



# **Metody analýzy mikroorganismů - opakování**

**doc. RNDr. Milan Bartoš, Ph.D.**

**bartosm@vfu.cz**

**Přírodovědecká fakulta MU, 2014**

# ***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**

**Toto je opakování vašich znalostí z jiných přednášek**

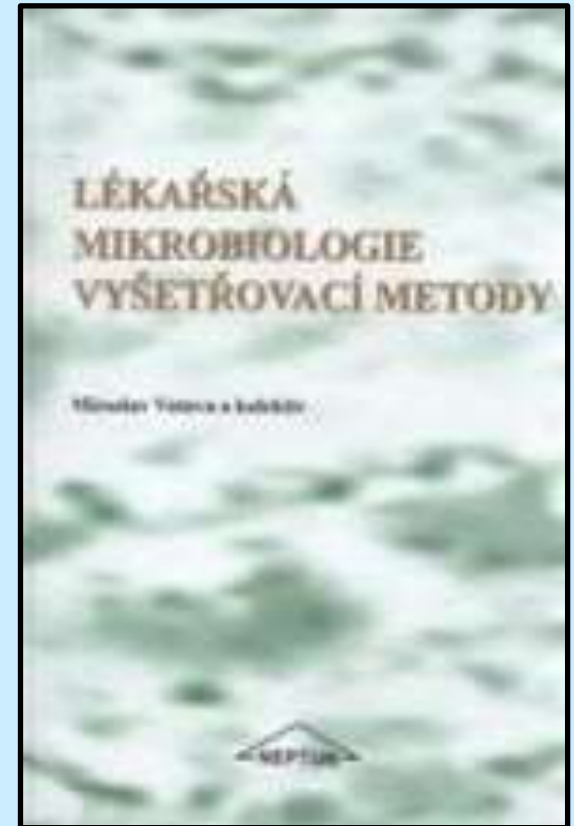


## *Doporučená literatura*

**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**

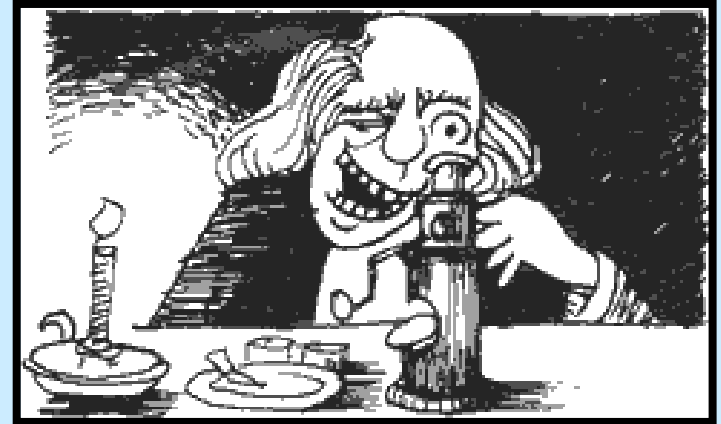
**Přímý průkaz spočívá v nalezení mikroorganismu nebo jeho komponent ve vyšetřovaném vzorku**

**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**

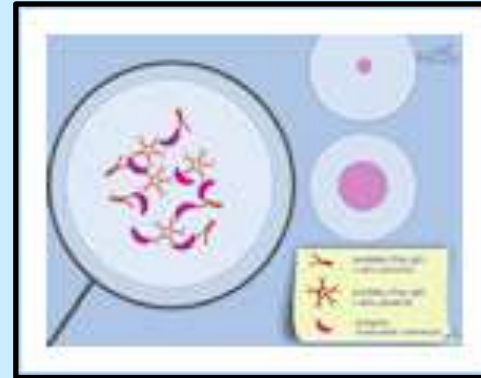


## **Moderní (nekultivační) postupy**

- **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.**

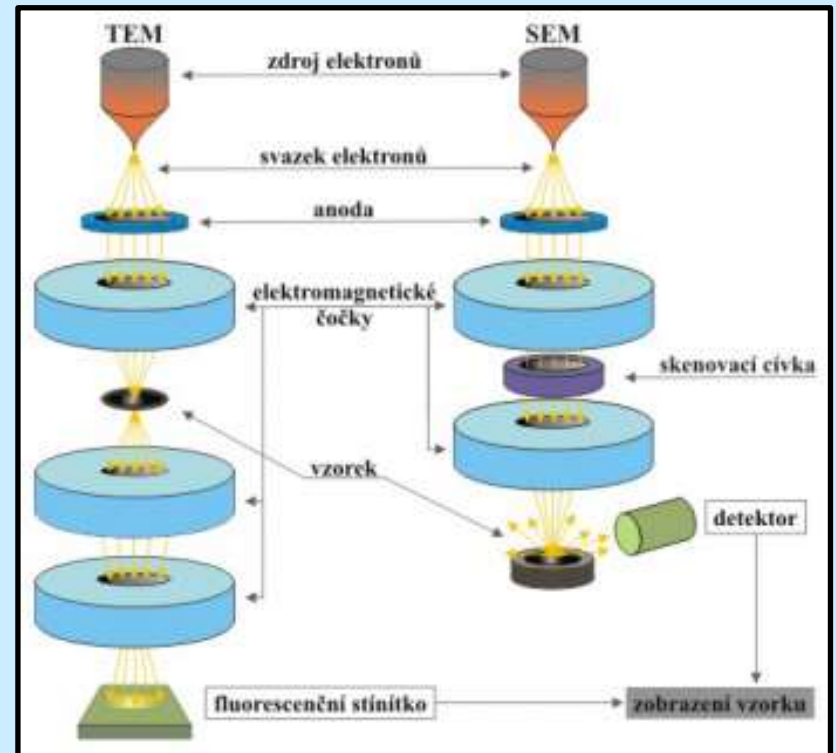


# Mikroskopie



## 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**

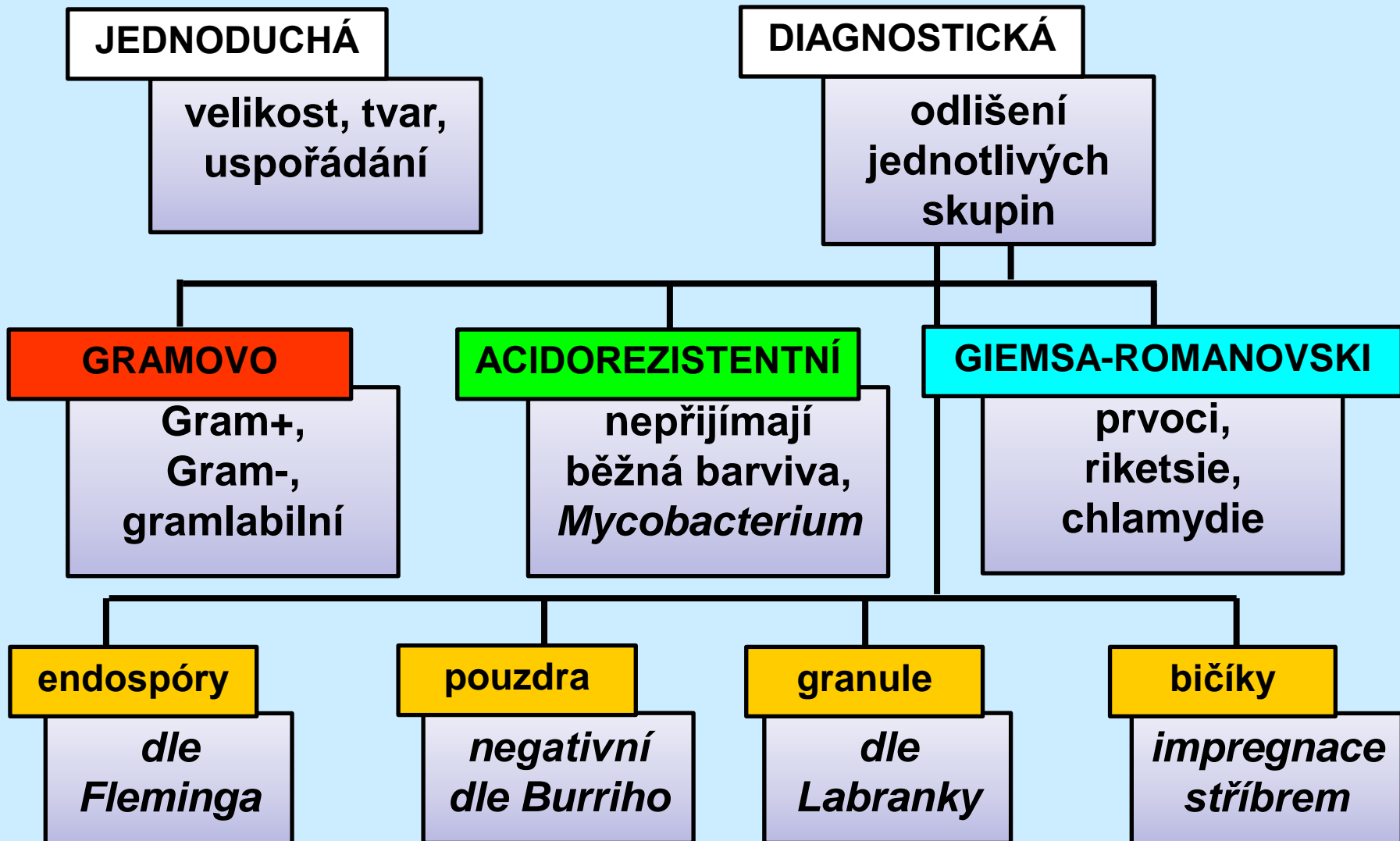
- **nesmí být ani tlustý ani tenký**
- **Ize připravit podobně jako krevní nátěr**
- **vzácně tzv. otisk**

## **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

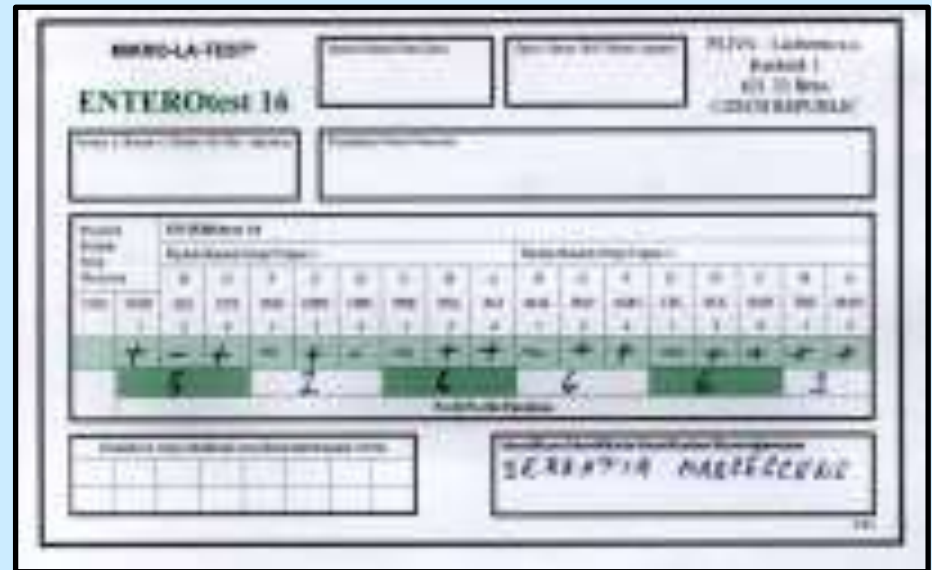
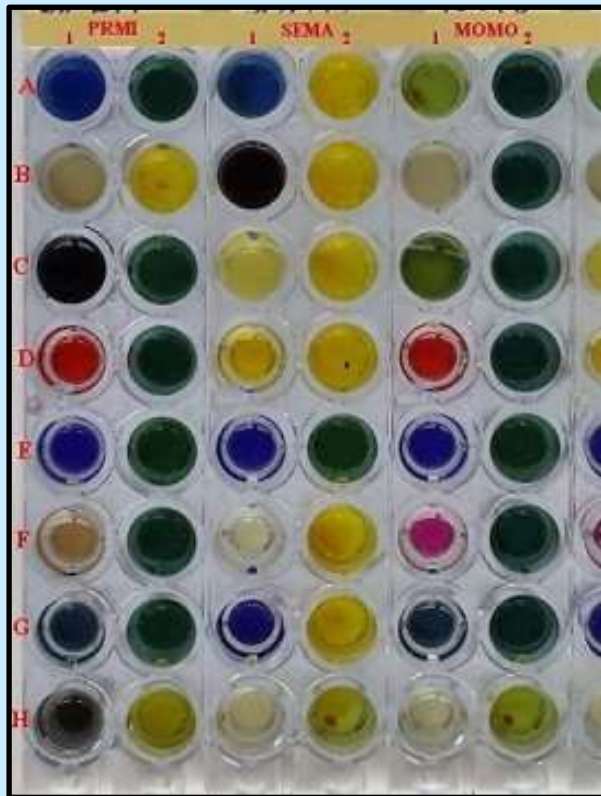
indikátor

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?**

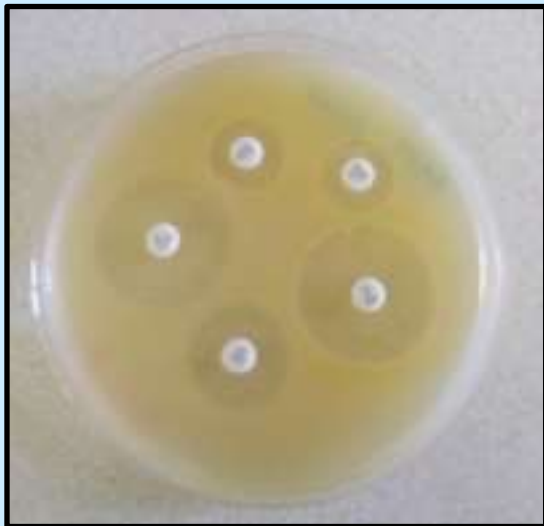
## **Kvalitativní**

- **Diskový difuzní test**

## **Kvantitativní**

- **Stanovení MIC**
- **E-testy**

# *Diskový difuzní test*



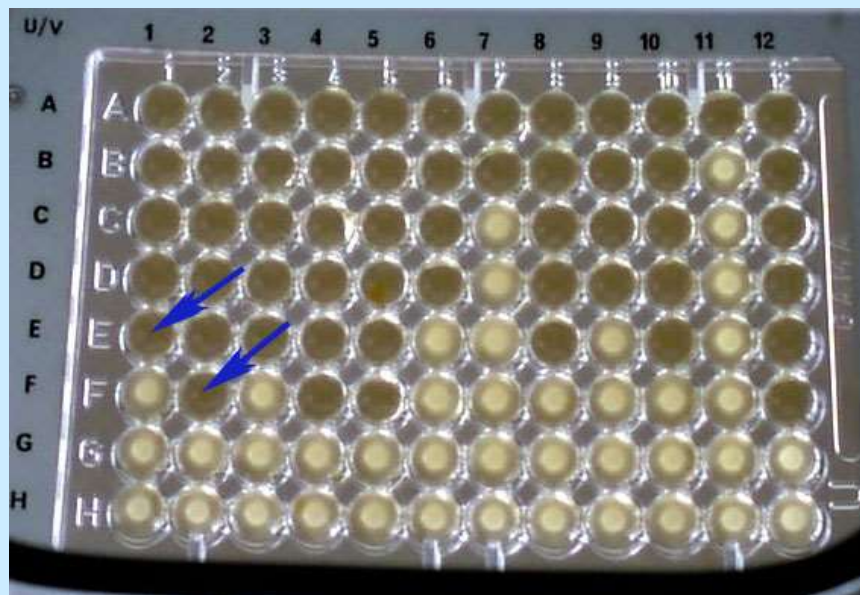
Vysvětlení testu najdete na

<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

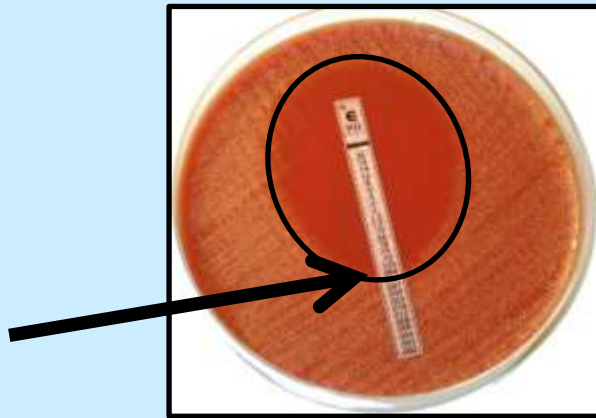


**Co to je MBC?**

**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?



**Protilátka**

- 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  
imunofluorescencně**



# *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 CO<sub>2</sub> u *Helicobacter pylori***





# *Nepřímý průkaz*



Zopakujme si, co to je ...

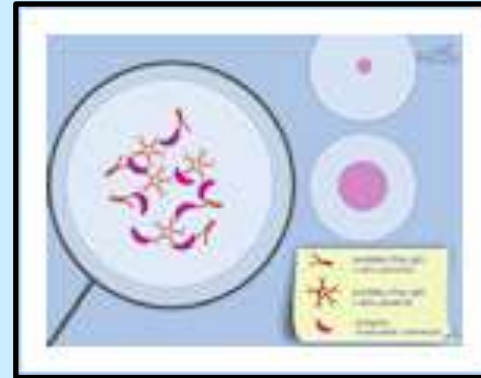
Nepřímý důkaz je založen na průkazu specifických stop zanechaných mikroorganismem v organismu (nejčastěji protilátky)

**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.**

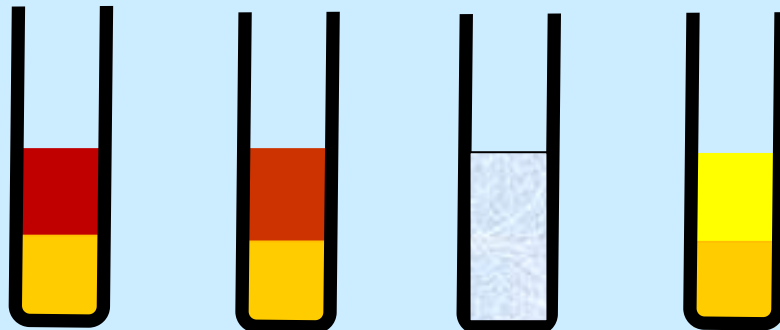


# Precipitace

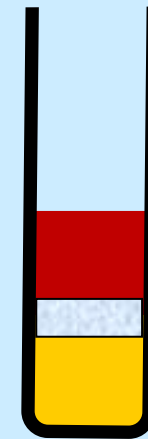
- sérologická reakce - antigen je koloidní povahy
- precipitát vzniká vazbou antigenu a protilátky

## Precipitace prstencová

### Flokulace



precipitát



antigen

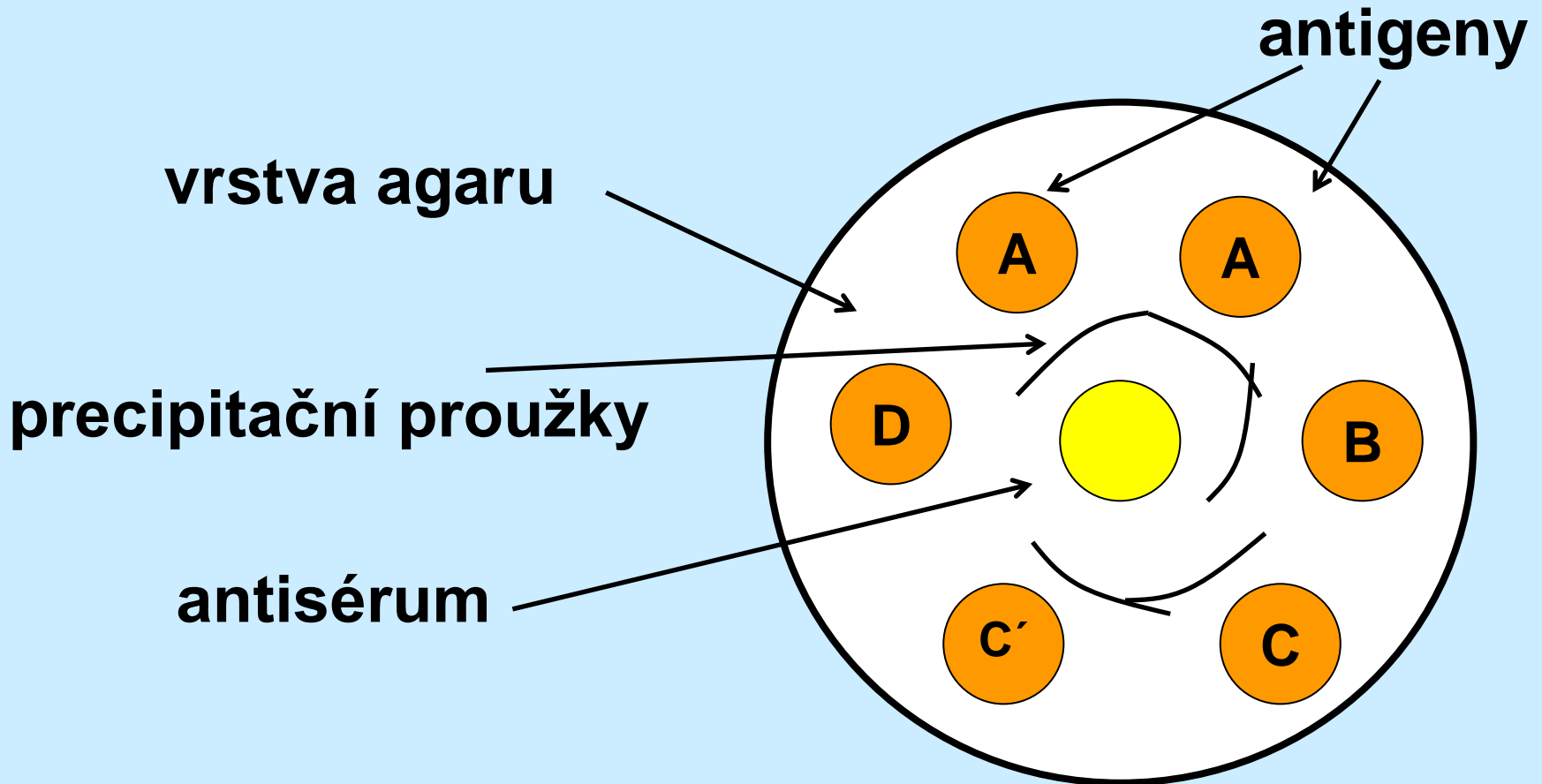
antisérum

flokulace v zóně ekvivalence

rostoucí koncentrace antigenu

# Ouchterlonyho technika

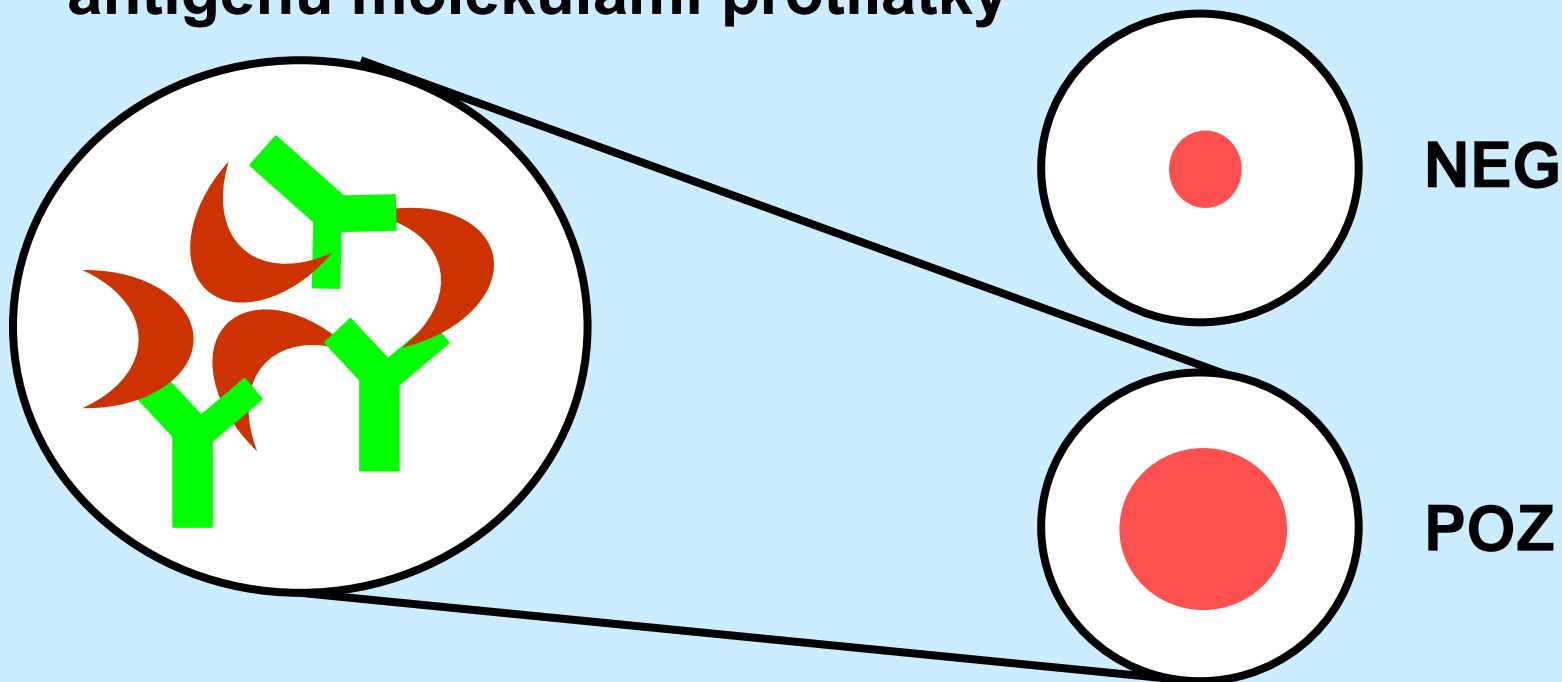
- precipitace využívající difúze v gelu



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

# ***Aglutinace***

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

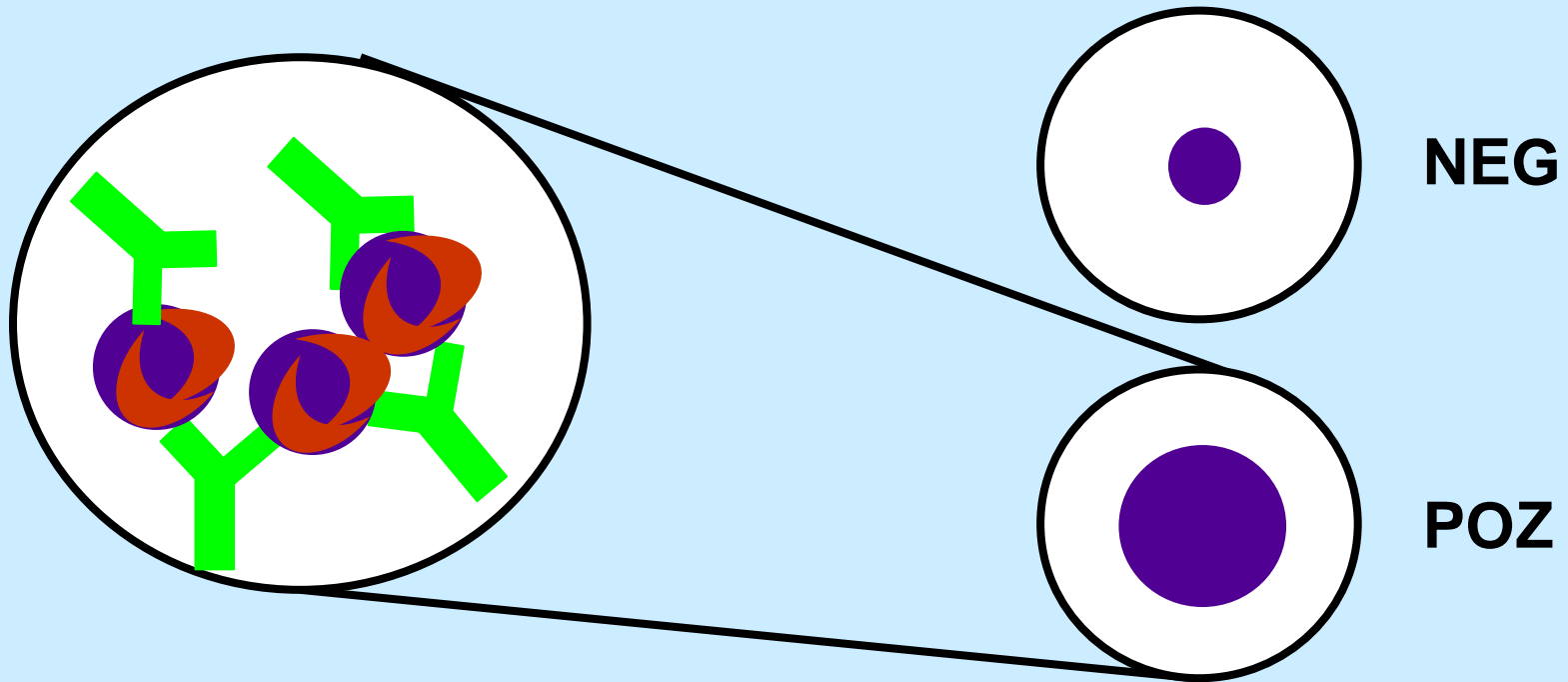


Podívejte se na animaci aglutinace na

[http://labmet.zshk.cz/media.aspx?id=ALM007&TB\\_iframe=true&height=750&width=820](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](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**

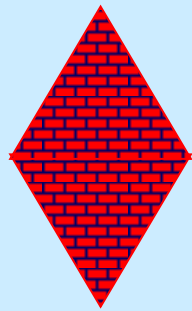
## **Enzyme-linked immunosorbent assay**

**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

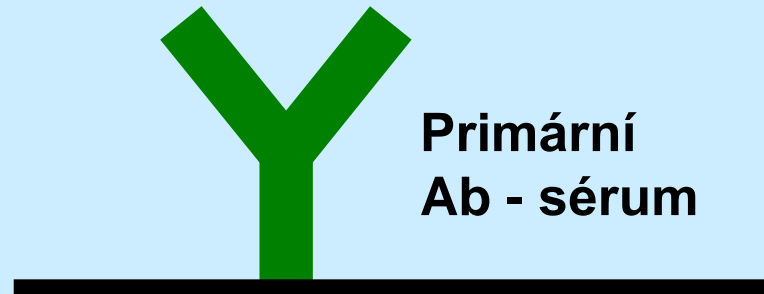
## Kompetitivní ELISA



Sekundární  
Ab - konjugát



Značka  
Sekundární  
Ab - konjugát



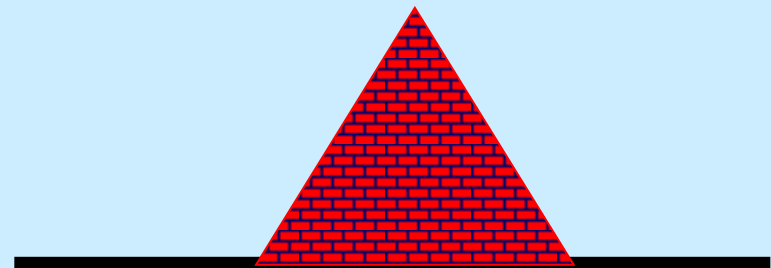
Primární  
Ab - sérum

## Nekompetitivní (sendvičová) ELISA

Značka

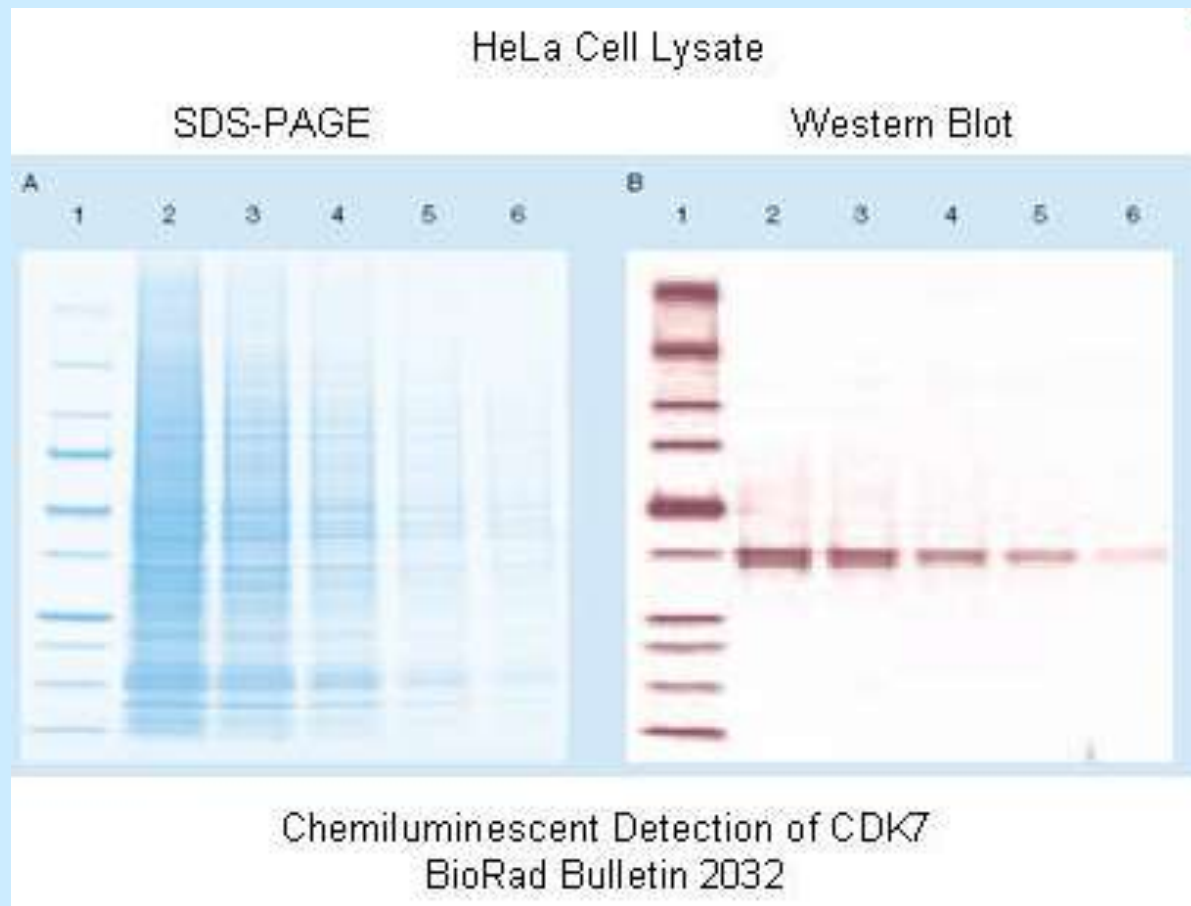


Primární  
Ab - sérum



# Western blot

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





# ***Jak se prokazují viry?***

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

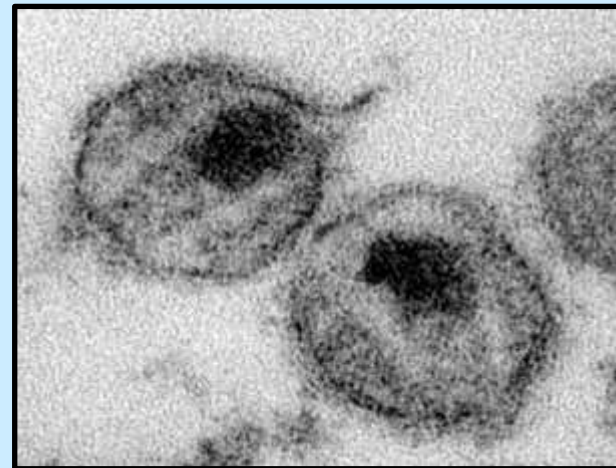
# ***Přímý průkaz virů***

- **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**

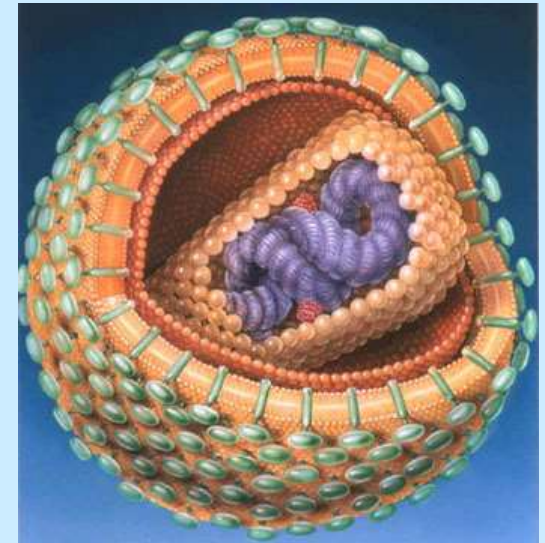
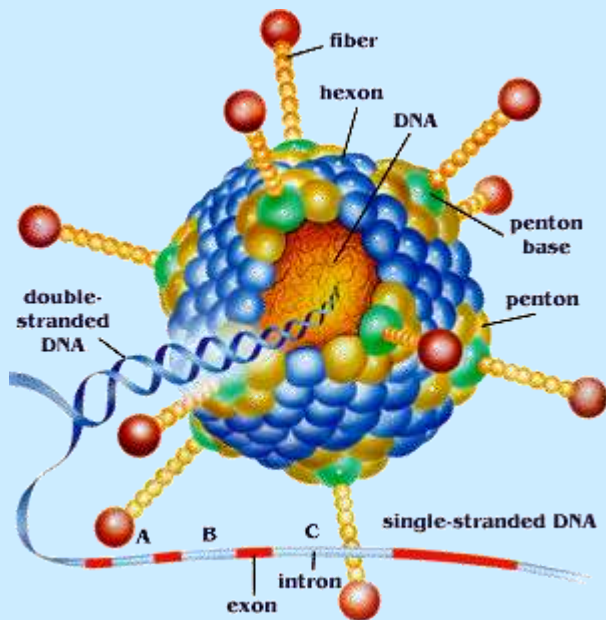
# *Průkaz nukleových kyselin*

Genová sonda

Metody amplifikace

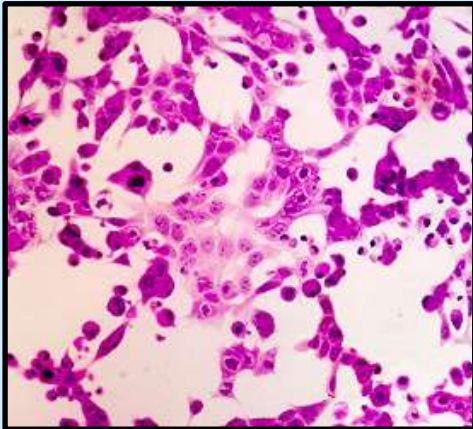
DNA viry

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**

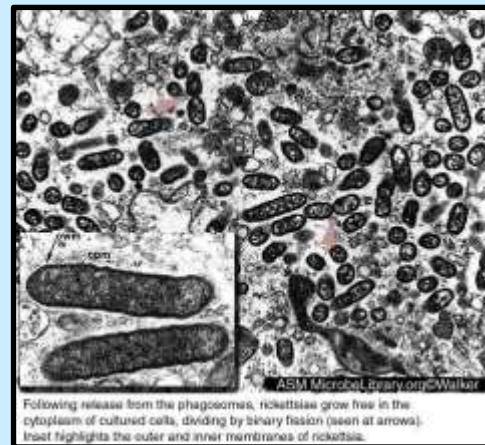
## **Hemaglutinačně inhibiční test**

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

# Se kterými bakteriemi se pracuje virologickými technikami?

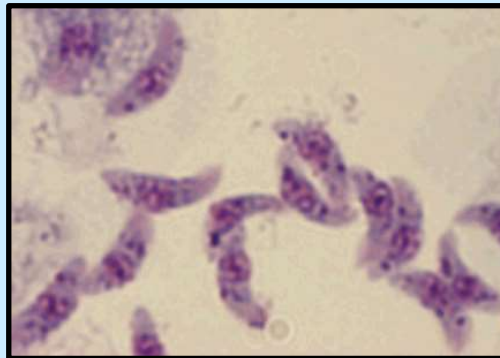
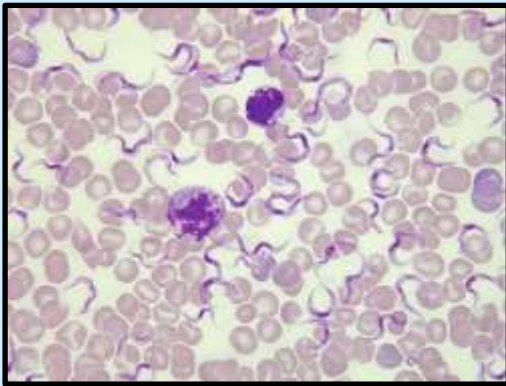


## S rickettsiemi a chlamydiemi





# ***Vyšetřovací metody v parazitologii***



# ***Přímý průkaz parazitů***

**Žádná kultivace, ale morfologický průkaz**

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

**Průkaz parazitárních antigenů**

**Ojediněle (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

