

Mikroby lidského těla – téma P2 – protokol pro praktické cvičení

Modul A: nepřímý průkaz mikrobů

Společně všem těmto metodám je, že nehledáme přímo mikroby, ale stopu po jejich přítomnosti v těle v podobě protilátek. Dělá se to tehdy, když přímý průkaz je obtížný nemožný, buď proto, že mikroba lze jen obtížně pozorovat v mikroskopu a kultivovat, nebo proto, že nevíme, kde přesně v těle mikrob je, a tak není možné odebrat vzorek, ve kterém bychom ho mohli dokazovat. Nepřímý průkaz má tu výhodu, že bez ohledu na to, kde se mikrob nachází, použijeme vždy jeden typ vzorku – sérum (tj. to, co zůstane z krve, když se srazí krvinky a složky koagulační kaskády). Na druhou stranu má nepřímý průkaz i nevýhodu: protilátky jsou v těle i dlouho po prodělané nemoci. Proto se snažíme zjistit nejen to, jestli protilátky v těle jsou anebo nesou, ale také kolik jich je a jak se jejich množství změní v čase, případně také ke které třídě patří.

A1 – Stanovení protilátek proti viru klíšťové encefalitidy tzv. komplementfixační reakcí

Komplementfixační reakce má poměrně složitý princip, který není třeba znát. Pro naše účely stačí vědět, že v reakci používáme ovčí červené krvinky, a že tyto krvinky v pozitivním případě sedají na dno důlku (je vidět červená tečka), kdežto v negativním se rozloží (není vidět nic, resp. ve skutečné reakci by byla vidět růžová tekutina; z pochopitelných důvodů uvidíte pouze model, v mikrotitrační destičce jsou místo skutečných červenýchrvinek tečky barvy).

Množství protilátek v séru neurčujeme v miligramech nebo milimolech na litr, ono to ani nejde. Určujeme takzvaný titer, to je nejvyšší ředění séra, které ještě reaguje s příslušným antigenem. Čím vícrát se sérum nechá zředit, aby ještě reagovalo (= čím je vyšší titer), tím více je v séru protilátek. V našem případě je titer takové ředění protilátek, při kterém je v příslušném důlku ještě pozitivní reakce (tečka), ale v následujícím důlku už je reakce negativní (tečka chybí). Hodnotí se ale nejen titer, ale i jeho změna za dva týdny; většinou se první sérum uschová a vyšetří se zároveň s druhým. Na destičce máte první sérum vždycky označené „I“ a druhé sérum „II“. Porovnává se vždycky sérum „I“ a sérum „II“ od stejného pacienta. Za **čerstvou infekci** lze považovat případ, kdy

- V prvním vzorku séra ještě protilátky nejsou (ještě se nestihly vytvořit), ve druhém ano. Nebo
- Protilátky jsou v obou vzorcích, ale ve druhém je jich nejméně čtyřikrát víc než v prvním. Nebo
- Protilátky jsou v obou vzorcích, ale ve druhém je jich nejméně čtyřikrát méně než v prvním. Nebo

Pokud protilátky sice jsou v obou vzorcích, ale je jich málo a jejich množství se nemění (nebo se změní jen dvakrát, což může být náhodný výkyv), interpretuje se výsledek jako **prodělaná (nikoli čerstvá) infekce**.

V prvním sloupci je takzvaná kontrola antikomplementarity. Pokud by někde v ní byla tečka, znamenalo by to, že sérum bylo špatné a výsledek nelze hodnotit. Od druhého sloupce začíná ředění séra od 1 : 10 dále.

Zakreslete výsledek, запиšte titry a jejich případné vzestupy či poklesy. U negativních sér (v řádku není vůbec žádná tečka) titer proškrtněte a výsledek interpretujte jako negativní. Pokuste se interpretovat průkaz protilátek u šesti pacientů. Až pak otevřete list se správnou interpretací a запиšte případné opravy.

Pacient								vzestup/pokles (kolikrát)	Váš závěr	Případná oprava závěru
		1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320			
Karel	I	○	○	○	○	○	○	TITR = 1:		
	II	○	○	○	○	○	○	TITR = 1:		
Ludmila	I	○	○	○	○	○	○	TITR = 1:		
	II	○	○	○	○	○	○	TITR = 1:		
Marek	I	○	○	○	○	○	○	TITR = 1:		
	II	○	○	○	○	○	○	TITR = 1:		
Nataša	I	○	○	○	○	○	○	TITR = 1:		
	II	○	○	○	○	○	○	TITR = 1:		
Oldřich	I	○	○	○	○	○	○	TITR = 1:		
	II	○	○	○	○	○	○	TITR = 1:		
Petronela	I	○	○	○	○	○	○	TITR = 1:		
	II	○	○	○	○	○	○	TITR = 1:		

A2 – Stanovení protilátek proti prvokovi *Toxoplasma gondii* reakcí ELISA

Reakce ELISA patří k modernějším reakcím, než je komplementfixace. Umí rozlišit protilátky různých tříd. Z toho důvodu se u ní zpravidla nepočítají titry. Reakce se opět provádí v plastové mikrotitrační destičce, tentokrát se ale se sérum každého pacienta pracuje jen v jediném důlku. Pozitivní reakce se projeví barevnou změnou. Míra této barevné změny se odečítá ve spektrofotometru jako absorbance. Tím se tedy barevnost převede na určité číslo. Odečítající pak už nepracuje s původní destičkou, ale se „sjetinou“ ze spektrofotometru. Tuto „sjetinu“ budete mít k dispozici i vy.

Destička vždycky obsahuje od výrobce dané kalibrační hodnoty, takzvané „cut off“, tedy hodnota, nad kterou je reakce pozitivní a pod kterou negativní. Většinou je „cut off“ ve dvou důlcích a pro další vyhodnocení se pracuje s jejich průměrem.

Zkuste tedy spočítat cut off (jako průměr obou důlků „c. o.“), prověřit, jestli je pozitivní kontrola opravdu pozitivní (= vyšší než cut off) a jestli je negativní kontrola opravdu negativní (= nižší než cut off). Poté porovnejte s hodnotou cut off i absorbance pacientů. To vše proveďte pro IgA (u toxoplasmosy se vyšetřují místo IgM, také znamenají čerstvou infekci) a IgM.



K jednotlivým pacientům máte ještě k dispozici následující údaje

P: screening u 29leté těhotné ženy, bez klinických potíží, doma dvě kočky

Q: screening u jiné, 24leté těhotné ženy, rovněž bez klinických potíží, kočky nemá

R: 21letá studentka, trávící svůj volný čas putováním po lese, žádné kočky, před dvěma týdny únavnost, zvětšené lymfatické uzliny

S: 65letý důchodce, žije na vesnici, jeho koníčkem je práce na zahradě, přes kterou často chodí kočky; symptomatologie chorioretinitidy, jiní v úvahu přicházející původci kromě *Toxoplasma* již vyloučení

C. O. =		C. O. =	
K+ OK?	K- OK?	K+ OK?	K- OK?
			
Z á v ě r		Případná oprava závěru	

Modul B: testování antibiotické citlivosti

B1 – Difusní diskový test

Je to nejběžněji používaný test, ve kterém se porovnávají velikosti zón s tzv. referenční zónou citlivosti.

Pokud je naměřená zóna větší než hraniční, dá se kmen považovat za citlivý, pokud je menší, je rezistentní

Vyhodnoťte citlivost na jeho antibiotika pro dva kmeny na stejnou sestavu antibiotik (do „citlivý či rezistentní“ pište „C“ nebo „R“)

Zkratky a názvy antibiotik	Kmen A			Kmen B		
	Hraniční zóna	Naměřená zóna	Citlivý či rezistentní	Hraniční zóna	Naměřená zóna	Citlivý či rezistentní
Zóny se měří v milimetrech, a jde o průměry, nikoli poloměry!						

B2 – Mikrodiluční test

Diluční mikrometodou (mikrodilučním testem) stanovujeme MIC v destičkách, jejichž důlky obsahují stoupající koncentrace antimikrobiálních látek. Destička se naočkuje suspenzí testovaného kmene bakterie a kultivuje se přes noc při 37 °C. Růst bakterie se projeví zákalem v důlcích destičky nebo tečkou ze sedimentovaných bakterií. (V našem případě je zákal znázorněn zelenou tečkou) První jamka, v níž došlo k inhibici růstu a která je tudíž bez zákalu, udává MIC daného antibiotika.

- ❖ Zakroužkujte všechny „čisté“ důlky (tj. bez zákalu, respektive bez tečky)
- ❖ Dvojitým kroužkem označte nejspodnější z důlků bez zákalu (minimální inhibiční koncentrace)
- ❖ Pro každé antibiotikum porovnejte hodnotu MIC s breakpointem (označeno >X<) a rozhodněte, zda je daný kmen na dané antibiotikum citlivý (C) nebo rezistentní (R).
- ❖ Pokud jsou u určitého antibiotika všechny důlky zakalené, nezakroužkovávejte nic a napište „R“. MIC je v tomto případě vyšší než nejvyšší hodnota zapsaná v tabulce.
- ❖ Pokud není u určitého antibiotika zakalený žádný důlek, zakroužkujte všechna čísla a dvakrát zakroužkujte nejspodnější, přestože skutečná hodnota MIC může být ještě nižší. Kmen je v takovém případě samozřejmě „C“.
- ❖ Napište plná jména antibiotik, запиšte, do které skupiny patří a jaké jsou vedlejší účinky při léčbě těmito preparáty (dle listů, které máte na stole)

Atb	AMP	AMS	CZL	CRX	CXT	GEN	COT	COL	OXO	OFL	TET	AZT
Koncentrace (mg/l)	32	64	64	64	64	32	128	32	64	16	32	KR
	16	32	32	32	32	16	>64<	16	32	8	16	64
	>8<	>16<	16	16	16	>8<	32	>8<	>16<	>4<	8	32
	4	8	>8<	>8<	>8<	4	16	4	8	2	>4<	>16<
	2	4	4	4	4	2	8	2	4	1	2	8
	1	2	2	2	2	1	4	1	2	0.5	1	4
	0.5	1	1	1	1	0.5	2	0.5	1	0.25	0.5	2
	0.25	0.5	0.5	0.5	0.5	0.25	1	0.25	0.5	0.125	0.25	1
C/R?												

KR = kontrola růstu (má být vždy zakalená, není tam žádné antibiotikum)

Vysvětlení zkratk antibiotik

Zkr.	Celý název preparátu	Skupina	Nežádoucí vedlejší účinky (jsou-li)
AMP			
AMS			
CZL			
CRX			
CXT			
GEN			
COT			
COL			
OXO			
OFL			
TET			
AZT			

B3 – E-test

Prohlédněte si materiály týkající se E-testů a zakreslete si do následujícího obrázku tvar zóny citlivosti při E-testu.

