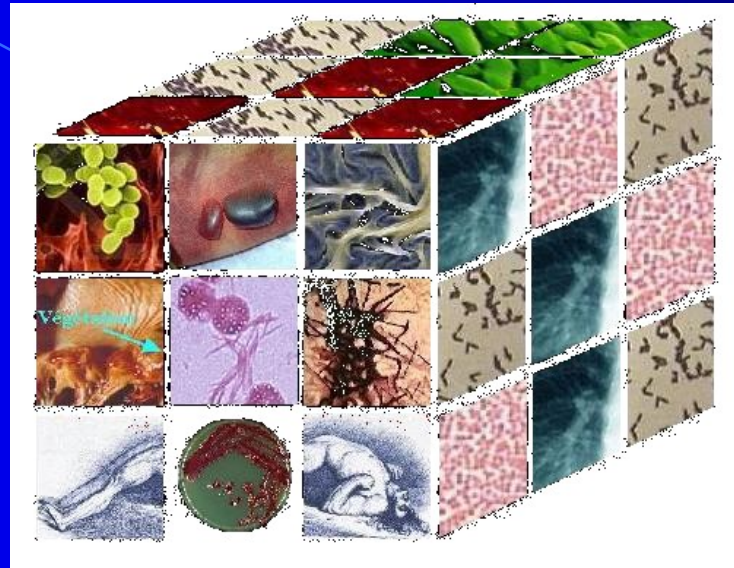


# Úvod k druhému praktiku



Mikrobiologie a imunologie – RV2BP\_MIKR

Ondřej Zahradníček

zahradnicek@fnusa.cz, 777 031 969

# Nepřímá diagnostika a antibiotika

# Modul A

## Nepřímý průkaz

# Antigen a protilátka

**Antigen** = makromolekula pocházející z cizího organismu: rostliny, mikroba, jiného živočicha. (Anebo sice z organismu vlastního, ale v tom případě jde o přestárlé či vadné, popř. zvrhlé buňky.)

V mikrobiologii nás zajímají **mikrobiální antigeny** = části mikrobiálního těla, které vzbuzují v hostiteli antigenní odpověď

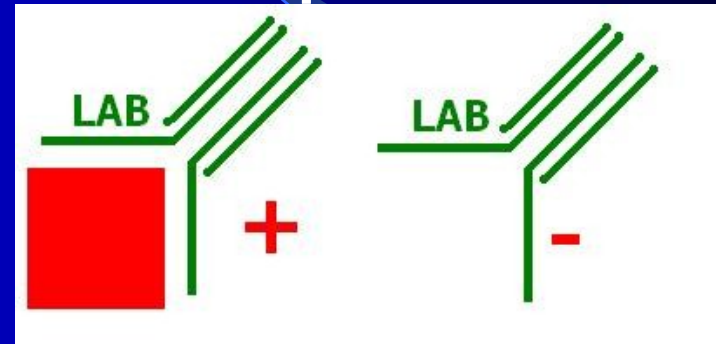
**Protilátka** = imunoglobulin, tvořený v těle hostitele (člověka, ale také zvířete) jako odpověď na antigenní výzvu

# Metody lékařské mikrobiologie

- **Přímé metody:** detekce mikroba, jeho části nebo produktu. Příklady: Mikroskopie, kultivace, biochemická identifikace, **průkaz antigenu**. **Pozitivita** = je jisté, že agens je **NYNÍ** přítomno.
- **Nepřímé metody:** detekce protilátek proti mikrobovi. **Pozitivita** = mikrob potkal hostitele v minulosti (nevíme, zda před týdny / měsíci / roky)

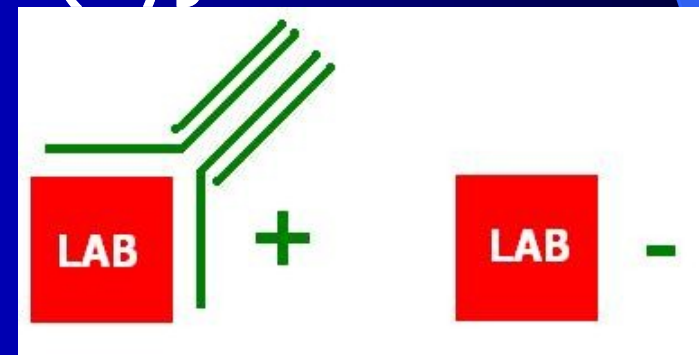
Dva způsoby, jak využít interakci mezi antigenem a protilátkou:  
Průkaz antigenu: laboratorní protilátky (zvířecího původu) + vzorek pacienta nebo kmen mikroba.

Přímá metoda



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

Nepřímá metoda



# Interpretace

- Průkaz antigenu je přímá metoda. Pozitivní výsledek znamená přítomnost mikroba v těle pacienta
- Průkaz protilátek: je to nepřímá metoda. Nicméně jsou způsoby, jak alespoň odhadnout, kdy přibližně se mikrob s tělem pacienta setkal:
  - Množství protilátek (relativní – titr) a jeho změny v čase (dynamika titru – viz A1)
  - Třída protilátek: IgM či IgA/IgG (více v A2)
  - (*Avidita protilátek*)

# Jak interpretovat nepřímý průkaz

- **Akutní infekce:** velké množství protilátek, 1 převážně třídy IgM, případně IgM i IgG
- **Pacient po prodělané infekci:** malé množství protilátek, pouze IgG (imunologická paměť) 2
- *Chronická infekce: různé možnosti podle aktivity infekce, mikrobiálního druhu apod.*





# Jak provést reakci „kvantitativně“

- Je **velmi těžké zjistit koncentraci protilátek** proti konkrétnímu antigenu (ne tedy celkové množství imunoglobulinů) v **jednotkách mol/l, mg/l** apod.
- Ale dá se dělat jiná věc: mnohonásobně **ředit pacientovo sérum**.
  - Reaguje-li **i po mnohonásobném ředění** →  
→ v séru je velké množství protilátky
  - Reaguje **jen při nevelkém zředění séra** →  
→ v séru je jen malé množství protilátky

# Dynamika titru

1- akutní sérum

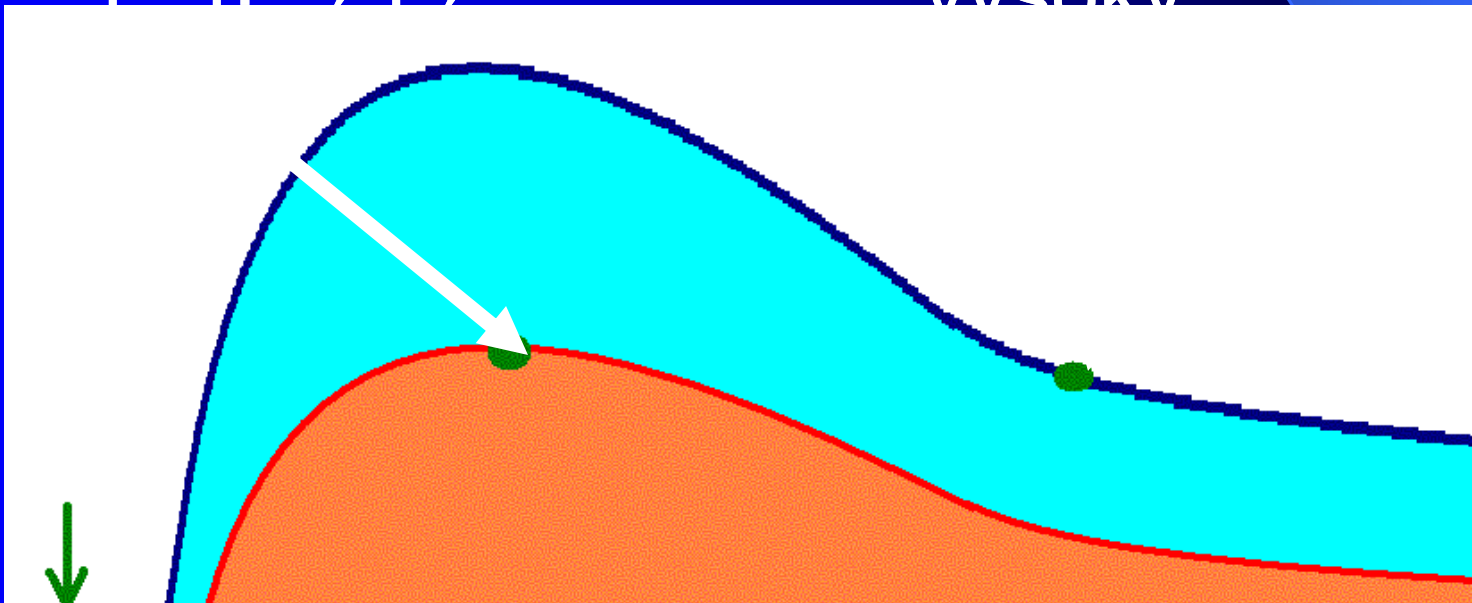
2 - rekonvalescentní

- Průřvih je, že každý má jinou úroveň protilátkové odpovědi. Proto samotná hodnota titru mnoho neříká
- Změna titru vypovídá více. Jde-li o čerstvou záležitost, titer se vždy vyvíjí, nejprve stoupá, později zvolna klesá.



# Proč nestačí samotný titr

- Někdy se stane, že málo reaktivní pacient má i v akutní fázi titr
- Velmi reaktivní pacient naopak i dlouho po infekci titr relativně vysoký



# Čtyřnásobný vzestup titru

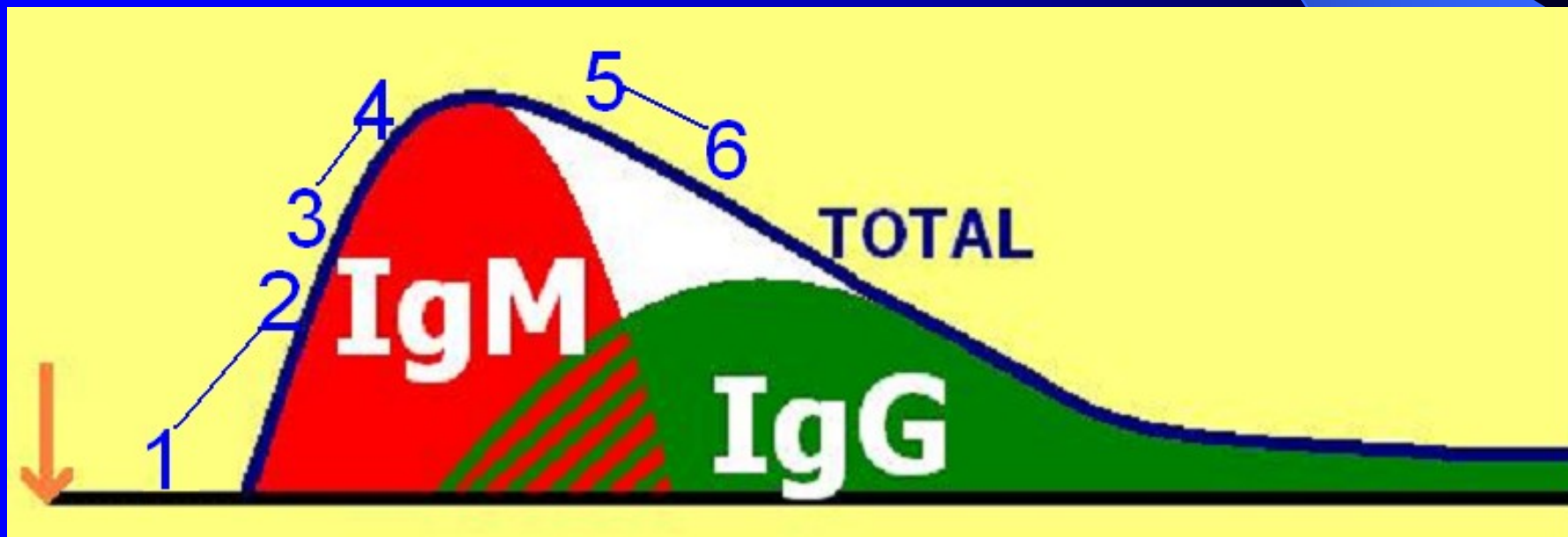
- Abychom mohli říci „tento pacient je pravděpodobně NYNÍ nemocný“ (= nejde o případ, kdy by šlo o stav o dávno prodělané infekci), zpravidla vyžadujeme nejméně **čtyřnásobný vzestup** titru mezi prvním a druhým odběrem krve (tedy za 10–14 dnů)
- Při geometrické řadě s koeficientem dva jde o posun o dva důlky.

# Dynamika titru – další aspekty

- Zvláštním případem je tzv. **serokonverze** – v prvním vzorku protilátky nejsou (ještě se nestihly vytvořit), v druhém už jsou. Takový důkaz je cennější než „důkaz čtyřnásobkem“
- **V některých případech místo vzestupu prokážeme pokles** (subakutní infekce). I ten by měl být nejméně čtyřnásobný.
- ***Velikost titru rozhodně neodpovídá vývoji klinických příznaků. Množství protilátek často vrcholí, až příznaky zmizí.***

# Příklady různých projevů dynamiky titru

- **1 – 2:** sérokonverze
- **3 – 4:** vzestup titru
- **5 – 6:** pokles titru



# Geometrická řada

- Technicky nejjednodušší způsob, jak ředit sérum pacienta, je použití **geometrické řady s koeficientem dva**.
- Vycházíme **z neřaděného séra**, nebo **ze séra o určitém předředění** (např. 1 : 5, 1 : 10, 1 : 20 a podobně)
- V každém dalším důlku je **dvojnásobné ředění** oproti předchozímu, například tedy řada 1 : 10, 1 : 20, 1 : 40, 1 : 80, 1 : 160...

# Počítání ředění v serologii

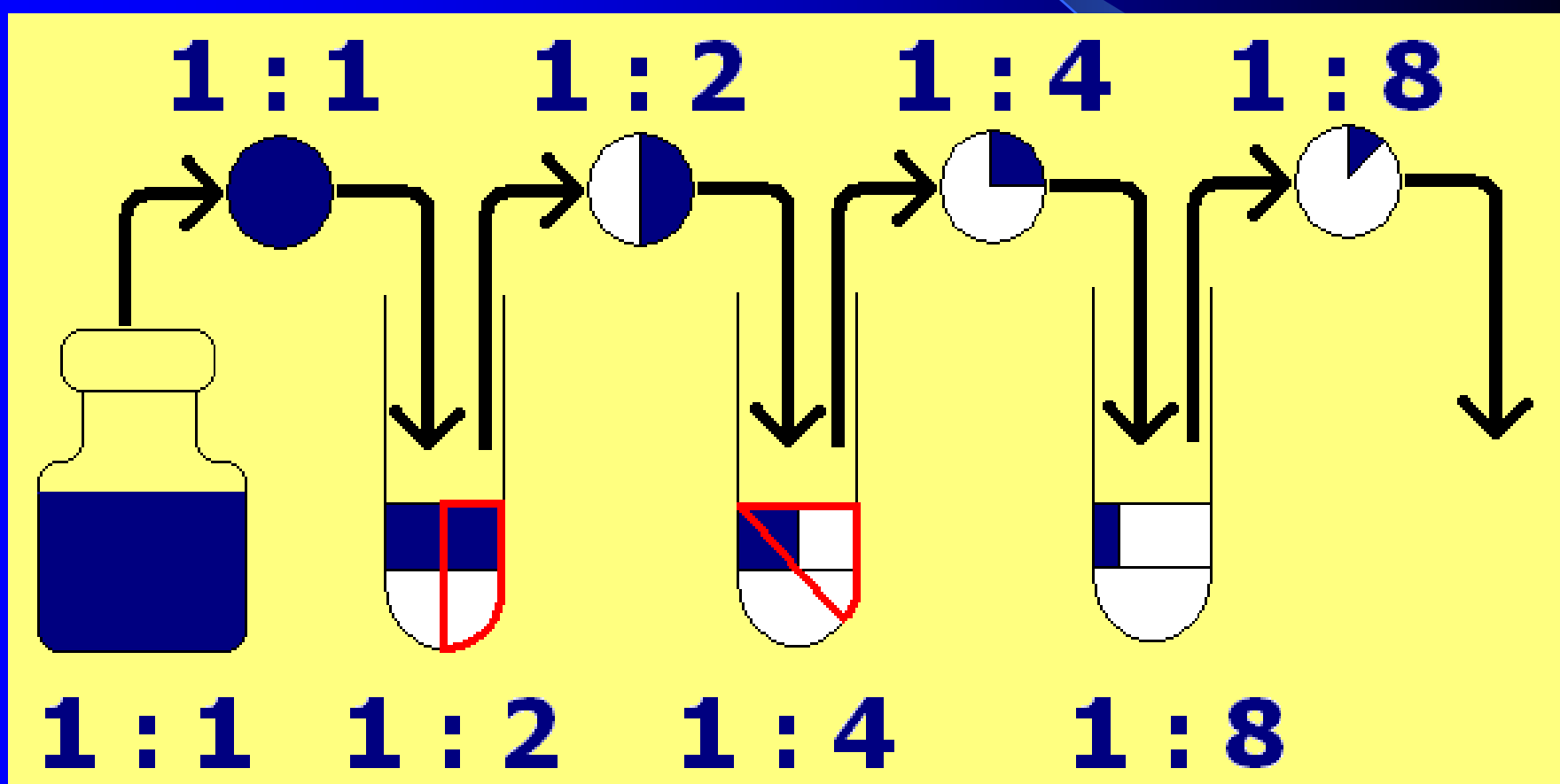
Pozor, v serologii např. ředění 1 : 4 znamená jeden díl séra a tři díly fyziologického roztoku (tj. čtyři díly celkem)!

Při „biochemickém“ počítání (počet dílů séra ku počtu dílů diluentu) bychom naše geometrické řady museli značit např. 1 : 9, 1 : 19, 1 : 39, 1 : 79. To by bylo značně nepraktické

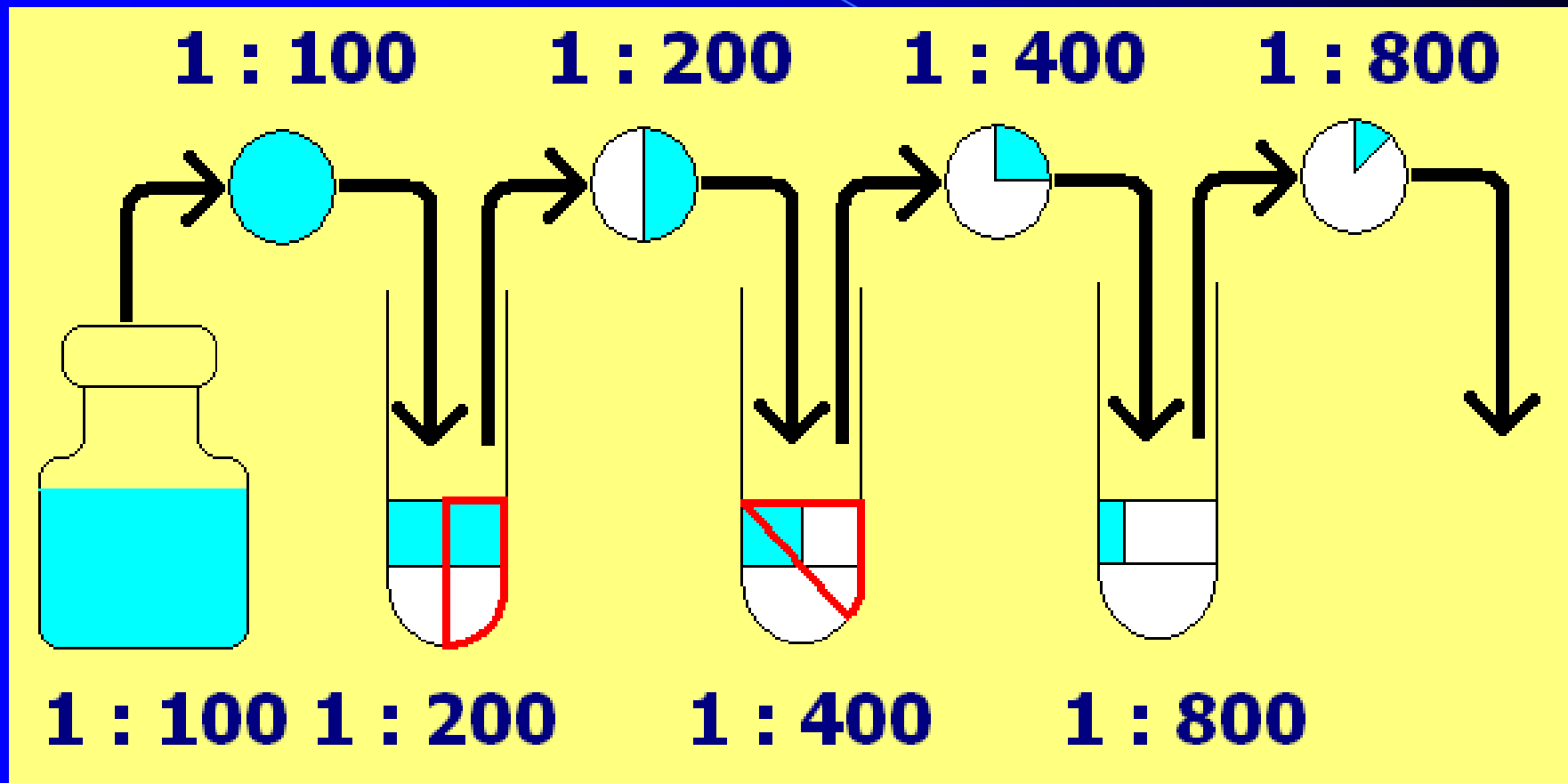


# Geometrická řada: jak ji udělat

a) bez předředění původního séra



## b) s předředěním původního séra



Samozřejmě, předředění nemusí být zrovna 1 : 100, může to být třeba 1 : 5, 1 : 10, 1 : 20 či jakékoli jiné.

# Úkol A1: Klinická situace

- Máme šest pacientů podezřením na klíšťovou encefalitidu, všichni mají neurologické potíže a udávají přisátí klíštěte
- Klíšťová encefalitida je nemoc poměrně běžná ve střední Evropě. Ačkoli má horší průběh u dospělých (zejména seniorů), lidé pohříchu nechávají očkovat spíše své děti než své rodiče.

# A1: Klíšťová encefalitida

- Destičku si postavte na výšku tak, abyste měli písmeno A vpravo nahoře a číslo 12 vpravo dole.
  - V prvním a druhém řádku je první pacient (Karel)
  - ve 3. a 4. řádku druhá pacientka (Ludmila)
  - v 5. a 6. řádku třetí pacient (Marek)
  - a tak dále
- První z obou řádků vždy odpovídá akutnímu, vzorku séra, druhý vzorku odebranému za dva týdny
- V prvním sloupci jsou opět testy antikomplementarity, následuje ředění geometrickou řadou od ředění 1 : 10
- Jde o to, zjistit titry a zhodnotit jejich vývoj v čase

# Průběh protilátkové odpovědi

- **Protilátky IgM** se tvoří jako první, ale také jako první mizí. Neprocházejí placentou, jejich průkaz u novorozence je svědectvím jeho infekce
- **Protilátky IgG** se tvoří později a zůstávají jako paměťové přítomny dlouhodobě. Procházejí placentou (novorozenec je tedy může mít od matky)



# Protilátky ostatních tříd

- Protilátky třídy **IgA** se u některých infekcí vyšetřují místo protilátek IgM. Tato třída se uplatňuje hlavně u slizniční imunity, a tedy u infekcí, kde branou vstupu je sliznice (například gastrointestinální)
- Protilátky třídy **IgE** se vyskytují u alergií a infestací červy. Zpravidla se však nestanovují specifické IgE proti nějakému patogenovi
- S protilátkami **IgD** se v mikrobiologii nepracuje

# Reakce se značenými složkami

- Na povrch se postupně navazují jednotlivé složky
- Místo jedné ze složek se pokusíme navázat vzorek od pacienta, o kterém si myslíme, že danou složku možná obsahuje
- Je-li to pravda, složka se naváže
- Pokud se všechny složky postupně navážou, vznikne nepřerušovaný řetězec
- Na konci řetězce je vhodné značidlo (u reakce ELISA např. enzym, který se detekuje reakcí s vhodným substrátem)

# Možnosti uspořádání složek žlutě vždy složka pocházející ze vzorku získaného od pacienta

- Povrch-**antigen**-protilátka-značidlo (P)
- Povrch-protilátka-**antigen**-protilátka-značidlo (P, např. průkaz HBsAg)
- Povrch-antigen-**protilátka**-antigen-značidlo (N)
- Povrch-antigen-**protilátka**-konjugát-značidlo (N)

*Konjugát je značená protilátka namířená  
proti lidské protilátce*



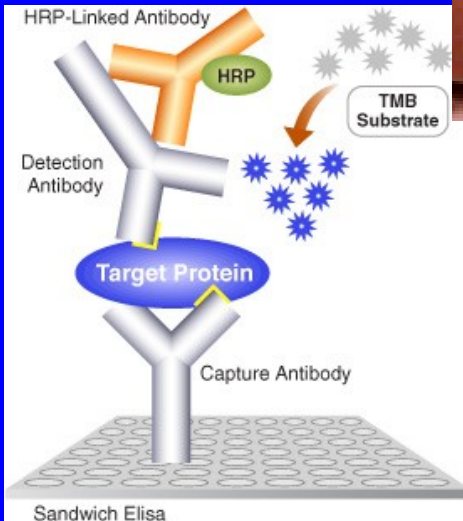
# Význam konjugátu

- **Konjugát** se používá zpravidla u reakcí nepřímého průkazu (průkaz protilátek)
- Je to protilátka, pro kterou je **antigenem lidská protilátka** např. IgM nebo IgG
- Dokáže být **selektivní** proti určité třídě lidské protilátky
- Použití konjugátu je tedy podstatou možnosti selektivního průkazu jednotlivých **tříd protilátek**

# ELISA



[www.cellsignal.com](http://www.cellsignal.com)



[virology-online.com](http://virology-online.com)

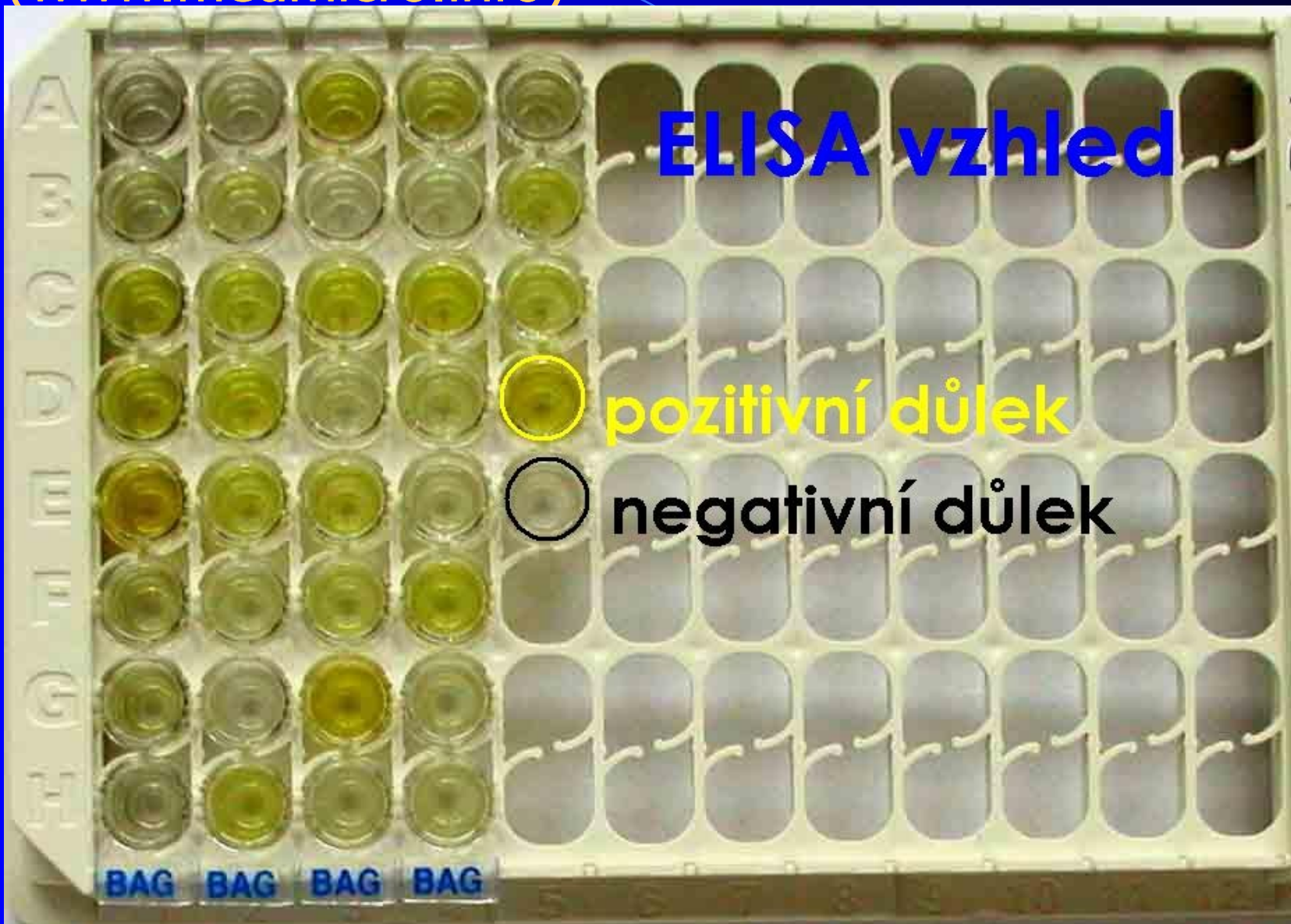
# ELISA – praktické provedení

- Zpravidla máme k dispozici **destičku s jamkami**. Na rozdíl od klasických serologických reakcí má každý pacient nikoli celý řádek, ale jen jeden důlek. To proto, že nezjišťujeme titry
- Před vlastními důlky pacientů mohou být důlky:
  - **Bl** – blank (pro kalibraci spektrofotometru)
  - **K-** a **K+** – pozitivní a negativní kontrola
  - **Cut off** (dva či tři důlky) – výrobcem dodané „vzorky“ s právě hraniční hodnotou absorbance („odsekávají“ pozitivní výsledky buď ostře, nebo s rozmezím plus minus 10 %)

*Vždy záleží na konkrétní reakci ELISA a jejím provedení. Někdy chybí blank, někdy není cut off přímo obsažen v destičce, ale počítá se jako průměr negativních kontrol + konstanta.*

# ELISA – ukázka

([www.medmicro.info](http://www.medmicro.info))



## A2: popis pacientů

- P: zdravá těhotná žena, doma kočky
- Q: jiná těhotná žena, bez koček
- R: mladá dáma toulající se v lesích; bez koček, zato však v kontaktu s prostředím kontaminovaným trusem divokých zvířat
- S: senior, pracující v zahradě, po které se procházejí kočky



# Modul B: Antibiotika



# Metody zjišťování citlivosti in vitro

- Zjišťování citlivosti **in vitro = v laboratoři**
- Nezaručí stoprocentní účinnost léčby
- Přesto vhodné u většiny nálezů kultivovatelných patogenních bakterií
- **V běžných případech kvalitativní testy** (citlivý – rezistentní)
- **V indikovaných případech kvantitativní** (zjišťujeme MIC). *Jde zpravidla o rizikové kmeny u rizikových pacientů.*



# Difúzní diskový test (B1)

- Na MH (nebo jiný) agar se štětičkou plošně naočkuje suspenze bakterie
- Pak se nanášejí tzv. antibiotické disky – papírky napuštěné antibiotikem
- Atb difunduje z disku agarem dál
- U standardní Petriho misky se používá zpravidla šest disků, někdy se dává ještě sedmý doprostřed

# Difúzní diskový test – pokračování

- Koncentrace atb klesá se vzdáleností od disku (a tedy i jeho schopnost inhibovat)
- Pokud mikrob roste až k disku, nebo má jen malou zónu, je **rezistentní** (necitlivý)
- Je-li kolem disku dost velká zóna citlivosti (větší než stanovená hranice), je **citlivý**.

# Difusní diskový test po lopatě



- 1 Bakterie se bojí antibiotika, rezistní zóna kolem atb disku dokonce tak velká, že se ani nedá změřit.
- 2 Bakterie se nebojí antibiotika, jsou na ně rezistentní. Malá, anebo vůbec žádná zóna kolem atb disku.

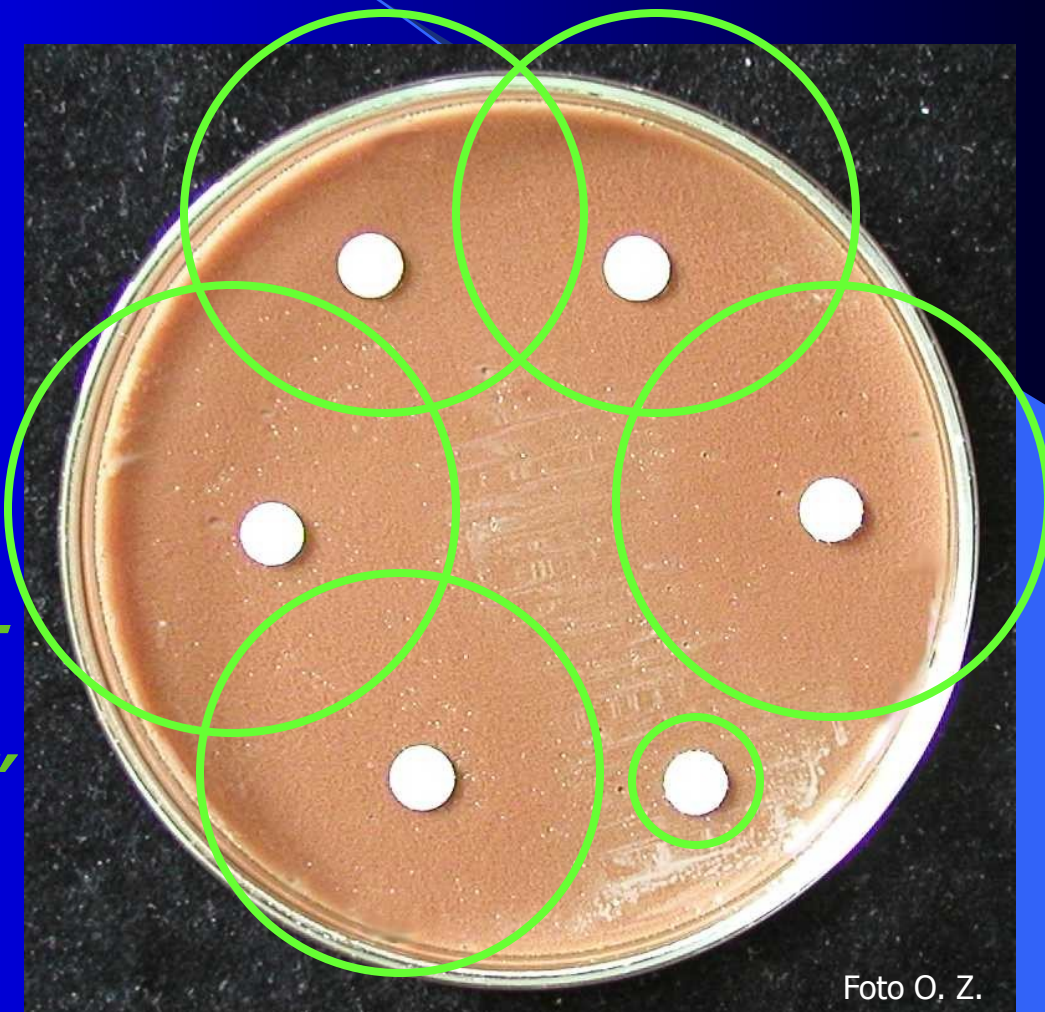
# Difúzní diskový test v praxi: zóny se změří a porovnájí s referenčními



# Někdy jsou příliš velké zóny

Jsou-li zóny tak velké, že se nedají změřit, tak je neměřte a prostě rovnou napište, že kmen je na dané antibiotikum citlivý.

***Zeleně jsou vyznačeny teoretické okraje zón – všimněte si, že z naprosté většiny buď splývají, nebo jsou mimo misku***



# Mikrodiluční test (B2)

- Atb je v řadě důlků v plastové destičce, koncentrace postupně klesá
- Nejnižší koncentrace, která inhibuje růst, představuje hodnotu MIC
- V přiložené šabloně je zpravidla označen **breakpoint**. Je-li MIC nižší než breakpoint, je kmen citlivý. Je-li MIC vyšší, je rezistentní
- Jedna destička se zpravidla použije pro jeden kmen, např. **12 antibiotik**, každé v 8 různých koncentracích (*přesněji: dvanácté jen v sedmi, rohový důlek vpravo nahoře je kontrola růstu*)



# Mikrodiluční test – ukázka

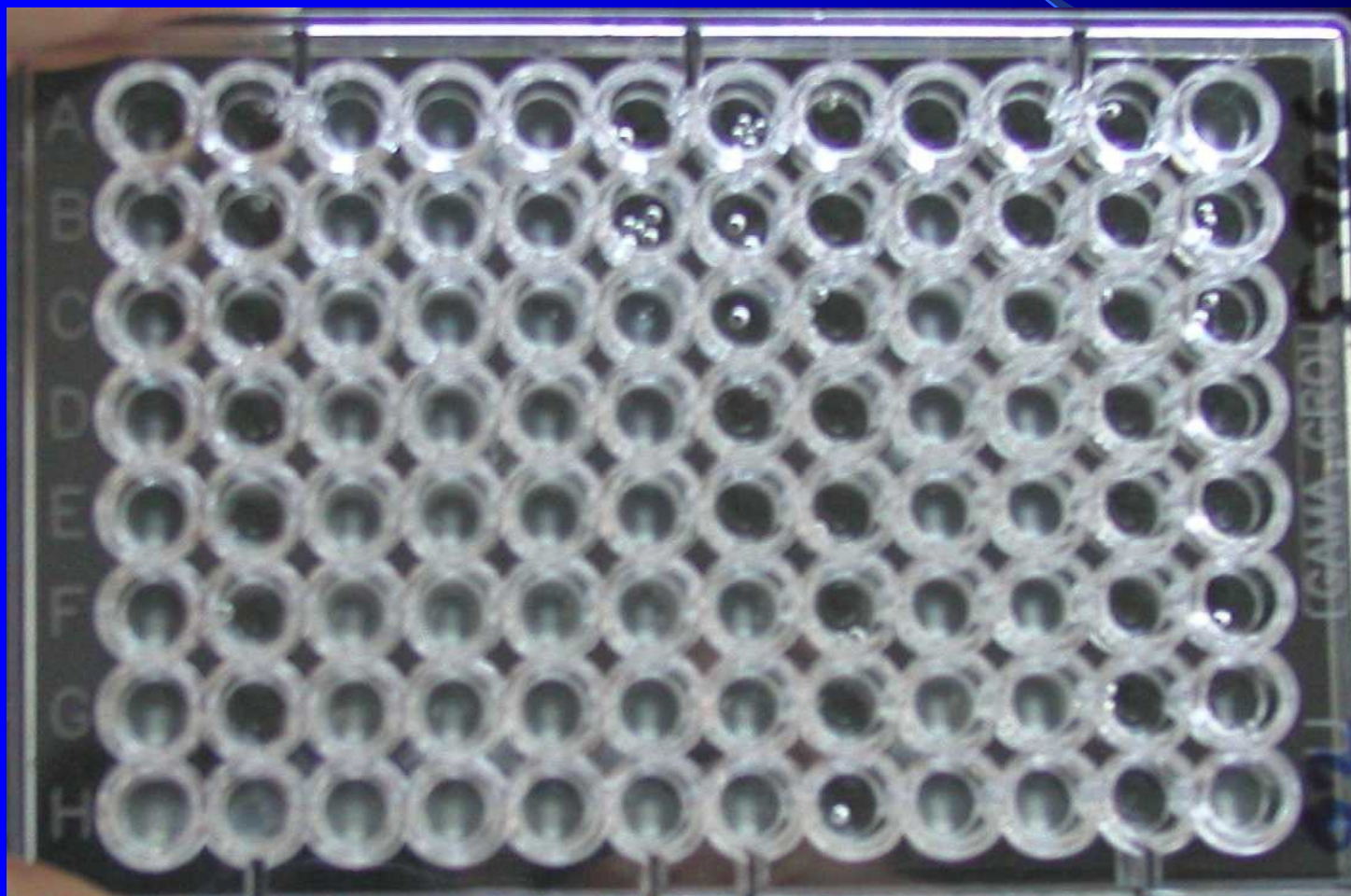
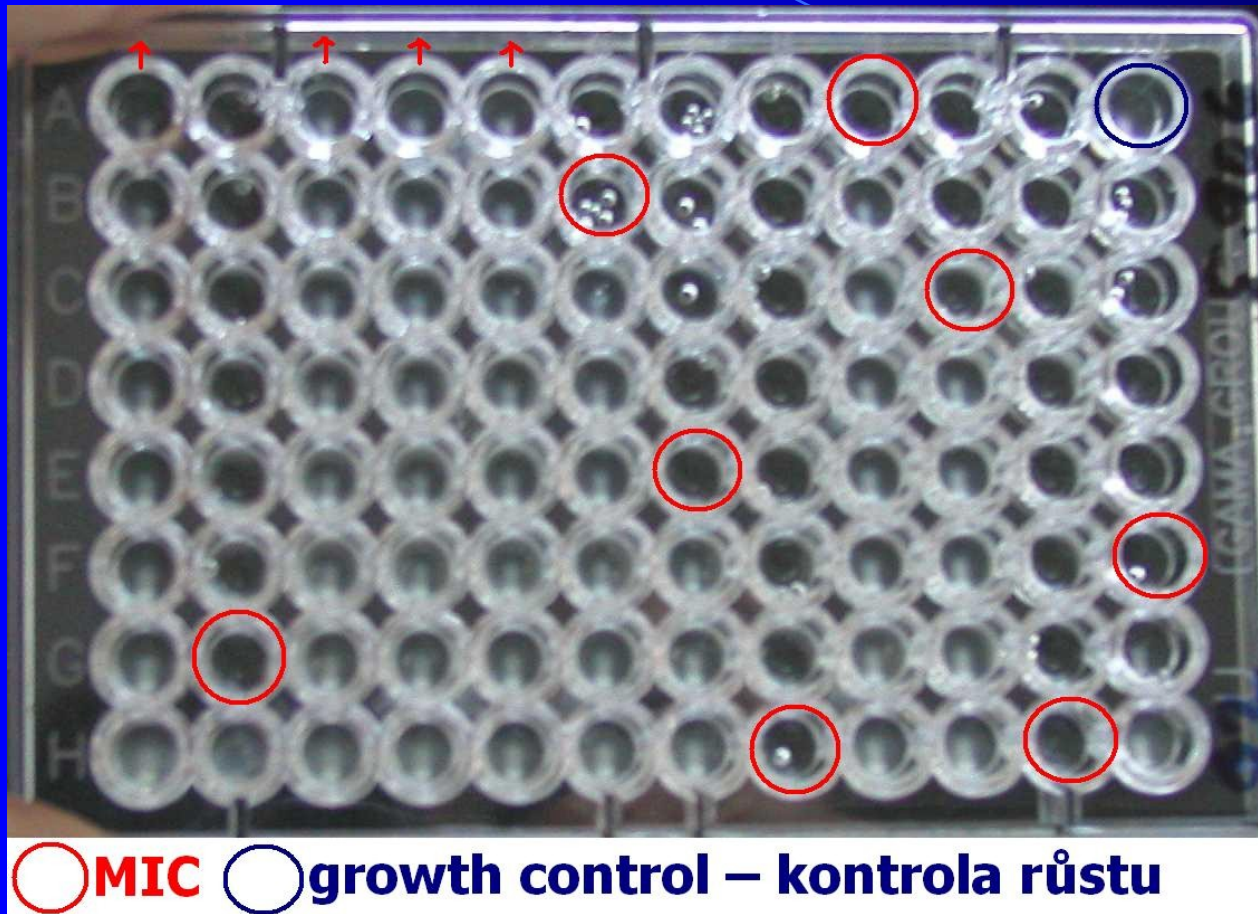


Foto O. Z.

# Mikrodiluční test – odečítání



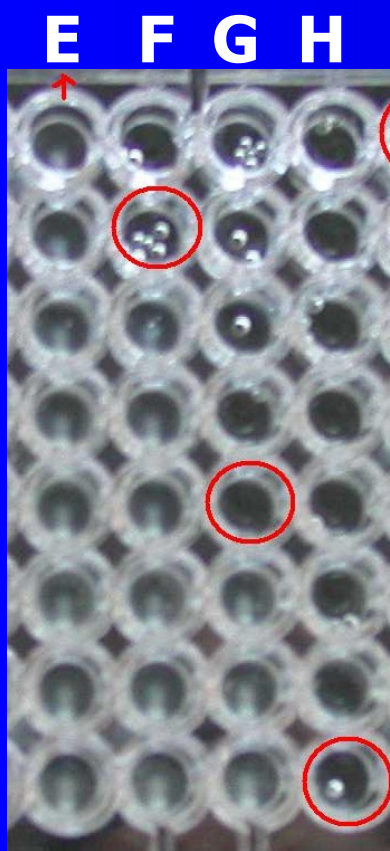
- Ve sloupcích 1, 3, 4 a 5 je hodnota MIC příliš vysoká než aby mohla být změřena.



# Odečtení mikrodilučního testu

- Zjistěte a zapište hodnoty MIC pro dvanáct testovaných antibiotik
- **Zakalený důlek = roste to tam**
- **Nezakalený důlek = neroste to tam**
- **Neroste to tam = je to inhibováno**
- Nejmenší koncentrace, která inhibuje je **minimální inhibiční koncentrace**
- **$MIC \leq \text{breakpoint} \rightarrow$  kmen citlivý**
- **$MIC > \text{breakpoint} \rightarrow$  kmen rezistentní**

# Příklad odečítání



E	F	G	H
32	64	128	64
>16<	32	64	32
8	>16<	>32<	16
4	8	16	>8<
2	4	8	4
1	2	4	2
0,5	1	2	1
0,25	0,5	1	0,5

- E: MIC >32, breakpoint = 16, závěr: rezistentní
- F: MIC = 32, breakpoint = 16, závěr: rezistentní
- G: MIC = 8, breakpoint = 32, závěr: citlivý
- H: MIC ≤ 0,5, breakpoint = 8, závěr: citlivý

# E-testy (B3)

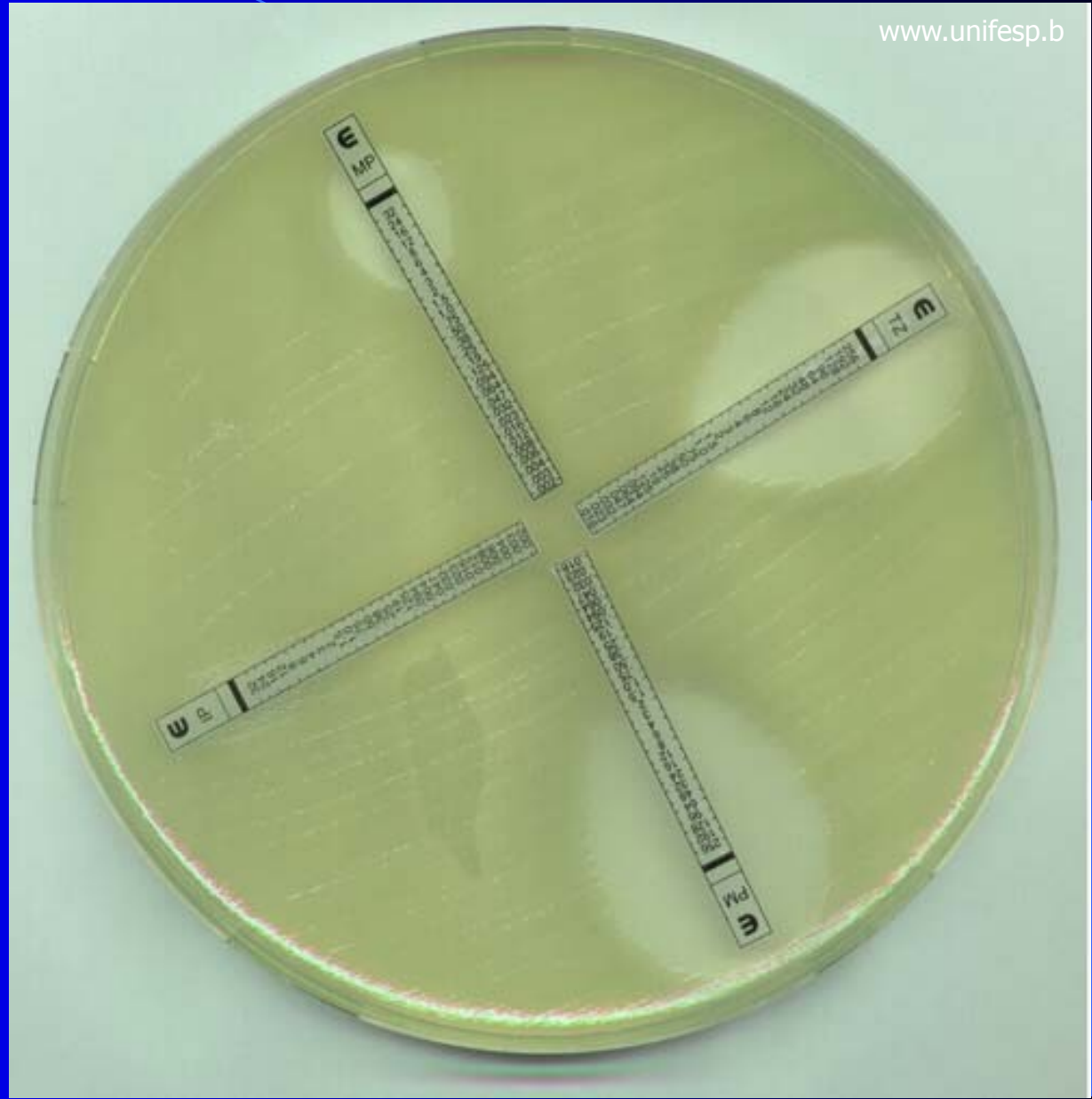
- Podobné v principu difúznímu diskovému testu
- Místo disku se však použije proužek
- V proužku stoupající koncentrace atb od jednoho konce ke druhému (získáno díky speciální technologii – proto jsou tak drahé)
- Zóna není kruhová, ale vejčitá.
- Test je kvantitativní
- Na papírku je stupnice – jednoduché odečítání (*viz obrázek na další obrazovce*)

# E-testy – vyhodnocení

Hodnota MIC se odečítá přímo na proužku – v místě, kde okraj zóny protíná daný proužek



# Někde používají speciální velké misky





Přeji Vám  
hezký zbytek  
dne...