

Otázka: Mikrobiální diagnostika

Předmět: Biologie

Přidal(a): Jana

Proč je mikrobiální diagnostika důležitá?

- Identifikace patogenního agens
- Subtypizace patogenního agens
- Identifikace mutant rezistentních na léčiva
- Cesty přenosu patogenního agens
- Evoluce mikrobů
- Detekce emergentních patogenů
- efektivní terapie
- epidemiologické studie

Identifikace mikroorganismu

- **Orientační:** morfologie kolonií, růst na selektivně diagnostických půdách, barvený preparát
- **Konečná identifikace:** biochemické a fyziologické vlastnosti, antigenní struktura, průkaz toxicity
- **Typizační kmene:** biotypizace, antibiogram, fagotypizace, bakteriocinotypizace,

molekulárně-biologické metody (RFLP a další).

Stupně biologické ochrany

Biosafety level 1 (BSL1)

- biologická agens, u kterých není pravděpodobné, že by mohla způsobit onemocnění zdravého (imunokompetentního) člověka (nebo zvířete).
- pouze ochranné oděvy (běžné bílé pláště) a ochranné rukavice
- podobnými laboratořemi disponuje každá nemocnice
- organismy: *Bacillus subtilis*, *Naegleria gruberi*, nepatogenní *E. coli*

Biosafety level 2 (BSL2)

- pracovníci na této úrovni používají vždy ochranné oděvy a rukavice, doplněné o prostředky pokročilé ochrany – o respirační filtry, obličejové štíty a jiné
- laboratoře na BSL2 vyžadují pro manipulaci s infekčními původci (často existuje očkování/terapie), speciální přístrojové vybavení například boxy s laminárním prouděním vzduchu
- biologická agens, která mohou způsobit onemocnění člověka (nebo zvířete), ale za normálních okolností není pravděpodobné, že by se stala vážným nebezpečím pro laboratorní. Většinou je dostupná účinná profylaxe nebo léčba případného onemocnění, riziko šíření je omezené. Mírné individuální riziko, omezené společenské riziko
- organismy: herpes simplex virus (typ 1 a 2), mnoho druhů bakterií rodu *Salmonella* či *Shigella*, *Staphylococcus aureus* (včetně MRSA), chřipkové viry typu B a C, většina chřipkových virů typu A, viry hepatitid, borelie (Lymská borelióza)

Biosafety level 3 (BSL3)

- je určen pro rutinní manipulaci s nebezpečnými původci nálezů, proti kterým mnohdy neexistuje účinná léčba je vyžadováno mnohonásobné očkování.
- ochranné prostředky na úrovni BSL3 jsou rozšířeny na kompletní ochranné kombinézy s kapucí doplněné pasivní respirační přístroj pracující na podobném principu jako plynové masky (vzduch prochází speciálním tzv. HEPA filtrem, který zachytí infekční původce a propustí jen vzduch), dvojité rukavice atd.
- samostatná vzduchotechnika s HEPA filtry

- biologická agens, která mohou způsobit závažná onemocnění člověka (nebo zvířat, či mohou vést k vážným ekonomickým následkům), ale většinou se nešíří náhodným kontaktem mezi jedinci. Představují závažné nebezpečí pro laboratorní pracovníky. Vysoké individuální riziko, nízké společenské riziko
- organismy: virus HIV, virus klíšťové encefalitidy či bakteriální původci tyfu a anthraxu, *Bacillus anthracis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Yersinia pestis* (mor), *Coxiella burnetii* (Q horečka), virus Hantaan, virus SARS-CoV-2

Biosafety level 4 (BLS4)

- je určen pro speciální manipulaci s vysoce infekčními původci onemocnění proti nimž neexistuje účinná léčba ani očkování.
- ochranné prostředky na těchto úrovních spočívají v použití speciálních skafandrů (kompletních hermeticky uzavřených obleků) s vlastním oběhem kyslíku pocházejícího buď z centrálního rozvodu, nebo aktivního respiračního přístroje. Trojnásobná vrstva rukavic.
- biologická agens, která způsobují závažná onemocnění člověka (nebo zvířat) a jsou snadno přenosná z člověka na člověka, ze zvířete na člověka nebo naopak. Představují vážné nebezpečí pro zaměstnance i nebezpečí rozšíření do prostředí mimo pracoviště, přičemž obvykle není dostupná žádná účinná profylaxe nebo léčba případného onemocnění. Vysoké individuální riziko, vysoké společenské riziko
- organismy: virus Eboly, Marburg, virus Lassa, Machupo, Junin, SARS-CoV-1, hantaviry, ruské kmény viru klíšťové encefalitidy, virus pravých neštovic, virus opičích neštovic, virus konžsko-krymské hemoragické horečky
- Konečná diagnóza: Klinika + Anamnéza + Výsledky laboratorních vyšetření (základní, speciální)

Základní laboratorní vyšetření

- **Odběr krve, separace séra**
- Krevní obraz
- Cholesterol celkový
- Glykémie
- Jaterní testy (alaninaminotransferáza ALT, asparátaminotransferáza AST, gamaglutamyltransferáza GMT, alkalická fosfatáza AP): hepatitidy, mononukleóza (EB virus)
- Urea, kreatinin (glomerulární filtrace, poškození ledvin)

- CRP: do 5 mg/ml normální; 6 – 30 mg/mL viróza, opak. za 1-2 dny; >30 mg/mL bakteriální infekce; kolem 300 mg/ml závažný bakteriální zánět
- Sedimentace: rychlost sed. erytrocytů, rychlejší při zánětu, infekci, nádorovém onemocnění

Zobrazovací metody

- **RTG, UZ, tomografické metody (PET, CT), oftalmologické vyšetření**
- Extrémně výhodné při charakterizaci patologických změn CNS

Další specializovaná vyšetření

- EKG – elektrokardiologické vyšetření
- ECHO – echokardiologické vyšetření

Faktory míry úspěšnosti mikrobiologického vyšetření

- Validní klinické + anamnestické údaje
- Validní vzorek
 - ze správného místa
 - optimální doba odběru
- správná technika odběru **správná terapie**
- dodržení podmínek skladování **epidemiologická opatření**
- Kvalitní laboratorní proces
- Správná interpretace výsledků

Odběr klinických vzorků

Zásady odběru

- Každý vzorek na mikrobiologické vyšetření musí splňovat

a) Klinickou validitu

- odběr ze správného místa, kde lze předpokládat přítomnost mikroba

b) Technickou validitu, tedy odběr ve:

- správný čas (např. před podáním antibiotika, fáze virémie atd.)
- správným způsobem (lege artis, asepticky)
- do správných souprav (označené sterilní nádoby, transportní média)

Validní vzorek

- **Odběr z místa pravděpodobného výskytu infekčního agens**
- **Záchyt optimálního množství materiálu (tj. agens) z místa infekce**
- **Optimální doba odběru**
- **Správná technika odběru**

Vhodná odběrová souprava:

- **Výtěry**- tampony na tyčince nebo drátku v kombinaci se zkumavkou
- **Tekuté vzorky** - moč atd., sterilní nádoby se širším hrdlem
- **Krev, Hnis, Aspirát** - injekční stříkačka na jedno použití uzavřená plast. zátkou (nikdy jehlou)

Preference odběru tekutých vzorků: hnisy, obsahy primárně sterilních dutin aspirací injekční stříkačkou (odběr tekutých vzorků tamponem často nevhodné - riziko falešně negativních výsledků, kontaminace)

Stěry a výtěry tamponem: pouze infekce orofaryngeální, nazofaryngeální, ušní, oční, některé urogenitální, při podezření na bakteriální - povrchové kožní léze, rektální

Požadavky na odběr (kultivace)

- **Likvor** (mozkomíšní mok): přísně asepticky, okamžitý transport do laboratoře při 37 °C nebo při 4 °C
- **Krev na hemokultivaci**: několik vzorků krve během jednoho dne, nelze-li odeslat hned do laboratoře uložit při 37 °C nebo při RT. Nejprůnosnější výsledky s velkým klinickým významem.
- **Sputum** přítomnosti hnisavých vloček x sliny, mikroskopický screening na posouzení validity vzorku, kvantitativní kultivace pouze u vzorků purulentních, s minimálním obsahem dlaždicových epitelů
- **Výtěr z krku**: setřít patrové oblouky tonzily, zaslat v transportní půdě, klinický význam hlavně pro průkaz původců akutní tonzilofaringitidy

- **Výtěr ze spojivkového vaku:** při hnisavých afekcích zaslat v transportní půdě, při podezření na mykotickou etiologii do transportní půdy nevkładat, doplnit nátěrem na sklíčko
- **Výtěr z ran a kožních lézí:** pouze nejde-li odebrat materiál tekutý do stříkačky, potom setřít okraj léze, kde probíhá akutní zánět s pravděp. přítomností původce, u rozsáhlých defektů otisk na kult. půdu
- **Poševní výtěry:** vždy dva - jeden na bakt. vyšetření v transp. půdě, druhý ve spec. půdě na trichomonády a kvasinky, plus dvě sklíčka s nátěrem na MOP (Gram, Giemsa), dle agens odběry ze zadní nebo střední klenby
- **Vyšetření na kapavku:** výtěry z uterty, pochvy, cervixu, krku, rekta, se vždy doplní nátěrem na sklíčko, zanoří se do vytemperované transportní půdy a při teplotě 37 °C zašlou do lab.
- **Moč:** střední proud moči po řádném omytí genitálu, ve sterilním kontejneru se okamžitě zašle do laboratoře, stanovení kvantitativní bakteriurie
- **Stolice:** výtěr na odběrovém tamponu v transportní půdě (průkaz kampylobaktera)
- **Parazitologické vyšetření stolice:** kousek stolice velikosti ořechu, není nutný sterilní kontejner, kultivovat je možno pouze prvoky
- **Virologická vyšetření:** speciální transportní médium k izolaci viru, vždy při 4 °C (tající led), na průkaz protilátek párová séra

Rozdělení metod pro mikrobiální diagnostiku

Co detekujeme (patogen vs. protilátka)?

- **přímé metody:** detekce patogenního agens, jeho složek (proteinů, NK)
- **nepřímé metody:** detekce protilátek (imunitní reakce na patogenní agens)

Jak detekujeme (princip)?

- kultivační metody
- biochemické testy
- testy citlivosti k antibiotikům, antivirotikům a fágům
- metody založené na reportérových systémech
- mikroskopické techniky (světelná a elektronová mikroskopie)
- molekulárně-biologické techniky (PCR, sekvenace)
- imunologické techniky (detekce protilátkové odpovědi nebo přímá detekce patogena)

- pomocí protilátek)
- proteomické (chemotaxonomické metody)

Jak přesně detekujeme (kvantifikace)?

- kvalitativní metody
- kvantitativní metody

Přímý průkaz

- průkaz infekčního agens nebo jeho složek (antigeny, nukleová kyselina)

Materiál:

- ***stěry/výtěry:** dutina ústní, nos, nosohltan, zevní zvukovod, rektum, perianální stěry, uretra, pochva – ze zevní nebo střední klenby, cervix, sekret z Bartholiniho žlázy, spojivkový vak, kožní léze, rána nebo hluboký defekt
- ***sputum**, endotracheální aspirát, výplachy paranasální dutiny, duodenální obsah, **stolice, moč** (střední či poslední proud, cévkovaná, z permanentního katétru, získaná suprapubickou punkcí), plodová voda, tekutina z adnex, prostatický sekret, ejakulát, **mozkomíšní mok**, tekutina z nitroočního prostoru, seškraby pokožky apod.
- ***bioptický materiál:** tkáň odebraná z infikované lokality, biopsie, excize, aspirace, peroperačně
- ***krev** (nesrážlivá EDTA, srážlivá), **kostní dřev, krevní nátěry**
- ***obsah patologických dutin, hnis**
- ***cizorodý materiál, dialyzát**
- ***suspektní útvary**
- Metody: Kultivace, mikroskopie, PCR, přímá/sandwich ELISA, MALDI-TOF, atd.

Nepřímý průkaz

- průkaz specifických stop, které mikroorganismus zanechal v organismu = průkaz protilátek
- Materiál: srážlivá krev (3 – 5 mL), sklivec (max 20 uL neředěného materiálu), mozkomíšní mok (max 100 uL)
- Detekce protilátek možná až po určité době po infekci
- Titry protilátek neklesají vždy záhy po léčbě

- Nevhodné pro stanovení úspěšnosti léčby
- Zkřížená reakce
- **Výsledek sérologického vyšetření = indikátor, jehož význam hodnotíme v souvislosti s výsledky ostatních typů vyšetření a klinickým stavem**

Metody:

- Precipitace
- Alutinace
- Komplementační reakce
- Neutralizační reakce
- Metody se značenými reagenty (ELISA, RIA, senzory...)

Klasické (mikrobiologické) metody pro diagnostiku bakterií

- Kultivační metody
- Barvicí techniky (též viz mikroskopie)
- Klasifikace s využitím selekčních / diferenciačních médií
- Biochemické testy
- Testy citlivosti k antibiotikům
- Fagotypizace a jiné diagnostické metody založené na bakteriofágách

Kultivační metody pro izolaci a identifikaci virů

- Metody založené na práci s tkáňovými kulturami
- Plaková titrace
- Imunofluorescenční barvení
- Virus-neutralizační test
- Reportérové virové systémy
- Izolace virů pomnožením na experimentálním zvířeti

Mikroskopické techniky pro diagnostiku mikroorganismů

- Světelná mikroskopie
- Mikroskopie nebarvených preparátů (mikroskopie v procházejícím světle, fyzikální kontrastní metody)
- Mikroskopie barvených preparátů, fluorescenční/konfokální mikr.

- Elektronová mikroskopie (TEM a SEM)
- **Techniky nevyžadující předchozí amplifikaci pomocí PCR** (např. pulsní gelová elektroforéza, hybridizační techniky, restrikční analýza)
- **Molekulární techniky založené na amplifikaci** (rozličné typy PCR)
- **Sekvenační techniky**

Imunologické metody pro diagnostiku mikroorganismů

- Klasické imunologické metody (aglutinační techniky, imunodifuzní techniky, imunoelektroforetické metody)
- Imunoanalytické metody (immunoassays)
- Rychlé imunologické metody (lateral flow immunoassays, dipstick techniky, antigenní testy)
- Biosenzorové technologie

Metody kvalitativní

- rozlišení pozitivního a negativního výsledku
- Westen Blot, klasická PCR, biochemické testy

Metody semikvantitativní

- pro orientační stanovení množství (koncentrace, titru) patogenního agens nebo protilátek ve vzorku
- antigenní testy (dip-stick technologie, mikroskopické metody, imunofluorescenční barvení)

Metody kvantitativní

- pro stanovení přesného množství (koncentrace, titru) patogenního agens nebo protilátek ve vzorku
- imunoanalytické metody, biosenzory, kvantitativní real-time PCR, bakteriální titrace na plotnách, plaková titrace, virus-neutralizační testy.

1. **Infekční nemoc a její příznaky - obecná patologie (VŠ)**

2. [Viry - maturitní otázka](#)
3. [Elektronová mikroskopie - otázka z biofyziky](#)