

Praktická cvičení z mikrobiologie pro farmaceuty

Marcela Nejezchlebová

Dominik Rotrekl

Praktická cvičení z mikrobiologie pro farmaceuty 2019

Farmaceutická fakulta veterinární a farmaceutické univerzity Brno
Ústav molekulární biologie a farmaceutické biotechnologie
Přednosta ústavu: PharmDr. Jakub Treml, Ph.D.

Sazba systémem maker \LaTeX (Petr Olšák) pro sazecí systém \TeX
<http://petr.olsak.net/opmac.html>

Zdroje včetně obrazového materiálu jsou uvedeny na konci kapitol.

Brno 2019

Obsah

1	Základy práce v mikrobiologické laboratoři: příprava a očkování půd, desinfekce a sterilizace	5
2	Určování bakterií: hodnocení kolonií, barvení a mikroskopie, biochemické testy	14
3	Stanovení citlivosti bakterií k antibiotikům	21
4	Mikrobiologická jakost farmaceutických produktů, stanovení množství mikroorganismů ve vzorku	26
5	Molekulární a sérologické metody v průkazu mikroorganismů a infekcí	33

1 Základy práce v mikrobiologické laboratoři: příprava a očkování půd, desinfekce a sterilizace

Milí studenti, tato skripta si kladou za cíl provést Vás ve zkratce základními mikrobiologickými a molekulárně biologickými metodami, které jsou užívané v klinické mikrobiologii a které nám umožňují identifikovat mikroorganismus ve vzorku, případně stanovit počet mikroorganismů v neznámém vzorku. Semináře podávají zjednodušenou formou informace, týkající se jednotlivých cvičení. Existuje celá řada velmi kvalitně zpracovaných skript, kde zvědavější studenti mohou nalézt podrobnější informace (doporučená skripta jsou uvedena na konci).

Představme si, že jsme pracovníci v klinické mikrobiologické laboratoři, kam přicházejí vzorky z ordinace klinického lékaře. **Vzorkem** může například být krev, moč, mozkomíšňní mok, sputum, kůže, odštěpek kosti, stolice, kousek nehtu nebo stěr či výtěr (z různých tělních povrchů a otvorů) na vatovém tamponu, obvykle zanořeném do transportního média. Vzorek obsahuje většinou směs různých mikrobů i různé buňky pacienta. Vzorek musí být doručen do mikrobiologické laboratoře co nejrychleji, neboť hrozí jeho znehodnocení. Optimálně by vzorek měl být zpracován do dvou hodin od odběru, u některých vzorků (především u močí) je to dokonce podmínka toho, aby bylo možno vzorek považovat za validní.

Nyní si krátce popíšeme pravidla práce v mikrobiologické laboratoři. V laboratoři užíváme laboratorní plášť a přezůvky k tomu určené. Základem je tzv. **aseptická práce**, to znamená, že je potřeba pracovat se sterilními pomůckami, ve sterilním prostředí (v laminárním boxu) a pokud provádíme něco mimo box, tak je potřeba postupovat rychle, aby se zkrátila možnost kontaminace vzorku. V případě, že existuje možnost vzniku mikrobiálního aerosolu, je nutno použít laminární box vždy. **Kontaminací** je myšleno znečištění určitého prostředí nežádoucími mikroby. Z tohoto důvodu je potřeba, abychom měli vlasy řádně stažené, aby při práci vlasy nepadaly do vyšetřovaného vzorku a nekontaminovaly ho. Je také potřeba nemluvit, nekašlat, vyhýbat se prudkým pohybům apod. Je nutné před prací i po ní (v případě polížení stolu infekčním materiálem i během práce) ošetřit pracovní stůl čerstvě naředěným dezinfekčním roztokem. Při každé mikrobiologické práci existuje riziko **infekce**. Proto si umýváme ruce teplou vodou a dezinfekčním mýdlem před započítím i po ukončení práce v laboratoři, na závěr vždy použijeme dezinfekční přípravek na ruce, který necháváme na rukou zaschnout. K osušení rukou používáme jednorázové papírové ručníky. Máme-li na rukou oděrky, použijeme jednorázové rukavice při veškerých úkonech. Pokud má někdo projevy infekce, použije ochrannou roušku a rukavice. Nikdy nepipetujeme ústy, nedotýkáme se obličeje a nic si nevkládáme do úst (tužky apod.). Veškerý odpadní materiál odkládáme do zvláštních nádob, označených jako nebezpečný odpad.

První pomoc při:

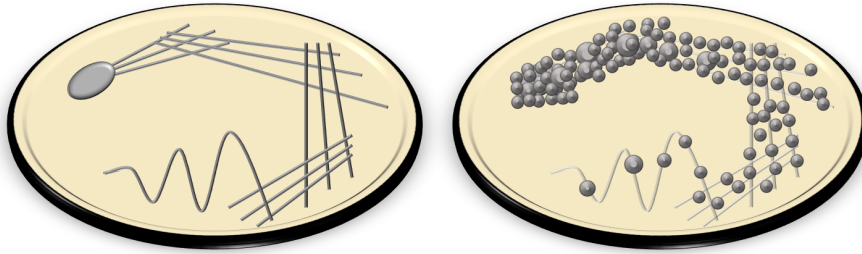
- *Vniknutí infekčního materiálu do úst:* vyplivnout do dezinfekčního roztoku, ústa vypláchnout 0,2% HCl nebo Lugolovým roztokem, vykloktat 0,2% HCl, za 20 min. požit 4 tbl. živočišného uhlí.

- *Vniknutí infekčního materiálu do oka:* vypláchnout vodou pomocí oční sprchy, nakapat Ophtalmo-Septonex oční kapky a vetřít Ophtalmo-Septonex oční mast, u bakteriálních infekcí Ophtalmo-Framykoin kapky a mast.
- *Vniknutí infekčního materiálu do nosu:* opakovaně se vysmrkat, vetřít Septonex mast, u bakteriálních infekcí Framykoin mast.
- *Drobná čistá poranění:* potřít antiseptikem, krýt rychloobvazem.
- *Drobná infikovaná poranění:* nechat krváčet, antiseptikum, v případě bakteriální kontaminace Framykoin.

Vraťme se nyní k odebranému vzorku, který dorazil do klinické mikrobiologické laboratoře. Jelikož se jedná (či spíše: může jednat — to nikdy dopředu nevíme) o směs různých mikroorganismů, musíme nejprve provést vyočkování neboli inokulaci s cílem získat čistý kmen nebo kmeny v podobě kolonií. Abychom to mohli provést, potřebujeme kultivační média.

Většina mikrobiologických laboratoří nakupuje již hotová agarová média v Petriho miskách, nicméně **příprava médií (kultivačních půd)** je vcelku jednoduchá. Komerčně vyráběné médium v suchém stavu navážíme a doplníme destilovanou vodou dle návodu a rozvaříme. Nesmíme zapomenout také na úpravu pH. Bakterie vyžadují pH kolem 7, zato kvasinky a houby od 4,5 do 6. Poté médium v zásobní skleněné nádobě vysterilizujeme v autoklávu a ještě za horka rozlijeme do jednorázových sterilních plastových Petriho misek za aseptických podmínek v laminárním boxu. Pokud bychom chtěli přidat do média nějakou termolabilní substanci, např. některá antibiotika, provedli bychom nejprve fyzikální dezinfekci roztoku antibiotika filtrací přes sterilní membránový filtr s velikostí pórů 0,22 μm , a poté bychom takto ošetřený roztok přidali do sterilizovaného média o teplotě kolem 45°C. Zvláštním případem jsou půdy s krví nebo čištěnými krvinkami, které jsou termolabilní a zároveň je takto sterilizovat nelze — v tom případě je třeba spoléhat na výrobce, který garantuje sterilitu použité krve. **Kultivační půdy** pro kultivaci bakterií a hub mohou být v podobě tekuté nebo pevné. Základní složení kultivační půdy pro kultivaci bakterií je masopeptonový bujón, který se skládá z peptonové vody (bílkovinný hydrolyzát), masového vývaru a chloridu sodného, základními složkami kultivačních půd pro kultivaci hub je např. sladový extrakt a mykologický pepton. Pro zpevnění tekuté půdy se používá agar. Tekuté půdy využíváme jednak pro namnožení mikrobů před vyočkováním na pevné půdy, jednak při různých testech, jako je např. stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC) mikrodiluční metodou. Pokud mikroby kultivujeme na pevných půdách, můžeme je potom pozorovat jako malé kopečky, kterým se říká kolonie. Existují diagnostické, selektivní a selektivně diagnostické půdy, které mají kromě základních složek ještě další komponenty, které umožní růst jen určitých skupin mikroorganismů. Nejjednodušším příkladem je např. kultivační půda s přídatkem 10% NaCl. Ze směsného vzorku by na této půdě vyrostl pravděpodobně jen rod *Staphylococcus*, neboť je adaptován na slané prostředí kůže.

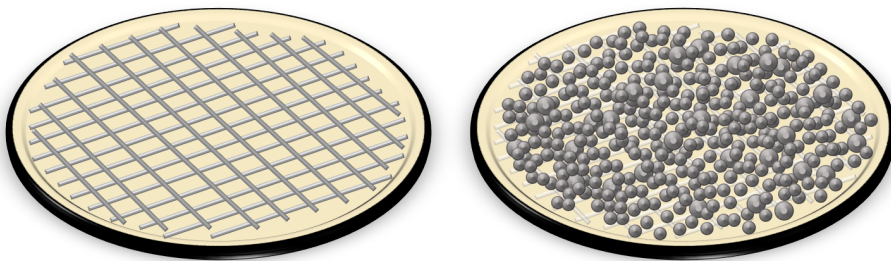
Izolační očkování (vyočkování, křížový roztěr, obr. 1.1) provádíme tak, že tampónem anebo bakteriologickou kličkou roztíráme malé množství mikrobiální hmoty po povrchu pevné kultivační půdy. Uděláme několik čar pod sebou a pootočíme kličku na čistou



Obrázek 1.1 Izolační očkování

stranu a uděláme další skupinu čar, a tak postupujeme tak dlouho, až se dostaneme k počátku. Pokud jsme již použili obě strany kličky, použijeme nově vyžíhanou kličku. Konec a počátek nesmí být spojené. Cílem této techniky je naředit mikrobiální směs. Pokud není směs příliš hustá, vytvoří každý druh mikroorganismu svoji vlastní charakteristickou kolonii, což je populace pocházející z jedné původní mikrobiální buňky. Pokud je kolonie skutečně izolovaná, je vždy tvořena jedním čistým kmenem, který můžeme dále přeočkovávat na nové kultivační půdy a podrobovat ho různým např. biochemickým testům, které nám umožní identifikaci mikroba, a dalším testům, například testům citlivosti na antibiotika. Pokud již čistý kmen k dispozici máme a chceme použít kupříkladu diskovou difúzní metodu pro stanovení citlivosti anebo rezistence mikroba, použijeme **očkování roztěrem** (obr. 1.2). Připravíme si inokulum, to znamená mikrobiální suspenzi určitého druhu mikroba v tekutém médiu, a určité množství tohoto inokula (až 1 ml dle metodiky) rozetřeme (hokejkou anebo špičkou automatické pipety) po povrchu agaru tak, aby byl dokonale pokryt. Inokulum musí být řádně zhomogenizováno, což se provádí pomocí vortexu. Abychom orientačně věděli, kolik je mikrobiálních buněk v inokulu, použijeme tzv. denzitometr, což je vlastně jednoduchý fotometr a změříme denzitu (hustotu) suspenze v jednotkách McFarland. McFarlandova zákalová stupnice byla historicky připravena smícháním roztoků chloridu barnatého a kyseliny sírové a vzniklá sraženina síranu barnatého tvořila základ pro přípravu zákalové stupnice. Pro většinu testů se připravuje inokulum o denzitě 0,5 – 1 McFarland, což odpovídá $1 - 2 \times 10^8$ CFU/ml *Escherichia coli*. (CFU Colony Forming Unit neboli KTJ kolonie tvořících jednotek). Jednotky CFU/ml nebo CFU/g používáme v případě, že potřebujeme **stanovit počet mikroorganismů ve vzorku** (např. při provádění testů pro stanovení mikrobiologické jakosti farmaceutických produktů).

Referenční kmene mikroorganismů, se kterými budeme pracovat ve cvičeních, mají označení CCM (Czech Collection of Microorganisms — Česká sbírka mikroorganismů) a číselné označení. Pod tímto označením je nalezneme a můžeme zakoupit v České sbírce mikroorganismů, což je pracoviště Ústavu experimentální biologie Přírodovědecké fakulty Masarykovy univerzity. Dlouhodobé uchování je umožněno lyofilizací mikrobů, uložením v kapalném dusíku při -196°C anebo uchováváním v glycerinovém médiu v hlubokomrazícím boxu při -80°C . Po zakoupení mikroorganismů a jejich oživení se mohou omezenou dobu přeočkovávat a uchovávat v lednici na pevných kultivačních



Obrázek 1.2 Očkování roztěrem

médiích. Přibližně po 5–7 přeočkováních je potřeba vzít novou zamraženou kulturu, neboť může docházet ke změnám vlastností mikroba.

Po provedení izolačního očkování dáme misky s kulturami do termostatu inkubovat.

Inkubace se provádí v termostatu, který nám automaticky zajišťuje zvolenou teplotu. Naočkované misky jsou inkubovány obrácené dnem vzhůru, aby vznikající kondenzáty nekapaly na kulturu. Obecně platí, že patogenní bakterie, patřící ve většině případů mezi tzv. mezofilní bakterie, potřebují ke zdárnému růstu 30–37°C (pro humánní klinicky významné bakterie se zpravidla volí teplota lidského těla, tj. 37°C), psychofilní bakterie pod 20°C, termofilní 50–55°C, kvasinky 26–30°C a plísně kolem 25°C. Důležitá je také atmosféra. Některé mikroorganismy jsou aerobní, rostou jen v přítomnosti kyslíku. Může jít o striktní aeroby, např. rod *Pseudomonas*, které kyslík vyžadují, anebo bakterie, které se umějí přizpůsobit a žijí s kyslíkem i bez kyslíku, např. rod *Escherichia*. V praxi lze jen obtížně rozlišit, zda jde o bakterie fakultativně anaerobní (přepínají metabolismus mezi aerobní respirací a fermentací) anebo aerotolerantní (jejich metabolismus je fermentativní, kyslík nevyužívají, ale nevadí jim). Další jsou anaerobní (nebo také striktně anaerobní) a kyslík je zabíjí (např. rod *Clostridium*). Mikroaerofilní a kapnofilní bakterie kyslík potřebují, ale v malém množství, kapnofilní kromě kyslíku vyžadují také vyšší množství CO₂. Doba kultivace je velmi orientačně u bakterií 24 hodin, u kvasinek 48 hodin, ale u anaerobních bakterií i několik dní a u mykobakterií několik týdnů.

Nyní musíme čekat do dalšího dne, až mikroby narostou, bude-li vše probíhat dobře, tak budeme mít vyselektované odlišné kolonie a obyvatele těchto kolonií budeme moci obarvit a podrobit biochemickým testům. Nyní nás ještě čeká řádný úklid, jehož součástí je mechanická očista, dezinfekce a sterilizace. Kdybychom totiž tyto úkony řádně neprováděli, tak by se mohly začít celou nemocnicí šířit rezistentní mikroorganismy a mohly by způsobit tzv. nozokomiální infekce neboli infekce získané při pobytu v nemocnici. Každé zdravotnické zařízení musí mít zpracovaný dezinfekční řád, takže do něho nahlédneme a vybereme vhodný dezinfekční prostředek na povrchy, naředíme ho do správné koncentrace a omyjeme všechny povrchy v laboratoři. Teprve po deklarované době expozice můžeme předpokládat, že došlo k řádné dekontaminaci. V laminárním boxu, který samozřejmě také očistíme dezinfekcí, ještě na závěr zapneme tzv. germi-

cidní zářivku, aby případní přeživší mikrobi byli zlikvidováni. Musíme také sterilizovat v autoklávu rozličné nástroje, aby byly připravené pro zítřejší práci.

Používané postupy a prostředky, týkající se mechanické očisty, dezinfekce a sterilizace, jsou upraveny příslušnou hygienickou legislativou (vyhláška č. 306/2012 Sb.).

Mechanická očista patří mezi dekontaminační postupy a zajistí odstranění nečistot a snížení počtu mikrobu a předchází jak procesu dezinfekce, tak sterilizace.

Dezinfekce je zaměřena na likvidaci patogenních organismů, které jsme si předsevzali zničit. Běžné desinfekční prostředky ničí vegetativní formy mikroorganismů, nejsou však zpravidla schopny zničit spory, některé viry, priony apod.; každá dezinfekce má svůj garantovaný účinek (pouze na bakterie / na bakterie a viry / i na spory apod.) a od toho se odvíjejí možnosti jejího použití. Samozřejmě účinek na deklarované typy organismů platí pouze v případě správného provedení. Zahrnuje fyzikální a chemické způsoby. Mezi **fyzikální dezinfekci** patří var za atmosférického tlaku (30 minut), var v přetlakových nádobách (20 minut), ultrafialové záření (germicidní lampy, vlnová délka 260 nm), filtrace přes membránové filtry s póry 0,22 um, žihání, spalování, pasterizace (zahřátí na 62,5°C, 30 minut). **Chemická dezinfekce** využívá chemické dezinfekční přípravky, které musí být deklarované jako zdravotnické prostředky (dezinficiencia) nebo jako přípravky registrované jako léčiva (antiseptika). Dezinficiencia jsou určena na neživé předměty a mělo by na nich být uvedeno spektrum účinku. Může mít různou formu, například slovní, stále se ale ještě setkáme i s písmenným označením: A — baktericidní, B — plná virucidní, C — sporocidní, T — tuberkulocidní, M — mykobaktericidní, V — fungicidní. Antiseptika jsou léčiva zneškodňující patogenní mikroorganismy v živých tkáních, ranách, sliznicích apod., přičemž je nesmí poškozovat. Často se jedná o totožné látky jako prostředky pro chemickou dezinfekci, pouze v odlišných koncentracích, případně i v různých lékových formách. Účinek je závislý na množství mikrobu v daném prostředí, na koncentraci dezinficiencia anebo antiseptika a na době působení.

- **Aldehydy** způsobují koagulaci bílkovin a poškození enzymů mikrobu. Formaldehyd, páchnoucí, toxický plyn je používán ve formě 40% vodného roztoku (formalin) ke konzervaci biologických materiálů. Glutaraldehyd (Chiroseptol) je méně toxický a velmi účinný, používá se pro tzv. vyšší stupeň dezinfekce (provádí se tam, kde není možná sterilizace, např. u endoskopů). Je nutný následný oplach sterilní vodou.
- **Alkoholy** (ethanol, propanol) v maximálních koncentracích mikroorganismy konzervují, účinek je založen na koagulaci bílkovin. Ethylalkohol je nejučinnější v 70% roztoku, ani ten se však samostatně v současnosti k dezinfekci nepoužívá. Moderní „alkoholová dezinficiencia“ jsou většinou směsí několika alkoholů, případně i alkoholů a dalších látek. Jsou používané především pro dezinfekci rukou, ať už běžnou anebo chirurgickou, neboť nezanechávají na kůži rezidua (Septoderm).
- **Barviva** (trifenylmethanová, akridinová) jsou používána jako ranná a slizniční antiseptika (SolutioNovikov, Rivanol).
- Cyklickou sloučeninou je **chlorhexidin**, který je užíván jednak pro dezinfekci rukou, jednak k lokálnímu léčení infekcí dutiny ústní (Septofort).

- **Fenol** (kys. karbolová) a **kresol** (Lysol) patří mezi klasické, dnes už jen výjimečně používané dezinfekční prostředky pro hrubou dezinfekci povrchů a exkrementů, některé jeho deriváty (amylmetakresol) jsou součástí antiseptik pro lokální léčbu infekcí dutiny ústní (Neo-Angin).
- **Halogeny** účinkují rychle a spolehlivě, ale přítomnost organických látek účinnost snižuje. Účinek je založen na oxidačních procesech. Používají se preparáty s chlórem a preparáty jodové. Mezi univerzální chlorové přípravky, které jsou užívány pro dezinfekci povrchů, patří chlornany (Savo — chlornan sodný) a chloraminy (Chloramin B — benzenchloramin). Jod je součástí řady antiseptik, účinek je založen na oxidaci proteinů a inaktivaci enzymů. Organické sloučeniny jodu, tzv. jodofory nevyvolávají tak často alergické reakce, jako tomu je u jodové tinktury (alkoholový roztok jodu a jodidu draselného). Jedním z nejúčinnějších kožních antiseptik, používaných i pro dezinfekci neporušené kůže před chirurgickým zákrokem, odběrem krve apod. je přípravek Betadine anebo Jodisol. Přípravek Jox je užíván při zánětech v dutině ústní. Oční přípravek Jodid draselný a sodný 2% je užíván při infekčních zánětech očí, způsobených plísněmi a k podpoře metabolických procesů v oku. Kontraindikací u všech jodových preparátů jsou všechna onemocnění štítné žlázy, těhotenství a kojení.
- **Kyseliny a zásady** (H_2SO_4 , NaOH, KOH apod.) patří mezi dezinficiencia, jejichž užití je omezeno na hrubou dezinfekci povrchů, nevýhodou je velká žíravost a korozivní účinek. Organické kyseliny jako např. kyselina benzoová jsou používány v potravinářství jako konzervancia, její deriváty tzv. parabeny bývají součástí kosmetických a farmaceutických přípravků jako konzervační činidla. Velmi silné baktericidní a fungicidní účinky mají tzv. perkyseliny (peroxokyseliny) např. kyselina peroctová (Persteril), která je často využívána ve zdravotnictví. Slabé kyseliny a zásady slouží jako antiseptika. Kyselina boritá je jako 3% roztok součástí očních kapek Ophtalmo-Septonex a oční vody Ophtal a slouží k léčbě neinfekčních zánětů spojivek a k výplachům. Kyselina salicylová má užití v dermatologii.
- **Oxidační činidla** oxidují organické látky a inaktivují enzymy. Mají široké spektrum účinku, některé působí i na spory a neobalené viry. Podobně jako tomu je u halogenů, které mohou být také řazeny mezi oxidační činidla, účinek je snižován přítomností bílkovin. Proto je nezbytné jejich použití v dostatečném objemu, případně vícekrát. Manganistan draselný je užíván jako antiseptikum u drobných poranění kůže, ale i na sekundárně infikované léze (např. bércové vředy, dekubity). Nevýhodou je nestabilita roztoku a při vyšších koncentracích dráždivost. Tříprocentní peroxid vodíku je antiseptikum pro výplach kožních ran a vředů, využívá se také při infekcích v dutině ústní. Neproniká sice do hloubky tkání, na druhou stranu dokáže rozrušovat biofilm. Benzoylperoxid je používán k lokální léčbě akné. Již zmiňovaná kyselina peroctová (Persteril) působí na spory, viry i mykobakterie, nevýhodou jsou korozivní účinky, nestabilita roztoků a výbušnost ve vysokých koncentracích. Dezinfekčně působí i výpary, používá se proto pro sterilizaci termolabilních nástrojů a pomůcek (Chirosan). Po ošetření je potřeba provést oplach sterilní vodou.

- **Tenzidy** neboli povrchově aktivní látky snižují povrchové napětí rozpouštědla, a tím usnadňují rozpouštění nečistot. Mezi tenzidy patří i mýdla a saponáty. Výrazný dezinfekční a antiseptický účinek mají tzv. kvartérní amoniové soli (KAS), které způsobují porušení buněčné stěny buněk, což vede k poklesu koncentrace složek buňky a zániku buňky. Jsou málo toxické, dobře pronikají do štěrbin, nezapáchají a mají současně i detergentní (mycí) účinek. Působí dobře proti grampozitivním bakteriím a plísním. Bývají proto nejen součástí kombinovaných přípravků, určených pro dezinfekci povrchů, ale i součástí antiseptik. Bromid carbethopendecinia (Septonex) je užíván jako kožní antiseptikum, bromid benzododecinia (Ajatin) je užíván mimo to jako přípravek k dezinfekci operačního pole a je jednou ze složek oční vody Ophtal. Chlorid benzalkonia je kožní antiseptikum (Dettol) a také potlačuje bolesti v krku různého původu (Septolete).
- **Těžké kovy**, jejichž sloučeniny koagulují bílkoviny mikroorganismů, jsou toxické a mají korozivní účinek. Minulostí je užití rtuti, v současné době je užíván pouze dusičnan stříbrný v oftalmologii a síran měďnatý (modrá skalice) pro své baktericidní a fungicidní účinky.

Každé zdravotnické zařízení musí mít zpracovaný dezinfekční řád, ve kterém je specifikováno, jaké dezinfekční přípravky (účinné látky) a s jakým spektrem účinku jsou používány na pokožku, na povrchy, na nástroje a pomůcky, v jaké koncentraci a jakým způsobem a musí být uvedena délka expozice, která zaručí deklarované spektrum účinku daného prostředku. Vzniku rezistence vůči dezinfekčním látkám lze zabránit pravidelným střídáním různých skupin dezinficiencí.

Kontrolu dezinfekčních metod provádíme pomocí chemických metod, kterými stanovíme aktivní látky a jejich obsah v dezinfekčních roztocích a mikrobiologickými metodami, kdy provádíme stěry, otisky, abychom zjistili účinnost dezinfekčních prostředků.

Vyšší stupeň dezinfekce a vícestupňová dezinfekce se provádějí u zdravotnických prostředků, které se používají k vyšetřování mikrobiálně fyziologicky neosídlených tělních dutin (např. endoskopy) a nemohou být klasickými metodami sterilizovány (např. v autoklávu). Používají se dezinfekční prostředky k tomuto způsobu dezinfekce určené, to znamená, že musí mít široké spektrum účinku a musí mít sporocidní, virucidní a tuberkulocidní účinnost (např. glutaraldehyd, kyselina peroctová). Vždy je nutný oplach předmětů sterilní vodou k odstranění reziduí chemických látek.

Sterilizace usmrtí všechny formy mikroorganismů v daném prostředí (včetně spor a virů; otázkou jsou priony), účinek je také odvislý od řádného provedení. Sterilizaci předchází předsterilizační příprava, což je vlastně mechanická očista, dezinfekce, sušení a zabalení do vhodných obalů. Tak jako u dezinfekce, tak i u sterilizace máme postupy fyzikální a postupy chemické. **Fyzikální sterilizace** zahrnuje sterilizaci vlhkým teplem neboli sytou vodní parou, která je prováděna v autoklávu. Autokláv je hermeticky uzavíratelná kovová nádoba, v níž dochází zahříváním ke vzniku syté vodní páry, která navyšuje tlak, a tím dochází k zahřátí vnitřního prostoru na teplotu vyšší než 100°C. Zpravidla se užívají tři režimy. První režim probíhá 20 minut při teplotě 121°C, druhý režim zajistí obdobný účinek a probíhá 4 minuty při 134°C. Třetí režim je užíván v případě rizika kontaminace nástrojů priony a trvá 60 minut při 134°C. Nicméně

dle vyhlášky č. 306/2012 Sb., nástroje, které přišly do kontaktu s tkáněmi pacientů, u nichž bylo prokázáno prionové onemocnění (např. CJD), musí být zničeny, neboť stále neexistuje úplně spolehlivá metoda likvidace prionů. Sterilizace v autoklávu je vhodná pro zdravotnické prostředky z kovu, skla, keramiky, textilu apod. Další fyzikální metodou sterilizace je sterilizace proudícím horkým vzduchem (horkovzdušná sterilizace), která je vhodná pro předměty skleněné, kovové, porcelánové apod. Používané jsou opět tři režimy, 60 minut při 160°C, 30 minut při 170°C a 20 minut při 180°C. Kromě těchto dvou hlavních postupů je používána pro sterilizaci termolabilních předmětů ještě vysoce účinná sterilizace plazmatem a sterilizace radiační (gama záření), která je určena pro sterilizaci jednorázových zdravotnických pomůcek přímo během výrobního procesu. **Chemická sterilizace zahrnuje sterilizaci formaldehydem a ethylenoxidem**, sterilizačním médiem jsou tedy plyny a proces probíhá za podtlaku přímo v konečných obalech. Tyto metody jsou opět určeny pro termolabilní zdravotnické materiály, jako jsou jednorázové zdravotnické pomůcky, vlna, kůže apod.

Kontrola sterilizace je prováděna biologickými systémy (použití bioindikátorů, např. spory *Bacillus stearothermophilus*, jehož případná životaschopnost je testována kultivací po proběhlém sterilizačním procesu) a nebiologickými postupy, které zahrnují Bowie-Dick test (test správného odvdzušnění a pronikavosti páry), chemické testy procesové reagující barevnou změnou a fyzikální systémy např. vakuový test, který je kontrolou těsnosti přístroje. Všechny vysterilizované předměty musí být **uloženy v ochranných obalech**, které zabraňují sekundární kontaminaci až do jejich použití. Obal musí být označen datem sterilizace a expirace.

Cvičení č. 1: Příprava živných médií, izolační očkování, kultivace mikroorganismů, testování antiseptik

Cíle:

- Připravit živná média pro následnou kultivaci mikroorganismů
- Testování antiseptické účinnosti vybraných dezinfekčních látek
- Izolační očkování

(práce ve dvojicích)

Materiál

- *Sklo a přístroje*: Erlenmayerova baňka k přípravě médií (100 ml), skleněný odměrný válec, hliníková fólie, plastové Petriho misky, vatové tampóny, automatická pipeta, špičky, bakteriologická zkumavka, kalibrovaná zkumavka plastová, váhy, míchadlo se zahříváním, vortex, laminární box, tlakový hrnec pro fyzikální dezinfekci, denzitometr, vaříč
- *Půdy (ve formě prášku i jako hotová půda v Petriho misce)*: masopeptonový bujón (Nutrientbroth), Malt bujón, agar

- *Mikroorganismy sk. 1: Micrococcus luteus* CCM 7320, *Escherichia coli* CCM 7929, *Saccharomyces cerevisiae* CCM 8191
- *Dezinfekční prostředky (antiseptika):* Betadine, 70% ethanol, 0,1% KMnO_4 , 2% chlorhexidin, Septonex. Kontrolou bude sterilní médium Nutrient.

Pracovní postup

1) Příprava kultivačních médií

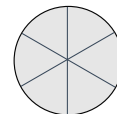
- do Erlenmayerovy baňky připravte 30 ml Nutrientbroth bujónu (podle návodu na zásobní láhvi)
- míchejte tak dlouho, až se prášek rozpustí, a přidejte agar tak, aby jeho výsledná koncentrace byla 3% (w/v)
- uzavřete nádobu hliníkovou fólií, popište ji a připravte k fyzikální dezinfekci
- předejte nádobu vyučujícímu, který fyzikální dezinfekci médií zajistí

2) Nalévání misek

- umístěte sterilní Petriho misky do laminárního boxu a rozlejte do nich ještě horký tekutý Nutrientbroth agar
- jednotlivé misky nechte otevřené, dokud agar neztuhne (snížení kondenzace vody na víčku) a pak zakryjte víčkem, otočte a popište misku na spodní straně

3) Inokulace sterilních misek s agarem mikroorganismy sk. 1 — testování antiseptické účinnosti vybraných přípravků, kdy každá dvojice bude mít: 1 Petriho misku s čistým agarem pro inokulaci a následné ošetření antiseptiky a 1 Petriho misku s Nutrientbroth agarem pro kultivaci *M. luteus*, *E. coli* nebo misku s Malt agarem pro kultivaci *S. cerevisiae*. Nejdříve proveďte inokulaci misky s čistým agarem a ošetření antiseptiky:

- připravené inokulum o hustotě 0,5 McFarlanda (*M. luteus*, *E. coli* nebo *S. cerevisiae*) 10× (100×) zřeďte v kalibrované plastové zkumavce (v laminárním boxu)
- 1 ml připraveného inokula (*M. luteus*, *E. coli* nebo *S. cerevisiae*) odeberte pipetou
- rovnoměrně rozetřete po agaru v misce (v laminárním boxu), přebytek odsajte a nechte zaschnout
- poté rozdělte misku ze spodní strany na 6 kvadrantů — Betadine, 70% ethanol, 0,1% KMnO_4 , 2% chlorhexidin, Septonex a sterilní médium Nutrient
- pomocí tamponů ošetřete vyznačené plochy jednotlivými antiseptiky a sterilním médiem a nechte působit cca 2 minuty (do zaschnutí)



4) Dále proveďte kontrolní sěr a kultivaci:

- zapište si přibližnou dobu, po kterou antiseptika působila a proveďte kontrolní sěr (pro každý kvadrant použijte nový tampón)

- tampónem, kterým jste provedli stěr, pak pečlivě přejeďte odpovídající kvadrant v misce s Nutrientbroth agarem anebo Malt agarem (tak jako v předchozím případě jsou rozděleny na 6 kvadrantů)
- misku uzavřete a označte: jméno, datum, čas
- kultivace bude probíhat při 37°C 24 hodin (*M. luteus* a *E. coli*) nebo při 30°C 48 hodin (*S. cerevisiae*) v termostatu, pak budou Petriho misky uloženy v lednici do dalšího cvičení

5) **Izolační očkování *M. luteus*, *E. coli* a *S. cerevisiae* a směs všech tří mikrobů (každá dvojice pouze jeden mikroorganismus nebo směs na jednu misku):** proveďte způsobem uvedeným na obrázku 1.1

- kultivace bude probíhat při 37°C 24 hodin (*M. luteus* a *E. coli*) nebo při 30°C 48 hodin (*S. cerevisiae*) v termostatu, pak budou Petriho misky uloženy v lednici do dalšího cvičení

Protokol č. 1 bude obsahovat:

- složení média Nutrientbroth a Malt, jaké je optimální pH média pro růst bakterií a hub
- latinské názvy všech tří mikroorganismů, použitých ve cvičení a dále, kde se s nimi můžeme setkat
- antiseptika použitá ve cvičení, jejich mechanismus účinku na mikroorganismy a jakým způsobem a kde se nejčastěji používají
- schéma Petriho misky s kvadranty
- výsledky v procentech účinnosti jednotlivých antiseptik pro všechny tři mikroorganismy ve formě grafů na základě počtu kolonií, které na ošetřeném povrchu vyrostly (vztaženo ke kontrole — sterilní médium)
- stručný popis principu izolačního očkování, co je cílem, přidat nákres anebo fotku

2 Určování bakterií: hodnocení kolonií, barvení a mikroskopie, biochemické testy

Následující den se podíváme na Petriho misky, tedy na kultury, které jsme předcházející den naočkovali vzorkem a inkubovali 24 hodin. Petriho misky hýří barvami, vidíme kolonie různých barev a tvarů. Řada z těchto mikroorganismů může patřit mezi tzv. normální mikrobiotu (mikroflóru, mikrobiom) lidského těla.







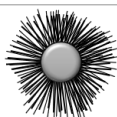



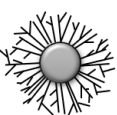

Za normální mikrobiotu lidského těla (tab. 2.1) považujeme mikroby, které běžně nacházíme u zdravého jedince. Její složení se liší podle místa na těle a závisí zejména na věku, výživě a okolním prostředí jedince. Odhaduje se, že celkový počet výrazně přesahuje počet somatických buněk. Tyto mikroby kolonizují všechna místa makroorganismu, která jsou ve styku s vnějším prostředím. Naprostou většinou se jedná o bakterie.

Kůže	<i>Propionibacterium acnes</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , rod <i>Corynebacterium</i>
Respirační trakt (nosní dutina)	<i>Staphylococcus epidermidis</i> , rod <i>Corynebacterium</i> a příbuzné rody (tzv. difteroidy), <i>Staphylococcus aureus</i> — malá množství
Oční spojivka	Koagulasanegativní stafylokoky, Difteroidy, <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i>
Křižovatka respirač- ního a zažívacího traktu — hltan, du- tina ústní	Streptokoky ze skupiny tzv. ústních streptokoků <i>Lactobacillus</i> , <i>Actinomyces</i> , <i>Peptostreptococcus</i> , <i>Veillonella</i> , <i>Prevotella</i> , <i>Porphyromonas</i> , <i>Fusobacterium</i> , rod <i>Haemophilus</i> včetně <i>Haemophilus influenzae</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> , rod <i>Neisseria</i> — tzv. „ústní“ neisserie, ale mohou být přítomna i malá množství neklonálních kmenů <i>Neisse- ria meningitidis</i> , nepatogenní spirochety (např. <i>Treponema denticola</i>)
Zažívací trakt — tlusté střevo	99% tvoří anaerobní bakterie, zejména rody <i>Bacteroides</i> , <i>Bifidobacterium</i> , <i>Eubacterium</i> , <i>Peptostreptococcus</i> , <i>Clostri- dium</i> (včetně druhů <i>C. perfringens</i> a <i>C. difficile</i>), dále je přítomna <i>Escherichia coli</i> a další zástupci řádu <i>Ente- robacteriales</i> , enterokoky, <i>Bacillus cereus</i> , <i>Candida</i> a ne- škodní komenzální prvoci
Poševní sliznice	<i>Lactobacillus acidophilus</i> a další laktobacily, malá množství gardnerel, anerobů, popřípadě i stafylo- koků či enterobakterií, <i>Candida</i> a další

Tabulka 2.1 Normální mikrobiota

Význam normální mikroflóry spočívá v její schopnosti bránit usídlení patogenních mikroorganismů, jakož i ve schopnosti stimulovat imunitní systém, někdy mohou mít i další prospěšné účinky (například syntéza vitamínů). Za určitých okolností však mohou téměř všechny tyto mikroorganismy být patogenní.

Většina tzv. normální mikrobioty může být s makroorganismem v symbiotických vztazích, které mohou přecházet od mutualistického vztahu až po parazitický v závislosti na stavu makroorganismu. Je třeba také zdůraznit, že v rámci běžné mikrobioty, v rámci jednotlivých druhů bakterií mohou být kmeny avirulentní, s nimiž bude žít makroorganismus v míru, a pak kmeny virulentní téhož druhu, které vyvolají onemocnění,

Profil		Tvar	Okraj		
	Plochý		Okrouhlý	Vroubkovaný	
	Zvýšený				
	Vypouklý		Laločnatý	Koncentrická stavba	
	Pupkovitý				
	Knoflíkovitý		Sektorový	Svraštělý	
	Bradavčitý				

Obrázek 2.1 Morfologické znaky kolonií

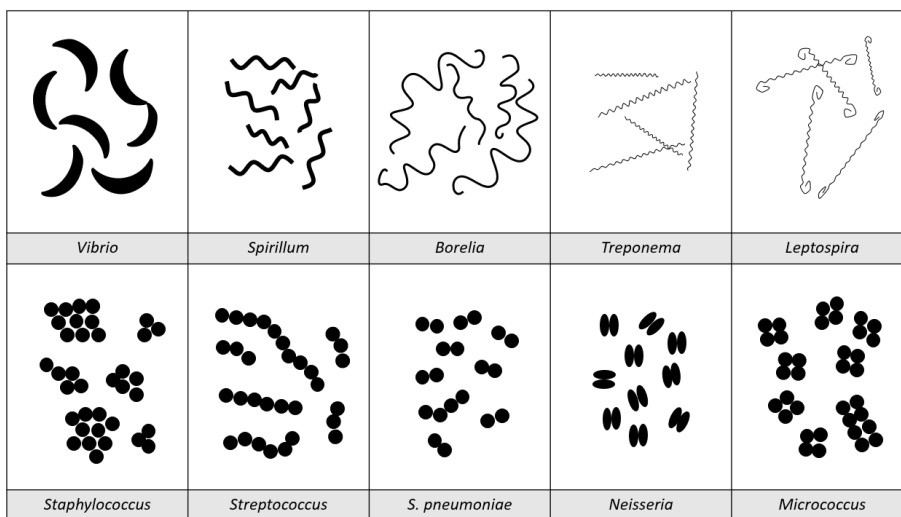
pouze však bude-li se jednat o citlivého jedince, jehož imunitní systém selhává. Mezi normální mikrobiotou jsou především mikroby tzv. oportunně (fakultativně) patogenní, které mohou, ale nemusí vyvolávat onemocnění, na rozdíl od mikrobu obligátně (primárně) patogenních, které onemocnění vyvolají určitě a nepatří tedy mezi normální mikrobiotu (např. *Mycobacterium tuberculosis*).

Různě vypadající kolonie mikroorganismů tedy podrobíme **makroskopickému pozorování kolonií**, což nám umožní orientační identifikaci mikroba. Kromě tvaru kolonie, jejího okraje a profilu (obr. 2.1), je významným znakem barva (např. druh *Micrococcus luteus* má žluté kolonie) anebo transparentnost a velikost kolonií v mm.

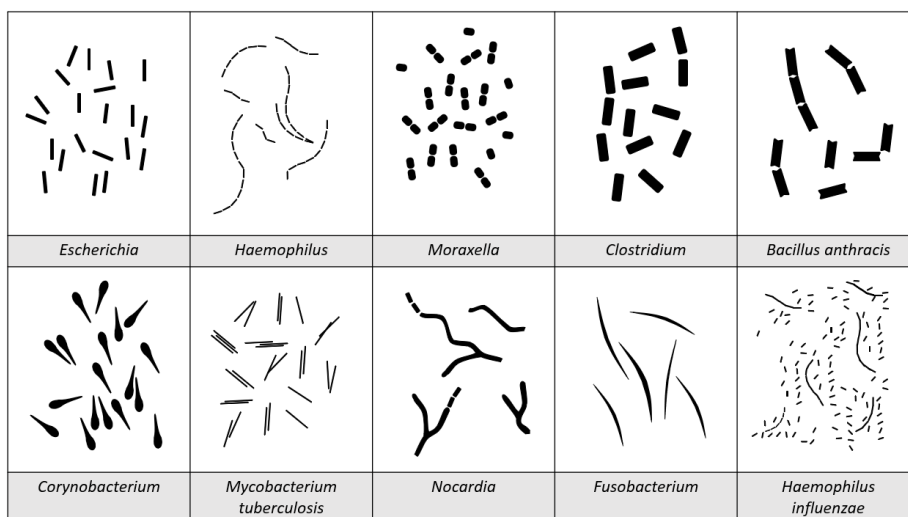
Dalším orientačním postupem je zhotovení mikroskopického preparátu z určité vybrané kolonie a jeho obarvení dle Grama.

Mikroskopickým pozorováním buněk jednotlivých mikroorganismů v rámci populace (kolonie) můžeme sledovat velikost mikroorganismů (např. rod *Staphylococcus* kolem 1 μm , rod *Candida* kolem 10 μm) a tvar jednotlivých buněk mikroorganismů (obr. 2.2 a 2.3) např. kulovitý — koky, protáhlý — tyčinky, spirály. Buňky se vyskytují jednotlivě nebo vytváří dvojice, řetězky, shluky, palisády. U některých bakterií se setkáváme s tzv. pleomorfismem, to znamená přítomností odlišných morfologických forem (koky, tyčinky apod.) u téhož kmene mikroorganismu (např. *Haemophilus influenzae*).

Mikroskopie je jednou ze základních metod, která nám umožňuje identifikaci mikroorganismů. Většinou používáme optický mikroskop, neboť mikroorganismy velikosti kolem 1 μm jsou při použití objektivu 100 \times a imerzního oleje dobře pozorovatelné. Elektronovým mikroskopem můžeme sledovat objekty velikosti 1 – 10 nm, používáme ho např. pro pozorování virů. Nejjednodušším preparátem je tzv. nativní preparát (suspenze mikrobu na sklíčku), který můžeme použít především v diagnostice parazitologické a mykologické, u bakterií jej využíváme v podstatě jen v případě pozorování pohybu.



Obrázek 2.2 Tvary bakterií 1



Obrázek 2.3 Tvary bakterií 2

Můžeme přitom využít různé zvláštní mikroskopické techniky, jako je mikroskopie v zástínu (neboli v temném poli), fázový kontrast apod. Nejčastěji však využíváme preparáty barvené. Abychom mohli preparát obarvit, musíme ho nejprve fixovat. Fixace může být chemická, např. metanolem, bakteriologové však častěji používají fixaci fyzikální, v plameni. Znamená to, že hodně naředěnou suspenzi mikrobiální kultury rozetřeme po

podložním sklíčku a necháme zaschnout při pokojové teplotě. Poté sklíčka protáhneme třikrát plamenem lihového kahanu. Tento postup zajistí devitalizaci mikrobů a buňky zůstanou pevně přichycené ke sklíčku. Následně preparát různými způsoby barvíme. Základním barvením je **barvení dle Grama**, které rozliší bakterie na grampozitivní a gramnegativní (mimo nich existují bakterie Gramem se nebarvící, a také se uvádějí bakterie gramlabilní, u kterých je výsledek barvení nejednoznačný). Toto barvení je založeno na odlišné stavbě buněčné stěny bakterií. Grampozitivní bakterie po obarvení roztokem krystalové violeti a moření Lugolovým roztokem zadržují tento komplex v buněčné stěně a jeví se nám jako fialové, na rozdíl od gramnegativních bakterií, u kterých je tento komplex použitím ethanolu nebo aceton-ethanolové směsi vymyt. Po dobarvení safraninem nebo karbolfuchsinem jsou gramnegativní bakterie obarveny růžově, stejně jako případné buňky hostitele přítomné ve vzorku (leukocyty, epitelie). Naopak kvasinky mají vzhledem ke své buněčné stěně přibližně stejnou barvu jako grampozitivní bakterie. Současně jsme informováni i o tvaru a uspořádání buněk. Grampozitivita anebo gramnegativita bakterií vypovídá také o citlivosti těchto skupin k různým skupinám antibiotik. Podle Grama barvíme nejen čistou kulturu bakterií, ale téměř každý tekutý vzorek zaslaný na mikrobiologické vyšetření (hnis, punktát, sputum apod.). Buněčná stěna některých bakterií obsahuje velké množství mastných kyselin a vosků (např. rod *Mycobacterium*) a nedá se barvit dle Grama. Nejčastěji se proto používá acidorezistentní **barvení podle Ziehl-Neelsena**. Mykobakterie barvíme za horka karbolfuchsinem, odbarvujeme kyselinou sírovou nebo kyselým alkoholem. Po opláchnutí se k dobarvení použije methylenová modř nebo malachitová zeleň, takže acidorezistentní mikroorganismy můžeme pozorovat jako růžové na modrém nebo zeleném pozadí.

K bližšímu určení (identifikaci) se užívá nejčastěji zjišťování biochemických a fyziologických vlastností izolovaného kmene. Někdy je nutno podezřelou kolonii izolovat do čisté kultury, to znamená, že ji přeočkujeme na vybranou selektivní, diagnostickou nebo selektivně diagnostickou půdu, která nám upřesní určitou skupinu mikroorganismů např. enterobakterie, stafylokoky apod. Dále pak používáme tzv. **biochemické identifikační testy**, které jsou v současné době již v hotových diagnostických soupravách a slouží pro diagnostiku zvolené skupiny bakterií např. u nás dostupné ENTEROtest 16 a ENTEROtest 24 (výrobce Erba Lachema Brno), kterým identifikujeme gramnegativní tyčinky z čeledi *Enterobacteriaceae*, STAPHYtest 16 (rovněž Erba Lachema), kterým rozlišíme různé druhy stafylokoků a mikokoků apod. V zahraničí existují obdobné soupravy s jinými názvy (a cenou). Diagnostickou soupravou je v případě u nás používaných souprav mikrotitrační destička s jamkami, v nichž jsou vysušená média se substráty (různé typy sacharidů, aminokyselin apod.) a indikátory, do kterých pipetujeme suspenzi mikrobiální kultury o určité denzitě. Po předepsané inkubaci odečítáme výsledky vizuálně anebo spektrofotometricky. Výsledkem je barevná změna substrátu, ke které dochází, v případě pozitivní biochemické reakce, změnou příslušného indikátoru.

Mezi testy, které nejsou součástí diagnostických souprav, patří průkaz enzymů oxidázy a cytochromoxidázy, které se podílí na oxidativních procesech v mikrobiální buňce. Provádí se pomocí tzv. diagnostických proužků, které můžeme přímo přitisknout na testovanou kolonii. Tento test nám umožňuje rozlišení gramnegativních bakterií. Dalším rychlým testem je test na průkaz katalázy. Tento enzym umožňuje bakteriím rozkládat

toxický peroxid vodíku, vznikající při fagocytóze, na vodu a kyslík. Při testu použijeme kapku 3% peroxidu vodíku, v níž rozetřeme vyšetřovanou kulturu. Při pozitivní reakci dochází k uvolňování bublinek kyslíku. Používá se pro rozlišení grampozitivních koků. Stafylokoky jsou kataláza pozitivní, streptokoky a enterokoky jsou katalázanegativní. Průkaz volné a vázané koagulázy nám umožňuje odlišit druh *Staphylococcus aureus* (koagulázapozitivní) od ostatních stafylokoků, které jsou vesměs koagulázanegativní. Přítomnost tohoto enzymu navyšuje virulenci *Staphylococcus aureus*. Principem stanovení koagulázy je reakce tohoto proteinu s fibrinogenem králičí plazmy, která se projeví tvorbou sraženin. Průkaz hemolyzinů, což jsou mikrobiální toxiny, ovlivňující také virulenci kmene, provádíme na plotnách s krevním agarem. Při kultivaci některých bakterií dochází k tvorbě hemolýzy, což znamená, že krevní agar se v okolí kolonií odbarví, protože působením hemolyzinů dochází k poškození červených krvinek a tím k uvolnění hemoglobinu a jeho rozkladu (např. *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*). Jako viridace se označuje změna krevního barviva na zelený verdoglobin (některé druhy rodu *Streptococcus*).

Cvičení č. 2: Vyhodnocení účinnosti antiseptik, hodnocení křížového roztěru, hodnocení kolonií, Gramovo barvení, katalázový test, mikroskopie trvalých preparátů

Cíle:

- Kontrola dezinfekce a antiseptické účinnosti vybraných dezinfekčních látek
- Vyhodnocení křížového roztěru
- Hodnocení kolonií
- Gramovo barvení
- Katalázový test
- Mikroskopie — trvalé preparáty

(práce ve dvojicích)

Materiál

- Plastová bakteriologická klička
- Pasteurova pipeta plastová
- Podložní skla
- Lihový kahan
- Sada připravených roztoků pro Gramovo barvení, peroxid vodíku 3%
- Mikroskop, sada trvalých preparátů

Pracovní postup

- 1) **Vyhodnocení účinnosti dezinfekčních látek a hodnocení kolonií mikroorganismů** *M. luteus*, *E. coli* a *S. cerevisiae*: spočítejte kolonie v jednotlivých kvadrantech a do protokolu č. 1 vyhodnoťte účinnost jednotlivých antiseptik v procentech; zpracujte výsledky graficky a uveďte antiseptickou účinnost u všech třech mikroorganismů
- 2) **Vyhodnocení křížového roztěru**: zhodnoťte, zda byla kultura naředěna tak, aby byly vidět jednotlivé kolonie
- 3) Dále proveďte **hodnocení kolonií** všech tří studovaných mikroorganismů s ohledem na následující znaky:
 - **velikost** — kolonie jsou tečkovité (menší než 1 mm) nebo se jejich velikost vyjadřuje průměrem v mm
 - **tvar** — kolonie pravidelně okrouhlá, nepravidelná. . .
 - **okraje** — rovné, zvlněné, výběžkaté, kořenovité
 - **profil** — plochý, mírně vypouklý, vypouklý, výrazně vypouklý, vyvýšené okraje. . .
 - **povrch** — lesklý, hladký, matný, drsný, zvrásněný. . .
 - **transparence** — průhledná, průsvitná, neprůsvitná
 - **barva** — bezbarvé, šedobílé, barva daná tvorbou pigmentu (*M. luteus* — žlutá)
- 4) **Gramovo barvení** *M. luteus*, *E. coli* a *S. cerevisiae*:
 - nepatrné množství z vybrané kolonie převedte bakteriologickou kličkou do kapky fyziologického roztoku na podložním sklíčku a nechejte zaschnout
 - připravený suchý preparát fixujte plamenem kahanu — třikrát protáhnout sklíčko odvrácenou stranou plamenem (dojde k usmrcení mikroorganismu a k jeho přichycení na sklíčko)
 - na takto připravený preparát kápněte kapku krystalové violeti a nechte působit 20 sekund
 - bez opláchnutí přikápněte kapku Lugolova roztoku
 - oba roztoky slijte a znovu nalejte dostatečné množství Lugolova roztoku a nechte působit 20 – 30 sekund
 - pomocí pipety přikapávejte opatrně aceton-ethanolovou směs na zešíkmené sklíčko nad nátěrem a nechejte volně stékat přes preparát, dokud nedojde k odbarvení (odtékající směs je bezbarvá)
 - preparát poté dobře opláchněte destilovanou vodou (stříčkou nebo pipetou, stejně opatrně jako při odbarvování)
 - na preparát přikápněte roztoku safraninu a nechte dobarvit po dobu — minimálně 60 sekund

- nakonec preparát znovu opláchněte destilovanou vodou a nechte oschnout; mikroskopujte v olejové imerzi (objektiv 100×)
- 5) **Katalázový test:** vyšetřovanou bakteriální kulturu rozetřete sterilní bakteriologickou kličkou na podložním skle v kapce 3 % peroxidu vodíku a pozorujte, zda dojde k uvolňování kyslíku
- 6) **Mikroskopie trvalých preparátů**

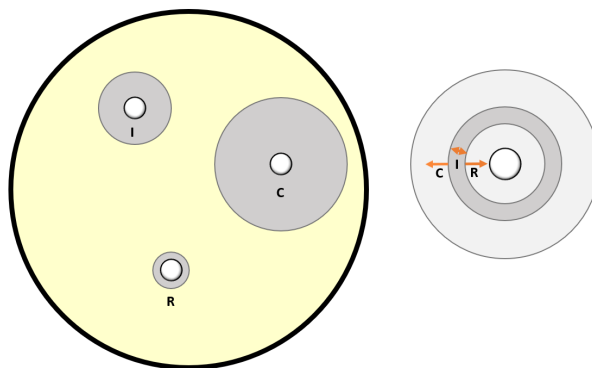
Protokol č. 2 bude obsahovat:

- hodnocení kolonií všech tří mikroorganismů dle znaků uvedených v bodě 3
- vyhodnocení křížového roztěru — podařilo se zředit kulturu natolik, abychom viděli jednotlivé kolonie?
- postup barvení Gramem, princip, nákres anebo fotku mikroskopických preparátů připravených ve cvičení
- odpověď na otázku, zda *M. luteus* a *E. coli* jsou katalázapozitivní anebo katalázane­gativní
- nákres anebo fotku trvalých preparátů, popis, zda se jedná o koky, tyčinky, G^+ , G^- , které z nich jsou součástí normální mikrobioty a kde se s nimi můžeme setkat (kůže, GIT apod.) a jaká onemocnění mohou způsobit

3 Stanovení citlivosti bakterií k antibiotikům

V předcházejících dvou cvičeních se nám podařilo získat pomocí kultivace, mikroskopie a biochemických metod kmen určitého druhu mikroorganismu, který pocházel ze zaslaného vzorku. Předpokládejme tedy, že tento kmen je odpovědný za infekci, kvůli které vzorek klinický lékař zaslal do mikrobiologické laboratoře. Abychom mohli navrhnout klinickému lékaři vhodné antibiotikum, na které bude daný kmen citlivý, musíme provést **stanovení citlivosti k antibiotikům**. Ta se stanovuje především fenotypovými metodami, které se dělí na kvalitativní průkaz citlivosti a kvantitativní stanovení citlivosti. Ke kvalitativnímu průkazu se používá nejčastěji disková difuzní metoda, ke kvantitativnímu stanovení citlivosti slouží diluční metody, především stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC) mikrodiluční metodou. Všechny testy pro stanovení citlivosti k antimikrobiálním látkám využívají půdu dle Muellera a Hintonové (MH) ve formě bujony a agaru. Od živného agaru se liší nepřítomností peptonu, který by bránil difuzi antibiotik agarem. Obsahuje také škrob, který chrání mikroby před jejich toxickými metabolity. Půda dle MH je využívána pro vyšetření citlivosti většiny grampozitivních i gramnegativních bakterií. Referenční kmeny jsou uchovávány při -80°C v glycerolovém médiu. Čistou kulturu lze vyočkovávat a používat denně do 7 dnů, pak je potřeba použít novou zamraženou kulturu. Výsledky testování mohou být výrazně ovlivněny stářím buněk (růstovou fází), koncentrací a způsobem přípravy inokula. Pro diskovou metodu se obvykle připravuje výchozí inokulum o koncentraci přibližně $1-2 \times 10^8$ CFU/ml u *Escherichia coli*, což odpovídá zákalovému standardu 0,5 stupňů McFarlanda. V případě

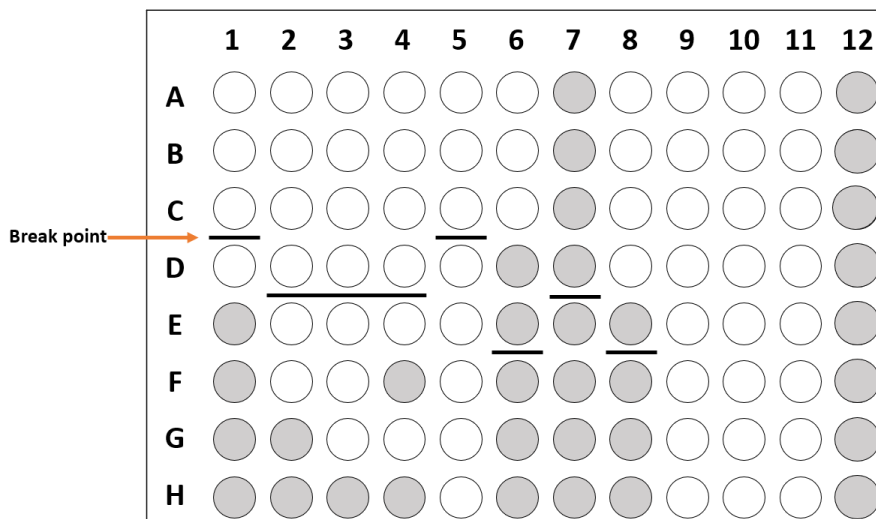
Obrázek 3.1 Disková difuzní metoda



mikrodiluční metody je výchozí inokulum upraveno na konečnou koncentraci $10^4 - 10^5$ buněk v ml, a to ředěním výchozího inokula fyziologickým roztokem nebo bujonem.

Disková difuzní metoda patří mezi rutinní vyšetření a užívá se pro stanovení citlivosti anebo rezistence k antimikrobním látkám na základě velikosti zóny, která se vytvoří po předepsané době inkubace kolem disku, napuštěného určitou antimikrobní látkou. Aby byl výsledek testu spolehlivý, musí se přesně dodržovat předepsaný postup. Do Petriho misky o průměru 9 cm se nalije 25 ml uvařeného a sterilizovaného média, což vytvoří vrstvu 4 mm vysokou. Před inokulací je potřeba případný kondenzát na povrchu agarů vysušit, protože jinak může dojít k rozmytí zóny. Provedeme očkování roztěrem, to znamená, že 1 ml inokula o hustotě 0,5 McFarlanda pečlivě rozetřeme po povrchu agarů pomocí hokejky nebo špičky a případný přebytek odsajeme anebo provedeme roztěr vatovým tampónem. Po naočkování (do 15 minut) klademe na zaschlý povrch antibiotické disky, na misku o průměru 9 cm maximálně 6 disků. Disky musíme pevně přitisknout, neboť naočkované misky se inkubují dnem vzhůru (18 hodin při 35 – 37°C). Po inkubaci se výsledky odečtou, to znamená, že se změří průměry inhibičních zón a na základě toho jsou zařazeny do kategorie citlivý (C), intermediární rezistentní (I) nebo rezistentní (R) k určité antimikrobiální látce (obr. 3.1). Referenční hodnoty získáme z tabulek EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) na stránkách Státního zdravotního ústavu (EUCAST Breakpoint Tables — www.eucast.org; česky: <http://www.szu.cz/eucastdokumenty>).

Stanovení minimální inhibiční koncentrace mikrodiluční metodou se provádí při vyšetřování citlivosti kmenů, které byly izolovány z krve anebo u mikrobu vypěstovaných z klinicky závažných případů. Tato metoda je užívána k určení minimální koncentrace antibiotika, potřebného k inhibici růstu vyšetřované bakterie a současně nám umožňuje stanovit citlivost nebo rezistenci daného kmene. Stanovení provádíme v mikrotitračních destičkách, které mají 96 jamek s rovným dnem. Pomocí multikanálových pipet do destiček pipetujeme médium a antibiotika. Jedna destička obvykle slouží pro kultivaci jednoho kmene s několika různými antibiotiky v osmi různých koncentracích, které získáme ředěním přímo v jamkách. Výsledný objem v jamce je většinou 100 μ l. Uspořádání destičky je možno modifikovat dle potřeby, vždy by však měla být zastoupena



Obrázek 3.2 Stanovení minimální inhibiční koncentrace, mikrotitrační destička

kontrola růstu, což je bujon bez antibiotika s mikroorganismem a kontrola kontaminace živného média, což je bujon bez antibiotika a bez mikroorganismu. Do jamek očkujeme inokulum o hustotě 0,5 McFarlanda, výsledná koncentrace v jamkách by měla být $10^4 - 10^5$ CFU/ml. Po stanovené době inkubace odečteme hodnotu minimální inhibiční koncentrace (MIC) jako nejnižší koncentraci antimikrobiální látky bez viditelného růstu mikroorganismů (zákal, sediment). Odečítání hodnot MIC je vizuální, případně spektrofotometrické za použití readeru. MIC se obvykle vyjadřuje v $\mu\text{g/ml}$ nebo v mg/l . Výsledky jsou opět porovnány s tabulkami breakpointů EUCAST. Klinické breakpointy jsou používány v klinických laboratořích k optimalizaci léčby pacienta a předcházení vzniku rezistence v důsledku užití nesprávného antibiotika v nevhodné koncentraci. Kmeny, jejichž MIC je nižší než stanovený breakpoint (rozhraní mezi citlivým a rezistentním kmenem), jsou k dané antimikrobiální látce citlivé. Kmeny, jejichž MIC je vyšší než breakpoint, jsou k dané antimikrobiální látce rezistentní. Na obrázku 3.2 jsou ve sloupcích 1 – 5, 9 – 11 kmeny, jejichž MIC je menší než breakpoint, jsou tedy citlivé. Ve sloupcích 6 – 8 jsou kmeny, jejichž MIC je větší než breakpoint, jsou rezistentní. Ve sloupci 12 je kontrola růstu. Koncentrace antibiotika stoupá ve sloupcích od H po A, každá jamka je dvojnásobkem koncentrace předchozí jamky.

U závažných stavů a u pacientů s poruchou imunity musí být nasazena antibiotika s baktericidním účinkem. Teoreticky by u nich bylo možno provést stanovení minimální baktericidní koncentrace (MBC). MBC je nejnižší koncentrace antibiotika, která je schopna usmrtit všechny bakteriální buňky (99,9%). Při stanovení se vychází z testování MIC. Tekutina z jamek, ve kterých došlo k inhibici růstu, se přeočkuje na pevnou půdu (případně do tekuté půdy) a nechá se opět 18–24 hodin kultivovat. Poté sledujeme případný nárůst kolonií na pevné půdě anebo zákal v tekuté půdě. Pokud dochází k ná-

růstu, koncentrace antibiotika mikroorganismus neusmrtila, pouze potlačila jeho růst. Pátráme tedy po nejnižší koncentraci antibiotika, která je ještě schopna mikroorganismus usmrtit (MBC).

V praxi se MBC ani u baktericidně působících antibiotik zpravidla nestanovuje. Hodnota MIC a MBC je u primárně baktericidních antibiotik téměř shodná, a proto stanovení MIC určí dostatečně dobře, zda antibiotikum bude možno využít. Zároveň u primárně bakteriostatických antibiotik je prakticky využitelné pouze určení MIC, protože hodnoty MBC jsou u nich tak vysoké, že se v praxi nedají využít. Stanovení MIC se tedy v praxi využívá u všech antibiotik, tj. primárně baktericidních i primárně bakteriostatických.

Cvičení č. 3: Stanovení citlivosti mikrobů k antimikrobiálním látkám

Cíle:

- Diskový difuzní test
- Mikrodiluční metoda — stanovení MIC

(práce ve dvojicích)

Materiál

- hotová miska s Nutrientbroth agarem (z prvního cvičení)
- tekutý Nutrientbroth
- roztoky chloramfenikolu
- automatické pipety
- sterilní Petriho misky pro multikanálovou automatickou pipetu
- sterilní špičky v krabičkách
- sterilní papírové disky
- sterilní pinzeta
- mikrobiologické zkumavky
- mikrotitrační destičky
- plastová bakteriologická klička
- denzitometr
- vortex

Pracovní postup

1) **příprava inokula (suspenze) *E. coli*:**

- k přípravě použijte jednotlivou kolonii získanou izolačním očkováním; požadovaná denzita suspenze je 0,5 McFarlanda, změřte pomocí denzitometru

	1. dvojice studentů				2. dvojice studentů				3. dvojice studentů				Výsledná koncentrace chloramfenikolu:
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A													32 μ g/ml
B													16 μ g/ml
C													8 μ g/ml
D													4 μ g/ml
E													2 μ g/ml
F													1 μ g/ml
G													0.5 μ g/ml
H													KONTROLA

Obrázek 3.3 Rozdělení mikrotitrační destičky

2) diskový difúzní test:

- na spodní straně Petriho misky označte místa disků i s koncentrací chloramfenikolu
- na Nutrientbroth agar pipetou naneste 1 ml bakteriální suspenze; přebytečnou tekutinu odsajte pipetou
- dále na agar vložte 4 disky pomocí sterilní pinzety (předtím na disky nakapejte pipetou 10 μ l připravených roztoků chloramfenikolu a média)
 1. disk: 3000 μ g/ml roztok chloramfenikolu (množství na disku 30 μ g)
 2. disk: 1500 μ g/ml roztok chloramfenikolu (množství na disku 15 μ g)
 3. disk: 750 μ g/ml roztok chloramfenikolu (množství na disku 7,5 μ g)
 4. disk: médium

3) Proveďte kvantitativní test mikrodiluční metodou (stanovení MIC):

- tři dvojice studentů budou mít k dispozici mikrotitrační destičku rozdělenou (podle obr. 3.3) a postupně každá dvojice zpracuje své 4 sloupce
- nejprve přidejte do jamek tekuté médium Nutrient broth:
 - řádek A 180 μ l
 - řádky B až G 100 μ l
 - řádek H 100 μ l
- do jamky v řádku A přidejte 20 μ l zásobního roztoku chloramfenikolu 320 μ g/ml, roztok pipetou promíchejte a do jamky v řádku B přepipetujte 100 μ l — takto postupujte až do řádku G (z jamky v řádku G nezapomeňte 100 μ l odpipetovat do odpadní nádoby), aby zůstal zachovaný stejný objem média)

- nyní přelijte připravené inokulum *E. coli* (0,5 McFarlanda) do sterilní plastové Petriho misky, odeberte multikanálovou pipetou 1 μ l inokula a převedte do jamek v destičce, postupujte od kontroly směrem nahoru; mikrotitrační destičku nechejte kultivovat při 37°C 24 hodin; destičky budou pak uloženy v lednici do dalšího cvičení

Protokol č. 3 bude obsahovat:

- co je to McFarlandova stupnice optické denzity? A jak ji stanovujeme?
- popište postup při diskovém difúzním testu, v dalším cvičení provedete měření velikosti inhibičních zón a doplníte do tohoto protokolu
- následným porovnáním s referenčními hodnotami dle EUCAST vyhodnotíte, zda je testovaný kmen *E. coli* citlivý anebo rezistentní, nákres nebo foto
- postup při stanovení MIC, v dalším cvičení doplníte výsledek (koncentraci chloramfenikolu v μ g/ml, která inhibovala růst *E. coli*)
- srovnáním s referenčními hodnotami dle EUCAST vyhodnotíte, zda je testovaný kmen *E. coli* citlivý anebo rezistentní, nákres nebo foto
- popište ATB chloramfenikol (baktericidní nebo bakteriostatické, princip účinku, užití...)

4 Mikrobiologická jakost farmaceutických produktů, stanovení množství mikroorganismů ve vzorku

V některých případech je nezbytné provést **stanovení množství mikroorganismů ve vzorku**. Stanovujeme počet kolonií, který odpovídá počtu CFU v 1 ml původního vzorku (CFU = Colony Forming Unit, neboli KTJ = kolonii tvořící jednotka). Příkladem může být vyšetření moče, kdy teprve hodnoty 10^4 až 10^5 CFU/ml svědčí o močové infekci. Dalším příkladem, který je významný pro studenty farmacie je **stanovení mikrobiologické jakosti farmaceutických produktů**, které musí být buď sterilní anebo musí vykazovat určitou mikrobiologickou jakost, která je uvedena v Českém lékopisu 2017. Uvedeme si proto kategorie farmaceutických přípravků dle jejich mikrobiologické jakosti a lékopisné zkoušky, které se týkají mikrobiologické jakosti.

Sterilita produktu musí být zajištěna použitím vhodných validovaných postupů produkce. Je nutné dodržovat správnou výrobní praxi, která zahrnuje kvalifikovaný personál, odpovídající výrobní prostory, vhodné zařízení pro sterilizaci, opatření k minimalizaci mikrobiální kontaminace před sterilizací a použití vstupních materiálů s nízkou mikrobiální kontaminací. Důraz je kladen na validované postupy, při kterých je prokázáno, že daným postupem je možno odstranit nejen bakterie, kvasinky a plísňe, ale také viry. Musí být pravidelně prováděn mikrobiologický monitoring a mezioperační výrobní kontroly. Je-li to možné, používá se sterilizace v konečném obalu parou, suchým teplem nebo ionizujícím zářením. Není-li možná sterilizace v konečném obalu, je

použita filtrace přes membránové filtry, ve všech případech je požadováno, aby obal i uzávěr zajistily sterilitu produktu po dobu jeho použitelnosti.

V určitých případech je užíván pojem „hladina sterilizační jistoty“ (sterility assurance level, SAL). Užívá se proto, že nemůžeme zaručit sterilitu u každé jednotky z určitého souboru podrobeného sterilizaci. Vždy zůstává určitá statistická pravděpodobnost, že nějaký mikroorganismus sterilizační proces přežije. Hladina sterilizační jistoty daného postupu je vyjádřena jako pravděpodobnost výskytu nesterilních položek v tomto souboru. Např. hladina sterilizační jistoty 10^{-6} vyjadřuje pravděpodobnost výskytu nejvýše jednoho životaschopného mikroorganismu v 1×10^6 položek konečného produktu.

Přítomnost určitých mikroorganismů v nesterilních přípravných může potenciálně snížit nebo inaktivovat léčivý účinek produktu a může potenciálně nepříznivě ovlivnit zdraví pacienta. Výrobci proto musí zajistit nízkou mikrobiologickou zátěž konečných lékových forem. V lékopise je uvedený nejmenší počet jednotek v rámci šarže, který musí být použit pro zkoušku na sterilitu.

• Kategorie farmaceutických produktů dle mikrobiologické jakosti

- **Léčivé přípravky s předepsanou sterilitou, nebo jiné přípravky, jež jsou označeny jako sterilní.**

Je požadována zkouška na sterilitu.

- Sterilní léčiva, jednorázové pomůcky, nástroje a implantáty
 - Infusní roztoky (NaCl, glukóza apod.)
 - Krev, krevní deriváty a krevní náhražky (dextran)
 - Úplná parenterální výživa (aminokyseliny, vitamíny, glukóza, tuky apod.)
 - Injekčně (nitrožilně, nitrosvalově, podkožně) podávané roztoky (1 – 50 ml) inzuliny, vakcíny, hormony, antibiotika
 - Sterilní voda na omývání nebo zvlhčování tkáně atd.
 - Dialyzační roztoky
 - Oční kapky
 - Rostoky na kontaktní čočky
 - Chirurgické nitě, obvazové materiály, vata
 - Drobné nástroje a jednorázové pomůcky (jehly, stříkačky, rukavice, katetry, skalpely, chirurgické nůžky, kleště atd.)
 - Kardiostimulátory, umělé chlopně, kloubní náhrady, atd.
- **Nesterilní léčivé přípravky a látky pro farmaceutické použití**

V rámci mikrobiologického zkoušení nesterilních produktů je požadováno jednak stanovení počtu mikroorganismů a dále zkoušky na specifikované mikroorganismy.

- Lékopis uvádí kritéria přijatelnosti, založená na *celkovém počtu aerobních mikroorganismů (TAMC) a celkovém počtu kvasinek a plísní (TYMC)* v CFU/g nebo

CFU/ml

10¹ CFU: nejvyšší přijatelný počet = 20

10² CFU: nejvyšší přijatelný počet = 200

10³ CFU: nejvyšší přijatelný počet = 2000, atd.

Dále specifikuje mikroorganismy, které nesmí být přítomny.

- Nevodné přípravky pro perorální podání, je povoleno TAMC 10³, TYMC 10², nepřítomnost *Escherichia coli* (v 1 g nebo 1 ml)
 - Vodné přípravky pro perorální podání, je povoleno TAMC 10², TYMC 10¹, nepřítomnost *Escherichia coli* (v 1 g nebo 1 ml)
 - Rektální podání, je povoleno TAMC 10³, TYMC 10²
 - Orální podání, kožní, nosní, ušní podání, je povoleno TAMC 10², TYMC 10¹, nepřítomnost *Staphylococcus aureus* a *Pseudomonas aeruginosa* (v 1 g nebo 1 ml)
 - Vaginální podání, je povoleno TAMC 10², TYMC 10¹, nepřítomnost *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* (v 1 g nebo 1 ml)
 - Transdermální náplasti, je povoleno TAMC 10², TYMC 10¹, nepřítomnost *Staphylococcus aureus* a *Pseudomonas aeruginosa* (v 1 g nebo 1 ml)
 - Inhalační podání, je povoleno TAMC 10², TYMC 10¹, nepřítomnost *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* a žluč tolerujících gramnegativních bakterií (v 1 g nebo 1 ml)
 - Perorální léčivé formy, obsahující látky přírodního původu, které nelze protimikrobně ošetřit a TAMC suroviny přesahuje 10³, je povoleno TAMC 10⁴, TYMC 10², nepřítomnost *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* (v 10 g nebo 10 ml) a *Escherichia coli* (v 1 g nebo 1 ml)
 - Premixy pro medikaci krmiva pro veterinární použití s pomocnými látkami rostlinného původu, které nelze protimikrobně ošetřit, je povoleno TAMC 10⁵, TYMC 10⁴, nepřítomnost *Escherichia coli* (v 1 g nebo 1 ml), *Salmonella* (v 25 g nebo 25 ml), maximálně 10⁴ žluč tolerujících gramnegativních bakterií (v 1 g nebo 1 ml)
- **Rostlinné léčivé produkty pro perorální použití a extrakty pro jejich přípravu**
V rámci mikrobiologického zkoušení nesterilních produktů je požadováno jednak stanovení počtu mikroorganismů a dále zkoušky na specifikované mikroorganismy
- Rostlinné léčivé produkty obsahující rostlinné drogy určené pro přípravu nálevů a odvarů za použití vroucí vody (např. rostlinné čaje) — je povoleno TAMC 10⁷, maximálně 50 000 000 CFU/g, TYMC 10⁵, maximálně 500 000 CFU/g, *Escherichia coli* CFU/g 10³, nepřítomnost *Salmonella*
 - Rostlinné léčivé produkty obsahující rostlinné drogy nebo extrakty, jejichž způsob přípravy (např. extrakce) nebo předchozí ošetření redukuje hladiny mikroorganismů — je povoleno TAMC 10⁴, maximálně 50 000 CFU/g nebo CFU/ml, TYMC 10², maximálně 500 CFU/g nebo CFU/ml, žluč tolerující gramnegativní bakterie 10⁴, nepřítomnost *Salmonella*, *Escherichia coli*

- Rostlinné léčivé produkty obsahující rostlinné drogy nebo extrakty, jejichž způsob přípravy neredukuje hladiny mikroorganismů na úroveň uvedenou v části B — je povoleno TAMC 10^5 , maximálně 500 000 CFU/g nebo CFU/ml, TYMC 10^4 , maximálně 50 000 CFU/g nebo CFU/ml, žluč tolerující gramnegativní bakterie 10^4 , nepřítomnost *Salmonella*, *Escherichia coli*

- **Lékopisné zkoušky na stanovení mikrobiologické jakosti farmaceutických produktů**

- * **Zkouška na sterilitu**

Tato zkouška se provádí u látek a přípravků nebo vybavení, kde je v souladu s lékopisem požadována sterilita. Vyhovující výsledek pouze udává, že ve zkoušeném vzorku nebyl nalezen v podmínkách zkoušky žádný kontaminující mikroorganismus.

Zkouška na sterilitu se provádí za aseptických podmínek. Veškeré pracovní prostory, v nichž je zkouška prováděna, se pravidelně monitorují vhodnou kontrolou (např. stěry, spad).

Živné půdy pro zkoušku se mohou připravit, nebo mohou být použity rovnocenné komerční půdy. Používají se dvě základní půdy. Thioglykolátová půda je určena především pro kultivaci anaerobních bakterií (umožňuje i kultivaci aerobních bakterií) a půda s hydrolyzáty sóji a kaseinu, která je určena jak pro kultivaci hub, tak pro kultivaci aerobních bakterií. Před prováděním zkoušky je třeba půdy inkubovat 14 dní pro průkaz sterility.

U každé šarže čerstvě připravené půdy je potřeba provést růstovou zkoušku aerobních a anaerobních bakterií. Mikroorganismy použité k inokulaci mohou projít maximálně pěti pasážemi z původního matečného inokula. Je také třeba provést zkoušku způsobilosti metody.

Zkouška může být provedena metodou membránové filtrace nebo přímou inokulací zkoušeného produktu do živné půdy. Jsou zahrnuty vhodné negativní kontroly. Metoda membránové filtrace je použita u vodných, ethanolových a olejových přípravků nebo přípravků mísitelných nebo rozpustných ve vodných nebo olejových rozpouštědlech. Tato rozpouštědla nesmí vykazovat v podmínkách zkoušky protimikrobní účinek. Používají se membránové filtry o velikosti pórů max. $0,45 \mu\text{m}$, je nutno filtrovat za aseptických podmínek, je nutné umožnit aseptické vyjmutí membránového filtru a jeho přenesení do živné půdy. Celý membránový filtr je přenesen do živné půdy nebo se asepticky rozdělí na dvě části a každá polovina je převedena do jedné ze dvou vhodných půd.

Půdy jsou inkubovány nejméně 14 dnů. Půdy jsou makroskopicky vyšetřeny na případný nárůst mikrobů v průběhu inkubace (kultivace) a na její závěr (14 dnů). Není-li pozorován žádný nárůst, zkoušený produkt vyhovuje zkoušce na sterilitu.

* **Mikrobiologické zkoušení nesterilních produktů: stanovení počtu mikroorganismů**

Zkoušky umožňují kvantitativní vyjádření mezofilních aerobních bakterií a hub. Tyto metody nemohou být použity pro produkty, které obsahují mikroorganismy jako aktivní složky. Pokud má zkoušený produkt protimikrobní účinky musí být přiměřeným způsobem odstraněny. Před započítáním zkoušky je také třeba ověřit růstové vlastnosti půd a kmenů, použitých pro testování. Týká se to každé šarže. Suspenze zkušebních kmenů nesmí projít více než pěti pasážemi z původního mateřského inokula. Vzorky jsou zpracovávány v závislosti na lipofilitě.

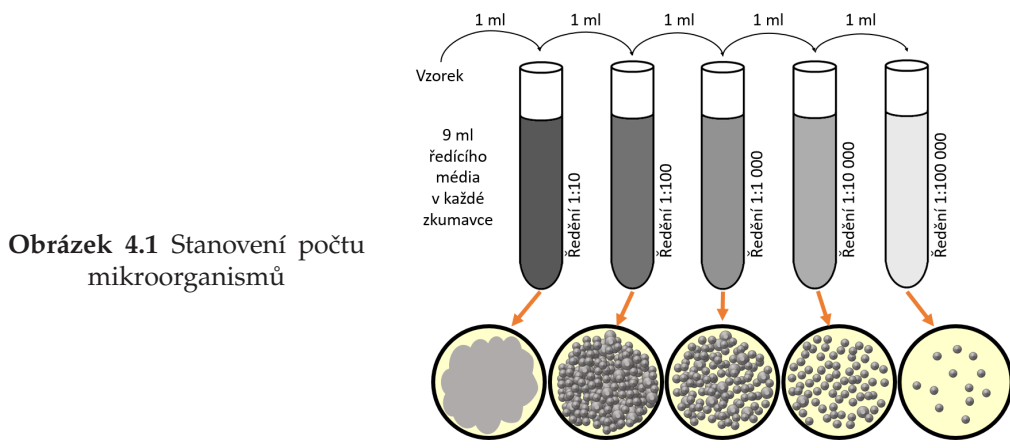
- *Produkty rozpustné ve vodě* jsou zředěny 1:10 v tlumivém roztoku chloridu sodného s peptonem o pH 7,0, ve fosforečnanovém tlumivém roztoku o pH 7,2 nebo v tekuté půdě s hydrolyzáty sóji a kaseinu.
- *Nelipidické produkty nerozpustné ve vodě* jsou zředěny 1:10 v tlumivém roztoku chloridu sodného s peptonem o pH 7,0, ve fosforečnanovém tlumivém roztoku o pH 7,2 nebo v tekuté půdě s hydrolyzáty sóji a kaseinu a může být přidána povrchově aktivní látka jako je např. roztok polysorbátu 80 (1 g/l) pro usnadnění tvorby suspenze špatně smáčivých látek.
- *Lipidické produkty* jsou rozpuštěny v isopropyl-myristátu, který je sterilizován membránovou filtrací nebo je smíchán se sterilním polysorbátem 80 (1 g/l), je zahříván na max. 45°C ve vodní lázni a naředěn 1:10 tak, aby vznikla emulze.
- *Transdermální náplasti* jsou zpracovávány tak, že lepidlo na povrchu náplasti je překryt sterilním porézním materiálem (gázou) a vzorek je vložen do rozpouštědla a třepán nejméně 30 minut.

Jednou z používaných metod je **zalévání do agarů**. Používají se Petriho misky o průměru 9 cm, do každé je přidán 1 ml vzorku (1:10) a 15 až 20 ml vhodné agarové půdy, zahřáté max. na 45°C (opět nejméně 2 misky pro každý mikroorganismus). Po inkubaci se stanoví aritmetický průměr pro každou půdu a vypočítá se počet jednotek vytvářejících kolonie v původním inokulu (CFU/ml).

Nejužívanější metodou je **metoda inokulace na povrch agarové půdy**. Do Petriho misky o průměru 9 cm je převedeno 15–20 ml vhodné půdy, sterilizované a vychladlé na 45°C. Po ztuhnutí se nechá povrch půdy zaschnout (v laminárním boxu). Pro každý mikroorganismus jsou připraveny dvě misky. Odměřený objem (1 ml), nejméně však 0,1 ml vzorku je rozetřen na povrch půdy. Po inkubaci se stanoví aritmetický průměr pro každou půdu a vypočítá se počet jednotek vytvářejících kolonie v původním inokulu (CFU/ml).

Očekáváme-li velkou mikrobiální kontaminaci, musíme provést sériové ředění vzorku, aby bylo možno kolonie spočítat. Ředění provádíme ve zkumavkách, z nichž potom odebereme 1 ml, který vyočkujeme na agarovou plotnu.

Na Petriho misce, kde již vidíme jednotlivé kolonie, spočítáme počet kolonií a tento počet vynásobíme počtem ředění. Získáme tak počet jednotek vytvářejících kolonie v původním inokulu (CFU/ml) (obr. 4.1).



* **Mikrobiologické zkoušení nesterilních produktů: zkoušky na specifikované mikroorganismy**

Zkoušky jsou navrhované tak, aby bylo určeno, zda látka nebo přípravek odpovídá stanovené specifikaci mikrobiologické jakosti. Sleduje se tedy případná přítomnost *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, klostridií a *Candida albicans*. V případě, že má produkt protimikrobní účinky, je třeba provést neutralizaci. Tak jako v předchozích případech je potřeba ověřit růstové vlastnosti půd a kmenů. Vzorky jsou ředěny v poměru 1:10, v případě rodu *Salmonella* nejméně 10 g nebo 10 ml produktu, v případě ostatních mikroorganismů 1 g nebo 1 ml produktu. Vzorky jsou převedeny do vhodných tekutých půd, kde jsou inkubovány za přesně stanovených podmínek. Po této předinkubaci je proveden odběr a subkultivace na vhodných selektivních tekutých a pevných půdách. Pokud dojde na pevné půdě k růstu kolonií, ukazuje to na možnou přítomnost daného mikroorganismu. Ta musí být potvrzena vhodnými biochemickými testy. Aby produkt vyhověl, nesmí být přítomny žádné kolonie nebo musí být biochemické identifikační zkoušky negativní.

Cvičení č. 4: Vyhodnocení diskového difúzního testu a MIC, stanovení MBC, stanovení mikrobiologické jakosti neznámého vzorku (stanovení počtu mikroorganismů)

Cíle:

- Vyhodnocení diskového difúzního testu
- Vyhodnocení citlivosti *Escherichia coli* k chloramfenikolu (MIC)
- Stanovení minimální baktericidní koncentrace chloramfenikolu (MBC)
- Stanovení mikrobiologické jakosti neznámého vzorku (stanovení počtu mikroorganismů)

Materiál

- masopeptonový bujón (nutrientbroth) — hotová půda v Petriho misce
- masopeptonový bujón (nutrientbroth) — tekutý
- bakteriologická klička
- mikrobiologické zkumavky
- zkumavka s kalibrací
- vortex
- automatická pipeta
- pravítko papírové
- transluminátor

Pracovní postup

1) Vyhodnocení diskového difúzního testu

- *E. coli* byla v růstu inhibována chloramfenikolem a kolem disků se vytvořily inhibiční zóny, změřte pravítkem průměr zón, dle EUCASTU vyhodnoťte, zda se jedná o citlivý anebo rezistentní kmen a výsledky zaznamenejte do protokolu č. 3

2) Vyhodnocení citlivosti *Escherichia coli* k chloramfenikolu (MIC)

- za MIC se považuje nejnižší koncentrace antibiotika, která je ještě schopna potlačit (inhibovat) růst testovaných mikrobů
- stanovte MIC chloramfenikolu dle zákalu v jamkách
- dle EUCASTU vyhodnoťte, zda se jedná o citlivý anebo rezistentní kmen a výsledky zaznamenejte do protokolu č. 3

3) Stanovení minimální baktericidní koncentrace chloramfenikolu (MBC)

- Petriho misku s Nutrientbroth agarem rozdělte na takový počet kvadrantů jako je jamek bez zákalu v mikrotitrační destičce, kde byla stanovena MIC
- bakteriologickou kličkou vyočkejte všechny 4 jamky náležející k určité koncentraci chloramfenikolu do určeného kvadrantu
- stejným způsobem postupujte v případě dalších koncentrací bez zákalu (např. 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 16 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 32 $\mu\text{g}/\text{ml}$) — vždy s novou bakteriologickou kličkou!

4) Stanovení mikrobiologické jakosti neznámého vzorku (stanovení počtu mikrobů)

- proveďte sériové ředění neznámého vzorku (modifikovaná metoda); každá dvojice bude mít 1 Petriho misku s Nutrientbroth agarem, kterou rozdělí na 5 segmentů, to znamená 5 ředění

- připravte sadu (5) mikrozkušavek (1,5 ml) do každé odpipetujte 900 μ l maso-peptonového bujónu (Nutrientbroth) — tekutého a uzavřete uzávěrem
- neznámý vzorek před použitím řádně promíchejte na vortexu, pak odeberte 100 μ l vzorku a přidejte do první mikrozkušavky, dobře promíchejte, odeberte 100 μ l do další zkumavky atd.
- všech 5 mikrozkušavek opět promíchejte na vortexu, odeberte 100 μ l z každé a dobře špičkou rozetřete po segmentu na agaru v misce (aniž byste porušili povrch agaru)
- Kultivace bude probíhat při 37°C 24 hodin, pak budou agary uloženy v lednici do dalšího cvičení

Protokol č. 4 bude obsahovat:

- definici MIC a MBC; v posledním cvičení vyhodnotíte MBC a výsledky doplníte do tohoto protokolu — zhodnotíte, zda je chloramfenikol bakteriostatický anebo baktericidní
- v posledním cvičení vyhodnotíte počet bakterií v neznámém vzorku, do protokolu nakreslete ředící schéma

5 Molekulární a sérologické metody v průkazu mikroorganismů a infekcí

Molekulární metody a sérologické metody (v nejširším smyslu toho slova) byly v klinické mikrobiologii uživané již dříve, především v diagnostice mikroorganismů, jejichž kultivace na umělých půdách je nemožná anebo velmi obtížná, dále u pomalu rostoucích mikroorganismů a všude tam, kde se jedná o život ohrožující infekce a je důležitá rychlost diagnostických metod. V současné době dochází k velkému rozvoji těchto metod i u mikrobů, kde stále dominují klasické metody mikrobiologie, jako je kultivace, mikroskopie a biochemické metody; u těchto mikrobů mají ale zpravidla jiný význam (genotypizace konkrétního kmene, analýza přítomnosti konkrétního významného genu apod.). Zatímco molekulární metody (průkaz nukleové kyseliny mikroba) jsou vždy *přímé*, tj. prokazují přítomnost mikroorganismu v makroorganismu, serologické metody, založené na principu interakce antigenu s protilátkou, mohou být buďto *přímé* (prokazujeme antigen pomocí laboratorní protilátky proti danému mikrobovi) nebo *nepřímé* (prokazujeme protilátky testovaného jedince pomocí laboratorního antigenu).

Na rozdíl od přímých metod pozitivita nepřímé metody prokazuje pouze to, že se makroorganismus s daným mikroorganismem někdy setkal. Nález protilátek tedy často nestačí k průkazu probíhající infekce. Aby bylo možno se alespoň částečně vyjádřit k fázi onemocnění, je zpravidla potřeba více údajů (například vývoj množství protilátek v čase nebo údaje o třídě nalezené protilátky). Na druhou stranu, nepřímé metody mají i jednu velkou výhodu: není u nich nutno vědět, kde v těle je mikrob lokalizován (u některých to ani nejde — např. toxoplazmóza nebo lymeská borelióza). Analyzovaným vzorkem

je totiž až na výjimky krevní sérum, a to bez ohledu na předpokládanou lokalizaci patogena.

Kromě molekulárních a sérologických metod je v této kapitole také zmínka o průkazech některých produktů metabolismu a o pokusu na zvířeti.

Molekulární metody — průkaz nukleových kyselin

Průkaz nukleových kyselin je možný pomocí různých metod, které se dají rozdělit na základní dvě skupiny podle toho, zda je použita amplifikace (zmnožení). Bez amplifikace ve vzorku se používají nejčastěji genové sondy. Metody s využitím amplifikace jsou potom jednotlivé typy PCR (polymerase chain reaction — polymerázová řetězcová reakce), LCR (ligase chain reaction — ligázová řetězcová reakce) a NASBA (nucleic acid sequence-based amplification — amplifikace nukleových kyselin na základě sekvenování).

- **Genové sondy**

Hlavními metodami průkazu nukleových kyselin bez využití amplifikace jsou genové sondy. Pojem genová sonda vychází ze vzhledu testovacího zařízení, malého čipu/sondy, kdy na pevném nosiči (skle/silikonové destičce) se nachází vybrané úseky jednovláknových oligonukleotidů, které jsou charakteristické pro určité části vybraných nukleových kyselin. Přímou na čip se nanáší vzorek, který se v komplementárních úsecích naváže — hybridizuje — na přítomné oligonukleotidy. Navázání může být úplné při plné shodě, částečné při nepřesné shodě, nebo k němu vůbec nedochází. Detekce probíhá pomocí fluorescence a výsledek je porovnán s databází (obr. 5.1).

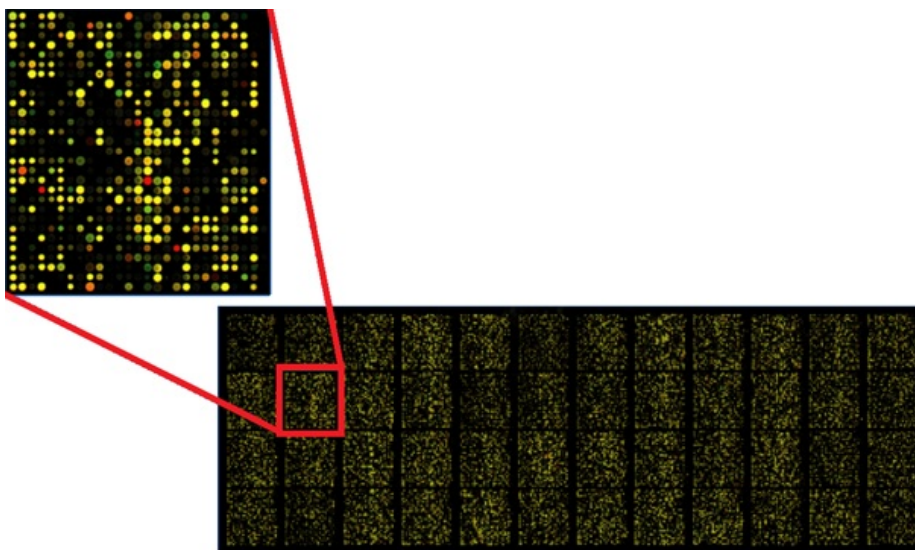
V mikrobiologii je tento způsob využíván například k průkazu DNA *Neisseria gonorrhoeae* a *Chlamydia trachomatis* ve vzorcích z urogenitálního traktu.

- **PCR**

Nejrozšířenější metodou využívající amplifikaci hledané DNA je polymerázová řetězcová reakce. Ta je založena na opakovaných cyklech, skládajících se ze tří základních kroků, při kterých dojde postupně k namnožení určitého úseku DNA. Reakce probíhají v termocykleru, kde jednou z důležitých částí procesu jsou správně nastavené teplotní podmínky, které se v průběhu reakce mění.

V prvním kroku reakce dochází k *denaturaci* v důsledku zvýšení teploty na hodnotu kolem 95°C. Za této teploty dochází k rozpadnutí vodíkových můstků mezi vlákny DNA a tím k rozdělení dsDNA na ssDNA.

Následujícím krokem je *annealing*. V tomto kroku se teplota sníží na 50–60°C (při této teplotě dochází k opětovné renaturaci jednořetězcové DNA) a do reakce jsou přidány v nadbytku specifické oligonukleotidy — primery, které nám značí hledaný úsek DNA. Díky své menší velikosti budou primery snadněji a rychleji hybridizovat s hledaným úsekem DNA než dlouhé sekvence, které vznikly v minulém kroku. Vhodná teplota



Obrázek 5.1 Ukázka genové sondy

v tomto kroku musí být správně nastavena pro konkrétní reakci a je pro výsledek PCR kritická — příliš nízká vede k vazbě primerů i na neúplně komplementární místa, naopak vysoká teplota vede k nedostatečnému vázání primerů.

Třetím krokem je *elongace*. Při teplotách 65 – 75°C dochází k syntéze nových řetězců. Tato syntéza probíhá od 3'-konce primerů, které nasedly na jednořetězcovou DNA (templát) v předchozím kroku pomocí DNA polymerázy a to z jednotlivých nukleotidů, které jsou v reakci přítomné v nadbytku.

Opakování těchto 3 kroků, tvořících jeden cyklus, vede k exponenciálnímu namnožení nově vytvořených řetězců (obr. 5.2). Výsledný produkt — *amplikon* — je následně analyzován, například elektroforeticky s následným obarvením.

Využití PCR reakcí je především pro detekci mikroorganismů, které rostou pomalu nebo je jejich kultivace náročná jako například *Mycobacterium tuberculosis*, *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* a další.

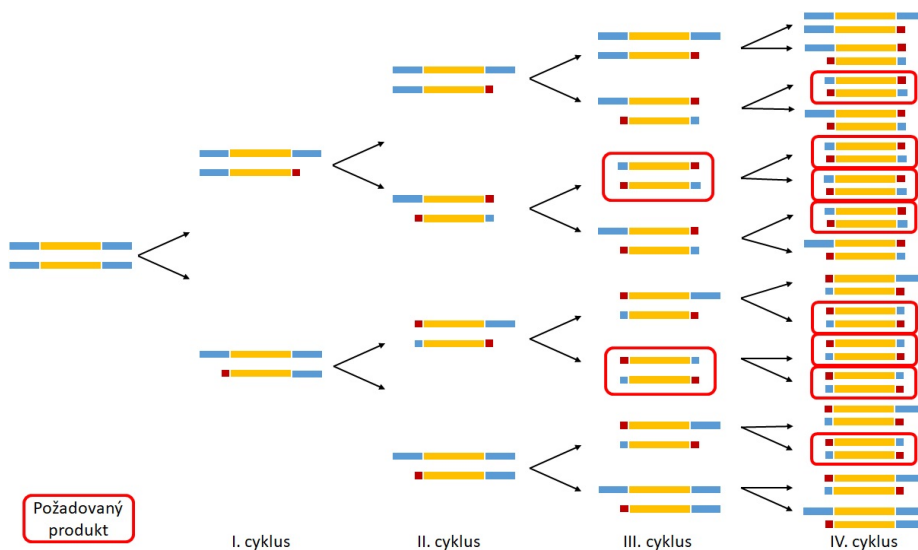
Mezi některé z používaných obměn PCR reakcí patří například:

- *Kvantitativní real-time PCR (qPCR)*

Tato metoda se využívá pro kvantifikaci určité sekvence ve vzorku. Samotné měření PCR produktu probíhá v reálném čase v průběhu amplifikace (PCR v reálném čase — real-time PCR). Využití má tato metoda například pro měření exprese konkrétního genu.

- *Reverzně transkripční PCR (RT-PCR)*

RT-PCR se používá pro amplifikaci mRNA. U této metody se postupuje od izolace



Obrázek 5.2 Schéma PCR reakce

celkové RNA nebo mRNA ze vzorku, přes následné převedení reverzní transkriptázou mRNA na cDNA a posledním krokem je potom klasická PCR.

- **LCR**

Je to metoda, jejíž princip je stejný jako u PCR, jen je do směsi přidána i termostabilní ligáza. Díky její přítomnosti je metoda přesnější a je schopna odhalit rozdíly i jen v jednom páru bází. Těto vlastnosti je například využíváno k rozlišení mezi patogenní *Listeria monocytogenes* a nepatogenní *Listeria innocua*.

- **NASBA**

Metoda je podobná klasické PCR, je založená také na primerech a transkripci, ale na rozdíl od PCR probíhá za izotermních podmínek (kolem 41°C). Tato metoda má uplatnění především při amplifikaci RNA. V průběhu metody jsou využity tři enzymy — reverzní transkriptáza, ribonukleáza a DNA dependentní RNA polymeráza. Výhodou oproti reverzně transkripční PCR jsou právě izotermní podmínky. Pomocí této metody se dají například identifikovat koronaviry.

- **MALDI TOF**

Jednou z dalších možností identifikace mikroorganismu je využití ionizace laserem za přítomnosti matrice (MALDI, matrix assisted laser desorption/ionization) v kombinaci s detektorem doby letu (TOF, time-of-flight). Jedná se o hmotnostní spektrometrickou metodu, při které je nanesena směs matrice a vzorku (v mikrobiologii se jedná o suspenzi

čisté kolonie, izolované z původního vzorku) na vhodný nosič a je následně ionizována paprskem laseru. Následuje pohyb takto nabitých částic v elektrickém poli a detekce jejich rychlosti. Ta je potom v závislosti na jejich molekulové hmotnosti a velikosti získaného náboje vyhodnocena a výsledkem této analýzy je specifický proteinový profil s charakteristickým obsahem proteinů a nukleových kyselin, který je dále porovnán s databází patogenů.

Touto metodou jsme schopni často určit nejen rod bakterie, ale dokonce i druh. S rozšiřující se databází a vzhledem k rychlosti a přesnosti analýzy je tato metoda stále častěji používána v mikrobiologických laboratořích.

Sérologické metody

- **Serologické metody použité k přímému průkazu**

- * **Průkaz strukturálního antigenu**

Antigeny jsou makromolekuly cizorodého původu, které jsou rozpoznány imunitním systémem a vzniká na ně imunitní reakce. Antigenem mohou tedy být jak části buněk, tak chemické produkty a sloučeniny různé velikosti, struktury a chemického složení. V mikrobiologii bývá nejčastěji sledovaným antigenem některá z povrchových struktur mikroorganismu (zpravidla proteiny nebo polysacharidy), případně jeho chemické produkty. Pokud jde o povrchovou strukturu, mluvíme o tzv. *strukturálním antigenu*. Antigeny prokazujeme pomocí sady známých protilátek. Pokud je průkaz antigenu pozitivní, značí nám to aktuální přítomnost infekčního agens, ze kterého antigen pochází.

Kromě průkazu antigenu ve vzorku je také možná antigenní analýza vypěstovaného kmene, tj. kombinace kultivačního průkazu (většinou k druhovému určení) a průkazu antigenu (používá se zpravidla k přesnějšímu určení — hovoříme o sérotypizaci, průkazu sérotypu neboli sérovaru neboli antigenního typu).

- * **Průkaz toxinu**

V některých ojedinělých případech je možné prokázat mikrobiální toxin jako antigen. Pomocí imunofluorescenční soupravy je například možné prokázat některé enterotoxiny jako třeba toxiny *Clostridium difficile*. Další metodou detekce bakteriálního toxinu je LAL (Limulus amebocyte lysate) test, při kterém dochází k vysrážení lyzátu, získaného z ostrorepa *Limulus polyphemus*, pokud je ve vzorku i jen nepatrné množství endotoxinu gramnegativních bakterií. Tato metoda není používána pro identifikaci přítomného mikroorganismu, ale především pro důkaz apyrogenity farmaceutických přípravků.

- **Sérologické metody použité k nepřímému průkazu**

Protilátka neboli imunoglobulin je látka bílkovinné povahy, která se specificky váže na antigen. Tvorba protilátek je součástí imunitní reakce, která vzniká po rozpoznání antigenu. Protilátky hrají důležitou roli při obraně proti cizorodým mikroorganismům a

jejich toxinům. Jsou schopné aktivovat další složky imunitního systému jako například komplementovou kaskádu, NK buňky, degranulaci žírných buněk a také mají schopnost opsonizace, čímž usnadňují fagocytózu. Jednotlivé imunoglobuliny můžeme najít na povrchu B-lymfocytů, které je produkují a také volně v krevním séru a tělních tekutinách. V časných fázích infekce se objevují protilátky IgM (někdy IgA), později pak třída IgG, která může velmi dlouho po prodělaném onemocnění přetrvávat. Samotná detekce protilátky tedy neprokazuje, že je patogen ještě přítomný v těle hostitele. Může také znamenat, že pacient byl v kontaktu s antigenem v minulosti.

Stejně jako neznámý antigen se prokazuje pomocí sady známých protilátek, protilátky prokazujeme pomocí známého antigenu.

Jak již bylo řečeno, sérologické metody v neširším slova smyslu lze použít k přímému i nepřímému průkazu. To platí i pro většinu jednotlivých technik, které se v sérologii používají. Je ale třeba upozornit, že někdy se pojem „sérologické metody“ zužuje jen na využití k nepřímému průkazu.

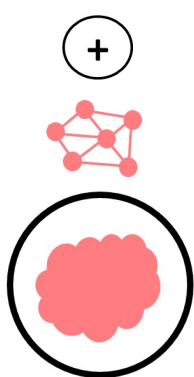
Liší se ovšem použité vzorky: zatímco u průkazu antigenu se jako u kterékoli jiné přímé metody zpravidla snažíme získat vzorek z místa infekce (u průkazu střevních rotavirů je to vzorek stolice, u průkazu neurovirů je to vzorek mozkomíšního moku apod.), u průkazu protilátek vycházíme nejčastěji ze vzorku krevního séra (nažloutlá tekutina bez buněčných elementů, která vznikla po vysrážení plné krve a následným odstraněním krevní sraženiny, bez obsahu srážecích faktorů).

Všechny sérologické reakce (v širším slova smyslu) jsou založené na reakci mezi antigenem a protilátkou, kdy jednu složku reakce vždy známe a druhou vyšetřujeme. Při použití k průkazu antigenu jsou většinou rychlejší než kultivace a umožňují i záchyt špatně kultivovatelných mikroorganismů. Pro použití k průkazu protilátek tuto výhodu ztrácejí, naopak je potřeba počítat s tím, že protilátky se v organismu hostitele objeví až po určitém čase (zpravidla dva až tři týdny). Průkaz protilátek v tomto „diagnostickém okně“ nicméně může mít překvapivý význam — slouží jako důkaz čerstvosti infekce (v prvním vzorku, získaném bezprostředně po infekci, ještě protilátky nebyly, ve druhém už jsou — důkaz, že došlo k tzv. sérokonverzi).

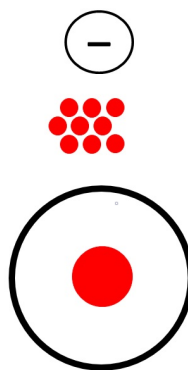
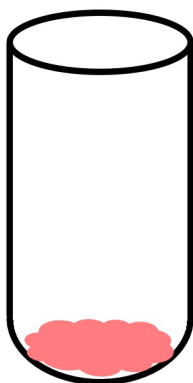
Mezi základní vyšetřovací metody patří: aglutinace, precipitace, komplement fixační reakce, neutralizace a reakce se značenými složkami. U klasických reakcí (což jsou všechny kromě reakcí se značenými složkami) se zpravidla pracuje s titrem — neboli nejvyšším ředěním, kdy ještě byla reakce pozitivní. Ředění bývá nejčastěji geometrickou řadou. U reakcí se značenými složkami zpravidla s titrem nepracujeme. Tyto metody totiž dokáží rozlišit jednotlivé třídy protilátek, takže důležitou informaci o tom, zda jde o čerstvou anebo dříve prodělanou infekci, získáme jiným způsobem.

* **Aglutinace**

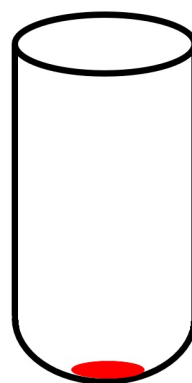
Aglutinace je metoda, při níž se v séru přidáním známých antigenů stanovují protilátky nebo naopak. Na rozdíl od precipitace nepracuje aglutinace s izolovanými molekulami antigenu, ale s částicemi (zpravidla celými mikroby), které mají antigen na povrchu.



Obrázek 5.3 Pozitivní výsledek aglutinace



Obrázek 5.4 Negativní výsledek aglutinace



• Aglutinace s heterofilním antigenem

Je metoda, při které se prokazuje tvorba protilátek na antigen, kterým není mikrob, ale jsou jím povrchové struktury erytrocytů. Při aglutinaci dochází k vzniku sraženiny. Využitím je například Paulova-Bunnelova reakce, kterou se prokazuje infekční mononukleóza.

• Stanovení protilátek aglutinací

Jde o stanovení protilátek v séru přidáním roztoku s antigeny, přítomnými na povrchu známých bakterií. Vzájemnou vazbou protilátky a antigenu dochází ke vzniku sraženiny. Tato metoda se využívá v několika reakcích sloužících pro průkaz patogenů. Například Widalova reakce (průkazu bakterií rodu *Salmonella* u břišního tyfu), Wrightova reakce (průkaz bakterií rodu *Brucella*), nebo Weilova-Felixova reakce (průkaz rickettsií). Pozitivním výsledkem reakce je vznik sraženiny připomínající nepravidelný chuchvalec oproti negativnímu sedimentu ve tvaru malého pravidelného kolečka (obr. 5.3 a 5.4).

• Průkaz antigenu a antigenní analýza aglutinací

Protilátky můžeme prokazovat ve vzorku (například mozkomíšního moku) nebo u čistého kmene. Tato metoda má například využití při rozlišování jednotlivých kmenů enteropatogenních *Escherichia coli* i při sérotypizaci celé řady bakterií (např. salmonel, yersinií, hemofilů, hemolytických streptokoků a mnoha dalších).

• Aglutinace na nosičích

Tento typ aglutinace využívá antigenů nebo protilátek navázaných na nosiči, kterým mohou být například erytrocyty nebo latexové či polycelulózové částice. Mezi aglutinace na nosiči, kdy jsou antigeny umístěny na erytrocytech, patří i hemaglutinační reakce (TPHA), kterou lze prokázat *Treponema pallidum*. Pomocí testů s latexovým nosičem lze například prokazovat původce hnisavých meningitid v mozkomíšním moku, ale lze (stejnou sadou) i typizovat již vykultivovaný kmen meningokoka.

* Precipitace

Při precipitaci vzniká nerozpustný komplex protilátky s antigenem. Tento nerozpustný komplex vzniká buď na rozhraní dvou fází, nebo ve formě vloček ve směsném roztoku. Vhodným prostředím mohou být buď vodné roztoky, nebo agarózový gel.

• Precipitace v roztoku

Prstencová reakce: nerozpustná sraženina vzniká ve formě prstence na rozhraní dvou vrstev roztoku, kdy došlo ve zkumavce k převrstvení roztoku s protilátkou roztokem s antigenem. Tato metoda má využití při určování například streptokoků.

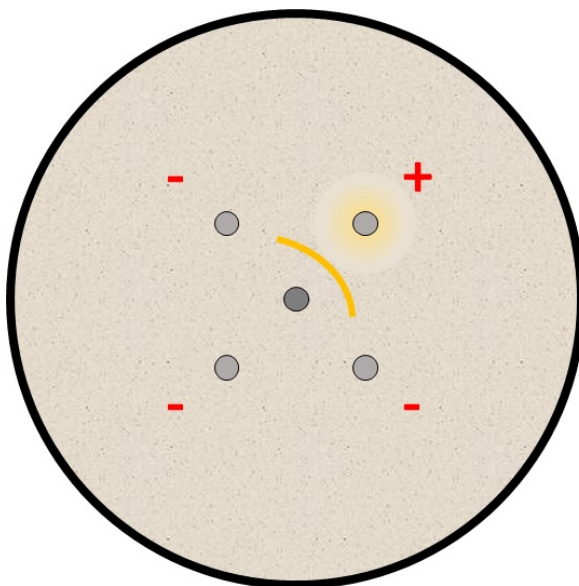
Flokulační reakce: nerozpustná sraženina vzniká ve formě vloček ve smíseném roztoku. Jedním z využití této metody je precipitační screeningový test na syfilis. Při tomto konkrétním testu nesledujeme protilátky zaměřené přímo proti původci onemocnění, ale sledujeme tzv. *heterofilní protilátky* — protilátky, které jsou zaměřeny na jiný antigen, který se charakteristicky vyskytuje v těle v průběhu daného onemocnění. V případě syfilis nesledujeme tedy protilátky proti *Treponema pallidum*, ale proti kardiolipinu (fosfolipid přítomný v těle syfilitiků). Jedná se pouze o rychlé screeningové vyšetření, které je potřeba následně potvrdit přesnějšími metodami.

• Precipitace v gelu

V gelu sraženina vzniká ve formě precipitační linie na rozhraní dvou difundujících fází z jamek v gelu. V těch jsou nanášeny roztoky antigenů, nebo protilátek. Jedním z konkrétních příkladů této metody je dvojité uspořádání podle Ouchterlonyho, kdy v prostřední jamce je vzorek séra a do 4 okolních jamek se nanášou suspenze antigenů (možná je i obrácená varianta, pokud sledujeme jeden typ protilátky u více pacientů). Z prostřední jamky tedy difundují protilátky (při obrácené variantě antigen) do okolí a z okolních jamek difundují přítomné antigeny (při obrácené metodě protilátky ze séra). Pokud máme shodu protilátky a antigenu, tak přibližně v půli cesty vzniká precipitační linie (obr. 5.5).

* Komplementfixace

Jednou z vlastností komplementu je jeho schopnost vázat se na komplex antigenu svázaného s protilátkou. Poté co se naváže, ztrácí schopnost lyzovat protilátkou senzitivované erythrocyty, kterou má ve volné formě. Komplementfixační reakce jsou založeny na těchto vlastnostech. Pro samotnou analýzu se ale nepoužije přítomný komplement ze séra (ten musí být napřed teplotně inaktivován), ale použije se uměle dodaný komplement z morčat. Pokud bude reakce pozitivní, dojde k navázání protilátky na antigen a následnému navázání komplementu. Takto navázaný komplement nebude vykazovat lýzu buněk ve vzorku. Naopak při negativní reakci se nebude mít komplement na co navázat a dojde tedy k lýze erythrocytů. Opět se touto metodou dá prokazovat přítomnost kardiolipinu u syfilis (historická, dnes již neužívaná reakce BWR), případně se různé obměny této metody využívají na průkaz brucel, listeriózy, *Mycoplasma pneumoniae* a zejména různých virových infekcí. Ve virologii se komplementfixace používá i jako přímá metoda, tj. k průkazu virového antigenu.



Obrázek 5.5 Dvojité uspořádání podle Ouchterlonyho

* Neutralizace

Metody neutralizace spočívají v inhibici charakteristických vlastností antigenu. Příkladem může být průkaz antistreptolysinu O (protilátka proti streptolysinu O — antigenu u streptokoků typu A, C, G např.: *Streptococcus pyogenes*). Ke vzorku séra se přidá určená koncentrace streptolysinu, jehož účinek na lýzi buněk je neutralizován v přítomnosti protilátky a pozitivním výsledkem je tedy zachování erytrocytů.

HIT — *hemaglutinačně inhibiční test* je metoda, při které se přítomnost protilátek prokazuje inhibicí hemaglutinačních účinků antigenu. Podmínkou pro tuto metodu jsou tedy hemaglutinační schopnosti antigenu. Tyto vlastnosti vykazují především viry (například myxoviry a paramyxoviry) a právě prokazování protilátek proti virovým onemocněním je nejčastějším využitím této metody.

* Metody značených protilátek

Při těchto metodách se využívají protilátky nebo antigeny značené různými indikátory (např. fluorescenční barviva, enzymy). Důležitou součástí klasických metod se značenými protilátkami je promytí, které odliší, zda došlo k reakci (indikátor je pevně navázan na povrch a neodplaví se) nebo k ní nedošlo (indikátor je odplaven a nebude detekován).

Můžeme sem zahrnout:

• EIA

EIA (enzymatické imunoeseje) známe nejčastěji v provedení ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). Je to kvantitativní analytická metoda využívaná ke stanovení množství antigenů nebo protilátek ve vzorku. Tato metoda je založena na imunoenzymatické

reakci, při které dochází k reakci bezbarvého substrátu na barevný produkt s následnou spektrofotometrickou analýzou. Na nerozpustném nosiči, kterým může být například mikrotitrační destička, je zakotven antigen nebo protilátka, na kterém je navázán enzym (například peroxidáza). Tento enzym následně katalyzuje chemickou reakci, která vede ke změně zbarvení. Koncentrace produktu je pak úměrná koncentraci protilátky nebo antigenu ve vzorku. V závislosti na způsobu detekce antigenu existují různé typy této metody.

• ELFA

ELFA (Enzyme-Linked Immunofluorescent Assay) je založena na specifické reakci antigen-protilátka a princip reakce je podobný jako u ELISA metody. Rozdíl spočívá v použitém substrátu, který je enzymem štěpen na fluorescenční produkt. Vzniklé chemické změny detekuje fotodiodový fluorimetr.

• Immunobloty

Imunoblot (western blotting a další příbuzné metody) je metoda detekce specifického proteinu ve směsném vzorku. Samotnému přenosu předchází rozdělení jednotlivých proteinů dle jejich velikostí například za pomoci elektroforézy. Následně jsou polypeptidy přeneseny z gelu na membránu (PVDF nebo nitrocelulóзовou) působením elektrického proudu. Následuje detekce za pomoci kolorimetrických nebo chemiluminiscenčních metod.

• Immunofluorescence

Imunofluorescenční vyšetření slouží k detekci antigenů v tkáních či buňkách a umožňuje také průkaz protilátek. *Přímá imunofluorescence* detekuje pomocí značených protilátek antigeny přítomné ve tkáních. Naproti tomu *nepřímá fluorescence* prokazuje přítomnost specifických protilátek v séru tak, že po odebrání séra a jeho reakci se substrátem se naváží značené protilátky proti sérovým protilátkám nemocného.

Vedle popsaných existuje i celá řada dalších metod (radioimunoesej, chemiluminiscenční metody apod.)

* Immunochromatografické metody

Je to zvláštní případ reakcí se značenými složkami, kdy je promytí nahrazeno cestováním jednotlivé složky nebo celého imunokomplexu porézní vrstvou (na principu chromatografie). Podle toho, zda je hledaná složka (antigen či protilátka) přítomna, dojde nebo nedojde k zachycení značené složky v určitém místě. Zde se pak objeví např. tečka či proužek. Tyto testy jsou uživatelsky velmi jednoduché, používají se i mimo laboratoře v ordinacích, nebo je dokonce mohou používat přímo pacienti. Příkladem je např. průkaz toxinu a strukturálního antigenu *Clostridium difficile* nebo průkaz pneumokokového a legionelového antigenu u pneumonií (výjimečně ve vzorku moče, protože zbytky mikrobů jsou tudy vylučovány). Mimo průkaz mikrobů je klasickým příkladem imunochromatografické metody těhotenský test.

Průkaz některých produktů bakteriálního metabolismu

Plynová a hmotnostní chromatografie nám může dobře posloužit při dokazování některých dalších produktů metabolismu mikroorganismů, například pro detekci mastných kyselin v hnisu, jejichž přítomnost je typická pro některé anaerobní bakterie. Při podezření na basilární meningitidu lze také stanovit přítomnost kyseliny tuberkulostearové ve vzorku likvoru.

Pokus na zvířeti

V minulosti se používal často, například ke stanovení letální dávky určitého mikroorganismu (kvantitativní vyjádření patogenity). Dnes jsou pokusy na zvířeti v diagnostice mikrobů až na výjimky opuštěny, mimo jiné z etických důvodů. Jednou z výjimek je průkaz toxinů klostridií *Clostridium botulinum* a *Clostridium tetani*, případně stafylokokového enterotoxinu.

Literatura

- 1) <http://www.sci.muni.cz/ccm/> [citováno dne 26. 11. 2018].
- 2) Příloha č. 4 k vyhlášce č. 306/2012 Sb.
- 3) <https://zdravi.euro.cz/clanek/sestra/dezinfekce-a-sterilizaceve-svetle-vyhlaskey-472149> [citováno dne 26. 11. 2018].
- 4) Šárka Bursová a kol.: Mikrobiologie potravin a mikrobiologické laboratorní metody: Obecná mikrobiologie, 2014; Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Ústav hygieny a technologie mléka, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno.
- 5) SÚKL Databáze léků — <http://www.sukl.cz/modules/medication/search.php> [citováno dne 26. 11. 2018].
- 6) <http://old-biomikro.vscht.cz/vyuka/lm/skriptalab.pdf> [citováno dne 26. 11. 2018].
- 7) Šárka Bursová a kol.: Mikrobiologie potravin — praktická cvičení I. Obecná mikrobiologie. Revidované vydání, 2014; Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Ústav hygieny a technologie mléka, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno.
- 8) Miroslav Votava, a kol.: Lékařská mikrobiologie vyšetřovací metody, 2010; Neptun.
- 9) Miroslav Votava. Lékařská mikrobiologie obecná, 2001; Neptun.
- 10) <http://www.szu.cz/eucast-dokumenty> [citováno dne 26. 11. 2018].
- 11) Ministerstvo zdravotnictví ČR: Český lékopis 2017; Grada.
- 12) Booth, Stephanie A., et al. Application of DNA array technology for diagnostic microbiology. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*, 2000, 11.6: 291-294.
- 13) Wiedmann, M., et al. Ligase chain reaction (LCR)-overview and applications. *PCR Methods Appl*, 1994, 3.4: S51-64.
- 14) Deiman, Birgit; Van Aarle, Pierre; Sillekens, Peter. Characteristics and applications of nucleic acid sequence-based amplification (NASBA). *Molecular biotechnology*, 2002, 20.2: 163-179.
- 15) www.wikiskripta.eu/w/Sérologické_metody [citováno dne 26. 11. 2018].