

# NEPŘÍMÝ PRŮKAZ MIKROORGANISMU

## PRŮKAZ VIRU

### ANAEROBY praktikum č. 7

Lékařská mikrobiologie – cvičení  
Mikrobiologický ústav LF MU

# Obsah cvičení

---

- ▶ Nepřímý průkaz mikroorganismu
  - Serologie, precipitace, aglutinace
  - Titr, KFR, neutralizace
  - Reakce se značenými složkami
- ▶ Průkaz virů
- ▶ Anaerobní bakterie
  - Charakteristika, význam, léčba
  - Diagnostika



# Antigeny a protilátky

---

- ▶ **Antigen (Ag)** = makromolekula pocházející z cizího organismu – mikroorganismu, rostliny, živočicha. Ve vzácných případech pochází z těla vlastního - vadné, staré buňky.
- ▶ **Mikrobiální antigeny** = části mikroorganismu nebo jeho produkty (např. toxiny), které v hostiteli vyvolávají antigenní odpověď.
- ▶ **Protilátka (Ab = antibody)** = odpověď na antigenní výzvu, váže se specificky na antigen nekovalentní vazbou. Bílkovina z rodiny imunoglobulinů.
- ▶ **Zkřížená reaktivita** = reakce Ab na Ag, který je pouze podobný tomu, který vyvolal její tvorbu.



# Metody průkazu mikroorganismu

---

- ▶ **Přímý průkaz** – nalezení mikroorganismu či jeho části nebo produktu. Mikroskopie, kultivace, biochemická identifikace průkaz antigenu. **Pozitivní nález = agens je přítomno nyní.**
- ▶ **Nepřímý průkaz** – detekce protilátek proti mikroorganismu. **Pozitivní nález = agens bylo v pacientovi přítomno v minulosti.**
- ▶ **Přímý průkaz** – reakce Ag s Ab → laboratorní Ab + vzorek od pacienta či kmen mikroba.
- ▶ **Nepřímý průkaz** – reakce Ag s Ab → laboratorní Ag + sérum pacienta.



# Nepřímý průkaz - interpretace

---

- ▶ Pozitivní nález Ab = přítomno agens → ale kdy?
- ▶ Možno alespoň odhadnout pomocí:
  - **Množství protilátek** (relativní – **titr**) a jeho změny v čase (dynamika titru – viz P07)
  - **Třída protilátek** – IgM/IgG (více v P08)
  - (***Avidita protilátek***)
- ▶ Kvantitativní hodnocení množství protilátky → ředění séra (viz dále):
  - Reakce je pozitivní i po velkém ředění pacientova séra = velké množství antigenu.
  - Reakce je negativní po velkém ředění pacientova séra = malé množství antigenu.



# Nepřímý průkaz - interpretace

---

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



# Nepřímý průkaz - interpretace

---

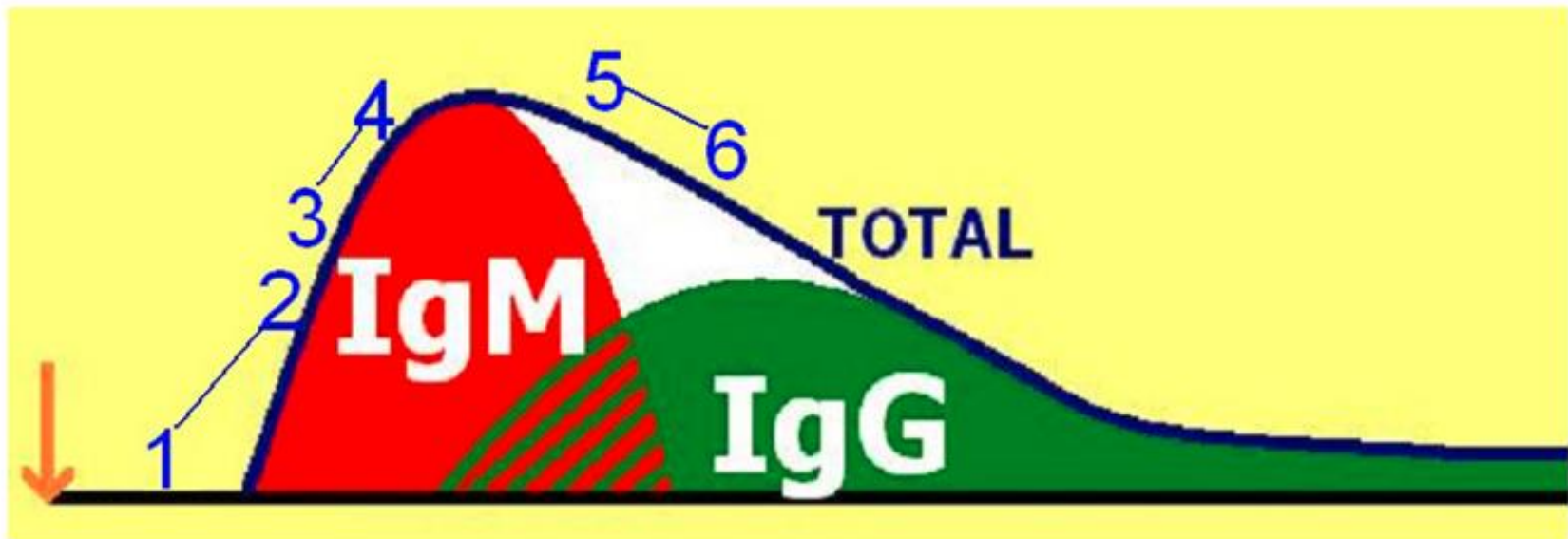
- ▶ Časté použití tzv. **párového séra** = první vzorek je uchováván v ledničce, dokud nepřijde druhý vzorek (10 – 21 dní). Oba vzorky jsou pak hodnoceny najednou. Čtyřnásobný vzestup množství protilátek = signifikantní pro akutní infekci.
- ▶ **Nepárová séra** – druhý vzorek vyšetřen zvlášť – zvětšuje se riziko náhodné chyby.
- ▶ **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).
- ▶ Velikost titru rozhodně neodpovídá vývoji klinických příznaků. Množství protilátek často vrcholí, až příznaky zmizí.



# Nepřímý průkaz – dynamika titru

---

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





# Ředění séra: Geometrická řada

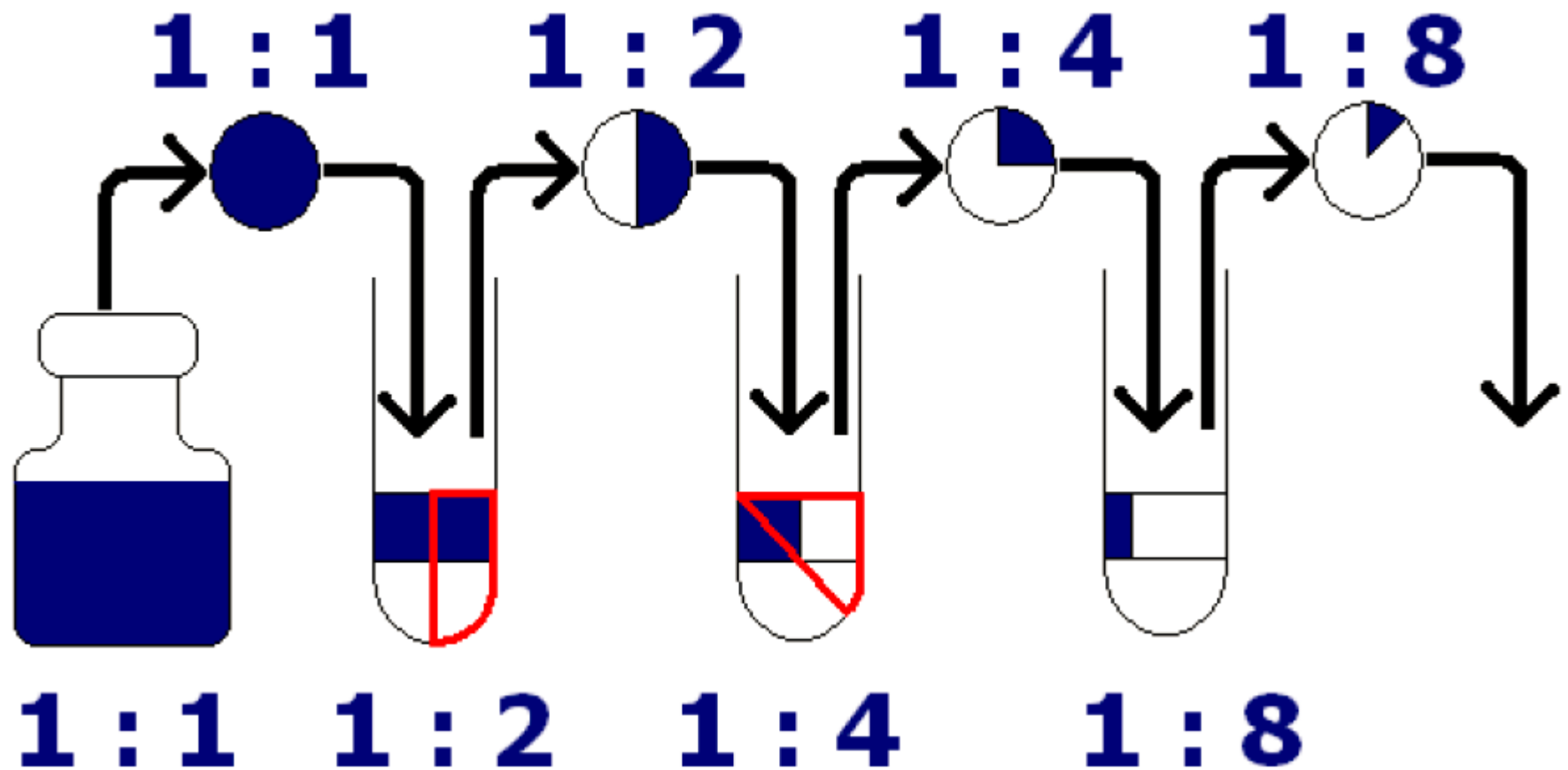
---

- ▶ Nejjednodušší způsob ředění séra je použití geometrické řady **s koeficientem dva**.
- ▶ Výchozí je sérum neředěné nebo předředěné (např. 1:5, 1:10, 1:20, 1:40 atd.) a v každém následujícím ředění (=důlku) je dvojnásobné ředění oproti předchozímu (např. 1:10, 1:20, 1:40, 1:80...).
- ▶ Pozor na odlišnost v počítání biochemickém a „serologickém“!
- ▶ Serologicky – 1:10 → 1 díl séra a 9 dílů fyziologického roztoku.
- ▶ Biochemicky – 1:9 → 1 díl séra a 9 dílů fyziologického roztoku.



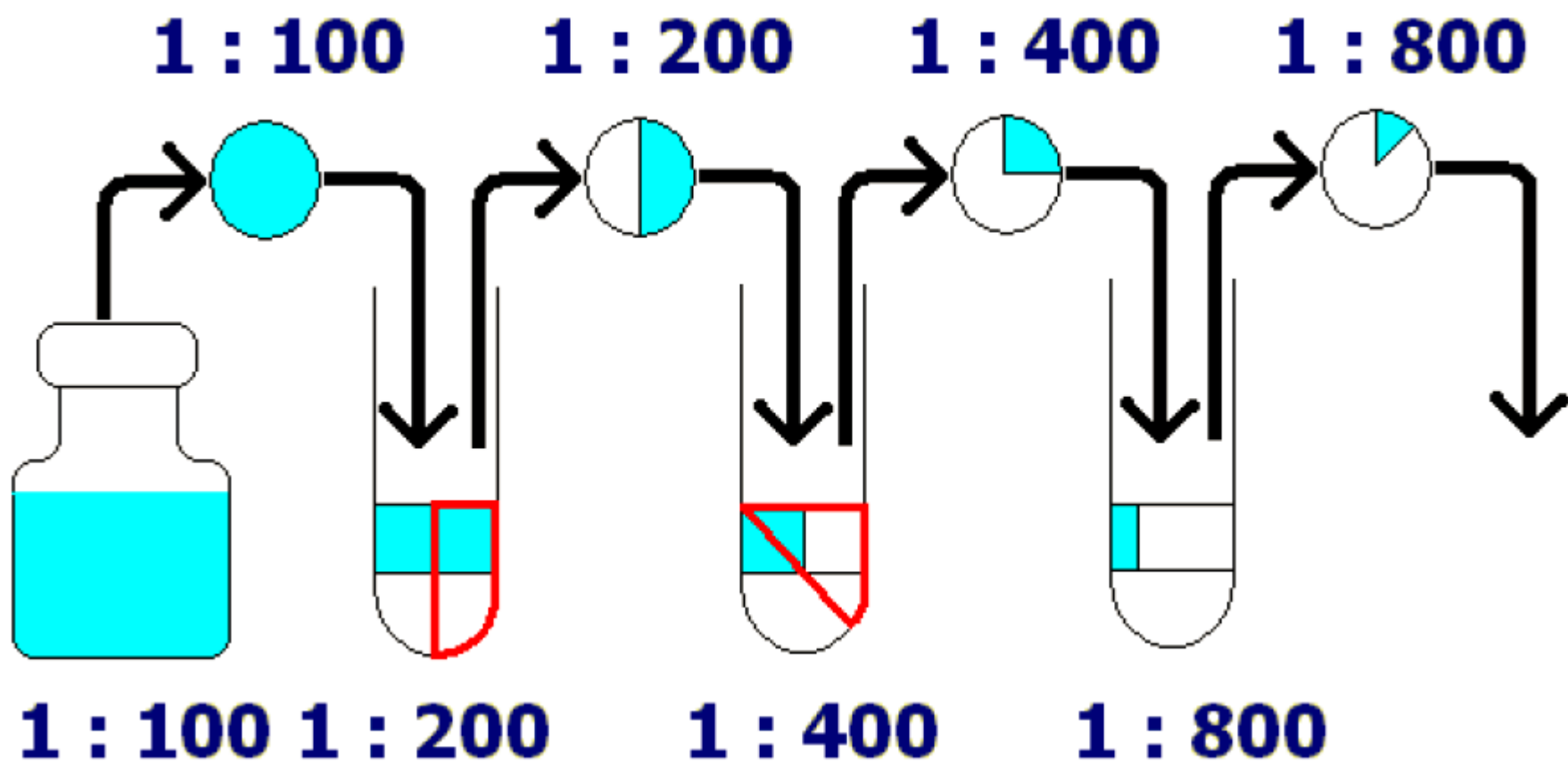
# Ředění séra: Geometrická řada

- ▶ Bez předředění séra:



# Ředění séra: Geometrická řada

- ▶ S předředěním séra:



# Ředění séra: Titr

---

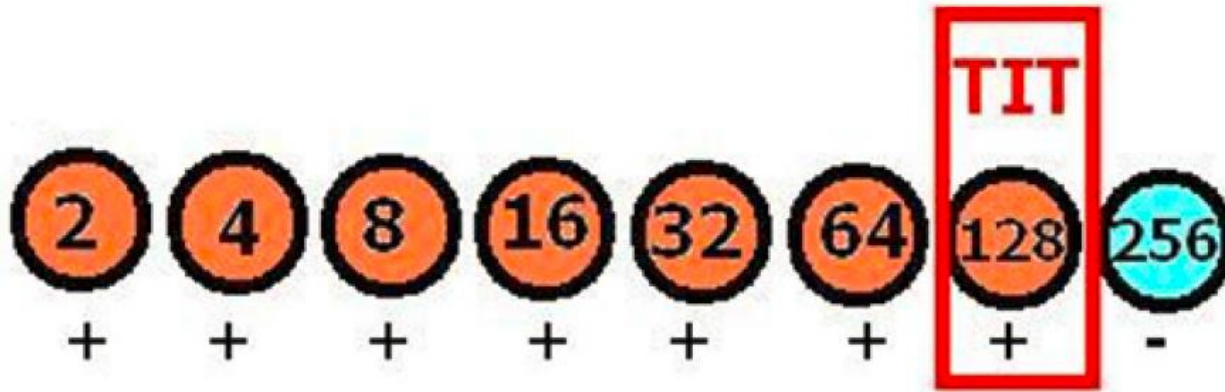
- ▶ **Princip reakce:** po naředění séra přidáme antigen.
- ▶ A) výsledek je viditelný hned
- ▶ B) výsledek je třeba znázornit přidáním dalších složek (červené krvinky, komplement...)
- ▶ (Pro připomenutí: komplement = viz dále)
- ▶ **Titř** = nejvyšší ředění, kde je ještě viditelná pozitivní reakce.



# Ředění séra: Titr

---

- ▶ Pokud máme dvě řady ředění, titr je nejvyšší ředění z obou těchto řad.



- ▶ Kdy titr neurčujeme:
    - Když jde o průkaz antigenu.
    - Screeningové reakce – kvalitativní testy. Typicky například testy v těhotenství – např. syfilis.
- 



# Precipitace a aglutinace – obecně

---

- ▶ Nejjednodušší serologické reakce – pouze Ag + Ab, žádné další složky.
- ▶ **2 typy reakcí:**
  - Důkaz Ag pomocí zvířecí nebo monoklonální Ab (= vyrobenou klonální populací plazmatických buněk). Nezjišťujeme titr.
  - Důkaz Ab laboratorním Ag. **Zjišťujeme titr.**



# Precipitace a aglutinace – obecně

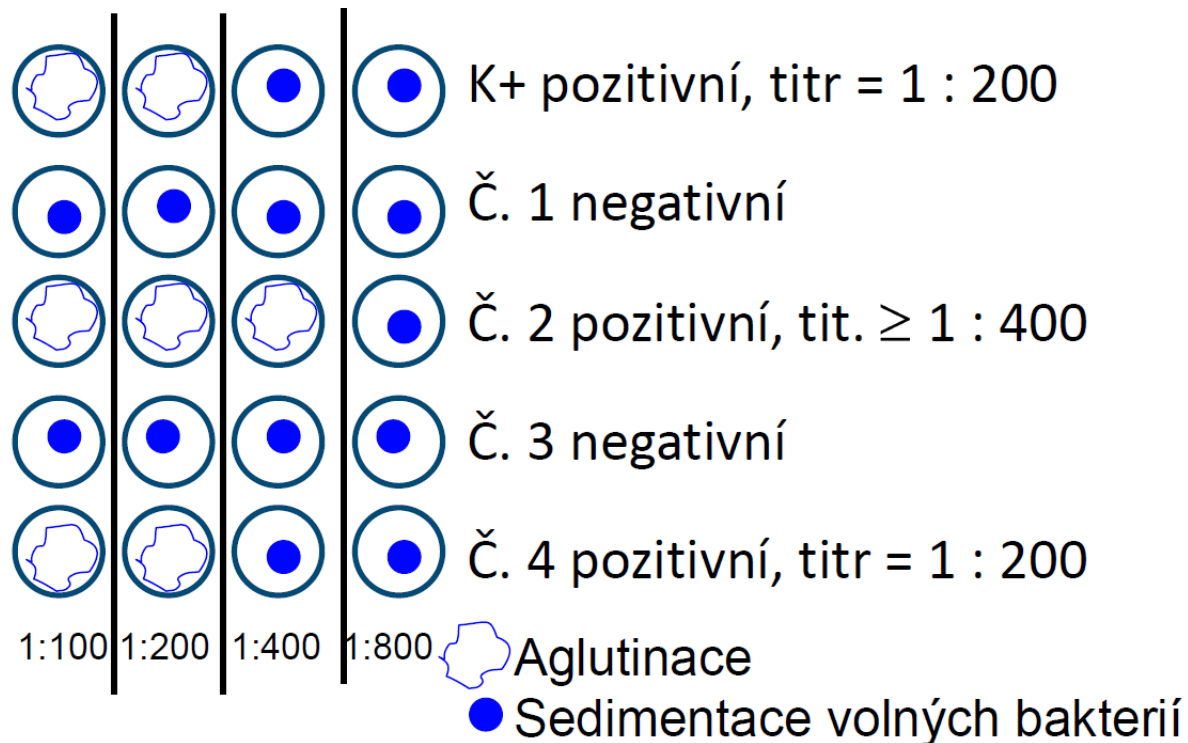
---

- ▶ **Precipitace:** antigeny koloidní = ve formě izolovaných makromolekul.
- ▶ **Aglutinace:** antigen korpuskulární = antigen je součástí buňky mikroba → práce s celými mikroby.
- ▶ **Aglutinace na nosičích:** izolované antigeny jsou navázány na nosič (latex, erytrocyt, polycelulóza, želatina...)



# Aglutinace – příklady

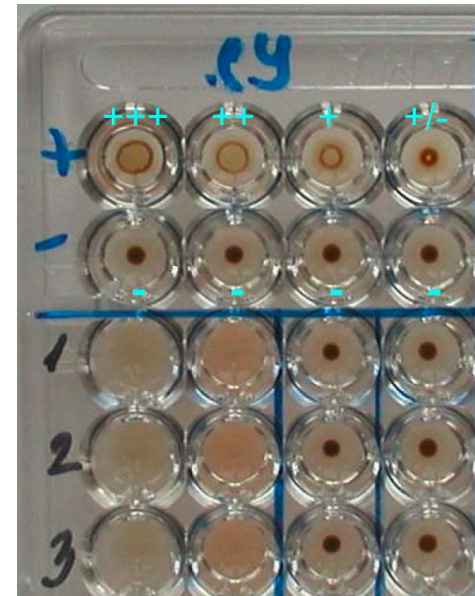
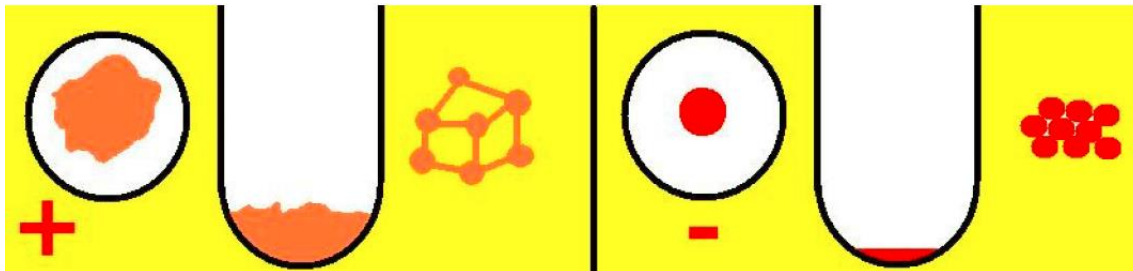
- ▶ Příklady aglutinace viz cvičení 5 – sledování titru u testu na přítomnost tularémie.
- ▶ Aglutinace na detekci protilátek proti yersiniím.





# Aglutinace na nosičích – příklad

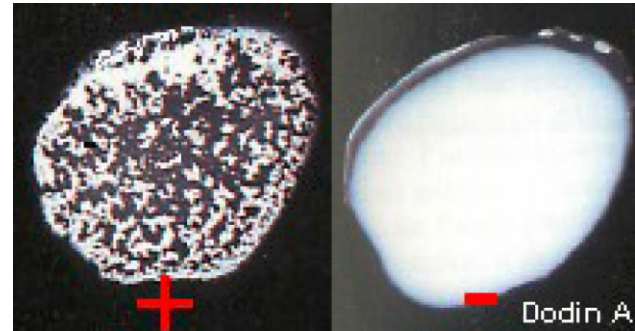
- ▶ *Treponema pallidum* pasivní hemaglutinace (TPHA) – pozitivní reakce = vznik sraženiny, „chuchvalce“, negativní reakce = sedimentace částic na dno důlku.
- ▶ Červené zbarvení je dáno přítomností nosiče = erytrocytu. Dnes erytrocyty často nahrazovány polycelulózovými částicemi (=TPPA).



# Aglutinace na nosičích – příklad

---

- ▶ **Průkaz entoropatogenní *E.coli*** - sklíčková aglutinace k antigenní analýze – bylo by nutné testovat 12 různých sér → proto použijeme nejprve **polyvalentní séra**: **nonavalentní serum** obsahuje protilátky proti devíti typům EPEC **trivalentní sérum IV** proti zbývajícím třem → testováno všech 12 serotypů.



- ▶ Pozitivní reakce = tvorba vloček. Pokud jedno z ze sér je pozitivní → použití **monovalentního séra**.
- ▶ Pozitivní reakce = tvorba vločky v kapce.
- ▶ Reakce je antigenní analýza, neurčujeme titr.



# Precipitace – příklad

---

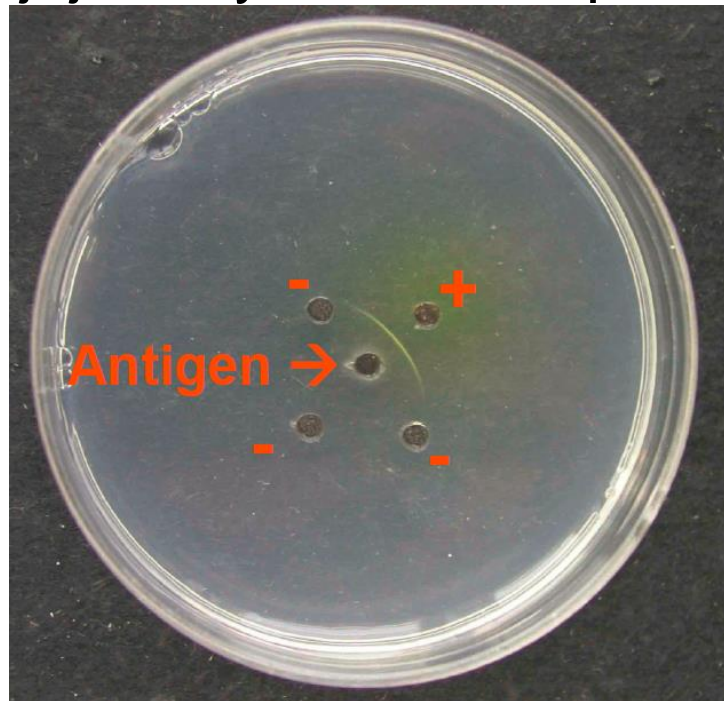
- ▶ **Reakce na syfilis – RRR (rychlá reaginová reakce)** – detekce protilátky vyskytující se charakteristicky u syfilitiků – kardiolipin. Nejedná se o protilátky *Treponema pallidum*.
- ▶ Kvalitativní reakce – 1. důlek = pozitivní kontrola, 2. důlek = negativní kontrola, každý pacient má jeden důlek – 0,05 ml séra + 0,05 ml kardiolipinu.
- ▶ Další testy na syfilis – na průkaz nespecifických antikardiolipinových protilátek – **VDRL** (Venereal Disease Research Laboratory) = precipitační test na sklíčku nebo **RPR** (Rapid Plasma Reagin) = makroskopická vizualizace pomocí karbonových částic nebo pigmentů.



# Precipitace – příklad

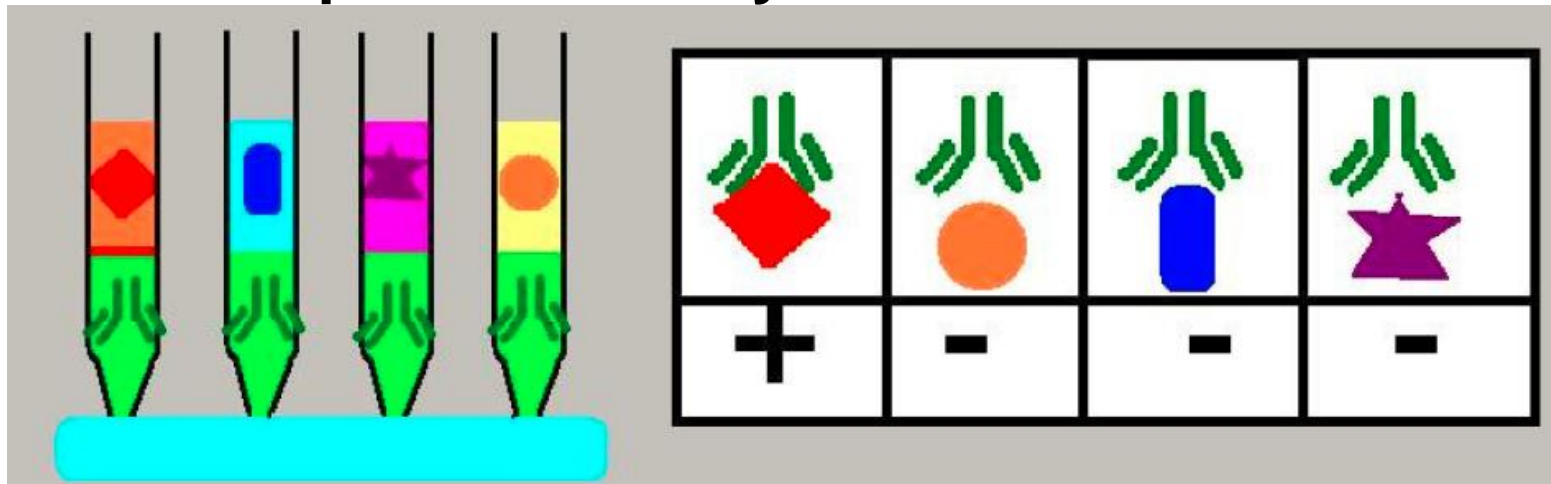
---

- ▶ **Mikroprecipitace v agaru dle Ouchterlonyho** - Do důlku uprostřed je nalita tekutina obsahující antigen. Ten difunduje agarem. Obsahuje-li sérum protilátky, difundují proti němu a na jejich styku vznikne precipitační linie.



# Precipitace – příklad

- ▶ Prstencová precipitace k detekci antigenu – do Pasteurových pipet zabodnutých v plastelíně postupně naléváme:
  - 1) zvířecí sérum s protilátkami
  - 2) čtyři různé extrakty kmenů
- ▶ **Pozitivita: prstenec na styku tekutin.**



# Komplement

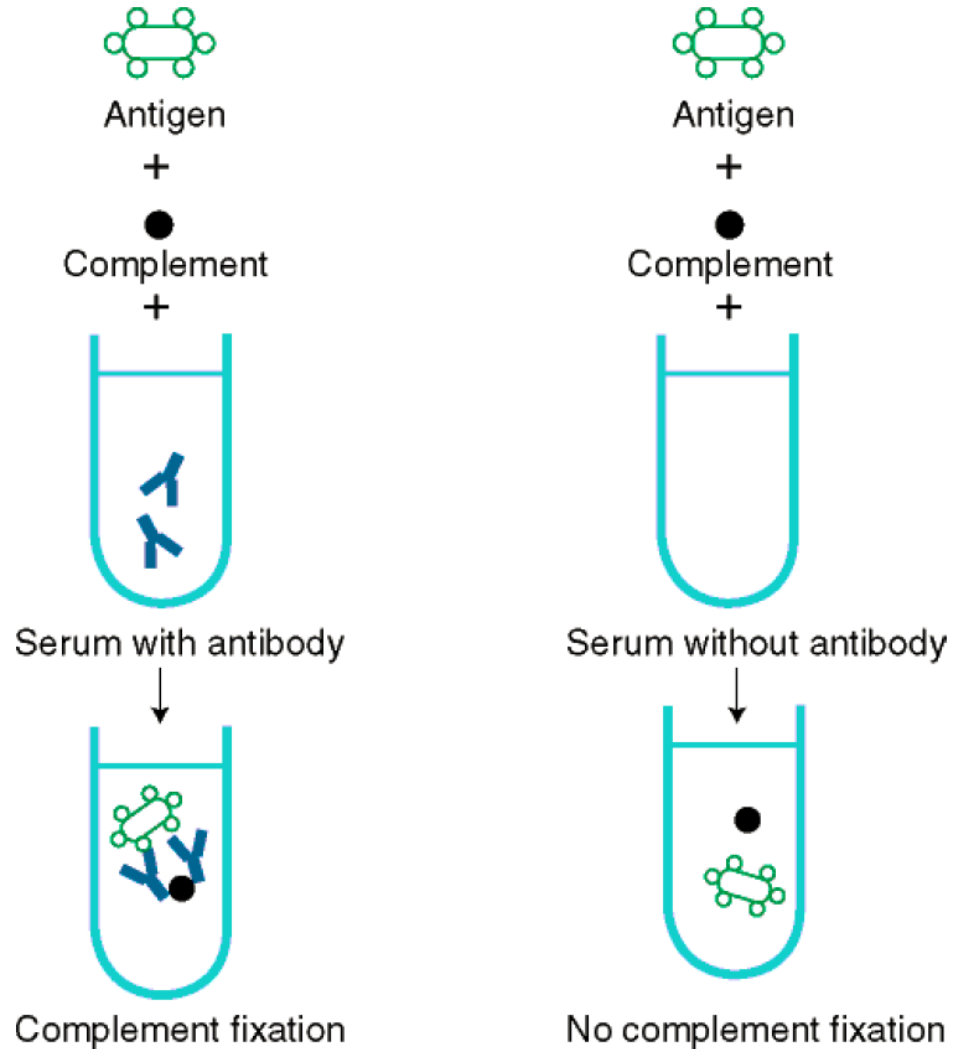
---

- ▶ Komplement = složka nespecifické humorální imunity. Složitý kaskádovitý systém složený z asi 30 různých proteinů. Zajišťuje opsonizaci, chemotaxi a protizánětlivé reakce.
- ▶ Komplement **není schopen vázat se na samotný antigen.**
- ▶ Komplement **není schopen vázat se na samotnou protilátku.**
- ▶ Komplement **je schopen vázat se pouze na KOMPLEX obou.**
- ▶ Pro KFR používáme morčecí komplement. Pacientův komplement je před reakcí inaktivován teplem.



# Komplement

---



# Komplement fixační reakce – KFR

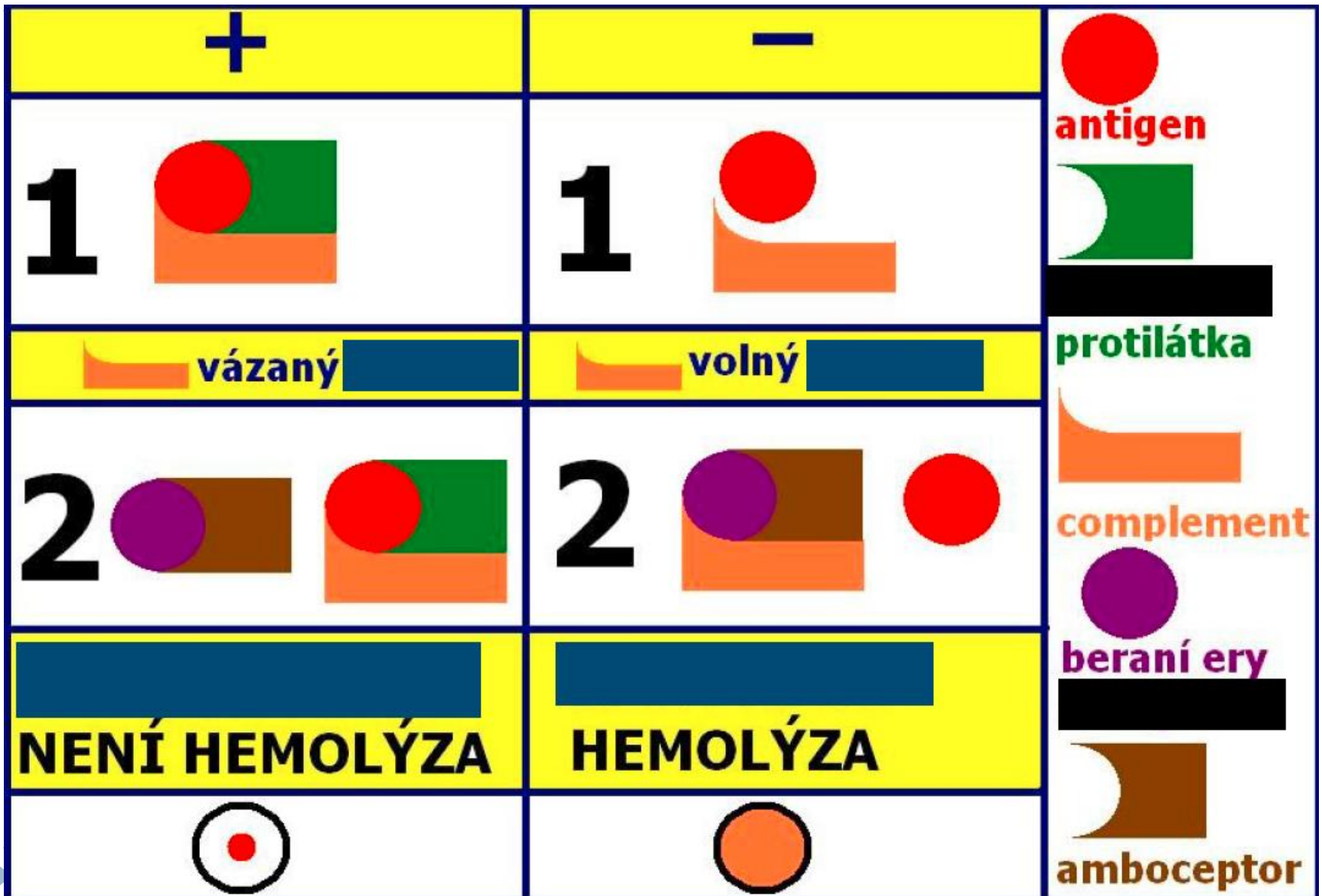
---

- ▶ **Sérum pacienta se smíchá s laboratorním antigenem** (*nebo, u přímé KFR, se smíchá pacientův vzorek se zvířecími protilátkami*).
  - ▶ **Přidá se komplement.** V pozitivním případě se naváže (je schopen se navázat jen pokud se vytvořil komplex Ag-Ig)
  - ▶ **Ve druhé fázi přidáme indikátorový systém (beraní erythrocyty + amboceptor).**
  - ▶ Pozitivní reakce – indikátor zůstává nedotčen.
  - ▶ Negativní reakce – dojde k hemolýze indikátoru.
- 





# Komplement fixační reakce – KFR



# KFR - použití

---

- ▶ KFR lze použít pro diagnostiku **mnoha, zejména virových infekcí**
- ▶ Jako i jiné serologické reakce se KFR používá k **průkazu antigenu či protilátky** (v tomto praktiku pouze průkaz protilátky).
- ▶ **Laboratorní antigen konfrontujeme se sérem pacienta** (kde hledáme protilátky).



# KFR - problémy

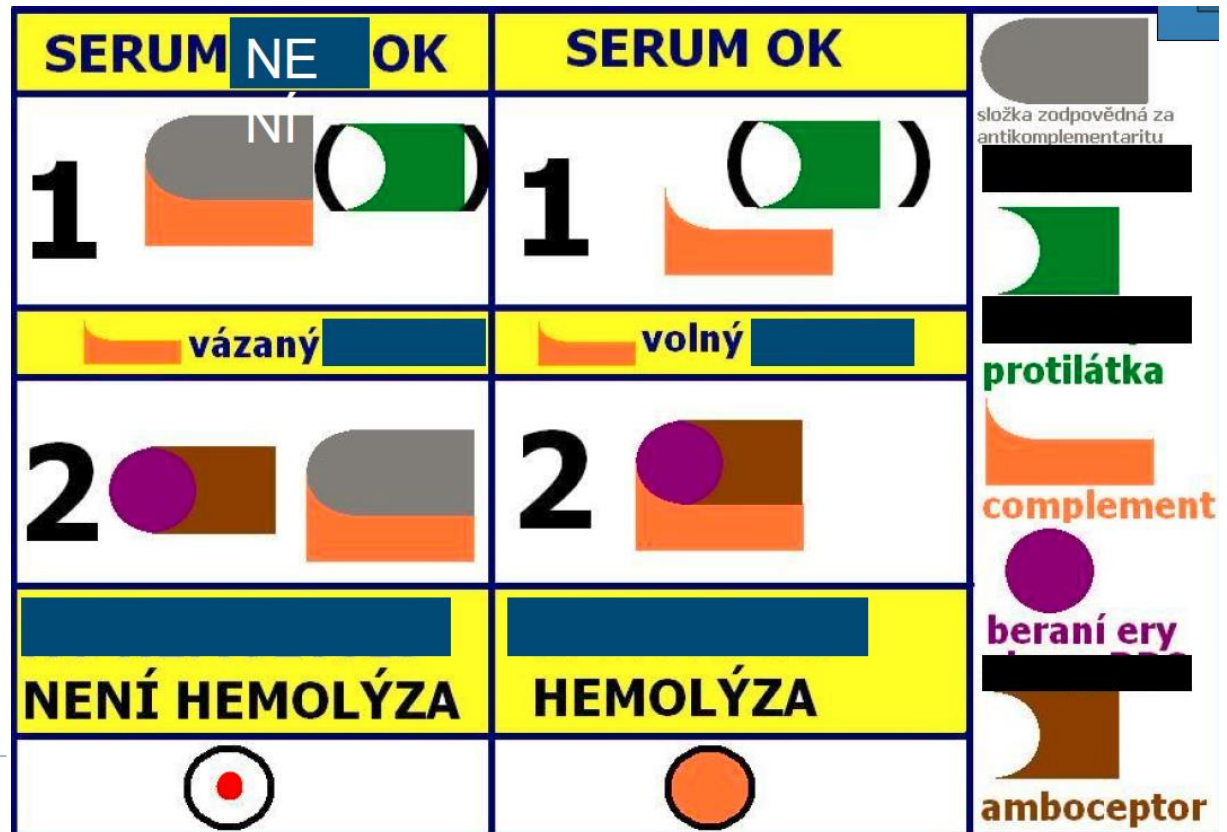
---

- ▶ **Příliš velké množství komplementu** → falešná negativita.
- ▶ **Řešení: titrovat komplement.** Pro reakci potřebujeme množství morčecího komplementu, které není moc velké ani malé. Proto zjišťujeme, **jaké množství komplementu hemolyzuje pracovní jednotku krvinek s amboceptorem (hemolytická jednotka).**



# KFR - problémy

- ▶ Některá složka séra sama o sobě vyvazuje komplement → falešná pozitivita. Řešení: Provést test antikomplementarity, tj. vše jako v normální reakci, ale bez antigenu.



# KFR - příklad

---

- ▶ **Atypická pneumonie** – může být způsobena mnoha různými respiračními viry, ale i některými bakteriemi (*Mycoplasma*, *Chlamydia*).
- ▶ Nutno určit agens – nasezení / nenasazení ATB terapie.
- ▶ Celá serologická destička patří **jednomu pacientovi**.
- ▶ Máme **šest respiračních patogenů**, každý je ve dvou řádcích (akutní vzorek a rekonvalescentní).
- ▶ **První sloupec je test antikomplementarity**
- ▶ Následuje **sedm ředění séra** – ve druhém sloupci 1 : 5 a pak geometrickou řadou s koeficientem dva. Kromě virů je ve škále i bakterie *Mycoplasma pneumoniae*.



# KFR - příklad

---

- ▶ **Klíšťová encefalitida** – opět testujeme protilátky:
  - v 1. řádku je pozitivní kontrola
  - ve 2. a 3. řádku první pacient
  - ve 4. a 5. řádku druhý pacient
  - v 6. a 7. řádku třetí pacient
- ▶ První z obou řádků vždy odpovídá akutnímu, druhý rekonvalescentnímu vzorku séra.
- ▶ V prvním sloupci jsou opět testy antikomplementarity, následuje ředění geometrickou řadou od ředění 1 : 4.



# KFR - příklad

---

- ▶ **Toxoplasmóza :**

- 1. řádek destičky – pozitivní kontrola.
- 2. – 7. řádek – 6 pacientů.

- ▶ **V prvním sloupci jsou opět testy**

**antikomplementarity**, následuje ředění geometrickou řadou od ředění 1 : 8. V tomto případě nesledujeme dynamiku titru (každý pacient má jen jeden řádek).



# Neutralizační reakce

---

- ▶ Neutralizační reakce se uplatní v případě **virů** nebo **bakteriálních toxinů**, které mohou být **přímo neutralizovány příslušnou protilátkou**.
- ▶ Celá bakterie se zpravidla jen tak jednoduše neutralizovat nedá.
- ▶ Většina aplikací neutralizace je tedy **ve virologii**.
- ▶ Výjimkou je však nejběžnější serologická reakce vůbec – **reakce ASLO**.





# Neutralizační reakce – princip

- ▶ **Přímá neutralizace** – zřídka kdy u celých bakterií (vzácně to ale možné je – např. pohyblivost *Treponema pallidum* u tzv. Nelsonova testu – TPIT), pozorováno u virů nebo bakteriálních toxinů.

Neutralizován	Objekt	Reakce
Toxin bakterie (hemolyzin)	Erytrocyt hemolýza	ASLO
Virus	Erytrocyt shlukování	HIT
Virus	Buňka efekt metabolický	VNT

# Neutralizační reakce – ASLO

---

- ▶ **Princip:** Protilátka blokuje hemolytický efekt toxinu (streptolysin O produkovanému beta-hemolytickými streptokoky skupiny A, C a G) na krvinku. Pozitivní je tedy zábrana hemolýzy se sedimentací krvinek (podobně, jako u KFR, ale ze zcela jiného důvodu).
  - ▶ **Panel se odečítá naležato.** Obsahuje pozitivní kontrolu a sedm pacientů.
  - ▶ **Tit nad cca 200** znamená riziko, že pacient je ohrožen pozdními následky streptokokové infekce.
  - ▶ Jinak obvyklý postup (ředění geometrickou řadou s koeficientem 2) by byl v tomto případě příliš hrubý, potřebujeme jemnější ředění. Jde sice o geometrickou řadu, avšak s koeficientem pouze 1,2 (a to ještě přibližně).
- 



# Neutralizační reakce – HIT

---

- ▶ **Hemaglutinačně Inhibiční Test**
- ▶ Protilátka neutralizuje virové shlukování krvinek (*in vitro* vlastnost většiny virů)
- ▶ **Shluk krvinek = negativní výsledek. Sedimentace = pozitivní**
- ▶ **Příklad použití:** Můžeme odečíst HIT u klíšťové encefalitidy – u každého pacienta akutní a rekonvalescentní sérum.
- ▶ HIT není aglutinace, ale neutralizace virového shlukování krvinek.
- ▶ HIT se liší od reakce ASLO především tím, že **krvinky nejsou hemolyzovány, ale shlukovány**. Stejně je naopak to, že specifická protilátka dokáže příslušnému efektu zabránit.

# Neutralizační reakce – VNT

---

- ▶ **Virus Neutralizační Test**
- ▶ **Buněčná kultura** bývá poškozena virem → změna pH → změna barvy buněk ze žluté na červené.
- ▶ Přítomny protilátky → zabrání poškození buněk.
- ▶ **Využití u coxsackievirů:**
- ▶ Celý panel patří vyšetření jednoho pacienta. Liché řádky = akutní sérum, sudé = rekonvalescentní. Co dva řádky, to jeden coxsackievirus (B1 až B6):
  - V prvním sloupci je ředění 1 : 5, dále opět 1 : 10 atd.
  - V posledním sloupci jsou kontroly. Je-li v tomto sloupci šest žlutých a šest červených důlků, je vše v pořádku
- ▶ **Titř je určen posledním důlkem, který má nezměněnou (žlutou) barvu.**
- ▶ Vyjde-li u dvou coxsackievirů signifikantní (alespoň čtyřnásobný) vzestup titrů, může sice jít o koinfekci, **pravděpodobnější je však zkřížená reaktivita u toho coxsackieviru, kde je nižší titr.**



# Třídy protilátek

---

- ▶ **IgM** – tvoří se jako první, ale také jako první mizí. Neprocházejí placentou – jejich nálezn u novorozence je svědectvím jeho infekce.
- ▶ **IgG** – tvoří se později a zůstávají jako imunologická paměť přítomny dlouhodobě. Procházejí placentou (novorozenec je tedy může mít od matky).
- ▶ **IgA** – součást slizniční imunity (tam, kde je vstupem infekce sliznice). U některých infekcí se vyšetřují namísto IgM (např. toxoplazmóza).
- ▶ **IgE** – alergie a infestace červy. Nestanovuje se specifické IgE proti nějakému patogenovi.
- ▶ **IgD** – v mikrobiologii se s nimi nepracuje.



# Reakce se značenými složkami – obecně

---

- ▶ **Na povrch** se postupně navazují jednotlivé složky.
- ▶ **Místo jedné ze složek** se naváže vzorek od pacienta, o kterém si myslíme, že danou složku možná obsahuje → pokud ji skutečně obsahuje, dojde k navázání a vznikne **nepřerušovaný řetězec**.
- ▶ Na konci řetězce je vhodná **značka**.
- ▶ Pokud by v reakci zůstalo přítomno i to, co se na nic nenavázalo, nedokázali bychom odlišit pozitivní reakci od negativní → po každém kroku reakce následuje **promytí**, po kterém zůstanou přítomny pouze složky **navázané** na pevný povrch
- ▶ **Je-li řetězec přerušen, odplaví promytí vše za místem přerušení.**



# Typy značek

---

- ▶ **Fluorescenční barvivo – imunofluorescence.**
- ▶ **Radioizotop – RIA.**
- ▶ **Enzym – ELISA.** Při použití enzymu je nutno do reakce přidat ještě substrát pro příslušný enzym.
- ▶ **Western blotting – zvláštní druh reakce ELISA,** jednotlivé antigeny jsou rozděleny **elektroforeticky.**



# Imunofluorescence

---

- ▶ **Přímá imunofluorescence:** (Povrch)-(antigen)-(značená protilátka)
- ▶ **Nepřímá imunofluorescence:** (Povrch)-(antigen)-(protilátka)-(značená protilátka proti lidské protilátce)
- ▶ Povrchem pro přípravu vzorku je ve většině případů **podložní sklíčko** → lze pak rovnou mikroskopovat a vidět tak i morfologii jednotlivých buněk.





# Radioimunoassay - RIA

---

- ▶ Jedná se o velmi citlivou *in vitro* assay pro detekci koncentrace antigenů za použití protilátek.
- ▶ Známé množství antigenu je značeno **radioaktivním izotopy** jódu. Takto označený antigen je poté smíchán se známým množstvím protilátky.
- ▶ Poté je přidáno sérum pacienta, které obsahuje neznámé množství stejného antigenu → v jedné směsi soupeří o vazbu na protilátku značené („hot“) a neznačené („cold“) antigeny.
- ▶ Se zvyšující se koncentrací „cold“ antigenů dochází k nahrazování vazeb „hot“ antigenů „cold“ antigeny.
- ▶ Navázané antigeny jsou poté separovány od nenavázaných a je změřena radioaktivita volných antigenů v supernatantu.



# ELISA

---

- ▶ **Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay** – kvantitativní stanovení Ag, vysoce specifická reakce. Na Ag či Ab je kovalentně vázán enzym → katalyzuje chemickou přeměnu substrátu (zbarvení) → detekce spektrofotometricky nebo fluorescenčně. Koncentrace produktu – úměrná koncentraci Ag nebo Ab ve vzorku. Upevněno na nosiči.
  - ▶ Složky ELISA:
    - 1) **Antigen** – detekovaný v testovaném vzorku, známý, komerčně připravovaný
    - 2) **Protilátka** – detekovaná v testovaném séru, známá, komerčně připravovaná
    - 3) **Konjugát** – jedná se opět o protilátku proti protilátce (konkrétně proti druhově specifickým imunoglobulinům příslušného izotypu, na kterou je navázaný enzym
    - 4) **Substrát** – je chemická látka, která reaguje s enzymem a tím změní svou barvu
- 



# ELISA – uspořádání složek

---

- ▶ Povrch-**antigen**-protilátka-značidlo (P)
- ▶ Povrch-protilátka-**antigen**-protilátkaznačidlo (P, např. průkaz HBsAg)
- ▶ Povrch-antigen-**protilátka**-antigen-značidlo (N)
- ▶ Povrch-antigen-**protilátka**-konjugát-značidlo (N)
- ▶ **Konjugát** – 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**.
- ▶ Výhody ELISA:
  - Nízké náklady a nulové radiační nebezpečí – výhoda oproti radioimunoassay.
  - Možnost automatizace a menší nároky na odečítacího – výhoda oproti imunofluorescenci.



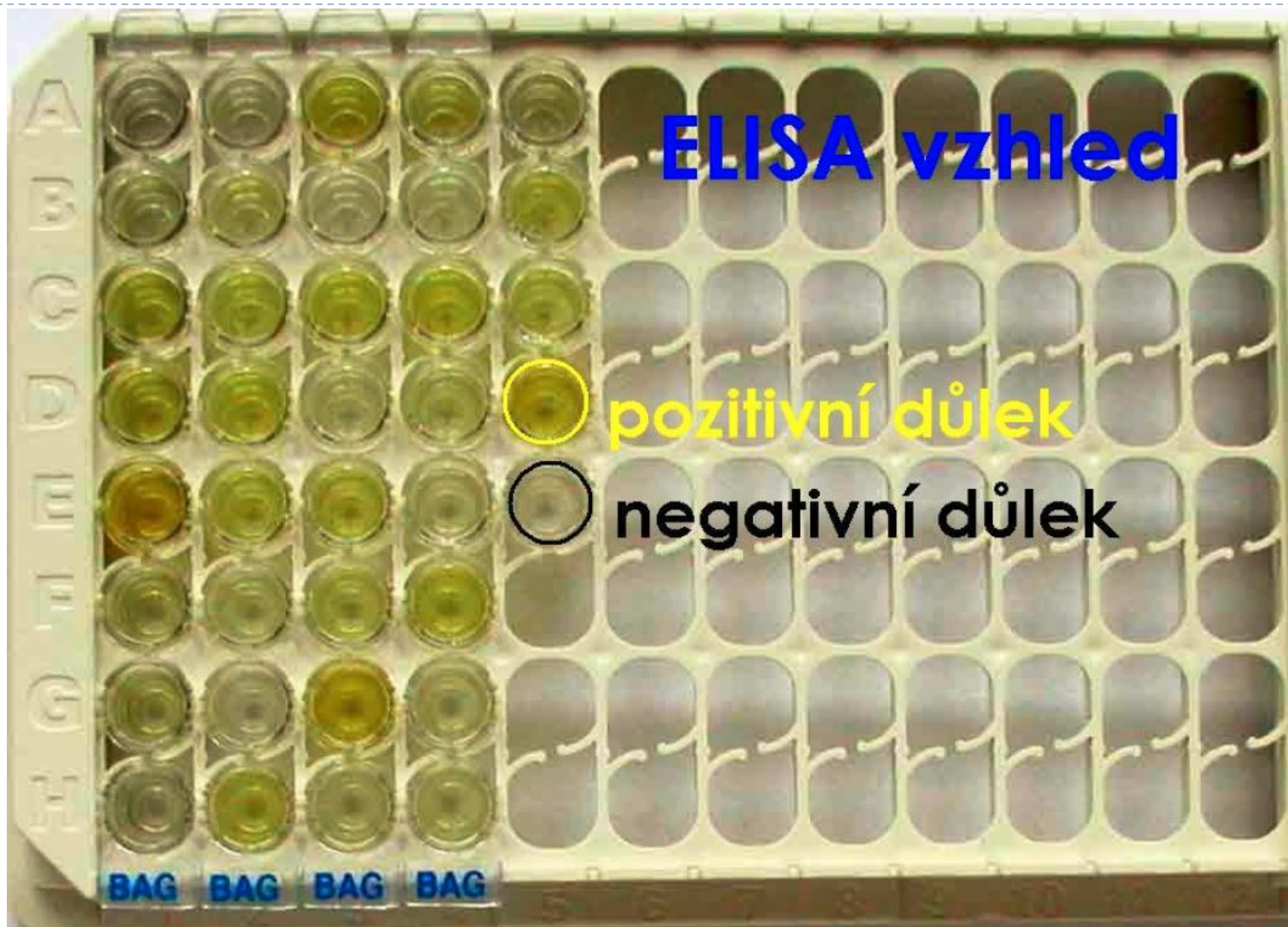
# ELISA – praktické uspořádání

---

- ▶ 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:
  - **BI** – blank (pro kalibraci spektrofotometru)
  - **K- a K+** – pozitivní a negativní kontrola
  - **Cut off** (c. o., dva či tři důlky) – „odsekávají“ pozitivní výsledky buď ostře, nebo s rozmezím plus mínus 10 %)
- ▶ Výrobce dodává „vzorky“ s negativní (K–), pozitivní (K+) a právě hraniční (c. o.) hodnotou absorbance.



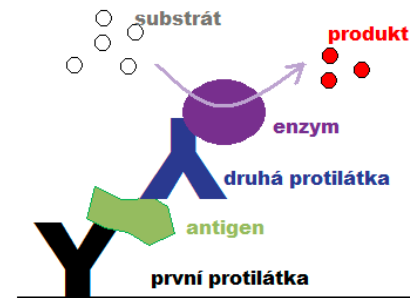
# ELISA



# ELISA – sendvičová

## ▶ Standardní **sendvičová ELISA** na zjištění koncentrace **antigenu**:

- navázání protilátky na dno zkumavky
- přidání vzorku a inkubace – dochází ke vzniku vazby **antigen-protilátka**
- odmytí nenavázaného antigenu
- přidání druhé protilátky, vážící stejný antigen, na které je kovalentně připojen **enzym**
- inkubace a odmytí nadbytečné protilátky s enzymem
- přidání substrátu a průběh **enzymem katalyzované reakce**



# Western blotting

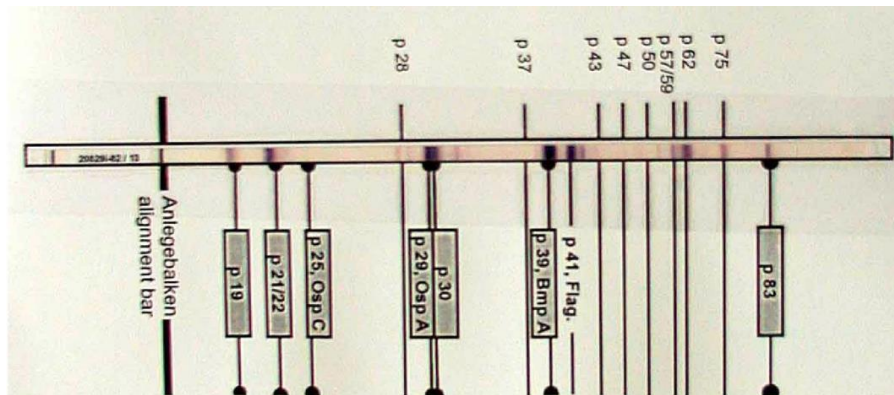
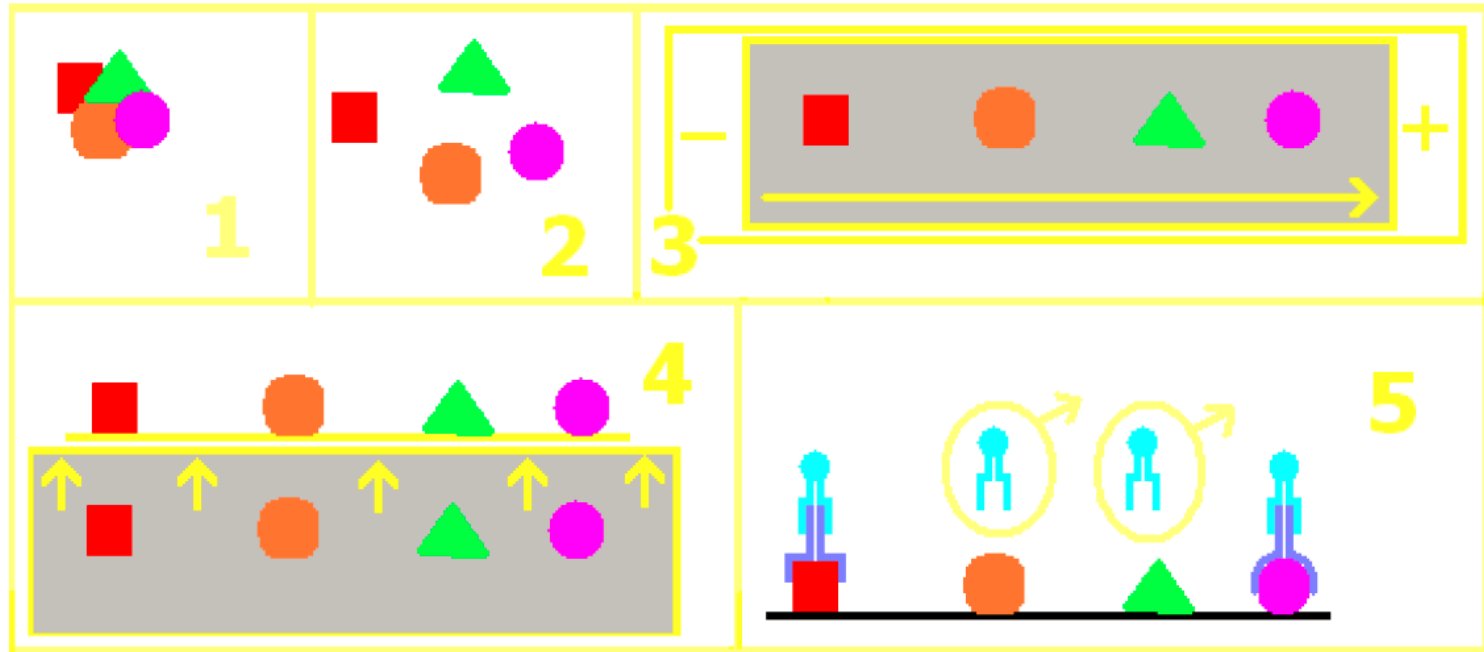
---

- ▶ Prakticky je to ELISA, ale směs antigenů je **rozdělena elektroforeticky** na jednotlivé antigenní determinanty → přesnější a vhodná v situacích, kdy klasická ELISA nestačí – např. zkřížený pozitivita u příbuzných mikroorganismů.
- ▶ Používá se pouze **k průkazu protilátky, ne antigenu.**
- ▶ **Princip:**
  - 1) původní antigen (směs)
  - 2) uvolnění jednotlivých antigenů detergentem
  - 3) elektroforetické rozdělení antigen
  - 4) „přesátí“ rozdělených antigenů na nitrocelulózu
  - 5) reakce ELISA (přítomny jsou jen některé protilátky)





# Western blotting





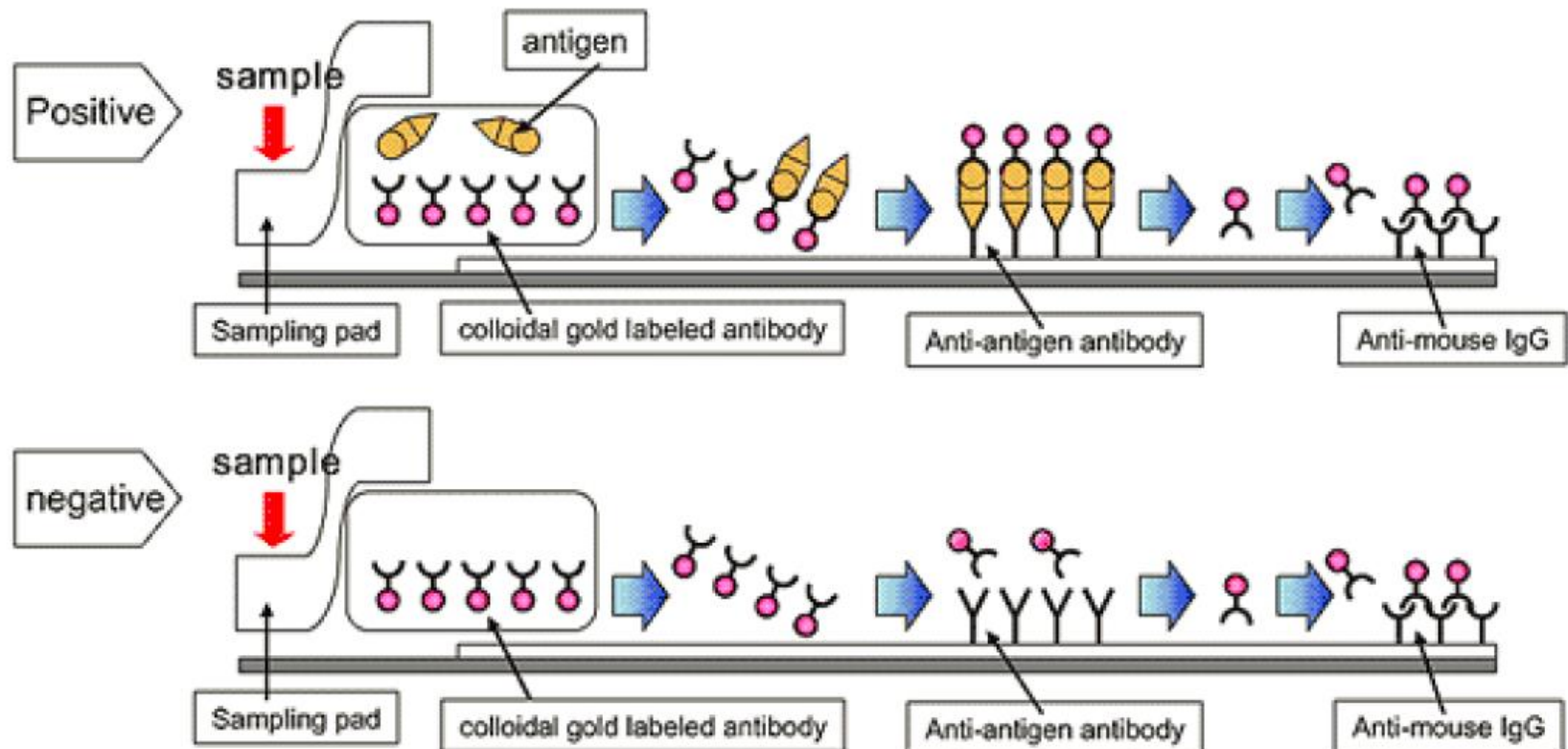
# Imunochromatografické testy

---

- ▶ Imunochromatografické testy – založeny na **navazování jednotlivých komponent** podobně jako předchozí.
- ▶ Důležitým rozdílem je, že zde **není promytí**.
- ▶ Některé komponenty jsou navázány na povrch na určitých místech (testovací a kontrolní místo), další se hned naváží na testovanou složku a spolu s ní **cestují porézní vrstvou**. V pozitivním případě je zpravidla pozorován proužek u testu i u kontroly, v negativním jen u kontroly.

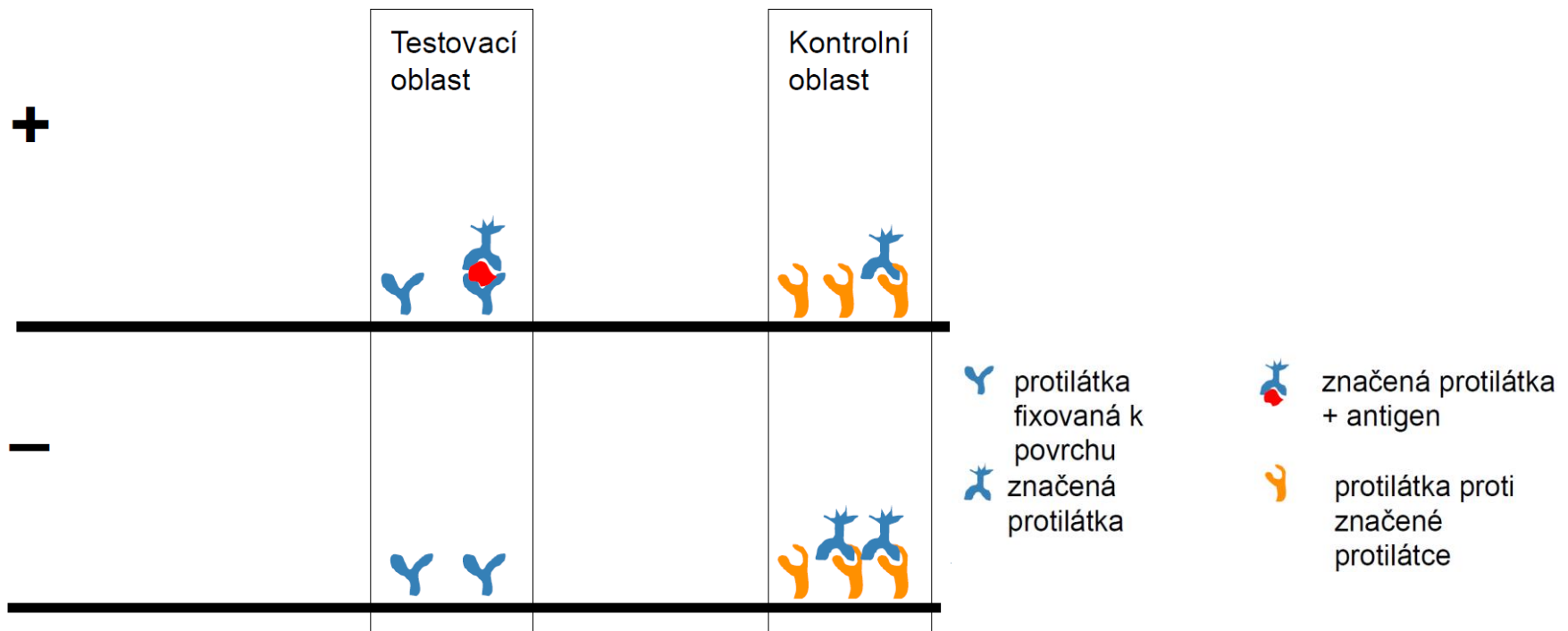


# Imunochromatografické testy



# Imunochromatografické testy - princip

- ▶ **V pozitivním případě** jsou některé značené protilátky navázány na antigen, a uchyty se v testovací oblasti. Některé další molekuly dojdou až do kontrolní oblasti.
- ▶ **V negativním případě** všechny značené protilátky přicházejí do kontrolní oblasti.



# Imunochromatografické testy – ne/výhody

- ▶ Výhody:
  - Velmi rychlé – desítky minut
  - Velmi jednoduché – některé lze dělat přímo u pacienta
  - Dostatečně přesné
  - Mnohoúčelové použití
- ▶ Nevýhoda: poměrně drahé



# Viry - opakování

---

- ▶ Nebuněčné organismy (jsou živé?), potřebují pro svůj růst a množení jiné organismy.
- ▶ Viry dělíme dle typu nukleové kyseliny (DNA x RNA), podle počtu vláken nukleové kyseliny (ss+ x ss- x ds), dle obalu (obalené x neobalené), dle hostitele (zooviry x fytoviry x bakteriofágy), dle symetrie kapsidy (helikální x kubická...).
- ▶ Virová částice = virion (20-300 nm) – složen z nukleokapsidy (nebo jádra a kapsidy) a obalu (u obalených).



# Viry hepatitid

---

- ▶ 5 hlavních skupin:
  - **VHA a VHE** (pomůcka: samohlásky) se přenášejí **fekálně-orální cestou** (ruce), **nepřecházejí do chronicity**
  - **VHB, VHC a VHD** (souhlásky) – přenos **krví, popř. sexuální** (u VHC spíše nevýznamný), **mohou přecházet do chronicity**
- ▶ Většina **jsou RNA viry, ale virus hepatitidy B je DNA virus.**



# Viry hepatitid

Hepatitida	Zařazení	Přenos
HAV	<i>Picornaviridae</i>	fekálně-orální
HBV	Zvláštní skupina DNA virů	sexuální, kreví
HCV (a HGV)	<i>Flaviviridae</i>	kreví
HDV	Delta agens – viroid	sexuální, kreví
HEV	Příbuzný kalicivirům	fekálně-orální



# Hepatitidy

---

- ▶ Jde o **infekční záněty jater (lidově žloutenky)**.
  - ▶ Pozor, „žloutnutí“ je možné i u jiných onemocnění, než jen u hepatitid – např. obstrukce žlučových cest kameny.
  - ▶ **Příznaky hepatitidy**: horečky, trávící potíže, možné zežloutnutí bělimy či kůže, změna barvy moče či stolice.
  - ▶ Nejzávažnější je **žloutenka typu B** – přechod do chronicity (až možnost cirhózy a karcinomu jater), možný přenos ve zdravotnictví (již ne ve vyspělých zemích), problém narkomanie.
  - ▶ **Screening hepatitidy B se běžně provádí např. před operacemi, v těhotenství atd.**
- 





# Hepatitidy – prevence a léčba

---

- ▶ **Očkování proti hepatitidě B** je nyní součástí normálního očkovacího kalendáře.
- ▶ **Očkování proti hepatitidě A** je dostupné a doporučené např. i při cestách do jižní Evropy či severní Afriky. Možné i současné očkování proti hepatitidě A + B.
- ▶ U některých hepatitid se používá léčba pomocí **interferonů**
- ▶ Použití **hepatoprotektiv** – látky chránící játra.



# Virus HIV

---

- ▶ **Retrovirus** – reverzní transkriptáze (přepis RNA do DNA)
- ▶ 2 typy: **HIV-1 a HIV-2** – HIV-1 způsobuje většinu infekcí
- ▶ **Přenos**: krev, pohlavní cesta, kongenitální přenos.
- ▶ Možnost léčby antiretrovirotiky – účinnost omezená
- ▶ Postihuje buněčnou imunitu.
- ▶ **Průběh**:
  - Nespecifická primární infekce
  - Dlouhé období latence
  - Generalizovaná lymfadenopatie a vývoj oportunních infekcí (od této chvíle již rozvinuté onemocnění AIDS)
- ▶ Úmrtí nastává v důsledku oportunních infekcí a nádorů.



# Diagnostika virů

---

- ▶ **Přímý průkaz:**
- ▶ **Kultivace → izolace** (virus se často nepomnoží, jen uchová živý). Vyžaduje živé buňky.
- ▶ **Mikroskopie: elektronoptická** spíše pro výzkum než pro běžnou diagnostiku, ale i **optická** k průkazu něčeho, co viry dělají *in vivo* či *in vitro* (inkluze, cytopatický efekt)
- ▶ **Biochemická identifikace** nepadá v úvahu
- ▶ **Pokus na zvířeti** zde splývá s izolací viru
- ▶ **Průkaz DNA** – u virů > u bakterií
- ▶ **Průkaz Ag ve vzorku** – u virů velmi běžný



# Diagnostika virů – mikroskopie

---

- ▶ **Elektronová mikroskopie** je vhodná pro pozorování většiny virů. Je však velmi nákladná a není vždy dostupná (= ne k rutinní diagnostice).
- ▶ **Optická mikroskopie** se dá použít:
  - K pozorování **cytopatických efektů** in vitro (řada různých virů).
  - K pozorování **buněčných inkluzí** in vivo (Negriho tělíška u vztekliny) – spíše v rámci histologie než mikrobiologie.
  - *K pozorování **velikých virů** (poxviry) – výjimečně, pro praxi se nehodí.*



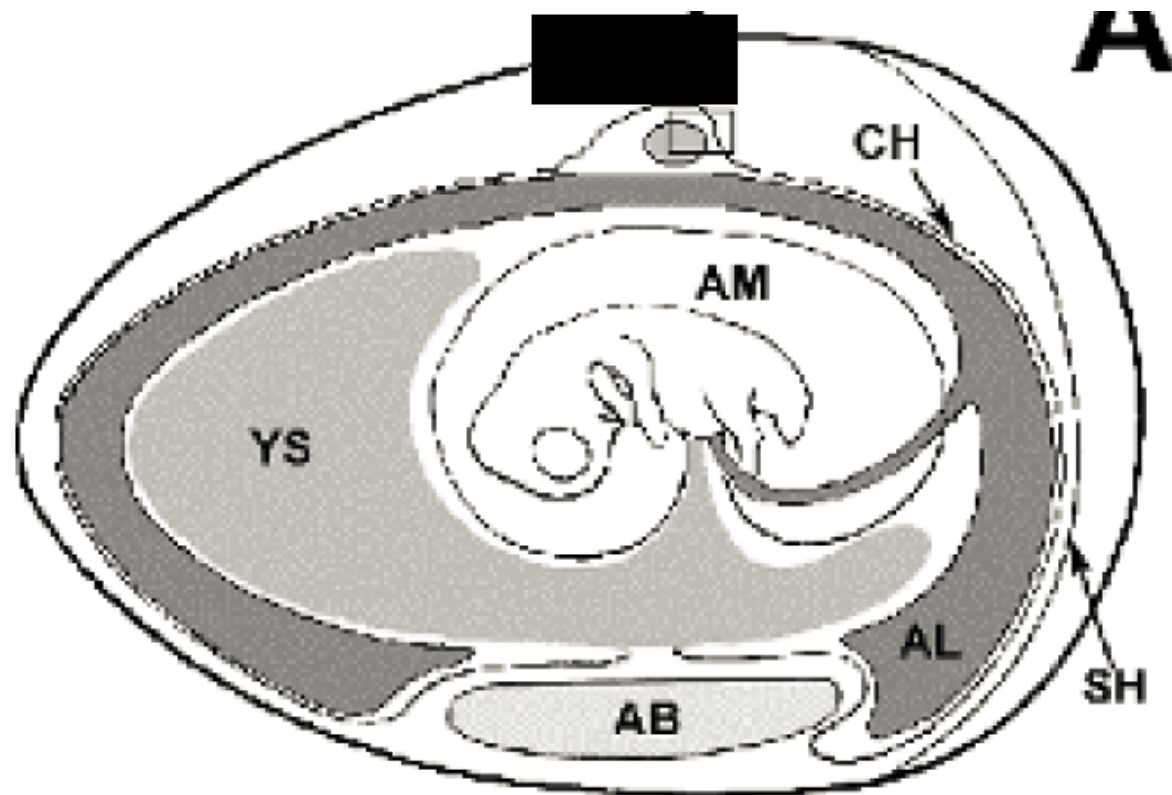
# Diagnostika virů – izolace

---

- ▶ **Zvíře** se používá dnes již méně často. Klasickým zvířetem je sající myš.
- ▶ **Vaječný zárodek** je klasickou metodou
  - **Amniová dutina** – viry chřipky
  - **Allantois** – málo výživný, použití při výrobě očkovací látky (nejprve nutno několik pasáží v amniu)
  - **Žloutkový vak** – chlamydie
  - **Chorioalantoidní membrána** (pouze zde někdy pozorovatelný výsledek – tzv. poky; v ostatních případech není výsledek izolace na zárodku viditelný) – poxviry, herpesviry
- ▶ **Buněčné kultury (kultury „nesmrtelných“ zvířecích či lidských buněk – embryonálních či nádorových):** například LEP, HeLa, opičí ledviny a různé jiné. Některé (jen některé!) viry dělají na buněčné kultuře cytopatický efekt (=morfologicky zjevný účinek působení viru na buňku, vznik plaků).



# Diagnostika virů – oplodněné vejce



SH –  
skořápková  
(papírová)  
membrána

<http://www.sclcg.nl/fb/be/i/mg/bres/v38n4/fig02.gif>  
AB – bílek

AM – amniový vak, YS – žloutkový vak, AL –  
allantois

CH – chorioallantoidní membrána (CAM)

# Diagnostika virů

---

- ▶ **Nepřímý průkaz:**
- ▶ **KFR**
- ▶ Různé typy neutralizací (**HIT, VNT**)
- ▶ V poslední době především **reakce se značenými složkami (hlavně ELISA)**
- ▶ (Pozor! Ne vše, kde se jako vzorek použije sérum, je nepřímý průkaz! U systémových viróz je často agens (nebo jen jeho antigen) v séru přítomno, a pak se dá sérum použít i pro přímý.)



# Diagnostika hepatitid A, C, D, E

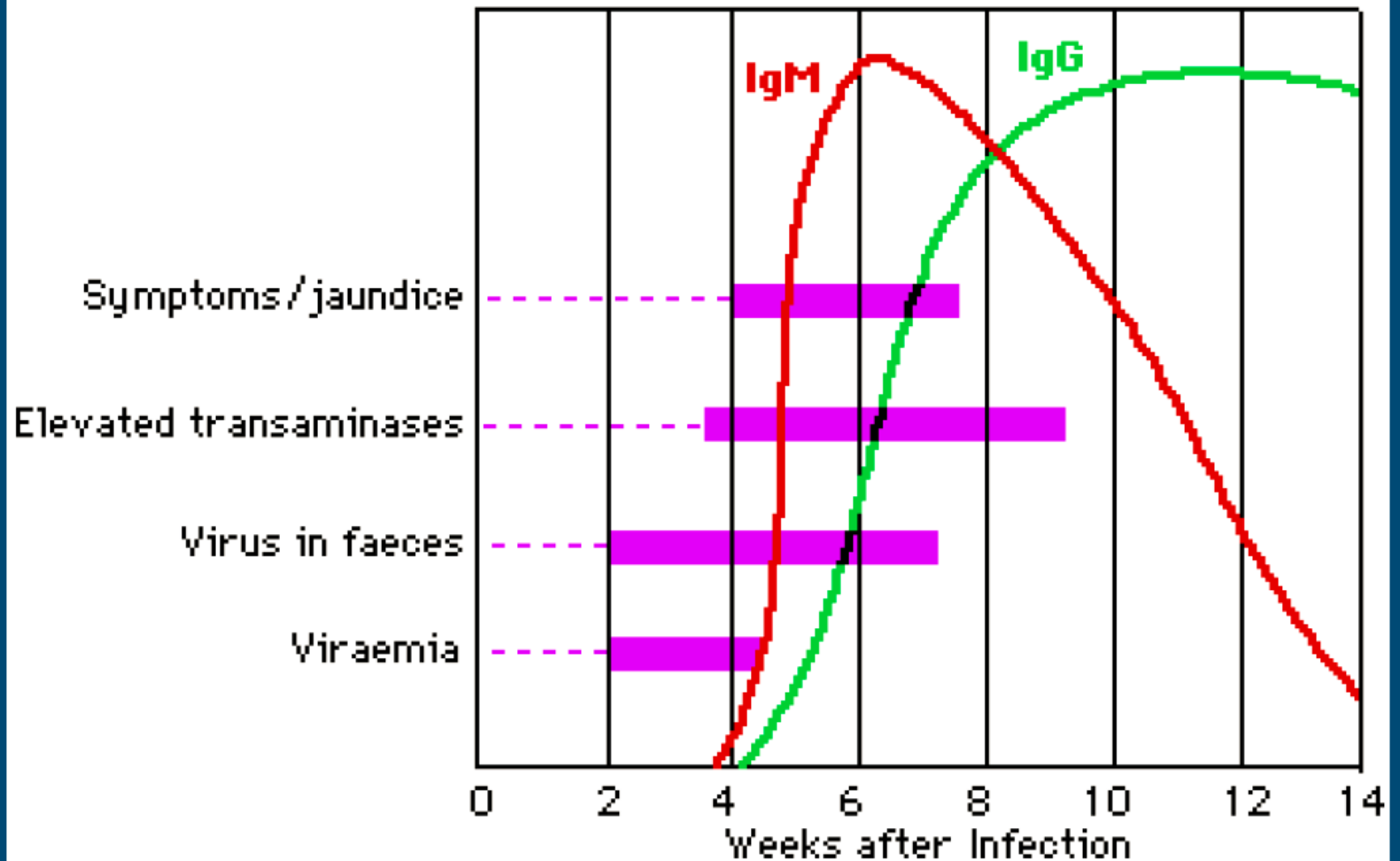
---

- ▶ **HAV** – stanovuje se metodou ELISA anti-HAV IgM s IgG, nebo IgM a celkové protilátky
- ▶ **HCV** – stanovuje se IgM a IgG protilátky metodou ELISA, dále se používá PCR
- ▶ **HDV** – prokazuje se delta antigen (HDAg), protilátky (anti-HD) či virová RNA PCR
- ▶ **HEV** – průkaz IgM a IgG protilátek metodou ELISA, ve výzkumu je PCR





# Hepatitida typu A – protilátky



# Diagnostika hepatitidy B

---

- ▶ Ve středu virionu hepatitidy B je **nukleokapsida**, kde je umístěna DNA a bílkoviny. Významné jsou dvě dřeňové bílkoviny, které mají povahu antigenů: **HBcAg** a **HBeAg**.
- ▶ Kromě toho má virus **obal**, který je zčásti tvořen dalším antigenem: **HBsAg**.
- ▶ HBsAg je nadprodukován, takže **v krvi kolují i prázdné obaly**.
- ▶ (Do prázdného HBsAg může proniknout také delta agens – původce hepatitidy D.)



# Diagnostika hepatitidy B – delta agens

---

- ▶ Delta agens je **viroid**, částice s neurčitou virologickou klasifikací.
- ▶ Může infikovat člověka buďto zároveň s virem hepatitidy B (**koinfekce**), nebo následně po takové infekci (**superinfekce**).
- ▶ Přítomnost delta agens podstatně zhoršuje prognózu virové hepatitidy.



# Diagnostika hepatitidy B

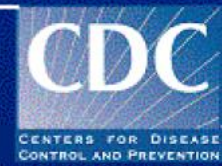
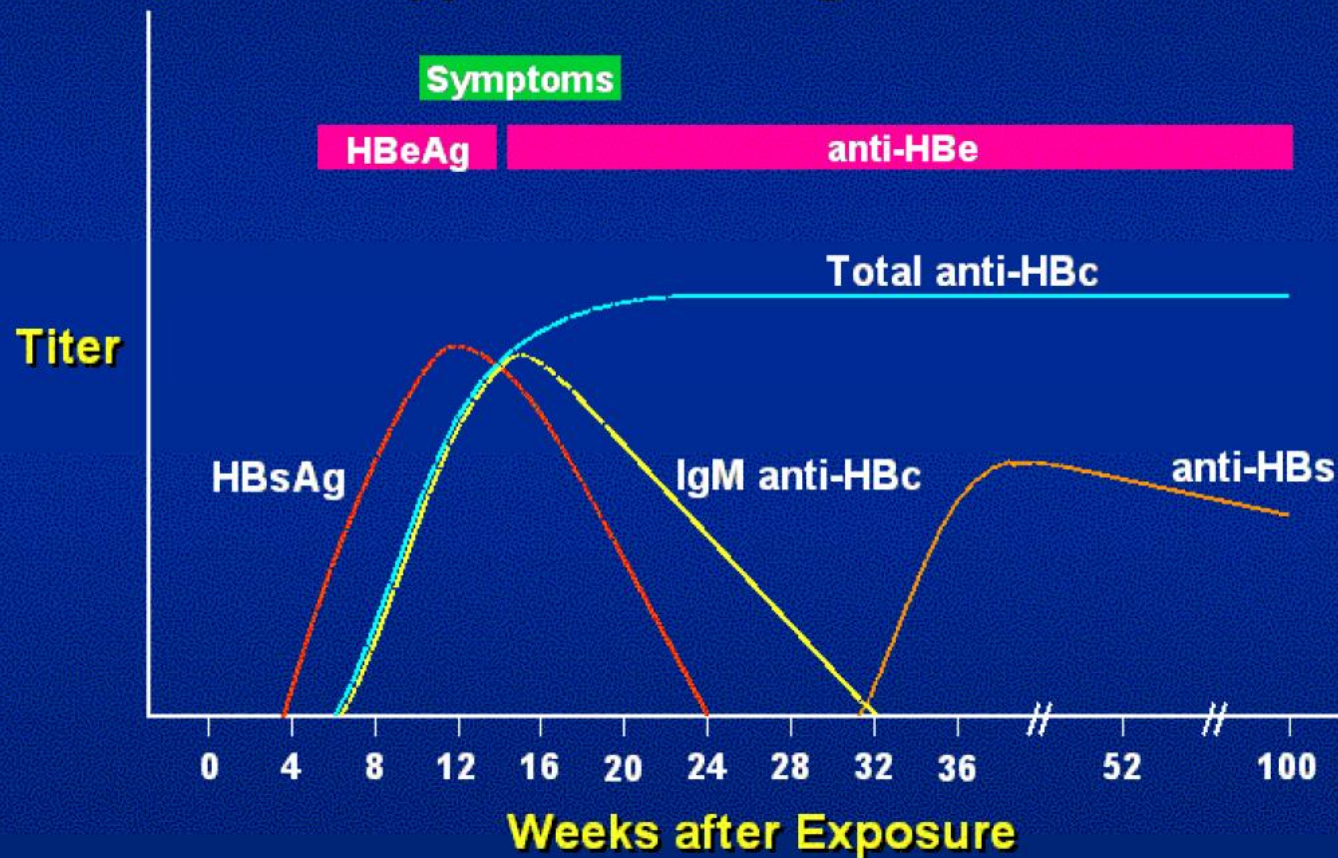
---

- ▶ HBV má 3 významné Ag:
  - 2 v séru - **HBsAg** a **HBeAg**. **HBsAg se tvoří v nadbytku**, takže je ho vždy v séru hodně, proto se hodí pro screening.
- ▶ Protilátky naopak můžeme stanovovat proti všem třem z nich: **anti-HBs**, **anti-HBe** i **anti-HBc**.
- ▶ Diagnostiku případně doplní **PCR**, průkaz **jaterních enzymů** aj.



# Diagnostika hepatitidy B

## Acute Hepatitis B Virus Infection with Recovery Typical Serologic Course



# Diagnostika viru HIV

---

- ▶ Průkaz protilátek proti obalovým glykoproteinům – **ELISA**.
- ▶ Pozitivní výsledek → vzorek séra do referenční laboratoře → **konfirmace** výsledku pomocí další ELISA a Western blotting. Výsledek, pokud je potvrzen, označován jako „**reaktivní**“ (nikoliv pozitivní).
- ▶ **Přímý průkaz** lze provádět pomocí PCR. Izolace viru je dnes již možná, ale velmi náročná a běžně se neprovádí.



# Diagnostika viru hepatitid a HIV – praxe

---

- ▶ Ačkoli některé reakce ELISA slouží k průkazu antigenu a jiné k průkazu protilátek, **praktický přístup je obdobný.**
- ▶ **Počítání cut off:** průměr důlků cut off, nebo průměr negativních kontrol + konstanta.
- ▶ Často **cut off  $10 \pm \%$  = hraniční hodnoty.**
- ▶ V některých případech, zvláště u diagnostiky VHA nevyšetřujeme protilátky IgM a IgG, nýbrž **IgM a celkové protilátky.** Je jasné, že negativní IgM a pozitivní celkové protilátky prakticky značí přítomnost protilátek IgG.
- ▶ PCR se používá hlavně u **diagnostiky HCV, případně HIV.**



# Anaerobní bakterie – rod *Clostridium*

---

- ▶ G+ tyčinky, relativně velké
- ▶ Sporulující
- ▶ Růst za anaerobních podmínek v prostředí s nízkým redoxním potenciálem. Některé mikroaerofilní.
- ▶ Saprophyté střev zvířat a člověka (účast na hnilobných procesech), spóry v prostředí (půda, bahno rybníků, prach, na vegetaci).
- ▶ Málo patogenních druhů.
- ▶ Patogenní způsobují neurotoxikózy, enterotoxikózy, nekrotizující infekce měkkých tkání.





# Neurotoxická klostridia – *Cl. tetani*

---

- ▶ Štíhlé tyčinky tvořící **terminálně uložené endospory**.
  - ▶ Součást běžné mikroflóry zvířat i člověka.
  - ▶ Původce **tetanu**.
  - ▶ Mikrob přítomen v těle – způsobí malý zánět, ale „problémem“ je až jeho toxin (tetanický toxin) – šíří se celým tělem a způsobuje **stah svalu, který nemůže relaxovat**. Toxin blokuje inhibici motorických neuronů (brání uvolňování mediátorů této inhibice).
  - ▶ Klasické jsou křeče svalů (trismus = křeče žvýkacích svalů), typické je lukovité prohnutí těla = **opistotonus**.
  - ▶ **Očkování** proti tetanu je součástí hexavakcíny, přeočkování jednou za 10 – 15 let.
- 



# Neurotoxická klostridia – *Cl. tetani*



# Neurotoxická klostridia – *Cl. botulinum*

---

- ▶ Původce botulismu – obrny svalů (ne spasmy jako u tetanu).
- ▶ Typy botulismu:
  - **Kojenecký** botulismus – toxin produkován ve střevě dítěte, *C. botulinum* se zde pomnoží
  - **Traumatický** botulismus – infikována rána
  - **Alimentární** botulismus - z potravin, typicky uzeniny, konzervy. Mikrob není přítomen v těle, pouze jeho botulotoxin. Příznaky: gastrointestinální projevy, rozostřené vidění, ztížené polykání, poruchy artikulace, zástava střevní peristaltiky, zástava močení.
- ▶ Botulotoxin – neurotoxin, který zabraňuje uvolňování acetylcholinu do synapse a dochází k přerušení vedení vzruchu → paréza svalstva. Využití v kosmetice – botox.



# Histotoxická klostridia – *Cl. perfringens*

---

- ▶ Další *Cl. novyi*, *septicum*, aj.
- ▶ Infekce měkkých tkání – typicky podkoží, svalstva, nekrózy kůže.
- ▶ V místech, kde je málo okyšličaná krev → vznik gangrén (léčba v hyperbarických komorách).
- ▶ Typické válečné onemocnění.



# *Clostridium difficile*

---

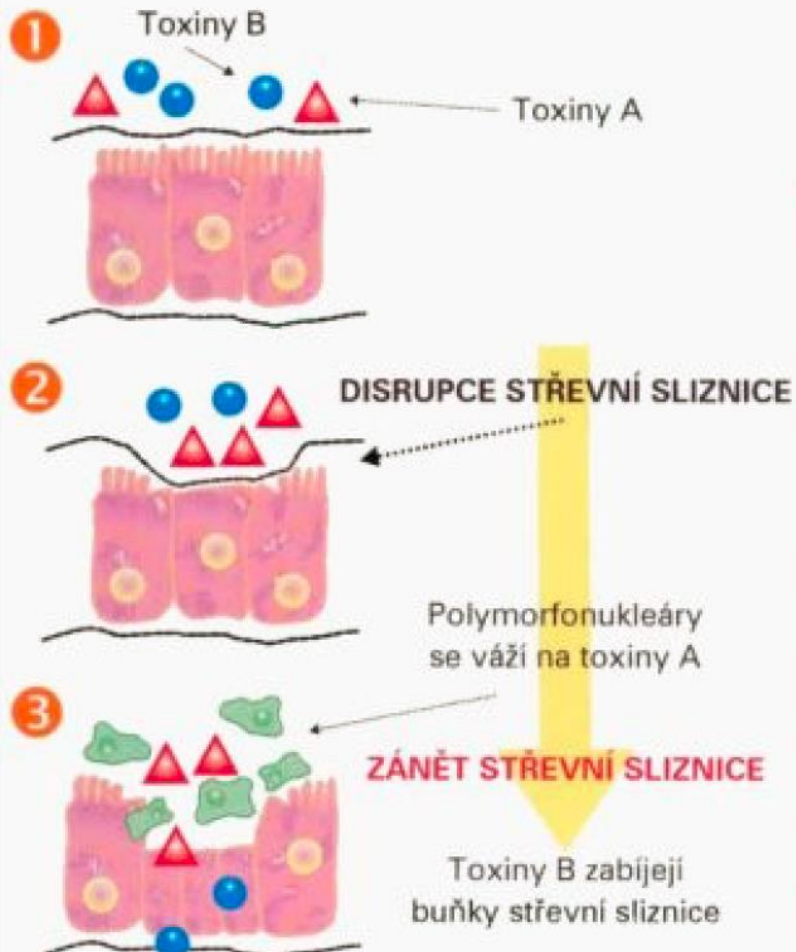
- ▶ Běžný výskyt ve střevech, infekce způsobuje u pacientů léčených typicky širokospektrými ATB (typicky např. linkosamidy) → **vybití běžné mikroflóry a přemnožení *Cl. difficile*** – produkce toxinu.
- ▶ Nejprve způsobuje **průjmy**, pokud není léčeno → **pseudomembranózní kolitida** (až ruptura střeva).
- ▶ **Léčba:** chemoterapeutikum metronidazol, perorálně vankomycin, transplantace stolice



# Clostridium difficile

www.zuova.cz

## Toxiny Clostridium difficile



# Přehled klostridií

---

<i>C. tetani</i>	Původce tetanu
<i>C. botulinum</i>	Producent botulotoxinu
<i>Clostridium perfringens</i> , <i>C. septicum</i> aj.	Klostridia plynatých snětí (+ enteropatogenita)
<i>C. difficile</i>	Enteropatogenní





# Nesporulující anaeroby + laktobacily

---

- ▶ Výskyt jako **běžná mikroflóra**:
  - **Tlusté střevo – 99,9 %** všech mikrobů, celkem až 1 kg
  - Ústa – přežití díky biofilmu
  - Pochva – u asi 70 % žen, při přemnožení (=dysmikrobie) se musí léčit
  - Některé na kůži
- ▶ **Endogenní infekce** – nezpůsobuje je jeden mikroorganismus, ale směs – někdy nazývána jako „**Veillonova mikroflóra**“.
- ▶ Může způsobovat např. novorozeneckou pneumonii (*Bacteroides fragilis*) nebo gingivostomatitis (*Prevotella gingivalis*)





# Přehled nesporelujících anaerobů

	Koky	Tyčinky
G+	<i>Peptococcus</i> <i>Peptostreptococcus</i>	<i>Propionibacterium</i> *** <i>Eubacterium</i>
G-	<i>Veillonella</i>	<i>Fusobacterium, Leptotrichia</i> * <i>Bacteroides, Prevotella,</i> <i>Porphyromonas</i> **

\*se zašpičatělými konci

\*\*s rovnými konci tyčinky

\*\*\*není stoprocentní anaerob



# Lactobacillus acidophilus

---

- ▶ „Döderleinův bacil“
- ▶ Robustní G+ tyčinky fermentující substráty (glukóza, laktóza) na kyselinu mléčnou (**laktát**).
- ▶ Nejdůležitější součást **vaginální mikroflóry**, součást střevní mikroflóry.
- ▶ Mikroaerofilní, ne anaerobní.



# Vztah bakterií ke kyslíku

---

Prostředí	Normální	↓ O <sub>2</sub>	↑ CO <sub>2</sub>	Bez O <sub>2</sub>
Striktní aeroby	ano	ano	ano	ne*
Fakultativ. anaeroby	ano	ano	ano	ano
Aerotolerantní bakt.				
Mikroaerofilní bakt.	ne	ano	(ano)	ne*
Kapnofilní bakterie	ne	(ano)	ano	ne*
Striktní anaeroby	ne	ne	ne	ano**

\*V praxi někdy vyrostou – běžně dosahovaná anaerobióza není dokonalá

\*\*V praxi někdy nevyrostou – běžně dosahovaná anaerobióza není dokonalá. Takové bakterie (EOS – Extremely oxygen sensitive) běžně nelze kultivovat

---



# Diagnostika anaerobů

---

- ▶ **Mikroskopie:** větší význam než u aerobů, vzhledem k morfologické různorodosti.
  - ▶ **Kultivace:** nutno zajistit anaerobiózu pomocí anaerostatů či anaerobních boxů. U tekutých půd postačuje přelití **parafinem**. Používá se **VL (viande levure) bujón**, VL krevní agar a různé speciální půdy. (U Sv. Anny se používá místo VL bujónu WCHA.)
  - ▶ **Biochemie:** kataláza a oxidáza většinou negativní, možné vzájemné rozlišení biochemicky, i analýza plynů chromatografií (jsou biochemicky aktivní).
  - ▶ **Antigenní analýza a nepřímý průkaz** se v diagnostice anaerobů příliš **nepoužívají**.
- 



# Anaeroby – odběr vzorků

---

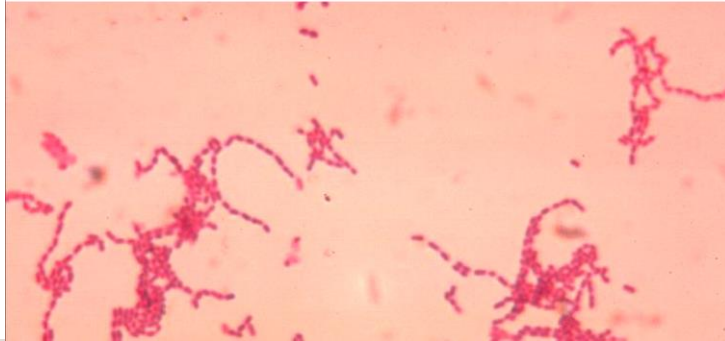
- ▶ Upřednostněn je **tekutý vzorek** – např. hnis, nejlépe zaslaný ve stříkačce s krytkou (po odstříknutí přebytečného vzduchu). (Dříve doporučený postup, kdy se na stříkačce ponechala jehla a zabodla do gumové zátky se již z bezpečnostních důvodů nedoporučuje.)
- ▶ **Výtěr pouze v transportní půdě** (např. Amiesova).
- ▶ Je možné domluvit naočkování vzorku přímo, např. preoperačně.



# Anaeroby – mikroskopie

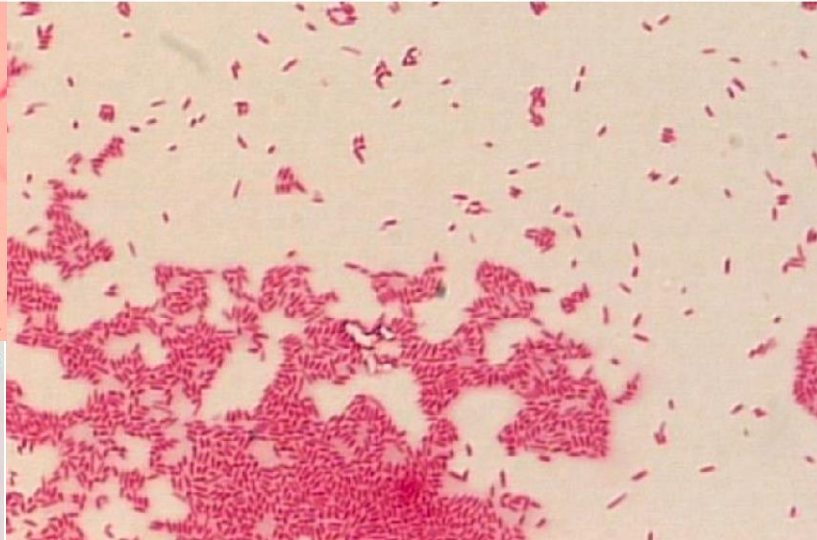
*Peptostreptococcus* sp.

<http://www.geocities.com>



*Bacteroides fragilis*

<http://www.geocities.com>  
Bacteroides fragilis



<http://www.docstoc.com/docs/123452532/clostridium-tetani>



*Clostridium tetani*

*Fusobacterium* sp.

<http://www.geocities.com>



*Veillonella* sp.

<http://www.primer.ru>



# Anaeroby – kultivace

---

- ▶ Anaerobní bakterie rostou často v **drobných, nepravidelných koloniích**, které mají někdy **výběžkaté okraje**. Typický je pro ně také **značný zápach**.
- ▶ Aerobní kultivace na krevním agaru umožňuje růst striktně aerobních a fakultativně anaerobních bakterií. Když tu tedy bakterie neroste, avšak roste na anaerobních půdách, je to striktní anaerob. Pro kultivaci anaerobů používáme VL krevní agar (v praxi mu říkáme prostě VL agar).





# Anaeroby – kultivace – anaerobióza

- ▶ **Mechanicky** – VL bujony přelijeme parafínovým olejem
- ▶ **Fyzikálně** – v anaerobním boxu se nahradí vzduch směsí anaerobních plynů, vháněných z bomby
- ▶ **Chemicky** – v anaerostatu se:
  - z organických kyselin tvoří vodík a CO<sub>2</sub>
  - v druhé fázi na palladiovém katalyzátoru reaguje vodík s kyslíkem za vzniku vody, takže se kyslík spotřebovává





# Anaerostat – princip

Palladiový kalalyzátor  
(pod víčkem)  
nezbytný pro druhou  
fázi reakce

Generátor  
anaerobiózy (sáček  
s chemikáliemi) nutný  
pro celou reakci



# Anaerostat – popis

- vzduchotěsné víčko
- palladiový katalyzátor  
(pod víčkem)
- konstrukce pro  
ukládání Petriho misek
- Generátor anaerobiózy  
(sáček s chemikáliemi)



# Anaeroby – morfologie kolonií

---

- ▶ Klostridia mívají poměrně velké, nepravidelné, smrduté kolonie.
- ▶ Jiné anaerobní bakterie mívají spíše drobné kolonie.
- ▶ Některé anaerobní bakterie (*Prevotella melaninogenica*) mají pigmentované kolonie (černý pigment).
- ▶ Je potřeba počítat s tím, že kultivace trvá déle než u aerobů (2 dny až týden, u některých ještě déle).



# Anaeroby – biochemické testy

---

- ▶ ANAERObtest 23 Lachema.
- ▶ Zapišeme výsledky jednotlivých reakcí („+“ nebo „-“) a spočítáme oktalogový kód.
- ▶ Výsledek se určí podle kódové knihy.
- ▶ POZOR – kódová kniha je rozdělená na několik částí podle morfologie anaerobních bakterií. Je třeba hledat v té správné části kódové knihy.



# Anaeroby – antibiotická citlivost

---

- ▶ Lékem volby u většiny anaerobů je klasický **penicilin**. **Rezistentní** je však rod *Bacteroides* (v užším slova smyslu – rody *Prevotella* a *Porphyromonas*, které se z něj kdysi odštěpily, jsou **citlivé**).
- ▶ Antibiotická citlivost se u anaerobů prováděla difúzním diskovým testem (nikoli na MH, ale na VL krevním agaru), nyní se ale zpravidla používá **E-test** (hodnota MIC se odečítá v místě, kde se kříží okraj zóny s testovacím proužkem).



# Anaeroby – detekce toxinu: průkaz lecitinázy

- ▶ Tvorba lecitinázy se projeví **precipitací kmene na žloutkovém agaru**. Protože však lecitináz je mnoho a nás zajímá pouze lecitináza druhu *Clostridium perfringens*, prověřujeme, zda je lecitináza inhibovatelná specifickým antitoxinem.

„Negativní I“  
vůbec  
neprodukuje  
lecitinázu.  
„Negativní II“  
produkuje, ale  
nějakou jinou,  
než nás zajímá



# Anaeroby – detekce toxinu: tetanický a botulický

---

- ▶ Pokus na zvířeti se používá u tetanu a botulismu.
- ▶ U tetanu se myš svíjí v křeči, u botulismu jsou naopak patrné parézy.



Tetanická myš

# Anaeroby – detekce toxinu: *Clostridium difficile*

---

- ▶ Imunochromatografické testy – navazování jednotlivých složek (stejný princip např. těhotenský test).
- ▶ V případě testování kmenů ***Clostridium difficile*** produkujících toxin se na rozdíl od některých jiných případů **testují paralelně toxiny A a B** a navíc ještě **antigen tohoto klostridia**.
- ▶ **Pozitivní toxin i Ag**: viditelné tečky uprostřed a dvě čárky.
- ▶ **Pozitivní pouze Ag**: tečky a jedna čárka vlevo.
- ▶ **Negativní**: pouze tečky (ty musí být přítomny vždy).
- ▶ **Pozitivní pouze toxin**: tečky a jedna čárka vpravo → nonsense!





