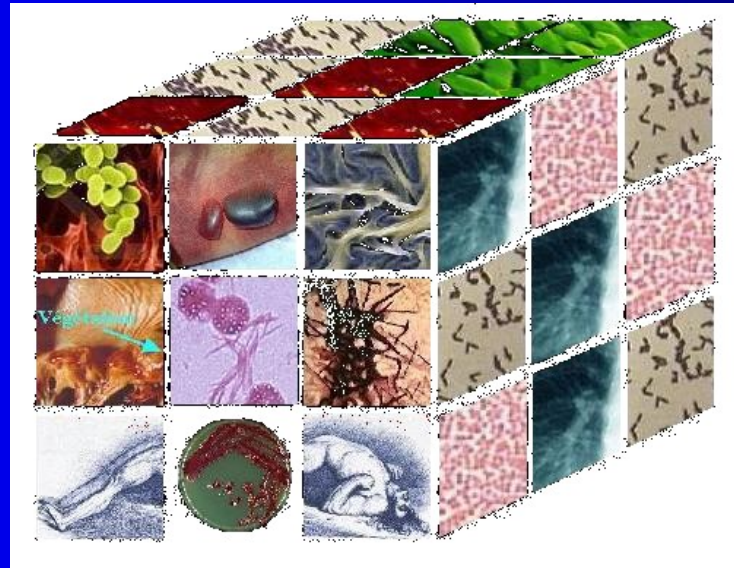


Úvod k druhému praktiku



Mikrobiologie a imunologie – RV2BP_MIKR

Ondřej Zahradníček

zahradnicek@fnusa.cz

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

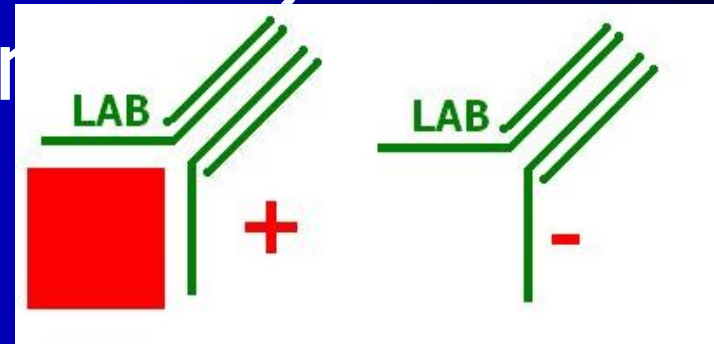
Metody lékařské mikrobiologie

- **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:

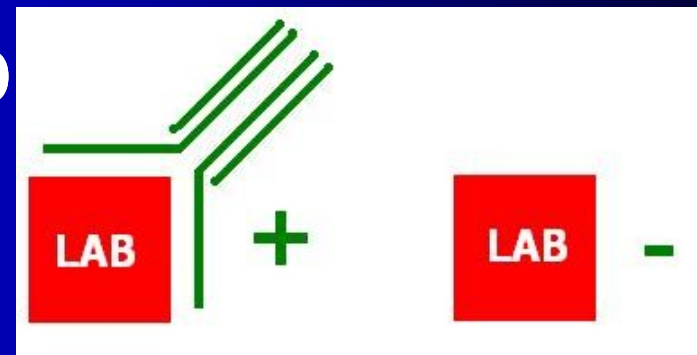
Průkaz antigenu: laboratorní protilátka (zvířecího původu) + vzorek pacienta nebo kmen

Přímá metoda



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

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

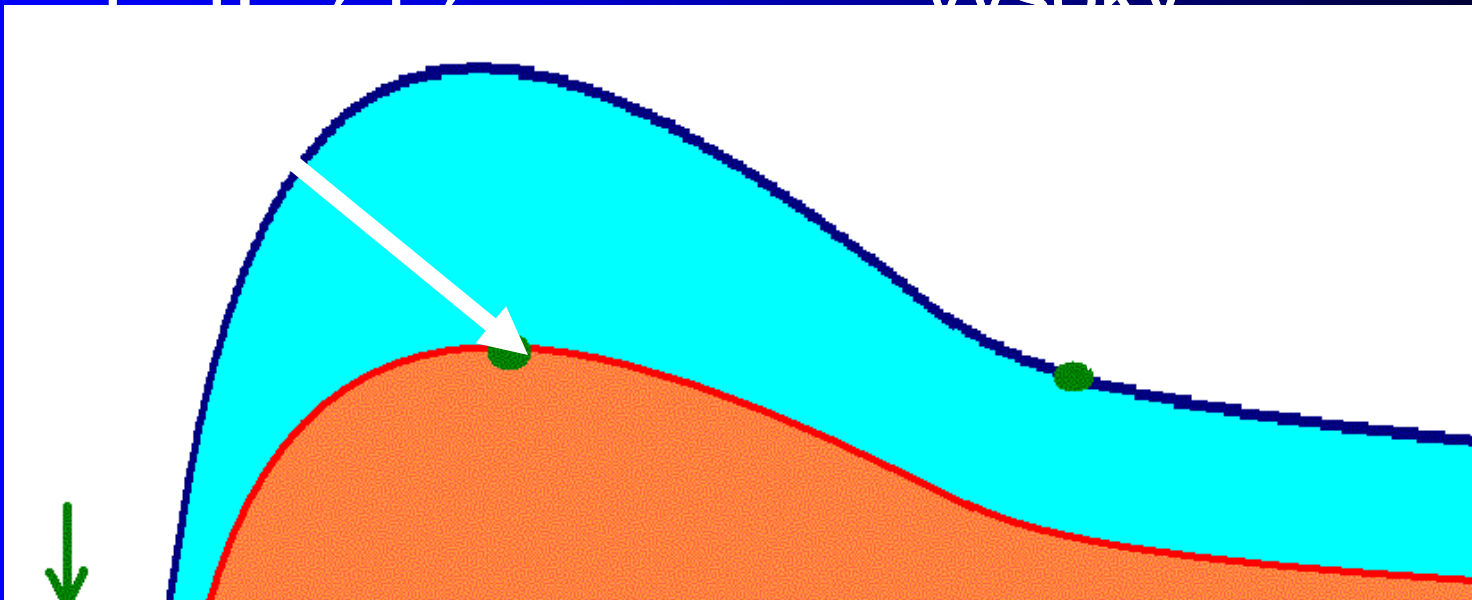
2 - rekonvalescentní

- **Průšvih 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 titer

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



Čtyřnásobný vzestup titru

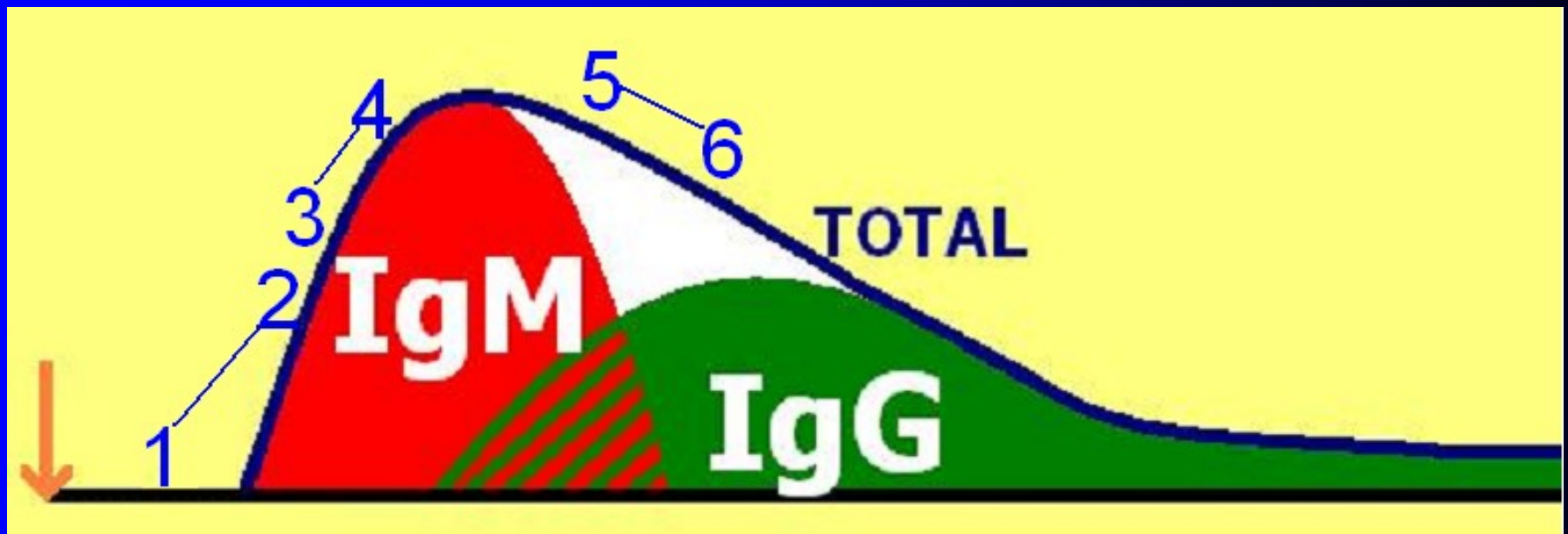
- Abychom mohli říci „tento pacient je pravděpodobně NYNÍ nemocný“ (= nejde o případ, kdy by šlo o stav o dávno prodělané infekci), zpravidla vyžadujeme nejméně **čtyřnásobný vzestup** titru mezi prvním a druhým odběrem krve (tedy za 10–14 dnů)
- Při geometrické řadě s koeficientem dva jde o posun o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

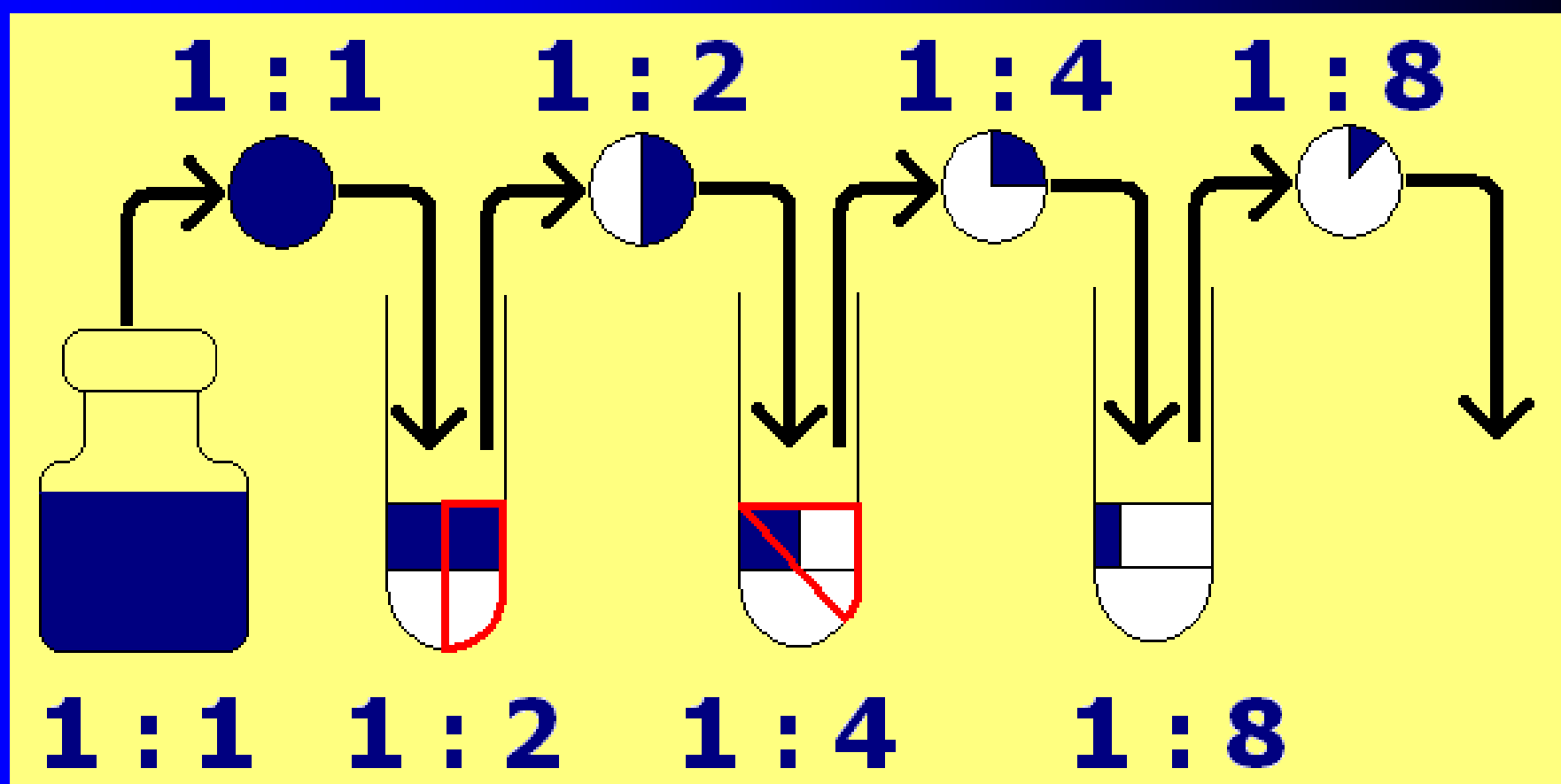
Počítání ředění v serologii

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

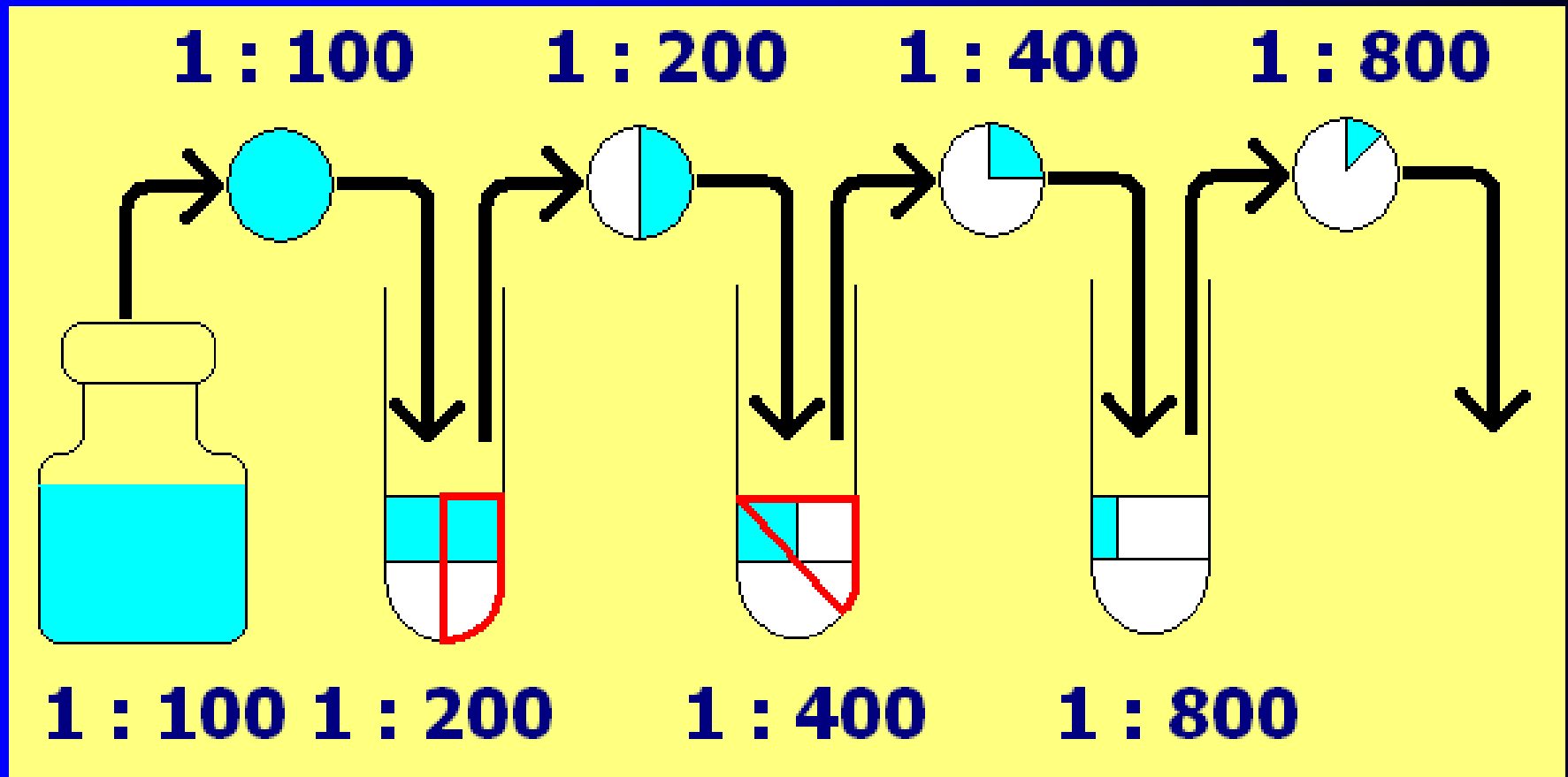
Při „biochemickém“ počítání (počet dílů séra ku počtu dílů diluentu) bychom naše geometrické řady museli značit např. 1 : 9, 1 : 19, 1 : 39, 1 : 79. To by bylo značně nepraktické

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.

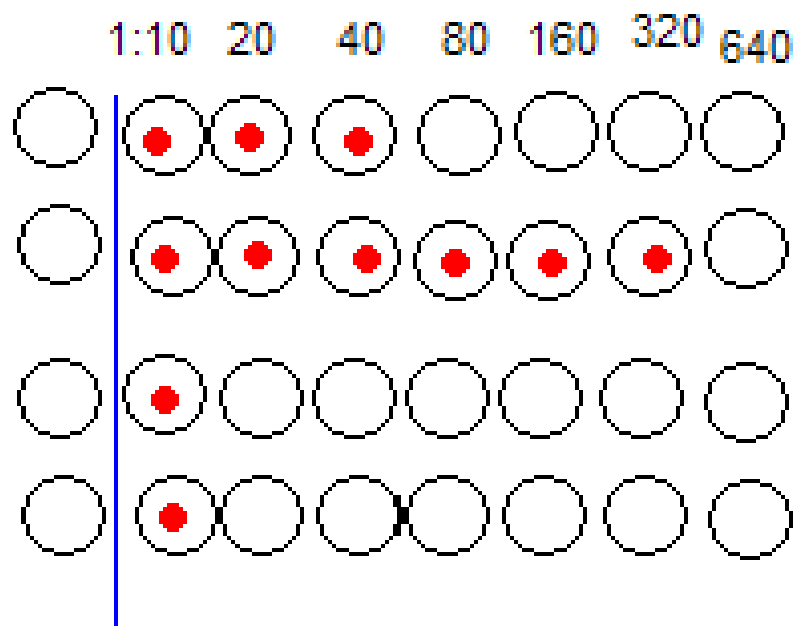
Úkol A1: Klinická situace

- 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

Příklad odečítání výsledku



1:40

1:320

$320 : 40 = 8 \Rightarrow$ osminásobný
vzestup titru \Rightarrow signifikantní
pro čerstvou infekci

1:10

1:10

žádná změna titru, pravděpodobně
dávno prodělaná nemoc

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*

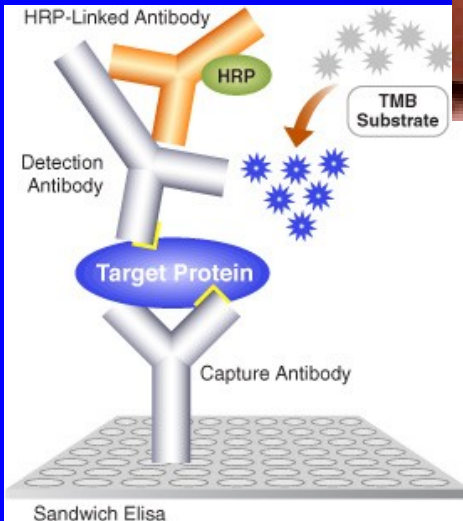
Význam konjugátu

- **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



virology-online.com

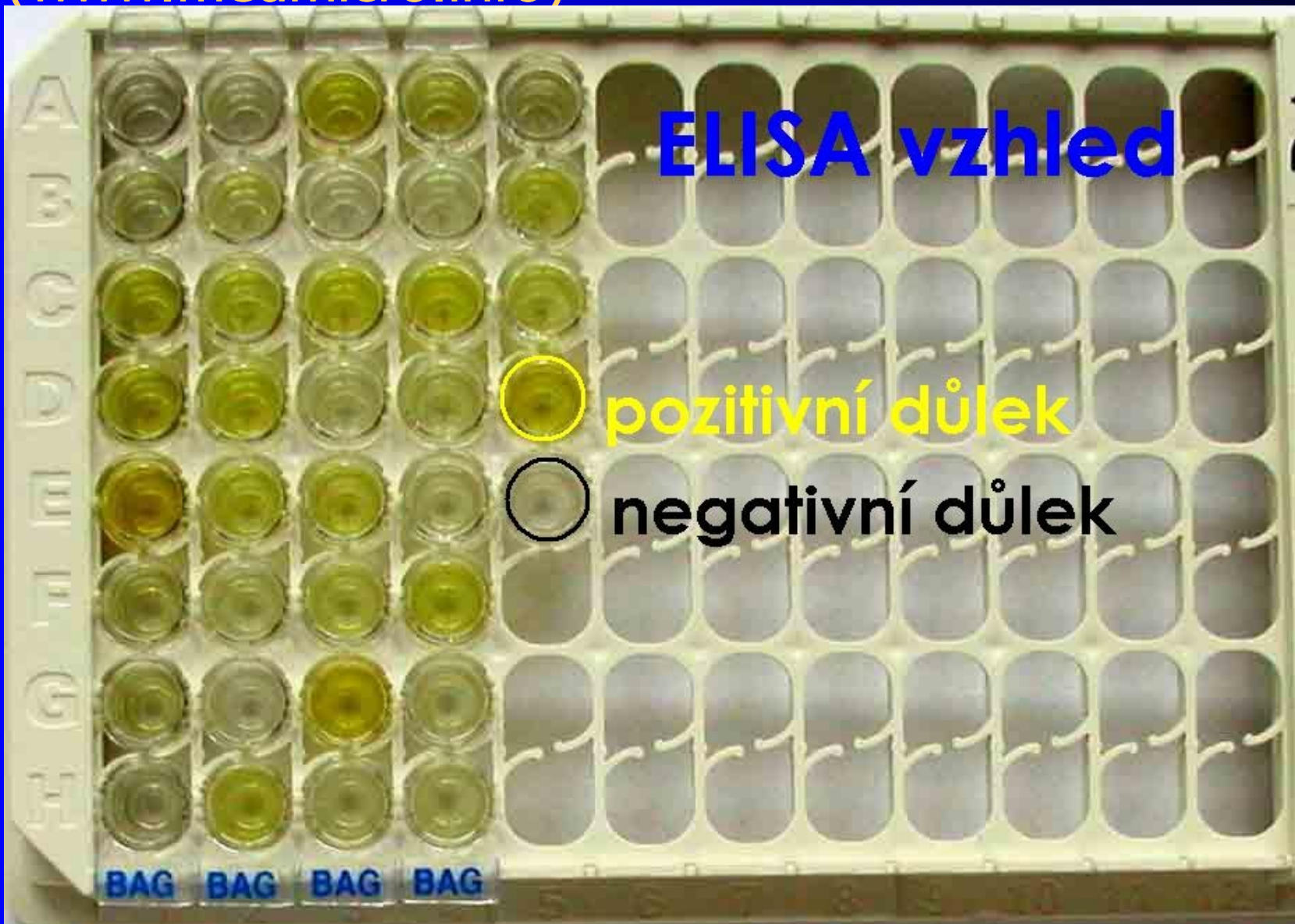
ELISA – praktické provedení

- 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)



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.** Vzniká zóna inhibice, která je 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.

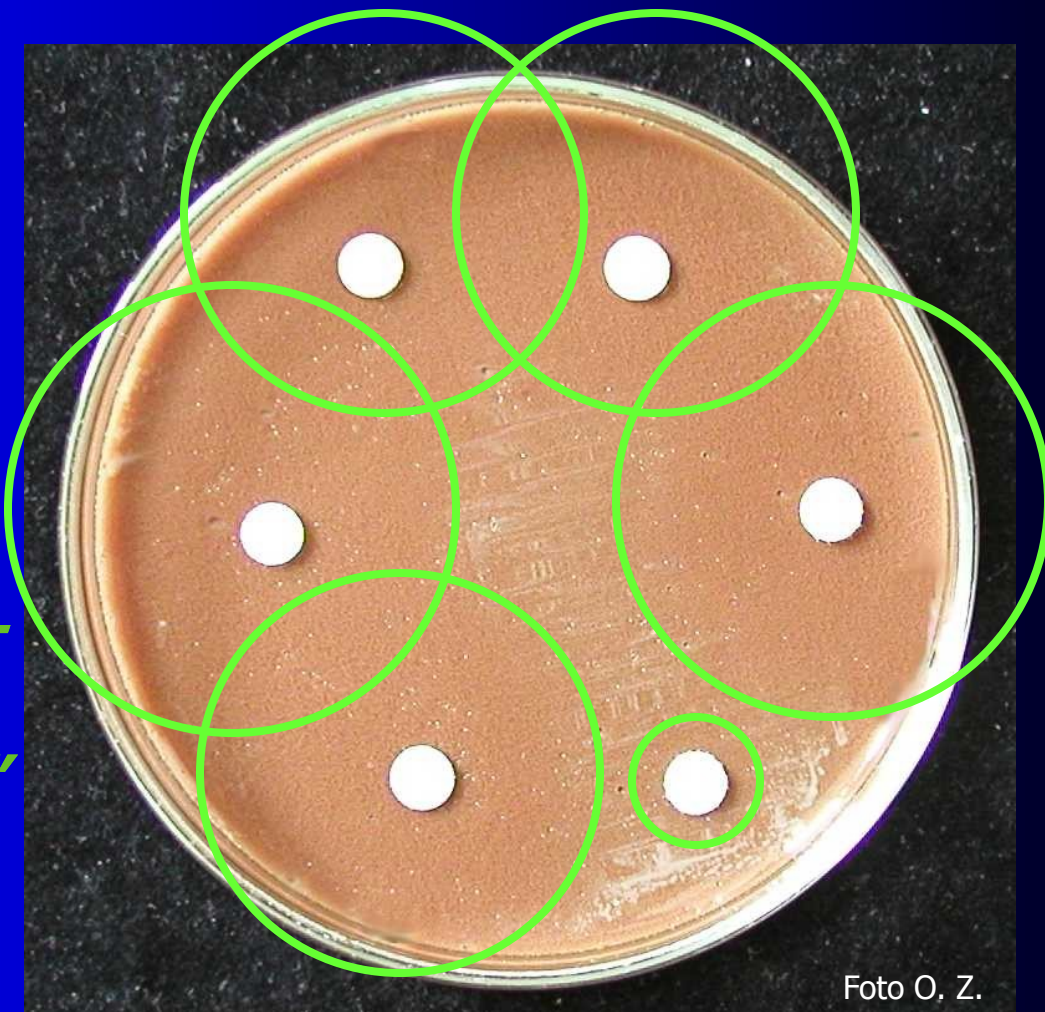
Difúzní diskový test v praxi: zóny se změří a porovnájí s referenčními



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

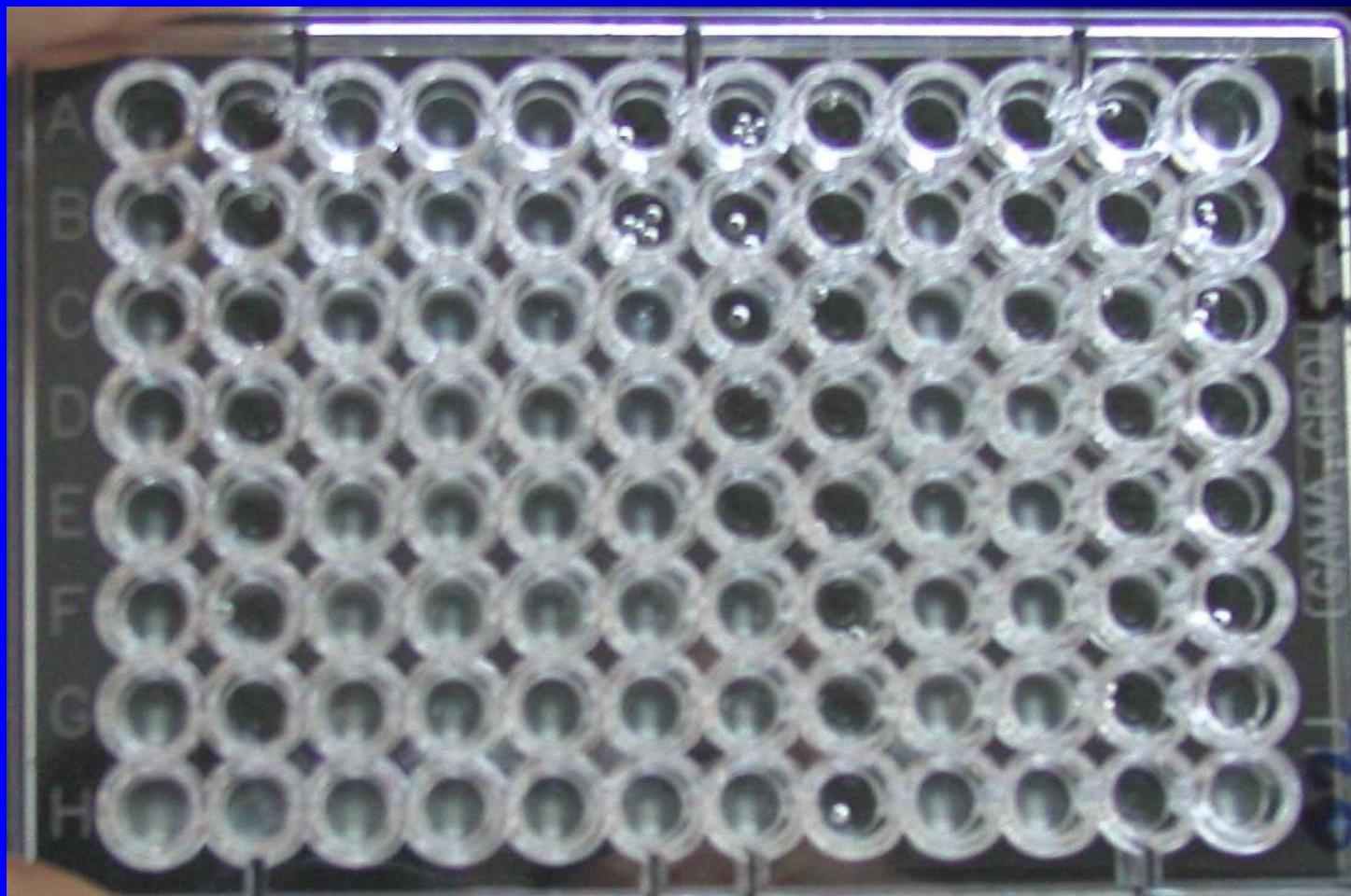
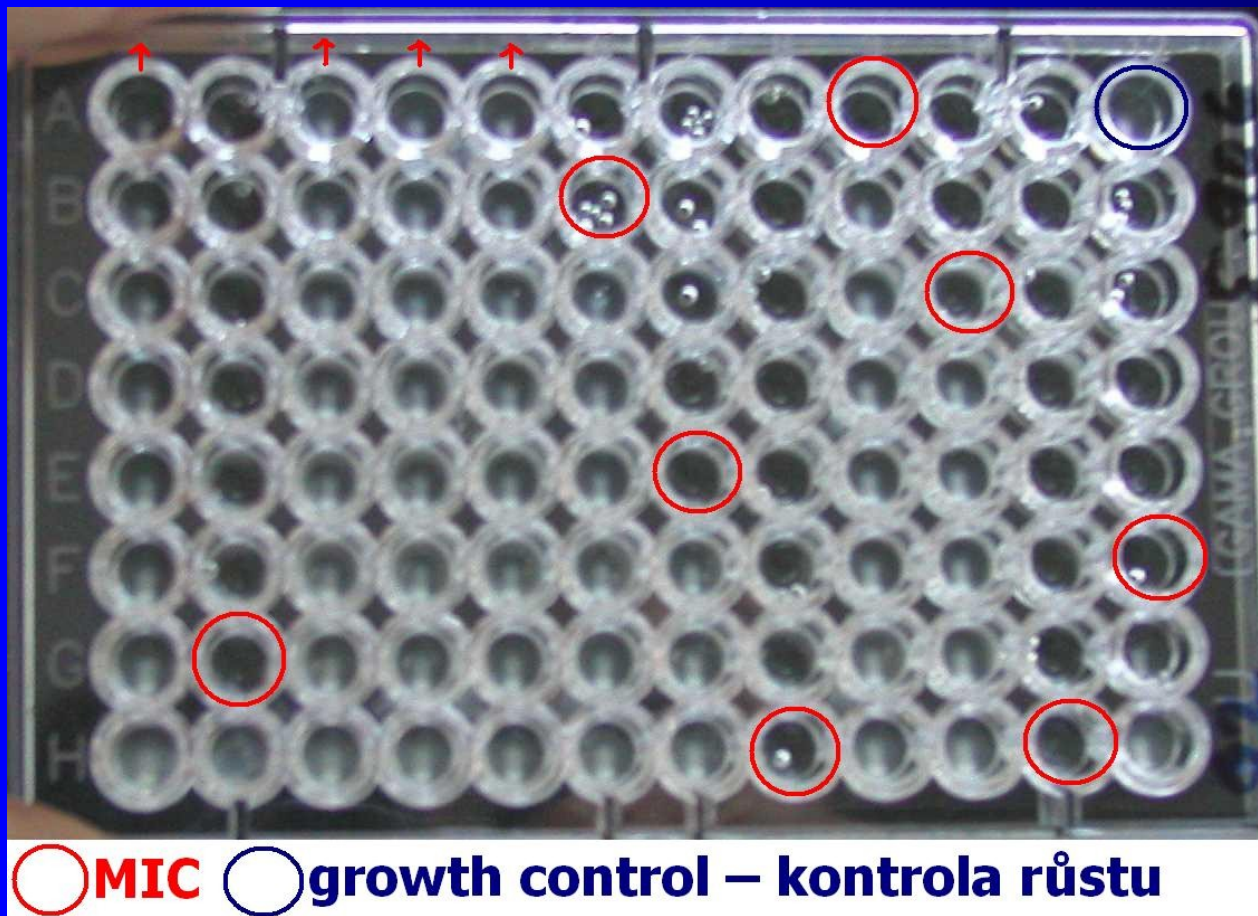


Foto O. Z.

Mikrodiluční test – odečítání

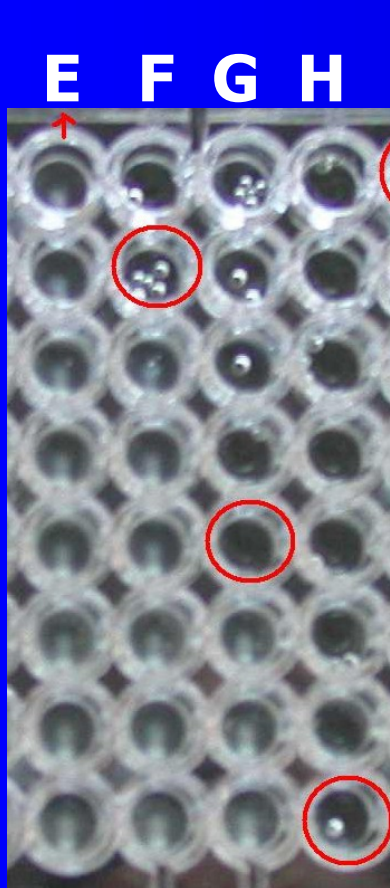


- Ve sloupcích 1, 3, 4 a 5 je hodnota MIC příliš vysoká než aby mohla být změřena.

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)

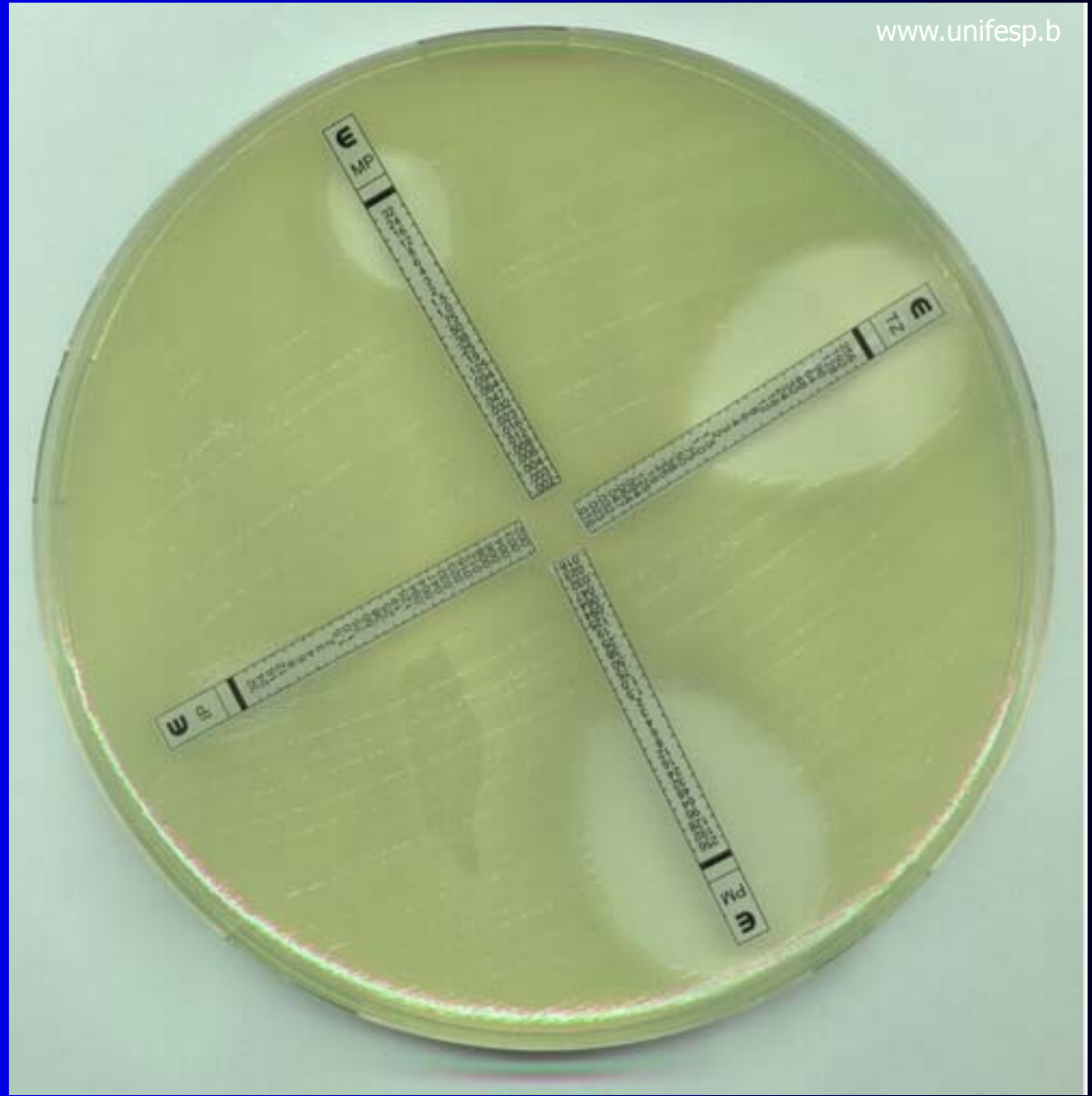
- **Podobné** v principu difúznímu diskovému testu
- Místo disku se však použije **proužek**
- V proužku **stoupající koncentrace atb** od jednoho konce ke druhému (získáno díky speciální technologii – proto jsou tak drahé)
- Zóna **není kruhová, ale vejčitá.**
- Test je **kvantitativní**
- Na papírku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