

Lékařská mikrobiologie pro ZDRL

Týden 7:

A. Antibiotika III (dokončení)

B. Pokus na zvířeti

**C. Genetické metody v
mikrobiologii**

Upraveno podle
Ondřeje Zahradníčka



Co nás dnes čeká

- Z antibiotik už jsme si probrali
 - přehled antibiotik a jiných antimikrobiálních látek
 - povídání o mikrobiálních rezistencích a polyrezistentních kmenech
 - povídání o tzv. antibiotické politice
- Na dnešek nám zbylo **testování citlivosti bakterií**
- V další části přednášky si pak něco povíme o **pokusu na zvířeti v mikrobiologii**
- A v ještě další části pak něco o **využití genetických metod (hlavně PCR)**

A. Zjišťování sekundárních rezistencí in vitro (v laboratoři): Postavení v systému metod

• CÍL 1: ODHALIT PATOGENA

– Přímé metody (mikrob – část – produkt):

- Mikroskopie – průkaz ve vzorku i id.
- Kultivace – průkaz ve vzorku i identifikace
- Biochemická identifikace – jen identifikace!
- Průkaz antigenu – průkaz ve vzorku i id.
- Průkaz nukleové kyseliny – zpravidla jen průkaz ve vzorku
- Pokus na zvířeti – zpravidla průkaz ve vzorku

– Nepřímé metody (protilátky)

• CÍL 2: ZJISTIT CITLIVOST/REZISTENCI PATOGENA NA ANTIMIKROBIÁLNÍ LÁTKY 3

U kterých mikrobů se provádí?

- **U virů** se zatím neprovádí, i když u některých se léčí antivirotiky. Testování citlivosti na antivirotika je zatím v experimentální fázi.
- **U bakterií** se provádí nejběžněji, i když jen u těch, které lze kultivovat (potřebujeme KMEN)
- **Z hub** se provádí jen u kvasinek, u vláknitých hub testovat citlivost na antimykotika nelze
- **U parazitů** se citlivost na antiparazitární látky netestuje (*přestože rezistence někdy také existují, například na antimalarika – zde se ale spoléhá na informace o citlivosti/rezistenci kmenů v určité geografické oblasti*)

Metody zjišťování citlivosti in vitro

- Zjišťování citlivosti ***in vitro*** = **v laboratoři**
- Nezaručí stoprocentní účinnost léčby
- Přesto **vhodné u většiny nálezů** kultivovatelných patogenních bakterií
 - V běžných případech **kvalitativní** testy (citlivý – rezistentní)
 - U závažných pacientů **kvantitativní** (zjišťujeme MIC)

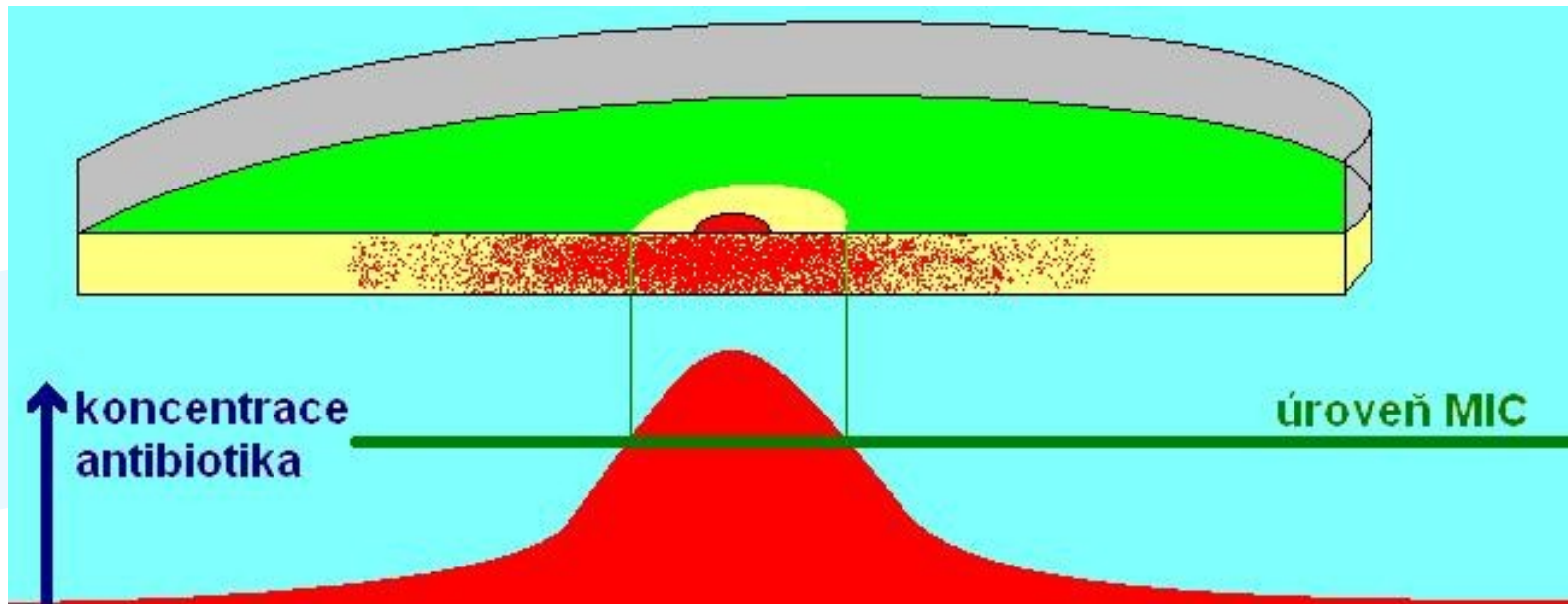
Příklady problémů při určování citlivosti

- **U infekce močového měchýře** je především důležité, jakou koncentraci má antibiotikum v moči, nikoli ve tkáni. Některá antibiotika mohou vyjít jako citlivá, ale nemusí zabrat. Používají se zato speciální antibiotika (nitrofurantoin)
- **U abscesů, infekcí kostí a zejména u meningitid** musíme počítat s tím, že mikroby dovnitř procesu špatně pronikají. Nutná je znalost průniku jednotlivých antibiotik do jednotlivých tkání.
- U mikrobů ve formě **biofilmu** také nemusí antibiotikum zapůsobit, ačkoli je in vitro dostatečně citlivé

Difúzní diskový test

- Na MH (nebo jiný) agar se štětičkou **plošně naočkuje suspenze bakterie**, nebo se suspenze na misku přelije a pak zase odlije
- Pak se nanášejí tzv. **antibiotické disky** – papírky napuštěné antibiotikem
- **Atb difunduje** (prostupuje) z disku agarem
- **Koncentrace antibiotika klesá** se vzdáleností od disku
- Pokud mikrob roste až k disku, nebo má jen malou zónu, je **rezistentní** (necitlivý)
- Je-li kolem disku dost velká zóna citlivosti (větší než stanovená hranice), je **citlivý**.

Difúzní diskový test – 1

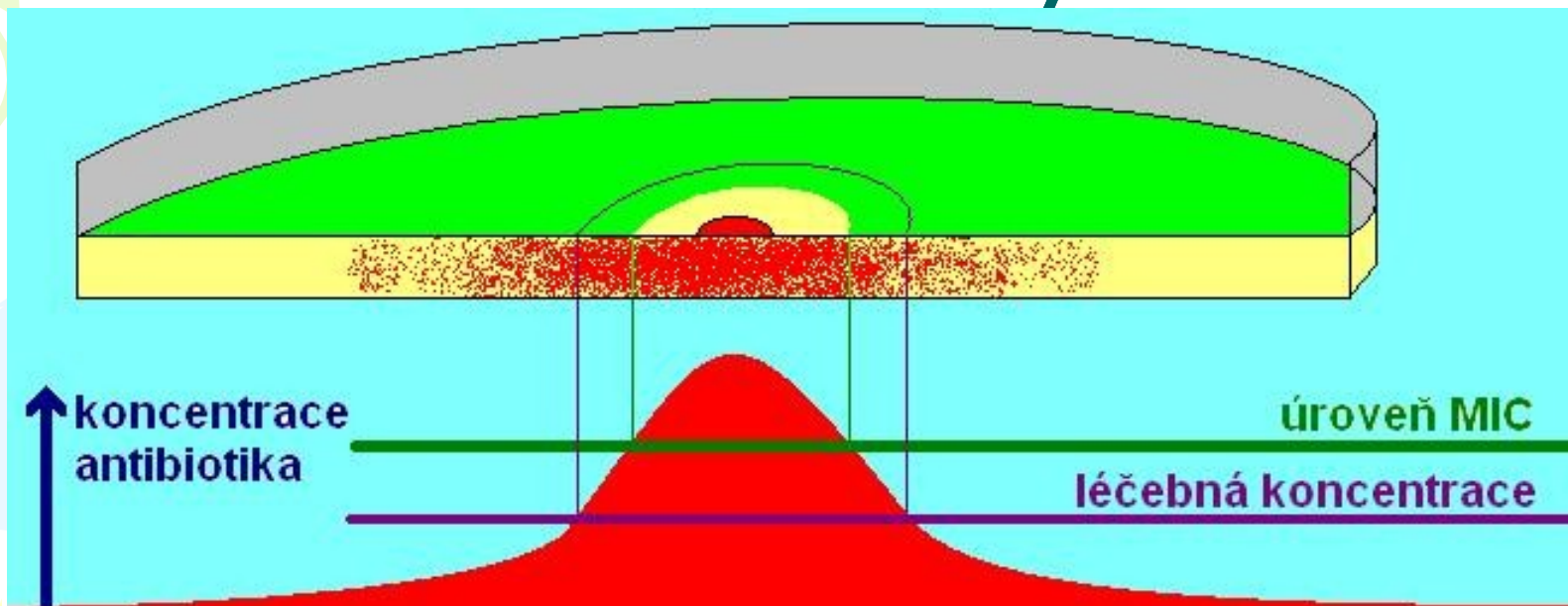


- Antibiotikum difunduje z disku, který je jím napuštěn, agarem. Čím dále od disku, tím je menší koncentrace antibiotika. V určitém bodě antibiotikum přestává být schopno inhibovat růst dané bakterie. (= koncentrace už je nižší než minimální inhibiční koncentrace – MIC)

Referenční mez

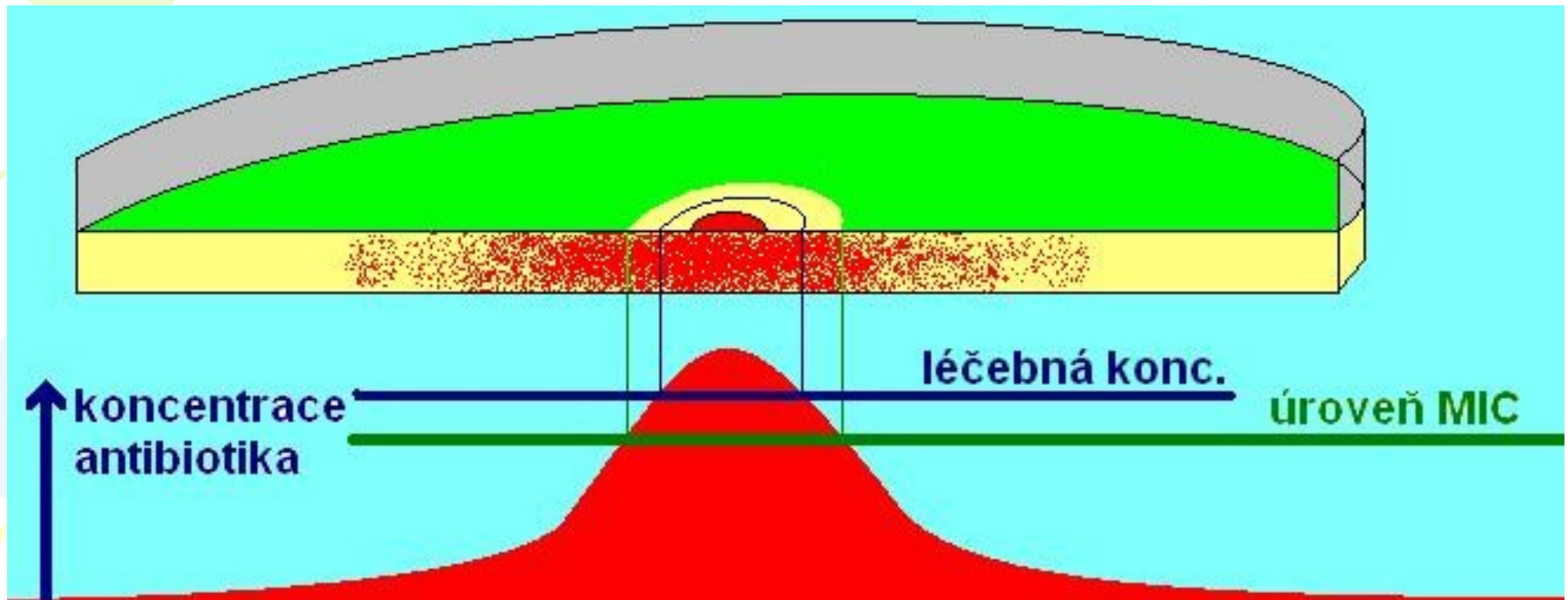
- Pro každé antibiotikum (respektive kombinaci antibiotikum-mikrob) je stanovena **hranice** (průměr zóny), které musí naměřená zóna dosahovat, aby kmen mohl být hodnocen jako citlivý
- Pro zjednodušení si můžeme představit, že hranice odpovídá **koncentraci, která se při léčbě ustálí v séru pacienta** („léčebná koncentrace“). Reálně se ale v praxi tato hranice určuje mnohem složitějším způsobem.

Difúzní diskový test – 2



- **Možnost A:** Hraniční („léčebná“) koncentrace neinhibuje růst mikrobů (je nižší než MIC). Růst mikrobů by inhibovala až vyšší koncentrace. Naměřená zóna je menší než hraniční. **Mikrob je na dané antibiotikum₁₀ rezistentní.**

Difúzní diskový test – 3



- **Možnost B:** Hraniční („léčebná“) koncentrace inhibuje růst mikrobů (je vyšší než MIC). Naměřená zóna je větší než hraniční. **Mikrob je na dané antibiotikum citlivý.**

Pamatujte si:

- V praxi sice porovnáváme zóny (měříme zónu v milimetrech a porovnáváme s hodnotou referenční zóny), ale nepřímou vlastně porovnáváme koncentrace: **MIC versus hraniční koncentrace**
- **Test je ovšem natolik nepřesný, že nelze jednoduše převést velikost zóny na MIC, chyba by byla příliš velká a nepřijatelná**

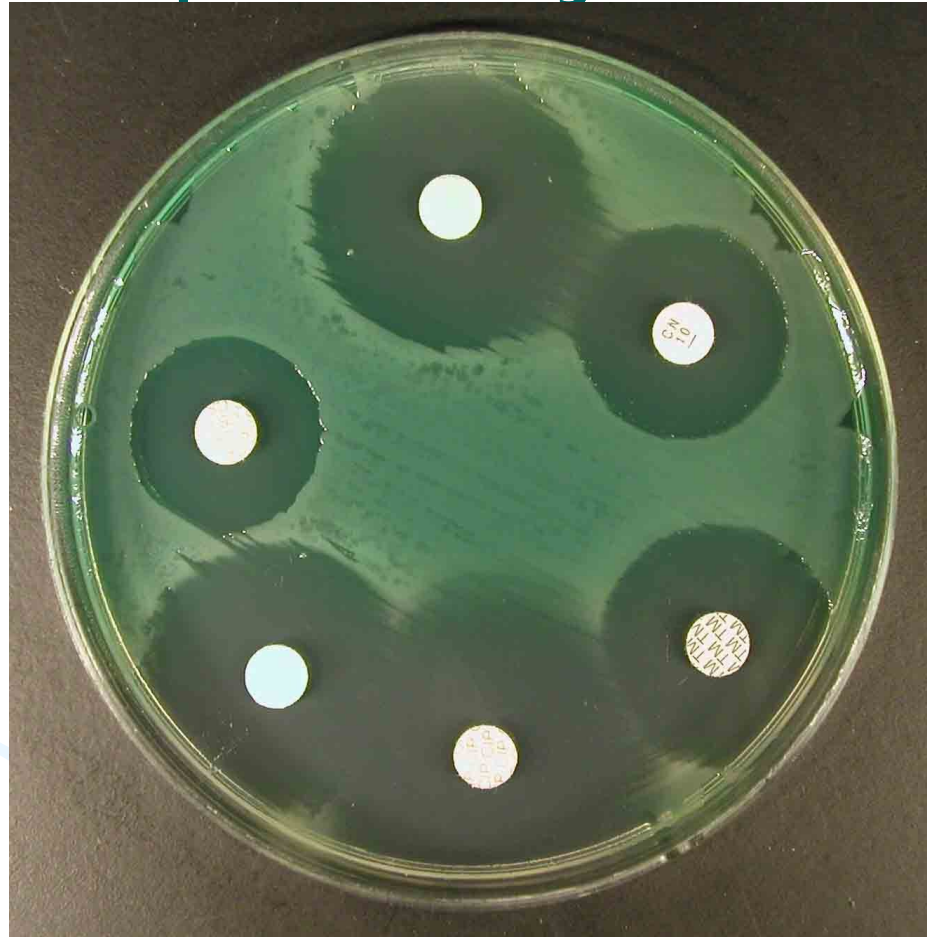
Difusní diskový test po lopatě

1

2

- **1 Bakterie se bojí antibiotika.** Velká zóna – někdy dokonce tak velká, že se ani nedá změřit.
- **2 Bakterie se nebojí antibiotika, jsou na ně rezistentní.** Malá či vůbec žádná zóna kolem atb disku.

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

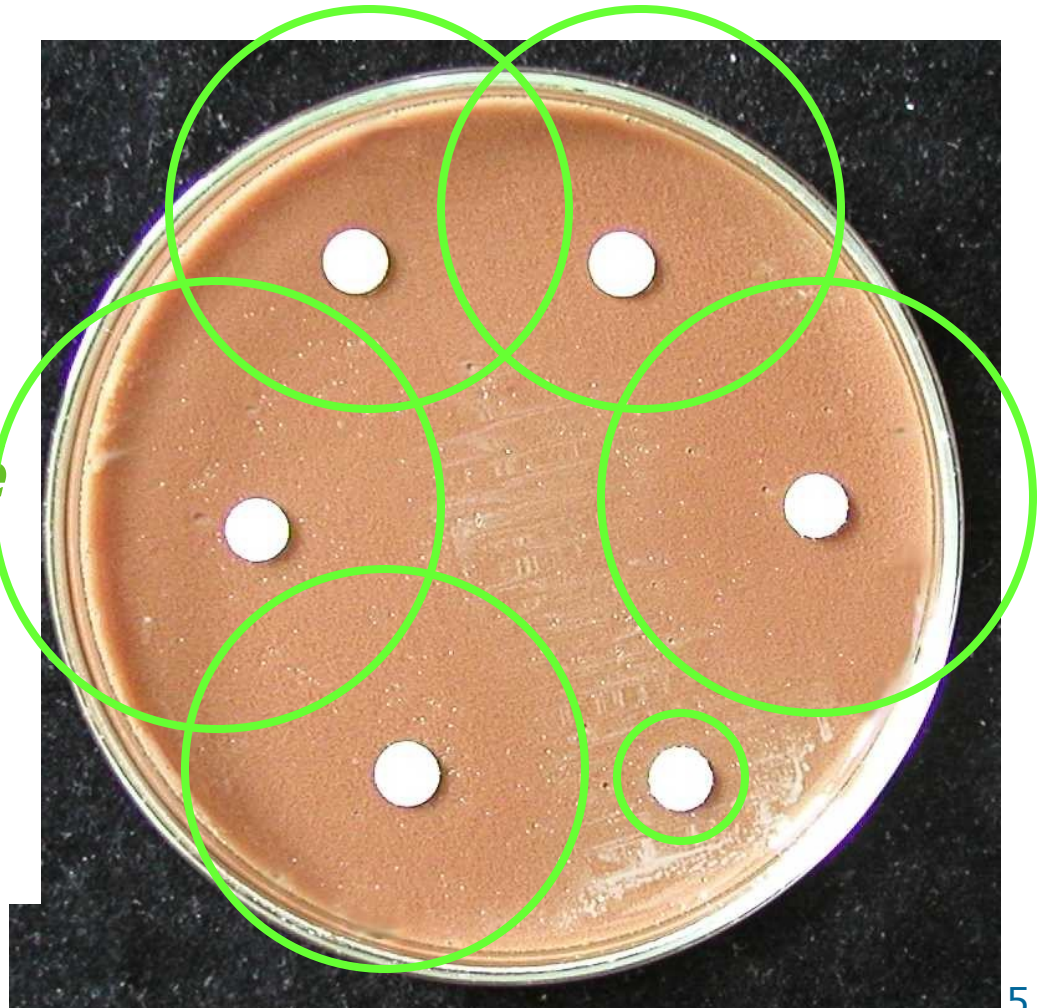


www.medmicro.info

Někdy jsou příliš velké zóny

Jsou-li zóny tak velké, že se nedají změřit, tak je neměříme a prostě rovnou napíšeme, že kmen je na dané antibiotikum citlivý.

Zeleně jsou vyznačeny teoretické okraje zón – všimněte si, že z naprosté většiny buď splývají, nebo jsou mimo misku



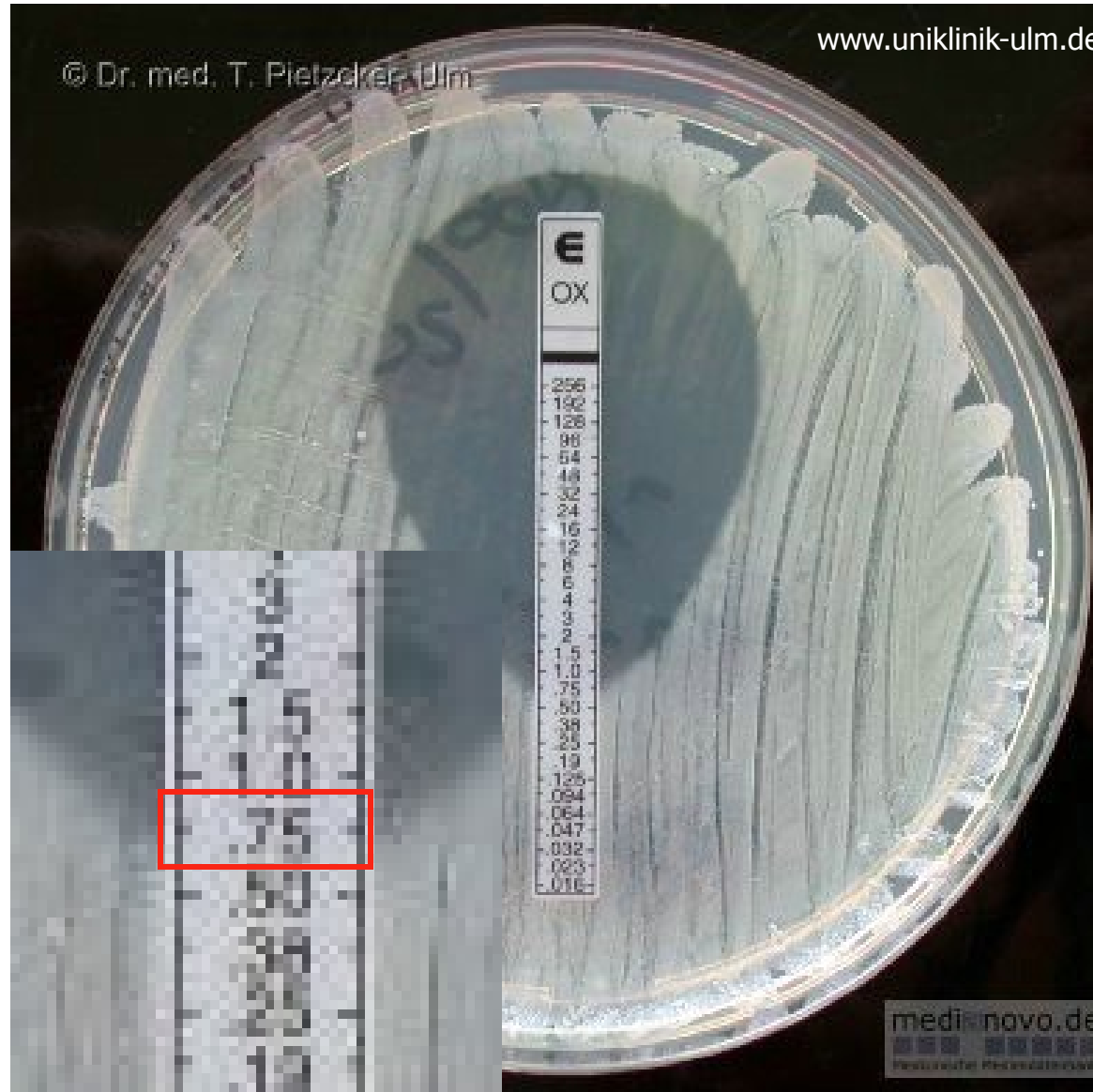
E-testy

- **Podobné** difúznímu diskovému testu
- Místo disku se však použije proužek
- V proužku **stoupající koncentrace atb** od jednoho konce ke druhému (speciální technologie, proto taky je to drahé jak prase).
- Zóna **není kruhová, ale vejčitá.**
- Test je **kvantitativní**
- Na papírku je **stupnice** →
→ jednoduché odečítání



E-testy – vyhodnocení

Hodnota MIC se odečítá přímo na proužku – v místě, kde okraj zóny protíná daný proužek





Co s naměřenou hodnotou MIC

- Naměřenou hodnotu MIC opět porovnáváme s referenční hodnotou – tentokrát ovšem nejde o zónu měřenou v milimetrech, ale o koncentraci
- Referenční koncentraci říkáme **breakpoint**. I tady platí, že pro zjednodušení (pro pochopení) můžeme vnímat breakpoint jako koncentraci dosahovanou při léčbě, ve skutečnosti to ale velmi často neplatí.



Hodnoty breakpointů

- udává Evropská komise pro testování antimikrobiální citlivosti (EUCAST)
 - Případně Ústav pro klinické a laboratorní standardy (CLSI)
- 
- 

Někde používají speciální velké misky

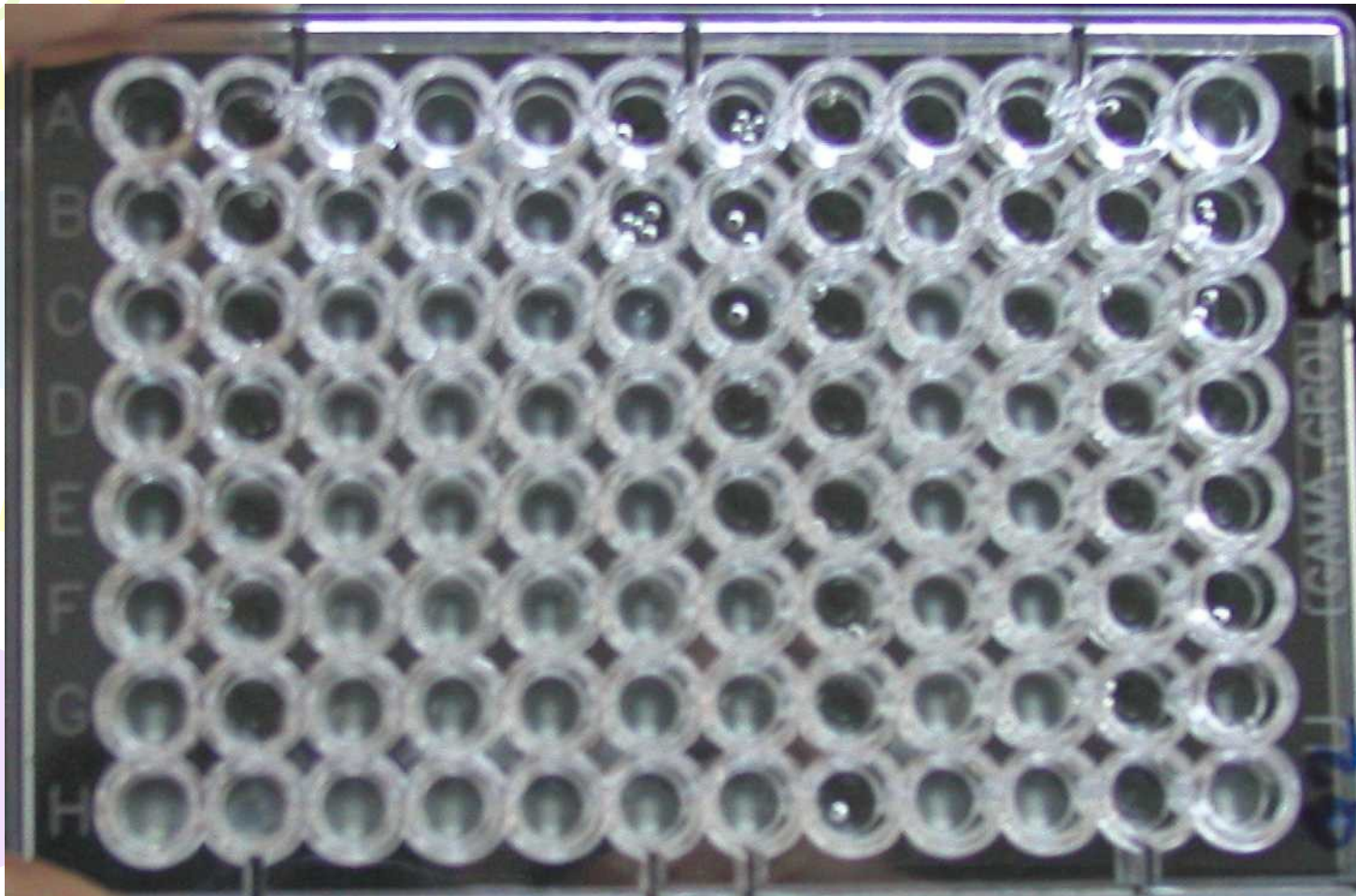
www.unifesp.b



Mikrodiluční test

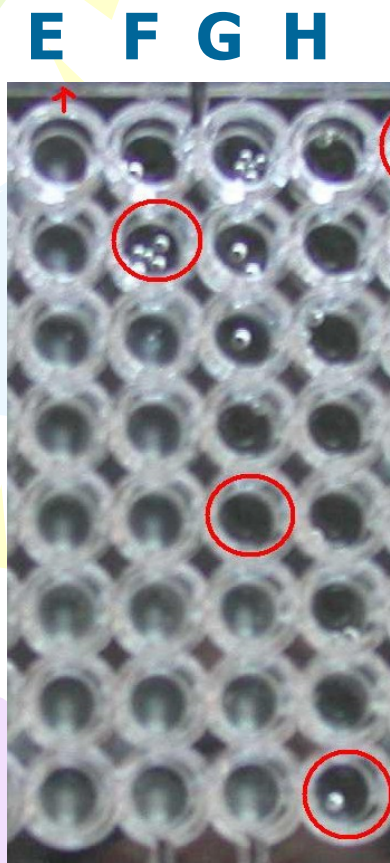
- Antibiotikum je v **řadě důlků** v plastové destičce, koncentrace postupně klesá
- **Nejnižší koncentrace, která inhibuje růst**, představuje hodnotu **MIC**
- V přiložené šabloně je zpravidla označen **breakpoint**. Je-li MIC nižší než breakpoint, je kmen citlivý. Je-li MIC vyšší, je rezistentní
- Jedna destička se zpravidla použije pro jeden kmen, např. **12 antibiotik**, každé v 8 různých koncentracích (*přesněji: dvanácté jen v sedmi, rohový důlek vpravo nahoře je kontrola růstů*)

Mikrodiluční test – ukázka



Příklad odečítání

V modrých obdélníčcích jsou breakpointy (ty jsou dané, neměří se)



E↑	F	G	H
32	64	128	64
16	32	64	32
8	16	32	16
4	8	16	8
2	4	8	4
1	2	4	2
0,5	1	2	1
0,25	0,5	1	0,5

- E: MIC > 32, breakpoint = 16, závěr: rezistentní
- F: MIC = 32, breakpoint = 16, závěr: rezistentní
- G: MIC = 8, breakpoint = 32, závěr: citlivý
- H: MIC ≤ 0,5, breakpoint = 8, závěr: citlivý

V červených kolečkách jsou naměřené hodnoty MIC

Interpretace stanovení MIC

- Zpravidla se pouze **porovná MIC a brakpoint, a dle toho se výsledek vyhodnotí jako citlivý/rezistentní**
- Pokud je výsledek rezistentní jen těsně, lze v některých případech antibiotikum použít při zvýšení koncentrace. Týká se to ale jen některých typů rezistencí a případů, kdy nelze použít jiné antibiotikum, dělá se to jen po konzultaci antibiotického střediska.

Bakterie v biofilmu

Jak už bylo řečeno, v případě biofilmu bakterie vzdorují i antibiotikům, na která jsou in vitro citlivá. Existují snahy tento problém překonat. Experimentálně se používá měření **MBEC** (minimální biofilm eradikující koncentrace).

Při měření MBEC se snažíme antibiotikem v různých koncentracích **zlikvidovat biofilm vytvořený na stěně plastového důlku**. Poté prokazujeme růst mikrobů například pH indikátorem²⁵



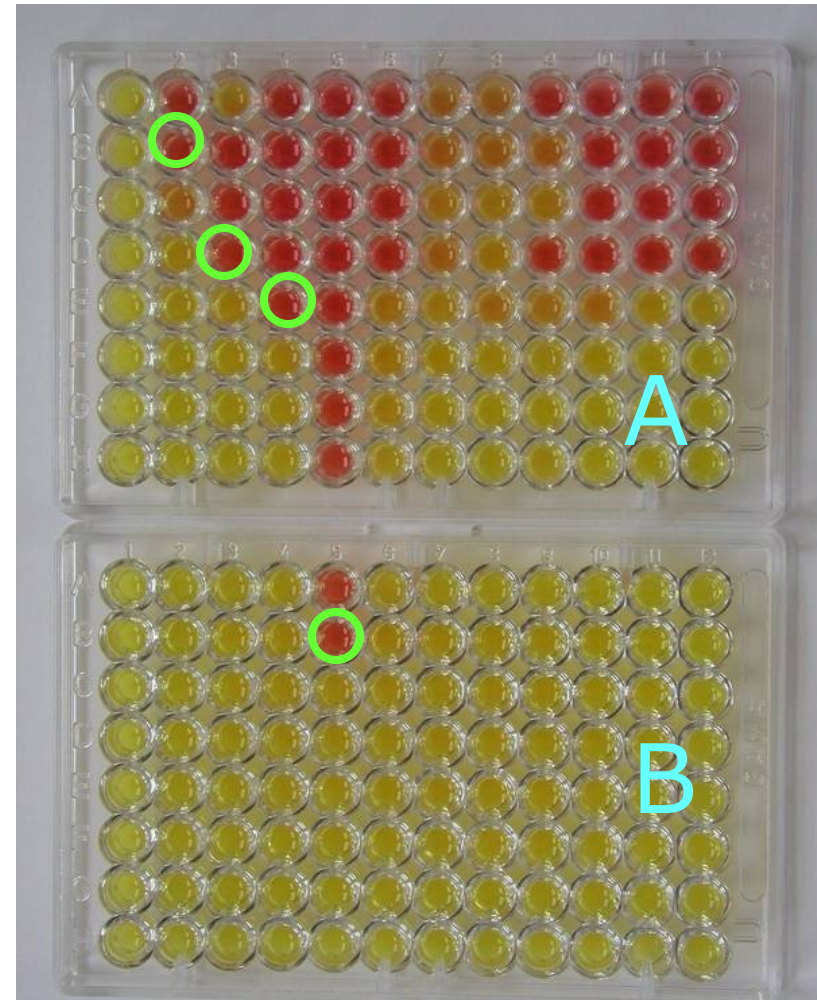
Problémy

Hodnoty MBEC jsou často mnohem vyšší než MIC. Při použití destičky s koncentracemi pro MIC se může stát, že naměříme jen výjimečně nějakou hodnotu (vše ostatní bude „vyšší než“)

Používáme proto často **dvojici destiček**, kterou si ovšem můžeme představit jako jednu destičku, kde je každé antibiotikum v šestnácti různých koncentracích (místo osmi)

Jak se odečítá MBEC

Zelené kroužky označují důlky s hodnotami MBEC pro atb ve druhém až pátém sloupci. Pro antibiotikum v prvním sloupci nelze hodnotu MBEC určit i přesto, že jsme použili dvě destičky, pořád je ještě příliš vysoká (vyšší než sledované)



Zjišťování faktorů rezistence

- 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**.
- Používá se
 - tam, kde **testy citlivosti nedávají spolehlivé výsledky** (z různých důvodů, např. nepůsobí testovaná látka přímo, ale jeho metabolit, a podobně)
 - tam, kde **chceme prokázat konkrétní faktor rezistence**, protože jde například o závažný faktor, šířící se mezi pacienty

Testování kmenů na produkci běžných betalaktamáz

- Používá se tam, kde **výsledek difusního diskového testu**, popř. ani mikrodilučního testu **není spolehlivý**
- Zejména se to týká
 - neisserií (penicilin)
 - *Moraxella catarrhalis* (ampicilin)
 - *Haemophilus influenzae* (ampicilin)
- Provedení testu je buď stejné jako u stripových biochemických identifikačních testů (oxidázový test), nebo jako např. u enterotestu

Betalaktamázový test ve formě diagnostického proužku (stripu)



Tentýž test ve formě důlků v mikrotitrační destičce

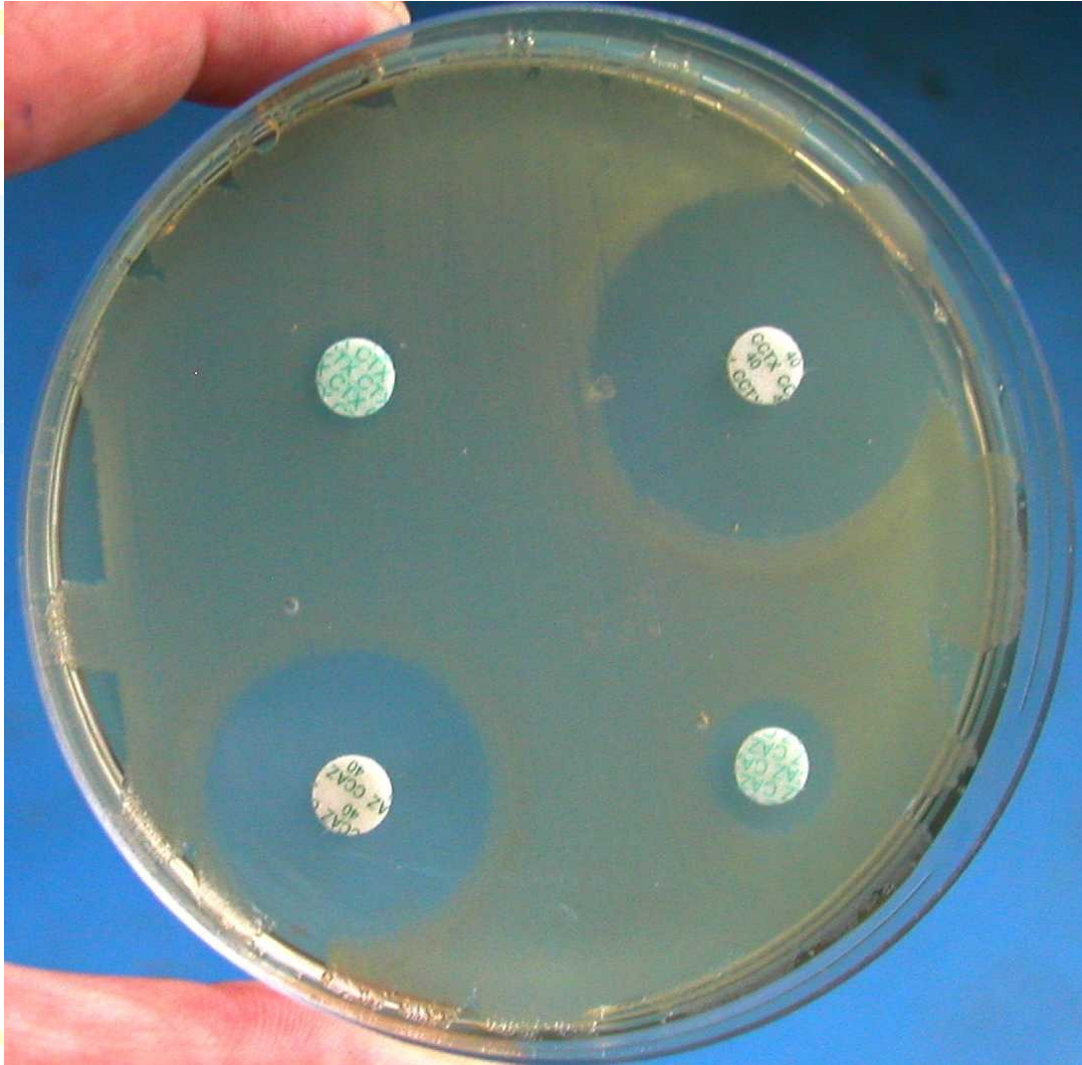


Testování na produkci ESBL (širokospektrých betalaktamáz)

- U širokospektrých betalaktamáz má **inhibitor betalaktamázy** (např. kyselina klavulanová) svůj **účinek**, i když není dle dostupných údajů dostatečný pro léčbu in vitro. Lze ho však **využít** – činí-li rozdíl mezi zónami kolem disků cefotaximu (ceftazidimu) bez inhibitoru a s ním více než pět milimetrů, je kmen považován za producenta (širokospektré) β -laktamázy.



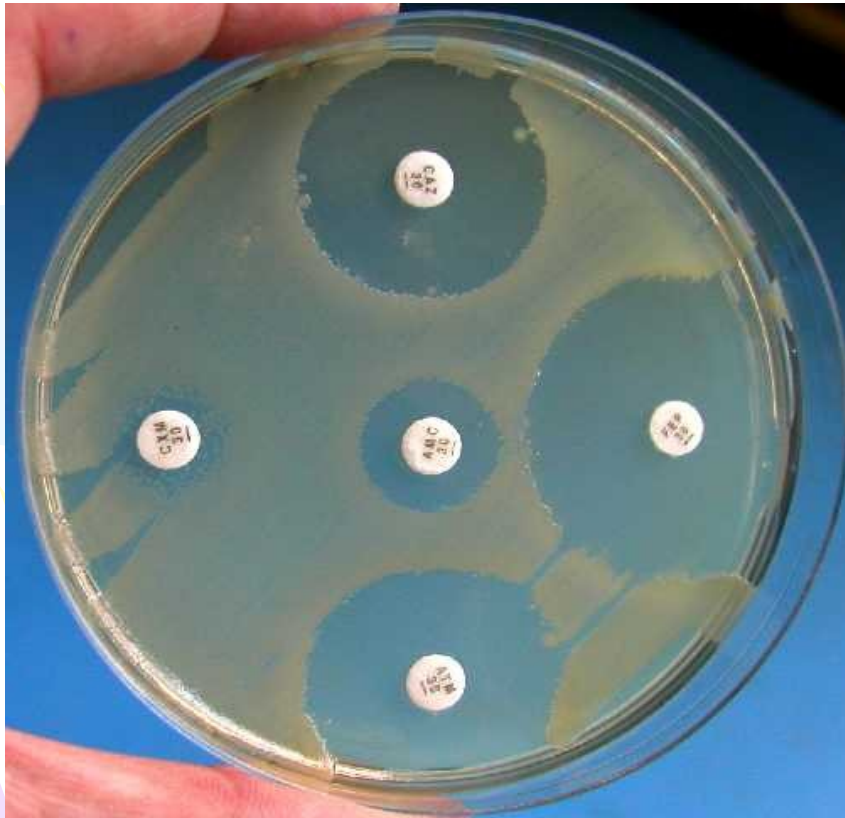
Výrazný ESBL producent



Testování kmenů na konstitutivní typ produkce betalaktamáz typu ampC

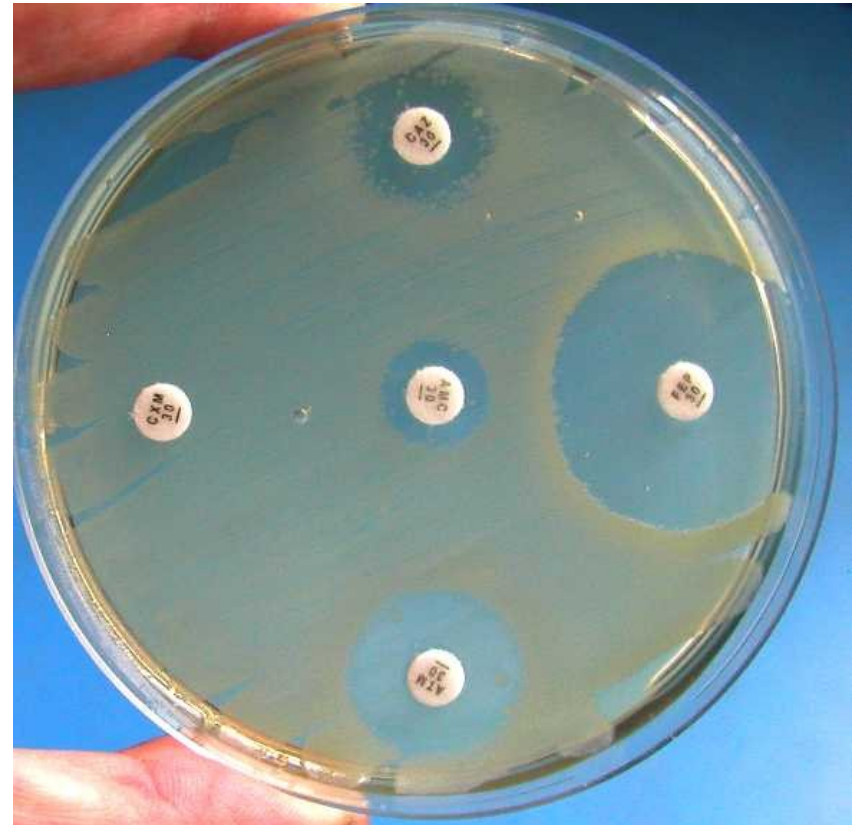
- Betalaktamázy ampC jsou druhem širokospektrých betalaktamáz. Na rozdíl od širokospektrých ESBL v užším slova smyslu jsou ale kmeny (snad?) citlivé na cefalosporiny čtvrté generace
- Konstitutivní typ znamená, že **rezistence je trvalá vlastnost**
- Testuje se na běžném MH agaru a na MH s oxacilinem. Porovnává se rozdíl ve velikosti zón citlivosti čtyř antibiotik.

Stejný kmen na MH a na MH s oxacilinem: porovnejte



MH + OXA

Foto O. Z.



MH

Detaily předchozích obrázků



MH + OXA



MH

Foto O. Z.

Betalaktamázy ampC – inducibilní typ

- V tomto případě jde o takzvanou **indukovanou produkci betalaktamázy**. Rezistence se projeví jen v případě současného působení kyseliny klavulanové. Betalaktamová antibiotika lze použít, ale opatrně (pokud je lze nahradit jinými, raději je nahradíme)
- Projeví se tak, že v testu na průkaz ESBL kyselina klavulanová zónu nezvětšuje, ale naopak zmenšuje

Betalaktamázy ampC – inducibilní typ

<http://www.ijmm.org>



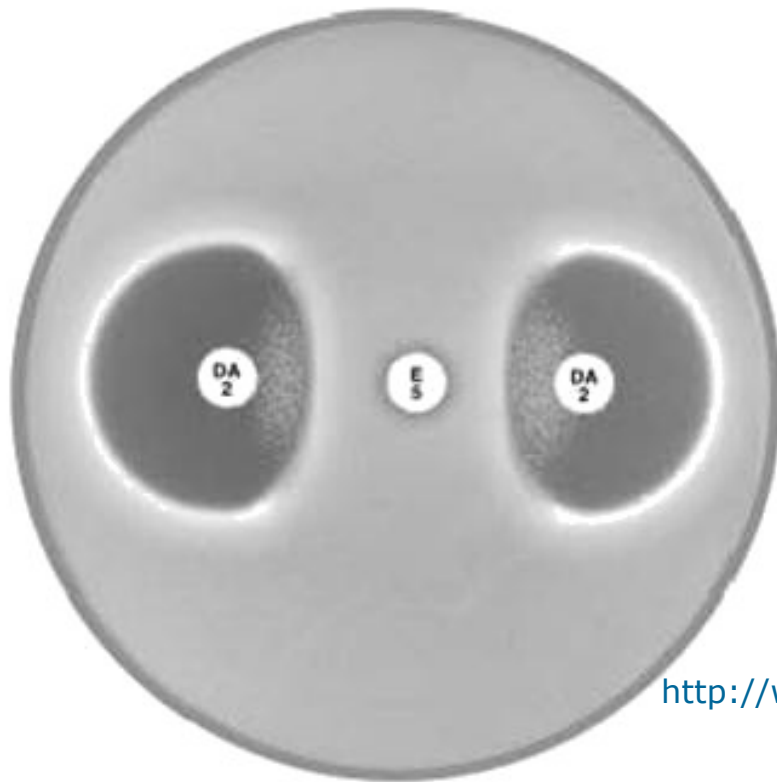
Figure 1b: Organism showing blunting of ceftazidime/cefotaxime zone of inhibition adjacent to cefoxitin disc (presumptive AmpC producer)

Metalobetalaktamázy (MBL) a KPC betalaktamázy

- Existují také testy na detekci **metalobetalaktamáz**, využívají například EDTA (chelát zachycující ionty Zn^{2+}) a testy na tzv. KPC betalaktamázy.
- Jde o betalaktamázy, při jejichž produkci je kmen rezistentní na všechny betalaktamy (u metalobetalaktamáz s výjimkou aztreonamu)

Mezi MBL patří i NDM-01 (New Delhi betalactamase), o níž se v létě psalo v novinách

Detekce indukované MLS rezistence u stafylokoků



<http://web.med.unsw.edu.au>

- Na linkomycin sám je kmen ještě citlivý, **rezistence však vzniká v přítomnosti erytromycinu.** Doporučuje se v těchto případech nepoužívat raději ani jedno z obou antibiotik

B. Pokus na zvířeti a C. genetické metody: Pro zopakování

- **Cílem mikrobiologických metod** je zpravidla detekce patogena, popř. určení jeho citlivosti na antimikrobiální látky.
- **Patogena určujeme**
 - **Přímými metodami**
 - detekce celého mikroba (jako morfologické či fyziologické jednotky)
 - detekce jeho části (antigenu, DNA)
 - detekce jeho produktu (například toxinu)
 - **Nepřímými metodami:** detekce protilátek

Přehled metod – opakování

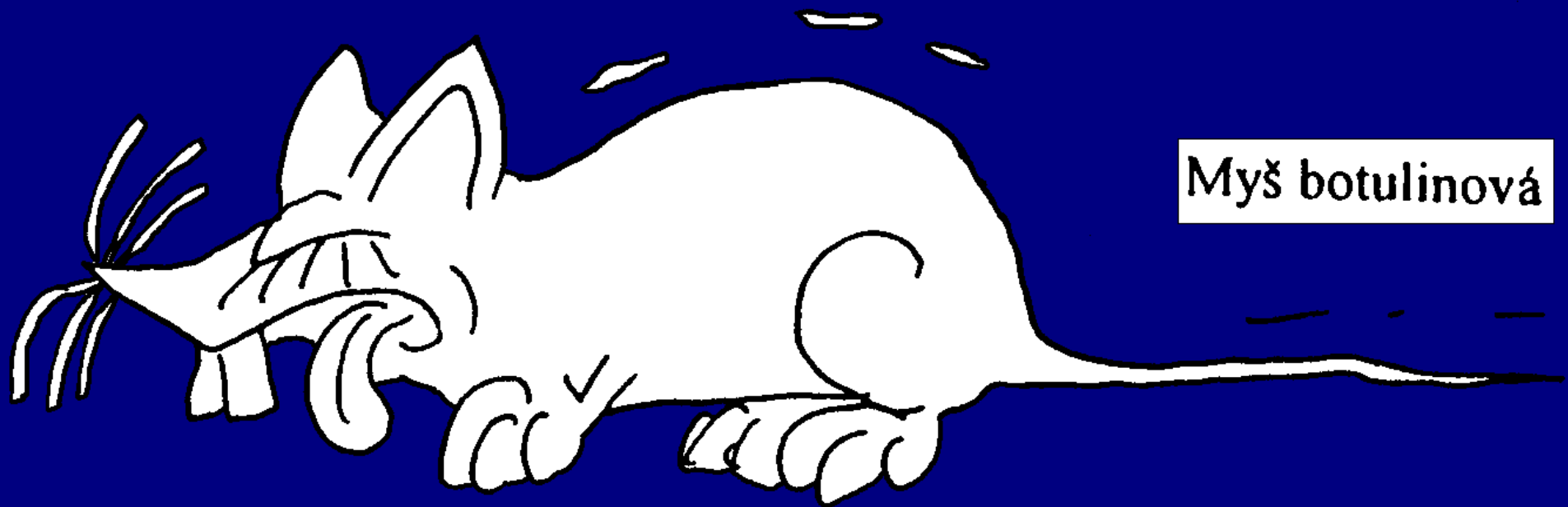
- **Přímé metody** (*práce se vzorkem či kmenem*)
 - Mikroskopie (nativní preparát, barvení...)
 - Kultivace (na tekutých i pevných půdách)
 - Biochemické a podobné identifikační metody
 - Průkaz antigenu (pomocí protilátky)
 - **Pokus na zvířeti (izolace, průkaz toxicity)**
 - **Průkaz nukleové kyseliny**
- **Nepřímé metody**
 - Průkaz protilátek (pomocí antigenu)

B. Pokus na zvířeti

- Pokus na zvířeti je **jednou z nejstarších metod** v mikrobiologii. Byl neocenitelnou pomůckách v dobách, kdy ještě nebylo k dispozici tolik umělých kultivačních médií, o dalších metodách ani nemluvě. Dodnes se používá tam, kde ještě nenašel náhradu



Myš botulinová



Myš botulinová

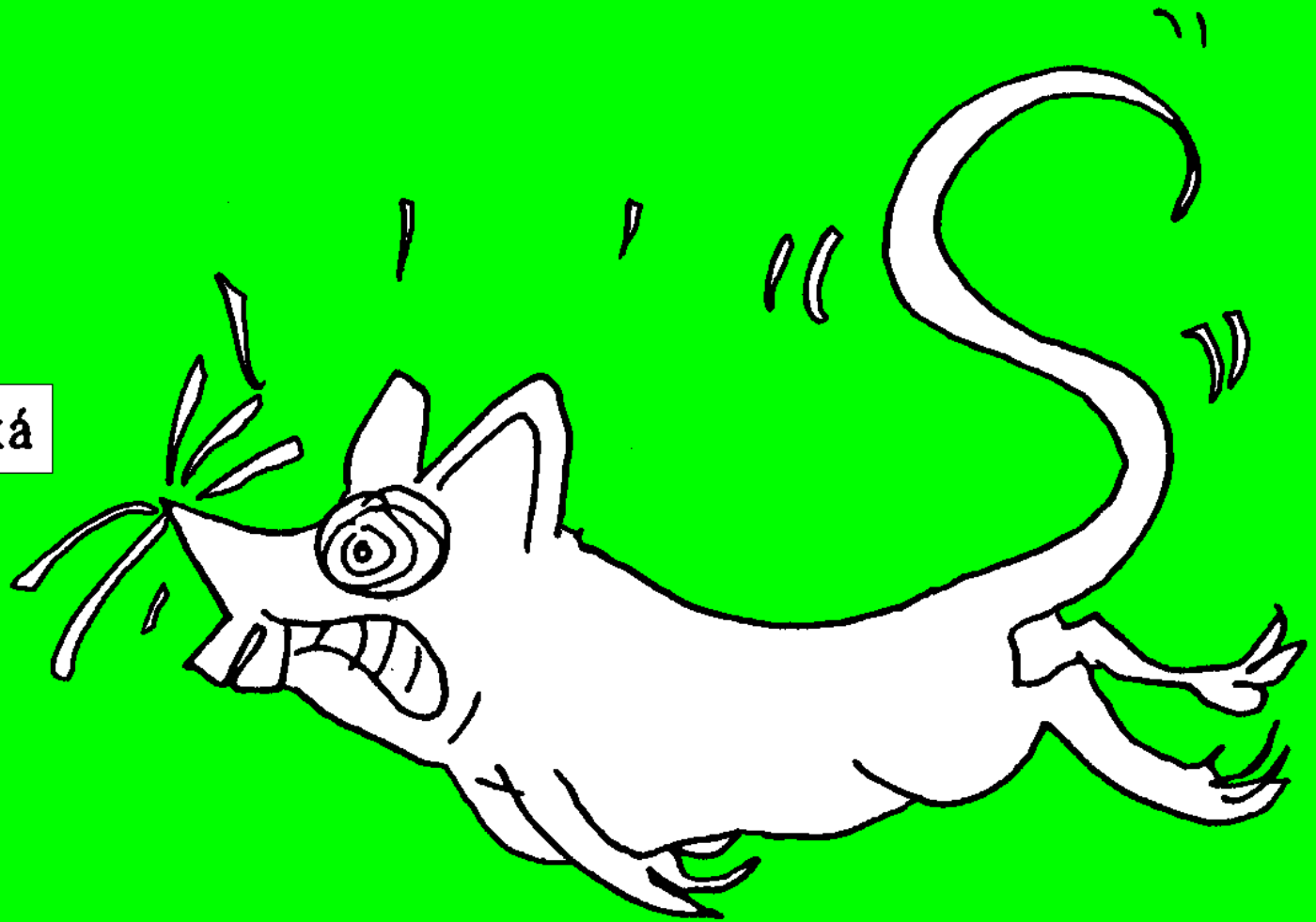
Autorem tohoto a dalších obrázků je Petr Ondrovč⁴⁵ík.
Obrázek je graficky upraven.

Historický význam pokusu na zvířeti

- V dobách Kocha a Pasteura se zjišťovalo, **který mikrob vlastně souvisí s kterou nemocí**. V této době sehrála pokusná zvířata velice důležitou a nenahraditelnou roli
- Proto také pokus na zvířeti („pokusném hostiteli“) má své významné místo v rámci tak zvaných **Kochových postulátů**.

Myš tetanická

Myš tetanická



Kochovy postuláty

- Určitý mikrob je etiologickým agens (= původcem nemoci), pokud
 1. je prokázán ve všech případech choroby a jeho rozložení v těle odpovídá pozorovaným poškozením;
 2. je z hostitele vypěstován a v čisté kultuře udržován po několik generací;
 - 3. takto vypěstovaným mikrobem lze napodobit onemocnění na jiném hostiteli;**
 - 4. je opět izolován z pokusně infikovaného hostitele.**

Zvíře jako měřítko virulence*

*Virulence = „jak moc je mikrob zlý“. Podrobněji rozebereme příště.

- Porovnáváme-li virulenci* různých druhů mikroba nebo různých kmenů stejného druhu, potřebujeme tuto **virulenci nějak vyčíslit**.
- K tomuto účelu lze použít například **LD₅₀**. Je to ukazatel virulence kmene: schopnosti usmrtit
- **LD₅₀ = 50% letální dávka**. Je to množství mikroba, které usmrtí přesně 1/2 pokusných zvířat

Poznámka:

Napsáno „50 %“ se čte „padesát procent“

Napsáno „50%“ se čte „padesátiprocentní“

Myš vzteklá



Myš vzteklá

Použití zvířete

- Zvíře tedy můžeme použít
 - jako kultivační médium, zejména tam, kde nelze použít kultivační médium neobsahující živé buňky (viry, rickettsie, chlamydie)
 - jako průkaz patogenního působení určitého kmene mikroba
 - jako průkaz toxicity mikrobiálního toxinu

Etický pohled na pokus na zvířeti

- **Názory na pokusy na zvířatech se různí.** Mnoho lidí by je chtělo úplně zakázat, většinou však nedovedou říci, jak je nahradit
- Na druhou stranu je **řada případů, kdy pokusy jsou prováděny zbytečně**, to však není ani tak případ zdravotnictví, jako především kosmetického průmyslu
- Legislativa **pokusy na zvířatech povoluje**, vyžaduje však splnění **přísných pravidel**

Myš septická

Myš septická



Etické podmínky pokusu na zvířeti

- Každý chov pokusných zvířat podléhá schválení etické komise. Pro každý typ pokusu (ať už v rámci diagnostiky, nebo výzkumu) musí být schválen **projekt pokusu**.
- V každém případě zvířata musí být chována za **vhodných podmínek** (teplota, vlhkost, kvalita vody, potravy, prostorové podmínky apod.)
- Velmi přísné jsou požadavky na **provedení pokusu** a samozřejmě i **způsob usmrcení**

Vědecké podmínky pokusu na zvířeti

- Má-li být pokus na zvířeti eticky alespoň do jisté míry ospravedlnitelný, **nesmí být zbytečný**, musí mít tedy nějakou **vypovídací hodnotu** o daném případě.
- Snažíme se tedy vždy nalézt u zvířete **typické příznaky dané choroby**. Pokud to lze, prokazujeme také, že zvíře ne onemocní, pokud ho ochráníme specifickým způsobem, například **podáním určité protilátky**.
- Každý pokus na zvířeti musí být pečlivě **doložen a zdokumentován**.

Myš uhynulá

Myš uhynulá



Myš



Velice důležité pokusné zvíře, používané v různých odvětvích mikrobiologie. Ve virologii se často používají sající myšata, na kterých se pěstují viry. Viry totiž nejsme schopni pěstovat na nebuněčných médiích. Myši se používají i v bakteriologii, například při průkazu tetanového toxinu či botulotoxinu je pokus na myši stále metodou volby a není reálně nahraditelný.

Králík

Králík se také používá v řadě testů, zejména při diagnostice syfilis. Zde se používá takzvaný RIT – rabbit infectivity test, test infekčnosti pro králíka. Dříve se používal ještě tzv. Nelsonův test, kde se používal laboratorní kmen původce syfilis pěstovaný na králičích varlatech



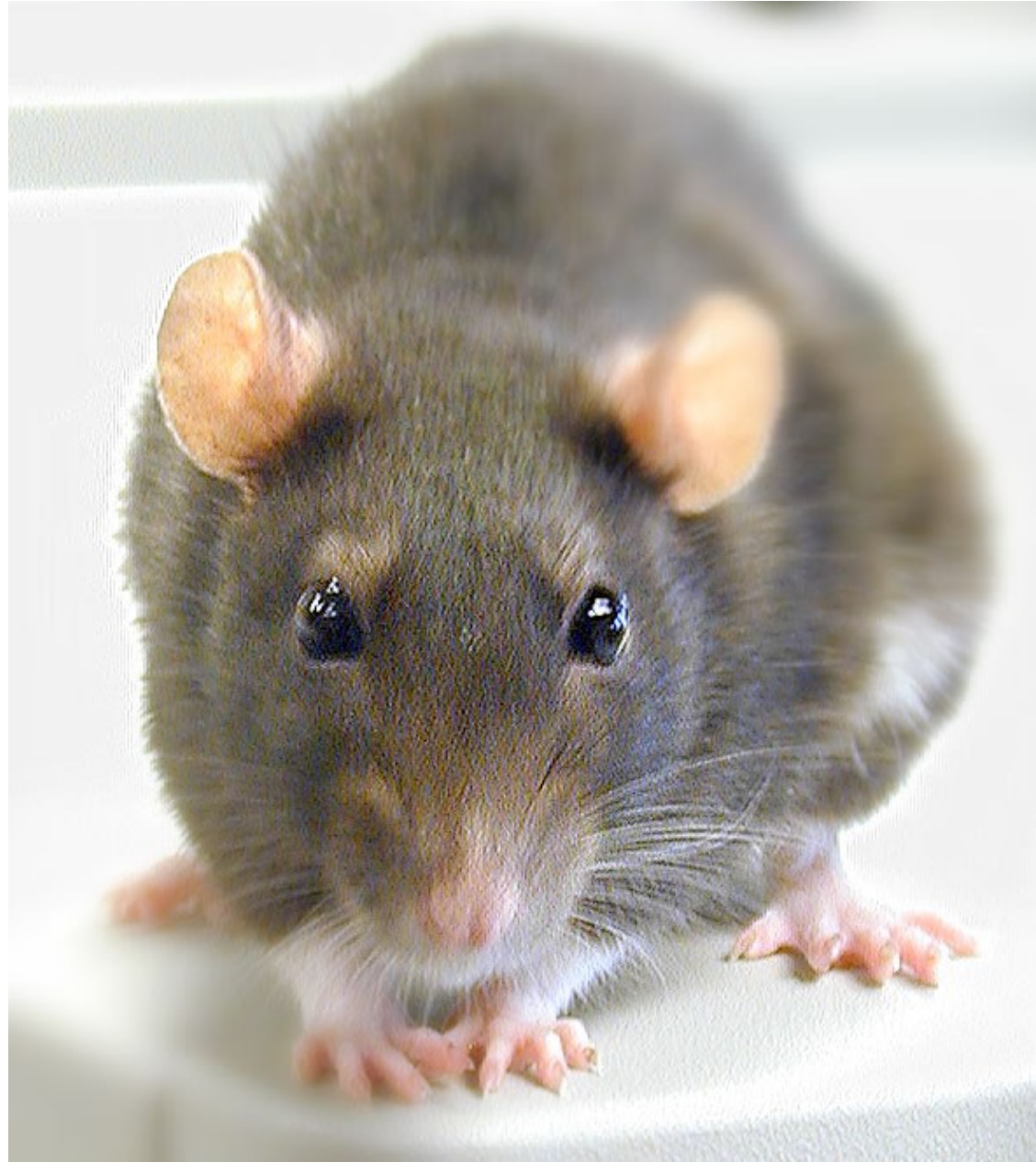
Morče

Také morče se v mikrobiologii uplatňuje poměrně často. Nejčastěji se to týká diagnostiky tuberkulózy



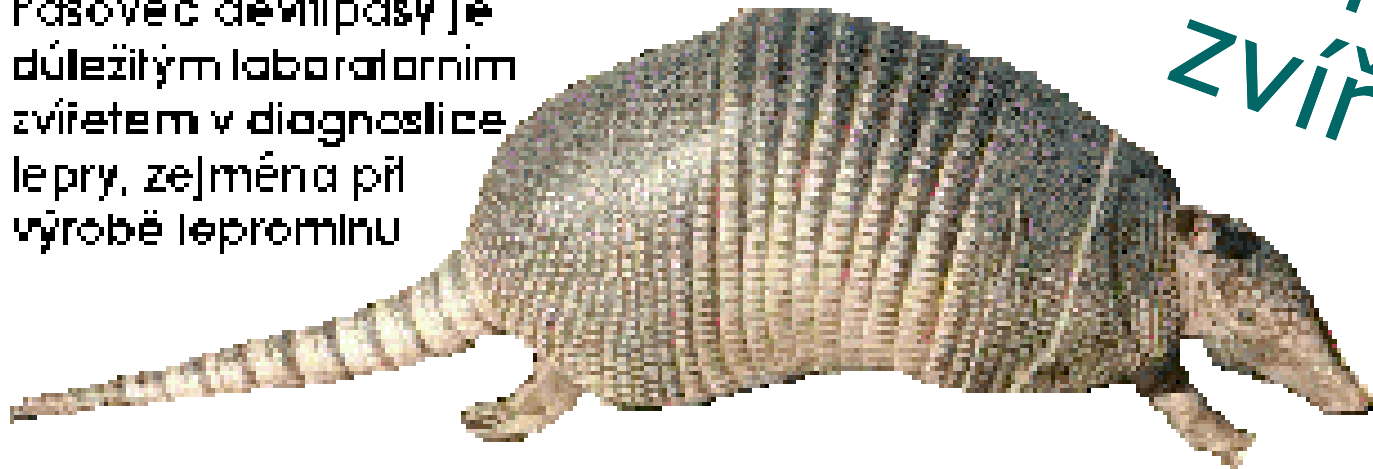
Krysa

V praxi používána poměrně málo, spíše pro experimentální účely než pro praktickou diagnostiku



- V určitých případech je nutno použít **zvláštní zvířata**, protože jiná nelze použít. Tak například pro diagnostiku lepry se v určitých případech používá **pásovec** (na obrázku)
- Mnohá zvířata se také používají jako **zdroj séra** pro sérologické reakce. Zde lze použít např. koňské či kravské sérum.

Pásovec devítipásý je důležitým laboratorním zvířetem v diagnostice lepry, zejména při výrobě leprominu



Jiná
zvířata

C. Průkaz nukleové kyseliny

- Stejně jako pokus na zvířeti je to metoda **komplikovaná a nákladná**. Obě metody tedy používáme většinou tam, kde běžně používané metody (mikroskopie, kultivace...) selhávají.
- Na rozdíl od pokusu na zvířeti však jde o metodu **progresivní a velice se rozvíjející**
- Průkaz NA je **možný i z mrtvých buněk**. To je výhodné u choulostivých mikrobů. Podařilo se např. i prokázat NA původce tuberkulózy na kosterních pozůstatcích z XI. století.

Důležité upozornění

- **Nehodláme studenty učit principiální otázky týkající se molekulárních metod.** K tomu jsou určeny jiné předměty
- Naším cílem je **seznámit studenty s.přehledem využitelnosti těchto metod v lékařské mikrobiologii.**
- Existuje **volitelný předmět VSMB081,** který vede as. Růžička, kde lze získat hlubší poznatky o této problematice.

Rozdělení metod průkazu NA

- **Metody bez amplifikace** (genetické sondy). Jsou méně citlivé, to je někdy i výhoda
- **Polymerázová řetězová reakce (PCR)** velmi citlivá, stačí i jedna molekula DNA. Lze ovšem uměle citlivost snížit.
- **Ligázová řetězová reakce (LCR) je velmi podobná** (ale zavedla ji jiná firma)
- **Průkaz virové RNA** je možný pomocí upravené PCR

Použití metod průkazu DNA (RNA) v klinické mikrobiologii

- Tyto metody používáme zpravidla tam, kde **mikroskopický a kultivační průkaz je obtížný nebo není vůbec možný**
- **Nehodí se příliš pro běžné patogeny přítomné všude.** Pro svou velkou citlivost by ruče vyčenichaly kdejakou molekulu přilétlou z vnějšího prostředí (týká se především metod s amplifikací)
- Metody nejsou **ani neužitečné**, jak si někdo myslí, **ani samospasitelné**, jak si myslí pro změnu jiní



Genové sondy bez amplifikace

- Jsou **nejstarší** z tohoto typu reakcí
- Používají se v diagnostice například chlamydiových infekcí
- Jsou méně citlivé, což může být i výhoda (nezachytí se tak snadno nějaké kontaminace)

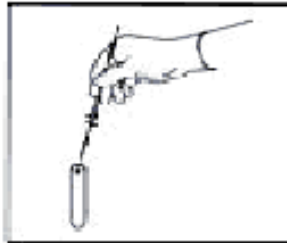
Genová sonda

www.pemed.com



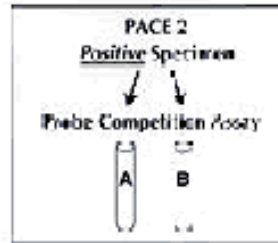
Použití genové sondy www.chlamydiae.com

Probe Competition Assay for *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*



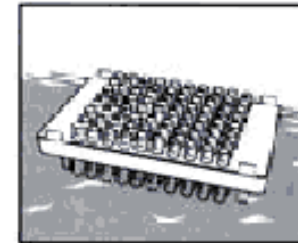
1. Sample Preparation

Vortex each specimen, express and discard swab.



2. Probe Competition Assay (PCA)

Run controls and specimens in duplicate using GEN-PROBE and PCA reaction tubes (A and B).



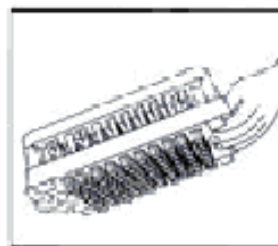
3. Hybridization

Pipette probe reagent into all tubes and incubate at 60°C for one hour.



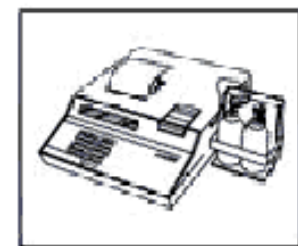
4. Separation

Incubate with separation suspension in a 60°C for 10 minutes. Separate magnetic particles and decant.



5. Wash

Fill tubes with wash solution; incubate at room temperature for 20 minutes.



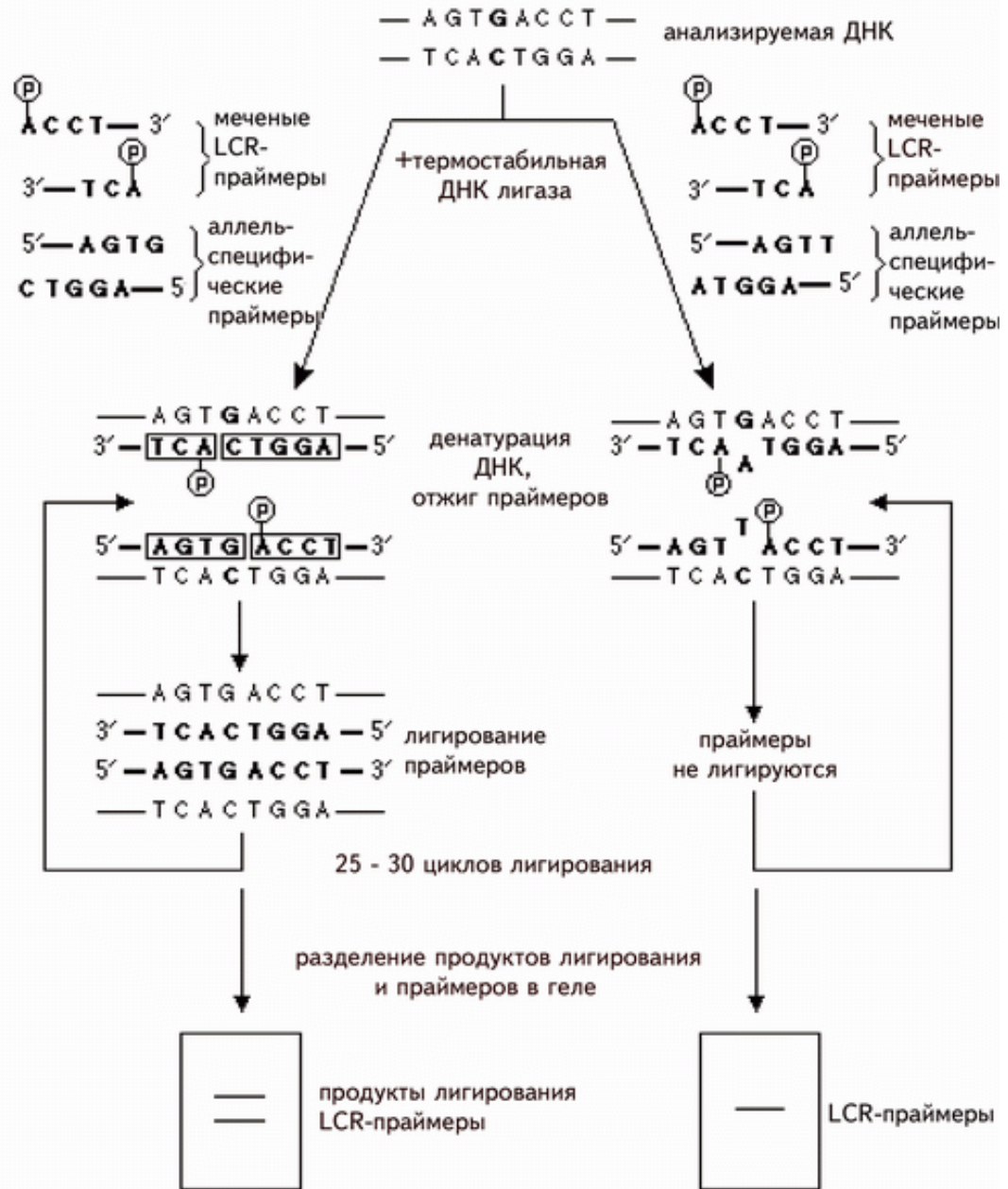
6. Detection

Using appropriate protocol, read the chemiluminescent response with your GEN-PROBE luminometer.

Metody s amplifikací

- U nás se nejčastěji používá PCR, tedy polymerázová řetězová reakce
- Její vznik umožnilo získání **termostabilní polymerázy** z bakterie *Thermus aquaticus* z horkých pramenů (proto se této polymeráze říká Taq polymeráza).
- Existují **různé možnosti detekce** jejích produktů (gelová elektroforéza, ELISA)⁶⁹

LCR rusky



Základní schéma reakce PCR

- **V první fázi** je nutno získat izolovanou DNA. Proces je poměrně složitý.
- **V druhé fázi** probíhá vlastní amplifikace (pokud vzorek obsahuje úsek DNA odpovídající příslušnému primeru)
- **Ve třetí fázi** probíhá detekce produktu amplifikace
 - Gelovou elektroforézou nebo
 - Metodou ELISA (**≠ serologická ELISA!!!**)

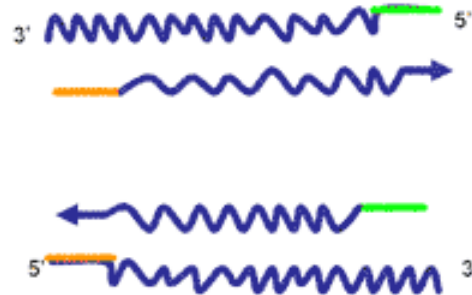
PCR proces



toxics.usgs.gov



Primers extended by Taq polymerase at 70°

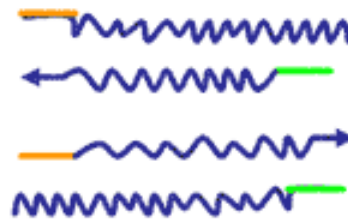


Copyright

- Heat to 95° to melt strands
- Cool to 65° to anneal primers



Molecular
Station .com



And so on,....

Postup izolace DNA pro PCR

Ke **500 μ l materiálu** (pokud je objem materiálu menší, je nutno doplnit do 500 μ l fyziologickým roztokem) přidat **25 μ l SARKOSYL**, inkubovat při 56 °C/15 min., v průběhu inkubace občas vortexovat.

Přidat **1,0 ml roztoku G1**, vortexovat, inkubovat při 65°C/10 min, vzorek zchladit na RT.*

Přidat **50 μ l SILICA**, obrácením promíchat (10 min.).**Centrifugovat při 6 000 g/30 sec., supernatant slít.

Přidat **1 ml roztoku G2**, vortexovat, centrifugovat při 6 000 g/30 sec., supernatant slít.

Přidat **1 ml 80% Etanolu**, vortexovat, centrifugovat při 6 000 g/30 sec., supernatant slít.

Přidat **1 ml 80% Etanolu**, vortexovat, centrifugovat při 6 000 g/30 sec., supernatant slít.

Přidat **1 ml Acetonu**, vortexovat, centrifugovat 6 000 g/60 sec., supernatant ihned **opatrně** slít.

Pelet vysušit (max. 2 min.) v otevřené zkumavce.

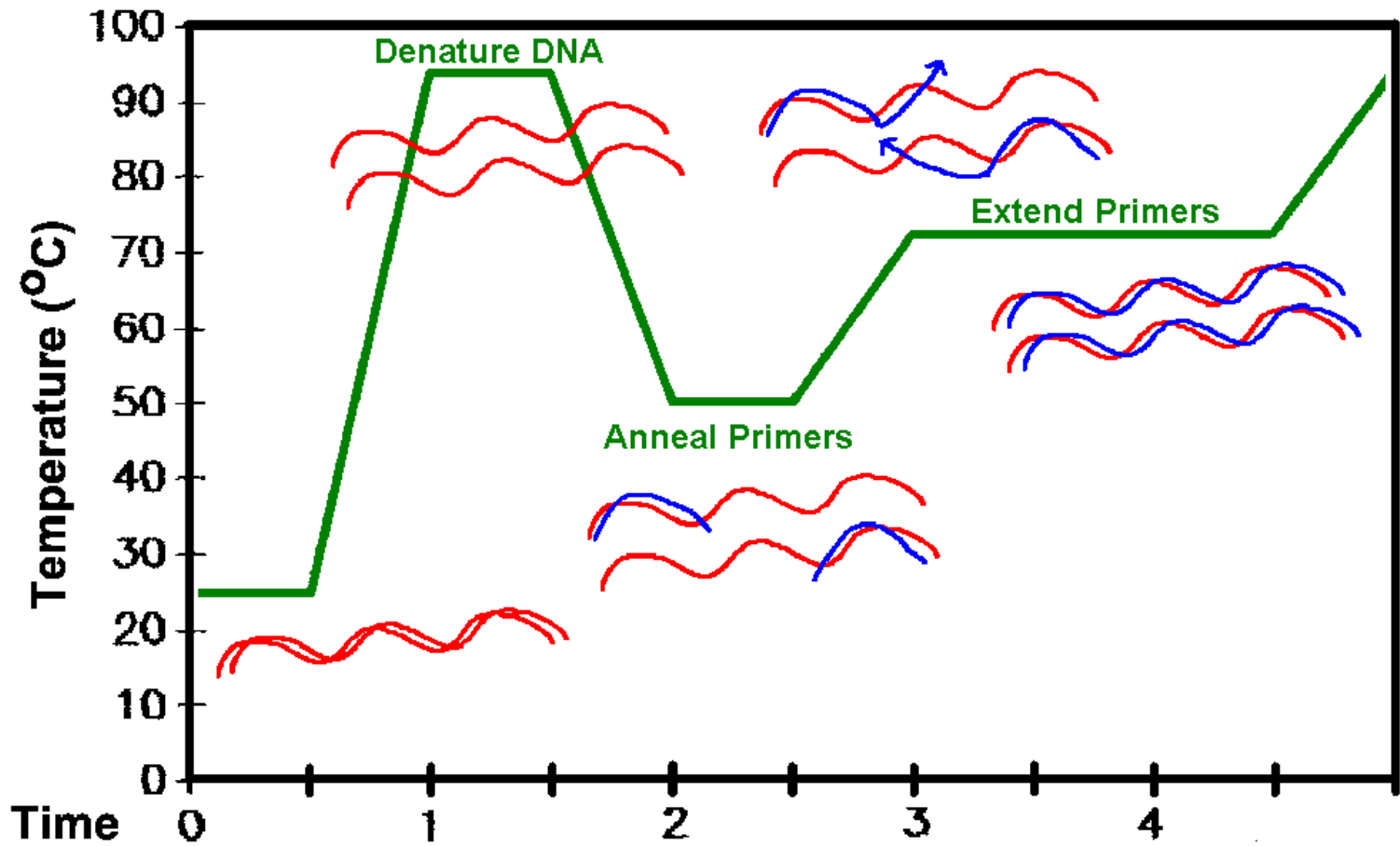
Přidat **50 μ l roztoku TE** (předehřátého na 56 °C), dobře protřepat.

Eluovat DNA při 56 °C/10 min., krátce vortexovat nebo protřepat.

Centrifugace 10 000- 14 000 g/2 min./RT.

Čirý roztok DNA odebrat ihned po centrifugaci do sterilní mikrozkušavky

PCR a teplota



Vývoj PCR byl umožněn výzkumem vedoucím k objevení Taq polymerázy z termofilní bakterie *Thermus aquaticus*, která umí přežít vysoké teploty.

Proč je důležitá interní kontrola

- Velmi běžným jevem je, že dochází k tzv. **inhibici reakce**. Inhibice reakce je dána přítomností různých interferujících látek (např. talek z rukavic)
- Proto by měla být pro detekci vždy použita směs, obsahující kromě vzorku a jemu příslušných primerů ještě **kontrolní DNA + primery**. Pozitivita IC je dokladem, že nedošlo k inhibici reakce
- Ovšem pozor: **IC může být negativní u vysoce pozitivních vzorků** (prohraje v kompletici o nukleotidy).

Thermocyklyery



kinich.cifn.unam.mx

<http://images/110.jpg>



Možné výsledky PCR

Následující možnosti platí bez ohledu na způsob detekce (gelovou elektroforézou nebo ELISou)

- **Pozitivní výsledek** vzorku svědčí o pozitivě vzorku. Přitom výsledek IC je zpravidla také pozitivní, ale u silně pozitivních případů nemusí být.
- **Negativní výsledek** vzorku při **pozitivním výsledku IC = negativní výsledek reakce**
- **Vzorek i IC negativní = inhibice reakce**⁷⁷

Přehled interpretace

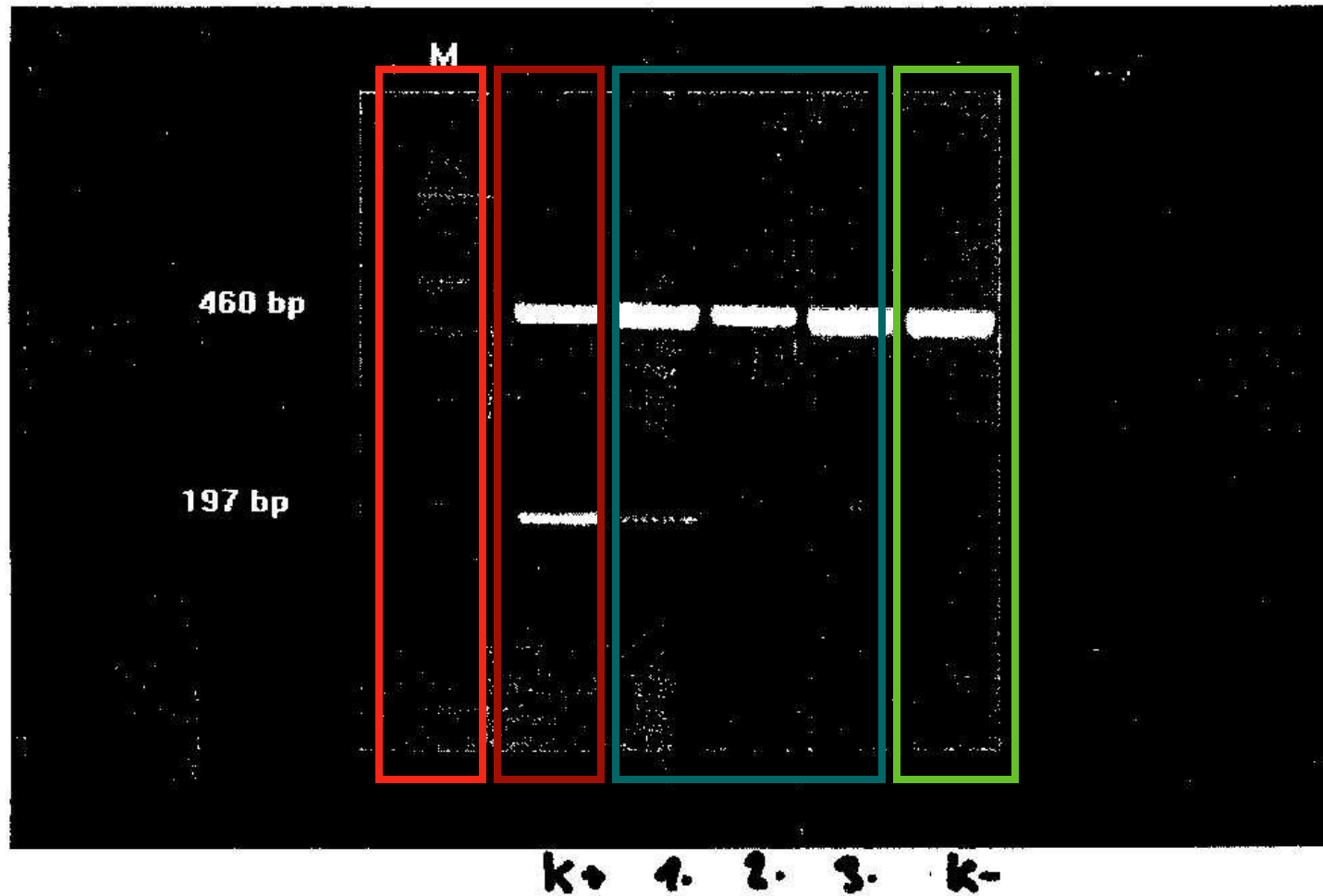
Vlastní reakce	Interní kontrola	Interpretace
negativní	pozitivní	negativní
negativní	negativní	inhibice reakce
pozitivní	pozitivní	pozitivní
pozitivní	negativní	(vysoce) pozitivní



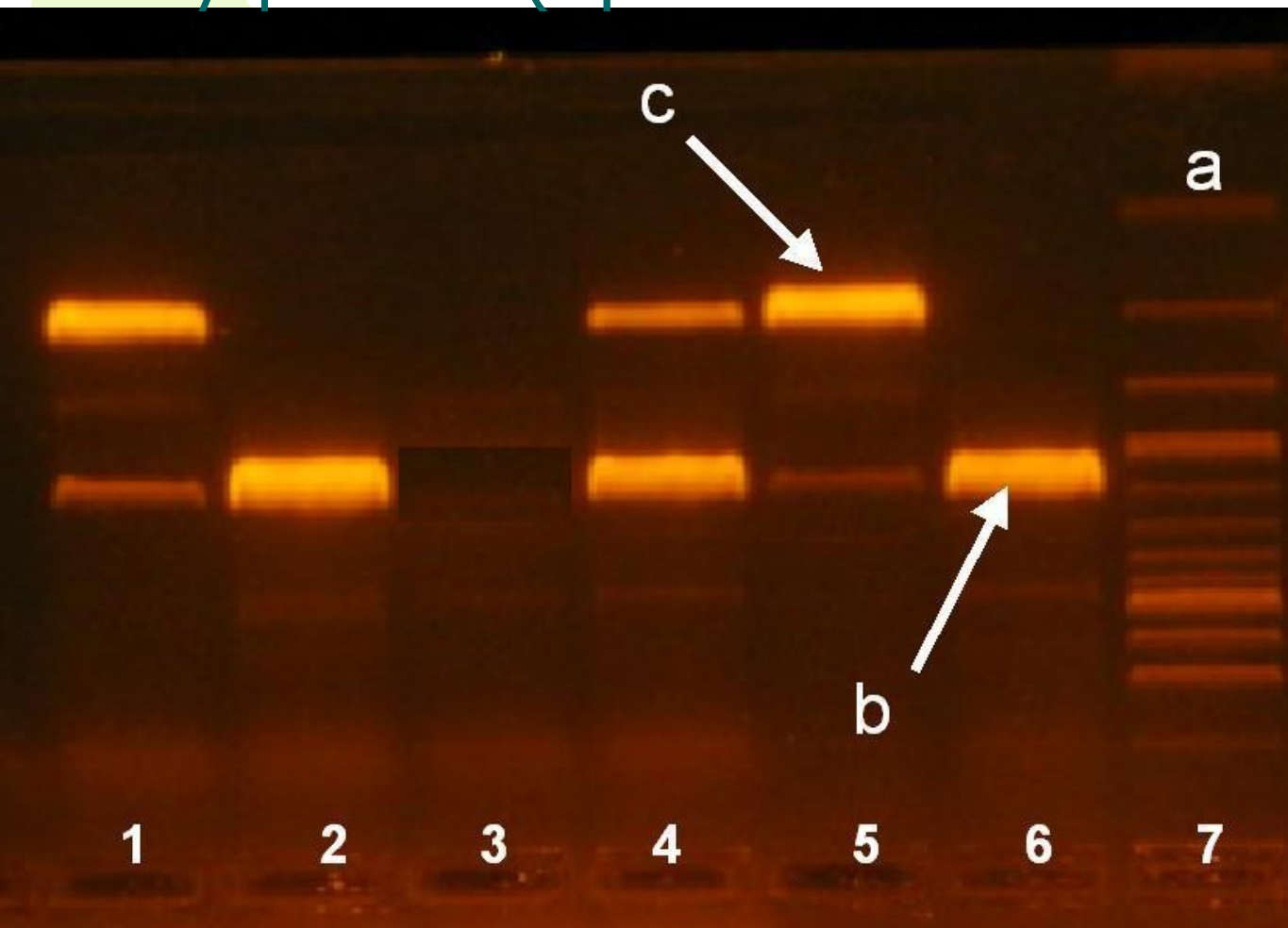
Detekce výsledků PCR pomocí gelové elektroforézy

- **Gelová elektroforéza** je jednou z možností detekce produktu PCR
- Produkty **putují gelem** od katody směrem k anodě a jsou zviditelněny pomocí UV-transluminátoru
- Každý vzorek obsahuje také **interní kontrolu (IC)**
- Kromě vzorků je použit také žebříček (**ladder**) jako měřítko

Ukázka gelu (ladder, pozitivní kontrola, tři vzorky, negativní kontrola)



Jiný příklad (upraveno dle www.medmicro.info)



← Vlastní reakce

← IC

Pacienti 1 a 4 – pozitivní, pacient 2 – negativní, pacient 3 – inhibice reakce. 5 – pozitivní kontrola, 6 – negativní kontrola, 7 – ladder



Druhá možnost – ELISA

- V tomto případě se produkt reakce detekuje pomocí **reakce ELISA**. Vysvětlení principu této reakce je mimo rámec této přednášky.
- Důležité je, že i v tomto případě hraje zásadní roli **interní kontrola**. Pokud je negativní reakce vzorku i kontroly, jde o inhibici reakce!

Odběr a zasílání vzorku na PCR

- Pokud komunikujeme se zařízením, které hodlá provést odběr vzorku na PCR, je nutno mít na paměti:
 - lze použít **téměř jakýkoli vzorek**, o kterém předpokládáme, že obsahuje mikroorganismy, po nichž pátráme
 - **není nutno zajistit životaschopnost mikrobů** (např. transportní půdou)
 - naopak **je třeba omezit riziko inhibice reakce** → nejlepší je suchý tampón nebo holý kusový vzorek bez nějakých úprav ⁸³

Interpretace vyšetření PCR

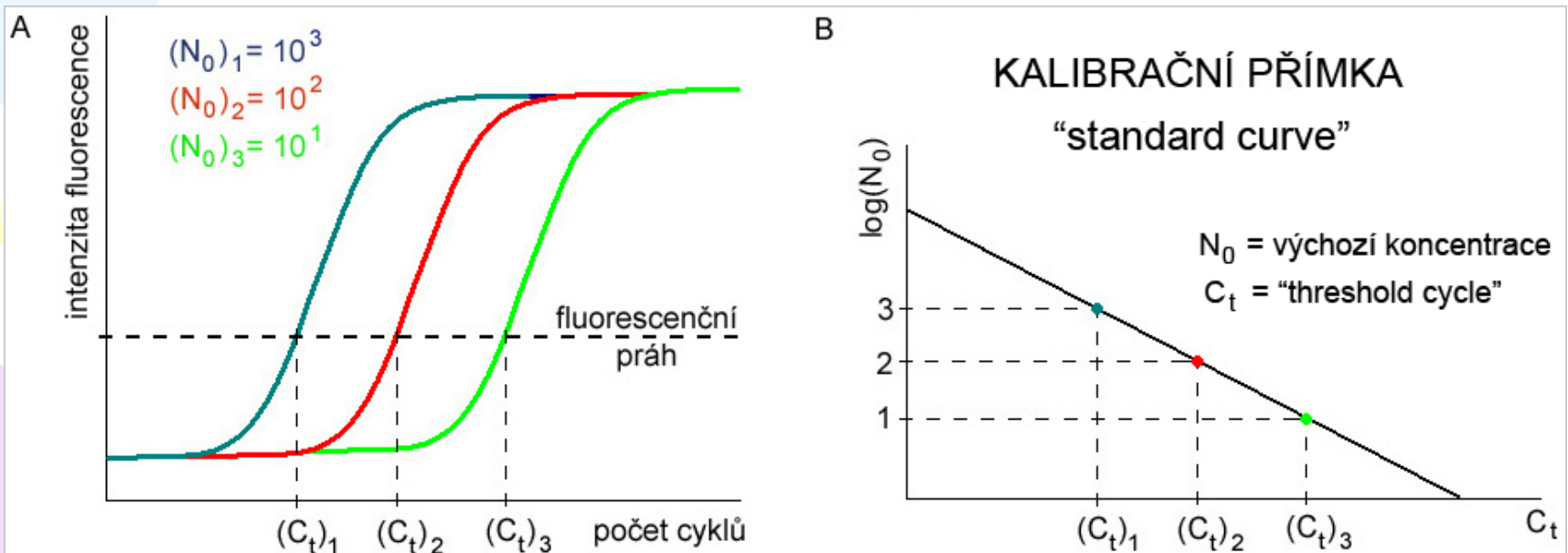
- Vyšetření PCR je vždycky nutno interpretovat **zároveň s ostatními vyšetřeními**
- Je potřeba vzít v úvahu, že je to **přímý průkaz** (neexistuje žádný „průkaz protilátek metodou PCR“, jak je někdy požadováno)
- I pokud je PCR centralizováno (např. na genetice, na biochemii), mikrobiologické PCR by měl vždy interpretovat **mikrobiolog**.

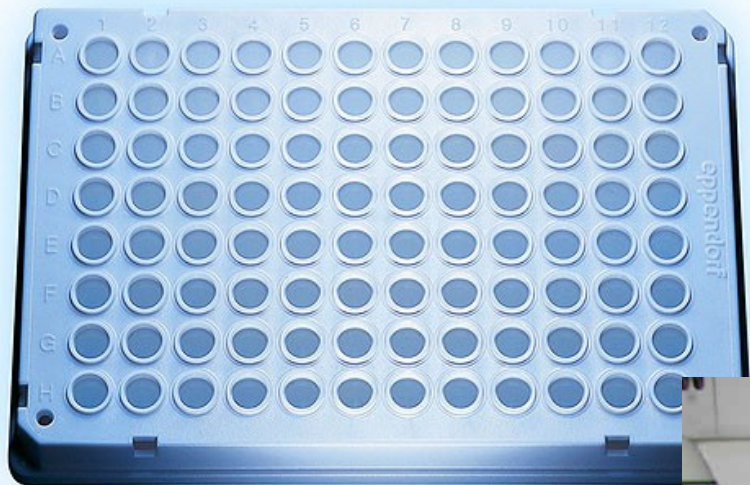
Real time PCR, RT-PCR

- Sledování průběhu reakce (PCR) přímo během reakce
- pomocí fluorescenčních sond či barviv, které detekují množství PCR produktu během reakce zvýšením své fluorescenční aktivity.
- výhody oproti konvenční PCR
- možnost přesného stanovení výchozího počtu kopií cílové templátové sekvence DNA – čili schopnost kvantifikace
- Real-time PCR se provádí ve speciálních **cyklerech**, které umožňují teplotního cyklování i detekci fluorescence v každém cyklu PCR

Real time PCR, RT-PCR

- Kvantifikace se provádí prostřednictvím matematické analýzy **amplifikačních křivek** vzniklých vynesemím naměřené fluorescence oproti pořadovému číslu příslušného cyklu





RT-PCR, detekční systémy

- Prvními látkami používanými pro detekci akumulace produktu během real-time PCR reakce byl *ethidium bromid*, *SYBR Green I*)
 - jejich fluorescenční aktivita vzrůstá po vazbě na dvouřetězcovou DNA
 - během PCR vzniká dvouřetězcový produkt - lze sledovat průběh amplifikace.
 - nevýhoda detekují veškerou dsDNA přítomnou v reakční směsi včetně nespecifických produktů amplifikace (*jako jsou např. tzv. primer-dimer artefakty*), které i při velmi pečlivé optimalizaci metody velmi často vznikají

RT-PCR, detekční systémy

- Elegantní řešení co se týče detekce nespecifických produktů nabízejí často využívané **oligonukleotidové sondy**
 - fluorescenčně značené oligonukleotidy, které hybridizují s určitou cílovou sekvencí uvnitř amplifikovaného regionu a výrazně přitom zvyšují svou fluorescenční aktivitu
 - výhoda je vysoká specifita, jelikož **detekce cílové sekvence probíhá ve 2 stupních** - na úrovni vazby primerů a rovněž na úrovni vazby sondy.

Nashledanou

Děkuji za
pozornost



Příště budeme pokračovat povídáním o
patogenitě a virulenci