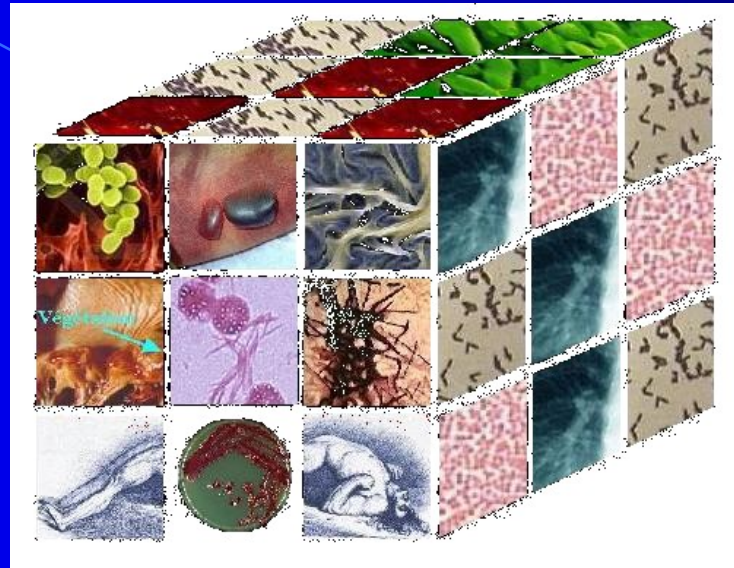


Úvod k prvnímú praktiku



Mikrobiologie a imunologie – RV2BP_MIKR

Ondřej Zahradníček

zahradnicek@fnusa.cz, 777 031 969

Diagnostika mikrobů

Cíle mikrobiologické diagnostiky

Odhalení původce nemoci (patogena)

Někdy: zjištění citlivosti patogena na antimikrobiální látky (*hlavně u bakterií a kvasinek, nedělá se u parazitů a vláknitých hub, u virů je to ve fázi výzkumu*)

Někdy také: určení faktorů virulence

Co je to vzorek

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

- **kusový či tekutý materiál ve zkumavce** či jiné nádobce (krev, sérum, moč...)
- **stěr či výtěr na vatovém tamponu**, obvykle zanořeném do transportního média.

Při diagnostice někdy pracujeme s celým vzorkem. Jindy je nutno získat ze vzorku kmen nebo kmeny patogenních mikrobů.

Co je to kmen

Kmen je čistá kultura („výpěstek“) jednoho druhu mikroba

Kmen získáme jedině kultivací (pěstováním) mikroba na pevné půdě.

Kochův objev, že bakterie lze takto pěstovat, měl zásadní význam v dějinách mikrobiologie.

Přehled metod

- **Metody přímé:** Hledáme mikroba, jeho část či jeho produkt
 - Přímý průkaz ve vzorku – pracujeme s celým vzorkem
 - Identifikace kmene – určení vypěstovaného izolátu
- **Metody nepřímé:** Hledáme 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*

*netýká se molekulární epidemiologie – sledování příbuznosti kmenů

Modul A

Mikroskopie

Co vidíme v mikroskopu

- **V případě mikroskopování kmene** vidíme jeden typ mikrobiálních buněk
- **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
 - **jiné struktury**, např. fibrinová vlákna, buněčnou drť (detritus) a podobně

Gramovo barvení

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

Gramem se nebarvící bakterie se neobarví v prvním kroku kvůli absenci buněčné stěny (*Mycoplasma*) nebo proto, že jejich stěna je vysoce hydrofobní (*Mycobacterium*).

Spirochety by se barvily gramnegativně, ale jsou velmi tenké, takže i je lze také vlastně považovat za „Gramem se nebarvící“ a Gram se v jejich diagnostice nepoužívá.

A1: Mikroskopie kmene

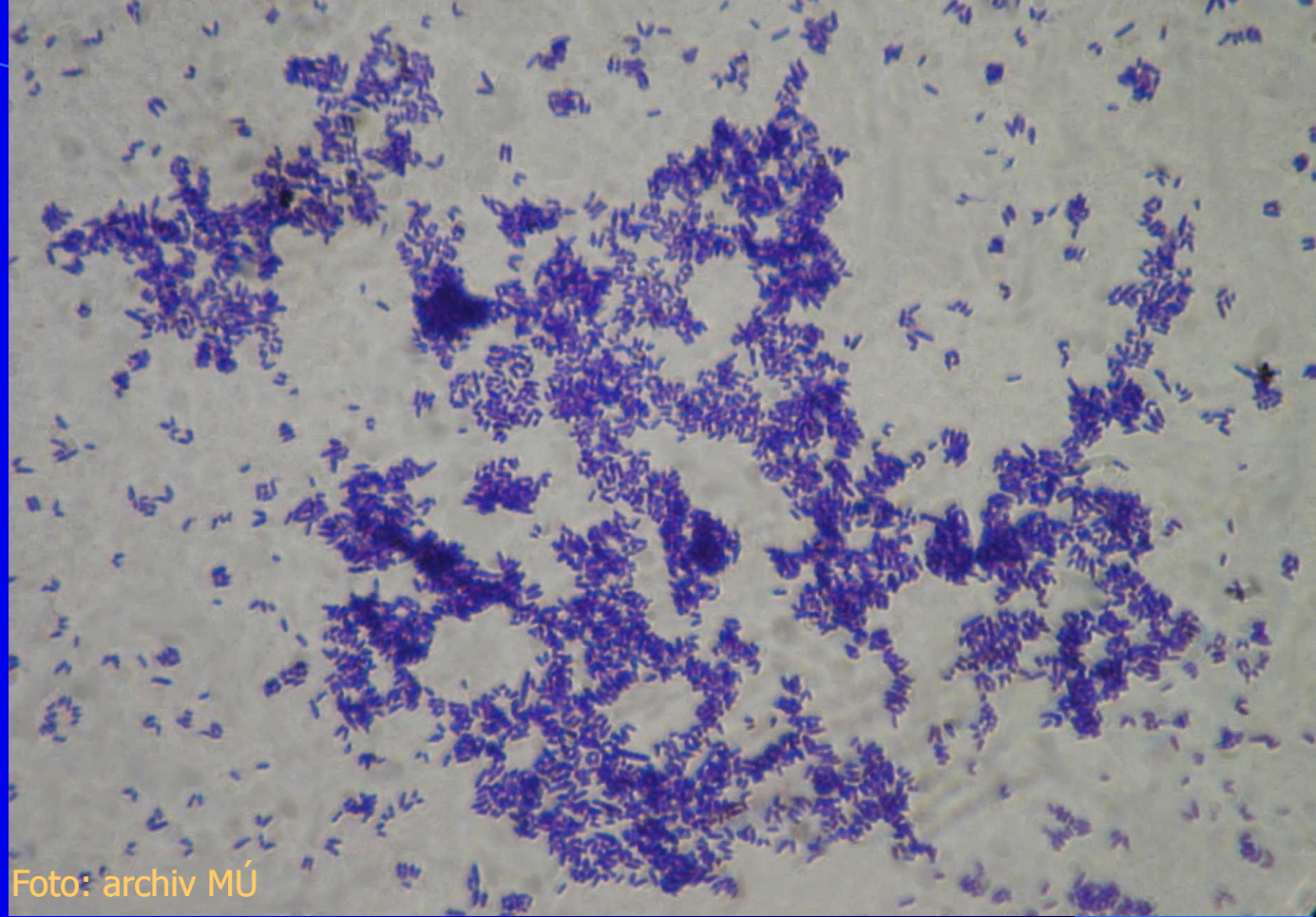


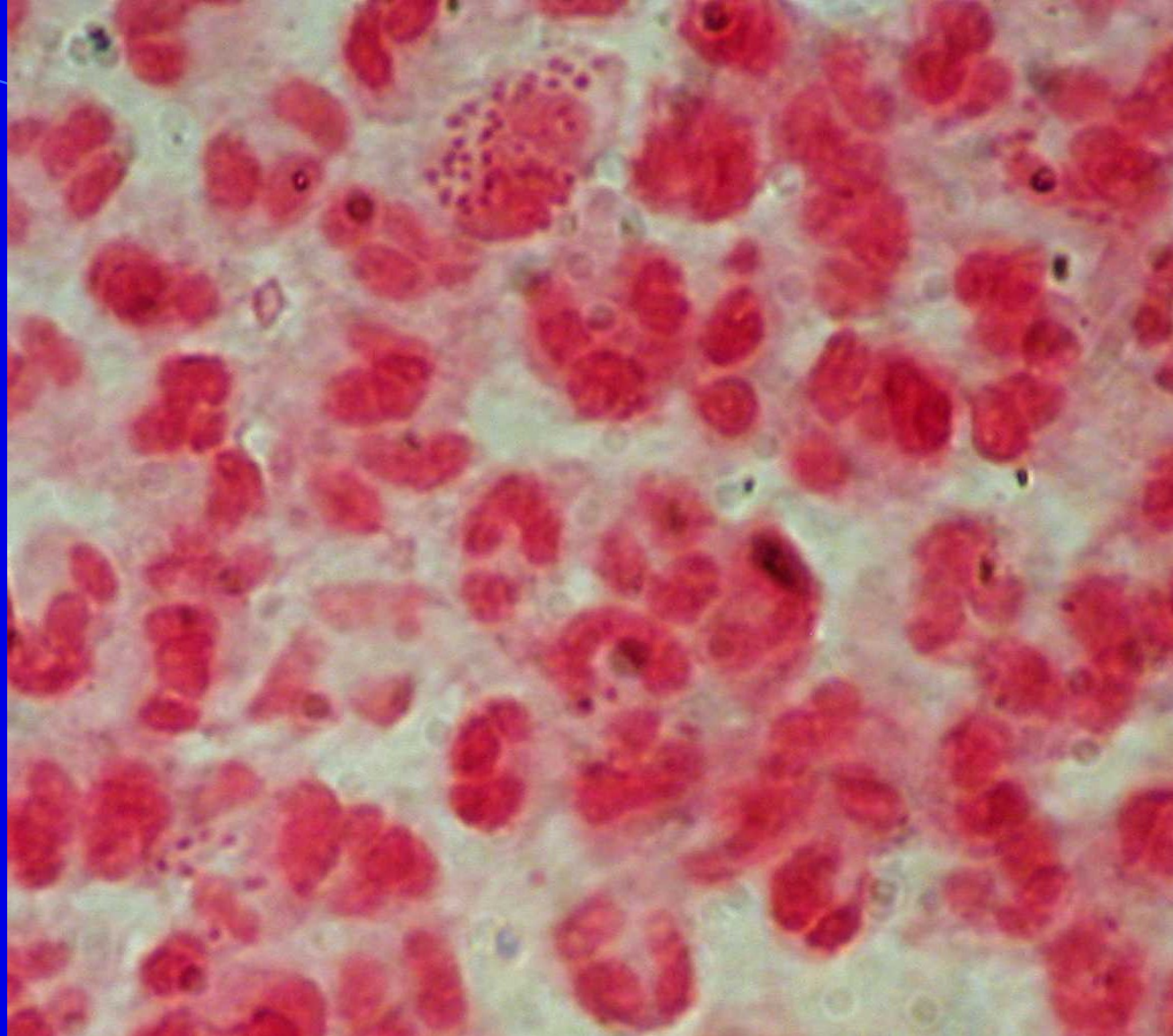
Foto: archiv MÚ

Prohlédněte si preparáty čtyř různých kmenů bakterií (A, B, C, D) a kmene kvasinky (E).

Bakterie budou koky i tyčinky, G+ i G-; šikovní a pozorní studenti uvidí v G+ tyčinkách i spory

Foto: archiv MÚ

A2: Mikroskopie vzorku



Prohlédněte si dva vzorky. První je nátěr sputa, druhý nátěr hnisu z močové trubice muže s kapavkou

Modul B: Kultivace + PCR

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

Připravené kultivační
půdy se uchovávají
v chladničce

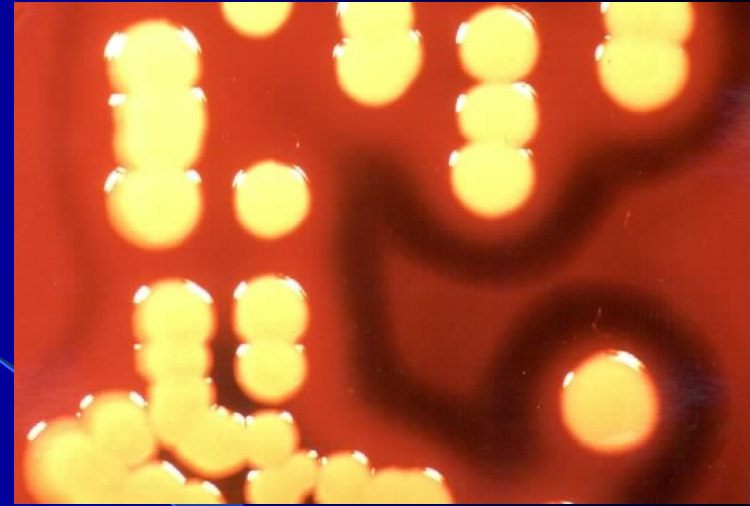
Foto: archiv MÚ



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

Pojem kolonie



- Kolonie je **útvár 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

B1: Prohlédněte si půdy

1. *bujon*

2. *VL-bujon*

3. *selenitový bujon*

4. Sabouraud

5. Löwenstein-Jenssen

6. KA

7. Endo

8. MH

9. NaCl

10. VLA

11. XLD

12. ČA

13. Levinthal

14. Slanetz-Bartley

Přehled půd – první část

*pouze jsou-li přidána antibiotika

Název	Druh	Barva	Typ	Pro
bujon	tekuté půdy	nažloutlá	pomno- žovací	aeroby
VL-bujon		tmavší		anaeroby
selenitový bujon		narůžovělá	selektivně pomnož.	salmonely
Sabourau- dův agar	pevné půdy ve zkumavce	bílá	selektivní*	houby
Löwentein- Jensen		zelená	obohacená	TBC
krevní agar	pevné půdy v misce	červená	obohacená diagnostická	většinu bakterií
Endova půda		růžová	selektivně diagnostická	především enterobakterie

Přehled půd – druhá část

Název	Druh	Barva	Typ	Pro
MH	pevné půdy na Petriho miskách	skoro bílá	speciální	atb citlivost
NaCl		hnědá	selektivní	stafylokoky
VL-agar		červená	jako KA	anaeroby
XLD (a blízký MAL)		oranžová	selektivně diagnostická	salmonely
čokoládový agar		hnědá	obohacená	hemofily, neisserie
Levinthalův agar		nažloutlá	obohacená	hemofily
Slanetz- Bartley		růžová	selektivně diagnostická	enterokoky

Přehled běžné mikroflóry

Kůže, nos, boltec, zevní zvukovod, kožní adnexa	Stafylokoky (i zlaté), korynebakteria, kvasinky
Hltan a ústní dutina	Ústní streptokoky a neisserie Hemofily, malá množství pneumokoků, meningokoků, anaeroby, nepat. treponem.
Tlusté (i tenké) střevo	Anaeroby, enterobakterie, enterokoky, <i>Entamoeba coli</i>
Vagina	Laktobacily, malá množství nejrůznějších mikrobů
Přechody (rty apod.)	Směs zástupců obou míst

B2: Otisky povrchu těla

V úkolu B2 máte různé otisky povrchu lidského těla. Povšimněte si, že téměř všechny obsahují bílé tečky, to jsou kožní stafylokoky.

- **Otisk prstů** obsahuje tedy především stafylokoky
- **Na jazyku** se nacházejí také ústní streptokoky
- **Na rtu** najdeme směs streptokoků a stafylokoků
- **Na penisu** stafylokoky s příměsí jiných bakterií, např. aerokoků

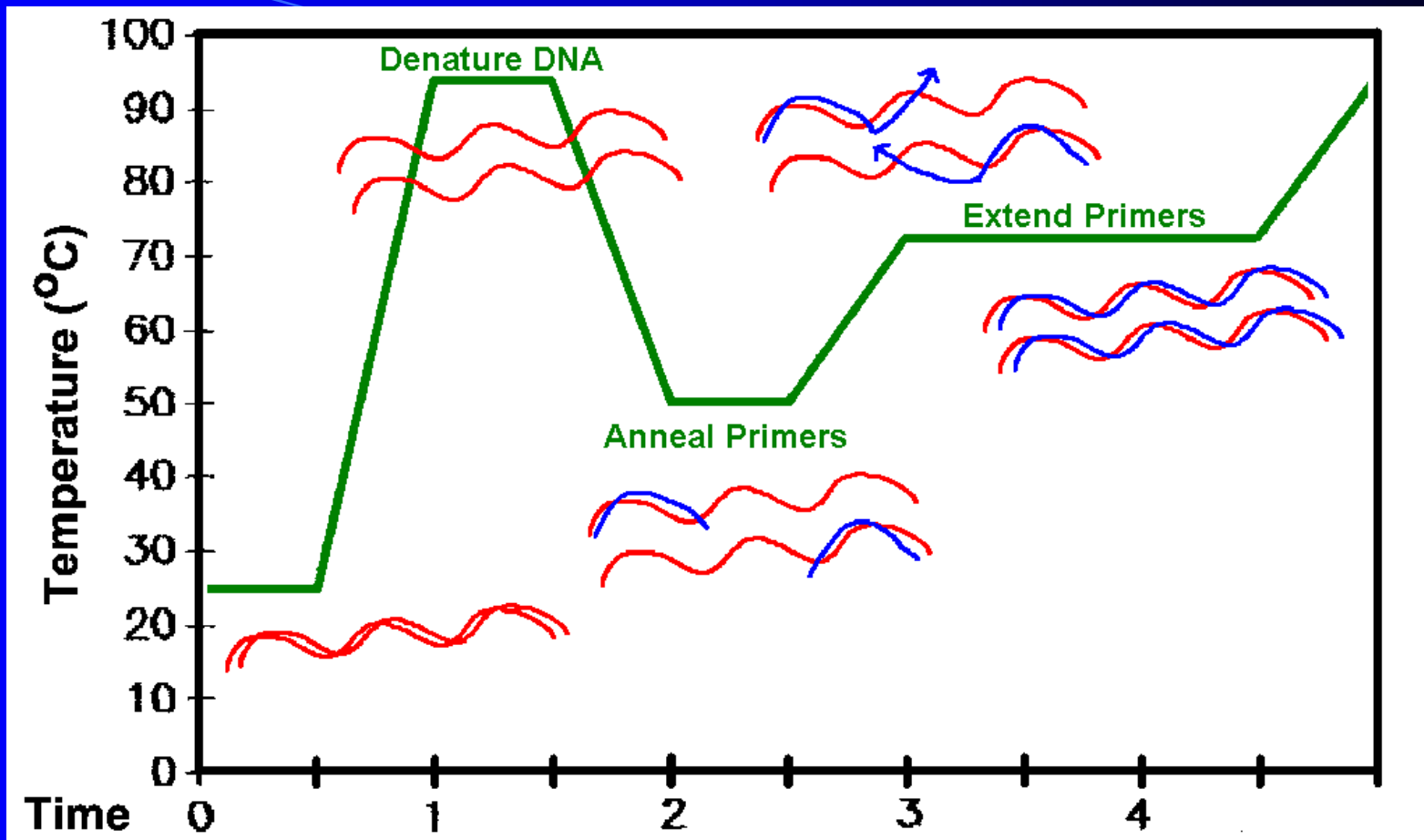
B3: Kultivace výtěrů

- V úkolu B3 máte výtěry. Na rozdíl od B2 jsou bakterie rozočkované, a lze provést výtěry i z míst, odkud by se otisky provést nedaly.
- **Výtěr z nosu** připomíná otisky z kůže, obsahuje také hlavně stafylokoky
- **Výtěr z ucha** je podobný
- **Výtěr z krku** připomíná otisk z jazyka (ústní streptokoky)
- **Výtěr z řiti** obsahuje střevní enterobakterie. Máte je i na Endově půdě, která se zde většinou používá

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

PCR a teplota



Vývoj PCR byl umožněn výzkumem vedoucím k objevení Taq polymerázy z termofilní bakterie *Thermus aquaticus*, která umí přežít vysoké teploty.

Thermocyklery



kinich.cifn.unam.mx

<http://images/110.jpg>



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. kompletici o nukleotidy). To ale nevadí, pozitivní reakce totiž nemůže být inhibována

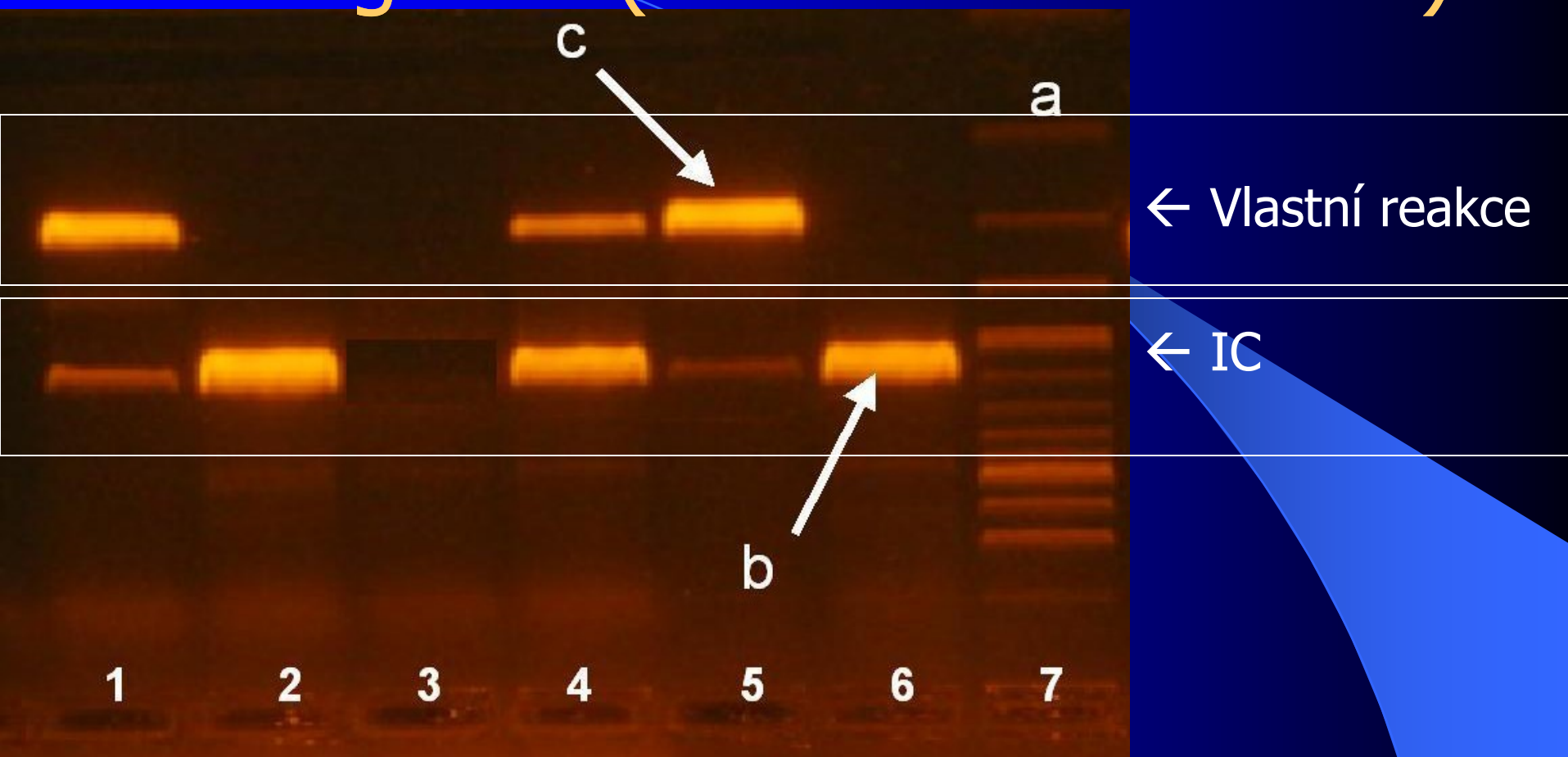
Možné výsledky PCR

- Pozitivní výsledek vzorku svědčí o pozitivě 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

Přehled interpretace

Vlastní reakce	Interní kontrola	Interpretace
negativní	pozitivní	negativní
negativní	negativní	inhibice reakce
pozitivní	pozitivní	pozitivní
pozitivní	negativní	(vysoce) pozitivní

Příklad gelu – (www.medmicro.info)



Pacienti 1 a 4 – pozitivní, pacient 2 – negativní,
pacient 3 – inhibice reakce. 5 – pozitivní
kontrola, 6 – negativní kontrola, 7 – ladder

B4: Vyhodnocení PCR

- Pokuste se na obrázku rozlišit
 - **pozitivní výsledky** (je vidět proužek vlastní reakce)
 - **negativní výsledky** (proužek vlastní reakce vidět není, ale je vidět proužek kontroly)
 - **inhibiči reakce** (není vidět žádný proužek)

Modul C: identifikace kmenů

Biochemické identifikační metody

- *I mezi savci jsou rozdíly. Člověk neumí tvořit vitamin C, někteří savci ano*
- Bakterii předložíme určitý **substrát** a zkoumáme, zda ho bakterie pomocí svého enzymu změní v **produkt**. Produkt se musí lišit od substrátu **skupenstvím** či **barvou**. Neliší-li se, 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

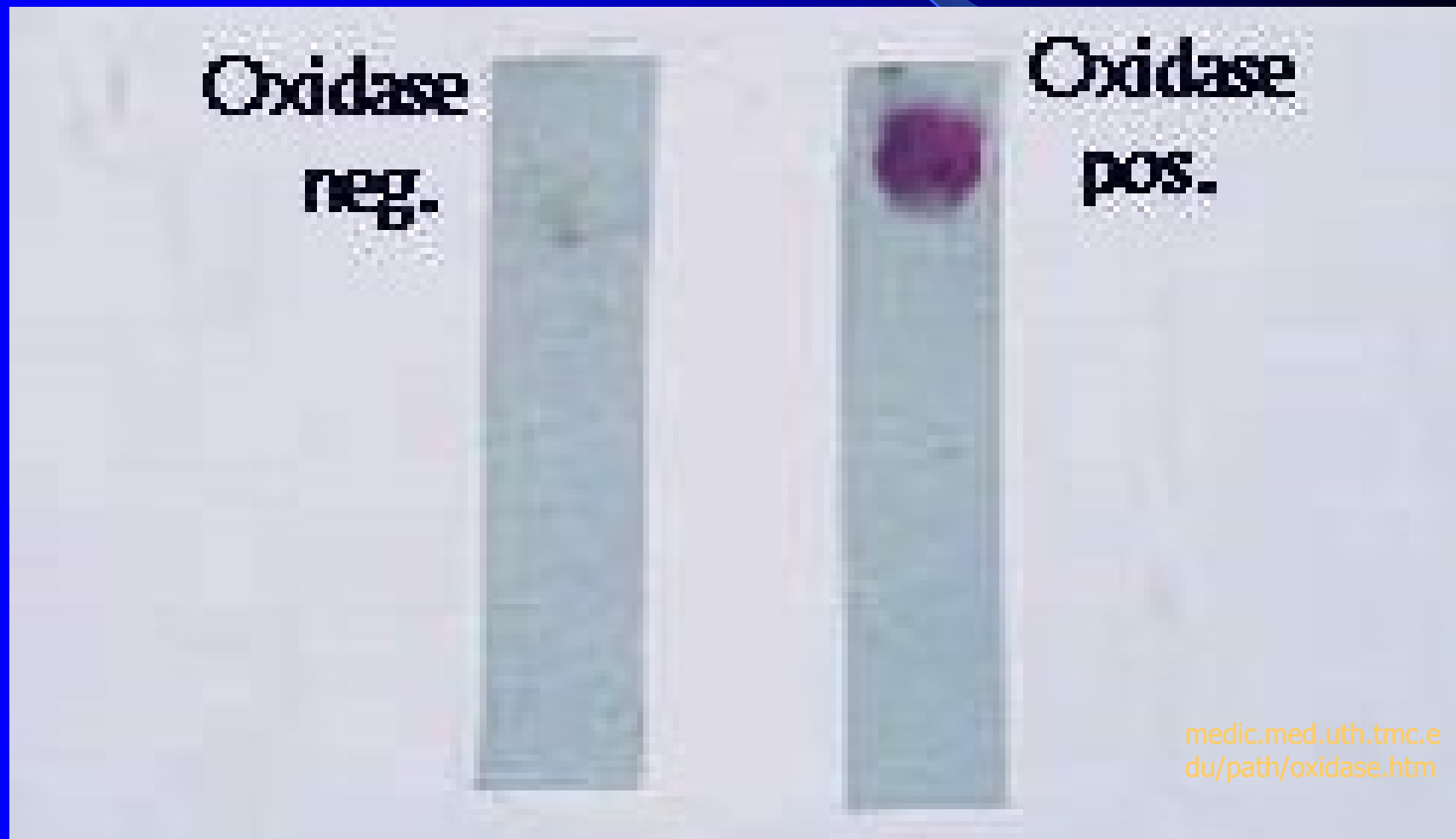
Catalase +



Catalase -



Příklady dalších testů: oxidázový test (diagnostický proužek)

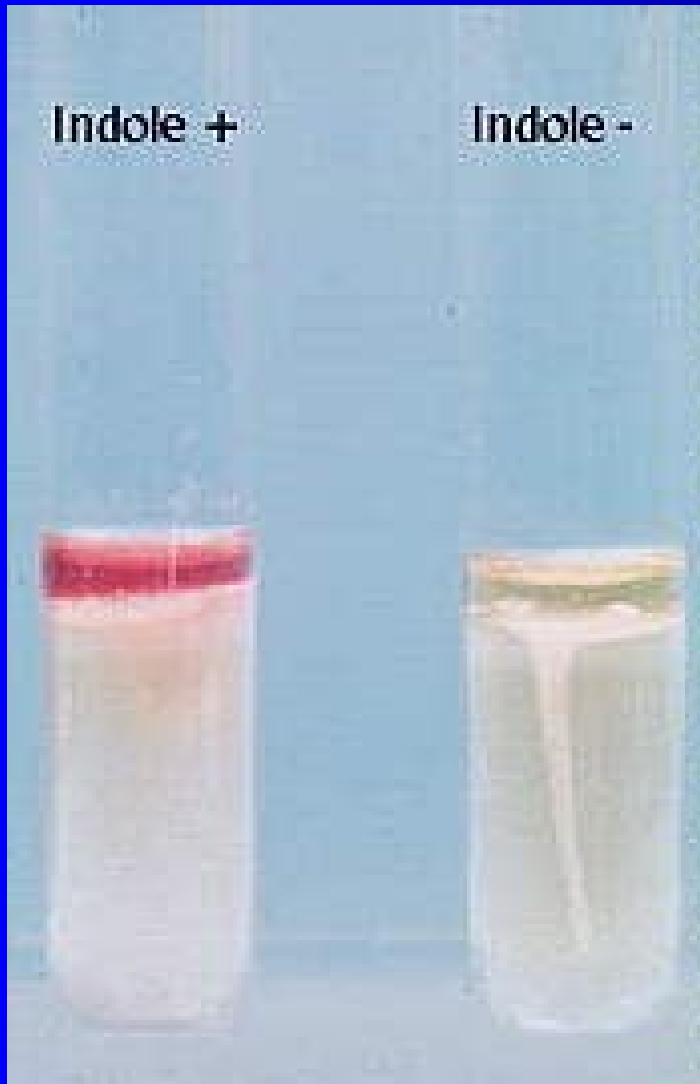


Provedení testu v praxi



Foto: archiv MÚ

...a další testy

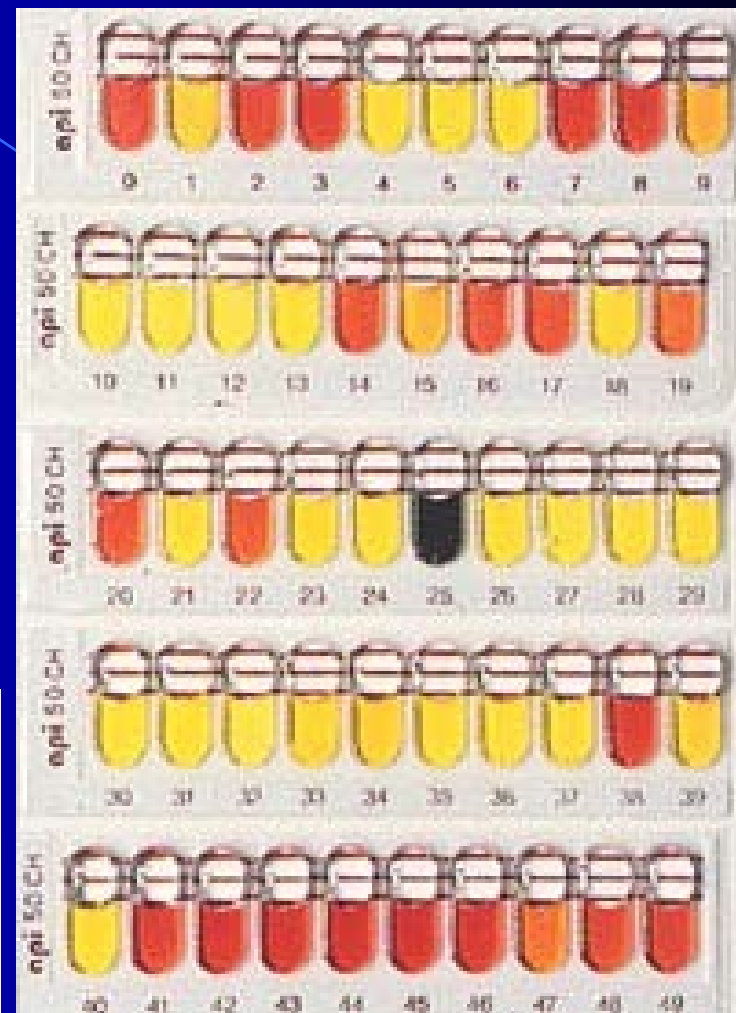


Zahraniční soupravy

www.ilexmedical.com/products_eng/api.htm



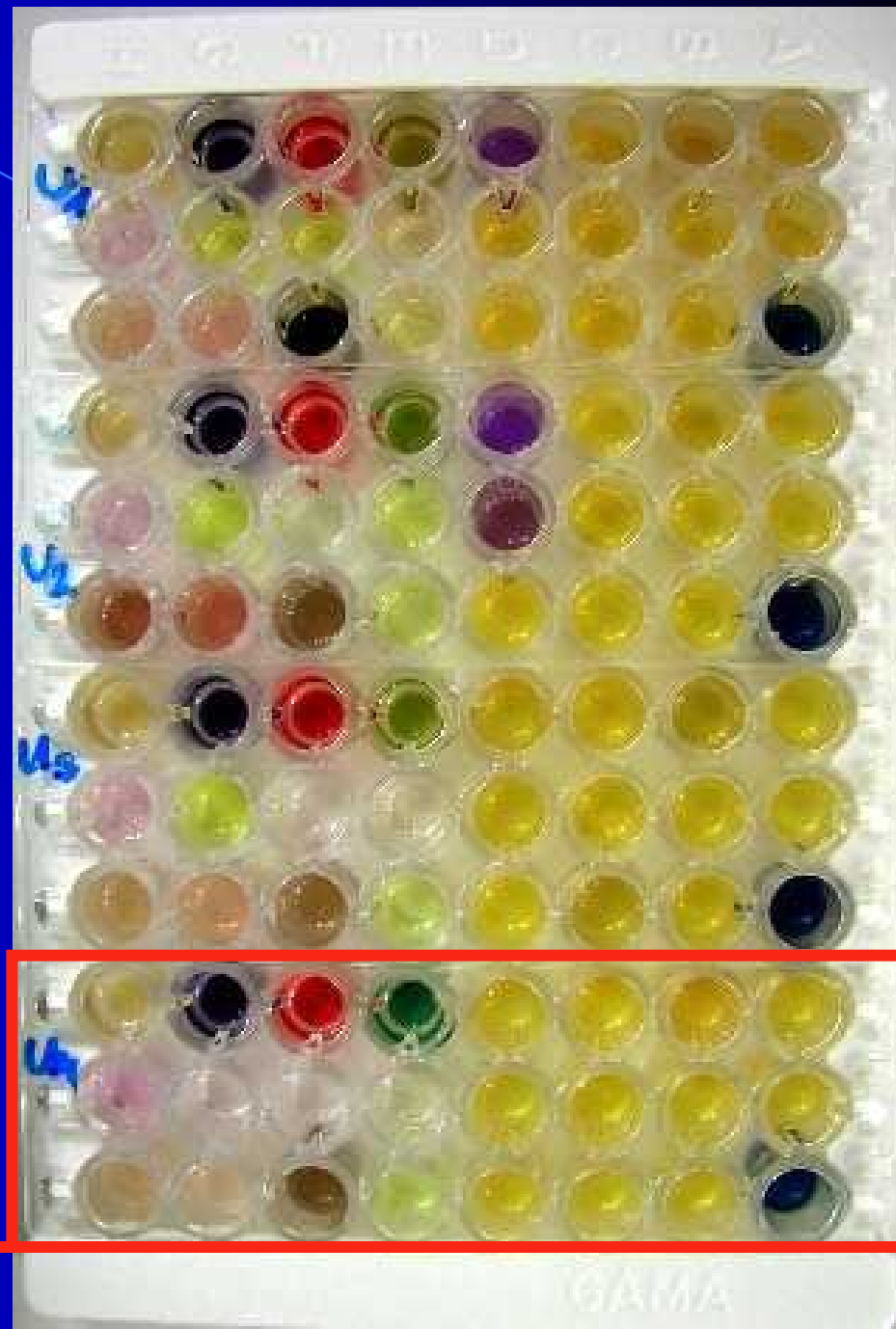
<http://www.oxid.com/bluePress/uk/en/images/PR020505.jpg>



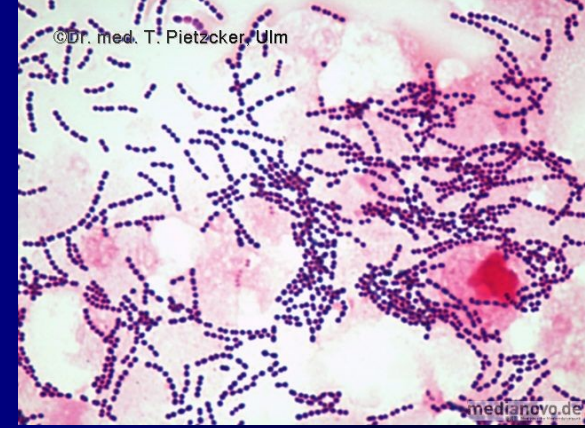
www.ilexmedical.com/products_eng/api.htm



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



Příklad kombinace metod v diagnostice



Neznámá bakterie

Jiné

G+ kok

Streptokok

Stafylokok

Enterokok

Streptokok s viridací

Streptokok s hemolýzou

Streptokok bez hemolýzy

Pneumokok

S. pyogenes

S. agalactiae (SAG)

Ústní streptokok

Streptokok non-A-non-B

C1 – Identifikace kombinací různých metod.

- Pokuste se identifikovat tři bakterie, jejichž vlastnosti máte popsané v tabulce, pomocí přiloženého klíče

Vyhodnocení destičkových testů

- Z takového testu dostaneme řadu výsledků – většinou ve tvaru „+“ (test pozitivní, substrát štěpen, došlo ke změně) nebo „-“ (test negativní, substrát nebyl štěpen, zbarvení zůstalo původní).
- **Příklad:** + - + + + - - - - - + + + +
- Je několik způsobů, jak takovou řadu převést na „čitelný výsledek“

Možné způsoby hodnocení

- Porovnání s tabulkou je možné jen u jednoduchých testů a jasných výsledků.
- Přepočet na **oktalové kódy** plus vyhledání výsledku v seznamu kódů. Nejběžněji používáno
- Výsledek se zadá **do počítače**, který „vyplivne“ vyhodnocení. Ne vždy praktické

Počítačové hodnocení se používá hlavně tehdy, pokud už „čtení“ výsledku probíhá automaticky, např. na spektrofotometru.

Oktaľové kódy – co to je a proč

- Matematicky vzato je to vlastně převedení dvojkové soustavy (zápis $+ + - - + + - - -$, respektive 110011000) do osmičkové soustavy (zápis 630)
- Z praktických důvodů se zpravidla uvnitř trojice sčítá opačně – normálně by při převodu z dvojkové do osmičkové či desítkové soustavy 1 1 0 měla být šestka a 0 1 1 trojka, v praxi to však počítáme většinou naopak

Přepočítávání trojic

--- 1 2 4		0
+ -- 1 2 4	1	1
- +- 1 2 4	2	2
++ - 1 2 4	1 + 2	3
-- + 1 2 4	4	4
+ - + 1 2 4	1 + 4	5
- + + 1 2 4	2 + 4	6
+++ 1 2 4	1 + 2 + 4	7

Konkrétně u ENTEROtestu16 (17 testů)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	
	ONPG	H	G	F	E	D	C	B	A	H	G	F	E	D	C	B	A	
		První řádek panelu								Druhý řádek panelu								
+																		
-																		
?																		
?	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	
	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	
	5			3			0			0			6			3		

Pravděpodobnost výsledku

- Je jasné, že, čím více testů použijeme, tím máme lepší šanci, že se nepleteme
- Přesto tato šance nikdy není celých 100 %
- Dá se vždy říci například, že náš hypotetický kmen je
 - na 99,3 % *Janičkella elegans*
 - na 0,5 % *Evičkella pulcherima*
 - na 0,2 % něco úplně jiného
- Je pak na zvážení identifikujícího, zda mu taková míra pravděpodobnosti stačí, nebo provede další rozlišující testy

Nejen procento pravděpodobnosti, ale i index typičnosti kmene

- Ve skutečnosti je výsledek biochemické identifikace zpravidla charakterizován dvěma čísly, nikoli jen jedním:
 - **% pravděpodobnosti:** např. že je 90% pravděpodobnost, že kmen opravdu je *Janičkella elegans* a ne něco jiného
 - **Index typičnosti:** míra shody s „ideálním kmenem“ *Janičkella elegans*. Pokud je kmen ideální, je $T_{in} = 1,00$; pokud kmen např. netvoří lenkulázu, ačkoli 90 % janičekel ji tvoří, bude T_{in} nižší než 1,00

C2: Vyhodnoťte Enterotest 16 u dvou kmenů


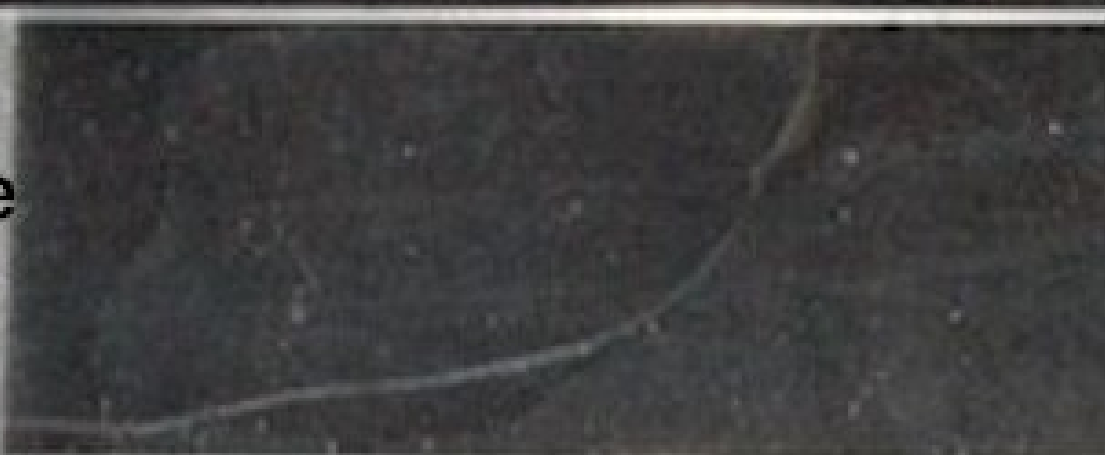
- Pokuste se identifikovat dva kmeny pomocí Enterotestu 16 (resp. obrázku jeho výsledku). Podívejte se také na to, jak dobře/špatně je kmen identifikován.

Přeji Vám hezký zbytek dne...

CATALASE TEST

<http://www.telmeds.org>

Negative



Positive