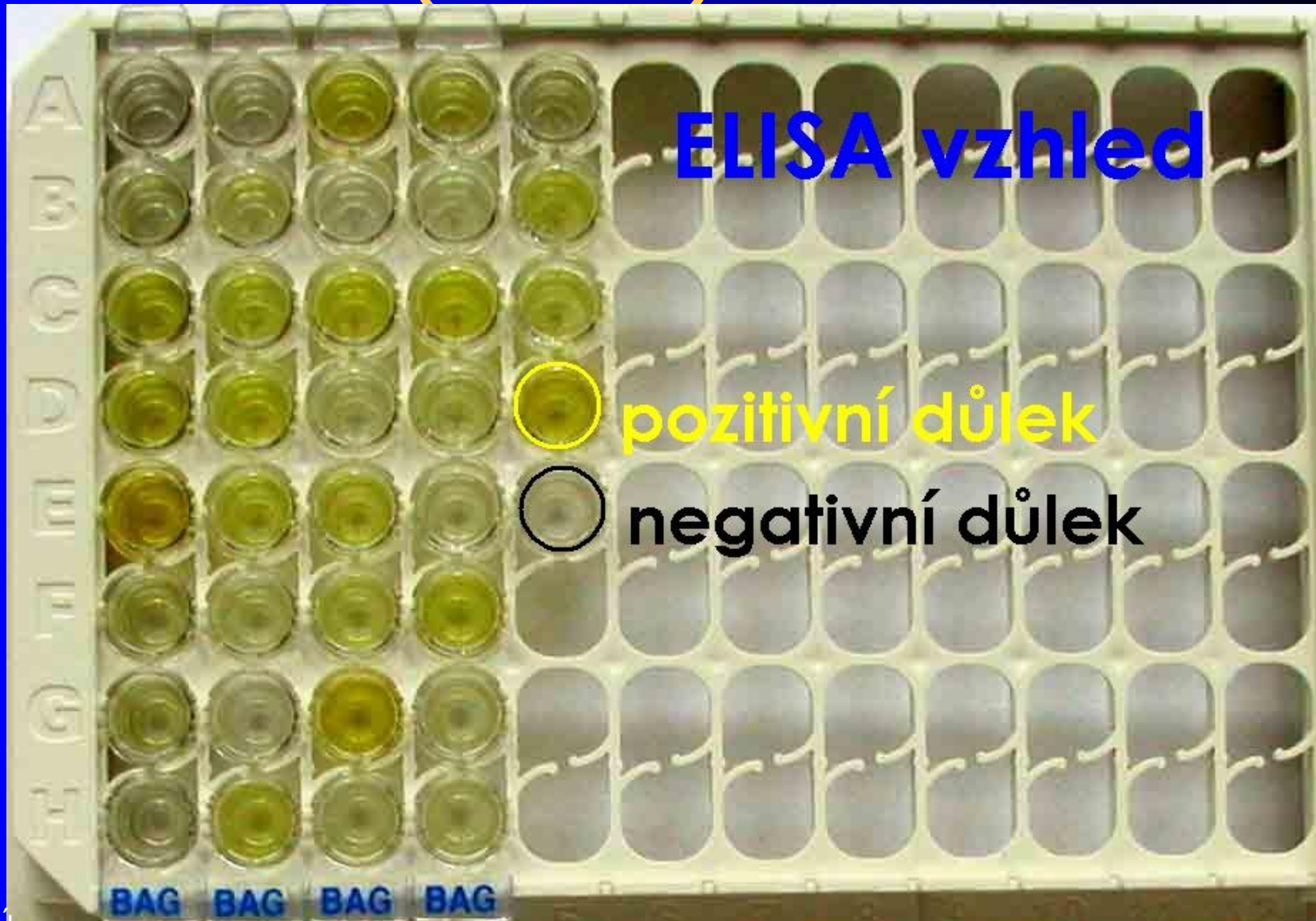
- Po nákaze přetrvávají protilátky dlouhodobě, někdy celoživotně. Samotný nálezn protilátek tedy tolik neznamena. Pro rozlišení čerstvé x dávno prodělané nákazy se používá:
 - **zjištění množství protilátek** (jako tzv. titru) a **změna tohoto množství v čase** (dynamika titru; za významnou se považuje 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 jiné serologické reakce (ELISA)



Nespecifické antigeny a heterofilní protilátky

I v životě se stává, že někdy lze otevřít zámek bez klíče, má-li například zloděj vhodný paklíč. Podobné situace nastávají i v případě reakce antigen-protilátka:

- **Nespecifický antigen** (například u tzv. Paul-Bunnellovy reakce k průkazu infekční mononukleózy): 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 (průkaz takovýchto protilátek se využívá například při diagnostice 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)
 - Imunoblotty (= 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 PRACOVNÍŠTĚ

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...

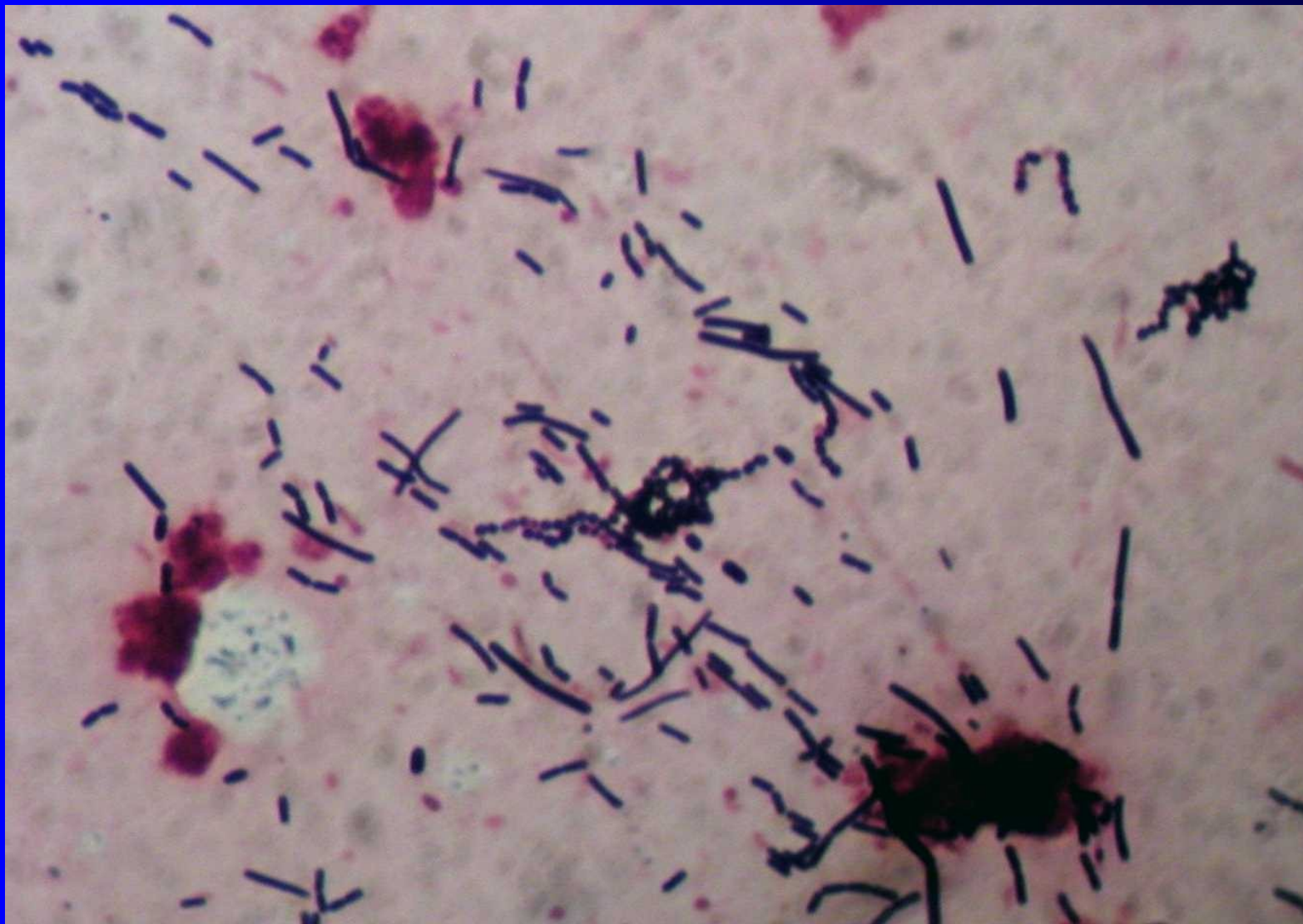


Foto: O. Z.