

Téma 3 Přehled mikrobiologických vyšetřovacích metod

3.1 Metody přímého průkazu mikrobů (přehled a charakteristika) – první část

Název metody	K průkazu ve vzorku	K identifikaci kmene
Mikroskopie	ano	ano
Kultivace (pěstování na půdách)	ano	ano
Biochemické a jim 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, běžně se nedělá

3.1.3 Mikroskopie

3.1.3.1 Nativní preparát

Nejjednodušší druh mikroskopie: mikroby se pozorují neobarvené, jen rozmíchané v kapce fyziologického roztoku a přikryté krycím sklíčkem. Nativní preparát se hodí na mikroby (baktérie, prvoky), kteří se **pohybují**, nebo jsou **velké**.

3.1.2.3 Mikroskopie v zástínu

Je to zvláštní druh nativního preparátu, světlo na preparát dopadá zešikma.

3.1.3.1 Barvené preparáty

Preparáty, které mají být nějak obarvené, musí být nejprve **vysušeny** a poté **zfixovány**. Poté se barví. Mikrobiologové provádějí nejčastěji **Gramovo barvení**. Rozliší bakterie podle typu **buněčné stěny** na tzv. grampozitivní a gramnegativní; špatně nebo vůbec se obarví bakterie, které buněčnou stěnu nemají nebo mají stěnu zvláštního. Schéma Gramova barvení uvádí následující tabulka:

Chemikálie	Čas (s)	Jak reaguje grampozitivní bakterie	Jak reaguje gramnegativní bakterie
Violeť	20–30	Obarví se na fialovo	Obarví se na fialovo
Lugolův r.	20–30	Upevní se vazba barviva na stěnu	Vazba barviva na stěnu se neupevní
Alkohol	15–20	Neodbarví se	Odbarví se
Safranin	60–120	Nanejvýš trochu změní odstín	Obarví se na červeno

Výsledkem tedy je, že grampozitivní bakterie jsou modrofialové, gramnegativní červené a Gramem se nebarví bakterie se vůbec neobarví.

Pokud Gramovo barvení použijeme k obarvení vzorku, vidíme i leukocyty, epitelie a další útvary.

Cytoplasma těchto buněk se zpravidla barví červeně, jádra červenofialově nebo fialově.

Různá **speciální barvení** se používají např. na tuberkulózu, na plísně, některé parazity apod.

Ke speciálním účelům se používá *fluorescenční barvení*.

3.1.3.4 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. Samozřejmě, je-li mikroskopie použita k **identifikaci**, vidíme už jenom buňky příslušného mikroba.

3.1.3.5 Elektronová mikroskopie

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

3.1.2 Kultivace

Je to vlastně **pěstování mikrobů**. U virů se používá pro tuto metodu pojem izolace.

3.1.2.3 Základní pojmy

Kultivace se v praxi zpravidla provádí na umělých půdách. Většinou se při kultivaci mikroby rozmnoží. Mikroskopie je sice nejklasičtější 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) izolovat 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, jak již bylo řečeno, je populace mikrobů, vzešlá z jedné buňky, bez ohledu na momentální konkrétní formu. Všichni jedinci v rámci kmene mají stejné vlastnosti.

Kolonie je označení konkrétního útvaru, který bakterie a kvasinky vytvářejí při kultivaci na pevných půdách. Teoreticky (a někdy i prakticky) je to potomstvo jedné jediné buňky, uchycené na povrchu pevné půdy. 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.

3.1.3.1 Tekuté půdy

jsou půdy sloužící především k pomnožení bakterií z málo početných vzorků. Nejdůležitější z nich je **masopeptonový bujón**.

3.1.2.3 Pevné (většinou agarové) půdy

Jsou to půdy, jejichž základem je zpravidla **živný agar** – to je bujón, do kterého je přidán výtažek agarové řasy. Tím se stane, že z tekutiny se stane hmota připomínající pudink nebo želatinu. Na agarových půdách bakterie (a také kvasinky) 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 řetízku, 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.

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

Nejdůležitější půda je **krevní agar** (živný agar s přídavkem ovčích červených krvinek), používá se ale i několik desítek dalších půd.

3.1.3.1 Jak se kultivuje na pevných půdách

Na povrch půdy **naneseme část vzorku** nebo několik kolonií z předchozí kultivace.

Bakteriologickou kličkou toto místo **"roztaháme" (rozředíme) po celé misce**.

Nyní misku **umístíme do termostatu**, většinou při 37 °C (lékařsky významným bakteriím tato teplota zpravidla vyhovuje). 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.

3.1.3 Biochemická identifikace

je založena na skutečnosti, že každý druh bakterie produkuje jinou sestavu enzymů

3.1.3.1 Princip biochemických identifikačních testů

je tedy takový, že bakteriím je předložen **substrát** (substráty). Pokud bakterie produkuje **enzym** (enzymy), 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 (třeba proto, že by v jeho přítomnosti proběhla špatně nebo neproběhla vůbec), přidává se až po proběhlé reakci ve formě **činitla**.
Používají se různé testy. Některé trvají řádově vteřiny až minuty, jiné hodiny až dny. Nejjednodušší je tzv. **katalázová reakce** založená na průkazu enzymu katalázy (štěpí peroxid vodíku). Jinak se často používají reakce, které testují štěpení různých **cukrů**.

3.1.4 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. Dnes je výjimečný. 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.

3.1.5 Průkaz antigenu

Jedná se o metodu přímého průkazu, avšak způsob provedení je až na technické detaily v podstatě shodný s nepřímým průkazem (průkazem protilátek) – v obou případech se hovoří o tzv. sérologických reakcích. Ty budou proto probrány v další části diagnostiky.

3.1.6 Průkaz nukleové kyseliny

Dělí se na **metody bez amplifikace** (klasické genové sondy) a **metody s amplifikací (namnožením) určité sekvence nukleové kyseliny**. Nejpoužívanější je dnes **polymerázová řetězová reakce (PCR)**. Podrobnější popis zde neuvádíme, neboť metoda se široce využívá i mimo mikrobiologii a naleznete ji tedy v jiných předmětech.

3.2 Metody nepřímého průkazu mikrobů (přehled a charakteristika)

3.2.1 Základní pojmy

***Poznámka:** Kromě metod nepřímého průkazu v tomto textu naleznete z praktických důvodů i jednu z přímých metod – průkaz antigenu, respektive antigenní analýzu. Je to proto, že průkaz antigenu i průkaz protilátek vychází ze stejného principu, liší se jen odpověď na otázky „co hledáme“ a „pomocí čeho to hledáme“.*

Tyto takzvané **sérologické metody** jsou metody pracující 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:

3.2.1.1 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 kmene (antigenní analýzu kmene)** – většinou k určení antigenního typu (serotypu) bakterie

3.2.1.2 Průkaz protilátky pomocí antigenu

Použije se **laboratorní antigen** a smíchá se s **pacientovým sérem** (protilátky hledáme v séru)

3.2.1.3 Ve všech případech platí, že:

- pokud **vznikl komplex antigen-protilátka, je reakce pozitivní**
- pokud komplex nevznikl, je reakce negativní (něco v ní chybí; to, co dodala laboratoř, určitě nechybí, chybí tedy to, co „měl dodat pacientův vzorek“)

3.2.2 Přehled sérologických metod

- Precipitace
- Aglutinace (a aglutinace na nosičích)
- Komplementfixační reakce (KFR)
- Neutralizace
- Reakce se značenými složkami:
 - Imunofluorescence (IMF)
 - Radioimunoanalýza (RIA)
 - Chemiluminiscenční analýza (CLIA, CMIA)
 - Enzymová imunoanalýza (EIA, ELISA)
 - Imunobloty (vlastně jde o zvláštní případ enzymové imunoanalýzy)
 - Imunochromatografické testy

Jednotlivé metody se od sebe liší především **způsobem, jak prokazujeme, zda vznikl komplex antigenu s protilátkou**. U nejjednodušších metod je komplex přímo viditelný, u jiných se musí přidávat mnoho různých složek, zato ale tyto metody bývají přesnější a spolehlivější.

3.2.3 Jak zjistit u nepřímého průkazu, jestli se jedná o probíhající infekci, nebo o infekci, které proběhla dříve?

Zatímco přímý průkaz (včetně průkazu antigenu a antigenní analýzy!) vždy dokazuje přítomnost mikrobi, u nepřímého průkazu tomu tak není. **Přítomnost protilátek pouze svědčí o tom, že se organismus někdy s mikroben setkal**. Přesto je možné aspoň s určitou pravděpodobností říci, jestli se o čerstvou infekci jedná, nebo jestli jsou protilátky nalezené v séru pacienta jen následkem infekce překonané dříve. Je potřeba využít některého z následujících tří způsobů:

Zjišťujeme, 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. Pro kvantifikaci se zpravidla určuje takzvaný **titr** – tento pojem v serologii znamená číslo, kolikrát můžeme zředit sérum pacienta, aby se nám příslušná reakce ještě stále jevila jako pozitivní. Laboratoř většinou používá ředění séra tzv. **geometrickou řadou** – sérum se předředí třeba desetkrát, a pak už – do dalších důlků ve stejném řádku plastové mikrotitrační destičky – dvakrát, a ještě dvakrát, a ještě dvakrát.... takže výsledná ředění jsou 1 : 10, 1 : 20, 1 : 40, 1 : 80 atd. Sleduje se hlavně **změna titru protilátek 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. Pokud pacient infekci kdysi prodělal a nyní ji už dávno nemá, má zpravidla nízký titr, který se v čase nemění nebo se mění jen nepatrně.

Zjišťujeme, k jaké třídě patří nalezené protilátky – to ovšem principiálně umožňují pouze reakce se značenými složkami. Převaha třídy IgM nad třídou IgG svědčí pro akutní infekci, přítomnost protilátek IgG bez třídy IgM většinou znamená infekci, která byla prodělána v minulosti a nyní už neprobíhá. U reakcí se značenými složkami se zpravidla používá pouze toto, tj. už se nepoužívá ředění geometrickou řadou a nesleduje se změna titru v čase.

Zjišťujeme tzv. aviditu, to je síla vazby protilátky na antigen. Čerstvé protilátky mají nižší aviditu než protilátky u infekcí, které už probíhají delší dobu