

Lékařská mikrobiologie pro ZDRL

Týden 7:

Antibiotika III (dokončení)

Pokus na zvířeti

**Genetické metody v
mikrobiologii**

The background features abstract, colorful swirls in shades of purple, green, and blue, interspersed with several yellow triangles pointing in various directions. The overall style is clean and modern.

Antibiotika III



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 4

U kterých mikrobů se zjištění citlivosti 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)

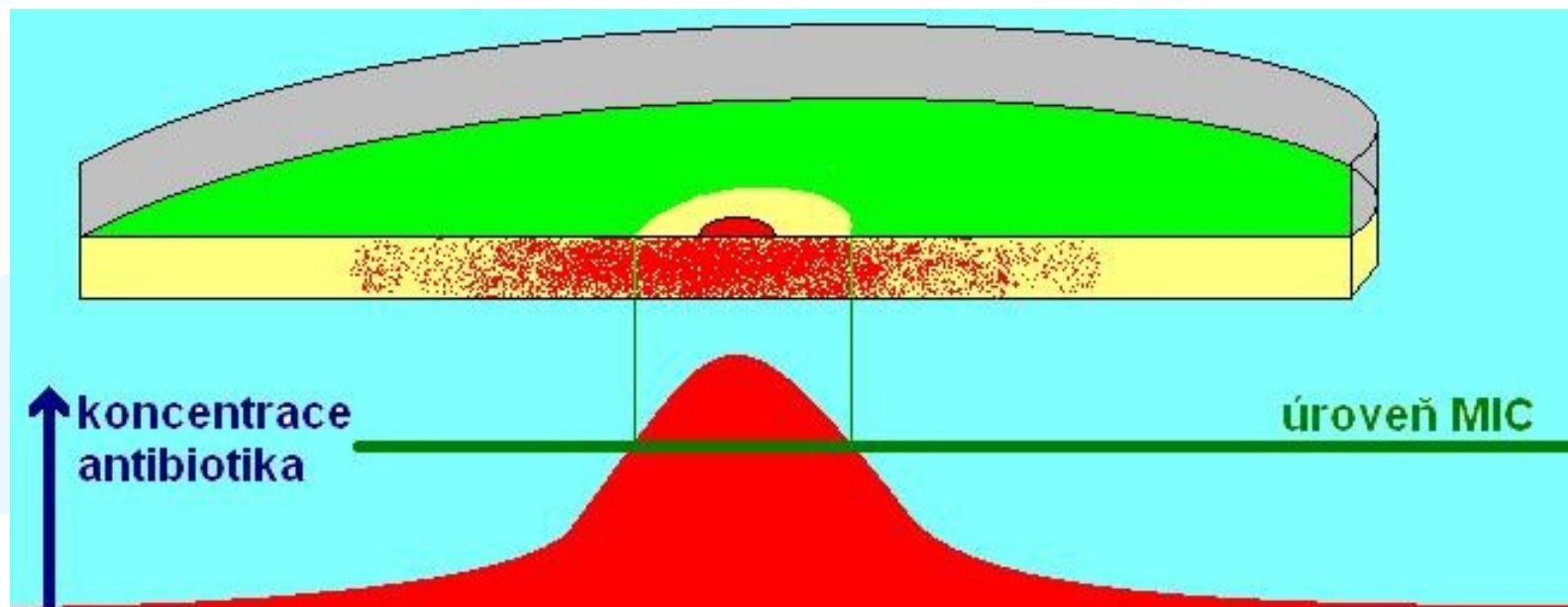
Příklady problémů při určování citlivosti

- **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

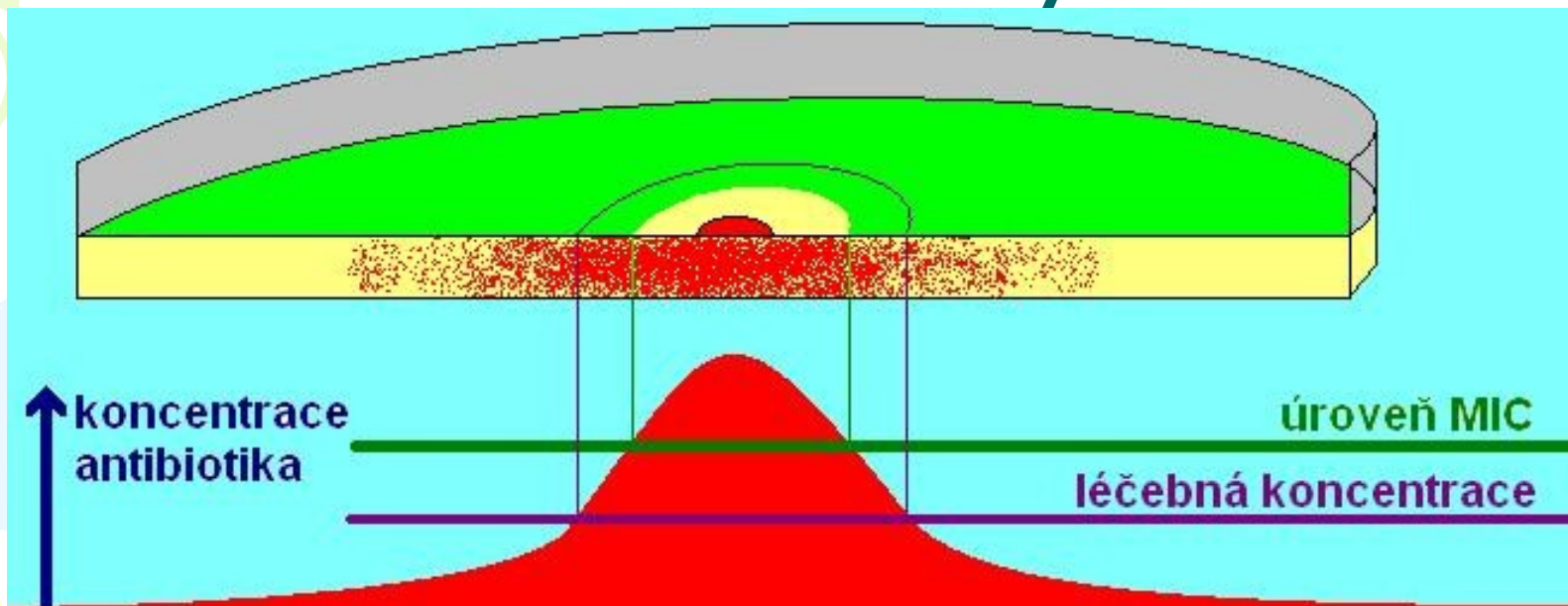


- Antibiotikum difunduje z disku, který je jím napuštěn, agarem. Čím dále od disku, tím je menší koncentrace antibiotika. V určitém bodě antibiotikum přestává být schopno inhibovat růst dané bakterie. (= koncentrace už je nižší než minimální inhibiční koncentrace – MIC)

Referenční mez

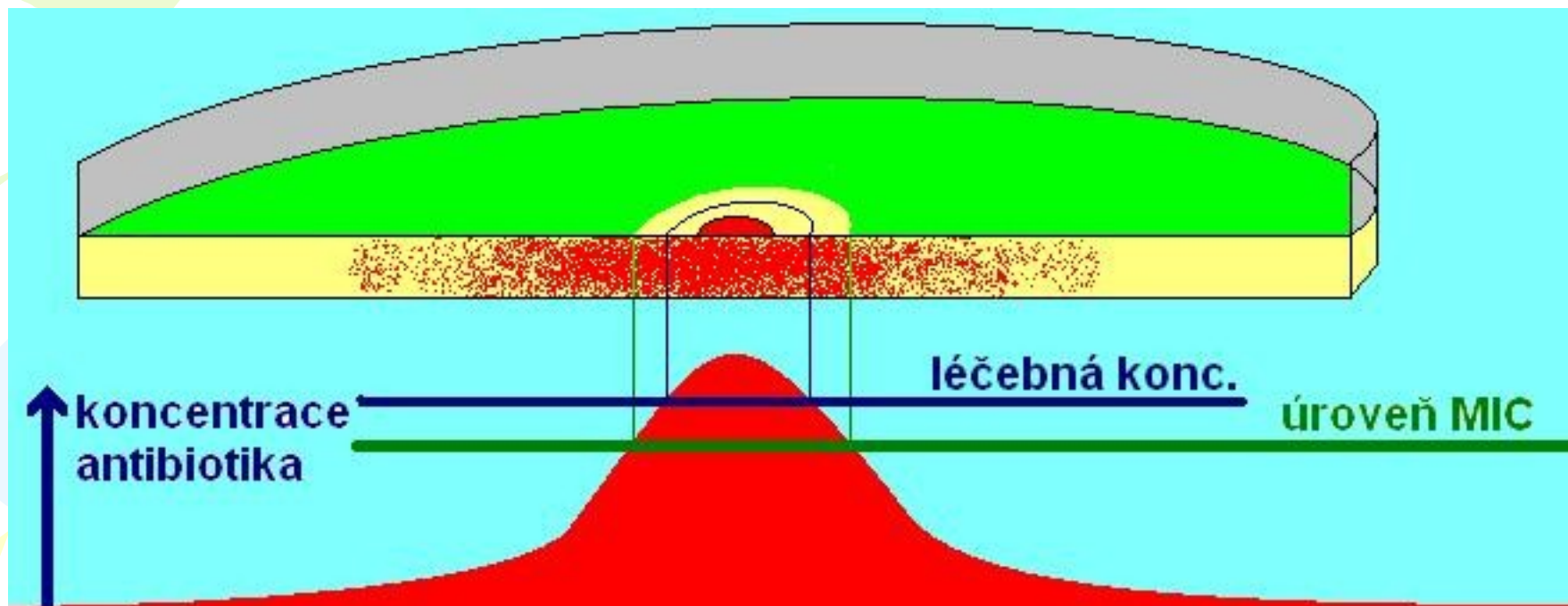
- Pro každé antibiotikum (respektive kombinaci antibiotikum-mikrob) je stanovena **hranice** (průměr zóny), které musí naměřená zóna dosahovat, aby kmen mohl být hodnocen jako **citlivý**
- Pro zjednodušení si můžeme představit, že hranice odpovídá **koncentraci, která se při léčbě ustálí v séru pacienta** („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 antibiotikum₁ 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 nepřímo 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

CITLIVÝ



REZISTENTNÍ



- **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

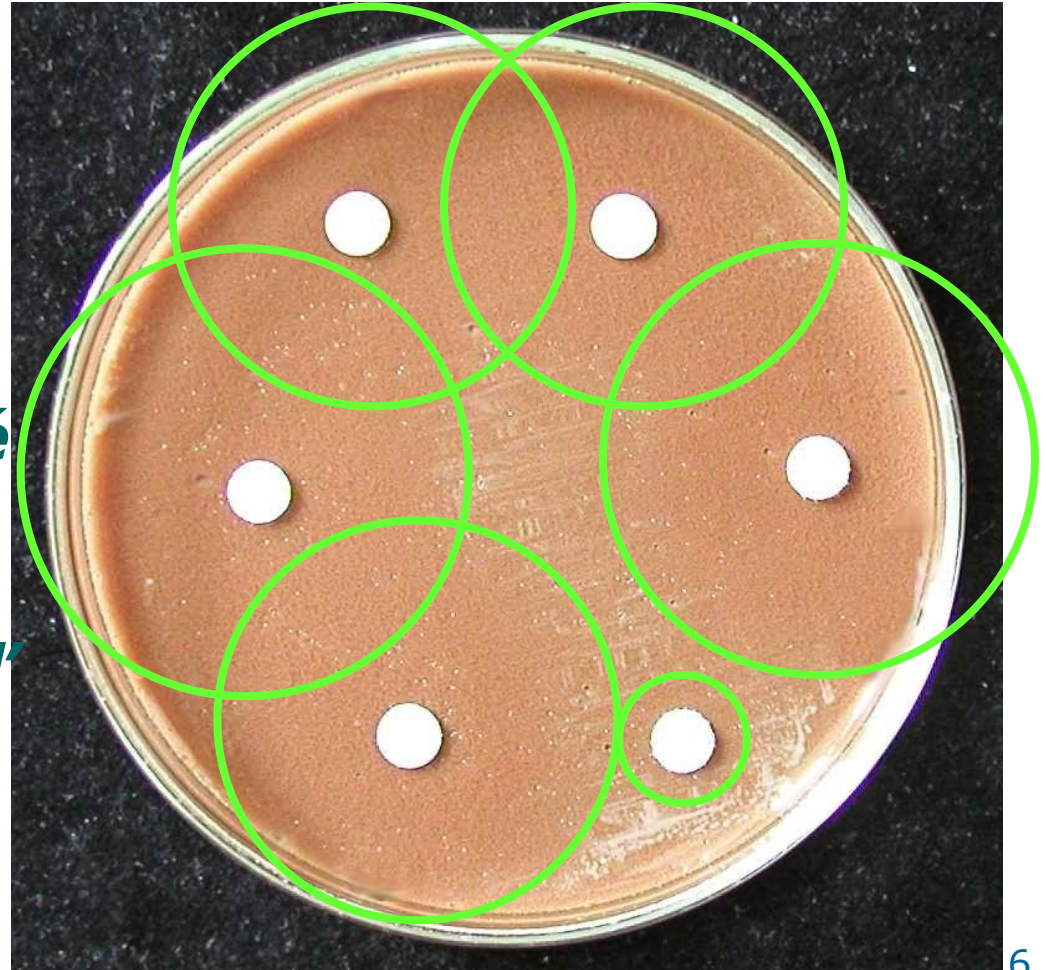


www.medmicro.info

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



Automatizace

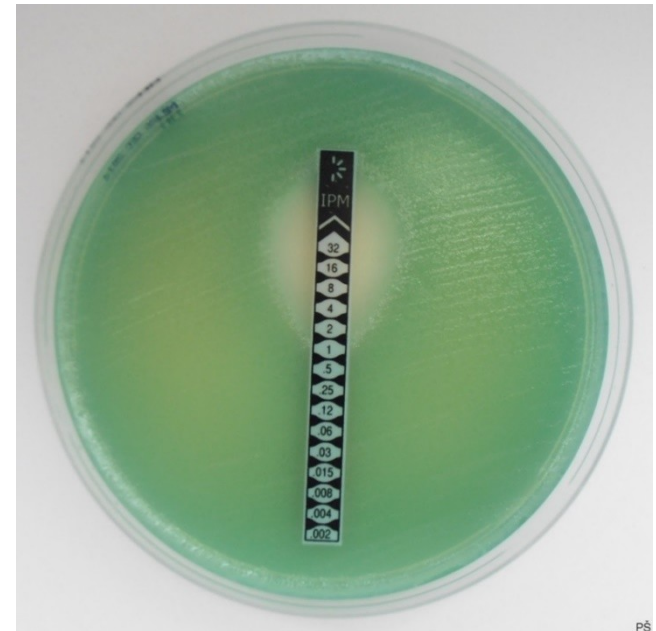


<http://www.bio-rad.com/en-ca/sku/93400-adagio-system>

- Automatizovaný odečet a interpretace citlivosti × rezistence k ATB
- Vhodný software umožňuje i sledování trendů v rezistenci k ATB a přispívá i ke sledování nozokomiálních nákaz

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.



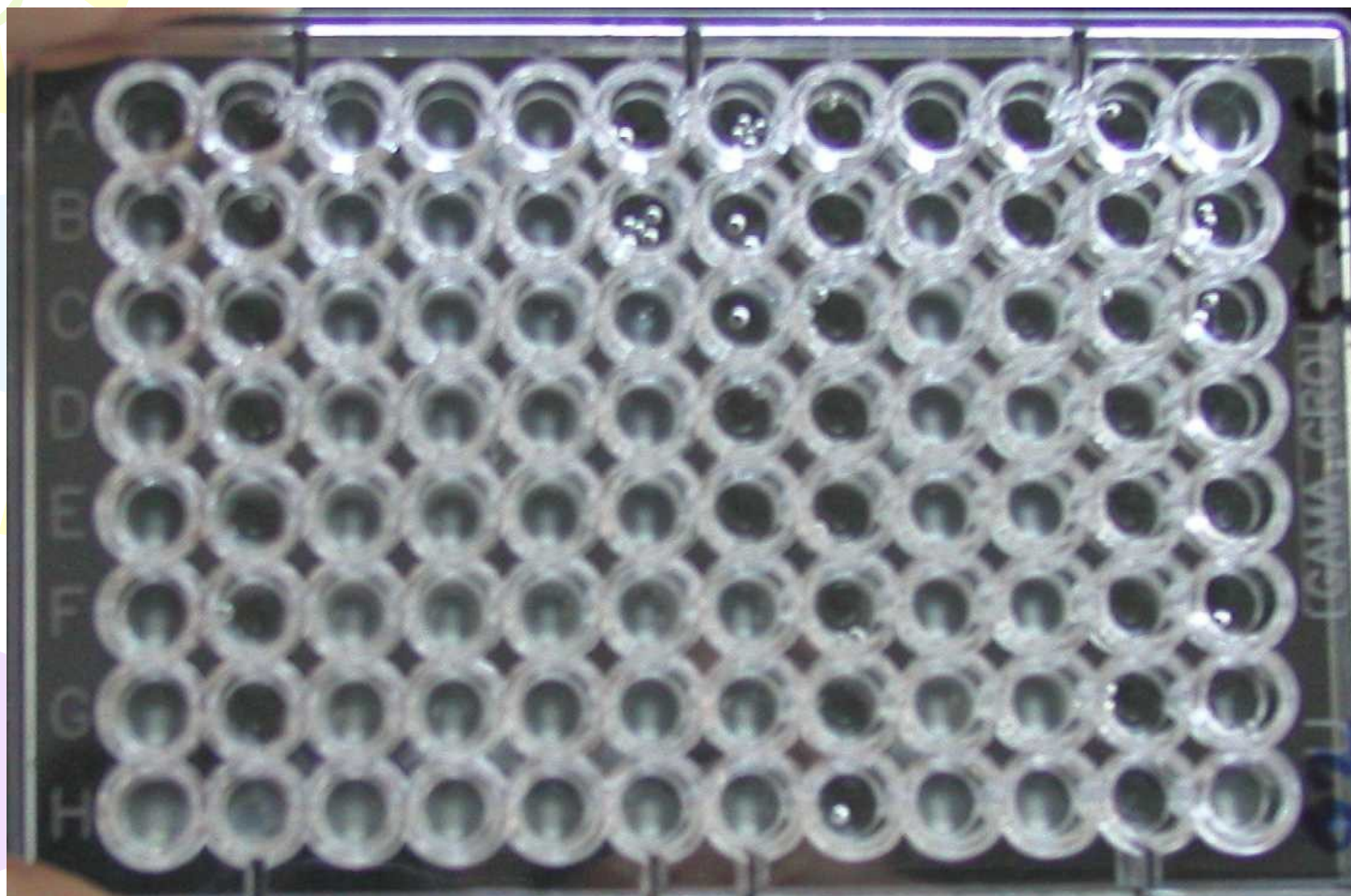
Hodnoty breakpointů

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

Mikrodiluční test

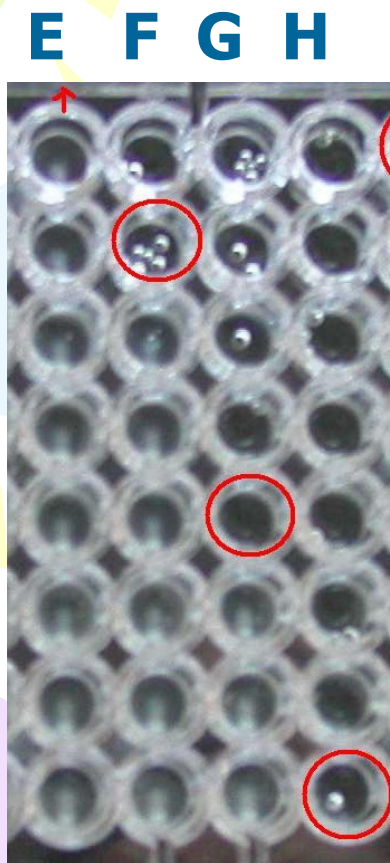
- Antibiotikum je v **řadě důlků** v plastové destičce, koncentrace postupně klesá
- **Nejnižší koncentrace, která inhibuje růst,** představuje hodnotu **MIC**
- V přiložené šabloně je zpravidla označen **breakpoint**. Je-li MIC nižší než breakpoint, je kmen citlivý. Je-li MIC vyšší, je rezistentní
- 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 růstu*)

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 breakpoint, 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 prokážeme růst mikrobů například pH indikátorem,



Problémy

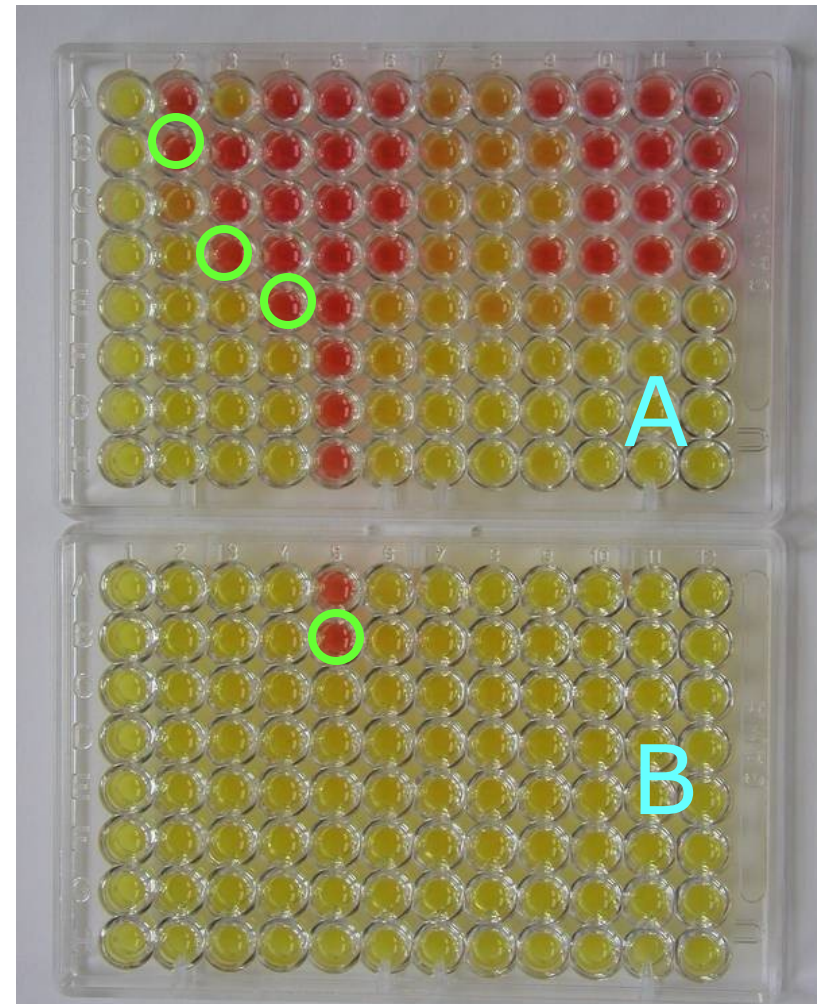
Hodnoty MBEC jsou často mnohem vyšší než MIC. Při použití destičky s koncentracemi pro MIC se může stát, že naměříme jen výjimečně nějakou hodnotu (vše ostatní bude „vyšší než“)

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

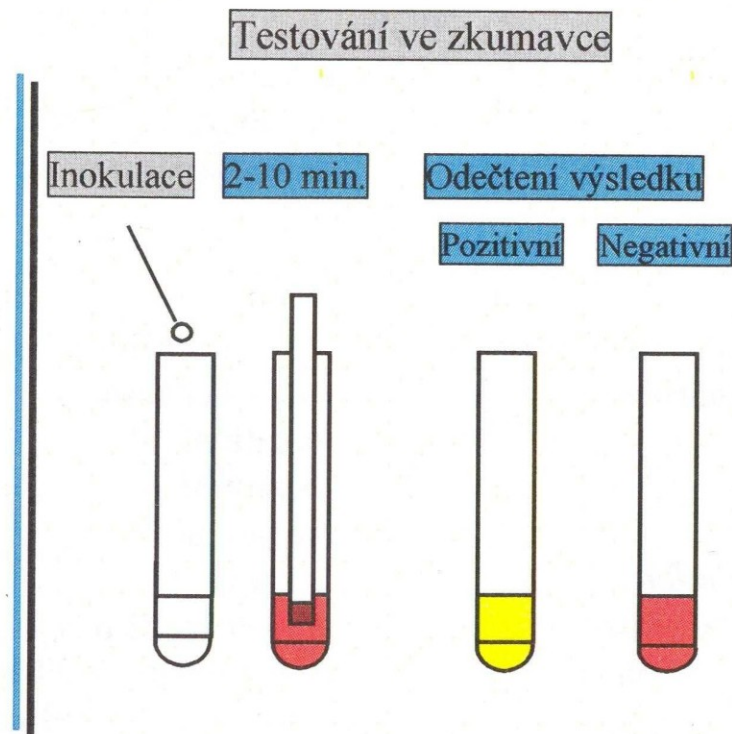
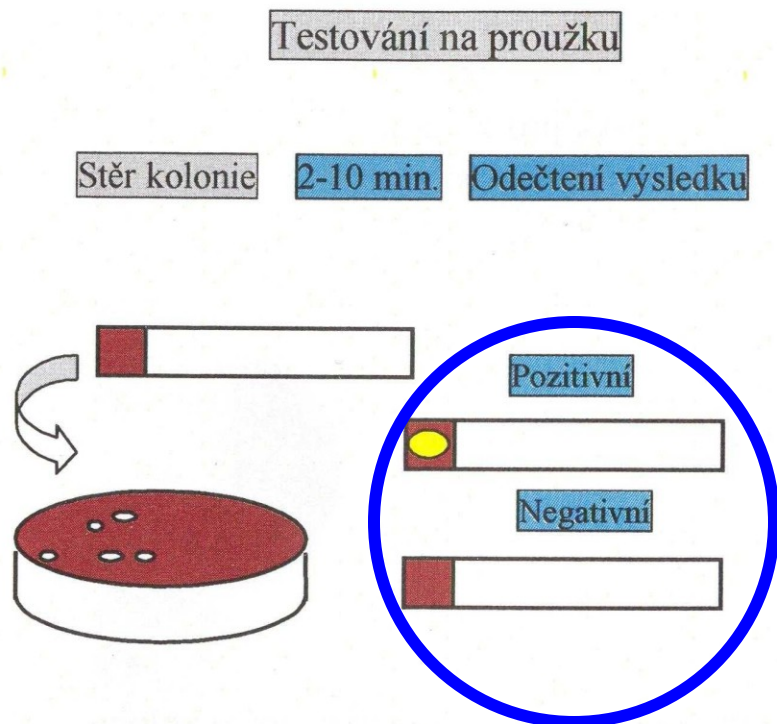
- Někdy je lépe speciálními metodami zjišťovat **přítomnost konkrétních faktorů rezistence**, např. betalaktamáz.
- Může se jednat o **diagnostické proužky** (chemický průkaz daného enzymu) nebo **testy na jiném principu**.
- Používá se
 - tam, kde **testy citlivosti nedávají spolehlivé výsledky** (z 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

Vyhodnocení

Obrázky z letáku výrobce testu

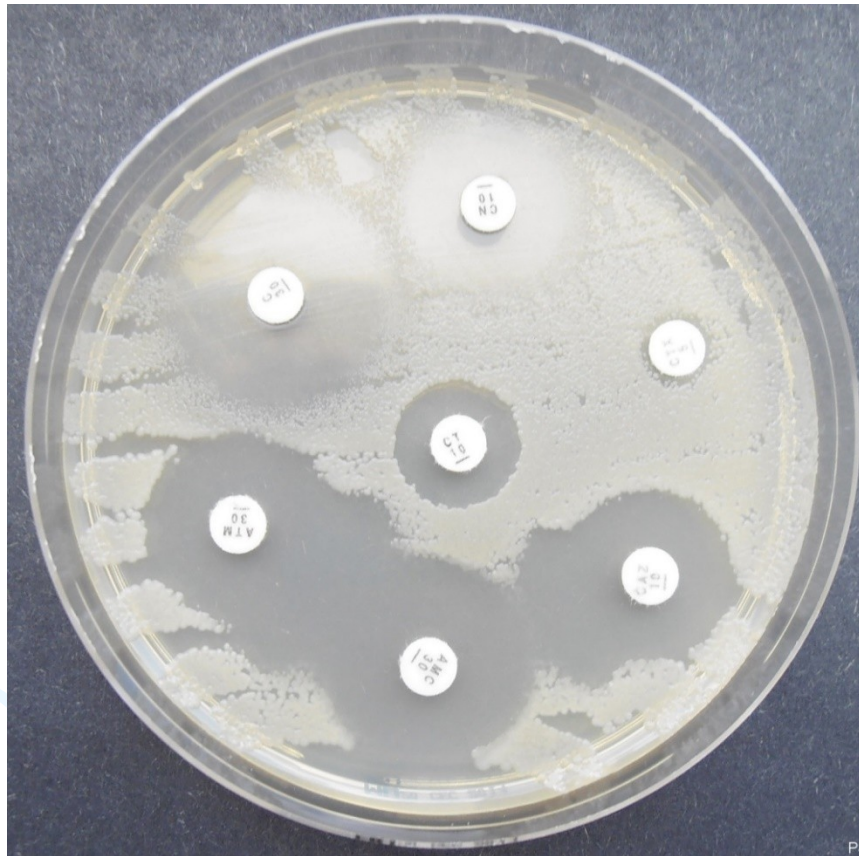


9. Hodnocení testu:

Negativní reakce: roztok zůstal červený nebo v místě nanesené kolonie nedošlo k barevné změně

Pozitivní reakce: roztok zežloutl nebo v místě nanesené kolonie došlo ke vzniku žlutě zbarvené skvrny

Testování na produkci ESBL (širokospektrých betalaktamáz)



Testování na produkci ESBL (širokospektrých betalaktamáz)

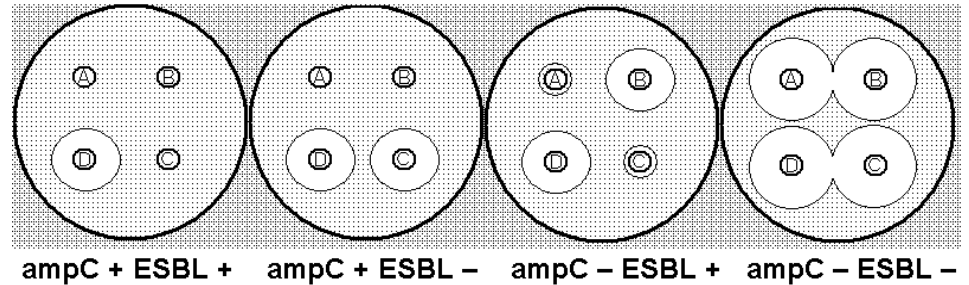
- U širokospektrých betalaktamáz má **inhibitor betalaktamázy** (např. kyselina klavulanová) svůj **účinek**, i když není dle dostupných údajů dostatečný pro léčbu in vitro. Lze ho však **využít** – činí-li rozdíl mezi zónami kolem disků cefotaximu (ceftazidimu) bez inhibitoru a s ním více než pět milimetrů,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



„ABCD“ test

U tohoto testu ověřujeme přítomnost dvou typů betalaktamáz najednou.

Rozdíly mezi jednotlivými antibiotiky jsou typické buď pro **betalaktamázu typu ESBL**, nebo pro **ampC betalaktamázu konstitutivního typu**



A = CPD (cefpodoxim), B = CPD + ESBL inhibitor, C = CPD + ampC inhibitor, D = CPD + oba inhibitory

ESBL pozitivní: B a D jsou větší než A a C (rozdíl 5 mm a více)

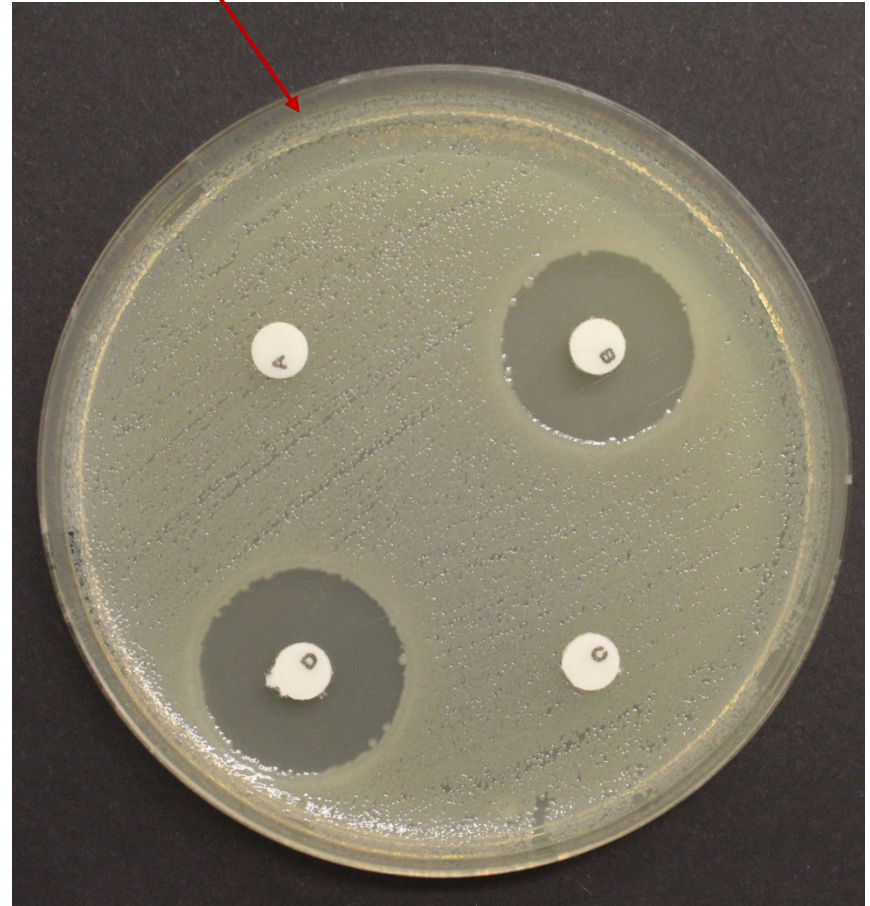
ampC pozitivní: C a D jsou větší než A a B (rozdíl 5 mm a více)

ESBL a ampC pozitivní: D je větší než ostatní, ostatní se vzájemně neliší

Výrazný ESBL producent



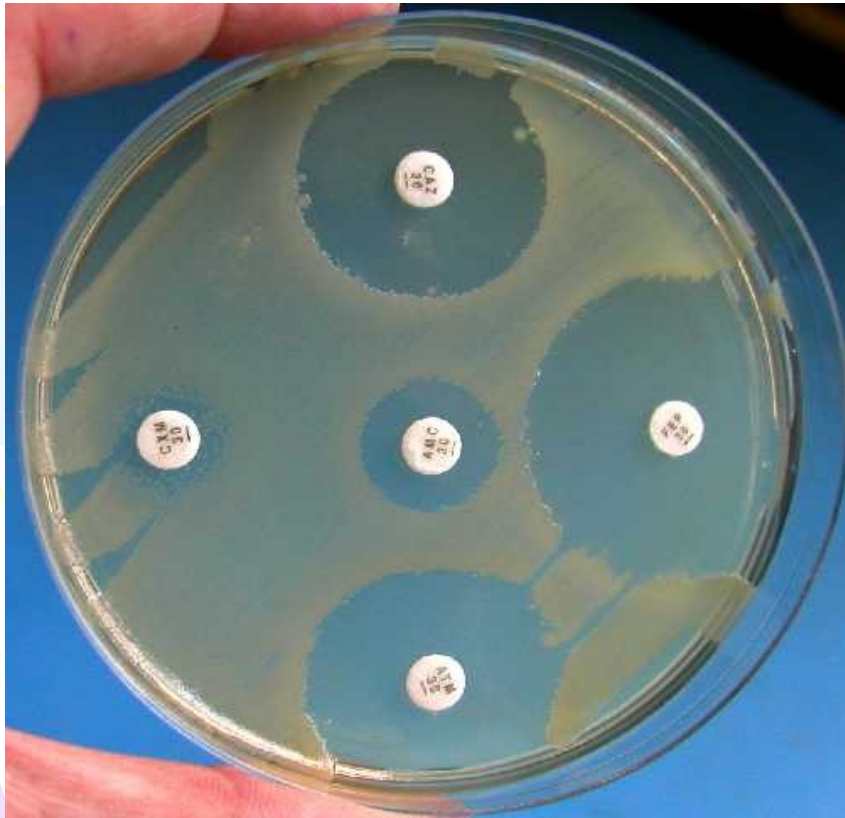
Negativní výsledek



Testování kmenů na konstitutivní typ produkce betalaktamáz typu AmpC

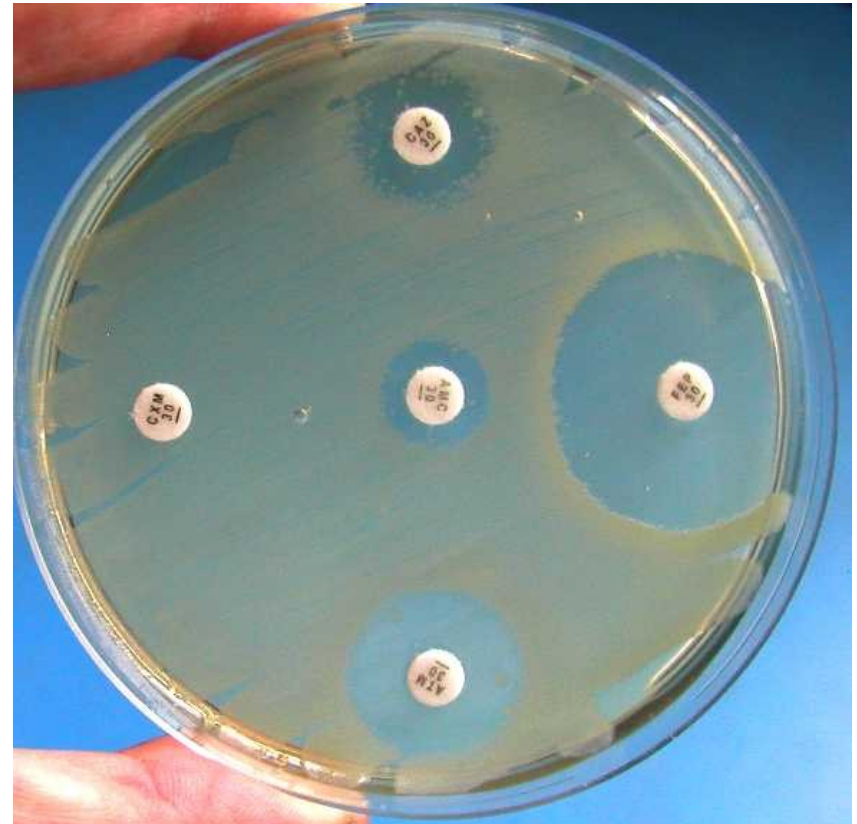
- Betalaktamázy AmpC jsou druhem širokospektrých betalaktamáz. Na rozdíl od širokospektrých ESBL v užším slova smyslu jsou ale kmeny (snad?) citlivé na cefalosporiny čtvrté generace
- Konstitutivní typ znamená, že **rezistence je trvalá vlastnost**
- Testuje se na běžném MH agaru a na MH s oxacilinem.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

Stejný kmen na MH a na MH s oxacilinem: porovnejte



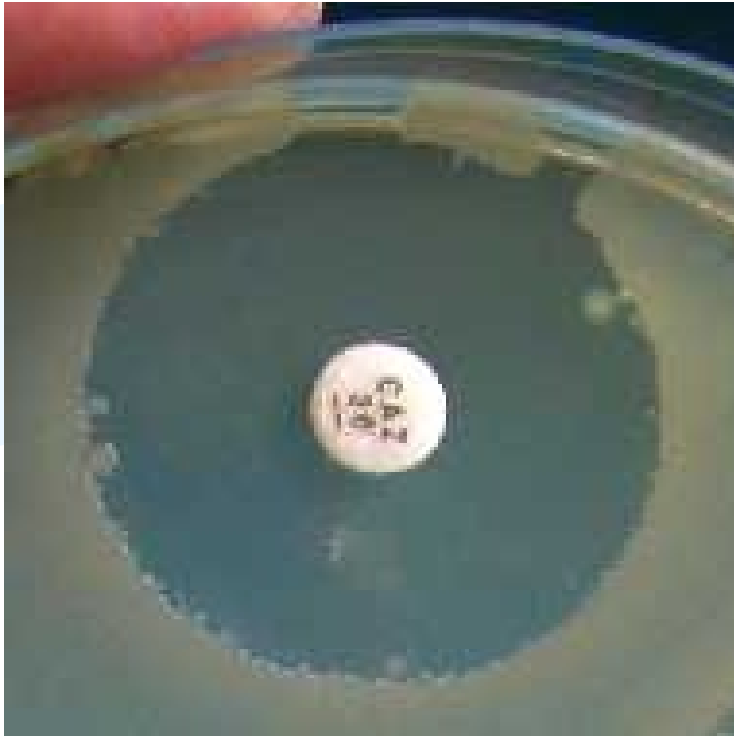
MH + OXA

Foto O. Z.



MH

Detaily předchozích obrázků



MH + OXA

Foto O. Z.



MH

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>

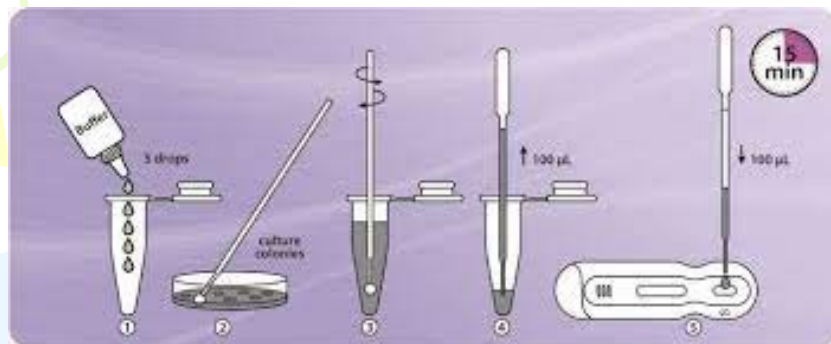


Figure 1b: Organism showing blunting of ceftazidime/cefotaxime zone of inhibition adjacent to cefoxitin disc (presumptive AmpC producer)

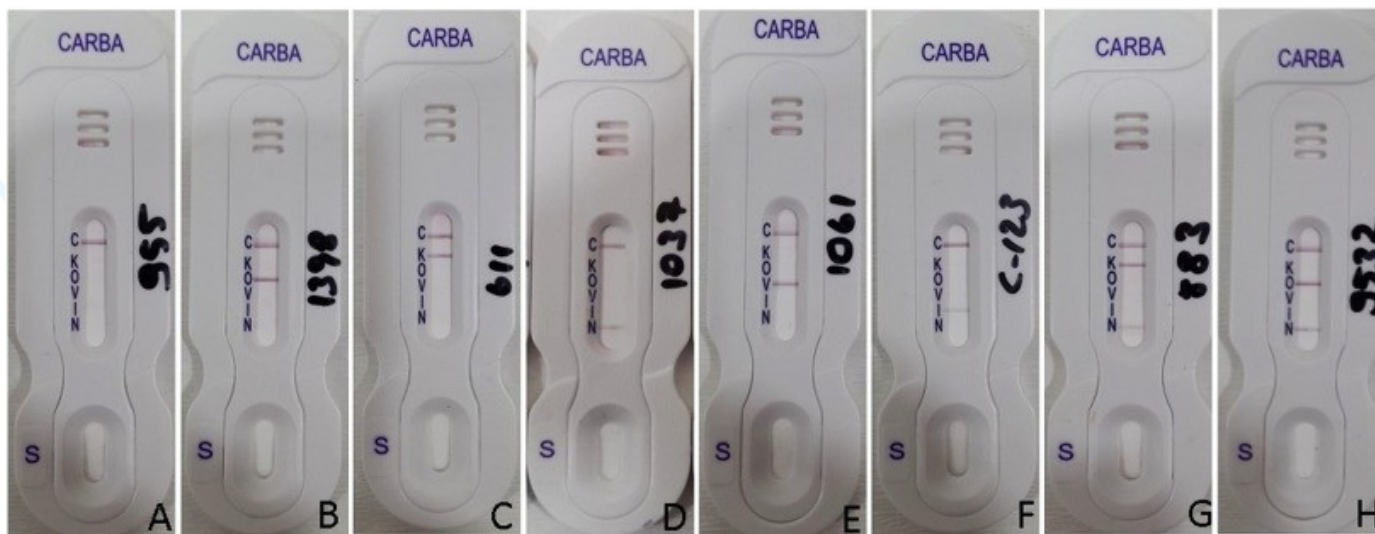
Metalobetalaktamázy (MBL) a KPC (*K. pneumoniae* karbapenemázy) metalobetalaktamázy

- Metalobetalaktamázy (obsahují atom Zn): štěpí i karabapenemy meropenem, imipenem a ertapenem. Jsou rezistentní na všechny cefalosporiny a peniciliny (včetně IV. generace a kombinace piperacilin/tazobaktam)
- 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 metalobatalaktamáz s výjimkou aztreonamu)⁴²

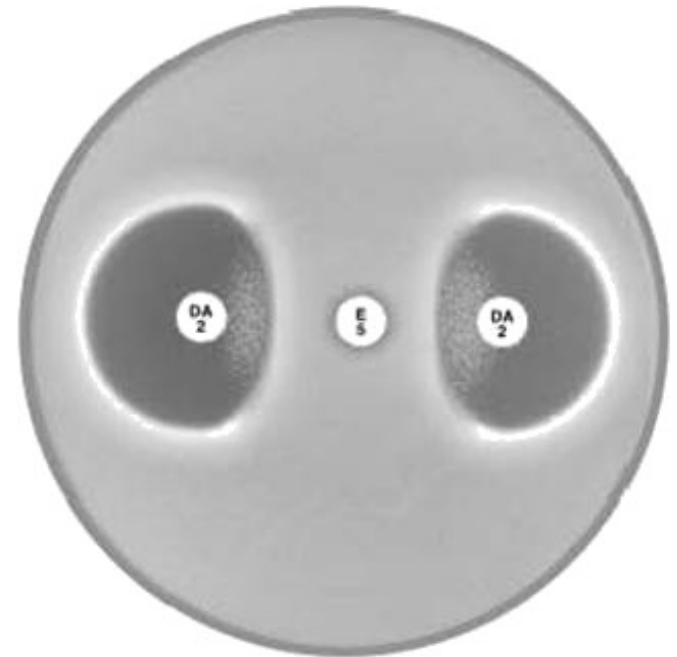
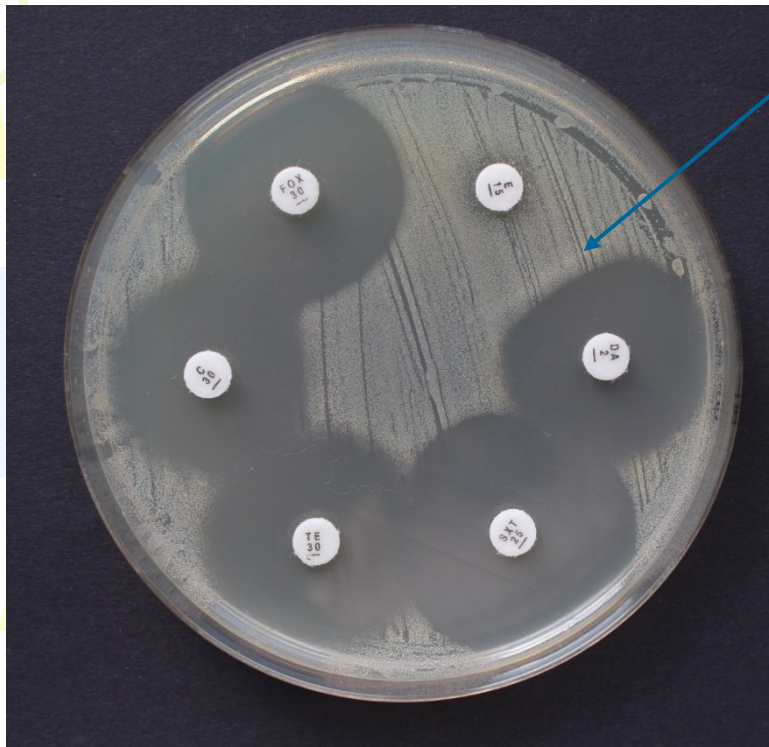
Průkaz karbapenemáz



Pět nejčastějších a nejdůležitějších typů karbapenemáz lze prokázat i pomocí imunochromatografie



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



Pokus na zvířeti

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

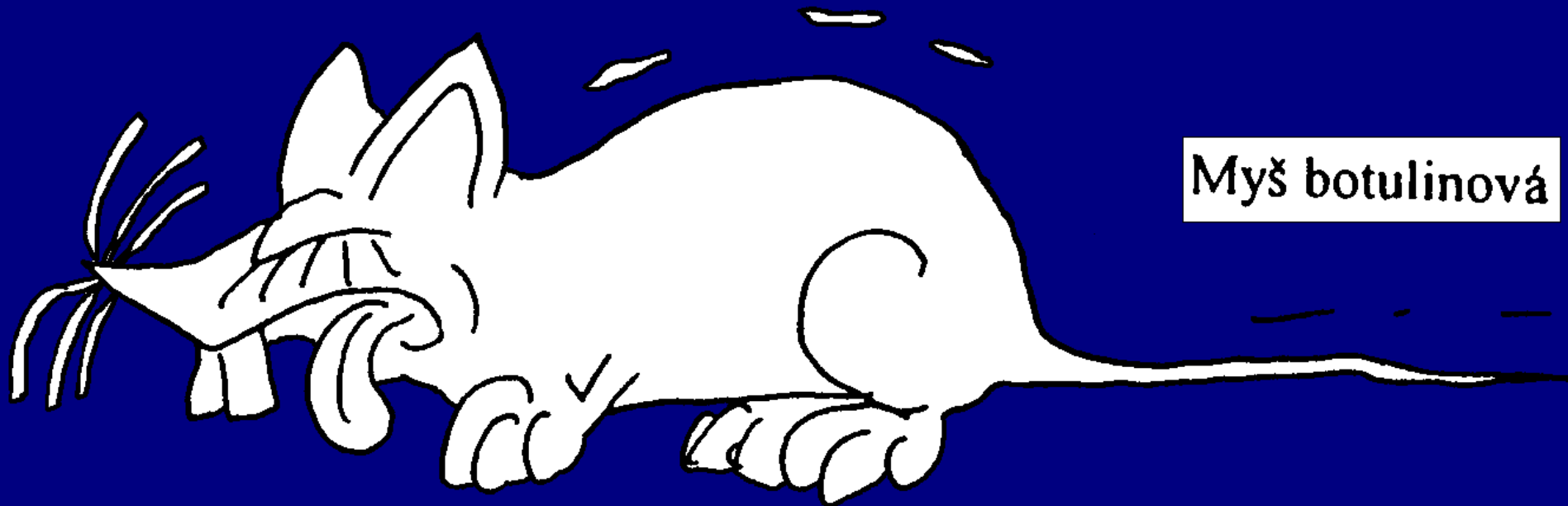
- **Přímé metody** (*práce se vzorkem či kmenem*)
 - Mikroskopie (nativní preparát, barvení...)
 - Kultivace (na tekutých i pevných půdách)
 - Identifikační metody
 - Průkaz antigenu (pomocí protilátky)
 - **Pokus na zvířeti (izolace, průkaz toxicity)**
 - **Průkaz nukleové kyseliny**
- **Nepřímé metody**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

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 a dalších metod. Dnes se používá už jen zřídka.



Myš botulinová



Myš botulinová

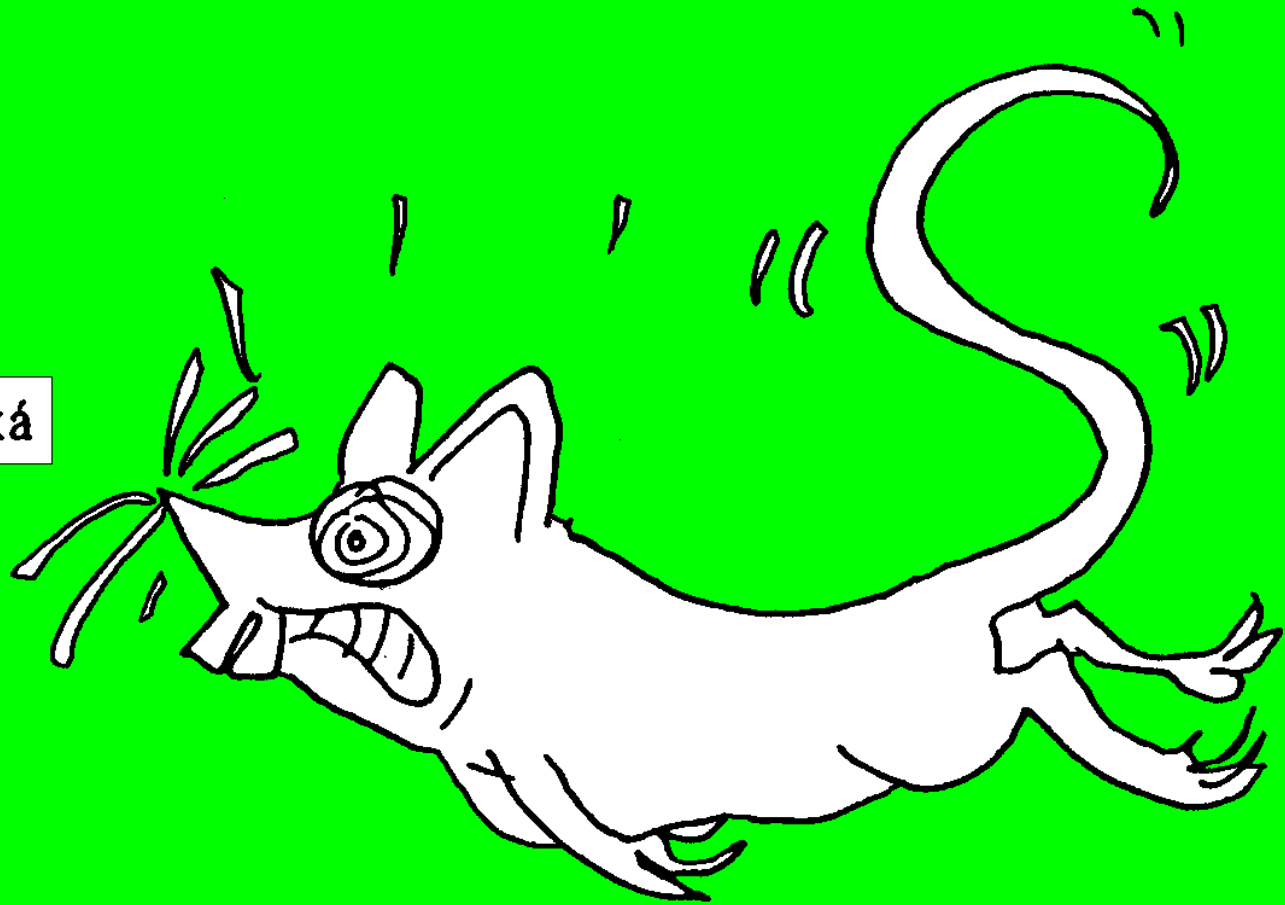
Autorem tohoto a dalších obrázků je Petr Ondrovčík. Obrázek je graficky upraven.

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“. Bude probráno v přednášce věnované patogenitě a virulenci.

- 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



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, např. **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.

<https://www.mall.cz/mysi/yenkee-yms-1025bk-mys-usb-quito-cerna?tab=reviews>

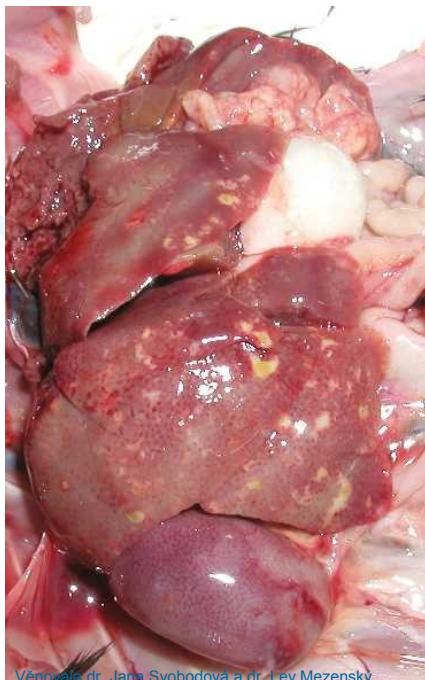
Králík

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



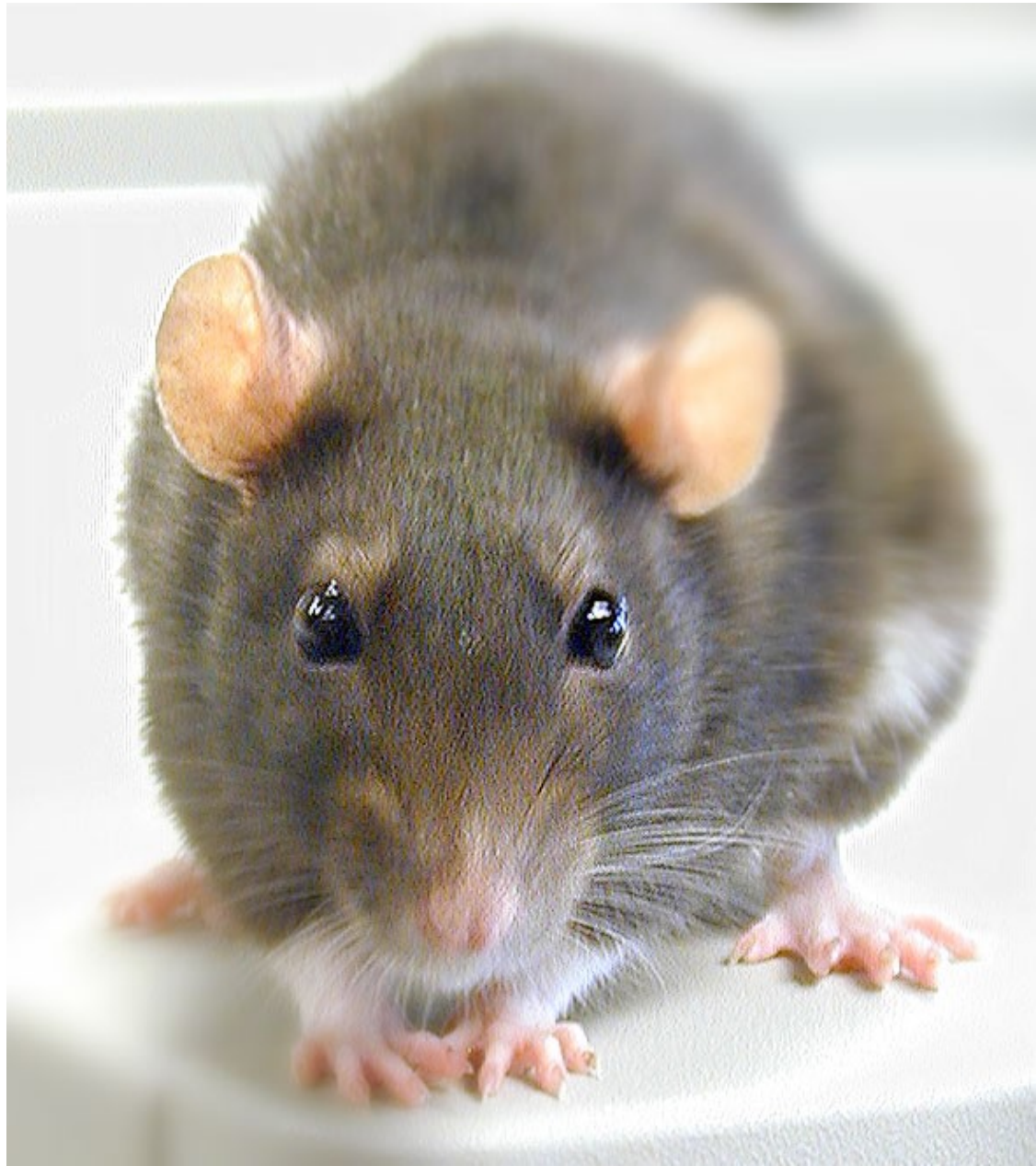
Věnovala dr. Jana Svobodová a dr. Lev Mezenský



<https://www.abicko.cz/clanek/precti-si-priroda/18296/kde-se-vzalo-morce-zviratka-nejen-na-mazleni.html>

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.



Jiná
zvířata

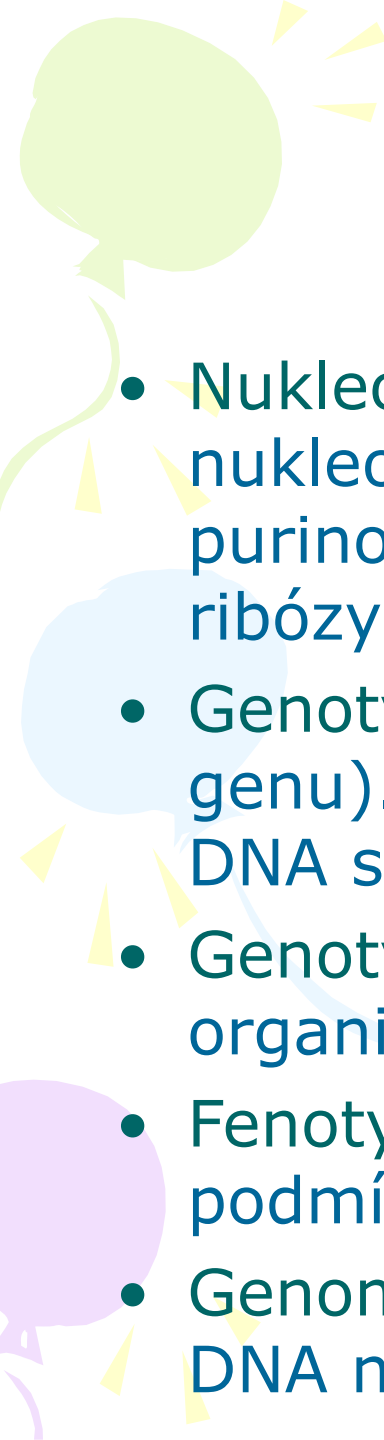
The background features abstract, colorful swirls in shades of purple, green, and blue, interspersed with several yellow triangles pointing in various directions, creating a dynamic and artistic feel.

Genetické metody v mikrobiologii



Důležité upozornění

- Průkaz DNA nebo RNA metoda přímého průkazu
- Detekce jednotlivých genů
- Analýza celého genomu (zatím spíše ne, epidemiologické studie, výzkum)
- Naším cílem je **seznámit studenty s přehledem využitelnosti těchto metod v lékařské mikrobiologii.**

- 
- Nukleová kyselina: makromolekula z monomerů nukleotidů. Nukleotid se skládá ze 3 částí purinové nebo pyrimidinové báze, sacharidu ribózy nebo deoxyribózy a fosfátu
 - Genotyp: sada alel organismu (alela je forma genu). Pokud se zkoumá genotyp, zkoumají se DNA sekvence.
 - Genotypizace: určování genotypu jednoho organismu
 - Fenotyp: pozorované charakteristiky organismu podmíněné jeho genotypem
 - Genom: veškeré genetické informace uložené v DNA nebo RNA (u virů) konkrétního organismu.

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 vyčlenily 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

Rozdělení metod průkazu NA

- **Metody bez amplifikace** (genetické sondy). Jsou méně citlivé, to je někdy i výhoda
- **Metody s amplifikací**
 - **Polymerázová řetězová reakce (PCR)** velmi citlivá, stačí i 1 molekula DNA. Lze ovšem uměle citlivost snížit.
 - Real-time PCR (=kvantitativní PCR qPCR)
 - **Průkaz virové RNA** je možný pomocí upravené PCR, využití **reverzní transkripce (RT-PCR)**
 - **Ligázová řetězová reakce (LCR)** je velmi podobná (ale zavedla ji jiná firma)

Metody bez amplifikace

- Genová sonda

- Uměle připravený úsek DNA (známá sekvence DNA) se váže na dané sekvence vyšetřované DNA na základě principu komplementarity. Sonda je značená (radioaktivními nukleotidy, chemicky značené nukleotidy např. biotinem) to umožňuje vizualizaci

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

Genová sonda

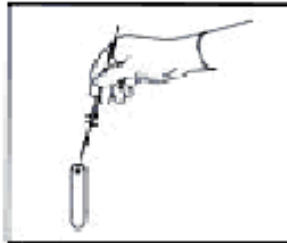
www.pemed.com

- proces hybridizace* není přímo viditelný → molekuly sondy značeny (digoxigenin, biotin, ...)
- značky specificky rozpoznány konjugátem (konjugace s fluoroforem nebo enzymem pro zviditelnění reakce)



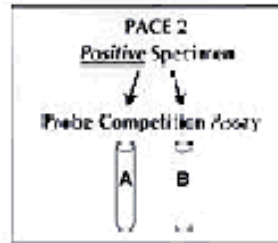
Použití genové sondy www.chlamydiae.com

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



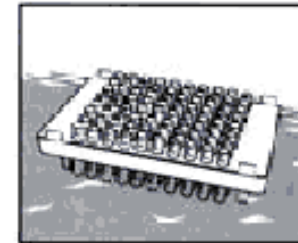
1. Sample Preparation

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).



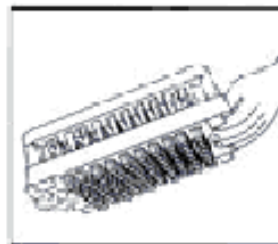
3. Hybridization

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



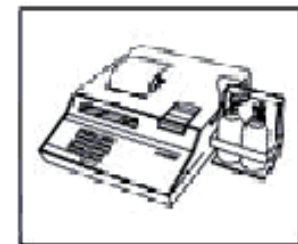
4. Separation

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

- PCR (polymerázová řetězová reakce), LCR (ligázová řetězová reakce), NASBA (nucleic acid sequence based amplification)
- PCR:
 - 1983 – vyvinuta (dr. Karry Mullis)
 - 1985 – použita termostabilní polymeráza → reakce jak ji známe dnes (Taq polymeráza)
 - 1993 – Nobelova cena za chemii (Mullis, Smith)
- LCR vyvinuta v roce 1991
- NASBA vyvinuta v roce 1991

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)

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
 - E-swab

Postup analýzy NA s amplifikací

- **V první fázi** je nutno získat izolovanou NA. 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
 - použitím fluorescenční sond

Izolace DNA: fenol-chloroform

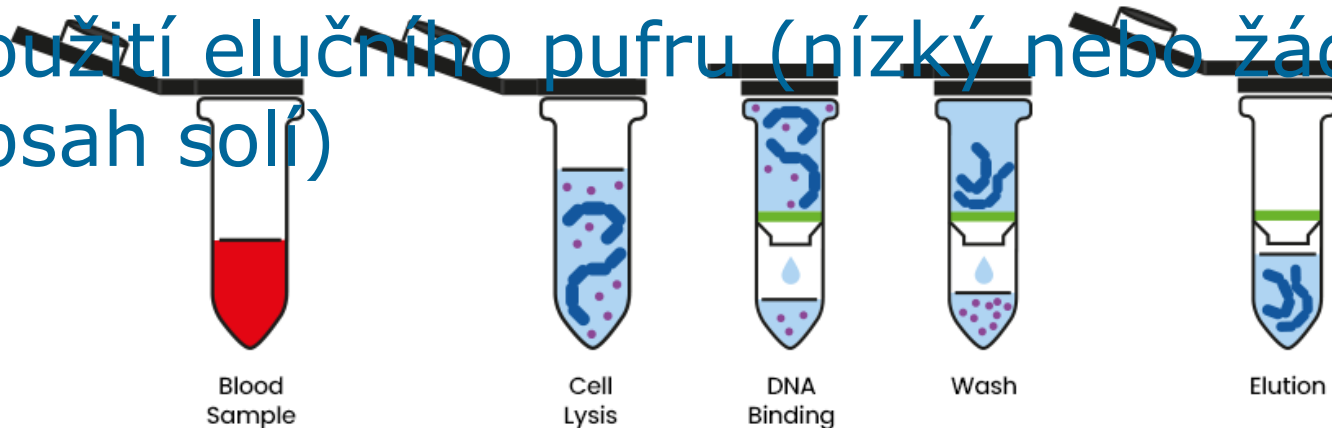
- fenol chloroformová extrakce je základní postup (moderní metody dále)
- promíchání lyzátu buněk (vodná fáze) s roztokem fenolu, případně se směsí fenolu a chloroformu (organická fáze)
- fenol je organické rozpouštědlo používané k denaturaci a oddělení proteinů od NK
- proteiny jsou hydrofobnější a zůstávají na rozhraní fází a částečně v organické fázi
- NK jsou vysoce nabitě a přecházejí do vodné fáze
- chloroform denaturuje proteiny, rozpouští tuky a napomáhá oddělení jednotlivých fází získaných v následujícím centrifugačním kroku

Izolace DNA: fenol-chloroform

- centrifugace: dojde k oddělení–spodní organické fáze, tvořené fenolem (případně směsí fenolu a chloroformu)–mezifáze, tvořené denaturovanými proteiny a zbytky buněk–horní vodné fáze, v níž jsou rozpuštěny NK a polysacharidy
- odebrání horní fáze a vysrážení NK etanolem, případně izopropanolem
- shromáždění precipitátu nukleových kyselin centrifugací a rozpuštění získaného sedimentu ve vhodném pufru

Izolace DNA: Silika kolonky

- vysoká adsorpce DNA na silikát v přítomnosti chaotropních solí (guanidinium thiokyanát, ...)
- opakovaným promýváním a centrifugací s guanidinium thiokyanátem se odstraní kontaminující složky
- přenést kolonku na novou zkumavku
- DNA zůstává adherovaná na silikátu až do použití elučního pufru (nízký nebo žádný obsah solí)



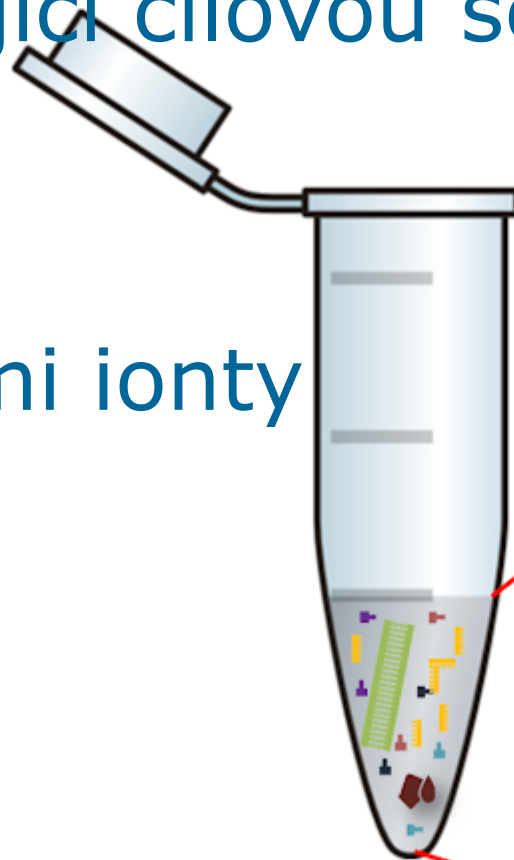
Izolace DNA: Magnetické částice

- magnetické částice: kulovité útvary, jejich jádro je tvořeno nejčastěji oxidy železa, povrch je modifikován tak, aby mohl vázat vlákna nukleových kyselin (např. SiO_2 , ...)
- magnetické částice přidáme ke vzorku a molekuly NA se na ně naváží
- během izolace NA zkumavku přiblížíme k magnetu, magnetické částice se přitáhnou ke stěně zkumavky a zbylý roztok s nenávaznými částicemi se odstraní
- následuje promývání a uvolnění NK z komplexu do pufru



Polymerázová řetězová reakce (PCR)

- templátová DNA
- primery ohraničující cílovou sekvenci
- polymeráza
- nukleotidy
- pufr s hořčnatými ionty



DNA template
Primers
Nucleotides
Taq Polymerase
Buffer mix

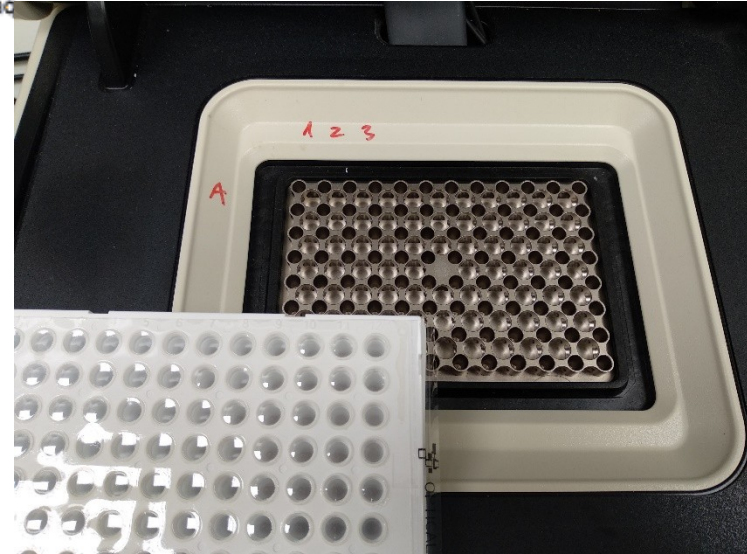
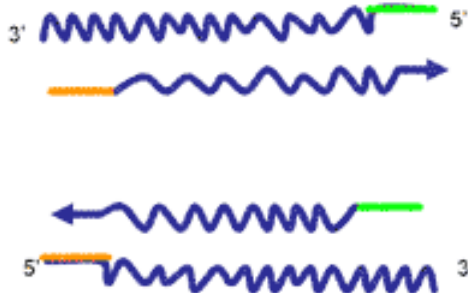
Polymerázová řetězová reakce: PCR

- Denaturace DNA rozpletení dvoušrobovice na jednořetězcová vlákna, vysokou teplotou
- Nasednutí primerů (hybridizace na základě principu komplementarity), snížení teploty
 - Primer - krátká nukleotidová sekvence (20-30 bází). Ohraničují místo, které má být amplifikováno.
- Syntéza nových kopií DNA termostabilní DNA polymerázou, optimálně pracuje při 72 °C
- Opakování těchto kroků 20-40x v termocykleru
- Vizualizace je možná např. fluorescencí

PCR proces

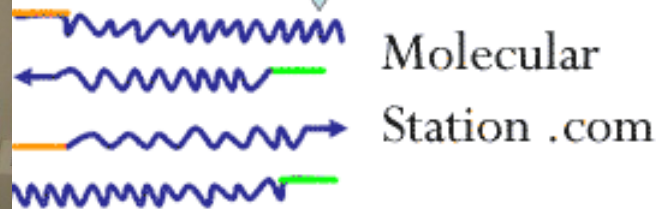


Primers extended by Taq polymerase at 70°

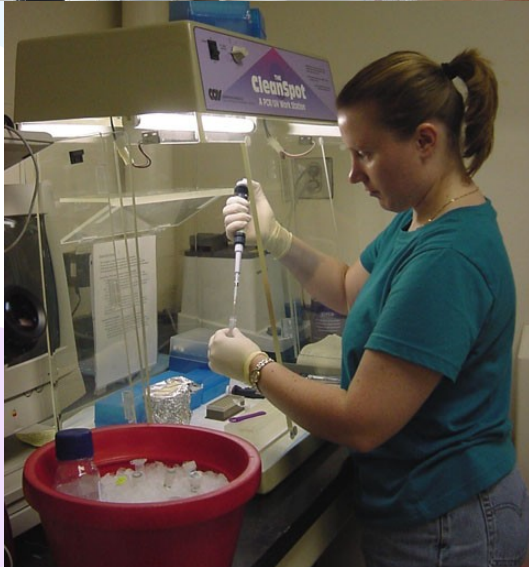
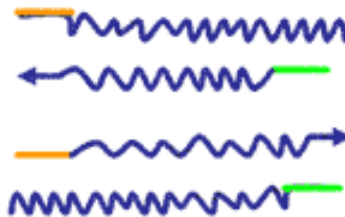


Copyright

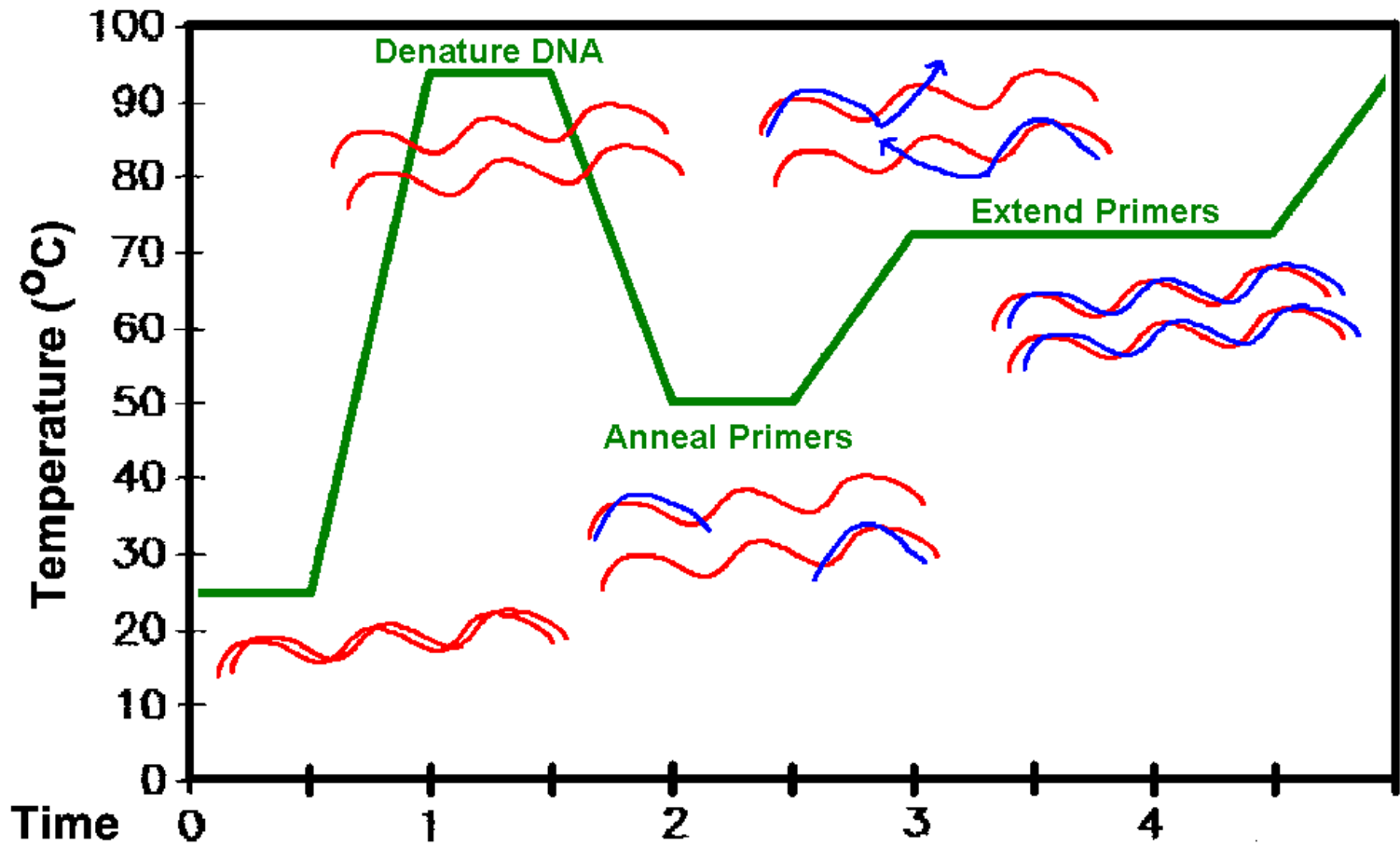
- Heat to 95° to melt strands
- Cool to 65° to anneal primers



Molecular
Station .com

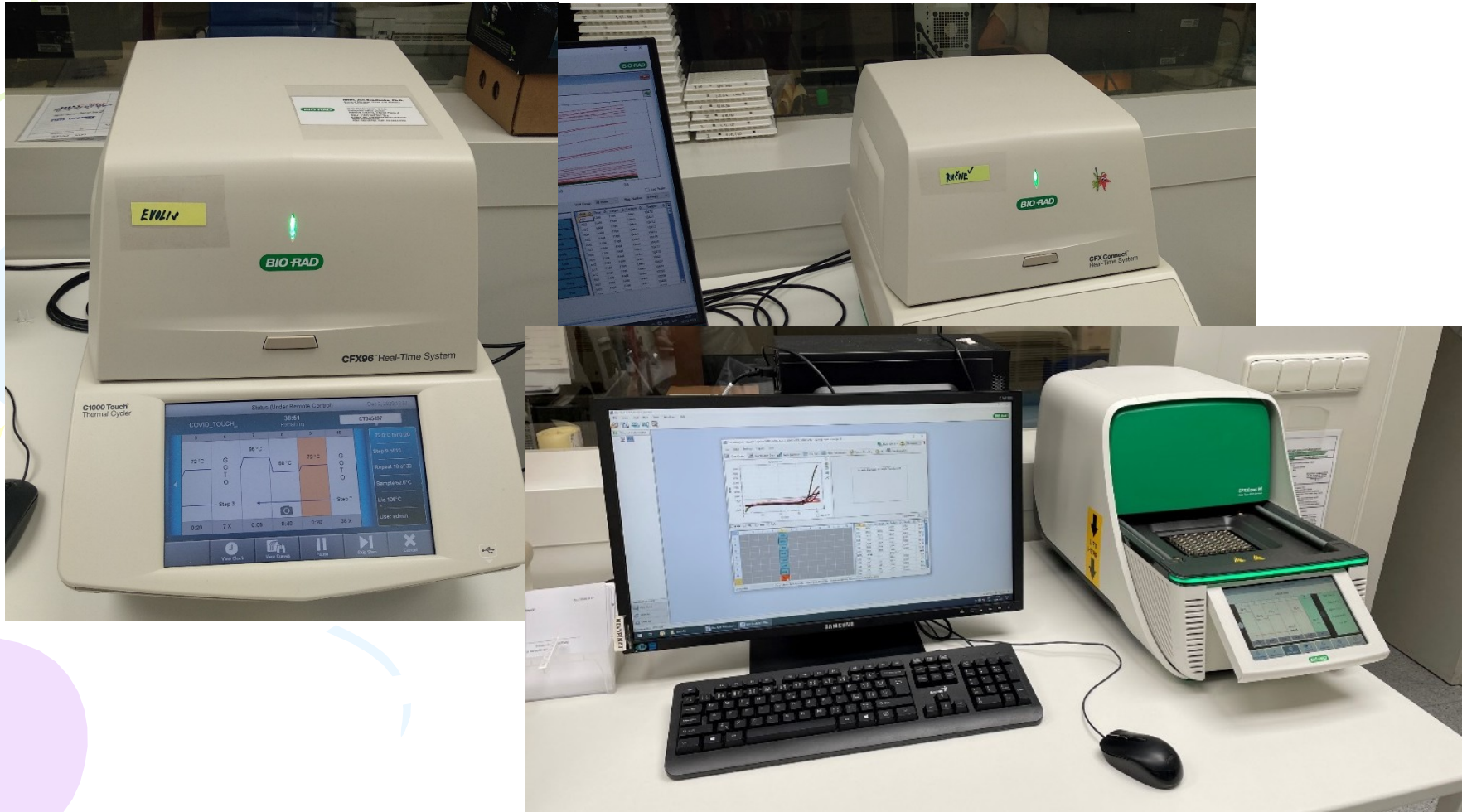


PCR a teplota



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

Thermocyklery



Polymerázová řetězová reakce

- „klasická“ PCR: end-point analýza (po proběhnutí všech cyklů analýza produktů gelovou elektroforézou)
- real-time PCR: sledování amplifikačních produktů po každém proběhlém cyklu („in real time“), nejčastěji používána kvantitativně (qPCR)
- reverzně transkripční PCR (RT-PCR): analýza RNA; samotné PCR předchází přepis RNA do cDNA reverzní transkriptázou
- •qRT-PCR (RT-qPCR): kvantitativní (real-time) reverzně transkripční PCR

Polymerázová řetězová reakce

- specifické PCR (specifický gen pro enzym, faktor patogenity apod.)
- multiplex PCR (několik specifických cílových míst v jedné reakci)
- univerzální (cílové místo je gen, který mají všechny bakterie, nejčastěji gen pro 16S rRNA)
- nested PCR (dvě sady primerů použité ve dvou následujících PCR; omezuje vznik nespecifický produktů)

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).

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**

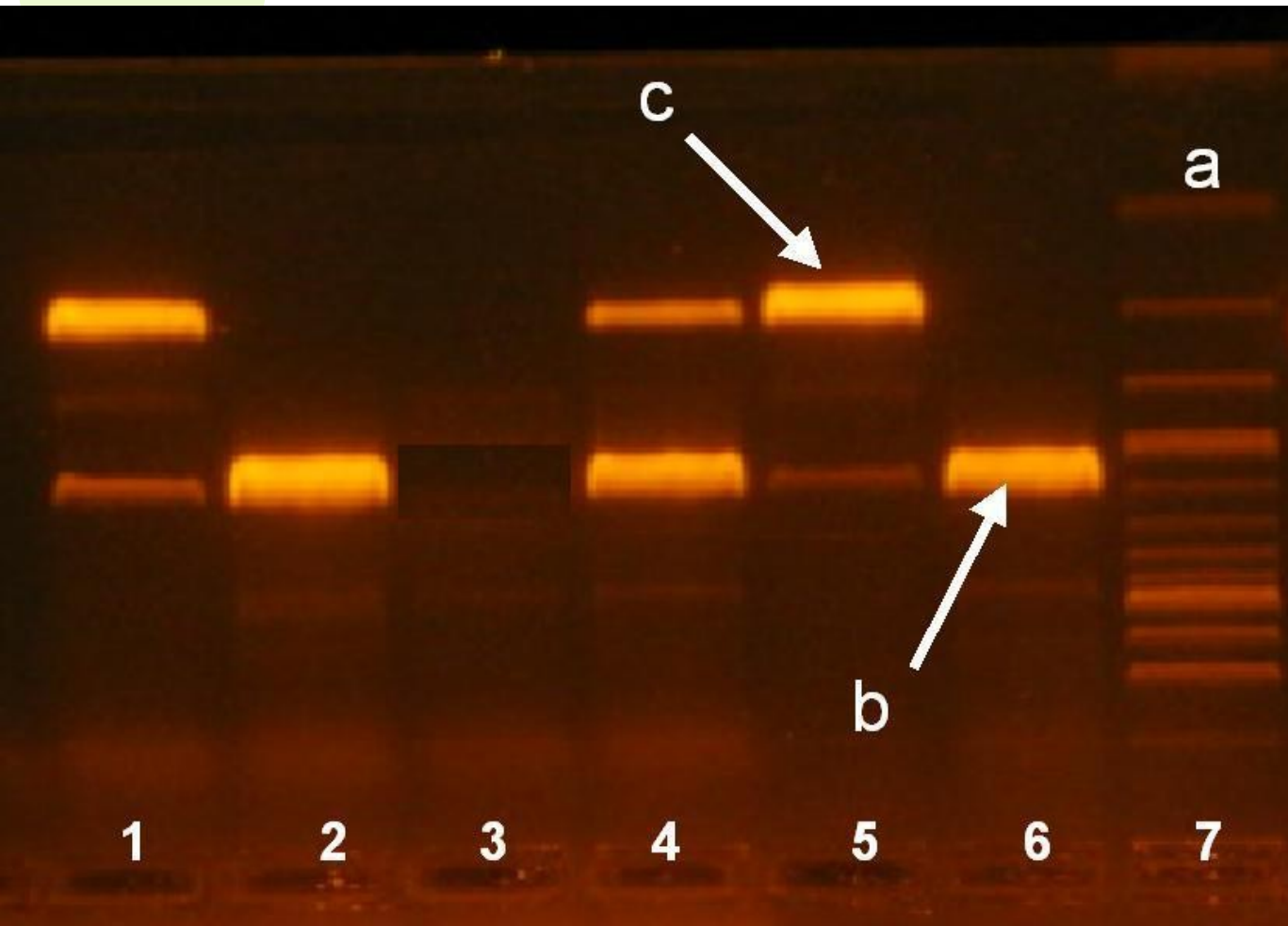
Přehled interpretace

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

Příklad gelové elektroforézy



← Vlastní reakce

← IC

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

Interpretace vyšetření PCR

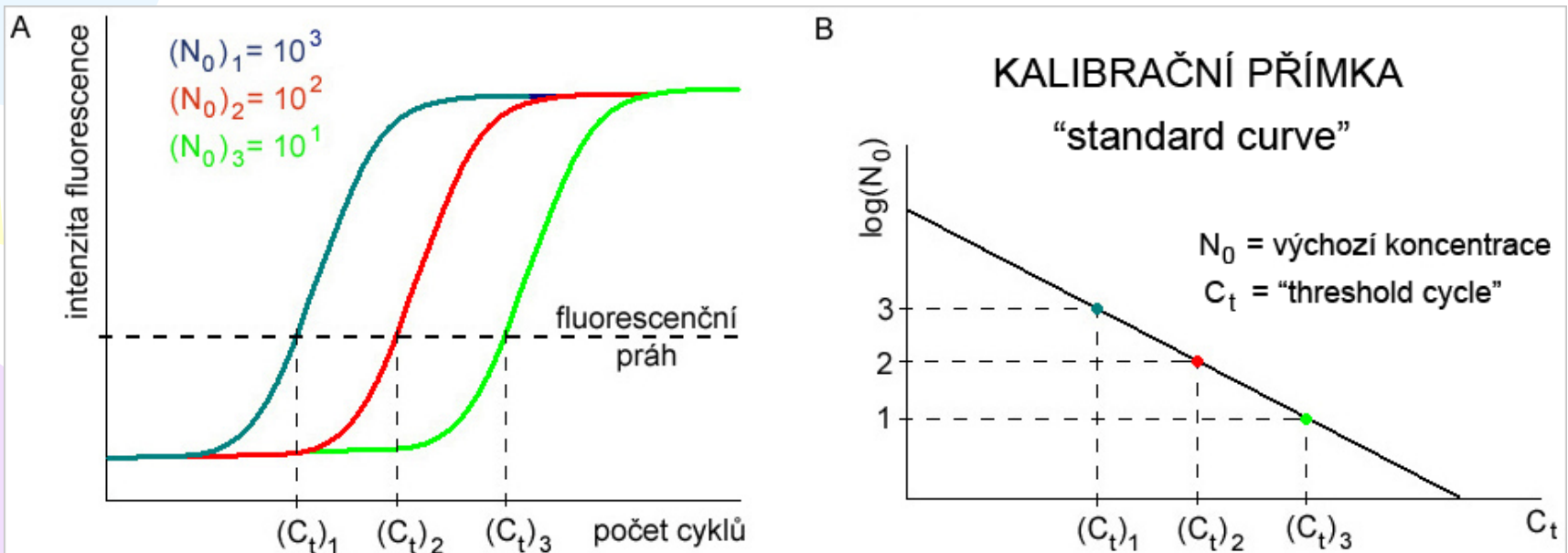
- Vyšetření PCR je vždycky nutno interpretovat **zároveň s ostatními vyšetřeními**
- Je potřeba vzít v úvahu, že je to **přímý průkaz** (neexistuje žádný „průkaz protilátek metodou PCR“, jak je někdy požadováno)
- I pokud je PCR centralizováno (např. na genetice, na biochemii), mikrobiologické PCR by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

Real time PCR, qPCR

- Sledování průběhu reakce (PCR)
- 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
 - qPCR se provádí ve speciálních **cyklerech**, které umožňují teplotního cyklování i detekci fluorescence v každém cyklu PCR

Real time PCR, qPCR

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



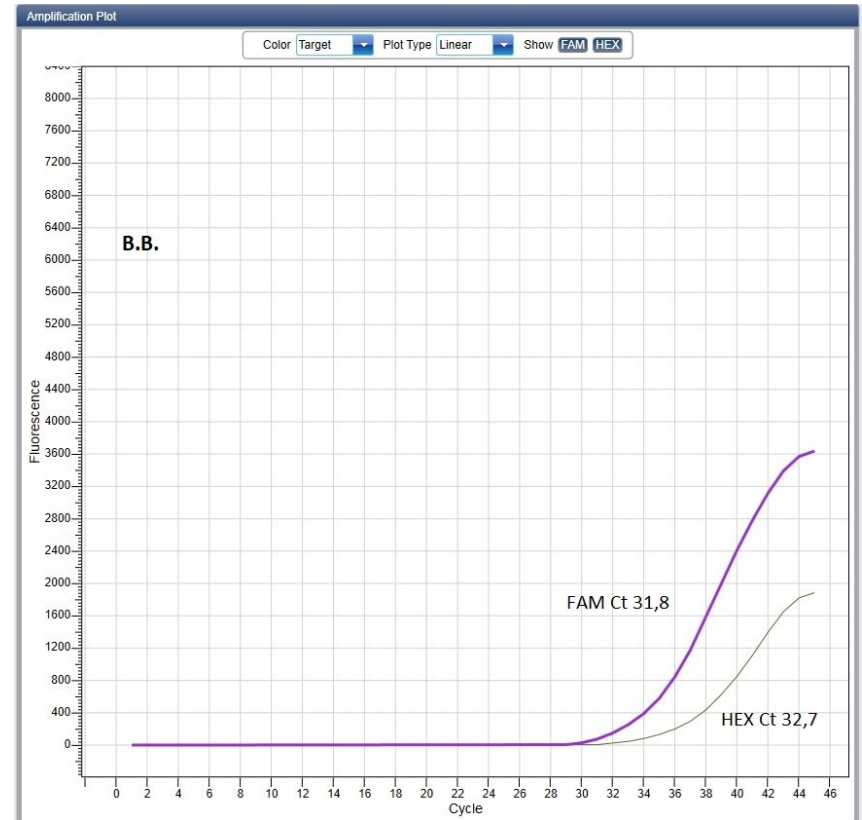
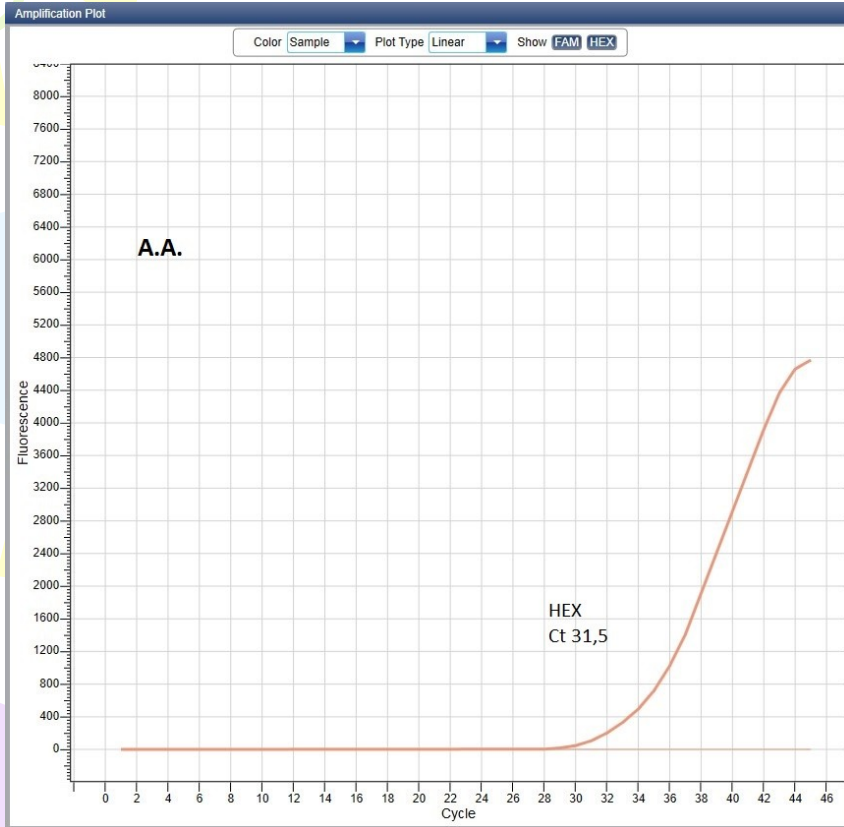
qPCR, detekční systémy

- Prvními látkami používanými pro detekci akumulace produktu během real-time PCR reakce byl *ethidium bromid* a *SYBR Green I*)
 - jejich fluorescenční aktivita vzrůstá po vazbě na dvouřetězcovou DNA
 - během PCR vzniká dvouřetězcový produkt - lze sledovat průběh amplifikace.
 - nevýhoda detekují veškerou ds DNA 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

qPCR, 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.

Výsledky



V kanálu HEX interní kontrola
V kanálu FAM detekce vlastního agens

RT-qPCR a multiplex PCR

- RT-qPCR
 - Detekce RNA
 - Reverzní transkriptáza na cDNA
- Multiplex PCR: detekce více agens najednou
 - respirační infekce
 - sepse
 - infekce GIT
 - STD

Další metody sloužící k subtypizaci bakterií

- PFGE – pulzní gelová elektroforéza
 - epidemiologické studie
 - zdlouhavá trvá 2 - 3 dny
 - využívají se restriční endonukleázy
 - vzniklé fragmenty NA se rozdělí podle velikosti v elektrickém poli, které periodicky mění směr

Děkuji za
pozornost



Příště budeme pokračovat povídáním o
patogenitě a virulenci