

Metody analýzy mikroorganismů

doc. RNDr. Milan Bartoš, Ph.D.

Bartos.Milan@atlas.cz

Přírodovědecká fakulta MU, 2017

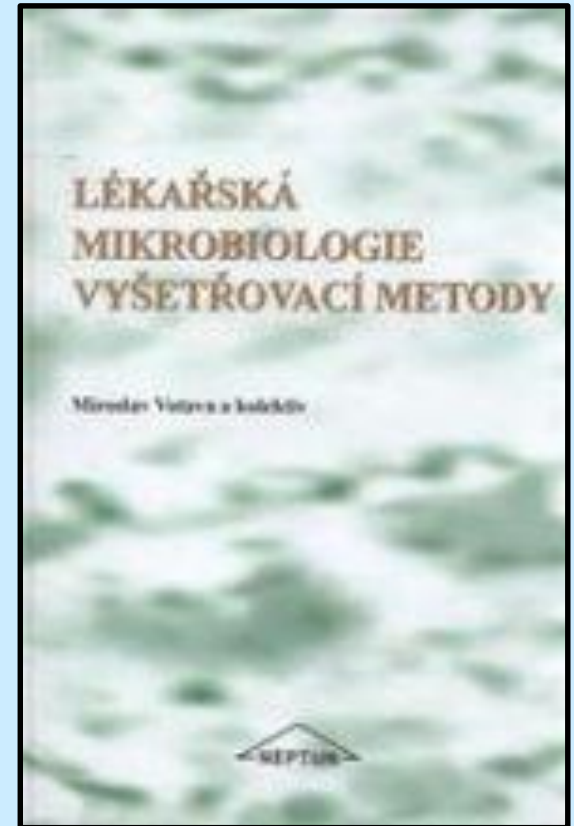
Obsah přednášky

- 1) Přímý průkaz v bakteriologii**
- 2) Nepřímý průkaz v bakteriologii**
- 3) Přímý průkaz virů**
- 4) Nepřímý průkaz virů**
- 5) Vyšetřovací metody v parazitologii**
- 6) Mykologické vyšetřovací metody**



Doporučená literatura

**Votava et al. (2010):
Lékařská mikrobiologie
vyšetřovací metody.
Neptun, Brno**



Účel mikrobiologického vyšetření

Zjistit, který mikroorganismus je příčinou onemocnění, tedy *prokázat etiologické agens infekce.*

- **průkaz přímý**
- **průkaz nepřímý**

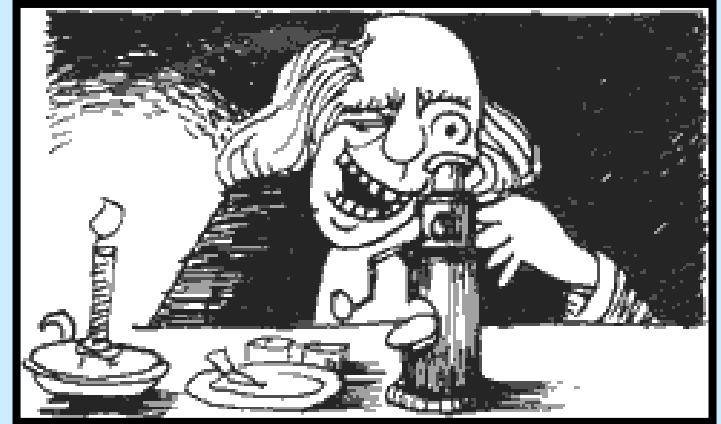
Přímý průkaz spočívá v nalezení mikroorganismu nebo jeho komponent ve vyšetřovaném vzorku

Nepřímý důkaz je založen na průkazu specifických stop zanechaných mikroorganismem v organismu (nejčastěji protilátky)

Metody přímého průkazu

Klasické postupy

- **Mikroskopický průkaz**
- **Kultivace (izolace)**
 - **identifikace**
 - **stanovení citlivosti na antibiotika**

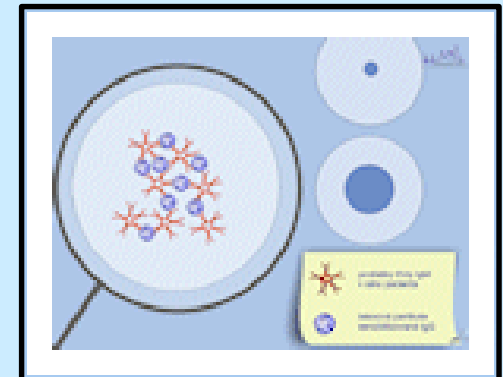
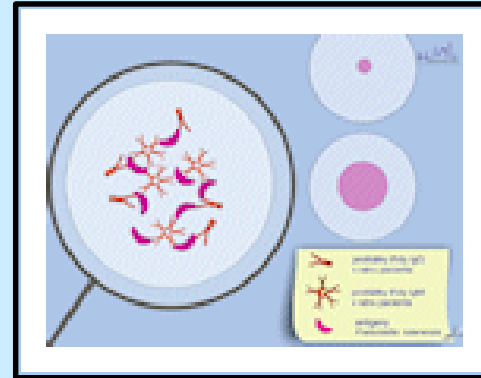


Moderní (nekultivační) postupy

- **Průkaz antigenů**
- **Průkaz nukleových kyselin**
- **Průkaz jiných chemických složek**

Metody nepřímého průkazu

- **Precipitace**
- **Aglutinace**
 - **Aglutinace na nosičích**
- **Vazba komplementu**
- **Neutralizace**
- **Metody se značenými složkami**
 - **Imunofluorescence**
 - **ELISA**
 - **Western blot, aj.**

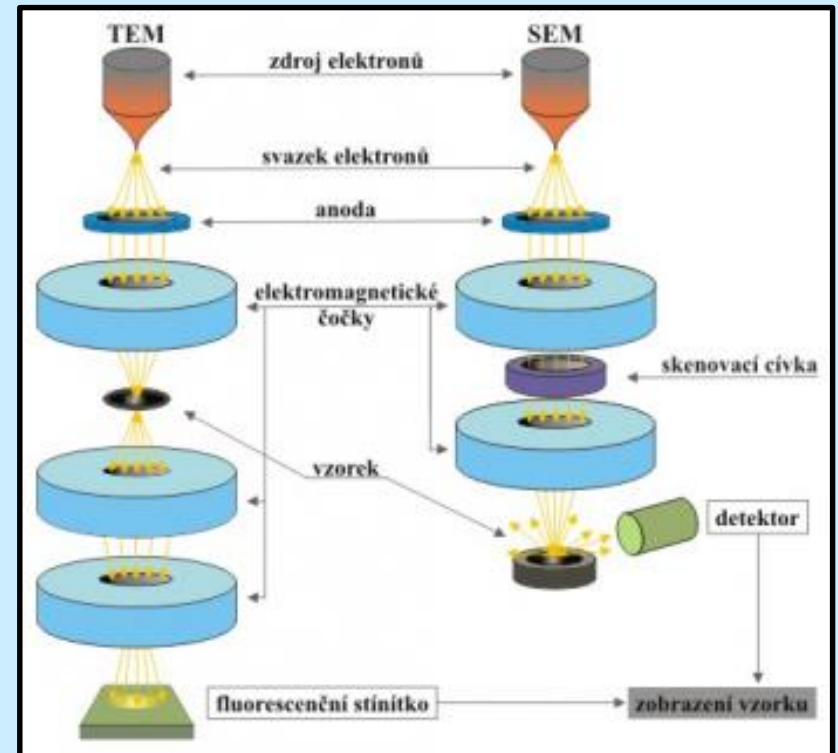


Mikroskopie



Jaké znáte typy mikroskopů?

- Světelný
- Fluorescenční
- Elektronový
 - Transmisní
 - Skenovací (rastrovací, konfokální)
 - ...



Podívejte se například sem:

<http://www.fzu.cz/popularizace/elektronovym-mikroskopem-donitra-materialu-aneb-jak-vypada-jejich-struktura>

Mikroskopický preparát



Jaké znáte typy mikroskopických preparátů?

Nativní

- Mikroorganismy v nativním stavu – živé
- Fyziologický roztok nebo růstové médium

Fixovaný

- Mikroorganismy jsou umrtveny a zafixovány k podložnímu sklíčku
- Tyto preparáty se barví

Zjistěte

- 1) Co to je „louhový preparát“?
- 2) Kde se používá?

Příprava fixovaného preparátu

1) Nátěr

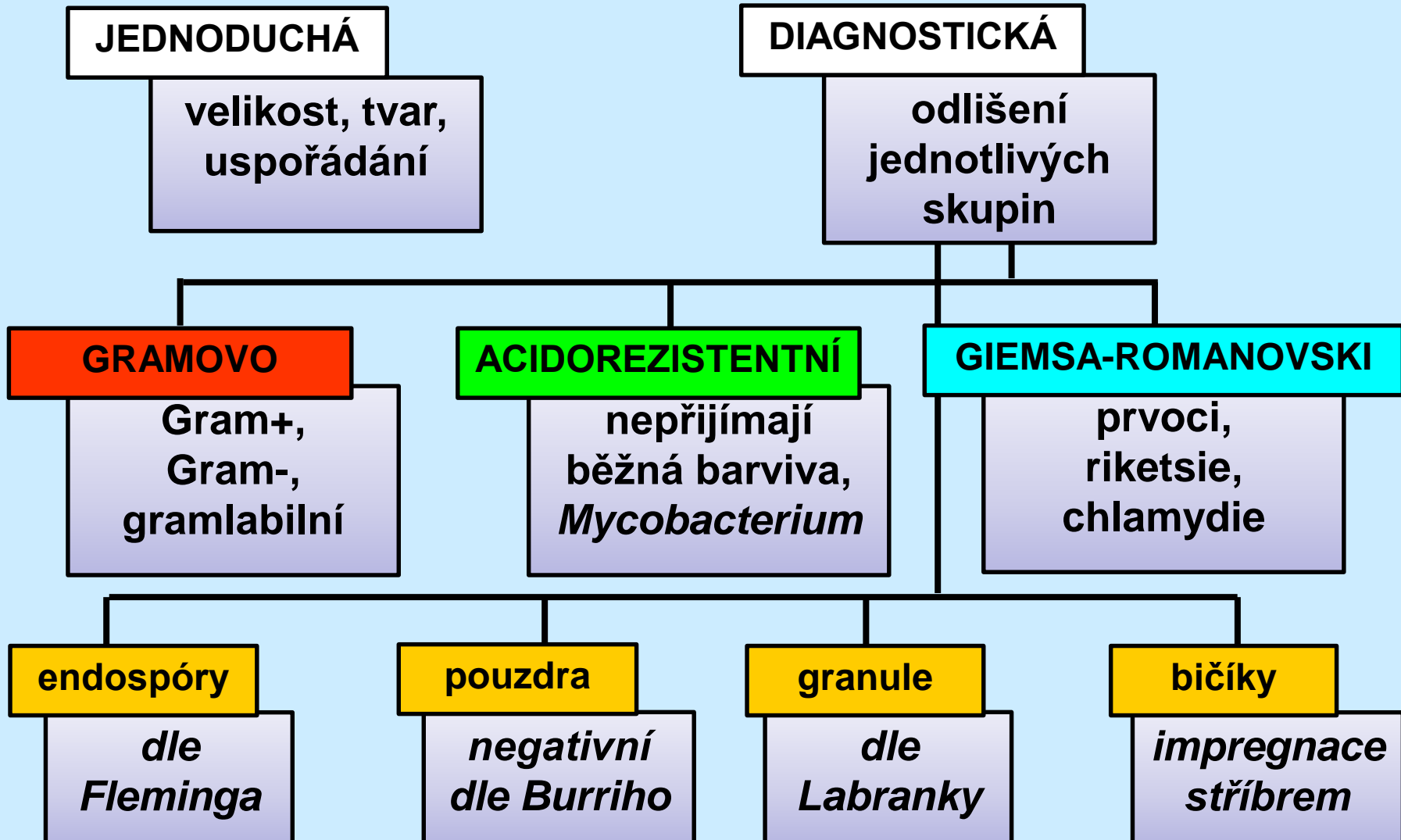
- **nesmí být ani tlustý ani tenký**
- **Ize připravit podobně jako krevní nátěr**
- **vzácně tzv. otisk**

2) Fixace nátěru

- **Šetrná denaturace bakteriálních proteinů**
- **Fixace teplem**
- **Chemická fixace**

3) Barvení preparátu

Zopakujme si druhy barvení



Barvení biofilmů?

Buněčnou část standardními postupy



**Jak byste znázornili
polysacharidovou
matrix u biofilmů?**



Kultivace bakterií



Co s narostlou bakteriální kulturou?

Metody další diagnostiky mikroorganismu

- Mikroskopické určení
- Další kultivace a získání více materiálu
- Biochemická charakteristika
- Antigenní analýza
- Fagotypizace
- **Analýza nukleových kyselin**
- Stanovení citlivosti na antibiotika
- Hmotnostní spektrofotometrie

Biochemická charakteristika

mikroorganismus



enzym

substrát

produkt

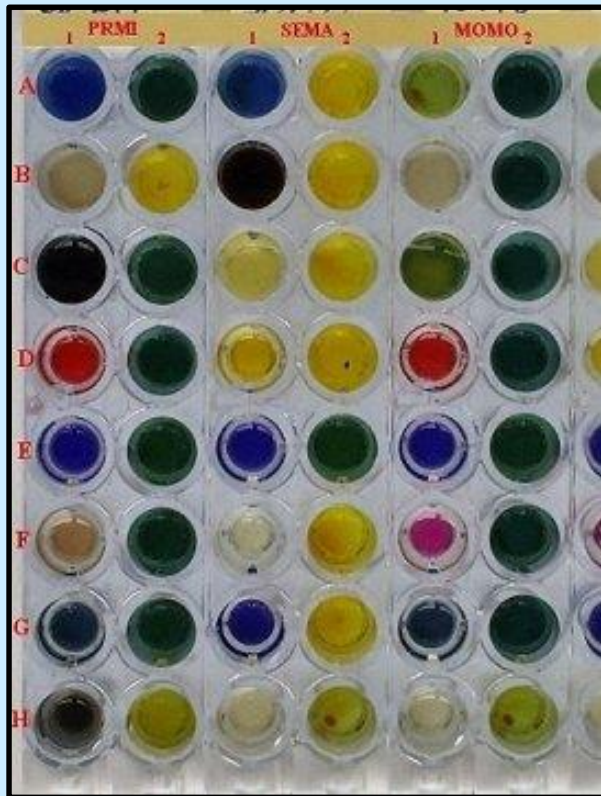
indikátor

reakce
pozitivní



reakce
negativní

Komerční diagnostické testy



ENTEROtest 16

WITKO - Lachema s.r.o.
Bokov 1
602 00 Brno
CZECH REPUBLIC

Pacient Jméno Příjmení Adresa	ENTEROtest 16								Klasifikace výsledků							
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+
	5		2		6		6		6		6		6		6	1

SEROTYP 14 PARATYP 6 S

Prohlédněte si informace o ENTEROtestu od firmy Lachema na <https://www.lachema.com/attachments/ENTEROtest%2016-CZ+SK+EN+RU+PL.pdf>

Stanovení citlivosti na antibiotika



Jaké znáte typy testů citlivosti na ATB?

Kvalitativní

- **Diskový difuzní test**

Kvantitativní

- **Stanovení MIC**
- **E-testy**

Diskový difuzní test



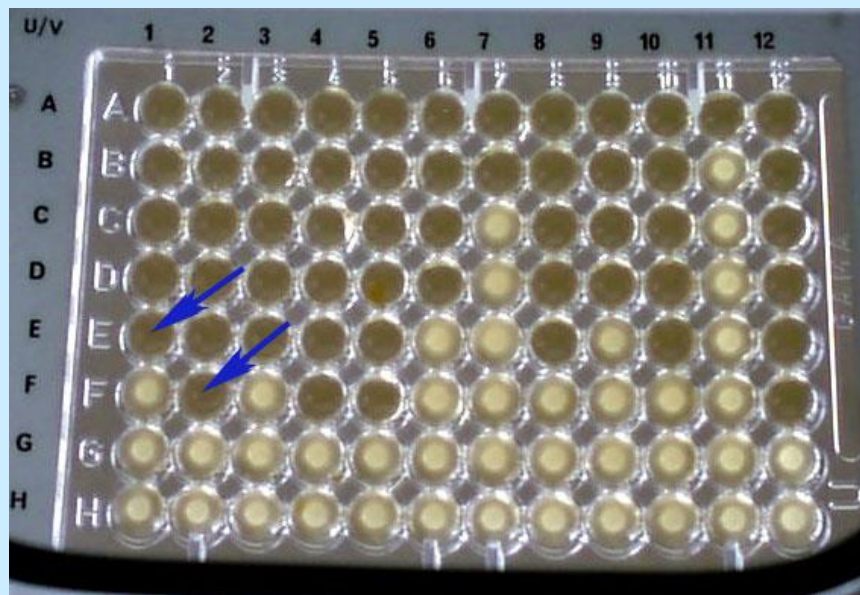
Vysvětlení testu najdete na

<http://old.lf3.cuni.cz/mikrobiologie/bak/uceb/obsah/disktest/disktest.htm>

Stanovení MIC

Minimální inhibiční koncentrace

Suspenze bakterií se nanese do komůrek destičky s rostoucí koncentrací antibiotika

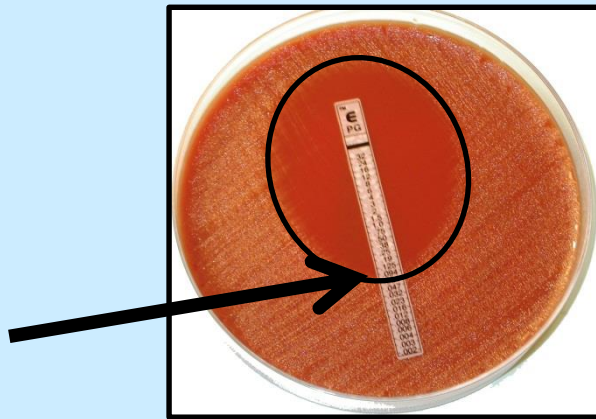


Co to je MBC?

Minimální baktericidní koncentrace

E-testy

- E-test je proužek papíru napuštěný stoupající koncentrací antibiotika
- Má vyznačené koncentrace antimikrobiální látky
- Klade se na misku s naočkovanou suspenzí mikroorganismu



- Inhibiční zóna má vejčitý tvar
- MIC se odečítá v místě protnutí proužku s inhibiční zónou

Průkaz antigenů

Co k průkazu antigenů potřebujeme?



Protilátka

- polyklonální
- monoklonální



Jak průkaz provedeme?

- aglutinací na pevném nosiči (latexová aglutinace)
- koaglutinací na proteinu A z usmrcených stafylokoků

**Průkaz antigenu lze provést
taky metodou ELISA nebo
imunofluorescenčně**



Průkaz nukleových kyselin

Genová sonda

Metody amplifikační

- **Polymerázová řetězová reakce**
- **Ligázová řetězová reakce**
- **...**

Průkaz RNA

Průkaz jiných chemických složek

Průkaz toxinů

- **Botulotoxin**
- **Stafylokokový enterotoxin**
- **Endotoxin gramnegativních bakterií**

Průkaz dalších produktů metabolismu

- **Mastné kyseliny u anaerobů**
- **Kyselina tuberkulostearová u *M. tuberculosis***
- **Značený CO₂ u *Helicobacter pylori***



Nepřímý průkaz



Zopakujme si, co to je ...

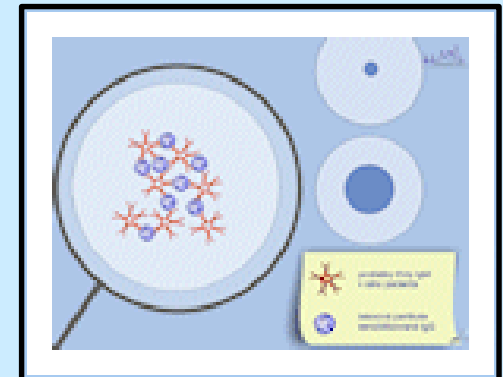
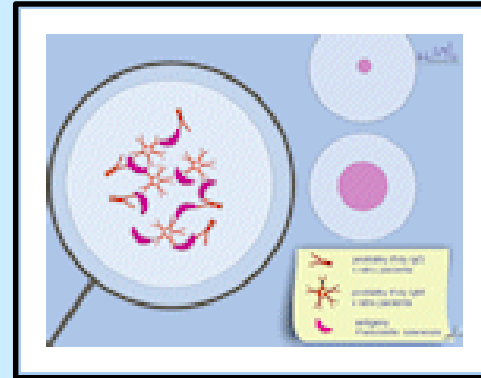
Nepřímý důkaz je založen na průkazu specifických stop zanechaných mikroorganismem v organismu (nejčastěji protilátky)

**Nepřímý průkaz je většinou
průkaz protilátek neboli
průkaz serologický**



Metody nepřímého průkazu

- **Precipitace**
- **Aglutinace**
 - **Aglutinace na nosičích**
- **Vazba komplementu**
- **Neutralizace**
- **Metody se značenými složkami**
 - **Imunofluorescence**
 - **ELISA**
 - **Western blot, aj.**

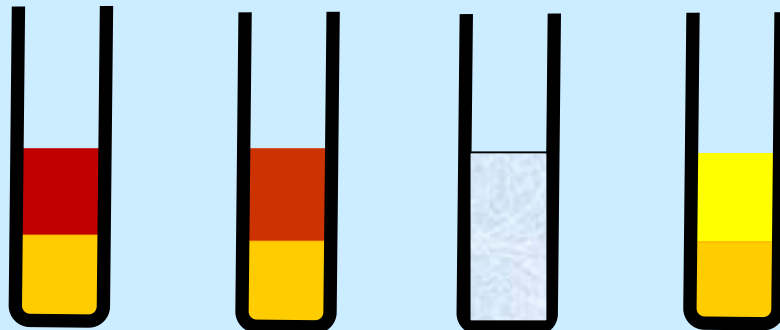


Precipitace

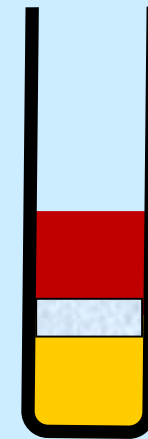
- sérologická reakce - antigen je koloidní povahy
- precipitát vzniká vazbou antigenu a protilátky

Precipitace prstencová

Flokulace



precipitát



antigen

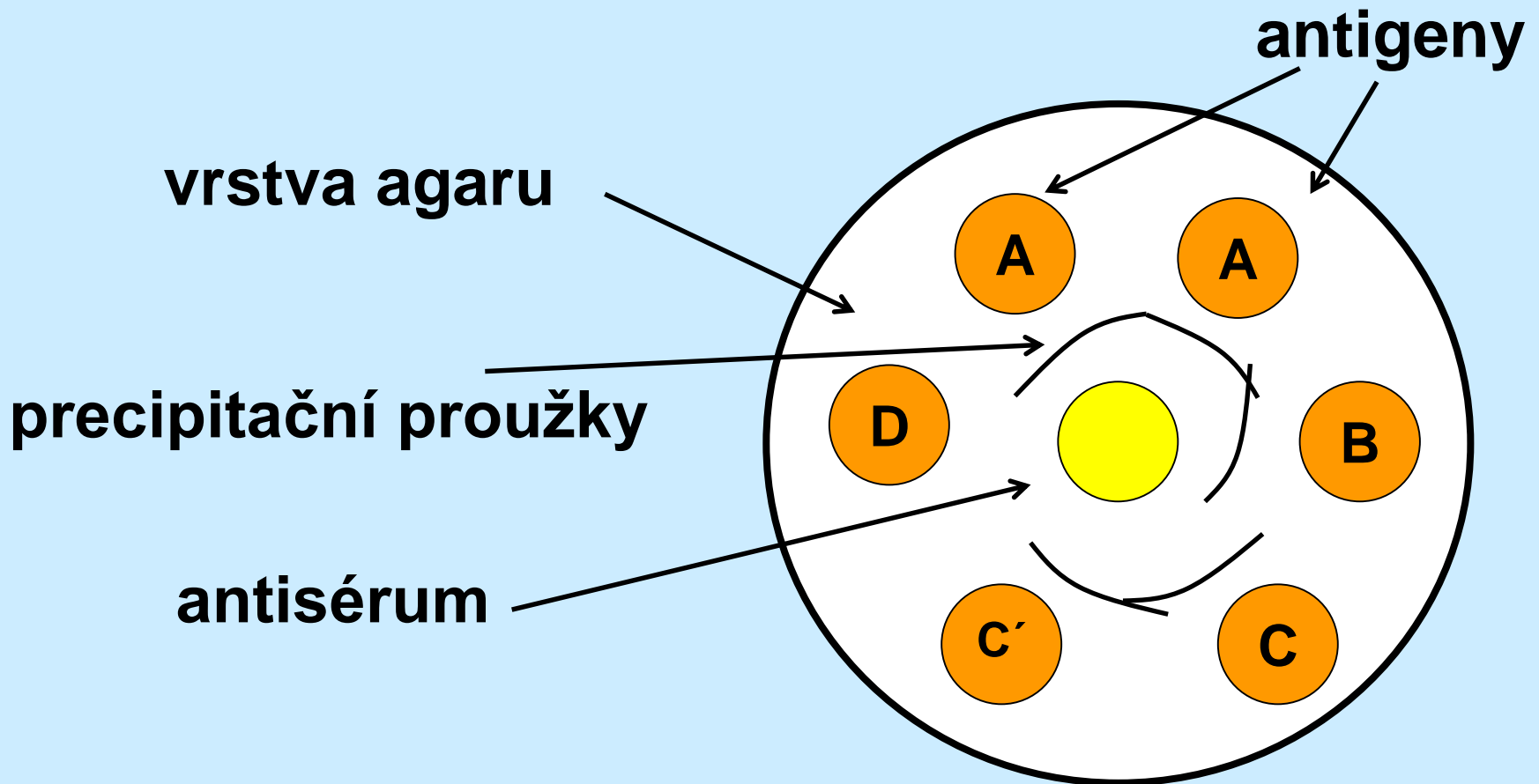
antisérum

flokulace v zóně ekvivalence

rostoucí koncentrace antigenu

Ouchterlonyho technika

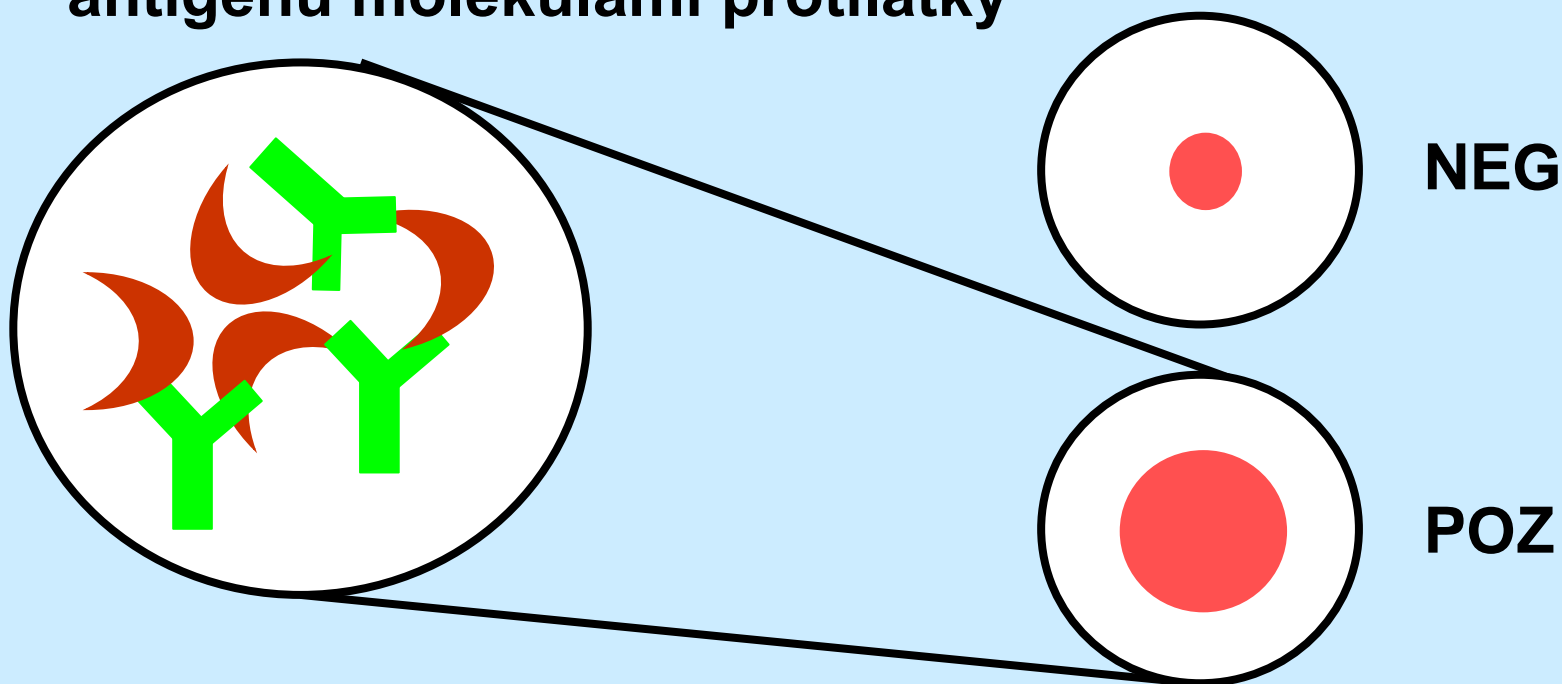
- precipitace využívající difúze v gelu



Radiální imunodifúze dle Manciniové, imunoelektroforéza, vstříčná imunoelektroforéza, ...

Aglutinace

- sérologická reakce - antigen je korpuskulární povahy
- aglutinát vzniká vzájemným pospojováním částic antigenu molekulami protilátky

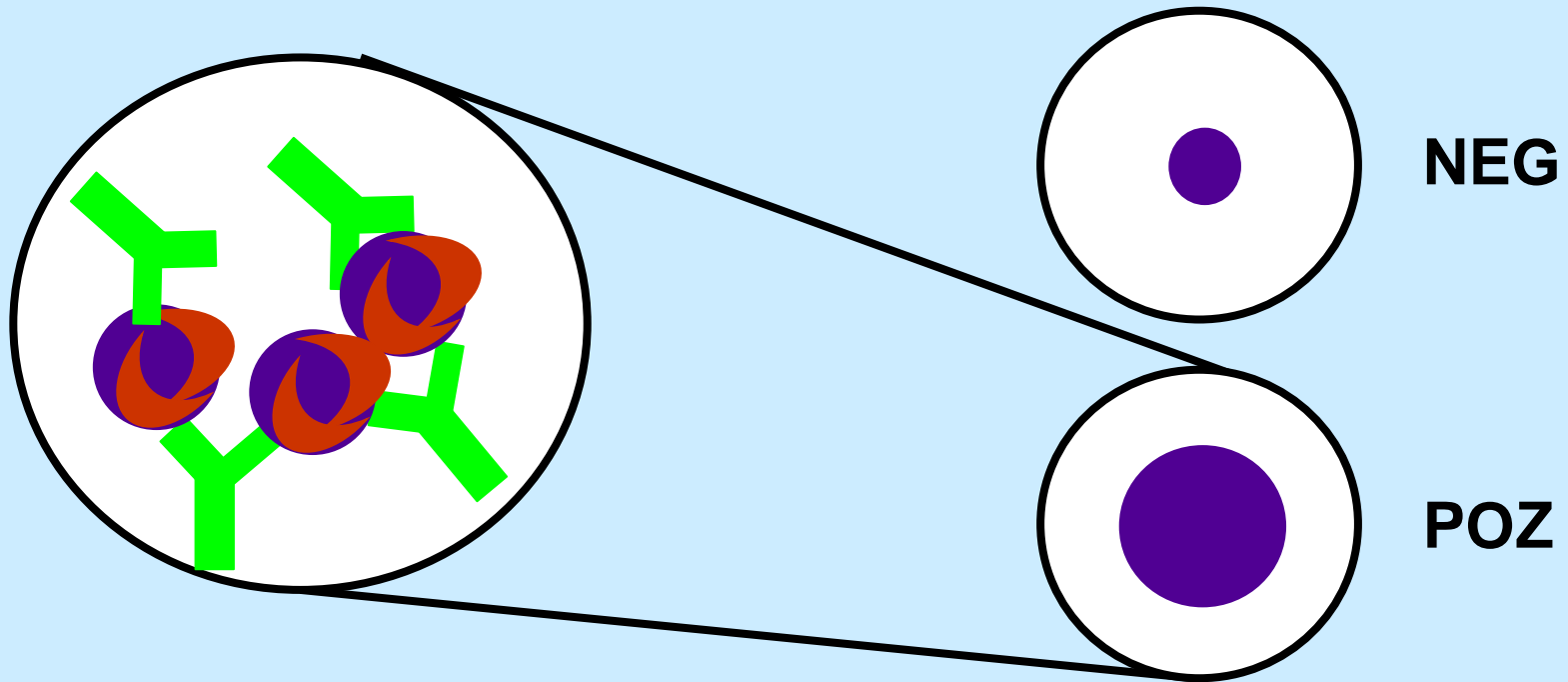


Podívejte se na animaci aglutinace na

http://labmet.zshk.cz/media.aspx?id=ALM007&TB_iframe=true&height=750&width=820

Aglutinace na nosičích

- **Precipitace převedená na aglutinaci**
- **Antigen koloidního charakteru nebo protilátka jsou navázány na povrch částice (latex)**



Podívejte se na animaci aglutinace na nosičích na
http://labmet.zshk.cz/media.aspx?id=ALM007&TB_iframe=true&height=750&width=820

Vazba komplementu

Komplement fixační reakce

- **Komplement se váže na komplex antigen-protilátka a dojde k jeho vyčerpání ze systému**
- **Není-li antigen nebo protilátka přítomen, komplement se nevyčerpá**



- **Komplement lyzuje erythrocyty**



- **Vyčerpání komplementu = zábrana hemolýzy**
- **Nevyčerpání komplementu = hemolýza**

Vyhodnocení komplement fixační reakce



Co je tedy pozitivní reakce?
A co je negativní reakce?

Zábrana hemolýzy

Protože je přítomna protilátka a komplement se vyčerpá vazbou na komplex antigen-protilátka

Hemolýza

Protilátka je nepřítomna a nevyčerpaný komplement lyzuje erytrocyty



Neutralizace

Sérologické reakce, při níž protilátka brání biologickým účinkům antigenu

- **ASLO (průkaz antistreptolyzinu), indikátorem jsou králičí erytrocyty**
- **Virusneutralizační test**
- **Hemaglutinačně inhibiční test**
- **Průkaz antipneumolyzinu**
- **Průkaz antistafylolyzinů**
- **Test inhibice metabolismu**
- **...**

Reakce se značenými složkami

Imunofluorescence

Sérologická reakce v níž je jedna složka označena fluorescenčním barvivem

Nepřímá imunofluorescence

- **univerzální metoda**
- **průkaz protilátek proti jakémukoli agens**

Antikomplementová imunofluorescence

- **vazba komplementu proběhlá na podložním sklíčku s fixovaným antigenem**
- **k průkazu protilátek proti viru varicella-zoster a CMV**

ELISA

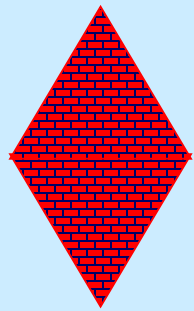
Enzyme-linked immunosorbent assay

Sérologická reakce v níž je jedna složka označena enzymem

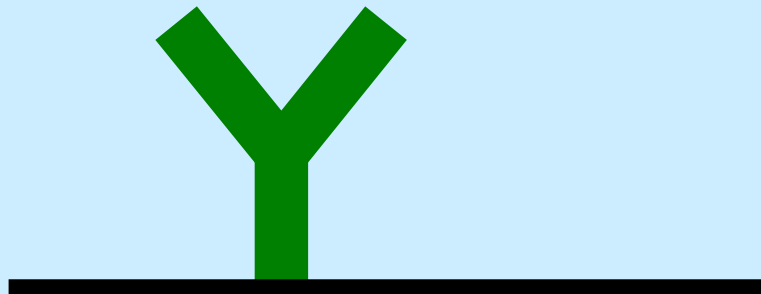
- **Využívá kombinace enzymaticky značené protilátky se sorpcí některé složky na pevný povrch**
- **Nekompetitivní (sendvičová) ELISA**
- **Kompetitivní ELISA**

Typy metody ELISA

Kompetitivní ELISA



Sekundární
Ab - konjugát

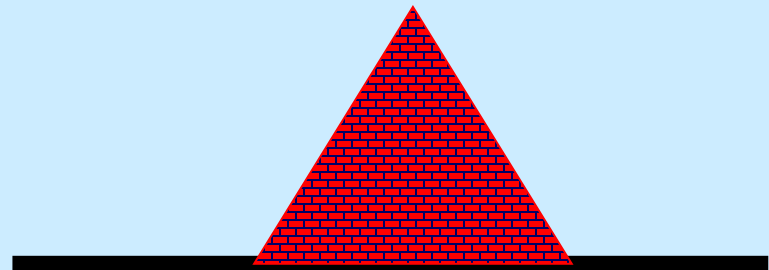
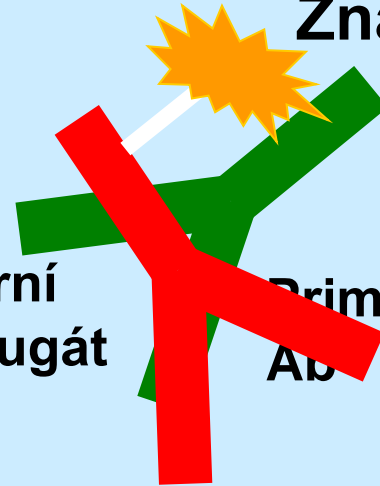


Nekompetitivní (sendvičová) ELISA

Značka

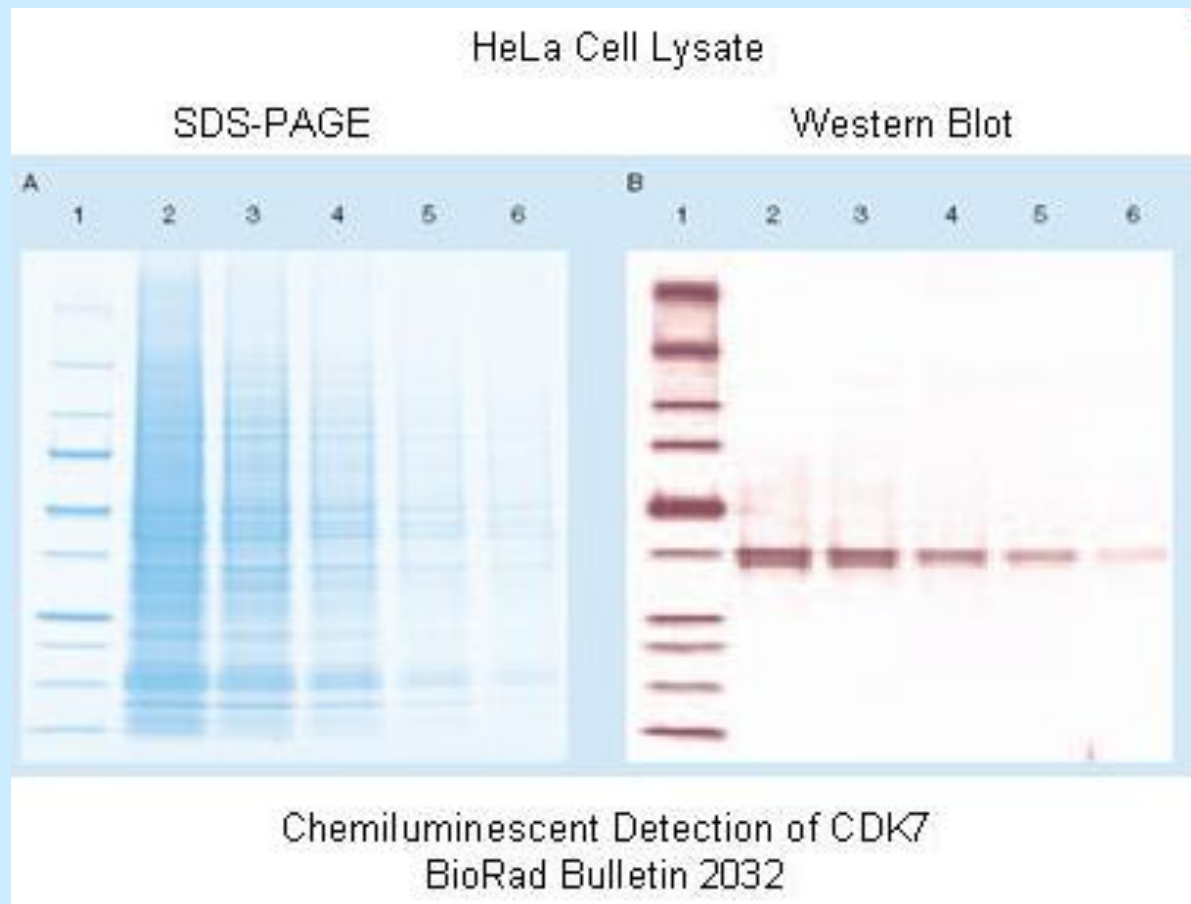
Sekundární
Ab - Konjugát

Primární
Ab - sérum



Western blot

- Immunoblot – varianta metody ELISA
- Charakterizuje protilátkovou odpověď proti mnohočetným antigenům



Jak se prokazují viry?

- **Průkaz přímý**
- **Průkaz nepřímý**

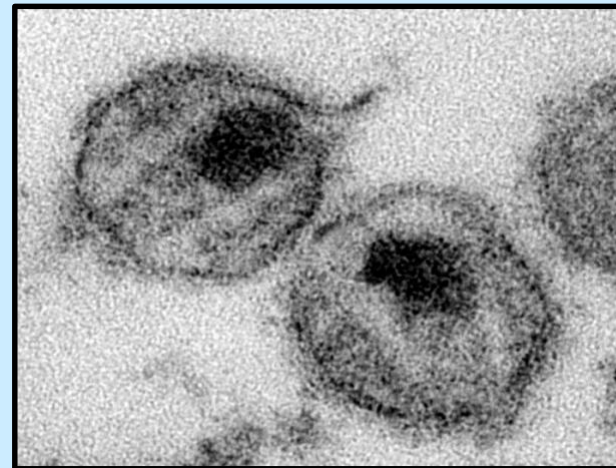
Přímý průkaz virů

- **Mikroskopický průkaz**
- **Průkaz virových antigenů sérologicky**
- **Průkaz typických chemických substancí (průkaz nukleových kyselin)**
- **Průkaz infekčního agens (izolace viru)**

Mikroskopický průkaz virů

Elektronový mikroskop

- **Negativní kontrast**



Světelný mikroskopie

- **Barvení dle Giemsy – poxviry, rickettsie a chlamydie**
- **Cytologický průkaz inkluzí (rabies virus)**

Průkaz virových antigenů

Imunoenzymatická stanovení

- **Metoda ELISA v sendvičovém uspořádání**

Imunofluorescence

- **Rutinní diagnostika vztekliny, chřipky, aj.**

Radioimunologická analýza

- **Nahrazuje se imunometodami**

Precipitace a příbuzné techniky

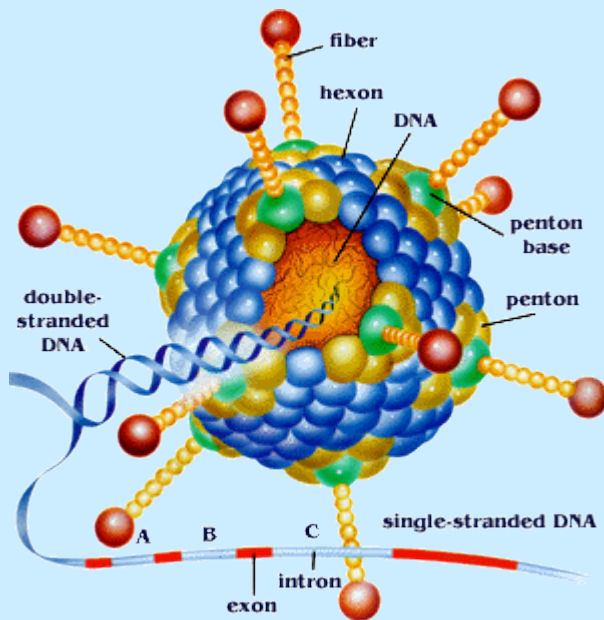
- **Rotaviry, noroviry a adenoviry**

Imunní elektronová mikroskopie

Průkaz nukleových kyselin

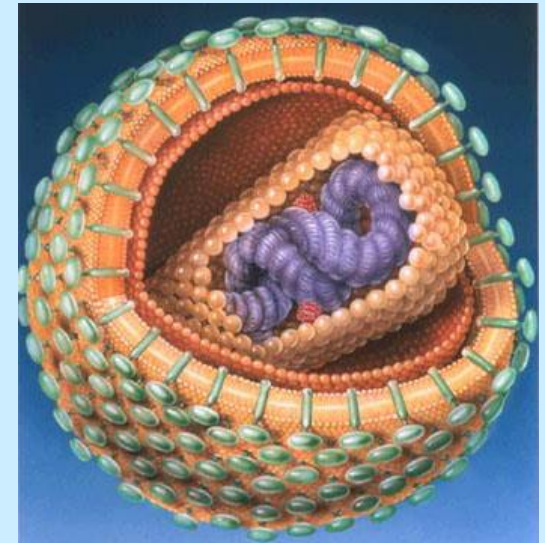
Genová sonda

Metody amplifikace



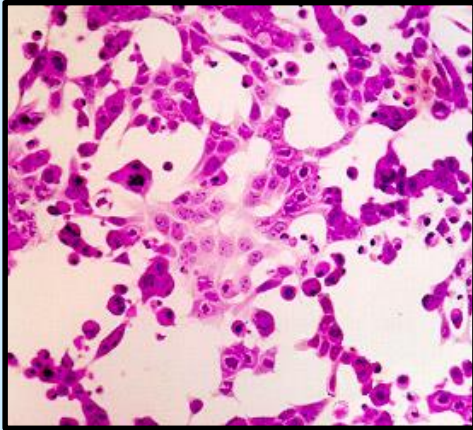
DNA viry

RNA viry



Izolace viru

Buněčné kultury



HeLa buňky infikované
adenovirem

Pokusná zvířata

- Myši
- Sající myšata
- Morčata

Pěstování na kuřecích zárodcích



Produkce vakcíny
proti chřipce

Nepřímý průkaz virů

Komplement fixační reakce

- **Respirační virózy, neuroinfekce, ...**

Reakce se značenými protilátkami

- **Imunofluorescence, ELISA, Western blot**

Neutralizační test

- **Vysoce specifický, pracný a nákladný**
- **Bližší určení virových izolátů**

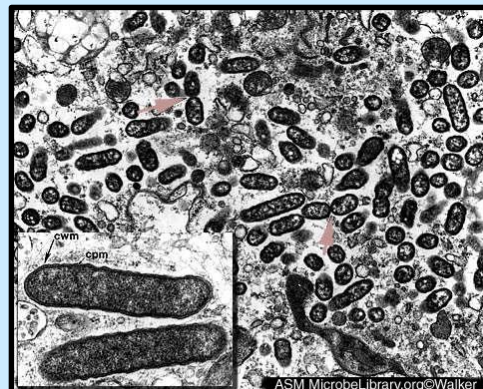
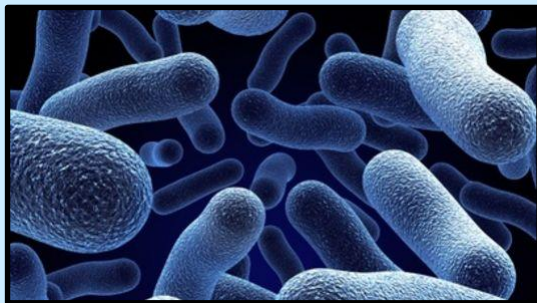
Hemaglutinačně inhibiční test

- **Druhá nejčastěji užívaná sérologická reakce ve virologii**

Se kterými bakteriemi se pracuje virologickými technikami?



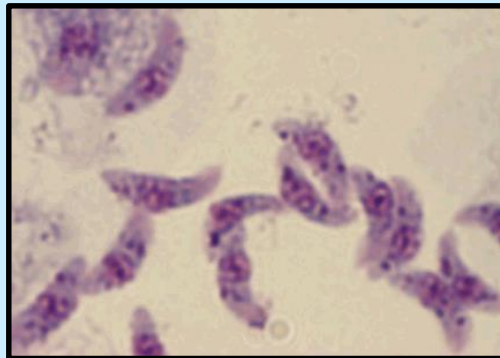
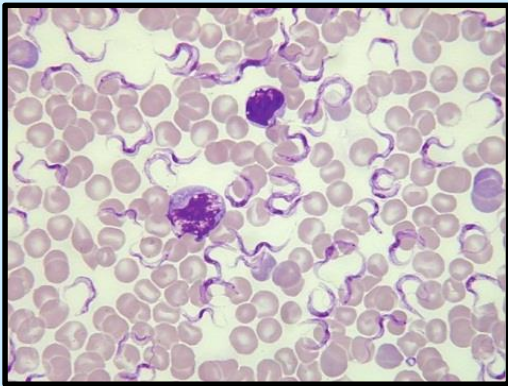
S rickettsiemi a chlamydiemi



Following release from the phagosomes, rickettsiae grow free in the cytoplasm of cultured cells, dividing by binary fission (seen at arrows). Inset highlights the outer and inner membranes of rickettsia.



Vyšetřovací metody v parazitologii



Přímý průkaz parazitů

Žádná kultivace, ale morfologický průkaz

- **Makroskopický**
- **Mikroskopický v nativním, otiskovém nebo barveném preparátu**

Průkaz parazitárních antigenů

Ojedinele (u prvoků) průkaz nukleových kyselin

Kultivace *Trichomonas vaginalis*

Pokus na zvířeti u trypanosom, leishmanií a *Toxoplasma gondii*

Nepřímý průkaz parazitů

Prokazují se pouze protilátky

- **Diagnostika protozoóz a helmintóz**
- **U nás především toxoplasmóza a larvární toxokaróza**
- **Většinou se vzorky stolice, perianálních otisků a krve odesílají do spádových nebo referenčních laboratoří**



Znáte referenční laboratoř pro průkaz parazitů?

Mykologické vyšetřovací metody

Podobné metodám bakteriologickým

- **Mikroskopické vyšetření klinického materiálu**
- **Kultivace vedoucí k identifikaci etiologického agens**
- **Stanovení citlivosti k antimykotikům**
- **Průkaz přítomnosti faktorů virulence**
- **Méně často se využívá antigenní analýza a imunochemické metody**
- **Nepřímý důkaz pro rychlou diagnostiku invazivních mykóz**
- **Metody molekulárně-biologické pro identifikaci a typizaci agens**

Shrnutí

- 1) Přímý průkaz v bakteriologii
- 2) Nepřímý průkaz v bakteriologii
- 3) Přímý průkaz virů
- 4) Nepřímý průkaz virů
- 5) Vyšetřovací metody v parazitologii
- 6) Mykologické vyšetřovací metody

