

Repetitorium jarního semestru praktických cvičení z lék. mikrobiologie – metody lékařské mikrobiologie

Sepsal: Ondřej Zahradníček

Autorská poznámka: tento text není kompletním přehledem toho, co se v jarním semestru v praktiku probíralo, zejména v něm nenajdete popisy konkrétních úkolů (ovšem ne že by po vás někdo chtěl znát z paměti, kdy se kam pipetuje kolik mililitrů).

Text chce být spíše teoretickým základem, který ovšem student bezpodmínečně musí doplnit svými poznámkami z jednotlivých praktických cvičení. Vřele také doporučuji nahlédnout na naše webové stránky www.medmicro.info.

Vzhledem k tomu, že text vznikl úpravou jiných textů, sloužících původně k jiným účelům, možná, že v něm najdete i informace nadbytečné, za což se omlouvám. Některé „nadbytečné“ informace jsem ale v textu nechal schválně – myslím, že třeba přehled nejdůležitějších bakterií či nejdůležitějších antibiotik se vám ještě bude hodit. Považuji však za poctivé zdůraznit, že tyto zelené části nejsou předmětem zápočtového testu z lékařské mikrobiologie v jarním semestru. Text je autorským vlastnictvím Ondřeje Zahradníčka a je určen k výukovým účelům, jeho použití k jiným účelům je třeba konzultovat s autorem.

Úvod (společný základ většiny témat)

Bezpečnost práce v laboratoři

Při práci v laboratoři je třeba dbát zásad bezpečnosti, zejména se vyhýbat všemu rizikovému chování. Hlavní nebezpečí jsou nebezpečí infekce a nebezpečí požáru. O druhém z nich vypovídá následující píseň:

Řeknu vám to na rovinu: není žádná sranda
Když se ráno před labinu dostaví ta banda
U skříněk se porvou všichni narvou si tam věci
A už dupou po světnici: Češi, Švédi, Řeci

Říkám že jsou hluční oni - Řeci ovšem zvláště
Všude dupou jako sloni, čmárají na pláště
Dimostenes sirkou škrtá, Christos ničí klíčku
První, druhá, třetí, čtvrtá pryč je za chvíličku

Jednou taky vytáhli si sklíčko z desinfekce
Zapomněli to co kdysi znali z první lekce
Rukou sklíčko z alkoholu nad plamenem suší
Je to zkrátka stádo volů co klid v duši ruší

A tak tedy sklíčko v ruce studentovi vzplálo
Trhnul sebou přímo prudce zděsil se ne málo
Zkrat a spousta lidí kolem měla na tom podíl
Do škatule s alkoholem on to sklíčko hodil

Krabice by během chvíle dohořela asi
Leč ty hlavy pošetilé začly si rvát vlasy
Do plamene hadry hází a ručníky taky
Kolem ohně spousta sazí a studentů mraky

Chtěl jsem proto do hašení vnést trochu klidu
Šel jsem čelem ku plameni - zády zase k lidu
Jedna hadra jež se vzňala ze stolu však sklouzla
Za úkol si asi dala provádět kouzla.

Hadra řádila jen s mírou - mohla řídit více
Přesto odnesla to dírou moje nohavice
Tyhle věci, ty se staly již před mnoha léty
Brzo mě pak jmenovali do požární čety!

Jednotlivé skupiny mikrobu

1. Priony (neobsahují nukleovou kyselinu, např. původce „nemoci šílených krav“)
2. Viry (DNA a RNA, obalené a neobalené)
3. Bakterie (tyčinky, koky, spirochety; grampozitivní, gramnegativní)
4. Mikroskopické houby (kvasinky a plísně)
5. Paraziti (živočišné patogeny): vnější (členovci) a vnitřní (prvoci, oblovci, ploštěnci)

Ad 2: Viry dělíme na DNA-viry RNA-viry. Viry také můžeme dělit na obalené a neobalené, případně podle počtu a typu vláken DNA, respektive RNA.

Ad 3: Bakterie dělíme například

- podle tvaru a uspořádání
 - koky – kulovité, mohou tvořit dvojice, řetězky, shluky...
 - tyčinky – protáhlé, mohou být rovné, zahnuté...
 - kokotyčinky (kokobacily) – přechod mezi koky a tyčinkami
 - spirochety – ve tvaru spirály
 - bez tvaru – mykoplasmata nemají buněčnou stěnu, a tedy ani tvar
- podle Gramova barvení (je to dáno typem buněčné stěny)
 - grampozitivní – barví se modře (tlustá, jednoduchá buněčná stěna)
 - gramnegativní – barví se červeně (tenká, zato složitá buněčná stěna)
 - Gramem se nebarvící – jiný typ stěny (mykobakteria) nebo stěnu nemají (mykoplasmata), jsou příliš tenké a proto se nebarví (spirochety) apod.
- podle vztahu ke kyslíku
 - striktně aerobní (rostou pouze v přítomnosti kyslíku)
 - striktně anaerobní (vyžadují atmosféru bez kyslíku)
 - fakultativně anaerobní (dokáží „přepínat metabolismus“ a přizpůsobit se)
 - aerotolerantní (metabolismus „nepřepínají“, ale také se přizpůsobí, v praxi neodlišitelné od přechozích)
 - mikroaerofilní (potřebují kyslík, ale musí ho být málo)
 - kapnofilní (potřebují kyslík, ale také zvýšený podíl CO₂ v atmosféře)
 - *pro praxi se používá často jen dělení na aerobní (rostou za normální atmosféry) a anaerobní (vyžadují atmosféru bez kyslíku)*

- podle patogenity:
 - nepatogenní: nejsou schopni vyvolat nemoc (žádný jejich kmen není virulentní)
 - potenciální (oportunističtí) patogeni jsou takové mikroby, které vyvolávají chorobu jen někdy, jindy jsou "hodné". (*E. coli* – běžnou flórou ve střevě, ale zároveň nejčastějším původcem močových infekcí)
 - obligátní (primární) patogeni vyvolávají nemoc vždy, když se setkají s makroorganismem (v dostatečném množství a vhodným způsobem)

PŘEHLED NEJDŮLEŽITĚJŠÍCH BAKTÉRIÍ (většina z nich se bude probírat v podzimním semestru praktických cvičení):

Nejdůležitější grampozitivní koky:

Staphylococcus: *S. aureus*, ostatní jsou tzv. koaguláza-negativní stafylokoky

Streptococcus: hemolytické (betahemolytické) streptokoky (*S. pyogenes*, *S. agalactiae*, takzvané „non-A-non-B“ streptokoky), viridující (alfahemolytické) streptokoky (*S. pneumoniae* = pneumokok a takzvané „ústní“ streptokoky)

Enterococcus: *E. faecalis*, *E. faecium*

Nejdůležitější grampozitivní tyčinky:

Listeria, Corynebacterium (nejen *C. diphtheriae*), Bacillus (ten je sporulující)

Nejdůležitější gramnegativní koky:

Neisseria (*N. gonorrhoeae* – gonokok, *N. meningitidis* – meningokok, „ústní“ neiss.)

Branhamella catarrhalis – také *Moraxella catarrhalis*

Nejdůležitější gramnegativní tyčinky:

Enterobakterie: *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Proteus*, *Providencia*, *Morganella*, *Serratia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*

Gramnegativní nefermentující tyčinky: *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter*, *Burkholderia*, *Stenotrophomonas*

Ostatní: *Haemophilus*, *Pasteurella*; *Campylobacter*, *Helicobacter*; *Vibrio*

Nejdůležitější anaeroby:

Clostridium (*C. tetani*, *C. botulinum*, *C. difficile*, *C. perfringens* a jiná tzv. „klostridia plynatých snětí“)

Actinomyces – původce aktinomykózy (pozor, neplést s houbovou infekcí – mykózou)

Ostatní anaeroby většinou působí ve směsi. Jejich názvy nejsou zvlášť důležité

Nejdůležitější spirochety:

Treponema (*T. pallidum* – původce syfilis), Borrelia, Leptospira

Nejdůležitější z ostatních bakterií:

Mycobacterium (*M. tuberculosis*, *M. leprae*), Mycoplasma (*M. pneumoniae*, *M. hominis*),

Ureaplasma (*U. urealyticum*), rickettsie, chlamydie

Přehled mikrobiologických vyšetřovacích metod

Metody přímého a nepřímého průkazu mikrobů

Mikrobiologická diagnostika směřuje k odhalení původce nemoci a v některých případech také ke zjištění (in vitro) citlivosti tohoto původce k antimikrobiálním látkám.

Skutečného původce je přitom často potřeba odlišit od

- běžné flóry - tedy mikrobů, které se v některých tělních dutinách vyskytují normálně, od
- náhodného nálezu, který se např. do úst zatoulal s potravou, a také od
- kontaminace, tedy od mikrobů, které se do vzorku přilepily omylem cestou.

Toto odlišení probíhá částečně v laboratoři a částečně na klinickém pracovišti.

In vitro citlivost se určuje u většiny bakterií a kvasinek, ne však u ostatních mikrobů. "In vitro" citlivost (určená v laboratoři) ovšem o skutečné "in vivo" citlivosti u pacienta vypovídá jen částečně. Je to dáno mimo jiné tím, že v laboratoři se mikroby chovají poněkud jinak než ve tkáních.

Metody, kterými určujeme mikroby, si můžeme rozdělit na:

METODY PŘÍMÉ, pomocí kterých **hledáme mikroba jako takového, jeho součást nebo jeho produkt** ve vzorku pacienta; vzorkem v takovém případě bývá např. moč, stolice, hnis, mozkomíšní mok, výtěry z nejrůznějších tělních povrchů a otvorů.

Metody přímé si můžeme dále rozdělit:

- A. Pokud hledáme mikroba bezprostředně ve vzorku, používá se zpravidla pojem přímý průkaz. Je potřeba vzít v úvahu, že vzorek zpravidla obsahuje buňky makroorganismu a že předem nevíme, kolik různých druhů mikrobů je ve vzorku obsaženo (pokud nějaké)
- B. Kvůli nevýhodám přímého vyšetřování vzorku často potřebujeme získat **kmen**. Kmen získáme kultivací mikroba na pevné půdě. Práce s kmenem mikrobiologům nahrazuje práci s jedincem, tak jak ji znají zoologové či botanici. Pokud máme k dispozici kmen a určujeme jeho vlastnosti, hovoříme o identifikaci mikroba. Některé metody identifikace jsou tytéž, které se používají i k přímému průkazu (například lze mikroskopovat vzorek – přímý průkaz – i kmen – identifikace)

METODY NEPŘÍMÉ, kterými **hledáme protilátky**. Rozdíl je v tom, že protilátka není součástí ani produktem mikroba - je produktem makroorganismu, i když by bez podráždění daným mikroblem (resp. jeho antigenem) nevznikla. Nevýhodou nepřímých metod je, že nejsou důkazem toho, že je mikrob v těle právě přítomen – svědčí jen o tom, že se s ním tělo někdy setkalo (anebo se setkalo s očkovací látkou, která obsahovala části těla toho mikroba).

Hlavní rozdíly mezi přímými a nepřímými metodami

Metody přímé	Metody nepřímé
<u>Prokazujeme</u> : mikroba, jeho součást nebo jeho produkt	<u>Prokazujeme</u> : protilátky
<u>Vzorek</u> : všechno možné, vždy to, kde by mohl být patogen	<u>Vzorek</u> : téměř vždy sérum
<u>Pozitivní nález</u> (zpravidla) znamená, že mikrob je přítomen v těle	<u>Pozitivní nález</u> znamená, že tělo se (někdy v historii) setkalo s mikroblem

Přehled přímých metod

Název metody	K přímému průkazu ve vzorku	K identifikaci kmene mikroba
Mikroskopie)	Ano	ano
Kultivace (pěstování na půdách)	Ano	ano
Biochemické a podobné identifikační metody	Ne	ano
Pokus na zvířeti	Ano	lze použít, ale nedělá se to
Průkaz antigenu/antigenní analýza	Ano	ano
Průkaz nukleové kyseliny	Ano	lze použít, ale nedělá se to

J01 + J02 – Mikroskopie

Nativní preparát

Nejjednodušší druh mikroskopie: mikroby se pozorují neobarvené, jen rozmíchané v kapce fyziologického roztoku a přikryté krycím sklíčkem. Nepoužívá se imerze. Nativní preparát se hodí

- na mikroby (baktérie, prvoky), kteří se pohybují
- na velké mikroby - především tedy parazity a houby

Mikroskopie v zástínu

Je to zvláštní druh nativního preparátu. V důsledku jiného směrování paprsků je výsledkem světlý objekt na tmavém pozadí. Používá se především u spirochet.

Barvené preparáty

Preparáty, které mají být nějak obarvené, musí být nejprve vysušeny a poté zfixovány - obvykle protažením plamenem. Poté proběhne vlastní barvení. Preparát se vysuší (např. filtračním papírem) a pozoruje se tzv. imerzním objektivem bez krycího sklíčka; mezi objektiv a preparát se kápne kapka imerzního oleje.

- *Jednoduché barvení* - používá se například metylénová modř. Dá se provádět i přímo v klinickém pracovišti jako nouzové orientační vyšetření.
- Mikrobiologové provádějí většinou *Gramovo barvení*. Je to nejdůležitější barvení v mikrobiologii. Rozliší baktérie podle typu buččné stěny na grampozitivní, gramnegativní a gramem se nebarvící. Má čtyři kroky, po každém z nich se preparát oplachuje vodovodní vodou. Po posledním oplachu se vysuší.

Chemikálie	Čas	Co se stane s grampozitivními	Co se stane s gramnegativními
Violeť*	30 s	Nabarví se na modrofialovo	Nabarví se na modrofialovo
Lugolův roztok	30 s	Viditelně nic, ale vazba se posílí	Skoro nic
Alkohol	15 s	Nic	Odbarví se
Safranin	60 s	Skoro nic, trochu změní odstín	Nabarví se na červeno

**genciánová violeť, krystalová violeť, Gram I*

- Různá *speciální barvení* se používají např. na tuberkulózu, na plísně, některé parazity apod.
- Ke speciálním účelům se používá *fluorescenční barvení*.

Interpretace mikroskopie. Použijeme-li mikroskopii jako přímý průkaz, nevidíme jenom mikroby samotné, ale také různé jiné věci, například epitelie a leukocyty makroorganismu. Jejich přítomnost a vzájemný poměr má velký význam při hodnocení nálezu. Například velké množství neutrofilů svědčí o bakteriální hnisavé záněť.

Množství jednotlivých elementů (baktérií, epitelí, leukocytů apod.) se hodnotí zpravidla semikvantitativně na jeden až tři (nebo čtyři) křížky.

Samozřejmě, je-li mikroskopie použita k identifikaci, vidíme už jednom příslušného mikroba.

Elektronová mikroskopie se používá u virů, ale nehodí se k rutinní diagnostice, spíše k výzkumu.

J03 – Kultivace

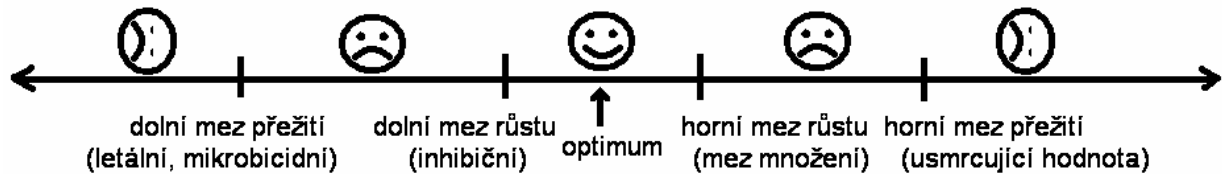
Kultivaci u virů se říká izolace.

Kultivace je pěstování mikrobů, zpravidla na umělých půdách. Mikroskopie je sice neklasičtější mikrobiologickou metodou, avšak kultivace je zdaleka nejdůležitější (alespoň v případě bakterií a kvasinkovitých hub). Její význam spočívá především v tom, že umožňuje ze **vzorku** (obsahujícího často směs mikrobů a téměř vždy buňky pacienta) izolovaný čistý **kmen** ve formě tzv. **kolonií**. To ovšem platí jen pro tzv. **pevné půdy**. Důležité jsou ale i **půdy tekuté**, sloužící zejména k pomnožení mikrobů tam, kde jich bylo získáno málo.

KMEN je populace mikrobů, vzešlá z jedné buňky, bez ohledu na formu. Všichni jedinci v rámci kmene mají stejné vlastnosti.

KOLONIE je označení konkrétního útvaru, který bakterie a kvasinky vytvářejí při kultivaci na pevných půdách. U většiny mikrobů vyroste za den. Pokud odtud mikroba přemístíme, přestává být kolonií, zůstává však kmenem.

KULTIVAČNÍ PODMÍNKY zahrnují teplotu, vlhkost, složení atmosféry a podobně. Zpravidla se laboratoř snaží vytvořit mikrobům podmínky blízké těm, které jsou v organismu. To znamená pro každý z použitých fyzikálních a chemických faktorů dosáhnout hodnoty ležící v okolí optima, resp. mezi dolní a horní inhibiční mezí:



ROZDĚLENÍ KULTIVAČNÍCH PŮD PODLE TYPU

Tekuté půdy (pomnožovací). Nejdůležitější je:

- Peptonová voda - obsahuje bílkovinný hydrolyzát (to jest: produkt rozkladu bílkoviny na aminokyseliny a polypeptidy). Samotná se používá zřídka, je však mezistupněm k další:
- Bujón (masopeptonový bujón) je peptonová voda s vývarem. Je to základní pomnožovací půda, běžně používaná v laboratoři hlavně tam, kde předpokládáme malé množství mikrobů, jež chceme namnožit.
- VL-bujón je bujón s přísadkou kvasnic (francouzsky *viande-levure* = maso-kvasnice). Hodí se pro anaeroby. Aby se mikroby při kultivaci nedostaly do styku se vzdušným kyslíkem, přelévá se VL-bujón při kultivaci vrstvou parafinového oleje.
- Selenitový bujón je příkladem půdy selektivně pomnožovací. Taková pomnoží jen některé mikroby – v případě selenitového bujónu salmonely (a několik dalších rodů).

Pevné (většinou agarové) půdy. Jsou to půdy, jejichž základem je zpravidla živý agar - to je bujón, do kterého je přidán výtazek agarové řasy. Tím se stane, že z tekutiny se stane hmota připomínající pudink nebo želatinu. Fyzikálně vzato je to ovšem pořád tekutina: jakákoli chemická látka, kterou umístíme na povrch agarové půdy, začne touto půdou poměrně rychle pronikat (difundovat).

Na agarových půdách je báječná jedna věc: bakterie (a také kvasinky) na nich tvoří kopečky, kterým říkáme **kolonie**. Každý druh bakterie tvoří na konkrétní půdě specifické kolonie charakteristické velikosti, barvy, tvaru apod., což velmi usnadňuje diagnostiku.

Jedna kolonie zpravidla vyrůstá z jedné bakterie (nanejvýš z jedné dvojice, jednoho řetězku, jednoho shluku - používá se tu anglický termín CFU = colony forming unit = jednotka tvořící kolonii). Z toho také logicky vyplývá, že pokud na agarovou půdu naočkujeme směs dvou bakterií, a pokud tato směs není příliš hustá, vytvoří každý z těchto druhů své vlastní charakteristické kolonie. Ty pak můžeme přeočkovat (= odebrat a nechat znovu kultivovat) a různými metodami identifikovat.

Živý agar se v praxi nepoužívá. Když už se totiž v laboratoři vaří agarová půda, vždycky se do ní něco přidává, co usnadňuje rozpoznání jednotlivých druhů.

U kolonií se dají popisovat různé znaky – velikost, barva, tvar, zápach a podobně.

Pevné půdy rozlišujeme podle účelu.

Diagnostické půdy jsou takové, na kterých "roste kdeco, ale každé jinak". Jinak řečeno - určitá vlastnost bakterie se projeví na vzhledu kolonie. Do této skupiny patří i půda, která je mezi klinickomikrobiologickými půdami úplně nejdůležitější:

- Krevní agar je živý agar s přísadkou ovčích červených krvinek. Využívá se toho, že patogenní druhy bakterií většinou rozkládají červené krvinky (úplná nebo neúplná beta-hemolýza) nebo aspoň mění červený hemoglobin na zelené barvivo (viridace, někdy také alfa-hemolýza). Méně patogenní druhy krvinek nemění (žádná hemolýza, také "gamma-hemolýza"). *Krevní agar lze považovat i za půdu obohacenou (viz dále) – logika tohoto zařazení spočívá v tom, že některé bakterie, např. streptokoky, by nerostly na živném agaru, ale na krevním agaru vyrostou.*
- VL-agar (VL-krevní agar) je pozměněný krevní agar pro anaerobní bakterie.

Selektivní půdy jsou takové, na kterých "roste jenom něco". (Podobně jako u tekutých, selektivně pomnožovacích pūd). Patří sem např.:

- Krevní agar s 10 % NaCl - je selektivní pro stafylokoky. Ostatní klinicky významné bakterie tak vysokou koncentrací NaCl nesnášejí. Je to logické – stafylokoky žijí na (zpacené) kůži.

Selektivně diagnostické půdy v sobě spojují vlastnosti obou předchozích. Jinak řečeno, jedny bakterie na nich nerostou, druhé bakterie rostou v určitých koloniích další zase v koloniích jiného vzhledu.

- Endova půda má svoji *selektivní vlastnost*. Ta spočívá v tom, že na ní rostou pouze gramnegativní (G-) bakterie. Má ale také *diagnostickou vlastnost*. Bakterie, které štěpí laktózu, na ní mají tmavočervené kolonie a tmavočervená je i půda v okolí kolonií. Laktózu neštěpící bakterie tvoří kolonie bledé. Příčinou je indikátor – Schiffovo činidlo
- Půdy XLD a MAL se používají k diagnostice salmonel.

Obohacené půdy jsou bohaté na živiny. Jsou určeny k pěstování náročných bakterií, které hned tak na něčem nevyrostou - například hemofily nebo původce kapavky.

- Čokoládový agar je vlastně krevní agar zahřátý asi na 80 °C. Přestože se do něj oproti krevnímu agaru nic nepřidává, je obohacený tím, že různé látky z krve v něm volně plavou a jsou tedy pro bakterie mnohem lépe dostupné.
- Levinthalův agar je přefiltrovaný čokoládový agar. Je téměř bezbarvý, přesto je funkčně hodně podobný předchozímu.

Speciální půdy mají své zvláštní určení.

- Müllerův-Hintonový agar je určen k testování citlivosti bakterií in vitro na antibiotika.

Jak se kultivuje na pevných pūdách

1. Na povrch půdy naneseme část vzorku nebo několik kolonií z předchozí kultivace.
2. Bakteriologickou kličkou toto místo "roztaháme" (rozředíme) po celé misce.
3. Nyní misku umístíme do termostatu, většinou při 37 °C. Většinou kultivujeme 16 - 28 hodin (tedy do druhého dne), někdy ale déle (dva, tři i více dní). Po vyjmutí vidíme na misce kolonie, které můžeme popisovat nebo s nimi provádět další identifikační pokusy.

J04 – biochemické identifikační metody

Tyto metody jsou založeny na skutečnosti, že každý druh bakterie produkuje jinou sestavu enzymů. A tak třeba máme bakterii, která třeba umí rozštěpit (pomocí příslušných enzymů) maltózu a sacharózu, ale ne trehalózu, a jinou, která umí štěpit sacharózu a trehalózu, ale ne maltózu. Kombinace vhodného počtu znaků může určit bakterii nejen na úroveň rodu, ale často i druhu.

PRINCIP těchto reakcí je takový, že bakterii je předložen substrát (substráty). Pokud bakterie produkuje enzym(y), dojde k přeměně substrátu (substrátů) na produkt (produkty). V případě, že se produkt(y) liší od substrátu(-ů) barvou, skupenstvím apod., můžeme změnu přímo pozorovat. Pokud změna není viditelná, musí být v reakci přítomen indikátor. Nelze-li indikátor mít v reakci od začátku, přidává se až po proběhlé reakci ve formě činidla.

Katalázová reakce je velmi jednoduchá biochemická reakce, založená na průkazu enzymu katalázy (štěpí peroxid vodíku). Používá se k rozlišování rodů bakterií, např. stafylokoky jsou kataláza pozitivní, streptokoky kataláza negativní. Provedení: kolonie bakterie je smíchána s kapkou peroxidu vodíku. V případě positivity kapka šumí - vznikají bublinky kyslíku. Výhodou je, že výsledek je viditelný během několika vteřin. Indikátor není třeba (bublinky jsou viditelné).

Reakce na diagnostických proužcích (stripech). Tyto reakce se také dají odečíst velmi rychle - během vteřin či nejpozději minut. Používá se plastových diagnostických proužků, jejichž reakční ploška se zvlhčí a přitiskne na kolonie testované bakterie. Po určité době (a někdy ještě po přikápnutí činidla) se pak sleduje, jestli na reakční plošce dojde k vývoji typického zbarvení (např. modrého, modrozeleného, červeného).

Testy ve zkumavkách. Jednoduché testy obsahují substrát (např. cukr) a indikátor. Do substrátu se vmíchá suspenze bakterie a inkubuje se přes noc. Když je reakce pozitivní, dojde k barevné

změně; když je negativní, ke změně nedojde. Složitě testy využívají vícesubstrátových směsí. Barevná změna pak může být např. jiná u hladiny (prsteneček určité barvy) a jiná v hloubce.

Testy v plastové mikrotitrační destičce („panelu“)

V podstatě jde o sérii miniaturizovaných jednoduchých zkumavkových testů. Bez ohledu na konkrétní podobu jednotlivých destičkových testů (liší se podle výrobce, nové výrobky od starších apod.) je princip prakticky vždy stejný: na dně důlků jsou lyofilizované substráty (případně substráty s indikátorem), do důlků se přikápnou suspenze bakterie a destička se nechá inkubovat (obvykle přes noc). Poté se hodnotí, u kterých testů došlo ke změně barvy. Hodnotí se to pouhým okem nebo automaticky - čtecím zařízením na principu spektrofotometru. Hodnotí se zpravidla najednou 8 – 30 různých biochemických reakcí.

POKUS NA ZVÍŘETI

Pokus na zvířeti býval důležitou součástí diagnostiky v začátcích mikrobiologie. Šlo tehdy i o to, prokázat, zda příslušný mikrob vůbec je původcem nemoci – naočkoval se tedy pokusnému zvířeti a čekalo se, zda také u zvířete propuknou příznaky podobné těm u pacienta.

V některých případech se podobně postupuje dodnes. Nejčastěji se používají myši, morčata, potkani, králíci. Význam pokusu na zvířeti klesá s rozvojem modernějších metod i s tím, jak si lidé stále více uvědomují, jak je jeho využívání eticky problematické.

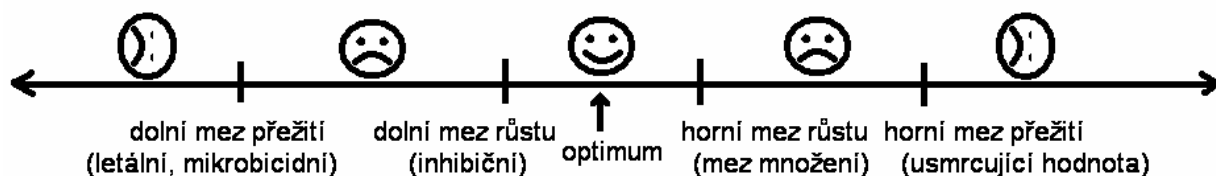
Zvířata (hl. hospodářská) se ovšem v mikrobiologické diagnostice uplatňují i jinak, např. jejich séra jsou zdrojem protilátek, z jejich krvinek se připravují krevní agary (nejčastěji s ovčím, ale i např. s hovězími či koňskými erytrocyty) apod.

PRŮKAZ ANTIGENU

Jedná se o metodu přímého průkazu, avšak způsob provedení je shodný s nepřímým průkazem (průkazem protilátek) - v obou případech se hovoří o tzv. sérologických reakcích. Ty budou proto probírány v další části diagnostiky.

Desinfekce a sterilisace – téma J05

Baktérie a vnější prostředí



Baktérie (a podobně i ostatní mikroby) jsou velmi citlivé na změny vnějšího prostředí. Na ose (která již byla uvedena u kultivace) znázorňující kvantitu nějakého faktoru (třeba pH či teplotu), můžeme určitou hodnotu definovat jako optimální. To je hodnota, při níž se baktériím daří nejlépe. Když se hodnota zvyšuje nebo snižuje, narazíme nejprve na inhibiční mez, kdy je inhibován (zastaven) růst bakterií, a nakonec na baktericidní mez, kdy jsou mikroby nevratně ničeny (usmrceny). Faktorem, o němž je řeč, může být kromě teploty také třeba tlak, vlhkost, koncentrace nějaké chemické látky apod. Pokud hovoříme o nějaké chemické látce, která baktériím škodí (desinfekční činidlo, antibiotikum – viz dále), používají se pro výše uvedené meze pojmy minimální inhibiční koncentrace a minimální baktericidní koncentrace.

Faktory se navzájem kombinují; přinejmenším se vždycky kombinují s časem. Proto vyšší teploty ničí bakterie za kratší dobu, než teploty nižší. - Lékařsky významné bakterie jsou obvykle nastaveny na podmínky, jaké mohou naleznout v lidském (nebo zvířecím) organismu: 37 °C, 0,9 % NaCl apod. Bakterie s optimem kolem 37 °C se nazývají mezofilní, ty, které mají optimum vyšší, termofilní, pokud nižší, jsou psychrofilní.

Praktický význam těchto mezí:

1. Baktericidní meze jsou významné pro boj s mikroby (sterilizace, desinfekce) - hodnoty působících faktorů musí být nastaveny tak, aby byly bakterie usmrceny.

2. Inhibiční meze a optimální hodnoty jsou důležité pro pěstování (kultivaci) bakterií. Je důležité vědět, že různé bakterie se liší (často velmi podstatně) ve svých nárocích na teplotu, vlhkost, koncentrace solí apod. Jednak je při kultivaci konkrétní bakterie důležité vytvořit jí vhodné podmínky, jednak lze rozdílů mezi druhy a rody bakterií použít také při jejich určování (roste na půdě s vysokou koncentrací solí? je to stafylokok; neroste tam? není to stafylokok). Inhibiční mez u antimikrobiálních látek (minimální inhibiční koncentrace) je důležitá pro antimikrobiální léčbu.

Dekontaminační metody

Jsou fyzikální a chemické postupy určené především k likvidaci zdraví ohrožujících organismů - mikrobů (sterilizace, vyšší stupeň desinfekce, desinfekce), hmyzu (desinsekce) a hlodavců (deratizace). Některými metodami se ovšem zlikvidují všechny (mikro)organismy. Při použití všech těchto metod je důležité dodržení několika zásad. Je nutno především:

- Vybrat **vhodnou sterilizační/desinfekční metodu nebo prostředek**. Pojem "vhodný" znamená:
 - musí bezpečně ničit ty organismy, které připadají v daném prostředí v úvahu
 - nesmí ničit desinfikovaný či sterilizovaný materiál (povrch, pokožku...)
 - musí být prakticky použitelný (z ekonomických hledisek, provozních apod.)
- Použít **dostatečnou intenzitu faktoru** - dostatečnou teplotu, intenzitu záření, dostatečnou koncentraci přípravku apod.
- Příslušný **faktor musí působit dostatečně dlouho** (často se nedodržuje - sestra potřebuje kůži desinfekcí a hned už píchá injekci!).

Protože koncentrace, teploty a působení jsou u každé metody a u každého prostředku jiné, je vhodné mít po ruce dostatečně čerstvý přehled těchto čísel. Vhodná je např. knížka Desinfekce a sterilizace, vydaná před časem nakladatelstvím Grada. Dobré je také mít k dispozici platnou vyhlášku. Je potřeba zjistit, zda se metoda hodí pro účel, pro který ji chceme použít, jaké se užívají hodnoty působícího faktoru (teploty, koncentrace) a jaký čas je předepsán pro jeho působení (u desinfekce je někdy místo přesného časového údaje udáno „do zaschnutí“ – to ovšem znamená, že prostředek je skutečně nutno nechat zaschnout!). U desinfekce je velice důležitý údaj o spektru účinku – např. A = bakterie a kvasinky, B = bakteriální spory, C = viry apod. U sterilizace není údaj nutný, protože z principu sterilizace musí být vždyničeno všechno.

STERILIZACE. Je to postup (obvykle fyzikální), kterým jsou zničeny všechny mikroby (včetně virů, hub a bakteriálních spor). Nejčastěji se používá:

1. Sterilizace **horkou parou pod tlakem** (autoklavování). Pára musí být právě nasycená (to znamená, že kdyby obsahovala jen nepatrně více vody, začala by se voda srážet). Hodí se na předměty ze skla, kovu, keramiky, kameniny, porcelánu, textilu, gumy a některých plastů. Teploty kolem 115 – 134 °C.
2. Sterilizace **horkou vodou pod tlakem** - pouze u chirurgických nástrojů k okamžitému použití. Málo se používá také sterilizace **horkým olejem**.
3. Sterilizace **horkým vzduchem** (u přístrojů s nucenou cirkulací vzduchu 180 °C 20 minut nebo 170 °C 30 minut nebo 160 °C hodinu). Hodí se na kovy, sklo, porcelán a kameninu.
4. Sterilizace **ohněm** se používá prakticky jen u mikrobiologických klíčků, protože většinu materiálů silně poškozuje. Spalování se hodí u odpadů.
5. Sterilizace **gamma zářením**: používá se pouze při průmyslové výrobě, např. rukavic na jedno použití.
6. **Chemická sterilizace parami** formaldehydu nebo ethylenoxidem (musí být přesně dodržen postup). Používá se tam, kde nelze použít fyzikální metody.
7. **Paskalizace** je sterilizace tlakem v potravinářství
8. **Odstatní metody: frakcionovaná sterilizace, filtrace roztoků aj.** jsou speciální, používají se výjimečně

VYŠŠÍ STUPEŇ DESINFEKCE je nový pojem, který znamená "něco mezi sterilizací a desinfekcí". Tento postup na rozdíl od sterilizace nemusí zničit například cysty prvoků nebo vajíčka červů.

Používá se **glutaraldehydu**, **Sekuseptu** nebo **Persterilu** (vyhláškou je dáno, jaké koncentrace je potřeba použít - vždy jsou vyšší než pro běžnou desinfekci). Vyšší stupeň desinfekce slouží například k ošetřování flexibilních endoskopů s vláknovou optikou, popř. i jiných přístrojů, u kterých nelze použít žádné metody sterilizace.

DESINFEKCE. Je to chemický nebo i fyzikální postup, kterým se ničí původci nemocí. Obvykle však nejsou ničeny všechny mikroby. Dobrá desinfekce je taková, která ničí všechny PATOGENNÍ mikroby, které se v daném prostředí vyskytují. Dobrá desinfekce tedy nemusí postihovat původce tuberkulózy, pokud se v daném místě nevyskytuje. Stejně provedená desinfekce v tuberkulózní léčebně by ovšem byla desinfekcí špatnou.

A. FYZIKÁLNÍ METODY

1. Var: a) za normálního tlaku - ve zdravotnictví alespoň 30 minut. V kuchyni i méně, ale jídlo se musí provařit (i uvnitř!), b) v tlakových hrncích - zkrácení času - ani v tom případě však nejde o sterilizaci!!!
2. Jiné fyzikální metody - filtrace, žhánání, slunění, UV záření apod.

B. DESINFEKČNÍ PROSTŘEDKY

- Oxidační činidla
3. Výborné jsou **peroxydy**, zvláště kyselina peroctová (CH_3COOOH , u nás Persteril). Působí i na spory, houby, a tuberkulózu; 0,5 % roztok spadá pod pojem vyšší stupeň desinfekce. Nevýhodou je agresivita na sliznice i materiály, např. kovy, odbarvování textilií a nestabilita roztoků.
 4. Peroxid vodíku (H_2O_2) - podobný, méně agresivní, také ale méně účinný.
 5. Dobré jsou i **halogenové preparáty**. Z chlorových je to chlornan sodný (NaOCl), u nás Savo s všestranným použitím. Také chlornany jsou bělidlem. Chlornan vápenatý ($\text{Ca}(\text{OCl})_2$; chlorové vápno) se hodí k hrubé desinfekci velkých ploch. Dříve se sypal do suchých záchodů, avšak hygienický přínos byl sporný a ekologický negativní.
 6. Chloramin je prášek (Chloramin B; Chloraminy BM a BS jsou s přísadami).
 7. Jodovou tinkturou se ošetřovaly drobných rány. Pak se zjistilo, že alergizuje a je agresivní, dnes se ale ukazuje, že to zase není tak hrozné. Přesto lepší jsou prostředky jako je Jodonal B a Jodisol, kde je jód vázán v komplexu. Jodonal B by měl dostat u nealergických pacientů před Ajatinem při ošetřování chirurgických ran.
 8. Manganistan draselný se již neužívá.
 - Alkoholy, fenoly a aldehydy
 9. Formaldehyd se samotný používá spíše jako konverzační činidlo a k uchování očkovacích látek. Často se však aldehydy (vedle formaldehydu především glutaraldehyd) používají ve směsích, např. s tenzidy.
 10. Kresol (lysol) je účinný, pro zápach a agresivitu se již téměř neužívá.
 11. Ethylalkohol není příliš účinný; když už, tak nejúčinnější je asi 70 % vodný roztok, koncentrovaný je neúčinný. Ani zapálením etanolu není dostatečně účinné a navíc hrozí požárem.
 - Kvarterní amonné soli a tenzidy
 12. Orthosan BF 12 k desinfekci např. povrchů - pozor, některé jiné Orthosany nejsou desinfekční prostředky, např. Orthosan BF 40 je na vši!
 13. Ajatin - běžný pro desinfekci pokožky. Není agresivní a nealergizuje. Jeho účinnost nedosahuje parametrů oxidačních činidel.
 14. Septonex se užívá na kůži, nejen jako desinficiens, ale také jako antiseptikum. Při dlouhodobém používání je ale pravděpodobně karcinogenní.
 - Anorganické kyseliny a louhy - hrubá df. v zemědělství a průmyslu
 - Těžké kovy - zřídka, např. k ochraně budov před plísněmi - Lastanox
 - Kombinované přípravky

Např. Incidur, Spitaderm, Sterilium, jinak nemá smysl uvádět konkrétně, neboť se stále mění. Nových desinfekčních roztoků se objevuje stále mnoho. Upoutávají moderními obaly a vůní, ne všechny jsou ale účinné, někdy jde vlastně jen o tekuté mýdlo a ne o desinfectans. Je vždycky potřeba zjistit konkrétní údaje o tom, k čemu se prostředek hodí, na které mikroby je účinný, v jaké koncentraci se používá. V případě pochyb se lze obrátit o radu na nejbližší hygienickou stanici.

Desinsekce a deratizace se někdy také řadí k dekontaminačním metodám.

Příprava před dekontaminací a uchování dekontaminovaných předmětů

Před dekontaminací. Chirurgické nástroje jsou často mechanicky znečištěny a musí se před desinfekcí umýt. Pozor!!! Mytí = odplavení nečistot, kdežto desinfekce = usmrcení patogenů! Mechanická očista obvykle předchází před desinfekcí. Výjimkou je desinfekce rukou kde je to naopak (jinak by se infekční částice rozprašovaly proudem vody).

Po dekontaminaci. Při použití par (formaldehydových, persterilových...) je nutno předměty řádně odvětrat. Je také nutno dbát na omezenou trvanlivost různých dekontaminačních postupů. Např. v papírových sáčcích vydrží předměty sterilní 3 měsíce, je-li sáček uzavřen lepením, avšak jen 4 týdny, je-li uzavřen pouze sešíváčkou. To vše stanoví vyhláška.

Kontrola účinnosti dekontaminace

Orientačně - smyslově - např. pomocí charakteristického zápachu

Stanovení skutečné koncentrace desinfekčních prostředků (chemicky)

Chemická kontrola sterilizace využívá indikátorů, které při určité teplotě mění vlastnosti (např. zbarvení). Způsob biologický užívá odolné kmeny *Bacillus subtilis* či *B. stearothermophilus*.

Mechanická očista (omývání)

nemůže nahradit desinfekci, ale také naopak desinfekce nemůže nahradit omytí. Mechanické nečistoty brání prostupu desinfekčního prostředku či třeba par formaldehydu na správné místo, proto je sterilizace či desinfekce bez omytí zbytečná. Viz též "Příprava před/po dekontaminací".

Asepsa a antisepsa jsou pojmy, které souvisejí s pojmy jako desinfekce, sterilizace apod., ale nesou v sobě jiný úhel pohledu. Nejde tu o to, který škodlivý organismus (všechny mikroby, patogenní mikroby...) má být zničen, ale o to zda jde o pasivní či aktivní přístup.

ASEPSE vychází z toho, že dané prostředí je primárně sterilní či přinejmenším zbavené patogenů. Aseptické postupy jsou tedy takové, které pasivně brání vniknutí infekce do takového prostředí. Patří sem vše od stavebního uspořádání operačních traktů (odděleně od ostatního nemocničního provozu) přes používání důsledně jednorázových nebo sterilizovaných nástrojů a materiálů až po režimová opatření. Asepticky se ale musí pracovat nejen na oddělení u pacienta, ale i v laboratoři při zpracování vzorků - cílem je nekontaminovat vzorek mikroby z prostředí, což by znamenalo falešné (falešně pozitivní) výsledky

ANTISEPSE zahrnuje postupy, které aktivně zasahují proti infekci. Mohu sem patřit postupy desinfekce a sterilizace, ale v podstatě i používání antiseptik, které jinak řadíme spíše mezi používání antimikrobiálních látek než mezi dekontaminační postupy.

Antimikrobiální látky – téma J06

Přehled antimikrobiálních látek

- **Antibiotika** - proti bakteriím, produkty bakterií nebo hub
- **Antibakteriální chemoterapeutika** - proti bakteriím, syntetická
- **Antituberkulotika** - proti bacilům tuberkulózy (ty se hodně liší od jiných bakterií)
- **Antivirotika** - proti virům
- **Antimykotika** - proti houbám
- **Antiparazitární látky** - proti parazitům
- **Antiseptika** - k lokální léčbě různých infekcí

- LÁTKY (primárně) BAKTERICIDNÍ - při běžně používaných koncentracích mikroby zabíjejí. Používají se i u těžkých stavů
- LÁTKY (primárně) BAKTERIOSTATICKÉ - při běžně používaných koncentracích inhibují růst, zbylé mikroby pak postupně hynou

Přehled antimikrobiálních látek

- PENICILINY působí na buněčnou stěnu bakterií, jsou baktericidní (bakterie zabíjejí), dobře se kombinují s aminoglykosidy, nesmějí se kombinovat s makrolidy, tetracykliny, chloramfenikolem a linkosamidy (navzájem snižují svůj účinek). Nejsou téměř toxické, ale mohou vyvolávat alergie. Toto vše platí i pro cefalosporiny a nové penemy.
 - *Klasické:* **penicilin** - účinný například na angíny
 - *Protistafylokokové:* **oxacilin** - pouze na stafylokoky
 - *Širokospekteré* - působí i na gramnegativní tyčinky. Nejstarší z nich je **ampicilin**. Podobný je také **amoxicilin** (AMOCLEN, DUOMOX).
 - *Kombinace s inhibitorem betalaktamáz* – viz dále, např. kyselina klavulanová v kombinaci s amoxicilinem (AUGMENTIN, AMOKSIKLAV).
 - *Protipseudomonádové* např. **tikarcilin**
- CEFALOSPORINY jsou účinné proti G+ kokům (hlavně první generace) a G- tyčinkám (hlavně třetí generace)
 - *I. generace:* **cefalotin** (injekční), **cefalexin** (CEFACLEN - tabletový)
 - *II. generace:* nejznámější **cefuroxim axetil** (ZINNAT, ZINACEF)
 - *III. generace:* například **ceftriaxon** (ROCEPHIN, LENDACIN), **cefoperazon** (CEFOBID);
 - *III. generace s inhibitorem betalaktamáz:* **cefoperazon se sulbaktamem**, (působí obdobně jako kyselina klavulanová - SULPERAZON)
 - *IV. generace:* např. **cefepim** (MAXIPIME)
 - *cefamyciny* - příbuzné cefalosporinům: **cefexitin** (MEFOXIN)
- NOVÉ BETALAKTAMY mají velice široké spektrum a používají se jako rezervní, když už nic nepomáhá (zejména karbapenemy)
 - *monobaktamy*, např. **aztreonam**
 - *karbapenemy*, např. **imipenem** (TIENAM)
- AMINOGLYKOSIDY jsou baktericidní. Nevýhodou je, že jsou jedovaté pro sluch a ledviny. Některé se pro jedovatost užívají jen lokálně (**neomycin** - tvoří spolu s bacitracinem FRAMYKOIN). Patří sem např. **gentamicin**, a **amikacin**. Hodí se hlavně na G- mikroby.
- TETRACYKLINY jsou pouze bakteriostatické. (Totéž platí i o dalších třech skupinách.) Jsou jedovaté pro játra a vyvolávají nevolnost. Nesmějí se kombinovat s alkoholem a s mlékem (vápník), ale ani s preparáty Mg, Fe a Zn. Nepodávají se u dětí do osmi let (kvůli vývoji kostí a zubů), těhotných a kojících. Dnes se používají méně, ale na některé mikroby jsou pořád nejlpepší. Používá se **tetracyklin**, či **doxycyklin**
- CHLORAMFENIKOL je jedovatý pro krvetvorbu, ale má dobrý průnik do mozkomíšního moku.
- MAKROLIDY jsou účinné prakticky jen na G+ bakterie (azithromycin i na hemofily). Nevolnost při užívání I. generace se u II. generace snížila. Používají se mj. při alergii na peniciliny.
 - *I. generace:* **erytromycin**
 - *II. generace:* **clarithromycin** (KLACID), **roxithromycin** (RULID), **azithromycin** (SUMAMED) /stačí znát jeden z nich/
- LINKOSAMIDY jsou rezervní antibiotika. Používají se jen v nemocnici při infekcích kostí a měkkých tkání. Patří sem např. **linkomycin**
- CHINOLONY jsou vlastně chemoterapeutika, nikoli antibiotika. I. a II. generace se hodí jen pro močové infekce (v moči se koncentrují, ve tkáních málo). Od II. generace se nesmějí podávat dětem do 15 let (mají asi vliv na chrupavku).
 - *I. generace* - **kyselina oxolinová** (DESUROL)
 - *II. generace* - **norfloxacin** (NOLICIN, GYRABLOCK)

- III. generace - **ciprofloxacín** (CIPROBAY, CIPRINOL), **ofloxacin** (TARIVID, OFLOXIN)
- OSTATNÍ ANTIBIOTIKA A CHEMOTERAPEUTIKA
 - *Sulfonamidy* mají omezené použití. Používá se hlavně **sulfametoxazol kombinovaný** s jiným chemoterapeutikem trimetoprimem jako **kotrimoxazol** (SEPTRIN, BISEPTOL). Při léčbě ve stravě zákaz konzumace kyselin (citron) - nebezpečí krystalizace v ledvinách.
 - **Nitrofurantoin** se používá pouze k léčbě močových infekcí. Barví moč na žluto (upozornit pacienta!)
 - **Rifampicin** se používá pouze v kombinaci. Dnes zůstává jako rezervní a k léčbě tuberkulózy
 - **Vankomycin** a **teikoplanin** jsou rezervní antibiotika na G+ mikroby. Jsou značně toxické (ucho, ledviny, krev)
 - *Polymyxiny* (**polymyxin B** a **colistin**) jsou značně jedovaté - ten první tak moc, že se používá pouze lokálně (v ORL). Druhý se používá zejména na rezistentní G- tyčinky.
- ANTITUBERKULOTIKA jsou např. **izoniazid** nebo **etambutol**. Vždy se používá kombinace tří nebo čtyř látek, dlouhodobá léčba
- ANTIMYKOTIKA
 - *Imidazolová a triazolová*: **flukonazol** (DIFLUCAN), **ketokonazol** (NIZORAL) k celkovému, popř. i lokálnímu podání; **kotrimazol** (CANESTEN) pouze k lokálnímu podání. Navzájem se značně liší v účinnosti na různé houby
 - *Polyenová*: **amfotericin B** - vysoce toxický, pro těžké mykózy - k celkovému podání; **nystatin** (FUNGICIDIN) - k lokálnímu podání
 - *Analoga pyrimidinů* (látky příbuzné některým cytostatikům **flucytosin** (ANCOTIL) - nutno vždy v kombinaci!!, i u dětí.
- ANTIVIROTIKA
 - *proti herpesvirům*: např. **acyklovir** (ZOVIRAX, HERPESIN)
 - *proti chřipce*: např. **amantadin**
 - *proti HIV*: např. **zidovudin**, další jsou nyní ve vývoji - na vývoji nadějných preparátů se podílí mj. český vědec dr. Holý
- ANTIPARAZITÁRNÍ LÁTKY
 - *proti prvokům*: nitroimidazoly - např. **metronidazol** (AVRAZOR); **chinin** a **chlorochin** (na malárii) a spousta dalších
 - *proti plochým červům*: např. **niklosamid**
 - *proti oblé červům*: např. **pyrvinium**
- ANTISEPTIKA A LOKÁLNÍ ANTIBIOTIKA. Vedle již zmíněného bacitracinu s neomycinem (FRAMYKOIN) se používá mupirocin (BACTROBAN), různé formy SEPTONEXu, ale také spousta dalších látek, používaných jako desinficiencia: JODONAL B, JODISOL. PERSTERIL, **peroxid vodíku**, nebo **chlorhexidin**.

(Poznámka: Názvy látek jsou uváděny jako **generické**, tedy název účinné látky, a případně FIREMNÍ - název konkrétního preparátu; z firemních názvů jsou vybrány jen ty nejběžnější - například kotrimoxazol je dnes u nás registrován pod čtrnácti názvy!)

Mechanismus účinku, vylučování, toxicita – přehled

Působí na:	Peniciliny	baktericidní	vylučování převážně močí (u jednotlivých se může lišit)	Toxicita: nepatrná, zato mohou vyvolávat alergie
	Cefalosporiny			
buněčnou stěnu	Nové b-laktamy	bakteriostatické	vylučování převážně žlučí	značná - ušní, močová, popř. nervová
	Vankomycin			
	Aminoglykosidy			
	Tetracykliny			játra, trávení; !zuby!

syntézu proteinů	Makrolidy		vylučování převážně ledvinami	malá (játra, trávení)
	Linkosamidy			malá (trávicí obtíže)
	Chloramfenikol			!!krvětvorba, tráv., nerv.
nukleové kyseliny	Chinolony	baktericidní		malá, tráv., CNS. !věk!
cytop. membránu	Polymyxiny			velká: nervy, moč. syst.
metabolismus	Sulfonamidy	bakteriostatické		ledviny, GIT a jiné

Pojem MIC

U antimikrobiálních látek platí totéž, co u jiných chemických látek (a podobně i v případě fyzikálních charakteristik): pokud zvyšujeme koncentraci, dosáhneme hodnoty MIC - minimální inhibiční koncentrace. Jedná se o koncentraci, při které se bakterie přestanou množit. Jinak řečeno, je to bakteriostatická koncentrace (resp. fungistatická, virustatická).

Pokud koncentraci zvyšujeme dále, dostaneme se na hodnotu MBC - minimální baktericidní koncentrace. Při této koncentraci jsou bakterie (či analogicky jiné mikroby) usmrceny.

U primárně baktericidních antibiotik je MIC a MBC prakticky totožná, tj. téměř se nestává, že by bakterie nerostly, ale přitom nebyly usmrceny. Nopak u primárně bakteriostatických antibiotik je MBC velmi vysoká, mnohem vyšší než MIC. Pro praxi tedy u těchto antibiotik používáme koncentrací, které jsou jen bakteriostatické. Nevadí to, protože se zbylými mikroby si poradí organismus pacienta. Nesmí ale jít o těžký stav, poruchu imunity apod. – tam je nutno vždy používat antibiotika primárně baktericidní.

Při praktickém používání antibiotik je známo, že při určitém běžném dávkování se u pacienta vytvoří určitá koncentrace antibiotika. Jde o to, jestli tato koncentrace je alespoň inhibiční. Musíme tedy znát koncentraci antibiotika, které je při běžném dávkování dosaženo v krvi a ve tkáních (s určitou rezervou a zahrnutím individuálních rozdílů) – breakpoint. S ním porovnáváme zjištěnou hodnotu MIC. Pokud je breakpoint vyšší než MIC, plyne z toho, že breakpointová koncentrace je inhibiční a antibiotikum lze použít. Pokud je koncentrace dosahovaná v krvi nižší než MIC, říkáme, že antibiotikum je na danou látku rezistentní - dosahovaná koncentrace není inhibiční. Je-li rozdíl jen malý, dá se problém vyřešit zvýšeným dávkováním; je-li větší, je nutno použít jiné antibiotikum.

Koncentrace dosahovaná v krvi je ovšem určující jen pro některé infekce. U opouzdřených procesů (abscesů) nebo třeba meningitid je nutno počítat s tím, že do místa infekce pronikne méně antibiotika, než do krve. U močových infekcí nemá vůbec smysl brát v úvahu koncentraci antibiotika v krvi - místo toho se MIC porovnává s koncentrací antibiotika v moči.

Problémem také je, že mnohé bakterie žijí na sliznicích ve formě biofilmu. K rozbití biofilmu zpravidla nestačí MIC. Používá se pojem MBIC – minimální biofilm inhibující koncentrace a pojem MBEC – minimální biofilm eradikující koncentrace. V praxi se však MBEC a MBIC (alespoň zatím) nestanovuje, vzhledem k extrémní pracnosti a náročnosti metod, kterými by se to dalo provádět.

Typy rezistencí na antibiotika a jejich mechanismy

Primární a sekundární rezistence

Primární (konstituční) rezistence je společná vždy všem kmenům daného druhu. Je zpravidla dána tím, že stavba mikroorganismu vylučuje, aby na něj dané antibiotikum působilo. Například betalaktamová antibiotika, působící na buněčnou stěnu, nelze použít k léčbě infekcí způsobených mykoplazmaty, protože ta žádnou buněčnou stěnu nemají. Některá antibiotika účinkují jen na grampozitivní nebo naopak jen na gramnegativní bakterie apod.

Sekundární (získaná) rezistence se vyskytuje jen u některých kmenů. Z toho také plyne, že není předvídatelná a musíme ji zjišťovat u každého kmene zvlášť. Sekundární rezistence je umožněna mutacemi na bakteriálním chromosomu nebo plasmidu. Za normálních okolností by se mutace neuplatnila. Pokud ale používáme určité antibiotikum, stane se „umění být necitlivá“ pro bakterii výhodnou a taková bakterie logicky vyhrává v soutěži s ostatními. Nadměrným a zejména nesprávným používáním antibiotik tedy zvýhodňujeme (selektujeme) rezistentní kmeny bakterií. Proto je tak důležité používat antibiotika s rozvahou.

Příklady mechanismů rezistence

Znehodnocení antibiotika ještě než vnikne do buňky (rozštěpení důležité části molekuly, navázání bočního řetězce, který mění antibiotikum v neúčinný metabolit, apod.)

Nevpuštění antibiotika do buňky, například změnou cytoplasmatické membrány

Změnou cílového místa pro působení antibiotika

Betalaktamázy a jejich inhibitory

Asi nejznámějším i nejvýznamnějším příkladem faktoru rezistence jsou různé typy betalaktamáz – jsou to enzymy, které produkují nejružnější typy bakterií. Betalaktamázy štěpí betalaktamový kruh penicilinových, cefalosporinových a ostatních betalaktamových antibiotik – většinou ale jen některých z nich.

Pro překonání některých typů betalaktamáz se používají takzvané inhibitory betalaktamázy.

Inhibitor betalaktamázy je „falešné antibiotikum“ – málo účinná betalaktamová látka, která je však silně atraktivní pro betalaktamázy. Betalaktamáza se vysytí tím, že rozštěpí betalaktamový kruh inhibitoru, zatímco skutečné účinné antibiotikum zůstává nepoškozené a může působit.

Nejběžnějšími kombinacemi antibiotika + inhibitoru betalaktamázy jsou amoxicilin + kyselina klavulanová, ampicilin + sulbaktam, tikarcilin + kyselina klavulanová, cefoperazon + sulbaktam.

Některé významné typy polyrezistentních kmenů, způsobující často nemocniční infekce

MRSA – methicilin rezistentní stafylokoky. Kvůli změně cytoplasmatické membrány nepouštějí tyto bakterie do svých buněk oxacilin (či methicilin, používaný v některých zemích tak jako oxacilin u nás). Oxacilin je přitom klasické protistafylokokové antibiotikum. Mnohé MRSA jsou rezistentní také na další antibiotika (makrolidy, linkosamidy) a pak už k léčbě zůstávají prakticky jen velmi drahé a toxické glykopeptidy (vankomycin, teikoplanin). Ve světě se bohužel objevily i stafylokoky částečně nebo úplně rezistentní na glykopeptidy (VISA, VRSA).

VRE – vankomycin rezistentní enterokoky. Kmeny enterokoků, které jsou necitlivé na glykopeptidy a zpravidla nejsou citlivé ani na většinu ostatních antibiotik. Léčba je obtížná či nemožná.

Producenti ESBL – gramnegativní bakterie (enterobakterie a gramnegativní nefermentující bakterie), které produkují takzvané širokospektré betalaktamázy. Ani účinek inhibitorů na ně není dostatečný. I v tomto případě zůstává jen velmi omezená škála účinných léčiv. Navíc tyto kmeny často v rámci nemocničních infekcí postihují oslabené jedince, kteří mnohá antibiotika nemohou dostávat vzhledem ke své základní chorobě.

Má-li dívka absces kůže
či dokonce prsa
Oxacilin nepomůže
je-li vinen MRSA
Ten kdo si ho pustí k tělu
anebo i jiné
/: kupříkladu klebsiely
toho léčba mine

Tvoří si ty klebsiely
betalaktamázy
Na arzenál farmak celý
drže bobky hází

My se jich však nebojíme
z nemocnic je ženem
/: co na ně - to přece víme
čistota a penem! :/

Přesto jsou i těžké chvíle
kdy si stýská klinik
Píše recept na lentilky
navrhuje cynik
I když to dá mnoho práce
naději však máme
/: léky nové generace
zas je přečůráme :/

Zjišťování citlivosti na antimikrobiální látky in vitro

Metody zjišťování citlivosti

Zjišťovat citlivost in vitro je vhodné u většiny nálezů patogenních bakterií, pokud se dají kultivovat. Je sice třeba brát v úvahu, že laboratorní výsledky nemusí z různých důvodů stoprocentně souhlasit s výsledky u pacienta, ale přesto je testování in vitro zpravidla mnohem lepší, než nedělat nic.

Nejběžněji se používá difúzní diskový test, který se snadno provádí, ale je pouze kvalitativní a nehodí se pro kmeny od závažných pacientů. U těch se používají kvantitativní testy – E-test anebo mikrodiluční test.

Difúzní diskový test

Na Müller-Hintonův agar (nebo jiný agar) se štětičkou plošně naočkuje suspenze bakterie. Pak se nanáší tzv. antibiotické disky – papírky napuštěné antibiotikem. Pokud mikrob roste až k disku, je rezistentní (necitlivý). Pokud je kolem disku zóna citlivosti, v níž mikrob neroste, a je větší než předepsaná, je citlivý.

V principu jde o to, že antibiotikum difunduje (prostupuje) z disku agarem dál, přičemž jeho koncentrace klesá. Každé vzdálenosti od disku by bylo možno přiřadit určitou koncentraci. "Předepsaná zóna" je vlastně taková, kde koncentrace odpovídá danému breakpointu, tj. koncentraci antibiotika v krvi (viz výše).

(Pro jednoduchost zde mluvíme jen o bakteriích; u kvasinek se tento test dělá zřídka, u ostatních mikrobů vůbec.)

E-testy

Jsou to podobné testy, ale místo disku se použije proužek se stoupající koncentrací antibiotika od jednoho konce proužku ke druhému. Antibiotikum opět difunduje, ale zóna tu není kruhová, ale vejčitá. Na rozdíl od předchozího testu se E-testem dá určit MIC (minimální inhibiční koncentrace - tedy nejnižší koncentrace, která zastavuje růst mikroba). Odečítání je jednoduché - na papírku je stupnice, a MIC se odečítá v místě, kde okraj zóny kříží papírek.

Mikrodiluční test

Antibiotikum je v řadě důlků v plastové destičce v klesající koncentraci. Nejnižší koncentrace, která inhibuje růst, je MIC. Jedna destička se zpravidla použije pro jeden kmen - testování např. 12 antibiotik, každé v 8 různých koncentracích. Pokud například v koncentracích 0,25 - 0,5 - 1 - 2 je přítomen zákal a v koncentracích 4 - 8 - 16 - 32 (vše v mg/l) zákal není, říkáme, že koncentrace 4 mg/l a vyšší jsou inhibiční - tedy koncentrace 4 mg/l je minimální inhibiční koncentrace (MIC).

Pokud důlky bez zákalu (tj. s inhibicí) vyučkujeme do půdy bez antibiotika, můžeme pozorovat, jestli bakterie byly pouze inhibovány, nebo usmrceny. Tím zjistíme hodnotu MBC. Tento postup se ale v praxi používá výjimečně.

Mikrodiluční test se používá místo difusního diskového testu zejména u pacientů těžce nemocných, v ohrožení života.

Zjišťování faktorů rezistence

Ne vždycky stačí výše uvedené zjišťování citlivosti či rezistence na antibiotika. Někdy je lépe speciálními metodami zjišťovat přítomnost konkrétních faktorů rezistence, např. betalaktamáz. Může se jednat o diagnostické proužky (chemický průkaz daného enzymu) nebo testy na jiném principu (u širokospektrých betalaktamáz porovnání velikosti zóny inhibice u téhož antibiotika s inhibitorem a bez inhibitoru betalaktamázy)

Metody nepřímého průkazu (průkazu protilátek) a průkazu antigenu (serologické metody): J07 – J10

Tyto metody pracují s reakcí ANTIGEN - PROTILÁTKA (za vzniku komplexu). V užším slova smyslu se někdy za sérologické považují pouze ty reakce, kde se jako vzorek používá sérum, popřípadě reakce, kde se hledá protilátka.

Jednotlivé sérologické metody se od sebe liší pouze způsobem, jak je detekován komplex antigenu s protilátkou. Všechny se však dají použít ke všem účelům, dále uvedeným:

- **Průkaz antigenu pomocí protilátky** - použije se laboratorní protilátka (ze séra pokusného zvířete) a smíchá se
 - buďto se vzorkem pacienta, ve kterém hledáme antigen – jde o **přímý průkaz antigenu**
 - nebo s kmenem, vypěstovaným z pacientova vzorku – jde o **identifikaci, antigenní analýzu**
- **Průkaz protilátky pomocí antigenu** - použije se laboratorní antigen a smíchá se s pacientovým sérem

VE VŠECH PŘÍPADECH PLATÍ, ŽE:

- pokud vznikl komplex antigen-protilátka, je reakce pozitivní
- pokud komplex nevznikl, je reakce negativní, něco v ní chybí

Přehled sérologických metod

- Precipitace
- Aglutinace
- Komplementfixační reakce
- Neutralizace
- Reakce se značenými složkami:
 - Imunofluorescence (IMF)
 - Radioimunoanalýza (RIA)
 - Enzymová imunoanalýza (EIA, ELISA)
 - Imunobloty

Nespecifické antigeny a heterofilní protilátky. U většiny serologických reakcí se pracuje se specifickými antigeny - například s antigenem spalniček u protilátek proti spalničkám, se stafylokokovým antigenem u protilátek proti stafylokokům apod. Někdy je ale výhodné při nepřímém průkazu použít místo skutečného mikrobiálního antigenu nějakou levnější a bezpečnější látku, o které je známo, že je také schopna vázat příslušnou protilátku: používají se např. červené krvinky všelijakých zvířat při průkazu infakční mononukleózy (Paul-Bunnellova reakce). Hovoří se pak o nespecifickém antigenu.

Někdy se také prokazují protilátky, které nejsou namířeny přímo proti mikrobu, ale proti nějaké molekule, která se uvolňuje z tkání změněných infekcí. Takovou látkou může být například kardiolipin - extrakt z hovězích srdcí při průkazu syfilis. Protilátky, které se s takovým nemikrobiálním antigenem spojují, se označují jako heterofilní protilátky.

Jak zjistit u nepřímého průkazu, jestli se jedná o akutní infekci?

Zatímco přímý průkaz (včetně průkazu antigenu a antigenní analýzy!!!) vždy dokazuje přítomnost mikroba, u nepřímého průkazu tomu tak není. Přítomnost protilátek pouze svědčí o tom, že se

organismus někdy s mikroblem setkal. Přesto je možné aspoň s určitou pravděpodobností říci, jestli se o akutní infekci jedná, nebo jestli jsou protilátky nalezené v séru pacienta jen následkem infekce překonané dříve. Je potřeba využít některého z následujících tří způsobů:

- **Zištěujeme, jaké je množství protilátek v séru a jestli se mění.** Využívá se toho, že v akutní fázi infekce množství protilátek prudce stoupá, pak zase klesá, a nakonec se udržuje na stálé, nízké hladině. Je ovšem těžké zjistit množství protilátek v séru absolutně (v gramech, v molech). Logicky ale - pokud je v séru hodně protilátek, můžeme takové sérum mnohonásobně zředit a pořád ještě bude reagovat s antigenem. Pokud je protilátek málo, bude reagovat jenom neředěné či málo ředěné sérum. Proto se připravují různá ředění séra (většinou geometrickou řadou: 1 : 10, 1 : 20, 1 : 40, 1 : 80 atd.) a všechna se míchají s antigenem. Tím získáme číslo zvané **TITR, které udává, kolikrát se dá sérum zředit, aby ještě reagovalo s antigenem. Důležitý ale nebývá samotný titr, ale jeho změna během dvou či tří týdnů.** Pokud během se během této doby titr zvýší aspoň čtyřikrát (= o dvě ředění, například z 20 na 80), jde velmi pravděpodobně o akutní infekci. Pouhé dvojnásobné zvýšení (= o jedno ředění) může být náhodné. Zjišťování titrů se používá u precipitací, aglutinací, komplementfixací a neutralizací (tj. u „klasických“ serologických reakcí – blíže o nich v dalším textu).
- **Zištěujeme, k jaké třídě patří nalezené protilátky** - to ovšem umožňují pouze reakce se značenými složkami (ELISA, imunofluorescence, RIA – viz dále). Převaha IgM nad IgG svědčí pro akutní infekci
- **Zištěujeme tzv. aviditu**, to je síla vazby protilátky na antigen. Čerstvé protilátky (u akutní infekce) bývají nízkavidní. Tato metoda je poměrně nová a zatím se příliš nepoužívá.

Precipitace a aglutinace – J07

Precipitace a aglutinace jsou nejjednodušší metody, protože kromě antigenu a protilátky už v systému nemusí být nic jiného. Bývají ale méně přesné a dají se použít jen v některých případech. Komplex se projeví sám jako sraženina (precipitát nebo aglutinát).

Rozdíl mezi precipitací a aglutinací:

- u **precipitace** je antigen povahy koloidní (jako antigen vystupují jednotlivé makromolekuly)
- u **aglutinace** je povahy částicové - korpuskulární (jako antigen vystupují větší částičky, například celé bakterie).

Aglutinace na nosičích je zvláštní případ, vlastně precipitace převedená na aglutinaci. Používá se tam, kde máme koloidní antigen, ale potřebovali bychom korpuskulární. Řeší se to tak, že antigen navážeme na vhodnou částici. Jako částice se používají latexové částice - pak se jedná o latexaglutinaci nebo červené krvinky - pak se jedná o hemaglutinaci (např. TPHA na syfilis). Tento případ je potřeba odlišit od aglutinace s krvinkou coby nespecifickým antigenem (například Paul-Bunnellova reakce na infekční mononukleózu). U TPHA je krvinka pasivním nosičem antigenu, u Paul-Bunnellovy reakce je sama antigenem (i když nespecifickým).

Komplementfixační reakce – J08

Komplementfixační reakce je mnohem složitější než předchozí dvě. Používá se při ní komplement, což je **přirozená složka humorální nespecifické, ale vlastně i specifické imunitní reakci**. Každé sérum obsahuje komplement. Pro komplementfixační reakci se ovšem nedá použít vlastní komplement pacienta, protože jeho množství je nejisté. Proto se vlastní pacientův komplement před reakcí inaktivuje, a do reakce se přidává komplement morčecí.

V **první fázi** ke dvěma složkám (laboratorní antigen plus sérum od pacienta - nebo laboratorní protilátka plus vzorek, ve kterém předpokládáme antigen) přidáme komplement. Pokud je reakce pozitivní, komplement se naváže na komplex antigenu s protilátkou. Pokud je reakce negativní, komplement je volný. Na komplementu je zajímavé to, že se neváže ani na

samotnou protilátku, ani na samotný antigen - pouze na komplex, který z antigenu a protilátky vznikl. Právě proto se používá v rámci diagnostiky - pokud se komplement naváže, je jisté, že došlo ke vzniku komplexu. Problém je ale v tom, že navázání komplementu na komplex antigen-protilátka není samo o sobě vidět. Proto musí mít komplementfixační reakce ještě **druhou fázi**. Nyní přidáme do reakce tzv. indikátorový systém. Je to soustava známého antigenu (beraní erytrocyty) a známé protilátky (takzvaný amboceptor - králičí protilátky proti beraním erytrocytům). Tato soustava má jednu zajímavost: když se na ni naváže komplement, dojde k hemolýze erytrocytů. No a v tom je právě onen vtip: pokud se v první fázi všechen komplement vyvázal na soustavu antigen - protilátka, nezbyl žádný volný komplement a indikátorový systém zůstane nedotčen. Pokud ale byla reakce negativní, zůstal komplement volný, váže se na indikátorový systém a hemolyzuje ho. Znamená to, že hemolýza svědčí o negativitě reakce, nepřítomnost hemolýzy o pozitivitě.

V případě KFR mohou nastat dva problémy:

- 1) Máme příliš mnoho komplementu a ten se nestačí vysytit (falešně negativní reakce). Aby nedošlo k této chybě, je třeba komplement před testem vytitrovat.
- 2) V séru je složka, která sama o sobě inaktivuje komplement (složka zodpovědná za antikomplementaritu séra). Reakce v tomto případě může být falešně pozitivní. Kvůli této chybě se ke každému ředění sér provádí (obvykle v prvním sloupci destičky) test antikomplementarity. V případě průkazu protilátky test antikomplementarity předpokládá kompletně proběhlou reakci až na to, že se v úvodu „zapomene“ přidat antigen. Pokud i bez antigenu vyjde test „pozitivní“, je sérum antikomplementární a test je třeba zopakovat s novým vzorkem séra.

KFR je běžně používaná zejména ve virologii, případě též v diagnostice hub a parazitů, méně často i bakterií. Ve virologii je to jedna z nejběžnějších metod u většiny běžných virů. U virů se také používá i k průkazu antigenu, i když méně často než k průkazu protilátek.

Neutralizační reakce – J09

V případě virů, které jsou malé, protilátka kromě různých dalších mechanismů účinku působí i přímo – neutralizuje účinek viru na buňku nebo krvinku.

Virus má zásluku na nějakou buňku či krvinku, které by rád provedl nějakou neplech (u krvinky např. její shluknutí – aglutinaci, u tkáňové kultury cytopatický efekt), ale protilátka mu v tom zabrání.

Bakterie jsou příliš velké na to, aby je mohla protilátka přímo inaktivovat. Co však protilátka nezumže s bakteriemi, zmumže s jejich toxiny. Proto se neutralizační v bakteriologii zpravidla používají tak, že protilátka neutralizuje účinek bakteriálního toxinu. Výjimkou mumže být např. neutralizace pohyblivosti bakterie (u jedné ze starších diagnostických reakcí u syfilis).

Antigenem v neutralizační reakci je tedy zpravidla virus nebo bakteriální toxin.

Některé příklady:

- **ASLO - antistreptolysin O**. Prokazujeme protilátku proti streptokokovému toxinu. V tomto výjimečném případě nám nejde ani tak o toxin, ale o protilátku jako takovou - ona totiž často nespecificky reaguje s endokardem či ledvinnými glomeruly, vedouc tak k revmatické horečce či glomerulonefritidě. Antistreptolysin O neutralizuje lýzu červených krvinek, kterou by normálně provedl streptolysin O: to znamená, že v případě positivity (protilátka JE přítomna) nedojde k hemolýze (krvinky sedimentují na dno dmulku), v případě negativity (protilátka NENÍ přítomna) k hemolýze dojde.
- **Hemaglutinačně inhibiční test (HIT)** se používá ve virologii. Jde o to, že řada virů je schopna in vitro shlukovat červené krvinky. Je-li však v reakci přítomna specifická protilátka, je mu v tom schopna zabránit. Pozitivní reakce je tedy taková, kde NEDOJDE ke shlukování krvinek (krvinky klesají na dno dmulku, sedimentujíce).
- **Virusneutralizační test (VNT)** je velice podobný. Virus pěstujeme na tkáňové kultuře na dně dmulku mikrotitrační destičky. Virus způsobuje cytopatický efekt (CPE), který se

projevuje i změnou metabolismu → za použití vhodného indikátoru změnou barvy. I tady může protilátka viru v efektu zabránit.

Pro jednoduchost jsme v předchozím textu hovořili o průkazu protilátek. Bystří studenti jistě vymyslí, jak by bylo třeba reakce uspořádat, aby neznámé virové agens či pacientův vzorek byl míchán s různými známými specifickými protilátkami tak, aby reakce sloužila k průkazu antigenu.

Reakce se značenými složkami – J10

Principem těchto reakcí je nepřerušovaný řetězec, jehož články jsou antigeny a protilátky; ne vždy je to jen jeden antigen a jedna protilátka. Řetězec začíná nějakým pevným povrchem (sklíčko, dno důlku) na který se naváže některá složka reakce, a končí – v pozitivním případě – nějakým "značidlem", které pak může být detekováno. Poslední složka, na kterou je "značidlo" navázáno (nakonjugováno – bývá to obvykle protilátka), se zpravidla označuje jako **konjugát**. V případě negativním jeden článek řetězku chybí, a proto všechny další, nejsou pevně svázány s povrchem, mohou být – a také jsou – vyplaveny při takzvaném "promývání". Promývání se dělá po každém novém kroku. Tímto způsobem nakonec skončí ve výlevce i to "značidlo". Jako „značidla“ se používají:

- Fluorescenční barvivo. V takovém případě je povrchem zpravidla podložní sklíčko a výsledný efekt je detekován prostřednictvím fluorescenčního mikroskopu. Výhodou je, že vidíme např. tvar bakterie. Hovoříme o imunofluorescenci.
- Radioizotop. V tom případě se efekt pozoruje pomocí vhodného přístroje k detekci radioaktivity. Metoda je náročná, vyžaduje laboratoř vybavenou pro práci s radioaktivním materiálem. Používá se dnes poměrně málo. Metoda se nazývá radioimunoassay či radioimunoesej, zkráceně RIA
- Enzym. V tom případě musí následovat ještě další fáze, ve které se přidá substrát reakce. Pokud je "značidlo" v podobě enzymu přítomno, dojde k rozštěpení substrátu na produkt, který se buďto liší barvou, nebo jej lze identifikovat s využitím indikátoru. Povrchem tu bývá dno důlku v panelu a celá reakce se dá snadno automatizovat: čím silněji reakce proběhla, tím intenzivnější je barevná změna, a tato intenzita barevné změny je měřitelná jako absorbance ve spektrofotometru. Nejběžnější variantou této reakce je reakce ELISA – je to zkratka a znamená enzym linked immunosorbent assay. ELISy se postupně staly standardními vyšetřovacími metodami u velkého množství mikrobů, nahradily starší a méně přesné metody.

Imunoblotty jsou vlastně speciálním případem reakce ELISA. Od klasické ELISy se výrazně liší metodou přípravy antigenu.

U klasické ELISy se prostě použije celý mikrob, a s ním pak mají možnost reagovat všechny protilátky, které jsou kompatibilní s kterýmkoliv z antigenů, který se na povrchu mikroba nalézá. Takových antigenů tam může být mnoho.

Někdy je ale výhodné pracovat se skutečnými jednotlivými antigeny. Je to především tehdy, kdy máme několik příbuzných mikrobů, které mají některé antigeny shodné a jiné odlišné.

Imunoblotová technika nám umožní antigeny navzájem oddělit a dopídit se zjištění, který z nich vlastně reagoval.

Antigeny jsou uvolněny z povrchu mikroba, rozděleny elektroforézou podle své hmotnosti a pak, opět elektroforeticky, přeneseny na speciální fólii. V tu chvíli pak začnou fungovat jako "běžný" antigen v reakci ELISA, dále už je to tedy všechno stejné.

Metoda se používá například u borrelií – existuje jich několik druhů, které jsou antigenně příbuzné, ale ne totožné.

Automatizace u serologických metod. Velkou výhodou zejména moderních metod, jako jsou ELISy a Western bloty, je možnost automatizace. Dnes již existují automaty, které jsou schopny celou reakci provést samy – hlídají potřebné časy reakcí, přidávají činidla, promývají apod.

Takto funguje např. přístroj "Elisamat", kterému se na mikrobiologii u sv. Anny začalo říkat

"Kryštofek", protože jedna jeho část je od firmy Columbus. Ze začátku s ním byly jisté problémy, např. do reakce omylem přidal etanol namísto kyseliny sírové. Toto dokumentuje následující píseň s názvem "Kryštofek".

1. Ten den všechno chystalo se na velikou slávu
jako kdyby měli přivést posvátnou nám krávu
Chyběly jen prapory a duo Lábus - Kaiser
když měl přijít na serolku slavný minilyzer
Škatulata hejbala se v nebyvalé míře
neboť místo dělalo se pro posvátné zvíře
Od těch dob co dorazilo to památné ráno
Všichni se s ním spřátelili, Kryštofek je zváno.

**R. Kryštofek nám denně mění všední chvíle v svátky
neobjeví Ameriku, zato protilátky.**

**/:Bez Kryštofa byli bychom ubožáci málem
Kryštofek je našim velkým elisovým králem!:/**

2. Bohužel se naše zvíře z kovu skla a plastu
oddávati začalo nám z ničeho nic chlastu.

Zkrátka místo vitriolu líh mu lépe chutná
Serolka i virolka je z toho celá smutná.

Kryštofek je náročný a ošidit se nedá
a ta jeho obsluha je učiněná věda

Ti co máme rodiny to celkem dobře chápem

S Kryštofem je stejná práce jak má žena s chlapem **Refrén**

Molekulárně biologické metody v mikrobiologii – téma J11

Jde o metody, které v klinické mikrobiologii nejsou samospasitelné, ale ani neužitečné; hodí se k využití v kontextu ostatních metod. Chybou je tedy jak je zavrhnout, tak i „zbožšřovat“.

Průkaz nukleové kyseliny (NA) je moderní metoda přímého průkazu, která umožňuje identifikovat i malá množství mikrobů, mikroby usmrčené, nebo dokonce mikroby, u kterých se nezachovala kompletní buňka či virová částice. Někdy je ovšem tento zvýšený záchyt spíše na škodu. Navíc je to metoda pořád ještě hodně drahá a náročná. Používá se proto jen u mikrobů, u kterých klasické metody nelze použít, nebo jsou příliš pomalé.

Průkaz NA (většinou průkaz DNA, u virů občas i RNA) se dělí na

metody bez amplifikace (klasické genové sondy) a

metody s amplifikací (namnožením) určité sekvence nukleové kyseliny.

Nejpoužívanější je dnes POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE (PCR), která patří do druhé skupiny.

Vedle ní se občas používá ještě ligázová řetězová reakce (LCR)

PCR se skládá ze tří fází:

- Rozbití vzorku a izolace DNA ze vzorku
- Vlastní amplifikace
- Detekce produktu elektroforézou nebo reakcí ELISA (nejde o serologickou ELISA reakci)

Podrobnější popis zde neuvádíme, neboť metoda se široce využívá i mimo mikrobiologii a je náplní učiva jiných předmětů, zejména biologie.

Problémem je, že vzorek může někdy obsahovat látku inhibující reakci.

Prevenčí je nepoužívat pro PCR transportní půdy (je to jeden s výjimečných případů, kdy není doporučena souprava s transportní půdou), vyhýbat se talkovaným rukavicím apod. (výčet všeho inhibujícího je mimo možnosti autora i mimo potřeby tohoto textu). Pro ověření, zda

nedošlo k inhibici, se používá interní kontrola – IC. Ta je detekována reakcí ELISA či imunofluorescencí zejména v případě, že vlastní reakce je negativní. IC je genetický materiál, který má delší řetězec nukleové kyseliny než produkt, o který nám jde – v kompetici by měl mít reálný produkt přednost před IC. Způsob interpretace v případě elektroforézy ukazuje obrázek, podobně je tomu i v případě reakce ELISA.

—	—	—	—	IC
—	—	—	—	
—	—	—	—	produkt
—	—	—	—	
M	1	2	3	4

M - měřítko (ladder)
1 - silně pozitivní výsledek
 (produkt amplifikován, na IC nezbyl materiál)
2 - pozitivní výsledek
 (produkt i IC amplifikován)
3 - negativní výsledek (produkt není amplifikován, zato IC ano)
4 - inhibice reakce (není amplifikován ani produkt, ani IC)

Virologická diagnostika (témata J12 + J13)

Diagnostika virů

Zapamatujte si:

- 1) Viry se vůbec nedagnostikují tak běžně jako bakterie. Má to několik příčin:
 - a) mnohé virové nemoci jsou viditelné na pacientovi pouhým okem (spalničky, neštovice)
 - b) další se léčí symptomaticky (např. respirační nebo střevní virosy) a jejich léčba tedy nevyžaduje znalost agens
 - c) i případná znalost agens zpravidla nemění nic na tom, že kauzální antivirotická léčba se používá výjimečně i prozatím nikdy podle in vitro vyšetření citlivosti (metodiky tohoto typu jsou teprve ve vývoji)
- 2) Pokud už diagnostikujeme viry, používáme zpravidla nepřímý průkaz
- 3) Pokud už používáme přímý průkaz, je to častěji průkaz antigenu než mikroskopie a kultivace

Přehled diagnostiky virů

I. Přímá.

A. Mikroskopie

- a) Elektronová (hrubé zařazení viru podle jeho tvaru)
- b) optická celých virů - pouze poxviry (velké - 300 nm)
- c) optická buněčných inkluzí (vzteklina...)
- d) optická - sledování CPE - viz kultivace

B. Kultivace (u virů se spíše hovoří o izolaci)

- a) Živé organismy (myši, myšata, bavlíková krysa)
- b) Vejce:
 - ba) Amniový vak (obklopuje zárodek)
 - bb) Žloutkový vak (vyživuje zárodek; největší je u mladých zárodků)
 - bc) Allantois (odpadní vak; největší u nejstarších zárodků)
 - bd) Chorionallantoidní membrána (jediný případ, kdy můžeme vidět výsledek – POKY)
- c) Tkáňové kultury (TK) - obvykle jsou to buněčné kultury z nádorů nebo z embryonálních buněk, protože ty mají "zakázané" stárnutí a mohou se tedy množit skoro neomezeně
 - ca) zvířecího původu
 - cb) lidského původu (například HeLa buňky)

U kultivace mnohdy není viděte pouhým okem výsledek. Vedle poků je druhou výjimkou cytopatický efekt u TK, ten se však zdaleka netýká všech případů izolace viru na TK. Obvykle je tedy nutné pokračování další metodou – například prokázat schopnost viru shlukovat krvinky (Hirstův test) nebo průkazem virového antigenu.

C. Průkaz antigenu (zpravidla ELISA, přímá KFR apod.) je Jedná se o tytéž metody jako u nepřímé diagnostiky (například u žloutenky B se dá provést ELISA k důkazu HBsAg i k důkazu anti-HBs).

D. Průkaz nukleové kyseliny (zpravidla PCR)

II. Nepřímá:

Aglutinace a precipitace se u virů používají málo.

KFR - ve virologii velmi důležitá

Neutralizace – hojně používána, zejména ve formě HIT a VNT – viz sérologické reakce/neutralizace.

ELISA včetně Western blottů (např. hepatitidy). V poslední době má u mnohých virů velký význam.

KONEC