

Metody analýzy mikroorganismů

doc. RNDr. Milan Bartoš, Ph.D.

Bartos.Milan@atlas.cz

Přírodovědecká fakulta MU, 2015

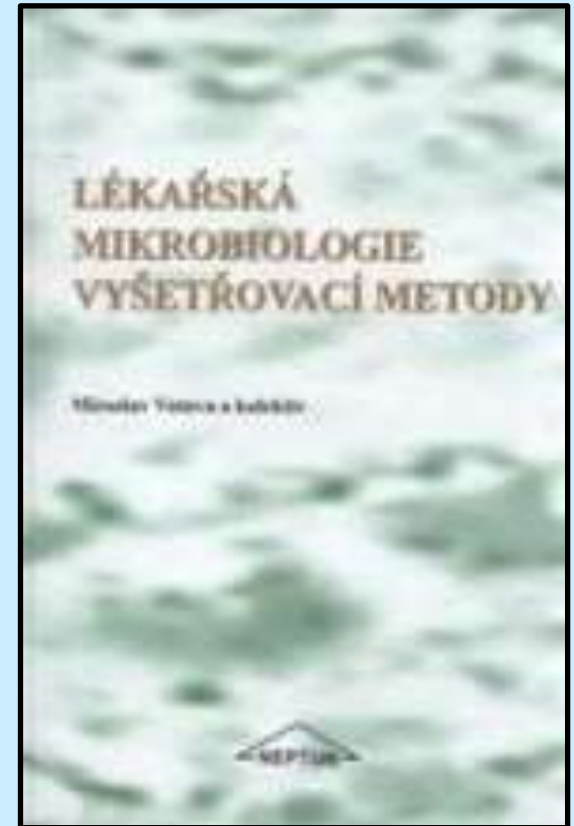
Obsah přednášky

- 1) Přímý průkaz v bakteriologii**
- 2) Nepřímý průkaz v bakteriologii**
- 3) Přímý průkaz virů**
- 4) Nepřímý průkaz virů**
- 5) Vyšetřovací metody v parazitologii**
- 6) Mykologické vyšetřovací metody**



Doporučená literatura

**Votava et al. (2010):
Lékařská mikrobiologie
vyšetřovací metody.
Neptun, Brno**



Účel mikrobiologického vyšetření

Zjistit, který mikroorganismus je příčinou onemocnění, tedy *prokázat etiologické agens infekce.*

- **průkaz přímý**
- **průkaz nepřímý**

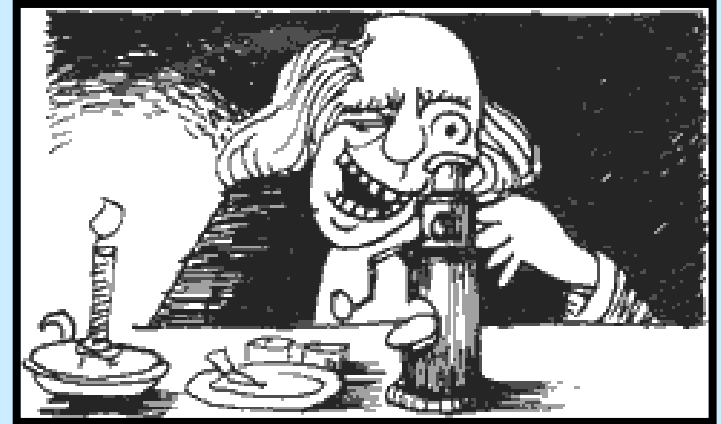
Přímý průkaz spočívá v nalezení mikroorganismu nebo jeho komponent ve vyšetřovaném vzorku

Nepřímý důkaz je založen na průkazu specifických stop zanechaných mikroorganismem v organismu (nejčastěji protilátky)

Metody přímého průkazu

Klasické postupy

- **Mikroskopický průkaz**
- **Kultivace (izolace)**
 - **identifikace**
 - **stanovení citlivosti na antibiotika**

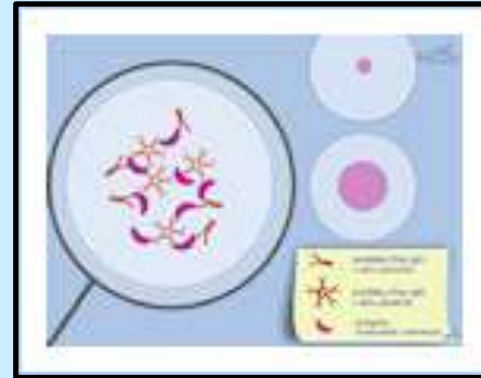


Moderní (nekultivační) postupy

- **Průkaz antigenů**
- **Průkaz nukleových kyselin**
- **Průkaz jiných chemických složek**

Metody nepřímého průkazu

- **Precipitace**
- **Aglutinace**
 - **Aglutinace na nosičích**
- **Vazba komplementu**
- **Neutralizace**
- **Metody se značenými složkami**
 - **Imunofluorescence**
 - **ELISA**
 - **Western blot, aj.**

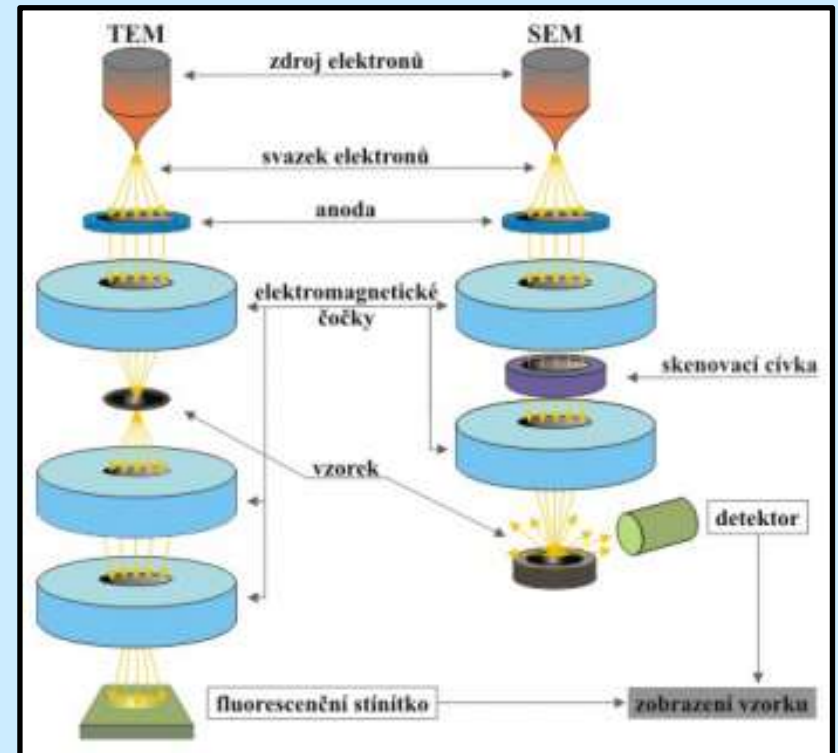


Mikroskopie



Jaké znáte typy mikroskopů?

- Světelný
- Fluorescenční
- Elektronový
 - Transmisní
 - Skenovací (rastrovací, konfokální)
 - ...



Podívejte se například sem:

<http://www.fzu.cz/popularizace/elektronovym-mikroskopem-donitra-materialu-aneb-jak-vypada-jejich-struktura>

Mikroskopický preparát



Jaké znáte typy mikroskopických preparátů?

Nativní

- Mikroorganismy v nativním stavu – živé
- Fyziologický roztok nebo růstové médium

Fixovaný

- Mikroorganismy jsou umrtveny a zafixovány k podložnímu sklíčku
- Tyto preparáty se barví

Zjistěte

- 1) Co to je „louhový preparát“?
- 2) Kde se používá?

Příprava fixovaného preparátu

1) Nátěr

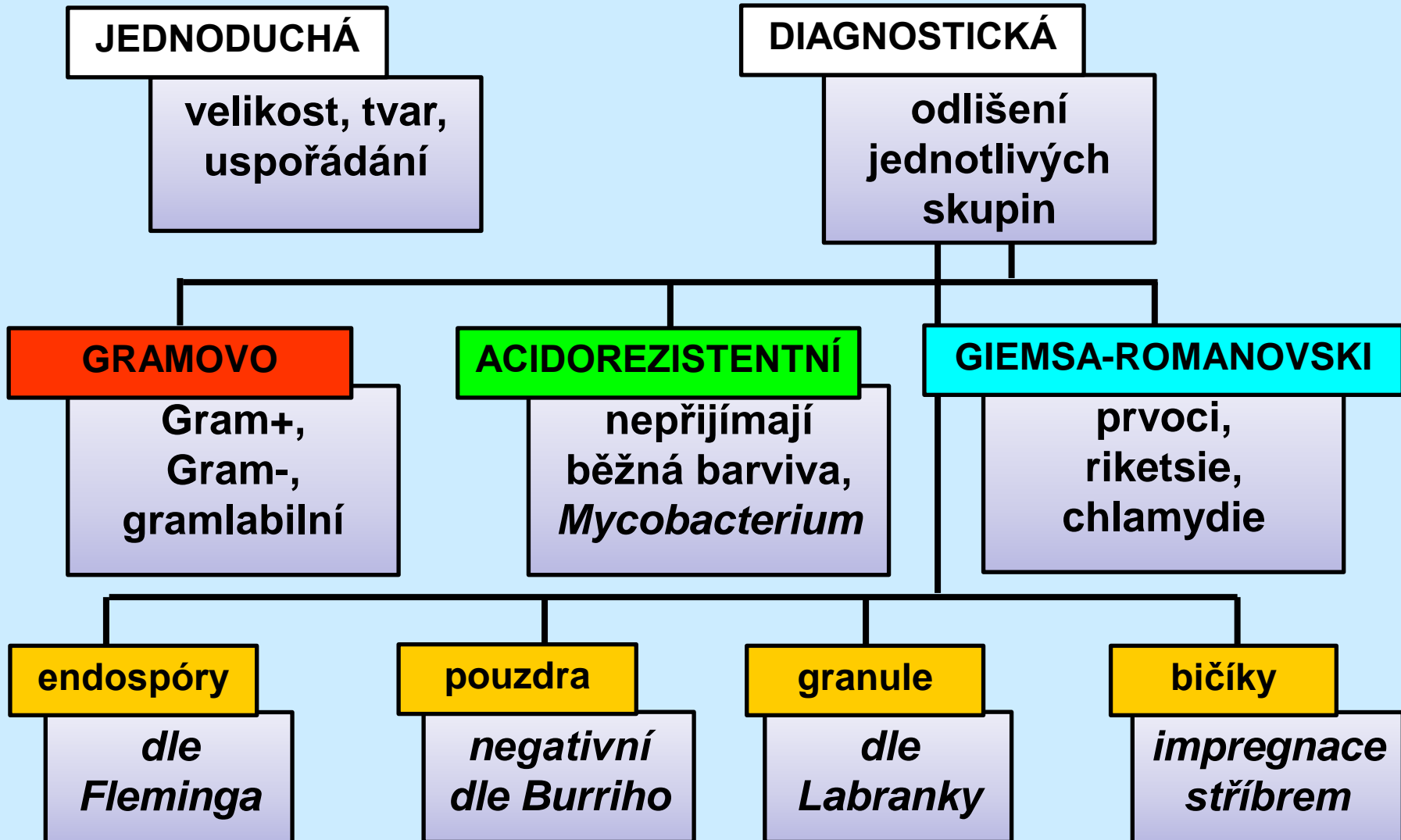
- **nesmí být ani tlustý ani tenký**
- **Ize připravit podobně jako krevní nátěr**
- **vzácně tzv. otisk**

2) Fixace nátěru

- **Šetrná denaturace bakteriálních proteinů**
- **Fixace teplem**
- **Chemická fixace**

3) Barvení preparátu

Zopakujme si druhy barvení



Barvení biofilmů?

Buněčnou část standardními postupy



**Jak byste znázornili
polysacharidovou
matrix u biofilmů?**



Kultivace bakterií



Co s narostlou bakteriální kulturou?

Metody další diagnostiky mikroorganismu

- Mikroskopické určení
- Další kultivace a získání více materiálu
- Biochemická charakteristika
- Antigenní analýza
- Fagotypizace
- **Analýza nukleových kyselin**
- Stanovení citlivosti na antibiotika
- Hmotnostní spektrofotometrie

Biochemická charakteristika

mikroorganismus



enzym

substrát

produkt

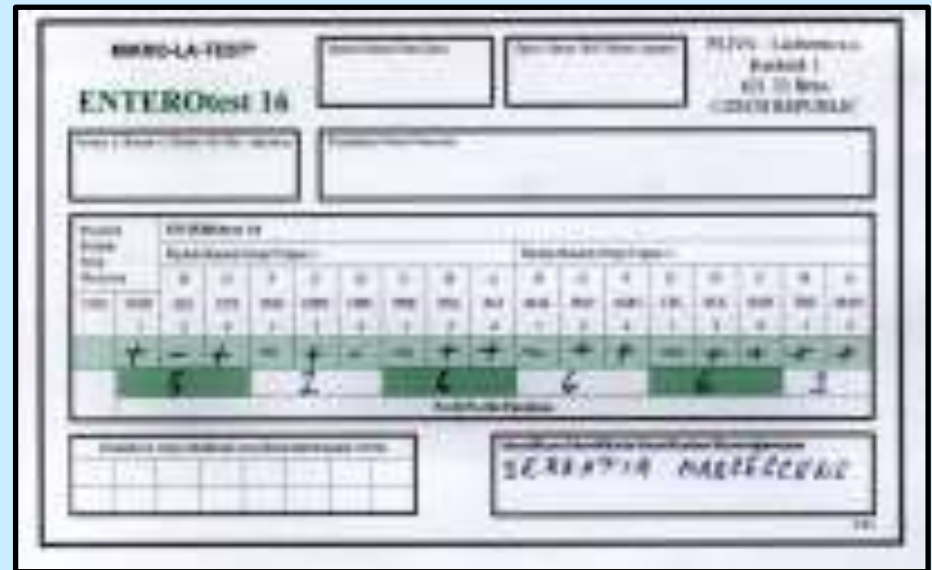
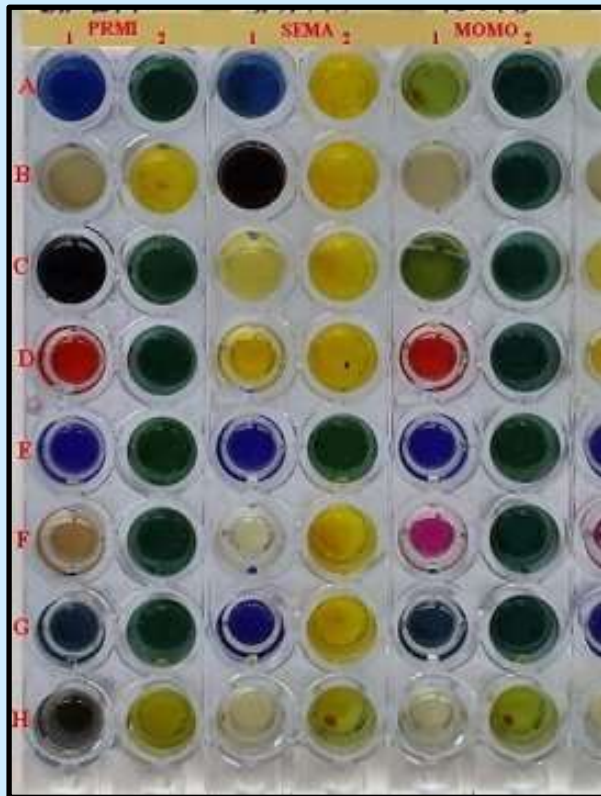
indikátor

reakce
pozitivní



reakce
negativní

Komerční diagnostické testy



Prohlédněte si informace o ENTEROtestu od firmy Lachema na <https://www.lachema.com/attachments/ENTEROtest%2016-CZ+SK+EN+RU+PL.pdf>

Stanovení citlivosti na antibiotika



Jaké znáte typy testů citlivosti na ATB?

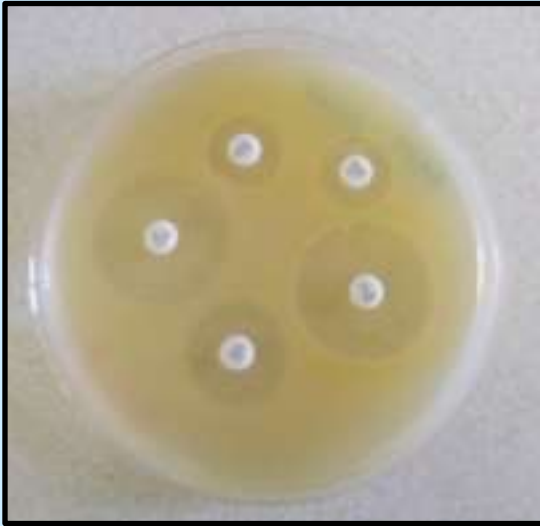
Kvalitativní

- **Diskový difuzní test**

Kvantitativní

- **Stanovení MIC**
- **E-testy**

Diskový difuzní test



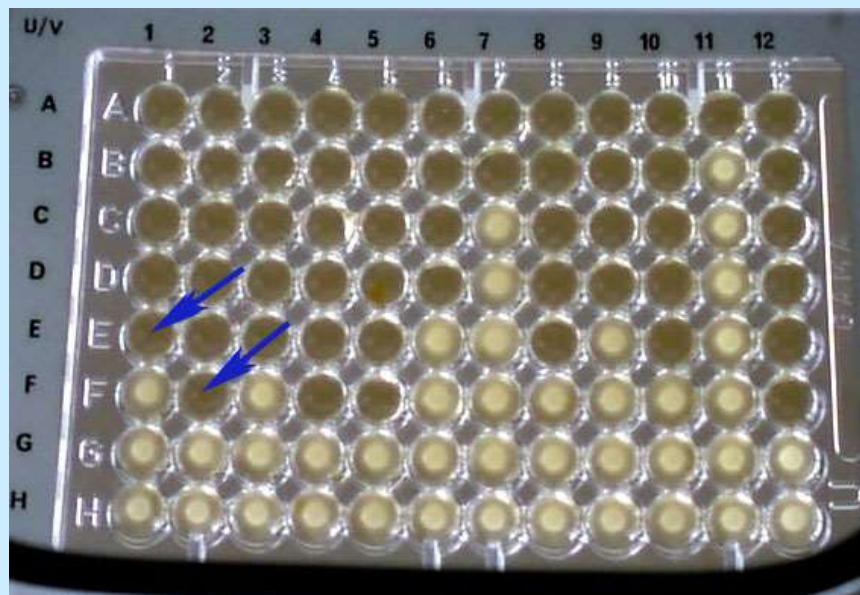
Vysvětlení testu najdete na

<http://old.lf3.cuni.cz/mikrobiologie/bak/uceb/obsah/disktest/disktest.htm>

Stanovení MIC

Minimální inhibiční koncentrace

Suspenze bakterií se nanese do komůrek destičky s rostoucí koncentrací antibiotika

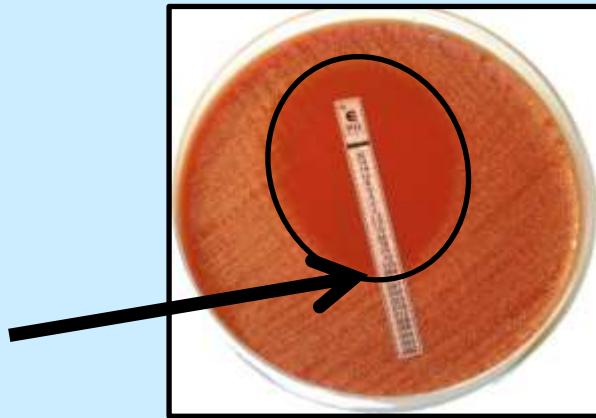


Co to je MBC?

Minimální baktericidní koncentrace

E-testy

- E-test je proužek papíru napuštěný stoupající koncentrací antibiotika
- Má vyznačené koncentrace antimikrobiální látky
- Klade se na misku s naočkovanou suspenzí mikroorganismu



- Inhibiční zóna má vejčitý tvar
- MIC se odečítá v místě protnutí proužku s inhibiční zónou

Průkaz antigenů

Co k průkazu antigenů potřebujeme?



Protilátku

- polyklonální
- monoklonální



Jak průkaz provedeme?

- aglutinací na pevném nosiči (latexová aglutinace)
- koaglutinací na proteinu A z usmrcených stafylokoků

**Průkaz antigenu lze provést
taky metodou ELISA nebo
imunofluorescenčně**



Průkaz nukleových kyselin

Genová sonda

Metody amplifikační

- **Polymerázová řetězová reakce**
- **Ligázová řetězová reakce**
- **...**

Průkaz RNA

Průkaz jiných chemických složek

Průkaz toxinů

- **Botulotoxin**
- **Stafylokokový enterotoxin**
- **Endotoxin gramnegativních bakterií**

Průkaz dalších produktů metabolismu

- **Mastné kyseliny u anaerobů**
- **Kyselina tuberkulostearová u *M. tuberculosis***
- **Značený CO₂ u *Helicobacter pylori***



Nepřímý průkaz



Zopakujme si, co to je ...

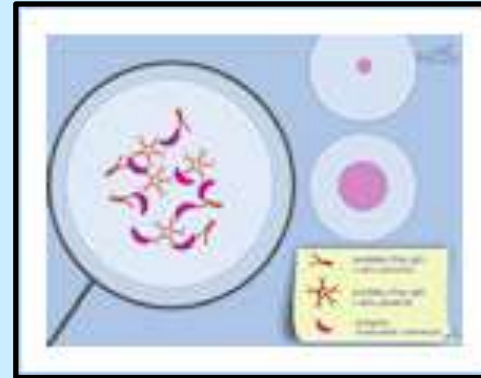
Nepřímý důkaz je založen na průkazu specifických stop zanechaných mikroorganismem v organismu (nejčastěji protilátky)

**Nepřímý průkaz je většinou
průkaz protilátek neboli
průkaz serologický**



Metody nepřímého průkazu

- **Precipitace**
- **Aglutinace**
 - **Aglutinace na nosičích**
- **Vazba komplementu**
- **Neutralizace**
- **Metody se značenými složkami**
 - **Imunofluorescence**
 - **ELISA**
 - **Western blot, aj.**

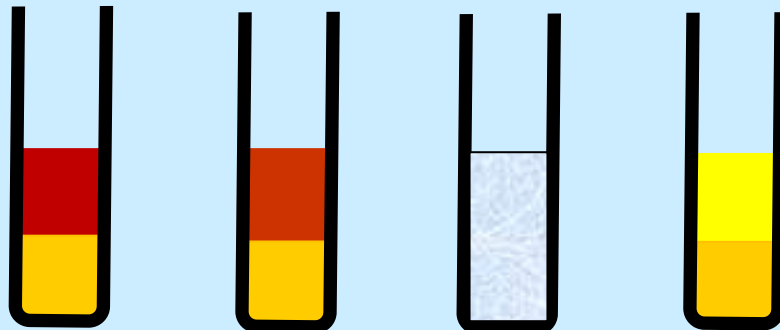


Precipitace

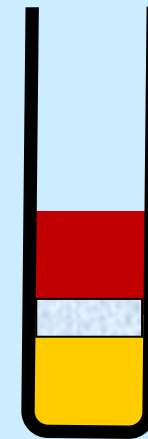
- sérologická reakce - antigen je koloidní povahy
- precipitát vzniká vazbou antigenu a protilátky

Precipitace prstencová

Flokulace



precipitát



antigen

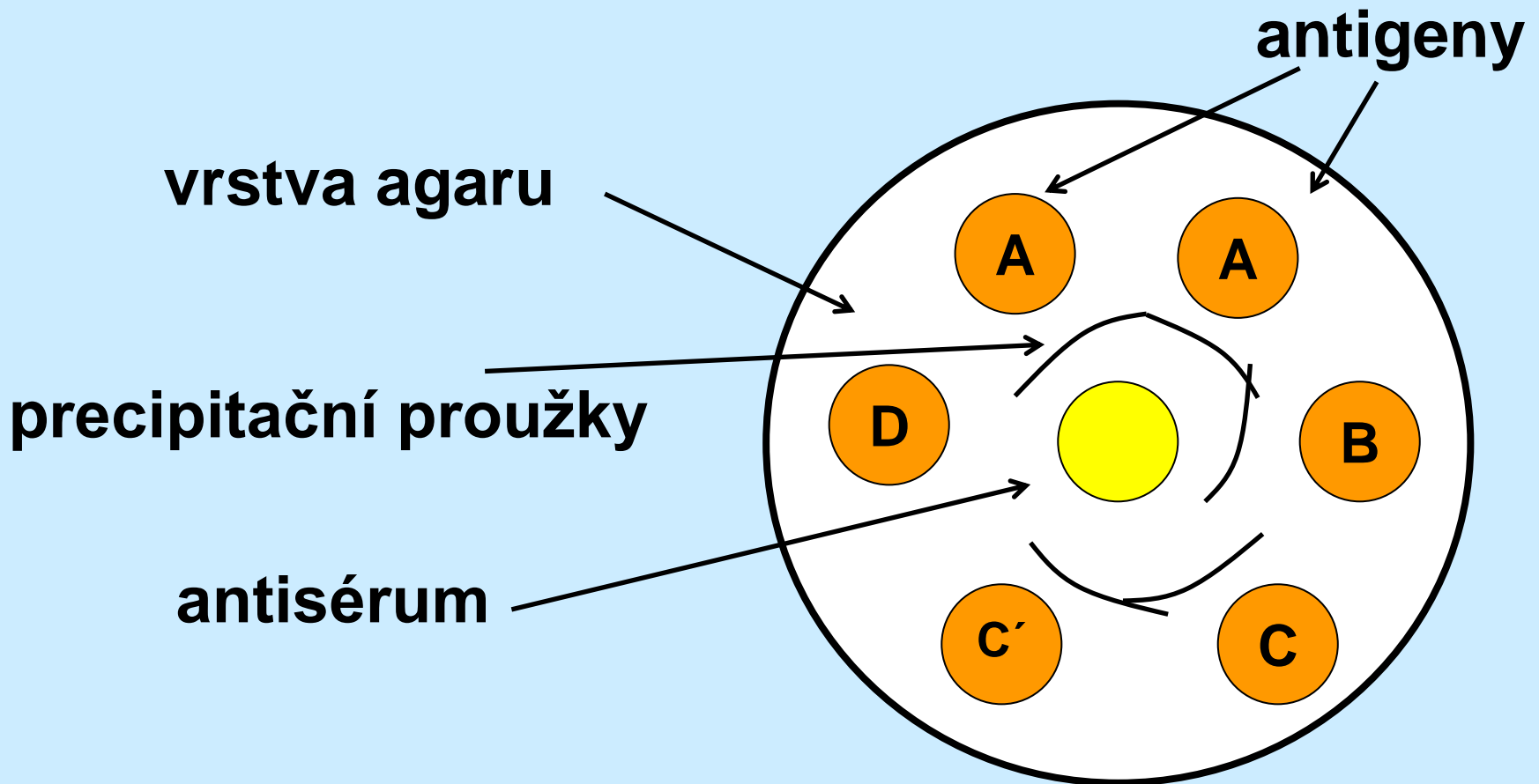
antisérum

flokulace v zóně ekvivalence

rostoucí koncentrace antigenu

Ouchterlonyho technika

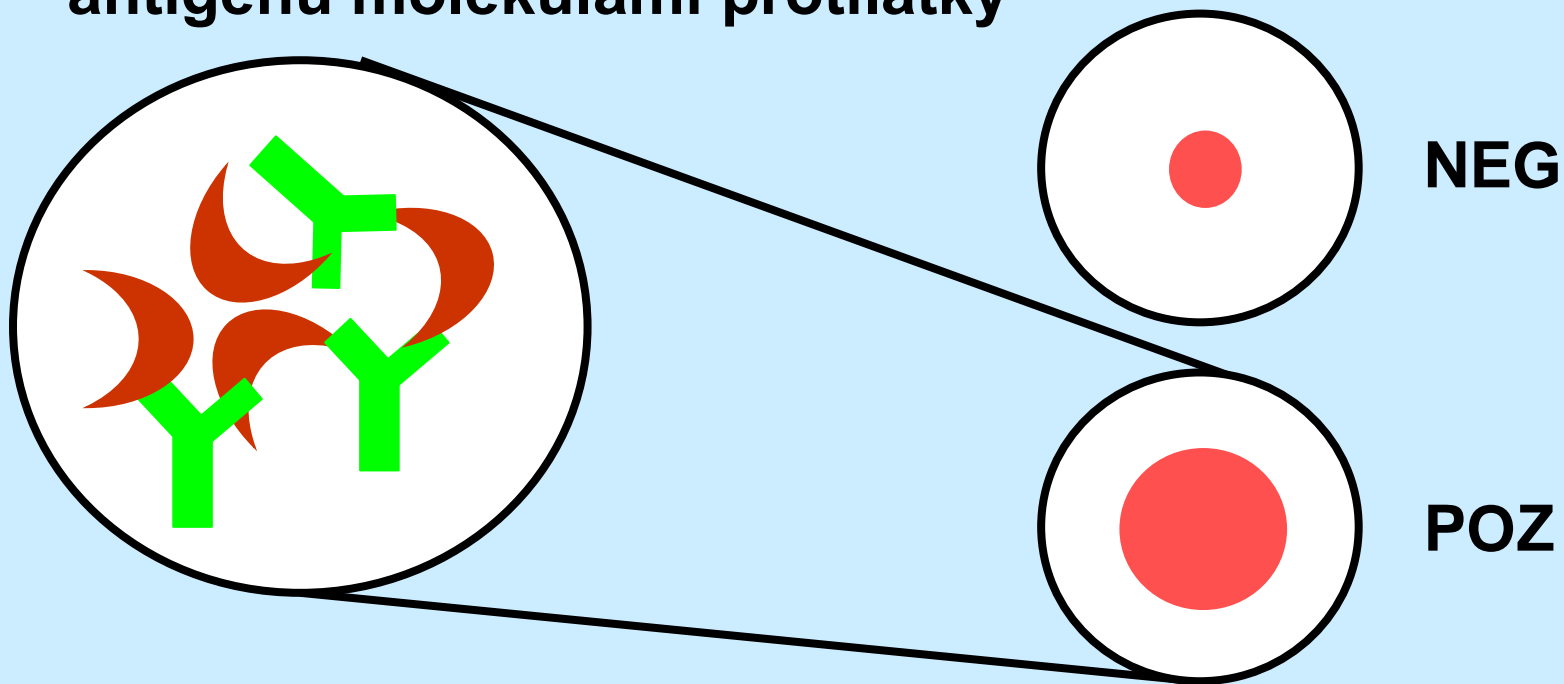
- precipitace využívající difúze v gelu



Radiální imunodifúze dle Manciniové, imunoelektroforéza, vstříčná imunoelektroforéza, ...

Aglutinace

- sérologická reakce - antigen je korpuskulární povahy
- aglutinát vzniká vzájemným pospojováním částic antigenu molekulami protilátky

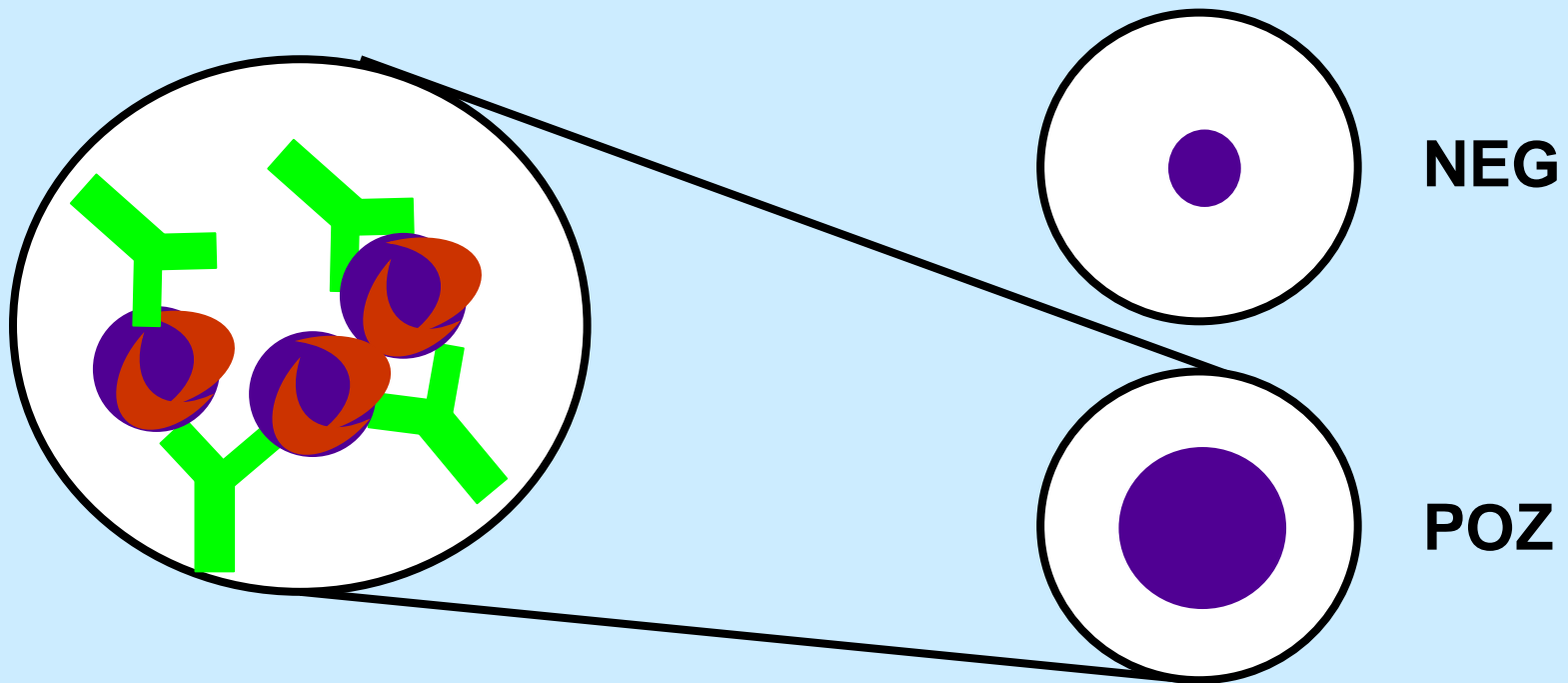


Podívejte se na animaci aglutinace na

http://labmet.zshk.cz/media.aspx?id=ALM007&TB_iframe=true&height=750&width=820

Aglutinace na nosičích

- **Precipitace převedená na aglutinaci**
- **Antigen koloidního charakteru nebo protilátka jsou navázány na povrch částice (latex)**



Podívejte se na animaci aglutinace na nosičích na
http://labmet.zshk.cz/media.aspx?id=ALM007&TB_iframe=true&height=750&width=820

Vazba komplementu

Komplement fixační reakce

- Komplement se váže na komplex antigen-protilátka a dojde k jeho vyčerpání ze systému
- Není-li antigen nebo protilátka přítomen, komplement se nevyčerpá



- Komplement lyzuje erythrocyty



- Vyčerpání komplementu = zábrana hemolýzy
- Nevyčerpání komplementu = hemolýza

Vyhodnocení komplement fixační reakce



Co je tedy pozitivní reakce?
A co je negativní reakce?

Zábrana hemolýzy

Protože je přítomna protilátka a komplement se vyčerpá vazbou na komplex antigen-protilátka

Hemolýza

Protilátka je nepřítomna a nevyčerpaný komplement lyzuje erytrocyty



Neutralizace

Sérologické reakce, při níž protilátka brání biologickým účinkům antigenu

- **ASLO (průkaz antistreptolyzinu), indikátorem jsou králičí erytrocyty**
- **Virusneutralizační test**
- **Hemaglutinačně inhibiční test**
- **Průkaz antipneumolyzinu**
- **Průkaz antistafylolyzinů**
- **Test inhibice metabolismu**
- **...**

Reakce se značenými složkami

Imunofluorescence

Sérologická reakce v níž je jedna složka označena fluorescenčním barvivem

Nepřímá imunofluorescence

- **univerzální metoda**
- **průkaz protilátek proti jakémukoli agens**

Antikomplementová imunofluorescence

- **vazba komplementu proběhlá na podložním sklíčku s fixovaným antigenem**
- **k průkazu protilátek proti viru varicella-zoster a CMV**

ELISA

Enzyme-linked immunosorbent assay

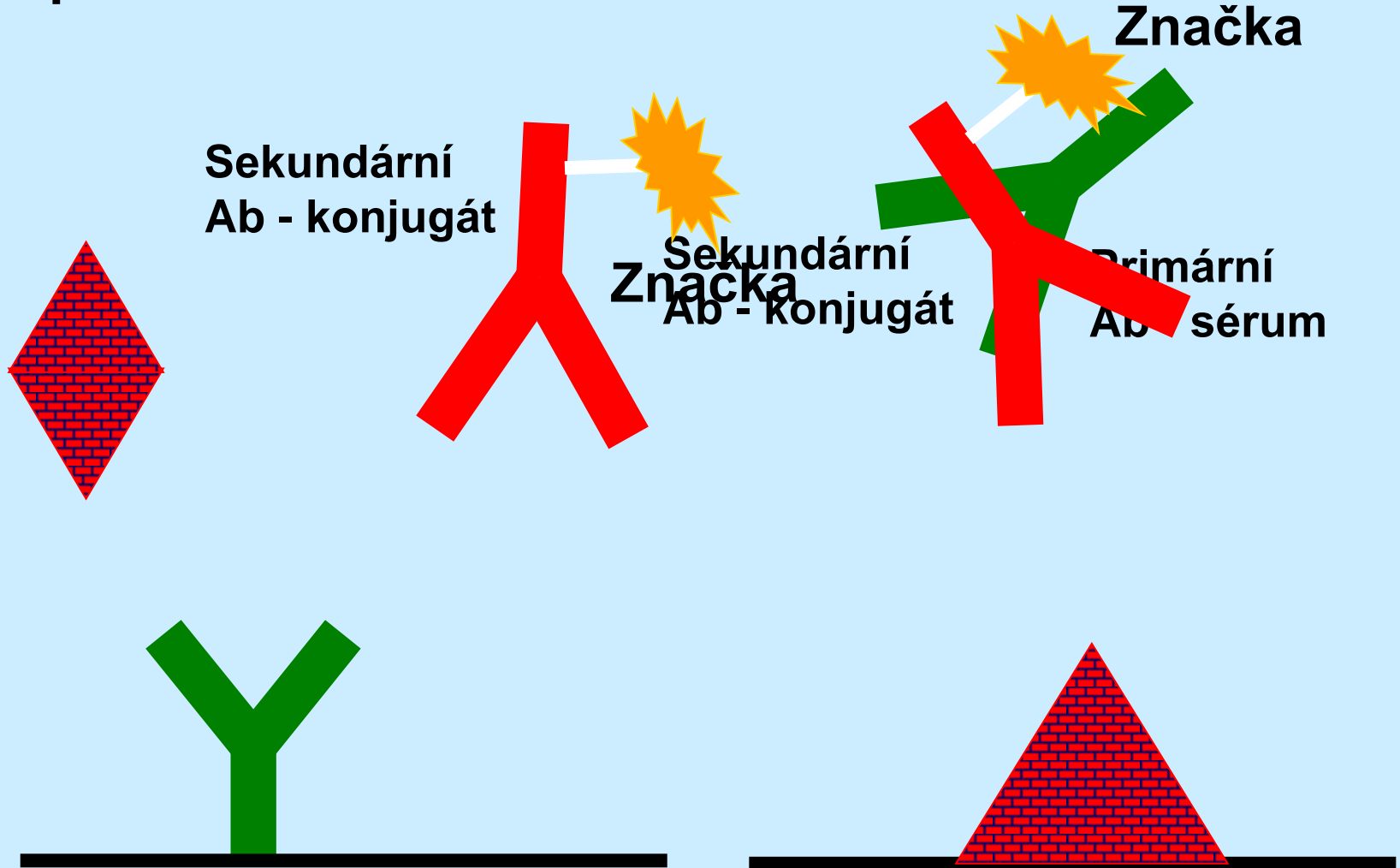
Sérologická reakce v níž je jedna složka označena enzymem

- **Využívá kombinace enzymaticky značené protilátky se sorpcí některé složky na pevný povrch**
- **Nekompetitivní (sendvičová) ELISA**
- **Kompetitivní ELISA**

Typy metody ELISA

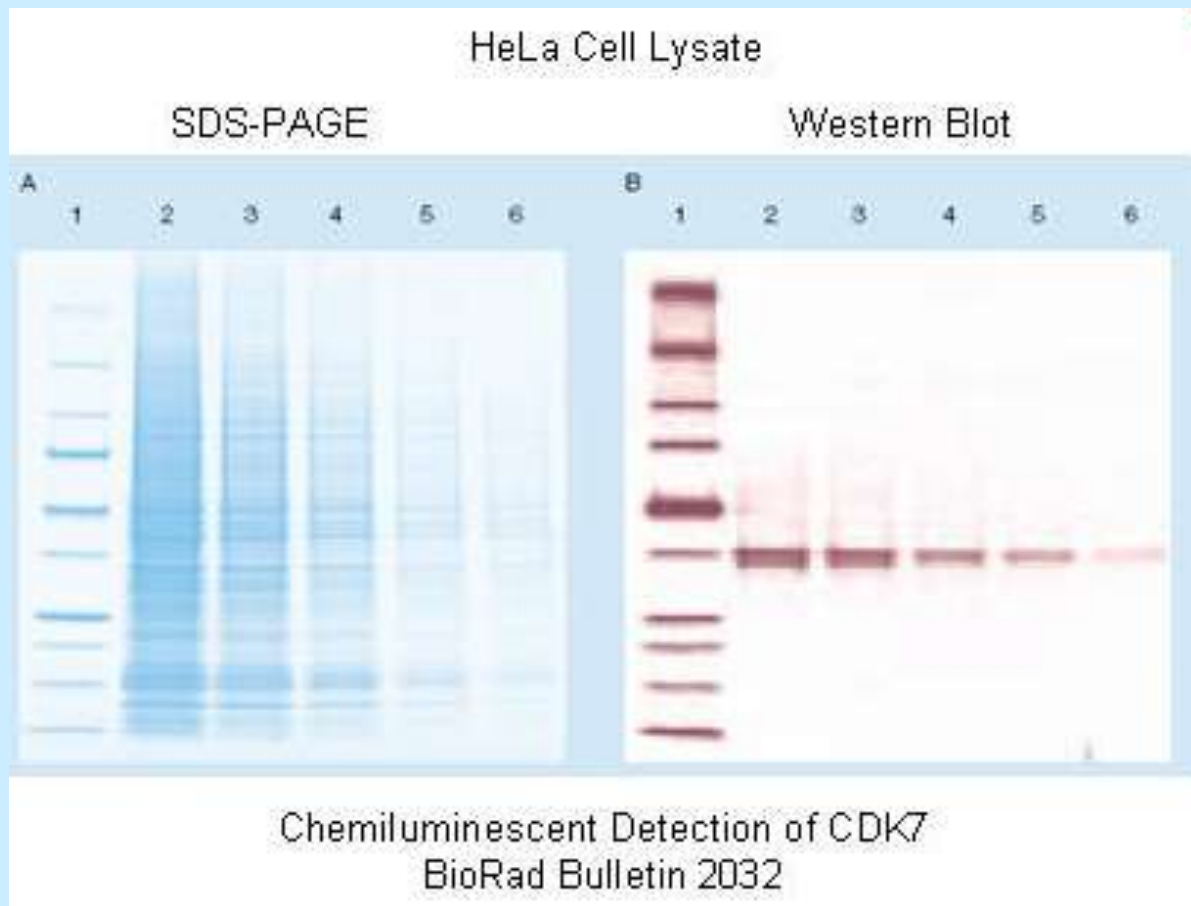
Kompetitivní ELISA

Nekompetitivní (sendvičová) ELISA



Western blot

- Immunoblot – varianta metody ELISA
- Charakterizuje protilátkovou odpověď proti mnohočetným antigenům



Jak se prokazují viry?

- **Průkaz přímý**
- **Průkaz nepřímý**

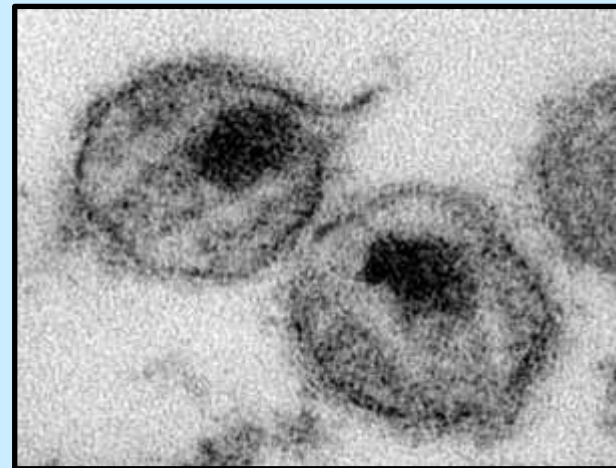
Přímý průkaz virů

- **Mikroskopický průkaz**
- **Průkaz virových antigenů sérologicky**
- **Průkaz typických chemických substancí (průkaz nukleových kyselin)**
- **Průkaz infekčního agens (izolace viru)**

Mikroskopický průkaz virů

Elektronový mikroskop

- **Negativní kontrast**



Světelný mikroskopie

- **Barvení dle Giemsy – poxviry, rickettsie a chlamydie**
- **Cytologický průkaz inkluzí (rabies virus)**

Průkaz virových antigenů

Imunoenzymatická stanovení

- **Metoda ELISA v sendvičovém uspořádání**

Imunofluorescence

- **Rutinní diagnostika vztekliny, chřipky, aj.**

Radioimunologická analýza

- **Nahrazuje se imunometodami**

Precipitace a příbuzné techniky

- **Rotaviry, noroviry a adenoviry**

Imunní elektronová mikroskopie

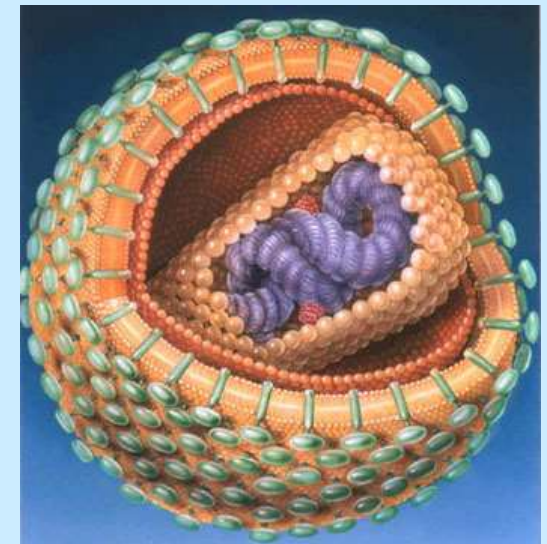
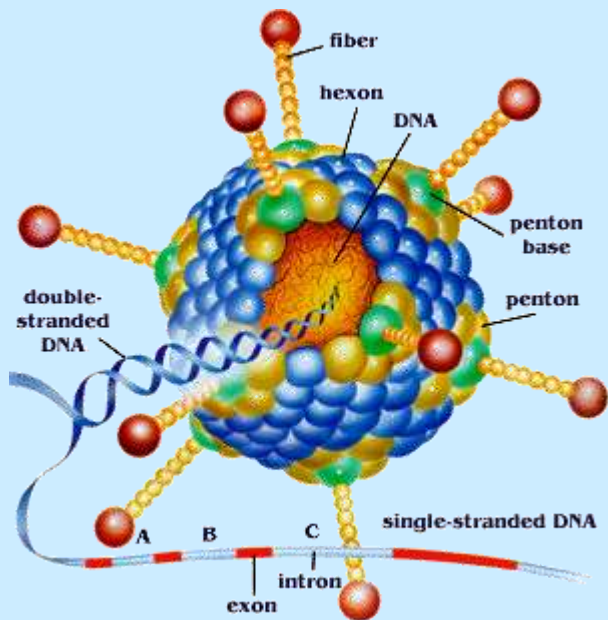
Průkaz nukleových kyselin

Genová sonda

Metody amplifikace

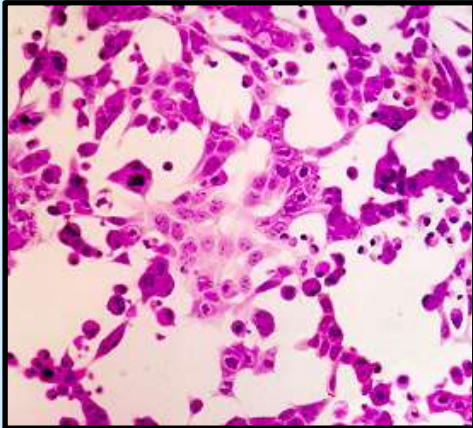
DNA viry

RNA viry



Izolace viru

Buněčné kultury



HeLa buňky infikované
adenovirem

Pokusná zvířata

- Myši
- Sající myšata
- Morčata

Pěstování na kuřecích zárodcích



Produkce vakcíny
proti chřipce

Nepřímý průkaz virů

Komplement fixační reakce

- **Respirační virózy, neuroinfekce, ...**

Reakce se značenými protilátkami

- **Imunofluorescence, ELISA, Western blot**

Neutralizační test

- **Vysoce specifický, pracný a nákladný**
- **Bližší určení virových izolátů**

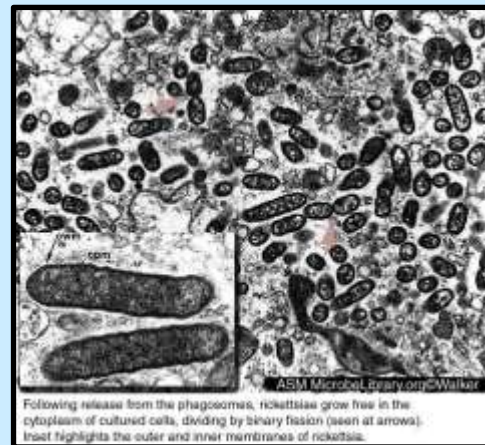
Hemaglutinačně inhibiční test

- **Druhá nejčastěji užívaná sérologická reakce ve virologii**

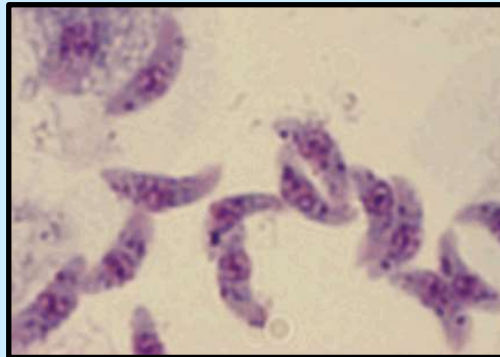
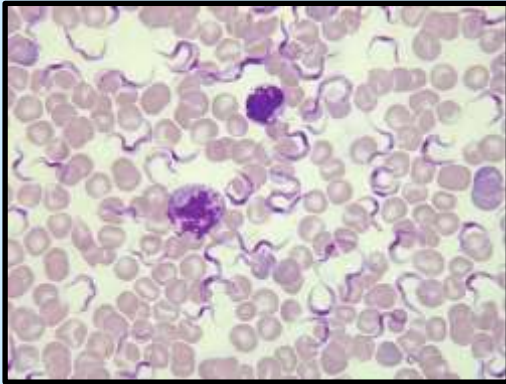
Se kterými bakteriemi se pracuje virologickými technikami?



S rickettsiemi a chlamydiemi



Vyšetřovací metody v parazitologii



Přímý průkaz parazitů

Žádná kultivace, ale morfologický průkaz

- **Makroskopický**
- **Mikroskopický v nativním, otiskovém nebo barveném preparátu**

Průkaz parazitárních antigenů

Ojedinele (u prvoků) průkaz nukleových kyselin

Kultivace *Trichomonas vaginalis*

Pokus na zvířeti u trypanosom, leishmanií a *Toxoplasma gondii*

Nepřímý průkaz parazitů

Prokazují se pouze protilátky

- **Diagnostika protozoóz a helmintóz**
- **U nás především toxoplasmóza a larvární toxokaróza**
- **Většinou se vzorky stolice, perianálních otisků a krve odesílají do spádových nebo referenčních laboratoří**



Znáte referenční laboratoř pro průkaz parazitů?

Mykologické vyšetřovací metody

Podobné metodám bakteriologickým

- **Mikroskopické vyšetření klinického materiálu**
- **Kultivace vedoucí k identifikaci etiologického agens**
- **Stanovení citlivosti k antimykotikům**
- **Průkaz přítomnosti faktorů virulence**
- **Méně často se využívá antigenní analýza a imunochemické metody**
- **Nepřímý důkaz pro rychlou diagnostiku invazivních mykóz**
- **Metody molekulárně-biologické pro identifikaci a typizaci agens**

Shrnutí

- 1) Přímý průkaz v bakteriologii
- 2) Nepřímý průkaz v bakteriologii
- 3) Přímý průkaz virů
- 4) Nepřímý průkaz virů
- 5) Vyšetřovací metody v parazitologii
- 6) Mykologické vyšetřovací metody

