

KAPITOLA 1

LABORATÓRNA DIAGNOSTIKA



Kapitolu zostavil
Ján Predný



Charakteristika lekárskej mikrobiológie

Predmetom **lekárskej mikrobiológie** je získavanie a využívanie poznatkov o mikroorganizmoch jednak ako o pôvodcoch infekcií človeka, ako aj o súčasťi humánnej **mikrobioty** (súbor všetkých mikroorganizmov v ľudskom organizme, alebo v určitej anatomickej lokalite, napr. tráviacom trakte), a to tak **v zdraví, ako aj v chorobe**. Zaoberá sa štúdiom a identifikáciou biologických, mikroskopických, rastových, biochemických i genetických vlastností, medzidruhových odlišností a vzájomných vzťahov medicínsky významných mikroorganizmov – baktérií, mikroskopických húb, vírusov, parazitov, ale aj nekonvenčných infekčných častíc, ako sú riasy (napr. rod *Prototheca* spp.) a príóny. Venuje sa skúmaniu ďalších vlastností mikróbov, predovšetkým patogénnych mikroorganizmov, ktoré sa uplatňujú pri vzniku a šírení infekčných ochorení, napr. mechanizmom, umožňujúcim mikrobiálnu kolonizáciu rezervoárov, šírenie a inváziu mikróbov do makroorganizmu a unikovým mechanizmom patogénov pred ich elimináciou imunitným systémom hostiteľa. Lekárska mikrobiológia zahŕňa takisto mikrobiologické stanovenie a epidemiologické sledovanie citlivosti a rezistencie k antimikrobiálnym látkam, rovnako aj sledovanie vplyvu fyzikálnych a chemických faktorov na mikroorganizmy. Skúma rôzne formy interakcií mikroorganizmov s makroorganizmom. Súčasťou lekárskej mikrobiológie je aj laboratórne skúmanie a sledovanie odpovede makroorganizmu na mikrobiotu, ktorá sa v ňom nachádza. Pritom analyzuje jeho rôzne zložky, ktoré buď signalizujú mikrobiálnu inváziu, alebo bránia šíreniu mikroorganizmov a ich patologickému uplatneniu v infikovanom makroorganizme. Zaoberá sa aj možnou mikrobiálnou etiológiou iných ako „klasických“ infekčných ochorení alebo podielom mikroorganizmov na vzniku iných ako infekčných ochorení (autoimunitných, metabolických, kardiovaskulárnych, onkologických a pod.). Skúma a objasňuje aj iné interakcie, ktoré ovplyvňujú zdravie človeka, napr. tvorbu endogénneho oxidu dusnatého bakteriálnou flórou v gastrointestinálnom trakte a jeho vplyv na kardiovaskulárny systém, epigenetické vplyvy mikrobioty na makroorganizmus a naopak. Skúma aj priame či nepriame ovplyvnenie mikrobioty faktormi zo strany makroorganizmu, napríklad hostiteľskými hormónmi. Mikrobiologická laboratórna diagnostika využíva tak klasické metódy (mikroskopia, kultivačné a izolačné techniky, biochemické analýzy, sérologické metódy, fagotypizácia a pod.). V súčasnosti sa dostávajú do popredia postupy molekulárnych – biologických a fyzikálno-chemických metód na identifikáciu a charakterizáciu génov, resp. celého genómu jednotlivých mikrobiálnych druhov alebo genetického spektra celej mikrobioty (**mikrobiómu**) – analýzy nukleových kyselín (hybridizácia, amplifikácia, sekvenácia a iné), biomolekulových spektier mikroorganizmov (MALDI-TOF), kvantifikáciu mikroorganizmov, dokazy tvorby biofilmu, génovú expresiu a pozorovanie iných vlastností mikroorganizmov modernými technológiami (cytometria, meranie impedancie, biočipy, biosenzory).

Najvýznamnejšou časťou lekárskej mikrobiológie je **klinická mikrobiológia**, ktorá sa zaoberá **vyšetrovaním vzoriek od chorých (resp. aj suspektne chorých a infekciou ohrozených) osôb**, ktoré kvôli svojmu zdravotnému stavu prichádzajú do zdravotníckych zariadení. Vyšetrenia v rámci klinickej mikrobiológie sú hradené z verejného zdravotného poistenia. Iné oblasti lekárskej mikrobiológie zahŕňajú laboratórnu diag-

nostiku so zameraním na verejné zdravie obyvateľstva a prevenciu ochorení, ktorá je zväčša hradená zo štátneho rozpočtu (napr. mikrobiologické monitorovanie potravín, pitnej vody, vodných zdrojov a prostredia, sledovanie cirkulácie patogénov a ich vektorov v prírodnom či urbanizovanom prostredí, prípravu podkladov na imunizačný program a výrobu očkovacích látok, ochrana pred zneužitím mikroorganizmov na bojové a teroristické ciele a pod.). Významnú úlohu v lekárskej mikrobiológii majú **referenčné mikrobiologické pracoviská** na úradoch verejného zdravotníctva, ktoré vykonávajú predovšetkým vyšetrenia zamerané na plnenie epidemiologickej surveillance¹, ale aj vyšetrenia na konfirmáciu pozitívnych výsledkov vzoriek vyšetrených na pracoviskách klinickej mikrobiológie. Mikrobiologickú diagnostiku za účelom ochrany verejného zdravia zabezpečujú aj **kontrolné laboratória v iných rezortoch** – v rezortoch poľnohospodárstva (laboratória Štátnej veterinárnej a potravinovej správy), vnútra a obrany. Časť úloh lekárskej mikrobiológie plní aj **školsťvo a vedecké pracoviská**, ktoré vyučujú mikrobiológiu študentov, školia mikrobiológov a vedú výskum alebo vývoj aplikovaných technológií, metód a postupov využiteľných nielen pre laboratórnu diagnostiku, ale aj modernú liečbu chronických infekcií (napr. fágová terapia, autovakcíny), chirurgických komplikácií (larválna terapia rán, MDT – maggot debridement therapy, biodebridement, biologická chirurgia) alebo profylaxiu komplikácií liečby (probiotiká a prebiotiká pri ATB liečbe).

Klinická mikrobiológia je základom praktickej diagnostiky, je postavená na klinicko-patologickej terminológii nozologických jednotiek a na klinicko-mikrobiologickej diagnostike infekčných ochorení s prípadným odvodením epidemiologických súvislostí v rámci klinických zariadení. Podrobne rozpracovanú náplň a funkciu odboru možno nájsť v koncepcii klinickej mikrobiológie.

Klinická mikrobiológia sa zaoberá diagnostikou ochorení spôsobených patogénnymi baktériami, vírusmi, mikroskopickými hubami a parazitmi, ako aj oportúnne patogénnymi mikroorganizmami, ktoré sa uplatňujú v patogenéze ochorení najmä u pacientov s poruchami imunity, toxickým alebo iným environmentálnym poškodením a pod.

Klinická mikrobiológia vo svojej diagnostickej činnosti využíva metódy priameho dôkazu etiologického agens v materiáli od pacienta po izolácii a rozmnožení pôvodcu alebo nepriameho dôkazu.

Na **priamy dôkaz** z biologického materiálu pacienta – identifikáciu pôvodcu ochorenia sa využíva mikroskopické vyšetrenie, dôkaz infekčného agens kultivačným vyšetrením, dôkaz špecifických antigénov, nukleových kyselín, alebo určenie ďalších vlastností a štruktúr charakteristických pre určovaný mikroorganizmus.

Súčasťou tohto diagnostického postupu je aj posúdenie virulencie infekčného agens (stanovenie produkcie toxínov a prítomnosti ďalších faktorov patogenity), určenie citlivosti mikroorganizmu na antiinfekčné liečivá a identifikácia mechanizmu rezistencie, čím zabezpečuje racionálnu liečbu pacienta.

¹ Surveillance chorôb je nepretržitý dohľad nad všetkými aspektami výskytu a šírenia danej choroby, ktorý je integrálnou súčasťou účinného boja proti nej. Surveillance znamená nepretržitý zber údajov, analýzu, interpretáciu a spätnú väzbu medzi tými, ktorí údaje poskytujú a tými, ktorí ich analyzujú a interpretujú. Surveillance je integrálna súčasť zdravotníckej starostlivosti.

Nepriama mikrobiologická diagnostika využíva **nepriame metódy dôkazu** infekcie, dôkaz markerov špecifickej imunitnej odpovede (protilátky, bunková odpoveď), ktoré vytvára pacient proti antigénom infekčného agens, alebo stanovenie aktivity nešpecifických ukazovateľov zápalovej reakcie.

Mikrobiologická diagnostika sa robí na **pracoviskách klinickej mikrobiológie (PKM)**, ktoré sú súčasťou **spoločných vyšetrovacích a liečebných zložiek (SVLZ)** ústavných zdravotníckych zariadení alebo sú to samostatné neštátne zariadenia. Zaoberajú sa diagnostikou bakteriálnych, vírusových, parazitárnych a mykotických infekcií. Niektoré mykologické laboratória sú pri dermatovenerologických klinikách/oddeleniach. Nadstavbovú diagnostiku alebo confirmáciu výsledkov určitých vyšetrení robia národné referenčné centrá (napr. pre HIV/AIDS, tuberkulózu a mykobakteriôzy, syfilis, hepatitídy a pod.).

Pracoviská klinickej mikrobiológie sa po roku 1989 delimitovali z hygienickej služby pod správu nemocníc, bližšie k pacientovi. **Ústavy a oddelenia klinickej mikrobiológie (ÚKM, OKM)** sa stali súčasťou nemocnice s poskytovaním služieb z oblasti mikrobiológie. Služby v mikrobiologických laboratóriách sú nastavené tak, aby čo najlepšie zodpovedali potrebám pacientov a klinických pracovníkov.

Vďaka bližšiemu kontaktu s lekármi z klinických pracovísk sa odbor rýchlejšie rozvíja. Neskôr sa mikrobiologické laboratória komercializovali, stali sa ekonomicky zaujímavejšími, vznikli neštátne súkromné laboratória.

Pozitívny rozvoj odboru sa prejavil na začiatku 90. rokov aj v oblasti postgraduálnej výučby na pôde Slovenskej zdravotníckej univerzity a Lekárskej fakulty Univerzity Komenského, kde prebiehajú kurzy a školenia v rámci prípravy na postgraduálne vzdelávanie mikrobiológov.

Sieť pracovísk klinickej mikrobiológie, náplň a rozsah ich činnosti musí zodpovedať požiadavkám na zabezpečenie dostupnej a kvalitnej diagnostiky v potrebnom rozsahu pre všetky ambulantné a ústavné zdravotnícke zariadenia. V niektorých oblastiach Slovenska nebola rajonizácia celkom dodržaná.

Odborno-metodické vedenie činnosti v odbore

Činnosť odboru klinická mikrobiológia odborne a metodicky riadi Ministerstvo zdravotníctva Slovenskej republiky (MZ SR) v spolupráci s hlavným odborníkom MZ SR pre odbor klinická mikrobiológia. V poradnom zbore hlavného odborníka sú menovaní krajskí odborníci. Pri svojej činnosti spolupracuje hlavný odborník MZ SR a jeho poradný zbor so stavovskými orga-

nizáciami a odbornými spoločnosťami, pôsobiacimi samostatne alebo v rámci Slovenskej lekárskej spoločnosti (SLS). Okrem iného spoločne pripravujú aj odborné usmernenia v oblasti lekárskej mikrobiológie, ktoré sú uverejňované vo Vestníku MZ SR. V rámci SLS je to predovšetkým Slovenská spoločnosť klinickej mikrobiológie. Stavovské organizácie reprezentuje Sekcia klinickej mikrobiológie Slovenskej lekárskej komory a Slovenská komora iných zdravotníckych pracovníkov, asistentov, laborantov a technikov.

Perspektívy odboru

V odbore klinická mikrobiológia je potrebné v súlade s rozvojom vedy a techniky perspektívne zavádzať nové metódy rýchlej mikrobiologickej diagnostiky, zavádzať rýchle molekulo-biologické a iné diagnostické metódy do rutínnej diagnostickej praxe, rozvíjať molekulo-biologické diagnostické metódy pre potreby epidemiologickej surveillance, využívať nové informačné technológie, spolupracovať pri tvorbe katalógu výkonov a následne pri tvorbe zoznamu výkonov. Je potrebné periodické zaraďovanie príslušných mikrobiologických vyšetrení do katalógu výkonov jednotlivých ochorení (guidelines), aby bolo zabezpečené skrátenie doby potrebnej na diagnostiku, spresnenie diagnostiky a usmernenie terapie tak, aby nedochádzalo k neindikovanej a ekonomicky náročnej aplikácii liečiv (napr. antibiotík), významne sa podieľať na programoch vypracovávaní a implementácie celoeurópsky platných metód diagnostiky a surveillance prenosných ochorení. Je potrebné rozvíjať nielen komplexnú laboratórnu diagnostiku, ale najmä posilniť klinickú orientáciu činnosti odboru a spoluprácu s klinikmi, najmä tzv. antimikrobiálnou starostlivosťou (antimicrobial stewardship), čo znamená komplex integrovaných postupov na optimalizáciu používania antimikrobiálnych látok a postupov v zdravotníckych zariadeniach. Ošetrujúci lekári a lekári so špecializáciou na infekčné choroby spolu s klinickými farmaceutmi sú považovaní za hlavných nositeľov programov antimikrobiálneho dozoru v zdravotníckych zariadeniach, je však nevyhnutné, aby v týchto programoch zohrávali kľúčovú úlohu klinickí mikrobiológovia. Cieľom je poskytnúť komplexnú stratégiu antimikrobiálnej starostlivosti o pacientov, ku ktorej budú mikrobiologické laboratória a klinickí mikrobiológovia významne prispievať vytváraním a pravidelnou aktualizáciou prehľadov o citlivosti mikroorganizmov na antimikrobiálne látky, poskytovaním nových možností rozšírenej diagnostiky a usmerňovaním v jej predanalytickej fáze, vzdelávaním poskytovateľov zdravotníckej starostlivosti a vytváraním systémov dohľadu (vrátane kontroly nozokomiálnych nákaz) a systémov varovaní.



Základným pracoviskom klinickej mikrobiológie je oddelenie klinickej mikrobiológie, ktoré môže byť organizačne samostatné, alebo je začlenené vo väčších organizačných jednotkách. Podľa rozsahu a druhu vykonávanej činnosti môže byť oddelenie rozdelené na úseky: klinickej bakteriológie, klinickej virológie, klinickej mykológie, klinickej parazitológie, imunoserologickej diagnostiky mikrobiálnych ochorení, úsek molekulárno-biologickej diagnostiky a úsek zabezpečenia laboratórnych a sanitárnych činností.

Oddelenie klinickej mikrobiológie zabezpečuje laboratórnu diagnostiku, objasňuje etiológiu a patogenézu ochorení mikrobiálneho pôvodu a imunopatologických stavov súvisiacich s prítomnosťou mikroorganizmov na slizniciach, koži a vnútorných orgánoch pacienta. Výstupy laboratórnych analýz sú podkladom pre racionálnu terapiu a prevenciu týchto ochorení.

Pracovisko klinickej mikrobiológie vedie lekár so špecializáciou v špecializačnom odbore klinická mikrobiológia. Kvalifikovanú konzultačnú činnosť lekárom ostatných medicínskych odborov, ako aj interpretáciu výsledkov mikrobiologických vyšetrení, poskytujú lekári so špecializáciou v špecializačnom odbore klinická mikrobiológia.

Minimálne požiadavky na personálne zabezpečenie a materiálno-technické vybavenie

Minimálne požiadavky na personálne zabezpečenie a materiálno-technické vybavenie pracovísk odboru klinická mikrobiológia upravuje osobitný predpis.

PKM vedie lekár so špecializáciou v klinickej mikrobiológii, ktorý garantuje kvalitu vyšetrení.

Výnos Ministerstva zdravotníctva Slovenskej republiky č. 09812/2008-OL z 10. septembra 2008 upravuje minimálne požiadavky na personálne zabezpečenie a materiálno-technické vybavenie PKM:

Personálne zabezpečenie PKM tvoria:

- minimálne 1 lekár so špecializáciou v špecializačnom odbore klinická mikrobiológia,
- minimálne 2 laboranti so špecializáciou v špecializačnom odbore laboratórna medicína.

Materiálno-technické vybavenie PKM tvoria

Základné funkčné priestory zariadenia spoločných vyšetrovacích a liečebných zložiek:

- laboratórna miestnosť s rozmermi najmenej 15 m² pre dvoch laborantov, na ďalšieho laboranta sa plocha zvyšuje o 5 m²,
- miestnosť s umývadlom na príjem materiálu s rozmermi najmenej 4 m²,
- denná miestnosť pre personál s rozmermi najmenej 6 m²,
- príručný sklad alebo skriňa s rozmermi najmenej 4 m²,
- hygienický filter pre personál – sprcha, toalety a umývadlo,
- šatňa,
- miestnosť s výlevkou pre upratovačku.

Ak ide o laboratórium, kde sa robia odbery biologického materiálu, je súčasťou základných funkčných priestorov aj odberová miestnosť, čakáreň a toaleta pre pacientov.

Minimálna plocha odberovej miestnosti je najmenej 8 m², steny a podlaha miestnosti musia byť umývateľné. V miestnosti je zabezpečené vetranie. Vecným vybavením miestnosti je ležadlo alebo polohovateľné kreslo, umývadlo, stolička a vešiak.

Minimálne vecné vybavenie a prístrojové vybavenie laboratórnej miestnosti tvoria: umývadlo, drez na umývanie pomôcok a vylievanie biologických materiálov, písací stôl, stolička, telefón, nádoba na odpad so šliapadlom, uzamykateľná skriňa na pomôcky, kartotečná uzamykateľná skriňa, dezinfekčné prostriedky, antiseptiká, prostriedky na vyšší stupeň dezinfekcie termolabilných nástrojov a prístrojov, laboratórny stôl a stolička, skriňa, chladnička, mraznička, centrifúga, germicídny žiarič, počítač s príslušenstvom, sterilizátor alebo autokláv.

Ďalšie priestory, ktoré tvoria PKM:

- odberová miestnosť – jedno odberové kreslo alebo posteľ s rozmermi najmenej 10 m², na každé ďalšie odberové kreslo sa plocha zvyšuje o 3 m²,
- prípravovňa pôd a médií s rozmermi najmenej 15 m², plochu možno zmenšiť pri automatickej plničke pôd,
- miestnosť na dekontamináciu infekčného materiálu s rozmermi najmenej 10 m²,
- umývareň a prípravovňa skla s rozmermi najmenej 10 m²,
- archív s rozmermi najmenej 10 m².

Ďalšie vybavenie jednotlivých úsekov, ktoré tvoria súčasť laboratória podľa aktuálneho predpisu sú: mikroskop, box s laminárnym prúdením vzduchu, termostat, vodný kúpeľ, plynový kahan, drez, v odberovej miestnosti: odberové kreslo, pojazdová stolička, pojazdový stolík, pracovná plocha, ležadlo alebo polohovacie kreslo, skrinka na nástroje, plynový kahan, umývadlo, vešiak na šaty, v prípravovni pôd a médií: laboratórne stoly, sterilný box, autokláv, analytické váhy, ph-meter, vodný kúpeľ, chladnička s mrazničkou, laboratórna skriňa, destilačný (deionizačný prístroj), v miestnosti na príjem materiálu: písací stôl, laboratórny stôl, stoličky, chladnička, laboratórna skriňa, umývadlo, v miestnosti na dekontamináciu infekčného materiálu: laboratórny stôl, autokláv, umývadlo, výlevka, v umývárni skla: laboratórny stôl, stoličky, umývací a dezinfekčný automat s horúcovzdušným sušením, ak pracovisko nemá zabezpečenú sterilizáciu dodávateľským spôsobom oddelením centrálnej sterilizácie, horúcovzdušný sterilizátor, laboratórna skriňa, umývadlo a drez. Prípravovňa pôd a médií sa nevyžaduje, ak laboratórium preukáže, že kultivačné pôdy a médiá nakupuje v plnom rozsahu od dodávateľa hotových pôd a médií.

Povrchy stien laboratórnych miestností musia byť ľahko umývateľné, dekontaminovateľné po celom obvode miestností do výšky až po strop a vrátane stropu. V závislosti od zaradenia pracoviska do príslušného stupňa úrovne ochrany sa požadujú ochranné opatrenia podľa osobitného predpisu.²⁾

Vybavenie laboratórií sa riadi zameraním laboratória a rozsahom diagnostických metód.

Vzhľadom na to, že uvedený Výnos uvádza len minimálne požiadavky na personálne, priestorové a prístrojové vybavenie

²⁾ Nariadenie vlády Slovenskej republiky č. 338/2006 Z. z. o ochrane zdravia zamestnancov pred rizikami súvisiacimi s expozíciou biologickým faktorom pri práci.



požadovaný v dobe svojej prípravy, neodráža dostatočne zmeny v laboratórnych metódach a technologický progres posledných dekád, ani metodické smerovanie odboru. Kodifikuje historický stav v odbore. Aktuálne možnosti vo vybavení dnešných mikrobiologických pracovísk sú uvedené v tabuľke 1.2.1. Na obrázku 1.2.1. je príklad zostavy diagnostických automatov (linky) pre sérologickú diagnostiku pomocou imunoanalýz s fluorescenčným značením a základomerných metód (turbidimetria, resp. nefelometria).



Obr. 1.2.1. Automatizovaná linka na vyšetřovanie vzoriek v sérologickom laboratóriu (najčastejšie sérum, ale aj likvor a pod). Do linky sa vkladajú primárne skúmavky („odberovky“) so scentrifugovanou krvou alebo iným materiálom, označené čiarovým kódom, na základe ktorého je vzorka identifikovaná čítačkou zabudovanou v ľavom module. Po identifikácii vzorky automat načíta z laboratórneho informačného systému (LIS) pracovný list s požadovanými parametrami pre prítomné vzorky a podľa typu vyšetření automaticky osadí jednotlivé vzorky do prepravného nosníka a odošle vzorku do príslušného vyšetřovacieho modulu (napr. pre turbidimetriu, imunoanalýzu a pod). Linka si menežuje sled vyšetření automaticky tak, aby sa dosiahol čo najvyšší počet vyšetřených vzoriek za daný čas. Po vyšetření je výsledok analýzy okamžite odoslaný do LIS-u a linka v prípade požiadavky na iný typ vyšetřenia posúva vzorku do iného modulu pre príslušné vyšetřenie. Linka si automaticky vykonáva celý manažment reagentov a spotrebného materiálu, rovnako aj kalibrácie a kontrolné merania. Analýzy tak prebiehajú automaticky, bez zásahu personálu laboratória.

Tab. 1.2.1. Prístrojové vybavenie a vybrané pomôcky na pracoviskách klinickej mikrobiológie – prehľad.

Špecifické prístrojové vybavenie
Kultivačné metódy • automat na identifikáciu baktérií zisťovaním ich metabolických vlastností • automat na testovanie ATB citlivosti (resp. poloaautomatické zariadenie) • automatický prístroj na hemokultiváciu • anaeróbny systém (LAS) • vortex • zákalomer • točňa Petriho misiek • elektrický alebo plynový kahan
Nekultivačné metódy
Mikroskopické metódy • optický mikroskop • fluorescenčný mikroskop • inverzný mikroskop • mikroskop s tmavým poľom • mikroskop s fázovým kontrastom • elektrónový mikroskop • ultramikrotóm • automatický prístroj na farbenie preparátov
Imunochemické • automatický alikvóter vzoriek • automatický pipetor • imunoanalýzátor (automat na imunoanalýzy – CLIA, FIA) • ELISA automat alebo čítačka (reader) • automatický prístroj na spracovanie a vyhodnocovanie imunoblotov • premývačka mikroplosiek • turbidimeter alebo nefelometer • rotatiter

Molekulárno-genetické

- izolátor (automat) nukleových kyselín
- PCR cykler
- Real Time PCR prístroj alebo automat na Real Time PCR (amplifikácia + detekcia)
- prístroj na detekciu nukleových kyselín viacerých druhov patogénov v jednej skúmavke (multiplex PCR)
- sekvenátor
- prístroj (bioanalýzátor) na validáciu, kvantifikáciu a čistenie DNA /RNA a proteínov
- prístroj na ELFO, horizontálna elektroforéza
- PCR termo blok
- UV iluminátor, UV lampa
- ultracentrifúga
- čítačka genomických alebo proteomic-kých mikročipov
- magnetický separátor

Spektrometrické

- MALDI TOF spektrometer

Iné metódy

- prietokový cytometer

Prístroje bez zaradenia k metódam

- digestor
- biologický termostat
- biologický termostat CO₂
- laminárny box
- laminárny box II. trieda
- laminárny box III. trieda
- centrifúga
- centrifúga chladená
- laboratórna trepačka
- spektrofotometer

Špecifické pomôcky

- bakteriálne kľučky (permanetné, jednorazové, kalibrované)
- mikropipety automaticky nastaviteľné objem 1 – 10, 20 – 100, 100 – 200, 500 – 1000 mikrolitrov

Nešpecifické prístrojové vybavenie pre biomedicínske laboratória

- sterilizátor
- autokláv
- analytické váhy
- vodný kúpeľ
- chladničky
- hlbokomraziaci box
- elektrická platňa
- mikrovlnná rúra
- zariadenie na prípravu destilovanej a inak upravovanej vody (reverzná osmóza)
- dopravníkový systém pre veľké laboratória
- potrubná pošta pre laboratória moderných nemocníc
- zdroj jednosmerného napätia

Administratívne prístrojové vybavenie

- počítačová sieť
- prístroj na tlač štítkov s čiarovým kódom
- čítačka čiarových alebo QR kódov
- skenery
- obáľkovač
- tlačiarne
- fotoaparát, kamera
- projekčná technika

LITERATÚRA

1. Votava M.: Lékařská mikrobiologie obecná. 2. přepracované vydání. Brno-Jundrov: Neptun, 2005.
2. Murray P.R., Rosenthal K.S., Tenover F.C. (eds): Medical Microbiology. 8. vydanie. Philadelphia: Elsevier, 2016.
3. Mandel G.L., Bennett J.E., Dolin R.: Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases. 7. vydanie. Philadelphia: Churchill Livingstone Elsevier, 2010.
4. Scharfen J., ml., Běbrová E., Buchta V. a kol.: Diferenciální diagnostika v klinické mikrobiologii. 1. vydanie. Health protection Agency, 2013.

1.3

LABORATÓRNE INFORMAČNÉ SYSTÉMY

Pršek D.



Laboratórny informačný systém (LIS) zabezpečuje elektronickú podporu procesov na pracoviskách laboratórnej diagnostiky. Už niekoľko desaťročí je dôležitou súčasťou poskytovania kvalitnej zdravotnej a efektívnej zdravotnej starostlivosti. Zároveň LIS poskytuje automatizáciu a elektronizáciu procesov v laboratóriách, čo vo výsledku prináša skrátenie času medzi prijatím vzorky a distribúciou výsledku, čo umožňuje lekárom skoršiu indikáciu liečby pacienta.

LIS zabezpečuje odporu procesov, začínajúc od príjmu materiálu na spracovanie, cez analytickú časť a končiac expedíciou výsledku vyšetrenia. Okrem procesov spojených so spracovaním a vyhodnotením materiálu je laboratórny informačný systém nepostrádateľnou súčasťou pri vykazovaní výstupov pre zdravotné poisťovne, nástrojom získavania rozmanitých štatistických výstupov ako aj prostriedkom pre elektronickú komunikáciu s lekárom prostredníctvom ambulantného či nemocničného informačného systému.

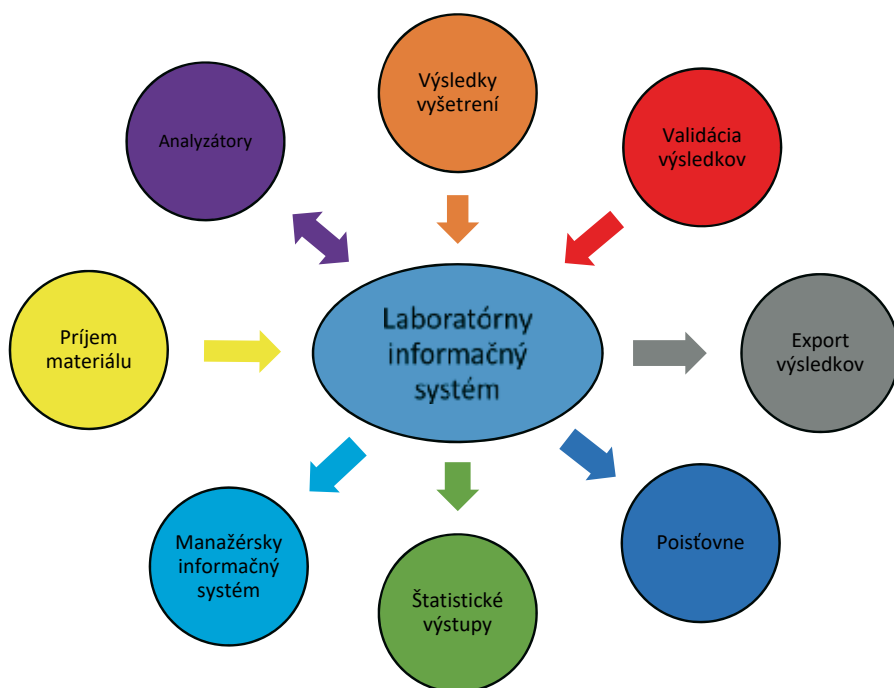
Ako zásadná vlastnosť Laboratórneho informačného systému je jeho neustály ďalší rozvoj na základe požiadaviek užívateľov, ako aj včasná aplikácia zmien vyplývajúca zo zmien legislatívy a rozvoja počítačových technológií.

Základné úlohy laboratórneho informačného systému

Aby laboratórny informačný systém splnil ciele na neho kladené, musí dokázať riešiť nasledovné úlohy:

- **Príjem materiálu na vyšetrenie** – vloženie informácie o požadovanom vyšetrení, možno vykonať ručným zápisom ako aj elektronickým príjmom žiadanky o vyšetrenie.

- **Komunikácia s analyzátormi** – odosielanie požiadaviek na vyšetrenie do analyzátora a príjem výsledkov vyšetrení vzoriek a kontrolných materiálov z analyzátora.
- **Podpora zápisu výsledkov vyšetrení** – možnosť ručne zapisovať výsledky vyšetrení, prípadne na základe vopred zadáných algoritmov vkladať ďalšie postupy spracovania materiálu.
- **Validácia výsledkov** – umožniť užívateľom niekoľkoúrovňovú validáciu výsledkov. Validovať výsledok rôznymi spôsobmi podľa potreby užívateľa (jednotlivo po metódach, po pacientoch, cez celý patientský sumár a pod.).
- **Expedícia výsledkov** – tlač výsledkov v papierovej forme; export elektronickou cestou do NIS a AIS, eHealth a pod.
- **Vyúčtovanie výkonov** – správa výkonov a možností vykazovania zúčtovacích dávok do poisťovní. Mechanizmy optimalizácie a sledovania vhodných kódov výkonov.
- **Štatistické výstupy** – tvorba rôznych typov štatistických výstupov. Generovanie zostáv odborných štatistík, cez ekonomické, prevádzkové až po legislatívne.
- **Manažérsky informačný systém** – poskytnutie dát do externého úložiska za účelom vhodnej transformácie dát s cieľom ich poskytnutia externým manažérskym systémom.



Obr. 1.3.1. Úlohy laboratórneho informačného systému.



Mikrobiologické laboratórne vyšetrenie je proces, ktorý zahŕňa časť predanalytickú (príprava pacienta, odber biologického materiálu, transport biologického materiálu do laboratória, a správne uchovanie vzorky do doby vlastnej analýzy), analytickú (vlastná analýza a výpočty) a postanalytickú (validácia, interpretácia výsledkov a ich doručenie zadávateľovi vyšetrenia). Pri interpretácii si treba uvedomiť, že získaný výsledok závisí od viacerých individuálnych faktorov. Pri interpretácii získaných výsledkov je nevyhnutný komplexný prístup, vrátane posúdenia celkového stavu pacienta a dôkladne odobratej anamnézy. Dôležité je posúdenie dynamiky hodnotených laboratórných vyšetrení. Komplexnosť takto poskytovaných laboratórných služieb so sebou nesie prísne požiadavky na vysokú profesionálnu erudíciu všetkých pracovníkov a na vybavenie pracoviska modernými technológiami. V posledných rokoch sa kladie dôkaz na kvalitu a komplexnosť poskytovaných laboratórných služieb. Jedným z prostriedkov ako tento cieľ dosiahnuť je zlepšovanie systému kvality podľa normy ISO 15 189.

V rámci odboru klinickej mikrobiológie existuje systém **externého hodnotenia kontroly kvality (EHKK)** mikrobiologických laboratórií organizovaný **SNAS**. V rámci správnej laboratórnej praxe laboratóriá postupujú podľa internej kontroly kvality, ktorou overujú laboratórne postupy a správnosť interpretácie laboratórných vyšetrení.

Hlavnými prioritami spolupráce s klinickými odborníkmi sú:

- správna prax v indikácii a interpretácii mikrobiologických vyšetrení,
- správna prax v antimikrobiálnej terapii a profylaxii na úrovni praktických lekárov špecialistov a nemocničnej lôžkovej starostlivosti,
- kontrola rezistencií na antibiotiká v komunite a v zdravotníckych zariadeniach,
- poskytovanie podkladov a aktívnej účasti na kontrole nozokomiálnych infekcií v záujme zníženia mortality skrátenia ošetrovacej doby, zníženia nákladov na liečbu.

Klinicko-mikrobiologická diferenciálna diagnostika je základným know-how tohto aplikovaného odboru, preto musí byť integrovanou súčasťou národných štandardných diagnostických postupov, ktoré sa budú uplatňovať v praxi akreditovaných a certifikovaných laboratórií.

Nenahraditeľnou úlohou v kontrole kvality má **externé hodnotenie kvality (EHK)**, poskytované akreditovanými pracoviskami **Úradu verejného zdravotníctva SR**, NRC pre sledovanie rezistencie na antimikrobiálne látky, ktoré posiela kontrolné vzorky do mikrobiologických laboratórií. Spolupracujúcim laboratóriám zabezpečuje NRC externú kontrolu v systéme NEQAS a následne zber dát pre **európsky monitorovací systém EARSS**. Okrem národnej kontroly kvality sú mikrobiologické laboratóriá zapojené do **medzinárodných EHK** (napr. Labquality ManaCon Fínsko, SEKK, INSTAND, UK NEQUAS a iných).

Význam národných štandardných postupov

Mikrobiologické pracoviská postupujú podľa štandardných pracovných postupov, ktoré sú súčasťou **riadenej dokumentácie**

cie mikrobiologických laboratórií v rámci akreditácie a certifikácie.

V budúcnosti je potrebné dosiahnutie štandardizácie a zavedenie správnej laboratórnej praxe, zavedenie akreditácie mikrobiologických laboratórií, zavedenia kontroly rezistencie do praxe v dobe narastajúcej rezistencie voči antibiotikám. V období globalizácie je potrebné monitorovať riziko importovaných infekcií a nových nebezpečných nákaz, vrátane bioterorizmu.

Význam mikrobiologických výsledkov sa bude zvyšovať s implementáciou systému DRG³ do praxe a bude mať priamy ekonomický vplyv na chod zdravotníckych zariadení.

Systém kontroly kvality v odbore klinická mikrobiológia

INTERNÁ KONTROLA

V rámci správnej laboratórnej praxe realizujú mikrobiologické laboratóriá internú kontrolu kvality, ktorou priebežne overujú úroveň vykonávaných laboratórných postupov a správnosti interpretácie výsledkov vyšetrení.

Pomocou kontrolných materiálov (kvalitatívne a kvantitatívne definované vzorky analyzovaného materiálu) sa pravidelne monitorujú výsledky kalibrácií, variáciu v hodnotách stanovovaní kontrolných látok a správnu funkciu jednotlivých analyzátorov alebo práce personálu. Denná frekvencia internej kontroly kvality (IQC) je závislá od objemu vzoriek, ktoré laboratórium počas dňa spracováva.

EXTERNÁ KONTROLA KVALITY

Externá kontrola kvality sa realizuje v spolupráci s príslušným referenčným pracoviskom, alebo účasťou v medzinárodných systémoch kontroly kvality. Významným ukazovateľom kvality pracoviska klinickej mikrobiológie je aj jeho akreditácia. Externá kontrola kvality (EQC) začína dorúčením špeciálnej testovacej sady vzoriek do laboratória, ktorých analýza sa uskutočňuje v rutinej prevádzke s ostatnými vzorkami štandardným spôsobom. Namerané výsledky kontrolnej vzorky sa zadajú online na webovej stránke dodávateľa externej kontroly kvality. V prípade potreby sa robia nápravné opatrenia, ktoré vyplývajú z vyhodnotenia EQC. Pracoviská klinickej mikrobiológie majú možnosť sa zapájať do riešenia vedecko-výskumných projektov aj medzinárodných aktivít, predovšetkým ESCMID (European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases), EUCAST, FEMS (Federation of European Microbiological Societies), ECDC (European Center Diseases Control), ISID, WHO a i.

³ Pôvodným cieľom vytvorenia skupín súvisiacich s diagnózou (Diagnosis-related group - DRG) bolo vyvinúť klasifikačný systém, ktorý identifikuje „produkty“ (diagnostické a liečebné postupy, lieky, pomôcky...), ktoré boli pacientovi v spojení s jeho diagnózou v rámci diagnostiky a liečby v konkrétnom zdravotníckom zariadení poskytnuté. Od zavedenia DRG na začiatku 80. rokov v zdravotníctve USA sa systém vyvíjal na základe potreby klasifikácie pacientov na vyššej úrovni sofistikovanosti a presnosti. Na splnenie týchto vyvíjajúcich sa potrieb sa cieľ systému DRG musel rozšíriť. Dnes už vo existuje niekoľko rôznych DRG systémov, ktoré sa stále dopĺňajú, resp. sa vyvíjajú nové.

AKREDITÁCIA

Akreditácia je nestranné a nezávislé posúdenie a osvedčenie spôsobilosti subjektu akreditačnou autoritou o tom, že subjekt je spôsobilý vykonávať činnosti špecifikované v osvedčení a trvalo plniť požiadavky spôsobilosti určené príslušným normatívnym dokumentom. Akreditácia – aj preto, že sa vykonáva nezávisle a nestranne – sa považuje za hlavný faktor dôveryhodnosti a správnosti výsledkov činnosti akreditovaného subjektu, čo je dôvod, pre ktorý má byť využitá na posudzovanie a na hodnotenie všetkých činností, od výsledkov ktorých spoločnosť očakáva vysoký stupeň správnosti a dôvery.

V garancii správnosti výsledkov sa môžu laboratória oprieť o vykonávanie pravidelnej internej (IQC) a externej kontroly kvality (EQC). Povinnosť vykonávať pravidelné merania IQC a EQC vyplýva z dodržiavania pravidiel správnej laboratórnej praxe a je základným predpokladom pre udelenie osvedčenia o akreditácii pre laboratórium. Interná kontrola kvality slúži na kontinuálnu revíziu správnosti a presnosti merania. V procese externej kontroly kvality preukazuje laboratórium nadväznosť svojich výsledkov merania jednotlivých parametrov na medzinárodné štandardy.

Väčšina slovenských mikrobiologických laboratórií je akreditovaných Slovenskou národnou akreditačnou službou (SNAS) podľa medzinárodne platnej normy ISO 15189.

VÝHODY AKREDITOVANÉHO LABORATÓRIA

Rozdiel medzi akreditovanými a neakreditovanými laboratóriami, ktoré sú certifikované systémom kvality ISO 9001, spočíva predovšetkým v nárokoch kladených na dôkladnejšie mapovanie a sledovanie všetkých procesov v laboratóriu (predanalytická fáza, samotná analýza, postanalytická fáza). Všetky

procesy v akreditovanom laboratóriu sú preto podrobne zdokumentované. Výhod je však oveľa viac:

- zavedenie kvalitného systému internej a externej kontroly kvality,
- prístroje validované servisnými a metrologickými autoritami,
- používanie výlučne certifikovaných reagencií, kalibrátorov a kontrolných materiálov,
- kvalifikovaný personál,
- laboratórium má stanovené ciele kvality a je povinné sa v zmysle normy neustále zlepšovať v prospech pacienta a lekára,
- kompetitívna výhoda pracoviska v uzatváraní zmluvných vzťahov so zdravotnými poisťovňami.

Akreditované pracoviská sú pravidelne kontrolované počas dohľadových návštev akreditačných orgánov (SNAS), ktoré sa vykonávajú najmenej raz ročne. Osvedčenie o akreditácii sa udeľuje na obdobie 4 – 5 rokov, v závislosti od toho, či ide o novoakreditovaný subjekt alebo reakreditáciu. Akreditované pracoviská sú zárukou maximálnej spoľahlivosti a presnosti.

LITERATÚRA

1. Úrad verejného zdravotníctva SR. Slovenský národný systém sledovania antibiotickej rezistencie (SNARS; *Slovak National Antimicrobial Resistance Surveillance System*) <https://www.snars.sk/>
2. Výnos MZ SR č. 09812/2008-OL z 10. septembra 2008 o minimálnych požiadavkách na personálne zabezpečenie a materiálno-technické vybavenie jednotlivých druhov zdravotníckych zariadení.
3. Koncepcia v odbore klinická mikrobiológia. Vestník Ministerstva zdravotníctva Slovenskej republiky, roč. 54, 2006, čiastka 54-55.

ÚLOHY A PÔSOBNOSŤ KLINICKEJ MIKROBIOLÓGIE V RÁMCI LIEČEBNO-PREVENTÍVNEJ STAROSTLIVOSTI A KOMUNIKÁCIA S OSTATNÝMI KLINICKÝMI ODBORMI

Líšková A.



Klinická mikrobiológia je samostatný interdisciplinárny medicínsky odbor, ktorý na základe poznatkov z mikrobiológie, infektológie, klinickej imunológie a alergológie, pediatrie, epidemiológie, vnútorného lekárstva, dermatovenerológie, laboratórnej diagnostiky, genetiky, chirurgických odborov, pracovného lekárstva a z prírodných, sociálnych a technických vied zabezpečuje laboratórnu diagnostiku, objasňuje etiológiu a patogenézu ochorení mikrobiálnej etiológie a imunopatologických stavov súvisiacich s prítomnosťou mikroorganizmov na slizniciach kože a vnútorných orgánoch pacienta.

Výstupy laboratórnych analýz sú podkladom pre racionálnu terapiu a prevenciu vyššie menovaných ochorení. Významne stúpa počet ochorení, ktoré vyvoláva alebo sa na ich vzniku podieľa mikrobiálna infekcia. Objavujú sa nové mikroorganizmy patogénne pre človeka, ako aj mikroorganizmy, ktorých zmenené biologické vlastnosti sú predpokladom zvýšenia patogenity a vzniku odolnosti voči dosiaľ účinnej antiinfekčnej liečbe. Antimikrobiálna rezistencia sa stáva závažným problémom hlavne u nemocničných patogénov.

Hlavnou náplňou odboru klinická mikrobiológia je vykonávanie komplexnej mikrobiologickej diagnostiky na objasnenie etiológie mikrobiálnych ochorení, stanovenie kauzálnej antimikrobiálnej liečby, prípadne odporúčenie imunomodulačnej terapie pacientov. Prispieva k účinnej prevencii vzniku, rozvoja a šírenia sa mikrobiálnych ochorení, vrátane skúmania možných rizík nosičstva mikrobiálnych pôvodcov.

Štandardné postupy v klinickej mikrobiológii tvoria integrálnu súčasť štandardov klinických odborov, najmä s ohľadom na indikáciu mikrobiologického vyšetrenia ako súčasť diferenciálnej diagnostického postupu a interpretácii výsledkov vyšetrení vrátane konzultácie racionálnej terapie.

Činnosť odboru klinickej mikrobiológie:

- spolupráca a konzultačná činnosť pre všetky odbory medicínskej praxe,
- organizovanie a rozvíjanie bázy odborných pracovísk v súlade s koncepciou odboru,
- rozvíjanie vedecko-výskumnej činnosti na špecializovaných pracoviskách a aplikácia nových poznatkov a moderných diagnostických postupov v rutinej aj špecializovanej praxi,

- spolupráca s ostatnými medicínskymi a vednými odbormi, s odbornými a profesijnými organizáciami, orgánmi verejnej správy v diagnostike, liečbe, prevencii a posudzovaní chorôb mikrobiálnej etiológie, spolupráca s úradmi verejného zdravotníctva.

Zdravotnícki pracovníci laboratórií klinickej mikrobiológie poskytujú výsledky laboratórnych vyšetrení, ktoré slúžia na vytvorenie surveillancie vybraných infekčných ochorení v súlade s prioritami výkonu politiky verejného zdravia.

Pracovisko mikrobiológie **hlási infekčné choroby podliehajúce hláseniu príslušnému regionálnemu úradu verejného zdravotníctva**. Zdravotnícki pracovníci klinickej mikrobiológie:

- neodkladne hlásia príslušným regionálnym úradom verejného zdravotníctva epidemiologicky závažne mikrobiologické nálezy,
- zúčastňujú sa svojim členstvom na činnosti Komisií pre racionálnu antiinfekčnú liečbu a antibiotickú politiku a Komisií pre riešenie nozokomiálnych nákaz,
- pripravujú podklady pre surveillancie a kontrolu rezistencie voči antibiotikám pre Národné referenčné centrum pre sledovanie antibiotickej rezistencie na Úrade verejného zdravotníctva SR,
- laboratórne potvrdzujú pôvodcov nozokomiálnych infekcií, ktoré sú prostredníctvom zamestnancov regionálnych úradov verejného zdravotníctva hlásené do centrálnej databázy Regionálneho úradu verejného zdravotníctva v Banskej Bystrici.

Špecializované pracoviská klinickej mikrobiológie **sa podieľajú na významných celospoločenských programoch rozvoja a ochrany zdravia** ako sú kardiovaskulárny program, onkologický program, imunizačný program, program PHARE. Podieľajú sa na vedecko-výskumnej činnosti v oblasti patogenézy, diagnostiky, terapie a prevencie mikrobiálnych ochorení a uplatňovaní jej výsledkov v medicínskej praxi v regionálnych, celoštátnych a medzinárodných programoch Európskej únie a programoch organizovaných a garantovaných ESCMID (European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases) a ESCV (European Society of Clinical Virology).



Predný J.

Asepsa. Epidemiologické aspekty pracoviska mikrobiologického laboratória. Prevencia a kontrola kontaminácie prostredia na mikrobiologických pracoviskách



Mikrobiologické pracoviská predstavujú **prostredie s vysokou biologickou záťažou** v zmysle možností prieniku patogénnych mikroorganizmov a ich šírenia. Hrozí tak vysoké riziko **vzniku infekcie personálu** na jednej strane, a na druhej strane hrozí riziko **kontaminácie priestorov a predmetov**.

Vyšetrovaný biologický materiál môže obsahovať aj infekčné mikroorganizmy, ktorých prítomnosť sa nemusela u pacienta doteraz klinicky manifestovať (napríklad HIV, HCV) a pri odbere sa na ne nemyslelo. Každý biologický materiál je preto treba považovať za potenciálne nebezpečný pre zdravie pracovníkov v laboratóriu. Je preto nevyhnutné striktne dodržiavať pravidlá bezpečnosti pri práci, a to bez ohľadu na predpokladaného pôvodu ochorenia.

Riziko kontaminácie priestorov, predmetov, diagnostík, aj samotného biologického materiálu predstavuje každodenná manipulácia so vzorkami od osôb s podozrením na infekciu alebo od osôb s už prebiehajúcim infekčným ochorením, práca s kultúrami mikroorganizmov alebo ich molekulárnymi štruktúrami. Tieto štruktúry, ako sú nukleové kyseliny, enzýmy (napr. nukleázy), antigény (napr. HBsAg a pod.), predstavujú riziko nežiaducej biotickej kontaminácie, ktorá môže tiež ovplyvniť prácu a výsledky na pracovisku. Zdrojom mikrobiologickej kontaminácie vzoriek a prostredia môžu byť nielen prítomné osoby, vyšetrované vzorky a naočkované médiá, ale aj zamorenie priestorov organizmami (infestácia – zamorenie priestorov inváznymi druhmi) alebo práca s nimi (laboratórne zvieratá).

1.6.1 Asepsa a aseptická technika

Poskytovatelia zdravotnej starostlivosti pri svojej špecifickej práci musia na zabránenie možného iatrogénneho poškodenia zdravia alebo až smrti pacienta používať aseptickú techniku. **Asepsa je súbor opatrení, ktorými pri zdravotníckych výkonoch bránime prístupu alebo zaneseniu mikroorganizmov do otvorených rán, alebo do telových dutín organizmu, na vzorky, zdravotnícky materiál a pomôcky. Asepsa neznamená sterilita**, používanie sterilných pomôcok je len súčasťou aseptických techník. Takisto si treba uvedomovať rozdiel medzi výrazmi asepsa a antisepsa. **Aseptická technika** teda znamená používanie postupov a mechanických prostriedkov na zabránenie prenosu mikroorganizmov na pacienta alebo predmet výkonu (biologickú vzorku, transplantát, liečivo a pod.). Obdobné zásady platia aj pri laboratórnej práci. Zahŕňajú uplatnenie najprísnejších pravidiel na minimalizáciu rizika infekcie alebo kontaminácie. Úroveň asepsy musí zodpovedať rizikám spojeným s daným typom zdravotníckeho výkonu alebo predmetu činnosti.

Hlavné aspekty aseptického prostredia v laboratóriu sú: **bariéry (pomôcky alebo zariadenia), príprava vzoriek a materiálu, organizácia práce a zaškolenie personálu, environmentálne opatrenia, kontroly a pokyny**.

BARIÉRY

Bariéry chránia pacienta, zdravotníckeho pracovníka alebo vzorky pred vzájomným prenosom patogénov a kontamináciou z prostredia. Bariéry používané v aseptickú techniku zahŕňajú:

- sterilné nástroje a pomôcky,
- sterilné alebo dekontaminované rukavice,
- sterilný alebo dezinfikovaný odev,
- masky alebo štít pre personál, resp. aj pacienta (odber vzorky).

Sterilné bariéry sú tie, ktoré boli efektívne vysterilizované a ktoré sa nedotkli kontaminovaného povrchu. Sú to špeciálne dekontaminované a zabalené predmety a pomôcky. Zdravotnícki pracovníci ich umiestňujú alebo používajú spôsobmi, ktoré minimalizujú ich expozíciu mikróbov až do momentu ich cieľového použitia a následne po použití sú už zohľadňované ako kontaminované.

PRÍPRAVA PERSONÁLU A MATERIÁLU NA DIAGNOSTIKU

Poskytovatelia zdravotnej starostlivosti používajú pri práci sterilné zariadenia a sterilné nástroje, pričom činnosť vykonávajú podľa schválených predpisov a v súlade so zaškolením. Pracovníci pred výkonom a po ňom aplikujú čistiacu a mikrobicídnu prípravku na pokožku (antiseptikum). Všetky diagnostiká sú pred použitím sterilné. Spracovanie biologických vzoriek, izolovaných kultúr a manipulácia s mikroorganizmami musí byť proces, v ktorom sú jednotlivé pracovné kroky rozdelené a cielene preušované tak, aby sa v každom nasledujúcom kroku vytvorila sterilná bariéra (vypaľovanie bakteriologickej kľučky, výmena pipetovacej špičky, ihly alebo pinzety za ďalšiu sterilnú pomôcku a pod.)

KONTROLA PROSTREDIA A ORGANIZÁCIA PRÁCE

Základom environmentálnej kontroly je pravidelná dekontaminácia, ktorou sa vytvorí aseptické prostredie. Udržanie aseptického prostredia si vyžaduje, aby boli počas prevádzky priestory pre jednotlivé činnosti primerane oddelené alebo uzatvorené. Prítomný by mal byť iba potrebný zdravotnícky personál. Čím viac ľudí je prítomných, tým vzniká viac príležitostí pre kontamináciu mikroorganizmami. Zároveň treba v laboratórnych diagnostických postupoch zabezpečiť, aby sa z hľadiska asepsy každý výkon nekončil len získaním výsledku analýzy, ale najmä bezprostredným odstránením kontaminovaných pomôcok a dekontamináciou pracovného prostredia. Opačný príklad je nekontrolované odkladanie biochemických testacích prúžkov, napr. na dôkaz oxidázy, voľne na pracovný stôl a mnoho ďalších zlozvykov.

POKYNY PRE KONTAKT S OSOBAMI, VZORKAMI, POMÔCKAMI

Keď majú poskytovatelia zdravotnej starostlivosti na sebe odev a prostriedky, ktoré predstavujú bariéry (sterilné/dekontaminované), mali by sa dotýkať len iných dekontaminovaných položiek. Kontakt s infekčným a kontaminovaným materiálom musí byť nepriamy a vždy pod kontrolou jednotlivých zúčastnených osôb. Jeho spracovanie by malo byť prednostne vykonávané v bezpečných uzatvorených systémoch (napr.

laboratórne analyzátory). Pracovníci by sa za každú cenu mali vyhnúť necielenému priamemu dotyku s nesterilnými povrchmi a predmetmi. **Jednotlivé pracovné kroky práce musia byť logicky zoradené tak, aby striktné oddeľovali pracovné pole na aseptických a kontaminovaných častí a nedochádzalo k ich vzájomnému skríženiu.** Uvedené zásady asepsy sú principiálne pre metodické a pracovné algoritmy *lege artis*, a to tak v mikrobiológii, ako aj v medicíne celkovo.

1.6.2 Epidemiologické a hygienické aspekty prevádzky mikrobiologického pracoviska



Príčinou, že sa mikróby uplatnia pri infekcii alebo kontaminácii v rámci mikrobiologického pracoviska, je väčšinou nedodržanie správnych laboratórnych postupov, aseptickkej techniky alebo prevádzkových nedostatkov v hygienickom režime daného pracoviska. Podmienkou správne zvolených režimových opatrení pri ochrane zdravia osôb je poznať potenciálne články epidemického procesu, ktorý môže v laboratóriách nastať, správne ich identifikovať a obmedziť tak riziká na konkrétnom pracovisku.

Vo všeobecnosti platí, že **prvý článok možného epidemického procesu pri vzniku laboratórnej nákazy predstavujú samotné mikroorganizmy** s charakteristickými vlastnosťami, ktoré sa tam s materiálom dostávajú, resp. sa s nimi pracuje. Tie majú určité mikrobiologicko-epidemiologické charakteristiky, ktoré v celom rozsahu určujú zásady práce na danom pracovisku. Jedným zo základných režimových opatrení, ktoré vychádza práve z charakteristík mikróbov, ktorých prítomnosť sa predpokladá vo vyšetrovaných vzorkách, je kategorizácia pracoviska podľa stupňa biologického rizika, do ktorého bolo dané mikrobiologické pracovisko zaradené. **Pri kategorizácii pracoviska podľa biologického rizika ohrozenia zdravia (angl. biosafety level, BSL) sa musí zohľadniť pravdepodobnosť šírenia mikroorganizmov, ktoré môžu byť v spracovávaných biologických vzorkách, spôsob ich prenosu, ich patogenitu, virulenciu, citlivosť resp. rezistenciu voči antimikrobiálnym látkam a dekontaminačným prostriedkom, kontagiozitu ochorenia (mieru individuálneho rizika a riziko pre komunitu), možnosti prevencie a liečby nimi vyvolávaných infekcií.** Na základe toho je dané pracovisko povinné mať príslušné priestorové umiestnenie, členenie, technické vybavenie (napr. vlastné elektrické generátory, hermetické uzávery, vzduchoventiláčne zariadenie s vysokoúčinnými HEPA filterami, usmernené prúdenie a pretlak vzduchu) a režim (hygienické slučky, uzavretú dekontamináciu a likvidáciu odpadu, určený spôsob a prostriedky na dekontamináciu plôch a predmetov, vrátane priestorových germicídnych UV žiaroviek a pod.). Napríklad pri manipulácii s biologickým materiálom pri predpokladanej príónovej nákaze sa odbery a ďalšie spracovanie odobratého materiálu musia vykonať v rukaviciach, jednorazovými ihlami, po odbere a spracovaní vzoriek sa tieto spolu s vatou, gázou a ostatnými pomôckami musia ponoriť na 2 hodiny do roztoku 1N NaOH, alebo 5 % NaOCl, následne použiť proteolytický enzým (proteínáza K) a až potom sterilizovať v autokláve. Takýto špecifický postup dekontaminácie na určitých zdravotníckych pracoviskách (príónové laboratórium, ale aj neurochirurgické oddelenia) sa vyžaduje práve pre neobvykle vysokú rezistenciu príónov voči všetkým dekontaminačným postupom, vďaka ktorej odolávajú štandardným postupom dezinfekcie a sterilizácie.

Podľa BSL kategórie daného laboratória musí mať byť k dispozícii vhodné materiálne vybavenie (laminárne boxy, prechodové sterilizátory, skafandre s pretlakom vzduchu a iné). Klasifikácia určuje aj vzdelanie personálu a zodpovednosť za riadenie pracoviska, určuje pravidlá vstupu na pracoviská, algoritmy pracovných postupov, určuje ako materiál, médiá a pomôcky vstupujú a opúšťajú pracoviská a všetky bezpečnostné

postupy v prípade mimoriadnych udalostí (havária, únik infekčného aerosólu a iné).

Ďalšie články možného epidemiologického procesu predstavujú zdroje infekcie, **rezervoáre (pramene pôvodcov), teda biotické a abiotické systémy v ktorých sa pôvodca dokáže rozmnožovať, spôsob a faktory prenosu týchto mikroorganizmov.** Rezervoáre sú napr. biologický materiál, pacient (pri odberoch vzoriek na PKM), asymptomatický nosič v rámci personálu, zvieratá alebo hmyz a pod. Predstavujú zdroje uvoľňovania faktoru prenosu mikroorganizmov (vehikula), napr. aerosólu. Aerosóly môžu vzniknúť jednak z fyziologických produktov, vylučovaných organizmom (kýchanie, reč a pod.), ale aj pri práci, napr. pri vyfukovaní pipety alebo pri centrifugácii tekutého materiálu v skúmavkách, pri kontakte vyšetrovaného materiálu s horúcou bakteriologickou kľučkou, pri rozbití sklenených nádob alebo pri nasávaní alebo vystrekovaní obsahu injekčnej striekačky. Osobitnú pozornosť si zaslúži manipulácia so sérom a krvou pacienta (hemokultivácia, sérologické vyšetrovacie metódy). V tomto prípade vyšetrovaný materiál predstavuje potenciálny faktor prenosu pôvodcov nebezpečných a vysoko virulentných vírusov (napríklad vírusy hemoragických horúčok). Hrozí aj inokulácia do kože a podkožia pri pichnutí sa ihlou, poranení úlomkom skla, či poškriabnutí alebo pohryznutí laboratórnym zvieratom. Niektorí pôvodcovia ochorení môžu preniknúť aj cez drobné, nenápadné poškodenia kože alebo cez konjunktívy. Aby taká situácia nevznikla, je potrebné vylúčiť riziká, napr. zabrániť prítomnosti nekvalifikovaných osôb v prevádzke, nosiť predpísané osobné ochranné prostriedky (OOP) a funkčne bezchybný ochranný odev, dodržiavať asepsu a predpísané pracovné postupy. Na mikrobiologických pracoviskách môžu pracovať iba osoby, ktoré sú jednak imunokompetentné, jednak poznajú a striktné dodržiavajú zásady práce s infekčným materiálom. Platí tam zákaz práce pre tehotné ženy. Za mimoriadne nebezpečné sa považuje porušovanie základných predpisov, ako je zanedbanie správnej dekontaminácie schválenými postupmi, vkladanie alebo vyberanie kontaktných šošoviek z očí, jedenie, pitie, maľovanie tváre a nanášanie rúžu na pery, fajčenie, ponechávanie otvorených či nezabezpečených nádob a pomôcok s kultúrami mikroorganizmov voľne na stoloch a iné nezodpovedné konanie v laboratóriu.

Príklad úspešného systémového riešenia prevencie rizika poranenia a kontaminácie bolo postupné nahradenie permanentných pomôcok zo skla a kovu, ktoré sa v širokej miere používali v minulosti (napr. opakovane sterilizované sklenené Petriho misky, skúmavky, pipety, ihly a striekačky) jednorazovými plastovými pomôckami, alebo aj zavedenie uzatvorených laboratórnych systémov v podobe plnoautomatických analyzátorov.

Konečným článkom epidemického procesu je **vnímavý organizmus**, teda najmä personál laboratória. Pri tomto článku sa okrem **nešpecifickej prevencie**, napr. nosením osobných ochranných prostriedkov snažíme pomocou špecifickej prevencie znížiť jeho vnímavosť voči infekciám. Dobrým príkladom realizácie účinnej špecifickej prevencie pri laboratórnej práci je povinné očkovanie všetkých zdravotníckych pracovníkov proti hepatitíde typu B a sledovanie protektívnych hladín príslušných špecifických protilátok. Riadne zaočkovaný zdravotnícky pracovník je tak chránený pred vírusovou hepatitídou typu B, ktorá bola v minulosti najčastejšie prenášanou laboratórnou infekciou. Podobne sa pri pracovníkoch v laboratóriách klinickej mikrobiológie musí zaisťovať imunizácia proti TBC, a to ešte pred ich nástupom na pracovisko. Rozšírenie očkovania, resp. preočkovania zdravotníckych pracovníkov vychádza jednak zo zaradenia pracoviska do kategórie podľa BSL klasifikácie a podľa aktuálnej epidemiologickej situácie (ohnisko nákazy, napr. osýpok, v spádovej oblasti).

V laboratóriu je dôležité aj dodržiavanie protipožiarnych zásad, nakoľko pri práci v mikrobiologickom laboratóriu sa používa celý rad horľavín a výbušných látok (lieh, acetón) a vykonáva sa pravidelná práca s ohňom (vypaľovanie bakteriologických kľučiek, fixácia preparátov plameňom a pod). Personálu pri

práci hrozí expozícia rôznymi chemickými a fyzikálnymi faktormi – dráždivými a toxickými, napr. formalín, fenol, prášok akrylamidu na prípravu elektroforetických gélov (je neurotoxický), karcinogénnymi látkami (interkalačné a iné farbivá), žiarenie a tepelné sálenie (UV, horúce médiá a pod.). Bezpečnostné opatrenia v mikrobiologickom laboratóriu musia zahŕňať pravidelné kontroly elektrických rozvodov (el. zásuviek), správnu manipuláciu a uskladnenie plynových fliaš (CO₂, N₂), ako aj správnu obsluhu tlakových nádob (autoklávy), to všetko vrátane zaškolenia personálu. Dodržaním spomínaných zásad práce sa zabezpečí ochrana personálu (prevencia poranenia kontaminovaným predmetom alebo poškodenie kožného krytu, priameho kontaktu s infekčným a chemickými agens, ich vdýchnutiu, prehĺtnutiu) a rovnako sa zabezpečí aj ochrana vzoriek, priestorov a pomôcok pred nežiaducou kontamináciou.

Rozhodujúce je aj profesionálne správanie sa personálu, jeho technická zručnosť a zodpovedný prístup. Je potrebné zdôrazniť, že na vznik poranenia má okrem neskúsenosti a nešikovnosti vplyv aj psychika zdravotníckeho pracovníka. Medzi významné psychické faktory patrí únava, neustály tlak na zvyšovanie pracovného výkonu a súvisiaci s vysokou mierou zodpovednosti za závažné následky v prípade omylu a iné. Nemožno vylúčiť ani alkoholovú či liekovú závislosť, ale aj syndróm vyhorenia.

1.6.3 BSL klasifikácia mikroorganizmov do skupín podľa biologického rizika

ÚROVEŇ 1 BIOLOGICKEJ BEZPEČNOSTI



Táto úroveň je vhodná pre prácu s dobre charakterizovanými druhmi mikroorganizmov, o ktorých nie je známe, že vyvolávajú ochorenie u zdravých dospelých ľudí a predstavujú minimálne potenciálne riziko pre pracovníkov laboratória a životné prostredie.

Zahŕňa väčšinu druhov baktérií a vírusov, ktoré ani pre inak zdravého človeka, ani pre iné organizmy nepredstavujú zdravotné riziko. Bola sem zaradená väčšina druhov mikroorganizmov, vrátane **nepatogénnych sérotypov *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae*** a pod., ako aj bunkové kultúry bez infekčných agens, fixované preparáty a **rekombinantná DNA**. Na tejto úrovni sú preventívne opatrenia s ohľadom rizika práce s biologicky nebezpečným materiálom minimálne. Požadované sú rukavice a určitá ochrana tváre, kompaktný účes, biely plášť, dlhé nohavice, uzatvorená nepremokavá obuv. Laboratórium nie je nevyhnutne oddelené od ostatných priestorov v budove nad rámec bežného členenia pracovných priestorov, resp. sociálnych priestorov a komunikácií. Práca sa zvyčajne vykonáva na otvorených stoloch s použitím štandardných mikrobiologických postupov. Dekontaminačné postupy pre túto úroveň sú preventívnym opatreniam proti bežným mikroorganizmom (t.j. umývanie rúk antibakteriálnym mydlom, dekontaminácia všetkých exponovaných povrchov laboratória dezinfekčnými prostriedkami atď.). Zvyčajne sú kontaminované materiály uskladnené v otvorených (ale oddelene označených) nádobách na odpad a pri ich likvidácii sa všetky materiály použité na kultiváciu buniek a/alebo baktérií buď dekontaminujú pomocou autoklávy (stáva si z nich komunálny odpad), alebo sa v nepremokavých a uzavretých obaloch vyvážajú do spaľovne. Laboratórny personál má špecifickú odbornú prípravu v laboratórnych postupoch, vykonávaných v mikrobiologickom laboratóriu a je pod dohľadom VŠ vzdelanej osoby v oblasti mikrobiológie alebo príbuzných vied. Vzhľadom na pomerne jednoduchú a bezpečnú prevádzku a údržbu laboratória BSL-1 sú to typy laboratórií, ktoré sa vo všeobecnosti používajú ako výučbové priestory pre stredné školy a vysoké školy.

ÚROVEŇ 2 BIOLOGICKEJ BEZPEČNOSTI

Táto úroveň je podobná úrovni 1 pre biologickú bezpečnosť a je vhodná pre prácu s agens mierneho, resp. potenciálneho

nebezpečenstva pre personál a životné prostredie. Platí pri ňom mierne individuálne riziko a nízke riziko pre komunitu. Ide o patogény, ktoré môžu spôsobiť ochorenie ľudí alebo zvierat, ale je nepravdepodobné, že by vážne ohrozili personál laboratória, komunitu, domáce zvieratá alebo životné prostredie. Laboratórne expozície (rezné poranenie, vpich, vniknutie do spojkového vaku) môžu síce spôsobiť vážnu infekciu, ale sú dostupné účinné liečebné a preventívne opatrenia a riziko šírenia infekcie je významne obmedzené.

Zahŕňa rôzne **baktérie, vírusy, parazity a huby, ktoré sa vôbec alebo len ojedinele prenášajú prostredníctvom aerosólu v laboratóriu, ako je *C. difficile*, väčšinu humánne patogénnych chlamýdií (okrem *Ch. psittaci*) a mykoplazmiem, *B. burgdorferi sensu lato*, *Salmonella* spp., MRSA a VRSA, vírusy hepatitíd A, B a C, chrípka A, vírus parotitídy, vírus osýpok, HIV, scrapie príón, *Plasmodium falciparum* a *Toxoplasma gondii*** a podobne.

BSL-2 sa líši od BSL-1 tým, že:

1. Pracovníci laboratória majú špecifickú odbornú prípravu na zaobchádzanie s patogénnymi mikroorganizmami a prácu riadia buď vedci s pokročilým vzdelaním, alebo lekár, resp. laboratórny diagnostik s absolúvanou špecializačnou prípravou.
2. Prístup do laboratória je obmedzený, riadený a kontrolovaný.
3. Vykonávajú sa osobitné preventívne opatrenia pri práci s kontaminovanými ostrými predmetmi.
4. Určité postupy, pri ktorých sa môžu vytvárať infekčné aerosóly alebo hrozí kontaminácia osôb, sa vykonávajú v laminárnych boxoch alebo inom fyzicky uzatvorenom priestore.

ÚROVEŇ 3 BIOLOGICKEJ BEZPEČNOSTI

Táto úroveň platí pre klinické, diagnostické, výučbové, výskumné alebo výrobné zariadenia, v ktorých sa vykonávajú práce s endemickými alebo exotickými agens, ktoré môžu po inhalácii spôsobiť vážne alebo potenciálne smrteľné ochorenie. Platí tu vysoké individuálne riziko, nízke riziko pre komunitu. Pracuje sa tu s patogénmi, ktorý zvyčajne spôsobujú vážne ochorenie človeka alebo zvierat, ale zvyčajne sa z jedného infikovaného jedinca na druhého nešíria. Existuje účinná liečba novej infekcie a k dispozícii sú aj účinné preventívne opatrenia. Táto skupina zahŕňa rôzne baktérie, parazity a vírusy, ktoré **môžu spôsobiť ťažké až smrteľné ochorenie u ľudí, pre ktoré ale existuje liečba, ako sú *Mycobacterium tuberculosis* komplex, *Bacillus anthracis*, *Chlamydia philly psittaci*, *Salmonella typhi*, *Coxiella burnetii*, *Rickettsia rickettsii*, *Leishmania donovani*, vírus West Nile, vírus venezuelskej konskej encefalitídy, vírus východnej konskej encefalitídy, koronavírus SARS, vírus horúčky Rift Valley a vírus žltej zimnice**.

Pracovníci laboratória majú špecifickú odbornú prípravu na zaobchádzanie s patogénmi a pôvodcami potenciálne smrteľného ochorenia a sú pod dohľadom príslušných odborníkov, ktorí majú skúsenosti s prácou s týmito agens.

Všetky postupy zahŕňajúce manipuláciu s infekčným materiálom sa vykonávajú v laminárnych boxoch, špeciálne navrhnutých digestoroch alebo v iných uzavretých zariadeniach a vykonávajú ich pracovníci, ktorí nosia a používajú vhodný osobný ochranný odev a ochranné prostriedky. Laboratórium má špecifické technické a vzduchovo-ventilačné vybavenie a priestorovo – konštrukčné riešenie. Na úrovni biologickej bezpečnosti 3 je vetranie do laboratória usmernené tak, aby umožňovalo prúdenie vzduchu smerom do miestnosti, prefiltrovaný vzduch z laboratórnej miestnosti sa odvádza a vypúšťa do vonkajšieho prostredia. V nich sa vykonávajú štandardné alebo špeciálne mikrobiologické postupy a počas práce je vstup do laboratória obmedzený. Niektoré existujúce zariadenia nemusia mať všetky ochranné riešenia a zariadenia odporúčané pre úroveň biologickej bezpečnosti 3 (napr. prístupová zóna s dvojítmymi dverami a uzavreté prestupy). Aj za týchto okolností sa môže dosiahnuť prijateľná úroveň bezpečnosti pri vykonávaní rutinných postu-

pov (napr. diagnostické postupy zahŕňajúce kultiváciu mikroorganizmov na identifikáciu, typizáciu, testovanie citlivosti atď.). Rozhodnutie o vykonaní tejto zmeny odporúčaní na úrovni biologickej bezpečnosti 3 vykoná len riaditeľ zariadenia, resp. inštitúcie.

ÚROVEŇ 4 BIOLOGICKEJ BEZPEČNOSTI

Táto úroveň je potrebná pre prácu s nebezpečnými a exotickými patogénmi, ktoré predstavujú vysoké riziko laboratórnych infekcií prenášaných aerosólmi. Platí tu vysoké individuálne riziko a vysoké riziko pre komunitu. Sú to patogény, ktoré zvyčajne spôsobujú vážne ochorenie človeka alebo zvierat a môžu byť ľahko prenášané z jedného jedinca na druhého priamo alebo nepriamo. Účinná liečba a preventívne opatrenia nie sú zvyčajne k dispozícii (nie sú k dispozícii účinné lieky a očkovacie látky). Patria sem **vírusy bolívijskej a argentínskej hemoragickej horúčky, vírus Marburg, vírus Ebola, vírusy horúčok Lassa, hemoragickej horúčky krymsko-konzskej, vírus Hendra, vírusy Nipah, vírus pravých kiahní a rôznych ďalších hemoragických infekcií.**

Laboratóriá na úrovni bezpečnosti 4 sú buď v samostatnej budove, alebo v kontrolovanom priestore budovy, ktorý je hermeticky izolovaný od všetkých ostatných častí budovy. Stavebné riešenie a členenie, rovnako a spätné prúdenie vzduchu zabezpečujú, že aj pri náhodnom vzniknutí infekčného aerosólu účinne zabráni úniku patogénov do prostredia. Vstup a výstup úrovne 4 BSL zahŕňa viac spŕch, vysávač, germicídne žiariče a ďalšie bezpečnostné opatrenia určené na zničenie všetkých rezíduí patogénov, ktoré predstavujú biohazard (biologické nebezpečenstvo). Majú zabudované viaceré vzduchové uzávery pre jednotlivé priestory, ktoré sú zabezpečené elektronicky, aby sa zabránilo súčasnemu otvoreniu oboch dvier.

Postupuje sa striktnie podľa špeciálnej príručky kvality a prevádzkových pravidiel. Vedú ich kvalifikovaní vedci, ktorí sú vyškolení a skúsení v práci s týmito patogénmi. Členovia laboratória majú špecifickú a dôkladnú odbornú prípravu pri zaobchádzaní s mimoriadne nebezpečnými infekčnými agens. Všetky postupy pri práci s ním, štandardné aj špeciálne, sa vykonávajú v laminárnych boxoch a uzavretých bioboxoch s nasávacími rukavicami v jednotlivých celotelových oblekoch s pretlakom vzduchu resp. skafandroch. Pri zaobchádzaní s biologickými faktormi na tejto úrovni je povinné použitie obleku s pozitívnym pretlakom vzduchu s oddeleným prívodom vzduchu na dýchanie. Prístup do laboratória je prísne kontrolovaný riaditeľom laboratória.

Všetky – aj letecké – zásielky biologického materiálu a dávky vody prechádzajúce a odchádzajúce z laboratória biologickej bezpečnosti úrovne 4, sú podrobené účinným dekontaminačným postupom tak, aby sa eliminovala možnosť náhodného šírenia infekčného agens.

Patogénne mikroorganizmy s podobnými vlastnosťami alebo identickým antigénnym zložením ako patogény úrovne 4 biologickej bezpečnosti sú skúmané na tejto úrovni dovtedy, kým sa nedosiahnu dostatočné poznatky buď na potvrdenie nevyhnutnosti pokračovať v práci na tejto úrovni, alebo možnosti preradiť ich na ďalšiu prácu na nižšej úrovni BSL. Treba na záver dodať, že mikrobiologické laboratórium tejto úrovne zatiaľ na Slovensku nemáme.

1.6.4 Zásady bezpečnosti práce na pracovisku klinickej mikrobiológie

Pri práci v infekčnom prostredí dodržiavame hygienický režim pre dané pracovisko.

- Ochranný odev používame výlučne v priestoroch infekčného pracoviska. Pri práci s mimoriadne virulentnými mikroorganizmami používame ďalšie ochranné prostriedky: rukavice, rúšku, čapicu, ochranný štít a pod. Na pracovisko neprinášame nepotrebné osobné predmety a nenesíme telesné ozdoby.

- V laboratóriu nikdy nepijeme a nejeme. Pri pipetovaní používame automatické pipety s jednorazovými sterilnými náradkami a uzavreté odsávačky.
- Použitie ihly sa odhadzuje do obalov s pevnými stenami, rovnako aj črepiny z prípadných rozbitých sklenených predmetov.
- Dôsledne dodržiavame pracovný postup a techniku, dbáme na rýchle a presné vykonanie všetkých úkonov. Nádobky s infekčným materiálom otvárame len na nevyhnutne dlhý čas, prácu zbytočne neprerušujeme a neopúšťame pracovné miesto bez jeho zabezpečenia (uzavretie a bezpečné uskladnenie spracovávaného materiálu, vypnutie plynových kahanov a pod.).
- Počas celého pracovného času, ako aj po skončení práce dôsledne dbáme na pravidelnú dezinfekciu pracoviska a pracovných predmetov (kľučky, pracovné stoly, podlahy a pod.).
- Na pracoviská s infekčným prostredím nemajú prístup tehotné ženy.
- Súčasťou bezpečnosti pri práci je aj trvalé udržiavanie poriadku a pravidelná dezinfekcia prostredia. Dezinfekciu ovzdušia zabezpečujú germicídne žiariče (UV). Na dekontamináciu uzavretých priestorov možno použiť aj pary formaldehydu alebo kyseliny peroxyoctovej, pričom pred vstupom osôb do týchto priestorov je nutné ich dokonalé odvetranie. Bežná (pravidelná) dezinfekcia zariadenia a pracovných stolov sa zvyčajne robí pomocou dezinfekčných roztokov (napr. 0,5 % Persteril, 1 – 3 % Chlóramín B, 1 % Dikonit alebo 0,5 – 3 % Incidur). Pracovné predmety sterilizujeme spôsobom vhodným pre materiál, z ktorého sú vyrobené.
- Po ukončení práce zabezpečíme likvidáciu ďalej nepotrebných vzoriek, kultúr a použitých pomôcok (najčastejšie autoklavovaním). Ruky si najprv umyjeme dezinfekčným prostriedkom (napr. 3 ml Spitadermu, 0,2 % Persterilu, 0,5 % Chlóramínu B, 1 % Jodonalu alebo 0,1 % Septonex tinktúry), ktorý necháme pôsobiť minimálne 1 minútu. Až potom si ruky umyjeme mydlom a opláchneme vodou.
- Pri rozliatí kultúry mikroorganizmov na nechránenom mieste (stoly, podlahy, termostaty, chladničky) postupujeme tak, že kontaminované miesto najprv dezinfikujeme aplikáciou vhodného dezinfekčného prostriedku, až po uplynutí požadovaného expozičného času priestor definitívne očistíme. Voľba dezinfekčného prostriedku závisí vždy od kontaminujúceho mikroorganizmu.

Postup pri rozliatí biologického materiálu:

- zvoliť dezinfekčný prostriedok s vírusinaktivačným účinkom v odporúčanej koncentrácii (napr. chlórový, aldehydový, peroxozlúčeniny, zlúčeniny s aktívnym kyslíkom a pod.),
- namočiť gázu alebo buničinu do dezinfekčného prostriedku so zvýšenou koncentráciou,
- položiť na znečistené miesto a nechať pôsobiť podľa odporúčaného návodu (zvyčajne 10 – 15 minút), môžeme použiť aj aplikáciu dezinfekčného roztoku vo forme aerosolu (sprej) a po uplynutí expozičnej doby vyčistiť papierovou utierkou,
- použitú gázu alebo utierku zlikvidovať ako infekčný odpad,
- umyť miesto bežným spôsobom,
- použiť odev, masku a hrubé gumené rukavice, ktoré je po skončení potrebné vydezinfikovať,
- umyť ruky po sňatí rukavíc (rukavice nenahrádzajú umytie rúk).
- Iným vhodným postupom je zasypanie rozliateho biologického materiálu granulovaným dezinfekčným prostriedkom, ktorý vsiakne biologický materiál a inaktivuje ho.
- Pri kontaminácii vírusmi volíme peroxozlúčeniny, chlórové prípravky, glutaraldehydový prostriedok, napr. Incidur.. Možno použiť aj fenolové zlúčeniny. Zlúčeniny ťažkých kovov a povrchovo aktívne látky, napr. KAZ, sú v tejto indikácii pri bežne odporúčaných koncentráciách neúčinné! Pri kontaminácii mykobaktériami používame kyselinu peroxyoctovú.

Tabuľka 1. 6. 1. Prehľad použitia vybraných dezinfekčných prípravkov pre plošnú dezinfekciu na pracovisku klinickej mikrobiológie

Dezinfekčný prostriedok	Spektrum účinnosti						Koncentrácia (%)	Expozičný čas
	Baktérie			Spóry	Vírusy	Huby		
	G+	G-	Mykobak.					
Persteril*	+	+	+	+	+	+	0, 1 – 0,5	30 – 60 sek.
Chlóramín B*	+	+	+	-	+	+	1,0 – 3	5 minút
Dikonit*	+	+	+	+/-	+	+	0,1 – 1,0	10 minút
Peroxo zlúčeniny*	+	+/-	+	+	+	+	3,0 – 6,5	3 – 5 minút
Incidur (aldehydy)	+	+	+	-	+	+	0,5 – 3,0	15 minút
Desam OX (peroxid + KAZ)	+	+	+	+/-	+	+	2 – 5	15 minút
Orthosan BF 12 (chlórofen+ izopropanol)	+	+	+	-	+/-	+	2 – 5	15 minút

*Informácie o účinných látkach v uvedených preparátoch preparátov vid' subkapitola 7

vú, chlórové a jódové prípravky alebo roztok krezolu. Uvedené prípravky aplikujeme v najvyšších odporúčaných koncentráciách.

1.6.5 Zásady prvej pomoci pri vzniku laboratórnej infekcie



Pri akomkoľvek nebezpečnom kontakte s infekčným materiálom informujeme zodpovedného pracovníka (vedúci laboratória), ktorý organizuje prvú pomoc a ďalší postup pri ošetrovaní. Pri vniknutí infekčného materiálu do spojivkového vaku alebo nosa postihnuté miesto vypláchneme 0,1 % kyselinou boritou a aplikujeme lokálny dezinfekčný prostriedok (Ophtalmoseptonex, chlórhexidínový preparát a pod.). Pri poranení kontaminovanými predmetmi ranu bežným spôsobom ošetríme a dezinfikujeme. Ďalší postup treba zabezpečiť vzhľadom na spôsob vniknutia do organizmu a patogenitu infekčného agensu. Postup pri pichnutí sa kontaminovanou ihlou:

- ranu nechať krváčať,
- dezinfikovať najlepšie kombinovaným alkoholovým dezinfekčným prostriedkom (jódovým alebo s chlórhexidínom), resp. peroxidom vodíka (3 %),
- odobrať krv na vyšetrenie HBsAg, anti HBs, anti HCV, anti HIV, – poranenie pracovníka preočkovať proti VHB (to je potrebné vykonať čo najskôr – najlepšie do 24 hod. od poranenia, u neočkovaných osôb je potrebné podať aj špecifický imunoglobulín). Je potrebné zistiť pri materiáli ktorého pacienta bola ihla bola použitá a vykonať vyšetrenie tohto pacienta pomocou tých istých parametrov. Vhodné je aj vyšetrenie RRR a TPHA – ak nebolo vykonané pacientovi pri prijímaní do zdravotníckeho zariadenia. Pri podozrení na možný prenos HIV (parenterálna kontaminácia pracovníka biologickým materiálom od HIV-pozitívneho pacienta) je nevyhnutné čo najskôr (najneskôr do 2 dní) začať chemoprophylaxiu antiretrovirotikami na špecializovanom infekčnom pracovisku. Ativirotiká sa v tomto prípade profylakticky podávajú po dobu 30 dní. Po uplynutí 6 týždňov a 3 mesiacov pri HCV a HIV (pri HBV aj po pol roku, čo je maximálny inkubačný čas pre ochorenie na hepatitídu B) znovu urobiť vyšetrenia uvedených parametrov (prípadne kontrolovať stav aj pomocou ďalších, napr. hepatálnych enzýmov),
- nahlásiť poranenie na odbor epidemiológie príslušného RÚVZ.

O každom úraze vedíme evidenciu v knihe úrazov a o závažnejších vyplníme Tlačivo o úraze.

1.6.6 Prevencia kontaminácie vzoriek

Okrem ochrany zdravia osôb si je v tejto súvislosti potrebné uvedomiť, že hlavnou úlohou mikrobiologických pracovísk je poskytovať kvalitnú mikrobiologickú diagnostiku, a preto je potrebné vylúčiť kontamináciu vyšetrovaných vzoriek, a to v celom procese až po získanie výsledkov analýz. Prípadný prenos mikróbov alebo ich molekulárnych zložiek môže spôsobiť kontamináciu diagnostík, pomôcok, predmetov a priestorov, a tak negatívne ovplyvniť výsledok analýz. Obdobný proces ako pri prenose mikroorganizmov a vzniku nákazy sa uplatňuje pri prenose kontaminácie na vzorky, predmety a prostredie. V rámci možnej laboratórnej kontaminácie sú jej zdrojom predovšetkým iné vzorky a naočkované médiá, ale aj kontaminovaná voda, vzduch, laboratórna pomôcka, infikovaný, kolonizovaný alebo kontaminovaný živočích a iné. Nenačkované médiá, diagnostiká a pomôcky v laboratóriu sú takmer vždy sterilizované alebo dezinfikované. Za kontaminované ich považujeme až po použití alebo porušení ochranných bariér (napr. poškodenie, zatečenie či perforácia obalu), ktoré inak zabezpečujú aseptické uchovávanie do doby použitia, resp. dátumu expirácie. Kontaminovanými sa môžu stať aj pri príprave, nesprávnej manipulácii a pri nevhodnom skladovaní. Aby sa vylúčilo použitie kontaminovaných diagnostík, napríklad tekutých a tuhých kultivačných pôd, musí sa na mikrobiologickom pracovisku každá nová šarža pripravených pôd kontrolovať kultivačne inkubáciou vzoriek nenaočkovaných pôd v termostate počas určenej doby (kontrola sterility). Pokiaľ pri nej dôjde k prejavom biologickej aktivity mikroorganizmov (rast kolónií, zákal, zmena pH, farby a iné), musia byť tieto šarže pôd vylúčené z používania. Použité pôdy s kultúrami a iným biologickým materiálom majú byť bezpečne likvidované ako kontaminovaný odpad, najlepšie sterilizáciou. Permanentné pomôcky musia byť vždy dekontaminované a sterilizované pred tým, ako majú byť znovu použité. Pri odpade sa vychádza z jeho zaradenia podľa Zákona o odpadoch, ktorý presne určuje bezpečný režim pri manipulácii s ním, pri jeho uskladnení a likvidácii. Prenos kontaminácie je pravdepodobný aj pri nedostatočne dekontaminovaných priestoroch, pomôckach a nedodržiavaním aseptiky pri práci, čo má za následok nevalidné výsledky diagnostiky (falošne pozitívne alebo falošne negatívne), predovšetkým pri metódach s vysokou analytickou citlivosťou (imunoanalýzy, metodiky molekulárnej biológie). Takými sú napríklad nevalidné výsledky PCR ako dôsledok práce v kontaminovanom priestore, bez priestorového delenia na samostatné úseky, bez špeciálnych rukavíc, ode-



vu, mimo laminárneho boxu alebo ako dôsledok kontaminácie vzoriek či diagnostík infekčným aerosolom.

V minulosti boli zdrojom laboratórnej kontaminácie napríklad aj chladničky, pri ktorých dochádzalo k tomu, že boli nedostatočne dekontaminované, navyše niekedy nevhodne využívané, napr. na súčasné skladovanie potravín a nápojov spolu s diagnostikami. Vyzdobovanie laboratórií dekoráčnymi textíliami a zariaďovanie čaluneným nábytkom je proti zásadám správnej laboratórnej praxe. Pestovanie črepníkových kvetov v priestoroch laboratória bolo v minulosti tiež častou príčinou kontaminácie diagnostík (napr. pomnoženie baktérií alebo húb v diagnostických sérach), najmä pri ich opakovanom používaní alebo ak boli ponechané voľne bez uzáverov. Riziko kontaminácie predstavovalo aj vlhnutie stien s tvorbou kolónií plesní a infestácia priestorov laboratórií obtiažnym hmyzom (šváby, rusy, svrčky a iné) či dokonca hlodavcami, najmä v starších zdravotníckych zariadeniach.

Personál by v rámci svojej kvalifikácie mal mať dostatočné vedomosti o dodržiavaní aseptických postupov a o vhodných postupoch dekontaminácie. Rovnako dôležitá pre dodržanie asepsy je jeho manuálna zručnosť a disciplína na pracovisku. Častým prípadom nedodržiavania predpisov je nosenie šperkov, umelých nechťov, piersingu a nevhodných účesov personálom.

Mikrobiologické pracoviská v zdravotníctve by mali mať ako zdravotnícke pracoviská vypracované prevádzkové poriadky, rovnako aj súbor správnych laboratórnych postupov, resp. mali by absolvovať akreditáciu s príslušnou riadenou dokumentáciou. Všetky tieto vnútorné predpisy musia zahŕňať aj všeobecné zásady prevencie prenosu nákaz a zásady prevencie vzniku kontaminácie, vrátane popisu postupov požadovanej dekontaminácie, dezinfekcie a sterilizácie v rámci vykonávaných pracovných procesov. Tvorba interných predpisov vychádza z cha-

rakteru mikrobiologickej diagnostiky daného pracoviska a jeho konkrétnych špecifik (napr. pracovisko s mykobakteriologickou diagnostikou, s virologickou diagnostikou na tkanivových kultúrach, laboratórium pre priónové nákazy a pod.).

Pri dekontaminácií je dôležité jej **systematické vykonávanie a kontrola. Vnútnymi normami, napr. v prevádzkovom poriadku, sa určia kompetentné osoby vykonávajúce pravidelnú dekontamináciu, určí sa vhodný postup dekontaminácie, vhodný prostriedok, miesto, čas a trvanie výkonu a aj to, ako často sa má vykonávať.** Súčasťou správnych laboratórnych postupov je aj kontrola vykonávania a účinnosti dekontaminácie, pri ktorej je potrebné stanoviť zodpovednú osobu, spôsob, frekvenciu vykonávania a aj spôsob evidencie vykonanej kontroly.

Na záver ešte jedna zásadná poznámka v tejto súvislosti a tá znie, že len erudovaný a skúsený mikrobiológ si dokáže včas všimnúť a odlíšiť prípadnú kontamináciu vzoriek, diagnostík, pomôcok alebo kultivačného média (napr. pri kultivačnej diagnostike, ale aj v serológii a molekulárnej diagnostike), kompetentne ich vyriešiť a vyhnúť sa tak diagnostickým omylom.

LITERATÚRA

1. Nariadenie vlády č. 83/2013 Z. z. Nariadenie vlády Slovenskej republiky o ochrane zdravia zamestnancov pred rizikami súvisiacimi s expozíciou biologickým faktorom pri práci.
2. Klein M.R.: Classification of biological agents, RIVM Letter report 205084002/2012
3. Liptáková A. et al.: Mikrobiologická diagnostika pôvodcov infekčných ochorení pre študentov medicíny. Bratislava: Univerzita Komenského, 2018.



Predný J.



Dekontaminácia predstavuje široký súbor opatrení a postupov na znižovanie počtu až po úplnú elimináciu mikroorganizmov. Najvýznamnejšie metódy z nich sú dezinfekcia a sterilizácia. Používajú sa cielene k usmrteniu mikroorganizmov tak, aby sa zabránilo ich možnému prenosu do živého organizmu alebo na predmety. Obe metódy sa používajú na zničenie alebo inaktiváciu mikróbov a ich rôznych foriem (vegetatívna bunka, spóra), rovnako aj ich molekulárnych štruktúr (napr. endo- alebo exotoxíny, pyrogény, enzýmy alebo nukleové kyseliny). Týmto metódami sa mikroorganizmy eliminujú nielen preto, lebo môžu vyvolať infekciu (vznik laboratórnej alebo profesionálnej nákazy), ale aj z dôvodu, že môžu negatívne ovplyvniť požadovaný výsledok práce. V zdravotníctve to môže byť napr. výroba liekov, infúzných roztokov alebo získanie výsledkov laboratórnych analýz. **V zdravotníctve je účinná a správne vykonávaná dekontaminácia základným postupom prevencie vzniku, šírenia a potlačania nozokomiálnych a profesionálnych nákaz.**

Pri výbere účinných **dekontaminačných prostriedkov** a postupov je treba dbať nielen na ich **antimikróbnu účinnosť**, ale aj na to, že nesmú sami o sebe predstavovať akékoľvek významnejšie a nekontrolovateľné riziko, napr. negatívne pôsobiť na zdravie osôb (toxicita, mutagenita, karcinogenita, teratogenita, popálenie žieravinou, vyvolávanie alergických reakcií a pod.), ani poškodzovať predmety a materiál, ktoré pomocou nich zbavujeme mikróbov (napr. spôsobovať koróziu kovov, zmenu zloženia alebo iných vlastností kultivačných médií a pod.).

Podľa rozsahu a úrovne rozdeľujeme dekontamináciu v širšom ponímaní (*sensu lato*) do niekoľkých skupín, pričom medzi nimi existuje vzájomná spojitosť a postupnosť.

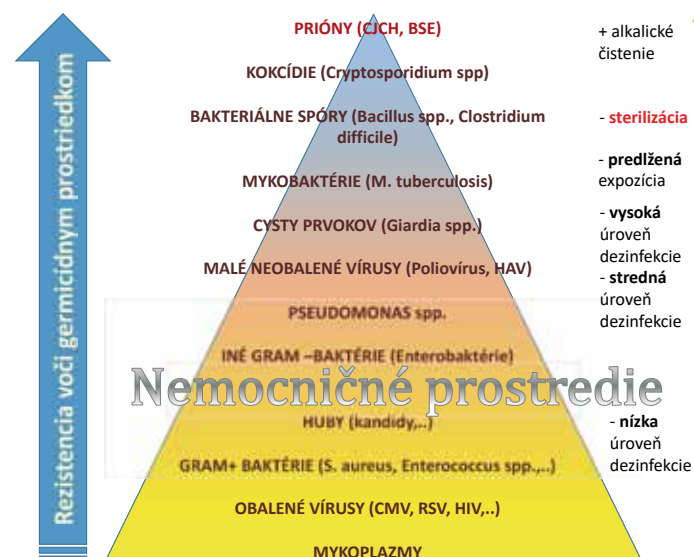
Jednotlivé úrovne dekontaminácie sú:

- **asanácia,**
- **sanitácia/dekontaminácia** (v užšom chápaní – *sensu stricto*),
- **dezinfekcia,**
- **sterilizácia.**

To, aký postup, úroveň a germicíd (mikrobicídny prostriedok) je potrebné zvoliť, závisí od viacerých faktorov. Pokiaľ sa zameriame na mikroorganizmy a ich vlastnosti vo vzťahu k dekontaminácii, dajú sa rozdeliť do skupín podľa ich stúpajúcej prirodzenej rezistencie voči vplyvu dekontaminácie (obr. 1.7.1).

Uvedené zoradenie rezistencie mikroorganizmov voči dekontaminácii platí len v oblasti lekárskej mikrobiológie a je odvodené od mikrobioty, ktorá vytvára interakcie s makroorganizmom (ľudským, živočíšnym). Ide o interakcie, v ktorých sa mikroorganizmy môžu uplatniť ako patogén, parazit, kmenzál, saprofyt, mutualista alebo symbiont človeka. Netýka sa to ale všetkých mikroorganizmov na Zemi, napr. extrémofilov. Extrémofily sú niektoré archea a baktérie, ktoré vyžadujú pre svoj život špecifické podmienky, napr. vodné prostredie horúce až 140 °C, extrémne kyslé alebo zásadité prostredie s vysokou koncentráciou síry alebo uhličitanu vápenatého, resp. aj vysoký hydrostatický tlak. Extrémne termofily sú zvyčajne len v horúcich prameňoch, hydrotermálnych otvoroch zemskej kôry v oceánoch a podobných oblastiach geotermálnej aktivity. Ich metabolismus, rozmnožovanie a šírenie sú podmienené tamojším prostredím, špecifickými zdrojmi biogénnych prvkov

a energie. Neuplatňujú sa v zmysle uvedených interakcií s makroorganizmami, preto sa ani nezohľadňujú pri definícii dekontaminácie, dezinfekcie a sterilizácie v chápaní lekárskej mikrobiológie. Majú však význam aj pre zdravotníctvo, napr. pri získavaní špecifických enzýmov (termorezistentné polymerázy pre molekulárno-genetické metódy, enzýmy do pracích prostriedkov a pod.).



Obr. 1.7.1. Úroveň prirodzenej rezistencie zdravotne významných mikroorganizmov na germicídne prostriedky a príslušné stupňovanie účinnosti germicídnych postupov.

Tak, ako pri antibiotikách, aj pri niektorých skupinách dezinfekčných látok si baktérie vytvorili **geneticky podmienené mechanizmy sekundárnej rezistencie** a niektoré z nich sú aj **horizontálne prenosné**. **Fenotypovú rezistenciu** baktérií voči biocídom predstavuje napríklad tvorba biofilmu (pozri nižšie).

1.7.1 Výber a použitie dekontaminačných prostriedkov

Pri používaní dezinfekčných látok je potrebné racionálne zvoliť účinný germicídny prostriedok alebo postup. Je nutné postupovať v zmysle prevencie vzniku rezistencie a pri pravidelnej dekontaminácii je vhodné niektoré dezinfekčné látky obmieňať.

Pri výbere dekontaminačného prostriedku, resp. postupu sú zásadné viaceré hľadiská.

1. Spektrum účinností, ktorá je daná prirodzenou rezistenciou mikroorganizmov (viď obr. 1.7.1). Mechanizmy prirodzenej rezistencie v mikroorganizmoch voči dekontaminačným prostriedkom sú rôzne. Spóry sú veľmi odolné, pretože plášť a kortex spóry pôsobia ako mechanická bariéra. Obsah dipikolínátov a osmotická funkcia kortexu (zabezpečuje dehydratáciu spóry) spôsobujú rezistenciu spór voči dezinfekčným



látкам vysokým, teplotám a radiácii. Mykobaktérie majú bunkovú stenu s mykolovými kyselinami, ktorá funguje ako voskový obal a zabraňuje vstupu dezinfekčného prostriedku do bunky. Gramnegatívne baktérie majú vonkajšiu membránu, ktorá pôsobí ako bariéra pre prienik niektorých dezinfekčných prostriedkov. Pri vírusoch je to naopak proteínová vrstva nukleokapsidu, ktorá lepšie chráni neobalé vírusy ako lipoproteínový vonkajší obal obalených vírusov, ktoré sú preto omnoho viac citlivé na pôsobenie biocídov.

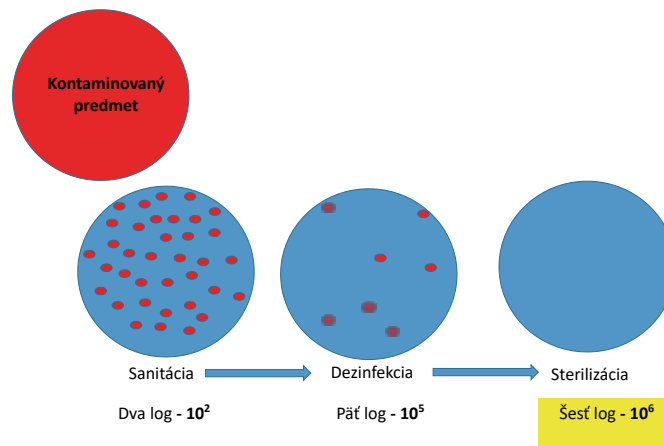
- Koncentrácia** dezinfekčného prostriedku a/ alebo **intenzita energie** (napr. teplota a tlak vodnej pary, energia elektromagnetického žiarenia a pod.). Pri dezinfekčných látkach okrem iodoforov a čiastočne aj alkoholov platí, že čím je koncentrácia vyššia, tým sú účinnejšie a preto platí, že pri použití nižších koncentrácií je potrebné predĺžiť expozičný čas. Podobne aj pri sterilizácii platí, že čím je vyššia teplota, tým kratší je potrebný expozičný čas.
- Hodnota pH** prostredia, v ktorom účinkujú. Plná antimikrobiálna aktivita niektorých dezinfekčných prostriedkov (napr. glutaraldehydu, kvartérnych amóniových zlúčenín) sa dá dosiahnuť zvýšením pH (alkalizácia), pri iných však zvýšenie pH znižuje účinnosť (napr. fenolov, chlórnanov a jódu).
- Dĺžka expozície** – čas potrebný na usmrtenie mikroorganizmov. Napríklad kombinované alkoholové dezinfekčné prostriedky na dezinfekciu kože proti vegetatívnym formám baktérií (napr. *E. coli*, *Salmonella* spp., VRE, MRSA, *Listeria* spp.), kvasinkám (napr. *Candida* spp.), mykobaktériám (napr. *M. tuberculosis*) a vírusom (napr. poliovírus) sú účinné v expozičných časoch približne do 60 sekúnd. Výrobcovia, resp. distribútori všetkých dezinfekčných prostriedkov musia na výrobkoch uvádzať okrem vhodnej koncentrácie aj expozičnú dobu, schválenú kontrolnými orgánmi štátu.
- Teplota**. Účinnosť dezinfekčného roztoku sa dosiahne zvýšením teploty vody, do ktorej sa dezinfekčný prípravok riedi. Na zvýšenie účinnosti dezinfekčného prostriedku sa na riešenie používa pri jódoých prípravkoch voda s teplotou 35 °C, pri fenolových prípravkoch a organických amóniových zlúčeninách (KAZ) voda s teplotou 50 až 60 °C, pri aldehydových, chlórových prípravkoch a peroxozlúčeninách sa používa studená voda.
- Počet zárodkov**. Pri rovnakých podmienkach testovania sa preukázalo, že chemická inaktivácia 10 spór *Bacillus atrophaeus* (predtým *Bacillus subtilis*) trvá 30 minút, ale inaktivácia 100 000 spór *B. atrophaeus* trvá 3 hodiny. Je to dôkaz potreby dôkladného čistenia zdravotníckych nástrojov pred dezinfekciou a sterilizáciou. Rovnako sa tým aj skracaie doba expozície potrebnej na usmrtenie mikroorganizmov. Výskumy tiež dokázali, že agregované bunky v zhlukoch (biofilm) sú ťažšie inaktivované ako dispergované (planktonické) bunky.
- Relatívna vlhkosť** je pri niektorých postupoch najdôležitejším faktorom ovplyvňujúcim účinnosť plyných dezinfekčných prostriedkov a sterilantov, ako je etylénoxid a formaldehyd.
- Prostredie** a lokalizácia, v ktorom germicíd pôsobí – ovplyvnenie účinnosti dezinfekčných prostriedkov organickými látkami (krv, hlien, stolica), znečistením, ich absorpciou, inaktiváciu prítomnosťou ostatných chemických látok roztoku, v ktorom sa riedia dezinfekčné prostriedky, napr. tvrdosť vody negatívne ovplyvňuje mnohé dezinfekčné látky, nakoľko ióny Mg^{2+} a Ca^{2+} s nimi reagujú a vznikajú tak nerozpustné komplexy. Dezinfikované povrchy musia byť dokonale v kontakte s dezinfekčným prostriedkom, preto nesmú vznikáť miesta, kde k tomu nedôjde, napr. vzduchové bubliny v dutinách.

Ostatné faktory, ovplyvňujúce výber a použité dezinfekčného prostriedku:

- spôsob použitia dezinfekčných prípravkov** – umývanie, ponorenie, postrek,

- aplikačná forma dezinfekčných prípravkov** – roztok, gél, pena, aerosol, odparovanie,
- nežiaduce účinky na ľudský organizmus**,
- vplyv na dezinfikovaný materiál**,
- cena**,
- ekologická toxicita a degradovateľnosť**.

Vo väčšine krajín je dekontaminácia pri poskytovaní služieb, predovšetkým v zdravotníctve, upravená legislatívne, vrátane aktuálneho zoznamu povolených dezinfekčných a sterilizačných prostriedkov.



Obr. 1.7.2. Úrovně dekontaminácie.

1.7.2 Biofilm a dezinfekcia

Biofilm tvoria mikrobiálne spoločenstvá, ktoré sú pevne spojené s povrchmi a nemožno ich ľahko odstrániť. Skladá sa z extracelulárnych polymérnych látok a tvorí konglomerát extracelulárnej DNA, proteínov a polysacharidov (podobným glykokalixu), ktoré sú produkované bunkami mikroorganizmov v biofilme. Ak sa takáto hmota vytvorí, mikróby v nej môžu byť chránené voči dezinfekčným prostriedkom viacerými mechanizmami, vrátane fyzikálnych vlastností starších biofilmov (nepriepustnosť), mikrobiálnej produkcie neutralizačných enzýmov a fyziologických gradientov v biofilme (napr. pH) a vplyvom genotypovej variability v spoločenstve baktérií. Baktérie v biofilmoch sú až 1000-krát viac odolné voči antimikrobiálnym látkam, než sú rovnaké baktérie v planktonickej forme. Biofilm sa môže tvoriť vo vrívkách, systémoch stomatologických súprav a v mnohých zdravotníckych pomôckach (napr. kontaktné šošovky, kardiostimulátory, hemodialyzačné systémy, močové katétre, centrálny venózný katéter, drény, endoskopy a iné). Dekontaminačné metódy na odstraňovanie biofilmov spočívajú na použití enzýmov, čistiacech a biocídnych prostriedkov (napr. chloramíny), ktoré môžu degradovať biofilm alebo znížiť počet životaschopných baktérií v biofilme. Povrchy a predmety sa po znečistení biologickým materiálom ihneď dezinfikujú ponorením do dezinfekčného roztoku a pomocou ultrazvuku, až potom sa mechanicky očistia – umývaním, čistením s použitím kefiiek, hubiek a podobne tak, aby sa odstránil aj prípadný biofilm. Obe tieto etapy možno spojiť za použitia dezinfekčných prostriedkov alebo technológií (umývačky a práčky), ktoré majú čistiace vlastnosti.

1.7.3 Metódy dekontaminácie

Účinnosť postupov na elimináciu biologických faktorov výrazne narastá od asanácie smerom k sterilizácii. Zatiaľ čo pri asanácii hovoríme o znížení kontaminácie rádo vo desiatkach percent účinnosti, pri sterilizácii je účinok takmer absolútny (napr. riadne vykonaný proces sterilizácie zníži počet vitálnych

bakteriálnych spór na počet ≤ 1 z 1 000 000 exponovaných spór).

Zoradenie jednotlivých krokov dekontaminácie závisí od konkrétnej situácie, napr. predmety určené na opakované použitie sú pred vlastnou sterilizáciou po predchádzajúcom použití najprv dezinfikované, potom dekontaminované ultrazvukom a mechanickou očistou a až následne sterilizované.

1.7.3.1 ASANÁCIA

Je súbor nešpecifických postupov, ktorými zneškodňujeme, inaktivujeme alebo odstraňujeme biotické a abiotické rizikové faktory pre zdravie človeka, zvierat alebo rastlín. Asanáciou eliminujeme potenciálne zdroje infekcie, vytvárame nepriaznivé podmienky pre prežívanie mikroorganizmov a možnú mikrobiálnu kolonizáciu prostredia, prerušujeme cesty prenosu kontaminácie, odstraňujeme alebo dekontaminujeme rezervoáre, likvidujeme prenášačov pôvodcov nákaz a bránime ich vnikaniu do priestorov. Asanácia je súbor opatrení na obnovu životného prostredia, či už v prírode, alebo v urbánnych celkoch a zameriava sa všeobecne na zlepšenie hygienických podmienok. Je to predovšetkým plánovanie územia, projekcia a výstavba objektov a infraštruktúry, sanácia vonkajších a vnútorných častí budov tak, aby neslúžili ako prostredie pre nežiaduce druhy starších organizmov a aby nedošlo k hromadeniu neživej organickej hmoty, mŕtvych tiel organizmov, hniezd a iných nežiaducich materiálov.

V praxi mikrobiologických laboratórií predstavuje asanačné opatrenie aj pravidelná a bezpečná likvidácia odpadu – od vzoriek biologického materiálu, cez kultúry mikroorganizmov a médiá (resp. telá či tkanivá pokusných zvierat, embryá), použité v diagnostických postupoch, ktoré predstavujú v zmysle zákona špecifický odpad až po použité jednorazové pomôcky, médiá, reagentie, odpadovú vodu, sklo, plasty, obaly, starý nábytok, nefunkčné prístroje, chemikálie a pod. Súčasťou asanácie v laboratóriách je pravidelné upratovanie, preventívna dezinfekcia a deratizácia a súvisiace opatrenia na zabránenie invázie článkonožcov (muchy, šváby a pod.), hlodavcov a vtákov, ako sú synantropizované holuby. Takými opatreniami sú napr. zavedenie sietí, mreží, sifónov, elimináciu kadáverov, exkrementov, vajčiek a hniezd. Takisto sem patria opatrenia proti vlnutiu stien a zatekaniu do priestorov, vzniku kompostu a iného organického materiálu z náletov alebo aj bežné vetranie priestorov.

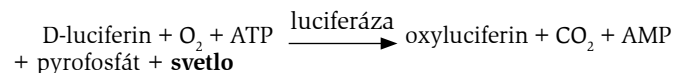
1.7.3.2 SANITÁCIA (dekontaminácia *sensu stricto*)

Predstavuje okruh cielených činností, ktorým sa dosiahne zníženie kontaminácie až o 90 %. Vykonáva sa mechanickým alebo automatickým čistením, umývaním alebo preplachovaním s teplými roztokmi enzýmov, detergentov (saponátov) alebo použitím jemných abrazív, kyselín a zásad. Sanitácia sa vykonáva aj fyzikálne (termicky, sedimentačne, filtračne a pod.), mechanickým a chemickým odstraňovaním nánosov (napr. vodného kameňa, mastnoty alebo bielkovín), odstraňovaním prachových častíc, aerosolu (vysávanie, vetranie alebo vzduchotechnika s filtrami), kvapiek, škvrín alebo biofilmu (pranie, ultrazvuk). V podmienkach mikrobiologických pracovísk sa vykonáva pravidelná dekontaminácia (umývanie a mechanická očista) plôch, sanity a prístrojov (mikroskopy, automaty), rovnako aj priestorová dekontaminácia spojená s dezinfekciou pomocou UV (funkčné germicídne žiariče sú podmienkou získania povolenia činnosti laboratória) a čistenie umelohmotných predmetov. V zmysle uvedených činností je vhodnejším označením dekontaminácie výraz sanitácia. Je to vhodné najmä preto, lebo výraz dekontaminácia sa v zdravotníctve, resp. v mikrobiológii, používa aj v iných, špecifických významoch, ktoré by sa nemali navzájom zamieňať. Okrem generalizovaného významu výrazu dekontaminácia (*sensu lato*) pre všetky postupy ničenia a odstraňovania mikroorganizmov, ich vektorov, ďalších biotických a abiotických článkov epidemického procesu (teda asanácia, sanitácia, dezinfekcia a sterilizácia spolu) má tento výraz aj ďalšie významy. Selektívna dekontaminácia tráviaceho traktu znamená eradikáciu

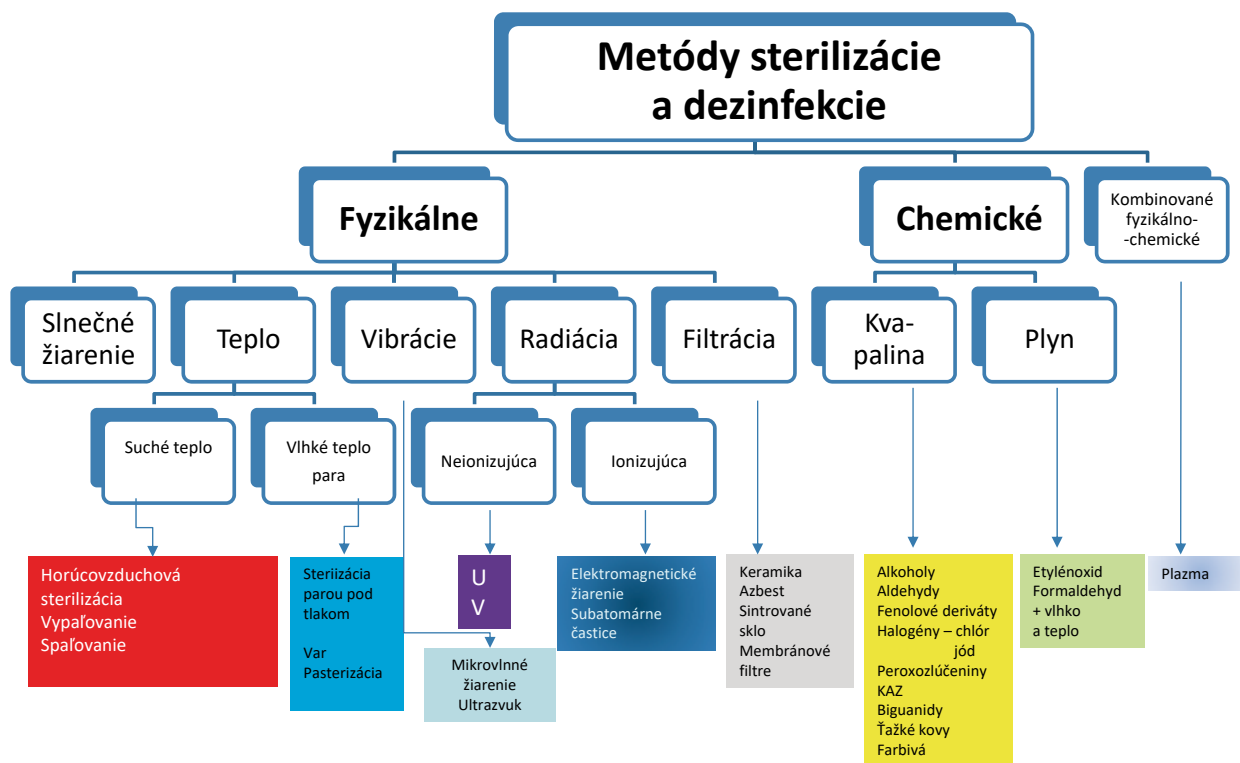
potenciálne patogénnych mikroorganizmov (intestinálna gram-negatívna fakultatívne anaeróbna bakteriálna flóra, *Staphylococcus aureus* a huby) v tráviacom trakte kritických pacientov kombináciou neabsorbovateľných antibiotík a antismykotík (napr. polymyxín E, tobramycín a amfotericín B) na jednotkách intenzívnej starostlivosti, pri transplantácii kmeňových buniek a pod. Iným špecifickým využitím slova dekontaminácia je pomenovanie časti laboratórneho vyšetrovacieho postupu, ktorým sa vo vzorke zbavujeme pomocou selektívneho činidla sprievodnej nežiaducej flóry (napr. dekontaminácia spúta pomocou 4 % roztoku KOH alebo 1% chlórhexidínom na izoláciu mykobaktérií). Dekontaminácia v laboratóriách sa v inom špecifickom význame slova vykonáva aj odstraňovaním špecifického odpadu v podobe toxických a rádioaktívnych látok. V anglosaskej oblasti sa napríklad doteraz v mikrobiológii, najmä v rámci sérologických, ako aj molekulárno-biologických metód často používajú na značenie konjugátov, sond alebo amplikónov rádioaktívne izotopy s krátkym polčasom rozpadu, ktoré je potom potrebné osobitne skladovať až do doby, kedy sa zníži ich rádioaktivita na požadovanú úroveň (tzv. vymieranie) a môžu sa zlikvidovať.

1.7.3.3 SYSTÉM MONITOROVANIA A KONTROLY SANITÁCIE V ZDRAVOTNÍCKYCH ZARIADENIACH POMOCOU ATP BIOLUMINISCENCIE (luminometricky) A FLUORESCENČNÉHO ZNAČENIA (fluorimetricky)

Adenozín trifosfát (ATP) je prítomný vo všetkých organizmoch, vrátane mikroorganizmov. Je prostriedok prepravy chemickej energie vo vnútrobunkovom metabolizme. ATP sa dá použiť aj ako indikátor organickej kontaminácie (napr. odlúpených buniek kože, mikroorganizmov atď.) na povrchoch. ATP reaguje s enzýmom luciferázou za vzniku svetla v reakcii:



Emitované svetlo z tejto reakcie sa meria pomocou luminometra. Monitorovacie systémy pre ATP monitoring sú navrhnuté tak, aby bolo umožnené ich jednoduché používanie a vyžadoval minimálny tréning. Komerčná testovacia súprava obsahuje navlhčené tampóny, uzatvorené v skúmavkách a prístroj na meranie bioluminiscencie (luminometer). Pri použití sa zvlhčený tampón vyberie z utesnenej skúmavky a kontrolovaná plocha, resp. predmet sa ním zotrie v jednom smere, potom v druhom smere (kolmom voči prvému) rotačným pohybom tak, aby sa zabezpečilo dobré pokrytie tampónu odobratým strom. Tampón sa potom vloží naspäť do skúmavky, a pohybom jej uzáveru sa prepichne priestor, kde sa nachádza reagentia (aktivizačné činidlo), ktoré sa uvoľní do skúmavky. Skúmavka sa následne pretrepe tak, aby sa reagentia s odobratou vzorkou premiešala. Po požadovanom čase (asi 5 sekúnd) sa tampón vyberie a umiestni sa do luminometra, ktorý zmeria intenzitu svetelného signálu do cca 30 sekúnd. Ak sa porovná signál dvoch odberov (pred a po dekontaminácii) z kontrolovanej plochy alebo predmetu, je možné numericky vyhodnotiť účinnosť sanitácie. Iným prístupom ku kontrole sanitácie je meranie fluorescencie značkovačov. Fluorescenčné značkovače sú pri dennom svetle číre a bezfarebné látky, ktoré fluoreskujú v tme po ožiarení UV – A svetlom. Preto by počas čistenia nimi označených plôch pri viditeľnom svetle nemali byť pre obsluhu viditeľné. Nanesením týchto fluorescenčných látok na povrchy nábytku, prístrojov, pomôcok a plôch priestorov v zdravotníckych zariadeniach pred plánovanou dekontamináciou je možná kontrola ich následného čistenia a posúdenie jeho účinnosti podľa toho, či bol z neho značkovač odstránený a v akom rozsahu. Postupuje sa tak, že sa plocha anonymne povrství značkovačom a po deklarovanom očistení, resp. umytí kontrolovaného priestoru sa takto dekontaminovaná plocha exponuje UV-A svetlu pomocou UV lampy. Ak bola dekontaminácia neúčinná, resp. nebola vykonaná vôbec, exponovaná plocha bude fluoreskovať.



Obr. 1.7.3. Prehľad metód dezinfekcie a sterilizácie.

1.7.3.4 DEZINFEKCIA



Je zneškodňovanie choroboplodných mikroorganizmov pomocou fyzikálnych, chemických alebo kombinovaných prostriedkov a postupov, čím sa preruší prenos nákazy od prameňa pôvodcu nákazy k vnímanému jedincovi. Pri dezinfekcii sa vychádza zo znalosti ciest a mechanizmu prenosu nákazy, možnosti ovplyvnenia účinnosti dezinfekcie faktormi vonkajšieho prostredia a odolnosti mikroorganizmov. Zväčša sa ňou nedokážu zničiť bakteriálne spóry a iné vysoko rezistentné formy mikroorganizmov. Dezinfekcia sa vykonáva ako indikovaný zdravotnícky výkon predovšetkým v troch základných oblastiach. Pri prvých dvoch ide o **individuálne ošetrovanie** jednotlivcov, pri treťom ide o **plošné systémové opatrenie**. Pri ošetrovaní sa dezinfekcia používa preventívne, napr. dezinfekcia kože pred vykonaním parenterálneho zákroku (venepunkcia, operačný zákrok a pod.), alebo pri kontaminácii kože alebo predmetov v styku s infekčným materiálom. Dezinfekcia je aj použitie dezinfekčného prostriedku na celistvú kožu, napr. ako dezinfekčné mydlá, šampóny alebo kúpele s cieľom znížiť množstvo mikróbov, zbaviť sa tranzientnej alebo dočasne devitalizovať aj rezidentnú mikroflóru. V súvislosti s použitím určitých dezinfekčných prostriedkov s nízkou tkanivovou toxicitou, napr. pri koži, slizniciach, v otvorených ranách alebo v telových dutinách je potrebné používať výraz antiseptisa (viď nižšie) a príslušné prostriedky nazývame antiseptiká.

Tretí spôsob využívania dezinfekcie je jej plošné vykonávanie ako súčasť protiepidemického režimu zdravotníckych zariadení, vrátane medicínskych laboratórií. Podobne sa dezinfekcia systémovo musí vykonávať aj ako úsek technologických postupov v prevádzkach spojených s epidemiologicky závažným činnosťami. Takými sú výrobné liečiv, výrobné kozmetických prípravkov, potravinárske a jedálenské zariadenia, kúpele, kaderníctva, podologické ambulancie, nechťové štúdiá, tetovacie štúdiá a pod.

Chemická dezinfekcia

Chemická dezinfekcia je dezinfekcia, pri ktorej sú mikroorganizmy ničené chemickými dezinfekčnými prostriedkami sta-

novenej koncentrácie, počas stanoveného času pôsobenia (expozícia doba) a s požadovaným spektrom dezinfekčnej účinnosti (nízka, stredná a vysoká). Látky, ktoré sa vyznačujú inaktivačným účinkom na mikroorganizmy nazývame **biocidy**. Pod inaktivačným účinkom rozumieme všetky dôsledky pôsobenia týchto látok na mikroorganizmy, od prerušenia metabolickej aktivity až po usmrtenie živých mikrobiálnej bunky, resp. buniek.

Biocidy chemickej povahy z hľadiska pôsobenia na mikroorganizmy rozdeľujeme na **dezinfekčné látky** (inaktivujúce mikroorganizmy na neživých povrchoch), **antiseptiká** (inaktivujúce mikroorganizmy na živých bunkách, tkanivách, orgánoch) a **konzervačné látky** (inaktivujúce mikroorganizmy v liečivách, potravinách, nápojoch, kozmetických prípravkoch a podobne, napr. parabény). Ten istý biocíd môže byť v závislosti od svojich vlastností zároveň aj dezinfekčná látka, aj antiseptikum alebo konzervantom, pri inom môže byť jeho využitie len jednoúčelové.

Biocídne prípravky s antimikróbnou aktivitou sú chemické látky rôznych typov:

- hydroxidy a iné alkalické zlúčeniny;
- kyseliny a niektoré ich soli:
 - anorganické (sol'ná, sírová, chrómsírová, chrómová, boriť, pentationová),
 - organické (mliečna, mravčia, propiónová),
 - estery kyselín (solbroly, parabény, čiže para- hydroxy benzoáty),
 - peroxikyseliny;
- oxidačné prostriedky (ozón, peroxid vodíka, kovové peroxidy, perboritan sodný, organické peroxidy, peroxouhlíčan sodný, persíran, manganistan draselný);
- halogény
 - a) chlór a jeho zlúčeniny (chlórdioxid, chlórany, chloramíny, deriváty kyseliny izokyanurovej, chloridy),
 - b) jód a jeho anorganické a organické zlúčeniny, jodofóry,
 - c) bróm, fluór;
- zlúčeniny kovov, síry, dusíka, fosforu a bóru;

- alkoholy a étery (metylalkohol, etylalkohol, propylalkohol, butylalkohol, jednomocné a viacmocné alkoholy – glykoly, glycerín, éter, etylénglykol);
- aldehydy (formaldehyd, glutaraldehyd, glyoxal, acetal);
- cyklické zlúčeniny (fenol, alkylfenoly, krezoly, difenoly, chlórphenoly, deriváty kyseliny salicylovej, difenylderiváty, hexachlorofén, chlórhexidín, picloxydín, deriváty furánu, akridínové farbivá);
- povrchovo aktívne látky – tenzidy (aniónaktívne, kationaktívne, amfotenzidy, neionogénne);
- kombinované.

Antiseptiká



Sú antimikróbne látky, ktoré po lokálnom podaní zničia mikroorganizmy alebo inhibujú ich rast a pomnožovanie na živom tkanive (na koži, sliznici a rane). Antiseptiká sa aplikujú zvonka (episomaticky) a preto sa na dosiahnutie účinného účinku a na zabránenie vzniku rezistencie tieto biocídy používajú v koncentráciách výrazne vyšších, ako sú minimálne baktericídne koncentrácie (MBC). V ideálnom prípade by antiseptiká mali široké mikrobicídne spektrum a silnú germicídnu aktivitu s rýchlym nástupom a dlhotrvajúcim účinkom. Antiseptické prípravky by nemali byť toxické pre tkanivá alebo bunky, mali by teda byť **biokompatibilné**. Ich biokompatibilita je aj v tom, že by nemali brzdiť proces hojenia. V mnohých prípadoch slúžia na topickú terapiu povrchových infekcií, na ošetrovanie rán a iných poškodení kožného krytu (ulkusy). Biokompatibilné antimikrobiálne látky sú najmä:

- benzalkónium chlorid (BAC) – kvartérna amóniová zlúčenina, KAZ,
- cetylpyridinium chlorid (CPC) – kvartérna amóniová zlúčenina, KAZ,
- chlorhexidín diglukonát (CHX) – biguanidín,
- oktenidín dihydrochlorid, napr. prípravok Octenisept® (OCT) – biguanidín,
- polyhexametylén bisguanid napr. prípravok Lavasept® (PHMB) – biguanidín,
- povidone iodin PVP-I, napr. prípravok Betadine roztok – iodofor,
- povidone iodin PVP-I, napr. prípravok Betadine masť – iodofor,
- triklosan (TRI) – fenolový derivát,
- na proteíny viazané striebro (Mild silver protein, MSP),
- dusičnan stříborný (AgNO_3),
- sulfadiazín (SSD).

Pri antiseptikách je dôležité na porovnanie antiseptických účinných látok okrem spektra antimikróbnej účinnosti aj index biokompatibility (BI). BI zohľadňuje výsledky testov *in vitro* cytotoxicity, t.j. koncentrácie, pri ktorej je poškodených 50 % testovaných fibroblastov ako modelových buniek, a mikrobicídny účinok, t.j. koncentrácia, pri ktorej sa redukuje aspoň o 3 log₁₀ (99,9 %) testovaných mikroorganizmov (napr. *Staphylococcus aureus* a *Escherichia coli*). BI vyšší ako 1 predstavuje antiseptickú látku s účinnou mikrobicídnu aktivitou kombinovanou s relatívne nízkou cytotoxicitou, zatiaľ čo BI menej ako 1 znamená antimikrobiálne činidlo s relatívne vysokou cytotoxicitou v definovanom médiu.

Zoradenie antiseptík podľa indexu biokompatibility testovaný na štandardných kultúrach spomínaných dvoch modelových druhov baktérií:

E. coli: OCT > PHMB > CHX > PVP-I(o) > PVP-I(s) > BAC > CPC > TRI > MSP,

S. aureus: OCT > PHMB > CHX > CPC > PVP-I(o) > BAC > PVP(s) > TRI > MSP.

Iné antiseptické látky, používané aj u nás, sú ďalšie kvartérne amóniové zlúčeniny, väčšinou v kombinácii s inými antiseptikami, napr. karbetopendecíniumbromid (účinná látka v antiseptickom prostriedku Ophtalmo – Septonex spolu s kyselinou

boritou). Ako antiseptiká sa uplatnili aj síra vo forme masť a roztokov, manganistan draselný, peroxid vodíka, kyselina benzoová a salicylová, organické farbivá (genciánová violet, malachitová zeleň) a mnohé iné zlúčeniny. Napr. genciánová (kryštalická) violet je nielen základné farbivo v mikrobiológii, ale aj stále používané antiseptikum na novorodeneckých oddeleniach. Genciánová violet (chemicky hexametylpara-rosanilinchlorid) je fialovo sfarbená tekutina s dezinfekčným účinkom proti niektorým baktériám a hubám, vrátane kvasiniek *Candida albicans*, ktoré spôsobujú soor (orálnu kandidózu, múčivku) u dojčiat. Používa sa na potieranie rôznych kožných a slizničných afekcií, ako sú vriedky, pliesňové ochorenia, afty a i. U nás sa tradične používala ako lokálna aplikácia na kožu a sliznice a bežne sa aplikuje v pôrodniciach do dutiny ústnej pri slizničnej kandidóze novorodencov, ako aj na prsné bradavky matiek pri ragádách (preveruje sa podozrenie, že by mohlo ísť o karcinogén).

Úrovně dezinfekcie

Tieto úrovne sú založené na intenzite mikrobicídneho účinku chemických látok na mikroorganizmy a môžu byť:

- **Dezinfekcia vysokej úrovne (high level disinfection – HLD)**: Vykonáva sa kvapalnými chemickými látkami, ktoré devitalizujú takmer všetky mikroorganizmy (ale nie cysty kryptosporídi, ani vajčeka niektorých helmintov) a tento postup nemá takú účinnosť v celom procese (teda až po použitie takto dezinfikovaného predmetu na invazívny zákrok), ako sterilizácia (napr. kvôli nevyhnutnosti následného oplachu na odstránenie toxických reziduí biocídu). Pri HLD sa používajú ortoformaldehyd, glutaraldehyd, kyselina peroxoctová, peroxid vodíka a formaldehyd.
- **Dezinfekcia strednej úrovne (intermediate level disinfection – ILD)**: Vykonáva sa pomocou chemických látok, ktoré eliminujú vegetatívne formy baktérií a niektoré ničia aj bakteriálne spóry. Patrí sem skupina fenolov, alkoholov, chlórnan sodný a iné.
- **Dezinfekcia nízkej úrovne (low level disinfection – LLD)**: Vykonávajú sa pomocou chemických látok, ktoré počas krátko časového obdobia (menej ako 10 minút) eliminujú vegetatívne baktérie, huby a niektoré vírusy. Jedným príkladom je skupina kvartérnych amóniových zlúčenín.

Dezinfekčné látky, používané v zdravotníctve

Najviac používané chemické dezinfekčné prostriedky v zdravotníctve obsahujú niektorý z uvedených typov chemických zlúčenín:

- **alkoholy** (etanol, propanol, izopropanol, metylalkohol),
- **organické a anorganické zlúčeniny s aktívnym chlóróm** (organické – chloramíny, chlór-deriváty kyseliny izokyanurovej, anorganické – chlórnan sodný),
- **jod a jodofory** – zlúčeniny s aktívnym jódom na vhodnom nosiči,
- **aktívny kyslík a peroxozlúčeniny** (ozón, peroxid vodíka, manganistan draselný, peroxooctová kyselina, anorganické peroxozlúčeniny, napr. perboritan sodný, persíran draselný, organické peroxidy, napr. peruhličitan sodný a iné),
- **aldehydy** (glutaraldehyd, glyoxal, ortho-ftalaldehyd, acetaldehyd),
- **organické amóniové zlúčeniny s kvartérnym dusíkom** (KAZ): (alkyl-benzyl-dimetyl amonium chlorid, dimetyl-didecyl-amonium chlorid a pod.),
- **fenoly** (fenol, krezol, triklosan)
- **biguanidínové deriváty** (napríklad chlórhexidín a iné),
- **koloidné striebro a iné**.

Prehľad skupín dezinfekčných látok, ich použitia a mechanizmus ich antimikróbneho účinku je v tabuľke 1.7.1.

Vo viaczožkových dezinfekčných prostriedkoch sa kombinujú najčastejšie dve alebo tri z uvedených látok: KAZ, aldehyd, alkohol, alebo chlórhexidín. V prípravkoch môže byť obsiahnu-



Tabuľka 1.7.1. Chemická skupina, typové zlúčeniny, použitie, cieľové štruktúry a známe alebo možné mechanizmy účinku dezinfekčných látok používaných v zdravotníctve.

Biocíd	Reprezentatívne chemické látky	Využitie	Cieľové štruktúry a mechanizmus účinku
Alkoholy	etanol, izopropanol, n-propanol	Antisepsa, dezinfekcia, konzervácia	Penetračné činidlá, ktoré spôsobujú stratu funkcie bunkovej membrány, vedú k uvoľňovaniu intracelulárnych zložiek, denaturácii proteínov a inhibícií syntézy DNA, RNA, proteínu a peptidoglykánu.
Aldehydy	glutaraldehyd, formaldehyd	Dezinfekcia, konzervácia, sterilizácia	Látky vytvárajúce krížové väzby, interagujú s amínmi vo bunkovej stene, čo vedie k strate jej funkcie. Zosieťovanie tiolových, sulfhydrylových a aminoskupín vedie k inhibícii proteínov a syntézy DNA a RNA.
Biguanidy	chlórhexidín, alexidín	Antisepsa, znižovanie tvorby zubného plaku, dezinfekcia, konzervácia	Povrchovo (membránovo) aktívne činidlá, ktoré poškadzujú bunkovú stenu a vonkajšiu membránu, čo vedie k kolapsu membránového potenciálu a úniku intracelulárnych zložiek. Zvýšená pasívna difúzia sprostredkováva ďalšie vstrebávanie, čo spôsobuje zrážanie cytosolu.
Látky uvoľňujúce halogén	jód – anorganické – ki, organické – pvp iód chlór – anorganické – chlórnan sodný, organické-chloramín	Antisepsa, dezinfekcia, čistenie	Chlórové preparáty sú vysoko aktívne oxidačné činidlá, ktoré ničia aktivitu bunkových proteínov. Narušuje oxidačnú fosforyláciu a aktivity súvisiace s membránou. Jód reaguje s cysteínovými a metionínovými tiolovými skupinami, nukleotidmi a masnými kyselinami, čo vedie k bunkovej smrti.
Peroxo zlúčeniny	peroxid vodíka, kyselina peroxoocetová, organické (dichlorizokyanuran sodný) a anorganické peroxozlúčeniny (perboritany, peroxosířany)	Dezinfekcia	Peroxid vodíka a peroxozlúčeniny sú činidlá, vytvárajúce hydroxylové voľné radikály, ktoré fungujú ako oxidanty, ktoré masívne reagujú s lipidmi, proteínmi a DNA a tým narušia ich integritu a funkciu.
Fenoly, bisfenol	fenol, krezol, triklosan	Dezinfekcia, konzervácia antisepsa, deodorant, dezinfekcia, konzervácia	Prípravky, ktoré zvyšujú permeabilitu cytoplazmatickej membrány, čo vedie k postupnému úniku intracelulárnych zložiek. Priepustnosť protónovej pumpy vedie k rozptylu protónov a inhibícii oxidatívnej fosforylácie, dochádza ku koagulácii cytoplazmy a k lýze buniek. Činidlo, ktoré sa viaže na enoyl-acylovú nosičovú proteínovú reduktázu, čo spôsobuje inhibíciu biosyntézy masných kyselín.
Kvartérne amóniové zlúčeniny (KAZ)	benzalkónium-chlorid, cetrimid	Antisepsa, dezinfekcia, konzervácia, čistenie	Povrchovo (membránovo) aktívne činidlá, ktoré poškadzujú bunkovú stenu a cytoplazmatickú membránu, sprostredkované väzbou na fosfolipidy, čo vedie k strate štruktúrnej integrity cytoplazmatickej membrány; zvyšuje sa vnikanie germicídu do bunky a indukuje únik intracelulárnych zložiek a lýzu buniek.
Látky s plynnou fázou v zmesi s parou	etylénoxid, formaldehyd, peroxid vodíka (ionizovaný na studenú plazmu)	Dezinfekcia, sterilizácia	Etylénoxid a formaldehyd: alkylačné činidlá, ktoré reagujú s aminoskupinami, karboxylovými, sulfhydrylovými a hydroxylovými skupinami proteínov a skupinami nukleových kyselín, ktoré ovplyvňujú syntézu purínových nukleozidov a nukleových kyselín.

tý aj derivát fenolu. K týmto kombináciám látok sa používajú ešte neiónový, alebo kationový tenzid. Viaczložkové dezinfekčné látky sú vhodné na tzv. „jednotapový“ postup čistenia a dezinfekcie.

Mnohé dezinfekčné prostriedky sú dodávané ako **koncentráty**. Slúžia teda ako zásobné roztoky, ktoré sa podľa odporúčania výrobcu pred aplikáciou riedia na účinnú koncentráciu vo forme **pracovného roztoku**.

Koncentrácia pracovného roztoku zo zásobného sa vypočíta pomocou vzorca:

$$x = \frac{\text{požadované množstvo} \times \text{požadovaná koncentrácia}}{\text{východisková koncentrácia}}$$

Príklad: Príprava 1 l 0,5 % Persterilu z 10 % zásobného roztoku

$$x = \frac{1000 \text{ ml} \times 0,5 \%}{10 \%} = 50$$

50 ml 10 % Persterilu + 950 ml vody = 1 l 0,5 % roztoku Persterilu

Iné dezinfekčné roztoky sa dodávajú priamo ako pracovné (účinné) roztoky v príslušnej aplikačnej forme.

Alkoholy

V rámci biocídov sa používajú dve skupiny alkoholov. Sú to **alifatické** (etylalkohol, propylalkohol, izopropanol a iné) a **aromatické** (2-fenyletanol, 2-fenoxietanol, benzylalkohol a iné). Alifatické sa používajú ako dezinfekčné látky v koncen-

trácii 50 – 70 %, aromatické sa používajú ako konzervanty (benzylalkohol, fenyletanol, enoxyetanol) v koncentráciách 1 – 25 %. Chlórbutanol a bronopol, hoci patria medzi alifatické, sa tiež používajú ako konzervanty.

Sú rýchlo pôsobiace baktericídne, menej bakteriostatické látky, ktoré účinkujú na vegetatívne formy baktérií, ale nie sú schopné zničiť bakteriálne spóry. Sú aj tuberkulocídne, fungicídne a virocídne. Antimikrobiálne pôsobenie alkoholu spočíva najmä v denaturácii bielkovín. Čídna aktivita alkoholov prudko klesá pri koncentracii pod 50 %, optimálna baktericídna koncentrácia je 60 až 90 %. Etylalkohol v 100 % koncentracii je silne dehydratujúci a preto je menej baktericídny ako zmes alkoholu a vody, nakoľko bielkoviny sú denaturované rýchlejšie v prítomnosti vody. Čo sa týka účinku alkoholov proti baktériam, G- baktérie sú citlivejšie ako G+. Už 40 % koncentrácia etylalkoholu dokáže v priebehu 10 sekúnd inaktivovať baktérie druhov *Serratia marcescens*, *E. coli* a *Salmonella typhi*. *Staphylococcus aureus* a *Streptococcus pyogenes* sú inaktivované v priebehu 10 sekúnd etylalkoholom až pri koncentrácii 60 – 95 %. Izopropylalkohol (isopropanol) je o niečo viac baktericídne účinný ako etylalkohol tak pre *E. coli*, ako aj *S. aureus*. 95 % etanol inaktivuje *Mycobacterium tuberculosis* v spúte alebo vo vode v priebehu 15 sekúnd. Etylalkohol, pri koncentraciách 60 – 80 %, je silne virocídny, inaktivuje všetky obalené vírusy (napr. herpes simplex vírus 1/2, vírus chrípky) a mnohé neobalené vírusy (napr. adenovírus, enterovírus, rhinovírus alebo rotavírus), ale nie je tak účinný na vírus hepatitídy typu A alebo poliovírus. Izopropyl alkohol nie je účinný ani voči iným enterovírusom (t.j. poliovírus, coxsackie vírus).

Pri testovaní cidného účinku na patogénne mikromycéty etylalkohol (70%) inaktivoval *Cryptococcus neoformans*, *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis* a *Histoplasma capsulatum* pri invazívnej fáze v tkanivách do 1 minúty, ale pri raste na kultivačných pôdach až po 20 minútach.

Peroxo zlúčeniny a iné oxidačné látky

PEROXID VODÍKA

Je látka s výbornou germicídnou aktivitou so širokým spektrom účinku. Má baktericídne, virocidné, sporocídne a fungicídne vlastnosti a predstavuje tak jednak chemický sterilant (vo forme plazmy), ako aj dezinfekčný prostriedok.

Peroxid vodíka vytvára voľné radikály hydroxylov, ktoré deštruuujú membránové lipidy, DNA a iné časti buniek. Peroxid vodíka vzniká prirodzene v bukách mnohých mikroorganizmov rozkladom hyperoxidov superoxidu dismutázou (SOD). Je vedľajším produktom degradácie purínov a oxidácie mastných kyselín a mohol by tak poškodiť genóm a proteíny. Kataláza, produkovaná aeróbnymi organizmami a fakultatívnymi anaeróbnymi, ktoré majú cytochrómové systémy, môže chrániť bunky pred endogénnym peroxidom vodíka (vznikajúcim v rámci niektorých metabolických dejov) tým, že degraduje peroxid vodíka na vodu a kyslík. Iné baktérie, ktoré nemajú katalázu (napr. *Enterococcus faecalis*), majú iné enzýmy, ktoré dokážu rozkladať peroxid vodíka pomocou iných enzýmov, napr. glutathion peroxidázy alebo NADH peroxidázy. Táto enzýmová ochrana je však neúčinná pri koncentráciách peroxidu vodíka používaných v dezinfekčných prostriedkoch, napriek tomu ovplyvňuje razáciu jeho účinku. Baktérie *S. aureus*, *S. marcescens* a *Proteus mirabilis* odolávali účinkom 0,6% roztoku peroxidu vodíka asi trojnásobne dlhšie ako tie baktérie, ktorých katalázy sú menej účinné, resp. nie sú v bunke v podobnej kvantite. Eukaryotické mikroorganizmy (*C. albicans*, *A. niger*) sú odolnejšie ako prokaryonty (baktérie) na účinnok peroxidov, omnoho odolnejšie sú však bakteriálne spóry. Úplná inaktivácia spór (*Bacillus* spp.) v denzite 10^6 sa dosiahla pomocou peroxidu vodíka s koncentráciou 10% a časom expozície 60 minút. Peroxid vodíka v koncentrácii 7,5% podľa výsledkov štúdií inaktivoval suspenziu s hustotou viac ako 10^5 baktérií polyrezistentného kmeňa *M. tuberculosis* po 10-minútovej expozícii. Tridsať minút bolo potrebných na >99,9% inaktiváciu poliovírusu a HAV. Roztok peroxidu vodíka s koncentráciou 3,0% bol v testoch neúčinný proti VRE po 3 a 10 minútach expozície a spôsobil iba zníženie počtu cýst *Acanthamoeba* spp. o 2-log 10 v priebehu približne 2 hodín. Koncentrácie peroxidu vodíka od 6% do 25% sa môžu upožívať za chemické sterilanty. V jednej štúdií bol 6% peroxid vodíka účinnejší pri vysokoúrovňovej dezinfekcii flexibilných endoskopov, ako 2% roztok glutaraldehydu. Nový, rýchlo pôsobiaci prostriedok na báze 13,4% peroxidu vodíka preukázal účinok sporocídny, mykobaktericídny, fungicídny a virocidny. Podľa údajov výrobcu pripravok sterilizuje za 30 minút a poskytuje vysokoúrovňovú dezinfekciu za 5 minút.

Za normálnych podmienok je peroxid vodíka mimoriadne stabilný, ak je správne skladovaný (napr. v tmavých nádobách). Rozklad alebo strata účinnosti v malých nádobách je nižšia ako 2% ročne pri bežných teplotách prostredia.

Komerčne dostupný 3% peroxid vodíka je stabilný a účinný dezinfekčný prostriedok, ak sa používa na živých, ako aj neživých povrchoch. Peroxid vodíka sa používa aj v koncentráciách od 3% do 6%, a to na dezinfekciu mäkkých kontaktných šošoviek (napr. 3% počas 2 – 3 hodín), tonometrov, ventilátorov, tkanín a endoskopov. Iné využitie predstavuje instilácia peroxidu vodíka do zberného vaku na moč, pričom znižuje mikrobiálnu kontamináciu vaku (tento postup však pri klinickej štúdií neznižil výskyt bakteriúrie spojenej s katétrom).

Pri peroxide vodíka neboli bežne pozorované problémy ako je zápach alebo toxicita. Boli ale hlásené prípady chemického podráždenia, pripomínajúce pseudomembranóznu kolitídu spôsobenú 3% peroxidom vodíka (podobne ako 2% glutaraldehydom) na gastrokopických pracoviskách, spojených s nedostatočným opláchnutím peroxidu vodíka z endoskopu.

Rovnako ako pri iných chemických sterilantoch sa musí riešenie peroxidu vodíka monitorovať pravidelným testovaním minimálnej účinnej koncentrácie (t.j. 6,0 až 7,5%) a to tak z dôvodu zachovania sterilizačnej účinnosti, ako aj materiállovej znášanlivosti.

KYSELINA PEROCTOVÁ

Kyselina peroctová (peroxyoctová kyselina, Persteril) sa vyznačuje rýchlym pôsobením na všetky mikroorganizmy. Uľahčuje odstraňovanie organického materiálu a nezanedbáva žiadne zvyšky. Zostáva účinná v prítomnosti organickej hmoty a je sporocídna aj pri nízkych teplotách. Kyselina peroctová môže korodovať meď, mosadz, bronz, čistú oceľ a pozinkované železo, ale tieto účinky môžu byť redukované aditívami a úpravou pH. Považuje sa za nestabilnú, zvlášť keď sa zriedi, napríklad na 1% roztok, stratí polovicu svojej účinnosti hydrolyzou za 6 dní, zatiaľ čo 40% roztok kyseliny peroctovej stratí 1 – 2% svojej účinnosti za mesiac. Mechanizmus účinku je podobný ako pri iných oxidačných činidlách – to znamená, že denaturuje proteíny, narušuje priepustnosť bunkovej steny a oxiduje tiolové a disulfidické väzby v proteínoch, enzýmoch a iných metabolitoch. Pracovné roztoky Persterilu majú obvykle koncentráciu 0,2 – 1%, odporúča sa expozícia cca 15 min. Pri príprave pracovných roztokov, ktoré sú pripravované zo zásobného roztoku Persterilu (10%), je potrebné roztok uchovávať v chladničke v tme. Kyselina peroctová inaktívuje bežné grampozitívne a gramnegatívne baktérie, huby a kvasinky počas < 5 minút pri 0,02% koncentrácii. V prítomnosti organickej hmoty sa vyžaduje 0,02 až 0,05%. Pri vírusoch je rozsah účinných koncentrácií široký (0,012 – 0,22%), napr. pri poliovírise dôjde k inaktivácii s 0,15 – 0,25% roztokom Persterilu za 15 minút. V jednej štúdií bola 3,5% kyselina peroctová neúčinná proti HAV po 1-minútovom vystavení s použitím nosičového testu. Kyselina peroctová (0,26%) bola v inom teste účinná na všetky testované kmene mykobaktérií (*M. tuberculosis*, *M. avium-intracellulare*, *M. chelonae* a *M. fortuitum*) v priebehu 20 až 30 minút bez ohľadu na organickú záťaž. V teste so suspenziami bakteriálnych spór Persteril spoľahlivo inaktivoval spóry v koncentrácii 1% v expozičnom čase 30 minút, čo z neho robí ideálny prostriedok pri eradikácii klostriediových spór v nemocničnom prostredí.

INÉ OXIDAČNÉ ZLÚČENINY

Manganistan draselný (hypermangán, KMnO_4) je silne oxidačná zlúčenina mangánu a tvorí čierno-šedé kryštáliky, ktoré sa veľmi dobre rozpúšťajú vo vode za vzniku fialového roztoku, ktorý vo vyšších koncentráciách silne odmasťuje lipofilom na pokožke. Preto sa používa v liečbe ako antiseptikum vo forme zriedeného roztoku (ružové zafarbenie), napr. vo forme kúpeľov alebo v mokrých obväzoch na hojenie povrchových rán, vredov a lézií spôsobených hubami pri tinea pedis a baktériami pri pemfigu a impetigu.

Medzi dezinfekčné látky s využitím aj v zdravotníctve patria aj anorganické peroxozlúčeniny, napr. perboritan sodný, persíran draselný, peroxouhlíčan sodný s vysokou bieliacou účinnosťou (dezinfekcia plôch a textilu) a ozón (dezinfekcia vody a priestorov).

Zlúčeniny s aktívnym chlóróm

Dezinfekčné prostriedky na báze aktívneho chlóru majú široké spektrum antimikrobiálnej aktivity, sú rýchlo účinkujúce, nezanedbávajú toxické zvyšky, ich účinnosť nie je ovplyvnená tvrdosťou vody, sú lacné a majú navyše aj bieliace účinky na textilie. Účinkujú na biofilmy, a to aj na vyschnuté alebo pevne prichytené na povrchoch. Pri používaní chlórových preparátov sa len ojedinele vyskytli závažnejšie prejavy toxicity. Chlornan sodný (NaClO , NaOCl , hypochlorid u nás napr. preparáty Savo alebo Domestos) je anorganická zlúčenina chlóru, získava mikrobiocídny účinok tvorbou nedisociovanej kyseliny chlórnej (HOCl). Miera disociácie HOCl na menej účinnú formu (ión chlornanu OCl^-) závisí od pH. Dezinfekčná účinnosť chlóru kle-

sá s nárastom pH. Potenciálne nebezpečenstvo jeho používania predstavuje vznik karcinogénu bis(chlorometyl)éteru pri kontakte chlórnanu s formaldehydom, alebo tvorbou živočíšneho karcinogénu trihalometánu v prípade, keď koncentrácia chlórnanu v teplej vode dosiahne kritickú hodnotu. Výhodou organických zlúčenín, uvoľňujúcich aktívny chlór, oproti chlórnanu je, že pomalšie uvoľňujú chlór a majú tak dlhší baktericídny účinok. Mikrobicídna účinnosť roztokov pripravených z tabliet s dichlórizokyanurátom sodným, teda organickou zlúčeninou chlóru, je väčšia ako roztoku chlórnanu sodného, hoci obsahujúce rovnaké množstvo celkovo dostupného chlóru. Nízke koncentrácie dostupného, teda voľného chlóru (napr. HOCl, OCl⁻ a elementárneho chlóru Cl₂) sú biocídne pre mykoplasmy a vegetatívne formy baktérií v priebehu niekoľkých sekúnd, pokiaľ nebolo prítomné organické zaťaženie (krv, sérum). Vyššie koncentrácie chlóru (2% roztok) sú potrebné na usmrtenie *M. tuberculosis*, ešte vyššia koncentrácia (5%) v priebehu 5 minút usmrť ≥ 99,9% spór *B. atrophaeus*. Chlórnan sodný v 5% roztoku inaktivuje spóry *Clostridioides difficile* v hustote 10⁶ v čase < 10 minút. Používa v koncentráciách od 3 do 6%. V stomatológii sa v nízkoobjemových množstvách používa aj ako antiseptikum na dezinfekciu koreňových kanálikov.

Chloramíny patria medzi organické zlúčeniny, ktoré vo vodnom roztoku uvoľňujú aktívny chlór. Majú baktericídnu, fungicídnu a virocidnú aktivitu. Pri vyššej koncentrácii a dlhšej expozícii ničia aj neobalené vírusy a spóry. Mechanizmom účinku je uvoľňovanie chlóru, ktoré je menej razantné. Možno ho urýchliť pridaním amónnych solí. Najčastejšie sa používajú benzenchloramín (Chloramin B) a tozylchloramid sodný (Chloramin T).

Iným chóróvým preparátom, ktorý sa používa v zdravotníctve, ale aj na dezinfekciu v komunálnej sfére (bazény, studne), je dichlórizokyanuran sodný (u nás sa predáva pod názvom Dikonit), obsahuje až 6,5% aktívneho chlóru. Pôsobí účinne a rýchlo. Nesmie sa miešať s horúcou vodou ani s kyselinami z dôvodu rýchleho rozpadu a uvoľňovania dráždivého plynu. Ide o zlúčeninu s najvyšším antimikróbnym účinkom medzi chlóróvymi preparátmi. V teréne a pri katastrofických udalostiach (záplavy, zemetrasenie, vojenské útoky a pod.) sa často používa chlórnan vápenatý Ca(ClO)₂, teda chlóróvé vápno.

Zdôvodnenie antimikróbného účinku chlóru nie je presne známe, ale ide o komplexný dej, v ktorom dochádza ku oxidácii enzýmov a aminokyselín, väzbe chlóru na aminokyseliny, strate intracelulárneho obsahu, zníženiu príjmu živín, inhibícii syntézy bielkovín, zníženej absorpcii kyslíka, oxidácii respiračných enzýmov, zníženiu tvorby adenosíntrifosfátu, zlomom v DNA a zastaveniu syntézy DNA. Vyššie koncentrácie chlóru pôsobia korozívne na kovy a poškodzujú plasty. Uvoľnený chlór jednak spôsobuje charakteristický nepríjemný zápach, a jednak je dráždivý, najmä pre sliznice, ale aj pokožku.

Jód, jódové vodné alebo alkoholové roztoky (tinktúry) a jodofóry

Vodné alebo alkoholové (tinktúrne) roztoky jódu sa v zdravotníctve používajú už viac 150 rokov ako antiseptiká a aj dezinfekčné prostriedky. Známy je napr. Lugolov roztok (5 g jódu – I₂ a 10 g jodidu draselného – KI v 85 ml destilovanej vody) alebo jódová tinktúra (10 g I₂ a 90 ml etanolu), ktoré sa v minulosti často používali na dezinfekciu a antiseptiku. Napriek vynikajúcim antimikróbnym vlastnostiam sú spojené s niektorými nežiaducimi účinkami, napr. podráždením kože či slizníc a nadmerným zafarbením dezinfikovaného povrchu. Vodné roztoky jódu sú vo všeobecnosti nestabilné; v roztoku je prítomných najmenej sedem foriem jódu v komplexnej rovnováhe, pričom primárne zodpovedná za antimikrobiálnu účinnosť je molekula jódu (I₂). Uvedené problémy boli prekonané vývojom jodofórov („nosičov jódu“ alebo látok uvoľňujúcich jód) v 60. rokoch 20. storočia. Najpoužívanejšie sú povidón (polyvinylpyrrolidón – PVP) – jód a poloxamér-jód v antiseptických a dezinfekčných prostriedkoch.

Jodofory sú komplexy jódu a solubilizujúceho činidla alebo nosiča, ktorý pôsobí ako zásobník aktívneho „voľného“ jódu. Vodné roztoky jodofórov (napr. vodou riedený Jodisol) sa považujú za menej aktívne proti určitým hubám a spóram než tinktúry. Jód je aj menej reaktívny ako chlór. Povidón-jód a iné jodofóry si zachovávajú baktericídny účinok jódu, ale na rozdiel od anorganického jódu sú vo všeobecnosti neškodné, relatívne netoxické a nedráždivé. Riedením jodofórov sa dosiahne rýchlejší baktericídny účinok ako má koncentrovaný povidón-jódový roztok. Testovanie komerčných PVP-jódových prípravkov dokázali rýchlejšie usmrtenie (sekundy až minúty) *S. aureus* a *M. chelonae* pri riedení 1:100 oproti tomu, ako to dokázal zásobný koncentrovaný roztok prípravku. Dôvod, prečo zriedenie zvyšuje baktericídnu aktivitu, nie je úplne jasný, ale predpokladá sa, že zriedenie povidón-jódu môže oslabiť jódovú väzbu na nosičový polymér so spríevodným zvýšením voľného jódu v roztoku. Koncentrované jodofóry sa musia riediť podľa údajov výrobcu tak, aby sa dosiahla požadovaná antimikrobiálna aktivita.

Mechanizmus účinku je v tom, že jód môže rýchlo preniknúť do bunky mikroorganizmov a predpokladá sa, že letálne účinky sú dôsledkom narušenia štruktúry a syntézy proteínov, navyše sa na kľúčové skupiny proteínov (najmä aminokyseliny s thiolovou skupinou – cysteín a metionín) a na nukleové kyseliny.

Jodofóry sú baktericídne, mykobaktericídne a virocidné, ale vyžadujú predĺženie kontaktného času na usmrtenie niektorých húb a baktérií. Komerčné jodofory nie sú sporocídne. Platí pri nich všeobecné pravidlo, že neobalené RNA vírusy a parvovírusy sú menej citlivé ako vírusy obalené. Účinnosť jodofórov proti poliovírusu v prítomnosti organických látok bola v testoch znížená, čo dokazuje bielkovinovú záťaž pri jódových preparátoch. Nie sú teda až tak vhodné na dezinfekciu predmetov, kontaminovaných krvou alebo sekrétmi. Dezinfekčné prostriedky na báze jódu by sa nemali používať na silikónových katétroch, pretože poškodzuje silikónové materiály. Naopak, jodofóry majú výbornú biokompatibilitu a sú preto často používne ako antiseptikum (napr. v preparáte Betadine).

Aldehydy

FORMALDEHYD

je dezinfekčný prostriedok a sterilant podľa toho, v akom skupenstve sa na dekontamináciu konkrétne používa. Kvapalný formaldehyd sa používal ako dezinfekčná látka, plyný sa používa ako chemosterilant. Formaldehyd ako vodný roztok sa nazýva formalín a distribuje sa ako 37% roztok formaldehydu. Formalín je baktericídny, tuberkulocídny, fungicídny, virocidný a čiastočne sporocídny. Inaktivuje mikroorganizmy alkyláciou aminoskupiny a sulhydrálových skupín proteínov a atómov dusíka purínových báz.

Napriek tomu, že formaldehyd je v plynnom skupenstve chemický sterilant a v kvapalnom vysokoúčinný dezinfekčný prostriedok, jeho použitie v zdravotníctve je limitované. Formaldehyd sa považuje za mutagén a na pracovisku je potrebné s ním zaobchádzať ako s potenciálnym karcinogénom. Sliznice dýchacieho traktu sú dráždené jeho výparmi a jeho štiplavým zápachom už v nízkych koncentráciách. Preto sa musia dodržiavať normy pre povolenú expozíciu zamestnancov, ktoré obmedzujú 8 hodinovú priemernú koncentráciu formaldehydu v ovzduší. Náhodné požitie formaldehydu môže byť smrteľné, dlhodobá expozícia parám formaldehydu vo vzduchu aj v nízkych koncentráciách pri vdychovaní alebo pri kontakte s pokožkou spôsobujú dýchacie problémy podobné astme a podráždenie pokožky, ako je napr. dermatitída a svrbenie.

Rôzne koncentrácie vodných roztokov formaldehydu sú účinné na širokú škálu mikroorganizmov. Inaktivácia poliovírusu počas 10 minút sa dosiahne 8% koncentráciou formalínu, ostatné vírusy sú inaktivované 2% formalínom. 4% formalín je tuberkulocídny, inaktivuje inokulum 10⁴ bacilov *M. tuberculosis* za 2 minúty. Roztok formaldehydu v koncentrácii 2,5% inaktivuje inokulum s hustotou asi 10⁷ baktérií *Salmonella Typhi* za

10 minút a to aj v prítomnosti organickej hmoty. Sporocídny účinok formaldehydu je pomalší ako pri glutaraldehyde. Pri porovnaní 4 % formalínu a 2 % glutaraldehydu na spórach *B. anthracis* sa dokázalo, že pri roztoku formaldehydu boli potrebné 2 hodiny kontaktu, aby sa dosiahol inaktivačný faktor 10^4 , pri glutaraldehyde sa tento efekt dosiahol už za 15 minút.

Formalín sa používa v zdravotníctve na prípravu vírusových vakcín (napr. poliovírus a chrípka) a ako prostriedok na konzerváciu anatomických vzoriek. Formalín sa používa na dezinfekciu hemodialyzačných zariadení. Aby sa minimalizovalo riziko možného zdravotného rizika pre dialyzovaných pacientov, dialyzačné zariadenie musí byť pred použitím dôkladne prepláchnuté dialyzačným roztokom a pravidelne testované na zvyškový formaldehyd.

Paraformaldehyd, pevný polymér formaldehydu, ktorý vzniká aj spontánne pri dlhodobejšom skladovaní formaldehydu, sa môže použiť aj v mikrobiologických laboratóriách na dekontamináciu boxov s laminárnym prúdením pred ich údržbou alebo výmenou filtra, kedy sa vyžaduje prístup dezinfekčnej látky (pár formaldehydu) do uzavretej časti lamináru. Jeho odparovanie sa zabezpečí zahrievaním polyméru.

GLUTARALDEHYD

Glutaraldehyd je nasýtený dialdehyd, ktorý v zdravotníctve získal široké uplatnenie ako vysokoúčinný dezinfekčný prostriedok a chemický sterilant. Vodný roztok glutaraldehydu je kyslý a vo všeobecnosti v tomto stave nie je sporocídny. Ak je roztok „aktivovaný“ (alkalizovaný) s použitím alkalizačných činidiel (napr. s hydrogenuhličitanom sodným) na pH 7,5 – 8,5, roztok sa stáva sporocídnym. Po aktivácii majú tieto roztoky životnosť minimálne 14 dní, no pri alkalických hodnotách pH dochádza ku polymerizácii molekúl glutaraldehydu. Táto polymerizácia blokuje aktívne miesta (aldehydové skupiny) molekúl glutaraldehydu, ktoré sú zodpovedné za svoju biocídnu aktivitu. Biocídna aktivita glutaraldehydu je výsledkom alkylácie sulfhydrylových, hydroxylových, karboxylových a aminokupín mikroorganizmov, ktoré menia syntézu RNA, DNA a proteínov. Nové formulácie glutaraldehydu sú už vyrábané ako stabilizované a alkalické (napr. glutaraldehyd-fenol-nátriumfenát). Tieto prípravky už obsahujú len neutrálne alebo alkalické glutaraldehydy, ktoré majú vysokoúčinné mikrobiocídne a antikoročné vlastnosti. Ich aktivita sa neoslabuje ani v prítomnosti organickej bielkovinovej záťaže (20 % hovädzie sérum). Nepoškodzujú a nepôsobia korozívne na endoskopické zariadenia, teplomery, gumu alebo plastové zariadenia.

In vitro vodné roztoky ≥ 2 % glutaraldehydu, pufrovaných na pH 7,5 – 8,5 s hydrogenuhličitanom sodným, účinne usmrčuje vegetatívne baktérie za < 2 minúty, *M. tuberculosis*, huby a vírusy < 10 minút a spóry rodov *Bacillus* spp. a *Clostridium* spp. za 3 hodiny. Ako ukázali niektoré štúdie, sú mikroorganizmy, ktoré majú vyššiu prirodzenú rezistenciu na glutaraldehyd, vrátane niektorých mykobaktérií (*M. chelonae*, *Mycobacterium avium-intracellulare*, *M. xenopi*), askospór niektorých húb (napr. *Microascus cinereus*, *Cheatomium globosum*), huby *Trichosporon* spp., ako aj parazitické prvoky *Cryptosporidium* spp. Napr. druh mykobaktérií – *M. chelonae* dlhodobo prežíval niekoľko hodín v 0, 2 % roztoku glutaraldehydu, používanom na skladovanie prasačích protetických srdcových chlopní. Aj odolnosť *M. tuberculosis* voči glutaraldehydu je vyššia v porovnaní s alkoholmi, formaldehydom, jódom a fenolom. Preto sa pri dezinfekcii používajú > 2 % roztoky glutaraldehydu, minimálne pri izbovej teplote, s expozičnou dobou viac ako 20 minút. Pri opakovanom používaní roztoku sa musí pomocou testovacích prúžkov kontrolovať koncentrácia glutaraldehydu, nakoľko dochádza k jeho postupnému zriedovaniu a tým aj k znižovaniu účinku.

Glutaraldehyd sa najčastejšie používa ako vysokoúčinný dezinfekčný prostriedok pre zdravotnícke pomôcky a zariadenia, ako sú endoskopy, rúrky spirometrov, respirátory, dialyzačné a anestéziologické zariadenia. Reziédu dezinfekčného roztoku

glutaraldehydu na endoskopochoch môžu vyvolať kolitídu, čomu sa dá predísť starostlivým oplachom endoskopu vodou.

Akútne alebo chronické vystavenie organizmu glutaraldehydu môže mať za následok podráždenie pokožky alebo dermatitídu, podráždenie slizníc (oko, nos, ústa) alebo problémy s dýchaním. Glutaraldehyd by sa nemal používať na pravidelné čistenie veľkoplošných povrchov (podlahy, sanita, keramické obklady). Expozičným výparom glutaraldehydu sa musí predísť výmenou vzduchu buď vzduchotechnicky, alebo vetraním.

ORTO-FTALALDEHYD (OPA)

OPA je nový typ dezinfekčného prostriedku, ktorý má silnú baktericídnu a sporocídnu aktivitu a bol navrhnutý ako náhrada za glutaraldehyd pri dezinfekcii endoskopov v koncentrácii 0,575 % roztoku. OPA je aromatická zlúčenina s dvoma aldehydovými skupinami. OPA má vynikajúcu mykobaktericídnu aktivitu (5-log₁₀ redukcia za 5 minút), teda lepšiu ako glutaraldehyd. Priemerný čas potrebný na dosiahnutie 6-log₁₀ redukcie *M. bovis* s použitím 0,21 % OPA bol 6 minút v porovnaní s 32 minútami s použitím 1,5 % glutaraldehydu. OPA vykazoval dobrú aktivitu proti testovaným mykobaktériám, vrátane kmeňov rezistentných na glutaraldehyd. Roztok 0,5 % OPA nebol sporocídny pri expozičii trvajúcej 270 minút. Zvyšovanie pH z 6,5 (normálne pH) na pH 8 zlepšila účinnosť OPA. Úroveň biocídnej aktivity priamo súvisí s teplotou. K zníženiu počtu spór *B. atrophaeus* o viac ako 5-log₁₀ pri 35 °C došlo za 3 hodiny, ale pri 20 °C až za 24 hodín. Pri testoch účinnosti klesala biocídna aktivita OPA s rastúcou koncentráciou séra pridávaného do suspenzie testovaných baktérií, jeho účinnosť teda ovplyvňuje bielkovinová záťaž.

Kvartérne amóniové zlúčeniny

Kvartérne amóniové zlúčeniny (bežne známe ako KAZ, angl. quats alebo QAC) sú kationové povrchovo aktívne látky, ktoré kombinujú baktericídne, fungicídne a čiastočne virocidné (len obalené vírusy) s dobrým detergentným účinkom a tým aj s čistiacou schopnosťou. Sú neúčinné proti mykobaktériám (pokiaľ nie sú v kombinácii s inými látkami ako sú alkoholy, ktoré umožňujú ich penetráciu do štruktúry mykobakteriálnej bunkovej steny) a sú všeobecne neaktívne proti neobaleným vírusom. Hoci iné typy povrchovo aktívnych látok, ako sú aniónové, neiónové a amfotérne povrchovo aktívne látky (s ohľadom na ich celkový náboj) majú určitú antimikrobiálnu účinnosť, kationové povrchovo aktívne látky (a niektoré amfotérne látky) majú najväčšiu antimikrobiálnu aktivitu. Patria sem hexadecyltrimetylamónium (cetrimid), benzalkóniumchlorid (alkyldimetylamóniumchlorid), benzododecylmóniumbromid (účinná látka v dezinfekčnom prostriedku Ajatin), karbetopendecíniumbromid (účinná látka v dezinfekčnom prostriedku Septonex), alkyl-didecyl-dimetylamóniumchlorid, dialkyldimetylamóniumchlorid a iné.

Kvartérne štruktúra amóniových zlúčenín ako povrchovo aktívnych látok umožňuje ničiť mikroorganizmy vďaka ich schopnosti prenikať do cieľových buniek. Medzi hlavné vlastnosti KAZ patrí znižovanie povrchového napätia, inaktivácia enzýmov a denaturácia proteínov. V dôsledku ich naviazania na cytoplazmatickú membránu mikroorganizmov sa mení jej priepustnosť. To je dané tým, že bunková membrána pozostáva z vnútornej hydrofóbnej a vonkajšej hydrofilnej vrstvy a molekuly KAZ svojimi silným hydrofóbnymi a hydrofilnými skupinami menia fyzikálno-chemické vlastnosti bunkových membrán. To má za následok únik intracelulárnych nízkomolekulárnych látok, degradácii proteínov, nukleových kyselín, bunkovej steny a tiež bunkovú lýzu pomocou autolytických enzýmov. Účinnosť KAZ je optimálna v alkalickom a neutrálnom pH (okolo 6 – 10), čo obmedzuje ich použiteľnosť v kyslom prostredí. Výbornú účinnosť prejavujú KAZ na G+ koky a kandidy. Naopak, v bežnej koncentrácii pracovných roztokov v nich môžu prežiť alebo rásť niektoré gramnegatívne baktérie, najmä nozokomiálne kmene (pseudomonády, acinetobaktérie a iné.). Praktickou výhodou KAZ je ich minimálny ko-

rozivný účinok na dezinfikované materiály a výrazný čistiaci efekt, čo ich disponuje na ideálny prostriedok na čistenie a dezinfekciu predmetov (vrátane elektroniky) a plôch v komunálnej sfére, použitie v nemocničnej sfére má však kvôli rastúcej rezistencii svoje limity a je nutná ich kombinácia alebo rotácia s inými dezinfekčnými látkami.

Ich účinnosť ovplyvňuje vysoká tvrdosť vody a nasiakavé materiály, ako sú napríklad bavlnené a gázové tampóny, ktoré môžu spôsobiť, že KAZ sú menej mikrobicídne, pretože nerozpustné minerálne zrazeniny alebo bavlna absorbujú účinné zložky. Ako často používané antiseptikum môžu pri styku s pokožkou ojedinele vyvolať jej iritáciu a vznik alergických reakcií, závažné následky môže mať ich vnútorné požitie – od nauzei a zvracania, až po kómu a úmrtie (v závislosti od koncentrácie).

Fenol a jeho deriváty

Deriváty fenolu vznikajú nahradením jedného z atómov vodíka na aromatickom kruhu fenolu inou funkčnou skupinou (napríklad alkyl, fenyl, benzyl, halogén). Deriváty fenolu, ktoré sa bežne vyskytujú ako zložky dezinfekčných prostriedkov používaných v nemocničnom prostredí, sú ortofenylfenol a orto-benzyl-para-chlórphenol. **Antimikrobiálne vlastnosti týchto zlúčenín a mnoho ďalších fenolových derivátov sú oveľa lepšie ako vlastnosti pôvodnej látky, teda fenolu.** Vo vyšších koncentráciách fenol pôsobí ako silný protoplazmatický jed, preniká bunkovou stenou a cytoplazmatickou membránou, ktorú narúša a vyvoláva vyžrážanie intracelulárnych proteínov. Nižšie koncentrácie fenolu a fenolových derivátov spôsobujú cídnu baktérii inaktiváciou základných enzýmových systémov v ich bunkách a vyvolaním úniku základných metabolitov z bunky. Testovanie antimikrobiálnej účinnosti bežne používaných fenolov ukázala, že sú baktericídne, fungicídne, virocídne pre obalené vírusy, nie sú účinné na neobalené vírusy (podľa testov na coxsackie B4, echovírus 11 a poliovírus, ktoré nedokázal inaktivovať). Účinné sú aj na väčšinu mikromycét. Komerčné fenolové prostriedky nie sú sporocídne, ale sú **výrazne tuberkulocídne** pri používaní v odporúčanom riedení a expozičnej dobe. Ak sa na čistenie a dezinfekciu používajú fenoly, musia sa zriediť podľa odporúčania na štítku výrobku. Fenolové dezinfekčné prostriedky sú absorbované poréznymi materiálmi a ich reziduá môže dráždiť pokožku s rôznymi následkami, napr. vznik depigmentácie kože spôsobenú detergentmi obsahujúcimi para-terciárny butylfenol a para-terciárny amylfenol. **Použitie fenolových látok v novorodeneckých a pediatrických zariadeniach sa neodporúča** kvôli ním vyvolávanému hyperbilirubínemiu u dojčiat. Okrem toho sa pozorovalo aj zvýšenie hladín bilirubínu u detí vystavených fenolom v porovnaní s deťmi, ktoré neboli vystavené fenolom. Fenoly (a niektoré iné dezinfekčné prostriedky) by sa nemali používať na čistenie detských lôžok a inkubátorov, pokiaľ sú v nich umiestnené deti. Zbytky fenolových prostriedkov, použitých na záverečné čistenie detských hračiek a inkubátorov je preto potrebné odstrániť, povrchy sa musia po dezinfekcii dôkladne opláchnuť vodou a vysušiť pred opätovným použitím pre detských pacientov a klientov. K skupine fenolových derivátov sa dá priradiť aj **triklosan** s podstatne nižšou toxicitou. Je to chlórovaná aromatická zlúčenina, ktorá obsahuje éterové a fenolové funkčné skupiny a má silný antibakteriálny a fungicídny účinok. Používa sa ako konzervačná látka na zabránenie rastu mikroorganizmov vo výrobkoch alebo ako účinná látka na primárnu dezinfekciu pokožky, slizníc a zubov, povrchov, vzduchu, vody a pod. Triklosan sa používa aj ako účinná látka do výrobkov pre telesnú hygienu (v maximálnej koncentrácii 0,3 %), napr. antiseptické, dezinfekčné, antimikrobiálne výrobky (mydlá a gély na pokožku) na osobnú hygienu, ústne vody a zubné pasty na prevenciu proti zápalom v ústnej dutine.

Biguanidíny

CHLÓRHEXIDÍN GLUKONÁT

Chlorhexidín glukonát je pravdepodobne najpoužívanejší biocíd v antiseptických výrobkoch, najmä pri umývaní rúk a vý-

robkoch ústnej hygieny, ale aj ako dezinfekčný a konzervačný prostriedok. Dôvodom je najmä jeho širokospektrálna účinnosť, dobrá kožná znášanlivosť a nízka dráždivosť, hoci podráždenie pokožky už bolo opakovane opísané (v mnohých prípadoch to mohlo byť špecificky pre daný produkt). Napriek viacerým výhodám chlórhexidínu, má aj slabšie stránky, napr. jeho aktivita závisí od pH a je výrazne znížená v prítomnosti organickej záťaže. Chlórhexidín je baktericídny, fungicídny a čiastočne virocídny prostriedok. Jeho vychytávanie baktériami a kvasinkami sa ukázalo ako extrémne rýchle, pričom maximálny účinok sa vyskytol v priebehu 20 s. Dochádza k poškodeniu vonkajších bunkových vrstiev, ale nie je dostatočné na vyvolanie lýzy alebo smrti buniek. Látka potom prechádza vonkajšou membránou aj bunkovou stenou, pravdepodobne pasívnou difúziou, a následne deštruuje bakteriálnu alebo kvasinkovú cytoplazmatickú membránu. Po poškodení membrány dôjde k úniku intracelulárnych zložiek, čo má za dôsledok bunkovú smrť. Vysoké koncentrácie chlórhexidínu spôsobujú zrážanie intracelulárnych zložiek – koaguláciu cytosolu. Mykobaktérie sú vo všeobecnosti vysoko odolné voči chlórhexidínu, preto sa chlorhexidín občas používa na dekontamináciu spúta pri mykobakteriálnej kultivácii (namieto NaOH). *Mycobacterium avium-intracellulare* je zreteľne odolnejší než iné mykobaktérie. Chlorhexidín nie je sporocídny. Dokonca aj vysoké koncentrácie biguanidínov neovplyvňujú životaschopnosť spór *Bacillus* spp. pri izbových teplotách, no pri zvýšených teplotách možno dokázať jeho čiastočný sporocídny účinok.

Chlorhexidín má malý účinok na klíčenie bakteriálnych spór. Antivírusová aktivita chlórhexidínu je rôzna pri rôznych typoch vírusov. Jeho aktivita je obmedzená len na obalené vírusy. Chlórhexidín neinaktivuje neobalené vírusy, ako je rotavírus, HAV alebo poliovírus. Chlorhexidín tak nie je považovaný za zvlášť účinnú virocídnu látku.

ALEXIDÍN

Alexidín sa chemicky líši od chlórhexidínu tým, že má etylhexylové koncové skupiny. Alexidín je rýchlejšie pôsobiaci baktericídny prostriedok a vyvoláva významne rýchlejšiu zmenu permeability bakteriálnej membrány ako chlórhexidín.

POLYMÉRNE BIGUANIDY

Polymérne biguanidy sa používajú ako všeobecné dezinfekčné prostriedky nielen v zdravotníctve, ale aj v potravinárskom priemysle a na dezinfekciu bazénov. U nás sa v zdravotníctve používa najčastejšie ako prípravok octenidín (Octenidine®, N-octyl-1-[10-(4-octyliminopyridin-1-yl)decyl]pyridin-4-imine dihydrochlorid), v severnej Amerike zase pod názvom Vantocil. Oba sa často používajú ako antiseptiká. Sú účinné proti grampozitívnym a gramnegatívnym baktériám, hoci *P. aeruginosa* a *Proteus vulgaris* sú menej citlivé. Nie sú sporocídne a neúčinkujú na neobalené vírusy. Polyhexanidy (polyhexametylén biguanid, PHMB) je membránovo aktívna látka, ktorá narúša integritu vonkajšej membrány gramnegatívnych baktérii. PHMB je účinná proti *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* (vrátane MRSA), *Escherichia coli*, enterokoky rezistentné voči vankomycínu a *Klebsiella pneumoniae* (aj ďalšie karbapeném rezistentné enterobaktérie), kvasinky a plesne – *Candida albicans*, dermatofyty, *Aspergillus* spp., a účinkujú aj na obalené vírusy. PHMB sa používajú pred a po chirurgickom zákroku na dezinfekciu pokožky a slizníc, pooperačné obvazy, chirurgické a nechirurgické obvazy na rany, chirurgické kúpele/hydraterapiu, chronické rany ako diabetické ulkusy na nohách a popáleniny, na rutinnú antisepsu počas malých incízií a ošetrovanie venózných vstupov, katetrizácií, endoskopií a dezinfekciu rán pri poraneniach. PHMB očné kvapky sa používajú na liečbu keratitídy vyvolanej akantamébami. Rovnako ako chlórhexidín sa používajú v kombinovaných dezinfekčných prostriedkoch s alkoholmi, kde zabezpečia ich remanentný účinok, teda pôsobia aj niekoľko hodín po

látkach nemusí nevyhnutne korelovať s jeho terapeutickým zlyhaním.

Bolo opísaných niekoľko mechanizmov, ktoré podmieňujú bakteriálnu rezistenciu voči biocídom. Niektoré sú charakteristické pre bakteriálnu bunku, iné pre bakteriálnu populáciu (napr. biofilm). Niektoré z mechanizmov rezistencie sú vrodené (prirodzené, vnútorné alebo intrinsec), iné boli získané prostredníctvom mutácií a selekčného tlaku, alebo prostredníctvom získania mobilných genetických prvkov. Prirodzený mechanizmus rezistencie baktériam poskytuje vysokú odolnosť proti biocídom (viď tab. 1.7.1 a 1.7.2). Najrozšírenejší mechanizmus je prirodzená nepriepustnosť bunkového povrchu voči biocídu. Je typická pre spóry, ale vyskytuje sa aj pri vegetatívnych baktériách, ako napr. mykobaktérie a do určitej miery aj pri niektorých gramnegatívnych baktériách. Táto bariéra v permeabilite obmedzuje množstvo biocídu, ktoré vstupuje do bunky, čím sa znižuje jeho účinnosť. Pri mykobaktériách je nepriepustnosť pre vstup mnohých antimikrobiálnych látok do baktérie spôsobená prítomnosťou mykoylátu, teda vrstvy mykoylacylarabinogalaktanu. Navyše, prítomnosť a zloženie arabinogalaktanu/arabinomananu bunkovej steny mykobaktérií má tiež úlohu pri znižovaní koncentrácie biocídov, ktoré môžu preniknúť do vnútra baktérií. Úloha lipopolysacharidu (LPS) ako bariéry permeability v gramnegatívnych baktériách je známa už dlhšie. Tiež bolo dokázané, že redukcia vstupu biocídu do bunky, teda aj jeho účinnosti, spôsobujú zmeny v ostaných zložkách ultraštruktúry vonkajšej membrány, vrátane proteínov, mastných kyselín a fosfolipidov. Vlastnosť náboja na bunkovom povrchu tiež má úlohu pri rezistencii baktérií na biocídy, napr. pozitívny náboj KAZ bráni vstupu do bunky. Prítomnosť efluxných komplexov (efluxné pumpy) pri gramnegatívnych baktériách je ďalší mechanizmus rezistencie voči dezinfekčným prostriedkom. Ten aktívne znižuje vstupnú koncentráciu toxických zlúčenín, vrátane biocídov a pumpujú ich do extracelulárneho priestoru. Efluxové pumpy tak zbavujú bunku viacerých biocídov, hlavne KAZ, derivátov fenolu, parabénov a interkalačných látok (organické farbivá, etídium bromid). Efluxné mechanizmy boli dokázané pri *Staphylococcus aureus* s identifikovanými mechanizmami ako QacA-D, Smr, QacG a QacH, v gramnegatívnych baktériách, ako napr. *Pseudomonas aeruginosa* (MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN a MexJK) alebo *Escherichia coli* s AcrAB-TolC, AcrEF-TolC a EmrE. Ako mechanizmus rezistencie bola opísaná aj enzymatická transformácia biocídov v baktériách, najmä pri ťažkých kovoch (enzymatická redukcia katiónu kovu, napríklad pri striebre a medi), pri parabénoch, aldehydoch (formaldehyddehydrogenáza) a peroxyzlúčeninách (kataláza, superoxid dismutáza a alkylhydroperoxidáza, ktoré vychytávajú voľné kyslíkové radikály). Väčšinou sa tieto mechanizmy môžu uplatniť tam, kde neboli dodržané predpísané podmienky dekontaminácie (vhodný prostriedok, vhodná koncentrácia, vhodná teplota, pH, bielkovinová záťaž a pod.).

Najčastejšie získané mechanizmy rezistencie na biocídy sú deštrukcia biocídu enzýmami a efluxová pumpa. Potvrdilo sa spojenie prítomnosti plazmidov v baktériách so zvýšenou toleranciou voči chlórhexidínu a ostatným biquanidom, KAZ a fenolom (triklosanu), alkoholom, ako aj diamidom, akrídiom a etídiom bromidu. Úloha plazmidov v kódovaní rezistencie (alebo zvýšenej tolerancie) na antiseptiká a dezinfekčné prostriedky, ako sú chlórové preparáty, peroxozlúčeniny, striebro a niektoré iné kovy sa ešte nepotvrdila.

Efluxová pumpa je mechanizmom, ktorý je najčastejšie zodpovedný za skríženú rezistenciu proti antibiotikám a dezinfekčným prostriedkom. Zmena permeability vonkajšej membrány bunky je mechanizmom, ktorý sa môže uplatniť hlavne pri rezistencii na KAZ, chlórhexidín a všeobecne na povrchovo aktívne látky. Práve uvedené mechanizmy umožňujú selekciu obávaných nozokomiálnych kmeňov v nemocniciach pri zanedbávaní protiepidemických opatrení.

Fyzikálne spôsoby dezinfekcie

Najrozšírenejšie spôsoby fyzikálnej dezinfekcie v zdravotníctve sú:

- var vo vode za atmosférického tlaku** v trvaní najmenej 30 minút. Účinnejšia je **tyndalizácia** 1x15 minút denne, 3 dni po sebe – prvý var zabezpečí stimuláciu klíčenia spór na vegetatívnu formu baktérií, ktoré sú zničené ďalším varným cyklom. Opakovanie cyklov tak zaručí úplné zbavenie sa spór,
- var v pretlakových nádobách** v trvaní najmenej 20 minút (pretlak zvyšuje teplotu bodu varu vody a tým aj germicídnu účinnosť varu),
- dezinfekcia v umývacích, pracích a parných prístrojoch** pri teplote vyššej ako 90 °C, 10 minút,
- prúdiaci horúci vzduch** o teplote 110 °C v trvaní 30 minút,
- pasterizácia** (zahriatie na 62,5 – 63 °C v trvaní 30 minút, 85 – 90 °C alebo 134 °C v trvaní niekoľko sekúnd a rýchle ochladenie),
- mikrovlnné žiarenie**,
- ultrafialové žiarenie** vlnovej dĺžky 260 – 264 nm,
- filtrácia, vypaľovanie, spaľovanie, slnenie a pod.**

DEZINFEKCIA MIKROVLNNÝM ŽIARENÍM

Mikrovlny vytvárajú veľmi krátke vlny v elektromagnetickom spektre. Princíp pôsobenia mikrovln spočíva v ich rýchlom kmitaní medzi kladným a záporným pólom s frekvenciou 2,45 bilióna kmitov za sekundu. Vzniká vibrácia molekúl v organickom materiáli (odpade alebo potravine), ktorých trením vzniká teplo premieňajúce vodu na paru. Dochádza k denaturácii bielkovín v mikroorganizmoch a k ich zničeniu.

DEZINFEKCIA A ČISTENIE ULTRAZVUKOM

Ultrazvuk je forma energie, ktorá je generovaná zvukovými vlnami pri frekvenciách, ktoré sú príliš vysoké, aby ich ľudské ucho rozpoznalo. V ultrazvuku dochádza k odstráneniu nečistôt a zvyškov biologického materiálu z povrchov a k inaktivácii mikroorganizmov. Deje sa tak v dôsledku kavitácie (rýchlo sa opakujúcej expanzie a následného stlačenia kvapaliny), ktorá vyvoláva tvorbu, rast a kolaps bublín vodnej pary, čím vzniká lokalizovaná mechanická a chemická energia. Ultrazvuk môžu generovať takzvané horúce škvrny – vysoké lokalizované teploty (až 5227 °C) a rýchle striedanie tlakov (1000 MPa), zároveň aj uvoľňovať reaktívne radikály.

Kvapalné médiá môžu obsahovať rozpustený plyn, ktorý vplyvom ultrazvuku (UZ) môže expandovať, podporujúc formáciu bublín a zároveň vedie aj k ich zrúteniu. Zvýšené zmeny teploty a tlaku môžu vyvolať mnohé chemické zmeny v parnej fáze vnútri kavitácie bubliny a okolitej kvapaliny. Vznikajúce voľné radikály spôsobujú oxidáciu lipidových membrán, narušenie enzymatickej aktivity proteínových komplexov zodpovedných za produkciu ATP a ovplyvňujú genetický materiál. Navyše, keď ultrazvukové vlny prechádzajú kvapalným médiom, v kvapaline sa vytvárajú mechanické vibrácie a akustické prúdenie. Tento jav generuje turbulenciu v mikrocirkulácii a ultrarýchle impulzy, ktoré majú efekt dýzy pri dopade na pevnú látku, aký sa používa na mechanické čistenie povrchov. Tento efekt sa využíva na odstránenie adherovaných bakteriálnych buniek na povrchu predmetov. V tabuľke 1.7.3. sú uvedené niektoré príčiny a účinky ultrazvuku na mikrobiálnych bunkách.

Tab. 1.7.3. Niektoré účinky ultrazvuku na mikrobiálnych bunkách.

Ultrazvukom vyvolaná príčina	Efekt na mikróby
Kavitácia	Narušenie štruktúry bunkových stien Planktonizácia a riedenie buniek Rozbitá bunková stena Tvorba pórov, narušenie bunkovej membrány a uvoľnenie obsahu cytoplazmy
Tvorba voľných radikálov	OH ⁻ , H ⁺ , peroxid vodíka poškodzuje DNA a spôsobujú jej lámanie



Energia uvoľnená počas kavitácie umožňuje očistu povrchov, ku ktorým je inak ťažký prístup (s úzkym lumenom, dutinkami a škárami a pod.). Samotný ultrazvuk zabezpečí rozrušenie a odstránenie biofilmov a inaktiváciu mikroorganizmov, ale úroveň dezinfekcie významne vzrastie v kombinácii s inými prostriedkami, napr. v kombinácii s kyselinou peroctovou. Do bunky narušenej ultrazvukom je uľahčený vstup iných dezinfekčných prostriedkov ako napr. zlúčenín chlóru, ktoré urýchľujú bunkovú smrť.



DEZINFEKČIA A STERILIZÁCIA POMOCOU ŽIARENIA

V zdravotníctve, resp. v s ním súvisiacom zdravotníckom a farmaceutickom priemysle sa používa dezinfekcia a sterilizácia, pri ktorej sa dekontaminované predmety, plochy a priestory dezinfikujú, resp. sterilizujú vystavením žiareniu (radiácii) rôznych vlnových dĺžok s germicídny účinkom. Na dekontamináciu žiarením sa používajú subatomárne častice (elektrónové lúče), alebo elektromagnetické žiarenie (röntgenové lúče, gama lúče alebo UV lúče). Žiarenie s vlnovou dĺžkou (λ) nižšou ako je viditeľné svetlo má vysokú energiu a delí sa na **ionizujúce** a **neionizujúce žiarenie** (viď tab. 1.74). Neionizujúce žiarenie je **ultrafialové (UV)** svetlo ($\sim 100 < \lambda < 400$ nm), ktoré sa považuje za bezpečné pri bežných expozičných podmienkach. Ionizujúce žiarenie, v tomto prípade **röntgenové lúče, γ -lúče** a **elektrónové lúče** (β -lúče), je vysoko energetické a môže ionizovať atómy alebo molekuly. Pri sterilizácii sú však používané nízke dávky energie, takže nedochádza k ionizácii sterilizovaného materiálu. Röntgenové lúče sú najpenetratívnejšie, elektrónové lúče sú najmenej penetratívne, pretože nesú elektrický náboj. Antimikróbný účinok týchto druhov radiácie spočíva v deštrukcii nukleových kyselín a tvorbe voľných radikálov. Výhodou radiačných technológií je, že nerozkladajú exponovaný materiál a nevytvárajú v ňom žiadne toxické vedľajšie produkty.

Tab. 1.74. Vlastnosti jednotlivých typov radiácie.

	Neionizujúce	Ionizujúce		
	UV svetlo	Röntgenové lúče	γ -lúče	Elektrónové lúče (β lúče)
Vlnová dĺžka (nm)	100 – 400	0,01 – 10	< 0,01	$\lambda = h/p$ *
Energia (eV)	3 – 12	$10^2 - 10^5$	$> 10^5$	Až do 10^7
Intenzita penetrácie	nízka	stredne intenzívna	vysoko intenzívna	nízka

* p je hybnosť a h je Planckova konštanta
 $1 \text{ eV} \sim 1.6 \times 10^{-19} \text{ J}$

Radiačná sterilizácia je vhodná pre zdravotnícke pomôcky, ktoré obsahujú plastové alebo organické komponenty, citlivé na teplo. Žiarenie sa aplikuje nielen na povrchy predmetov obalové materiály ale aj na liečivá a zdravotnícke pomôcky.

Gamažiarenie je najrozšírenejší spôsob využitia žiarenia na sterilizáciu, pretože má dobrú penetráciu, ktorá zabezpečuje sterilizáciu širokej škály zdravotníckych pomôcok s rôznou hustotou a jej prevládka sa považuje za najbezpečnejšiu. Gamažiarenie predstavujú vysokoenergetické fotóny, ide teda o elektromagnetické žiarenie vysokej frekvencie s krátkou vlnovou dĺžkou. Zdrojom gamažiarenia sú rádioizotopy, zvyčajne kobalt-60 (^{60}Co) alebo cézium-137 (^{137}Cs). Bežne sa používa na sterilizáciu jednorazových zdravotníckych pomôcok, ako sú striekačky, ihly, kanyly a intravenózne súpravy, ale aj potraviny.

Elektrónový lúč – **betažiarenie** – sa vytvára tým, že z katódy emitované elektróny sú urýchľované cez evakuačnú trubicu a pomocou magnetov sú orientované tak, že sa ich prúd zaostrí do lúča. Používajú sa elektrónové lúče s vyššou energiou, obvykle pri 10 MeV, aby sa zabezpečilo dostatočný prienik elektrónov. Penetrácia elektrónov je priamo úmerná energii a nepriamo úmerná hustote sterilizovaného materiálu. Keďže

spracovanie elektrónovým lúčom pracuje v rozsahu nižších dávok energie ako gama a v kratších expozičných časoch, menej poškodzuje plastové komponenty. Zariadenia na ochranu pracovníkov a životného prostredia pred vystavením tomuto žiareniu tvoria hrubé betónové štíty.

Röntgenové žiarenie je elektromagnetické žiarenie v rozsahu vlnových dĺžok od 100 pikometrov do 10 nanometrov. Vzniká prudkým zabrzdением urýchlených elektrónov (brzdové žiarenie) alebo prechodom elektrónov na nižšie energetické hladiny v atóme (charakteristické žiarenie). Technológia sterilizácie röntgenovými lúčmi je v súčasnosti najmenej využívanou radiačnou technológiou, lebo vyžaduje najvyššie náklady na bezpečnosť prevádzky.

UV ŽIARENIE

V závislosti od vlnovej dĺžky UV žiarenie zahŕňa UV-C (100 až 280 nm), UV-B (280 až 315 nm) a UV-A (315 až 400 nm). Ako zdroj UV žiarenia slúži väčšinou ortuťová výbojka. Elektrický výboj medzi elektródami ionizuje plynnú fázu, ktorá vyžaruje fotóny. Spektrum vyžarovaného svetla je určené aktívnym plynom a fluorescenčným povlakom žiarovky. Pri dezinfekcii vody sa používajú hlavne nízkoenergetické ortuťové výbojky. UV svetlo v zdravotníctve, teda aj na mikrobiologických pracoviskách, nepredstavuje len účinný dezinfekčný prostriedok, ale aj prostriedok na diagnostiku, (predovšetkým UV-A, napr. fluorescenčné mikroskopické a iné laboratórne diagnostické techniky, Woodova lampa v dermatológii na klinickú diagnostiku porúch pigmentácie, dermatofytóz, keratinomykóz a niektorých bakteriálnych infekcií), alebo terapiu (napr. PUVA terapia ekzémov, psoriázy, vitiliga a iné).

Parametre výkonnosti súvisiace s UV dezinfekciou zahŕňajú dávku žiarenia (J/m^2) a času expozície. Efektívnosť sa zvyšuje so znižujúcou sa vzdialenosťou medzi UV lampou a dezinfikovaným povrchom resp. predmetom, pri dezinfekcii kvapalín zase klesá vtedy, keď sú v tekutinách prítomné tuky alebo proteíny.

UV-C žiarenie, ktoré sa používa ako germicídny prostriedok, inaktivuje mikroorganizmy predovšetkým prostredníctvom reverzibilného poškodenia DNA s maximálnym účinkom približne pri 280 nm (absorpčné maximum nukleových kyselín). Mechanizmy mikrobiálnej UV inaktívácie sú fototerminálny, fotochemický a fotodesorpčný účinok. Fototerminálny účinok je spôsobený povrchovým ohrevom absorbovanou UV energiou. Bolo dokázané, že pokiaľ dávka UV žiarenia presahuje $0,5 \text{ J/cm}^2$, spôsobuje praskanie buniek v dôsledku prehriatia. Priame fotochemické účinky sú zapríčinené absorpciou UV svetla pyrimidínovými a purínovými bázami v nukleových kyselinách a nukleoproteínoch. UV svetlo spôsobuje priame poškodenie DNA indukciou zlomov na jednom z reťazcov a tvorbou kovalentne viazaných tymínových dimérov, ktoré inhibujú riadnu transkripciu a replikáciu. Nepriame účinky vznikajú z UV-indukovanej fotochemickej generácie voľných peroxy- alebo hydroperoxy- radikálov, ktoré sú vysoko reaktívne a viažu sa na membrány, proteíny, enzýmy a DNA. Tento účinok môže byť zvýšený prísadami, ktoré pri UV žiarení uvoľňujú reaktívne oxidačné radikály (napr. peroxid vodíka). Ďalším sterilizačným účinkom UV žiarenia je fotodesorpcia. Fotóny s dostatočne vysokou energiou sú absorbované bunkovými biomolekulami a spôsobujú rozpad chemických väzieb až na atomárnu úroveň (tzv. leptanie). Z atómov sa potom formujú prchavé plynné zmesi a tým sa umožní ľahší prístup fotónov UV žiarenia k DNA.

Čo sa týka senzitivity mikroorganizmov na UV, najcitlivejšie sú gramnegatívne baktérie, po ktorých nasledujú grampozitívne baktérie a huby. Najviac UV-rezistentnými organizmami sú vírusy (konkrétne adenovírusy) a bakteriálne spóry. Prvky akantaméby sú tiež vysoko odolné voči UV žiareniu.

Pigmentácia buniek má tiež pravdepodobne ochrannú funkciu z dôvodu čiastočnej absorpcie UV žiarenia. Proti účinkom UV žiarenia si organizmy vyvinuli rôzne mechanizmy, ako sú napr. tvorba pigmentov alebo fotoreaktivácia. Fotoreaktivácia je bun-

kový mechanizmus na opravu UV poškodenia nukleových kyselín. Je indukovaný viditeľným svetlom (350-510 nm) a katalyzovaný fotolýzou, ktorá rozdeľuje už vytvorené pyrimidínové diméry. Účinok fotolýzy je pritom indukovaný práve viditeľným svetlom. Boli tiež opísané ďalšie opravné mechanizmy, napr. v tme prebiehajúci mechanizmus (ktorý nevyžaduje svetlo), a ďalší, ktorý je špecificky spojený so spórmi. Pri opravnom mechanizme v tme sa ukázalo, že ho vlastní takmer všetky baktérie. Spóry nemajú žiadny aktívny metabolizmus, preto opravu začínajú pri klíčení. Vírusy nemajú žiadny metabolizmus, takže nemôžu opraviť poškodenie vlastného genómu. Niektoré vírusy dokážu využiť opravné enzýmy hostiteľskej bunky. To je aj príčina vysokej rezistencie adenovírusu, ktorý ako dvojvláknový DNA vírus dokáže použiť na opravu mechanizmy hostiteľskej bunky, zatiaľ čo napr. RNA vírusy to nedokážu. Iné vírusy, napr. opičí vírus SV40, majú zase gény pre opravné enzýmy.

Kontrola dezinfekcie

Vykonáva sa chemickými metódami kvalitatívnymi (dôkaz prítomnosti dezinfekčnej látky na dezinfikovanom povrchu), alebo kvantitatívnymi (stanovenie koncentrácie účinnej látky v pracovnom roztoku), ako aj mikrobiologickými metódami na stanovenie účinnosti dezinfekčných prostriedkov (prítomnosť alebo pokles počtu vitálnych mikroorganizmov na dezinfikovanom povrchu).

KVALITATÍVNE METÓDY

Chemickými stermi – sú rýchle, s okamžitým výsledkom na mieste a ľahko vykonateľné. Ak bola deklarovaná plocha deklarovaná ako dezinfikovaná určeným dezinfekčným prostriedkom, vatovým tampónom sa pretrie jej časť približne o rozmere 20 x 20 cm, vytrepe sa v skúmavke s destilovanou vodou a pridá sa reagentia, ktorá vytvorí komplex s danou dezinfekčnou látkou so charakteristickým zafarbením (pozri tab. 1.7.5).

Tab. 1.7.5. Prehľad dezinfekčných látok a reagentii na chemickú kontrolu ich prítomnosti na dezinfikovaných povrchoch.

Dezinfekčná látka	Reagentia	Výsledné sfarbenie
Chlórové preparáty	O-toluidín	Žlté až hnedočervené
Formalín	Floroglucin v alkalickom prostredí	Svetlé až tmavočervené
Jodonál B	1. molybdénový roztok a HNO ₃	Žltá zrazenina
	2. molybdénový roztok + HNO ₃ + octan benzidínu	modré
Ajatín	Dusičnan strieborný	Biely zákal
Orthosan BF	4 - aminoantipyrín	Sýtooranžové
Krezolové zlučiny	Diazotovaná sulfanilová zlučiny	Žltohnedé - oranžovočervené

Kontrola kontaminácie plôch, pomôcok a prostredia sa vykonáva aj prúžkovou metódou pomocou komerčných diagnostických prúžkov (napr. Hemodetect - P), ktoré obsahujú špecifický chromogén pre farebnú detekciu prítomnosti príslušného dezinfekčného prostriedku.

KVANTITATÍVNE METÓDY

Kvapková rýchlometóda – k určenému množstvu kontrolovaného dezinfekčného prostriedku sa prikvapáva činidlo až do zmeny sfarbenia. Podľa množstva kvapiek sa odčíta koncentrácia.

Analytická metóda – stanovuje sa účinná chemická látka titračnou laboratórnou metódou.

Pomocou komerčných testacných prúžkov sa kontroluje koncentrácia dezinfekčnej látky v pracovných roztokoch. Detekčné prúžky obsahujúce reagens, pri ktorých sa zmena farby

porovnáva s farbenou škálou na etikete a určí sa príslušná koncentrácia.

MIKROBIOLOGICKÉ METÓDY KONTROLY DEZINFEKČIE

Kontrola povrchov a predmetov – sterom, odtlačkovou metódou, preplachom či ponorom. Hodnotí sa nimi účinnosť vykonanej dezinfekcie, teda či v odobranej vzorke z plochy alebo predmetu po vykonanej dezinfekcii dôjde alebo nedôjde pri jej kultivácii k rastu mikroorganizmov. Po odobratí vzorky je vhodné pridať do kultivačného média inaktivátor dezinfekčnej látky, ktorá sa na dezinfekciu použila – pyruvát pre inaktiváciu dezinfekčných látok na báze aktívneho kyslíka, tiosíran pre halogénové prostriedky, histidín pre formalín, polysorbát (Tween 80) pre fenol a jeho deriváty, lecitín pre KAZ a pod. Pre tento účel existujú aj komerčne dodávané hotové kultivačné pôdy, ktoré uvedené inaktívatory dezinfekčných látok obsahujú, napr. RODAC™ (Replicate Organism Detection and Counting).

Stery sa vykonávajú sterilným tampónom namočeným do sterilného fyziologického roztoku. Odberie sa ster z plochy 10 x 10 cm, ktorý sa naočkuje priamo na tuhú kultivačnú pôdu. Odtlačky sa vykonávajú priamo priložením kontrolovaných dezinfikovaných predmetov na kultivačnú pôdu, alebo nepriamo pomocou sterilného filtračného papierika zvlhčeného sterilným fyziologickým roztokom. Ten sa položí na kontrolovanú plochu, s pomocou sterilného tampónu pritlačí v každom bode kontaktu papierika a plochy. Potom sa preniesie na tuhú kultivačnú pôdu s otláčenou stranou k médiu. Po následnej kultivácii sa stanovujú sa nielen druhy, ale i množstvo mikroorganizmov.

Dezinfekciu možno kontrolovať ponorom tuhej kultivačnej pôdy nanesenej na plastový nosič (podobne ako pri systéme Urikult pri diagnostike bakteriúrie). Metóda sa používa na kontrolu roztokov, používaných na oplachy, preplachy. Táto metóda nie je veľmi presná, je skôr orientačná. Lepšie je vykonať kontrolu tak, že ponorením dezinfikovaného predmetu do sterilného fyziologického roztoku získame oplach. Ten potom scentifugujeme a sediment vyočujeme na kultivačnú pôdu, ktorá sa následne inkubuje v termostate. Pri hodnotení kultivačného nálezu je dôležité nielen druhové určenie vyrastených mikroorganizmov, ale najmä kvantitatívne zhodnotenie počtu mikroorganizmov. Metodickou chybou je pomnožovanie mikroorganizmov v odobratých vzorkách oplachov a sterov v tekutých médiach, nakoľko ich pomnoženie znemožní určiť východiskový počet životaschopných buniek mikroorganizmov na kontrolovanom predmete alebo ploche.

KONTROLA DEZINFEKČNEJ ÚČINNOSTI GERMICÍDNYCH ŽIARIČOV

Účinnosť germicídnych žiaričov sa kontroluje jednak odpočtom prevádzkových hodín automatickým spínačom s elektromerom, ale aj mikrobiologicky. Mikrobiologická kontrola spočíva v tom, že pod žiarič umniestnime otvorenú Petriho misku s čerstvou nanesenou suspenziou s určenou denzitou (cca 10³ – 10⁴, pri ktorej sa po inkubácii tvoria ešte izolované, teda spočítateľné kolónie) kontrolného kmeňa *Serratia marcescens*. Polovicu misky prekryjeme materiálom, ktorý neprepúšťa UV žiarenie (napr. alobalové tienidlo). Potom zapneme germicídny žiarič a misku exponujeme UV žiareniu po dobu 30 minút. Následne odstránime tienidlo, misku uzatvoríme a inkubujeme v termostate pri 37°C po dobu 22 – 24 hodín. Ak počet vyrastených kolónií na exponovanej časti misky je o 99 % nižší ako na jej neexponovanej polovici, môžeme germicídny žiarič hodnotiť ako účinný.

KONTROLA MIKROBIÁLNEJ ZÁŤAŽE OVZDUŠIA

Ober vzorky môžeme vykonať buď sedimentačnou metódou a to expozíciou otvorenej Petriho misky so živnou pôdou po dobu 30 min, alebo prúdením určitého objemu vzduchu priamo na tuhú živnú pôdu, umiestnenú pod nasávacou štrbinou v aerokope, resp. filtračnou metódou, ktorá je najpresnejšia. Pri filtračnej metóde určený odobratý objem vzduchu prejde v aerokope cez membránový filter, na ktorom sa zachytia mikroorganizmy. Filter sa po ukončení odberu preniesie na tuhú kul-

tivačné médium v Petriho miske a tá sa následne kultivuje predpísaným spôsobom. Po kultivácii sa podľa počtu vyrastených kolónii určí počet zárodkov v odobranom vzduchu, resp. určí sa aj druhová identita vykultivovaných mikroorganizmov

1.7.3.5 STERILIZÁCIA



Sterilizácia je usmrtenie všetkých foriem mikroorganizmov, vrátane bakteriálnych spór na povrchu predmetov, v materiáloch a roztokoch. Vykonáva sa fyzikálnymi, chemickými metódami alebo ich kombináciou.

Ako sterilné teda nemožno niečo deklarovať len na základe fyzikálnej alebo chemickej kontroly procesu sterilizácie. **Tak možno označiť len predmety a látky, na ktorých boli usmrtené všetky mikroorganizmy a ich sterilita bola overená štandardným postupom mikrobiologickej kontroly** (viď nižšie). Aj po správnej sterilizácii môžu byť prítomné zvyšky mikroorganizmov a inaktivovaných spór, predovšetkým vtedy, ak nebol sterilizovaný materiál zbavený v predsterilizačnej príprave mikroorganizmov. Môže tak obsahovať pyrogénne látky, ktoré v určitých prípadoch predstavujú pre pacienta zdravotné riziko, preto sa v určitých prípadoch sterilizované materiály, napr. implantáty alebo infúzne roztoky, kontrolujú na apyrogénnosť.

Predsterilizačná príprava

Všetky predmety určené na sterilizáciu musí byť dôkladne mechanicky očistené, vysušené a zabalené do vhodného obalu. Pri predmetoch kontaminovaných biologickým materiálom, najmä krvou, je potrebné v záujme prevencie profesionálnych nákaz pred etapu umývania a čistenia zaradiť dezinfekciu mikrobiocídnym prostriedkom s čistiacim účinkom. Personál sa chráni pred infekciou rukavicami a okuliarmi, resp. štítom. Predsterilizačná príprava sa vykonáva fyzikálnymi (napr. ultrazvukom) a chemickými metódami dezinfekcie, potom nasleduje mechanické čistenie a dôkladné opláchnutie pitnou vodou.

Druhy sterilizácie

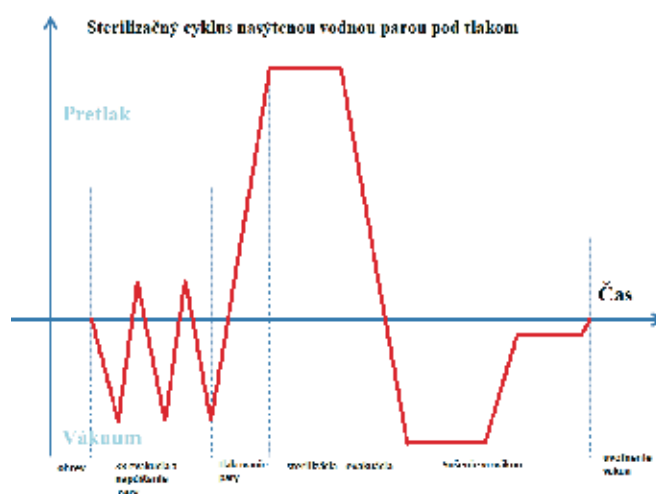
Sterilizácia predmetov sa dosahuje pomocou fyzikálnych a chemických sterilizačných metód, ktorých podmienky upravuje vyhláška MZ SR č. 553/2007 Z. z. Pri sterilizácii liečiv a pomocných látok sa postupuje podľa podmienok a parametrov uvedených v platnom Liekopise.

FYZIKÁLNA STERILIZÁCIA

- sterilizácia vlhkým teplom pod tlakom,
- sterilizácia cirkulujúcim horúcim vzduchom,
- iné spôsoby fyzikálnej sterilizácie napr. rádiácia alebo filtrácia (lieky, produkty z telesných tekutín a pod.).

Sterilizácia vlhkým teplom (parná sterilizácia, sterilizácia nasýtenú vodnou parou pod tlakom)

Je vhodným spôsobom sterilizácie termostabilných zdravotníckych pomôcok z kovu, gumy, skla, z textilu, papiera, porcelánu, keramiky a niektorých druhov syntetických polymérov zabalených do sterilizačných obalov. V rámci mikrobiologických laboratórií slúži aj na prípravu kultivačných médií a roztokov. Sterilizácia má cyklus, ktorý väčšinou zahŕňa odvodušenie a frakcionované napúšťanie sterilizačnej komory parou, vytvorenie pretlaku pary a požadovanej teploty po stanovenú dobu (expozícia), evakuácia pary a napustenie čistým, ohriatym vzduchom (obr. 1.7.4). Sterilizačná expozícia je doba počítaná od dosiahnutia požadovaného tlaku a teploty v sterilizačnom priestore do času, kedy sa zastaví prívod pary do tohto priestoru. Parné sterilizátory (autoklávy) musia byť vybavené antibakteriálnym filtrom, ktorý zabezpečí potrebnú čistotu vzduchu na dosušenie sterilizovaného materiálu po ukončení sterilizácie. Následne sa sterilizovaný obsah nechá vychladnúť, vykoná sa kontrola procesných indikátorov sterilizácie a pokiaľ tieto indikujú správny priebeh sterilizačného cyklu, môže byť sterilizovaný materiál označený a uložený (skladovanie) ako vhodný na použitie.



Obr. 1.7.4. Priebeh sterilizačného cyklu v parnom sterilizátore (autokláve).

Sterilizácia vlhkým teplom sa vykonáva v tlakových prístrojoch (autoklávoch) pri nasledujúcich parametroch (tab. 1.7.6).

Tab. 1.7.6. Hodnoty fyzikálnych veličín pri sterilizácii vlhkým teplom. Upravené podľa prílohy č. 3 k Vyhláške MZ SR č. 553/2007 Z. z.

Sterilizačná teplota – teplota nasýtenej vodnej pary	Pretlak (kPa)	Tlak (kPa)	Expozičná doba
121 °C	205	105	20 min.
134 °C	304	204	10 min.
134 °C *	304	204*	60 min.*

*Pre inaktiváciu priónov: autoklábovanie pri 134 °C 1 hod. po alkalickom čistení 2 M NaOH.

Na sterilizáciu v zdravotníctve sa vyrábajú rôzne typy parných sterilizátorov s automatickým alebo poloaautomatickým režimom, rôznym technickým vybavením. Delia sa v zásade na prístroje:

- stolné maloobjemové prístroje s vyvíjačom pary priamo v komore a bez vývevy na odsávanie vzduchu pred sterilizáciou; v týchto prístrojoch nemožno sterilizovať porézne materiály a textil, uplatňujú sa najmä v stomatologických ambulanciách,
- väčšie prístroje nemusia mať plášť, ale musia vývevu a manometer alebo teplomer s časovým ovládačom,
- veľkoobjemové prístroje na oddeleniach centrálnej sterilizácie a operačných sálach musia mať vývevu, plášť, zapisovacie zariadenie o priebehu tlaku, teploty a automatické riadenie cyklu a tlačiareň zaznamenávajúca dosiahnuté parametre sterilizácie.

Sterilizácia cirkulujúcim horúcim vzduchom

Je určená pre termostabilné zdravotnícke pomôcky z kovu, skla, porcelánu, keramiky a kameniny. Vykonáva sa v horúco-vzduchových sterilizátoroch s nútenou cirkuláciou vzduchu pri týchto parametroch:

- 160 °C po dobu 60 minút,
- 170 °C po dobu 30 minút,
- 180 °C po dobu 20 minút.

Uvedené hodnoty platia pre prístroje s nútenou cirkuláciou vzduchu. Pri prístrojoch bez nútenej cirkulácie vzduchu musí byť objem pracovnej komory menší ako 5 litrov. Pri väčšom objeme treba sterilizačnú expozíciu zdvojnásobiť. Sterilizátor sa otvára až teplota na teplomere klesne na 60 °C. Teploty do 160 °C možno používať iba na sušenie skla. Suché teplo viac ovplyvňuje vlastnosti sterilizovaného materiálu ako vlhké.

Sterilizácia radiáciou

Radiačná sterilizácia sa vykonáva v špeciálnych radiačných centrách. Používa sa iba v priemyselnej výrobe na sterilizáciu novoprodukovaného, prípadne exspirovaného materiálu, ktorý pri opakovanom ožiarení nezmení funkčné a vzhľadové vlastnosti. Používa sa na sterilizáciu predmetov na jedno použitie zhotovených z plastických hmôt napr. odberových tampónov, pipetovacích špičiek, jednorazových bakteriálnych kľúčiek, skúmaviek a pod., ďalej textílií, gumených predmetov a pomôcok. Používa sa aj na sterilizáciu buničiny, šijacieho materiálu, farmaceutických výrobkov, liečiv, niektorých transplantátov, vakcín a antigénov.

CHEMICKÁ STERILIZÁCIA

Mnoho tepelne citlivých zdravotníckych a chirurgických pomôcok môže byť účinne sterilizovaných buď ponorením do kvapalných sterilizačných prostriedkov, najmä glutaraldehydom, peroxooctovou kyselinou a peroxidom vodíka (pozri dezinfekčné látky), alebo sterilizačnými procesmi v parnej fáze. Pri kvapalinách sa rezíduá germicídnej látky odstraňujú opláchnutím pitnou vodou, pri sterilizácii látkami v parnej fáze sa rezíduá odstraňujú odvetrávaním.

Sterilizanty s plynou fázou

Sterilizačným médiom sú plyny predpísaného zloženia a koncentrácie. Sterilizácia prebieha v tlakových sterilizátoroch za stanoveného pretlaku (etylénoxidový alebo formaldehydový) alebo podtlaku (plazmový) a teplotách do 80 °C. Sterilizovaný materiál môže vyplňať maximálne 3/4 objemu komory, nesmie sa dotýkať stien a ukladá sa zvisle, aby sa uľahčil prístup sterilizujúceho plynu k predmetom. Predmety určené na chemickú sterilizáciu musia byť do prístrojov vkladané suché a zabalené v schválených obaloch pre daný plyn. Najčastejšie používané aktívne látky v týchto plynových „studených“ systémoch sú etylénoxid, formaldehyd a nedávno vyvinutý postup sterilizácie použitím peroxidu vodíka alebo peroxooctovej kyseliny vo forme plazmy. Etylénoxid a formaldehyd sú širokospektrálne alkylačné činidlá. Ako alkylačné činidlá sa viažu na proteíny, nukleové kyseliny a iné organické zlúčeniny. Obe reagujú so sulfhydrylovými a inými reaktívnymi skupinami enzýmov. Ich aktivita závisí od aktívnej koncentrácie, teploty, trvania expozície a relatívnej vlhkosti. Etylénoxid má nevýhody v tom, že je mutagénny a výbušný, ale vo všeobecnosti nepoškodzuje materiály ani zariadenia. Toxické rezíduá po sterilizácii sa musia eliminovať správnym odvetrávaním. Formaldehyd v plynnej fáze má podobný mikrobiocídny účinok a má navyše výhodu, že nie je výbušný, napriek tomu sa až tak široko nepoužíva v zdravotníctve ako etylénoxid.

Sterilizácia formaldehydom

Vykonáva sa v špeciálnych tlakových prístrojoch pri teplote do 80 °C a pri parametroch stanovených výrobcom. Je určená pre sterilizáciu termolabilných predmetov, kovových ostrých predmetov, niektorých optických prístrojov, guma a pod., neodporúča sa pre textil.

Sterilizácia etylénoxidom

Vykonáva sa v špeciálnych tlakových prístrojoch pri teplote do 55 °C a pri parametroch stanovených výrobcom. Po sterilizácii sa musia všetky predmety poriadne odvetrať (v špeciálnych odvetrávacích skrinách pri teplote 55 °C trvá odvetrávanie 24 hodín, za atmosférických podmienok pri teplote nad 15 °C trvá minimálne 72 hodín, pri predmetoch z guma a plastov minimálne 7 dní). Je určená pre sterilizáciu termolabilných predmetov, niektorých prístrojov s optikou, ostrých nástrojov, papiera, porezačných materiálov, ako je perie, molitan, matrace, mastenec a pod.

Sterilizácia plazmou

Peroxid vodíka a peroxooctová kyselina vo fáze studenej plazmy (ako oxidačné činidlá) sú aktívnejšie pri nižších koncentráciách ako v kvapalnej forme. Obidve aktívne činidlá sa používajú vo forme plynovej plazmy v nízkoteplotných sterilizačných systémoch. Ich hlavné výhody oproti iným systémom

s plynou fázou zahŕňajú nízku toxicitu, rýchly účinok a aktivitu pri nižšej teplote. Nevýhody zahŕňajú obmedzenú priestupnosť a menej možností aplikácie.

Plazma vzniká vtedy, keď vďaka vysokému rozdielu potenciálov medzi dvoma elektródami dôjde k elektrickému výboju a následnej ionizácii plynu. Na rozdiel od plynu je plazma štvrté skupenstvo hmoty, ktoré sa skladá z iónov, elektrónov a voľných radikálov a vykazuje vysokú vodivosť. Vlastnosti plazmy závisia predovšetkým od hustoty elektrónov, resp. podielu voľných elektrónov, vznikajúcich vplyvom teploty. Zatiaľ čo termálna plazma pri jadrovej fúzii alebo v elektrických výbojoch vykazuje teplotu do 10⁵ °C, studená plazma vzniká približne pri izbovej teplote (max. 50 °C) a má tak praktický význam práve pri sterilizácii. Vzniká v elektromagnetickom poli v sterilizačnej komore pôsobením energie vysokofrekvenčných vln na prekursor oxidačných radikálov (peroxid vodíka, kyselina peroxooctová) pri vysokom vákuu. Studená plazma sa zvyčajne generuje pri podtlaku medzi 1 Pa až 100 kPa a pri napätí od približne 100 V do niekoľkých kV. Studená plazma sa používa na povrchovú sterilizáciu pevných materiálov ako je oceľ, plast a ich kombinácie.

Účinok plazmy sa vytvára tak chemickým, ako aj tepelným pôsobením. Chemický vplyv je výsledkom pôsobenia antimikrobiálnych látok, ako sú ozón a voľné hydroxylované radikály. Uvoľnené UV žiarenie spôsobuje chemický a environmentálny stres buniek, rýchlo rozkladá anorganické aj organické zlúčeniny oxidáciou membránových lipidov, proteínov a nukleových kyselín. Tepelný vplyv sa prejavuje rozkladom alebo naleptaním membrán, nakoľko pri priamom kontakte s plazmou sú bunkové membrány perforované elektrostatickými silami a nastáva uvoľňovanie bunkového obsahu (proteíny, DNA) do extracelulárneho priestoru. Podobný mechanizmus platí aj pre inaktiváciu spór.

Rýchlosť mikrobiálnej inaktivácie závisí od vlastností mikrobiálnych buniek, zvolených parametrov expozície a umiestnenia mikroorganizmov na povrchu, ku ktorému sú adherované. Gramnegatívne baktérie sú o niečo menej odolné voči plazme, nakoľko majú tenšiu bunkovú membránu, ktorá zvyšuje náchylnosť k úniku cytoplazmy z bunky a ich inaktivácia nastáva už v priebehu 30 – 60 sekúnd. Kvasinky a spóry baktérií sú inaktivované až za 6 minút vďaka polysacharidom okolo ich bunkových stien a vírusy sú ešte odolnejšie. Samotný sterilizačný cyklus trvá 45 minút až hodinu.

Obalové materiály pri sterilizácii

Predmety sa do sterilizačných prístrojov vkladajú len vo schválených obaloch alebo sterilizačných boxoch.

Obaly sa uzatvárajú zatavovaním účelovými zatavovacími prístrojmi alebo lepením vodotesným lepidlom. Obaly typu papier – fólia sa otvárajú oddeľovaním jednotlivých vrstiev od seba. Papierové sáčky a polyamidové fólie sa otvárajú odstrihnutím.

Pre kombinované a papierové obaly platí, že obaly nesmú byť poškodené, sú jednorazové a nesmú sa v nich resterilizovať expirované materiály, pretože po uskutočnenom sterilizačnom cykle menia svoje vlastnosti a sterilizačné médium do nich nepreniká. Predmety s prekročenou expiráciou sa sterilizujú rovnakou metódou v nových obaloch.

Ďalšie pravidlá ktoré je potrebné dodržiavať pri sterilizovnom materiáli:

- použité jednorazové predmety sa nemôžu resterilizovať,
- predmety sterilizované radiačne nemožno resterilizovať v etylénoxidových sterilizátoroch, pretože sa z materiálov uvoľňuje viac toxických látok,
- obaly musia byť označené miestom sterilizácie, dátumom sterilizácie a musia mať uvedený dátum expirácie,
- pri Transporte vsterilizovaného materiálu je nutné zabezpečiť obaly pred poškodením,
- sterilný materiál v obaloch sa skladuje v čistých uzavretých skrinách alebo voľne v skladovacom priestore v ďalšom prachotesnom obale,

- pri manipulácii so sterilným materiálom musia byť dodržiavané zásady aseptického spôsobu práce a nesmie sa použiť po uplynutí expiračnej doby.



Kontrola sterilizácie

Výsledky kontroly slúžia na potvrdenie účinnosti sterilizačného procesu s cieľom dokázať a dokumentovať účinnosť sterilizácie.

Kontrola účinnosti sterilizácie sa robí:

A. **Bioindikátormi** podľa štandardnej metodiky po inštalácii nového prístroja a po jeho oprave, pri akejkoľvek pochybnosti o sterilizačnej účinnosti prístroja, pri periodických kontrolách v centrálnych sterilizáciách a sterilizačných centrách aspoň raz mesačne. V ostatných prevádzkach po 200 sterilizačných cykloch, minimálne však raz za rok. Princíp biologickej skúšky spočíva v usmrtení nepatogénnych bakteriálnych spór v dôsledku vystavenia sterilizačnému procesu. Používajú spóry dvoch termorezistentných bakteriálnych druhov:

- *Geobacillus stearothermophilus*, hustota suspenzie 1×10^6 /ml pre parnú sterilizáciu,
- *Geobacillus stearothermophilus*, hustota suspenzie 1×10^6 /ml pre formaldehydovú sterilizáciu,
- *Geobacillus stearothermophilus*, hustota suspenzie $2,3 \times 10^6$ /ml pre plazmovú sterilizáciu,
- *Bacillus atrophaeus*, hustota suspenzie 1×10^6 /ml pre horúcovzduchovú sterilizáciu,
- *Bacillus atrophaeus*, hustota suspenzie 1×10^6 /ml pre etylénoxidovú sterilizáciu.

Tie sa v rôznych formátoch (ampulky, prúžky, korálky a pod) vkladajú do sterilizačného prístroja spolu so sterilizovaným materiálom a prejdú príslušným sterilizačným cyklom. Po ukončení sú bioindikátory kultivované 10 dní v príslušnom médiu a pri príslušnej teplote (37°C *Bacillus atrophaeus*, pri 55°C *Geobacillus stearothermophilus*). Ak dôjde k rastu bioindikačného bakteriálneho kmeňa, zmení sa pH média, čo sa prejaví zmenou farby média. Znamená to, že sterilizátor je nefunkčný a nesmie byť naďalej používaný. Až po jeho oprave a vyhovujúcom výsledku následného testu bioindikátorom ho možno považovať za funkčne schopný.

B. **Chemickými testami sterilizácie**, ktoré sú založené na zmene farby po dosiahnutí požadovaných parametrov pri sterilizačnom procese. Sú určené na zistenie, či boli splnené podmienky sterilizácie a sú odčítané ihneď po skončení sterilizačného cyklu. K chemickým testom patrí aj tzv. Bowie-Dick test, ktorý je testom prenikavosti pary. Chemické procesové testy reagujú farebnou zmenou na prítomnosť sterilizačného média.

C. **Fyzikálnymi testami sterilizácie** – vkladanie teploměry a vstavané meracie prístroje ukazujú alebo zaznamenávajú teplotu a tlak, vstavané pritom slúžia k sústavnému meraniu týchto veličnín.

D. **Fyzikálno-chemickými testami sterilizácie**, pri ktorých sa využíva zmena farby alebo skupenstva niektorých chemických látok v závislosti od dosiahnutej teploty a expozičného času.

KONTROLA STERILITY

Kontrola sterility predmetov sa robí podľa schválených štandardných mikrobiologických metód. Sterilné predmety na kontrolu sterility je nutné odoberať a analyzovať za prísnych aseptických podmienok v laminárnom boxe. Analýzy sa vykonávajú sterilnou, oplachovou, odtlačkovou metódou alebo najčastejšie priamym vložením predmetu do kultivačnej pôdy. Počas kultivácie vzorky v príslušnom médiu počas niekoľkých dní sa sledujú akékoľvek zmeny v médiu, ktoré by svedčili o raste mikroorganizmov (zákal, sediment, blanka a pod.) Ak k takej zmene dôjde, vzorka bola nesterilná.

TESTOVANIE STERILIZOVANÝCH LÁTOK A PREDMETOV NA ICH APYROGENNOSŤ

Okrem sterility sú niektoré biologicky aktívne látky (napr. lieky, vakcíny) a pomôcky, ktoré boli pripravené a fyzikálne sterilizované za účelom ich parenterálneho použitia, testované na ich apyrogennosť (teda že nevyvolávajú zápalovú reakciu, napr. na neprítomnosť lipopolysacharidu gramnegatívnych bakterií – **endotoxínu**) a to viacerými možnými testami. Lyzát hemocytov z kra-

bov (*Tachypleus tridentatus*) spôsobí pri styku s endotoxínom (LPS) tvorbu koagula (gelifikáciu), čo je princíp tzv. **Limulus testu** na zisťovanie endotoxínu v kontrolovanom materiáli. Hemocyt kraba (amebocyty) totiž obsahujú niekoľko serínových proteázových zymogénov, ktoré tvoria koagulačnú kaskádu. Jej aktiváciu vyvoláva endotoxín aj v stopovom množstve. Existuje aj koagulačná dráha sprostredkovaná (1–3)- β -D-glukánom, ktorá tiež vedie k tvorbe gélu. **Limulus test je používaný ako jednoduchý a veľmi citlivý testovací spôsob pre detekciu endotoxínov a je omnoho citlivejší (až 300x) ako testovanie prítomnosti endotoxínu na králikoch** (vyvolanie zápalu injikovaním testovanej látky do zvieraťa). Iným kontrolným systémom sú testy apyrogenity pomocou **aktivácie ľudských monocytov** alebo monocytoidných bunkových línií, ktoré pri kontakte s pyrogénmi začnú uvoľňovať cytokíny ako sú IL-1 β , IL-6 a TNF α , a v organizme vyvolajú horúčku. Túto aktiváciu a uvoľňovanie cytokínov možno merať podobne ako pri IGRA testoch (pozri subkapitolu 1.21).

LITERATÚRA

1. Akbar B., John K.C.A., Jalal Y.B., Kamaruzzaman B, Zaleha K.: 2010. Mechanism in the Clot Formation of Horseshoe Crab Blood during Bacterial Endotoxin Invasion. Journal of Applied Sciences, 2010, 10: 1930-1936.
2. Border B.G., Rice-Spearman: Microwaves in the laboratory: effective decontamination. J Clin Lab Sci, 1999, 12(3): 156-160.
3. Brickner P.W., Vincent R.L., First M., Nardell E., Murray M., Kaufman W.: Public Health Rep, 2003, 118(2): 99-114.
4. Centers for Disease Control and Prevention (CDC): Guideline for Disinfection and Sterilization in Healthcare Facilities, 2008.
5. Halls N.: The microbiology of irradiation sterilization. Med Device Technol, 1992, 3(6): 37-45.
6. Harrell C.R., Djonov V., Fellabaum C., Volarevic V.: Risks of Using Sterilization by Gamma Radiation: The Other Side of the Coin. International Journal of Medical Sciences, 2018, 15(3): 274-279. doi:10.7150/ijms.22644.
7. Lambert B.J., Mendelson T.A., Craven M.D.: Radiation and Ethylene Oxide Terminal Sterilization Experiences with Drug Eluting Stent Products. AAPS Pharm Sci Tech, 2011, 12(4): 1116-1126. doi:10.1208/s12249-011-9644-8.
8. McDonnell G., Russell A.D.: Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action, and Resistance. Clinical Microbiology Reviews, 1999, 12(1): 147-179.
9. Muller G., Kramer A.: Biocompatibility index of antiseptic agents by parallel assessment of antimicrobial activity and cellular cytotoxicity. J Antimicrob Chemother, 2008, 61: 1281-1287. doi: 10.1093/jac/dkn125.
10. Reed N.G.: The History of Ultraviolet Germicidal Irradiation for Air Disinfection. Public Health Reports, 2010, 125(1): 15-27.
11. Russell A.D.: Activity of biocides against mycobacteria. J Appl Bacteriol, 1996, 81: 87-101.
12. Russell A.D.: Bacterial adaptation and resistance to antiseptics, disinfectants and preservatives is not a new phenomenon. J Hosp Infect, 2004, 57(2): 97-104.
13. Rutala W.A. et al.: Disinfection and sterilization: An overview. American Journal of Infection Control, 2011, 41(5): S2 – S5.
14. Shintani H., Sakudo A., Burke P., McDonnell G.: Gas plasma sterilization of microorganisms and mechanisms of action. Experimental and Therapeutic Medicine, 2010, 1(5): 731-738. doi:10.3892/etm.2010.136.
15. Stickler D.J.: Intrinsic resistance of Gram-negative bacteria. In: Fraiese AP, Lambert PA, Maillard J.Y. (eds): Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterilization. 4th edn. Oxford: Blackwell Scientific Publ., 2004, s. 154-169.
16. Štefkovičová M. et al.: Dezinfekcia a sterilizácia, teória a prax. II. 2007.
17. Vyhláška Ministerstva zdravotníctva Slovenskej republiky 553 z 15. augusta 2007, ktorou sa ustanovujú podrobnosti o požiadavkách na prevádzku zdravotníckych zariadení z hľadiska ochrany zdravia.
18. Weber D.J., Rutala W.A.: Occupational risks associated with the use of selected disinfectants and sterilants. In: Rutala W.A. (ed.): Disinfection, sterilization, and antisepsis in healthcare. Champlain, New York: Polyscience Publications, 1998: 211-226.
19. Weber D.J., Rutala W.A.: Use of Germicides in the Home and the Healthcare Setting: Is There a Relationship Between Germicide Use and Antibiotic Resistance? Infect Control Hosp Epidemiol, 2006, 27: 1107-1119.
20. Wright W.F., Overman S.B., Ribes J.A.: (1-3)- β -D-Glucan Assay: A Review of its Laboratory and Clinical Application. Laboratory Medicine, 2011, 42(11): 679-685. https://doi.org/10.1309/LM-8BW8QNV7NZBROG



Ako má postupovať lekár, aby stanovil svojmu pacientovi pri podozrení na infekčné ochorenie správnu diagnózu a účinnú liečbu?

Okrem zistenia osobnej a rodinnej anamnézy so zameraním na epidemiologické a cestovateľské súvislosti, zistenia subjektívneho stavu pacienta, klinických symptómov (napr. horúčka, vyrážka, kašeľ, hnačka a pod.) musí lekár správne navrhnuť diagnostický algoritmus. Na zistenie etiopatogenézy infekčného ochorenia je dôležité vyšetriť bežné ukazovatele – krvný obraz, analýza moču, sedimentácia, hepatálne testy, röntgenologické vyšetrenie, elektrokardiogram, ultrasonografické vyšetrenie. A aj náročnejšie vyšetrenia ako biopsia orgánov, počítačová tomografia, magnetická rezonancia či endoskopické metódy majú nezastupiteľné miesto pri správnom určení diagnózy. Diagnostický algoritmus uzatvárajú mikrobiologické laboratórne vyšetrovacie metódy, ktorými cielene dokážeme pôvodcu ochorenia. Tieto vyšetrenia sa vykonávajú na pracoviskách klinickej mikrobiológie (PKM), ktoré sú súčasťou ústavných zdravotníckych zariadení alebo sú samostatnými poskytovateľmi zdravotnej starostlivosti. Národné referenčné centrá s celoslovenskou pôsobnosťou poskytujú vysokošpecializované vyšetrenia, ktoré sa rutinne nevykonávajú na PKM.

Konečná diagnóza pri podozrení na infekčné ochorenie sa môže urobiť iba v spolupráci ošetrojúceho lekára a klinického mikrobiológa.

Ošetrojúci lekár musí vedieť posúdiť, aký materiál v akom čase treba odobrať a ako správne zaslať na vyšetrenie na PKM a musí cez elektronickú žiadamku (online prepojenie PKM s klinickými pracoviskami) alebo klasickú papierovú žiadamku žiadať o konkrétne mikrobiologické vyšetrenie. Výsledok vyšetrenia na PKM závisí od dodržania správnych zásad pre odber, od zasielania a spracovania materiálu v laboratóriu a zasiela sa v reálnom čase bez zbytočných časových strát priamo do elektronického chorobopisu pacienta. Posúdenie výsledku mikrobiologického vyšetrenia vždy vyžaduje koreláciu s klinickým obrazom. Klinický mikrobiológ by mal byť v procese starostlivosti o pacienta integrálnym článkom terapeutického tímu a interpretovať výsledky mikrobiálnych laboratórnych vyšetrení u pacientov.

Včasná terapia môže výrazne zlepšiť prognózu priebehu infekčného ochorenia, skrátiť jeho priebeh a predísť nežiaducim komplikáciám. Podporná a symptomatická liečba sa v prípade potreby aktualizuje na kauzálnu (antiinfekčné liečivá).

Liečbu je niekedy potrebné nasadiť empiricky. Porovnanie s výsledkami vyšetrení laboratória klinickej mikrobiológie môže byť potvrdiť jej správnosť alebo je podkladom ošetrojúcemu lekárovi na jej prehodnotenie.

Zásady odberu a transportu materiálu na mikrobiologické vyšetrenie

Mikrobiologické vyšetrenie ordinuje ošetrojúci lekár. Je zodpovedný za správny odber a správny transport na pracovisko klinickej mikrobiológie (PKM). Za správny postup pri spracovaní materiálu a interpretáciu výsledkov vyšetrení je zodpovedný primár/vedúci laboratória, ktorý to svojím podpisom potvrdí.

Zásady správneho odberu biologického materiálu

1. Na základe možnej patogenézy ochorenia, ktoré lekár u pacienta predpokladá, rozhodne sa pre odber najvhodnejšieho druhu materiálov a načasovanie ich odberu (hlavne pri opakovaných odberoch).
2. Pojmom biologický materiál, ktorý sa odoberá na analýzu, označujeme krv, moč, stolicu, spútum, bronchoalveolárnu laváž, žalúdočnú, duodenálnu a pankreatickú šťavu, ale aj slzy, nosový sekrét, sliny, vývratky, žlč, mozgovomiechový mok, kostnú dreň, výpotok (synoviálny, pleurálny, ascitický), exsudát, hnis, plodovú vodu, vaginálny sekrét, spermie, tkanivá a uvoľnené bunky.
3. Odoberá dostatočné množstvo materiálu.
4. Ak je to možné, odber urobí pred začatím antiinfekčnej terapie.
5. Na odber použije vhodné odberové súpravy.
6. Dodržiava zásady odberu, platné pre odber určitého konkrétneho materiálu na určitý druh vyšetrenia; používa vhodné odberové súpravy.
7. Pri odbere sa sám chráni pred infekciou.
8. Počas odberu dbá na to, aby nekontaminoval odobratú vzorku.
9. Lekár alebo sestra označí vzorku čiarovým kódom alebo plným menom pacienta, dátumom narodenia, o akú vzorku ide (napr. výter z nosa, z tonzíl) a v prípade potreby označí aj hodinu odberu (napr. krv na kultiváciu baktérií).
10. Lekár alebo sestra vyplní všetky požadované údaje elektronicky alebo na sprievodnom lístku, vrátane čísla poisťovne pacienta a vyšetrení, ktoré požaduje od PKM.
11. Lekár označí elektronickým podpisom žiadamku, ktorú online doručí do PKM alebo klasickou cestou: pečiatkou a pridá svoj podpis na sprievodný lístok; bez riadne vyplneného sprievodného lístka nemôže PKM zaslaný materiál vyšetriť a musí si údaje zdĺhavo overovať telefonicky.

Zásady správneho transportu

- Cieľom správneho transportu je doručiť na PKM vzorky v takom stave, ako boli pri jeho odbere. Iba tak možnorobiť relevantnú mikrobiologickú diagnostiku. Spolu s materiálom musí byť zaslaný sprievodný lístok, na základe ktorého sa PKM rozhoduje pre určitý algoritmus vyšetrenia.
- Na transport treba zvoliť vhodné transportné médium, ak to druh materiálu vyžaduje.
- Treba zabezpečiť vhodnú teplotu pre transport materiálu (napr. vzorky na izoláciu vírusu zasielať v chlade, vzorky na izoláciu *N. gonorrhoeae* – pôvodcu kvapavky – zasielať pri laboratórnej teplote).
- Vzorku chrániť pred kontamináciou z prostredia.
- Zabezpečiť rýchly transport a neprekročiť maximálnu povolenú dobu transportu; pri obzvlášť závažných ochoreniach (napr. meningitída), zabezpečiť okamžitý transport kuriérom do PKM (a súčasne informovať pracovníkov laboratória o zasielaní urgentnej vzorky).

Zasielanie infekčného materiálu na mikrobiologické vyšetrenie

Pri transporte materiálu je potrebné mať na zreteli dve základné požiadavky:

1. Udržať materiál vo vzorke taký neporušený ako je najviac možné.

2. Chrániť všetkých, čo prichádzajú do styku s odobratým a transportovaným materiálom pred infikovaním sa.

Faktory, ktoré vplývajú na uchovanie sa infekčného agens v materiále sú: druh mikroorganizmu, druh biologického materiálu (likvor, krv, moč, plodová voda, tkanivá, hnis sú v tomto zmysle kritické materiály a vyžadujú si expresný transport so špecifickými podmienkami) teplota, vlhkosť, čas transportu, pH, množstvo a druh transportného média so vzorkou materiálu, vplyv slnečného alebo UV žiarenia, ako aj otrasy počas cesty. Antigény, nukleové kyseliny a mikrobiálne bunky sa mechanickými otrasmi obvykle narušia menej než morfológia alebo infektivita vírusov. Vždy platí zásada doručiť materiál do mikrobiologického laboratória tak rýchle, ako je to možné. Množstvo mikróbov výrazne klesá pri teplote nad 50 °C, pomerne rýchlo aj pri teplotách 25 – 30 °C. Niektoré neobalené vírusy (napr. enterovírusy) sú relatívne stabilné aj pri teplotách okolo 20 °C počas viac hodín. Na krátkodobý transport vírusov je najvhodnejšia teplota +4 až +10 °C, zvlášť citlivé vírusy (napr. respiračné vírusy) sa transportujú na topiacom sa ľade v kontajneri (termoske). Infektivitu a morfológiu vírusov narušujú aj zmeny teploty. Pomalé zmrazenie poškodzuje väčšinu vírusov (rotavírusy, herpetické vírusy a pod.), preto sa pri krátkodobom skladovaní vzorky nezmrázujú. Ak je potrebné uskladniť vzorky na dlhší čas je výhodnejšie zmrazenie na -70 °C, platí to najmä pre vzorky, ktoré sa budú vyšetrovať molekulárno-genetickými metódami (RNA vírusy). Pri zasielaní vzoriek musia byť skúmavky (nádoby) so vzorkou dobre uzavreté (ak nie je závitový uzáver, tak je potrebné zátku fixovať, napr. adhezívnou páskou), ak sa transportuje viac ako 1 nádobka, treba zabrániť ich vzájomnému poškodeniu dobrým zabalením. Pri zasielaní určitých vzoriek je potrebné (najmä pri zvlášť nebezpečných infekciách, ako je tuberkulóza, antrax, HIV/AIDS, besnota, hemoragické horúčky a pod.) obaliť primárnu nádobku so vzorkou buničinou s objemom najmenej 5-krát väčším, ako je objem vzorky a takto uložiť do ďalšej nepriepustnej nádoby (kovová, plastiková) s označením, že ide o zásielku s vysokým stupňom ohrozenia zdravia infekciou. V prípade poškodenia primárneho obalu sa tak zabezpečí kompletné vsiaknutie materiálu do buničiny a nedôjde ku kontaminácii vytečením vzorky mimo obal.

Zásady správneho spracovania materiálu

Pri prijíme materiálu na PKM je potrebné skontrolovať kompletnosť údajov na sprievodnom lístku a na materiáli.

Spracovanie vzoriek sa riadi algoritmami vyšetrení v klinickej mikrobiológii – pozri tabuľkovú časť nižšie.

Ak ošetrojúci lekár žiada o vyšetrenie, ktoré nie je súčasťou bežných algoritmov (napr. molekulárnu diagnostiku malárie), PKM to rešpektuje a navrhne laboratórium, ktoré požadované vyšetrenie zrealizuje.

Ak PKM vzorku nespracováva, pretože bola nesprávne odobratá, elektronicky alebo telefonicky o tom informuje ošetrojúceho lekára, ktorý materiál zaslal.

Opakovane odobraté materiály v ten istý deň z tej istej lokality sa vyšetrujú, ak ide o krv na hemokultiváciu; ak ide o ma-

teriály z rôznych miest určitej lokality (napr. výtery z rozsiahlej/hlbokej rany na dolnej končatine) odobraté tiež počas jedného dňa, treba bližšie špecifikovať miesto odberu (ster z okolia rany, výter z hĺbky rany).

Závažné aj predbežné nálezy hlási klinický mikrobiológ elektronicky alebo telefonicky ošetrojúcemu lekárovi aj keď sa ešte nemusí jednať o konečný výsledok (napr. mikroskopický nález v likvore pri podozrení na meningitídu).

V prípade potreby konzultuje s ošetrojúcim lekárom ďalší možný postup v diagnostike daného ochorenia.

LITERATÚRA

1. Baron E.J.: Specimen collection, transport and processing. In: Manual of clinical microbiology. Vol. 1. 11. ed. Washington DC: ASM Press, 2015, 1389 s. ISBN 978-1-55581-737-4.
2. Dubreuil L., Nagy E.: Anaerobes. In: Cornaglia G. et al.: 2012. European manual of clinical microbiology. 1th edition. Marne: Le Réveil de la Marne, 2012, 469 s. ISBN 978-2-87805-026-4. Laudat P., Nagy E.: Bacteria in purulent and serous fluid. In: Cornaglia G. et al.: 2012. European manual of clinical microbiology. 1th edition. Marne: Le Réveil de la Marne, 2012, 469 s. ISBN 978-2-87805-026-4.
3. Liptáková A. et al.: Mikrobiologická diagnostika pôvodcov infekčných ochorení pre študentov medicíny. Bratislava: Univerzita Komenského, 2018.
4. McLeod S.D. et al.: Reliability of transport medium in the laboratory evaluation of corneal ulcers. Am J Ophthalmol, 2005, 140: 1027-1031.
5. Meiyanti et al.: Alkaline peptone water plus 0.5 % agar suitable for transport of *Vibrio cholerae*. Universa Medicina, 2011, 30(2).
6. Miller J.M. et al.: A Guide to Utilization of the Microbiology Laboratory for Diagnosis of Infectious Diseases: 2018 Update by the Infectious Diseases Society of America and the American Society for Microbiology. Clinical Infectious Diseases, 2018, 67(4): (level Ia)
7. Mobley H.L.T. et al.: *Helicobacter pylori*: Physiology and Genetics. Washington DC: ASM Press, 2001, (level III).
8. Peugie-Lafeuille H., Riegel P.: Central nervous system infections. In: Cornaglia G. et al.: 2012. European manual of clinical microbiology. 1th edition. Marne: Le Réveil de la Marne, 2012, 469 s. ISBN 978-2-87805-026-4.
9. Public Health England: Investigations of Faecal Specimens for Enteric Pathogens. UK Standards for Microbiology Investigations. 2014, B 30 Issue 8.1.
10. Public Health England: Detection of bacteria with carbapenem-hydrolysing β -lactamases (carbapenemases). UK Standards for Microbiology Investigations. 2016, B 60 Issue 2.1.
11. Public Health England: Investigation of pus and exudates. UK Standards for Microbiology Investigations. 2016, B 14 Issue 6.2.
12. Public Health England: Investigation of Genital Tract and Associated Specimens. UK Standards for Microbiology Investigations. 2017, B 28 Issue 4.6.
13. Public Health England: Investigation of specimens other than blood for parasites. UK Standards for Microbiology Investigations. 2017, B 31 Issue 5.1.
14. Public Health England: Investigation of tissues and biopsies from deep-seated sites and organs. UK Standards for Microbiology Investigations. 2018, B 17 Issue 6.3.
15. Public Health England: Investigation of urine. 2018, B 41 Issue 8.6. s. 1-51.
16. Ronnberg C., Mildh M., Ullberg M., Ozenci V.: Transport time for blood culture bottles: underlying factors and its consequences. Diagn Microbiol Infect Dis, 2013, 76: 286-290.
17. Steele R.W., Marmer D.J., O'Brien M.D., Tyson S.T., Steele C.R.: Leukocyte survival in cerebrospinal fluid. J Clin Microbiol, 1986, 23: 965-966.
18. van der Velden L.B., Vos F.J., Mouton J.W., Sturm P.D.: Clinical impact of preincubation of blood cultures at 37 degrees C. J Clin Microbiol, 2011, 49: 275-280.

Tab. 1.8.1. Odber, transport a uskladnenie biologických vzoriek na mikrobiologické vyšetrenie.

Biologický materiál	Odborová súprava	Teplota uchovávaní vzorky a optimálny čas od odboru po spracovanie v laboratóriu	Teplota uchovávaní vzorky a maximálny čas od odboru po spracovanie v laboratóriu	Osobitné odporúčania	Poznámky	Informácie pre laboratórium
venózna plná krv na hemokultiváciu - dospelí: 20 – 30 ml na jednu sadu hemokultúr (objem podľa odporúčania výrobcu, resp. 1 diel krvi / 4-5 dielov média), rozdelených do aeróbnej a anaeróbnej hemokultivačnej fľaše, - deti: objem krvi podľa váhy dieťaťa	hemokultivačná fľaša	+20 až +25 °C umiestniť naočkovanú hemokultivačnú fľašu do automatu čo najskôr po odbere	+20 až +25 °C umiestniť naočkovanú hemokultivačnú fľašu do automatu čo najskôr po odbere, najneskôr však do 2 hod.	Je potrebné dodržať objem krvi/hemokultivačná fľaša podľa odporúčania výrobcu. Odber vykonávame pred podaním antibiotík. Akútny febrilný stav: 2 sady ¹ z 2 odberových miest v priebehu 10 minút Subakútny febrilný stav: 2 alebo 3 sady počas 24 hod. odobraté z rôznych odberových miest, interval medzi odbermi min. 3 hod. Akútna endokarditída: 3 sady z rôznych odberových miest v priebehu 1-2 hod. Podozrenie na katérovú infekciu: odobrať simultánne 1 sadu cez katéter, ďalšiu sadu z periférnej žily. Horúčka neznámej etiológie: 2 až 4 sady z rôznych odber. miest. Keď sú negatívne po 24 až 48 hod., treba odobrať 2-3 ďalšie sady.	Hemokultivačný automat by mal byť umiestnený v lôžkovom zdravotníckom zariadení tak, aby bol dostupný počas 24 hodín. Predĺženie času od odboru po umiestnenie naočkovanej hemokultivačnej fľaše do automatu spôsobuje predĺženie doby detekcie pozitIVITY.	Na žiadanú uviesť čas odboru
likvor na mikroskopiu a kultiváciu	sterilná skúmavka	+20 až +25 °C Spracovať bezodkladne po odbere (do 15-30 min). Výsledok mikroskopie hlásiť do 1 hodiny po odbere.	+20 až +25 °C Spracovať maximálne do 2 hod. po odbere. Po 2 hodinách od odboru dochádza k rozpadu leukocytov a vzorka neodráža reálne klinický stav pacienta.	Nikdy nedávať likvor do chladničky! Minimálny objem vzorky 1 ml.		Na žiadanú uviesť čas odboru. V prípade akútneho ochorenia informovať laboratórium o odbere a zaslaní likvoru na vyšetrenie.
punktát, aspirát, exudát, sekret, hnis – z telesných dutín, vnútorných orgánov, z abscesu, výplach dutín, žalúdočný obsah, žľe, plodová voda, dialyzát	sterilná nádobka/skúmavka Pri podozrení na infekciu anaeróbnymi baktériami je nutné zabezpečiť anaeróbne podmienky pre uchovávanie a transport : injekčná striekačka bez vzduchu s bezpečným uzáverom, anaeróbna hemokultivačná fľaša, anaeróbne transportné systémy.	+20 až +25 °C Spracovať bezodkladne po odbere (do 15 – 30 min).	+20 až +25 °C Spracovať bezodkladne po odbere (do 15-30 min), najneskôr však do 2 hodín ² . Pri oneskorení dodania vzorky do laboratória sa znižuje šanca na zachytí anaeróbných baktérií.	Minimálny objem vzorky 1 ml. Väčší objem hnisu a purulentnej tekutiny zabezpečuje lepšiu životaschopnosť anaeróbných baktérií. Dialyzát – optimálny objem pre mikrobiologickú analýzu je 10-50 ml. Dialyzát (5 až 10 ml) možno očkovať do hemokultivačných nádob.	Uprednostniť odber tekutého biologického materiálu pred výterom na odberový tampón.	Na žiadanú uviesť čas odboru.

Biologický materiál	Odberová súprava	Teplota uchovávaní vzorky a optimálny čas od odboru po spracovanie v laboratóriu	Teplota uchovávaní vzorky a maximálny čas od odboru po spracovanie v laboratóriu	Osobitné odporúčania	Poznámky	Informácie pre laboratórium
tkanivá, bioptické vzorky	sterilná nádobka/skúmavka	+20 až +25 °C Spracovať bezodkladne po odbere (do 15 -30 min).	+20 až +25 °C Spracovať bezodkladne po odbere (do 15 -30 min), najneskôr však do 2 hod. ^c . Pri oneskorení dodania vzorky do laboratória je sa znižuje šanca na zachyt an aeróbných baktérií.	Minimálny objem vzorky 1 cm ³ . Bioptické vzorky a menšie kúsky tkaniva je odporúčané umiestniť do malého množstva sterilnej injekčnej vody. Na transport vzoriek pľúcneho tkaniva a biopsie pľúc nepoužívať fyziologický roztok, môže pôsobiť inhibične na <i>Legionella</i> spp.	Uprednostniť odber vzoriek tkanív pred výterom na odberový tampón.	Na žiadanku uviesť čas odboru.
biopsia žalúdočnej sliznice na dokaz <i>H. pylori</i>	sterilná nádobka/skúmavka s 20 % roztokom glukózy	+20 až +25 °C Spracovať čo najskôr po odbere (do 1 hod).	+2 až +8 °C do 4 hod. po odbere ^c			Na žiadanku uviesť čas odboru. Cieľový odber, je potrebné vopred dohodnúť s laboratóriom.
chlopňové náhrady, kľbne náhrady, cievne štepy, súčasti drenážnych systémov, katetre, kanyly, dreňy, intrauterinné teliesko	sterilná nádobka/skúmavka	+20 až +25 °C Spracovať bezodkladne po odbere (do 15 - 30 min).	+2 až +8 °C do 2 hod. po odbere ^c	Rýchlym dodaním vzorky do laboratória predídeme vyschnutiu vzorky.		Na žiadanku uviesť čas odboru.
zoškrab z rohovky, biopsia rohovky, aspirát, výplach, biopsia sklovca, vnútroočná tekutina, aspirát z prednej komory	Inokulácia na kultivačné médiá (tuhé a pomnožovacie) a príprava náteru na sterilné sklíčko priamo pri lôžku pacienta.	+20 až +25 °C Dodať do laboratória bezodkladne po odbere (do 15 - 30 min).	+20 až +25 °C Spracovať maximálne do 2 hod. po odbere.	Pri podozrení na kanalikulitídu spôsobenú najčastejšie <i>Actinomyces</i> sp. dodať vzorku do laboratória v transportnom médiu podľa Amiesu bezodkladne po odbere	Kultivačné médiá poskytuje laboratórium.	Na žiadanku uviesť čas odboru.
zoškrab z rohovky, kontaktné šošovky pri podozrení na amébovú infekciu	Inokulácia kultivačnej pôdy ihneď po odbere. Kontaktné šošovky poslať v puzdre na ich uskladnenie aj s roztokom.	+20 až +25 °C Dodať do laboratória bezodkladne po odbere (do 15 - 30 min).	+20 až +25 °C Dodať do laboratória bezodkladne po odbere (do 15 - 30 min).		Kultivačné médiá poskytuje laboratórium	Na žiadanku uviesť čas odboru.
duodenálna ščava na giardiózu, aspiráty, kostná dreň, tkanivá na dokaz echinokokózy, amebózy, tkanivové parazitozy, likvor	sterilná odberová skúmavka	+37 °C v termoske Dodať do laboratória čo najskôr po odbere (do 1 hod).	+37 °C v termoske Dodať do laboratória čo najskôr po odbere (do 1 hod).			Na žiadanku uviesť čas odboru.

Biologický materiál	Odberová súprava	Teplota uchovávaní vzorky a optimálny čas od odboru v laboratóriu	Teplota uchovávaní vzorky a maximálny čas od odboru po spracovanie v laboratóriu	Osobitné odporúčania	Poznámky	Informácie pre laboratórium
výter z tonzíl výter z faryngu výter z nosa ster z jazyka ster z bukálnej sliznice výter z rany výter z ložiska ster z kože výter z konečníka stolica na dôkaz bakteriálnych črevných patogénov	sterilný detoxikovaný vatový tampón s transportným médiom podľa Amiesa alebo Stuarta s aktivným uhlím	+20 až +25 °C Spracovať čo najskôr po odbere – pre spolaživý kultivačný dôkaz citlivých mikroorganizmov ^{a,b} Pri podozrení na infekciu <i>N. gonorrhoeae</i> sa odporúča očkovať biologický materiál priamo na kultivačnú pôdu a ihneď inkubovať pri teplote 36±1 °C v prostredí s 5 % CO ₂	+20 až +25 °C 2 až 4 ^c hod. – predĺžovaním času od odboru po spracovanie vzorky klesá pravdepodobnosť kultivačného dôkazu citlivých mikroorganizmov ^{a,b}	Pri podozrení na hnačku spôsobenú bakteriálnymi črevnými patogénmi je odporúčané poslať stolicu na tampóne v transportnom médiu.	Nepoužívať detoxikovaný tampón bez transportného média.	Na žiadanku uviesť čas odboru. Kultivácia na <i>Bordetella pertussis</i> sa rutinne nevykonáva, odber je potrebné vopred dohodnúť s laboratóriom.
výtery na dôkaz mikrobiálnych antigénov	sterilný tampón podľa odporúčania výrobcu diagnostickej súpravy	+20 až +25 °C Spracovať čo najskôr po odbere u hospitalizovaných pacientov v akútnom stave.	+20 až +25 °C alebo +2 až +8 °C do 24 hod. ^c		Výsledok vyšetrenia pri purulentnej meningitíde je hotový do hodiny od dodania vzorky do laboratória.	
výter z pošvy výter z cervixu vagino-rektálny výter na skrining <i>Streptococcus agalactiae</i> v 35. -37. týždni gravidity	sterilný detoxikovaný vatový tampón s transportným médiom podľa Amiesa alebo Stuarta bez aktívneho uhlia	+20 až +25 °C Spracovať čo najskôr po odbere – pre spolaživý kultivačný dôkaz citlivých mikroorganizmov ^{a,b} Pri podozrení na infekciu <i>N. gonorrhoeae</i> sa odporúča očkovať biologický materiál priamo na kultivačnú pôdu a ihneď inkubovať pri teplote 36±1 °C v prostredí s 5 % CO ₂	+20 až +25 °C 2 až 4 ^c hod. – predĺžovaním času od odboru po spracovanie vzorky klesá pravdepodobnosť kultivačného dôkazu citlivých mikroorganizmov ^{a,b}		Nepoužívať detoxikovaný tampón bez transportného média.	Na žiadanku uviesť čas odboru.

Biologický materiál	Odberová súprava	Teplota uchovávaní vzorky a optimálny čas od odboru po spracovanie v laboratóriu	Teplota uchovávaní vzorky a maximálny čas od odboru po spracovanie v laboratóriu	Osobitné odporúčania	Poznámky	Informácie pre laboratórium
výter z nazofaryngu výter z laryngu (pri epiglottitíde sa vyhybať výterom, odporúčaný je odber hemokultúry) výter z ucha hnis zo stredoušia na tampóne výter zo spojovky výter z uretry prostatický sekrét na tampóne	sterilný detoxikovaný vatový tampón na drôte s transportným médiom podľa Amiesu alebo Stuarda bez aktívneho uhlia alebo s aktívnym uhlím.	+20 až +25 °C Spracovať čo najskôr po odbere – pre spoľahlivý kultivačný dôkaz citlivých mikroorganizmov ^{a, b} , Pri podozrení na infekciu N. <i>gonorrhoeae</i> sa odporúča očkovať biologický materiál priamo na kultivačnú pôdu a ihneď inkubovať pri teplote 36±1 °C v prostredí s 5% CO₂	+20 až +25 °C 2 až 4 ^h hod. -predĺžovaním času od odboru po spracovanie vzorky klesá pravdepodobnosť kultivačného dôkazu citlivých mikroorganizmov ^{ab} .	Tekutina získaná pri tympanocentéze alebo tampón tekutiny z dutiny stredného ucha u pacientov s myringotomickými rúrkami alebo otorrheou, doručiť do laboratória pri +20 až +25 °C do 2 hod.	Nepoužívať detoxikovaný tampón bez transportného média. Kultivácia na <i>Bordetella pertussis</i> sa rutinne nevykonáva, odber je potrebné vopred dohodnúť s laboratóriom	Na žiadanú uviesť čas odboru Kultivácia na <i>Bordetella pertussis</i> sa rutinne nevykonáva, odber je potrebné vopred dohodnúť s laboratóriom
spútum bronchoalveolárna laváž, aspiráty z dolných dýchacích ciest chránený kefkový ster – PBS – bez požiadavky na anaeróbnú kultiváciu	sterilná odberová nádobka	+20 až +25 °C Spracovať čo najskôr po odbere – pre spoľahlivý kultivačný dôkaz citlivých mikroorganizmov ^b ,	+20 až +25 °C do 2 hod. po odbere, +2 až +8 °C v deň odboru ^c .	Dodržanie podmienok chladeného transportu je podmienkou správneho výsledku semikvantitatívnej kultivácie.		Na žiadanú uviesť čas odboru. Je nutné sledovať teplotu transportu.
aspiráty z dolných dýchacích ciest chránený kefkový ster – PBS –pri požiadavke na anaeróbnú kultiváciu	sterilná odberová nádobka	+20 až +25 °C Spracovať čo najskôr po odbere – pre spoľahlivý kultivačný dôkaz citlivých mikroorganizmov ^{ab}	+20 až +25 °C do 2 hod. po odbere, +2 až +8 °C v deň odboru ^c .		Anaeróbne podmienky pre uchovávanie a transport: injekčná striekačka bez vzduchu s bezpečným uzáverom, anaeróbna hemokultivačná nádobka, anaeróbne transportné systémy.	Na žiadanú uviesť čas odboru
moč	sterilná odberová nádobka/ skúmavka	+20 až +25 °C Spracovať čo najskôr po odbere (do 2 hod).	+20 až +25 °C do 2 hod. po odbere +2 až +8 °C v deň odboru ^c V prípade použitia odberovej skúmavky s obsahom 1-2 % kyseliny boritej sa transportná doba predlži na 48 hodín. ^e	Dodržanie podmienok chladeného transportu je podmienkou správneho výsledku semikvantitatívnej kultivácie.	Kyselina boritá môže mať inhibičný účinok na niektoré mikroorganizmy. Je potrebné dodržať objem vzorky odporúčanej výrobcom odberovej skúmavky.	Na žiadanú uviesť čas odboru. Je nutné sledovať teplotu počas transportu.

Biologický materiál	Oberová súprava	Teplota uchovávaní vzorky a optimálny čas od odboru po spracovanie v laboratóriu	Teplota uchovávaní vzorky a maximálny čas od odboru po spracovanie v laboratóriu	Osobitné odporúčania	Poznámky	Informácie pre laboratórium
ejakulát	sterilná odberová nádoba	+20 až +25 °C Spracovať čo najskôr po odbere - pre spoľahlivý kultivačný dôkaz citlivých mikroorganizmov ^{a, b}	+20 až +25 °C v prípade, že sa nepredpokladá prítomnosť citlivých mikroorganizmov ^{a, b} , dodať do laboratória pri +2 až +8 °C v deň odboru ^c			Na žiadanku uviesť čas odboru
stolica na dôkaz mikrobiálnych antigénov, toxínov	sterilná odberová nádoba	+20 až +25 °C V prípade hospitalizovaných pacientov spracovať čo najskôr po odbere.	+2 až +8 °C do 24 hod. ^c		Výsledok vyšetrenia je hotový do hodiny od dodania vzorky do laboratória.	
stolica na dôkaz <i>Enterobacteriaceae</i> produkujúcich karbapenemázu	sterilná odberová nádoba	+20 až +25 °C V prípade hospitalizovaných pacientov spracovať čo najskôr po odbere.	+2 až +8 °C do 24 hod. ^c			
stolica na dôkaz <i>Vibrio cholerae</i>	odberová nádoba s alkalickou peptónovou vodou	+20 až +25 °C Spracovať v laboratóriu čo najskôr po odbere.	+20 až +25 °C do 6 hod. po odbere ^c .			Na žiadanku uviesť čas odboru. Cieľový odber, je potrebné vopred dohodnúť s laboratóriom.
výtěr z cervixu, výtěr z uretry	odberová súprava na mykoplazmy a ureaplazmy (dodáva výrobca diagnostickej súpravy)	+20 až +25 °C do 5 hod po odbere (zdroj: výrobca diagnostickej súpravy)	+2 až +8 °C do 48 hod. po odbere ^c (zdroj: výrobca diagnostickej súpravy)	Odporúčané je používať odberovú súpravu dodávanú laboratóriom do ktorého bude odobratá vzorka odoslaná. K diagnostickým súpravám rôznych výrobcov primárne žia rôzne odberové súpravy.	Vhodný je daktrónový, kalcium-algínátový alebo polyesterový tampón na umelohmotnej paličke. Tampón po odbere zalomiť do transportného média dodávaného laboratóriom.	
výtěr z cervixu, výtěr z uretry na dôkaz <i>Trichomonas vaginalis</i>	špeciálna odberová súprava na s transportnou pôdou, sterilný detoxikovaný vatový tampón (na drôte) s transportným médiom podľa Amiesu alebo Diamandovo médium	+20 až +25 °C do 2 hod.	+20 až +25 °C do 24 hod. po odbere ^c			

Biologický materiál	Odberová súprava	Teplota uchovávaní vzorky a optimálny čas od odberu po spracovanie v laboratóriu	Teplota uchovávaní vzorky a maximálny čas od odberu po spracovanie v laboratóriu	Osobitné odporúčania	Poznámky	Informácie pre laboratórium
stolica na parazity	sterilná odberová nádoba s lopatkou	+20 až +25 °C Hnačkovitá stolica – spracovať v laboratóriu bezodkladne po odbere (do 30 min). Polotuhá stolica – spracovať v laboratóriu čo najskôr po odbere (do 1 hod.).	Formovaná stolica: +2 až +8 °C do 24 hod. po odbere Hnačkovitá a polotuhá stolica: +20 až +25 °C do 30 min. až 1 hod.	Hnačkovitá stolica môže obsahovať trofozoity prvokov, polotuhá stolica môže obsahovať trofozoity aj cysty prvokov. Trofozoity sú citlivé na vyschnutie. Nikdy nepridávať formalín k vzorke.		
perianálny otláčok	podložné skličko s priehladnou lepiacou páskou	+2 až +8 °C v deň odberu	+2 až +8 °C do 24 hod. po odbere			
determinácia červov a ich častí	sterilná nádoba s niekoľkými kvapkami fyz. roztoku alebo vody, pri dlhšom transporte vložiť do etanolu	+20 až +25 °C Dodať do laboratória v natívnom stave bezodkladne po odbere (do 15 min).	+20 až +25 °C Dodať do laboratória v natívnom stave bezodkladne po odbere (do 15 min).	Nepridávať fixačné roztoky (napr. formalín).		
likvor, očná tekutina na dôkaz autochtonej produkcie protilátok	sterilná skúmavka	+20 až +25 °C spracovať do 2 hod. po odbere	+2 až +8 °C spracovať do 6 až 12 hod. po odbere -18 až -24 °C > 12 hod. (na žiadanke je potrebné uviesť informáciu o zmrazení vzorky a dátum zmrazenia). Vzorky nie možno opakovane zmrazovať a rozmrazovať.			ZML sprostredkuje informáciu o špecializovaných analýzach vykonávaných v ŠML/ NRC- odberové súpravy, podmienky transportu.
vzorky na molekulárno-biologickú diagnostiku (plná krv, likvor, BAL, punktiáty, očná tekutina, sery, tkanivá, moč)	odberová súprava na odber krvi s EDTA, skúmavky, tampón s plastovými vlákнами, špeciálne odberové súpravy	+20 až +25 °C spracovať do 2 hod. po odbere	+2 až +8 °C spracovať do 12 až 24 hod. po odbere. -18 °C až -24 °C > 24 hod. (na žiadanke je potrebné uviesť informáciu o zmrazení vzorky a dátum zmrazenia). Vzorky nie možno opakovane zmrazovať a rozmrazovať.			ZML sprostredkuje informáciu o špecializovaných analýzach vykonávaných v ŠML/ NRC- odberové súpravy, podmienky transportu.

Biologický materiál	Odberová súprava	Teplota uchovávaní vzorky a optimálny čas od odberu v laboratóriu	Teplota uchovávaní vzorky a maximálny čas od odberu po spracovanie v laboratóriu	Osobitné odporúčania	Poznámky	Informácie pre laboratórium
venózna krv na stanovenie špecifických protilátok/antigénov (5 – 10 ml)	odberová súprava bez protizrážanl. činidiel, s aktivátormi zrážania	Odobratú krv je vhodné nechať stáť pri izbovej teplote +20 až +25 °C do 1 až 2 hod. Dodržať do laboratória v deň odberu.	+2 až +8 °C do 72 hod. ° sérum alebo plazma (oddeliť od krvných elementov centrifugáciou). -18 °C až -24 °C > 72 hod. (na žiadanke je potrebné uviesť informáciu o zmrazení vzorky a dátum zmrazenia). Vzorky nie možno opakovane zmrazovať a rozmrazovať. Sérum musí byť do laboratória prepravené zmrazené.			Na žiadanke uviesť čas odberu. ZML sprostredkuje informáciu o špecializovaných analýzach vykonávaných v ŠML/ NRC- odberové súpravy, podmienky transportu
spútum, BAL, moč, hnis, sery/výtery, likvor, pleurálny punktát, tekutina po výplachu žalúdka, krv, kostná dreň na dôkaz mykobaktérií	Sterilná skúmavka/ odberová nádobka	+2 až +8 °C do 24 hod. po odbere	+2 až +8 °C do 24 hod. po odbere	Odber je potrebné vykonať pred podaním anti-tuberkulotík.	Ciprofloxacín, levofloxacín, moxifloxacín, azitromycín, klaritromycín môžu mať signifikantný účinok na mykobaktérie.	

- 1 1 sada pozostáva z aeróbnej a anaeróbnej hemokultivačnej fľaše
- 2 Maximálny čas dodania do laboratória sa vzťahuje na ambulantné zdrav. zariadenia s obmedzenou dostupnosťou mikrobiologického laboratória.
- 3 Pri požiadavke o kultiváciu na anaeróbné baktérie spracovať vzorku bezodkladne, najneskôr do 2 hodín po odbere, uchovávať pri 20-25 °C.
- 4 N. gonorrhoeae, N. meningitidis, S. pneumoniae, H. influenzae, Shigella spp., Bordetella pertussis – pre spľahlivú detekciu týchto patogénov je potrebné bezodkladné spracovanie vzorky po odbere! Oneskorené spracovanie do 6 hod. spôsobuje pokles ich náložu aj pri použití transportného média. Po 6 hodinách nastane významný pokles počtu uvedených baktérií vo vzorke.
- 5 Maximálny čas dodania do laboratória sa vzťahuje na ambulantné zdrav. zariadenia s obmedzenou dostupnosťou mikrobiologického laboratória.
- 6 Pri požiadavke o kultiváciu na anaeróbné baktérie spracovať vzorku bezodkladne, najneskôr do 2 hodín po odbere, uchovávať pri 20-25 °C.
- 7 N. gonorrhoeae, N. meningitidis, S. pneumoniae, H. influenzae, Shigella spp., Bordetella pertussis – pre spľahlivú detekciu týchto patogénov je potrebné bezodkladné spracovanie vzorky po odbere! Oneskorené spracovanie do 6 hod. spôsobuje pokles ich náložu aj pri použití transportného média. Po 6 hodinách nastane významný pokles počtu uvedených baktérií vo vzorke.
- 8 Maximálny čas dodania do laboratória sa vzťahuje na ambulantné zdrav. zariadenia s obmedzenou dostupnosťou mikrobiologického laboratória.
- 9 Pri požiadavke o kultiváciu na anaeróbné baktérie spracovať vzorku bezodkladne, najneskôr do 2 hodín po odbere, uchovávať pri 20-25 °C (Miller, 2018).
- 10 N. gonorrhoeae, N. meningitidis, S. pneumoniae, H. influenzae, Shigella spp., Bordetella pertussis – pre spľahlivú detekciu týchto patogénov je potrebné bezodkladné spracovanie vzorky po odbere! Oneskorené spracovanie do 6 hodín spôsobuje pokles ich náložu aj pri použití transportného média. Po 6 hod. nastane významný pokles počtu uvedených baktérií vo vzorke.
- 11 Maximálny čas dodania do laboratória sa vzťahuje na ambulantné zdrav. zariadenia s obmedzenou dostupnosťou mikrobiologického laboratória.
- 12 Maximálny čas dodania do laboratória sa vzťahuje na ambulantné zdrav. zariadenia s obmedzenou dostupnosťou mikrobiologického laboratória.

Vysvetlivky: ŠML – špecializované mikrobiologické laboratórium, NRC – Národné referenčné centrum.



Pracovníci a prístroje na mikrobiologických pracoviskách neustále vykonávajú rôzne pracovné postupy na dôkaz prítomnosti patogénu vo vyšetrovanom biologickom materiáli. Následne spravia zaužívané postupy na jeho identifikáciu alebo na sledovanie priebehu a liečby infekčného ochorenia pomocou odporúčaných laboratórnych parametrov. Každý deň od začiatku pracovnej doby tak prebieha ranná rutina ako je príprava diagnostík a pomocného materiálu, inicializácia a kalibrácia prístrojov, príprava naočkovaných vzoriek z predchádzajúcich dní na odčítanie, príjem a spracovanie nových vzoriek a mnoho ďalších. Každé pracovisko má síce svoju typickú dennú rutinu, ale tá je pre každé pracovisko počas každého dňa takmer rovnaká. Väčšina z pracovníkov už nemusí rozmýšľať nanovo, aký bude ďalší krok v poradí. To sa naučili už predtým, v príprave na povolanie a v praxi na svojom pracovisku. Pre väčšinu dennej práce platí, že pracovné postupy prebiehajú viac či menej automaticky a v súlade s vnútornými predpismi pracoviska.

Prevádzka na mikrobiologickom pracovisku sa na prvý pohľad pre nezainteresovanú osobu môže javiť ako pomerne zložitá. Pre odborníka je však dostatočne jednoduchá na to, aby ju vedel jednoznačne opísať. A pokiaľ sa dá niečo jednoznačne opísať, môže to v mnohých prípadochrobiť aj stroj alebo zoradené prístrojové linky. Prevádzku v modernom laboratóriu preto môže v čoraz väčšej miere riadiť počítač a analýzy môžu vykonávať prístroje namiesto laboranta, resp. mikrobiológa.

Svoj intelektuálny potenciál by každý mikrobiológ mal využiť efektívnejšie, najmä na expertnú činnosť, pri ktorej je potrebné využiť množstvo odborných informácií a dlhoročné skúsenosti. Ide o:

- indikáciu adekvátnych, klinicky relevantných a nákladovo efektívnych mikrobiologických vyšetrení vedúcich k dôkazu infekčného agens v rámci komplexnej diferenciálnej diagnostiky ochorenia infekčnej etiológie,
- určenie a kontroly preanalytických požiadaviek na správnu mikrobiologickú diagnostiku, najmä správny odber, uchovávanie a transport validne indikovaných vzoriek,
- vykonávanie mikrobiologických vyšetrovacích metód zvolených v optimálnej nadväznosti na konkrétne klinickú symptomatológiu a epidemiologickú charakteristiku ochorenia vyšetrovaného pacienta,
- interpretácia laboratórnych výsledkov vo vzťahu ku klinickým prejavom infekcií s prípadným odporúčaním cielej antimikróbovej terapie,
- dodržiavanie zásad antibiotickej politiky, obozretného používania antimikrobiálnych liečiv,
- prevencie a kontroly infekcií vrátane infekcií spojených s poskytovaním zdravotnej starostlivosti,
- prevencie a kontroly antibiotickej rezistencie,
- efektívnu a medziodborovú spoluprácu s klinickými aj komplementárnymi disciplínami v procese komplexnej starostlivosti o pacientov s predpokladaným alebo potvrdeným infekčným ochorením,
- klinicko-mikrobiologické konzultačné a konziliárne činnosti,
- odborného a organizačného riadenia prevádzky mikrobiologického pracoviska,
- riadenie kvality v činnosti mikrobiologického pracoviska vrátane procesu akreditácie a certifikácie,
- tvorbu algoritmov (pracovných, procesných, diagnostických a liečebných).

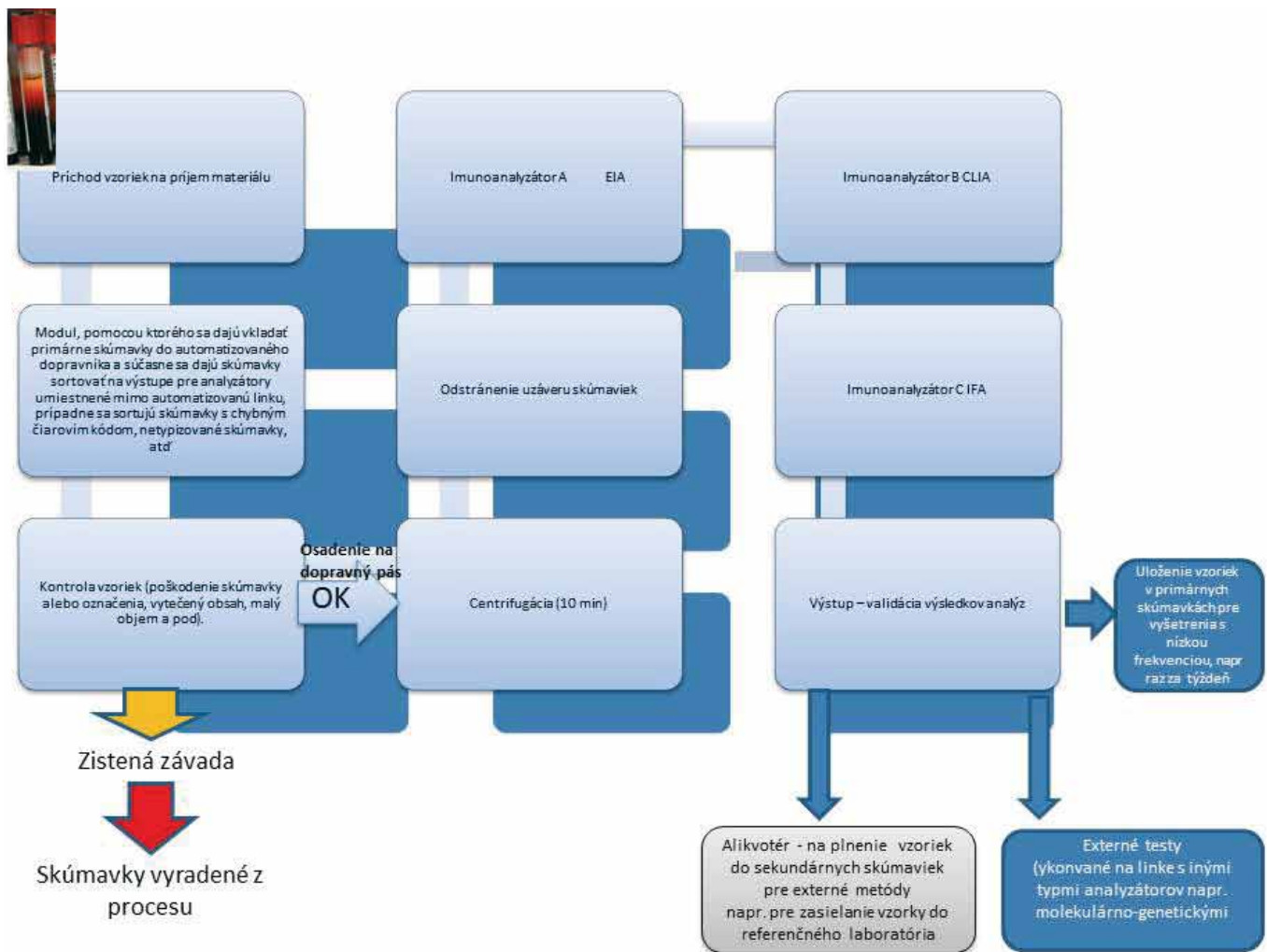
Uvedené činnosti zatiaľ žiadne prístrojové a softvérové vybavenie v našich podmienkach nedokáže.

Realita je však taká, že pokiaľ v klinickej medicíne dokážu už roboty operovať človeka, je otázkou času, kedy sa také autonómne systémy objavia aj v klinickej mikrobiológii. Vývoj v laboratórnych a informačných technológiách neustále napreduje a mnohé z diagnostických technológií, predovšetkým v oblasti imunoanalýz a molekulárno-genetických analýz, už dnes dokážu fungovať čiastočne bez zásahu obsluhy. Dokážu viac-menej autonómne menežovať potrebné diagnostiká a systémové kvapaliny (odpadáva teda potreba ich externého uchovávaní v chladničkách, ich opakovaného vykladania a ukladania do analyzátorov, potreba sledovať ich expiráciu a pod.), samostatne sa dokážu kalibrovat' v predpísaných intervaloch, vykonať svoju údržbu bez zásahu obsluhy a majú autodiagnostiku prípadných porúch. Dokážu vytvoriť kontinuitálne a optimálne zoradenie prijatých biologických vzoriek do sledu analýz s cieľom čo najskôr získať výsledky z čo najväčšieho počtu vzoriek s možnosťou kedykoľvek zaradiť statimovú (urgentnú) vzorku s jej prednostným vyšetrením v priebehu niekoľkých minút. Majú aj expertný modul, ktorý vie validovať výsledky analýz vzoriek na základe výsledkov analýz kontrolných materiálov, navrhnúť interpretáciu a/alebo ďalší postup. To všetko v omnoho kratšom čase, ako by to dokázali ľudia.

Vznik takýchto systémov je umožnený vytvorením vhodných procesných algoritmov na základe množstva informácií. Zásadným predpokladom úspešného zvládnutia záplavy informácií je ich triedenie a priradovanie priorit. Ak sa stanoví, podľa akých kritérií sa vlastne informácie (dáta, hodnoty) posudzujú, možno tak vytvoriť pre ich triedenie automatizované filtre, pomocou ktorých to namiesto človeka ľahko urobí počítač, keď mu autonómny postup správne popíšu v programe. Tieto spoľahlivé pracovné postupy, ktoré možno vykonávať bez aktívneho a permanentného zapojenia ľudského intelektu, sa nazývajú algoritmy. Je to rutinný, stále rovnako sa opakujúci sled pracovných krokov, ktoré spoľahlivo vedú k výsledku. Aj keď vývoj algoritmov smeruje do fungovania strojov a počítačov, má rovnako zásadný význam aj v organizácii práce a pracovnej činnosti ľudí. Cez algoritmy pracovných činností zamestnancov laboratória v spojení algoritmami, podľa ktorých pracujú zapojené technológie tak vzniká denná rutina.

Optimálnym zvládnutím dennej rutiny vzniká voľná kapacita na vlastnú expertnú činnosť a iných kreatívnych činností na plnenie komplexných úloh mikrobiologickej diagnostiky. Pre názornosť podobne oslobodzujúci efekt má kalkulačka pri výpočtoch, kde sa síce človek tak dobre nepocvičí v matematike a nie je v priamom kontakte s tým, čo sa s číslami vlastne deje, ale získa skoro okamžitý a bezchybný výsledok. Z predchádzajúcich poznatkov vyplynuli niektoré podmienky, ktoré musí pracovný postup spĺňať, aby sme ho vyhlásili za **algoritmus**:

1. **Musí byť opísateľný.**
2. **Musí nám dávať nejaký výsledok.**
3. **Musí byť zložený z inštrukcií tak základných, že ich vykonávateľ alebo prístroj vie vykonať bez ďalších podmienok, otázok či premýšľania.**
4. **V každom okamihu musí byť postupom dané, podľa ktorej inštrukcie sa bude ďalej pokračovať.** Nesmie to závisieť na slobodnom rozhodnutí vykonávateľ alebo na náhodných



Obr. 1.9.1. Procesný algoritmus v modernom sérologickom laboratóriu.

chybách v hardvéri či softvéri. Postup sa tiež nesmie „zaseknúť“ kvôli neočakávaným okolnostiam. Vždy musí byť jasné, čo robí ďalej alebo že sa proces ukončil (napr. zabudovaná autodiagnostika v automatoch).

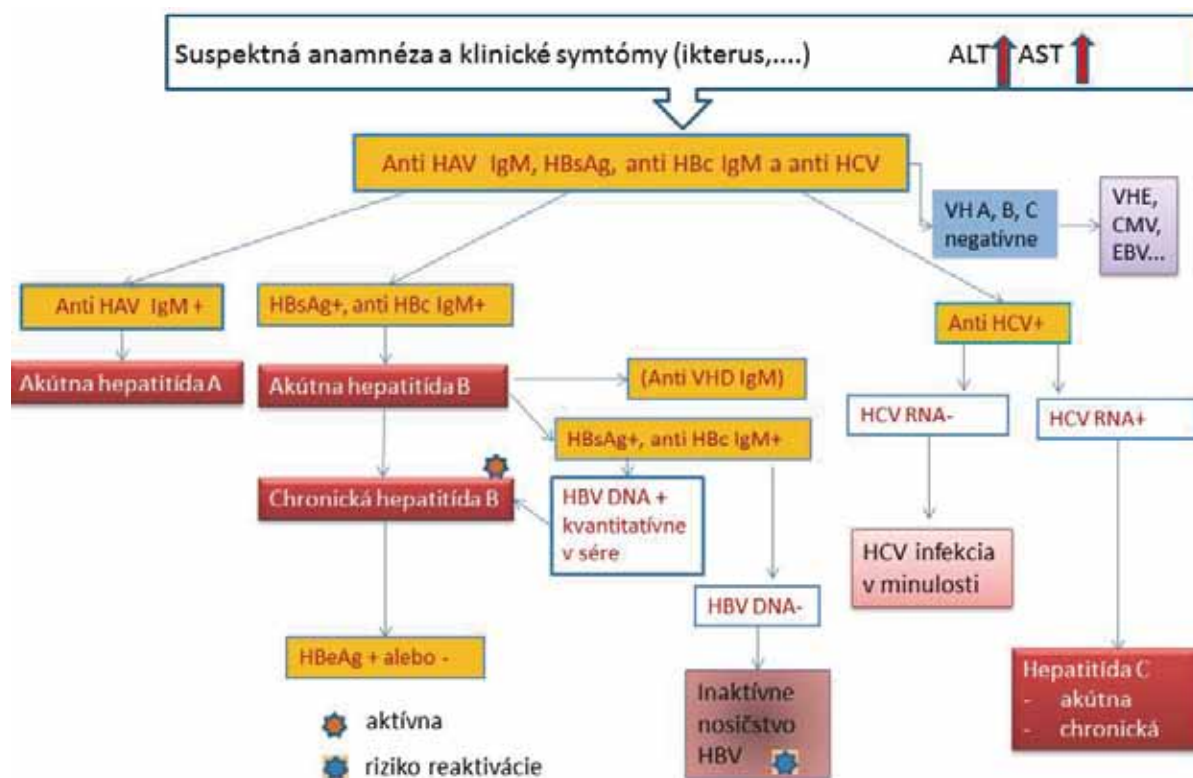
Algoritmus definujeme ako pracovný postup, ktorý má tieto povinné vlastnosti:

1. **Rezultatívnosť** – to znamená, že postup vždy vydá nejaký výsledok. Algoritmus musí vždy dospieť k správne mu výsledku, a to pomocou konečného počtu krokov.
2. **Finitnosť (konečnosť)** – to znamená, že sa vždy niekde skončí. Inými slovami, skončí po nadefinovanom počte vykonaných krokov.
3. **Elementárnosť (jednoduchosť)** opisu. Algoritmus je opísaný konečným počtom základných inštrukcií. Teda takých, pri ktorých je presne určené, ako sa vykonajú (a teda neumožňujú žiaden osobitý výklad niektorého vykonávateľa).
4. **Determinovanosť (jednoznačnosť)** zhŕňa presnosť, zrozumiteľnosť a jednoznačnosť. V každom okamihu riešenia musí byť jasné, akú operáciu má algoritmus vykonávať. Postup práce je jasne daný a vždy závisí iba na opise algoritmu a na vstupe („pracovný materiál“, či už ide o biologickú vzorku, alebo o informácie, napr. nejaké označenia, hodnoty alebo čísla). Na priebeh algoritmu nemá žiadny vplyv náhoda alebo slobodná vôľa vykonávateľa.
5. **Opakovateľnosť** – pri rovnakých hodnotách vstupných dát musí algoritmus vždy dospieť k rovnakému výsledku.
6. **Hromadnosť (masovosť)** – algoritmus musí opisovať spracovanie celej skupiny príbuzných vzoriek alebo hodnôt, napr.

algoritmus laboratórnych vyšetrení vzoriek sér pacientov s podozrením na infekciu primárne hepatotropných vírusov (viď obr. 1.9.2).

7. Podstatnou a žiaducou vlastnosťou je **efektívnosť** (bilančnosť). Samozrejme, že vždy sa vytvárajú také algoritmy, ktoré vedú k výsledku najrýchlejšie, najľahšie, najlacnejšie, najbezpečnejšie atď.

Uvedené vlastnosti tak spoločne zaručujú práve tú hlavnú a skvelú výhodu algoritmov, že môžu byť vykonávané automatizovane, bez dozoru, a pritom sa môžeme spoľahnúť na výsledok. Užívatelia nemusia ani vedieť, ako presne fungujú a čo sa v priebehu práce v danom okamihu konkrétne deje, na to sú už dnešné analyzátory priveľmi komplexné. Používa sa pre ne preto termín tzv. čierne skrinky (black boxes). Do skrinky sa vloží povolený vstup (označená vzorka) a na druhej strane vypadne zodpovedajúci výstup s danými vlastnosťami, v tomto prípade výsledok analýzy. Čo sa deje vo vnútri skrinky užívateľ nemusí detailne vedieť, čo je často veľké uľahčenie situácie. Tento princíp v klinickej mikrobiológii, ale aj v iných laboratórnych odboroch predstavujú automaty – analyzátory, ktoré spoľahlivo nahrádzajú množstvo ľudskej práce a s tým aj eliminujú subjektívne chyby analýz, ale aj prípadné zdravotné riziká v zmysle laboratórnej infekcie. Ich postupné zavádzanie do dennej rutiny laboratórií je neodvratný progres, ktorý spĺňa všetky uvedené parametre využitia pracovných a diagnostických algoritmov. Napriek tomu ešte dlho nebudú predstavovať alternatívu voči úlohe experta, či už klinického mikrobiológa alebo



Obr. 1.9.2. Algoritmus laboratórnej diagnostiky vírusových hepatítid.

diagnostika v klinickej mikrobiológii tak, ako si to omylom vysvetlili niektoré iné paraklinické odbory, predovšetkým tzv. laboratórna medicína pri konsolidácii prevádzky na niektorých združených pracoviskách.

V expertnej činnosti na národnej úrovni sa pri tvorbe diagnosticko-liečebných algoritmov dodržiavajú obdobné postupy, ako pri tvorbe laboratórnych algoritmov (rezultatívnosť, finitnosť, determinatívnosť, elementárnosť atď.) a predstavujú jeden z legislatívnych nástrojov štátnej zdravotnej politiky. Zvereňujú sa vo forme **odborných usmernení Ministerstva zdravotníctva Slovenskej republiky, vydávaných vo Vestníku Ministerstva zdravotníctva SR, napr.** Odborné usmernenie MZ SR o štandardizácii laboratórnej diagnostiky vírusových hepatítid

(VH) A, B, C, D a E (A – E) a o šandardizácii diagnostiky, liečebných postupov a dispenzarizácie pacientov pri chronických hepatitídach B a C (Vestník MZ SR z roku 2007, čiastka 48-60). Rovnako vysokú autoritu z hľadiska *lege artis* postupov a algoritmov v mikrobiologickej diagnostike majú odporúčania, vydávané jednotlivými odbornými spoločnosťami Slovenskej lekárskej spoločnosti či postupy podľa medzinárodných odporúčaní (angl. guideline – vodítko, smernica).

LITERATÚRA

1. <https://spseke.sk/tutor/projekt/algorithmy.htm>
2. https://popelka.ms.mff.cuni.cz/~lessner/mw/index.php/U/C4%8Debnice/Algoritmus/Co_je_to_algoritmus

1.10

SEPARAČNÉ TECHNIKY, KTORÉ SA UPLATŇUJÚ V LEKÁRSKEJ MIKROBIOLOGII

Predný J.



Isolačné a separačné techniky na mikrobiologických pracoviskách

Pre väčšinu metód priamej aj nepriamej diagnostiky je podmienkou ich vykonania čiastočne alebo úplne odseparovať analyzovaný objekt (bunku, subcelulárnu štruktúru, molekuly) od ostatných súčastí vzorky, ktoré bránia analýze alebo ju negatívne ovplyvňujú. V mikrobiológii sa používajú metódy, ktoré umožňujú izoláciu mikroorganizmov a separáciu častí ich buniek a biomolekúl (proteíny, nukleové kyseliny a pod.). Separáčne postupy v klinickej mikrobiológii zahŕňajú aj izoláciu buniek a molekúl, produkovaných ľudským organizmom v spojení s infekciou (krvinky, protilátky, reaktanty zápalu, cytokíny, interferóny a pod.) za účelom ich identifikácie a/alebo kvantifikácie.

Separáčne postupy sa delia nasledovne:

Inokulačné

- **izolácia**, pre separáciu suspektného pôvodcu zo vzorky.

Založené na fyzikálno-chemických postupoch (vrátane prístrojových techník)

- **pre heterogénnu sústavu** – filtrácia, sedimentácia, flotácia, odstredovanie (centrifugácia).
- **pre homogénne sústavy** – destilácia, extrakcia, zrážanie, chromatografia, dezorpcia a elektroforéza.

1.10.1 Izolácia

V mikrobiológii termín izolácia označuje dva princípy. Jednak označuje zachyt vírusov z klinického materiálu na príslušnom biologickom systéme (bunkové kultúry, kuracie embryá a zvieratá, pozri kapitolu 1.13), jednak získanie klonu vyšetrovaného druhu baktérií alebo húb, ktoré možno kultivovať. Ide o mechanické oddelenie zástupcov jednotlivých druhov zo vzorky, kde je druhovo zmiešaná populácia mikróbov prítomných v makroorganizme v rámci ich typickej lokalizácie, napríklad z kožnej, orálnej alebo črevnej flóry a pod. Tým možno získať čistú kultúru a identifikovať druh suspektného pôvodcu. Princípom je 3- až 4-etapové rozriedenie prítomných životschopných mikróbov o niekoľko rádoov až na jednotlivé bunky na vhodných tuhých pôdach a tak dosiahnuť ich rast vo forme izolovaných kolónií (kmeňov, klonov, izolátov), ktoré možno ďalej identifikovať (obr. 1.10.1).

Izolácia sa využíva nielen v rámci kultivačných metód a iných makrotechnikách, ale aj v rámci nových molekulárno-biologických postupov, napr. pri digitálnej PCR na získavanie jednotlivých reťazcov nukleovej kyseliny (pozri kapitolu 19) distribuovaných samostatne v pikoútvoroch (kvapky vo femtolitrových objemoch, v ktorých sú jednotlivé vlákna ďalej amplifikované a analyzované).

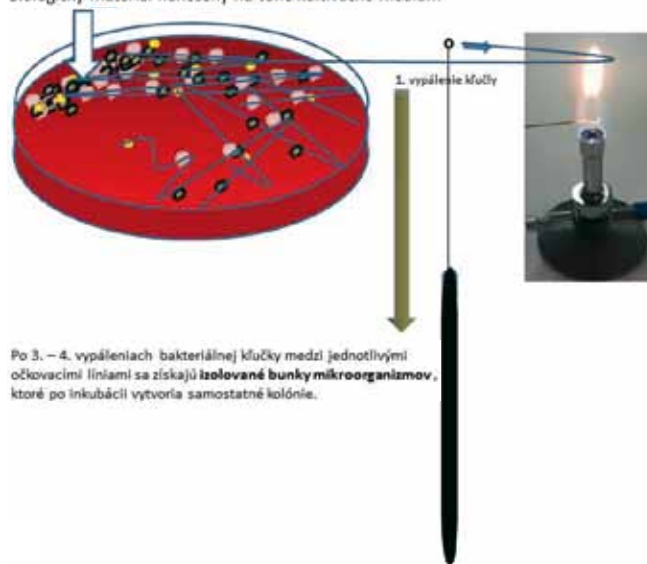
1.10.2 Sedimentácia a flotácia

Sedimentácia (alebo usadzovanie) je fyzikálny dej, pri ktorom dochádza vplyvom gravitácie k ukladaniu tuhých častí v suspenziách. Rýchlosť usadzovania závisí od veľkosti, tvaru a hustoty separovaných častíc, ako aj od viskozity a hustoty kvapalnej fázy suspenzie. V mikrobiológii nepredstavuje široko používaný separačný postup (na rozdiel od iných klinických odborov, napr. sedimentácia erytrocytov pri zápalových ochoreniach). Tento fyzikálny jav predstavuje pri niektorých labora-

tórnych postupoch skôr možné metodické riziko nesprávnej analýzy. Typickým príkladom je stanovenie hustoty bakteriálnej suspenzie podľa Mc Farlanda. Pokiaľ tesne pred meraním nedôjde k pretrepaniu suspenzie (napr. pomocou vortex prístroja), sedimentácia buniek baktérií skreslí výsledok.

Flotácia je prevažne fyzikálno-chemický proces separácie častíc z tekutiny (opak sedimentácie), pričom sú tieto častice vynášané na hladinu, z ktorej sa následne odstraňujú. Využíva sa hlavne tam, kde tuhý podiel je ľahší ako kvapalina. Metódička sa bežne využíva v parazitológii na izoláciu vajčiek a cyst parazitov vo vzorke stolice (napr. v metodikách podľa Fausta alebo Kwazsa a Predného).

Biologický materiál nanesený na tuhé kultivačné médium



Obr. 1.10.1. Izolácia patogénov z klinického materiálu (napr. tampón tonzil) na krvnom agare.

1.10.3 Filtrácia

Filtrácia je mechanické oddeľovanie zmesi dvoch fáz pomocou priepustného materiálu, ktorým prechádza iba jedna z oboch fáz. Filtrácia pomocou buničiny (filtračný papier, vatová zátk a pod.) sa používala v minulosti vo veľmi širokej miere (napr. príprava kultivačných médií), v súčasnosti sa však už postupne vytráca, lebo pôdy sa dnes buď kupujú hotové, alebo sa varia väčšinou z komerčných, sterilných sušených zmesí. Napriek tomu si tento spôsob separácie našiel nové spôsoby uplatnenia, napr. pri príprave vírusového antigénu zo stolice slúži vatový filter na oddelenie zložiek stolice od eluátu antigénu.

Filtrácia sa v mikrobiológii využíva aj na sterilizáciu termolabilných tekutín (zložky séra, roztoky niektorých cukrov a pod.). Najčastejšie sa používajú membránové filtre s veľkosťou pórov 0,22 µm, ktoré ale neodstránia mykoplazmy, vírusy a príóny. Preto pri roztokoch, kde hrozí kontaminácia mykoplazmami (bunkové kultúry) sa používajú filtre s veľkosťou pó-

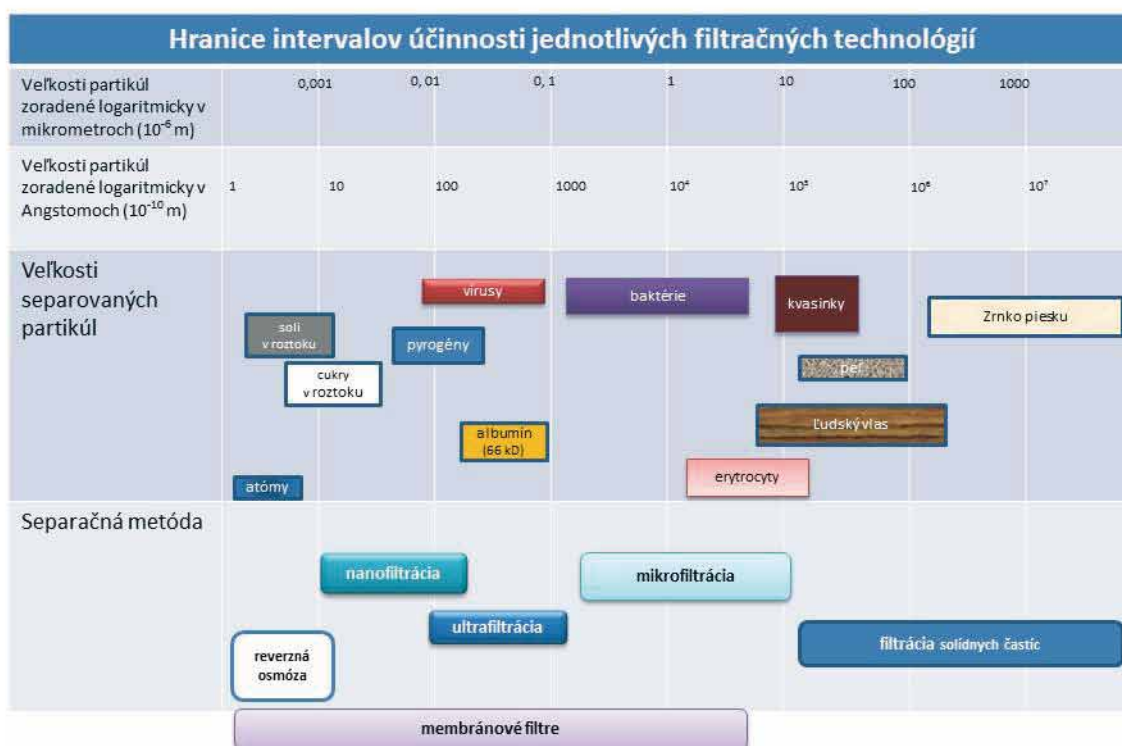
rov 0,1 μm . Pri odstránení vírusov z roztokov možné použiť na to určené membránové filtre (obr. 1.10.2).

Na filtráciu sa používajú filtre rôznych typov:

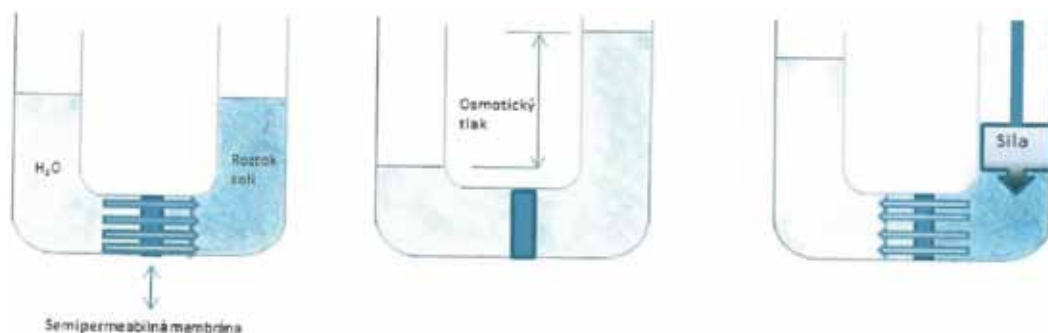
- 1. Anorganický filter:** skladá sa z porcelánu, spekaného (sintrovaného) alebo brúseného skla umiestneného vo filtračnej banke, používa sa pri sterilizácii séra počas prípravy média, napr. Seitzov filter.
- 2. Organický filter:** skladá sa z organických molekúl alebo filtra (napr. kremelina – diatomická zemina, čo je prirodzene sa vyskytujúca mäkká, kremičitá, sedimentárna hornina zo zvyškov diatómov – rozsievok).
- 3. Membránový filter:** skladá sa z pórov s jednotnou alebo špecifickou veľkosťou, veľkosť pórov sa pohybuje v rozmedzí od 0,01 do 10 mikrometrov, sú zložené z inertného acetátu celulózy alebo polykarbonátu; tieto filtre sa používajú v laboratóriách a priemysle na sterilizáciu kvapalín. V mikrobiologickom laboratóriu sa používa aj na izoláciu, stanovenie počtu a identifikáciu baktérií zo vzorky vody alebo vzduchu.

4. Iný spôsob filtrácie v mikrobiológii sa využíva pri niektorých molekulárno-biologických metodikách, kedy je napr. potrebné použitie ultračistej vody získavanej napr. reverznou osmózou, alebo pri vytváraní atmosféry v čistých priestoroch pomocou HEPA filtrov (laminárne boxy). Reverzná osmóza je technológia čistenia vody, ktorá využíva semipermeabilnú membránu na odstránenie iónov, molekúl a väčších častíc z vody. Pri reverznej osmóze sa na prekonanie osmotického tlaku používa aplikovaný tlak. Reverzná osmóza môže odstrániť mnoho druhov rozpustených a suspendovaných častíc z vody vrátane baktérií a vírusov (obr. 1.10.4).

HEPA (High efficiency particulate air) filter sa používa s laminárnym prúdením na vytváranie čistého vzduchu bez prachu a mikroorganizmov. Sú základnou súčasťou laminárnych boxov. HEPA filtre sú zložené lamely z náhodne a do siete usporiadaných vlákien. Táto sieť je zložená zo sklenených vlákien, ktoré majú priemery medzi 0,5 až 2,0 mikrometrov. Kľúčovými



Obr. 1.10.2. Delenie filtračných metód podľa veľkosti separovaných partikul. (upravené podľa: <https://ars.els-cdn.com/content/image/3-s2.0-B9780857090614500104-f10-04-9780857090614.jpg>)



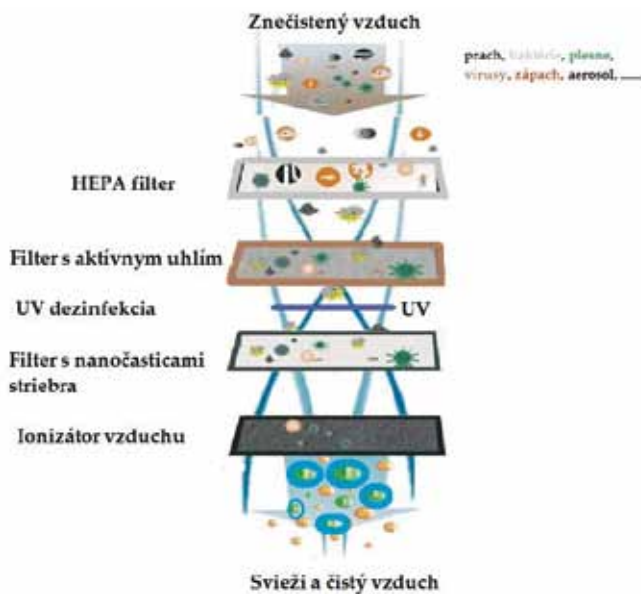
Priama osmóza – rozpúšťadlo (H_2O) prechádza semipermeabilnou membránou (napr. celofán) do prostredia s vyššou koncentráciou osmoticky aktívnych látok (roztokov solí, cukrov a pod.)

Osmotická rovnováha

Reverzná osmóza – pôsobením proti osmotickému tlaku dochádza k spätnému prechodu molekúl rozpúšťadla cez semipermeabilnú membránu bez rozpustených látok

Obr. 1.10.3. Princíp reverznej osmózy.

faktormi ovplyvňujúcimi funkcie filtra sú priemer vlákien, hrúbka filtra a rýchlosť prúdenia vzduchu. Priestor medzi vláknami HEPA filtra je väčší ako 0,3 µm. Na rozdiel od membránových filtrov s touto veľkosťou pórov, HEPA filter nefunguje len ako mechanické sito, kde môžu prechádzať častice menšie ako najväčší otvor alebo ako je vzdialenosť medzi vláknami. HEPA filtre navrhnuté tak, aby zachytávali aj oveľa menšie znečisťujúce látky a častice. Tieto častice sú zachytené (prilepia sa na vlákno) prostredníctvom kombinácie rôznych fyzikálnych mechanizmov, ktorých opis je nad rámec účelu tejto knihy. HEPA filtre sú rozhodujúce pre prevenciu šírenia vzdušných bakteriálnych a vírusových, a preto infekcie. Zvyčajne HEPA filtračné systémy na určené na použitie v zdravotníctve tiež zahŕňa vysokoenergetické ultrafialové žiarenie na usmrtenie živých baktérií a vírusov zachytených filtráciou. Najkvalitnejšie HEPA filtre majú účinnosť až 99,995 %, čo zaručuje veľmi vysokú úroveň ochrany proti šíreniu chorôb prenosných vzduchom. HEPA filtre neodfiltrujú plyny, prchavé látky a zápach. Ak sa vyžaduje filtráciu prchavých organických zlúčenín, chemických výparov, zápachu, je po filtrácii vzduchu HEPA filtermi, potrebné zaradiť ďalší stupeň filtrácie pomocou aktívneho uhlia (uhlia) alebo iného typu aktívneho filtra.



Obr. 1.10.4. Filtrácia vzduchu pre vytvorenie aseptického prostredia. (upravené podľa: <http://artsrepublika.com/zq/46663/20n0o2-magnificent-purest-make/46644/>)

1.10.4 Odstreďovanie (centrifugácia)

Odstreďovanie je fyzikálna metóda oddeľovania pevných alebo kvapalných častíc s rozdielnou hustotou (mikrobiálnych buniek, štruktúr a biomolekúl) v roztoku pomocou odstredivej sily, ktorá mnohonásobne prevyšuje gravitačné zrýchlenie (g). Za normálnych podmienok $g = 9,81 \text{ m.s}^{-2}$. Vykonáva sa v odstredivkách (centrifúgach). Centrifúgy sa používajú na zvýšenie gravitačnej sily, pôsobiacej na častice. Podmienky odstredovania charakterizuje relatívna odstredivá sila, ktorá udáva, koľkokrát je dosiahnuté odstredivé zrýchlenie vyššie, ako gravitačné zrýchlenie na Zemi. Tým, že sa biologická vzorka otáča vysokou rýchlosťou, vystavia sa v nej obsiahnuté častice intenzívnej zvyšujúcej sa gravitačnej sile a tak sa dosiahne ich sedimentácia. Sedimentácia častíc a molekúl závisí od mernej hustoty častice, veľkosti častíc a viskozity média. Ťažšie častice sa relatívne rýchlo usadia, lebo sú vystavené väčšiemu gravitačnému zaťaženiu. Menšie a ľahšie častice, ktoré sa neusadzujú tak ľahko, začnú sedimentovať až pri pôsobení vyššej gravitačnej sily.

Príkladom každodenného využitia centrifugácie je príprava sérologických a molekulárno-biologických vzoriek. V závislosti

od zvolenej metódy možno na analýzu použiť plazmu alebo sérum. Plazma je kvapalná fáza krvi, pri ktorej sa pridaním antikoagulantov (heparín, citrát alebo EDTA) do odberovej striekačky a premiešaním obsahu zabráni zrážaniu koagulačných plazmatických faktorov. Na získanie séra sa musí krv bez antikoagulantov ponechať minimálne 30 minút voľne odstáť, pričom dôjde ku vyzrážaniu plazmatických faktorov (to znamená ku koagulácii a vzniku fibrínových vlákien) a retrakcii krvného koláča (zrazenina krviniek a fibrínovej siete). Uloženie krvi do chladničky spomalí tento proces, pridanie guľčiek s drsným povrchom do odberovej skúmavky naopak proces vyzrážania urýchli. Pri týchto procesoch môže dôjsť aj k hemolýze erytrocytov, najmä pri odbere vzorky krvi do polystyrénových skúmaviek. V tomto prípade môže byť hemolytické sérum nevhodné pre niektoré analýzy, podobne ako chylózne (chylomikróny tukov v krvi v dôsledku jej postprandiálneho odberu) alebo pre prítomnosť bilirubínu v sére. Dôsledkom vyzrážania koagulačných faktorov je gelifikácia séra, preto musí byť vzorka scentrifugovaná tak, aby sme oddelili pevnú fázu od kvapalnej a získali čisté sérum, vhodné na analýzy. Oddelenie oboch fáz sa musí uskutočniť najneskôr do 2 hodín po odbere krvi. Účinok centrifugácie (G) sa vypočíta pomocou počtu otáčok centrifúgy (U/min) a vzdialenosti dna rotujúcej skúmavky od osi rotora (r) pomocou vzorca:

$$G = r \times \left(\frac{U/\text{min}}{1000} \right)^2 \times 11,18 \text{ m/s}^2$$

Faktor 11,18 m/s^2 sa odvodzuje od gravitačného zrýchlenia (g). Účinok centrifugácie pri tej istej centrifúge závisí od g a od dĺžky centrifugácie, ktoré sú vzájomne v recipročnom vzťahu. To znamená, že pri zdvojnásobení doby centrifugácie možno znížiť počet otáčok o polovicu a naopak. Centrifugáciou zvýšime aj výťažok séra oproti nescentrifigovanej vzorke o viac ako štvrtinu. Pri centrifugácii plnej krvi by sa mala dodržať doba 15 min. a počet otáčok 2000/min, pri zvýšení g alebo predĺžení doby môže dôjsť k hemolýze. Zvýšenie teploty vzoriek krvi pri centrifugácii bez chladenia by nemala prekročiť teplotu prostredia o viac ako 15 °C a nikdy by nemala prekročiť 37 °C.

V mikrobiologických laboratóriách sa používajú najmä **stolové centrifúgy** s nízkou rýchlosťou, dosahujúce $10^3 - 10^5$ otáčok/min a odstredivou silou 3000 g. Tieto prístroje obvykle pracujú pri izbovej teplote bez kontroly teploty vzoriek. V prístroji sa môžu použiť dva typy rotorov, jednak také, kde sa skúmavky umiestňujú v držiakoch s pevným uhlom a jednak rotory s výkyvným držiakom. Nízkoobrátkové centrifúgy sa prevažne používajú pre urýchlenie sedimentácie hrubých dispergovných častíc, vrátane buniek. Bunky sedimentujú ku dnu kviet a po centrifugácii môže byť roztok, v ktorom sa bunky nachádzali, odstránený dekantáciou. Následne môžu byť bunky znovu resuspendované v čistom roztoku, čím sa zabezpečí ich premývanie.

Centrifúgy strednej rýchlosti sa nazývajú sa **mikrofúgy**. Maximálna rýchlosť väčšiny komerčných mikrofúg je medzi 12 000 a 15 000 ot/min, čo prináša silu 11 000 - 12 000 x g.

Vysokoobrátkové centrifúgy (**ultracentrifúgy**), dosahujúce niekoľko sto tisíc otáčok/min, slúžia k deleniu koloidných disperzií. Môžu byť vybavené optickým systémom pre pozorovanie pohybu jednotlivých frakcií makromolekúl. Vysokorýchlostné centrifúgy môžu pracovať s rýchlosťou od 25 000 otáčok za minútu, čím sa v procese dosiahne odstredivá sila približne 90 000 x g až po 100 000 otáčok/min a 540 000 x g. Priestor komory je vybavený tak, aby v ňom bolo možné vytvoriť vákuum a bolo zabezpečené chladenie, majú rotor s pevným uhlom, a držiak má pozície pre väčšinou šesť vzoriek s objemom približne 0,2 - 2,2 ml.

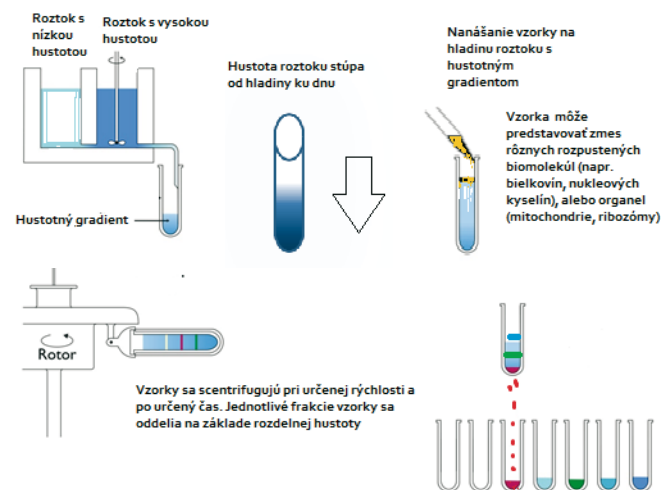
Priestor rotora vysokoobrátkovej centrifúgy musí byť chladený, nakoľko rýchly pohyb rotora vo vzduchu vytvára trenie a môže tak dôjsť ku degradácii biologického materiálu. Centrifúgy sú vybavené chladiacimi zariadeniami na odstránenie tepla generovaného v dôsledku trenia medzi vzduchom a rotorom, resp. sa z priestoru

evakuuje vzduch (vákuové centrifúgy). Pomocou termočlánku možno teplotu udržiavať v rozsahu 0 – 4 °C. Rotory ultracentrifúg musia byť vyrobené z veľmi odolných materiálov s ohľadom na ich veľké namáhanie odstredivou silou (napr. z titánu). V súčasnosti sú k dispozícii rotory, ktoré sú vyrobené z kompozitných materiálov z uhlíkových vlákien. Tieto nové rotory sú o 60% ľahšie ako porovnateľné hliníkové a titánové rotory. Z dôvodu nižšej hmotnosti a ovládania brzdy sa skracujú doby zrýchlenia a spomalenia, a preto sú časové intervaly odstredovania kratšie.

Pre správnu funkciu každej centrifúgy je nevyhnutné dokonalé vyváženie kyviek so vzorkami. Pri odstredovaní vkladáme centrifugačné skúmavky (kyvety) do odstredivky vždy v pároch, vyvážené a oproti sebe. Nevyváženy rotor sa inak rozochvieva a môže dôjsť aj k jeho odtrhnutiu a deštrukcii celého zariadenia. Centrifúgu otvárame až po úplnom zastavení odstredivky.

Frakcia, ktorá sa pri odstredovaní usadí na dno kyvety sa nazýva **sediment** (pri bunkách sa nazýva aj pelet) a kvapalina nad sedimentom **supernatant**. Ako centrifugačné skúmavky možno použiť hrubostenné sklenené skúmavky alebo kyvety, alebo pri vyššej rýchlosti otáčania sa používajú skúmavky z plastov. V mikrobiológii sa centrifugácia využíva nielen na separáciu, ale aj na koncentráciu, napr. na dostatočné množstvo bunkového materiálu zo vzorky (likvor, moč a pod.), ale je použiteľná na umiestnenie mikrokvapiek reakčných roztokov na dno mikroskúmaviek, ktoré sa pri pipetovaní prilepili na ich steny, aby sa dosiahlo ich úplné splynutie v jednom objeme a požadovaná koncentrácia reakčných zložiek.

Diferenciálna centrifugácia je metóda, ktorá umožňuje frakcionovať zmes častíc s dostatočne odlišným sedimentačným koeficientom, postupným, viacstupňovým zvyšovaním relatívnej odstredivej sily. Na delenie látok s blízkymi hodnotami sedimentačného koeficientu sa využíva centrifugácia v hustotnom gradiente. Častice, ktorých hustota je vyššia ako hustota danej frakcie gradientu, v ňom budú sedimentovať. Pohyb sedimentujúcej zložky sa zastaví tam, kde vztlaková sila bude rovnaká ako sila odstredivá (hustejšia frakcia). Na prípravu gradientov sa najčastejšie používa sacharóza, chlorid cézny, Ficoll a polyvinylpyrrolidón (Percoll). Hustotný gradient pozostáva zo starostlivo namiešaného roztoku s najväčšou koncentráciou na dne skúmavky, na ktorý postupne nalievame roztoky s nižšou koncentráciou, pričom pri pozornej príprave sa tieto roztoky nezmiešajú ale ostanú ako oddelené fázy. Pri centrifugácii bunkového materiálu v takomto hustotnom gradiente dochádza k zachytávaniu rôznych ťažkých sedimentov na určitom medzistupni/fáze. Ťažký bunkový materiál klesne na dno, organely sa zachytia vo vyšších vrstvách, pretože im ich hmotnosť nedovolí prejsť cez hustejšiu a ťažšiu, napr. sacharózový roztok (obr. 1.10.5).



Obr. 1.10.5. Separácia molekúl, organel alebo buniek v hustotnom gradiente (upravené podľa: <http://elte.prompt.hu/sites/default/files/tananyagok/IntroductionToPracticalBiochemistry/ch05s03.html>).

1.10.5 Separácia proteínov

Bielkoviny (proteíny) majú špecifické biologické funkcie a sú predmetom mnohých analýz aj v mikrobiológii, či už z hľadiska ich štruktúrnych alebo funkčných vlastností. V bakteriálnej bunke sú proteíny v neustálom kolobehu syntéza – premena – odbúravanie, pričom tieto cykly sú neustále kontrolované regulačnými mechanizmami na zabezpečenie homeostázy. Regulácia týchto cyklov riadi aj adaptáciu bakteriálnych buniek na meniace sa podmienky okolitého prostredia. Časť proteínov sú **konštitutívne**, teda existenciálne pre vitálne funkcie mikrobiálnej bunky (translačné produkty tzv. **house keeping génov**), časť sú **indukovateľné**, ktoré sa vytvárajú len za určitých podmienok. Molekuly bakteriálnych proteínov pretrvávajú vo vegetatívnych bunkách v rozmedzí od niekoľkých minút po niekoľko týždňov, v spórach desiatky rokov.

Podľa funkcie, ktorú v mikrobiálnej bunke proteíny plnia ich delíme na skupiny:

- štruktúrne – stavebné jednotky, ktoré zabezpečujú architektúru celej bunky a organel, ale aj výplň cytosolu a cytoskeletu, štruktúru fimbrií, pri mnohobunkových organizmoch (napr. vlákňité huby) aj spojenia buniek do tkanív,
- katalytické – enzýmy a regulačné proteíny metabolismu mikroorganizmov,
- signálne alebo efektorové – extracelulárne (napr. malé quorum sensing molekuly, efektorové molekuly T3SS – sekrečného systému typu III a iné) a intracelulárne molekuly (histidínové kinázy, metyl dependentné receptory chemotaxie, niektoré proteín kinázy, adenylátové a diguanylátové cyklázy a c-di-GMP fosfodiesterázy a pod.),
- kinetické – intracelulárne súvisia s pohybom cytoskeletu, pohybom organel v cytoplazme (kinezín), topoizomerázy rozpleťajú vlákna DNA; epicelulárne proteínové fibrily tvoria vlákna (trichy) a flagely zabezpečujú aktívny pohyb mikroorganizmov,
- transportné – pre pasívny a aktívny transport malých rozpustných látok cez membrány, siderofóry. Okrem proteínov sa v mikrobiálnych bunkách nachádzajú alebo sa syntetizujú rôzne iné biomolekuly napr.:
- výživové a zásobné (napr. glykogén, kyselina poly-beta-hydroxymaslová, poly-beta-hydroxybutyrát a iné),
- antibiotiká a bakteriocíny, farbivá, toxíny luminofóry a iné.

Proteomika, ako sa nazýva všeobecne veda o genetike, štruktúre, funkciách a vlastnostiach proteínov, vrátane jednotlivých analytických laboratórnych postupov, našla v mikrobiológii široké uplatnenie. V rámci klinickej mikrobiológie zásadne ovplyvnila možnosti jej rozvoja.

Ako **enzýmy – biokatalyzátory** mnohých chemických reakcií v mikrobiálnych bunkách – sa v mikrobiologických laboratóriách **funkčnými testami** dokazujú nielen biochemické vlastnosti vnútrobunkového metabolismu mikroorganizmov (predovšetkým baktérií a húb), ale aj extracelulárna produkcia niektorých enzýmov mikroorganizmami. Takými sú napr. oxidázy, katalázy, hyaluronidázy, DNázy, betalaktamázy. Pri identifikácii vírusov sa dokazujú enzýmy ich vonkajšieho obalu (napr. neuraminidázy pri víruse chrípky) a podobne. Postupy, akými sú využívané dôkazy prítomnosti a katalytických vlastností enzýmov na základe premeny substrátov v rámci lekárskej mikrobiológie, sú opísané detailnejšie v ďalších kapitolách, najmä v rámci identifikácie a taxonómie.

Štruktúrne **vlastnosti** (ako **komplex antigénov**) a **neenzymatické funkčné vlastnosti** proteínových molekúl (enzýmy, toxíny, receptory, transportné a signálne proteíny, hormóny atď.) sa skúmajú alebo dokazujú prevažne inými postupmi. Pri niektorých enzýmoch sa dokazuje ich proteínová molekula ako antigén (nie ich enzymatická funkcia), napr. **imunochemickými testami** sa dokazuje antigénne zmenený penicilín viažuci proteín (PBP₂) v izoláte *S. aureus*, glutamát dehydrogenáza ako špecifický antigén na dôkaz prítomnosti *Clostridioides difficile* v sto-

lici, prarazit špecifická laktát dehydrogenáza či aldoláza (*Plasmodium* spp.) v krvi a mnoho iných. Do proteomických postupov v rámci klinickej mikrobiológie patrí aj stanovenie iných ako mikrobiálnych proteínov, predovšetkým ľudských – napr. imunoglobulínov. Sú takisto stanovované predovšetkým imunochemickými metódami, ktoré sú uvedené v subkapitole 21.

V poslednom desaťročí sa v lekárskej mikrobiológii široko uplatňuje aj **hmotnostná spektrometria**, ktorá je založená na rozdelení „rozvoľnených“ nabitých častíc (v tomto prípade mikrobiálnych proteínov) podľa ich molekulových hmotností v elektromagnetickom poli, MALDI – TOF (pozri kapitolu 1.17).

Pri ostatných proteomických analýzach antigénnych a neenzymatických vlastností mikrobiálnych proteínov je často potrebné separovať ich jednak od seba navzájom, jednak od iných biomolekúl. Napríklad je potrebné získavanie čistých a dobre charakterizovaných mikrobiálnych proteínov na výrobu diagnostík pre mikrobiológiu, resp. na imunizáciu osôb či zvierat tak, aby to vyvolalo tvorbu príslušných protilátok, využiteľných aj v diagnostike. Podľa toho, či ide o extracelulárne alebo celulárne proteíny a podľa metódy, ktorou budú mikrobiálne vzorky ďalej použité v diagnostike, je potrebné zvoliť spôsob ich získania z biologického materiálu – z mikrobiálnej kultúry, tkaniva, krvi a pod. Na začiatku sú to postupy extrakcie bielkovín:

- lýza s použitím detergentov,
- zmrazovanie a rozmrazovanie,
- osmotický šok,
- ultrazvukom,
- mechanické metódy,
- enzymatické natrávenie,
- komerčné súpravy a pufre na lýzu buniek.

Proteíny je potrebné vyčistiť (separovať) od ostatných zložiek, najprv filtráciou od hrubších nečistôt a následne od jemnejších tak, že ich prevedieme do dvoch oddelených fáz – napr. supernatantu a sedimentu. Tie potom oddelíme postupmi, ako je dekantácia alebo rôznymi postupmi centrifugácie s prípadným predchádzajúcim vyzrážaním proteínov organickými alebo anorganickými látkami. Takto pripravené vyčistené zmesi je potrebné oddeliť na frakcie jednotlivých proteínov, ktoré zmes tvorili. Až následne ich možno identifikovať a stanoviť ich obsah vo vzorke, resp. určiť ich fyzikálne a chemické vlastnosti. V ďalšom texte sa obmedzíme na separačné postupy, ktoré sa používajú predovšetkým v klinickej mikrobiológii – chromatografia a elektroforéza, hoci ojedinele sa používajú aj iné metódy, ako napr. membránová filtrácia napr. na oddelenie solí od proteínov.

Bielkoviny sa líšia svojimi veľkosťami, tvarmi, polaritou, nábojom a afinitou k väzbe s inými proteínmi a molekulami. Ich štruktúrne vlastnosti sa menia vplyvom pH a iónovej sily roztokov, v ktorej sa nachádzajú. Na základe týchto rozdielov sa môžu oddeľovať a triediť.

V mikrobiológii sa na separáciu **jednotlivých skupín proteínov** uplatňujú najmä tri princípy:

- A. na základe relatívnej hmotnosti pomocou odstredovania** (napr. gradientovej centrifugácie, viď. vyššie),
- B. na základe afinity** (schopnosti vytvárať určitú reverzibilnú väzbu s inými látkami),
- C. separácia na základe elektrického náboja** – elektromigračné techniky.

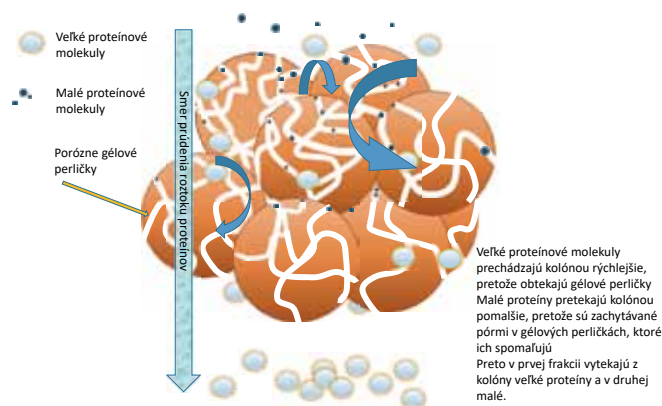
CHROMATOGRRAFIA

Mnoho proteínov má v natívnom stave osobitnú veľkosť a často jedinečnú afinitu k rôznym látkam, a to vďaka svojej terciárnej a kvartérnej štruktúre. Látky v okolitom prostredí (matrix) proteínov vstupujú do rôznych interakcií s nimi (mechanické ovplyvnenie, chemické väzby, elektrostatické interakcie atď.). Sú buď v stacionárnej alebo kvapalnej fáze a ovplyvňujú pohyb bielkovín (ale aj iné molekuly – napr. nukleové kyseliny, cukry a pod.), ktoré sa pohybujú v kvapalnej fáze. Počas separácie dochádza k opakovanému prenosu látok do

mobilnej a späť do stacionárnej fázy, v určitom rovnovážnom pomere. Mobilná fáza je väčšinou kvapalina, ktorá sa počas oddeľovacieho procesu nemení, alebo sa účelovo mení (napr. jej zloženie a koncentrácia). Pri niektorých metódach je mobilná fáza plyn. Po aplikácii vzorky na začiatok kolóny dochádza vplyvom toku mobilnej fázy k pohybu jej zložiek a ku ich separácii. Tieto vlastnosti využíva metóda separácie biomolekúl, ktorá sa nazýva **chromatografia** a pri ktorej sa využívajú rôzne typy afinity biomolekúl k náplni stacionárnej fázy. Stacionárnu fázu tvorí väčšina kolón, čo je sklenená alebo kovová nádoba stĺpcovitého tvaru s náplňou rôznych typov. Náplňou môžu byť gélové guľičky s pórmi (z dextránu, agarózy alebo polyakrylamidu) – tzv. gélová chromatografia, ionomenič (ionex, t.j. guľičky zo živíc, celulózy atď.) priťahujúci buď kladné alebo záporné častice na základe elektrostatických síl – tzv. iónovo-výmenná chromatografia. Pri afinitnej chromatografii sa separované proteíny viažu na imobilizované ligandy, ktoré sú po prechode mobilnej fázy a odtoku ostatných látok z kolóny uvoľnené elučným roztokom. Tieto a iné rozdiely v afinitě využíva niekoľko rôznych typov chromatografie, napr.:

- stĺpcová chromatografia,
- iónovo-výmenná chromatografia,
- gélová chromatografia (molekulové sito),
- afinitná chromatografia,
- papierová chromatografia,
- chromatografia na tenkej vrstve,
- plynová chromatografia,
- dye – ligandová chromatografia,
- hydrofóbná interakčná chromatografia,
- pseudoafinitná chromatografia,
- vysokotlaková kvapalinová chromatografia (HPLC).

Viacere z uvedených metód sa využívajú aj v lekárskej mikrobiológii. V súčasnosti sa v rámci mikrobiológie napr. veľmi často používa imunochromatografia, ktorá spája vlastnosti papierovej chromatografie a imunochemickej reakcie.

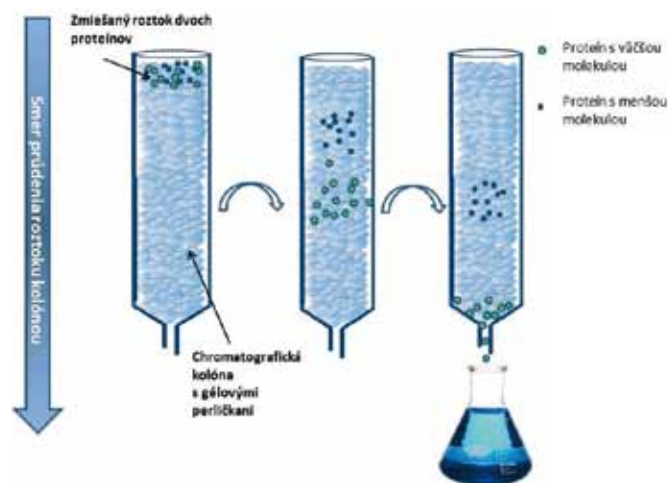


Obr. 1.10.6. Chromatografická separácia proteínov na princípe gélovej chromatografie (molekulové sito).

ELEKTROMIGRAČNÉ TECHNIKY

Všetky molekuly nesú určitý elektrický náboj a tento náboj sa môže použiť aj na oddelenie proteínov v elektromagnetickom poli medzi dvoma elektródami – zápornej katóde a kladnej anóde. Niektoré majú pozitívny náboj (katióny a putujú (migrujú) ku katóde, zatiaľ čo iné majú negatívny náboj (anióny) a migrujú ku anóde. Pomocou techniky nazývanej gélová elektroforéza sa tieto proteíny môžu oddeliť na základe ich náboja, tvaru a veľkosti, intenzity elektrického poľa, typu a porozite matrice. Po ukončení separácie sa molekuly sa detegujú ako pásy v rôznych polohách v matrici. Matricu môže predstavovať rôzny materiál – papier, celulóza, acetát alebo gély, ktoré sú najčastejšie používané na separáciu proteínov, ale aj nukleo-

vých kyselín. Najčastejšie pozostávajú z polyakrylamidu alebo agarózy. V géloch z akrylamidu a agarózy slúži matrica pri separácii ako molekulové sito s rôznou veľkosťou selektovaných molekúl. Molekuly sú nútené k pohybu cez gél aplikovaným napätím, väčšie molekuly sú pri migrácii brzdené viac ako menšie molekuly. Molekuly menšie ako póry v matrici nie sú spomaľované, migrujú ako vo voľnom roztoku. Na druhej strane, molekuly väčšie ako póry nemôžu gélom prestupovať. V géli sa ale nedajú vykonať niektoré imunochemické reakcie, ktoré sú potrebné pre analýzu separovaných proteínov, preto sa musia preniesť na pevnú fázu, ktorá ich imobilizuje a umožní vykonať potrebné analytické postupy.

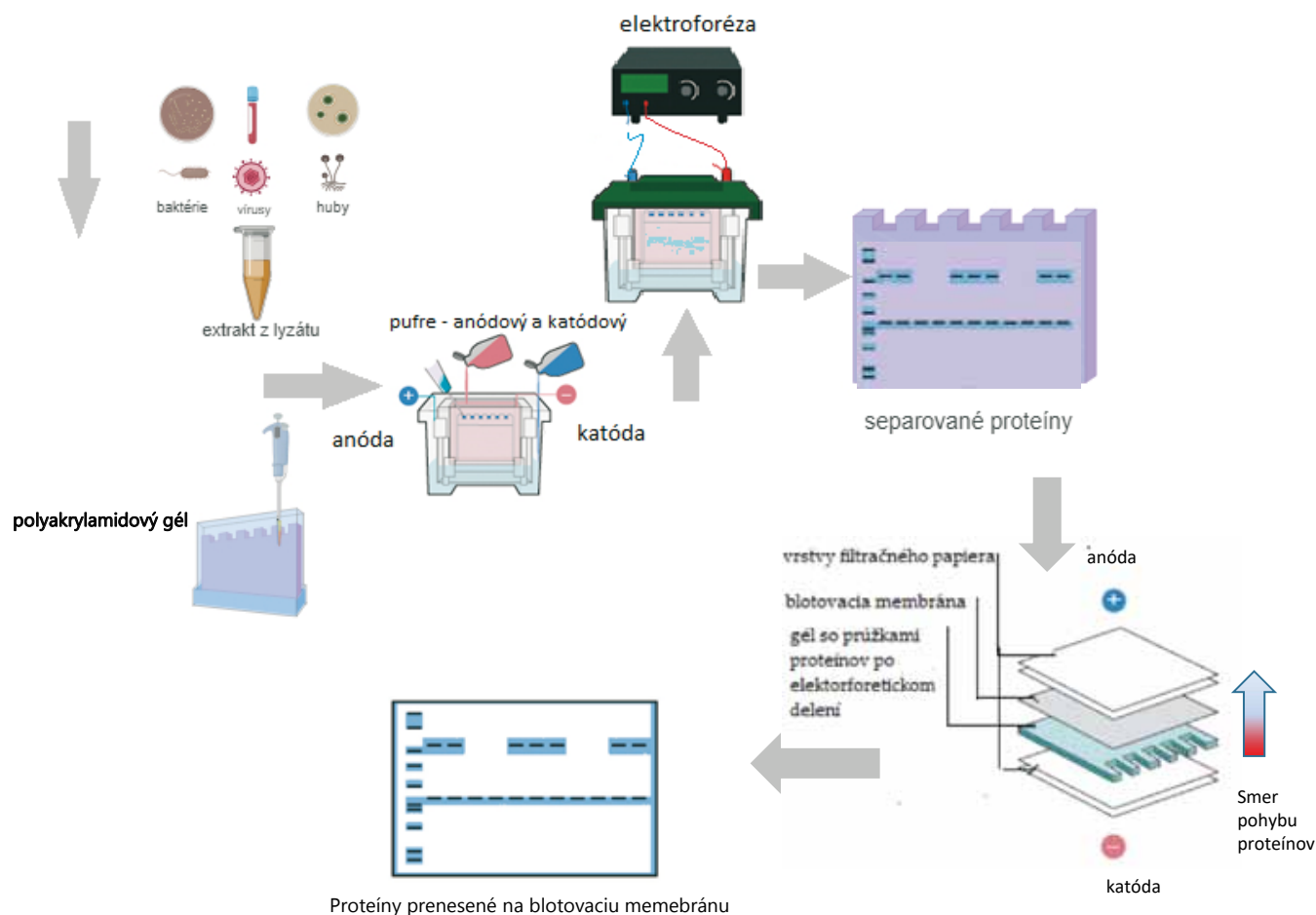


Obr. 1.10.7. Stĺpcová gélová chromatografia.

BLOTOVANIE

Western blot (WB) je separačná metóda používaná na kvalitatívnu alebo semikvantitatívnu detekciu proteínov vo vzorke. Metóda pozostáva z:

- elektroforetickej separácie proteínov na polyakrylamidovom géli,
- prenosu oddelených proteínov z gélu na nitrocelulóзовú membránu, pričom dôjde k ich fixácii na membráne,
- detekcie na membráne fixovaných proteínov imunochemickou reakciou so značenou protilátkou podobne, ako napr. v metóde ELISA.



Proteíny prenesené na blotovaciu membránu

Obr. 1.10.8. Blotovanie mikrobiálnych proteínov – Western blot.

Elektroforéza je migračná separačná metóda, ktorá využíva rozdielnu pohyblivosť proteínov v jednosmernom elektrickom poli. Pohyblivosť častíc v elektrickom poli určuje veľkosť ich náboja, veľkosť ich molekuly a odpor, ktorý im kladie prostredie. Proteíny, ktoré majú väčšinou negatívny náboj, sa vplyvom elektrického poľa pohybujú v polyakrylamidovom géli k anóde. Prídavkom povrchovo-aktívnej látky laurylsíranu sodného (SDS), ktorý zabezpečí vyrovnanie nábojov všetkých proteínov na negatívne, sa proteíny nebudú deliť na základe náboja, ale sa rozdelia na základe svojich molekulových hmotností od najväčších po tie najmenšie, ktoré sú vždy najbližšie k anóde (elektroda s kladným nábojom). Pásky prislúchajúce jednotlivým proteínom vzniknuté po elektroforetickej separácii proteínov sa bližšie identifikujú pomocou metódy označovanej ako Western blotting alebo imunoblotting. Počas blotovania sa elektroforeticky rozdelená zmes natívnych proteínov (získaných z lyzáty bakteriálnej alebo bunkovej kultúry) alebo rekombinantných proteínov, prenesie z gélu na nitrocelulózovú membránu. Elektroforetický prenos proteínov sa uskutočňuje v jednosmernom elektrickom poli v smere kolmom na smer pôvodnej migrácie molekúl v géli. Nitrocelulózová membrána je v tesnom kontakte s gélom a je uložená ku kladnému pólu. Po uložení nitrocelulózovej membrány na gél a použitím elektroforézy preniesieme proteínové pásky na membránu. Elektrické pole je orientované tak, že záporný náboj je na géli a kladný na membráne. Vtedy záporne nabité proteíny migrujú a prenású sa na kladne nabitú membránu. Proteíny sa lepšie viažu na nitrocelulózu pri nižšom pH, preto treba použiť optimálnu hodnotu pH. Nitrocelulózová membrána je schopná viazať proteíny veľmi pevne a preto možno získať presný odtlačok (blot) elektroforetogramu proteínov, rozdelených pôvodne v polyakrylamidovom géli. Proteíny sú po prenose na povrchu membrány a sú tak disponované pre interakciu so špecifickými, značenými protilátkami, ktoré vydávajú po naviazaní na komplemetárny proteínový antigén viditeľný, resp. aj merateľný signál.

Analogický je postup pre izoláciu špecifických úsekov nukleových kyselín – Southern blot (pre DNA) a Northern blot (pre RNA).

IZOELEKTRICKÁ FOKUSÁCIA

Ako matrica na tento spôsob separácie proteínov, ale aj iných molekúl biopolymérov (napr. nukleových kyselín), sa používa najčastejšie polyakrylamidový gél buď medzi dvoma plochami, alebo v kapiláre. Rozloženie na rôzne frakcie prebieha v elektrickom poli medzi dvoma elektródami, kde katóda (s mínusovým nábojom) je oblasť vysokého pH (cca 10) a anóda (kladný náboj) je v oblasti nízkeho pH (cca 3). Pri separácii molekúl s rôznym elektrickým nábojom sa využíva ich pohyb v elektrickom poli a pri stúpajúcom pH (gradiente) medzi dvoma elektródami až na miesto, kde hodnota pH vyrovná ich náboj na nulový (izoelektrický bod). Ak by sa proteín nachádzal napríklad v oblasti nižšieho pH ako je jeho izoelektrický bod, bude mať kladný náboj (správa sa ako kation) a migruje smerom ku katóde do oblasti pH, kde náboj stratí a stane sa elektricky neutrálny a tým nepohyblivý.

1.10.6 Izolácia a separácia nukleových kyselín

Izolácia nukleových kyselín je prvým krokom v mnohých molekulárno genetických analýzach. Je potrebné získať cieľovú nukleovú kyselinu (DNA alebo RNA) v dostatočnom množstve a kvalite, to jest bez prímies „zbytočných“ látok, tzv. kontaminantov. Výber metódy izolácie závisí od spôsobu, akým sa bude nukleová kyselina v ďalšom postupe analyzovať. Napr. pri použití metódy PCR (polymerázová reťazová reakcia) postačujú malé množstvá DNA, ktorej čistota, ani integrita nie sú vo väčšine prípadov kritické. Na druhej strane pri klonovaní, enzymatickom opracovaní DNA restriktívnymi endonukleázami alebo pri sekvenovaní, sú potrebné relatívne väčšie množstvá DNA s vyš-

šou čistotou. Rovnako pri kvalitatívnej a kvantitatívnej analýze génovej expresie je potrebné väčšie množstvo mRNA, ktorej integrita je kritická pre výsledok ďalších molekulárno-biologických analýz.

Izoláciu nukleových kyselín možno rozdeliť na dva základné kroky, ktorými sú:

- lýza buniek,
- purifikácia nukleových kyselín od kontaminujúcich zložiek bunkového obsahu.

1.10.6.1 LÝZA BUNIEK A TKANÍV

Nukleové kyseliny možno izolovať z rôznych zdrojov. V prípade, že sa mikrobiálna kultúra pestuje v tekutom médiu, je prvým krokom izolácie oddelenie buniek od média centrifugáciou. Aby došlo k uvoľneniu nukleovej kyseliny do vodného roztoku, je potrebné rozrušiť (dezintegrovat) bunkové steny a biomembrány. Iné postupy si vyžaduje izolácia z bakteriálnych buniek, iné z rastlinných buniek a najjednoduchšie sa izolujú nukleové kyseliny zo živočíšnych tkanív a bunkových kultúr.

Lýza bakteriálnych buniek

V prípade niektorých baktérií, ktoré majú veľmi hrubú bunkovú stenu alebo tvoria veľa sekundárnych metabolitov, je vhodné izolovať DNA z buniek v logaritmickú fázu rastu, t.j. pri ich aktívnom delení. Na lýzu bakteriálnych buniek sa najčastejšie používa enzymatické natrávenie bunkovej steny lyzozýmom, ktorý hydrolyzuje glykozidické väzby v peptidoglykáne. Tento enzým sa prirodzene vyskytuje vo vaječnom bielku a v slzách. Druhým krokom je rozrušenie cytoplazmatickej membrány bakteriálnej bunky pôsobením ionogénnych detergentov, napr. SDS – dodecylsulfát sodný. Často je potrebné okrem chemickej lýzy použiť aj mechanickú lýzu bakteriálnych buniek pomocou ultrazvuku, avšak priveľmi intenzívna ultrasonikácia môže viesť k rozbitiu nielen samotných bakteriálnych buniek, ale aj k narušeniu bakteriálneho chromozómu.

Chelatačné činidlá

K rozpadu bunkových štruktúr prispieva degradácia proteínov pomocou enzýmov proteáz, napr. proteinázy K. Dôležitým faktorom je aj prítomnosť chelatačných činidiel (napr. EDTA – kyselina etyléndiamíntetraoctová), ktoré z roztoku „vychytávajú“ dvojmocné kationy (Mg^{2+} , Ca^{2+}), čím inaktivujú bunkové DNázy, ktoré by mohli degradovať cieľové úseky DNA. Nepřítomnosť dvojmocných kationov zároveň destabilizuje vonkajšiu bakteriálnu membránu. Pri lýze sa uvoľní celý obsah buniek do roztoku, pričom vznikne komplexná zmes obsahujúca zvyšky bunkových stien a bunkových membrán, proteíny, nukleové kyseliny, polysacharidy a rôzne nízkomolekulové zložky. Aby nedochádzalo k degradácii izolovanej nukleovej kyseliny, je potrebné použiť čo najmiernejšie podmienky lýzy, t.j. uskutočňovať ju v tlmivom roztoku a v chlade. Pri práci s vysokomolekulovou DNA je zároveň nutné dávať pozor pri homogenizácii a pipetovaní, aby nedošlo k jej fragmentácii mechanickým rozrušením.

Centrifugácia v hustotnom gradiente

Zdrojom nukleových kyselín môžu byť aj subcelulárne častice – napr. vírusy, ktoré získame po izolácii centrifugáciou v hustotnom gradiente (viď vyššie).

1.10.6.2 PURIFIKÁCIA NUKLEOVÝCH KYSELÍN

Princípom purifikácie akéhokoľvek materiálu z buniek je zbaviť sa zložiek, ktoré obmedzujú ďalšiu analýzu. Pri izolácii nukleových kyselín je dôležité odstrániť zo zmesi proteíny, medzi ktoré patria aj bunkové nukleázy, ktoré môžu degradovať izolovanú nukleovú kyselinu, rovnako aj proteíny viažuce sa na DNA, ktoré svojou prítomnosťou môžu rušiť následné analýzy (napr. štiepenie restriktívnymi endonukleázami). Na odstránenie proteínov sa používajú nešpecifické proteázy, najčastejšie proteináza K. Na odstránenie RNA z pripravovanej DNA sa použí-

va pankreatická RNáza. Tento enzým je veľmi stabilný a zároveň nevyžaduje pre svoju aktivitu dvojmocné ióny (Mg^{2+} , Ca^{2+}), čo neplatí napr. pre DNázy. Pri izolácii RNA je zas dôležitým krokom odstránenie prímiesí genomickej DNA, čo zabezpečí pankreatickú DNázu. V tomto prípade je potrebné použiť komerčne dostupné DNázy, ktoré neobsahujú stopové množstvá RNáz.

Fenolová extrakcia

Na odstránenie proteínov z pripravovaných nukleových kyselín sa často používa extrakcia organickými rozpúšťadlami (fenol, chloroform – trichlórmetylán). Tieto látky sú s vodou nemiešateľné, a preto sa po ich pridaní k vodnému roztoku nukleových kyselín vytvoria dve fázy. Pri premiešaní takejto zmesi dochádza na fázovom rozhraní k denaturácii proteínov – vznikne zrazenina. Tieto denaturované proteíny možno odstrániť centrifugáciou, počas ktorej ich zrazenina vytvorí prstenec na rozhraní medzi spodnou (organickou, chloroformovou/fenolovou) a hornou (vodnou) fázou.

Ak sa roztok nukleových kyselín extrahuje fenolom s neutrálnym pH, nukleové kyseliny zostávajú po extrakcii vo vodnej fáze. V prípade, že sa na extrakciu použije kyslý fenol, vo vodnej fáze zostáva len RNA a molekuly DNA prechádzajú do organickej fázy.

Po fenolovej extrakcii je dôležité zbaviť roztoky nukleových kyselín zvyškov fenolu, pretože fenol môže inhibovať ďalšie enzymatické reakcie (napr. reštrikčné štiepenie). Na tento účel sa používa extrakcia zmesou chloroformu s izopropylalkoholom a zrážanie nukleových kyselín alkoholom (etanolom alebo izopropanolom).

Zrážanie nukleových kyselín alkoholom

Na prečistenie nukleových kyselín od nízkomolekulových látok (solí, zvyšky fenolu) a na skoncentrovanie vzorky sa používa alkoholové zrážanie (najčastejšie čistým, bezvodým etanolom alebo izopropanolom). Zrážanie sa robí v prítomnosti jednomocných iónov (napr. 0,1 M octan sodný) a pri nízkej teplote (-20°C). V týchto podmienkach je výťažok dostatočný aj pri nízkej koncentrácii DNA. Na druhej strane, zrážanie pri laboratórnej teplote ($+20^{\circ}\text{C}$) je výhodné, ak chceme vyvrázať DNA bez súčasného vyvrážania kontaminujúcej RNA. Vyvrážaná nukleová kyselina sa nazýva precipitát. Precipitát DNA sa od roztoku oddelí vysokootáčkovou centrifugáciou. Premytím 70 % etanolom sa odstránia zvyšky solí prítomné v precipitáte a precipitát sa vysuší tak, aby sa odparili zvyšky etanolu, ale zároveň aby DNA zostala hydratovaná. Molekula DNA v kyslom prostredí môže spontánne degradovať, preto sa má DNA rozpúšťať v slabo zásaditom tlmivom roztoku s prídavkom EDTA (tzv. roztok TE). Roztoky nukleových kyselín sa skladujú pri teplote 4°C , dlhodobejšie pri -20°C .

Podobný postup precipitácie možno použiť aj v prípade RNA, ale vtedy je vhodnejšie výsledný precipitát rozpustiť v čistej vode namiesto roztoku TE. Roztok RNA sa zásadne uskladňuje pri nižších teplotách (-80°C).

Alkalická lýza – izolácia plazmidovej DNA

Táto metóda sa používa pri izolácii plazmidov z bakteriálnych buniek za súčasného odstránenia chromozomálnej DNA. Bakteriálne bunky sú lyzované v alkalickom prostredí (0,2 M NaOH), pričom dôjde k v prítomnosti detergentu (1 % SDS). Chromozomálna DNA je pri lýze fragmentovaná na lineárne molekuly, zatiaľ čo plazmidová DNA, ktorá má podstatne menšiu veľkosť, si zachová cirkulárnu formu. Pri pH okolo 12, ktoré je v roztoku, dochádza k denaturácii DNA, t.j. vodíkové väzby medzi bázami sa uvoľnia a vznikajú jednovláknové molekuly. Po neutralizácii roztoku (octanom draselným) kruhová plazmidová DNA renaturuje do pôvodnej dvojvláknovej formy. Lineárne molekuly chromozomálnej DNA nie sú schopné tak rýchlo renaturovať, a preto agregujú s inými zložkami lyzátnu (bunkové steny a membrány, proteíny, SDS). Tieto zlož-

ky vo forme zrazeniny sa odstraňujú z roztoku centrifugáciou, čím sa získa plazmidový preparát, ktorý možno priamo použiť v ďalších experimentoch.

Ultracentrifugácia v gradiente CsCl

DNA môže byť purifikovaná zo zmesi makromolekúl ultracentrifugáciou za pomoci chloridu cézneho (CsCl) a etídium bromidu. DNA sa skoncentruje do úzkeho prúžku v strede gradientu, pričom lineárna a cirkulárna (plazmidová) DNA majú inú hustotu, a preto ich možno ich touto metódou navzájom oddeliť. Po centrifugácii sa vyberú frakcie obsahujúce DNA, etídium bromid sa odstráni extrakciou n-butanolom a DNA sa z roztoku získa etanolovou precipitáciou. Výsledkom tejto techniky je vysokomolekulárna DNA s vysokou čistotou. Gradientová centrifugácia je veľmi prácna, časovo náročná a relatívne drahá, a preto sa už v súčasnosti používa zriedkavo.

Izolácia RNA

Pri izolácii RNA z akéhokoľvek biologického materiálu je hlavným problémom jej nestabilita. Molekula RNA podlieha degradácii oveľa ľahšie ako DNA a zároveň ribonukleázy sú vo všeobecnosti veľmi stabilné a všadeprítomné enzýmy, ktoré na rozdiel od DNáz nepotrebujú k svojej aktivite ako kofaktory dvojmocné ióny Mg^{2+} a Ca^{2+} . Preto je potrebné pri izolácii dodržiavať absolútnu čistotu laboratórnych pomôcok, používať sterilné „RNáza-free“ roztoky a spotrebný materiál a pracovať v rukavičkách. RNáza sa vyskytuje všade. Vylučuje sa aj potnými žľazami na končekoch prstov, takže práca bez rukavíc je absolútne neprípustná. Z evolučného hľadiska je vraj toto vylučovanie RNázy spojené s ochranou pred RNA-vírusmi. Na zabránenie degradácie sa do roztokov s RNA pridávajú inhibítory RNáz, ktorými sú napr.:

- RNasin (RNázový proteínový inhibítor z ľudskej placenty),
- vanadyl-ribonukleozidový komplex,
- guanidin-hydrochlorid,
- guanidin-izotiokyanát,
- heparín,
- dextránsulfát.

Metódy izolácie a purifikácie RNA sú založené na rýchlej lýze buniek, ktorá neutralizuje prítomné nukleázy. Kontaminujúce bielkoviny sa odstraňujú fenolovou extrakciou v kyslom prostredí alebo na silikagelových kolónkach. Zvyšky chromozomálnej DNA možno rozložiť pôsobením DNázy. Purifikovaná RNA sa využíva na prípravu komplementárnej DNA (cDNA), northernovu hybridizáciu, RT-PCR a pod. Pri mnohých aplikáciách je výhodné použiť iba frakciu mRNA. Z celkovej ribonukleovej kyseliny sa mRNA najčastejšie purifikuje chromatografiou na oligo-dT nosičoch.

Purifikácia mRNA

V princípe izolácia mRNA spočíva vo využití prirodzenej enzymatickej posttranskripčnej modifikácie eukaryotickej mRNA, a to je pridávanie poly (A)-koncovky na 3'-koniec molekuly mRNA za pomoci enzýmu poly (A)-polymerázy. Oligo-dT nosiče sú štruktúry, na ktorých sú fixované jednovláknové molekuly so sekvenciou poly(T), a teda sú komplementárne k jednovláknovému mRNA s poly(A) koncami. Ak sa roztok mRNA naleje na tieto nosiče, v prostredí s vyššou iónovou silou (pridanie solí) dochádza k hybridizácii, a teda zachytávaniu mRNA na týchto nosičoch. Následne sa upraví chemické prostredie použitím solí s nižšou iónovou silou a mRNA sa z nosiča oddeľ a eluát sa zachytí do skúmaviek, v ktorých je jej koncentrácia podstatne vyššia, ako mal pôvodný roztok pred purifikáciou

Elektroforéza NK

Patrí k najpoužívanejším separačným technikám na izoláciu a analýzu NK. Využíva sa pri nej pohyb nabitých molekúl v elektrickom poli. Náboj molekúl NK určujú predovšetkým

negatívne nabité fosfátové skupiny, preto sa pohybujú k anóde. Elektroforéza NK prebieha v géli, preto hovoríme o gélovej elektroforéze. V závislosti od veľkosti fragmentov sa používajú buď polyakrylamidový gél (pre veľkosť 10 bázových až 1000 bázových párov), alebo agarózový gél (veľkosť 100 bázových až 50 kilobázových párov). Formáty sú buď planárne (horizontálna, vertikálna) alebo kapilárna gélová elektroforéza. Pohyblivosť fragmentov NK pri elektroforéze nezávisí od náboja, ktorý je rovnomerne rozložený pozdĺž celého fragmentu, čo znamená, že na jednotku dĺžky je rovnaký. Preto je pohyblivosť daná veľkosťou fragmentu – čím je väčší, tým pomalší je jeho pohyb. To sa využíva pri určení neznámej veľkosti molekuly DNA. Porovnaním pohyblivosti s elektroforetickou pohyblivosťou fragmentov alebo molekúl sa známou veľkosťou (hmotnostné štandardy, ladder) zistíme veľkosť skúmaných molekúl alebo fragmentov NK, pretože sa budú v elektrickom poli pohybovať rovnakou rýchlosťou ako hmotnostný štandard rovnakej veľkosti. Po skončení elektroforézy a vizualizácii (napr. preliatím gélu roztokom etídiumbromidu a ilumináciou UV lampou) budú v rovnakej vzdialenosti ako príslušný štandard.

V súlade s princípom tvorby laboratórnych algoritmov a štandardizáciou rámci klinickej mikrobiológie sa uvedené klasické metódy separácie proteínov a nukleových kyselín čoraz viac nahrádzajú komerčnými súpravami. Tie sú síce výrazne drahšie, ale spolu s prístrojovou technikou a neustále zlepšovaným softvérom a databázami umožňujú automatizáciu mikrobiologickej diagnostiky a premenu analýz proteínov a nukleových kyselín mikroorganizmov na metódy

rýchlej diagnostiky so všetkými jej výhodami pre pacienta, lekára a takisto odborných pracovníkov v rámci klinickej mikrobiológie.

LITERATÚRA

1. <http://elte.prompt.hu/sites/default/files/tananyagok/IntroductionToPracticalBiochemistry/ch05s03.html>
2. Ali N., Rampazzo de C.P., Costa A.D.T., Krieger M.A.: Current Nucleic Acid Extraction Methods and Their Implications to Point-of-Care Diagnostics. *BioMed Research International*, 2017, 9306564. doi:10.1155/2017/9306564.
3. Coskun O.: Separation techniques: Chromatography. *Northern Clinics of Istanbul*, 2016, 3(2): 156-160. doi:10.14744/nci.2016.32757
4. <https://biopedia.sk/molekularna-biologia/izolacia-nukleovych-kyselin>
5. <https://courses.lumenlearning.com/microbiology/chapter/using-physical-methods-to-control-microorganisms/>
6. Saraswat M., Musante L., Ravida A. et al.: Preparative purification of recombinant proteins: current status and future trends. *Biomed. Res Int*, 2013, s. 312709.
7. Olmsted R.N. et al.: Pilot study of directional airflow and containment of airborne particles in the size of *Mycobacterium tuberculosis* in an operating room. *Am J Infect Control*, 2008, 36(4): 260-267.
8. Thomas L.: Labor und Diagnose – Indikation und Bewertung von Laborbefunden für die medizinische Diagnostik. 8. Auflage. 2012. ISBN 978-3-9805215-8-1.
9. Wickramasinghe S.R. et al.: Understanding virus filtration membrane performance. *Journal of Membrane Science*, 2010, 365(1-2): 160-169.
10. Wilson K., Walker J.: Practical Biochemistry: Principles and techniques. Cambridge University Press, 2010.

1.11 MIKROSKOPICKÉ TECHNIKY V KLINICKEJ MIKROBIOLÓGIÍ

Schwarzová K.



Pre správnu terapiu ochorení vyvolaných patogénnymi mikroorganizmami je mikroskopické vyšetrenie v dnešnej dobe nevyhnutnou súčasťou diagnostiky. V mikroskopickej analýze sú spracované a hodnotené rôzne typy materiálov: tkanivá, stery, punkáty, alebo tekutiny.

Mikroskopické pozorovanie mikroorganizmov umožňuje sledovať tvar a veľkosť buniek (tab. 1.11.1), usporiadanie buniek, prítomnosť, tvar, veľkosť a umiestnenia spór, pohyblivosť baktérií (v natívnom preparáte), zistiť príslušnosť baktérií podľa Grama, zistiť počet mikroorganizmov, preparát informuje tiež o acidorezistencii, prítomnosti puzdra a i.

Tab. 1.11.1. Veľkosť niektorých bakteriálnych buniek.

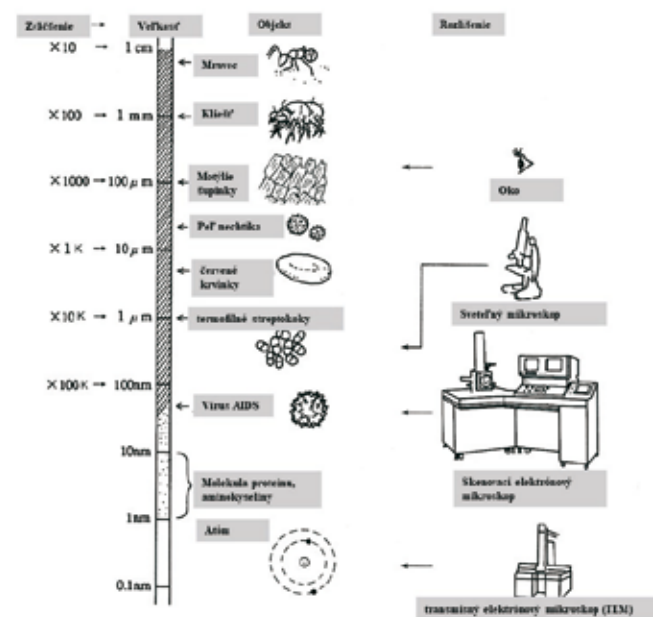
Mikroorganizmus	Veľkosť (μm)
Chlamydia	0,2 – 1,5
Vibrio	0,5 × 3
Rickettsia	0,3 – 2,0
Staphylococcus	0,5 – 1,0
Escherichia	1 × 2
Bacillus	0,25 – 1,0
Candida	10 – 12
Mycoplasma	0,15 – 0,3
Spirochaetae	5 – 250

História pozorovania drobných živočíchov a fragmentov pomocou predchodcov optických prístrojov siaha až do obdobia pred 2000 rokov. Okolo r. 1590 vyvinuli prvé mikroskopy Janssenovci, ale až holandský obchodník, vedec a jeden z priekopníkov mikroskopie, A. van Leeuwenhoek v druhej polovici 17. storočia vyrobil a použil prvý mikroskop s 270-násobným zväčšením. Anglický geológ R. Hooke prvýkrát použil základnú konfiguráciu troch šošoviek, ktorá sa v mikroskopoch využíva dodnes. Svoje pozorovania pod mikroskopom tiež zakreslil. V polovici 17. storočia pri pozorovaní vzorky z korku sledoval Hooke tvary pletiva, malé komôrky, ktoré mu pripomínali bunky včelieho plástu. Prisudzuje sa mu preto zavedenie biologického pojmu celula, „bunka“ do mikrobiológie. Historický pokrok v mikrobiológii sa datuje od r. 1786, kedy dánsky prírodovedec O. F. Müller, zobrazil a opísal základné tvary baktérií (koky, bacily, spirily, vibriá). Do polovice 19. storočia však bolo možné sledovať pomerne skreslené obrázky, kvôli nízkej kvalite skla a nedokonalému tvaru šošoviek. Až korporácie, ako napr. Zeiss (výrobu mikroskopov zahájili už v r. 1847) alebo Spencer začali vyrábať jemné optické prístroje, ktoré sa neustále vyvíjali až do dnešnej podoby. V r. 1931 patentovala spoločnosť Siemens elektrostatičný objektív vďaka R. Rudenbergovi a začína sa éra vývoja elektrónového mikroskopu. Rudenberg sa vývojom elektrónového mikroskopu zaoberal kvôli potrebe identifikovať pôvodcu poliomyelitídy svojho dvojročného syna, nakoľko optickým mikroskopom nebolo možné vírus zachytiť. Prvý tzv. „prežarovací“ elektrónový mikroskop (TEM – Transmission electron microscope) vyvinuli v Nemecku r. 1931 M. Knoll a E. Ruska. Zakladateľom elektrónovej mikroskopie

v 50. rokoch 20. storočia bol v bývalom Československu český fyzik A. Delong.

Mikroskop je veľmi jemný a drahý prístroj a preto je s ním potrebné pracovať opatrne a šetrne.

Podľa spôsobu zobrazovania sledovaného objektu (obr. 1.11.1) a jeho využitia v mikrobiológii rozoznávame niekoľko typov mikroskopov:



Obr. 1.11.1. Možnosti pozorovania objektu (upravené podľa: jointlab.upol.cz).

1. Binokulárny mikroskop.
2. Svetelný (optický) mikroskop.
3. Konfokálny mikroskop.
4. Fázovo kontrastný mikroskop.
5. Mikroskop s tmavým poľom.
6. Fluorescenčný mikroskop.
7. Elektrónový mikroskop.

1. **Binokulárny mikroskop** je najzákladnejším typom mikroskopu, ktorý pozostáva z objektívu, tvoreného niekoľkými šošovkami, ktoré zaostrujú vzorku podsvietenú zdrojom svetla. Jeho pracovná vzdialenosť je od 3 cm do 20 cm a jeho rozlišovacia schopnosť je cca 200 nm. Modernejším optickým mikroskopom je tzv. trinokulárny mikroskop, ktorý je variantom binokulárneho mikroskopu, pričom tretia optická časť slúži na pripojenie kamery.

2. **Svetelný (optický) mikroskop** je základným a historicky najstarším typom mikroskopu. Základnou technikou mikroskopického vyšetrenia je pozorovanie preparátu v prechádzajúcom viditeľnom svetle pomocou štandardne vybaveného svetelného mikroskopu. Technika dovoľuje hodnotiť tak natívne, ako aj farbené preparáty. Výsledné zväčšenie mikroskopu dostaneme

vy násobením zväčšenia objektívu a okulára. Optický mikroskop zväčšuje 100- až 3 000-násobne. Jeho rozlišovacia schopnosť dovoľuje znázorniť väčšinu baktérií a pri niektorých veľkých baktériách aj subcelulárne štruktúry. Je využitelný pri identifikácii mikroorganizmov (farbiace techniky, morfológia húb, parazitov), ale aj pri kvantitatívnej analýze mikroorganizmov (analýza počtu mikroorganizmov, fragmentov húb, vývojových štádií parazitov).

Optický mikroskop tvoria tri časti (obr. 1.11.2): **mechanická časť** (statív, nosič tubusu, tubus, revolverový menič objektívov, pracovný stolík, mikrometrická skrutka, makrometrická skrutka), **optická časť** (okuláry, objektívy) a **osvetľovacie zariadenie** (zrkadlo, kondenzor – irisová clona, objímka, sústava šošoviek a lampa). Novšie modely mikroskopov umožňujú aj pripojenie na počítač pomocou USB káblu, vďaka čomu možno urobiť fotografiu, alebo videozáznam z pozorovania.

Obraz v mikroskope pozorujeme okulárom. Novšie mikroskopy sú vybavené tubusom pre dva okuláre (binokulárny tubus), takže obraz pozorujeme súčasne oboma očami. Pre malé zväčšenie sa využívajú skôr stereomikroskopy (preparačné lupy), ktoré pozorujú obraz stereoskopicky súčasne dvoma samostatnými optickými systémami. Na presmerovanie svetla do fotografického prístroja alebo kamery sú určené trinokulárne tubusy. Objektívy (obvykle 3) sú uložené v revolverovom meníči. Sú zložené zo systému šošoviek. Každý z objektívov má iné zväčšenie. Rozlišujeme suché (napr. 5x, 10x, 45x) a imerzné (100x) objektívy. Medzi suchým objektívom a pozorovaným preparátom je vzduch. Lúč svetla, ktorý vystupuje z preparátu pod uhlom α sa na rozhraní medzi krycím sklíčkom a vzduchom láme, čím sa nemôže využiť pri tvorbe obrazu. Lúč svetla, ktorý prechádza zo skla do imerzného prostredia nemení svoj smer a môže byť využitý pri tvorbe obrazu. Pri použití **imerzného objektívu** je potrebné zvýšiť index lomu svetla a dosiahnuť homogénne optické prostredie medzi preparátom a čelnou šošovkou kondenzora, preto sa na krycie sklíčko preparátu kvapká imerzný olej (najčastejšie cédrový olej), prípadne kvapka vody, glycerolu a pod. Pri pozorovaní preparátu sa potom objektív do tejto kvapky opatrne ponorí.



Obr. 1.11.2. Zloženie svetelného mikroskopu (autorka obrázku K. Schwarzová).

Na vytvorenie obrazu používa mikroskop najmenej dve šošovky alebo dva systémy šošoviek. Prvá šošovka, obrátená k objektívu, vytvára skutočný, zväčšený a prevrátený obraz. Druhá šošovka, obrátená k okuláru slúži ako lupa, ktorou sa

pozeráme na skutočný obraz vytvorený objektívom a tým si obraz ešte zväčšujeme. Pri novších typoch mikroskopov je zdroj svetla integrovaný do statívu. Kondenzor je umiestnený hneď pod stolčekom a skladá sa z viacerých šošoviek. Slúži na koncentráciu a reguláciu množstva svetla do preparátu cez kruhový otvor v stolčeku. V kovovej obručke pod kondenzorom je umiestnená irisová clona pre reguláciu množstva svetla, zároveň nesie mliečne a farebné optické filtre. Po prestúpení cez preparát lúč svetla pokračuje do zväčšovacieho optického systému tvoreného objektívom a okulárom. Často sa zabúda, že pokiaľ sa nekvapne imerzný olej medzi kondenzor a podložné sklíčko (tzv. kondenzorová imerzia), nedá sa využiť plne rozlišovacia schopnosť imerzného objektívu.

Pomocou svetelného mikroskopu môžeme preparát analyzovať vo svetelnom poli, vo fázovom kontraste a s použitím diferenciálnej interferenčnej mikroskopie. Rozlišovacia schopnosť svetelného mikroskopu je obmedzená dĺžkou svetelnej vlny a preto možno pozorovať častice len do veľkosti 0,2 μm .

Významnou pomôckou v medicíne (napr. v mikrochirurgii) môže byť aj špeciálny svetelný mikroskop – stereomikroskop, v ktorom je pre obe oči zabezpečená samostatná dráha lúča, čím vzniká priestorový obrazový dojem (3D rozmer). Stereomikroskop (binokulárna lupa) zvyčajne dosahuje asi 100-násobné zväčšenie a veľkú hĺbku ostrosti.

3. Konfokálny mikroskop je typ svetelného mikroskopu s vyššou rozlišovacou schopnosťou. Pozostáva z fluorescenčného mikroskopu, z niekoľkých zdrojov laserových lúčov, skenovacej hlavy s optickým a elektronickým príslušenstvom, počítačom a monitorom na zobrazovanie a softvérom na získavanie, spracovanie a analýzu snímok. Zdrojom svetla je laser (ultrafialové, infračervené alebo viditeľné spektrum), ktorý cez bodovú (konfokálnu) clonu a objektív osvetľuje preparát. Mikroskop dokáže zobrazovať obraz aj po vrstvách (sníma sériu optických rezov) a vytvorí tak trojrozmerný obraz skúmaného objektu, čo umožňuje pozorovať aj štruktúry ponorené v hĺbke. Konfokálnou mikroskopiou sa získava rozlíšenie a kontrast vyšší ako u ostatných typov svetelnej mikroskopie. Obraz sa spracuje elektronicky pomocou zabudovaného počítača. Je využívaný pri štúdiu priestorových štruktúr buniek (napr. cytoskeletu), využíva sa tiež v cytológii a cytogenetike, ale aj v dermatológii. V praxi sa využíva laserový konfokálny mikroskop so skenovacím zariadením a konfokálny mikroskop s rotujúcim diskom.

4. Fázovo kontrastný mikroskop slúži na pozorovanie živých buniek v natívnom preparáte. Princíp spočíva v nerovnej priepustnosti a lámavosti svetelných lúčov, prichádzajúcich cez nezafarbené štruktúry živých mikroskopických objektov. Metóda fázového kontrastu vyžaduje mikroskop vybavený špeciálnym kondenzorom a objektívmi. Dovoľuje rozlíšiť štruktúry s odlišnou optickou hustotou, ktoré rôzne posúvajú fázu prechádzajúceho svetla. Výsledným vnemom je kontrastný farebný obraz v zornom poli. Zmena fázy svetla, ktorá nastáva pri priechode objektom nie je zrakom priamo viditeľná. Ak teda objekt nemá detaily, ktoré sa líšia kontrastom, je pre zrak pozorovateľa priehľadný, číry. Metóda je vhodná najmä na štúdium fyziologických vlastností mikroorganizmov pri použití natívneho preparátu, ale umožňuje sledovať aj detaily bunkových štruktúr.

5. Mikroskop s tmavým poľom. Tento typ mikroskopovania sa využíva na zobrazenie skúmaného objektu bočným osvetlením. Pri tomto postupe sa pomocou paraboloidného kondenzora centrálné lúče vyradia z osvetľovania preparátu a osvetľujúce bočné lúče prechádzajú mimo objektívu (zorné pole je tmavé). Bočné osvetlenie sa dosiahne veľkým vychýlením zrkadla, alebo irisovej clony kondenzora z centrálnej polohy. Na dokonalé osvetlenie v tmavom poli sa používajú špeciálne zrkadlové kondenzory. Keďže povrch prítomných mikroorganizmov láme a odráža bočné lúče do objektívu, kontúry mikroorganizmov sa zobrazia ako kontrastné svetlé štruktúry v tmavom poli (žiariace body). Pre suché objektívy stačí zastrieť výstupnú šošovku kondenzoru clonou pre tmavé pole. V tmavom poli sa pozoruje

jú malé objekty, ktoré nemožno rozlíšiť v svetelnom poli, objekty s malým indexom lomu vzhľadom na vodu, alebo objekty, ktoré sa nedajú farbiť. Môžu sa pozorovať baktérie, ktorých rozmer je menší ako 0,1 μm a preto unikajú pozornosti v prechádzajúcom svetle a nemožno ich rozlíšiť v svetelnom poli (napr. spirochéty – treponémy, borélie, leptospiry). Táto metódika sa využíva aj pri diagnostike mykóz a pri dôkaze parazitov.

6. Fluorescenčný mikroskop. Princípom fluorescenčnej mikroskopie je schopnosť niektorých látok absorbovať po ožiarení svetlo určitej vlnovej dĺžky a následne vyžarovať (emitovať) svetlo dlhšej vlnovej dĺžky. Od optického mikroskopu sa fluorescenčný mikroskop líši tým, že je doplnený o veľmi silný zdroj svetla (obvykle UV lampa) a má dva filtre. **Excitačný filter** prepúšťa svetlo, potrebné k excitácii farbiva. **Bariérový (emisný) filter** prepúšťa fluorescenčné (emitované) svetlo, čím vzniká čierne pozadie obrazu. Pri mikroskopovaní sa používajú špeciálne fluorescenčné farbivá (fluorofóry alebo aj fluorochrómy). Fluorofóry sú chemické zlúčeniny s charakteristickým excitačným a emisným pásmom, ovplyvňujúcim intenzitu fluorescence. Excitačné a emisné žiarenie danej látky sa líši vlnovými dĺžkami (emisné žiarenie má dlhšiu vlnovú dĺžku ako excitačné) a tým sa líšia aj zafarbením (napr. ak je fluorofór GFP – Green fluorescent protein ožiarovaný svetelným lúčom z modrej až UV oblasti s maximom pri 395 nm, fluoreskuje jasne zelenou farbou s maximom pri 509 nm). Fluorofóry sa rozdeľujú na vlastné (vnútorné) a nevlastné (vonkajšie). **Vlastné fluorofóry** zodpovedajú za prirodzenú autofluorescenciu vzorky, kedy sama vzorka obsahuje určité farbivá a vykazuje aj istú mieru fluorescence. Zdrojom takejto autofluorescencie sú proteíny s aromatickými aminokyselinami tryptofánom, tyrosínom a fenylalanínom (tab. 1.11.2). Autofluorescenciu vykazujú aj chlorofyl, hemoglobín, cytochrómy, vitamín A, alebo redukované formy NADH a NADPH. Väčšina fluorochrómov v prírode má široký rozsah vlnových dĺžok excitačného a emisného žiarenia. Pre biologický výskum sa využívajú aj tzv. **nevlastné fluorochrómy**, ktoré majú definované excitačné a emisné hodnoty a sú umelo pridávané do študovaného systému. Takéto nevlastné fluorochrómy sa v sledovanom systéme naviažu na cieľové štruktúry kovalentne (ako fluorescenčné značky) alebo nekovalentne (ako fluorescenčné sondy) (tab. 1.11.3, 1.11.4).

Tab. 1.11.2. Hlavné fluorofóry proteínov (upravené podľa Fišar, 2003).

Fluorofóry	$\lambda_{\text{ex}}^{\text{max}}$ (nm)	Použitie
Tryptofán (Try)	295 – 353	štúdium štruktúry a interakcie proteínov
Tyrozín (Tyr)	275 – 304	
Fenylalanín (Phe)	260 – 282	na celkovej fluorescencii bielkovín sa nepodíela

Tab. 1.11.3. Príklady fluorescenčných sond (upravené podľa Fišar, 2003).

Fluorofór	$\lambda_{\text{ex}}^{\text{max}}$ (nm)	Použitie
Akridínová oranžová (DNA)	500 – 526	Vizualizácia RNA/DNA; prietoková cytometria
Akridínová oranžová (RNA)	460 – 650	
Etídium bromid	518 – 605	Farbenie odumretých buniek, detekcia DNA; elektroforéza; prietoková cytometria
Propídium jodid	535 – 617	Farbenie odumretých buniek; prietoková cytometria
DAPI (4',6-diamidino-2-fenylindol dihydrochloride)	358 – 461	Farbenie bunkových jadier; mikroskopia
Fluorescein diacetát (FDA)	490 – 513	Meranie životnosti buniek

Fluorofóry sa špecificky viažu len na určité molekuly v bunke a umožňujú ich vizualizáciu. Takto možno zobraziť bunkové jadrá, DNA chromozómy, jadierka, cytoskelet a jeho zložky, sledovať biochemické deje, alebo diagnostikovať a lokalizovať poškodenia buniek, tkanív, orgánov. Fluorescenčné farbivá, schopné vykazovať fluorescenciu sa používajú veľmi často pri vitálnom farbení, keďže nízke koncentrácie farbív živým bunkám neškodí. Pre biologický výskum sa využívajú komerčne dostupné fluorofóry, ktoré sa viažu na príslušné štruktúry buniek (napr. farbivo etídium bromid na molekulu DNA) alebo sú konjugované s určitou molekulou, ktorá má schopnosť naviazať sa na sledovanú štruktúru (napr. protilátky).

Nevlastnými fluorofórmi sú aj fluorescenčné značky (tab. 1.11.4), ktoré sa kovalentnou väzbou viažu na biomolekuly (proteíny, peptidy, ligandy, oligonukleotidy). Väčšinou sa používajú na fluorescenčné značenie proteínov s aplikáciou v imunológii, histochémii, chromatografii a pod.

Tab. 1.11.4. Významné fluorescenčné značky (upravené podľa Fišar, 2003).

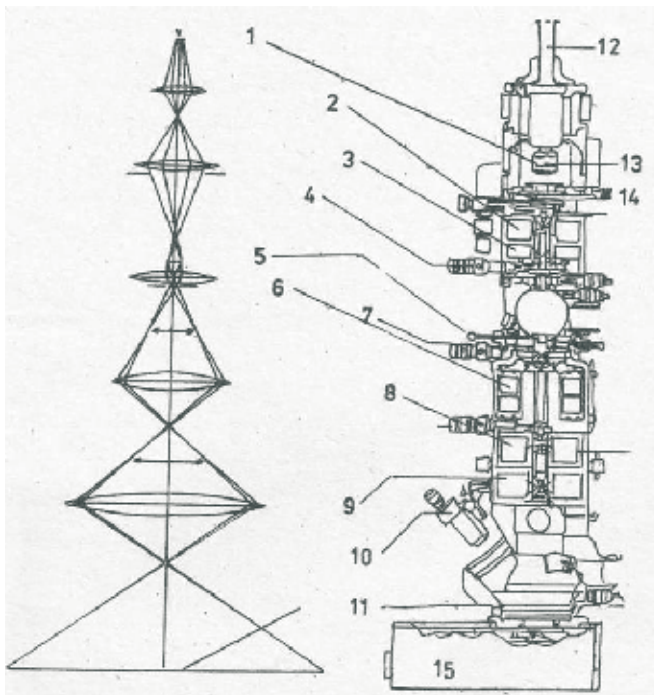
Fluorofór	$\lambda_{\text{ex}}^{\text{max}}$ (nm)	Použitie
Fluorescein izotiokyanát (FITC)	492 – 525	Imuno-fluorescencia
Tetrametylrhodamin izotiokyanát (TRITC)	535 – 580	
Eosin (2',4',5',7'-tetrabromofluorescein)	524 – 544	Fosforescenčné sondy
Erythrosin (2',4',5',7'-tetrajodofluorescein)	530 – 555	

Preparát, ofarbený príslušným fluorofórom žiari (fluoreskuje) na tmavom pozadí podľa druhu použitého fluorescenčného farbiva na zeleno, žltu alebo červeno. V oblasti klinickej mikrobiológie slúži táto technika na identifikáciu rôznych bakteriálnych rodov (napr. *Lactobacillus*, *Chlamydia*, *Mycoplasma*), húb (napr. *Microsporium*, *Trichophyton*) a vírusov (adenovírusy, herpes vírusy). Princíp fluorescence sa môže kombinovať pri dôkaze antigénov alebo protilátok (imunofluorescencia), pričom vizualizácia vzniknutého imunokomplexu sa robí pomocou protilátok značených fluorescenčnými farbivami, napr. FITC (fluorescein izotiokyanát). Technika je známa v dvoch modifikáciách, ako priama a nepriama imunofluorescencia. Priama imunofluorescencia (priama IFA) sa používa na detekciu antigénov (elementárne telieska *Chlamydia trachomatis* v epiteliálnych bunkách pohlavných orgánov, *Treponema pallidum* z miesta ulcusu alebo mukokutánnej lézie, na identifikáciu ťažko kultivovateľných alebo nekultivovateľných mikroorganizmov v tkanivách (*Borrelia burgdorferi*, *Legionella pneumophila*, *Leptospira* sp., *B. pertussis*, vírusy HSV, CMV, RSV, VZV). Metóda nepriamej imunofluorescencie (nepriama IFA) sa využíva na dôkaz protilátok prítomných v analyzovaných vzorkách (sérum pacienta) proti antigénu, fixovanému najčastejšie na podložné sklíčka (napr. *Treponema pallidum* – FTA ABS – fluorescenčný absorbčný test). Tieto metódy sa uplatňujú aj pri diagnostike vírusov (*Variola*, EBV, arenavírusy a pod).

7. Elektronový mikroskop (EM). Na rozdiel od svetelného mikroskopu (obr. 1.11.3, tab. 1.11.5) využíva elektronový mikroskop na vytvorenie zväčšeného obrazu prúd elektrónov, podobný žiareniu s veľmi malou vlnovou dĺžkou. Skúmaný predmet možno zväčšiť až 250 000-krát, zväčšenie špičkových mikroskopov dosahuje až niekoľkonásobne vyššie hodnoty. Tým možno pozorovať podrobnejšie detaily na povrchu alebo vnútornú štruktúru vzorky a to vo veľkom rozlíšení. Zväčšený obraz sa elektromagnetmi usmerňuje na fluorescenčné tienidlo obrazovky, prípadne na fotografickú platňu. Obraz vzniká prechodom elektrónov danou vzorkou, prípadne jej odtlačkom v podobe tenkej blany (transmisná mikroskopia, TEM), alebo odrazom elektrónov od jej povrchu (odrazová mikroskopia,

SEM). Elektrónové mikroskopy používajú na ovládanie dráhy elektrónov elektromagnetické a elektrostatické šošovky. Čím rýchlejšie sa elektróny pohybujú, tým kratšia je ich vlnová dĺžka. Rozlišovacia schopnosť mikroskopu priamo súvisí s vlnovou dĺžkou ožarovania, ktoré sa používa na vytvorenie obrazu. Rozlíšenie mikroskopu sa zvyšuje, ak sa zvýši urýchľovacie napätie elektrónového lúča (uvedené je v kilovoltach – kV). Lúč elektrónov môže objektom prechádzať (napr. pri ultratenkom reze baktérie), alebo sa od objektu (napr. celá baktéria) odráža.

Týmto mikroskopom (obr. 1.11.3) možno zhodnotiť morfológiu baktérií (rozmery, štruktúra, bičíky), vírusov a subcelulárnych štruktúr, nedajú sa však pozorovať procesy v živých bunkách. Na rozdiel od preparátov používaných pri svetelnej mikroskopii (podložné a krycie sklíčko, pozorovný objekt) musí byť vzorka, sledovaná v elektrónovom mikroskope umiestnená na sieťkach, vyrobených z platiny, paládia, niklu, zlata alebo medi. Veľkosť sieťok býva 2,3 mm a 3,0 mm a majú rôzny počet ôk.



Obr. 1.11.3. Porovnanie svetelného a elektrónového mikroskopu (prevzaté Bobák a Horák, 1986). **Legenda:** 1 - katóda, 2 - prvý kondenzátor, 3 - druhý kondenzátor, 4 - kondenzorová clona, 5 - preparát, 6 - objektív, 7 - objektívová clona, 8 - pomocný projektor, 9 - hlavný projektor, 10 - binokulárna lupa, 11 - tienidlo, 12 - kábel, 13 - dýza, 14 - anóda, 15 - fotokomora.

Medzi základné kritériá pri príprave preparátov pre elektrónovú mikroskopiu patrí správna fixácia biologického materiálu. Medzi základné činidlá patria: 1 – 2 % oxid osmičelý (OsO_4), ktorý preparát nielen fixuje, ale zvyšuje aj kontrast pozorovaných štruktúr; manganistan draselný (KMnO_4), používaný na štúdium membránových štruktúr bunky; glutaraldehyd, ktorý je na fixáciu bielkovín vhodnejší ako formaldehyd a akroleínové fixačné roztoky. Tieto roztoky sú používané na zachovanie jemných štruktúr bunky princípom „dvojitej fixácie“. Najbežnejšia zmes dvojitej fixácie je glutaraldehyd a oxid osmičelý.

Podľa toho, či má biologický objekt afinitu ku kontrastnej látke rozlišujú sa dva druhy kontrastovania (farbenia) preparátu:

1. Pozitívne kontrastovanie – pri tomto postupe ostáva tmavý objekt na svetlom pozadí. Soli uránu, wolfrámu a olova sa označujú ako „elektrónové farbivá“ (používajú sa aj v kombináciách ako dvojité kontrastovanie, napr. uranylacetát s citra-

nom olovnatým) a viažu sa na určité štruktúry v bunke. Najčastejšie sa používajú uranylacetát, hydroxid olovnatý, citran olovnatý, alebo manganistan draselný.

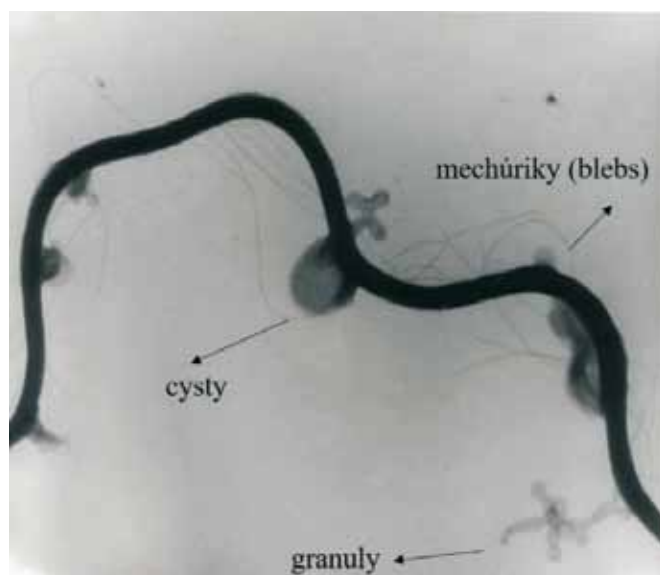
Tab. 1.11.5. Základné rozdiely medzi svetelným a elektrónovým mikroskopom (upravené podľa Bobák a Horák, 1986).

Časti prístroja	Svetelný mikroskop	Elektrónový mikroskop
Zdroj osvetlenia	Svetelné lúče, elektrické svetlo	Lúč elektrónov vychádzajúci zo žeravého vlákna katódy
Ovládanie osvetlenia	Abbého kondenzor (sústreďuje a nasmeruje svetlo zo zdroja pomocou viacerých šošoviek na pozorovaný objekt)	Magnetická šošovka kondenzora
Skúmaný predmet je umiestnený	Na podložnom 2 mm hrubom sklíčku	Na jemnej kolódiovej, cca 100 nm hrubej blanke
Systém, ktorý vytvára obraz	Sústava sklenených šošoviek – objektívov	Magnetická šošovka objektívu
Ďalšie zväčšenie	Sklenná šošovka – okulár	Magnetická šošovka projektoru
Prostredie, ktorým prechádzajú lúče	Vzduch a sklo	Vysoké vákuum cca $5 \cdot 10^{-5}$ mm Hg
Pozorovanie obrazu	Obraz sa pozoruje zrakom cez okulár	Obraz je viditeľný po dopade elektrónov na fluoreskujúce tienidlo
Zaostrenie obrazu:	Pohyb objektívom pri súčasnom pozorovaní ostrosti	Zmenou intenzity na magnetickú šošovku (objektív) magnetizujúceho prúdu (čím sa mení ohnisková dĺžka za súčasného pozorovania obrazu na tienidle)
Rozlišovacia schopnosť:	Teoretická a praktická hranica je 200 nm	Teoretická hranica je 0,05 nm, praktická hranica pod 1 nm

2. Negatívne kontrastovanie – objekt ostáva svetlý na tmavom pozadí. Negatívne kontrastovanie sa používa hlavne v molekulárnej biológii, mikrobiológii, virológii a pod. Vďaka týmto postupom sa získavajú cenné informácie napr. o molekulárnej štruktúre izolovaných ribozómov, mitochondriách, plastidoch a pod. Medzi najviac používané negatívne farbivo patrí kyselina fosfowolfrámová (PTA), alebo molybdenan amónny (AM).

V súčasnosti sa používajú dva **základné typy elektrónových mikroskopov: transmisný a rastrovací (skenovací)**. Urýchlené elektróny, ktoré sa po rozptyle prežiarujú cez preparát, sú využívané pri tvorbe obrazu v transmisnom (prežiarovacom) elektrónovom mikroskope (TEM). Tento typ mikroskopu je vybavený optikou, ktorá pokrýva široký rozsah zväčšenia (4 500- až 500 000-krát). Takéto zväčšenie sa dosahuje zaradením viacerých šošoviek a zmenou ich ohniskovej vzdialenosti (tým sa mení aj zväčšenie). TEM sa používa na analýzu veľmi tenkých rezov tkanív, s hrúbkou asi 100 nm a to pri vysokom zväčšení a s veľkou rozlišovacou schopnosťou. V prípade sledovania biologických vzoriek sa dosahuje rozlišovacia schopnosť asi 0,3 – 0,25 nm. Biologické vzorky sú však málo kontrastné, keďže sú zložené z prvkov (C, O, H, N) s malou atómovou hmotnosťou a nedajú sa v elektrónovom mikroskope rozoznať. Preto je kontrast vzorky možné zvýšiť napr. pomocou zlúčenín ťažkých kovov (elektrónové farbivá), ktoré umožnia zvýšiť rozptyl primárnych elektrónov. Na farbenie preparátov sa zvyčajne využívajú ťažké kovové soli (zlúčeniny molybdénu, uránu alebo wolfrámu). Veľkosť preparátu je daná rozmerom kovových (väčšinou medených) sieťok s priemerom asi 3 mm s otvormi, na

ktoré sa vzorky nanášajú. Praktickým výstupom z TEM je digitálny záznam pozorovaného materiálu pomocou webkamier.



Obr. 1.11.4. Morfológické formy borélie (cysty, granuly, mechúriky), sú metabolicky neaktívne v dôsledku zlých životných podmienok (elektrónová mikroskopia, x 2500; autorka fotografie K. Schwarzová).

Podstatou tvorby obrazu v rastrovacom elektrónovom mikroskope (SEM) je jav, kedy elektróny, ktoré dopadajú na povrch preparátu uvoľňujú sekundárne elektróny, ktoré vyraďujú z povrchu preparátu. SEM sa svojou konštrukciou podobá

transmisnému elektrónovému mikroskopu. Zdrojom urýchlených elektrónov je dýza. Zväčšenie mikroskopu je založené na princípe, že sa zobrazuje malá plocha vzorky na veľkej ploche obrazovky (detekcia odrazených sekundárnych elektrónov z preparátu). Obraz získaný SEM sa vyznačuje veľkou hĺbkou ostrosti. SEM umožňuje pozorovať povrchové detaily buniek, ako aj ich ultraštruktúru. Rastrovacie elektrónové mikroskopy majú rozlišovaciu schopnosť asi 10-20 nm a vzorku môžu zväčšiť asi 20- až 50 000-krát. Vysušené biologické preparáty však nie sú vhodné na pozorovanie v SEM, keďže sú slabo vodivé a dochádzalo by k deformácii a strate ostrosti obrazu. Preto sa preparát pokrýva tenkou vrstvičkou vodivého materiálu (najčastejšie je to kov), čím sa zaistí ochrana preparátu pred tepelným poškodením a zvýši sa denzita preparátu. **Princípom imunosorbentnej elektrónovej mikroskopie (ISEM)** je selektívne zachytenie buniek mikroorganizmov na elektrónové mikroskopické sieťky, ktoré sú obalené špecifickou (monoklonálnou) protilátkou. ISEM je spoľahlivý, citlivý podobne ako ELISA test a výsledky získané touto mikroskopiou sa často dajú získať v priebehu jednej alebo dvoch hodín. Tento postup však vyžaduje elektrónový mikroskop a preto nie je vhodný na bežné rutinné testovanie.

Elektrónová mikroskopia vyžaduje špeciálnu a časovo náročnú prípravu vzorky (ultra tenké rezy, nanášanie na sieťky), preto sa v rutínnej klinickej bakteriologickej diagnostike v súčasnosti bežne nepoužíva.

LITERATÚRA

1. Bobák M., Horák J.: Elektrónová mikroskopia. Bratislava: UK, 1986, 99 s.
2. Držík M. a kol.: Moderná mikroskopia a digitálne spracovanie obrazu. 1. vyd. Bratislava: FMFI, 2008, 124 s.
3. Fišar Z.: Fluorescenční spektroskopie v neurovědách. 2003, 88 s. Publikované na internete: <http://www1.lf1.cuni.cz/~zfisar/fluorescence/Default.htm>

1.12 FARBENIA A PREPARAČNÉ TECHNIKY V KLINICKEJ MIKROBIOLÓGII

Schwarzová K.



Identifikácia a taxonomické rozdelenie mikroorganizmov sú v medicíne a biotechnológiách, ako aj pre základný výskum, kľúčové. Napriek metódam modernej molekulárnej identifikácie mikroorganizmov využívame v dnešnej dobe aj niektoré jednoduché morfológické a biochemické analýzy, pomocou ktorých vieme odlíšiť špecifické typy baktérií, niektoré ich faktory patogenity, ale aj jednobunkové eukaryotické organizmy.

Pre identifikáciu medicínsky významných baktérií v klinickej mikrobiológii sa používa mikroskopický preparát. Ako mikroskopický preparát označujeme dostatočne tenký objekt, ktorý je umiestnený na podložnom skle, spravidla prikrytý krycím sklom a je dobre pozorovateľný v mikroskope.

Základný prínos k farbeniu preparátov priniesli výskumy R. Kocha. Vyvinul množstvo postupov na kultiváciu baktérií, fixáciu mikroorganizmov anilínovými farbivami a fotografovanie mikroskopických preparátov. Ako prvý tiež zaviedol dezinfekciu. Svojimi objavmi významne prispel k rozvoju sérológie, imunológie a mikrobiologickej diagnostiky. Základný postup farbenia baktérií, používaný dodnes, opísal r. 1884 Ch. Z. Gram.

V mikrobiológii sa používajú dočasné (nefixované) a trvalé preparáty (tab. 1.12.1).

Tab. 1.12.1. Nefixované (dočasné) a fixované (trvalé) preparáty.

Nefixované preparáty	Fixované preparáty
Natívny preparát – morfológické znaky a pohyb	Gramovo farbenie – používa sa na rozlíšenie baktérií na grampozitívne, gramnegatívne a gramlabilné, určuje sa aj rad fyziologických a chemických vlastností
Visiaca kvapka – špecifikácia pohybu (aktívny, brownov – neusporiadaný chaotický)	Farbenie spór – spóry sú rezistentné voči fyzikálno-chemickým vplyvom, fixujú sa teplom a koncentrovanými farbivami
Vitálny preparát – sleduje sa tvar buniek, zoskupenie, používajú sa netoxické neriedené farbivá 1:1, rozpustné vo vode, napr. neutrálna červená, metylénová modrá, Janusová zelená	Acidorezistentné farbenie – používa sa hlavne na farbenie mykobaktérií
Skličkový preparát – využíva sa na pozorovanie rastu a rozmnožovania buniek	Farbenie púzdiar
Negatívne sfarbený preparát – pozoruje sa nezafarbená bunka alebo jej časti (bakteriálny sliz, puzdrá) v kontraste s farebným prostredím (tuš, kongo červená)	Farbenie podľa Burriho, farbenie kongočervenou, štandardné farbenie – hematoxylín a eozín, Giemsovo farbenie

1.12.1 Dočasné preparáty

Zhotovujú sa v pomerne krátkom čase, preskúmajú sa, opíšu a potom sa zrušia. Vhodným prostredím, do ktorého je sledovaný objekt vkladáný, je najmä voda, glycerol, roztok farbív. Pokiaľ je dočasný preparát pripravený náterom tekutej vzorky na podložné sklo, označuje sa ako **rozterový**. Rozmačkaním skúmaného objektu sa pripravuje **roztlakový preparát**, pričom rozter býva do stratená a podložné sklo musí byť starostlivo

odmastené (v etanole). Ako rozterové sklo možno použiť podložné alebo krycie sklíčko.

1.12.2 Trvalé preparáty

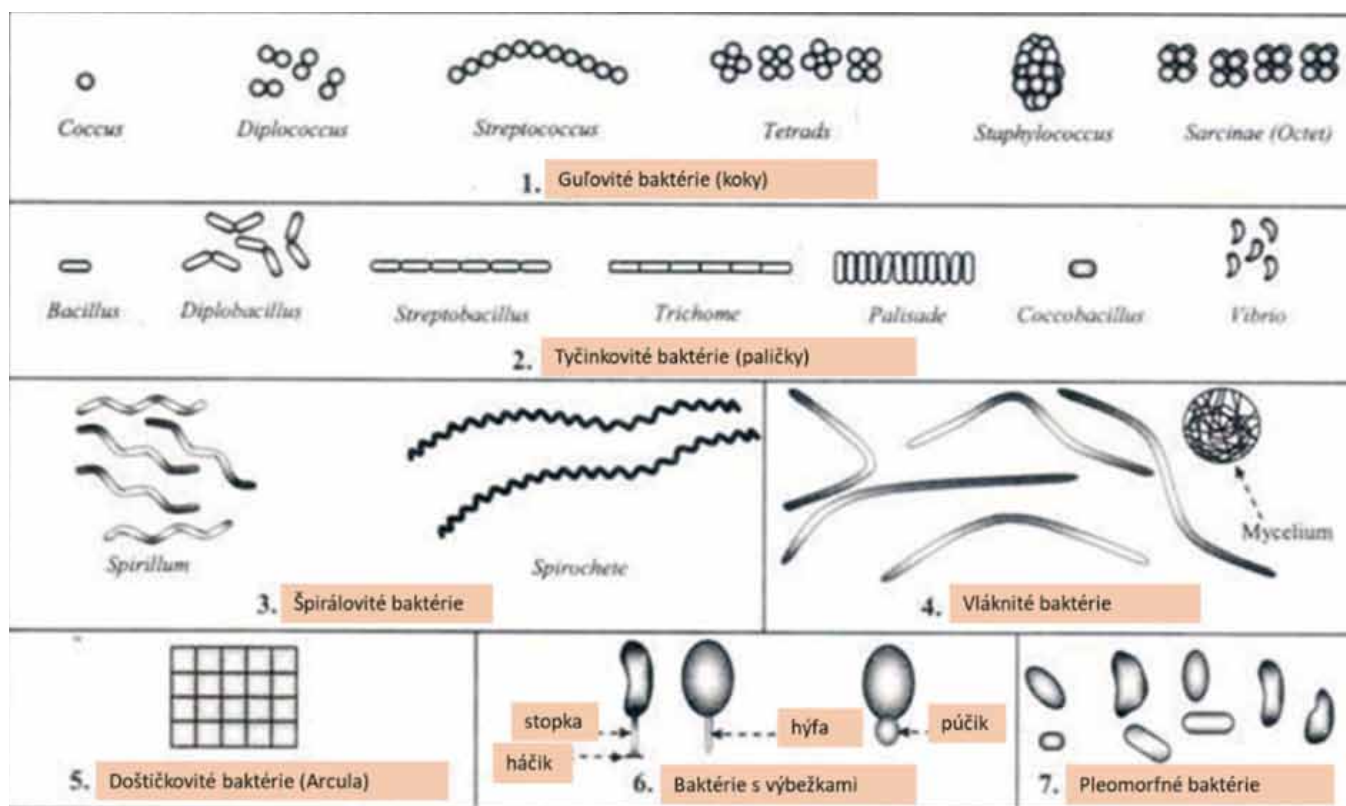
Pripravujú sa tak, aby ich bolo možné opakovane používať aj niekoľko rokov a môžu sa tiež archivovať. Obsahujú biologický materiál, ktorý je vhodným spôsobom fixovaný (plameňom, etanolom, formaldehydom), farbený (napr. metylénovou modrou, metylénovou zelenou, eozínom) a sú uzavreté do vhodného prostredia (napr. do kanadského balzamu). Krycie sklíčko je na trvalom preparáte pripevnené k podložnému sklu špeciálnym tmelom. Preparát musí byť opísaný. Celý proces zhotovenia trvalého preparátu často zahŕňa systém postupov (napr. postupné odvodňovanie, parafínovanie, zavodňovanie), často sa trvalý preparát zhotovuje aj niekoľko dní.

1.12.3 Výber a príprava mikroskopického preparátu

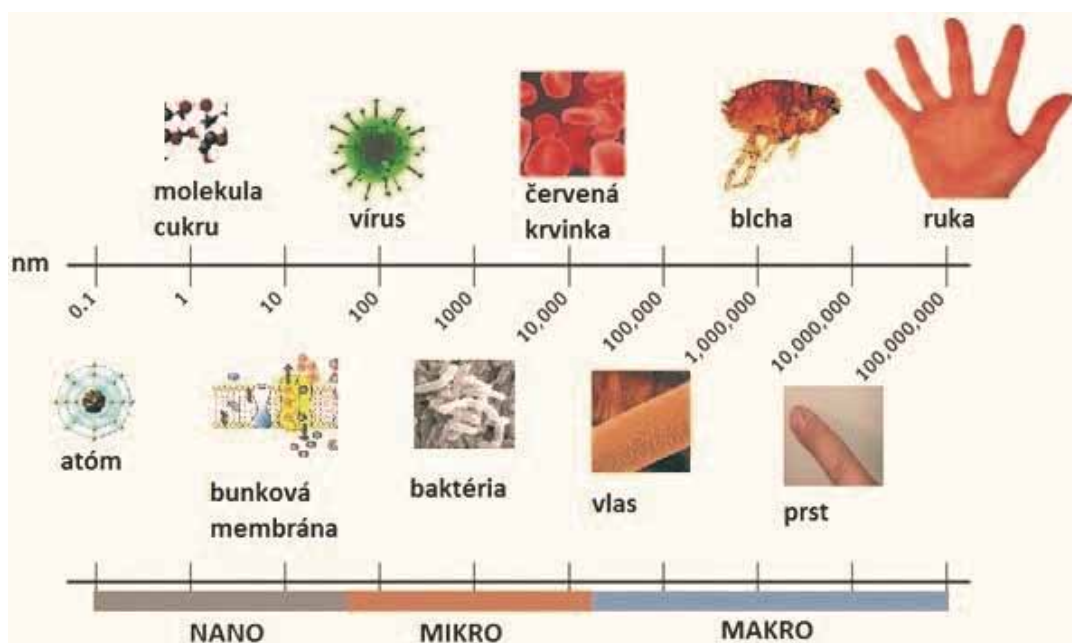
Mikroskopický preparát sa pripravuje podľa toho, či ide o biologický materiál izolovaný od pacienta, alebo o pripravenú čistú kultúru, ale záleží aj na tom, aké vlastnosti mikroorganizmu chceme zistiť. Preparát priamo zo vzorky poskytuje informácie aj o kvantite mikroskopických elementov, umiestnení baktérií (extracelulárne, alebo intracelulárne), prítomnosti bunkových elementov (epiteliálne bunky, leukocyty), umožňuje posúdiť kvalitu vzorky na bakteriologické vyšetrenie, či bol dodržaný správny odber, alebo nedošlo ku kontaminácii vzorky pri odbere (napr. spútum, moč, výter z rany) a zápalovú aktivitu (zistenie prítomnosti, typu a množstva leukocytov). Mikroskopické pozorovanie mikroorganizmov umožňuje pozorovať tvar a veľkosť buniek, usporiadanie buniek, prítomnosť, sledovať tvar, veľkosť a umiestnenie spór, pohyblivosť baktérií (v natívnom preparáte), zistiť príslušnosť baktérii podľa Grama, počet mikroorganizmov (semikvantitatívne počítanie buniek + až ++++), preparát informuje aj o acidorezistencii, prítomnosti púzdra a i. (obr. 1.12.1, 1.12.2).

1.12.4 Natívny preparát

Pomocou neho môžeme pozorovať pohyb a delenie mikroorganizmov, ktoré si v procese spracovania zachovávajú svoju virulenciu. V bakteriologickej diagnostike sa využíva v menšej miere, väčší diagnostický význam majú v parazitológii. Natívny preparát možno pozorovať v prechádzajúcom svetle, v tmavom poli alebo pod fázovým kontrastom. Preparáty so živými mikroorganizmami slúžia na pozorovanie pohybu mikroorganizmov, meranie veľkosti buniek, na sledovanie spór anaeróbných baktérií, klíčenie výtrusov húb, pučanie kvasiniek, pozorovanie aktinomycét alebo pri sledovaní obsahu buniek. Aktívny pohyb môžeme napríklad sledovať u *Escherichia coli*, ktorá využíva bičík ako orgán aktívneho pohybu. Príkladom nepohyblivého mikroorganizmu je kvasinka *Candida albicans*, ktorá nemá bičík ako orgán pohybu a v mikroskope môžeme pozorovať len pasívny pohyb mikroorganizmov (kvasinky sú unášané pôsobením fyzikálnych faktorov). Preparáty sa pripravujú v kvapke sterilnej vody, prípadne iného fyziologického roztoku. Pre dlhšie a súvislejšie pozorovanie niektorých vlastností mikroorganizmov sú vhodné vlhké komôrky.



Obr. 1.12.1. Tvar a usporiadanie mikroorganizmov (upravené podľa: <https://microbiologyinfo.com>).



Obr. 1.12.2. Veľkosť mikroorganizmov v porovnaní s makroobjektami (upravené podľa Tkáčová a Lavický, 2014).

V praxi sa často stretávame s potrebou **stanovenia koncentrácie buniek** (počet buniek na danú objemovú jednotku, väčšinou na 1 ml suspenzie). Jedným zo základných sledovaných parametrov je stanovenie ich životaschopnosti (viability), t.j. určenie pomeru živých a mŕtvych buniek v populácii. Testovanie životaschopnosti je nevyhnutné pri určovaní cytotoxického účinku niektorých látok, pri práci s bunkovými kultúrami, ale

napr.aj v kryobiológii (testovanie účinku nízkych teplôt na živé organizmy, orgány a bunky).

Pre stanovenie počtu buniek mikroorganizmov pozorovaním v mikroskope sa používajú rôzne **typy počítacích komôrok** – tzv. Bürkerova alebo Thomova. Pre analýzu s využitím tmavého poľa sa využíva Petroff – Hauserova počítacia komôrka (napr. na počítanie buniek borélií). Princíp metódy spočíva

v priamom počítaní buniek v mikroskopickom preparáte, preto sa označuje aj ako metóda mikroskopická. Vďaka tejto metóde sa určí počet živých aj mŕtvych buniek v suspenzii, po zafarbení 0,01 % metylénovou modrou sa rozlíšia živé bunky (biele) od mŕtvych buniek (modré). Počítacia komôrka je špeciálne upravené podložné sklíčko s dvoma počítacími ploškami, ktoré sú oddelené zárezom. Počítacia ploška komôrky je tvorená 9 veľkými štvorcami (každý o ploche 1 mm²), ktoré sú rozdelené do 16 menších štvorcov (s plochou 0,04 mm²). V každej počítacej ploške je mikromriežka s presne definovaným rozmerom a na jej dne sú vyznačené rôzne veľké štvorce. Pod mikroskopom možno počítať, koľko buniek je v každom štvorci a podľa rozmerov štvorcov a hĺbky komôrky možno prepočítať počet buniek na ich celkovú koncentráciu. V mikrobiológii sa často stretávame s jednotkou CFU (z anglického colony-forming unit), ktorá sa používa pri vyjadrení počtu mikroorganizmov vo vzorke, v jednotkách CFU/ml, alebo CFU/g.

1.12.5 Fixácia preparátu

V mikrobiológii sa častejšie využívajú farbené preparáty, na koľko pomocou nich možno pozorovať nielen tvar, veľkosť a usporiadanie buniek, ale vďaka špeciálnym farbivám aj puzdrá, bičiky, metachromatické zrná, prípadne iné štruktúry, spóry a pod. Poznáme niekoľko typov mikroskopických preparátov: krvný náter, preparát s epiteliálnymi bunkami, bioprickým materiálom, zoškraby, výtery, odtlačkové preparáty (tkanivo sa pritlačí o podložné sklíčko a pozorujú sa bunky, napr. tumorového tkaniva na cytológii) atď. Tkanivá sa po vyrezaní ukladajú vo formalíne, aby sa predišlo rozkladu buniek a pred samotnou prácou sa odvodnia pomocou etanolu. Vysušené tkanivo sa vloží do čistiackej látky a nakoniec sa zaleje do parafínu. Musí byť dostatočne tuhé, aby ho bolo možné krájať na prístroji zvanom mikrotóm. Vzniknuté plátky sú priehľadné a hrubé 4 až 10 µm, čo predstavuje približne jednu vrstvu buniek.

Príprava trvalého preparátu sa zakladá na fixácii a následnom zafarbení preparátu (buniek). Fixácia, ktorá zastaví životné funkcie v bunkách, môže byť fyzikálna a chemická. Predovšetkým pri náteroch a odtlačkoch sa používa **fyzikálna fixácia**, kedy sa preparát suší pri laboratórnej teplote, alebo zahrieva nad kahanom. Pri **chemickej fixácii** sa uplatňujú predovšetkým tekuté fixatíva, napr. metanol, etanol, formaldehyd, metylalkohol, alebo zmes etylalkoholu s éterom. Preparát sa pripravuje tak, že sa na podložnom sklíčku najprv nechá zaschnúť kvapka vyšetrovanej kultúry. Preparát sa potom opakovane fixuje plameňom, alebo sa prelieva metylalkoholom, prípadne zmesou etylalkoholu s éterom (punktáty, hnis, krv, atď.). Po fixácii sa preparát zafarbí, pričom sa využíva afinita mikroorganizmov k jednotlivým farbivám. Využívajú sa neutrálne farbivá, ktorých zásaditá zložka farbí jadrá a kyslá zložka plazmu. Môže sa použiť jedno farbivo (farbenie orientačné – monochromatické), alebo dve a viac rôznych farbív (farbenie diagnostické – polychromatické). Kyslé farbivá baktérie nefarbia, ale používajú sa na kontrastné dofarbovanie pozadia. Fixovaný a farbený preparát sa pozoruje v priamom prechádzajúcom svetle pomocou imerzie (imerzný olej).

1.12.6 Farbenie preparátov

Výhodou farbeného preparátu je, že je stabilný, inaktivuje väčšinu baktérií, zlepšuje ich farbitelnosť a môže sa použiť aj pri hodnotení schopnosti mikroorganizmov prijímať farbivo a odfarbovať sa (tinkčné vlastnosti). Význam farbených preparátov je v niektorých diagnostických otázkach zásadný, napr. pri diagnostike chlamýdií (psitakóza, ornitóza), kedy pre vyslovenie diagnózy postačuje dôkaz inklúzií v bunkách. Farby používané pri svetelnej mikroskopii sú organické. Väčšina z nich bola objavená v polovici 18. storočia v odevnom priemysle a pomáhali tak pri rozvoji zlatého veku mikroskopie anatómie v období rokov 1860 – 1900. Princíp farbenia je spoločný, jed-

notlivé štruktúry v bunke sa líšia svojím pH. Jeho hodnotu určujú makromolekuly, ktoré ich tvoria, najčastejšie bielkoviny. Pri spracovaní vzorky sa farbivá viažu na makromolekuly opačnej polarizácie. Táto elektrická príťažlivosť je základom farbiacej schopnosti. Pretože každá časť buniek aj tkanív vycitáva iné farby, dajú sa takto odlíšiť rôzne anatomické štruktúry (tab. 1.12.2). Podľa svojej afinity ku kyslému alebo zásaditému prostrediu sa farbivá rozdeľujú na **acidofilné**, napr. eozín, kongo červené a **bázické**, napr. metylénová modrá, genciánová violet, safranín atď. Používajú sa aj neutrálne farbivá, napr. azúrová -eozín.

Farbenia, ktoré sa používajú v mikrobiológii sú:

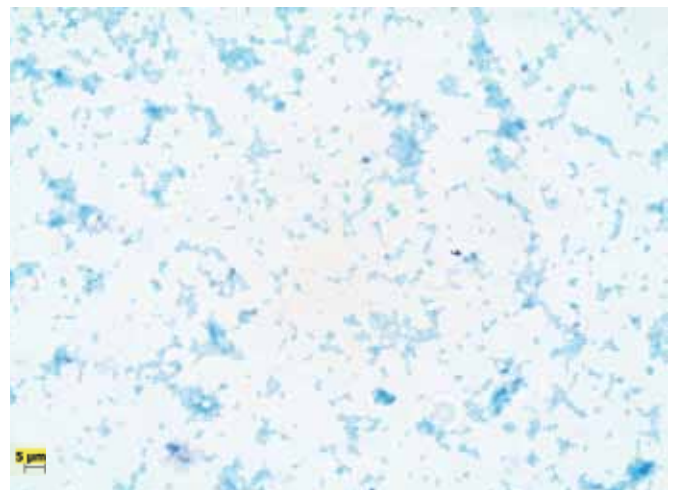
1. **Monochromatické, orientačné farbenie**, kedy sa používa jeden druh farbiva, vďaka ktorému možno znázorniť morfológické znaky mikroorganizmov.
2. Pri **diagnostickom farbení** sa mikroorganizmy farbja zmesou roztokov, pomocou ktorých možno rozpoznať niektoré diagnosticky významné vlastnosti mikroorganizmov. Farbenia ako napr. Gramovo, acidorezistentné farbenie karbolfuchsinom, farbenie podľa Giemsa napomáhajú baktérie identifikovať.
3. Pri **negatívnom farbení** sa bunky nefarbujú ani nefarbja, farbí sa však ich okolie, napr. tušom, alebo nigrosinom (modročierne farbivo). Tento postup sa využíva aj na presné meranie veľkosti buniek, ktoré nie sú deformované fixáciou a farbením.

Tab. 1.12.2. Možnosti farbenia preparátov.

Orientačné farbenie	Negatívne farbenie	Vitálne farbenie	Diferenciačné farbenie	Diagnostické farbenie
pozorovanie tvaru a veľkosti		rozlíšenie živých a mŕtvych buniek	vonkajšie štruktúry (spóry, membrány), zlúčeniny vo vnútri bunky	identifikácia
používa sa 1 farbička	zafarbí iba pozadie, používa sa tuš	zafarbí iba mŕtve bunky	farbenia podľa: Albertsa, Gomoriho, Papanicolaouova	farbenia podľa: Grama, Ziehl-Neelsena, Giemsa, Burriho

1.12.6.1 ORIENTAČNÉ FARBIENIE/MONCHROMATICKÉ

Jedná sa o metódu na rýchle a jednoduché určenie veľkosti, tvaru, počtu a usporiadania buniek baktérií (obr. 1.12.3).



Obr. 1.12.3. Monochromatické farbenie *S. pyogenes* (foto Marek Straka).

Na zafarbenie zafixovaných baktérií sa aplikuje len jedno farbivo (metylénová modrá, kryštálová violet, fuksín, zriedený karbolfuchsín), preto ho označujeme aj ako farbenie monochromatické. Tieto farbivá sa zhotovujú či už čerstvo pripravené vodné roztoky na priame použitie, alebo vo forme alkoholického zásobného roztoku, ktorý je potrebné riediť vodou pred každým použitím. Výsledná farba baktérií závisí od typu použitého farbiva. Skvalitniť výsledky možno použitím alkalického metylénovej modrej, ktorá zvýrazní polárne farbenie bakteriálnych buniek. Využíva sa najmä na dôkaz klostridií, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* a *Escherichia coli* a pod.

1.12.6.2 NEGATÍVNE FARBenIE

Možno pozorovať tvar a veľkosť buniek, prípadne vonkajšie povrchové štruktúry – puzdrá. Samotné bunky sa zafarbujú monochromaticky, puzdrá ostávajú nezafarbené. Bližšie pozri kap. 1.12.6.3 (farbenie podľa Burriho).

Test vitality

Ak potrebujeme zistiť okamžitý stav populácie sledovaných buniek (rozlíšiť a spočítať živé a odumreté bunky), využívame metódu priameho počítania buniek farbením natívneho preparátu. K farbeniu sa využívajú netoxické farbivá. Test je založený na priepustnosti membrány odumretých buniek voči roztoku metylénovej modrej. Živé bunky sa prieniku farbiva „bránia“ svojimi kanálkami v membráne a neprepúšťajú ich, prípadne sa ich snažia odbúrať. Pri živých bunkách sa roztok odčerpáva bunkovým membránovým systémom a nepreniká dovnútra bunky. Bunky majú sfarbenú len bunkovú stenu a vo svetelnom mikroskope sa javia ako svetlomodré krúžky s výrazným okrajom. Mŕtve bunky majú naopak narušený membránový systém, roztok preniká do bunkového obsahu a spôsobuje jeho tmavomodré sfarbenie. Takto možno sledovať napr. pôsobenie zvýšenej teploty na prežívanie buniek a vitálnym testom sledovať úbytok živých buniek v určitých časových intervaloch. Výhodou je rýchlosť, nízka spotreba materiálu a možnosť rozlíšenia pomeru živých a odumretých buniek. V praxi má test vitality značný význam pri kontrole životaschopnosti mikroorganizmov.

1.12.6.3 DIAGNOSTICKÉ FARBenIE

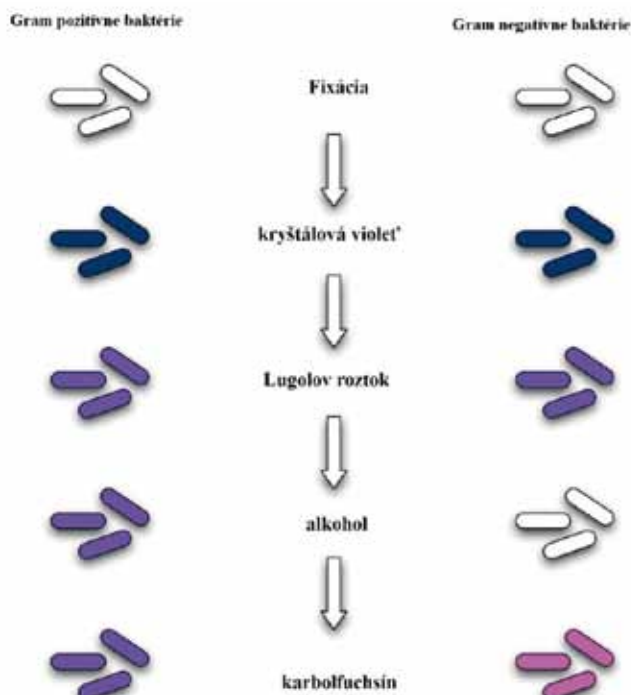
Farbenie umožňuje rozpoznať niektoré diagnosticky významné vlastnosti, napr. grampozitivita, acidorezistencia, prítomnosť puzdier alebo spór, atď. Základným diagnostickým farbením je farbenie podľa Grama.

Farbenie podľa Grama

Zaviedol ho r. 1884 Dán Ch. Gram. Gramovo farbenie patrí medzi základné diagnostické farbenia v klinickej mikrobiológii (obr. 1.12.4). Farbiteľnosť podľa Grama súvisí aj s ďalšími bakteriálnymi vlastnosťami, napr. so zložením bakteriálnej steny, s citlivosťou na antibiotiká a je aj dôležitým taxonomickým kritériom. Rozdelenie je založené na chemických a fyzikálnych vlastnostiach bunkovej steny baktérií. Bunkové steny grampozitívnych (G+) baktérií majú oveľa hrubšiu vrstvu peptidoglykán ako bunkové steny gramnegatívnych (G-) baktérií. G- bunky majú vo vonkajšej bunkovej stene aj množstvo lipidov. Pri farbení sa používajú slabo alkalické roztoky bázičických farív (kryštalická violet, metylénová modrá, genciánová violet).

Princíp metódy je v tom, že farbivo tvorí v baktériách komplex s jódom. Pôsobením organického rozpúšťadla gramnegatívne baktérie tento komplex strácajú a odfarbujú sa (ružovočervené). Podstata rozlíšenia grampozitívnych a gramnegatívnych mikroorganizmov spočíva v rýchlosti odfarbovania baktérií. Grampozitívne baktérie si komplex farbiva a jódu zachovávajú v cytoplazme a aj po tomto postupe zostávajú sfarbené do modrofialova. Dôvodom tohto javu je odlišná stavba bunkovej steny baktérií. Gramnegatívne baktérie (napr. *Neisseria*, *Haemophilus influenzae*, *Bordetella pertussis*, *Legionella*, *Brucella*, *Vibrio*, *Klebsiella*, *E. coli*) majú v bunkovej stene viac

lipidov, ktoré sa rozpúšťajú v nepolárnom rozpúšťadle (acetón, etanol), čím sa komplex farbiva a jódu z buniek vyplaví. Grampozitívne baktérie (napr. *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Corynebacterium*, *Clostridium*, *Listeria*, *Bacillus*) majú v bunkovej stene podstatne viac peptidoglykánov a tvoria aj pomerne hrubšiu vrstvu. Polysacharidy bunkovej steny sú v prítomnosti alkoholu ťažšie priepustné a komplex farbiva a jódu sa z bunky nemôže vyplaviť. Väzba farbiva sa stabilizuje morením alkalickým Lugolovým roztokom. Nakoniec sa preparát dofarbuje komplemetárnym (červeným) kontrastným farbivom karbolfuchsínom (alebo safranínom).



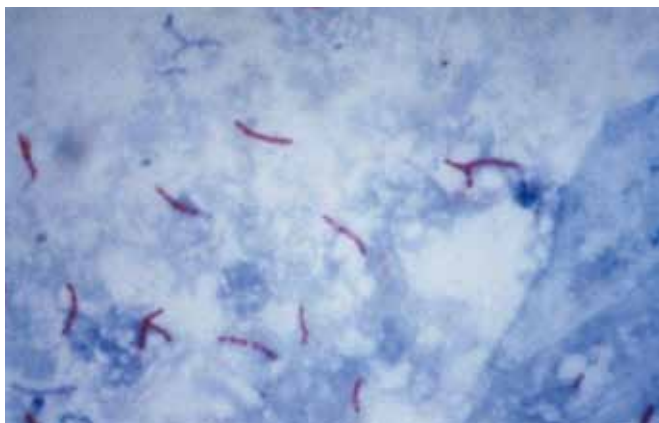
Obr. 1.12.4. Gramovo farbenie (schéma podľa www.bio.miami.edu upravila K. Schwarzová).

Niektoré baktérie sa môžu po dlhodobej kultivácii, niekoľkonásobnom pasážovaní buniek (vek kultúry), alebo po aplikácii antibiotickej terapie zameranej na bunkovú stenu (L - formy) zmeniť z G+ na G-. Počas rastu sa v bunkách *Bacillus*, *Clostridium* znižuje hrúbka peptidoglykán a baktérie sa stávajú gramnegatívne. Gramovo farbenie je takmer vždy prvým krokom k predbežnej identifikácii bakteriálnej bunky a cenným diagnostickým nástrojom v klinickej a výskumnej oblasti. Nie všetky baktérie však môžu byť touto technikou definitívne systematicky identifikované. Jedná sa o gramvariabilné (ružové a purpurové bunky) a gramneurčité baktérie. Gramneurčité baktérie nereagujú na Gramovo farbenie a preto sa nemôžu určiť ako grampozitívne alebo gramnegatívne. Patrí sem mnoho druhov rodu *Mycobacterium*, vrátane *M. tuberculosis* a *M. leprae*. Tieto baktérie majú v bunkovej stene veľa mastných kyselín a voskov a preto sa podľa Grama nefarbujú. V prípade tohoto rodu sa používa farbenie baktérií podľa Ziehl-Neelsena.

Farbenie acidorezistentných baktérií podľa Ziehl-Neelsena

Tento postup patrí medzi najrozšírenejšie diagnostické farbivacie metódy. Metódu objavili a opísali bakteriológ F. Ziehl a patológ F. Neelsen. Je druhou najrozšírenejšou metódou diagnostického farbenia a týmto procesom sa farbujú acidorezistentné mikroorganizmy (napr. mykobaktérie, nocardie, korynebakterie).

térie, aktinomycéty, bakteriálne spóry a askospóry niektorých kvasiniek aj vývojové štádiá niektorých prvokov – *Cryptosporidium*, *Isospora*, *Coccidia*) (obr. 1.12.5).

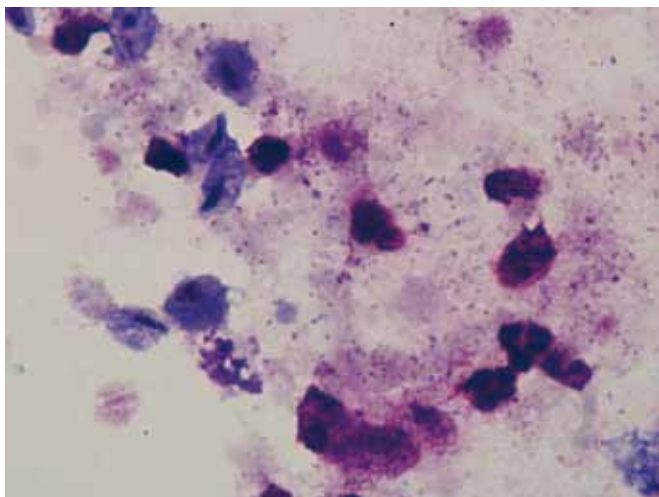


Obr. 1.12.5. Bunky *Mycobacterium tuberculosis* farbené podľa Ziehl-Neelsena. Zdroj: https://en.wikipedia.org/wiki/Ziehl-Neelsen_stain#/media/File:Mycobacterium_tuberculosis_Ziehl-Neelsen_stain_02.jpg.

Jedná sa o jednu z najpoužívanějších metód diagnostiky tuberkulózy (Kochov bacil, *Mycobacterium tuberculosis*). Podstatou acidorezistencie je prítomnosť voskov s veľmi dlhými tzv. mykolovými kyselinami v bunkovej stene príslušných baktérií. Acidorezistentné baktérie charakterizuje mimoriadna odolnosť voči chemickým vplyvom prostredia (kyseliny, lúhy, detergenty). Na rozdiel od ostatných baktérií sa farbja len za tepla a pomocou koncentrovaných farbív. Bunková stena acidorezistentných baktérií se neodfarbuje kyslým alkoholom (96% alkohol s 3% HCl). Pred hodnotením preparátu sa odfarbené mikroorganizmy dofarbia kontrastným farbivom (metylénová modrá alebo malachitová zeleň).

Giemsovo farbenie

Metódu vyvinul nemecký chemik G. Giemsa. Farbenie je založené na absorpcii farbiva organickými štruktúrami, najčastejšie sa používa pre farbenie krvného náteru, fixovaného vaginálneho steru (MOP) (obr. 1.12.6).



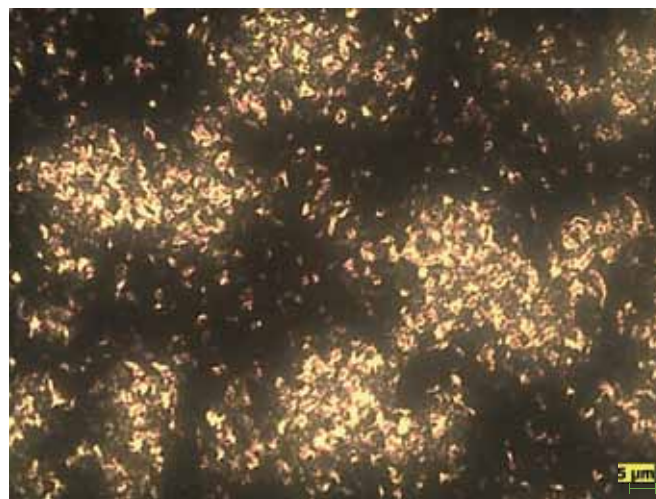
Obr. 1.12.6. Giemsovo farbenie preparátu MOP V (foto M. Záborská).

Používa sa v protozoológii pri cytologických preparátoch na znázornenie prvokov, na farbenie chlamýdií, mykoplazmiem, spirochét, ricketsií, parazitov, intracelulárnych inklúzií, organel

a bunkových štruktúr v ofarbenom krvnom nátere, v tkanivách a v odtlačkových preparátoch. Rýchlou modifikáciou sa dobre znázorňujú intracelulárne baktérie a ricketisie, pomalá metóda je výhodnejšia pri farbení spirochét, leptospír a chlamýdií. Po ofarbení Giemsovým farbivom sa cytoplazma leukocytov a epitelii farbja modrofialovo, erytrocyty sú ružové a baktérie modrofialové. Jadrá buniek sa farbja červenofialovo. V modrofialovej cytoplazme buniek sa pozorujú kontrastne sfarbené zhluky baktérií.

Farbenie podľa Burriho

Metódu vyvinul švajčiarsky bakteriológ R. Burri a slúži na negatívne znázornenie bakteriálnych puzdier (obr. 1.12.7). Puzdrá (kapsuly) sú vonkajšie ochranné vrstvy niektorých baktérií, uplatňujú sa aj ako faktory virulencie (napr. u klinicky významných baktérií: *Bacillus anthracis*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Salmonella typhi*, *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli*) a húb (*Cryptococcus neoformans*, *C. gattii*), sú tvorené predovšetkým z polysacharidov a proteínov, neprijímajú bežné farbivá a pri farbení buniek mikroorganizmov sa nefarbja. Negatívne znázornenie je najčastejšie používanou jednoduchou a rýchlou metódou, ktorou možno dokázať puzdrá. Pri Burriho metóde sa bakteriálna suspenzia, pripravená vo vode (nie vo fyziologickom roztoku!) zmieša s malým množstvom tušu a zhotoví sa z nej náter na podložnom sklíčku. Pozadie tenkého náteru tým získa tmavú farbu. Ak sa potom bakteriálne bunky monochromaticky dofarbia, puzdrá vystúpia na tmavom pozadí ako svetlé nezafarbené dvorce okolo kontrastne sfarbených buniek baktérií. Puzdrá sa takto dajú odlíšiť od bubliniek a artefaktov.



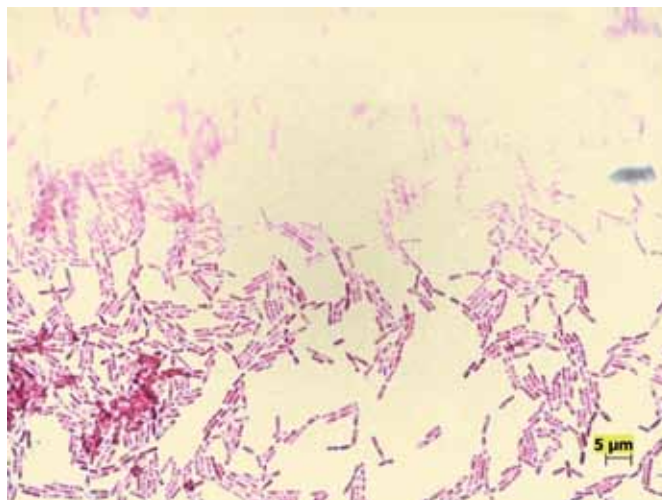
Obr. 1.12.7. Puzdrá *K. pneumoniae* (farbenie podľa Burriho; foto M. Straka).

Farbenie bakteriálnych spór podľa Wirtz-Conklinovej

Synonymum je diagnostické farbenie podľa Schaefferovej a Fultona z r. 1930, ktorí modifikovali metódu bakteriológov R. Wirtza a M.E. Conklinovej (okolo r. 1900), obr. 1.12.8.

Spóry sú kľudové formy baktérií, mimoriadne rezistentné voči fyzikálno-chemickým vplyvom prostredia, s minimálnym metabolizmom. Tvorja sa v nepriaznivých podmienkach buniek a ak sa podmienky zmenia, vyklíčia ako nové vegetatívne bunky. Pri bežnom farbení sa nefarbja a prijímajú farbivo len pri farbení koncentrovanými farbivami a za tepla (napr. 5% malachitová zeleň). Pokiaľ sa zafarbja, dobre odolávajú bežným odfarbovacím metódam a zachovávajú si farbivo. Pred pozorovaním sa v preparáte musia odfarbené vegetatívne bunky baktérií dofarbiť kontrastnou farbou (napr. zriedený karbolfuksín). Pri hodnotení preparátu vidíme intra- aj extracelulárne sa nachádzajúce spóry (napr. *Bacillus cereus*), zafarbené na zeleno.

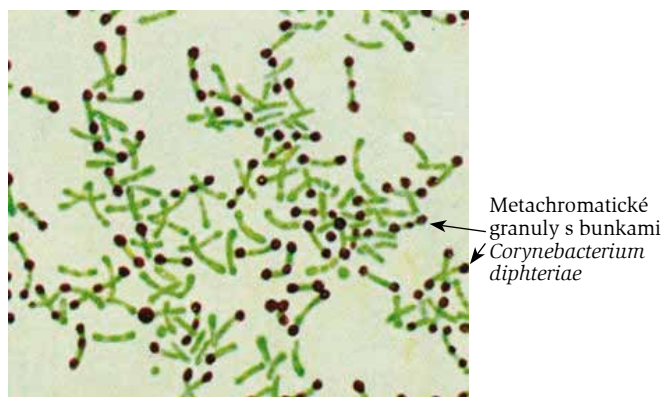
Bunky baktérií sa farbja na ružovo, môžu obsahovať centrálnu uloženú spóru, ktorá nedeformuje bunku baktérie. Uloženie spór a morfológia sporulujúcich baktérií je pri jednotlivých rodoch a druhoch charakteristicky odlišné (napr. *Clostridium* spp., *Bacillus* spp.).



Obr. 1.12.8. Endospóry *Bacillus cereus* (autor fotografie M. Straka).

Dôkaz metachromatických granúl

Albertsova metóda (napr. u *Corynebacterium diphtheriae*; obr. 1.12.9). Zásobné látky (volutínové, metachromatické granuly) majú okrem významu v metabolizme baktérií aj diagnostický význam. Na dôkaz týchto metachromatických granúl, nazývaných aj Ernst-Babesové granuly sa používa farbenie podľa Alberta, alebo podľa Neissera. Tieto granuly sa v minulosti pokladali za typické pre pôvodcu záškrtu, ale nachádzajú sa aj u iných korynebaktérií. Nález pôvodcu záškrtu nie je častý, preto sa toto farbenie používa len zriedka. Výsledkom farbenia je, že farba granúl je sýtomodrá, telá baktérií sú sfarbené na zeleno.

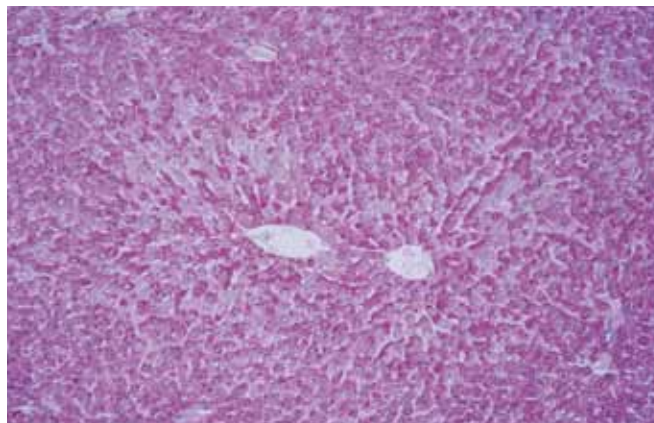


Obr. 1.12.9. Farbenie *Corynebacterium diphtheriae* podľa Alberta (zdroj: <http://www.nios.ac.in/media/documents/dmlt/Microbiology/Lesson-19.pdf>).

PAS

PAS (Periodic acid Schiff) farbenie je základnou metodikou na dôkaz polysacharidov. Používa sa aj ako jedna z farbiacich metód pri tvorbe histologických preparátov (obr. 1.12.10.) a môže sa použiť aj na dôkaz onychomýkóz. PAS farbí glykogén a mukoproteíny v bunkovej stene húb. Výsledkom sú purpurovo červené substancie (glykogén, neutrálne mukopolysacharidy a mukoproteíny), na modro sa dofarbia jadrá buniek.

Obr. 1.12.10. Farbenie pečene na dôkaz glykogénu (PAS, 200x, foto P. Janega).



LITERATÚRA

1. Böhmer D., Danišovič L., Repiská V.: Lekárska biológia a genetika 1. Bratislava: Asklepios, 1. vyd. 2011, 97 s.
2. Neuhaus B., Schmid T., Riedel J.: Collection management and study of microscope slides: Storage, profiling, deterioration, restoration procedures, and general recommendations. Zootaxa, 2017, 4322 (1): 1-173.
3. Zahradnický J. a kol.: Mikrobiologické vyšetrovacie metódy. Martin: Osveta, 1981, 704 s.
4. Tkáčová Z., Lavický T.: Základy nanovedy a nanotechnológií pre učiteľov. Metodicko-pedagogické centrum, Bratislava, 2014, 58 s.



Kultivácia baktérií je priamou metódou mikrobiologickej diagnostiky, ktorá sa najčastejšie používa na záchyt a rozmnoženie baktérií, taktiež kvasiniek a mikroskopických vláknitých húb. Spomínané mikroorganizmy sa kultivujú na kultivačných pôdach. Na izoláciu vírusov a obligátne intracelulárnych baktérií ako napr. *Chlamydia* spp., *Rickettsia* spp., ktoré sa izolujú zriedkavejšie, sa používajú hlavne bunkové kultúry, menej často kuracie embryá a ojedinele laboratórne zvieratá. Bakteriálne druhy ako *Mycobacterium leprae* a *Treponema pallidum* sa nedajú vykultivovať na kultivačných pôdach.

1.13.1 Kultivácia vírusov

V rámci virologickej diagnostiky je **kultivácia vírusov zlatým štandardom**, voči ktorému sú porovnávané všetky ostatné diagnostické metódy, vrátane moderných molekulárno-biologických. Je však materiálovo, personálne a časovo náročná, jej

výsledky väčšinou nie je k dispozícii v reálnom čase tak, aby pomohli v klinickej diagnostike a liečbe konkrétneho pacienta, zároveň je málo možností ju automatizovať. Preto boli v laboratóriách klinickej mikrobiológie kultivačné postupy vo virológii vytlačené inými, rýchlejšími metódami. Kultivácia vírusov a ich následná identifikácia sa zväčša vykonáva v národných referenčných centrách a na špecializovaných výskumných pracoviskách. Na izoláciu, identifikáciu, rozmnoženie, kvantifikáciu vírusov, ale aj na sledovanie exprese vírusových génov, získavanie vírusových proteínov, sledovanie ovplyvnenia signálnych dráh v bunke vírusmi a účinkov antivirotických látok sa naďalej používajú **bunkové kultúry**. Tie sa pripravujú zo zvieracích alebo ľudských tkanív a orgánov. Delia sa na:

- **primokultúry** (bunky z embryí alebo orgánov zdravých jedincov, napr. kuracie alebo morčacie embryonálne bunky umožňujú len 1 – 2 pasáže vírusu),

Živý systém	Prejavy replikácie vírusu	Diagnostické metódy identifikácie vírusu
Bunkové kultúry	1. CPE ako napr: - strata adherencie buniek k podkladu - inklúzie - syncýty - vakuolizácia cytoplazmy - zaguľatenie buniek - lýza buniek 2. fenomén interferencie 3. hemadsorbcia 4. hemaglutinácia	- HIT (inhibícia aglutinácie erytrocytov vírusom) - VNT (potlačenie cytopatického efektu vírusu, neutralizácia vírusu, bez prítomnosti plakov v bunkovej kultúre) - ELISA - imunofluorescencia - elektrónová mikroskopia - histologické farbenie infikovaných buniek
Kuracie embryó	1. CPE prejavujúci sa uzlíkovitými léziami na chorioalantoickej membráne 2. zakrpatenie embrya 3. odumretie zárodka 4. hemaglutinácia	- hemaglutinačno-inhibičný test (HIT) - vírus neutralizačný test (VNT)
Laboratórne zvieratá	špecifické prejavy vírusovej infekcie: - obrny zvierat - malformácie orgánov/fétusov - úhyn zvierat alebo embryí	

Obr. 1.13.1. Kultivácia vírusov.

- **diploidné bunkové línie** (diploidné bunky získané z primokultúr, ktoré sa dokázali dobre adaptovať na *in vitro* kultiváciu, napr. ľudské diploidné bunky z embryonálnych pľúc – LEP),
- **stabilizované heteroploidné bunkové línie** (transformované bunky zo zdravého alebo nádorového tkaniva s atypickým počtom chromozómov, napr. HeLa, VERO, BHK-21).

Častejšie ako primárne bunky sa používajú generácie čistých laboratórnych línií diploidných buniek, ktoré možno pasážovať dostatočne dlhú dobu, a to až 50 pasáží. Bunkové kultúry sa pripravujú enzymatickou (natrávenie trypsínom, kolagenázou a pod.) alebo mechanickou disociáciou buniek zo zdravých živočíšnych či ľudských tkanív, napr. buniek z opíčích obličiek, ľudských embryonálnych obličiek, ľudských diploidných pľúcnych fibroblastov, kožných fibroblastov a z iných tkanív. Pre svoju prakticky neobmedzenú schopnosť pasážovania našli v kultivácii vírusov svoje univerzálne uplatnenie aj stabilizované heteroploidné línie, napr. ľudské nádorové HeLa bunky (bunky získané z ľudského karcinómu krčka maternice po infekcii ľudským papilomavírusom) so stratenou schopnosťou apoptózy. Podobne dlhodobu pasážovateľnosť majú aj ľudské lymfoblastoidné bunky získané z periférnej krvi, ktoré boli immortalizované *in vitro* vírusom EBV a slúžia ako modelové bunky pre výskum EBV infekcie a aj ako zdroj antigénov pre diagnostiku EBV. **Bunkové línie**, ktoré sú najčastejšie používané **v rámci virológie**, sú:

- RhMK, primárne opície bunky z obličiek druhu makak rhesus (*Macaca mulatta*),
- primárne bunky z králičích obličiek,
- MRC-5, diploidná línia ľudskej bunkovej kultúry zložená z fibroblastov odvodených z fetálneho pľúcneho tkaniva,
- fibroblasty z mužskej predkožky (prepúcia),
- Vero bunky, aneuploidná (s abnormálnym počtom chromozómov) bunková línia epiteliálnych buniek z obličiek opíc druhu mačička zeleného (*Chlorocebus aethiops*),
- HEp-2, ľudské epiteliálne bunky odvodené z karcinómu hrtana,
- A549, ľudské alveolárne bazálne epiteliálne bunky z pľúcneho adenokarcinómu,
- HEK 293, transformované ľudské embryonálne obličkové bunky,
- HeLa bunky.

Voľba vhodnej bunkovej kultúry je podmienkou úspešnú izoláciu stabilného kmeňa vírusu. Najvhodnejšie je vybrať typ buniek z prirodzeného hostiteľa tohto vírusu. **Pri pasážovaní vírusu na nie optimálnej bunkovej kultúre (podobne ako aj pasážovanie na nespecifickom hostiteľskom živočíšnom druhu) môže dôjsť k zmene vlastností vírusu** oproti divému typu, napr. k strate jeho virulencie (atenuované kmeň).

Niektoré skupiny vírusov, napr. retrovírusy, nemožno kultivovať v konvenčných bunkových líniiach, nakoľko tieto nemajú príslušné receptory pre naviazanie daného vírusu. Preto sa používajú **transgénné bunkové línie**, ktoré boli pomocou vektorov geneticky manipulované tak, aby umožnili infekciu tohto vírusu, rovnako aj jeho úplnú replikáciu. V prípade kultivácie retrovírusov nesú vektory pre transgénnu zmenu napr. HeLa buniek heterológny gén, kódujúci expresiu CD4 receptora na ich povrchu, ktorý pochádza pôvodne z lymfoidných buniek. Jeho integráciou do genómu HeLa buniek a jeho expresiou na ich povrchu získajú bunky permissivitu k HIV. Takto zmenené transgénné bunkové kultúry sú využívané napr. **pri fenotypovom testovaní anti-virov** alebo rezistencie voči nim. Sú pri tom infikované indikátorovými laboratótnymi kmeňmi HIV, do ktorých bol umelo vnesený iný vektor (génová kazeta) s inzertovanými génmi pre kľúčové vírusové enzýmy, slúžiace ako cieľové miesta účinku anti-virov (reverzná transkriptáza – RT, vírusová proteínáza – PR a pod.) z vírusu pacientskeho kmeňa. Zároveň s nimi je inzertovaný aj nevírusový gén pre indikátor. Indikátorový gén

je umiestnený tak, aby sa exprimoval súčasne s vírusovým génom, kódujúcim proteín potrebný pri kompletizácii nových vírusových častíc na konci replikačného cyklu, napr. oblasti *env* génu. Vírus, ktorý sa v bunke úspešne zreplikoval, aktivizovuje zároveň aj expresiu indikátorového génu. Umožní tak označenie bunky s replikovanými viriónmi reportérskou molekulou, ktorý je produktom expresie indikátorového génu (napr. enzýmu luciferáza, katalyzujúceho svetelnú reakciu v takejto bunke). Uvedeným vnášaním génových kazieta s génmi patientských vírusových kmeňov a indikátorového génu do indikátorových virionov HIV – 1 sú konštruované tzv. **vírusové pseudotypy**, ktoré sa využívajú na fenotypové testovanie účinnosti antivirofík. Ak bol napr. kmeň vírusu od pacienta rezistentný na niektoré používané antivirofikum na báze inhibítora RT alebo PR , vírusový pseudotyp má v sebe jeho gén aj s mutáciou pre rezistenciu voči testovanému antivirofiku. Preto sa dokáže replikovať aj v jeho prítomnosti. Svojou replikáciou v bunke aktivuje zároveň aj expresiu luciferázy v nej a umožní dôkaz rezistencie vírusu vytváraním svetelného signálu v infikovanej bunke.

Manipulácia s bunkovými kultúrami si vyžaduje prísny stupeň aseptickkej práce v laminárnom boxe. Na zvýšenie úspešnosti infekcie buniek vírusmi v kultúre sa niekedy používa centrifugácia, ktorá zabezpečí tesné prilnutie vírusových partikul ku vrstve permissívnych buniek v kultivačnej nádobe. **Adherujúce línie buniek** (napr. línie BHK-21 alebo Vero) vytvárajú jednu vrstvu buniek (**monolayer**) a to vďaka fenoménu tzv. **kontaktnej inhibície**, ktorá bráni rastu normálnych buniek rôznymi smermi vo forme zhluku buniek, resp. viacerých na sebe uložených vrstiev. **Nádorové bunky, teda imortalizované, nepodliehajú kontaktnej inhibícii, rovnako ani apoptóze.** Niektoré bunkové línie sa pasážujú planktonickou kultiváciou (napr. Sp2 bunky, ktoré sú hybridómami B lymfocytov, používaných na produkciu monoklonálnych protilátok, ľudské lymfoblastoidné bunky a pod.).

Adherujúce bunkové kultúry sa prepasážujú pomocou trypsínu, ktorý ich uvoľní z pôvodnej monovrstvy do média ako oddelené bunky pre založenie nasledujúcej pasáže, plaktonické kultúry sa prepasážujú centrifugáciou. Tým, že vírusy potrebujú pre svoju replikáciu živé bunky, musia byť bunky pestované submerzne v tekutých kultivačných médiách, **s nutričným zložením vhodným pre rast buniek** (fyziologické a izotonické zloženie cukrov, tukov, bielkovín, vitamínov, hormónov, katiónov Na, K, Mg, chloridov, fosforečnanov a pod.). Ich kultivácia umožňuje udržanie podmienok pre optimálny metabolizmus konkrétneho typu buniek pomocou **vhodných kultivačných podmienok** (teplota, pH od 7,2 do 7,4, osmotický tlak, tenzia O₂ a CO₂). Pre názornosť – kompletné médium pre kultiváciu buniek obsahuje napr.:

- a) 10 % tepelne inaktivovaného fetálneho hovädzieho séra,
b) anorganické soli,
c) ATB a ATM, napr. penicilín a streptomycín (v koncentrácii 100 U/ml, resp. 100 µg/ml) a amfotericín B (0,5 µg/ml),
d) upravené pH 7,2 a inkubuje sa pri 35 – 37 °C, v atmosfére 5% CO₂.

Najčastejšie používané médiá pre bunkové kultúry vo virológii sú bazálne Eaglovo médium (BEM), alebo Dulbeccom modifikované Eaglovo médium (DBEM).

Niektoré kultúry si vyžadujú aj neustály pohyb kultivačnej nádoby, ktorý bunkám zabezpečí rovnomerné prostredie kultivačného média a prístup k živinám. Zabráni sa tak aj prípadnej sedimentácii buniek pri planktonickej kultúre. V metabolizme kultivovaných buniek vzniká CO_2 , ktorý znižuje pH média, preto sa doň pridáva bikarbonátový alebo fosforečnanový pufo a indikátor pH. Najčastejšie používaným indikátorom pH je fenolová červen, ktorá pri fyziologickom pH 7,4 zostáva svetločervená, v kyslom prostredí farbí médium do oranžova až žltá a v zásaditom do fialova.

Pokiaľ sa týka samotného virologického vyšetřovania klinických vzoriek na bunkovej kultúre (napr. nazofaryngeálne sek-

réty, moč, mozgovomiechový mok, BAL, obsah pľuzgierov atď.), musí byť biologický materiál, z ktorého má byť vírus izolovaný a identifikovaný, dezintegrován, homogenizovaný vo vortexe a odstredený centrifugáciou ešte pred jeho naočkovaním na pripravenú bunkovú kultúru. V pelete, ktorý sa po centrifugácii usadí na dne skúmavky, ostávajú bunky tkaniva, baktérii, húb a podobné kontaminujúce elementy. V **supernatante ostávajú virióny, ktoré sa použijú na inokuláciu bunkovej kultúry**. Tá musí byť ošetrována antibiotikami a antimykotikami, ktoré zabránia kontaminácii bunkovej kultúry baktériami, hubami, plesňami, ale najmä mykoplazmami. Tie predstavujú časté riziko biologickej kontaminácie v laboratóriu bunkových kultúr. Využitie bunkových kultúr v rámci mikrobiológie sa týka najmä kultivácie vírusov, ale ich využitie je omnoho širšie, napr. na kultiváciu intracelulárnych baktérií, húb a parazitov. Rovnako sa využívajú na biologický dôkaz bakteriálnych toxínov (napr. shiga-like toxínu pri niektorých enterovirulentných kmeňov *E. coli* na líniiach Vero buniek, preto je aj jeho pôvodný názov Verotoxín) a na iné diagnostické postupy.

Vírusy sa v bunkách replikujú rôzne dlho v závislosti od druhu vírusu (napr. herpes simplex vírus je rýchlo sa množiaci vírus s replikačným cyklom cca 1-2 dni do vzniku cytopatického efektu, cytomegalovírus naopak pomalšie, cca 10 - 30 dní). **Infekcia buniek vírusmi** môže prebiehať v dvoch formách - buď v **lytickej**, počas ktorej vírus bunku usmrť, alebo **lyzogénnej**, kedy sa vírus môže replikovať bez toho, aby došlo k jej lýze alebo iným morfológickým zmenám. **Lytickú infekciu** na adherovanej bunkovej kultúre vidno ako tvorbu plakov - vyčistené miesta sférického tvaru v monovrstve buniek, podobné ako pri lytickej infekcii baktérií bakteriofágom. Pri bunkách, v ktorých sa vírusy rozmnožili, pozorujeme pomocou svetelného mikroskopu typické morfológické zmeny - tzv. **cytopatický efekt**, ktorý sa prejavuje napr. **lýzou infikovaných buniek, tvorbou inklúzií v cytoplazme alebo jadre infikovanej bunky, tvorba mnohoadrových buniek, ktoré vznikli delením jadra bez následného delenia cytoplazmy (polykaryocyty), splývaním jednotlivých buniek do mnohoadrových útvarov - syncytií alebo degeneráciou tvaru buniek ich zaguľatením, odlupovanie vrstvy adheziujúcich buniek od podkladu** a pod. Na vytvorenie viditeľného cytopatického efektu sa nie vždy možno spoľahnúť, najmä ak ide o **lyzogénnu infekciu**. V prípade niektorých vírusov, ktoré sa pomnožili v bunkách, sa vo svetelnom mikroskope neprejaví cytopatický efekt. Vtedy možno na dôkaz rozmnoženia vírusu v bunkách použiť tzv. **fenomén interferencie**, ktorý spočíva v tom, že bunka, ktorá už bola nainfikovaná jedným typom vírusu sa stáva **nepermisívnou pre iný vírus**. Inými slovami - vírusová interferencia je fenomén, pri ktorom sa bunka infikovaná jedným vírusom stáva rezistentnou voči infekcii druhým vírusom (superinfekciou). Na superinfekciu sa použije vírus, ktorý zvyčajne na danom type buniek vytvára výrazný CPE, no vďaka interferencii kultúra primárne infikovaných buniek zostane neporušená. Ďalším postupom, ktorým sa môže dokázať permissívna infekcia niektorými vírusmi (morbili, mumps, chrípka) na bunkových kultúrach, sú **hemadsorpcia**. Vírusom infikované bunky na svojom povrchu exprimujú hemaglutinín, ktorý pri kontakte s erytrocytmi (kuracie, husacie, morčacie a iné) tieto krvinky na seba viaže (adsorbujú). Ak teda na infikované bunky nalejeme náplav prepraných erytrocytov a necháme ich spolu inkubovať, erytrocyty sa naviažu na infikované bunky a po zliatí náplavu zostávajú na týchto bunkách adsorbované, čím sa pri pozorovaní pod zväčšením potvrdí replikácia vírusu v daných bunkách.

Na potvrdenie infekcie buniek vírusom sa veľmi často používajú aj mnohé sérologické metódy, napr. vírus neutralizačný test, nepriama aglutinácia a imunoanalýza (pozri subkapitolu 1.21, imunochemické metódy). Patrí tam aj **priama imunofluorescenčná mikroskopia**, pri ktorej sa značené monoklonálne antivírusové protilátky viažu na povrch infikovaných buniek, resp. na ich vnútorné štruktúry a vzniká na nich fluorescenčný

signál, pozorovateľný pod fluorescenčným mikroskopom. To možno využiť aj prípade niektorých vírusov, pri ktorých sa CPE v bunkách vyvinie až za dobu dlhšiu ako 2 týždne, ako je to v prípade cytomegalovírusu, avšak antigény tohto vírusu (napr. pp65) môžu byť dokázané v bunkách pomocou imunofluorescencie už po jednom až dvoch dňoch.

Ďalším živým systémom, avšak dnes čoraz menej využívaným na rozmnožovanie vírusov, sú **laboratórne zvieratá**. V súčasnosti vzhľadom na lepšiu dostupnosť iných lepšie reprodukovateľných systémov a v dôsledku prísnejšej legislatívy z humánnych dôvodov sa v diagnostike vírusových ochorení používajú v praxi zo zvierat najmä myši a to len v tých prípadoch ak neexistuje iný vhodný kultivačný systém. Metódy molekulárnej biológie taktiež už dnes umožňujú detegovať in vitro aj také vírusové infekcie, pre ktoré boli v ich diagnostike v minulosti využívané laboratórne zvieratá. Na izoláciu sa využívajú **novorodené alebo dospelé myši**, napr. na izoláciu a identifikáciu niektorých sérotypov vírusov coxsackie skupiny A a niektorých arbovirusov. Niekedy, a to nielen vo virológii, je pre izoláciu a kultiváciu mikroorganizmov potrebný gnotobiotický organizmus - získaný za neprítomnosti akýchkoľvek foriem mikrobiálnych zárodkov. Gnotobiotické zvieratá (**gnotobionti**) sú životaschopné plody zvierat získané prenatálnym odberom z matrice a chované v špeciálnych aseptických podmienkach.

Všeobecný princíp kultivácie vírusov s použitím laboratórnych zvierat spočíva v inokulácii vyšetrovanej vzorky napr. intracerebrálne, intraperitoneálne alebo subkutánne súčasne viacerým zvieratám. Za **pozitívny výsledok** sa považujú špecifické prejavy, ako sú napr. **spastické alebo chabé obrny, ulcerácia, úhyn zvierat alebo odumretie embrií, odmietanie potravy a iné zmeny správania**. Vírus sa následne izoluje zo suspenzie orgánov, do ktorých bol inokulovaný, alebo v ktorých predpokladáme jeho prítomnosť. Najčastejšie sa jedná o suspenzie pripravené z mozgového tkaniva, srdca, pečene a kostrového svalstva. Tkanivá a orgány sa najprv opakovane zmrazia, rozmrazia, pridá sa k nim tlmivý roztok obsahujúci antibiotikum a suspenzie orgánov sa pripraví buď v trecej miske po zmiešaní so sterilným pieskom, použitím mixéru, alebo pomocou ultrazvuku. Po centrifugácii sa vírus z takto pripravenej suspenzie identifikuje sérologickými testami.

Vírusy možno taktiež kultivovať v **kuracom embryu**, ktoré je sterilným systémom obsahujúcim rôzne druhy rýchlo sa množiacich buniek. Po inokulácii vyšetrovanej vzorky injekčnou striekačkou do kuracieho embrya sa povrch škrupinky uzavrie voskom alebo adhezívnou páskou. Zárodky sa kultivujú po dobu 72 hodín pri 37 °C. Po otvorení vajčiek sa sterilnou striekačkou odoberie na identifikáciu tekutina získaná zo zárodočných obalov. Na plodových obaloch **ako chorioalantoická a amniotická membrána** možno badať **cytopatický efekt prejavujúci sa charakteristickými uzlíkmi**. Ak je to nevyhnutné, tak sa kurací zárodek môže využiť na izoláciu vírusu chrípky, poprípade na rozmnoženie herpetických vírusov, poxvirusov, togavirusov a mnohých retrovirusov. Takisto ho možno využiť aj k izolácii a kultivácii intracelulárnych baktérií ako napr. chlamýdií a rickettsií. V súčasnosti sa kuracie embryá využívajú ojedinele a to hlavne na účely **přípravy vírusových vakcín** (vakcína proti chrípke), kedy sa pre požadované významné pomnoženie vírusu očkuje vírusová suspenzia do alantoickej dutiny. Na izoláciu herpetických vírusov a poxvirusov sa infekčný materiál očkoval na chorioalantoickú membránu a na izoláciu togavirusov a rickettsií do žltkového vaku. Kuracie embryá, napriek ich využitiu pri príprave vakcín, sú pre rutinnú izoláciu vírusov v laboratóriách čoraz viac nahrádzané bunkovými kultúrami.

Na kvantitatívne určovanie infekčnej aktivity vírusov sa využíva **titrácia** vírusu (ale aj iných mikroorganizmov, napr. parazitov). Infekčná jednotka vírusu sa stanovuje ako najmenšie množstvo vírusových častíc, ktoré je schopné v príslušnom biologickom substráte vyvolať pre vírus typickú špecifickú reakciu.

Vyjadruje sa vždy vo vzťahu k objemovej jednotke (obvykle 1 ml alebo 0,1 ml). Stanovenie množstva vírusu – titrácia – sa robí pomocou vzostupného riedenia (obvykle 10-násobného) vírusového materiálu, každé riedenie sa potom naočkuje na 4 kultúry vnímavého detekčného systému (napr. bunkové kultúry, kuracie embryá alebo laboratórne zvieratá). Najvyššie riedenie, pri ktorom sa prejaví typickým spôsobom prítomnosť vírusu (cytopatický efekt, plaky na membránach kuracieho zárodku, uhynutie laboratórneho zvieratka), je potom označené ako titer vírusu. Na naočkovanie každého riedenia používame vždy niekoľko skúmaviek s bunkovou kultúrou alebo niekoľko kuracích zárodkov je preto obvyklé, že sa na niektorých z nich v najvyššom riedení prejaví prítomnosť vírusu a na iných pri tom istom riedení vírusu sa účinok neprejaví. Je to dané nerovnakým rozdelením vírusových jednotiek v danom objeme materiálu a rozdielmi vo vnímanosti individuálnych buniek. Konečný titer sa potom určí ako také riedenie, ktoré vyvolá v 50% použitých kultúr prejavy prítomnosti vírusu. Označí sa ako ID₅₀.

1.13.2 Kultivácia parazitov

Kultivácia *in vitro* na bunkových kultúrach, resp. v umelých médiach a *in vivo* pomocou zvierat sa využíva aj v parazitológii. Kultivácia parazitov v klinickej diagnostike u nás je v porovnaní s kultiváciou baktérií, kvasiniek a mikroskopických vláknitých húb zriedkavou metódou. Na kultiváciu parazitov sa môžu použiť tri typy kultivácie:

- **Xenická kultúra** – kultivácia parazitov s nedefinovanou mikroflórou, napríklad na vzorke stolice (*Entamoeba histolytica*).
- **Monoxenická kultúra** – parazity sú kultivované s jedným druhom známej baktérie, napríklad vzorka biopsie rohovky kultivovaná s *Escherichia coli* ako postup na izoláciu druhov *Acanthamoeba*.
- **Axenická kultúra** – ide o čistú kultiváciu na definovaných médiach bez bakteriálnych alebo iných buniek. Používa sa ako izolačné médium pre parazity, ako aj na pomnoženie (*T. vaginalis*).

Z parazitov, ktoré sa vyskytujú u nás, možno na špeciálnych axenických kultivačných pôdach kultivovať améby (*E. histolytica*, *Dientamoeba fragilis*, *Balantidium hominis* and *B. coli*, ale aj voľne žijúce améby) a *Trichomonas vaginalis*. V diagnostike **trichomonózy** ako parazitárneho ochorenia sa na dôkaz pôvodcu rutinne používa kultivácia na axenickom **Diamondovom médiu** v anaeróbných podmienkach. Kultivácia týchto parazitov na médiu trvá 5 dní a rast sa overuje denne mikroskopicky. Toto médium je vhodné aj pre kultiváciu *G. intestinalis* a *E. histolytica*. **Leishmánie a trypanozómy** je tiež možné kultivovať v špeciálnych axenických médiach, napr. **NNN médium** (Nový, Mc Neal, Nicolle, bifázické médium – jedna fáza je tuhá, druhá nad ňou je kvapalná). Na **dôkaz voľne žijúcich améb** (*Naegleria fowleri*, *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*) sa používa metóda **monoxenickej kultivácie** na nevýživnom agare so suspenziou **živej alebo** teplom usmrtenej nemukózne kultúry enterobaktérií druhov *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, resp. *Enterobacter aerogenes*. Po týždňovej kultivácii možno v prípade pozitívneho nálezu pozorovať pod mikroskopom vývojové štádiá améb – cysty a trofozoity.

Kultivácia parazitov *in vitro* pre iné účely ako je klinická diagnostika, napr. pre účely štúdií a výskumu, overovania antimikróbnej účinnosti antiparazitík a podobne vychádza zo zásad:

1. Parazitické helminty sa ťažšie kultivujú ako prvky (*Plasmodium* spp., *Babesia* spp.). Zložitost organizmu a metabolizmu helmintov, ako aj neschopnosť splniť základné environmentálne podmienky na priebeh ich jednotlivých vývojových fáz spôsobujú, že v mnohých prípadoch nedokážu dokončiť ich životné cykly za umelých podmienok. U nás sa za účelom výskumu a získavania diagnostických antigénov kultivuje

napr. *Trichinella spiralis* alebo *Toxocara canis* na laboratórnych myšiach (Parazitologický ústav SAV).

2. Na kultiváciu striktnie intracelulárnych parazitov sa používa bunkové kultúry, napríklad *Plasmodium* spp. a kokcidie (napr. *Toxoplasma gondii* na Vero bunkách alebo ľudských fibroblastoch).
3. V axenických kultivačných médiach sa používajú rôzne druhy živín ako krv, sérum, hemín, slepačie vajcia, peptón, minerály a sacharidy.
4. Teplota požadovaná pre optimálny rast je zvyčajne 37 °C, hoci v niektorých prípadoch môžu byť potrebné nižšie teploty, napr. 25 °C pre promastigoty leishmání.
5. Inkubácia pri kultivácii parazitov je aeróbná s niektorými výnimkami, ako sú mikroaerofilné podmienky pre améby a *Giardia* spp. a atmosféra s 5 % CO₂ pre *Plasmodium* spp.
6. Pri identifikácii parazitov sa sleduje charakteristická morfológia a výsledky vyšetrení pomocou priamej imunofluorescencie, PCR, enzýmová imunoanalýza a pod.
7. Pri kultivácii sa vykonávajú paralelné pozitívne kontroly rastových médií a použitej metódy.

XENODIAGNOSTIKA

V krajinách Južnej Ameriky je ku xenodiagnostike pôvodcu Chagasovej choroby používaný ich prirodzený vektor – plosťice rodu *Triatoma*. Na diagnostikovanie pôvodcu tejto infekcie pri ľuďoch, bičíkovca *Trypanosoma cruzi* v prípadoch, kedy nebolo možné preukázať parazita v krvných náteroch. Laboratórne nekontaminované plosťice sa nechajú nasať krvi pacienta a o 10 až 30 dní je črevný obsah triatóm vyšetrený na prítomnosť parazitov. Tento materiál sa môže následne naočkovať myšiam na ďalšie kultivačné potvrdenie.

V minulosti sa aj v bývalom Československu **laboratórne kultivoval zbierkový kmeň *T. gondii*** na myšiach, z ktorých sa získavali **živé virulentné trofozoity pre klinickú diagnostiku toxoplazmózy** pomocou **Sabin-Feldmanového farbiaceho testu**. Test je založený na dôkaze prítomnosti špecifických protilátok v sére pacienta, ktoré po ich naviazaní na trofozoity aktivujú pridaný komplement a dôjde k ich lýze. Pri lyzovaných trofozoitoch nemôže dôjsť k vstupu metylénovej modrej do cytoplazmy buniek. Pri testovaní klinických vzoriek sú séra pacientov inkubované s trofozoitmi toxoplazmy aj s aktivátorom (komplement). Po inkubácii sa pridá metylénová modrá. Ak sú v sére prítomné anti-toxoplazmové protilátky, dôjde k lýze membrány parazita, úniku cytoplazmy do prostredia a k stenšeniu bunky. Také schránky trofozoitov toxoplazmy zostanú nezafarbené (pozitívny výsledok). Ak nie sú v sére pacienta špecifické protilátky, trofozoity s intaktnou membránou sa zafarbí a pod mikroskopom sú modré a a normálne tvarované (negatívny výsledok). Test sa robí v rade dvojnásobných riedení a výsledok sa udáva v titroch. Je vysoko citlivý a špecifický, preto bol veľmi dlho považovaný ako **zlatý štandard v diagnostike toxoplazmózy**. V súčasnosti sa vykonáva už len ojedinele.

1.13.3 Kultivácia mikromycét

V prípade mykotických ochorení sa biologický materiál pri podozrení na povrchovú mykózu inokuluje na Sabouraudov agar bez alebo s antibiotikom, resp. cykloheximidom (Actidione). Na dôkaz dermatofytov sa pôdy kultivujú aeróbne počas 10 – 28 dní, pri teplote 25 °C a ich rast sa kontroluje v týždňových intervaloch. Rast sa v prípade najrýchlejšie rastúcich dermatofytov prejaví do 7 dní. Ostatní pôvodcovia slizničných a kožných mykóz ako napr. kvasinky z rodu *Candida* spp. a *Malassezia* spp. sa kultivujú paralelne pri 25 °C a 37 °C a ich rast sa vyhodnocuje každé 2 dni. Pri kultivácii pôvodcov systémových mykóz sa biologický materiál inokuluje na Sabouraudov agar a na pomnoženie aj do Sabouraudovho glukózového bujónu. Takto naočkované médiá sa kultivujú aeróbne paralelne pri 25 °C a 37 °C. Pri rýchlo rastúcich mikroskopických vláknitých hubách ako je napríklad rod *Aspergillus* spp. sa rast kontroluje každé 2 dni. Na záchyt niektorých



pomaly rastúcich pôvodcov (napr. *Blastomyces* spp. a *Histoplasma* spp.) je potrebné kultiváciu predĺžiť až na 4 týždne.

Kultivácia baktérií na kultivačných pôdach umožňuje ich rast a rozmnožovanie v laboratórnych podmienkach. Jej cieľom v mikrobiologickej diagnostike je zachytenie, izolácia a rozmnoženie skúmaných mikroorganizmov. Získanie čistej kultúry (subkultúry) je nevyhnutnou podmienkou pre väčšinu ďalších diagnostických postupov ako sú napr. biochemická identifikácia a sérotypizácia.

1.13.4 Kultivácia baktérií a kvasiniek

Medicínsky významné baktérie a kvasinky sú chemoorgano-trofné organizmy, ktoré sú svojimi rastovými nárokmi adaptované na podmienky episomatického a vnútorného prostredia ľudského tela. Hoci celý rad z nich je schopný prežívať alebo sa dokonca množiť aj v cudzom prostredí, ich spoločnou vlastnosťou je, že optimálne prostredie pre ich rast a rozmnožovanie predstavuje práve ľudský organizmus (samozrejme ten s čo najmenej funkčným imunitným systémom). Ich kultivácia *in vitro* si preto vyžaduje vytvorenie podobného chemického a fyzikálneho prostredia, aké poskytuje naše telo a jeho jednotlivé kompartmenty. Potrebné chemické prostredie vytvoríme dodaním potrebných zdrojov biogénnych prvkov, stopových prvkov a suplementov do rastových médií. Fyzikálne podmienky pre kultiváciu vytvoríme vhodnou teplotou, vlhkosťou, pH, prístupom ku kyslíku a iným zložkám atmosféry, oxido – redukčným potenciálom a izotonickým prostredím počas potrebnej dĺžky kultivácie. Zámerným nastavením konkrétnych podmienok kultivácie preto môžeme vytvárať požadovaný selekčný tlak prostredia tak, aby sme dosiahli optimálny rast predpokladaných patogénov, umožnili ich izoláciu a identifikáciu, ale zároveň potlačili rast sprievodnej flóry.

Pre rast a rozmnožovanie mikroorganizmov *in vitro* je potrebné zabezpečiť im vhodné podmienky zodpovedajúce ich nutričným nárokom. Medzi tieto patrí zvoliť si vhodnú kultivačnú pôdu s optimálnym pH **obsahujúcu potrebné živiny, rastové faktory a vitamíny**. Počas práce s klinickým materiálom, pri jeho

spracovaní a očkovaní na kultivačné pôdy pracujeme za aseptických podmienok a dodržiavame predpísaný postup. **Základné chemické zložky potrebné na rast baktérií v prirodzenom prostredí makroorganizmu a *in vitro* sú uvedené v tabuľke 1.13.1.**

Väčšina patogénnych mikroorganizmov vyhovuje pH v rozmedzí 6 až 8. Pri väčšie kultivačných pôd sa pH upravuje lúhom či kyselinou na hodnoty 7,2 – 7,4. Niektoré klinicky významné rody však vyžadujú pri kultivácii kyslé prostredie (sú acidofilné, napr. *Lactobacillus* spp., pH 3), alebo naopak, vyžadujú zásadité prostredie (alkalofilné, napr. *Vibrio* spp., pH 8). Takisto je dôležité zabezpečiť dostatočnú vlhkosť pôdy, ktorá je nevyhnutná pre difúziu živín a metabolické procesy, optimálnu teplotu, dobu kultivácie a vhodné zloženie atmosféry. V tabuľke 1.13.2 je uvedené rozdelenie jednotlivých druhov baktérií podľa ich rastových nárokov na teplotu.

Tab. 1.13.2. Rozdelenie baktérií podľa ich optimálnej teploty rastu.

	Psychrofilné (0 – 20 °C)	Psychro- tolerantné (tolerujúce aj t > 0 °C)	Mezofilné (20 – 40 °C)	Termofilné (> 40 °C)
baktéria	nepatogénne MO chladných oceánskych a jazerných vôd	napr. <i>Listeria</i> sp. množiaca sa v širokom teplotnom rozmedzí (4 – 45 °C)	väčšina medicínsky významných MO (<i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> ...)	baktérie horúcich prameňov (<i>Thermus aquaticus</i>) a napr. <i>Campylo- bacter</i> sp.
teplotné optimum rastu	uvedené teplotné rozpätie	30 – 35 °C	cca 37 °C	<i>T. aquaticus</i> - > 45 °C <i>Campylo- bacter</i> spp. 42 °C

Kultivácia mikroorganizmov prebieha v elektricky vyhrievaných termostatoch alebo pri laboratórnej teplote, pričom optimálna teplota kultivácie pre väčšinu ľudských patogénov je

Tab. 1.13.1. Chemické rastové zložky pre rast baktérií v prirodzenom prostredí makroorganizmu a *in vitro*.

Biogénne (esenciálne) prvky a suplementy	Substráty, ktoré sa zvyčajne biogénne prvky nachádzajú v prírode	Chemické látky bežne pridávané do mikrobiologických médií ako zdroje biogénnych prvkov
C – Uhlík	Oxid uhličitý (CO ₂), uhličitany (HCO ³⁻), organické zlúčeniny	Organické: jednoduché cukry (napr. glukóza), acetát alebo pyruvát; extrakty ako peptón, tryptón, kvasnicový extrakt atď. anorganické: oxid uhličitý (CO ₂) alebo hydrogenuhličitanové soli (HCO ³⁻)
H – Vodík	Voda (H ₂ O), organické zlúčeniny	
O – Kyslík	Voda (H ₂ O), kyslík (O ₂) atmosferický,	
N – Dusík	Amoniak (NH ₃), dusičnan (NO ³⁻) Organické zlúčeniny napr. aminokyseliny	organické: aminokyseliny, dusíkaté bázy anorganické: NH ₄ Cl, (NH ₄) ₂ SO ₄ , KNO ₃
P – Fosfor	Fosforečnany (PO ₄ ³⁻) KH ₂ PO ₄ , Na ₂ HPO ₄	
S – Síra	Sírovodík (H ₂ S), sírany (SO ₄ ²⁻), Organické zlúčeniny, napr. cysteín	Na ₂ SO ₄ , H ₂ S
K – Draslík	K ⁺	KCl, K ₂ HPO ₄
Mg – Horčík	Mg ²⁺	MgCl ₂ , MgSO ₄
Ca – Vápnik	Ca ²⁺	CaCl ₂ , Ca (HCO ₃)
Na – Sodík	Na ⁺	NaCl
Fe – Železo	Fe ³⁺	Organické komplexy železa, FeCl ₃ , Fe (NH ₄) (SO ₄) ₂ , Fe-cheláty
Stopové prvky Co, Zn, Mn....	Zvyčajne sú prítomné vo veľmi nízkych koncentráciách	CoCl ₂ , ZnCl ₂ , Na ₂ MoO ₄ , CuCl ₂ , MnSO ₄ , NiCl ₂ , Na ₂ SeO ₄ , Na ₂ WO ₄ , Na ₂ VO ₄
Organické rastové faktory	Zvyčajne sa vyskytujú vo veľmi nízkych koncentráciách	Vitamíny, aminokyseliny, puríny, pyrimidíny

37 °C. Väčšina medicínsky významných baktérií sa kultivuje 24 až 48 hodín. V prípade anaeróbov je kultivácia dlhšia, trvá cca 2 a viac dní. Kultivácia kvasiniek a mikroskopických vláknitých húb vrátane dermatofytov je predĺžená a rast baktérie *Mycobacterium tuberculosis* trvá dokonca až 3 – 12 týždňov. Väčšina patogénov vyrastá v kultivačnom prostredí s bežným zložením atmosféry. V tabuľke 1.13.3. je uvedené rozdelenie baktérií podľa požiadaviek na prítomnosť kyslíka, resp. jeho odstránenie v kultivačnom prostredí.

Podmienkou pre anaeróbnú kultiváciu mikróbov je nízky oxidačno-redukčný (redox) potenciál kultivačného prostredia, nakoľko pri kultivácii anaeróbov v prostredí s nevhodným redox-potenciálom v ich bunkách neprebiehajú fosforylačné reakcie, ktoré sú nevyhnutné na získanie energie. Pri striktných anaeróboch je limitujúci potenciál -200 mV, pri menej náročných anaeróboch sa pohybuje v rozmedzí 0 až +150 mV, pôdy pre aeróbnú kultiváciu majú hodnotu redox-potenciálu asi +300 mV. Redukčné prostredie (so zápornou hodnotou redox-potenciálu) sa dosahuje v tekutých a polotuhých pôdach jednak tým, že sa čerstvo pripravené pôdy rýchlo ochladia, alebo tým, že po prevarení (20 min.) a rýchlom ochladení sa pridajú do pôdy redukujúce látky a povrch tekutej pôdy sa prevrství sterilným parafínovým olejom. Je možný aj postup, pri ktorom sa pridá malé množstvo agaru (0,1 – 0,3 %), ktorý podstatne obmedzí difúziu vzdušného kyslíka do pôdy. Pri tuhých pôdach používame čerstvo pripravené alebo tesne pred použitím regenerované médiá. Kultivácia sa po naočkovaní deje za anaeróbných podmienok (pozri ďalej). Kultivačné prostredie pre mikroorganizmy musí byť **izotonické** (roztok látok s rovnakým osmotickým tlakom, ako má sérum), čo sa zabezpečí pridaním NaCl do väčšiny pôd (0,5 % roztok).

Tab. 1.13.3. Rozdelenie baktérií podľa ich požiadaviek ku kyslíku.

Mikroorganizmy podľa požiadaviek na prítomnosť kyslíka (na zloženie atmosféry)		
mikroorganizmus		
Aerózne	<i>Pseudomonas</i> spp., <i>Mycobacterium</i> spp., <i>Vibrio</i> spp., kvasinky a mikroskopické vláknité huby	
Anaerózne	striktné anaerózne	<i>Clostridioides difficile</i> , <i>C. botulinum</i> , <i>C. tetani</i> , <i>C. novyi</i> , <i>Bacteroides fragilis</i>
	aerotolerantné	<i>Clostridium perfringens</i> , <i>C. histolyticum</i> , <i>C. septicum</i>
Fakultatívne anaerózne	väčšina medicínsky významných baktérií: <i>Staphylococcus</i> spp., <i>Streptococcus</i> spp. čľaď <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Listeria monocytogenes</i>	
Mikroerofilné	<i>Helicobacter pylori</i> , <i>Campylobacter</i> spp.	
Kapnofilné*	<i>Neisseria meningitidis</i> , <i>Neisseria gonorrhoeae</i> , <i>Haemophilus</i> spp.	

*Poznámka mikroorganizmy vyžadujúce pri kultivácii vyššiu tenziu CO₂ v prostredí (5 – 10 %), kultivácia prebieha v CO₂ termostatoch.

KULTIVAČNÉ PÔDY

Používajú sa ako médium na zachytenie, izoláciu a rozmnoženie baktérií. Podľa daného zloženia kultivačných pôd môže počet kultivácie určiť vybrané fyziologické a biochemické vlastnosti skúmaného mikroorganizmu. Kultivačné pôdy príslušného zloženia a konzistencie si vyberáme podľa účelu, na ktorý ich chceme použiť.

Kultivačné pôdy (mediá) sa rozdeľujú podľa rôznych hľadísk do niekoľkých skupín. Podľa pôvodu a spôsobu ich prípravy ich možno rozdeliť na prirodzené (pozostávajú zo zložiek živočíšneho a rastlinného pôvodu), syntetické (obsahujú chemicky

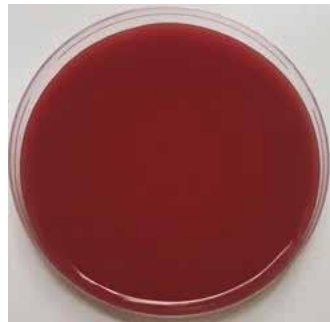
definované zlúčeniny) a polosyntetické (okrem definovaných chemických látok sú zložené aj z prirodzených zložiek).

Podľa konzistencie ich delíme na pôdy **tekuté**, **polotekuté** a **pevné**.

Príkladom **tekutých pôd** sú napríklad **pomnožovacie** médiá (živný bujón, **selenitová** pôda, VL bujón, alkalická **peptónová voda** a **tioglykolátový bujón**). Existujú určité výhody a nevýhody využitia tekutých pôd. Medzi výhody patrí ľahký prístup živín a vody k baktériám následne sa rýchlo množiacich v tekutom médiu. Nevýhodou tekutých pôd je skutočnosť, že rast mikroorganizmov v takýchto pôdach sa väčšinou prejavuje vytvorením zákalu, na základe ktorého nemožno jednoznačne určiť, či sa jedná o čistú kultúru pomnožených baktérií, alebo zmes rôznych bakteriálnych druhov.

Medzi **polotekuté médiá** patrí napr. **MIU pôda** a **Hajnov agar**. **MIU pôda** (z anglických slov motility-indole-urea) je pôda, ktorá sa nalieva do skúmaviek a vyšetrovaný mikroorganizmus sa do nej očkuje vpichom. Na tejto pôde sa u vyšetrovaných baktérií zisťuje schopnosť pohybu (tzv. motilita), produkcia indolu a tzv. ureázová aktivita (schopnosť štiepiť ureu produkciou enzýmu ureáza). MIU pôda v spojení s Hajnovou pôdou umožňujú predbežnú diferenciáciu identifikáciu enterobaktérií. Príkladom ďalšej polotekutej pôdy je Hajnov agar. Je to našikmo naliaty agar v skúmavkách, ktorý sa používa hlavne na odlíšenie salmonel a šigel od iných enterobaktérií. Hajnov agar obsahuje ako substráty menšie množstvo glukózy, laktózu a sacharózu, pričom indikátorom ich štiepenia je fenolová červen. Pôda tak isto obsahuje substrát pre produkciu sírovodíka (tiosulfát sodný) a indikátor citrát železitoamónny. Na Hajnovom agare možno u baktérií (napr. v prípade *Escherichia coli*) detegovať aj tvorbu CO₂.

Medzi **pevné pôdy** patrí napr. **živný agar**, **krvný agar**, **Sabouraudov agar**, **čokoládový agar**, **Levinthalov agar**, **MacConkeyov agar**, **Endov agar**, **Dezoxycholátová pôda** a ďalšie.



Obr. 1.13.2. Krvný agar.



Obr. 1.13.3. Krvný agar krémové kolónie *Staphylococcus aureus*.



Obr. 1.13.4. Sabouraudov agar.



Obr. 1.13.5. Sabouraudov agar *Candida* sp.

Na kultiváciu baktérií sa využívajú rôzne druhy pevných agarov (kultivačných pôd), pričom ich výhodou je, že umožňujú získať čistú kultúru daného mikróba a takisto izolovať jed-

notlivé bakteriálne kolónie. Kultivačné pôdy možno **rozdeliť podľa ich použitia** (resp. účelu) na **pôdy základné, obohatené, transportné, pomnožovacie, selektívne, diagnostické, selektívno-diagnostické, chromogénne a pôdy na stanovenie citlivosti mikroorganizmov voči antibiotikám**. Medzi **základné (univerzálne)** pôdy možno zaradiť napr. **krvný agar**, na ktorom vyrastá väčšina medicínsky významných baktérií bez špeciálnych rastových nárokov. Nakoľko krvný agar okrem živného základu obsahuje aj krv je tiež pôdou obohatenou. Na krvnom agare možno zároveň sledovať aj niektoré diagnostické vlastnosti ako napr. typ hemolýzy (hlavne u grampozitívnych kokov), preto túto pôdu považujeme aj za pôdu diagnostickú.

Obohatené pôdy umožňujú rast väčšiny mikroorganizmov, ktoré rastú zle na základnej pôde- živnom agare, alebo tu nerastú vôbec. Na obohatenej pôde porastú lepšie rastovo náročnejšie baktérie ako sú napr. streptokoky. Rastovo náročné baktérie ako sú napr. hemofily a patogénne neisérie pre svoj rast vyslovene potrebujú obohatené pôdy. Najčastejším obohacovadlom týchto pôd je zvieracia krv (napr. barania, ovčia, konská). Krvný agar sa pripravuje zmiešaním na cca 50 °C ochladeného „vautoklávovaného“ agarového základu a defibrinovanej baranej krvi. Obsahuje zmes rôznych vitamínov a rastových faktorov ako hovädzí odvar, peptón (zdroj bielkovín), kvasničný autolýzát, škrob, NaCl a agar (polysacharid vyextrahovaný z červených morských rias). Z patogénnych neisérií na ňom porastie iba *Neisseria meningitidis*. **Náročné baktérie**, ako sú hemofily a *Neisseria gonorrhoeae* kultivujeme na čokoládovom alebo **Levinthalovom agare**, lebo nie sú schopné rastu na krvnom agare. Čokoládový agar je modifikáciou krvného agaru, má rovnaké zloženie, avšak mierne sa odlišuje spôsobom prípravy. Krv sa primiešava ešte k horúcemu (80 °C) agarovému základu. Následkom vysokej teploty dôjde k rozrušeniu erytrocytov, vznikne hnedý nepriehľadný čokoládový agar. Levinthalov agar vzniká z čokoládového agaru jeho prefiltrovaním ešte za horúca. Príkladmi **diagnostických pôd** sú napr. **Endova pôda** a **Mac Conkeyov agar**, ktoré obsahujú vhodný indikátor, ktorý odhalí charakteristické metabolické alebo fyziologické vlastnosti vyšetřovaného mikroorganizmu (skvasovanie laktózy). Na dezoxycholátovej pôde sme schopní okrem štiepenia laktózy navyše u niektorých baktérií pozorovať tvorbu sírovodíka (ako napr. u salmonel) a pri *Proteus* spp. potlačenie jeho plazivého rastu.

CLED pôda (z angličtiny cystine-lactose-electrolyte deficient agar) je diagnostickou pôdou určenou na záchyt patogénov z moču pacientov pri infekciách močových ciest. Je to laktózo-ová pôda obsahujúca L-cysteín, laktózu a farebný indikátor brómtymolovú modrú. Kmene štiepiace laktózu okysľujú médium a menia jeho pôvodné zelené zafarbenie na žlté. Príkladom baktérií štiepiacich laktózu je napr. *Escherichia coli* a *Klebsiella* spp., ktoré tu vyrastajú v podobe žltých kolónií a navyše klebsiely sú aj mukózne. Kmene, ktoré laktózu neštiepia (napr. *Salmonella* spp., *Proteus* spp., *Pseudomonas* spp.) tvoria na CLED pôde modré alebo modrozelené kolónie. Charakteristickou vlastnosťou tejto pôdy je, že tu dochádza k potlačeniu plazivého rastu u *Proteus* spp.

Na **selektívnych pôdach** (ako napr. **dezoxycholátová pôda** pre izoláciu gramnegatívnych baktérií, **Claibergova pôda** pre záchyt *Corynebacterium diphtheriae*, **žlč-eskulínový agar** a **Slanetz-Bartley agar** pre enterokoky) rastú len určité mikróby (väčšinou patogény), zatiaľ čo **rast nežiaducich (napr. bežná flóra) je potlačený**. Tieto pôdy obsahujú látky, ktoré cielene potláčajú rast určitých mikroorganizmov alebo celých skupín mikroorganizmov, pričom sa ako inhibičné faktory používajú soli ťažkých kovov, antibiotiká, farbivá a pod., alebo sú naopak ochudobnené o nejaké látky (napr. im chýba nejaká aminokyselina). K záchytu pôvodcu záškrtu sa používa Claibergova pôda, obsahujúca inhibítor telluričitan draselný, ktorý inhibuje rast gramnegatívnych baktérií. Ako selektívnu pôdu na izoláciu enterokokov možno okrem žlč-eskulínového agaru použiť aj Slanetz-Bartleyho agar s azidom sodným ako inhibítorom, kto-

rý je pre všetky mikroorganizmy okrem enterokokov toxický. Medzi selektívne médiá radíme aj **Löwenstein-Jensenovu** vajecnú pôdu, určenú k selektívnemu záchytu *Mycobacterium tuberculosis*, pričom ako inhibítor rastu grampozitívnych baktérií sa do tejto pôdy pridáva malachitová zeleň. Na izoláciu atypických mykobaktérií ako napr. *Mycobacterium avium* a *Mycobacterium kansasii* z pôdy ako ich potenciálneho zdroja sa používa selektívne médium Middlebrook 7H10 s inhibítorom rastu malachitovou zeleňou. **Tiosulfát-citrát-žlč-sacharózový agar** (TCZS) sa používa k selektívnemu záchytu *Vibrio cholerae* a taktiež iných vibrií. Sacharóza štiepiace vibriá (*Vibrio cholerae*) vyrastajú na pôde v podobe veľkých žltých kolónií. Tie, ktoré sacharózu neštiepia (*V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus*) tu tvoria veľké modrozelené kolónie. K selektívnemu záchytu baktérií možno použiť aj disky napustené antibiotikom, voči ktorému sú dané baktérie rezistentné. Príkladom je napr. selektívny záchyt hemofilov na čokoládovom/Levinthalovom agare po pridaní disku s bacitracínom, voči ktorému sú hemofily rezistentné, pričom dochádza k potlačeniu sprievodnej bakteriálnej flóry (bacitracín inhibuje hlavne grampozitívne koky). Na odlčenie bežnej flóry pri selektívnom záchyte *Neisseria meningitidis* z faryngeálnych vzoriek sa vzorky vyočkovávajú na krvný agar s VK diskom (disk s vankomycínom a kolistínom).

Selektívno-diagnostické pôdy spĺňajú súčasne vlastnosti selektívnych aj diagnostických pôd. Umožňujú simultánnu selekciu vybraných patogénov a potlačenie nežiaducich mikroorganizmov, a takisto záchyt určitého diagnostického znaku hľadaných baktérií. Väčšinou sa používajú k záchytu obligátnych patogénov zo stolice ako sú napr. salmonely a šigely. Medzi **selektívno-diagnostické pôdy** zaraďujeme napr. **Endov agar**, **Mac Conkeyov agar** a **dezoxycholátovú pôdu**. Selektívnou vlastnosťou týchto pôd je, že umožňujú rast gram negatívnych baktérií (rastú tu hlavne enterobaktérie), zatiaľ čo rast grampozitívnych baktérií je inhibovaný pridaním príslušného inhibítora do pôdy. Endov agar obsahuje ako inhibítor rastu zásaditý fuchsín. Inhibítorom rastu grampozitívnych baktérií na Mac Conkeyovom agare sú žlčové soli a kryštalická violeť. Endov agar, Mac Conkeyov agar a dezoxycholátová pôda sú zároveň aj pôdy diagnostické, možno na nich detegovať štiepenie laktózy u baktérií na nich rastúcich. Vďaka tejto diagnostickej vlastnosti – schopnosti baktérií na nich rastúcich štiepiť laktózu – ich voláme aj ako pôdy laktózo-ové. Baktérie štiepiace laktózu tu vyrastajú v podobe ružových až tmavo červených kolónií. Typickým zástupcom laktóza pozitívnych (laktózu štiepiacich) baktérií je napr. *Escherichia coli*, ktorá na laktózo-ových médiách (ako napr. na Endovej pôde) rastie v podobe tmavočervených kolónií, pričom aj samotná pôda sa v okolí kolónií sfarbuje do červena. Baktérie, ktoré laktózu neštiepia (laktóza negatívne) tvoria na laktózo-ových pôdach bledé bezfarebné kolónie.



Obr. 1.13.6. Mac Conkeyov agar.



Obr. 1.13.7. Mac Conkeyov agar laktóza+ červené kolónie *Klebsiella pneumoniae*.

Medzi laktóza negatívne baktérie sa zaraďujú napr. rody *Salmonella*, *Shigella*, *Proteus* a *Pseudomonas*. Ďalším diagnostic-

kým znakom baktérií *Proteus mirabilis* a *Proteus vulgaris* je ich tzv. plazivý rast na povrchu Endovej pôdy, rovnako ako aj na krvnom agare. Deoxycholatová pôda je selektívne-diagnostická pôda, ktorá umožňuje rast gramnegatívnych baktérií a inhibuje grampozitívne baktérie. Jej diagnostickým znakom je umožnenie produkcie sírovodíka, ktorý tu vytvárajú napr. salmonely a baktérie z rodu *Proteus*.



Obr. 1.13.8. Deoxycholatová pôda.



Obr. 1.13.9. Deoxycholatová pôda ružové kolónie *Citrobacter freundii* sfarbujúce sa do čiernej produkciou sírovodíka H_2S .

Chromogénne pôdy sú pôdy, ktoré obsahujú tzv. chromogén. Jedná sa o substráty ako napr. laktóza alebo glukóza, na ktoré je naviazaná molekula farbiva (**chromofór**). Mikroorganizmus absorbuje a enzymaticky štiepi chromogén na dve pôvodné časti, z ktorých sa skladá. Mikroorganizmus využije substrát pre svoj metabolizmus a uvoľnený, nerozpustný farebný chromofór sa zhromažďuje v mikrobiálnej bunke. Výsledkom je, že mikróby vyrastajú na chromogénnom médiu vo forme farebných kolónií. Chromogénne médiá často obsahujú dva a viac chromogénov, čiže rôzne mikroorganizmy vyrastajú na chromogénnom médiu v podobe rôznofarebných kolónií. Príkladom chromogénneho média je tzv. Uriselect médium, ktoré sa používa v diagnostike močových patogénov. Obsahuje dva chromogény, ktoré slúžia na detekciu β -galaktozidázy a β -glukozidázy. Kmene produkujúce β -galaktozidázu (ako napr. *Escherichia coli*) tvoria na Uriselect médiu ružové kolónie. Tie, ktoré produkujú β -glukozidázu (napr. enterokoky, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp.) vyrastajú na tejto pôde vo forme tyrkysovomodrých, alebo modrofialových kolónií. V Uriselect médiu je takisto prítomný tryptofán. Kmene, ktoré ho štiepia (*Proteus* spp., *Morganella* spp., *Providencia* spp.), produkujú enzým tryptofán deamináza a na pôde vytvárajú oranžovohnedé kolónie.



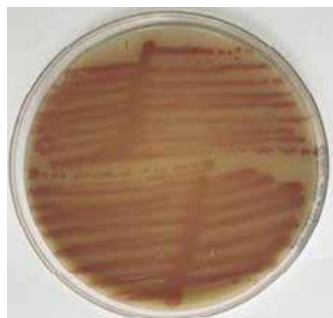
Obr. 1.13.10. Uriselect médium.



Obr. 1.13.11. Uriselect médium tyrkysové kolónie *Klebsiella pneumoniae*.

Medzi najznámejšie **transportné médiá** s univerzálnym použitím zaraďujeme **Stuartovo a Amiesovo médium**. Transportné médiá majú väčšinou (za účelom udržania dostatočnej vlh-

kosti prepravovaného materiálu) polotekutú konzistenciu a namiesto živín obsahujú látky, ktoré bránia metabolizmu baktérií (napr. redukujúce látky) a látky absorbujúce toxické produkty metabolizmu baktérií (napr. aktívne uhlie).



Obr. 1.13.12. Uriselect médium staroružové kolónie *Escherichia coli*.



Obr. 1.13.13. Uriselect médium oranžovohnedé kolónie *Pseudomonas aeruginosa*.



Obr. 1.13.14. Uriselect médium zmes tyrkysové kolónie *Enterococcus faecalis* a narúžové *Escherichia coli*.

Hlavnou úlohou **transportného média** je **udržať mikroorganizmy počas ich transportu do laboratória životaschopné (odtiaľ názov transportné médium)**, a **uchovať ich v takom stave (v rovnakej kvantite, bez pomnožovania)**, v akom boli vo vzorke počas samotného odberu. Stuartovo transportné médium bolo vyvinuté na transport klinického materiálu pri podozrení na kvapavku a trichomonózu. Amiesovo transportné médium je vhodné na transport aj tých najviac chúlостivých mikroorganizmov. Transportné médium **Cary-Blair** je vhodné na transport **anaeróbných baktérií, mykobaktérií a gramnegatívnych baktérií**.

Na rutinné **stanovenie citlivosti** rastovo nenáročných baktérií voči antibiotikám kvalitatívnym diskovým difúznym testom sa používa **Mueller-Hintonovej agar (MH agar)** bez prídavku krvi.



Obr. 1.13.15. MH agar antibiotickej citlivosti.



Obr. 1.13.16. MH agar stanovenie *Pseudomonas aeruginosa* s charakteristickým zeleným pigmentom.

V prípade baktérií, ktoré pre svoj rast vyžadujú obohatené médiá (krv) sa aj ich citlivosť stanovuje na médiu, v ktorom je obsiahnutá (MH agar s prídavkom zvieracej krvi). K určeniu minimálnych inhibičných koncentrácií (MIC) v kvantitatívnom teste citlivosti sa využíva MH bujón rovnakého zloženia ako jeho pevná forma bez prídavku krvi.

Pre prípad nízkeho počtu mikróbov v odobratom materiáli slúžia **pomnožovacie pôdy**. Sú to **tekuté** médiá, ktoré slúžia na pomnoženie baktérií pred ich izoláciou na pevnej pôde. Príkladom takýchto pôd je napríklad živný bujón obsahujúci hovädzi odvar, peptón a NaCl, slúžiaci na pomnoženie **bežných baktérií** bez špeciálnych rastových nárokov. **Selenitová pôda** sa používa na **selektívne pomnoženie salmonel** zo vzoriek stolice. Obsahuje látky (ako napr. peptón, seleničitan sodný a sacharidovú zložku), ktoré potlačujú množenie koliformných baktérií a umožňujú množenie salmonel a niektorých druhov šigel. Na selektívne **pomnoženie vibrií** sa používa **alkalická peptónová voda**. **Tioglykolátový bujón** slúži ako pomnožovacie médium pre aeróbne a anaeróbne baktérie. Existujú jeho viaceré modifikácie, ale väčšinou obsahuje kazeín, glukózu, kvasničný extrakt, cysteín a tioglykolát sodný. Pri jeho obohatení o hemín a vitamín K sa stáva vhodným médiom pre pomnoženie anaeróbov. Pre anaeróby sa taktiež používa **VL** (Viande-Levure) **bujón**.

Medzi jednotlivými kultivačnými pôdami neexistujú ostré hranice. Niektoré pôdy môžu súčasne slúžiť ako pôdy základné a diagnostické (napr. rast streptokokov a ich hemolýza na krvnom agare). Existujú viaceré pôdy, ktoré spájajú súčasne selektivitu s diagnostickými vlastnosťami (napr. rast *E. coli* a štiepenie laktózy na Endovom agare). V tabuľke 1.13.4. sa uvádza prehľad častejšie používaných kultivačných pôd.

INOKULÁCIA MIKROORGANIZMOV NA KULTIVAČNÉ PÔDY

Očkovanie mikroorganizmov – inokulácia je prenesenie skúmaných mikroorganizmov do sterilného kultivačného média. Spôsob očkovania materiálu na kultivačné pôdy (obr. 1.13.17.) závisí od toho, či chceme mikroorganizmus zachytiť a rozmnožiť (tekuté kultivačné pôdy) alebo súčasne získať aj izolované kolónie pre ďalšiu diagnostiku (kultivácia na pevných pôdach). Rast baktérií v navzájom od seba dobre izolovaných kolóniách získame prenosom buniek z kolónie primokultúry pomocou bakterio-logickej kľučky a ich rozočkovanie na povrchu novej pôdy. Kultivačné médium volíme podľa predpokladaného pôvodu ochorenia.

Primokultúra sa obyčajne zakladá na pevnej pôde. Jedná sa o zmiešanú kultúru viacerých druhov baktérií, ktorá je výsledkom prvej kultivácie mikroorganizmov priamo z infekčného materiálu. Ak sa predpokladá prítomnosť nízkeho počtu pôvodu ochorenia v odobratej vzorke, vzorku očkujeme okrem pevných pôd aj do tekutých médií a po pomnožení baktérií ich následne vyočkujeme na nové pevné pôdy.

Z primokultúry (väčšinou ide o zmes viacerých bakteriálnych druhov, prípadne kvasiniek) sa zakladajú subkultúry. **Subkultúra vzniká preočkovaním kolónií potencionálnych patogénov na nové pevné pôdy** s cieľom získať čistú bakteriálnu kultúru pre následnú identifikáciu príslušného patogénu diagnostickými postupmi ako sú napr. biochemické testy a následné stanovenie citlivosti voči antimikrobiálnym látkam.

Rast mikroorganizmov sa vyhodnocuje v závislosti od rýchlosti rastu mikrobiálneho druhu najčastejšie za 18 – 24 hodín. Kultivácia anaeróbných baktérií trvá približne 48 hodín až niekoľko dní a v prípade mykobaktérií rast pozorujeme až za niekoľko týždňov. V závislosti od konzistencie pôdy hodnotíme rôzne formy rastu. Rast baktérií v tekutých médiách (napr. enterobaktérií) sa zvyčajne prejaví vytvorením zákalu. Menej často baktérie vyrastajú v tekutých médiách vo forme blanky na povrchu pôdy (napr. pseudomonas), alebo vo forme sedimentu (napr. streptokoky). Často možno pozorovať aj kombinácie ich jednotlivých foriem rastu. Baktérie izolované na pevných pôdach vyrastajú vo forme kolónií. Charakteristické črty

rastu niektorých baktérií na pevných pôdach umožňujú ich predbežnú diagnostiku aj na základe samotnej kultivácie. Pri hodnotení rastu baktérií si všimame ich charakteristické vlastnosti ako je napr. farba, veľkosť kolónií, zápach resp. vôňa, typ hemolýzy na krvnom agare a ich diadnostické vlastnosti (napr. schopnosť štiepenia laktózy na tzv. laktózových pôdach).

ANAERÓBNA KULTIVÁCIA

Nevyhnutnou a neoddeliteľnou súčasťou anaeróbnej kultivácie pre záchyt anaeróbných baktérií z klinického materiálu je odber materiálu vykonaný správnou technikou a zabezpečenie transportu v anaeróbnom prostredí (napr. odber materiálu do skúmavky s transportným médiom pre anaeróbne baktérie – t.j. transportné médium so zníženým oxidačno-redoxným potenciálom (Eh) v prostredí bez prítomnosti kyslíka a s indikátorom Eh, alebo odber tekutého materiálu do striekačky, z ktorej sa po nasatí vytesní vzduch a následne sa ihla zapichne do sterilnej gumenej zátky, pričom sa upevní pred odpadnutím prelepením lepiacou páskou).

Predpokladom úspešnej anaeróbnej kultivácie je výber vhodnej pôdy pre anaeróbne baktérie a zabezpečenie atmosféry bez prítomnosti kyslíka. Používajú sa kultivačné pôdy, ktoré majú znížený Eh (obsahujú redukujúce látky – cysteín, tioglykolát, vitamín C). Tieto pôdy môžu obsahovať aj rastové faktory podporujúce rast anaeróbných baktérií (hemín, vitamín K) a selektívne činidlá, ktoré potláčajú rast sprievodnej flóry. Pôdy slúžiace k záchytu anaeróbných baktérií sú napr. VL-agar, Schaedlerov agar, tioglykolátový bujón, VL-bujón. Kultivácia trvá približne 2 – 7 dní, v závislosti od rastu jednotlivých druhov baktérií. Zároveň sa simultánne overuje aj rast týchto baktérií na kultivačnom médiu určenom pre rast aeróbných baktérií v prítomnosti kyslíka, (ak nerastú v prítomnosti kyslíka potvrdí sa ich striktné anaeróbný metabolizmus alebo v opačnom prípade sa identifikujú ako fakultatívne anaeróby. Testované vzorky sa môžu očkovať napr. aj do tekutých médií (napr. VL-bujón) v skúmavkách, ktoré sa po inokulácii okamžite prevrstvia parafrínovým olejom.

Na kultiváciu anaeróbov sa na zabezpečenie vhodnej atmosféry používajú anaerostaty so špeciálnymi setmi, pomocou ktorých sa chemickou cestou vytvorí presne definovaná anaeróbná atmosféra (napr. Gas-pack). Anaerostaty sú hermeticky uzatvárateľné nádoby, do ktorých možno naukladať väčšie množstvo Petriho misiek (približne 10), ku ktorým sa priloží generátor plynov. Jedná sa o plastové vrecko obsahujúce zmes chemikálií, do ktorého sa nožnicami urobí otvor a následne sa sem pridá určené množstvo vody, čím sa aktivuje generátor plynov a anaerostat je potrebné rýchlo uzavrieť. Súčasťou anaerostatu je aj paládiový katalyzátor. V dôsledku chemických reakcií v anaerostate dochádza k vzniku zmesi dusíka, vodíka, CO₂ a vodnej pary a k vytvoreniu anaeróbného prostredia.



Obr. 1.13.18. Anaerostat s agarovými miskami a generátorom plynov.



Obr. 1.13.19. Anaeróbná kultivácia za použitia plastového vrecúška.

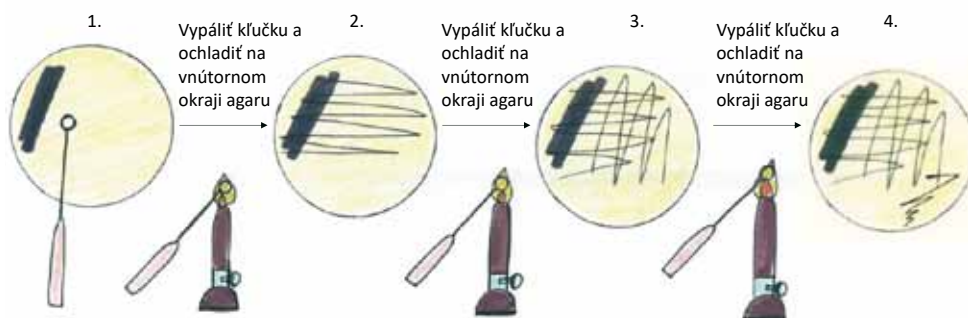
Na anaeróbnú kultiváciu menšieho počtu platní možno použiť špeciálne vrecúška, ktoré využívajú rovnaký princíp

Tab. 1.13.4. Prehľad vybraných kultivačných pôd.

Pôda/zaradenie podľa účelu	Základné zložky	Použitie
Živný bujón základná	mäsový extrakt, 0,5 % NaCl, 1 % peptón	tekutá pôda pre bežne rastúce baktérie
Živný agar základná	ako živný bujón + 1,5 % agar	pevná pôda pre bežne rastúce baktérie
Krvný agar univerzálna/základná diagnostická	živný agar, 2-5 % barania defibrinovaná krv	kultivácia väčšiny medicínsky významných baktérií a rastovo náročnejších, určovanie hemolýzy
Čokoládový/Levinthalov agar obohatená	živný agar, barania krv pridaná do 80 °C/100 °C agaru	kultivácia hemofilov a patogénnych neissérií
Claubergova pôda selektívno-diagnostická	živný agar, barania krv, glycerín, kálium telurit, cystín	selektívno-diagnostická pôda pre korynebaktérie
Selenitový bujón selektívno-pomnožovacia	peptón, laktóza, seleničitan sodný	selektívna a pomnožovacia pôda pre salmonely
Endova pôda selektívno-diagnostická	živný agar, laktóza, fuchsín (indikátor), siričitan sodný	kultivácia enterobaktérií, rozlíšenie skvasovaním laktózy
Dezoxycholátová pôda selektívno-diagnostická	živný agar, peptón, laktóza, soli železa, dezoxycholát sodný, neutrálna červen	kultivácia enterobaktérií, rozlíšenie skvasovaním laktózy a tvorbou sírovodíka
Mac Conkeyov agar selektívno-diagnostická	živný agar, peptón, laktóza, indikátory pH, žľčové soli	kultivácia enterobaktérií, rozlíšenie skvasovaním laktózy
Wilsonova-Blairova pôda selektívno-diagnostická	živný agar, bizmut-sulfitový roztok	izolácia salmonel
Meullerov-Hintonovej bujón/agar pôda na stanovenie citlivosti MO	mäsopeptónový bujón, škrob, agar, (barania krv)	pôda pre určovanie citlivosti na antimikróbné liečivá
Slanetz-Bartley agar selektívna	peptón, laktóza, tetrazólivá soľ	kultivácia enterokokov
Sabouraudova pôda po pridaní antibiotík selektívna pre plesne a kvasinky (inhibuje rast baktérií)	agar, peptón, 4 % glukóza, pH5,6 (antibiotiká)	kultivácia plesní a kvasiniek
Tioglykolátový bujón pomnožovacia	kazeín, glukóza, kvasničný extrakt, cysteín, tioglykolát sodný, hemín, vitamín K	pomnoženie anaeróbných baktérií
VL bujón/VL agar pomnožovacia/obohatená	peptón, kvasničný autolýzát, hovädzí odvar, cysteín, NaCl, glukóza, (agar)	pomnoženie a kultivácia anaeróbných baktérií
Schaedlerov bujón/agar pomnožovacia/obohatená	kazeinový hydrolyzát, peptón, kvasničný extrakt, hydrolyzát zo sójovej múčky, glukóza, NaCl, K_2HPO_4 , Tris (hydroxymethyl) aminomethan, L-cysteín, hemín (agar)	pomnoženie a kultivácia anaeróbných baktérií
CLED pôda diagnostická	agar, peptón, tryptón, laktóza, L-cysteín, sušený mäsový výťažok, brómtymolová modrá	pôda pre záchyt močových patogénov
Löwenstein-Jensenova pôda selektívna	agar, KH_2PO_4 , malachitová zeleň, citrát horečnatý, L-asparagín, glycerín, destilovaná H_2O	pôda pre selektívny záchyt mykobaktérií
Tiosulfát-citrát-žľč-sacharózový agar TCŽS selektívna	agar, kvasničný autolýzát, peptón, NaCl, sacharóza, tiosíran sodný, citrónan sodný, citrónan železito- amónny, hovädzia sušená žľč, brómtymolová modrá	selektívny záchyt <i>Vibrio</i> spp.
Uriselect chromogénne médium diagnostická	agar, zmes peptónov, tryptofán, zmes chromogénov, oxid kremičitý	pôda pre záchyt močových patogénov
Stuartovo médium univerzálne transportné médium	agar, glycerolfosfát sodný, L-cysteínhydrochlorid, tioglykolát sodný, $CaCl_2$, metylénová modrá	pôda pre transport aj rastovo náročných baktérií vrátane <i>Neisseria gonorrhoeae</i>
Amiesovo médium univerzálne transportné médium	Agar, NaCl, KCl, $CaCl_2$, tioglykolát sodný, $MgCl_2$, KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , aktívne uhlie	pôda pre transport aj rastovo náročných baktérií vrátane <i>Neisseria gonorrhoeae</i>
Alkalická peptónová voda selektívno-pomnožovacia	NaCl, peptónový hydrolyzát zvieracieho tkaniva	selektívna a pomnožovacia pôda pre vibriá
MIU pôda diagnostická	Agar, enzymatický kazeinový hydrolyzát, NaCl, KH_2PO_4	polotekutá pôda na dôkaz motility, tvorby indolu a dôkazu ureázovej aktivity u enterobaktérií
Hajnov agar	agar, kazeinový hydrolyzát, peptón, laktóza, sacharóza, glukóza, NaCl, fenolová červen, $Na_2S_2O_4$, citrát železitoamónny	polotekutá pôda na dôkaz štiepenia glukózy, laktózy a sacharózy, produkcie CO_2 a H_2S u enterobaktérií

tvorby anaeróbnej atmosféry. Anaeróbna atmosféra sa dá vytvoriť aj fyzikálnou cestou, kedy je anaerostat napojený na zariadenie na fyzikálnu evakuáciu vzduchu a na plnenie zmesou inertných plynov (80 % N_2 , 10 % CO_2 , 10 % H_2).

V prípade ak nedisponujeme generátorom plynov (plastové vrecúško obsahujúce zmes chemikálií) ani prístrojom na evakuáciu vzduchu a fyzikálnym plničom zmesi plynov, je alternatívou pre **fyzikálne vytvorenie mikroaeróbnej atmosféry je sviečka**, kedy po jej vložení do anaerostatu a zapálení sa ana-



Obr. 1.13.17. Schéma postupu očkovania na pevnú kultivačnú pôdu.

erostat uzavrie. Princíp takejto kultivácie potom spočíva v tom, že po spotrebovaní všetkého kyslíka obsiahnutom v anaerostate plameň sviečky zhasne.



Obr. 1.13.20. VL agar krémové kolónie *Propionibacterium* spp.



Obr. 1.13.21. Anaeróbna kultivácia *Propionibacterium* spp.

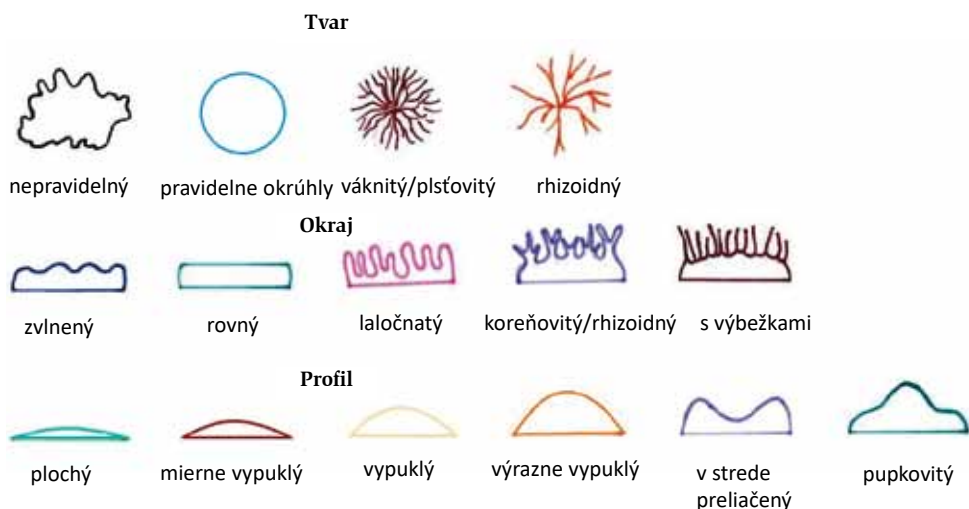
Ďalšou možnosťou ako **biologickou metódou** navodiť čiastočne anaeróbne (mikroaeróbne) podmienky je naočkovať na polovicu agaru s vyšetrovanou vzorkou aj **baktériu** *Serratia marcescens*, ktorá po precíznom utesnení Petriho misky spotrebuje všetok kyslík, ktorý v nej bol obsiahnutý. Najdokonalejší spôsob anaeróbného spracovania materiálu a anaeróbnej kultivácie umožňuje anaeróbny box, ktorý obsahuje hermeticky uzavretý anaeróbny priestor s termostatom. Laboratórny pracovník pri práci používa vzdychotesné gumené pracovné návleky na ruky, ktoré sú pripojené k otvorom v prednej stene boxu.

1.13.4.1 Rast mikroorganizmov na živnej pôde a jeho hodnotenie

Rast mikroorganizmov sa vyhodnocuje v závislosti od rýchlosti rastu mikrobiálneho druhu najčastejšie za 18-24 hodín. Kultivácia anaeróbných baktérií trvá približne 48 hodín až niekoľko dní a v prípade mykobaktérií rast pozorujeme až za niekoľko týždňov. V závislosti od konzistencie pôdy hodnotíme rôzne formy rastu. Rast baktérií v tekutých médiách (napr. enterobaktérií) sa zvyčajne prejaví vytvorením zákalu. Menej často baktérie vyrastajú v tekutých médiách vo forme blanky na povrchu pôdy (napr. *Pseudomonas* spp.), alebo vo forme sedimentu (napr. streptokoky). Často možno pozorovať aj kombinácie ich jednotlivých foriem rastu. Baktérie izolované na pevných pôdach vyrastajú vo forme kolónií. Počas inkubácie naočkováných agarových médií sa za vhodných podmienok z každej bunky rozmnožovaním geometrickým radom vytvorí kolónia. Kolónia teda predstavuje bakteriálnu masu, ktorá je potomstvom jednej bunky (klon). Za konštantných podmienok je vzhľad kolónií charakteristický pre určitú skupinu alebo dokonca rod, prípadne druh baktérií. Charakteristické črty rastu niektorých baktérií na pevných pôdach umožňujú ich predbežnú diagnostiku aj na základe samotnej kultivácie. Pri hodnotení rastu baktérií si všimame ich charakteristické vlastnosti ako je napr. farba, veľkosť kolónií, zápach resp. vôňa, typ hemolýzy na krvnom agare a ich diagnostické vlastnosti (napr. schopnosť štiepenia laktózy na tzv. laktózových pôdach).

Pri posudzovaní bakteriálnych kolónií si teda všimame nasledujúce znaky:

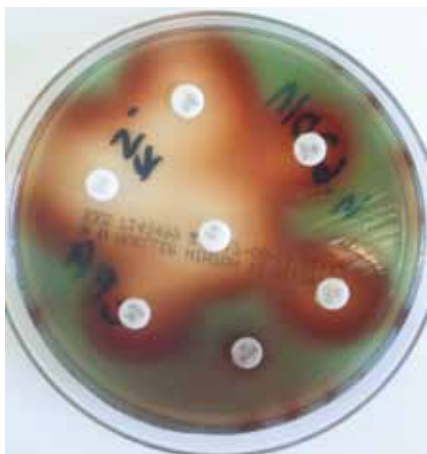
1. **Veľkosť** – kolónie môžu byť bodkovité alebo sa ich merateľná veľkosť vyjadrí (priemerom v mm); v mikrobiologickej



Obr. 1.13.22. Hodnotenie rastu mikroorganizmov na agare podľa tvaru, okraju a profilu kolónií (upravené podľa <https://microbiologyonline.org/teachers/observing-microbes/observing-bacteria-in-a-petri-dish>).

praxi sa konvenčne veľkosť kolónií hodnotí na veľmi malé, malé, stredne veľké a veľké.

2. **Tvar** – kolónie sú pravidelne okrúhle, nepravidelné, vláknité.
3. **Okraje** – rovné, zvlhčené, s výbežkami, koreňovité, laločnaté.
4. **Profil** – plochý, mierne vypuklý, vypuklý, výrazne vypuklý, pupkovitý, vyvýšený (obr. 1.13.22).
5. **Povrch** – lesklý, hladký, matný, drsný, zvráskavený a pod.
6. **Transparencia** – priehľadná, priesvitná, nepriesvitná.
7. **Farba** – bezfarebné, sivobiele (väčšina medicínsky významných druhov), vlastná farba kolónií (farba daná tvorbou pigmentu, napr. *Micrococcus luteus* alebo *S. aureus* – žltá, *M. roseus* – ružová, *Serratia marcescens* – korálovo červená, *Chromobacterium violaceum* – fialová a iné) a arteficiálne vizuálne zmeny kolónií, napr. vznik kovovo zrkadiacich pigmentov na vyrastených kolóniách *E. coli* na EMB agare (eozín metylénová modrá), alebo farebnou zmenou indikátora v živnej pôde (napr. laktózu štiepiace a neštiepiace enterobaktérie na selektívne diagnostických pôdach s laktózou).
8. **Zmeny okolia kolónií** – posudzujeme zmenu farby (produkcia vo vode rozpustných pigmentov *Pseudomonas aeruginosa* – obr. 1.13.23), zmena pH média – zmena farby indikátora, na KA si všímame stupeň hemolýzy erytrocytov:
 - čiastočná hemolýza – α hemolýza (zozelenanie okolia kolónie – viridácia),
 - úplná – β hemolýza,
 - bez viditeľnej hemolýzy – γ hemolýza.



Obr. 1.13.23. MH agar – uvoľňovanie vo vode rozpustných pigmentov (pyocyanín, pyoverdín a pyorubín) do média u niektorých kmeňov *P. aeruginosa*).

9. **Konzistencia** – mazľavá, maslovitá, drobivá, vosková, hlienovitá.
10. **Zápach** – fekálny, hnilobný, kyslý, sladkastý, jasmínový a pod. (vo veľkej miere je hodnotenie či ide o vôňu či zápach subjektívny znak, závislý od hodnotiteľa, ale tak či onak, je vždy pre každého charakteristický a nezameniteľný).
11. **Fenomény rastu** – ako napr. satelitizmus – rast *Haemophilus influenzae* v zóne β -hemolýzy *Staphylococcus aureus* v podobe drobných priehľadných kolónií a Rausov fenomén, ktorý je charakterizovaný tzv. plazivým rastom *Proteus* spp. (rast v príbojových vlnách, kedy *Proteus* spp. v priebehu jedného dňa pokryje od miesta inokulácie celú Petriho misku) na krvnom agare ako aj na Endovej pôde.
12. Niektoré druhy mykobaktérií vykazujú schopnosť **fotochromogenity**. Fotochromogénne mykobaktérie, *M. kansasii* a *M. marinum*, obsahujú nefarebné prekursor, ktoré sa po expozícii viditeľnou časťou svetla a za prítomnosti vzduchu mení na žlté až oranžovo sfarbené deriváty beta karoténu. Kultivácia prebieha v dvoch sériách. Prvá séria skúmaviek sa kultivuje zabalená do tmavého papiera, druhá sa ponechá nezabalená. Po troch týždňoch inkubácie sa nezabalené

skúmavky vystavujú na dve hodiny účinku svetla. Fotochromogenita sa preukáže, ak majú kolónie v ožiarených skúmavkách žltú pigmentáciu kolónií, v porovnaní s neexponovanými, v ktorých rastú kolónie krémovej farby.

Je potrebné si uvedomiť, že kolónie rovnakého bakteriálneho druhu, dokonca aj toho istého bakteriálneho kmeňa môžu mať na pevných pôdach rôzny charakter tzv. **rastovej** či **disociačnej fázy**. Spravidla rozoznávame tri základné rastové fázy, označované ako fáza M, S, R.

Kolónie v **M-fáze** (**mucous** – hlienovitý) sú kolónie hlienovitého vzhľadu a konzistencie, pologuľovité vypuklé, ostro ohraničené, majú tendenciu sa zlievať. V preparáte z týchto kolónií sú baktérie opuzdrené, paličkovité baktérie sú kratšie, bunky streptokokov v tejto fáze sú častejšie po jednej, dvoch alebo len v krátkych retiazkach. Mikróby rastúce v tejto fáze sú spravidla najvirulentnejšie, predovšetkým vďaka prítomnosti púzdra. V tekutej pôde rastú tieto mikróby difúznym zákalom.

Kolónie v **S-fáze** (**smooth** – rovný, hladký) sú hladké, lesklé a plochejšie ako kolónie v M-fáze. Mikroskopicky sú paličky dlhšie, streptokoky tvoria dlhšie retiazky kokov. V tejto fáze baktérie netvorí púzdra. Virulencia kmeňov v S-fáze je nižšia ako kmeňov v M-fáze. V tekutej pôde rastú tieto mikróby najčastejšie takisto difúznym zákalom.

Kolónie v **R-fáze** (**rough** – drsný) sú na povrchu drsné, s nepravidelným okrajom, bývajú často radiálne zbrázdnené, s vyvýšeným stredom. Tieto mikróby rastú v tekutej kultivačnej pôde najčastejšie vo forme zrnitého sedimentu. Mikroskopicky ide o dlhé paličky až vlákna, koky bývajú častokrát pretiahnuté, usporiadané do dlhých retiazok. Virulencia týchto mikróbov je znížená, alebo im úplne chýba. Mikróby v R-fáze sa líšia od mikróbov toho istého kmeňa v M-fáze alebo S-fáze i antigénne. Majú obmedzenú antigénnu výbavu.

Fáza, v ktorej rastie určitý bakteriálny kmeň, nie je jeho stabilná vlastnosť. Okolité vplyvy môžu viesť k zmene disociačnej fázy jedným alebo druhým smerom. Pasážovanie kultúry na pevných pôdach vedie mnohokrát k postupnej degradácii pôvodnej M-fázy do fázy S alebo R, podobne, ako pasážovanie mikroorganizmov na nevnímavých jedincoch. Naopak, pasážovanie na vnímavých jedincoch, napr. vhodných laboratórnych zvieratách, vedie k zvýšeniu virulencie daného patogéna.

Okrem uvedených „klasických“ metód kultivácie sa do popredia dostávajú moderné metódy, ktoré významne urýchľujú izoláciu, pomnoženie a identifikáciu kultivovateľných mikroorganizmov. Takými sú napr. impedančné metódy (pozri subkapitolu 1.18 – Elektrochemické metódy v lekárskej mikrobiológii) alebo rádiometrická metóda, ktorá sa už niekoľko rokov používa na zrýchlenú kultiváciu mykobaktérií. Je založená na rádiometrickom meraní $^{14}\text{CO}_2$ produkovaného metabolizmom mykobaktérií. Ten vzniká premenou kyseliny palmitovej značenej izotopom ^{14}C , ktorá je prítomná v kvapalnom kultivačnom médiu.

Na princípe merania CO_2 tiež neradiometrický prístroj MB/Bacto. Metóda spočíva v spôsobe detekcie CO_2 , ktorá prebieha kolorimetricky. Na dne kultivačných fľaštičiek sú zabudované terčíky, ktoré naratajúcim množstvom oxidu uhličitého menia svoju farbu. Kultivačné automaty sú vybavené senzormi, ktoré svetelne a zvukovo hlásia zmeny farby jednotlivých terčíkov. Ďalšie novšie neradiometrické prístroje využívajú podobný spôsob detekcie, ale založený na meraní. Kultivačný systém MGIT (Mycobacterium Growth Indicator Tube) je systém, ktorý meria spotrebu kyslíka. Biologická vzorka sa dáva do špeciálnych fľaštičiek, vybavených kyslíkovým senzorom. Ako kultivačné médium je využívané selektívne Middlebrookovo 7H12B médium a v kultivačnej nádobe je na silikónovom uzávere upevnený fluorescenčný indikátor. Výsledná intenzita fluorescenčného žiarenia je meraná UV transluminátorom. Je priamo úmerná spotrebe kyslíka, a tým množstvu prítomných mykobaktérií.

LITERATÚRA

1. Goering R.V., Dockrell H.M., Zuckerman M. a kol.: Mimssova lékařská mikrobiologie. 5. vydanie. Praha: Triton, 2016.
2. Hu Y., Yu X., Zhao D. et al.: Isolation of nontuberculous mycobacteria from soil using Middlebrook 7H10 agar with increased malachite green concentration. *AMB Express*, 2017, 7: 1-6.
3. Klaban V.: Ilustrovaný mikrobiologický slovník. 1. vydání. Praha: Galén, 2005.
4. Liptáková A. a kol.: Mikrobiologická diagnostika pôvodcov infekčných ochorení pre študentov medicíny. 1. vydanie. Bratislava: UK, 2018.
5. Murray P.R., Rosenthal K.S., Pfaller M.A.: Medical microbiology. 8. Ed. Philadelphia: Elsevier, 2016.
6. Perry J.D., Butterworth L.A., Nicholson A. et al.: Evaluation of a new chromogenic medium, Uriselect 4, for the isolation and identification of urinary tract pathogens. *Journal of Clinical Pathology*, 2003, 56: 528-531.
7. Petrovičová A.: Praktické cvičenia z lekárskej virológie. 1. vydanie. Bratislava: Univerzita Komenského Bratislava, 1996.
8. Slobodníková L. a kol.: Príručka na praktické cvičenia z mikrobiológie. 1. vydanie. Bratislava: Univerzita Komenského Bratislava, 2005.
9. Votava M.: Kultivační půdy v lékařské mikrobiologii. 1. vydání. Brno: Hortus, 2000.
10. Votava M. a kol.: Lékařská mikrobiologie speciální. 1. vydání. Brno: Neptun, 2006.
11. Votava M.: Lékařská mikrobiologie obecná. 2. vydání. Brno: Neptun, 2005.
12. Leland D.S., Ginocchio C.C.: Role of Cell Culture for Virus Detection in the Age of Technology. *Clinical Microbiology Reviews*, 2007, 20(1): 49-78. doi:10.1128/CMR.00002-06.
13. Hui-Yuen J., McAllister S., Koganti S., Hill E., Bhaduri-McIntosh S.: Establishment of Epstein-Barr Virus Growth-transformed Lymphoblastoid Cell Lines. *Journal of Visualized Experiments, JoVE*, 2011, 57: 3321. doi:10.3791/3321
14. Olivo P.D.: Transgenic cell lines for detection of animal viruses, *Clin Microbiol Rev*, 1996, 9(3): 321-334.
15. Ahmed N.H.: Cultivation of parasites. *Tropical Parasitology*, 2014, 4(2): 80-89. doi:10.4103/2229-5070.138534.
16. Weng Y. et al.: A simple and cost-saving phenotypic drug susceptibility testing of HIV-1, *Scientific Reports*, 2016, 6, Article number 33559.
17. Christos J. et al.: A Novel Phenotypic Drug Susceptibility Assay for Human Immunodeficiency Virus Type. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2000, 44(4): 920-928. DOI: 10.1128/AAC.44.4.920-928.2000



Mikrobiologické laboratórne vyšetrenie je zamerané na určenie infekčného agensa, ktorý môže byť etiologickou príčinou ochorenia alebo sa môže na ochorení podieľať.

Priama mikrobiologická laboratórna diagnostika je zameraná na dôkaz pôvodcu ochorenia stanovením prítomnosti mikroorganizmov alebo ich súčastí (antigénov, toxínov) v biologickom materiáli. Súčasťou priamej mikrobiologickej diagnostiky je mikroskopické vyšetrenie biologického materiálu, kultivácia baktérií a ich identifikácia do rodov a druhov, prípadne biotypov, sérotypov, antigénnych typov a stanovenie citlivosti voči antimikrobiálnym látkam. Presná, vo väčšine prípadov druhová, identifikácia izolovaných bakteriálnych pôvodcov ochorení je dôležitá pre určenie pôvodcu ochorenia, vo vzťahu k testovaniu citlivosti voči antimikrobiálnym látkam a k interpretácii testov, ktorá je pre jednotlivé skupiny, rody a druhy baktérií a antimikrobiálne látky rôzna. Ako príklad možno uviesť určovanie metilínovej rezistencie kmeňov *Staphylococcus aureus* a koaguláza negatívnych stafylokokov prostredníctvom rozdielnych veľkostí inhibičných zón cefoxitínu v diskovom difúznom teste alebo hodnôt MIC v dilučných testoch. Vyhodnotenie testu vyžaduje presnú druhovú identifikáciu na zvolenie správnych testovacích a interpretačných kritérií. Druhová identifikácia baktérií je aj základom pre rešpektovanie prirodzenej (vrodenej) rezistencie bakteriálnych rodov alebo druhov voči antimikrobiálnym látkam (napr. prirodzená rezistencia enterokokov a *Listeria monocytogenes* voči cefalosporínom). Presná identifikácia tvorí základ pre epidemiologické sledovanie výskytu pôvodcov nozokomiálnych nákaz a rezistentných kmeňov.

Podmienkou správnej identifikácie baktérií je okrem výberu vhodných a relevantných testov pre príslušný bakteriálny druh práca s čistou bakteriálnou kultúrou v exponenciálnej fáze rastu.

Identifikácia bakteriálneho druhu sa zvyčajne vykonáva testovaním enzymatickej výbavy a metabolickej aktivity pomocou metabolických biochemických testov (biochemická identifikácia baktérií), ktoré sú pre jednotlivé druhy baktérií charakteristické a prejavujú sa vo fenotype bakteriálneho kmeňa.

Identifikácia sa vykonáva buď orientačne jednoduchým alebo viacerými metabolickými testami alebo pomocou komerčne vyrábaných zostáv testov.

Princíp testovania:

V teste je prítomný špecifický substrát a chemický indikátor. Základným princípom, používaným pri väčšine metabolických testov, je sledovanie pôsobenia baktérie a jej enzymatickej výbavy na dodaný definovaný substrát, ktorý sa vplyvom enzymatickej aktivity môže meniť na špecifický produkt odlišný od substrátu. Vzniknutý produkt sa môže líšiť zmenou farby (chromogénnou zmenou substrátu z bezfarebného na farebný produkt) alebo skupenstvom alebo ho môžeme dokázať pomocou vhodného indikátora vzniknutého produktu. Štiepenie, utilizácia substrátu môže viesť k zmene pH prostredia (acidifikácia alebo alkalizácia média) a túto zmenu preukážeme zmenou farby pH indikátora.

Pri testovaní sa využíva detekcia enzymatických schopností baktérií:

- štiepiť sacharidy (cukry), napr. laktózu, glukózu, sacharózu, maltózu a iné,
- degradovať bielkoviny a aminokyseliny, napr. ornitín, lyzín, arginín,

- tvoriť zo substrátu ďalšie dokázateľné produkty (indol, sírovodík),
- štiepiť lipidy,
- utilizovať niektoré substráty, napr. využiť citrát sodný ako jediný zdroj uhlíka,
- meniť niektoré anorganické substráty.

Testy možno pripraviť ako:

- skúmavkové testy – pridaním konkrétneho substrátu do základného média v skúmavke (tekuté, polotuhé, tuhé – šikmo naliate), napr. tzv. pestrý rad cukrov alebo pridaním diskov s obsahom substrátu do roztoku s bakteriálnou kultúrou – ONPG test, VP (Voges-Proskauer) test, tributyrínový test,
- pridaním substrátu/substrátov do pevných kultivačných pôd alebo pridaním diskov s obsahom testovanej látky (obsah cukrov v kultivačnej pôde),
- samostatné a rýchle vykonanie niektorých testov použitím substrátu (katalázový test, plazmakoagulázový test),
- samostatné a rýchle vykonanie niektorých testov pomocou plastických stripov s reakčnou ploškou s obsahom substrátu, prípadne indikátora – oxidázový test, PYR test, dôkaz produkcie indolu,
- mikrotesty – testy možno pripraviť miniaturizované (analogicky ako na mikrotitračnej platničke), substráty sú pripravené komerčne v lyofilizovanom stave, kombinuje sa viacero testov v definovanom súbore testov,
- automatizované testovanie – kazety obsahujúce definované súbory testov na polo- alebo automatické spracovanie v automatizovaných systémoch.

Testy môžu prebiehať na pevnej kultivačnej pôde, v tekutom médiu v skúmavke, testovať môžeme pomocou testovacích diskov alebo prúžkov.

Pre jednotlivé skupiny baktérií je potrebné vybrať vhodný súbor rozlišovacích testov, ktoré umožňujú identifikáciu baktérií. Na základe viacerých charakteristík môžu byť vyvinuté pravdepodobnostné modely identifikácie. Princípom vyhodnotenia je zaradenie izolátu do taxónu.

Priamo z izolovaných kolónií možno testovať:

Katalázový test

Aeróbne baktérie sú schopné rozkladať peroxid vodíka (H_2O_2) vznikajúci v priebehu aeróbnej respirácie buď pomocou enzýmu peroxidáza (bez vzniku plyného kyslíka) alebo kataláza (za vzniku plyného kyslíka). Kataláza tým chráni baktérie pred toxickým účinkom H_2O_2 .

Princípom testu je schopnosť enzýmu kataláza štiepiť H_2O_2 na vodu a kyslík.

Na test sa používa 3 % H_2O_2 . Test vykonáme tak, že na podložné sklíčko (alebo do skúmavky) kvapneme malé množstvo H_2O_2 a pridáme testovanú bakteriálnu kolóniu. V prípade pozitívnej reakcie príde k štiepeniu H_2O_2 a tvorbu kyslíka môžeme pozorovať ako prítomnosť bubliniek (unikanie kyslíka) (obr. 1.14.1).

Test používame napr. na rýchle orientačné odlíšenie stafylokokov a streptokokov. Stafylokoky sú kataláza pozitívne (tvoria katalázu), streptokoky a enterokoky sú kataláza negatívne. Potrebne je jemné nabratie testovanej kolónie, aby sme sa vyhli nabratiu krvného agaru s obsahom erytrocytov, čo by mohlo viesť k falošne pozitívnej reakcii.



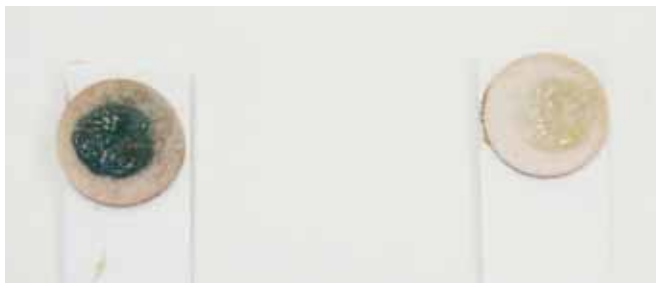
Obr. 1.14.1. Katalázový test. Vľavo v kvapke H_2O_2 negatívna reakcia po pridaní testovanej kultúry (streptokoky), vpravo pozitívna reakcia (stafylokoky) (foto M. Straka).

Oxidázový test

Oxidázový test je rýchly diagnostický test, vhodný na prvotné odlíšenie oxidáza negatívnych enterobaktérií od vibrií a aeromonád a tiež na rozlíšenie oxidáza pozitívnych gramnegatívnych nefermentujúcich paličiek *Pseudomonas* spp. od oxidáza negatívnych gramnegatívnych nefermentujúcich paličiek *Acinetobacter* spp. Test umožňuje aj odlíšenie oxidáza pozitívnych kolónií rodu *Neisseria* a *Moraxella*.

Princípom testu je detekcia enzýmu cytochrómozidáza.

Test sa vykonáva buď pomocou filtračného papierika, ktorý je napustený zmesou alfa-naftolu a tetrametyl-p-fenyléndiamínu alebo komerčne vyrábaným prúžkom s reakčným terčíkom obsahujúcim reakčnú zmes (obr. 1.14.2). Reakčný terčík sa zvlhčí vodou a na jeho povrch sa platinovou alebo plastovou kľučkou nanesie testovaná kolónia. V prípade pozitívnej reakcie (prítomnosť cytochrómozidázy) príde v mieste nánosu takmer okamžite k zmodraniu reakčnej plochy.



Obr. 1.14.2. Oxidázový test. Vľavo pozitívna reakcia (zmodranie reakčnej plošky po nanesení testovanej bakteriálnej kultúry) *Pseudomonas* spp., vpravo negatívna reakcia Enterobacteriaceae *E. coli*.

PYR test

PYR test je rýchly kolorimetrický test na predbežnú identifikáciu a rozlíšenie niektorých skupín baktérií.

Princípom PYR testu je detekcia enzýmu pyrolidonyl aminopeptidáza (pyrolidonyl arylamidáza, PYRáza), ktorej prítomnosť je charakteristická pre všetky druhy enterokokov. Zo streptokokov produkuje tento enzým iba *Streptococcus pyogenes* (sk. A). Test sa preto využíva na rýchle odlíšenie enterokokov (sk. D) od ostatných streptokokov a tiež na odlíšenie *S. pyogenes* od ostatných skupín beta-hemolytických streptokokov (obr. 1.14.3).

Obr. 1.14.3. PYR test. Vľavo pozitívna reakcia (sčervenanie reakčnej plošky) v mieste nanesenia testovanej kultúry *Streptococcus pyogenes*, vpravo nezmenené sfarbenie po nanesení kultúry betahemolytického streptokoka skupiny C.

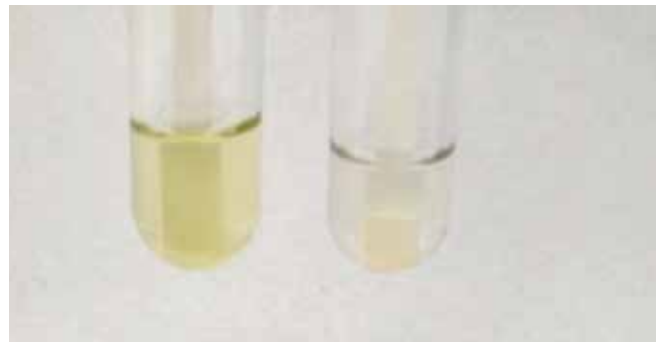


Princíp testu je hydrolýza β -naftylamidu kyseliny pyroglutámovej bakteriálnou pyrolidonyl arylamidázou a reakcia je detegovaná reakciou s p-dimethylaminocinamaldehydom, obsiahnutým v roztoku činidla pre test PYR, za vzniku červeného sfarbenia.

ONPG test

Test slúži na detekciu beta-galaktosidázy.

Princíp testu: substrátom je o-nitrofenyl- β -D-galaktopyranosid, ktorý sa bakteriálnym enzýmom beta-galaktosidázou rozkladá za uvoľnenia žltého o-nitrofenolu. Test sa používa na odlíšenie salmonel, ktoré sú ONPG negatívne, napr. od ONPG pozitívnych citrobakterov (obr. 1.14.4). ONPG test možno použiť aj v diagnostike *Neisseria meningitidis*.



Obr. 1.14.4. ONPG test. Po pridaní reakčného pásika pre ONPG test do suspenzie bakteriálnej kultúry vo fyziologickom roztoku a po inkubácii možno vľavo pozorovať pozitívnu reakciu (žlté sfarbenie) *Citrobacter* spp., vpravo negatívna reakcia (bez zmeny sfarbenia) *Salmonella* spp. (foto J. Havelová).

Ďalšie metabolické testy

Testovanie sacharolytických vlastností

Termín fermentácia je voľne používaný na označenie schopnosti baktérií utilizovať cukry, napr. laktózu (laktózu fermentujúce a laktózu nefermentujúce baktérie).

Fermentácia je definovaná ako oxidačno-redukčný metabolický proces prebiehajúci v anaeróbnom prostredí, kde namiesto kyslíka je terminálnym akceptorom vodíka (elektrónov) organická zlúčenina. V bakteriologických testoch je tento proces detegovaný zmenou farby pH indikátora, pretože dochádza k tvorbe kyslých produktov.

K acidifikácii testovacieho média môže dôjsť aj degradáciou sacharidov inými procesmi ako fermentáciou alebo môže testovacie médium obsahovať iné substráty, ktoré vedú k tvorbe kyslých koncových produktov.

Sacharolytické vlastnosti sa dokazujú v pôdach s 1 % obsahom sacharidu (cukrové pôdy). Pri skvasovaní sacharidu dochádza k okyseleniu pôdy vplyvom kyslých medziproduktov a produktov, ktoré sa deteguje zmenou farby použitého pH indikátora (fenolová červená, brómtymolová modrá).

K často používaným reakciám patrí štiepenie laktózy. Laktóza je pridávaná ako substrát do niektorých diagnostických, resp. selektívno-diagnostických médií, ako je MacConkey agar, dezoxycholatová pôda na odlíšenie laktózu skvasujúcich (laktóza pozitívne) a laktózu neskvajúcich (laktóza negatívne) baktérií. Laktóza pozitívne baktérie skvasovaním laktózy vedú k zmene pH média, čo sa prejaví zmenou farby pH indikátora a vedie k tvorbe ružovo sfarbených kolónií, laktóza negatívne baktérie rastú v bledých, transparentných kolóniách (obr. 1.14.5).

Test štiepenia laktózy sa využíva ako jeden z prvých orientačných testov napr. na odlíšenie črevných patogénnych baktérií spôsobujúcich infekcie gastrointestinálneho traktu. Rody *Salmonella*, *Shigella* a *Yersinia* patria medzi laktóza negatívne baktérie na rozdiel od mnohých ďalších enterobaktérií, napr. *E. coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., ktoré sú laktóza pozitívne.



Obr. 1.14.5. MacConkey agar. V hornej polovici kultivačnej platne naočkované laktóza pozitívne baktérie *E. coli* tvoriace ružovo sfarbené kolónie, v dolnej polovici platne laktóza negatívne baktérie *Salmonella* spp. tvoriace bledé transparentné kolónie (foto J. Havelová).

Test štiepenia arabinózy sa používa ako jednoduchý test na rozlíšenie *Enterococcus faecalis* (neštiepi arabinózu) a *Enterococcus faecium* (štiepi arabinózu za vzniku žltého sfarbenia média).

Podobne možno dokázať využitie ďalších cukrov, napr. glukóza, maltóza, sacharóza, xylóza a i.

Testy štiepenia cukrov sú súčasťou súprav metabolických testov.

Tvorba plynu pri štiepení sacharidov

Konečným produktom oxidatívnej fosforylácie sacharidov je voda a CO_2 . Vznik plynu sledujeme v skúmavke s tekutým médiom s obsahom príslušného cukru, do ktorej je hore dnom vložená naplnená malá skúmavka, tzv. Dürhamova plynovka. Po 24 – 48 hod inkubácie sa zachytáva bublinka vznikajúceho plynu v plynovke. Reakcia je typicky negatívna pri dôkaze *Shigella* spp., ktoré na rozdiel od väčšiny enterobaktérií netvoria plyn.

Dôkaz dekarboxyláz

Na dôkaz dekarboxyláz používame roztok príslušnej aminokyseliny, napr. ornitín, lyzín, arginín. Pri ich degradácii v anaeróbných podmienkach vznikajú amíny, ktoré vedú k alkalizácii prostredia, čo sa deteguje zmenou farby pH indikátora (napr. brómtymolová modrá). Test je súčasťou súprav testov na identifikáciu napr. enterobaktérií, vibrií, stafylokokov.

Test deaminácie fenylalanínu je typickým testom (typická vlastnosť) rodu *Proteus* spp., využívame ho najmä na odlíšenie *Proteus* spp. od *Salmonella* spp.

Detekcia tvorby sírovodíka

Sírovodík (H_2S) sa tvorí pri odbúravaní aminokyselín s obsahom síry (cystín a cysteín). Tvorbu H_2S dokazujeme pridaním soli železa (citrát železitý, železitoamónny) do média, ktoré reagujú so vznikajúcim H_2S na čierne soli sírnika železitého. Reakcia sa prejaví na pevných kultivačných médiách, napr. dezoxycholátová pôda, XLD agar, Hajnova pôda rastom kolónií s čierno sfarbeným stredom (obr. 1.14.6 a 1.14.7). Dôkaz tvorby H_2S sa používa ako jedna z reakcií v diferenciácii salmonel od ostatných enterobaktérií (H_2S produkuje aj rod *Proteus* a *Citrobacter*, potrebné sú ďalšie diferenciálne testy).

Tvorba indolu

Indol vzniká ako degradačný produkt bakteriálneho metabolizmu aminokyseliny tryptofánu (štiepenie bielkovín, deaminácia tryptofánu) tryptofanázou. Pri reakcii dochádza k hydrolýze

tryptofánu za vzniku indolu (a pyruvátu a amoniaku). Indol dokážeme pridaním indikátora, ktorým je Kováčsovo alebo Ehrlichovo reagens (základom je p-dimetylaminobenzaldehyd, s ktorým tvorí červený prstenec (p-dimetylaminobenzaldehyd a aldehydová skupina). Reakciu môžeme pekne preukázať aj v skúmavke s pôdou MIU (motility, indol, urea) (obr. 1.14.8). Je to polotuhá pôda, pomocou ktorej zisťujeme schopnosť pohybu baktérií, tvorbu indolu a ureázovú aktivitu (obr. 1.14.10).



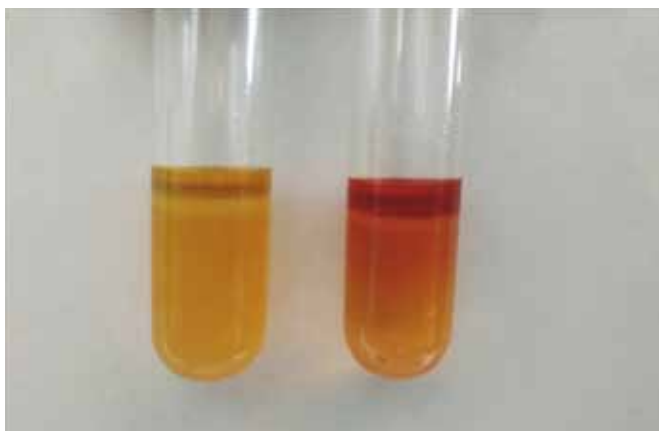
Obr. 1.14.6. Tvorba sírovodíka, dezoxycholátová pôda. V hornej polovici kultivačnej platne bakteriálna kultúra *E. coli*, netvorí sírovodík, rastie vo forme ružových (laktóza pozitívnych) kolónií, v dolnej polovici platne kultúra *Salmonella* spp. tvoriaca sírovodík, rastie vo forme bledých kolónií (laktóza negatívnych) s čierno sfarbeným stredom (foto J. Havelová).



Obr. 1.14.7. Tvorba sírovodíka, pôda podľa Hajna. Čierne sfarbenie dolnej časti pôdy pri raste kultúry *Salmonella Enteritidis* (vľavo), negatívna reakcia pri raste kultúry *E. coli* (vpravo), kde zároveň vidieť fermentáciu cukrov (žlté sfarbenie v celom objeme pôdy) a tvorbu plynu (roztrhanie pôdy, bubliny v pôde; foto M. Horniačková).

Dôkaz tvorby indolu slúži na diferenciáciu indol pozitívnych druhov enterobaktérií (napr. *E. coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Proteus vulgaris*) a indol negatívnych druhov (napr. *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae*, *Proteus mirabilis*), reakcia je súčasťou testovacích súprav.

Test možno pripraviť aj ako rýchly samostatný test pomocou indikátorových prúžkov s reakčnou ploškou, reakčným kruhom a pod., na ktoré sa nanáša vyšetřovaná bakteriálna kolónia.

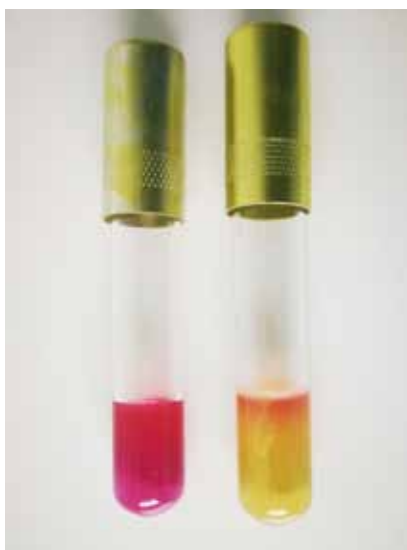


Obr. 1.14.8. Detekcia produkcie indolu v skúmavke s pôdou MIU. Po pridaní Kováčovho reagens je vpravo viditeľná pozitívna reakcia (vytvorenie červeno sfarbeného prstenca pri raste *E. coli*, vľavo negatívna reakcia (žltý prstenec) *Klebsiella pneumoniae* (foto J. Havelová).

Testovanie ureázovej aktivity

Ureázová aktivita, čiže schopnosť enzýmu ureáza štiepiť močovinu za vzniku amoniaku vedie k alkalizácii média, ktorú detegujeme pomocou pH indikátora (fenolová červen). Test sa často vykonáva na Christensenovej pôde, pôde MIU, na ktorej sa ureázová aktivita prejaví zmenou farby pôdy z bledožltej na ružovú (obr. 1.14.9). Ureázová aktivita je typická napr. pre rod *Proteus* spp., ale je negatívna u *Salmonella* spp., deteguje sa aj u *Helicobacter pylori*.

Na pôde MIU je možné aj testovanie pohyblivosti baktérií. Baktérie sa očkujú vpichom do pôdy a inkubujú 24 h. Nepohyblivé baktérie rastú iba v mieste primárnej inokulácie – v čiare vpichu a pôda v skúmavke zostáva priehľadná. Pohyblivé baktérie sú schopné rásť v celom objeme pôdy, aj mimo čiaru vpichu, čo sa prejaví zakalením pôdy. Medzi nepohyblivé baktérie typicky patrí rod *Klebsiella* a *Shigella*.

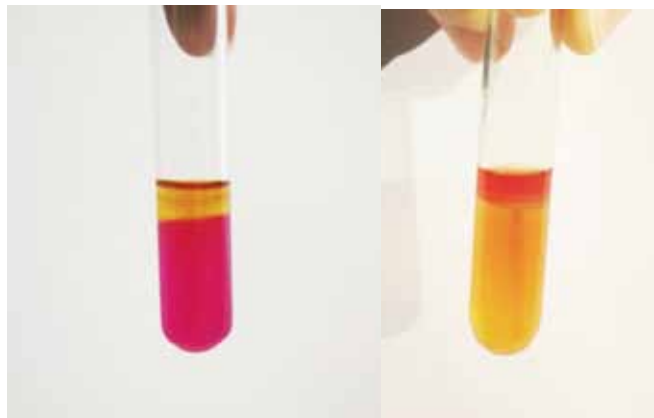


Obr. 1.14.9. Detekcia ureázovej aktivity na pôde MIU. Vpravo pozitívna reakcia *Proteus mirabilis*, ktorá sa prejaví ružovým sfarbením média, vľavo negatívna reakcia *Salmonella Enteritidis*.

Schopnosť využitia substrátu

Schopnosť využívať substrát citrát sodný ako jediný zdroj uhlíka sa deteguje na pôde označovanej ako Simmons-citrátová pôda. Indikátorom alkalizácie pH pri utilizácii citrátu je bróm-

tymolová modrá (zmena farby zo zelenej na modrú). Utilizácia citrátu je charakteristická pre rody enterobaktérií *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Proteus*, negatívna, resp. na pôde nerastie *E. coli*.



Obr. 1.14.10. Pôda MIU. Vľavo *Proteus mirabilis*, pozitívna ureázová aktivita (ružové sfarbenie pôdy) a negatívny test na produkciu indolu (žltý prstenec po pridaní Kováčovho reagens), vpravo *E. coli*, negatívna ureázová aktivita (žlté sfarbenie pôdy) a pozitívny test produkcie indolu (červený prstenec po pridaní Kováčovho reagens).

Oxidačno-fermentačný test (O/F test)

OF test je určený na rozlíšenie fermentatívneho a oxidatívneho metabolismu glukózy. Oxidatívne mikroorganizmy môžu metabolizovať glukózu alebo ostatné cukry v aeróbnom podmienkach (aeróbnym spôsobom), t.j. kyslík je terminálnym akceptorom vodíka (elektrónov), vznikajú slabé kyseliny. Ostatné organizmy fermentujú glukózu a akceptorom vodíka (elektrónov) je organická látka, vznikajú silné kyseliny. Na detekciu slabých kyselín pri oxidatívnom metabolizme je potrebné použitie citlivého polotuhého Hugh-Leifsonovho média (OF médium) so zníženým obsahom peptónu, s obsahom testovaného cukru (glukóza) približne 1 % a indikátorom pH (brómtymolová modrá).

Vpichom sa inokulujú dve skúmavky a jedna sa ihneď prelieva parafínovým olejom na vytvorenie anaeróbného prostredia a inkubujú sa 24 až 48 hod. Tvorba kyselín v médiu sa prejaví jeho zožltnutím.

Oxidatívne baktérie charakterizuje tvorba kyselín (žlté sfarbenie) v aeróbnej skúmavke a zelené (nedochádza k fermentácii) v anaeróbnej skúmavke.

Fermentujúce baktérie charakterizuje tvorba kyseliny (žlté sfarbenie média) v oboch skúmavkách – aeróbnej aj anaeróbnej.

V prípade nesacharolytických baktérií nedochádza v médiu k žiadnym zmenám ani v jednej skúmavke.

Test sa používa najmä na odlíšenie enterobaktérií a nefermentujúcich gramnegatívnych paličiek. *Enterobacteriaceae* vytvoria kyslú reakciu v celom objeme média v oboch skúmavkách.

Mikroorganizmy, ktoré nemôžu štiepiť cukry aeróbne ani anaeróbne, napr. *Alcaligenes faecalis*, vytvoria alkalickú reakciu v otvorenej skúmavke a v zatvorenej skúmavke nebude prítomná žiadna reakcia.

V diagnostike mykobaktérií sa ako skríningové testy využívajú metódy založené na odlišných biochemických vlastnostiach jednotlivých druhov mykobaktérií. Medzi základné biochemické testy patria produkcia niacínu, redukcia nitrátov a schopnosť rasti na pôdach s prídavkom hydrazidu kyseliny tiofén-2-karbónovej (TCH).

Na základe schopnosti tvoriť niacín odlišujeme *M. tuberculosis* od iných druhov mykobaktérií. Niacín produkovaný mykobaktériami tvorí deriváty s kyanidmi a za prítomnosti anilínu

sa vytvára žlté zafarbenie. Pozitívny výsledok tohto testu indikuje *M. tuberculosis*, pozitívny býva aj pri niektorých kmeňoch *M. bovis* BCG. Možná je aj tvorba niacínu aj pri *M. microti*, *M. chelonae* u pre niektorých kmeňoch *M. africanum* a *M. simiae*. *M. bovis* a ostatné mykobaktérie niacín netvoria.

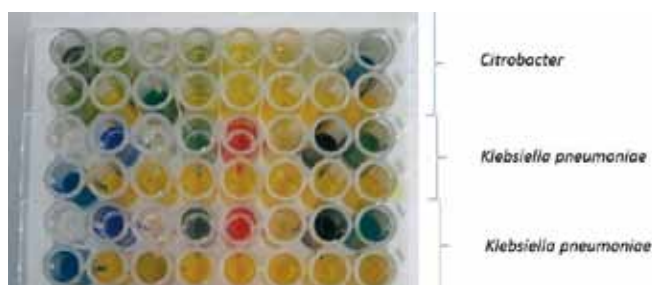
Enzymatické vlastnosti niektorých mykobaktérií sa zisťujú aj pomocou redukcie nitrátov na dusičnany, ktoré následne vytvárajú s detekčnými reagentami červenú zlúčeninu. Pozitívne vzorky sa tak prejavajú jasnočerveným zafarbením. Kontrola negativity testu sa vykoná pridaním zinkového prachu, kedy sa negatívny výsledok zafarbí na červeno. Pozitivita tohto testu určuje druhy *M. tuberculosis*, *M. kansasii*, *M. fortuitum* a *M. szulgai*. Typicky negatívny výsledok vychádza pri *M. bovis*, *M. avium-intracellulare*, *M. xenopi*, *M. chelonae* alebo *M. simiae*. Pri *M. bovis* BCG, *M. scrofulaceum* a *M. marinum* môže byť výsledok variabilný.

Test citlivosti na TCH slúži najmä k odlíšeniu *M. tuberculosis* a *M. bovis*. Vzorka mykobakteriálnej kultúry sa naočkuje na vaječnú pôdu prídavkom 1 mg TCH a súčasne na kontrolnú pôdu bez TCH. Rast *M. bovis* za prítomnosti TCH inhibovaný. Na pôde s TCH nerastie ani *M. bovis* BCG, ani *M. africanum*. *M. tuberculosis* a iné mykobaktérie sa na pôde s prídavkom TCH rozmnožujú.

Okrem týchto testov sa k druhovému určenie mykobaktérií využívajú ešte ďalšie testy založené na dôkaz biochemických a rastových vlastností.

Testovacie súpravy, automatizované testovanie

Samostatné jednotlivé testy nie sú na druhovú identifikáciu baktérií dostatočné. Potrebne je používať kombináciu vhodných testov, ktoré umožnia dostatočné rozlíšenie baktérií podľa ich metabolických vlastností. Podľa identifikačných algoritmov baktérií sa testy môžu skombinovať napr. do tzv. pestrej rady (skúmvakové testy) alebo možno použiť komerčne pripravené zostavy testov usporiadané na identifikáciu napr. grampozitívnych kokov, stafylokokov, enterokokov, gramnegatívnych palčiek, enterobaktérií, nefermentujúcich baktérií, anaeróbných baktérií a pod. Takéto identifikačné súpravy obsahujú lyofilizované substráty v miniaturizovaných množstvách, ku ktorým sa pridáva bakteriálna suspenzia čistej kultúry izolovaného kmeňa vo fyziologickom roztoku alebo výrobcom určenom suspenznom médiu, upravená na predpísanú hustotu inokula (množstvo kolónie tvoriacich jednotiek (KTJ)/ml). Potrebná hustota inokula je stanovená výrobcom testu a vyjadrená optickou densitou podľa tzv. McFarlandovej stupnice. Meria sa pomocou denzitometra. Inkubácia prebieha zväčša 18 – 24 hod pri teplote 37 °C, niektoré testy umožňujú aj skoršie odčítanie po niekoľkých (štyroch) hodinách. Mikrotesty v zostave buď obsahujú indikátory reakcie alebo sa reakcie hodnotia po pridaní indikátora alebo chemickej zlúčeniny na dôkaz vzniknutého produktu. Výsledkom je farebná zmena a každá reakcia sa vyhodnocuje ako pozitívna alebo negatívna (+ alebo -). Vyhodnotenie sa môže robiť voľným okom – sledujú sa farebné zmeny pri každej reakcii alebo je možné spektrofotometrické odčítanie pomocou spektrofotometra (obr. 1.14.11).



Obr. 1.14.11. Identifikačná súprava na identifikáciu gramnegatívnych enterobaktérií súpravou MIKROLATEST ENTEROtest 16 (Erba Lachema s.r.o., ČR) (foto: J. Havelová).

Samotná identifikácia baktérií kombináciou viacerých testov sa potom môže vykonať:

- manuálne porovnaním s identifikačnými alebo frekvenčnými tabuľkami (uvádzajú frekvenciu výskytu testovaných znakov);
- pomocou numerického kódovania;
- počítačovým spracovaním.

Manuálne porovnanie získaných pozitívnych a negatívnych výsledkov s identifikačnými alebo frekvenčnými tabuľkami je realizovateľné, iba ak zostava obsahuje malý počet testov (napr. šesť).

Castejšie však zostavy obsahujú aspoň 16, 24 alebo aj viac testov na zvýšenie pravdepodobnosti správnej identifikácie. Vyskytovať sa môžu aj atypické kmene, ktoré reprezentujú daný druh, avšak v niektorých vlastnostiach sa môžu od typického kmeňa líšiť. Väčšina metabolických charakteristík bakteriálneho druhu nemá striktné danú buď len pozitívnu (100%) alebo negatívnu (0%) hodnotu pre daný bakteriálny rod (biotyp), pri mnohých reakciách určité percento kmeňov môže vykazovať konkrétnu metabolickú aktivitu a malé percento kmeňov ju nevykazuje (alebo opačne). Napriek tomu má zostava umožniť s čo najväčšou pravdepodobnosťou správnu identifikáciu izolovanej baktérie a identifikovať aj atypické kmene, prípadne navrhnúť ďalšie dodatkové testy na spresnenie identifikácie.

Spôsoby identifikácie sú založené na údajoch identifikačnej matice (frekvenčnej matice a pod.), t.j. tabuľky obsahujúce taxóny, testy a percentá pozitívnych reakcií jednotlivých testov pre každý taxón.

Vyhodnotenie testov sa realizuje pomocou numerických kódovacích systémov, ktoré sú uvádzané v kódových knihách alebo sú vyhodnocované počítačovým identifikačným programom. Numerický kód je systém, pomocou ktorého sú viaceré identifikačné charakteristiky baktérií preložené do poradia číslíc, tzv. číselného (numerického) kódu, ktorý reprezentuje jeden alebo viacero bakteriálnych druhov.

Tvorba numerického kódu vychádza z identifikačných charakteristík a teda zo zápisu pozitívnych a negatívnych reakcií, označených + alebo -. Identifikačné charakteristiky sú prenesené do binárneho kódu (vyjadrené zápisom číslíc 1 a 0). Princípom identifikácie je prevedenie binárneho reťazca pozitívnych a negatívnych výsledkov do kratšieho oktalového kódu a určenie hodnoty tzv. profilu. Profily sú usporiadané v kódovej knihe a umožňujú jednoduché vyhľadanie výsledkov.

Tvorba numerického kódu: jednotlivé metabolické biochemické testy v zostave sú zoskupené do trojíc. Negatívne reakcie v každej trojici nadobúdajú číselnú hodnotu 0, pozitívne výsledky hodnotu 1, 2 alebo 4 (dané výrobcom testovacej súpravy). Sčítaním pozitívnych hodnôt jednotlivých reakcií v každej trojici sa získa oktalový kód (obr. 1.14.12).

A photograph of a MIKROLATEST ENTEROtest 16 identification card. The card contains a table for recording test results and a section for the final identification. The table has columns for various biochemical tests (H, G, F, E, D, C, B, A, H, G, F, E, D, C, B, A) and rows for different bacterial strains. The results are recorded as + (positive) or - (negative). The final identification section shows the name of the bacterium, Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae, and the numerical code, 546773.

Obr. 1.14.12. Vyhodnotenie jednotlivých pozitívnych a negatívnych reakcií testovaného izolátu *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* a vytvorenie numerického kódu v súprave MIKROLATEST ENTEROtest 16 (Erba Lachema s.r.o., ČR) (foto M. Straka).

Oktálové kódy, známe aj ako biotypové čísla, sú číselným vyjadrením prejavenej fenotypových charakteristík a sú jedinečné pre jednotlivé bakteriálne druhy. Každé číslo v oktálovom kóde reprezentuje tri biochemické metabolické vlastnosti a číslo samotné predstavuje vzorec pozitívnych a negatívnych reakcií. Oktálový kód, ktorý zodpovedá určitému taxónu, predstavuje najpravdepodobnejšiu identifikáciu testovaného kmeňa. Baktérie sú zoskupené do tzv. taxónov, ktoré reprezentujú skupiny mikroorganizmov na úrovni druhu alebo biotypu s rovnakými, resp. veľmi podobnými vlastnosťami.

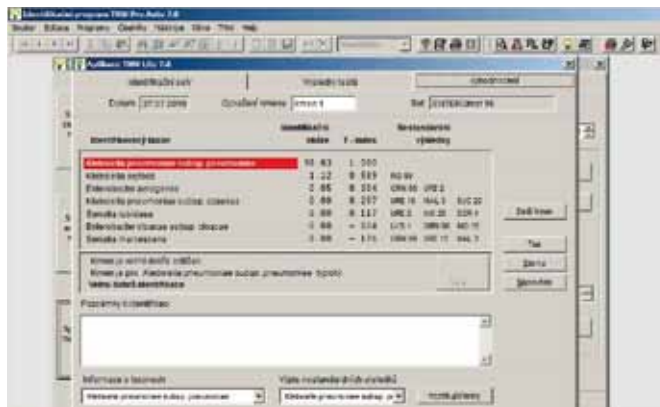
Výrobca testovacích súprav predpisuje spôsob hodnotenia jednotlivých testov v súprave a poskytuje príslušnú kódovú knihu alebo vyhodnocovací počítačový program.

Pri vyhodnení testov pomocou počítačového programu nemusí byť potrebné zisťovanie kódu. Po spektrofotometrickom odčítaní jednotlivých reakcií sú tieto prevedené priamo do počítačového programu a vyhodnotenie je urobené automaticky. Možno je aj odčítať reakcie vizuálne a zadať výsledky (+ a -) do počítačového identifikačného programu.

Identifikačný program poskytuje aj ďalšie údaje, ktoré je treba brať do úvahy pri identifikácii baktérie. Je to percento pravdepodobnosti (identifikačné skóre) a index typickosti (obr. 1.14.13).

Percento pravdepodobnosti vyjadruje pravdepodobnosť, s akou sa jedná o daný taxón, resp. s akou získaný výsledok zodpovedá danému taxónu. Vyjadruje sa v percentách.

Index typickosti určuje mieru zhody testovaného kmeňa s najtypickejším kmeňom pre daný taxón, uvádza teda, do akej miery výsledok zodpovedá najtypickejšiemu výsledku pre daný taxón. Nadobúda hodnotu 0 až 1 (1 znamená úplnú zhodu s typickým kmeňom). Nemá priamu súvislosť s percentom pravdepodobnosti. Ako už bolo spomenuté, atypické kmene môžu mať vysoké percento pravdepodobnosti, že patria k danému taxónu. Môže ísť aj o kmeň, pri ktorom nie je jasné rozlíšenie medzi dvoma veľmi podobnými druhmi a je potrebné zväziť atypické znaky (testy) a/alebo vykonať dodatočné rozlišujúce testy.



Obr. 1.14.13. Použitie vyhodnotenia reakcií identifikačnej súpravy baktérií pomocou počítačového programu (Erba Lachema s.r.o., ČR; foto A. Longauerová).

tifikáciu baktérií, preto mechanické odpísanie výsledku nemusí byť postačujúce a správne ani pri použití počítačového programu alebo numerického profilu. Uvedené kódy predstavujú charakteristické metabolické vlastnosti živých baktérií, ich jedinečný fenotypový prejav. Aj pri automatizovanom a počítačom hodnotení identifikácie je potrebné interpretovať identifikačné testy v súlade s ostatnými informáciami, charakteristikami neznámeho mikroorganizmu, ako sú morfológia kolónií, schopnosť rastu a reakcie na rôznych kultivačných médiách, morfológia buniek v Gramovom farbení, výsledky predbežných biochemických testov, citlivosť voči antimikrobiálnym látkam a klinický obraz infekcie (morfológické, kultivačné a klinické charakteristiky).

Možné chyby pri identifikácii môžu vyplývať z:

- nesprávne zvolenej zostavy testov pre daný bakteriálny izolát (chyba v identifikačnom algoritme) – napr. použitie gram-pozitívnej sady pre gramnegatívne baktérie, použitie zostavy iba pre enterobaktérie pre nefermentujúce gramnegatívne palčky a pod., použitie zostavy nezhrňajúcej daný izolát,
- použitie zmiešanej, kontaminovanej bakteriálnej kultúry,
- nesprávne pripravené inokulum,
- nesprávne vykonanie testu,
- nevyriešenie diskrepancií testovania, napr. vykonaním dodatkových testov.

Identifikácia môže byť nesprávna alebo neúplná, ak testovaný mikroorganizmus nie je súčasťou použitej zostavy testov.

Testovanie sa často vykonáva/vykonávalo v automatických systémoch identifikácie baktérií. V súčasnosti je identifikácia baktérií pomocou metabolických enzymatických vlastností nahradzaná inou metódou – hmotnostnou spektrometriou, ktorá má tiež svoje silné a slabé stránky a výsledky je potrebné hodnotiť celistvo. Baktérie sú meniace sa živé organizmy, preto v identifikácii je potrebné zvažovať aj ich fenotypové charakteristiky a na identifikáciu najmä zriedkavo sa vyskytujúcich alebo atypických kmeňov, kmeňov s nejasnou klinickou relevanciou môže byť potrebná aj kombinácia jednotlivých metód identifikácie.

LITERATÚRA

1. Diagnostický seznam pro MIKROLATEST®. Dostupné na: https://www.erbalachema.com/attachments/ENTEROtest%2024%20N_CZ.pdf <https://www.erbalachema.com/cz/produktova-podpora/pracovni-navody/pracovni-navody-mikrobiologie/>
2. Jorgensen J.H., Pfaller M.A. (eds): Manual of Clinical microbiology. 11. vydanie. Washington, DC.: ASM Press, 2015.
3. Public Health England: Introduction to the preliminary identification of medically important bacteria and fungi from culture. UK Standards for Microbiology Investigations. ID1 Issue 2. 2017. Dostupné na : <https://www.gov.uk/uk-standards-for-microbiology-investigations-smi-quality-and-consistency-in-clinical-laboratories>.
4. Slobodníková L. a kol.: Průručka na praktické cvičení z mikrobiologie. Bratislava: UK. ISBN 978-80-223-2808-1
5. Votava M. a kol.: Lékařská mikrobiologie vyšetřovací metody. Brno: Neptun, 2010.
6. Washington W., Allen S. (eds.): Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology. 6. vydanie. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2006.

Súčasťou akejkoľvek metódy mikrobiologickej diagnostiky je správna interpretácia získaných výsledkov. Platí to aj pre iden-

1.15 FAGOTYPIZÁCIA BAKTÉRIÍ

Straka M.

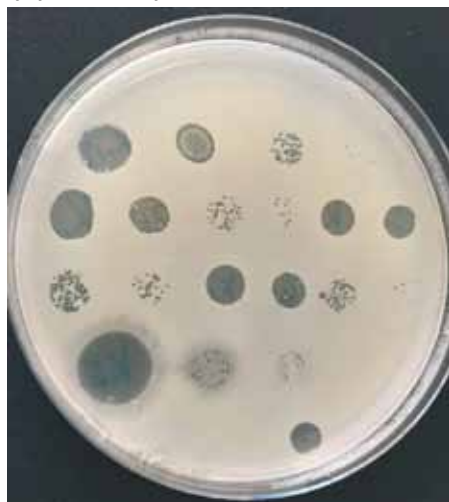


Fagotypizácia sa uplatňuje pri priamej diagnostike mikrobiálnych pôvodcov ochorení. Táto metóda využíva prirodzených bunkových parazitov (vírussy) baktérií – bakteriofágy (alebo skrátené fágy). Každý bakteriofág potrebuje pre iniciáciu infekcie baktérie špecifický antigén (receptor), ktorý sa nachádza na jej povrchu. Bakteriofágy teda napádajú bakteriálne kmene špecificky (len určité kmene baktérií, ktoré majú daný receptor). Schopnosť fágov infikovať bakteriálnu bunku preto odzrkadľuje jej antigénové vybavenie a môže sa tak využiť pri poddruhovej typizácii bakteriálneho kmeňa.

Fagotypizácia sa vykonáva v Petriho miskách s agarovým médiom, ktoré je vhodné pre rast vyšetřovaného bakteriálneho kmeňa. Na povrch média sa rovnomerne naočkuje bakteriálna suspenzia so štandardnou veľkosťou inokula. Po jej zaschnutí sa aplikujú typizačné lytické bakteriofágy, ktoré sú nariadené na pracovnú koncentráciu (minimálne množstvo bakteriofágov, ktoré spoľahlivo lyzuje príslušný druh baktérie). Takto pripravené platne sa inkubujú pri 37 °C 7 – 8 hodín. Citlivosť bakteriálneho kmeňa sa prejaví lýzou buniek a vznikom plaku v mieste inokulácie fága, ktorý je viditeľný voľným okom. Podľa vnímanosti vyšetřovaného bakteriálneho kmeňa na typizačné fágy sa určí jeho fagotyp.

Iná modifikácia fagotypizácie využíva fakt, že niektoré fágy nelyzujú bakteriálnu bunku, ale prechádzajú do lyzogénie, pričom sa ich nukleová kyselina stáva súčasťou bakteriálnej bunky. Takéto kmene baktérií sú potom nevnímavé voči fágu, ktorým sú lyzogenizované (fenomén interferencie).

Obr. 1.15.1. Plaky vzniknuté v mieste inokulácie bakteriofága v dôsledku lýzy bakteriálnych buniek (foto Z. Hubenáková).



Využitie fagotypizácie spočíva v epidemiologickej charakteristike zdroja a ciest šírenia bakteriálnej infekcie. Najčastejšie sa uplatňuje pri typizácii salmonel, najmä sérovarov *Salmonella Typhimurium* a *Salmonella Enteritidis*, ale aj ďalších. Tiež sa využíva pri charakterizácii šigel, stafylokokov a výnimočne aj iných baktérií. V súčasnosti je však fagotypizácia nahrádzaná molekulárno-genetickými typizačnými metódami.

LITERATÚRA

1. https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/media/en/healthtopics/food_and_waterborne_disease/toolkit/Documents/tool-07-1c-sub-typing-explained.pdf
2. Liptáková A. *et al.*: Mikrobiologická diagnostika pôvodcov infekčných ochorení pre študentov medicíny. Bratislava: Univerzita Komenského, 2018.
3. Rabsch W.: *Salmonella typhimurium* phage typing for pathogens. *Methods in Molecular Biology*, 2007, 394: 177-211.



Stanovenie citlivosti mikroorganizmov voči antimikrobiálnym látkam je dôležitým krokom a výsledkom mikrobiologickej laboratórnej diagnostiky. Tvorí neoddeliteľnú súčasť algoritmov priamej mikrobiologickej diagnostiky patogénnych mikroorganizmov a je základom racionálnej liečby infekcií.

V súčasnosti sme svedkami enormného šírenia sa rezistencie baktérií voči antimikrobiálnym látkam (antibiotikám), ktorá predstavuje globálnu hrozbu pre verejné zdravie. Antimikrobiálna rezistencia vedie k ohrozeniu života a zdravia pacientov, je spojená so zvyšovaním chorobnosti a letality, sťažuje až znemožňuje liečbu infekcií a infekčných komplikácií a prispieva k nárastu výdavkov na zdravotnícku starostlivosť.

Na vzniku antimikrobiálnej rezistencie sa podieľa nadmerné, neodôvodnené a neindikované podávanie antibiotík, ktoré vytvára selekčný tlak na vznik rezistentných kmeňov. K vzniku rezistencie významne prispieva aj používanie antibiotík v iných sektoroch, ako je zdravotníctvo; vo veterinárnej medicíne a v poľnohospodárstve za iným účelom, ako je liečenie infekcií. Vážnosť situácie a potreba jej globálneho riešenia viedla k prijatiu viacerých dokumentov a programov na úrovni Európskej komisie a Svetovej zdravotníckej organizácie (SZO). Predchádzanie antimikrobiálnej rezistencii a jej znižovanie vyžaduje koordinované úsilie mnohých organizačných (svetové, národné, miestne manažérske štruktúry) a výkonných zdravotníckych zložiek. Veľký dôraz je kladený na tímovú spoluprácu pri tvorbe a dodržiavaní pravidiel správneho používania antibiotík, ktoré je označované ako „antimikrobiálny stewardship“, správne používanie antibiotík. Podporuje sa tvorba tímov pre správne používanie antibiotík a antibiotických komisií s účasťou zástupcov viacerých medicínskych špecializácií – klinický farmaceut, klinický farmakológ, klinický mikrobiológ, infektológ, anesteziológ – intenzivista, zástupcovia chirurgických odborov, prípadne konzultant pre antibiotickú liečbu, nemocničný epidemiológ alebo hygienik, ktorí spolupracujú s ošetrojúcimi lekármi. Taktiež sa podporuje tvorba tímov na kontrolu šírenia infekcií, nozokomiálne infekcie, úloha nemocničného epidemiológa alebo hygienika. Tímy majú mať manažérsku podporu vedenia zdravotníckych zariadení. Dôležitým opatrením na zabránenie šírenia rezistentných mikroorganizmov v zdravotníckom zariadení je možnosť izolácie pacientov, ktorí majú infekciu alebo sú kolonizovaní epidemiologicky závažnými alebo multirezistentnými mikroorganizmami, na samostatných (jednolôžkových) izolačných izbách.

V procese sledovania vývoja antimikrobiálnej rezistencie, sledovania a hodnotenia prijatých intervencií na predchádzanie jej vzniku, výskytu a šírenia má nezastupiteľnú úlohu klinický mikrobiológ a mikrobiologická laboratórna diagnostika, poskytujúca základné údaje získané testovaním citlivosti mikroorganizmov voči antimikrobiálnym látkam.

Prečo je teda potrebné mikrobiologické vyšetrenie a testovanie citlivosti na antibiotiká?

Klinický mikrobiológ na základe mikrobiologického vyšetrenia poskytuje údaje o pôvodcovi ochorenia a jeho citlivosti voči antibiotikám, konzultuje nálezy s klinickým lekárom. Testovanie citlivosti poskytuje údaje na výber vhodného antibiotika pre individuálnu liečbu infekcie u pacienta, ktoré umožňujú predpovedať (predpokladať) úspech alebo zlyhanie liečby konkrétnym antibiotikom, teda pre racionálnu liečbu infekcií. Testovanie citlivosti zároveň vytvára nevyhnutné podklady pre

empirickú (kalkulovanú) liečbu v prípadoch závažných infekcií (infekcie centrálneho nervového systému, sepsa, ventilátorová pneumónia) a u pacientov v ťažkom stave, kedy je potrebné okamžité zahájenie správnej antimikrobiálnej liečby. Výber vhodného antibiotika pred vyšetrením citlivosti konkrétnych mikroorganizmov izolovaných z biologického materiálu pacienta je založený na základe sledovania výskytu rezistentných kmeňov a mechanizmov rezistencie v danej oblasti, nemocnici, na nemocničnom oddelení a podľa predpokladaného pôvodcu ochorenia. Pre rýchlu a správnu voľbu antibiotík sú nevyhnutné prehľady citlivosti/rezistencie. Lokálne (miestne) prehľady citlivosti a rezistencie vypracováva na základe testovania citlivosti mikrobiologické laboratórium pre jednotlivé nemocničné oddelenia, JIS, OAIM a pod. za určité časové obdobie (štvrtročne, mesačne, týždenne). Konkrétne údaje sú nevyhnutné pre antimikrobiálne „stewardship programy“.

Klinický mikrobiológ poskytuje tiež konzultačnú činnosť o správnom odbere a transporte materiálu, zabezpečuje poskytovanie klinicky relevantného a správneho laboratórneho testovania. Zúčastňuje sa na klinickom manažmente pacienta, ako súčasť konziliárnej činnosti priamo pri lôžku, zúčastňuje sa vizít na vybraných oddeleniach a poskytuje konzultačnú činnosť ohľadom správnej antimikrobiálnej liečby. Ako člen komisií v zdravotníckom zariadení (antibiotická komisia, nozokomiálna komisia a pod.) sa aktívne podieľa na tvorbe antibiotickej politiky (antibiotické formuláre, antibiotická profylaxia) na rôznych úrovniach s využitím údajov mikrobiologického testovania.

Detekcia rezistentných kmeňov, ich výskyt u pacienta alebo v zdravotníckom zariadení je dôležitá tiež z epidemiologického hľadiska. Poskytuje okamžité (rýchle, včasné) informácie o výskyte nebezpečných kmeňov nemocničným tímom, ktoré sa zaoberajú výskytom nozokomiálnych infekcií, na prijatie účinných opatrení (izolácia pacientov, protiepidemické opatrenia). Umožňuje sledovanie dlhodobých trendov výskytu rezistencie a kontrolu účinnosti prijatých opatrení.

Štandardizované vykonávanie testov citlivosti umožňuje nielen národné, ale aj medzinárodné porovnávanie výskytu antimikrobiálnej rezistencie. Takéto údaje sledovania rezistencie mikroorganizmov izolovaných z krvi pri infekciách krvného riečiska alebo pri infekciách centrálneho nervového systému sú pre krajiny Európskej únie zapojené do testovania a zberu údajov dostupné v databáze EARSNET.

Spracovanie údajov o výskyte bakteriálnej rezistencie (testovania citlivosti) sa používa na tvorbu antibiotickej politiky na rôznych úrovniach, lokálnej, nemocničnej – nemocničné protokoly, antibiotické formuláre a národnej politiky preskripcie liečiv.

Testovanie citlivosti vedie aj k získaniu informácií o pôsobení nových druhov liečiv.

Fenotypová detekcia rezistencie/citlivosti umožňuje zistiť výskyt nových, dovtedy neznámych mechanizmov rezistencie alebo rezistentných mikroorganizmov, ktoré môžu vzniknúť v konkrétnych podmienkach (napr. selekčným tlakom antibiotík) alebo môže prísť k ich rozšíreniu z iných oblastí (medicínska turistika, cestovanie a pod.).

K zásadám správnej antibiotickej liečby patrí správna indikácia antibiotickej liečby a kontrola spotreby antibiotík. Antibiotická liečba by sa mala riadiť mikrobiologickými testami citlivosti. Ak je to možné, odber biologického materiálu na

mikrobiologickú diagnostiku je vhodné vykonať pred začatím liečby antibiotikami. Pri výbere a podávaní antibiotika je potrebné brať do úvahy aj charakter ochorenia, lokalizáciu infekčného procesu, prestup antibiotika na miesto infekcie v organizme, trvanie a spôsob podávania liečiva.

V ostatných rokoch sme svedkami pribúdania nových mechanizmov rezistencie, ktoré sa prejavujú enormným nárastom rezistencie voči antibiotikám. Zvyšuje sa výskyt multirezistentných baktérií (MDR) charakterizovaných rezistenciou na najmenej jedno antibakteriálne liečivo v troch a viac antibiotických skupinách. Ako široko (extrémne) rezistentné (XDR) sú označované kmene, ktoré sú citlivé iba na lieky v jednej, nanajvýš dvoch kategóriách. Nebezpečné je šírenie karbapenemázy produkujúcich enterobaktérií (CPE), ktoré spolu s inými mechanizmami rezistencie môžu viesť až k vzniku panrezistentných kmeňov (PDR), ktoré sú necitlivé na všetky antibiotiká vo všetkých skupinách antibiotík. CPE môžu byť odhaľované iba prostredníctvom mikrobiologického testovania fenotypovými testami a následne sú detegované ich genetické determinanty. Okrem liečebných stratégií vyžadujú aj prijímanie komplexných protiepidemických opatrení a aktívne vyhľadávanie nosičov CPE.

Šírenie rezistentných kmeňov je rýchle nielen medzi pacientmi vrámci jedného zdravotníckeho zariadenia, ale aj medzi jednotlivými nemocnicami, štátmi a kontinentmi, hovoríme teda skutočne o globálnom šírení antimikrobiálnej rezistencie.

Testovanie citlivosti na antimikrobiálne látky (MIC a inhibičné zóny) má význam, ak sú stanovené kritériá hodnotenia. Mikrobiologické laboratórne testovanie citlivosti voči antimikrobiálnym látkam sa preto vykonáva stanovenými metódami a postupmi v prísne dodržiavaných podmienkach a hodnotí a interpretuje sa podľa medzinárodne platných kritérií. Slovenská republika sa riadi pravidlami Európskeho výboru pre testovanie antimikrobiálnej citlivosti (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, EUCAST), ktoré môžu byť doplnené národnými pravidlami a postupmi, ktoré vydáva Národné referenčné centrum pre sledovanie rezistencie mikroorganizmov na antibiotiká zriadené na Úrade verejného zdravotníctva SR. V iných krajinách sveta (USA, americký kontinent) možno používať odporúčania a kritériá Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI).

Postupy stanovovania citlivosti voči antimikrobiálnym látkam a dodržiavanie záväzných pravidiel testovania a interpretácie testov sa kontrolujú internými a externými národnými (NRC pre sledovanie rezistencie mikroorganizmov na antibiotiká, ÚVZ SR) alebo medzinárodnými kontrolami kvality laboratórneho testovania citlivosti. Interné hodnotenie metód používaných v diagnostickej praxi laboratória sa vykonáva pravidelne v stanovených časových intervaloch pomocou štandardných referenčných bakteriálnych kmeňov so známymi hodnotami MIC a inhibičných zón pre jednotlivé antimikrobiálne liečivá.

1.16.1 Metódy testovania citlivosti mikroorganizmov voči antimikrobiálnym látkam

Na testovanie citlivosti mikroorganizmov voči antimikrobiálnym látkam môžeme použiť fenotypové a genotypové metódy

(tab. 1.16.1). Pracujeme s vhodnými vybranými druhmi antimikrobiálnych látok definovanými postupmi na určenie citlivosti/rezistencie mikroorganizmov (fenotypový prejav) alebo pomocou molekulárno-biologických metód vo vybraných prípadoch určujeme príslušné genetické determinanty rezistencie.

Zostavy testovaných antibiotík

Zostavy testovaných antibiotík na testovanie citlivosti sú tvorené tak, aby obsahovali vhodné antibiotiká pre jednotlivé skupiny mikroorganizmov, napr. pre grampozitívne koky, stafylokoky, enterokoky, streptokoky (betahemolytické; *Streptococcus pneumoniae*), gramnegatívne paličky, enterobaktérie, nefermentujúce gramnegatívne paličky (*Pseudomonas* spp.; *Acinetobacter* spp.), anaeróbne baktérie. Zostavy sú vytvorené aj podľa lokalizácie infekcie v organizme, napr. pre liečbu infekcií močového traktu alebo lokálne používané liečivá. Spektrum testovaných antibiotík sa líši aj podľa použitia na liečbu infekcií u pacientov v ambulantnej starostlivosti alebo hospitalizovaných pacientov so závažnými infekciami.

Hraničné hodnoty koncentrácie antibiotík – klinické break-pointy

Stanovené hraničné hodnoty koncentrácie antibiotík – klinické break-pointy (hraničné koncentrácie) indikujú pravdepodobnosť úspechu alebo zlyhania antibiotickej liečby na základe mikrobiologického vyšetrenia. Definujú rozhranie medzi citlivosťou a rezistenciou mikroorganizmu voči antimikrobiálnej látke. Používajú sa v každodennej praxi pri liečbe pacienta. Klinické breakpointy pre interpretáciu minimálnej inhibičnej koncentrácie (MIC) (mg/l) sú založené na farmakokinetických a farmakodynamických parametroch, distribúcii hodnôt MIC jednotlivých mikroorganizmov a liečiv, na mechanizmoch rezistencie a na klinických skúsenostiach s liečbou konkrétnych typov infekcie daným antibiotikom. V prípade diskového difúzneho testu sú reprezentované priemerom inhibičných zón (mm). **Klinické breakpointy určujú kategórie citlivosti, rezistencie a intermediárnej citlivosti.**

Doteraz platné definície:

- **Klinicky citlivý (C) mikroorganizmus** je definovaný ako citlivý pri takej koncentrácii antimikrobiálnej látky, ktorá je spojená s vysokou pravdepodobnosťou terapeutického úspechu.
- **Klinicky rezistentný (R) mikroorganizmus** je definovaný ako rezistentný pri takej koncentrácii antimikrobiálnej látky, ktorá je spojená s vysokou pravdepodobnosťou terapeutického zlyhania.
- **Klinicky intermediárny (I) mikroorganizmus** je definovaný ako intermediárne citlivý pri takej koncentrácii antimikrobiálnej látky, pri ktorej je neistý terapeutický účinok.

Interpretácia výsledkov testovania citlivosti

Interpretáciu získaných výsledkov testovania citlivosti vykonáva lekár mikrobiológ. Interpretatívne odčítanie testov citlivosti zohľadňuje vedomosti o vrodenej (prirodzenej, intrinsic) rezistencii testovaných baktérií na testované antibiotiká, skrýženej

Tab. 1.16.1. Metódy testovania citlivosti/rezistencie mikroorganizmov voči antimikrobiálnym látkam a molekulárne metódy stanovenia faktorov rezistencie (autor J. Predný)

Kultivačné (rastové) metódy testovania citlivosti/rezistencie		Molekulárne metódy stanovenia faktorov rezistencie	
Fenotypové metódy		Fenotypové metódy	Genotypové metódy
Kvalitatívne (C, I, R)	Kvantitatívne Stanovenie MIC/MBC (mg/l)	Dôkaz antigénnej štruktúry proteínu (napr. zmeneného PBP2, resp. rôznych druhov karbapenemáz imunochemickou metódou)	PCR
Diskový difúzny test	Agarová dilučná metóda	Funkčné testy – napr. betalaktamázová aktivita enzýmov (napr. nitrocefinový test)	Hybridizačné metódy
Breakpointové metódy	Bujónová dilučná metóda		Sekvenácia
	Bujónová mikrodilučná metóda		Genomické biočipy
	Gradientový test (ϵ test)		
	Kolorimetrické a automatizované metódy		

rezistencii (citlivosti) medzi jednotlivými antibiotikami, o testovaní získaných mechanizmov rezistencie a ich interpretácii v konečnom výsledku testovania.

Na interpretáciu výsledkov sú vydávané expertné pravidlá EUCAST na testovanie a interpretáciu výsledkov testov. Pravidlá sa môžu meniť v závislosti na zmenách klinických breakpointov, nových poznatkoch z klinických štúdií, vývoji rezistencie a nových mechanizmov rezistencie, zavádzaní nových látok a pod. Expertné pravidlá vychádzajú zo stanovených aktuálnych breakpointov a znalostí o mechanizmoch rezistencie.

Pri testovaní citlivosti je potrebné brať do úvahy **prirodzenú (vrodenú, intrinsic) rezistenciu** mikroorganizmov, ktorá je charakteristicky prítomná u všetkých izolátov v rámci bakteriálneho druhu, napr. prirodzená rezistencia Enterobacteriaceae voči glykopeptidom a linezolidu, *Proteus mirabilis* voči nitrofurantoinu a kolistínu, *Stenotrophomonas maltophilia* voči karbapenémom, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* sp. voči ertapenému, enterokokov a *Listeria monocytogenes* voči cefalosporínom a i.

Výnimočné fenotypy rezistencie sú také fenotypy rezistencie bakteriálnych izolátov voči konkrétnym antibiotikám, ktoré sa ešte nevyskytli alebo je ich výskyt extrémne zriedkavý. V takýchto prípadoch je potrebné testovanie opakovať a starostlivo preveriť, či je výsledok správny a vylúčiť laboratórnu chybu (napr. zmiešaná kultúra, nesprávna identifikácia mikroorganizmu, nedodržanie pravidiel testovania a pod.). Izolát s výnimočným fenotypom rezistencie sa má zaslať do príslušného referenčného centra na jeho ďalšie overenie a preskúmanie. Výnimočné fenotypy rezistencie sa môžu postupne vyvíjať a meniť, napríklad nárastom rezistencie v priebehu času. Príkladom výnimočného fenotypu by bola rezistencia *Streptococcus pyogenes* voči penicilínu (rezistentné kmene sa nevyskytujú).

Pravidlá obsahujú aj odporúčania na odvodenie citlivosti podľa testovania jedného antibiotika, ktoré môže reprezentovať zástupcu skupiny. Podľa výsledkov testovania jedného antibiotika je teda v niektorých prípadoch možné odvodiť citlivosť pre skupinu alebo vybrané antibiotiká. Príkladom môže byť testovanie citlivosti stafylokokov voči norfloxacinu diskovým difúznym testom (DDT), ktoré môže byť použité ako skríningový test fluorochinolónovej rezistencie. Izoláty stafylokokov citlivé voči norfloxacinu môžu byť považované za citlivé aj na ciprofloxacin, moxifloxacin, levofloxacin a ofloxacin; izoláty kategorizované ako necitlivé voči norfloxacinu musia byť testované voči jednotlivým fluorochinolónom osobitne.

Interpretatívne odčítanie citlivosti zahŕňa/predstavuje odvodenie mechanizmov rezistencie z výsledkov testovania citlivosti a interpretáciu klinickej citlivosti na základe mechanizmu rezistencie. Niektoré pravidlá sú relatívne jednoduché (napr. testovanie MRSA), iné berú do úvahy viaceré vzťahy medzi antibiotikami alebo výsledky viacerých testov (napr. Enterobacteriaceae a aminoglykozidy).

Nikdy sa neodporúča úprava intermediárneho alebo rezistentného výsledku testu na citlivý alebo rezistentný na intermediárny, pretože môže byť prítomný nový, dovtedy neznámy rezistencius rezistencie (a liečba by mohla zlyhať).

Väčšina pravidiel interpretatívneho odčítania vyžaduje presnú (druhovú) identifikáciu testovaného mikroorganizmu. Na testovanie je často potrebné použiť široké spektrum testovaných antibiotík a interpretačné pravidlá môžu vyžadovať testovanie takých antibiotík, ktoré sa klinicky nepoužívajú (v liečbe testovaného mikroorganizmu alebo slúžia iba na detekciu mechanizmu rezistencie).

Správne odčítanie, zhodnotenie a najmä interpretácia testu citlivosti teda vzhľadom na jeho klinický význam a antimikrobiálnu rezistenciu vyžaduje množstvo poznatkov, ktoré je potrebné pri interpretácii brať do úvahy. Niektoré významné mechanizmy rezistencie a ich detekcia a interpretácia môžu byť obsiahnuté v niektorých systémoch na testovanie citlivosti.

1.16.1.1 FENOTYPOVÉ METÓDY TESTOVANIA CITLIVOSTI MIKROORGANIZMOV NA ANTIMIKROBIÁLNE LÁTKY

Na fenotypové testovanie citlivosti baktérií sa používajú **kvalitatívne a kvantitatívne metódy**. Fenotypové metódy testovania sú založené na stanovení minimálnej inhibičnej koncentrácie (MIC) v mg/l (kvantitatívny parameter).

Minimálna inhibičná koncentrácia je definovaná ako najnižšia koncentrácia antimikrobiálnej látky, ktorá v štandardných podmienkach inhibuje voľným okom pozorovaný rast testovaného mikroorganizmu v bujóne alebo na povrchu pevného média. Kvalitatívne metódy (diskový difúzny test) sú kalibrované podľa MIC. Na interpretáciu výsledkov testovania je potrebné použiť medzinárodne stanovené breakpointové hodnoty (podľa EUCAST) a podľa nich kategorizovať mikroorganizmy ako citlivé, intermediárne citlivé alebo rezistentné (C, I, R).

Kvalitatívne metódy

Kvalitatívne metódy (C, I, R) sú:

- a) diskový difúzny test,
- b) breakpointové metódy.

Pri kvalitatívnom stanovení citlivosti určujeme, či je daný mikroorganizmus voči antimikrobiálnej látke citlivý, rezistentný alebo intermediárne citlivý a zaraďujeme ho do niektorej z uvedených kategórií (C, I, R).

Kvalitatívne testovanie citlivosti sa využíva rutinne a vykonáva sa pomocou diskového difúzneho testu (DDT). Je vhodné pre testovanie väčšiny aeróbných a fakultatívne anaeróbných bakteriálnych patogénov, vrátane rastovo náročných baktérií, až na určité výnimky liečiv a baktérií, kedy je potrebné stanoviť MIC, napr. kolistín u Enterobacteriaceae; vankomycín (glykopeptidy a lipoglykopeptidy) u stafylokokov. DDT je flexibilný vo výbere testovaných antibiotík, vzájomné interferencie medzi niektorými antibiotikami umožňujú aj testovanie niektorých mechanizmov rezistencie. Nevýhodou je poskytnutie iba kvalitatívnych údajov (C, I, R).

A. DISKOVÝ DIFÚZNY TEST

Princíp testovania: podstatou DDT je difúzia testovanej antimikrobiálnej látky (antibiotika) z antimikrobiálneho (antibiotického) disku do pevného kultivačného média a posúdenie jeho vplyvu na testovaný bakteriálny izolát, ktorý je naočkovaný na kultivačné médium. Hodnotí sa prítomnosť (neprítomnosť) a veľkosť zóny inhibície rastu okolo antibiotického disku, ktorá vzniká pôsobením antibiotika na testovaný izolát.

Na diskový difúzny test sú potrebné:

- Antibiotické disky
Antibiotické disky sú filtračné papieriky s presne definovaným obsahom antimikrobiálnej látky (podľa EUCAST, event. CLSI). Množstvo látky je vyjadrené v mikrogramoch alebo v jednotkách (U, penicilín). Pri testovaní sa používajú komerčne vyrábané antibiotické disky, ktoré musia spĺňať požiadavky na kontrolu kvality diskov.
- Kultivačné médium

Ako kultivačné médium je podľa EUCAST predpísané použitie Mueller-Hintonovej agaru (MHA) pre rastovo nenáročných baktérií alebo Mueller-Hintonovej agaru s 5 % prídavkom mechanicky defibrinovanej konskej krvi a 20 mg/l β-nikotínamid adenín dinukleotidu (β-NAD) (MHF) pre testovanie *Streptococcus* spp. (vrátane *Streptococcus pneumoniae*), *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni* a *Campylobacter coli*, *Pasteurella multocida*, *Corynebacterium* spp., *Aerococcus sanguinicola* a *Aerococcus urinae* a *Kingella kingae*.

Pôdy možno pripraviť v laboratóriu alebo sa vyrábajú komerčne. Dôležité je dodržanie správnej prípravy kultivačného média. V Petriho miske s definovaným priemerom je potrebné dodržať presne stanovený objem kultivačnej pôdy tak, aby pôda v kultivačnej miske dosahovala predpísanú výšku 4,0 ± 0,5 mm. Zloženie pôdy, jej výška, ako aj rôznyi obsah

a charakter antibiotika v disku ovplyvňujú difúziu antibiotika a tým aj výsledok testovania citlivosti. Na kultivačnú platňu s priemerom 90 mm je odporúčané uloženie maximálne šiestich antibiotických diskov. Disky sa ukladajú pomocou sterilnej pinzety alebo automatickým disperzerom diskov (obr. 1.16.1).



Obr. 1.16.1. Disperzer antibiotických diskov (foto J. Havelová).

Testovaná bakteriálna kultúra a príprava bakteriálneho inokula

Na správne odčítanie a interpretované hodnotenie testu citlivosti je nevyhnutné pracovať s čistou bakteriálnou kultúrou, z ktorej sa pripravuje bakteriálne inokulum.

Na testovanie citlivosti sa používa inokulum s optickou densitou 0,5 McFarlandovej stupnice pripravené v sterilnom fyziologickom roztoku (FR), ktoré zodpovedá približne $1 - 2 \times 10^8$ kolónie tvoriacich jednotiek (KTJ)/ml *Escherichia coli*.

Inokulum pripravíme tak, že bakteriologickou kľučkou vyberieme dobre izolované kolónie, ktoré rozotrieme vo FR na suspenziu a zmeriame jej optickú densitu. Pridaním FR alebo bakteriálnej kultúry upravíme optickú densitu inokula na požadovanú hodnotu. Na meranie optickej denzity inokula je potrebné použiť kalibrovaný denzitometer (fotometer), aby bolo zaistené presné dodržanie predpísanej hustoty inokula (množstva KTJ/ml) (obr. 1.16.2). Odchýlky množstva baktérií vedú k skresleniu získaných výsledkov a nesprávnemu stanoveniu citlivosti, či už v DDT alebo pri stanovení MIC.



Obr. 1.16.2. Denzitometer na meranie optickej hustoty inokula (foto J. Havelová).

Pri vykonávaní testovania je potrebné dodržiavať pravidlo 15'-15'-15', ktoré hovorí o prípustných časových intervaloch medzi jednotlivými krokmi vyšetrenia. Význam tohto pravidla je zrejmy hlavne pri práci s veľkým počtom testovaných kmeňov. Pripravené inokulum je potrebné do 15 min od prípravy

naočkovať na povrch kultivačného média, do 15 min od inokulácie je potrebné aplikovať antibiotické disky a do 15 min od aplikácie diskov treba vložiť platne do bakteriologického inkubátora. Porušenie ktoréhokoľvek kroku môže viesť k získaniu nesprávnych výsledkov testovania. Ak sú napr. platne s inokulovanou bakteriálnou kultúrou ponechané dlhší čas pri laboratórnej teplote (pri teplote prostredia), mikroorganizmy začnú rásť, príde k ovplyvneniu veľkosti inokula a zmenšovaniu inhibičných zón, čo vedie k nesprávnym výsledkom testovania.

Inokulum nanášame na kultivačné médium sterilným vatovým tampónom. Očkujeme na pripravené platne MHA alebo MHF so suchým povrchom, bez prítomnosti kondenzovanej vody. Tampón ponoríme do skúmavky s pripraveným inokulom a v prípade gramnegatívnych baktérií odstránime prebytočnú tekutinu z tampónu tak, že ho pritlačíme a otáčame po vnútornej strane skúmavky. Tampónom naočkujeme celý povrch platne v troch smeroch. Postupujeme vždy po celom povrchu platne od jedného okraja po druhý, potom platňu v ruke o tretinu pootočime, opäť rozočkujeme po celom povrchu platne, opäť platňu v ruke o tretinu pootočime a rozočkujeme. Tampón pri očkovaní tiež pootočime. Pri očkovaní na pôdu dbáme na to, aby bol rovnomerne naočkovaný celý povrch kultivačnej pôdy v Petriho miske, aby neboli prítomné voľné miesta alebo medzery medzi očkovacími líniami. Cieľom je získanie tzv. splyvavého rastu bakteriálnych kolónií – kolónie sa majú dotýkať svojim okrajom. Rast nemá byť príliš hustý ani príliš riedky (nemajú byť prítomné prázdne miesta). Rovnomerne nanesené inokulum poskytne reprodukovateľné priemery inhibičných zón. Na naočkovanie platne možno použiť aj automatický platňový inokulátor.

Po naočkovaní inokula sa na povrch platne po jej obvode umiestnia (manuálne sterilnou pinzetou alebo automatickým disperzerom) antibiotické disky tak, aby boli od okraja misky vzdialené približne 2 cm. Ak sa už raz disk dotkol povrchu platne, je potrebné ho na danom mieste nechať, nesmie sa ním hýbať, ani ho ťahať po povrchu platne, pretože difúzia antibiotika z disku je veľmi rýchla. Počet diskov, ktoré možno umiestniť na platňu je daný jej veľkosťou, napr. na platňu s priemerom 90 mm možno umiestniť šesť diskov. Potrebné je dodržať maximálny počet aplikovaných antibiotických diskov, aby sa neprekrývali zóny inhibície rastu a aby nedochádzalo k neželanej interferencii medzi jednotlivými antibiotikami. Disky je potrebné naložiť na platňu do 15 min od vyočkovania inokula a do 15 min od umiestnenia diskov je potrebné platňu vložiť do bakteriologického inkubátora. Kultivácia prebieha pri $35 \pm 1^\circ\text{C}$ za prístupu vzduchu 16 - 20 hod alebo pri $35 \pm 1^\circ\text{C}$ za prístupu vzduchu v 4 - 6% CO_2 16 - 20 hod, podľa druhu testovaných baktérií.

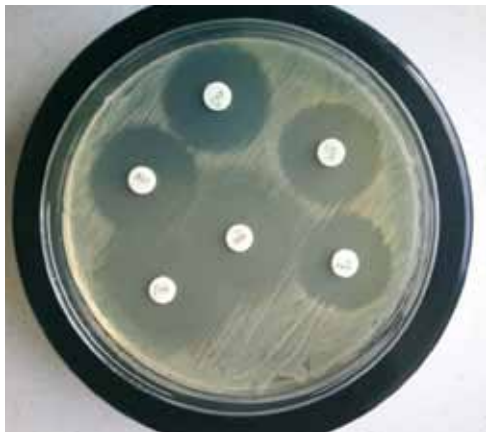
Okamžite po kontakte antibiotického disku s kultivačnou pôdou dochádza k difúzii antibiotika do média. Jeho pôsobenie na rastúce baktérie sa prejaví vytvorením zóny inhibície rastu (inhibičná zóna) rovnomerne okolo antibiotického disku, teda zóny, v ktorej baktérie vplyvom účinku antibiotika nie sú schopné rásť. Rovnomerne rastúce bakteriálne kolónie vytvárajú ohraničené inhibičné kolónie, s neporušenými okrajmi (obr. 1.16.3).

Hodnotenie a interpretácia testu

Na vyhodnotenie testu je potrebné kalibrovaným meradlom zmerať priemer zóny inhibície rastu okolo antibiotického disku, ktorý sa vyjadruje v milimetroch. Odčítanie testu (meranie inhibičných zón) robíme voľným okom (odčítame okraje inhibičnej zóny v mieste úplnej inhibície rastu baktérií, ak nie je stanovené inak). Inhibičné zóny v DDT na MHA meriame zo spodnej strany platne oproti čiernej podložke v odrazenom svetle, testy na MHF platniach meriame po otvorení vrchného viečka z prednej strany platne v odrazenom svetle.

Dosiahnuté hodnoty inhibičnej zóny porovnáme s breakpointovými hodnotami inhibičných zón pre jednotlivé mikroorganizmy a jednotlivé antibiotiká podľa aktuálnych kritérií EUCAST.

Ak je priemer inhibičnej zóny väčší alebo rovný breakpointovej hodnote, potom testovaný kmeň je voči danej antimikrobiálnej látke in vitro citlivý. Ak je hodnota menšia ako breakpointová hodnota pre stanovenie rezistencie, je testovaný kmeň voči danej antimikrobiálnej látke in vitro rezistentný. Ak sa nameraná hodnota inhibičnej zóny nachádza medzi hodnotami pre citlivé a rezistentné kmene, ide o intermediárnu citlivosť.



Obr. 1.16.3. Diskový difúzny test (foto M. Horniačková).

B. BREAKPOINTOVÉ METÓDY

Pri tzv. breakpointových metódach sa testuje obmedzené množstvo koncentrácií daného antibiotika, alebo koncentrácie na úrovni klinických breakpointov. Aj keď ide o dilučné metódy, neobsahujú dostatočné množstvo riedení antibiotika na stanovenie MIC a prípadné odhalenie mechanizmov rezistencie, jedná sa o kvalitatívne testovanie. Breakpointové metódy sú využívané v niektorých automatizovaných systémoch, výhodné sú pri spracovávaní veľkého množstva testov, ak nie je potrebné stanovenie MIC, od ktorého sa odvíja stanovenie farmakologických prediktívnych parametrov (Pk/Pd).

Na rozdiel od MIC a DDT (ak sú zaznamenávané veľkosti inhibičných zón) neumožňujú zaznamenanie trendov v posune MIC, napr. postupný nárast MIC aj vrámci jednotlivých kategórií (C, I, R).

Kvantitatívne metódy (MIC, MBC)

STANOVENIE MINIMÁLNEJ INHIBIČNEJ KONCENTRÁCIE (MIC v mg/l):

- agarová dilučná metóda,
- bujónová dilučná metóda,
- bujónové mikrodilučné metódy,
- gradientová metóda.

Pri kvantitatívnej metóde stanovujeme hodnotu MIC antimikrobiálnej látky, vyjadrenej v mg/l, na základe ktorej je možné posúdiť citlivosť, rezistencie alebo intermediárnej citlivosti izolovaného kmeňa voči testovanej látke.

Kvantitatívne stanovenie citlivosti sa vykonáva na pevných médiách – agarovou dilučnou metódou, gradientovým testom alebo v tekutých médiách – bujónovou dilučnou metódou, v praxi najčastejšie rôzne modifikovanými bujónovými mikrodilučnými metódami, niektorými automatizovanými metódami.

Hodnota MIC je potrebná aj pri výpočte farmakokinetických a farmakodynamických parametrov (Pk/Pd), ktoré sú používané v individuálnej liečbe pacienta a ovplyvňujú výber a podávanie antibiotika (dávkovanie, spôsob podávania liečiva, dávkovací interval, trvanie liečby) a pod. Farmakologické prediktívne parametre spájajú farmakodynamické a farmakokinetické charakteristiky liečiva a aktuálnu hodnotu MIC testovaného kmeňa.

Najčastejšie používané sú tri prediktívne parametre pre rôzne skupiny antibiotík:

- čas, počas ktorého koncentrácia liečiva presahuje hodnotu MIC ($T > MIC$). Je to dôležitý parameter pre liečivá bez alebo len s nevýznamným postantibiotickým účinkom. Potrebné je upraviť aplikáciu liečiva tak, aby ploché inhibičné hladiny pokrývali čo najväčšiu (dostatočnú) časť dávkovacieho intervalu na dosiahnutie adekvátnej klinickej a mikrobiologickej účinnosti. $T > MIC$ teda vyjadruje percento dávkovacieho intervalu, v ktorom hladina liečiva by mala byť nad hodnotou MIC daného mikroorganizmu. Tento parameter je hlavným parametrom pre betalaktámové liečivá;
- pomer maximálnej dosiahnutej koncentrácie liečiva k MIC pôvodcu ochorenia (C_{MAX}/MIC) je vhodným parametrom pre antibiotiká s výrazným postantibiotickým účinkom. Pri podávaní liečiva je snaha o dosiahnutie čo najvyššej nárazovej koncentrácie liečiva. Tento parameter je hlavným determinantom pri liečbe aminoglykozidmi;
- plocha pod dávkovou krivkou liečiva ohraničenou MIC ($AUC > MIC$) za 24 hod, je parameter označovaný ako AUC_{24} (plocha pod inhibičnou krivkou počas 24 hod). AUC_{24} je kumulatívny parameter, považuje sa za najlepší prediktor účinnosti chinolónov, makrolidov a vankomycínu (bližšie uvedené v kapitole Princípy racionálnej antiinfekčnej liečby).

Stanovenie MIC sa považuje za zlatý štandard fenotypového testovania citlivosti voči antimikrobiálnym látkam. Testovanie sa robí kvantitatívnymi dilučnými metódami in vitro, pri ktorých sa riedi testované antibiotikum v požadovanom rozpätí koncentrácií dvojnásobným riedením od koncentrácie antibiotika 1 mg/l smerom nadol a nahor (0,03; 0,06; 0,125; 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 8; 16; 32; 64 mg/l). MIC umožňuje kategorizovať baktérie na citlivé, intermediárne citlivé alebo rezistentné, ako aj detekciu niektorých mechanizmov mikrobiálnej rezistencie. Dôraz sa kladie na presné vykonanie metódy stanovenia MIC (použitie testovacieho médium, inokulum, podmienky inkubácie a pod.). MIC predstavuje kvantitatívny údaj potrebný pre výpočet farmakologických prediktívnych parametrov – Pk/Pd parametrov (stanovenie breakpointov, individualizácia dávkovania liečiv), poskytuje aj dôležité údaje pre kontrolu šírenia infekcií a epidemiológiu (surveillance, trendy rezistencie a pod.).

a) Agarová dilučná metóda

Agarová dilučná metóda používa rad pevných médií (MHA) s pridanými vzostupnými koncentraciami antibiotika v jednotlivých agarových médiách, na ktoré sa naočkovujú testované bakteriálne kmene a po inkubácii sa vyhodnocuje prítomnosť rastu baktérií. Ako MIC je určená najnižšia koncentrácia prítomná v médiu s najnižším obsahom antibiotika, kde nie je prítomný rast testovaného bakteriálneho kmeňa.

Ak je zistená hodnota MIC menšia alebo rovná breakpointovej hodnote pre stanovenie citlivosti, potom testovaný kmeň je voči danej antimikrobiálnej látke in vitro citlivý. Ak je hodnota MIC vyššia ako breakpointová hodnota pre stanovenie rezistencie, je testovaný kmeň voči danej antimikrobiálnej látke in vitro rezistentný. Ak sa nameraná hodnota inhibičnej zóny nachádza medzi hodnotami pre citlivé a rezistentné kmene, ide o intermediárnu citlivosť.

b) Bujónová dilučná metóda, mikrodilučné metódy

Keďže agarová dilučná metóda je náročná na prípravu médií s obsahom antibiotika a je pomerne pracná, v bežnej laboratórnej praxi sa používa testovanie v tekutom médiu. Antibiotikum sa riedi v tekutom médiu v skúmavkách (bujónová dilučná metóda) alebo v mikrotitračnej platničke (bujónová mikrodilučná metóda) v malých objemoch. Odporúčaným médiom podľa EUCAST je Mueller-Hintonovej bujón s upravenými kationmi (MHB) pre rastovo nenáročné baktérie alebo Mueller-Hintonovej bujón s upravenými kationmi obohatený prídavkom 5 % lyzovanej konskej krvi a 20 mg/l β -NAD (MHF bujón) pre testovanie *Streptococcus* spp. (vrátane *Streptococcus pneumoniae*), *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Listeria mono-*

cytogenes, *Campylobacter jejuni* a *Campylobacter coli*, *Pasteurella multocida*, *Corynebacterium* spp., *Aerococcus sanguinicola* a *Aerococcus urinae* a *Kingella kingae* a niektorých ďalších rastovo náročných baktérií.

Do média s nariadenou koncentráciou antibiotika sa pridá definované množstvo baktérií získané predpísaným riedením bakteriálneho inokula. Po inkubácii sa hodnotí prítomnosť rastu baktérií vizuálne voľným okom, fotometricky (turbidimetricky) alebo kolorimetricky.

Vizuálne hodnotíme prítomnosť rastu baktérií v tekutom médiu, ktorý charakterizuje tvorba sedimentu, blanky alebo zákalu; fotometricky meraním zákalu v tekutom médiu a kolorimetricky pomocou pridania farebného indikátora rastu baktérií (tetrazóliové soli). MIC je najnižšia koncentrácia antibiotika v skúmavke, kde už nie je prítomný viditeľný rast baktérií.

V rutinnej praxi sa používajú komerčne pripravené testy založené na mikrodilučnej metóde, obsahujúce vzostupné riedenia lyofilizovaných antibiotík v mikrotitračnej platničke alebo na inom nosiči (kazeta, panel antibiotík). Počet riedení antibiotika v komerčných systémoch je rôzny a je potrebné odlišiť breakpointovú metódu (jedno riedenie alebo obmedzený počet riedení) od súprav na presné stanovenie MIC s väčším počtom riedení antibiotika (séria dvojnásobného riedenia antibiotika, 8 – 15 riedení). Výhoda komerčne pripravených platničiek spočíva v ich jednoduchom použití, rešpektovaní požiadaviek na zachovanie stability antibiotík (obsah iónov, pH) a udržaní deklarovaných parametrov pri ich správnom skladovaní a používaní, aby nedochádzalo k odchýlkam (chybám) v testovaní. Vyhodnocované môžu byť v automatických systémoch, prípadne spoločne s identifikáciou testovaného bakteriálneho izolátu. Niektoré z automatických systémov umožňujú tiež interpretatívne odčítanie citlivosti rešpektovaním prirodzených rezistencií bakteriálnych rodov a druhov voči konkrétnym antibiotikám a detekciou a vyhodnotením získaných mechanizmov rezistencie.

Kolorimetrická metóda stanovenia citlivosti predstavuje modifikáciu bujónovej mikrodilučnej metódy, ktorá využíva na detekciu rastu baktérií ako farebný indikátor tetrazóliové soli (tetrazólium bromid). Pri tejto metóde sa používa plastový panel s netransparentnými nylonovými mikroskopickými – reakčnými terčikmi (na spôsob mikrotitračnej platničky). Reakčné terčiky obsahujú 8 vzostupných riedení jednotlivých antibiotík v stĺpcoch a súprava pre jeden bakteriálny kmeň umožňuje otestovať až 20 rôznych antibiotík (obr. 1.16.4). Po pridaní inokula testovaného kmeňa a inkubácii (18 – 24 hod) sa pridá rastový indikátor a platnička sa inkubuje ešte 30 min. Rast baktérií v prítomnosti antibiotika sa prejaví zmenou farby indikátora zo žltej (žiadny rast) na modrú (rast prítomný). MIC reprezentuje najnižšia koncentrácia antimikrobiálnej látky, ktorá inhibuje rast testovaných baktérií (bezfarebný terčik s najnižším riedením antibiotika).



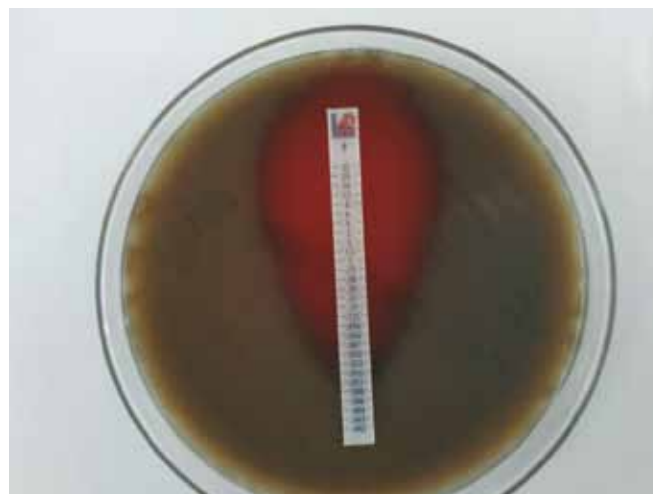
Obr. 1.16.4. Modifikovaná bujónová mikrodilučná metóda. Rast baktérií je detegovaný farebným indikátorom rastu – tetrazóliovými soľami. Komerčná diagnostická súprava in vitro na stanovenie citlivosti na antibiotiká Miditech (Bel-MIDITECH, SR; foto J. Havelová).

Odčítanie testu sa robí pomocou skenera a stanovenie citlivosti sa interpretuje pomocou expertného interpretačného počítačového

systému, ktorý zahŕňa interpretáciu prirodzenej rezistencie baktérií a detekciu a interpretáciu testovaných mechanizmov rezistencie. Expertný systém obsahuje aj farmakokinetický/farmakodynamický systém (modul), ktorý umožňuje výpočet/stanovenie prediktívnych farmakologických parametrov a návrh dávkovania liečiva (plazmatické hladiny) podľa aktuálnej hodnoty MIC. Zbieranie a uchovávanie údajov umožňuje tvorbu prehľadov citlivosti/rezistencie podľa požadovaných parametrov.

c) Gradientový test

Kombináciou difúzie antimikrobiálnej látky do média a stanovenia MIC je gradientová metóda, označovaná aj ako E-test (obr. 1.16.5). Predstavuje komerčný produkt vo forme plastového pásiku impregnovaného postupne sa znižujúcou koncentráciou testovanej antimikrobiálnej látky (antibiotikum, antimykotikum). Pásik sa umiestni na povrch výrobcom predpísaného kultivačného média s naočkovaným testovaným kmeňom. Okamžite po priložení pásiku na povrch média dochádza k difúzii antibiotika a vytvára sa jeho exponenciálny gradient. Po inkubácii vzniká pôsobením antibiotika na testovanú bakteriálnu kultúru elipsovité zóna inhibície rastu. Ako MIC je určená hodnota testovanej látky prítomná v mieste, kde okraj vytvorenej inhibičnej zóny pretína plastový prúžok (mg/l). Táto metóda je v rutinnej mikrobiologickej diagnostike vhodná (až na určité výnimky) na testovanie jednotlivých antibiotík, ktoré nie sú súčasťou komerčných zostáv alebo automatizovaných systémov, na testovanie rastovo náročných baktérií, na testovanie pomaly rastúcich mikroorganizmov vrátane anaeróbných baktérií a kvasiniek.



Obr. 1.16.5. E-test Gradientová metóda stanovenia MIC (foto M. Straka).

d) Automatické systémy na stanovenie citlivosti

V súčasnosti je k dispozícii viacero automatických alebo poliautomatických komerčných systémov na stanovenie citlivosti na antibiotiká. Používajú sa štandardne pripravené komerčné mikrotitračné platničky, resp. ich modifikácie, v ktorých sú inkorporované antibiotiká. Po pridaní bakteriálneho inokula a po inkubácii umožňujú stanovenie citlivosti. Rast mikroorganizmov sa deteguje spektrofotometricky alebo turbidimetricky. Niektoré systémy obsahujú zároveň testy na identifikáciu mikroorganizmu. Potrebné je dôsledné poznanie princípu testu a rozsahu riedení daného antibiotika na posúdenie, či je možné stanovenie MIC alebo sa jedná o breakpointovú metódu, umožňujúcu iba kvalitatívne testovanie (C, I, R kategória) bez presného stanovenia hodnoty MIC.

Pri ktorejkoľvek z uvedených metód je dôležité dodržiavať štandardizované postupy testovania (použitie odporúčanej metódy; práca s čistou izolovanou bakteriálnou kultúrou; pravidlo 15'-15'-15'; postup podľa odporúčaní výrobcu testu; správne

odčítanie a interpretácia testu), aby nedochádzalo k variabilite a odchýlkam v testovaní. Chyby by mohli mať závažný dopad na výsledok a interpretáciu testovania. Najdôležitejšie chyby sú označené ako „veľmi významná chyba“, kedy je rezistentný izolát chybné označený ako citlivý; „významná chyba“ predstavuje označenie citlivého izolátu ako rezistentný (v porovnaní s referenčnou metódou).

STANOVENIE MINIMÁLNEJ BAKTERICÍDNEJ KONCENTRÁCIE (MBC)

Okrem stanovenia MIC môžeme stanoviť aj minimálnu baktericídnu koncentráciu (MBC) liečiva.

MBC je definovaná ako najnižšia koncentrácia liečiva, ktorá v štandardných podmienkach usmrť minimálne 99,9% testovaných baktérií. Hodnoty MBC bývajú pri baktericídnych antibiotikách blízke hodnotám MIC (zväčša dva až štyrikrát vyššie ako MIC), v prípade bakteriostatických antibiotík sú oveľa vyššie (až 16- až 64-krát vyššie ako hodnota MIC).

MBC sa stanovuje vyočkováním skúmaviek alebo jamiek mikrotitračnej platničky s koncentraciami antibiotika, v ktorých došlo k inhibícii rastu baktérií, na pevne kultivačné médium. Po inkubácii sa hodnotí nárast baktérií a MBC predstavuje najnižšiu koncentráciu antibiotika v médiu, kde nie je prítomný viditeľný rast baktérií.

1.6.1.2 GENOTYPOVÉ METÓDY

Genotypové metódy sú založené na detekcii špecifických génov kódujúcich mechanizmus rezistencie alebo jeho produkt. Genotypové metódy predpovedajú iba rezistenciu, nie sú kvantifikovateľné. Na detekciu génov rezistencie sa používajú molekulárno-biologické metódy a pre epidemiologické účely tiež metódy molekulárnej epidemiológie.

Dôležité je upozorniť, že nie vždy sa prítomnosť génu rezistencie prejaví vo fenotypе baktérie a nemusí sa rovnať *in vivo* klinickému zlyhaniu liečby infekcie. Príslušný produkt génu nemusí byť exprimovaný vôbec alebo iba na veľmi nízkej úrovni. Na druhej strane absencia génu rezistencie nevylučuje prítomnosť iného mechanizmu rezistencie voči určitej látke.

V rutinnej praxi sú genotypové metódy vhodné na rýchlu detekciu niektorých génov rezistencie s ohľadom na rýchle začatie účinnej antimikrobiálnej liečby (MRSA, VRE) a tiež kvôli detekcii príslušných mechanizmov rezistencie pre účely kontroly infekcií, zabráneniu šírenia rezistentných kmeňov (CPE) a prijímaní účinných opatrení v ďalšom manažmente pacienta.

Genotypové metódy sa tiež vykonávajú v referenčných laboratóriách na potvrdenie nezvyčajných fenotypov rezistencie, na monitorovanie šírenia kmeňov s nebezpečnými mechanizmami rezistencie, surveillance rezistencie.

Používa sa metóda PCR na stanovenie jednotlivých génov, multiplexová PCR, PCR v reálnom čase (real-time PCR), DNA sekvenácia, hybridizačné metódy a genomické biočipy.

Výhodou molekulárnych metód je ich rýchlosť (real-time PCR) a presnosť určenia známych genetických determinantov rezistencie. Nevýhodou je, že nedokážu zachytiť nové, novo sa vyskytujúce, dosiaľ neznáme genetické determinanty rezistencie, nové varianty známych génov rezistencie. Zachytávajú aj gény rezistencie bez fenotypového prejavu. Citlivosť na antimikrobiálne látky musí byť vo väčšine prípadov potvrdená fenotypovými metódami.

1.16.2 Testovanie vybraných mechanizmov rezistencie

Okrem stanovenia citlivosti baktérií na antibiotiká je pri testovaní citlivosti na antimikrobiálne látky možné pomocou interferencie medzi antibiotikami pri testovaní daného kmeňa zisťovať aj prítomnosť niektorých mechanizmov rezistencie, napr. stanovenie betalaktamáz s rozšíreným spektrom účinku ESBL a betalaktamáz typu AmpC u enterobaktérií, karbapenemáz u enterobaktérií (CPE), MLSB fenotyp rezistencie a pod.

DDT alebo hodnota MIC sa môže použiť aj ako test (skríninové antibiotikum), kde výsledok testovania pomocou určitého antibiotika sa môže vzťahovať na celú antibiotickú skupinu, teda pomocou testu jedného antibiotika možno odvodíť citlivosť voči iným antibiotikám alebo antibiotickej skupine. Pomocou skríninového testovania môžeme odhaliť mechanizmy rezistencie, napr. MRSA.

METICILÍN REZISTENTNÝ STAPHYLOCOCCUS AUREUS – MRSA

Kmeň MRSA je rezistentný na všetky betalaktamové antibiotiká okrem cefalosporínov piatej generácie (ceftarolín, ceftobiprol). Podstatou rezistencie je zmena penicilín-viažucích proteínov (PBP), ktoré sú cieľovou štruktúrou účinku betalaktamových antibiotík. Rezistencia je podmienená prítomnosťou génu (*mecA* alebo *mecC*), ktorý kóduje tvorbu zmenených PBP2', ktoré sa vyznačujú nízkou afinitou pre betalaktamové antibiotiká. Aj keď by sa niektoré betalaktamové antibiotiká mohli pri testovaní *in vitro* javiť ako citlivé, ich klinické použitie vedie k zlyhaniu liečby infekcie *in vivo*, a preto je kmene *S. aureus* (a aj koaguláza negatívnych stafylokokov) s prítomnosťou tohto typu rezistencie potrebné interpretovať ako rezistentné voči betalaktamovým antibiotikám (s výnimkou cefalosporínov piatej generácie). Hovoríme o tzv. interpretatívnom odčítaní citlivosti.

Detekcia meticilínovej rezistencie bola v minulosti realizovaná *in vitro* testovaním meticilínu, následne prostredníctvom oxacilínu. V súčasnosti sa zistilo, že najspoľahlivejšie výsledky sa získavajú testovaním pomocou disku s cefoxitínom, ktorý spoľahlivo predpovedá meticilínovú rezistenciu. Cefoxitín rezistentné kmene *S. aureus* sú interpretované ako MRSA.

MLSB FENOTYP REZISTENCIE VOČI MAKROLIDOM A LINKOZAMIDOM

Rezistencia typu MLSB predstavuje súčasnú rezistenciu voči makrolidom, linkozamidom a streptogramín B. Môže byť konštitutívna alebo inducibilná. Prítomnosť inducibilnej rezistencie môžeme testovať pomocou vzájomného blízkeho uloženia disku s erytromycínom a klindamycínom. V prípade výskytu inducibilnej MLSB rezistencie nie je okolo disku s erytromycínom vytvorená žiadna zóna inhibície rastu, okolo disku s klindamycínom sa síce inhibičná zóna vytvorí, ale na strane k erytromycínu príde k oplošteniu tejto zóny (indukcia rezistencie) v tvare písmena D, preto tento test býva označovaný ako tzv. D-test. V prípade pozitívneho D-testu sa test citlivosti daného izolátu voči klindamycínu interpretuje ako rezistentný. Test sa používa na detekciu MLSB fenotypu u stafylokokov, streptokokov (betahemolytických, viridujúcich a *Streptococcus pneumoniae*).

VANKOMYCÍN-REZISTENTNÝ STAPHYLOCOCCUS AUREUS

Rezistencia *S. aureus* voči vankomycínu môže byť rôzna. Prítomnosť génu *vanA*, exogénne získaného od enterokokov, sa prejavuje ako Van-A podmienená vysoká úroveň rezistencie *S. aureus* voči vankomycínu (*VanA-mediated high-level vankomycin resistant S. aureus*) a vyznačuje sa vysokými hodnotami MIC > 8 mg/l (vankomycín rezistentný *Staphylococcus aureus*, VRSA).

Označenie vankomycín intermediárny *S. aureus* (VISA) a heterorezistentný vankomycín intermediárny *S. aureus* (hVISA) predstavuje non-VanA podmienenú nízku úroveň rezistencie (*non-VanA low-level resistance to vankomycin*). VISA izoláty majú MIC vankomycínu 4 – 8 mg/l a hVISA izoláty sú voči vankomycínu citlivé (MIC ≤ 2 mg/l), ale obsahujú prítomnosť minoritnej populácie buniek (1 z 10⁶ buniek) s MIC > 2 mg/l.

Rezistencia izolátov VISA a hVISA je endogénne podmienená (chromozomálne mutácie) s komplexným mechanizmom vzniku. VISA a hVISA izoláty sa vyznačujú zhrubnutím bakteriálnej bunkovej steny (asociovej) s hyperprodukciou väzbových cieľových miest pre glykopeptidy).

Všetky uvedené kategórie majú byť považované za klinicky rezistentné voči vankomycínu. Výskyt takýchto izolátov je vzácný, VRSA (výnimočný fenotyp rezistencie) v Európe ešte neboli opísané. Väčšina izolátov s vyššími hodnotami MIC vankomycínu (VISA) alebo s prítomnosťou heterogénnej populácie (hVISA) sú kmene MRSA.

Na testovanie MIC vankomycínu voči *S. aureus* je odporúčaná bujónová mikrodilučná metóda (nie DDT). Izoláty s potvrdenou MIC > 2 mg/l majú byť zaslané do referenčného laboratória.

VANKOMYCÍN REZISTENTNÝ ENTEROCOCCUS FAECIUM A ENTEROCOCCUS FAECALIS

Izoláty vankomycín rezistentného *Enterococcus faecium* a *Enterococcus faecalis* (VRE) vykazujú MIC > 4 mg/l. Keďže enterokoky sú všeobecne rezistentné na mnohé antimikrobiálne látky, rezistencia na vankomycín výrazne komplikuje možnosti liečby. VRE sú v súčasnosti prítomné prevažne ako mikroorganizmy kolonizujúce pacientov, môžu perzistovať a šíriť sa v nemocničnom prostredí. Rezistencia voči vankomycínu je sprostredkovaná plazmidicky kódovanými VanA a VanB ligázami, ktoré zamieňajú terminálny D-Alanín v peptidoglykáne za D-Laktát, čo vedie k redukcii väzbových miest pre glykopeptidy. VanA kmene sa prejavujú rezistenciou na vankomycín aj teikoplanín, VanB kmene zvyčajne zostávajú na teikoplanín citlivé.

VRE fenotypy rezistencie môžu byť zistené stanovením MIC, DDT alebo breakpointovou agarovou metódou, problematickejšia je detekcia *vanB* rezistencie. V DDT je dôležité posúdenie charakteru okraja inhibičnej zóny, ktorý má byť v prípade citlivých izolátov ostrý a priemer zóny má byť nad stanovený breakpoint. Potrebné je dôsledné dodržiavanie pravidiel testovania podľa EUCAST, vrátane 24 h trvajúcej inkubácie na detekciu inducibilnej rezistencie.

DETEKCIA BETALAKTAMÁZ

Pomocou nitrocefínového testu možno stanoviť tvorbu betalaktamázy u kmeňov *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* a *Neisseria gonorrhoeae*. Test nie je spoľahlivý u stafylokokov. Nitrocefín je chromogénny cefalosporínový substrát, ktorý pri hydrolyze amidovej väzby beta-laktámového kruhu pôsobením bakteriálnej betalaktamázy mení svoje sfarbenie na červené. Pozitívny test predpovedá rezistenciu na niektoré betalaktámové antibiotiká, pozitívne izoláty *H. influenzae* sú považované za rezistentné na ampicilín, amoxicilín a piperacilín bez inhibítorov betalaktamázy; pozitívne izoláty *N. gonorrhoeae* sú považované za rezistentné na benzylpenicilín, ampicilín a amoxicilín.

Testovanie produkcie širokospektrálnych betalaktamáz – betalaktamáz s rozšíreným spektrom účinku ESBL

Testovanie produkcie ESBL je významné pre kontrolu šírenia infekcie a epidemiologické účely, ale v súčasnosti neovplyvňuje samotnú interpretáciu testovania citlivosti.

ESBL sú enzýmy, ktoré hydrolyzujú väčšinu penicilínov a cefalosporínov vrátane oxyimino- β -laktámových zlúčenín (cefuroxím, cefalosporíny tretej a štvrtej generácie a aztreonam), ale nehydrolyzujú cefamycíny ani karbapenémy. Väčšina ESBL patrí do skupiny A podľa Amblerovej klasifikácie betalaktamáz a je inhibovaná inhibítormi betalaktamáz (kyselina klavulánová, sulbaktám, tazobaktám) a avibaktámom.

Tento mechanizmus rezistencie je často združený aj s inými mechanizmami rezistencie voči iným skupinám antibiotík (iné betalaktamázy, aktívny eflux, zmenená permeabilita bakteriálnej bunkovej steny), čo vedie k veľkej variabilite fenotypových prejavov rezistencie. ESBL sú rozšírené u enterobaktérií, najmä u *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* a *E. coli*. Liekom voľby na terapiu nimi vyvolaných infekcií ostávajú/ostávajú často len karbapenémové liečivá.

V testovaní ESBL sa používajú skríningové (vyhľadávacie) testy a konfirmačné testy, potvrdzujúce ich samotnú produkciu. Ako skríning sa používa testovanie voči cefalosporínom (ich

znížená citlivosť) v rutinnom testovaní pomocou tzv. skríningových breakpointových hodnôt MIC alebo priemerov inhibičných zón v DDT (cefotaxim alebo ceftriaxon a ceftazidím; alebo cefpodoxím).

Samotná produkcia ESBL môže byť potvrdená/dokázaná pomocou viacerých fenotypových metód, napr. dvojitém diskovým testom synergie (DDST, angl. *double disc synergy test*); kombinovaným diskovým testom (CDT, angl. *combined disc test*); bujónovými mikrodilučnými metódami; gradientovými testami. Dokazuje sa štiepenie substrátu, najčastejšie cefalosporínov cefotaxim alebo ceftriaxon, ceftazidím a cefepim a inhibícia ESBL kyselinou klavulánovou. V DDST sa využíva synergický účinok medzi inhibítorom betalaktamázy kyselinou klavulánovou a cefalosporínmi III. generácie alebo aztreonamom, ktorý sa pri uložení diskov v správnej vzdialenosti v pozitívnom prípade prejaví rozšírením (deformáciou) inhibičnej zóny (obr. 1.16.6).



Obr. 1.16.6. Dvojitém diskový test synergie, dôkaz tvorby betalaktamáz s rozšíreným spektrom účinku ESBL *E. coli* (foto M. Horniačková).

V kombinovanom diskovom teste sa používajú cefalosporíny s a bez kyseliny klavulánovej a hodnotí sa veľkosť inhibičných zón alebo v mikrodilučnom teste rozdiel v MIC antibiotika bez inhibítora betalaktamázy a antibiotika s inhibítorom betalaktamázy, ktorý v prípade pozitívnej detekcie ESBL je $\geq 3 \log_2$ (riedenia). Stanovenie je možné aj pomocou komerčných gradientových testov ESBL.

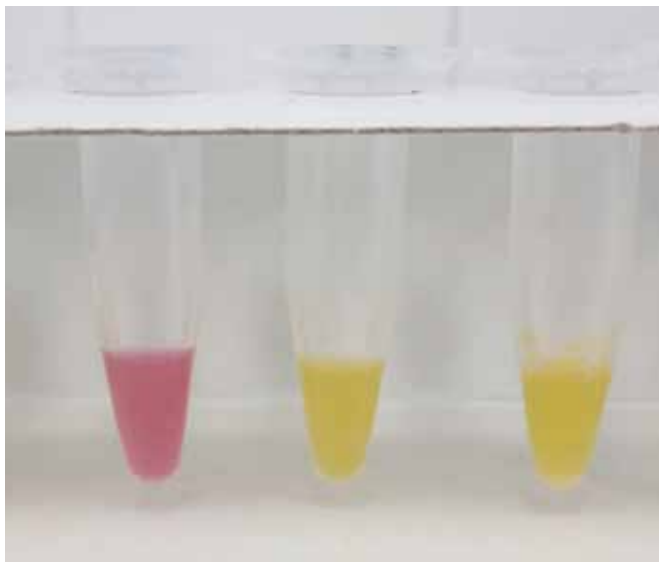
Testovanie produkcie betalaktamáz typu AmpC

Podľa Amblerovej klasifikácie patria AmpC cefalosporinázy do triedy C. Hydrolyzujú penicilíny, cefalosporíny a cefamycíny (vrátane cefalosporínov tretej, ale nie štvrtej generácie) a monobaktámy. Sú slabšie inhibované klasickými inhibítormi betalaktamáz ESBL, obzvlášť kyselinou klavulánovou. Prenosné plazmidické β -laktamázy typu AmpC sú v SR rozšírené u *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* spp. *pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae* subsp. *oxytoca*, *Salmonella enterica* a *Proteus mirabilis*, pre terapiu ostávajú účinné cefalosporíny štvrtej generácie a karbapenémy. Obvykle sa združujú s ďalšími mechanizmami rezistencie. Výskyt AmpC betalaktamáz je však v porovnaní s ESBL oveľa nižší. Fenotypový dôkaz produkcie AmpC môže prebiehať pomocou skríningových breakpointov cefalosporínov (cefoxitín, ceftazidím, cefotaxim) a konfirmáciou pomocou fenotypových testov, ktoré sú všeobecne založené na inhibícii AmpC betalaktamáz kloxacilínom alebo kyselinou borónovou.

Testovanie produkcie karbapenemáz

Karbapenemázy patria medzi betalaktamázy, ktoré hydrolytický štiepia betalaktámové antibiotiká – penicilíny, vo väčšine prípadov cefalosporíny a s rôznou aktivitou karbapenémy a monobaktámy (okrem metalobetalaktamáz). Najčastejšie sa vyskytujúce typy karbapenemáz sú KPC, NDM, OXA-48, VIM a IMP. Produkcia karbapenemáz môže viesť k rezistencii na všetky betalaktámové antibiotiká, je prenosná a zvyčajne sa združuje aj s mechanizmami rezistencie voči iným antibiotickým skupinám (fluorochinolóny, aminoglykozidy, ko-trimoxazol). Môže sa vyskytovať hlavne u zástupcov čeľade Enterobacteriaceae, najmä *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* a *E. coli*, výskyt bol však opísaný aj u ďalších rodov enterobaktérií (napr. *Enterobacter* spp.); označujú sa ako CPE (*carbapenemase producing Enterobacteriaceae*). CPE fenotyp je spojený s výrazne obmedzenými možnosťami liečby, častejším zlyhaním liečby a zvýšenou letalitou.

Dôkaz tvorby karbapenemáz je založený na skriningových testoch pri rutinnom vyšetrení citlivosti pomocou skriningových hodnôt MIC alebo inhibičných zón pre meropeném s následným potvrdením produkcie konfirmačnými testami. Ako konfirmačný test sa môže použiť dôkaz karbapenemázovej aktivity UV spektrofotometricky; dôkaz karbapenemázovej aktivity hmotnostnou spektrometriou (MALDI TOF); dôkaz karbapenemázovej aktivity pH-metrickým (kolorimetrickým) testom (napr. Carba-NP test) (obr. 1.16.7).



Obr. 1.16.7. Dôkaz produkcie karbapenemáz bakteriálnymi izolátmi pomocou kolorimetrického testu. Vľavo negatívna kontrola (červené sfarbenie média), v strede a vpravo skúmavky s pozitívnym testom (žlté sfarbenie média pri hydrolýze imipenému) u karbapenemázu tvoriacich Enterobacteriaceae *Klebsiella pneumoniae* (foto A. Žáková).

Fenotypový kolorimetrický test je rýchly test, založený na detekcii enzymatickej hydrolýzy karbapenémového antibiotika karbapenemázou, čo vedie k zmene pH média, ktorá sa prejaví zmenou farby pH indikátora (fenolová červená). Uvedené zmeny sa prejavajú a umožňujú odčítanie testu do 2 hod.

Na konfirmáciu sa používajú aj fenotypové testy, ktoré nie sú založené na dôkaze enzymatických vlastností pomocou substrátov, ale dokazujú prítomnosť, resp. identitu týchto enzýmov ako proteínov na základe ich antigénnych vlastností, teda pomocou imunochemického dôkazu (napr. imunochromatografickými súpravami).

Na dôkaz produkcie a jednotlivých typov karbapenemáz sa používa dôkaz génov rezistencie molekulárnymi metódami (PCR, multiplexová PCR, real-time PCR, sekvenácie).

LITERATÚRA

1. Cornaglia G., Courcol R., Hermann J.L., Kahlmeter G., Peigue-Lafeuille H., Vila J.(eds): European Manual of Clinical Microbiology. 1. vydanie. Epernay (Marne), 2012, Scriptorium.
2. Gattringer R, Nikš M, Ostertag R, a kol.: Evaluation of MIDITECH automated colorimetric MIC reading for antimicrobial susceptibility testing. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2002, 49: 651 – 659.
3. Giske G., Martinez-Martinez L., Cantón R. a kol.: EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance. Version 2.0, July 2017. http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Resistance_mechanisms/EUCAST_detection_of_resistance_mechanisms_170711.pdf
4. Leclercq R., Cantón R., Brown D.F.J. a kol.: EUCAST expert rules in antimicrobial susceptibility testing. Clin Microbiol Infect, 2013, 19: 141–160.
5. Magiorakos A.P., Srinivasan A., Carey R.B. a kol.: Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. Clin Microbiol Infect, 2012, 18: 268–281.
6. Murray P.R., Rosenthal K.S., Pfaller M.A.: Medical Microbiology. 7. vydanie. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2013.
7. Odborné usmernenie Ministerstva zdravotníctva Slovenskej republiky pre diagnostiku a protiepidemické opatrenia pri výskyte bakteriálnych pôvodcov infekčných ochorení s klinicky a epidemiologicky významnými mechanizmami rezistencie. Vestník MZ SR, časť 27-32, vydané dňa 25. júna 2014, ročník 62.
8. Olejník J. a kol.: Perioperačný manuál chirurga. Bratislava: Ebner, 2002.
9. Scharfen, J., Jr.: Diferenciální diagnostika v klinické mikrobiologii. Praha: Nucleus HK, 2013.
10. Slobodníková L. a kol.: Průručka na praktické cvičenia z mikrobiologie. Bratislava: Vydavateľstvo UK, 2010.
11. Votava M. a kol.: Lékařská mikrobiologie vyšetřovací metody. Brno: Neptun, 2010.
12. www.eucast.org



Hmotnostná spektrometria je semikvantitatívna analytická metóda, ktorá umožňuje identifikovať prítomnosť a molekulárnu štruktúru neznámych látok vo vzorkách. Metóda je založená na presnom stanovení molekulovej hmotnosti molekúl vo vzorke. Pri analýze vzoriek pomocou hmotnostnej spektroskopie je prvým krokom ionizácia a odparenie jednotlivých zložiek analyzovanej zmesi. V druhom kroku ionizované molekuly putujú vo vákuu pod vplyvom elektrického napätia v závislosti od pomeru ich náboja a hmotnosti, čo umožňuje zhotoviť profil jednotlivých molekúl vo vzorke, nazývaný hmotnostné spektrum. Vyhodnotenie spektier neznámych vzoriek sa najčastejšie uskutočňuje porovnávaním s referenčnými spektrami v databáze analytického identifikačného programu.

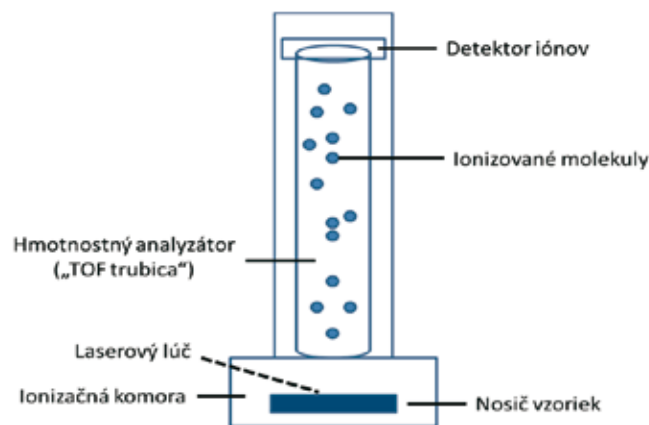
MALDI-TOF MS (MATRIX-ASSISTED LASER DESORPTION IONIZATION TIME-OF-FLIGHT MASS SPECTROMETRY)

V mikrobiológii sa na rutinnú identifikáciu baktérií a húb využíva jedna z modifikácií hmotnostnej spektrometrie – MALDI-TOF MS (matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry). Pri identifikácii mikroorganizmov sa využíva analýza spektra mikrobiálnych proteínov v hmotnostnom rozsahu 2 – 20 kDa. Sú to prevažne intracelulárne proteíny, v prvom rade ribozómové proteíny, proteíny viažuce nukleové kyseliny, alebo proteíny chladového a tepelného šoku. Vo väčšine mikrobiálnych spektier MALDI-TOF sú zahrnuté konzervatívne proteíny základného metabolizmu („house-keeping“ proteíny), ktoré sú len veľmi nepatrne ovplyvňované vonkajšími podmienkami a ktoré sú preto ideálne pre rutinnú identifikáciu. Metóda MALDI-TOF je jednoduchá a rýchla a umožňuje identifikovať na úroveň rodu, druhu a potenciálne umožňuje aj poddruhovú klasifikáciu.

Analytický postup pri MALDI-TOF MS začína nanesením malého množstva mikroorganizmov, ktoré sa majú identifikovať (stačí aj časť dobre izolovanej kolónie priamo z pevného kultivačného média), do jednej z jamiek vodivej kovovej platničky (nosiča vzoriek). Vzorka mikroorganizmov sa najčastejšie aplikuje priamo, bez opracovania špeciálnym činidlom pre dezintegráciu bunkovej steny. Väčšina mikroorganizmov totiž lyzuje v ďalšom kroku pracovného postupu po pridaní matrixového roztoku, ktorý obsahuje vodu, organické rozpúšťadlá a kyseliny. Proteíny z rezistentnejších mikroorganizmov, napr. niektorých vírusov, bakteriálnych spór a buniek húb, sa pred analýzou uvoľnia po pridaní organických kyselín (napr. kyseliny mravečnej) alebo alkoholov. Tieto činidlá sa pridávajú priamo ku vzorke mikroorganizmov v jamke nosiča vzoriek (tzv. semiextrakčný postup). Extrakčná metóda sa využíva pri analýze niektorých druhov baktérií (napr. aktinomykét), alebo pri príprave vlastných knižníc spektier. Pri tomto postupe sa extrakcia mikrobiálnych proteínov uskutočňuje ešte pred nanesením vzorky na nosič. Vo všetkých troch prípadoch sa vzorky analyzovaných mikroorganizmov po aplikácii na nosič nechajú zaschnúť. Ďalším krokom je prevrstvenie zaschnutej vzorky matrixovým roztokom, ktorý obsahuje organické rozpúšťadlo a organické kyseliny masívne absorbujúce svetelné spektrum vlnovej dĺžky lasera použitého v MALDI-TOF ionizátore (najčastejšie sa používa kyselina 2,5-dihydroxybenzoová alebo alfa-kyano-4-hydroxyškoricevová). Pri zasychaní matrixu sa odparia prítomné roz-

púšťadlá a matrixové kyseliny kryštalizujú spolu s proteínmi vzorky. Molekuly kyselín prítomných v matrixe zachytávajú väčšinu ionizačnej energie pri ionizácii a splyňovaní analyzovanej vzorky a chránia tak molekuly proteínov vo vzorke pred fragmentáciou (tzv. mäkká ionizácia; „soft ionization“). Na jeden nosič vzoriek sa dá aplikovať väčší počet analyzovaných vzoriek (24 až 96; podľa typu analyzátora) a celá príprava až po zaschnutie matrixu trvá 10 až 20 minút. Po úplnom zaschnutí matrixu je platnička pripravená na analýzu a vkladá sa do MALDI-TOF spektrometra, kde sa jednotlivé vzorky nanosené na platničke postupne analyzujú. Celý analytický proces je úplne automatizovaný.

Hmotnostný spektrometer MALDI-TOF je zložený z troch funkčných jednotiek: z ionizačnej komôrky s pulzným ionizačným laserovým zdrojom, z hmotnostného analyzátora rozdeľujúceho zložky analyzovanej zmesi na základe ich náboja a hmotnosti a z detektora, ktorý registruje čas priletu jednotlivých frakcií analyzovanej zmesi proteínov a ich kvantitu (obr. 1.17.1).

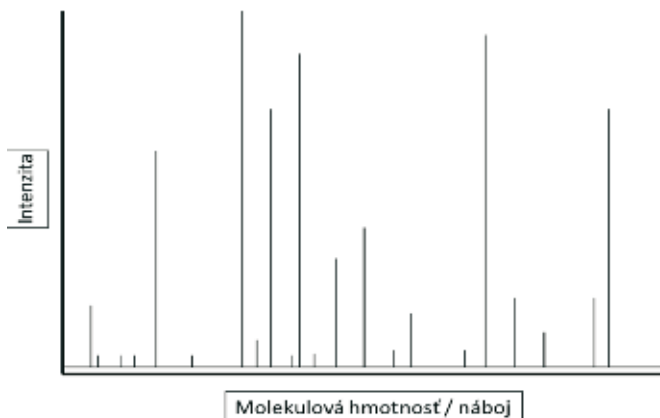


Obr. 1.17.1. Schéma MALDI-TOF MS.

V ionizačnej komôrke na vzorku pôsobia rýchle pulzy žiarenia vlnovej dĺžky 337 nm z ultrafialového nitrogénového lasera, ktoré rozptýlia molekuly matrixu a vzorky do plynného skupenstva a zároveň ich ionizujú. Väčšinu žiarenia zachytia molekuly matrixu, ktoré získavajú kladný náboj. Pri náhodných kolíziách nabitých molekúl matrixu s proteínmi vzorky sa náboj preniesť aj na tieto molekuly.

Mrak ionizovaných proteínov sa urýchli elektrostatickým poľom a usmerní sa do komory hmotnostného analyzátora, ktorý tvorí vákuová trubica zakončená iónovým detektorom. Analyzátor zaznamenáva čas, za aký preletia jednotlivé molekuly od začiatku po koniec trubice (TOF – time of flight – detektor). Rýchlosť s akou sa jednotlivé molekuly dostanú na koniec komory k detektoru závisí v prvom rade od hmotnosti častíc (ich náboj je vo väčšine prípadov jednotný). Na záver prístroj vygeneruje grafické znázornenie hmotnostného spektra, ktoré zobrazuje prítomnosť jednotlivých proteínov (os X) a ich relatívne množstvo (os Y) (obr. 1.17.2).

Samotná identifikácia sa uskutočňuje porovnaním hmotnostného spektra identifikovaného mikroorganizmu s referenčnými hmotnostnými spektrami jednotlivých taxónov uložených v databáze identifikačného počítačového programu. Vyhodnocovací softvér určí taxón, ktorého hmotnostné spektrum najviac zodpovedá spektru identifikovaného mikrobiálneho izolátu ako aj pravdepodobnosť správnej identifikácie. Presnosť a spoľahlivosť identifikácie je okrem kvality získaného spektra závislá aj od kvality referenčnej databázy, ktorá sa výrobcami priebežne rozširuje a dopĺňa. Izoláty, ktoré nemožno zatiaľ presne identifikovať ani metódou MALDI-TOF, sa môžu doriešiť molekulárno-biologickými metódami, z ktorých je najčastejšie využívaná (a už aj komerčne dostupná) metóda sekvenovania génu pre 16S rRNA baktérií alebo 18S rRNA mikroskopických húb.



Obr. 1.17.2. Príklad grafického znázornenia hmotnostného spektra.

Okrem druhej identifikácie baktérií a húb pomocou MALDI-TOF MS, ktorá je v súčasnosti bežnou súčasťou rutínnej mikrobiologickej diagnostiky, je táto metóda vhodná aj na ďalšie analýzy. Môže sa použiť pri rýchlej diagnostike pôvodcov infekčných chorôb priamo zo vzoriek krvi, likvoru, moču alebo vzoriek z dolných dýchacích ciest pacientov s cystickou fibrózou. Umožňuje detegovať baktérie s klinicky významnými mechanizmami rezistencie – stafylokoky rezistentné voči meticilínu, enterokoky rezistentné voči vankomycínu, producentov rozličných typov betalaktamáz, vrátane ESBL a karbapenemáz, ako aj kmene baktérií, ktoré enzymaticky modifikujú aminoglykozidy. Poddruhová identifikácia baktérií a typizácia baktérií a mikroskopických húb pomocou MALDI-TOF MS je užitočnou pomocou epidemiológov. Táto spektrometrická metóda našla svoje uplatnenie aj v lekárskej virológii pri detekcii vírusov v biologických vzorkách, typizácii vírusov, alebo pri detekcii vírusových mutácií, vedúcich k rezistencii voči antivirotikám. MALDI-TOF MS je využiteľná pri rýchlej identifikácii agensov potenciálne zneužívaných vo forme biologickej zbrane (*Brucella* spp., *Coxiella burnetii*, *Bacillus anthracis*, *Francisella tularensis*, *Yersinia pestis*) a pri detekcii bakteriálnych toxínov, ktoré sa môžu aplikovať vo forme aerosólov (botulinický toxín, epsilon toxín *C. perfringens*, stafylokokový enterotoxín B, šigatoxín).

PCR-ESI/MS (PCR-ELECTROSPRAY IONIZATION MASS SPECTROMETRY)

Analýza nukleových kyselín mikroorganizmov metódou PCR-ESI/MS je ďalšou možnosťou využitia hmotnostnej spektrometrie v mikrobiologickej diagnostike. Táto metóda kombinuje amplifikáciu nukleových kyselín pomocou polymerázovej reťazovej reakcie (PCR) s detekciou PCR produktov pomocou hmotnostnej spektrometrie. Prvým krokom PCR-ESI/MS je extrakcia DNA z čistých mikrobiálnych kultúr alebo priama izolácia nukleových kyselín z klinických vzoriek. V druhom kroku sa získané DNA amplifikujú pomocou PCR, najčastejšie s využitím širokospektrálnych primérov zacielených na konzervatívne gény (napr. 16S rRNA gény baktérií alebo 18S rRNA gény húb). Produkty PCR majú malú veľkosť (80 – 150 bp) a ich dĺžka a sekvencia sa líšia v závislosti od druhu mikroorganizmu. Posledným krokom je analýza PCR produktov pomocou hmotnostnej spektrometrie. Vzorky nukleových kyselín sa aplikujú do analyzátoru pomocou elektrospejovej iónizácie (ESI; electrospray ionization) a presná molekulová hmotnosť jednotlivých molekúl sa stanoví princípom TOF (time of flight), podobne ako pri identifikácii mikroorganizmov metódou MALDI-TOF. Pri analýze sa určí presná molekulová hmotnosť oboch vlákní DNA, z ktorej sa vypočíta počet jednotlivých báz (A, C, G, T) v molekule. Získané výsledky sa porovnávajú s databázou referenčných PCR produktov a tým sa identifikujú príslušné mikroorganizmy prítomné vo vzorke. Metóda PCR-ESI/MS umožňuje na základe zvoleného panelu PCR primérov v jednom kroku detegovať priamo v klinickej vzorke viacero rôznych druhov mikroorganizmov (baktérií, mikroskopických húb, vírusov) a stanoviť aj niektoré dôležité vlastnosti týchto mikroorganizmov – napríklad prítomnosť génov kódujúcich toxíny alebo rezistenciu voči antimikrobiálnym liečivám (napr. blaKPC, mecA, vanA, vanB). Nevýhodou metódy PCR-ESI/MS je vysoká cena prístrojového vybavenia a pomerne vysoké náklady na diagnostické súpravy potrebné pre spracovanie vzoriek. Preto sa táto metóda dnes využíva prevažne vo výskume a jej zavedenie do rutínnej praxe v klinických diagnostických laboratóriách je zatiaľ obmedzené.

LITERATÚRA

1. Banerjee S., Mazumdar S.: Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte. Int J Analyt Chem, 2012, Article ID 282574.
2. Cobo F.: Application of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical virology: A review. Open Virol J, 2013, 7: 84-90.
3. Croxatto A., Prodhom G., Greub G.: Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. FEMS Microbiol Rev, 2012, 36: 380-407.
4. Ho C.S., Lam C.W.K., Chan M.H.M. a kol.: Electrospray Ionisation Mass Spectrometry: Principles and Clinical Applications. Clin Biochem Rev, 2003, 24: 3-12.
5. Massire C., Buelow D.L., Zhang S.X. a kol.: PCR Followed by Electrospray Ionization Mass Spectrometry for Broad-Range Identification of Fungal Pathogens. J Clin Microbiol, 2013, 51: 959-966.
6. Singhal N., Kumar M., Kanaujia P.K., Virdi J.S.: MALDI-TOF mass spectrometry: An emerging technology for microbial identification and diagnosis. Front. Microbiol, 2015, 6: art. 791.
7. Slobodníková L.: Identifikácia baktérií. In: Liptáková A a kol.: Mikrobiologická diagnostika pôvodcov infekčných ochorení pre študentov medicíny. Bratislava: Univerzita Komenského, 2017.
8. Theel E.S.: Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for the Identification of Bacterial and Yeast Isolates. Mayo Medical Laboratories communiqué, 2013, 38: 2-8.



Pre kvantitatívne a kvalitatívne stanovenie mikroorganizmov (baktérií a húb) možno použiť elektrochemické metódy. Elektrochemické metódy v mikrobiológii patria medzi tzv. **rastové testy**. V konvenčných rastových testoch je výsledkom tvorba ohraničených, dobre rozlíšiteľných kolónií na povrchu pevných médií, ktoré sú spočítateľné alebo zákal kvapalných médií, ktorý je niekedy sprevádzaný aj zmenou ich farby. Tieto metódy sú však časovo zdĺhavé, pracné a zaťažené mnohými subjektívnymi chybami. Preto sa vyvinuli rýchle metódy, založené na impedancii, ktoré sú v spojení s miniaturizovanými mikroelektrodami často použité v biosezoroch na laboratórne a aj terénne sledovanie napr. mikrobiálnej kontaminácie potravín alebo vody.

V prípade elektrických metód ide o mikrobiálnu metabolizáciu elektricky neutrálnych substrátov v živných roztokoch na vodivé molekuly, čím sa zmenia hodnoty elektrických parametrov v roztoku. Elektrické metódy sú založené na meraní odzvy metabolizmu mikrobiálnych kultúr na striedavý prúd pri určitých frekvenciách. Meracie elektródy sú umiestnené priamo do živného média a monitorovanými parametrom je impedancia. Impedancia môže byť zjednodušene definovaná ako odpor voči striedavému prúdu pri prechode cez vodivý materiál. Ak je roztok elektrolytu vystavený elektrickému poľu, kationy migrujú k zápornej elektróde (katóde) a anióny k kladnej elektróde (anóde). Iónový tok tvorí elektrický prúd v roztoku, pričom každý ión nesie zlomok prúdu v pomere k jeho pohyblivosti a koncentrácii. Impedancia sa meria v jednotkách Ohm (Ω). Impedancia má vždy dve zložky – kapacitu a vodivosť. Kapacita viac odráža vlastnosti a zmeny na elektródach, zatiaľ čo vodivosť zmeny prostredia (roztoku, gélu) medzi elektródami. Obe komponenty závisia od frekvencie striedavého prúdu aplikovaného na elektródový systém. Pri nízkych frekvenciách je impedancia vo veľkej miere ovplyvnená kapacitou, zatiaľ čo pri vysokých frekvenciách je prevažne závislá od vodivosti. Impedancia je taktiež veľmi závislá od teploty, preto pri meraní impedancie je potrebné veľmi presné sledovanie teploty (zvýšenie teploty o 1 °C bude mať za následok priemerný nárast kapacity o 0,9% a vodivosti 1,8%). Každé rastové médium má určitú hodnotu impedancie, ktorá závisí od jeho chemického zloženia (obsah solí a makromolekúl) a zloženia inokula. Faktorom, ktorý výrazne ovplyvňuje meranie impedancie je koncentrácia solí v roztoku, vysoký obsah solí nad určitú koncentráciu znemožňuje priame meranie impedancie.

METÓDA MERANIA PRIAMEJ IMPEDANCIE

Substráty používané v živných médiách pre impenančnú mikrobiológiu sú zvyčajne bez elektrického náboja (nie sú ionizované) alebo majú nízky náboj. Pri ich metabolizme produkujú mikroorganizmy vodivé metabolity a tým zvyšujú vodivosť média (napr. vznik amínov a amoniaku, spôsobený štiepením proteínov alebo kyseliny mliečnej v dôsledku štiepenia uhľohydrátov). Zloženie živného média je preto veľmi dôležité. Musí byť selektívne pre testovaný mikroorganizmus, podporovať jeho rast a byť musí byť optimalizované pre tvorbu elektrického signálu. Po inokulácii vzorky sa skúmavky inkubujú pri teplote zodpovedajúcej nárokom sledovanému mikroorganizmu. Merací systém sa skladá z inkubačnej a meracej jednotky pripojenej k počítaču. Impedančný systém meria impedanciu živného média v pravidelných intervaloch (zvyčajne každých 6 minút). Na za-

čiatku testu používateľ definuje kritériá testu (teplota, kapacita a vodivosť, čas). Počítač zobrazuje priebeh merania každej vzorky vo forme rastovej krivky a tiež sleduje čas na dosiahnutie hodnoty zvoleného parametra u pozitívnych vzoriek či prekročenie časového limitu pri negatívnych vzorkách. Získané údaje možno archivovať a ďalej spracovávať. Zvolený ukazovateľ sa primárne zobrazuje ako závislosť zmeny daného parametra v čase (rastová krivka). Miesto na krivke a zodpovedajúci čas, kedy bola najprv zaznamenaná odchýlka rastovej krivky, sa označuje ako detekčný čas. Detekčný čas je funkciou veľkosti pôvodnej mikrobiálnej populácie, kinetiky rastu testovaného mikroorganizmu a vlastností rastového média. Je nepriamo úmerný počiatočnej mikrobiálnej hustote inokula. V čase detekcie sa obvykle očakáva približne 10^5 až 10^6 KTJ.ml⁻¹ pozorovaných mikroorganizmov v testovanej kultúre. Výsledné krivky sú reprodukovateľné pre druhy a kmene mikroorganizmov. Čas určenia je rádovo niekoľko hodín, v závislosti od počtu vitálnych mikrobiálnych buniek vo vzorke. Závislosť časov detekcie od počtu mikroorganizmov v inokule je lineárna. Preto môže byť detekčný čas použitý na určenie počtu mikroorganizmov po vykonaní príslušných kalibračných meraní.

Moderné technológie umožnili miniaturizáciu zariadení na meranie impedancie do formátu biosenzorov, pri ktorých sa čas na detekciu výrazne skrátil.

NEPRIAMA METÓDA MERANIA IMPEDANCIE

Množstvo selektívnych živných médií obsahuje vysokú koncentráciu soli, rovnako aj niektoré vyšetrované potraviny. Výsledné hodnoty vysokej impedancie týchto médií presahujú normálny merací rozsah metódy priamej impedancie. Tento problém možno odstrániť metódou nepriamej impedancie, pri ktorej sa mikrobiálny metabolizmus hodnotí na základe produkcie oxidu uhličitého. Do trubice elektród sa pridáva hydroxid draselný, meranie impedancie sa vykonáva v tejto trubici. Inokulované kultivačné médium je v oddelenej komore bez priameho kontaktu s elektródami alebo KOH. Celý systém je pevne uzavretý tak, aby bol všetok CO₂ vznikajúci pri metabolickej činnosti mikroorganizmov absorbovaný do roztoku KOH, čo spôsobuje výsledný pokles impedancie. Metóda môže tiež detegovať niektoré mikroorganizmy, ktorých rast spôsobuje iba malé alebo nedetegovateľné zmeny impedancie (napr. kvasinky a plesne). To je čiastočne spôsobené tým, že nevytvárajú silno ionizované metabolity, alebo tvoria neionizované konečné produkty, ako je etanol. Nepriama metóda sa môže použiť aj pre vzorky, ktoré môžu v priamom kontakte nepriaznivo ovplyvniť elektródy. Je dobre využiteľná najmä v potravinárstve pri dôkaze kontaminácie potravín mikroorganizmami *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *E. faecalis*, *B. subtilis*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas hydrophila*, *Salmonella* spp., kvasiniek a plesní.

LITERATÚRA

1. Wang R., Lum J., Callaway Z., Lin J., Bottje W., Li Y.: A Label-Free Impedance Immunosensor Using Screen-Printed Interdigitated Electrodes and Magnetic Nanobeads for the Detection of *E. coli* O157:H7. *Biosensors* (Basel), 2015, 15; 5(4): 791-803. Epub 2015 Dec 15.
2. Kargupta, Roli et al.: Rapid culture-based detection of living mycobacteria using microchannel electrical impedance spectroscopy (m-EIS). *Biol Res* [online], 2017, 50, 21. ISSN 0716-9760. <http://dx.doi.org/10.1186/s40659-017-0126-7>.



Využitie analýzy látok pomocou svetla predstavuje princíp mnohých analytických metód. Optické metódy sa používajú v mnohých oblastiach lekárskeho vied, vrátane mikrobiológie. Napr. denzitometria (nepriame meranie hustoty bakteriálnych buniek podľa Mc Farlanda, tzv. veľkosť inokula), turbidimetria, nefelometria alebo imunoanalýzy (ELISA, CLIA a pod.), sú mikrobiologické metódy založené na optických analýzach. Rovnako aj kultivačné mikrobiologické automaty, ktoré automaticky vykonávajú všetky kroky potrebné na identifikáciu a určenie citlivosti na antibiotiká izolovaných kmeňov majú detekčné zariadenia (readre, čítačky) založené na fotometrických metódach. Umožňujú kinetickú analýzu odčítaním jednotlivých biochemických testov každých 15 minút. Zabudovaný optický systém spája viackanálové meranie fluorimetra a fotometra na zaznamenávanie fluorescenčných, zákalových a kolorimetrických signálov, ktoré sú vyhodnotené cez zabudovanú počítačovú jednotku a softvér. Identifikácia pomocou nich tak trvá len 2 – 4 hodiny.

Výhoda optických metód je v tom, že analyzovaný materiál nie je optickými analýzami poškodzovaný ani ovplyvňovaný a môže tak byť využitý pre iné analýzy (napr. stanovenie MIC).

Povaha svetla je v súčasnej fyzike definovaná dvoma teóriami – v klasickej fyzike ako elektromagnetické žiarenie, resp. **elektromagnetické vlnenie**, v ktorom kmitajú vzájomne priečne vektory elektrického a magnetického poľa kolmo v smere šírenia svetla. V kvantovej fyzike je svetlo považované za prúd častíc – fotónov, čiže kmitajúcich dávok energie (korpuskulárny model). Na dualizme povahy svetla sa delia aj jednotlivé metódy analýzy látok pomocou svetla. Ak považujeme svetlo za elektromagnetickú vlnu ktorá sa šíri v priestore, je charakterizované vlnovou dĺžkou (λ , udávaná v nanometroch – nm), frekvenciou (ν , počet vln na jednotku dĺžky) a intenzitou elektromagnetického poľa. Ak svetlo považujeme za **prúd fotónov, teda korpuskulárnych častíc**, je charakterizované energiou fotónov (E , v jednotkách eV = $1,6 \cdot 10^{-19}$ J) a ich počtom. Podľa povahy žiarenia je jeho intenzita daná buď veľkosťou vektora elektrického poľa alebo počtom fotónov (s). Vlnová dĺžka λ , frekvencia ν a energia fotónu E sú spolu spriahnuté vzťahy:

$$E = h\nu = hc/\lambda$$

h – je Planckova konštanta, c – je rýchlosť svetla vo vákuu.

Na opis povahy svetla sa používa teória korpuskulárno-vlnového dualizmu, ktorá je základnou dogmou kvantovej mechaniky. Vlnový charakter opisuje svetlo ako elektromagnetické vlnenie, opísateľné pomocou Mawellových rovníc a pre ktoré sú typické znaky vlnenia ako napr. interferencia alebo lom svetla. Zároveň je však svetlo opísateľné diskretnými kvantami energie – fotónmi, ktoré sa pri vzájomnej interakcii správajú ako častice. Tento dualizmus je princípom Einsteinovho fotoelektrického javu, podľa ktorého $E = h \cdot f$ pre určenie energie fotónu (diskretného kvanta energie svetla), pričom h je Planckova konštanta a f je frekvencia svetla. Podľa tejto teórie sa teda pri emisii alebo absorpcii svetla atómom, energia nepredáva spojitou, ale diskretnú po kvantách – fotónoch. Z toho vyplýva aj to, že energia emitovaných častíc nezávisí od intenzity zdroja svetla.

Pre niektoré analytické metódy je dôležitá je aj možnosť svetlo polarizovať, teda primäť ho kmitať v presne určenej rovine, čo umožňuje odstrániť nedostatky difúzne sa šíriaceho sa svetla pri analýzach.

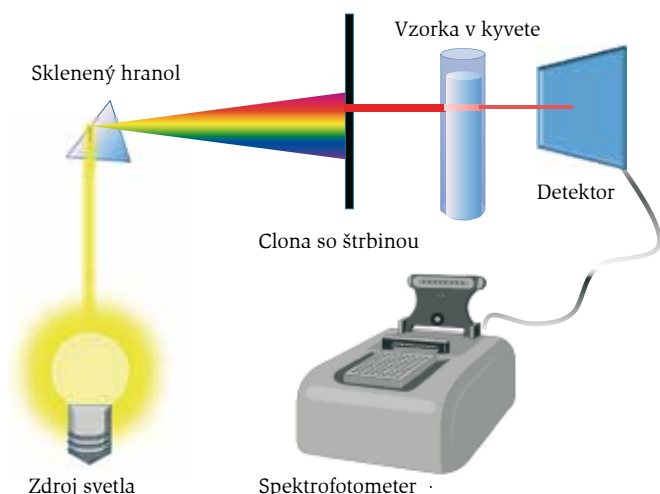
Optické analytické metódy predstavujú fyzikálno-chemické metódy, ktoré sa zakladajú na interakcii elektromagnetického žiarenia, resp. fotónov s analyzovanou látkou (analytom – molekuly, častice alebo celé bunky, najčastejšie rozptýlené vo vodnom prostredí). V dôsledku tejto interakcie dochádza buď k **zmene smeru** (odrazu a rozptylu), k **vyžiareniu** alebo **pohltieniu energie**. Preto pri optických analýzach meriame intenzitu svetla, resp. množstvo fotónov dopadajúcich na detektor v závislosti od koncentrácie niektorého z reaktantov, alebo v závislosti na čase. Meranie závislosti intenzity signálu pri určitej vlnovej dĺžke od zloženia meranej vzorky nazývame **meranie spektra**. Podľa toho, či v priebehu merania dochádza k emisii alebo absorpcii žiarenia, sa jedná o **emisnú alebo absorpčnú spektrálnu analýzu**.

Svetlo vo viditeľnej oblasti je zložené zo všetkých farieb (spektrum). Každá látka prepúšťa, odráža a absorbuje svetlo trochu inak. Tak, ako odtlačok prsta identifikuje každého jednotlivca, tak každá látka je charakteristická tým, koľko absorbuje červeného, zeleného, modrého svetla alebo niektorej inej farby svetelného spektra. Každá farba v svetelnom spektre má inú vlnovú dĺžku, takže keď svetlo zasiahne meraný objekt, napr. roztok v skúmavke, niektoré vlnové dĺžky sa absorbujú a iné sa odrážajú. To, ktoré svetlo je v roztoku pohltené a ktoré odrazené, je dané chemickým zložením roztoku. Ľudské oko vníma len odrazené farby. Napr. list stromu na jar vnímame iba zelene, pretože všetky ostatné farby boli biomasou listu absorbované. Meraním absorbancie svetla pri určitej vlnovej dĺžke danou látkou umožňuje identifikovať a kvantifikovať rôzne látky. Fotometria a spektrofotometria sú metódy, ktorými sa meria množstvo svetla s definovanými vlastnosťami absorbovaného skúmanou látkou a z toho sa odvodí aj množstvo meranej látky vo vzorke. Pri **fotometrii** sa na získanie monochromatického svetla použije **farebný filter**, ktorý po vniknutí polychromatického svetla prepúšťa ďalej len svetlo určitej vlnovej dĺžky a ostatné vlnové dĺžky pohltí. Získaný monochromatický lúč je nasmerovaný tak, aby zasiahol analyt (v kyvete, skúmavke, v jamke mikrotitračnej platničky a pod.) a po prechode sa vystupujúci lúč zachytí na detektore (fotočlánok, ktorý mení optický signál na elektrický). Ten zmeria jeho intenzitu a takto vytvorený signál sa zobrazí na meracom zariadení. Pri **spektrofotometrii** svetelný zdroj emituje svetelné lúče smerom na vzorku. V dráhe lúča je umiestnená prizma (obvykle sklenený hranol, rozkladajúci dopadajúce svetlo), ktorý rozdeľuje biele (napr. slnečné) svetlo do spojitého farebného spektra (podobne, ako kvapky dažďa rozkladajú svetlo na dúhu). Ak sa do dráhy rozložených lúčov umiestni clona – **monochromátor** s nastaviteľnou štrbinou, umožní sa tým prechod lúčov len s jednou zvolenou špecifickou vlnovou dĺžkou svetla a získa sa tak monochromatické svetlo.

ZDROJE SVETLA

Meranie spektrier vyžaduje použitie polychromatického zdroja, aby sa mohla zvoliť potrebná vlnová dĺžka svetelného lúča pre danú analýzu. Ako zdroj svetla pritom najčastejšie slúži lampy (žiarovka alebo žiarivka), ktorá vyžaruje svetlo v širokom spojitom rozsahu vlnových dĺžok. Spektrálna oblasť žiarenia môže byť daná použitým plynom (napr. xenón) vnútri lampy. Silné vysokotlakové xenónové lampy síce poskytujú vysoký výkon, ale ten zahŕňa širokú oblasť spektra. Po zvolení úzkej oblasti spektra monochromátorom bude však výkon pre vlastné meranie o niekoľko rádov men-

ší, čo môže byť pre fotometrickú analýzu nedostatočné. Najvýkonnejším zdrojom monochromatického svetla sú lasery (pozri ďalej), ktoré vyžarujú svetlo v jednej alebo niekoľko málo vlnových dĺžkach. Lasery nachádzajú uplatnenie v aplikáciách, kde meriame za presne určených podmienok (určená vlnová dĺžka). Vysoký výkon lasera potom umožňuje meranie vzoriek, ktorých signál je slabý. Kompromisom medzi uvedenými dvoma zdrojmi svetla sú kvalitné LED diódy. V súčasnosti sa ako zdroje využívajú LED diódy a laserové diódy, ktoré emitujú v časti spektra v rozsahu niekoľkých desiatok nm a majú vlastnosti tak lampy, ako aj lasera, pričom ich veľkou výhodou je nízka cena, lacná prevádzka a dlhá životnosť.



Obr. 1.19.1. Princíp spektrofotometrickej analýzy.

DETEKTORY

Na detekciu svetla sa najčastejšie používajú fotonásobiče. Sú založené na tom princípe, že pri dopade fotónu je zo svetlocitlivej fotokatódy uvoľnený elektrón, ktorý je potom urýchlený v silnom elektrickom poli a multiplikovaný pomocou systému dynód. Elektróny sú pritom postupne urýchľované elektrickým napätím medzi jednotlivými elektródami (dynódami). Vplyv urýchlených elektrónov na dynódu vyvoláva emisiu väčšieho počtu elektrónov (tzv. sekundárne emisie). Výsledkom je znásobenie počtu elektrónov, ktoré sú urýchľované smerom k ďalšej dynóde. Po sérii zesilovných prúdov elektrónov dopadá na anódu. Celkové zesilovanie môže v niektorých prípadoch dosiahnuť rádovo až 10^8 , čo umožňuje pomocou fotonásobiča detegovať aj jednotlivé fotóny.

Vzhľadom na to, že dopadajúci fotón musí mať k vyvolaniu požadovaného efektu dostatočnú energiu (tj. istú maximálnu vlnovú dĺžku, pričom platí, že čím nižšia je vlnová dĺžka žiarenia, tým vyššia energia a *vice versa*), majú detektory svoje limity svojej na dlhovlnnej strane spektra – pri bežných fotonásobičoch je to 820 nm, pri fotodiodách 1100 nm.

METÓDY ZALOŽENÉ NA ABSORBCII A EMISII SVETLA

V súčasnosti sú v klinickej mikrobiológii u nás najrozšírenejšie optické metódy pre **nekultivačné** postupy práve ELISA, založené na absorpcii svetla. Využívajú polystyrénové mikrotitračné platničky ktoré slúžia aj ako mninitaurizované kyvety, aj ako absorbný povrch (pevná fáza) na imobilizáciu analyzovaných molekúl (antigény, protilátky). Sú však čoraz viac nahrádzané inými formátmi, ktoré sú omnoho vhodnejšie pre automatické a rýchle analýzy na moderných automatoch. Na imobilizáciu analytu sa pri nich väčšinou používajú guľičky s magnetickým jadrom a ich optická analýza je založená na emisii svetla prostredníctvom imunofluorescencie alebo imunoluminiscencie. Pri fluorometrických reakciách vedie pohltie energie fotónov ku excitácii atómov, molekúl, iónov alebo radikálov a to vyvolá

spontánnu emisiu žiarenia. Pri chemoluminiscencii vytvorí svetelný signál chemická reakcia medzi enzýmom a substrátom (napr. luciferáza a luciferín alebo elektrochemická excitácia). Tieto metódy našli široké uplatnenie nielen pri imunochemických analýzach, ale aj v molekulárno-genetických, ktoré sa v súčasnosti v mikrobiológii používajú.

Pri **kultivačných** postupoch sa uplatnilo meranie absorbancie pri poloautomatickom a automatickom odčítavaní metabolických vlastností mikroorganizmov na mikrotitračných platničkách (napr. Enterotest). Táto metóda sa uplatnila (spolu s fluorimetriou pri metabolických testoch, kde štiepením substrátu bakteriálnym metabolizmom dôjde k tvorbe fluorogénneho produktu) aj pri technológiách na identifikáciu a automatické stanovenie citlivosti baktérií na ATB, napr. automaty Phoenix 100 (BD Biosciences) and the Vitek 2 (bioMérieux).

1.19.1 Absorpčná spektroskopia v ultrafialovej oblasti a oblasti viditeľného svetla (190 – 400 nm/400 – 800 nm, UV/VIS)

Absorpčná spektroskopia (fotometria) je základnou a najpoužívanejšou spektroskopickou technikou. Meranie pri jednej vlnovej dĺžke alebo len pri niekoľkých, presne definovaných vlnových dĺžkach monochromatického svetla nazývame **fotometria**. Meranie, pri ktorom sa dá vlnová dĺžka monochromatického svetla ľubovoľne nastaviť alebo merať časť absorbného spektra v určitom úseku vlnových dĺžok, sa nazýva **spektrofotometria**.

Pri prechode svetelného lúča vzorkou dochádza k exponenciálnemu **poklesu intenzity svetla** podľa Lambert-Beerovho zákona, ktorý matematicky vyjadruje **závislosť absorpcie svetla od vlastností materiálu, cez ktorý žiarenie prechádza (absorbancia)**:

$$I(\lambda) = I_0(\lambda) 10^{-\varepsilon(\lambda) c l}$$

kde I_0 znamená intenzitu dopadajúceho lúča, I intenzitu prechádzajúceho lúča, l (v exponente) optickú dráhu (tj. hrúbku vzorky) a c koncentráciu vzorky.

Zákon platí pre monochromatické žiarenie, preto musí byť zariadenie na tieto analýzy vybavené svetelným monochromátorom alebo filtermi. Extinkčný koeficient ε (molárny absorpčný koeficient) a jeho závislosť na vlnovej dĺžke sú charakteristické pre každý druh molekuly a jeho meraním sa dajú získať informácie o **chemickom zložení vzorky**. Pri vlastnom meraní spektrometre zvyčajne ukazujú hodnoty **absorbancie** A , ktorá je priamo úmerná koncentrácii vzorky.

$$A = \log(I_0/I) = \varepsilon(\lambda) c l$$

Hodnoty koeficientu extinkcie bývajú pre jednové látky udávané vo fyzikálnych tabuľkách v jednotkách $\text{cm}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$, a ak sa meria v štandardnej kyvete s optickou dráhou 1 cm, tak výpočtom podielom A/ε dostávame **koncentráciu vzorky** v jednotkách $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Nakoľko vykonanie analýzy, ako aj obsluha prístrojov sú jednoduché, je meranie absorpcie najčastejšou metódou pre stanovenie koncentrácie látok v roztokoch. Dá sa použiť na **dôkaz prítomnosti (kvalitatívne analýzy)** a **meranie kvantity** určitých zložiek v sére a iných telesných tekutinách (**kvantitatívne analýzy**), teda aj dôkaz, identifikácia, meranie množstva a sledovanie rastu baktérií. V súčasnosti na týchto princípoch pracuje väčšina automatov v rámci mikrobiológie. Absorpčné spektrometre v nich sa štandardne skladajú z polychromatického zdroja (lampy), monochromátora, držiačky vzorky a detektora. V mikrobiológii sa používajú väčšinou metódy umožňujúce analýzu desiatok vzoriek, napr. v mikrojambkových platničkách, ktoré predstavujú časovú úsporu a efektívnosť, na druhej strane však vyžaduje kvalitnú technológiu a softvér na vyhodnocovanie dát. Dôležitý je aj výber materiálov, napr. výber vhodnej platničky, ktorá musí byť transparentná v oblasti spektra, v ktorej

chceme sa má merať. Mikrotitračné platničky sú jednorazové a vzhľadom k väčšiemu počtu naraz meraných vzoriek sú podstatne lacnejšie ako plastové kyvety.

Pri meraní na platničke je lúč svetla smerovaný vertikálne, s premenlivou optickou dráhou (je daná výškou hladiny vzorky v jamke). Údaje o absorbanzii a koeficiente extinkcie k určeniu absolútnej koncentrácie vzorky nepostačujú. Vychádza sa z relatívneho porovnania vzoriek (blank kontrola), pričom objem roztoku vo všetkých jamkách by byť identický. Na rozdiel od klasických fotometrov, v ktorých sa absorbanzia meria vodorovným lúčom kolmo na os mernej kyvety a optická dráha je daná štandardným rozmerom kyvety, pri meraní pomocou zvislého lúča dĺžka optickej dráhy závisí od výšky hladiny tekutiny v jamke. Ak ku vzorke pridáme určité množstvo bezfarebného rozpúšťadla, zníži sa koncentrácia absorbujúcej látky, zároveň sa ale úmerne zvýši hladina roztoku v jamke (predĺži sa optická dráha) a výsledná absorbanzia bude rovnaká. Naopak, ak by sa zo vzorky odparila časť bezfarebného rozpúšťadla, optická dráha sa skrúti a zároveň stúpne koncentrácia absorbujúcej látky, preto sa absorbanzia nezmení. Pri klasickej fotometrii absorbanzia zodpovedá koncentrácii absorbujúcej látky v roztoku, pri meraní zvislým lúčom sa závisí absorbanzia na látkovom množstve absorbujúcej látky vo vzorke.

Pre fotometriu zvislým lúčom je potrebné menší objem vzorky – jamky sa spravidla plnia len 100 až 300 ml roztoku. Zmeranie všetkých 96 jamiek (pri plnom využití pevnej platničky, resp. zvolenom počte 8-jamkových stripov v rámečku), trvá len niekoľko sekúnd. Pri fotometrii zvislým lúčom sa okrem pojmu absorbanzia používa ešte termín **optická hustota (OD** – z anglického optical density), pre ktorú platí:

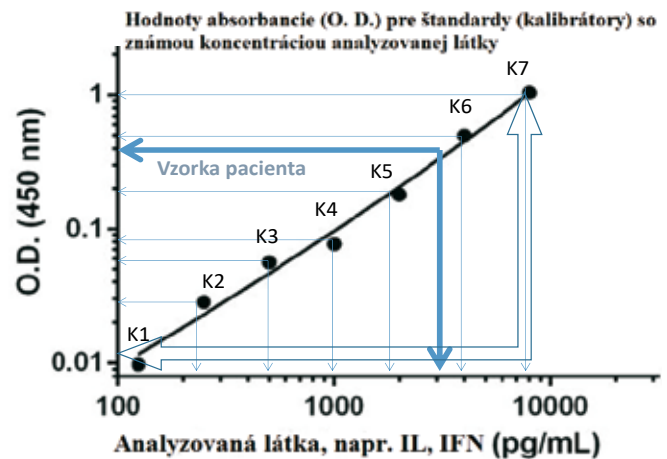
$$OD = A/l$$

OD – optická hustota, A – absorbanzia, l – dĺžka optickej dráhy.

Príkladom metód v klinickej mikrobiológii, kde sa bežne využívajúce vertikálne meranie absorbanzie v mikrojамkovej platničke je práve metóda ELISA, ktorá je postavená na základe imunochemickej reakcie s reakčným členom (antigén, protilátka) s naviazaným enzýmom, ktorý katalyzuje vznik farebnej látky zo substrátu. Na základe vzniku optickej hodnoty signálu v dôsledku chemickej reakcie ide teda o fotochemickú reakciu. Reader (rídér, čítač) ELISA testov má fotometer so sadou farebných filtrov, ktoré umožňujú merania farieb svetla najbežnejších chromogénnych substrátov. Meranie analytu v mikrotitračnej platničke sa vykonávajú dvojicou lúčov s dvoma vlnovými dĺžkami, aby sa odfiltrovali nešpecifické signály pozadia z mikrotitračnej platničky, zákal a pod. Vyžaduje si to zistiť rozdiel výsledkov merania tzv. blank kontroly pri druhej vlnovej dĺžke, preto musí druhá vlnová dĺžka (referenčná) byť čo najďalej od maximálnej absorpcie substrátu. Ak je napr. substrátom TMB (3,3',5,5'-tetrametylbenzidín, ktorý je často používaným substrátom pre detekciu imunokomplexov v ELISA testoch, konvertujúci enzým je chrenová peroxidáza), je maximálna absorbanzia pri 492 nm a referenčná vlnová dĺžka je pri 620 nm. Pri kvantitatívnej analýze (napr. stanovenie hladiny protilátok proti predpokladanému patogénu) sa hodnoty z fotometrického merania radu kalibrátorov (riedení analytu so známou koncentráciou) využívajú na vytvorenie tzv. štandardnej kalibračnej krivky, pomocou možno stanovenie hodnôt dokazovanej molekuly v klinickej vzorke. Namerané hodnoty kalibrátorov sa pritom nanesú na graf, kde ich spojením vznikne krivka (manuálne vyhodnocovanie je možné, ale dnes už obsoletné) alebo sa z kalibročných meraní vypočítavajú hodnoty patientských vzoriek pomocou rovnice lineárnej regresie (automatický výpočet).

Okrem štandardov a diagnostikovaných vzoriek sa v testoch musia vždy použiť pozitívne a negatívne kontroly, aby sa jednak vypočítala hraničná hodnota (medzná hodnota, cut off) a jednak aby sa overil správny priebeh celej analýzy. Väčšina

ELISA automatov, resp. imunoanalýzátorov dokáže bez zásahu obsluhy spracovať materiál osadený na nosník v primárnych skúmavkách autonómne, vrátane výpočtu kvalitatívnych alebo kvantitatívnych výsledkov a ich expedície vo forme dátového výstupu do laboratórneho informačného systému.



K1 – K7 sú kalibrátory (štandardy)

Merací rozsah

Obr. 1.19.2. Princíp kvantitatívneho stanovenia látok pomocou spektrofotometrie a ostatných optických metód. Meraním absorbie (resp. svetelného signálu) sady kalibrátorov sa získava hodnota pre jednotlivé koncentrácie stanovovanej látky (analytu, napr. antigén, potilátka, CRP, ASLO, presepsín, neopterin, interferón a pod.) v merateľnom rozsahu. Priradením hodnoty absorbie (signálu) k príslušnej koncentrácii analytu v kalibrátore (napr. v pg/mL pre cytokíny), vzniká kalibračný bod. Spojením radu kalibračných bodov vznikne kalibračná (štandardná) krivka. Ak meraním spektrofotometrom získame hodnotu absorbie pre vzorky pacientov, pomocou kalibračnej krivky vypočítame neznámu hodnotu analytu vo vzorke.

U netransparentných vzoriek môžeme určiť ich absorpčné spektrum nepriamo, pomocou tzv. reflexnej spektroskopie. Metóda vychádza z toho, že reflexné spektrum (závislosť intenzity odrazeného svetla na vlnovej dĺžke) je doplnkovým spektrom k spektru absorpčnému.

1.19.2 Fluorescenčná spektroskopia

Absorpciou fotónu z lúča vo viditeľnej či ultrafialovej oblasti spektra (UV/VIS) sa molekuly niektorých látok dostávajú do excitovaného stavu, ktorý je nestabilný. Molekula sa tak získanej prebytočnej energie zbaví tým, že pri návrate do základného stavu vyžiari (emituje) iný fotón. Tento dej nazývame (foto) **luminiscencia** a príslušné látky sa nazývajú **luminofóry**. Excitovaný stav možno dosiahnuť nielen svetlom (fotónový lúč), ale aj dodaním elektrického náboja, chemickou alebo biologickou reakciou. Pri uvedenom procese dochádza počas odlišne dlhej doby zotrvania molekúl luminifórov v excitovanom stave k rôznym relaxačným procesom, teda ku strate energie. Pri relaxácii sa emitovaný fotón vyznačuje menšou energiou, a teda väčšou vlnovou dĺžkou, ako mal fotón absorbovaný molekulou luminifóru. Táto vlastnosť luminifórov znamená schopnosť ich molekúl meniť farbu svetla. V závislosti na mechanizme návratu molekuly do základného stavu rozlišujeme dva typy fotoluminiscencie – **fluorescenciu** a **fosforescenciu**. Pre prvý je typický jednoduchší prechod excitovaného singletového elektrónu do základného stavu a kratšia doba emisie fotónu po ukončení excitácie (asi 10^{-10} až 10^{-7} s). Látky so schopnosťou fluorescencie nazývame fluorofóry. U niektorých molekúl však môže dochádzať k relaxácii molekúl z tzv. tripletného (metastabilného) stavu a návrat do základného stavu potom vyžaduje súčasnú zmenu elektrónového aj spinového stavu molekuly. V tomto

prípade ide o fosforescenciu a tento typ luminiscencie je výrazne pomalší.⁴

Prístroje pre fluorescenčné spektroskopiu väčšinou pracujú v tzv. L-usporiadaní, kedy je emisia svetla zo vzorky snímaná v smere kolmom na smer dopadajúceho excitačného lúča. V rôznych technikách sú využívané monochromatické aj polychromatické, kontinuálne, pulzné aj modulované zdroja svetla. Použitie emisného monochromátoru umožňuje odfiltrovanie rozptýleného excitačného svetla, čo dáva fluorescenčným technikám vysokú citlivosť (detekcia až femtomolárnych koncentrácií analytu, napr. pri digitálnej PCR).

Čo sa týka počtu meraných veličín, aj využívaných techník, je fluorescenčná spektroskopia v porovnaní s absorpčnou spektroskopiou oveľa pestršia, čo vidno aj na vývoji technológií určených pre diagnostiku na pracoviskách klinickej mikrobiológie v posledných rokoch. Medzi sledované veličiny analýz patrí intenzita fluorescencie pre danú vlnovú dĺžku, excitácie a emisie, teda excitačné spektrum (závislosť intenzity na vlnovej dĺžke excitácie pri pevne danej vlnovej dĺžke emisie), emisné spektrum (závislosť intenzity na vlnovej dĺžke emisie pri konštantnej vlnovej dĺžke excitácie), anizotropia fluorescencie (otočenie polarizácie emisie voči smeru polarizácie excitačného svetla) a doba zotrvania v excitovanom stave. K dispozícii je veľké množstvo fluorofórov pokrývajúcich vlnové dĺžky od ultrafialové až po blízku infračervenú oblasť spektra. Rozlišujeme fluorescenčné značky, tj. fluorofóry kovalentne naviazané na skúmanú molekulu a nekovalentne interagujúce fluorescenčné sondy, ktoré menia svoje fluorescenčné vlastnosti v závislosti na interakcii s molekulami analytu. Využitie oboch skupín látok spočíva predovšetkým v odlíšení alebo špecifické zviditeľnenie určitých molekúl buniek alebo tkanív, v sledovaní molekulárnych interakcií a v špecifickej detekcii vybraných analytov alebo opisu fyzikálnych parametrov systému, ako je veľkosť molekuly, polarita, pH alebo viskozita okolitého prostredia. Fluorescenčné značenie vybraných biomolekúl možno vykonávať buď priamo (ak je ich možno izolovať), alebo nepriamo, pomocou označenia inej molekuly, ktorá s danou molekulou špecificky interaguje. Ak je vybraná látka antigénnej povahy, interaguje so značenou protilátkou; v prípade nukleových kyselín možno na značenie využiť oligonukleotid s komplementárnou sekvenciou.

Na fluorescenčnom značení je založené veľmi citlivé a špecifické farbenie vybraných molekúl alebo častí bunky – fluorescenčné mikroskopia. K veľkému rozvoju fluorescenčnej mikroskopie došlo potom, čo sa podarilo využiť zvláštny druh značiek, tzv. fluorescenčné proteíny, ktoré umožnili farbiť jednotlivé bunkové komponenty s vysokou špecificitou. Vysoká špecificita značenia sa dá dosiahnuť aj pripojením génu pre fluorescenčný proteín ku génu vybraného bunkového proteínu.

⁴ Formou luminiscencie je aj laser, ktorý sa používa na zosilnenie svetla. Zosilnenie svetla vzniká vďaka stimulovanej emisii fotónov. Pri nej elektróny z vybudenej stavov (do ktorého sa dostali pohľtením fotónu, ktorý má presne tú energiu, ktorá je potrebná na prechod elektrónu do vyššej energetickej hladiny) prechádzajú na základné stavy za sprievodu spontánne (náhodne) vyžiareného fotónu. Pri lasere vplyvom interakcie vybudenej elektrónu s ďalším fotónom zodpovedajúcej vlnovej dĺžky je elektrón donútený vrátiť sa do pôvodnej energetickej hladiny, pričom uvoľní pohľtený prvý elektrón, ktorý ďalej letí v smere druhého interagujúceho fotónu. Takto vyžiarený „nový“ fotón má rovnakú frekvenciu aj fázou ako druhý fotón. Fotóny majú tak časticový, ako aj vlnový charakter. Pretože medzi vlnením oboch fotónov nie je fázový posun, ich vlnenie sa spojí (skladanie vln), a tak sa ich amplitúda zdvojnásobí. Rovnako sa zdvojnásobí ich energia. Vďaka umiestneniu do rezonátora (napr. dve rovnobežné zrkadlá), spontánne vyžiarený fotón opakovane prechádza svetlo zosilňujúcim materiálom, napr. kryštál Al_2O_3 s prímiesou chrómu (korund, resp. rubín), polovodič, kvapalina, plyny ako neón, argón, hélium a iné, čo vyvoláva stimulovanú emisiu a tak vznikajú nové a nové fotóny s rovnakým smerom letu a fázou, ktoré vyvolávajú ďalšiu stimulovanú emisiu a dochádza k reťazovému efektu a vzniku prúdu koherentných fotónov s vysokou energiou. Tak vznikne lúč najjasnejšieho známeho svetla (dokonca ešte jasnejšie než slnečné svetlo) – laser.

Bunka neskôr exprimuje tzv. fúzne proteíny, ktoré vďaka fluorescenčnému proteínu emitujú v oblasti viditeľného svetla (pozri pseudotypy HIV, subkapitola 1.13: Kultivácia mikroorganizmov). Existencia farebných variantov fluorescenčných proteínov umožňuje viacfarebné značenie. Fluorescenčné značenie je tiež súčasťou iných metód, napr. western-blotting, metód EIA alebo prietokovej cytometrie.

V spracovávaných biologických vzorkách okrem pridávaných diagnostických fluorofórov existujú v tkanivách natívne molekuly, ktoré sú po ožiarení prirodzene schopné fluorescencie. Hovoríme o vlastnej fluorescencii (angl. intrinsic fluorescence), čiže autofluorescencii. V rutinnom laboratórnom vyšetrowaní v mikrobiológii môže mať tento fenomén skôr charakter interferencie, ktorý sťažuje interpretáciu nálezu.

1.19.3 Chemiluminiscencia

Iným princípom fotochemickej analýzy je chemiluminiscencia, ktorá vzniká ako výsledok chemickej, elektrochemickej alebo biochemickej reakcie. Luminiscencia preto nevyžaduje svetelný zdroj na excitáciu alebo optiku na výber diskretných excitačných vlnových dĺžok. Luminiscenčný optický systém pozostáva zo svetelne izolovanej komory a detektora (analógový detektor alebo detektor fotónov). Fotónové čítanie je najcitlivejší prostriedok detekcie luminiscencie. Niektoré rídre pre chemoluminiscenciu majú sadu voliteľných optických filtrov alebo laditeľné optické systémy monochromatických vlnových dĺžok pre záznam a vyhodnotenie špecifických luminiscenčných vlnových dĺžok. Schopnosť merania viacerých vlnových dĺžok alebo dokonca rozsahov vlnových dĺžok umožňuje detekciu testov, ktoré obsahujú viac luminiscenčných reportérových molekúl. Jedným z mnohých príkladov využitia chemiluminiscencie je pyrosekvenácia mikrobiálneho genómu (pozri 1.20.4.31 Sekvenovanie nukleových kyselín).

1.19.4 Metódy elastického rozptylu svetla

Pri elastickom rozptyle dochádza iba k zmene smeru svetla na časticach s indexom lomu odlišným od okolitého prostredia, bez zmeny vlnovej dĺžky svetla. Podľa veľkosti častíc, na ktorých dochádza k rozptylu, hovoríme o Rayleighovom rozptyle (veľkosť analyzovaných častíc je menšia než 1/20 vlnovej dĺžky svetla, čo sa týka biomolekúl, napr. reaktantov zápalu), alebo Mieovom rozptyle (veľkosť častíc je porovnateľná s vlnovou dĺžkou svetla alebo je väčšia, čo je prípad buniek alebo organel, napr. pri meraní hustoty inokula baktériálnej kultúry pri stanovení citlivosti na antimikrobiálne látky).

Zákalometria je optická metóda, založená na meraní intenzity svetelného lúča prechádzajúceho zákalom, resp. jeho úbytku, teda absorpciou alebo rozptylom svetla na čistočkách zákalu. Zákal môže byť spôsobený rôznymi čistočkami, napr. suspenziou baktérií, čo sa využíva aj v bakteriológii na priame metódy, akými sú napr. stanovenie hustoty inokula (analogického McFarlandovej stupnice) alebo na sledovanie rastovej krivky danej baktériálnej kultúry (vrátane citlivosti na antimikrobiálne látky). V sérológii je zdrojom meraného zákalu (turbidity) precipitát, vzniknutý imunochemickou reakciou medzi antigénom (stanovovaný proteín) a protilátkou, reagujúcou špecificky s dokazovaným proteínom. **Turbidimetrické a nefelometrické** postupy sú analytické zákalomerné metódy, ktoré sa používajú aj v klinickej mikrobiológii najmä aj na stanovenie celkových proteínov v sére, likvore a iných telesných tekutinách, ktoré majú priamo vzťah k infekčným ochoreniam, napr. ASLO, anti DNÁza B, ale aj iných proteínov, ktorých hladiny sa menia v súvislosti s priebehom infekciou napr. CRP, celkové IgG, IgM, IgA a IgE. Podstatou je meranie zákalu alebo rozptylu, ktorý v roztoku vytvoril precipitát po imunochemickej reakcii medzi príslušným proteínom vo vzorke pacienta (v sére, likvore a pod.), ktorý predstavuje antigén a príslušnou protilátkou, obsiahnutou v diagnostických reagentoch (obr. 1.21.8).

Táto reakcia musí byť vysoko štandardizovaná, aby bol zákal dostatočne stabilný a merania reprodukovateľné vo veľkom me-

Tab. 1.19.1. Príklady fluorescenčných látok (farbív, fluoroórov), ktoré sa využívajú na mikrobiologickú diagnostiku a štúdium mikroorganizmov.

Farbivo	Excitačná vlnová dĺžka (λ_{max}) (nm)	Emisná vlnová dĺžka (λ_{max}) (nm)	Ligand alebo substrát	Využitie
TOTO-3	642	660	DNA, RNA	kvantifikácia DNA, štúdie bunkového cyklu
SYTOX Green	504	525	DNA, RNA	životaschopnosť, kvantifikácia DNA
PI	536	625	DNA, RNA	životaschopnosť, kvantifikácia DNA, štúdie bunkového cyklu
Etídium bromid	510	595	DNA, RNA	kvantifikácia DNA, štúdie bunkového cyklu
Hoechst 33258/33342	340	450	DNA (páry GC)	štúdie bunkového cyklu
SYTO 13	488	509	DNA, RNA	životaschopnosť, kvantifikácia DNA, štúdie bunkového cyklu
Mitramycín	425	550	DNA	štúdie bunkového cyklu
Pyronine Y	497	563	RNA	kvantifikácia RNA
FITC	495	525	proteín	detekcia mikróbov
Texas Red (sulforhodamín izotiokyanát)	580	620	proteín	detekcia mikróbov
Oregon Green izotiokyanát	496	526	proteín	detekcia mikróbov
Indo-1	340	398–485	Ca ²⁺	mobilizácia Ca ²⁺
Fura-2	340	549	Ca ²⁺	mobilizácia Ca ²⁺
Fluor-3	469	545	Ca ²⁺	mobilizácia Ca ²⁺
BCECF	460–510	520–610	pH	metabolické variácie
SNARF-1	510	587–635	pH	metabolické variácie
DIOC6(3)	484	501	membránový potenciál	citlivosť na antibiotiká, metabolické zmeny
Oxonol [DiBAC4(3)]	488	525	membránový potenciál	citlivosť na antibiotiká, metabolické zmeny
Rodamín 123	507	529	membránový potenciál	citlivosť na antibiotiká, metabolické zmeny
Fun-1	508	525–590	kvasinková vakuolárna enzýmová aktivita	metabolický stav kvasiniek
Nílska červeň	490–550	540–630	lipidy	
Lektíny	závisí od konjugovaného fluorochrómu	závisí od konjugovaného fluorochrómu	membránové oligosacharidy	zloženie bunkovej steny, detekcia mikróbov
Fluorescenčne značené oligonukleotidy	závisí od konjugovaného fluorochrómu	závisí od konjugovaného fluorochrómu	nukleotidové sekvencie	identifikácia mikróbov
Calcofluor white	347	436	chitín a iné uhľovodíkové polyméry	detekcia húb
Substráty spojené s fluorochrómmi			enzýmové aktivity	metabolická aktivita
Protilátky značené fluorochrómmi	závisí od konjugovaného fluorochrómu	závisí od konjugovaného fluorochrómu	antigény	detekcia mikróbov

racom rozsahu. Preto sa v reakcii používajú ochranné polyméry (napr. polyetylén glykol). Pri zákalomerných metódach meranie ruší prítomnosť cudzorodých látok (chylózne alebo hemolytické sérum). Prejavuje sa to najmä pri nefelometrii, ktorá je aj analyticky citlivejšia a dokáže merať aj veľmi nízke koncentrácie, približne 10x citlivejšie ako turbidimetria. Turbidimetria je v tomto zmysle robustnejšia, teda menej citlivá, ale zároveň je aj menej ovplyvňovaná rušivými faktormi. **Turbidimetria meria úbytok svetla** v lúči, ktorý prechádza priamo cez zákal, čiže meria absorbanciu. Svetlo je pri turbidimetrii merané fotometrom a stanovené proteíny, resp. ich imunokomplexy sa merajú pri vlnovej dĺžke približne 340 nm. **Nefelometria meria difúzny odraz svetelného lúča**, dopadajúceho na dispergované častice vytvoreného zákalu. Na rozdiel od turbidimetrie meria odrazené svetlo, teda pod iným uhlom, ako je smer dopadajúceho svetla, väčšinou pod uhlom 70° – 90°. Zdrojom svetelného lúča pri nefelometrii je laser (hélium-neónový alebo argónový), signál sa zachytáva na fotodióde alebo fotonásobiči. Obe techniky sú schopné merať buď po ukončení reakcie (end point), alebo počas reakcie meraním zme-

ny úbytku či rozptylu svetla v závislosti od času – teda kinetiku, ktorá je priamo úmerná rýchlosti vzniku imunokomplexu Ag-Ab.

Zákalomerné techniky sa vykonávajú zväčša na prístrojoch, ktoré sú schopné automaticky upraviť proces riedenia vzorky a merania tak, aby sa vyhlí problémom, vyplývajúcim jednak z nadbytku protilátok (efektu prozóny) alebo rozpadu imunokomplexu pri prebytku antigénu (efektu postzóny), jednak z vplyvu rušiacich faktorov (hemolytické vzorky).

LITERATÚRA

1. Liptáková A. et al.: Mikrobiologická diagnostika pôvodcov infekčných ochorení pre študentov medicíny. Bratislava: Univerzita Komenského, 2018.
2. Cibiček N. a kol.: Principy a využití vybraných analytických metod v laboratorní medicíně. Olomouc: Univerzita Palackého, 2014, 160 s. ISBN: 978-80-244-3951-8
3. Álvarez-Barrientos A., Arroyo J., Cantón R., Nombela C., Sánchez-Pérez M.: Applications of Flow Cytometry to Clinical Microbiology. Clinical Microbiology Reviews, 2000, 13(2): 167-195.

Predný J.



MOLEKULÁRNO-GENETICKÉ METODIKY V MIKROBIOLOGII

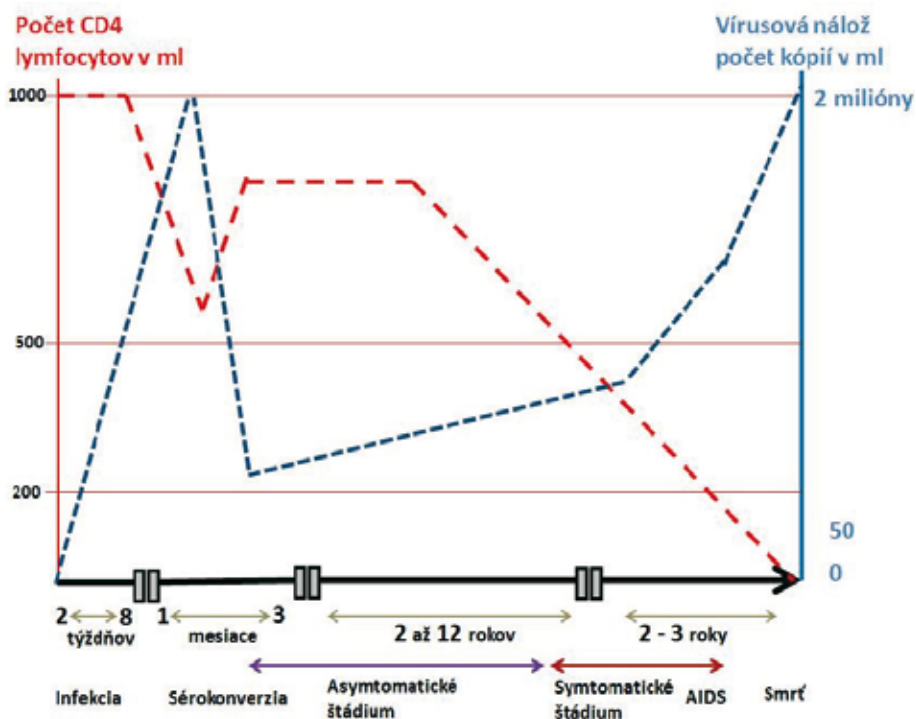
Konvenčná mikrobiologická diagnostika (mikroskopia, kultivácia...) je väčšinou cenovo priaznivá, ale často sú s ňou spojené mnohé zásadné obmedzenia, napr. to, že uzatvorenie vyšetrenia trvá aj niekoľko dní, alebo že niektoré mikroorganizmy nemožno kultivovať. Niektoré z týchto obmedzení pretrvávajú aj po zavedení rýchlej kultivačnej automatizovanej diagnostiky, MALDI-TOF metód a rýchlych sérologických metód. Preto sa v súčasnosti v mikrobiologických laboratóriách čoraz častejšie používajú molekulárne-genetické (MG) techniky, hoci sú cenovo náročnejšie. Molekulárne-genetické metódy sú založené na dôkaze špecifickej sekvencie DNA alebo RNA a patria medzi metodiky priameho dôkazu mikroorganizmuov. Patria sem:

- hybridizácia pomocou génových sond,
- amplifikácia špecifických sekvencií NK,
- sekvenácia nukleových kyselín,
- analýza enzymaticky štiepených fragmentov NK,
- génové mikročipy,
- kombinované metódy.

Vďaka automatizácii prístrojov na MG testy sú v súčasnosti tieto metódy nielen vysoko citlivé a špecifické, ale aj rýchle. Mnohé z týchto moderných techník má už komerčný formát, a to tak vo forme kvalitných diagnostických setov, ako aj sériovo vyrábaných automatov s vysokou úrovňou štandardizácie metodík, určených pre klinické využitie. V rámci klinickej mikrobiológie sa uplatňujú najmä amplifikačné techniky, prevažne polymerázová reťazová reakcia (PCR), resp. polymerázová reťazová reakcia v reálnom čase (real time PCR), nielen na dôkaz

a identifikáciu, ale aj na genotypizáciu a kvantifikáciu. Amplifikácia je aj predstupňom sekvenovania nukleovej kyseliny mikroorganizmov na ich druhové, resp. ešte detailnejšie taxonomické určenie.

MG metódy sa používajú predovšetkým na urgentnú diagnostiku pôvodcov ochorení vyvolaných náročnými, pomaly rastúcimi, nekultivovateľnými organizmami v klinických vzorkách, ale aj na detekciu, identifikáciu a určenie vlastností niektorých izolátov. Umožňujú odhaliť a identifikovať pôvodcu aj v prípadoch, kedy ide o neživotaschopné mikroorganizmy (napr. ktoré boli inhibované vplyvom podávaných antimikrobiálnych látok). Dávajú možnosť identifikovať nielen živé, ale aj mŕtve alebo dezintegrované baktérie, najmä po ATB terapii. Týka sa to aj identifikácie inak životaschopných, ale v danom čase nekultivovateľných baktérií alebo tých, ktoré sa adaptovali na perzistentnú infekciu či prežívane tlaku antibiotík vo forme SCV (small colony variant). MG diagnostikou sa dokazujú vlastnosti mikroorganizmov, ktoré sa nedajú určiť konvenčnými kultivačnými, mikroskopickými alebo sérologickými technikami a určenie týchto vlastností je dôležité pre rozhodnutie o spôsobe ďalšej liečby (napr. genotyp HCV). Ďalšou výhodou MG metód je možnosť kvantifikovať počet kópií danej sekvencie vo vzorke, a tým je umožnené sledovať množstvo infekčného agens (zvýšenie alebo naopak úbytok, teda dynamika) napr. virémie (obr. 1.20.1). To môže byť znakom progresie ochorenia (napr. reaktiváciu vírusu ešte pred nástupom klinických príznakov), alebo naopak, poklesom sa preukáže účinnosť zvolenej antivírusovej terapie. Pokrok v diagnostike najmä vírusových patogénov a liečba nimi vyvolávaných ochorení by boli bez MG diagnostiky nepredstaviteľné. Molekulárno-genetické testy do-



Obr. 1.20.1. Príklad aplikácie MG metodík v klinickej mikrobiológii – monitoring vírusovej nálože.

Virologický monitoring (sledovanie kinetiky) infekcie HIV-1. Po infekcii vírusom HIV-1 možno pomocou molekulárno genetických metód vo fáze akútnej choroby stanoviť vysokú vírusovú nálož (záťaž), po ktorej nasleduje silný pokles počtu CD4 buniek. Po sérokonverzii a vzniku chronickej infekcie (približne 14 týždňov po infekcii) vírusová záťaž poklesne na úroveň, od ktorej sa u neliečeného pacienta v priebehu niekoľkých rokov stále zvyšuje a zároveň klesá počet jeho CD4 buniek. Pokles počtu CD4 na menej ako 200 buniek/mm³ je jedným z kritérií na diagnostiku infekcie v štádiu 3 (AIDS). Zdroj: <http://ibase.info/ttfa/section-2/214-how-cd4-and-viral-load-are-related/>.

kázu priniesť v priebehu niekoľkých minút až hodín výsledky o mikrobiálnej etiológii, ktoré sú reálne využiteľné pre diferenciálnu diagnostiku a určiť vhodnú zdravotnú starostlivosť o kriticky chorých pacientov, napr. novorodencov, pri akútnych pneumóniách, pri pacientoch s neuroinfekciami, pri niektorých hemoragických vírusových ochoreniach a pod. Pri náročných, život zachraňujúcich liečebných postupoch, ako sú transplantácie krvotvorných buniek alebo aj orgánových transplantáciách by ich *lege artis* výkon bez MG metódik nebol možný. Výsledky MG diagnostiky sú kľúčové aj pre celý manažment terapie závažných chronických infekcií, napr. pri liečbe vírusových hepatitíd B a C a HIV infekcie.

Uplatnenie hybridizačných metód v klinickej mikrobiológii sa týka najmä rýchlej identifikácie patogénov v pozitívnych hemokultúrach a gramnegatívnych pôvodcov pneumónií metódou FISH (fluorescenčná in situ hybridizácia). Pri detekcii metódami PCR, ktorá sa doteraz najviac uplatnila v MG diagnostike, možno vývoj rozdeliť na dva prúdy. Doteraz najčastejšie využívaným postupom je identifikácia mikroorganizmov pomocou špecifických PCR reakcií, umožňujúcich detekciu buď konkrétneho druhu baktérie, alebo nanajvýš niekoľko desiatok druhov (multiplex PCR). Druhým, čoraz častejším postupom v bakteriológii je využitie panbakteriálnych PCR s primérmami zameranými do oblasti 16S rRNA, ktoré sú spoločné pre všetky baktérie. Vzniknuté PCR produkty sú následne osekvenované a zistená sekvencia je porovnaná so typovými sekvenciami baktérií v počítačovej databáze. Tak možno určiť druh akejkoľvek baktérie, prítomnej vo vyšetrovanom biologickom materiáli. Najčastejšie takto vyšetrované biologické materiály sú biofilmy (viď kap. Klinická mikrobiológia, Infekcie súvisiace s biofilmom a cudzím telesom), chlopňové náhrady, kĺbové či iné punkty, abscesy, likvor, stery, plodová voda, ale aj krv. Pre uvedenú detekciu patogéna v krvi je dôležitá preanalytická fáza, najmä načasovanie odberu, nakoľko baktérie sú z krvi veľmi rýchlo eliminované. Zásadný význam má sekvenovanie 16S rRNA pri kultivačne negatívnych infekciách, kedy umožňuje nielen identifikovať etiologického pôvodcu ochorenia, ale predovšetkým nasadiť čo najskôr cieľnú antibiotickú terapiu.

Horeuvedené výhody MG diagnostiky mnohých nezasvätených (aj študentov) zvädzajú k ilúzií o možnosti využívať ju ako absolútnu a univerzálnu metodiku dôkazu všetkých mikroorganizmov a ich vlastností (hlavne ako záchranná formula odpovede v písomných testoch z mikrobiológie na otázku, aká je mikrobiologická diagnostika pri danej infekcii). Nie je tomu tak a veľmi dlho nebude. Okrem stále vysokej ceny jednotlivých MG vyšetrení (v porovnaní s konvenčnými metódami) a osobitných preanalytických požiadaviek je to tak preto, že v praxi neumožňuje komplexne testovať vlastnosti identifikovaného mikroorganizmu (napr. zloženie a kvantitatívne charakteristiky mikrobioty, v ktorom daný druh patogénu existuje, jeho početnosť, rastové, makro – a mikroskopické vlastnosti, citlivosť na ATB a pod.). Je to dané aj tým, že ponuka komerčne dostupných MG diagnostík s príslušným klinickým certifikátom („**for clinical use**“) je voči počtu mikrobiálnych druhov veľmi obmedzená. Sú to diagnostiká, ktorých špecifická a senzitivita voči špecifickému ochoreniu bola laboratórne a klinicky overená a potvrdená niektorou z vládnych a inštitucionálnych medzinárodných autorít, napr. US FDA – Správa potravín a liečiv USA alebo Paul – Ehrlich Institut v Nemecku. Mnoho potrebných MG metódik je preto iba na úrovni experimentálnych postupov, pri ktorých sa používajú diagnostiká bez klinického certifikátu („**for reserch use only**“) a nie štandardizovaná diagnostika. Stačí si predstaviť koľko desiatok drahých MG analýz a príslušného času by bolo potrebné na mikrobiologické vyšetrenie jednej vzorky moču pri cystitíde v porovnaní so štandardným kultivačným vyšetrením a stanovením účinných ATB, resp. ich účinných hladín pre zvolenie správnej terapie. Z praktického hľadiska treba podotknúť, že napriek obrovskému rozvoju za posledných 20 rokov je ponuka certifikovaných MG diagnostík a inštrumentálnych platforiem pre klinickú mikrobiológiu, ktoré sú jednak

bilančné (priaznivé porovnanie nákladov voči výške úhrady za vyšetrenia), jednak dostupné, stále obmedzená. Mnoho mikrobiologických vyšetrení v oblasti MG diagnostiky je realizovaná pomocou tzv. **in house** metódik. Ide o upravené postupy podľa štandardizovanej metódy (zverejnenej domácou autoritou, napr. referenčným laboratóriom alebo medzinárodnou autoritou, napr. WHO) a upravené tak, aby sa dala vykonať v rámci podmienok daného pracoviska. Uvedené „užívateľské“ delenie diagnostických súprava a metódik na klinické, výskumné a „in house“ platí v laboratórnej diagnostike univerzálne, čiže pre všetky testy (nielen pre mikrobiológiu).

MG analýzy za bežných podmienok **nie sú metódou voľby pri kultivovateľných mikroorganizmoch vo väčšine klinických materiálov**. Na rozdiel od kultivačnej diagnostiky, napr. pri vyšetrení vzorky tampónu tonzíl pacienta, nezodpovie MG analýza otázku, aká mikroflóra a v akom množstve sa v nej nachádza a neumožňuje ani prípadnú izoláciu vitálneho mikroorganizmu na ďalšie analýzy. Zodpovie len na špecifickú otázku: „Je vo vzorke genetický materiál konkrétneho druhu mikroorganizmu s vopred špecifikovanými vlastnosťami?“ Mnohé mikroorganizmy, ktoré môžu za určitých podmienok vyvolať ochorenie (endogénna infekcia), sú bežnou druhovou súčasťou mikrobioty človeka a sú pre daný typ vzorky autochtónne (t. j. pôvodné, vyskytujúce sa bežne v mieste svojho pôvodu), resp. sa tam pravidelne objavujú ako tranzitná mikroflóra alebo kontaminácia. Ich patogénny význam možno objasniť lacnejšími, rýchlejšími, nenáročnejšími a niekedy klinicky výpovednejšími testami v rámci dennej rutiny (napr. potvrdiť pôvodcov vaginóz, vaginitíd a pod.). Osídlenie kože a slizníc fyziologickou mikrobiotou a prítomnosť tranzitnej flóry v spojení s extrémnou citlivosťou MG analýz a s rizikom kontaminácie vzorky sťažuje (niekedy až znemožňuje) interpretáciu MG výsledku ako dôkazu etiologického agens ochorenia. To musí lekár kriticky zohľadniť vopred pri výbere vyšetrenia. Buď sa rozhodne pre výpovednejšie kultivačné, sérologické, mikroskopické vyšetrenie na jednej strane alebo rýchlejší a citlivejší MG dôkaz na strane druhej. Na základe toho vykoná odber príslušnej vzorky pomocou vhodnej odberovej súpravy. Ak sa napr. rozhodne pri uretritíde pre rýchly dôkaz *N. gonorrhoeae* pre MG diagnostiku, musí zvážiť vopred viac okolností, napr. či ide o diagnostiku na zistenie pôvodcu hnisavého výtoku pri pacientovi na prvej návšteve v ambulancii urológa. **MG dôkaz** ribozomálnej RNA (neamplifikačnými metódami) alebo DNA gonokokov (amplifikačnými metódami) **je v tomto prípade vhodný**, najmä duálnym testom pre gonokoky a chlamýdie (resp. trojtestom, spolu s genitálnymi mykoplazmami), lebo môže ísť o negonokokovú uretritídu alebo častú koinfekciu s *C. trachomatis*, resp. *M. genitalium*). Naopak, pre kontrolný odber po ATB liečbe je **MG dôkaz nevhodný**, lebo amplifikačný dôkaz DNA gonokoka môže byť pozitívny aj tri týždne po preliečení a v prípade zlyhania liečby neumožní stanoviť jej príčinu. Ak sa po zvážení lekár rozhodne pre MG dôkaz, zariadi buď správny odber prvej porcie moča pacientom do sterilnej nádoby (vhodný pre amplifikačný MG dôkaz), alebo si vyberie rýchlejší neamplifikačný MG test a odoberie mu sám výter z uretry na sterilný tampón s plastovými vláknami (nie vatový, ani kalcium alginátový). Takto odoberatý materiál možno uchovávať pri izbovej teplote až dva týždne. Ak sa rozhodne pre kultivačné vyšetrenie, použije sterilný tampón s plastovými vláknami, resp. vatový s transportným médiom a živočíšnym uhlím. Zabezpečí bezprostredný transport do laboratória pri najmenej izbovej teplote tak, že materiál bude spracovaný najneskôr do 6 hodín (optimálne do 30 min). Uvedený príklad poukazuje na potrebu znalosti lekárov o dostupných možnostiach aktuálnej mikrobiologickej diagnostiky v danom priestore, vrátane MG metód, preanalytických požiadaviek na odber a transport vhodného materiálu a na základe toho zvoliť vyšetrenia vhodné pre daného pacienta. Zo strany mikrobiológa je zase potrebné správne nastavenie metód, zabezpečenie reálnej dostupnosti týchto vyšetrení, ich štandardného výkonu v laboratóriu a pri

väčšine MG vyšetrení v neposlednom rade aj **vytvorenie správnej interpretácie v zmysle danej indikácie**. Pre obe strany vyplýva v záujme pacienta potreba vzájomnej komunikácie, presahujúcej výmenu žiadanky z jednej strany a z druhej strany prosté vyjadrenie názvu mikróba alebo hodnoty analytu v laboratórnom výsledku.

Pomerne jednoznačná je interpretácia v prípade dôkazu primárnych patogénov pri exogénnej infekcii (napr. baktérií *T. pallidum*, *M. tuberculosis*, *C. trachomatis* a ľudských patogénnych vírusov, napr. HIV a pod.). Väčšinou zrejme je interpretácia pri väčšine MG analýz likvoru, krvi a pri vzorkách z iných primárne sterilných miest. Ale aj tam sa môže vyskytnúť problém, napr. že v súčasnosti dostupné MG metodiky v klinických laboratóriách nedokážu odlišiť časti genómu z rozpadnutých mikróbov alebo kontaminácie vzorky od nukleovej kyseliny vitálneho mikroorganizmu, ktorý je zodpovedný za aktuálnu infekciu. Podobne problematické sú z hľadiska interpretácie pozitívnych výsledkov MG analýz patogény vyvolávajúce latentnú alebo chronickú infekciu. Navyše, pri niektorých ochoreniach sa po niekoľkých rokoch používania metodík MG diagnostiky empiricky zistilo, že nie sú tak senzitívne, ako iné (napr. pri neuroborrelióze je dôkaz *B. burgdorferi sensu lato* v likvore pomocou PCR menej citlivý ako dôkaz pomocou stanovenia protilátkového indexu). Preto je potrebné aj pri MG diagnostike vidieť problém komplexne a vždy zohľadniť klinický stav pacienta a výsledky ostatných vyšetrení.

1.20.1 Súčasné využitie molekulárno-genetických techník v lekárskej mikrobiológii

Na pracoviskách klinickej mikrobiológie sa MG techniky uplatnili najmä na:

1. dôkaz nekultivovateľných agens ako napr. *Tropheryma Whipplei*, ľudské papilomavírusy, vírusy hepatitíd B a C, ľudské herpetické vírusy 6 – 8 atď.;
2. urgentnú diagnostiku pri život ohrozujúcich stavoch ako sú sepsa, meningitída a encefalitída (HSV1/2, VZV, CMV, EBV, enterovírusy, ľudský parechovírus, *Streptococcus agalactiae*, *H. influenzae* typ b, *S. pneumoniae*, *N. meningitidis* skup. A, B, C, Y, W135, *E. coli* K1, *Cryptococcus neoformans* a iné), respiračné infekcie novorodencov vírusového pôvodu, prematúrnych a inak stigmatizovaných detí, ale aj niektorých dospelých pacientov (influenza vírusu typu A a B, vírusy parainfluenzy, RSV, adenovírusy, rinovírusy, enterovírusy, metapneumovírusy, parechovírusy, koronavírusy a iné), niektoré respiračné infekcie bakteriálneho pôvodu (*S. pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *B. pertussis*), hnačky vírusového (adenovírus, norovírus, rota-, astro- a enterovírusy), bakteriálneho (*Campylobacter* spp., salmonelly, shigelly, *E. coli* O157, *C. difficile*, yersinie, *V. cholerae*, *Aeromonas hydrophila* a iné), resp. parazitárneho pôvodu (*Cryptosporidium* spp., *Entamoeba histolytica*, *Blastocystis hominis*, *Giardia lamblia* a iné) a kritické stavy pri imunokompromitovaných pacientoch (HSV1/2, VZV, CMV, EBV, JC polyomavírus, BK polyomavírus, *T. gondii*, *P. jirovecii*, kvasinky, vlákňité mikromycéty a iné). Pri tejto diagnostike, zameranej na rýchly dôkaz pôvodcov orgánových infekcií, je vyslovene vhodné použiť multiplexové MG metódy;
3. rýchly a priamy dôkaz pôvodcov niektorých sexuálne prenosných ochorení, napr. *Chlamydia trachomatis*, *N. gonorrhoeae*, *T. pallidum*, atď.;
4. rýchly dôkaz rastovo náročných alebo pomaly rastúcich patogénov, napr. *Mycobacterium tuberculosis*, *Legionella pneumophila* a iné;
5. sledovanie vírusovej nálože (na určenie prognózy ochorenia alebo odpovede na liečbu): napr. vírusy hepatitíd B a C, HIV, CMV atď.;
6. diferenciácia antigénne podobných variantov patogéna: napr. na detekciu špecifických genotypov ľudského papilloma ví-

rusu, indikujúcich potenciál na tvorbu tumorov a vznik rakoviny;

7. potvrdenie alebo vylúčenie kongenitálnej infekcie, napr. plodu a séropozitívnych novorodencov HIV pozitívnych matiek, CMV a pod.;
8. detekciu vysoko virulentných agens, ktorých kultivácia je riziková a náročná: napr. Ebola vírus *Francisella tularensis*, *Brucella abortus*, *Coccidioides immitis* atď.;
9. dôkaz infekčných agens *in situ*: napr. *Toxoplasma gondii*, vírusy v tkanivách a bunkách;
10. dôkaz mikroorganizmov prítomných vo vzorke v nízkom počte, napr. detekcia HIV u pacientov bez dokázateľných protilátok, vyšetrenia vnútroočnej tekutiny, forenzné vzorky atď.;
11. testovanie citlivosti, resp. rezistencie na antivírusové liečivá: napr. HIV na stanovenie rezistencie voči antiretrovirotikám;
12. dôkaz mutácie génov, ktoré sú príčinou rezistencie na antibiotiká, ako sú napr. mutácie génov Mec A (MRSA), Van A a B gény (VRE), KPC 1-3 pri karbapeném rezistentných kmeňoch *K. pneumoniae*, rpoB gén *M. tuberculosis* na rifampicín;
13. na dôkaz určitého faktora virulencie pri izolovanom kmeni mikroorganizmov (napr. toxikogénne kmene *Corynebacterium diphtheriae*);
14. konfirmácia nezvyčajnej fenotypovej identifikácie kultivačného výsledku (napr. optochín rezistentného kmeňa *Streptococcus pneumoniae* alebo ureáza negatívny kmeň *Klebsiella pneumoniae*).

V rámci lekárskej mikrobiológie, teda nad rámec potreby liečby konkrétneho pacienta, sa MG metódy uplatňujú aj na:

- identifikáciu a charakterizáciu nových patogénov alebo nových variantov (napr. rod *Cronobacter* pomocou MLST – Multilocus sequence typing),
- diagnostiku pre účely molekulárnej epidemiológie, napr. na identifikáciu zdroja nozokomialnej epidémie v nemocniciach a ohnisk epidémií v komunitách,
- analýzy v rámci vakcinačného programu, napr. pri živej poliovakcine, kedy je vírus vylučovaný do prostredia, koluje a môže dôjsť k revertovaniu vakcinačného kmeňa smerom ku divému typu poliovírusu s vysokou virulenciou,
- identifikáciu etiologického agensa pri hrozbe použitia biologických zbraní a iné.

1.20.2 Odber a transport materiálu na MG vyšetrenie

Hoci platí niekoľko všeobecných zásad pre odber materiálu na MG vyšetrenia, každé laboratórium vydáva a zverejňuje svoje vlastné pokyny pre odber a transport biologických vzoriek pre konkrétne analýzy, čo je podmienené buď požiadavkami výrobcov používaných diagnostík a technológií, alebo napr. v prípade in house metód to je dané predpísaným postupom. Výrobcovia MG diagnostík vždy odporúčajú alebo priamo dodávajú vhodné odberové súpravy, ako aj transportné kontajnery s fixačným roztokom, inhibítorom nukleáz, prípadne aj s lyzačným roztokom pre materiál vo vzorke a tak je vzorka preanalyticky zabezpečená až po jej spracovanie.

Mikrobiálnu NK možno získať z veľkého množstva rôznych typov biologického materiálu – z tekutín (krv, likvor, moč, plodová voda, obsah vezikúl, sklovce či komorová voda), sterov slizníc, bunkového debris (zoškrab z rohovky) alebo z tkanív a pod. Pri MG analýzach z krvi, leukocytov a plazmy platí, že vzorky sa odoberajú do sterilných plastových odberových nádob s 0,05 M EDTA, alebo s 4 % roztoku citrátu sodného v pomere 500 µl krvi na 50 µl antikoagulantu (nie heparín!). Pri analýzach zo séra sa plná krv odoberie do sterilnej plastovej skúmavky bez antikoagulantu a krv sa nechá odstáť pri izbovej teplote na dobu 30 minút do vzniku koagula a oddelenia séra. Pri odbere materiálu na tampón je potrebné zvoliť radiačne ste-

rilizované tampóny bez RNáz a DNáz s plastovými vláknami (napr. polyesterová alebo polyuretánová vata na tampónoch typu Dacron alebo Rayon pre cervix, uretru a vagínu), nie s buničitou vatou alebo kalcium alginátovou vatou s hliníkom (interferujú s niektorými MG analýzami). V súčasnosti sa do predia dostávajú univerzálne tampóny typu „flocked“ (akumulačné) s nylonovými vláknami, ktorých paralelné usporiadanie okolo konca tyčinky pripomína chvost vystresovanej mačky, resp. kefu na čistenie fliaš s úzkym hrdlom. Majú všestranné využitie (kultivácia, MG vyšetrenia a pod.) a ich výťažnosť pri akumulácii biologického materiálu oproti iným odberovým tampónom je výrazne vyššia.

Tampóny s odobraným materiálom je ihneď po odbere potrebné uzavrieť v sterilnej skúmavke alebo inom sterilnom transportnom obale a doručiť čo najskôr do laboratória. Pri niektorých typoch steru, napr. steroch z konjunktív, nosohltanu a pod. sa niekedy nezasiela tampón, ale ster sa po odobratí vytrepe v sterilnej skúmavke s pevným uzáverom, zbytok vzorky z tampónu sa vytlačí (tampón otrieme o stenu skúmavky), tampón sa vytiahne a skúmavku sa uzavrie. Pri vzorke moču, bronchoalveolárnej laváže (BAL) či výplachu sa materiál umiestňuje priamo do sterilnej skúmavky so skrutkovým uzáverom, pri likvore alebo kúsku tkaniva (biopsia) do sterilnej skúmavky typu Eppendorf. Odobratý materiál sa riadne označí (štítkom, kódom a pod.) a k nemu sa priloží vyplnená žiadanica (ak je laboratórium v spoločnej sieti so zasielateľom a používajú kódy, tento krok odpadá). Materiál, ktorý sa musí odoslať ešte v deň odberu do laboratória, väčšinou nie je potrebné zchladíť. Hoci väčšina biologických materiálov pre MG analýzu má výrazne dlhšiu expiráciu, aká sa vyžaduje pri iných diagnostických metódach, po odbere je potrebné materiál čo najskôr dodať do mikrobiologického laboratória. Materiál na izoláciu RNA (napr. pri HCV) a pri niektorých iných prípadoch je potrebné udržiavať vzorky v chlade, o čom je lekár vopred informovaný. Nukleové kyseliny sú všeobecne citlivé na rôzne formy elektromagnetického žiarenia (UV, slnečné, infračervené), preto musí byť odobraná vzorka chránená pred žiarením. RNA v odobraných vzorkách je viac citlivá na degradáciu ako DNA.

Odbor vzoriek biologického materiálu na **dôkaz respiračných patogénov** MG (PCR) analýzami je vhodné vykonať na začiatku ochorenia, keď je vylučovanie vírusov maximálne. Materiál sa odoberá sterilnými tampónmi. Vzorka nazofaryngeálneho výteru sa získava pomocou flexibilného tampónu. Pacientovi je potrebné vopred skontrolovať vzdialenosť od nosovej dierky k nazofaryngu (cca polovica vzdialenosti od nosovej dierky k uchu) a potom zasunúť tampón. Tampón sa jemne vloží pozdĺž jednej nosovej dierky (rovno dozadu, nie nahor) a posúva sa po spodine nosovej dutiny, až kým sa nedostane do nosohltanu. Tampón sa otočí 2- až 3-krát a podrží na mieste po dobu minimálne 5 sekúnd. Tampóny je potrebné umiestniť do skúmaviek s médiami určenými pre transport vírusov. Prebytočná dĺžka tampónu sa skráti zalomením na značke (záreze), aby bolo možné skúmavku uzavrieť. Na získanie vzorky na dôkaz *Mycoplasma pneumoniae* sa používa výter hrdla. Pri materiáli, získanom zo sterilných miest alebo bronchoalveolárnym výplachom, sa vzorky zbierajú do sterilných, nepriepustne uzatvárateľných nádob. Respiračné patogény, pre ktoré sú dostupné komerčné MG analýzy, kde sa materiál získava hore uvedenými postupmi, sú: chrípka A, chrípka B, parainfluenza 1, 2, 3 a 4, respiračný syncytiálny vírus A a B, respiračné adenovírusy, ľudský metapneumovírus, ľudské rinovírusy, enterovírusy, koronavírusy, *Chlamydia pneumoniae* a *Mycoplasma pneumoniae*.

K dispozícii sú aj komerčné PCR testy pre nasledujúce vírusy: **HSV1/2, VZV, enterovírusy (likvor), EBV (krv a likvor) a CMV (krv, likvor alebo BAL)**. Testovanie nukleových kyselín vírusov v krvi pomocou PCR vyžaduje jej odber do určenej sterilnej odberovej skúmavky s EDTA. Pri seróznom likvore, získanom z lumbálnej punkcie, by mala byť väčšina pacientov testovaná panelom pre vírusové meningitídy a encefalitídy (ide-

álne multiplex PCR). Pre detekciu HSV 1/2 alebo VZV PCR sú vhodné materiály: likvor, vezikulárna tekutina, tampón z ulcerácií alebo BAL (spútum a tracheálne aspiráty sú nevhodné).

Pre dôkaz enterovírusov pomocou PCR je vhodné odobrať likvor do sterilnej skúmavky. Vzorku je potrebné chladiť na ľade a exportovať do laboratória (RNA vírusy).

Na odber krvi pre EBV PCR je vhodný objem 5 ml do skúmavky s EDTA. Pri likvore je potrebný objem minimálne 1,0 ml v sterilnej skúmavke a transport do laboratória okamžite po odbere. Pri EBV je PCR vhodná len na diagnostiku a monitorovanie posttransplantačného lymfoproliferatívneho ochorenia a podobných stavov, nie je vhodná na diagnostikovanie mononukleózy, a nie je ani prvotínovou diagnostikou meningitídy/encefalitídy u imunokompetentných pacientov.

Na **monitoring CMV infekcie pomocou kvantitatívnej PCR** je potrebný odber plnej krvi do 5 ml skúmavky (s EDTA). Pre likvor je potrebný odber minimálne 0,5 ml v sterilnej skúmavke a okamžité dodanie do laboratória. **CMV kvalitatívna PCR** vyžaduje odber minimálne 2,0 ml BAL alebo 1,0 ml plodovej vody do sterilnej skúmavky. Materiál je potrebné okamžite odoslať do laboratória.

Na sledovanie **vírusovej nálože HIV pomocou PCR, počtu kópií RNA vírusu hepatitídy C pomocou RT PCR a počtu kópií DNA vírusu hepatitídy B pomocou PCR** sa pre každý test odoberá najmenej 6 ml plnej krvi do sterilnej skúmavky s EDTA a vzorku je potrebné okamžite odoslať do laboratória. Pri HCV je vhodný transport vzoriek uložených na suchom ľade, pri potrebe dlhodobého skladovania je vhodnejšie čo najskôr izolovať RNA a zamraziť ju na -70 °C. Vzorky je vo všeobecnosti potrebné spracovať do 6 hodín od odberu.

Na **dôkaz papilomavírusov v bunkách krčka maternice** pomocou MG sa materiál získava sprístupnením odberového miesta pomocou spekula a čistiaceho tampónu (spatula) na odstránenie hlienovej zátky na cervixe a odberom pomocou cytobrašu (štetôčkový tampón), zasunutého a rotovaného v endocervikálnom kanáli. Materiál na potom spolu s cytobrašom (skrútený zalomením) vloží do skúmavky so sterilným fyziologickým roztokom, uzavrie a transportuje v chlade (2 - 8 °C) do laboratória. Po odobratí sa vzorky môžu skladovať a prepravovať pri teplote 2 až 30 °C až 14 dní. Je nevhodné ich uchovávať v mrazničke.

Na detekciu *Neisseria gonorrhoeae* a *Chlamydia trachomatis* pomocou amplifikácie DNA (PCR) je vhodný moč, výter endocervixu, uretry, konjunktív, ústnej dutiny alebo hltana a rektálny tampón. Nenahrádza kultiváciu gonokokov, ktorá je potrebná kvôli zisťovaniu stavu rezistencie a zároveň prítomný genetický materiál môže pochádzať z usmrtených baktérií, preto by mala byť odobraná aj paralelná vzorka na kultiváciu. Rovnako pri septickej gonokokovej artritíde sa odoberá materiál na hemokultiváciu.

Pred odberom vzorky moču by pacient nemal močiť aspoň jednu hodinu. Moč sa odoberá do sterilného kalíška, z ktorého je prenesený pomocou sterilnej plastovej pipety do skúmavky s tesným uzáverom a odošle sa do laboratória.

1.20.3 Izolácia a purifikácia nukleových kyselín

Okrem prípadov dôkazu mikroorganizmov *in situ* sa väčšina molekulárno genetických metód začína izoláciou nukleovej kyseliny zo vzorky biologického materiálu. Izolácia NK sa začína lýzou buniek, pomocou ktorej sa uvoľní obsah bunky alebo organel pomocou detergentov, prípadne pomocou ultrazvuku. Nukleové kyseliny je potrebné chrániť pred degradáciou, preto lýza bunky prebieha v tlmivom roztoku a vo vhodných teplotných podmienkach. Separácia NK z lýzátu si vyžaduje ich dočasnú denaturáciu (napr. vyzrážaním organickými rozpúšťadlami, teplotou, vysolovaním). Odstránenie zvyškov RNA v prípade, ak chceme izolovať DNA, možno zabezpečiť pomo-

cou enzýmu ribonukleázy, proteíny v lyzáte sú rozkladané pomocou proteínázy K. Najčastejšou metódou separácie DNA v minulosti bola fenol-chloroformová extrakcia, pri ktorej sa využíva rozdielna rozpustnosť DNA a iných zložiek lyzátu. Jej podstatou je oddelenie vodnej fázy s DNA od roztoku obsahujúceho fenol a chloroform s hydrofóbnymi zložkami lyzátu pomocou vysokootáčkovej centrifugácie s následnou etanolovou precipitáciou DNA. Zrážanie organickými rozpúšťadlami (etanol, polyetylén glykol) sa uskutočňuje na základe zníženia rozpustnosti NK (zvýšením intramolekulej elektrostatickej interakcie). Vysolovanie je metóda založená na princípe zmeny rozpustnosti molekúl DNA v závislosti od zmeny koncentrácie iónov v roztoku, napr. síranu amónneho. Na separáciu NK sa uplatnia aj chromatografia na živcových kolónkach, ktorá využíva viazanie a následne uvoľnenie NK pomocou výmeny iónov medzi pevnou fázou a kvapalinou, ktorá ju obklopuje. Ide v princípe o historickú metódu, ale s moderným dizajnom. Je rýchla, s vysokou výťažnosťou a čistotou DNA. Ďalšou je metóda chromatografie na kremičitanových kolónkach (SILIKA, SiO_2), ktoré v prítomnosti chaotropných solí (teda látok, ktoré rušia vodíkové mostíky medzi molekulami, napr. jodid sodný, guanidín tiokyanát) adsorbujú DNA na svoj povrch, z ktorej je po opakovanom prečistení uvoľnená pomocou elučného činidla. Oba opísané spôsoby sú dostupné vo forme komerčných kitov. Najnovšie metódy izolácie využívajú magnetické mikročastice alebo nanočastice. Majú jadro tvorené magnetickými oxidmi železa a sú obalené organickými polymermi alebo živinou, ktoré viažu NK. Po naviazaní NK sa tieto magnetické častice separujú pôsobením silného magnetu, potom sú premyté a uvoľnenie NK z komplexu sa dosiahne pomocou elučného činidla. Táto metóda vo forme komerčne dostupných setov umožňuje pomerne v krátkom čase získať jednak DNA, ktorá nie je kontaminovaná proteínmi, alebo vyčistenú RNA. Postup nevyžaduje manipuláciu so škodlivými organickými rozpúšťadlami, opakovanú centrifugáciu, filtráciu vo vákuu alebo separáciu pomocou kolón. Je preto ideálny na automatizovanú separáciu. Pritom sa používajú izolačné automaty, ktoré zabezpečia v krátkom čase a štandardných podmienkach izoláciu NK pre všetky vzorky, ktoré majú byť vyšetrené, preto sú vhodné aj v rutinných laboratóriách. Ich nevýhodou je finančná náročnosť (automat, kity, špeciálny pomocný materiál).

1.20.4 Molekulárno-genetické metódy, ktoré sa uplatnili v lekárskej mikrobiológii

MG metódy v mikrobiológii sa delia na:

- **metódy hybridizácie** – vhodné na identifikáciu mikroorganizmov, sú menej citlivé ako metódy s amplifikáciou,
- **amplifikačné metódy** – najrozšírenejšie MG metódy, zlepšujú citlivosť v dôsledku kroku amplifikácie, umožňujú kvantifikáciu,
- **sekvenčné metódy** – umožňujú celogenómové analýzy, identifikáciu nových taxónov (napr. polyomavírus z karcinómu Merkelových buniek u ľudí v r. 2008), klinickú diagnostiku kryptopatogénov (inými metódami neodhaliteľní pôvodcovia ochorení),
- **metódy s enzymatickým štiepením nukleových kyselín** – reštrikčné mapovanie a porovnávanie spektier reštrikčných fragmentov najmä pri epidemiologických sledovaniach,
- **kombinované** – kombinácie viacerých MG metód, kombinácie s imunoanalýzou alebo prietokovou cytometriou, genomické čipy, biosenzory.

Uplatnenie jednotlivých MG metód vo svete je podmienené historicky a geograficky (zdravotná a ekonomická situácia obyvateľstva, technologická úroveň v diagnostickom priemysle a v zdravotníctve). Navyše, vývoj niektorých z nich bol iba reakciou na aktuálne dianie v komerčnej sfére, napr. bol podmienený snahou prelomiť patent. Prehľad, ktorý uvádzame, bol zostavený skôr pre systematické účely a objasnenie princí-

pov, je limitovaný svojim didaktickým poslaním a neodráža preto aktuálne zastúpenie metód MG diagnostiky v klinickej diagnostike na Slovensku. Niektoré platformy, ktoré ďalej uvádzame, sa u nás doteraz neuplatnili a asi sa ani v budúcnosti neuplatnia, napr. ligázová reťazová reakcia (LCR), na rozdiel od etablovanej PCR. Napriek tomu ich uvádzame, lebo sú nielen myšlienkovú inovatívne a v inej geografickej oblasti sa rutinne používajú v klinickej diagnostike, ale sú aj často uvádzané v svetovej odbornej literatúre. Podľa autora tejto subkapitoly by bolo škoda, keby pojem o nich slovenským mikrobiológom chýbal, resp. by ich zaskočil.

1.20.4.1 METÓDY HYBRIDIZÁCIE NUKLEOVÝCH KYSELÍN

Hybridizačné metódy sú založené na koordinovanom spojení dvoch vlákien nukleovej kyseliny so vzájomne komplementárnymi báзовými sekvenciami (t.j. na základe **homológie**). To je dané vlastnosťou dusíkatých báz A (adenín), T (tymín), G (guanín), C (cytozín) a U (uracil), ktoré tvoria vlákna NK, navzájom sa špecificky naviazať do dvojíc A-(T alebo U) a G-C prostredníctvom vodíkových väzieb a vytvoriť dvojreťazcovú (**hybridnú, duplexnú**) molekulu. Pri RNA vytvára väzbu s adenínom namiesto tymínu iná dusíkatá báza – uracil, väzba guanínu s cytozínom v RNA je rovnaká ako pri DNA. Čím viac väzieb pozdĺž vlákien vznikne, tým je homológia oboch vlákien vyššia a spojenie silnejšie. Princíp hybridizačných testov je, že jedno oligonukleotidové vlákno nukleovej kyseliny s naviazanou značkou (**reportérska molekula**), má známu sekvenciu (poradie) nukleotidov, jedinečnú pre daný špecifický gén (resp. druh mikroorganizmu). Také vlákno sa nazýva **sonda**. Druhé, cieľové vlákno pochádza zo vzorky, v ktorej má byť daný gén identifikovaný. Keďže hybridizácia dvoch vlákien DNA vyžaduje ich vzájomnú sekvencnú homológiu (presne určené poradie báz na oboch partnerských vláknach NK), pozitívna hybridizačná reakcia medzi týmito dvoma vláknami, teda vytvorenie vodíkových väzieb medzi nukleotidmi vlákna sondy a nukleotidmi cieľového vlákna, potvrdí identitu zdroja cieľového vlákna, napr. identitu hľadaného mikroorganizmu.

Sondy sú jednovláknové DNA alebo RNA, preto možno hybridizáciou vytvárať duplexy DNA-DNA, DNA-RNA a RNA – RNA. Sú to väčšinou oligonukleotidy, dlhé 20 až 50 báz, ale môžu mať dĺžku aj niekoľko sto až tisíc báz. Využitie hybridizačných reakcií v klinickej mikrobiológii bolo umožnené jednak postupným vznikom databáz cieľových sekvencií pre jednotlivé gény (napr. GENBANK) a jednak komerčnou výrobou sond pomocou chemickej syntézy a ich značením.

Hybridizačné metódy sú všeobecne chápané ako neamplifikačné, ale sondy môžu byť využité pri amplifikačných metódach, napr. FRET sondy (pozri real time PCR) pri kvantifikácii počtu kópií mikrobiálnej NK v odobranej vzorke biologického materiálu.

Príprava značených sond

Cieľom prípravy sondy je dokonalá komplemetarita vlákna sondy s cieľovou sekvenciou mikrobiálnej nukleovej kyseliny. To pri syntéze sond určuje tak presné poradie nukleotidov, ako aj jej dĺžku. Výber sondy je závislý od toho, ktorý mikroorganizmus, resp. jeho gén chceme identifikovať. Cieľová sekvencia pre sondu musí byť preto jedinečná pre daný gén a takýto gén sa nesmie vyskytovať pri iných taxónoch.

V minulosti sa génové sondy získavali pomocou rekombinácie a klonovania nukleových kyselín. V súčasnosti sa vyrábajú chemickou syntézou pomocou sofistikovaných priemyselných technológií presne podľa požiadaviek zadávateľa, predovšetkým na presnosť sekvencií báz, ich stabilitu pri skladovaní, nežiadúcej tvorby sekundárnych a intramolekulárnych väzieb, požadovanej denaturačnej teploty (melting) a podobne.

Sondy sa pri výrobe označujú pomocou rádioaktívnych alebo nerádioaktívnych značiek. Bežné rádioaktívne izotopy používané na značenie sú ^{125}I , ^3H , ^{32}P , ^{35}S . Napriek tomu, že sa využitím



rádioaktívnych izotopových značiek dosahuje vysoká citlivosť a umožňujú aj kvantifikáciu komplexov pomocou scintilačného merania, ich nevýhody sú ťažkosti s manipuláciou, určité zdravotné riziko, krátke expiračné doby a problémy s likvidáciou. Preto sa na Slovensku v rámci klinickej mikrobiológie neudomácnili. Nerádioaktívne reportérske molekuly (značky) sú napr. biotín – avidín, digoxigenín – antidigoxigenín, fluoresceín, akridínium ester a mnohé iné fluorescenčné alebo chemoluminiscenčné značky. Prepojenie vlákna sondy s reportérskou molekulou sa dosiahne buď nepriamo cez proteín (biotín, protilátka), alebo priamo chemickou väzbou značky na deoxyuridín trifosfát (dUTP), ktorý sa začleňuje do vlákna sondy namiesto tymínu. Sondy sa označujú buď po celej dĺžke, alebo na ich konci značenými nukleotidmi, ktoré sú súčasťou reakčnej zmesi pri syntéze sondy. V súčasnosti sa enzýmové značenie sond používa čoraz menej. Moderné hybridizačné metódy používajú buď priame značenie sondy fluorescenčným reportérom, alebo nepriame pomocou avidínu konjugovaného s fluoresceínom, resp. biotínovou molekulou s naviazanou protilátkou, ktorá má na sebe konjugovaný fluoresceín. Obdobne sa v mikrobiologickej praxi do popredia dostáva chemiluminescenčné značenie sond (napr. pomocou akridínium esteru alebo izoluminolu). Metóda na značenie sond je viacero, napr. metóda posunu jednoreťazcového zlomu („nick translation“ pozri obr. 1.20.3).

Príprava cieľovej nukleovej kyseliny

Zdrojom cieľovej nukleovej kyseliny môže byť mikroorganizmus v klinickej vzorke, v kultúre alebo fixovanom preparáte. Nukleová kyselina je upravená tak, aby sa stabilizovala a zachovala sa jej integrita. Opis izolácie cieľovej NK je uvedený vyššie, resp. aj v kap 5 Separčné techniky.

Zmiešavanie a hybridizácia cieľovej nukleovej kyseliny a sondy

Spájanie cieľovej nukleovej kyseliny so zodpovedajúcou špecifickou génovou sondou na základe komplementarity pri optimálnej teplote a vhodnej koncentrácii solí sa nazýva hybridizácia. RNA-RNA duplexy sú stabilnejšie ako duplexy RNA-DNA, tie zas sú stabilnejšie ako duplexy DNA-DNA. Hybridizáciu ovplyvňujú vytvorené podmienky ako napr. koncentrácia solí a dezintegrujúcich látok, resp. teplota. Pri samotnej hybridizácii musí byť DNA denaturovaná tak, aby sa získali jednotlivé oddelené vlákna (chemicky – napr. formamidom alebo močovinou pri 40 °C, tepelne – inkubáciou pri 95 °C).

Stabilitu vzniknutých hybridov ovplyvňujú viaceré faktory, napr.:

- teplota,
- dĺžka hybridizujúcich vlákien,
- stupeň vzájomnej homológie,
- zastúpenie dvojíc GC a AT v hybridizujúcich vláknach,
- matrix, v ktorej hybridizácia prebieha,
- pH,
- prítomnosť látok, ktoré destabilizujú vodíkové väzby medzi reťazcami (močovina, formamid).

Detekcia hybridizačnej reakcie

Metódy detekcie hybridizačnej reakcie delíme na rádiometrické, t.j. autorádiografiou (sondami označenými rádioaktívnymi izotopmi), kolorimetrické (enzýmy konjugované na biotín alebo digoxigenínom značené sondy), fluorometrické (napr. s fluoresceínom, fluoresceínom značený avidín alebo protilátka) alebo chemiluminescenčné (napr. sonda značená esterom akridínu). Detekčný limit je približne 10^4 cieľových sekvencií. Biotinylované sondy sa detegujú aj pomocou enzýmov, naviazaných s avidínom a ich reakciou s chromogénnym substrátom. Pri tomto postupe sa sondy nechajú hybridizovať so vzorkou. Nenaviazané sondy sa odstránia ich rozložením pomocou špecifických nukleáz, štiepiacich jednolátkovú reťazku a rozložené zvyšky štiepenia nenaviazaných sond sa zo vzorky odplavia premytím. Po premytí sa pridá komplex enzým-avi-

dín, ktorý sa naviaže na sondu. Molekula biotínu na vzniknutom hybride NK špecificky viaže štyri molekuly pridanej komplexu avidínu s enzýmom, čím sa zosilní signál. Do hybridizačnej reakcie sa pridá substrát, ktorý pri štiepení enzýmom vytvorí farebný produkt. Farebný signál tak potvrdí pozitívnu hybridizačnú reakciu.

Hybridizácia s použitím fluorescenčných látok na fixovaných preparátoch sa pozoruje v mikroskopoch pod UV svetlom. Signál z reportérskych molekúl v moderných automatoch a cytometroch sa meria pomocou fluorometrov alebo luminometrov.

Hybridizácia sa delí do **dvoch typov**:

- hybridizácia v roztoku (liquid phase),
- hybridizácia na pevných podkladoch (solid phase).

Hybridizácia v roztoku

Zmes cieľovej nukleovej kyseliny a sondy môže voľne interagovať vo vodnom prostredí. Vodné prostredie urýchľuje rýchlosť hybridizácie. Po denaturácii (uvoľnení vlákien od seba) je cieľová jednolátková DNA zmiešaná s jednolátkovými sondami. Nehybridizované jednoreťazcové nukleové kyseliny sa odstraňujú pomocou nukleáz, ktoré štiepia iba jednolátkovú NK a nie duplexy. Hybridizovaná dsDNA (duplexy) sa izoluje zrážaním v kyseline trichlóroctovej. Ďalšou etapou izolácie je imobilizovať hybridizovanú dsDNA na kolónu hydroxyapatitu, ktorá sa selektívne viaže s dsDNA alebo pomocou magnetických mikroperličiek, ktoré prednostne viažu duplexy hybridizovanej NK. Takto purifikované duplexy sú potom umiestnené v detekčnom zariadení, ktoré meria signál z reportérskych značiek na duplexoch.

Rovnako sa môžu použiť aj značené protilátky proti hybridnému DNA-RNA duplexu vo forme homogénnej analýzy v roztoku. Po denaturácii cieľovej DNA sa do roztoku pridajú špecifické RNA sondy, ktoré s homológny DNA vláknami vytvoria hybridné duplexy. Anti hybrid capture protilátky (protilátky špecifické pre duplexy RNA-DNA), ktoré majú na sebe chemoluminiscenčnú reportérsku molekulu sa naviažu na tieto duplexy a intenzita vzniknutého signálu sa meria v luminometri. Komerčné systémy, ktoré sú založené na tomto princípe, detegujú napr. *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae* a HPV (Quiagen) vo vzorkách z urogenitálu.

Hybridizácia v tuhej fáze

Hybridizačná reakcia sa uskutočňuje na pevnom nosiči, ako je napríklad nitrocelulózo alebo nylonová membrána. Medzi metódy hybridizácie na pevnej fáze patria hybridizácia dot/blot, sendvičová hybridizácia, hybridizácia south blot a hybridizácia *in situ*:

a) Bodová hybridizácia („Dot“ blot)

„Dot“ blot je metóda využiteľná pri vzorkách, v ktorých sa nukleová kyselina nachádzala v dostatočnom počte kópií (10^4 – 10^5 molekúl/ml). Pri tomto type blotu sa nukleové kyseliny, ktoré sú predmetom detekcie, nedelia chromatograficky, ale zmes identifikovaných úsekov sa nanesie priamo na membránu ako bod, resp. škvrna (angl. dot). Membrána sa pri tom opracováva tak, aby došlo k uvoľneniu cieľovej DNA z mikroorganizmu a došlo k jej denaturácii na samostatné reťazce. Na membránu sa nanášajú celé mikroorganizmy alebo ich izolovaná DNA. Následne sa cieľová sekvencia deteguje génovými sondami. Membrána sa ponorí do roztoku obsahujúceho značené sondy a nechá sa inkubovať, pričom dochádza ku hybridizácii. Neviazané sondy sa následne premyjú a hybridizované duplexy sa detegujú podľa povahy reportérových značiek (enzýmu, fluorofóru, chemoluminofóru alebo rádioizotopu). Výhodou tejto techniky je, že na testovanie vzoriek od niekoľkých pacientov môže byť použitá jedna membrána a naopak, na jednej membráne môže byť testovaná jedna vzorka pacienta na dôkaz prítomnosti niekoľkých organizmov, resp. genotypov naraz (napr. ľudské papilomavírusy).

b) Sendvičová hybridizácia

Využíva dve sondy, pričom neznačená sonda, ktorá je pripojená k pevnej podložke (napr. mikrotitračná dosťička), slúži na zachytenie cieľovej nukleovej kyseliny z testovanej vzorky. Prítomnosť tohto duplexu sa potom deteguje pomocou druhej sondy, ktorá je značená a zároveň homológna pre inú sekvenčnú časť cieľovej nukleovej kyseliny. Odstup dvoch miest komplementárnosti pre dve sondy znižuje riziko nešpecifických reakcií (zvyšuje špecifickosť), ale metóda je prácnejšia kvôli väčšiemu počtu krokov spracovania (viď obr. 1.20.2).

c) Southern blot hybridizácia

Pri tejto metóde sa DNA najprv extrahuje a následne purifikuje (vyčistí). Potom sa s použitím reštrikčných enzýmov rozštípi na niekoľko fragmentov rôznych veľkostí. Vzniknuté fragmenty DNA sa v géli elektroforeticky rozdelia podľa veľkosti. Fragmenty DNA sú následne prenesené (blotované) na nitrocelulózovú alebo nylonovú membránu, kde sú zafixované (imobilizované). Membrána sa ponorí do hybridizačného roztoku, ktorý obsahuje značené génové sondy. Na zníženie nešpecifických väzieb sond sa používa deionizovaný formamid (amid kys. mravčej) a detergenty, ako napr. SDS (laurylsíran sodný).

Hybridizované duplexy sa detegujú pomocou rádiometrických, enzymatických alebo fluorometrických techník (napr. fluorescenčné farbivo etídium bromid) v závislosti od typu použitej reportérovej molekuly. Pri ich detekcii sa v mieste hybridizácie sledujú detekčné pružky, označujúce špecifický cieľový fragment DNA.

d) Test lineárnej sondy (LIPA) – reverzná hybridizácia

V LIPA sa séria sond, špecificky detegujúcich sekvencie sledovaných patogénov, naviaže na nitrocelulózovú membránu alebo pásik, na ktorý sa potom aplikujú amplikóny z predchádzajúcej PCR. Ide teda o reverzný (obrátený) Southern blot. Biotínom označený PCR produkt sa hybridizuje s imobilizovanými sondami. Po hybridizácii sa pridá streptavidín značený alkalickou fosfatázou, ktorý sa viaže na biotinylované hybridné duplexy. Tie sa farebne vizualizujú pridaním substrátu.

Klinické aplikácie LIPA: genotypizácia HCV a HBV, mutácie pri HIV a pri mykobaktériách, identifikácia subtypov HPV, identifikácia klinicky významných húb a iné.

e) Northern blot hybridizácia

Je podobná metóda ako Southern blot vo všetkých krokoch, ale cieľová nukleová kyselina je jednovláknová RNA.

f) In situ hybridizácia

Hybridizácia *in situ* umožňuje identifikáciu patogénu priamo v mieste vzniknutej patologickej lézie resp. na fixovanom preparáte. Pri *in situ* hybridizácii pôsobí mikroskopické sklo s nanesenou vzorkou tkaniva ako pevná fáza. Vzorky tkaniva sa spracovávajú tak, aby sa zachovala štruktúrna integrita tkaniva a zároveň umožnila uvoľňovanie a denaturovanie nukleovej kyseliny patogénu na jednovláknové molekuly s intaktnou sekvenciou, umožňujúcou čo najlepšiu hybridizáciu. Používajú sa buď sondy značené rádioizotopom, digoxínové, biotínové, ale najmä fluorescenčné sondy (fluorescenčná *in situ* hybridizácia – FISH). FISH metódu je možné využiť aj pri iných materiáloch, ako sú solídne tkanivá, napríklad pri detekcii patogénov v krvi.

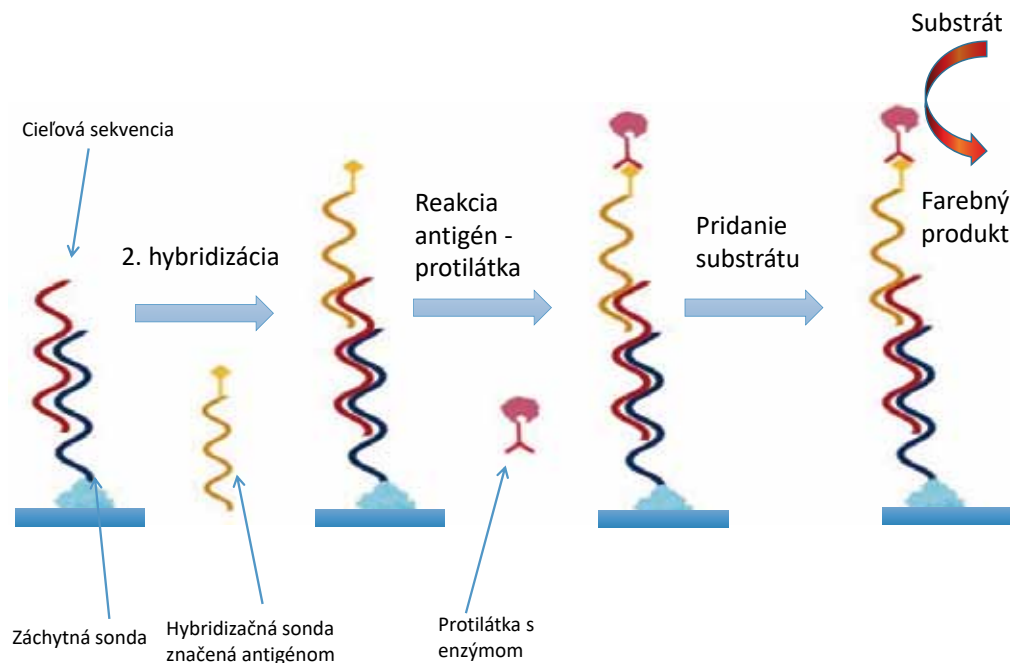
Výhody hybridizácie *in situ*:

- použitím tejto metódy možno identifikovať a lokalizovať mikrobiálneho pôvodcu a súčasne sa dá sledovať aj histopatologická štruktúra vzorky,
- metóda umožňuje presnú detekciu infikovaných buniek v tkanive alebo tekutine,
- metóda je použiteľná pri detekcii intracelulárnych parazitov, akými sú vírusy, chlamýdie a pod.,
- možnosť kvantifikácie mikroorganizmov v tekutých vzorkách pomocou prietokovej cytometrie.

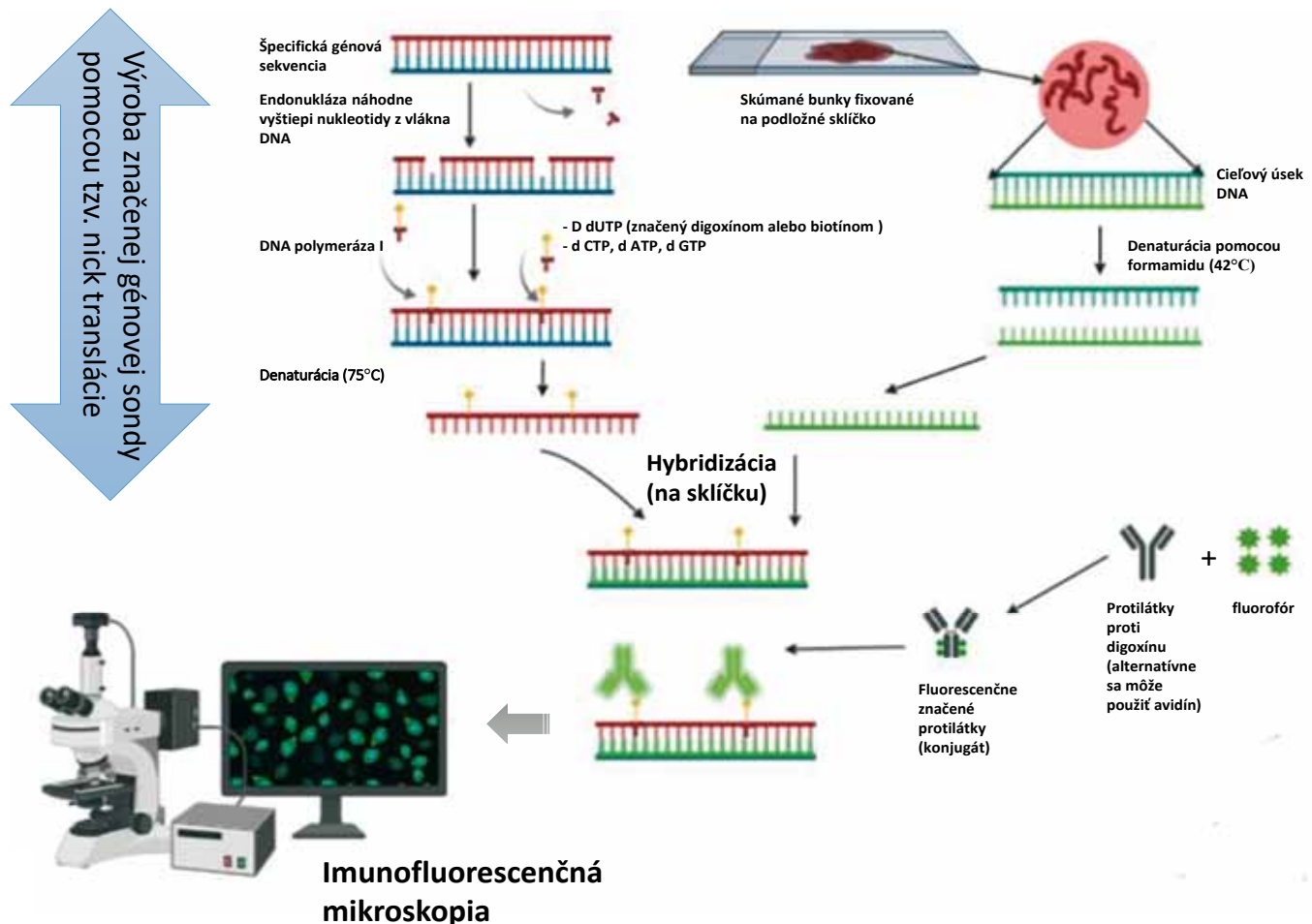
g) Fluorescenčná in situ hybridizácia (FISH)

Pri metóde FISH sa používa sonda označená fluorescenčne. Značenie sond možno vykonávať enzymaticky a to pomocou tzv. nick-translácie, kedy sa jednoreťazcový úsek DNA inkubuje v zmesi DNázy, ktorá štípi v určitých miestach vlákno NK, DNA polymerázy a deoxyribonukleotidtrifosfátov(dNTP) s chemicky naviazaným fluorochrómami. V prítomnosti kationov horčíka sú pomocou DNA polymerázy postupne do vlákna DNA v miestach naštiepenia začlenené značené dNTP. Metódou priameho neenzýmového značenia sa získavajú veľmi homogénne značené hybridizačné sondy.

Využitie a výhody komerčných FISH kitov napr. pri identifikácii pôvodcov infekcií krvného riečiska oproti klasickým kultivačným metódam dokázali viaceré porovnávacie štúdie. Fluorescenčná *in situ* hybridizácia využíva špecifickú väzbu fluorescenčných sond na komplementárne DNA sekvencie – 16S rRNA pre baktérie a 18S rRNA pre huby, pričom sa môže uskutočniť priamo z pozitívnych hemokultúr. Naviazanie sond na fixovanom preparáte sa pozoruje fluorescenčným mikroskopom. Výber sond závisí od predchádzajúceho mikroskopického



Obr. 1.20.2. Sendvičová hybridizácia s enzymatickým značením.



Obr. 1.20.3. Metóda fluorescenčne značenej hybridizácie (FISH) pomocou tzv. nick-translácie („posun zlomu“) pozorovanej pomocou IF mikroskopu (upravené podľa: <https://ccrhawaii.org/lessons/nucleic-acid-hybridization-expression-analysis/>).

vyšetrenia pomocou Gramovo farbenia. Pri grampozitívnych kokoch sú to stafylokokové sondy (*S. aureus*/koaguláza-negatívne stafylokoky), enterokokové sondy (*Enterococcus faecalis*/*Enterococcus faecium*), pri gramnegatívnych baktériách sú to sondy proti trom najčastejším patogénom (*Escherichia coli*/*Pseudomonas aeruginosa*/*Klebsiella pneumoniae*) a pri kvasinách sú to sondy pre *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* a *Candida krusei*.

Vylepšenie pôvodných FISH metód predstavujú **PNA sondy** (Peptide Nucleic Acid). Pri týchto sondách bola negatívne nabitá kostra vlákna nukleovej kyseliny, ktorá pozostáva z lineárne prepojených pentózo-fosfátových jednotiek (ribózo-, resp. deoxyribózo-fosfát) nahradená neutrálnou polyamidovou kostrou, na ktorú sa potom pripájajú dusíkaté bázy (A, C, G, T, resp. U) v zvolenom poradí. To umožňuje PNA sonde hybridizovať sa s NK vo vzorke podľa prirodzených zákonitostí (A-T, G-C, resp. A-U). Takéto umelé vlákna sond sa hybridizujú lepšie a špecifickejšie na cieľové sekvencie natívneho vlákna NK vo vzorke, ako tradičné sondy s pentózo-fosfátovou kostrou. Navyše, nie sú rozkladané ani nukleázami, ani proteázami, teda sú stabilnejšie, a to aj v zmysle dlhšej expirácie či už v diagnostickom kite, alebo aj po jeho otvorení. Boli už schválené prostredníctvom FDA (US Food and Drug Administration) na klinické použitie na priamu detekciu patogénov v hemokultúrach. Pri tejto metóde rýchlej diagnostiky pôvodcov sa kvapka pozitívnej hemokultúry fixuje na podložnom sklíčku a prevrství roztokom fluorescenčne značených PNA sond. Po určenom čase dôjde k ich hybridizácii, sklíčko sa následne premyje (odstránenie nenaviazaných sond), preparát sa prevrství fixačným médiom, prekryje krycím sklíčkom a pozoruje sa

vo fluorescenčnom mikroskope so sadou špeciálnych optických filtrov.

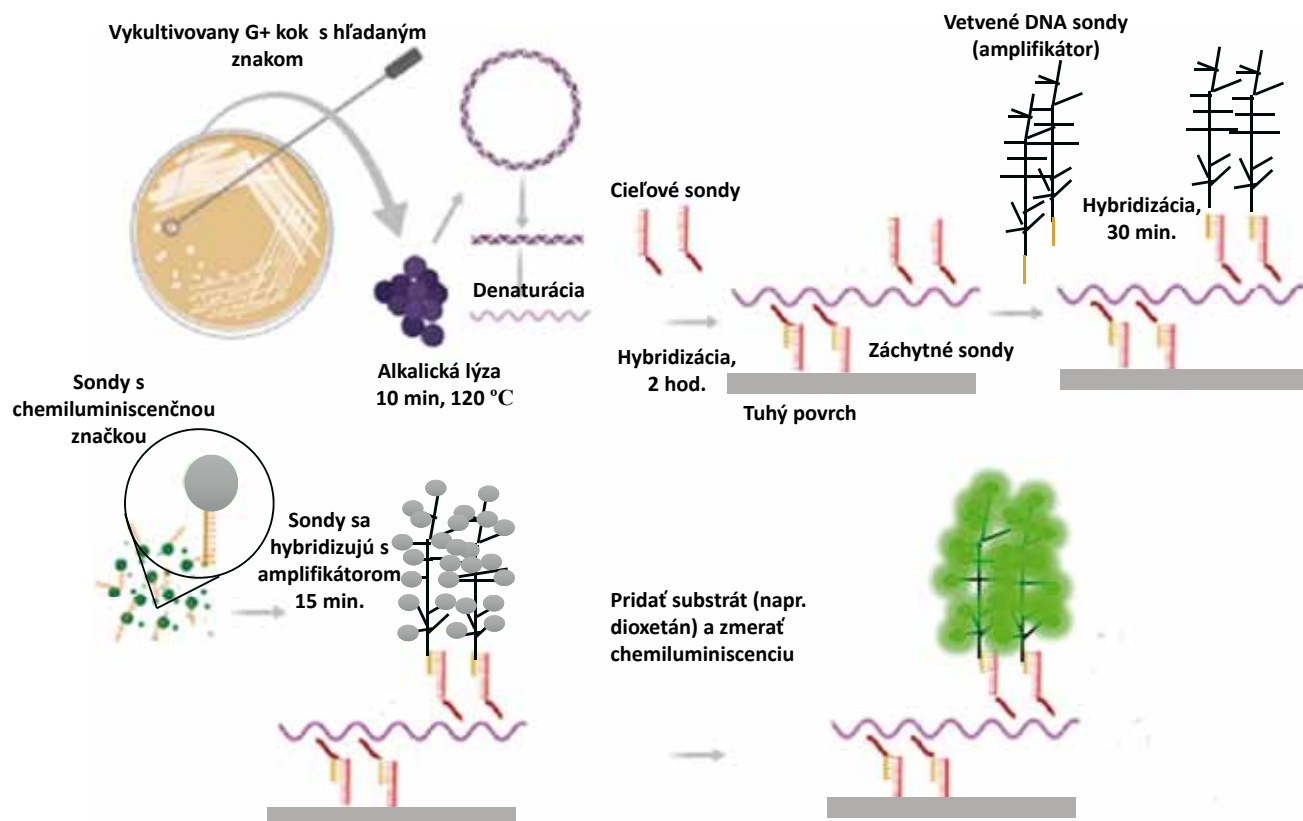
Komerčné sety PNA-FISH a Quick-FISH vyžadujú čas v rozmedzí 1,5 až 3 hodiny s citlivosťou 97 – 100 % a špecificitou 90 – 100 %. Systém AccuProbe je založený na DNA sondách, ktoré dokážu detegovať *S. aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus* spp. a streptokoky skupiny A a B. Citlivosť a špecifickosť dosahujú viac ako 97 %, s výnimkou sondy *S. aureus*, ktoré vykazujú citlivosť 99,8 % a špecifickosť 80,8 %.

Metódy zosilnenia signálu

Zosilňujú signál generovaný značenými sondami. Pomocou týchto postupov možno detegovať 10^3 – 10^5 kópií cieľovej nukleovej kyseliny. Reportérske značky sú fungujú väčšinou na princípe chemoluminiscencie.

a) Systém rozvetvenej DNA (branched - bDNA)

Využíva vzájomné komplementárne väzby niekoľkých sond podobne ako pri sendvičových metódach. Cieľová sekvencia je zachytená, viazaná a označená komplexom 3 sond. Prvou je zachytávacia sonda, ktorá imobilizuje budúci hybrid. Cieľová sekvencia denaturovanej nukleovej kyseliny je tak zachytená (captured) a následne hybridizovaná s druhou, neznačenou sondou, ktorá má dve ramená, teda dve hybridizačné sekvencie. Jedna je smerovaná proti cieľovej sekvencii a druhá je schopná hybridizovať so sekvenciou zachytávacej (imobilizujúcej) sondy. S rovnakou sekvenciou, ako sa viazala so zachytávacou sondou sa na inom viaže aj tretia sonda, tzv. zosilňovačom s multimétnym vetvením molekuly, umožňujúceho väzbu veľkého počtu reportérskych molekúl (obr. 1.20.4).



Obr. 1.20.4. Metóda zosilnenia signálu pri hybridizácii pomocou rozvetvenej DNA sondy.

Tento systém je vysoko citlivý, pretože cieľová nukleová kyselina hybridizuje tak so záchytnou sondou, ako aj s mediárnou sondou, ktorá sa inou časťou svojej molekuly hybridizuje s vetvenou (branched) sondou amplifikujúcou signál. Zosilnený signál priamo závisí od počtu molekúl cieľovej NK, prítomných v pôvodnej vzorke. Aby nevznikal signálny šum z prípadných nešpecifických väzieb bDNA sondy s inými, čiastočne homologickými sekvenciami NK vo vzorke, inkorporuje sa pri syntéze bDNA sondy a komplementárneho ramena druhej sondy do vlákna analógy báz - izocytidín (isoC) a izoguanidín (isoG). Tieto syntetické analógy sú vzájomne komplementárne, takže umožňujú výlučne hybridizáciu sond, ale nie sú komplementárne voči prírodným analógom - bázam, pochádzajúcim zo vzork, teda guanigínu(G) alebo cytidínu (G). Preto sa tieto sondy neviažu na natívne sekvencie s podobnou homologiou a nevytvárajú tak šum vo vzorke.



Obmedzenia hybridizačných techník

Citlivosť hybridizácie je nižšia ako pri amplifikačných metódach, pre spoľahlivú detekciu je potrebný väčší počet kópií cieľovej NK $\sim 10^4$ až 10^6 kópií NK/ml. Vzniká tak riziko falošného „negatívneho“ výsledkov vyšetrenia vzoriek. Pri bunkách baktérií a eukaryotov je vhodné použiť najmä ribozomálne NK, ktorá tam je v omnoho väčšom počte kópií ako DNA. Ak hybridizácii predchádza pomnoženie mikroorganizmov, napr. pri pozitívnych hemokultúrach, môže bakteriálne inokulum dosiahnuť 1×10^6 až 2×10^8 buniek/ ml pre grampozitívne koky a 2×10^7 až 1×10^9 /ml pre gramnegatívne baktérie, čo zabezpečí vysokú citlivosť tejto metódy aj pre hybridizáciu s DNA pre vzorky krvi, pokiaľ neovplyvnené napr. antibiotikami. Hybridizácie, ktoré sú metódami dôkazu špecifických úsekov nukleovej kyseliny bez amplifikácie (ale aj iné neamplifikačné metódy, napr. pomocou niektorých typov genómových mikročipov), sú

na druhej strane menej ovplyvňované inhibítormi amplifikácie a menej náchylné na kontamináciu, ako tomu je pri metódach založených na PCR.

Klinické využitie hybridizačných techník

- priama detekcia patogénov vo vzorke, napr. streptokokov skupiny A z tampónu tonzíl pri faryngitíde, *N. gonorrhoeae*, *Ch. trachomatis*, pri ľudských papillomavírusoch a iných vírusoch,
- pri bakteriálnych a mykotických infekciách rôznych orgánov alebo krvného riečiska,
- identifikácia kultúr izolátov, napr. identifikácia dimorfných húb, mykobaktérií atď.,
- možnosť kvantifikácie (v spojení s prietokovou cytometriou).

1.20.4.2 AMPLIFIKAČNÉ METÓDY

Amplifikačné metódy zlepšujú citlivosť diagnostiky cieľového úseku nukleovej kyseliny v dôsledku jeho amplifikácie – čiže zmnoženia počtu kópií špecifickej sekvencie o niekoľko rádov viac, ako sa nachádzali v pôvodne vo vzorke. Amplifikačné metódy sú rozdelené do troch kategórií:

- umožňujúce amplifikáciu cieľovej sekvencie nukleovej kyseliny,
- amplifikáciu signálu,
- amplifikáciu sondy.

Je veľa amplifikačných metód, ktoré sú založené na uvedených troch princípoch, ďalej uvádzame niektoré, ktoré sa uplatnili v mikrobiológii.

Amplifikácia cieľového úseku

Tieto systémy zvyšujú jej detekciu cieľovej sekvencie nukleovej kyseliny tým, že cyklicky replikujú jej počet na dvojnásobok, a tak sa v priebehu niekoľkých desiatok cyklov (najčastejšie 25 - 35) amplifikácie vytvorí veľký počet jej kópií

($10^7 - 10^{10}$ kópií, čiže **amplikónov**) teoreticky z 1 pôvodnej molekuly. Tento princíp využíva väčšina systémov detekcie a kvantifikácie mikrobiálnych NK. Molekulárne metódy sú vo všeobecnosti rýchlejšie ako fenotypové postupy identifikácie, pretože sú nezávislé od kultivácie.

Pri použití metód dôkazu sekvencií nukleovej kyseliny na báze amplifikácie, ako je napríklad PCR, je potrebné zohľadniť obmedzenia spojené s niektorými špecifikami daného materiálu, napr. so vzorkou plnej krvi:

1. prítomnosť inhibítorov PCR (napr. EDTA, detergentny, vysoká koncentrácia solí a pod.),
2. prítomnosť vysokého množstva nemikrobiálnej nukleovej kyseliny,
3. prítomnosť kontaminujúcej DNA,
4. prítomnosť DNA z neživých mikróbov.

Preto sú na trhu rôzne komerčné sety na extrakciu a izoláciu NK, vhodné pre daný typ vzorky.

Amplifikačné metódy cieľového úseku sa dajú deliť na dve skupiny – metódy s **termickým cyklom** a **izotermické** metódy.

Tradičnejšie a rozšírenejšie sú metódy s termickým cyklom (polymerázová reťazová reakcia, PCR), pri ktorých sa využíva účelový prístroj – **cyklér** s termočlánkom. Ten v priebehu reakcie mení teplotu troch etáp cyklu a tým usmerňuje a posúva jednotlivé fázy amplifikácie.

Izotermické metódy predstavujú amplifikácie, pri ktorých nie je potrebné používať termocyklér. Bežne používané izotermické metódy sú NASBA (amplifikácia založená na sekvencii nukleovej kyseliny) a TMA (amplifikácia sprostredkovaná transkripciou) a iné.

Amplifikačné metódy umožňujú nielen jednoduchý dôkaz prítomnosti hľadanej sekvencie vo vyšetrovanom materiáli (**jenoduchá PCR**), ale aj nepriamu alebo priamu kvantifikáciu počítateľného množstva kópií cieľového úseku qPCR (**kvantitatívna PCR**).

POLYMERÁZOVÁ REŤAZOVÁ REAKCIA (PCR)

PCR môže enzymaticky amplifikovať malé množstvá DNA alebo RNA na veľký počet kópií ($\geq 10^7$ kópií) v krátkom čase, ktoré je potom možno ľahko detegovať. Úspešný výsledok amplifikácie možno dosiahnuť teoreticky z jednej cieľovej molekuly nukleovej kyseliny (templátová NK, šablóna) z vyšetrovanej vzorky, pričom do PCR je ku vzorke izolovanej NK potrebné pridať:

- **priméry** – dva krátke syntetické úseky DNA (oligonukleotidy, dĺžka 20 – 30 nukleotidov), ktoré sú komplementárne k 3'-koncom cieľových DNA vlákien a na ktoré sa špecificky viažu (hybridizujú). Ich naviazanie na cieľové sekvencie termicky denaturovaných (jednovláknových) reťazcov NK sa nazýva **annealing**. Do PCR sa pridávajú dva odlišné priméry v rovnakej koncentrácii a amplifikovaný úsek DNA sa tak ohraničí ľavým (priamym, forward) a pravým (reverzným, reverse) primérom. Oba by nemali byť vzájomne komplementárne a teplota na ich anenalingu by mala byť približne rovnaká. Cieľový úsek má zvyčajne dĺžku od 50 do 1000 báзовých párov. Použitím dvoch primérov so sekvenciou nukleotidov, ohraničujúcich úsek génu špecifického pre daný mikroorganizmu, sa zabezpečí, že amplifikáciu vzniknú produkty (aplikóny) len v prípade, že sa vo vzorke nachádzal určený templát z dokazovaného mikroorganizmu;
- **deoxynukleotidtrifosfáty** (dATP, dTTP, dGTP a dCTP), z ktorých sa pomocou polymerázy syntetizuje nové vlákno na podklade templátovej NK;
- **termostabilnú DNA polymerázu**, napr. *Taq* DNA polymeráza, získaná génovou manipuláciou z extrémofila *Thermus aquaticus* (takisto *Pfu* polymeráza z *Pyrococcus furiosus* alebo *Vent* polymeráza, známa aj ako *Tli* polymeráza z *Thermococcus litoralis* a iné.) Je schopná katalyzovať syntézu NK vlákna pri teplotnom rozmedzí 60 – 95 °C (teplotné optimum 75 – 80 °C);

- **pufrovaný roztok s potrebnou koncentráciou Mg^{2+} iónov.** Pufrovací roztok ktorý obsahuje KCl, Tris-HCl (pH = 8,5 pri 25 °C) a $MgCl_2$ ako zdroj horčíka (Mg^{2+}). Správna koncentrácia horčíka v reakčnej zmesi má zásadný vplyv na priebeh PCR. Vyššia koncentrácia Mg^{2+} spôsobuje hromadenie nešpecifických produktov, nedostatočná koncentrácia horčíka znižuje výťažnosť produktov reakcie.

Pre predstavu uvádzame príklad zloženia reakčnej zmesi PCR pre 25 a 50 μ l reakciu (tab 1.20.1) Jej príprava sa uskutočňuje v sterilnej 0,5 ml skúmavka, osadenej v chladiacom paneli.

Tab. 1.20.1. Príklad zloženia PCR reakčnej zmesi.

Zložka reakčnej zmesi	Pre 25 μ l reakciu	Pre 50 μ l reakciu	Výsledná koncentrácia
ThermoPol, Standard <i>Taq</i> alebo in house reakčný pufor (50 mM KCl, 10 mM Tris pufu (pH 8,4), 1,5 mM $MgCl_2$)	2,5 μ l	5 μ l	1
10 mM dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	0,5 μ l	1 μ l	200 μ M
10 μ M forward primér	0,5 μ l	1 μ l	0,2 μ M (0,05–1 μ M)
10 μ M reverse primér	0,5 μ l	1 μ l	0,2 μ M (0,05–1 μ M)
Templátová DNA	$10^2 - 10^5$ kópií	$10^2 - 10^5$ kópií	< 1,000 ng
<i>Taq</i> DNA polymeráza*	0,125 μ l	0,25 μ l	1,25 jednotiek pre 50 μ l PCR
Voda zbavená nukleáz	Doplniť do 25 μ l	Doplniť do 50 μ l	

*Vzhľadom na ťažkosti s pipetovaním malých objemov enzýmu sa *Taq* DNA polymeráza môže pred pridaním do reakčnej zmesi najprv zriediť v reakčnom pufri. Napríklad 1 μ l *Taq* DNA polymerázy sa zmieša s 4 μ l reakčného pufu a 1 μ l tejto zmesi sa pridá k reakcii. Enzým, zriedený reakčným pufom by sa nemal uchovávať na ďalšie použitie.

Po pridaní všetkých zložiek do mikrokvyety je potrebné reakčnú zmes jemne premiešať a odstrediť v mikrocentrífuge. Ak termocyklér nemá vyhrievaný kryt, pridáva sa jedna kvapka sterilného minerálneho oleja do reakčnej skúmavky, aby sa predišlo odparovaniu rozpúšťadla.

Vhodné je používať komerčné zmesi PCR reagentií, tzv. **master mix**, ktoré obsahujú optimálne zloženie univerzálnych chemikálií do reakcie a pri ich použití sa už len pridávajú priméry a templátová NK. Pri niektorých typoch PCR sa používa aj tzv. hot start PCR (horúci začiatok). Ide o modifikáciu PCR, ktorá zabraňuje nešpecifickej amplifikácii DNA (*Taq* DNA polymeráza predlžuje primer už pri laboratórnej teplote) a to pomocou inaktivácie DNA polymerázy pri nižších teplotách. Používajú sa na to protilátky alebo špecifické proteíny, ktoré sa pri nižších teplotách viažu na aktívne miesto polymerázy. Anti-*Taq* protilátky znižujú *Taq* polymerázovú aktivitu pod 72 °C, čo je optimálna teplota, pri ktorej enzým rozširuje priméry. Na jej aktiváciu je tak potrebný počiatočný krok aktivácie pri 95 °C. Tento krok tepelne denaturuje protilátky, resp. proteíny viazané na aktívne centrum enzýmu. Keď sa pri horúcom štarte denaturované protilátky oddelia od *Taq*-polymerázy, prebieha amplifikácia s väčšou špecifitou.

Základné kroky v PCR sú:

1. **Termická denaturácia DNA** (95 °C alebo vyššia počas 15 sekúnd až 2 minút), ktorá vedie k rozpleteniu dvojitej špirály DNA a vzniku samostatných vlákien.
2. **Annealing (hybridizácia) primérov** s komplementárnou časťou templátovej DNA (45 – 68 °C, 1 – 2 min). Naviazaním pri-

mérov sa inicializuje syntéza dcérskeho vlákna polymerázou a novosyntetizované **vlákno sa predlžuje v smere 5' – 3'**. Teplota annealingu je závislá od sekvencií nukleotidov v priméroch a templátu, teda pomeru A, C, T a G nukleotidov. Od sekvencií je závislá aj teplota topenia (melting temperature, T_m). Čím väčší je podiel G-C, tým bude teplota topenia vyššia (G-C ma tri vodíkové väzby, A-T len dve). T_m určuje aj teplotu annealingu a vypočítava sa podľa vzorca:

$$2x (A+T) + 4x (G+C).$$

Optimálne dvojice primérov sú dizajnované tak, aby hybridizovali (teplota annealingu) vo vzájomnom odstupu teplôt 1 – 5 °C na zabránenie nespecifických väzieb. Špecifická annealingu klesá vtedy, ak je aktuálna teplota výrazne nižšia ako vypočítaná T_m .

3. Dosyntetizovanie (extenzia, rozšírenie) priméru na komplementárne vlákno termostabilnou DNA polymerázou (72 °C, 1 minúta na syntézu produktu s dĺžkou 1000 bázo- vých párov).

V ďalšom kroku slúži novosyntetizované vlákno a aj pôvodná sekvencia ako templát pre ďalší cyklus reakcie. Preto každý cyklus zdvojnásobí počet cieľových sekvencií. Cyklus sa opakuje x-krát (počet cyklov je daný protokolom), čím sa dosiahne konečný počet približne 10^9 kópií NK počas 2 – 3 hodín. Proces nastavenia príslušnej teploty pre jednotlivé fázy cyklu je dosiahnutý použitím automatizovaných prístrojov nazývaných termocyklyery. Po určitom počte PCR cyklov dosiahne PCR tvorba amplikónov tzv. plató, kedy už nerastie počet kópií ako dôsledok vyčerpania zložiek reakčnej zmesi. Dostatočným počtom cyklov PCR sa získa potrebné množstvo amplifikovaných produktov PCR (amplikónov) bez ohľadu na počiatočné množstvo templátovej NK (šablón), a tak sa dá produkt reakcie detegovať a analyzovať.

Tab. 1.20.2. Príklad štandardného priebehu PCR s hot štartom.

Cyklus	Teplota	Čas	Počet cyklov
Iniciálna denaturácia	95 °C	30 sekúnd	1
Denaturácia	95 °C	15 – 30 sekúnd	30
Annealing (nasadenie primérov na templát)	55 – 68 °C	15 – 60 sekúnd	
Elongácia reťazca (extenzia)	68 °C	1 minúta na 1 kb	
Záverečná extenzia	72 °C	5 minút	1
Udržiavanie produktu	4 °C	∞	

Detekcia produktov PCR (amplikónov)

Detekcia amplikónov sa deje na princípoch opísaných pri **hybridizácii** pomocou značených sond alebo **elektroforeticky** s nespecifickým značením produktu interkalantným fluorescenčným značením. Hybridizácia produktu so sondami môže prebiehať vo dvoch formátoch – tuhom a kvapalnom (solid phase, liquid phase). Použitím značených sond na detekciu produktu sa zabezpečí tak ich vizualizácia, ako aj overenie špecifity produktu.

Podstata elektroforézy pri detekcii produktov PCR spočíva vo využití jednosmerného elektrického prúdu a záporného náboja nukleových kyselín. Na základe tejto vlastnosti putuje DNA vždy od zápornej anódy ku kladnej katóde. Zariadenie potrebné pre elektroforetickú separáciu DNA rozdeľujeme na dva typy. Prvú skupinu predstavujú horizontálne elektroforézy, pri ktorých sa ako nosné médium využíva agaróza. Druhú skupinu predstavujú vertikálne elektroforézy, pri ktorých nosným separačným médium je polyakrylamidový gél (PAGE). Metóda slúži na separáciu (delenie) produktov amplifikácie nukleových kyselín, ktoré sa získajú pri PCR. Umožňuje stanovenie ich dĺžky a molekulovej hmotnosti porovnaním voči hmotnostnému štandardu (ladder),

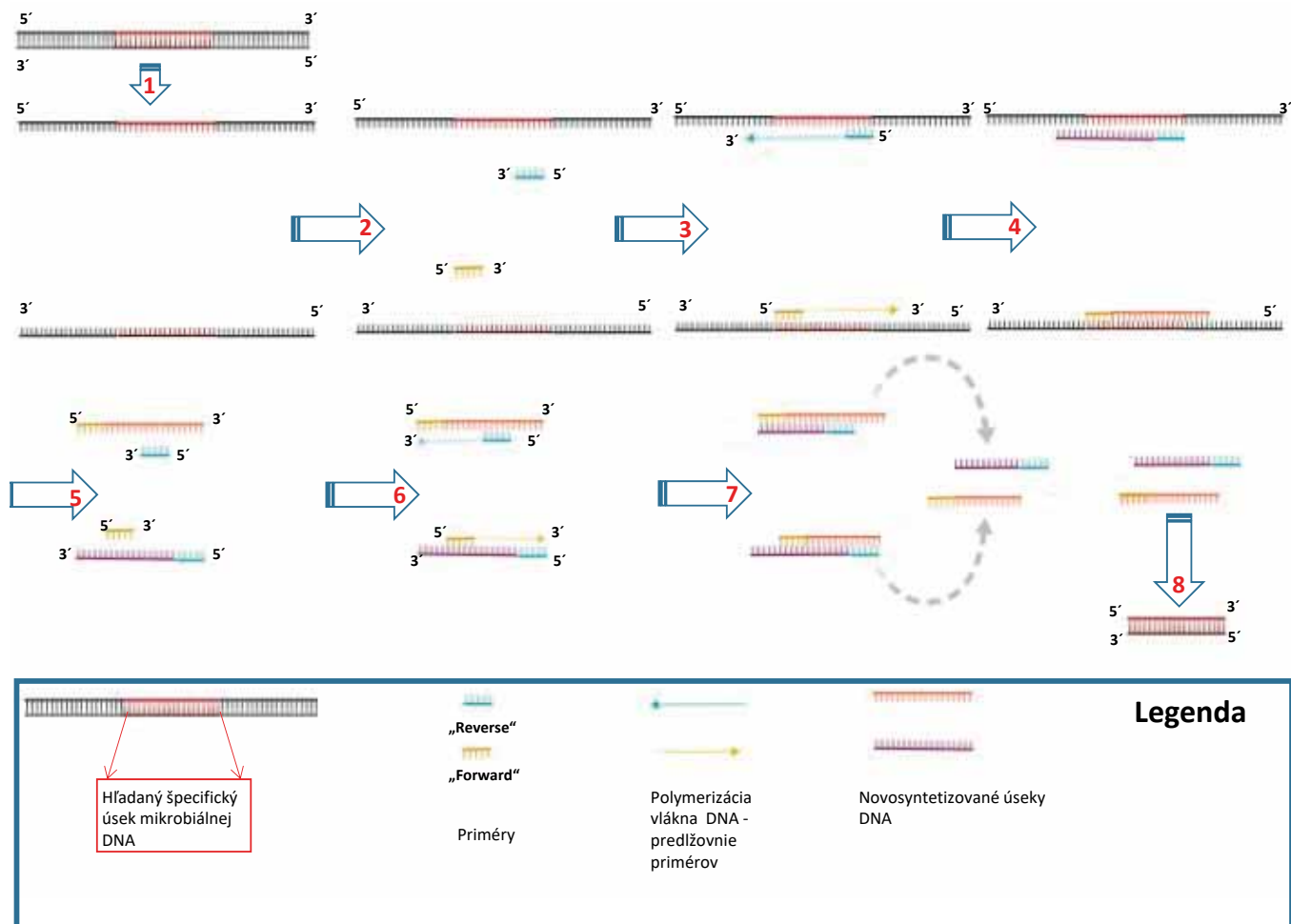
čo je zmes asi 15 – 20 fragmentov DNA, každý fragment s presne známou veľkosťou. Tie putujú v elektroforéze paralelne s produktom a po ich rozdelení zaujmú pozíciu v závislosti od veľkosti (molekulovej hmotnosti) fragmentu od najväčšieho po najmenší (v smere od štartu). Každý typ fragmentu vytvorí jeden pás v dráhe pohybu v elektrickom poli a všetky produkty PCR, ktoré sú po elektroforetickom rozdelení na úrovni niektorého fragmentu leddera, majú tú istú veľkosť. Ak sa veľkosť PCR produktu zhoduje s metodicky udanou veľkosťou, potvrdí sa tým jeho špecifita. Pri vizualizácii fragmentov DNA je najčastejšie používanou interkalačnou látkou etídium bromid, ktorý sa včlení medzi nukleotidy dsDNA (dvojvláknovej DNA) a pri použití UV transluminátora dochádza k vizualizácii DNA (fluorescencia). Nevýhodou etídium bromidu je jeho toxicita a mutagenita, preto je potrebné dodržiavať bezpečnostné zásady pri manipulácii s ním. Z tohto dôvodu boli vyvinuté iné interkalačné látky, ktoré sa vyznačujú vyššou bezpečnosťou aj citlivosťou, napr. SYBR green, ktoré majú navyše širšie využitie. Pri použití kalibrátorov DNA so známou koncentráciou (množstvom kópií) možno po naviazaní etídium bromidu porovnaním intenzity fluorescence kalibrátorov a vzoriek stanoviť aj približný obsah DNA vo vzorkách. Nazývame to **end point** kvantifikácia.

Metódy kvantifikácie NK používané v klinickej mikrobiológii musia byť čo najpresnejšie a aspoň čiastočne automatizovateľné a preto sú štandardom qPCR (**kvantitatívna PCR**) a qRT-PCR (**kvantitatívna PCR** s reverznou transkripciou), ktorá sa požíva pri stanovení počtu počtu cieľovej RNA (napr. HIV). Pri qPCR sa produkt kvantifikuje počas toho, ako sa amplifikuje, preto sa tiež označuje ako **PCR v reálnom čase (real time PCR)**. Pri týchto metodikách je vznik novej kópie cieľovej sekvencie spojený so vznikom svetelného signálu. Na qPCR sú teda potrebné cykléry, ktoré vykonávajú nielen termický cyklus PCR, ale sú schopné zaznamenávať svetelné signály a počítačovo spracovávať zaznamenávané údaje. Emisia fluorescenčného signálu je počas qPCR úmerná množstvu syntetizovanej DNA a môže byť zobrazená ako krivka, resp. ako amplifikačný graf, zobrazujúci závislosť množstva fluorescenčného signálu od počtu, resp. poradia termických cyklov. Prvá, plochejšia časť krivky charakterizuje iniciačnú (Ia) fázu PCR počas prvých cyklov, kde sa emitovaná fluorescencia nedá odlíšiť od základnej prahovej hodnoty prostredia reakcie (prirodzená fluorescencia pozadia – cut off, threshold a pod.). Počas nasledujúcej exponenciálnej alebo logaritmické fázy dochádza k exponenciálnemu zvyšovaniu počtu kópií, ktoré úmerne spôsobí aj prudké zvýšenie fluorescence. Kvantifikácia produktov je možná iba v tejto exponenciálnej fáze. Čím nižší počet cyklov je potrebných na dosiahnutie nástupu exponenciálnej fázy, tým viac kópií bolo vo vzorke, a naopak, ak bol počet kópií vo vzorke nízky, bude počet cyklov na dosiahnutie exponenciálnej fázy oveľa vyšší. Nástup exponenciálnej fázy sa prejaví výrazným nárastom fluorescenčného signálu. Dôležité pre kvantifikáciu je teda určiť C_T (threshold cyklus), teda poradové číslo cyklu, v ktorom sa prejavil exponenciálny nárast signálu. Pri kvantifikácii počtu kópií vo vzorkách najprv zmeriame C_T kalibračných štandardov (rad vzoriek so známym počtom kópií cieľovej sekvencie) a vynesieme hodnoty C_T voči príslušnému kalibračnému štandardu do grafu, čím získame kalibračnú krivku. Na základe paralelného merania C_T vzoriek pacientov možno z kalibračnej krivky vypočítať počet kópií vo vzorkách a kvantifikovať tak napr. množstvo vírusu v patientskej vzorke.

Keď sa po niekoľkých desiatkach cyklov PCR spotrebujú zložky v reakčnej zmesi, dosiahne sa plató fáza. V tejto poslednej fáze v dôsledku vyčerpania reagensí nedochádza k ďalšej amplifikácii templátu ani k zvyšovaniu fluorescence, signál zostáva nezmenený a PCR je ukončená.

Kontrola a riešenie možných problémov pri PCR

Falošne negatívna reakcia môže byť v dôsledku prítomnosti inhibítorov PCR (napr. heparín v o vzorke krvi, z ktorej bola izolovaná templátová NK), kontaminácia endonukleázami, ale



Obr. 1.20.5. Polymerázová reťazová reakcia (PCR): 1. Dvojzátvitnica DNA sa denaturuje (rozpojí, roztopí) pri teplote viac ako 90°C a vlákna sa vzájomne oddelia. 2. Teplota klesne tesne pod teplotu pre anealing (hybridizáciu) oboch primérov T_m , a oba priméry sa naviažu na komplementárne úseky uvoľnených vlákien. Priméry sú do reakcie pridávané v prebytku, čím sa zabráni rehybridizácii pôvodných vlákien. 3. Nastanie polymerizácie dcérskych vlákien (extenzia) v smere $5' \rightarrow 3'$ na oboch pôvodných vláknoch. 4. Pridané nukleotidy sa včleňujú do nového vlákna pozdĺž hľadaného úseku pôvodného vlákna DNA (templátu). 5. Novosyntetizované vlákna, rovnako aj pôvodná templátová DNA, slúžia v ďalších cykloch ako templáty, na ktoré sa viažu priméry. Pri novosyntetizovaných vláknoch sa priméry viažu vice versa (na vlákno s forward koncom sa viaže reverse primer a naopak). 6. Polymeráza predlžuje nové vlákno smere $5' \rightarrow 3'$ až po koniec templátového úseku, ktorým sa ohraničí hľadaná sekvencia... 7. V ďalších cykloch sa opakuje už len syntéza hľadanej sekvencie. 8. Na konci PCR dôjde po znížení teploty k hybridizácii oboch novosyntetizovaných vlákien DNA hľadanej sekvencie a vzniká finálny produkt PCR – amplikóny.

bo kvôli zlej izolácii nukleovej kyseliny a zlej účinnosti amplifikácie. Naopak falošne pozitívny výsledok PCR môže byť dôsledkom kontaminácie NK z iného zdroja, napr. z inej vzorky. Existujú rôzne metódy na validáciu amplicónov vygenerovaných v PCR, ktoré slúžia na diferenciáciu cieľovej amplifikácie od nešpecifickej amplifikácie. Tieto metódy zahŕňajú nielen horeuvedenú hybridizáciu komplementárnymi sondami k amplifikovanej cieľovej sekvencii a elektroforézu amplicónov, ktorá potvrdí zhodu medzi očakávanou a dosiahnutou veľkosťou amplicónov, ale aj:

- **analýza krivky topenia amplicónov.** Pomer dvojíc A-T a G-C je určujúci pre priebeh topenia a preto každá špecifická sekvencia má presne danú teplotu topenia, ktorá spôsobí, že v 50% dvojvláknových amplicónov dôjde k odpojeniu oboch vlákien od seba. To sa prejaví sa zvýšením absorbancie v roztoku, resp. ak boli na detekciu amplicónov použité interkalačné farbivá, po rozptýlení duplexov dôjde k poklesu fluorescence. Tieto zmeny pri určenej teplote dokazujú špecifickosť vzniknutých amplicónov. Väčšina moderných prístrojov pre real time PCR má modul pre analýzu krivky topenia amplicónov a umožňujú tak kontrolu produktov reakcie;
- sekvenovanie amplicónov.

Na kontrolu správnosti priebehu sa do niektorých typov PCR pridáva do reakcie alebo paralelne kontrola. Je to vzorka NK so inou sekvenciou, ako je cieľová (rovnako aj k nej komplementárnych primérov), ktorej amplifikácia potvrdí dodržanie, resp. odhalí nedodržanie požadovaných podmienok PCR daných protokolom.

Aby sa zamedzilo kontaminácii (šírenie amplicónov z jednej PCR na inú), je potrebné jednotlivé procesy priestorovo oddeliť, a to prácou v PCR boxoch alebo laminárnych boxoch a/alebo rozdelením etáp prípravy a spracovania do viacerých miestností. Napríklad, izolovanú prípravu primérov, PCR puftrov a dNTP, izolovanú prípravu PCR testu (príprava tzv. master mixu) s výnimkou pridania cieľovej nukleovej kyseliny v druhej miestnosti, spracovanie vzorky, izolácia, resp. príprava cieľovej nukleovej kyseliny a pridanie cieľovej molekuly k PCR testu v inej miestnosti, oddelené PCR cyklovanie pri amplifikácii a oddelenú elektroforézu amplicónov na agarózovom géli alebo inú analýzu PCR produktu. Amplifikované produkty by nikdy nemali byť prenosené do miestnosti pre prípravu PCR reagentov. Ultrafialové svetlo degraduje nukleové kyseliny, preto je v každom laminárnom, PCR boxe alebo miestnosti nutná UV dekontaminácia. Na odstránenie kontaminujúcej NK sa používajú aj niektoré špecifické nukleázy, napr. **uracil-DNA glykozyláza**. Jej využitie je umož-

nené začlenením dUTP do všetkých produktov PCR (nahradením dTTP za dUTP alebo začlenením uracilu namiesto tymínu počas syntézy primérov). Výmenou tymínu za uracil sa nijak neovplyvní ďalšia analýza templátovej sekvencie. Táto nukleáza sa pridáva ku každej ďalšej reakčnej zmesi. Modifikuje PCR produkty tak, že ak sa dostali v novej reakcii do zmesi (kontaminácia), budú všetky zvyškové produkty z predchádzajúcich amplifikácií PCR rozštiepené a zabráni sa tak ich amplifikácii, pričom templátové vlákna DNA nie sú nijak ovplyvnené. Pri prvom cykle PCR sa uracil-DNA glykozyláza v reakčnej zmesi inaktívuje pri teplote 95 °C a ďalej tak reakciu neovplyvňuje. Moderné PCR automaty sú schopné zabezpečiť všetky uvedené procesy automaticky v jednom prístroji, resp. dvoch prístrojoch (v prípade samostatnej automatickej extrakcie NK), vrátane prevencie kontaminácie. Alternatívne sa dajú amplifikačné produkty inaktívovať pomocou psoralénu alebo izopsoralénu (furokumarínové zlúčeniny), ktoré sa vmedzerujú medzi bázoové páry DNA (interkalačné látky). Pri UV svetle (320 – 400 nm) sú tieto látky excitované na reaktívne formy, ktoré vytvárajú komplexy s pyrimidínovými bázami, blokujúcimi aktivitu DNA polymerázy.

Niektoré typy PCR

RT-PCR (PCR s reverznou transkripciou)

Na detekciu nukleovej kyseliny RNA vírusov (napr. HIV, HCV, vírus osýpok a mnohé iné) v klinickej vzorke sa pred začatím PCR cyklov musí uskutočniť krok navyše. PCR môže amplifikovať iba cieľové sekvencie DNA, molekuly RNA musia byť preto pred vlastnou amplifikáciou prepísané do DNA. Pritom sa primér hybridizuje s templátovou RNA a pomocou reverznej transkriptázy sa syntetizuje komplementárne cDNA vlákno pripájaním komplementárnych párov báz. Templátová RNA sa odstráni použitím enzýmu RNáza H, ktorý ju rozpúšťa a uvoľní tak z hybridného duplexu RNA-DNA novovytvorenú jednovláknovú cDNA, ktorá môže byť amplifikovaná v PCR. Na tento typ PCR sa používa rekombinantná DNA polymeráza, odvodená z extrémofilnej baktérie *Thermus thermophilus* (Tth pol). Má polymerázovú aktivitu, ako aj aktivitu reverznej transkriptázy.

Nested („vnorená“) PCR

Táto metóda PCR zvyšuje citlivosť aj špecifickosť. V nested PCR sa používajú dve sady amplifikačných primérov. Prvá dvojica vonkajších primérov sa použije na ohraničenie a amplifikáciu cieľovej sekvencie a druhá sada vnútorných primérov sa použije na amplifikáciu špecifického úseku vo vnútornej oblasti prvej cieľovej sekvencie. Pretože syntéza druhého, vnútorného amplikónu závisí od úspešného vytvorenia prvého amplikónu, vytvorenie druhého automaticky potvrdí presnosť syntézy prvého amplikónu. Princíp nested PCR robí reakciu veľmi špecifickou a obmedzuje riziko falošne pozitívnej reakcie, ktoré sa môžu vyskytnúť pri iných PCR systémoch. Hlavnou nevýhodou nested PCR je vysoké riziko kontaminácie.

Multiplex PCR

Multiplex PCR sa môže použiť na testovanie viacerých rôznych organizmov v jednej reakcii. Ušetrí sa tým práca, diagnostiká, čas a aj množstvo vzorky potrebné pre analýzu. V multiplexnej PCR sa môže súčasne amplifikovať niekoľko jedinečných cieľových sekvencií v jednej vzorke biologického materiálu spolu, v jednej reakcii, napr. špecifických sekvencií 3 až 30 patogénov (bakteriálnych, vírusových a mykotických pôvodcov meningoencefalitíd, gastroenteritíd, respiračných infekcií a pod.). Môže sa použiť aj v diagnostických testoch, ktoré používajú jednu sadu primérov na vnútornú kontrolu (overenie správneho priebehu PCR), zatiaľ čo ďalšie sady testovacích primérov sú komplementárne voči sekvenciám DNA možných etiologických agensov. Absencia kontrolného amplikónu signalizuje, že podmienky PCR neboli splnené a PCR je potrebné zopakovať. Priméry sú navrhnuté tak, aby každý amplifikovaný produkt mal jedinečnú veľkosť, ktorá umožňuje detekciu a identifikáciu kon-

krétnych mikroorganizmov. Sady primérov, použitých v určitom multiplex protokole PCR (napr. neuroinfekcie) by mali mať podobné teploty annealingu (hybridizácia priméru s templátovým vláknom). Obmedzenie multiplexovej PCR spočíva v tom, že miešanie rôznych primérov môže spôsobiť určitú interferenciu v procese amplifikácie a zvyšovanie počtu primérov sťažuje optimalizáciu podmienok reakcie.

Kompetitívna kvantitatívna PCR (QC PCR):

Kompetitívna PCR je kvantitatívna PCR, ktorá sa používa na kvantifikáciu množstva nukleovej kyseliny vo vzorke. Princípom je súťaž medzi cieľovou nukleovou kyselinou a kompetitívnou DNA pri amplifikácii. Kompetitívna DNA viaže rovnaký pár primérov ako cieľová, teda dochádza k súťaži s ňou o väzbu s primérom a do reakcie sa pridáva v známej koncentrácii. Od cieľovej DNA sa odlišuje vo veľkosti alebo v prítomnosti jedinečného reštrikčného miesta, čo umožňuje presné rozlíšenie cieľovej DNA od kompetitívnej DNA po ukončení amplifikačného procesu. Množstvo cieľovej DNA sa potom stanoví porovnaním s koncentráciou kompetitívnej DNA.

PCR v reálnom čase (real-time PCR)

Systém PCR v reálnom čase sa odlišuje od bežnej PCR tým, že:

- je schopná detegovať amplifikovanú cieľovú DNA fluorescenčne značenými sondami pri tvorbe hybridov (t.j. detekcia amplikónu v reálnom čase);
- amplifikácia aj detekcia produktu sa uskutočňuje v jednej reakčnej nádobe bez toho, aby sa musela otvárať a ďalej spracovávať, a tým sa znižuje riziko kontaminácie („uzatvorený systém“);
- akumulácia amplikónov sa sleduje priebežne (real time) počas toho, ako sú syntetizované, preto možno kvantifikovať množstvo produktu a tiež určiť počet kópií cieľovej nukleovej kyseliny v pôvodnej vzorke;
- šetrí čas, lebo sleduje dynamiku reakcie už počas amplifikácie bez nutnosti vykonávať analýzu po ukončení reakcie (napr. elektroforézu).

Na priebežnú detekciu amplikónov počas jednotlivých cyklov real time PCR sa používajú

1. Interkalačné farbivá

Etídium bromid alebo kyaninové farbivá (napr. SYBR Green I) sú fluorescenčné farbivá s nešpecifickou väzbou na akúkoľvek dsDNA, bez ohľadu na sekvenciu.

Pre kvantifikáciu amplikónov interkalačným farbivami sa používajú aj fluorescenčné kyaninové farbivá, napr. SYBR® Green, ktoré postupne nahradili v minulosti používaný etídium bromid. Obe sa viažu na všetky dostupné molekuly DNA, čiže v porovnaní s použitím značených sond ide o nešpecifické značenie. Najčastejším mechanizmom tejto väzby je interkalácia (vmedzerenie) farbičky medzi bázy DNA alebo jej väzba do malého žliabku DNA. Fluorescencia SYBR green je po väzbe na DNA (interkalácii) až 100x vyššia a fluorescenčný signál sa zvyšuje so vzrastajúcim množstvom PCR produktu. Signál sa meria na konci elongácie alebo kontinuálne. Farbivá, ktoré sa viažu na DNA sa nemôžu uplatniť pri mnohonásobných reakciách a ich nevýhodou oproti predchádzajúcej metóde je nemožnosť odlišenie nešpecifických produktov. Nešpecifické signály, ktoré môžu byť tvorené dimérmi primérov, negatívne ovplyvňujú meranie, preto je potrebný výber primérov tak, aby netvorili diméry.

2. Fluorescenčné (fluorogénne) sondy, viažúce sa na stredovú časť amplifikovaného úseku

Podstatou fluorogénnych sond je to, že na vytváranie fluorescenčného signálu je potrebná špecifická hybridizácia medzi sondou a cieľom, inými slovami – fluorescenčný signál sa vytvorí len v prípade, že sa sonda špecificky naviaže na komplementárny úsek cieľovej DNA, nachádzajúci sa približne v strednej časti. Signál sa meria v každom cykle. Fluorogénne



sondy môžu byť označené rôznymi reportérovými farbivami s odlišiteľnými signálmi (svetlo rôznej vlnovej dĺžky) a tak sa dá amplifikovať viacero odlišných sekvencií v jednej PCR reakcii (multiplex real time PCR) a detegovať pritom jednotlivé typy produktov.

Sondy používané pri metóde PCR v reálnom čase:

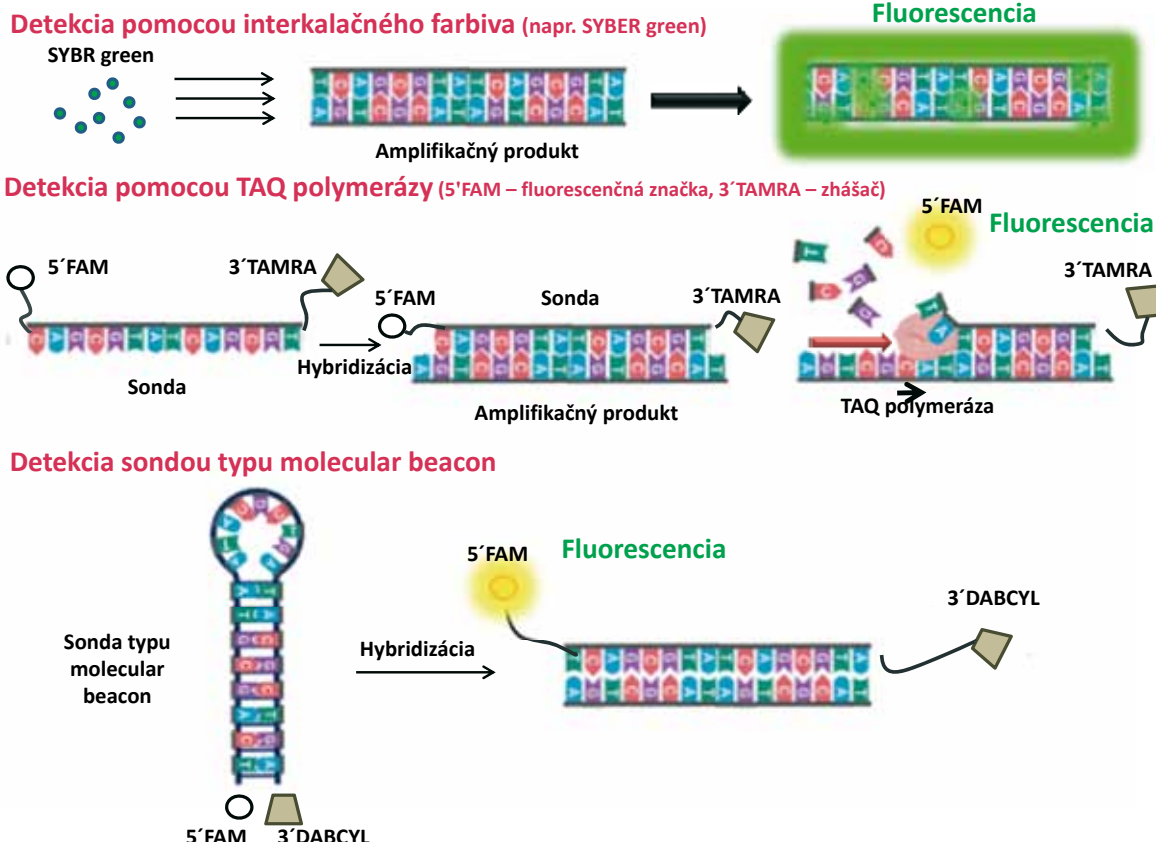
- **hydrolyzačné:** TaqMan sondy s Taq polymerázou,
- **hybridizačné:** FRET, Molecular Beacons (majáky) Scorpions® (škorpióny).

Hydrolyzačné sondy

Sú oligonukleotidy s dvoma naviazanými farbivami, každé na inom konci sondy. Jedno sa nazýva reportér alebo donor a ide o fluorescenčné farbivo na 5'-konci (ako napr. FAM karboxyfluoresceín), druhé je zhášač alebo akceptor (angl. quencher) na 3' konci molekuly sondy. Ide tiež o farbivo, ako je napr. TAMRA (tetrametyl-6-karboxyródamin) alebo DABCYL [kyselina 4-(dimetylaminoazo) benzén-4-karboxylová]. Akceptorový fluorofór má schopnosť potlačiť fluorescenciu donorového fluorofóru (pohltením jeho fluorescenčnej energie), ak sú dostatočne blízko seba. Pokiaľ je sonda naviazaná, jej priestorový tvar spôsobuje takú fyzickú blízkosť zhášača, že významne znižuje fluorescenciu reportérového farbiva. Pokiaľ je vo vzorke prítomná cieľová sekvencia DNA, sonda sa na ňu napojí v mieste, kde prebieha syntéza komplementárneho vlákna v smere od jedného z primérov. Tým, ako prebieha syntéza, posúva sa Taq DNA polymeráza po templátovom reťazci až k miestu, kde je naviazaná sonda, ktorú rozštípe vďaka svojej 5' nukleázovej aktivite. Toto štiepenie sondy oddelí reportérové farbivo od zhášacieho farbiva, čím sa výrazne zvyšuje signál reportérového farbiva. Počet odštiepených molekúl reportérového farbiva z príslušných sond rastie v každom cykle, čo vedie k zvýšeniu intenzity celkovej fluorescence, úmernej množstvu vytvorených amplifikátov.

Hybridizačné sondy

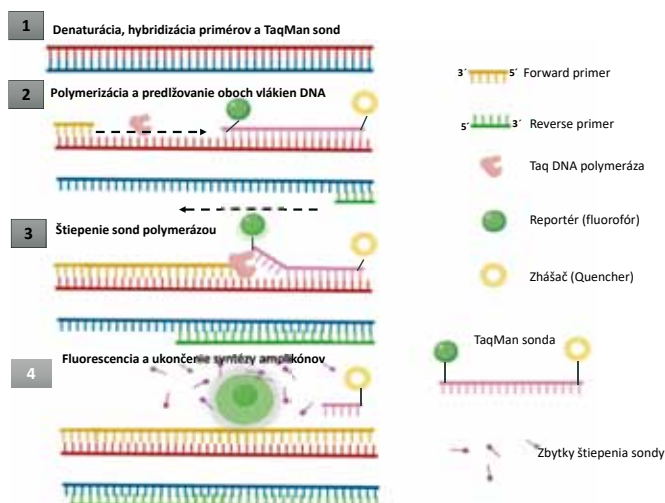
FRET alebo tiež susediace sondy sú typom sond, ktoré fungujú na špeciálnom princípe, t. j. **Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET)**, čiže fluorescenčný rezonančný prenos energie. Je to princíp, na ktorom funguje väčšina sond používaných pri real-time PCR. Každá sonda má na sebe jeden z dvoch typov fluorescenčných značiek – reportéra, ktorý emituje energiu v určitej vlnovej dĺžke a zhášača (quencher), ktorý absorbuje energiu reportéra a túto potom premení na energiu v inej vlnovej dĺžke. Absorpčné spektrum zhášača sa musí prekryvať s excitačným spektrom reportéra, aby mohlo dôjsť k prenosu energie – rezonancii. Zhášač pohlcuje excitačnú energiu špecifickej vlnovej dĺžky od reportéra, ktorý tak nemôže do prostredia emitovať vlastnú fluorescenciu. Pokiaľ sa ale zhášač od reportéra dostatočne vzdiali, reportér emituje svetelný signál. Zhášač pohltenú energiu premení na emisiu vlastného signálu. Aby mohlo dochádzať k fluorescenčnému rezonančnému prenosu energie, musí byť vzdialenosť medzi oboma fluorescenčnými značkami menšia $\leq 100 \text{ \AA}$ ($1 \text{ \AA} = 0,1 \text{ nm}$), čo je dĺžka 1 – 5 nukleotidov. FRET sondy majú také sekvencie, aby hybridizovali vedľa seba na susediace nukleotidové sekvencie templátu, najčastejšie oddelené iba dvojbazovou medzerou. Prvá sonda býva na 3' konci značená fluorofórom s excitačným maximom okolo 480 nm, a nazýva sa donor. Druhá sonda je značená niektorým z farbív s vyšším excitačným (A_m) a emisným maximom (E_m), ako sú napr. farbivá TAMRA ($A_m = 557 \text{ nm}$, $E_m = 583 \text{ nm}$) alebo Cy3. Táto sonda je označovaná aj ako akceptor. Musí byť na 3' konci blokováná, aby nedochádzalo k predlžovaniu sondy DNA polymerázou počas PCR reakcie. Ak sú sondy voľne v roztoku, fluoresceín na donorovej sonde emituje zelené žiarenie s vlnovou dĺžkou 480 nm. Po hybridizácii oboch sond s DNA reťazcom tesne vedľa seba prenesie donor energiu na akceptora, ktorý následne emituje fluorescenčné žiarenie s vyššou vlnovou dĺžkou (obr. 1.20.8). Pri annealing kro-



Obr. 1.20.6. Niektoré možnosti detekcie amplifikátov pri PCR (upravené podľa: https://www.researchgate.net/figure/Detection-methods-used-for-real-time-PCR-a-TaqMan-probes-with-Taq-polymerase-b_fig5_268080963)

ku teda dochádza k nárastu fluorescence s vyššou vlnovou dĺžkou. FRET sondy nie sú degradované na rozdiel od hydrolyzačných sond a ich fluorescence je reverzibilná. Preto sa tie isté sondy uplatňujú znova v každom cykle PCR reakcie.

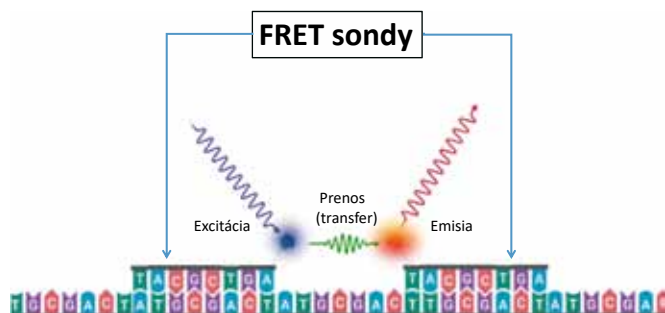
Princíp molekulárnych majákov (angl. molecular beacons) je založený na ich sekundárnej štruktúre. Konce oligonukleotidu sú navzájom komplementárne, takže nenaviazaná sonda vytvára vlásenkovú štruktúru. Prostredná časť oligonukleotidu tvorí slučku a je komplementárna k amplifikovanému useku DNA. Hybridizácia s DNA linearizuje sondu a ruší vlásenkovú formu a vzdaluje zhášač od reportéru, ktorý tak emituje fluorescenciu do prostredia.



Obr. 1.20.7. Princíp kvantitatívnej real time PCR pomocou TaqMan sond. Vzniknutý fluorescenčný signál narastá v každom cykle proporčne s nárastom počtu kópií hľadaných úsekov DNA (upravené podľa: <https://www.intechopen.com/books/nucleic-acids-from-basic-aspects-to-laboratory-tools/nucleic-acids-the-use-of-nucleic-acid-testing-in-molecular-diagnostics>)

Na to, aby sa dala kvantifikovať cieľová sekvencia v klinickej vzorke, je potrebné použiť štandardnú krivku, ktorá zaznamenáva priebeh amplifikácie známeho množstva nukleovej kyseliny, z ktorej sa vypočíta množstvo nukleovej kyseliny vo vzorke. Pri jej vytvorení sa použije známe množstvo cieľovej sekvencie, ktoré sa amplifikuje v real-time PCR spolu s klinickou vzorkou obsahujúcou neznáme množstvo cieľovej sekvencie.

Klinické aplikácie PCR v reálnom čase sú v rámci mikrobiológie hlavne pri sledovaní dynamiky infekčného ochorenia a monitoringu odpovede na antimikrobiálnu liečbu (HIV, HCV, HBV, CMV, JK vírus a pod.).



Obr. 1.20.8. Princíp fluorescenčného rezonančného prenosu energie pri použití FRET sondy v PCR.

Digitálna PCR (d-PCR)

Predstavuje tretiu generáciu PCR s veľkou perspektívou uplatnenia v mikrobiológii ako nová metóda kvantifikácie cie-

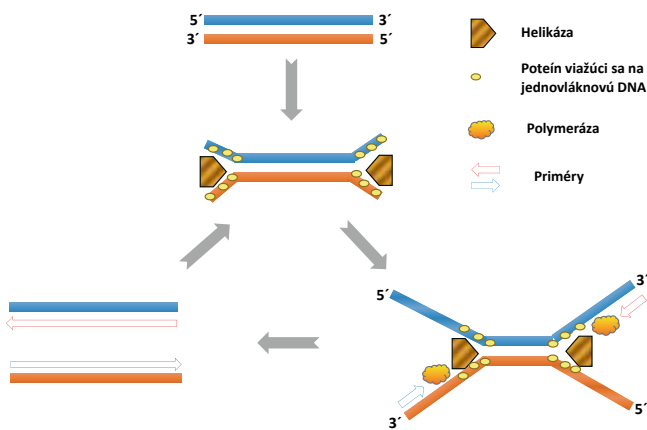
lových sekvencií. Umožnili ju nové technológie miniaturizácie, pričom základom je pôvodný princíp amplifikácie NK, ktorý prebieha na mikročipovom alebo mikrofluidnom formáte. V mikrobiológii sa využíva na stanovenie počtu kopíí vírusov, ale aj počtu baktérií, húb a parazitov pričom nie je závislá na kalibrácii, ktorá je potrebná pri iných metódach kvantitatívneho stanovenia, napr. PCR v reálnom čase. Princíp digitálnej PCR spočíva na mikrofluidnom alebo mikroemulznom rozdelení analyzovanej vzorky, teda aj vlastných cieľových sekvencií, do veľkého množstva čiastkových vzoriek. Vzorka vyšetřovaného materiálu s objemom 20 μ l sa rozdelí do asi 20 000 reakčných bodov na štvorcový milimeter, každý v objeme rádo vo niekoľko femtolitrov (10^{-15} litera). Tým sa vytvorí predpoklad toho, že v danom reakčnom bode alebo mikroemulznej kvapke bude distribuovaná len jedna templátová molekula NK z analyzovanej vzorky. Distribúcia vzorky sa vykonáva buď použitím miniatúrnych čipov, kedy je vzorka pomocou mikrokapilár rozdelená do radu malých segmentov (reakčných bodov, resp. komôrok) na čipe, alebo je zo vzorky vytvorená emulzia olejových mikrokvapiek v rovnakom počte. Následne prebieha v každom reakčnom bode čipu (resp. každej mikrokvapke) štandardný proces PCR a tým dôjde k amplifikácii v nej uloženého vlákna, resp. nedôjde, ak sa do danej pozície pri distribúcii žiadna cieľová molekula NK nedostala. V závislosti od počtu mikrokvapiek alebo kapacity čipu získavame tisíce až niekoľko desiatok tisíc parciálnych kvalitatívnych výsledkov na základe detekcie fluorescenčného signálu (pozitívny – po vzniku amplikónu, negatívny – bez vzniku amplikónu) pre analyzovanú vzorku, ktorých absolútny počet zodpovedá pôvodnému počtu molekúl templátovej NK vo vzorke. Vzhľadom k určitej pravdepodobnosti možnej prítomnosti dvoch (viacerých) cieľových molekúl súčasne v jednej mikrokvapke, resp. v reakčnom bode čipu je v rámci celkového vyhodnocovania táto skutočnosť zohľadnená a výsledky sú korigované pomocou algoritmov na základe metódy Poissonovho rozdelenia (štatická metóda). Na rozdiel od tradičnej PCR, kedy zodpovedá množstvo amplifikovaného produktu iba približne množstvu templátu a je značne ovplyvnené počtom PCR cyklov, kvantifikácia cieľovej sekvencie v prípade digitálnej PCR prakticky nezávisí od počtu amplifikačných cyklov, čo eliminuje závislosť kvantifikácie od exponenciálneho rastu množstva výsledného PCR produktu, ako je tomu u konvenčnej PCR či PCR v reálnom čase, čiže umožňuje absolútnu kvantifikáciu. Na trhu sú už dostupné komerčné formáty prístrojov pre d-PCR (napr. fa. BioRad).

Izotermálne amplifikácie

Z dôvodu poskytnúť systematický prehľad o rôznych možnostiach amplifikačných metód iných ako varianty PCR (non PCR amplifikácie) uvádzame aj príklady izotermálnej reakcie.

HELIKÁZA-DEPENDENTNÁ AMPLIFIKÁCIA

Táto technika je podobná tradičnej PCR, ale proces amplifikácie prebieha pri konštantnej teplote. Namiesto tepelnej denaturácie DNA sa používa DNA helikáza, ktorý rozvíja DNA dvoivláknú a oddeľuje obe vlákna od seba. Použitím tepelne stabilnej helikázy sa test môže uskutočňovať pri 60 °C, čo vedie k zlepšeniu citlivosti a špecifickosti a tiež eliminuje potrebu prídavných proteínov v tomto teste (spomínaný hot start). Termostabilná helikáza je odvodená od termofilnej baktérie *Thermoanaerobacter tengcongensis*. Počas amplifikácie helikáza odvíja z DNA duplexu jednovláknové DNA, na ktoré sa viažu proteíny stabilizujúce výsledné jednotlivé vlákna (krok 1). Tie následne hybridizujú s primérmi (krok 2). DNA polymeráza ako druhý enzým v reakcii potom priméry predlžuje do komplementárneho vlákna (krok 3) a novo vytvorené duplexy môžu pôsobiť ako šablóny pre nasledujúce cykly (krok 4). Celý proces sa uskutočňuje pri jednej teplote, takže nie je potrebný termocyklér. Produkty amplifikácie sú detegované pomocou fluorescenčne značených sond, a to buď v real time, alebo v end point móde.



Obr. 1.20.9. Priebek helikáza dependentnej amplifikačnej reakcie ako príkladu izotermálnej reakcie pri 60 °C (upravené podľa: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2014/mb/c3mb70304e>).

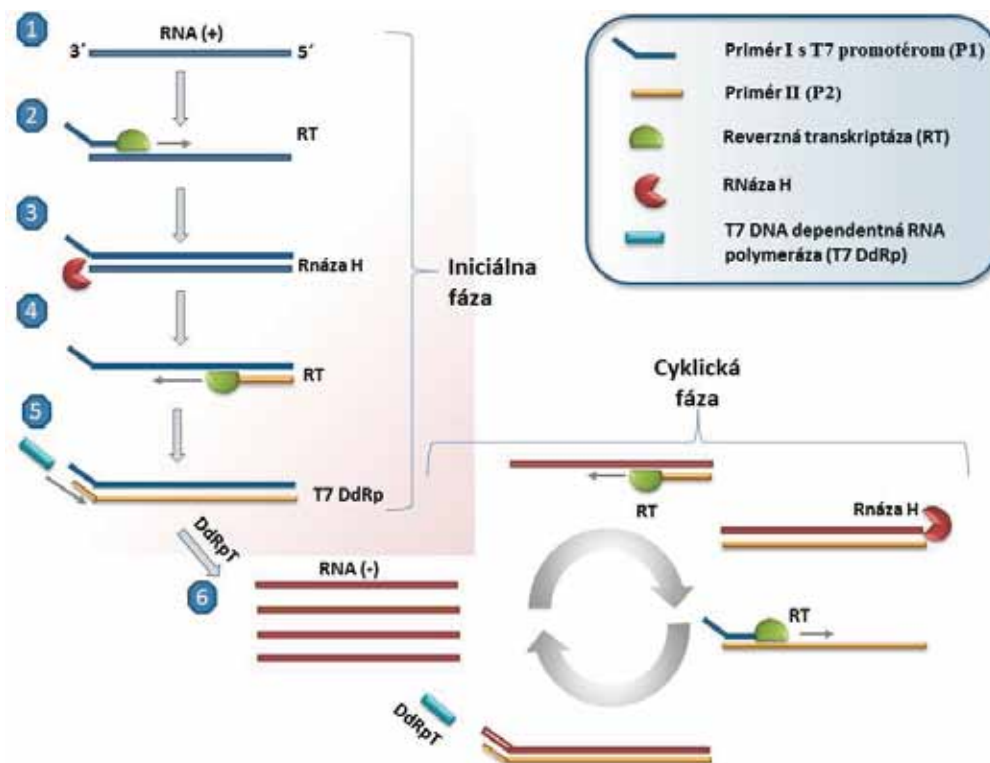
Amplifikácia sprostredkovaná transkripciou (TMA)/amplifikácia založená na sekvencii nukleovej kyseliny (NASBA)

Sú to izotermické metódy amplifikácie RNA. Výhodou týchto metód je ich uskutočňovanie v izotermických podmienkach bez

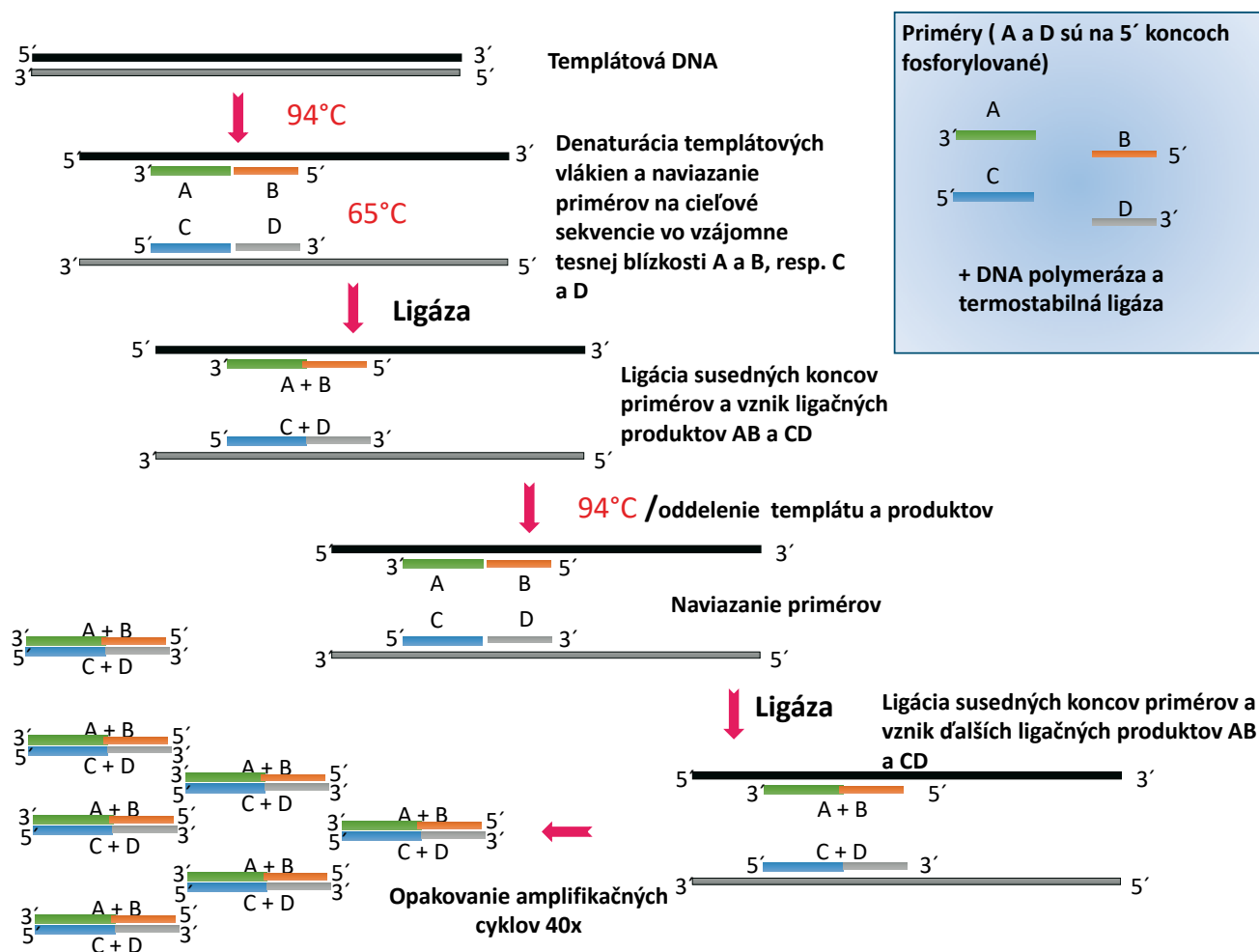
potreby pracovať s termocyklérom. Technika NASBA používa v reakčnej zmesi 3 enzýmy – reverznú transkriptázu, RNázu H a DNA-dependentnú RNA polymerázu. V TMA má enzým použitý na reverznú transkripciu aj aktivitu RNázy H, preto sa v TMA používajú len 2 enzýmy. Pri týchto technikách sa najprv vytvorí cDNA s použitím reverznej transkriptázy, a tá slúži ďalej ako templát pre transkripciu. DNA kópia (cDNA) cieľovej RNA sa pripraví použitím špecifického priméru, ktorý sa viaže na cieľovú RNA. Reverzná transkriptáza syntetizuje komplementárnu DNA, čo vedie k vzniku hybridného duplexu RNA-cDNA. Enzým RNáza H rozštípe a odstráni reťazec RNA z hybridu, pričom zostáva jeden reťazec cDNA. Potom sa na reťazec cDNA naviaže druhý primér a reverzná transkriptáza ho predĺži ako komplementárne vlákno s použitím cDNA ako templátu, čo vedie k vzniku dsDNA kópie cieľovej RNA. Pomocou RNA polymerázy sa z tejto molekuly dsDNA vytvorí niekoľko kópií antisense RNA (- polarita). Tieto RNA molekuly slúžia ako templát pre DNA syntézu pomocou reverznej transkriptázy, čo vedie k vytvoreniu molekúl dsDNA a ten istý cyklus sa opäť opakuje.

Klinické aplikácie TMA/NASBA

V rámci mikrobiologickej diagnostiky sa tieto metódy využívajú na stanovenie vírusovej nálože vo vzorke, napr. HIV, vírusu hepatitídy B, vírusu hepatitídy C, na monitoring antivirotickej liečby pacientov s HCV, na priamu detekciu *M. tuberculosis* v klinických vzorkách, identifikáciu enterovírusov a iné.



Obr. 1.20.10. Priebek amplifikácie založenej na sekvencii nukleovej kyseliny (NASBA). Na cieľovú oblasť RNA templátu, pridanom do reakčnej zmesi (1), sa viaže prvý primér s T7 promótorovou oblasťou. Pri tom sa na svojom 5 ,konci sa pripojí k svojmu komplementárnemu miestu na 3' konci templátu (2) Reverzná transkriptáza syntetizuje opačný, komplementárny reťazec DNA, predĺžovaním 3 ,konca priméru, pričom sa posúva upstream pozdĺž templátu RNA. V ďalšom kroku RNáza H rozloží RNA templát z duplexu DNA-RNA (3). RNáza H rozkladá iba RNA v RNA-DNA hybridoch, ale nie jednovláknovú RNA. Druhý primér sa naviaže na 5 ,koniec (antisense) DNA reťazca. (4) Reverzná transkriptáza dosyntetizuje ďalší reťazec DNA predĺžovaním pripojeného priméru, čo vytvorí dvojitý vlákno DNA T7 DNA dependentná RNA polymeráza sa viaže na promótorovú oblasť na dvojitý vlákno reťazca. (5) Pretože táto polymeráza môže transkribovať iba v smere 3 ,až 5 , transkriptuje sa len sense (+) DNA a tak sa vytvorí anti-sense (-)RNA. (6). Toto sa cyklicky opakuje a polymeráza kontinuálne produkuje komplementárne RNA vlákna podľa tohto templátu, takže dochádza ku amplifikácii cieľového miesta. Táto cyklická fáza prebieha podobne ako v predchádzajúcich krokoch. Druhý primér sa pritom najprv viaže na (-) RNA Reverzná transkriptáza potom vytvorí (+) cDNA / (-) RNA duplex.. RNáza H následne opäť degraduje RNA a prvý primér, ktorý má oblasť promótoru T7, sa viaže na jednovláknovú + (cDNA). Reverzná transkriptáza dosyntetizuje komplementárnu (-) DNA, čím sa vytvorí dsDNA duplex Presne ako v kroku 6 sa T7 polymeráza viaže na promótorovú oblasť, dosyntetizuje sa (-) RNA a tým sa cyklus je uzavrie. (upravené podľa: <https://pubs.rsc.org/services/images/RSCpubs.ePlatform.Service.FreeContent.ImageService.svc/ImageService/ArticleImage/2011/LC/c0lc00666a/c0lc00666a-f3.gif>)



Obr. 1.20.11. Priebeh ligázovej reťazovej reakcie (upravené podľa: http://www.epibio.com/images/default-source/product-page-images/i_ampligase_fig1.gif?svrsn=0.22120843825849912).

Metódy amplifikácie sondy

Produkty amplifikácie týmito metódami obsahujú len sekvenciu sondy. Patria sem technológie Ligase Chain Reaction, Cycling Probe a pod. Tieto typy amplifikácie síce našli uplatnenie aj v klinickej mikrobiológii, no u nás nie sú rozšírené. Uvádzame ich viac – menej z metodických dôvodov.

Ligázová reťazová reakcia (Ligase Chain Reaction – LCR)

Zatiaľ čo je amplifikácia PCR postavená na polymerizácii nukleotidov v kópiach templátu, LCR amplifikuje oligonukleotidy použité ako sondy. LCR amplifikácia je založená na cykloch ligácii dvoch lineárne vedľa seba umiestnených oligonukleotidových sond na komplementárnom templáte. LCR využíva dva enzýmy: DNA polymerázu (používa sa na počiatočnú amplifikáciu templátu a potom sa teplom inaktivuje) a termostabilnú DNA ligázu. V reakcii sa používajú 4 sondy. Po denaturácii sa na každom z dvoch vlákien cieľovej DNA viažu na cieľovú sekvenciu v polohe koniec ku koncu (end to end) dve oligonukleotidové špecifické sondy (pozri obr. 1.19.15). Termostabilná DNA ligáza potom navzájom spojí (liguje) obe sondy cez susedné konce. Tento proces sa uskutočňuje na oboch vláknach templátovej DNA. Výsledný duplex sa zahrieva na oddelenie cieľovej DNA a ligovaných dvojíc sond. Separovaná cieľová sekvencia a ligované sondy teraz pôsobia ako ciele pre ďalšie sondy, ktoré sa viažu rovnakým spôsobom. Tieto kroky sa opakujú niekoľkokrát a výsledkom je namnoženie sondy geometrickým radom. Každý cyklus vedie k zdvojnásobeniu počtu replikátu cieľovej molekuly nukleovej kyseliny, ktorý vznikol ligáciou sond. Kľúčovou výhodou LCR je väčšia špecifita v po-

rovnaní s PCR. LCR umožňuje diskrimináciu sekvencií DNA, ktoré sa líšia iba v jednom páre báz, odhalí tak aj bodovú mutáciu.

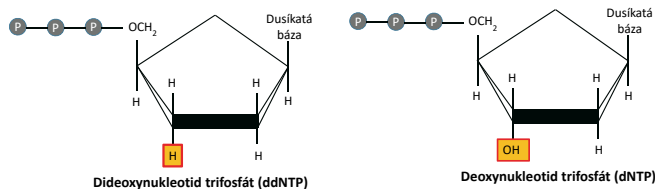
Klinické aplikácie LCR: detekcia baktérií ako *Borrelia burgdorferi*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Neisseria gonorrhoeae* a *Chlamydia trachomatis*, izolácia a identifikácia vírusov, napr. ľudského papilomavírusu, herpes simplex vírusu, HIV atď.

1.20.4.3 SEKVENOVANIE NUKLEOVÝCH KYSELÍN

Sekvenovanie DNA znamená určenie poradia nukleotidov v molekule DNA (gén alebo jeho fragment), získanej extrakciou plazmidu alebo chromozomálnej DNA. Táto technika sa môže použiť na štúdium štruktúry génu, detekciu mutácií, porovnanie genetickej príbuznosti a návrh oligonukleotidových primérov, ale aj na odovodenie aminokyselinovej sekvencie kódovaných proteínov. V súčasnosti idú do popredia laboratórnej diagnostiky aj metódy celogenómovej sekvenácie (whole genome sequencing).

Základnou sekvenačnou technikou je metóda ukončenia syntézy reťazca, nazývaná aj Sangerova sekvenačná metóda, ktorú vyvinul Frederick Sanger v roku 1972. Metóda zahŕňa replikáciu jednoreťazcového templátu s použitím DNA priméru na iniciáciu syntézy komplementárneho vlákna, DNA polymerázy, zmesi štyroch bežných deoxynukleotidových (dNTP) monomérov a malého podielu dideoxynukleotidov (ddNTPs), pričom každý je označený signálnou molekulou (reportérom). DdNTP sú monoméry, pri ktorých chýba hydroxylová skupina (-OH)

v mieste, kde sa zvyčajne viaže iný nukleotid, aby vytvoril reťazec (obr. 1.20.12).



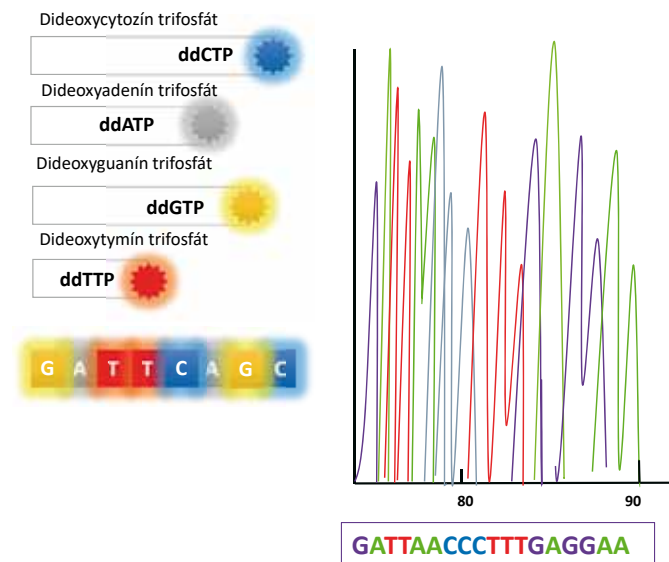
Obr. 1.20.12 Dideoxynukleotid (ddNTP) má štruktúru podobnú deoxynukleotidu, ale chýba 3'-hydroxylová skupina (označená červeným orámovaním žltého poľa). Keď je dideoxynukleotid začlenený do reťazca DNA, syntéza DNA sa zastaví. ddNTP má na svojej molekule fluorogénnu značku (fluorofór), pričom typ fluorofóru je vždy zodpovedajúca typu dusíkatej bázy, napr. adenín je konjugovaný vždy s fluorofórom Cy3 (zelená fluorescencia), tymín s Cy5 (červená fluorescencia) a podobne (upravené podľa: <https://courses.lumenlearning.com/wm-biology1/chapter/reading-dna-sequencing/>).

Zakaždým, keď je ddNTP náhodne inkorporovaný do rastúceho komplementárneho reťazca, ukončí proces replikácie DNA daného reťazca. Tak vzniká množstvo kratších vlákn replikovanej DNA, ktoré sú počas replikácie zakončené na inom mieste. Reakčná zmes s amikónmi sa rozdelí v elektroforéze na polyakrylamidovom géli, ktorá je schopná odseparovať od seba reťazce, vzájomne sa od seba líšiacie dĺžkou len o jeden bázy pár. DNA vlákna amikónov vytvoria elektroforetogram podľa veľkosti od najväčšieho po najmenší.

V dobe, keď sa táto metóda vyvíjala, boli vytvorené štyri typy reakcie pre každú molekulu DNA, ktorá bola sekvenovaná, pričom každá reakcia obsahovala iba jeden zo štyroch možných ddNTP. Každý ddNTP bol značený molekulou rádioaktívneho fosforu. Produkty štyroch reakcií boli potom elektroforeticky delené v samostatných dráhach vedľa seba na dlhých, úzkych PAGE géloch a pásy s rôznou dĺžkou boli detegované autoradiografiou. Tento proces sa dnes zjednodušil použitím ddNTP, z ktorých každý je označený iným typom fluorofóru (obr. 1.20.13), pričom prebieha v jednej sekvenčnej reakcii obsahujúcej všetky štyri možné ddNTP pre každú sekvenovanú DNA molekulu. Pretože každý zo štyroch ddNTP sú označené jedným typom signálnej molekuly (fluorofórom) pre danú bázu (napr. ddNTP s adenínom je označený fluorofórom emitujúcim zelený signál, s tymínom tvorí červený signál atď.), dá sa odčítať poradie nukleotidov na templáte na základe dĺžky reťazca a príslušného farebného signálu na jeho konci (obr. 1.20.14). Tieto svetelné signály sú detegované pomocou fluorescenčného spektroskopu. Určenie fluorescenčnej farby každého pásma, ktoré prechádza detektorom, vytvára nukleotidovú sekvenciu detegovanej NK. Okrem dnes už klasickej metódy podľa Sangeru vznikali iné formáty, napr. chemická metóda (Maxam-Gilbertova), neskôr bola vyvinutá aj dnes široko používaná automatická pyrosekvenácia. Napriek mnohým nedostatkom (vysoká pracnosť, časová náročnosť a iné) je Sagerova metóda stále zlatým štandardom, s ktorým boli porovnávané ostatné metódy sekvenácie pri ich vývoji.

Od roku 2005 sa na trh dostali automatizované platformy sekvenovania používané na rýchle sekvenovanie mikrobiálnej DNA aj v mikrobiologických laboratóriách, ktoré sa označujú ako **sekvenovanie nasledujúcej generácie (next generation sequencing)**. Tieto metódy priniesli revolúciu v oblasti molekulárnej genetiky, pretože nízko nákladové sekvenátory môžu generovať sekvencie stoviek tisíc alebo miliónov krátkych fragmentov (25 až 600 párov báz) za jeden deň. Hoci sekvenčné technológie novej generácie (napr. pomocou pyrosekvenovania) vyrábajú rôzne firmy, všetky umožňujú rýchle sekvenovanie miliónov báz, čo robí sekvenovanie časti alebo celých genómov relatívne jednoduché, lacné a bežné. V pyrosekvenáčnom po-

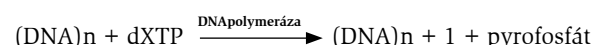
stupe sa napríklad vzorka DNA, ktorá má byť osekvenovaná, štiepi na fragmenty s veľkosťou 300 – 800 bp. Pri pyrosekvenácii dochádza k syntéze DNA v reálnom čase bez značených primérov alebo nukleotidov, rovnako aj bez nevyhnutnosti separovať produkty elektroforézou.



Fluorescenčne značené dideoxynukleodity (ddNTP), ktoré sú pridané do PCR, sú použité na tvorbu DNA fragmentov rôznej dĺžky, pretože náhodná inkorporácia ktoréhokoľvek ddNTP do niektorého zo vznikajúcich dcérskych vlákn zastaví jeho ďalšie predlžovanie.

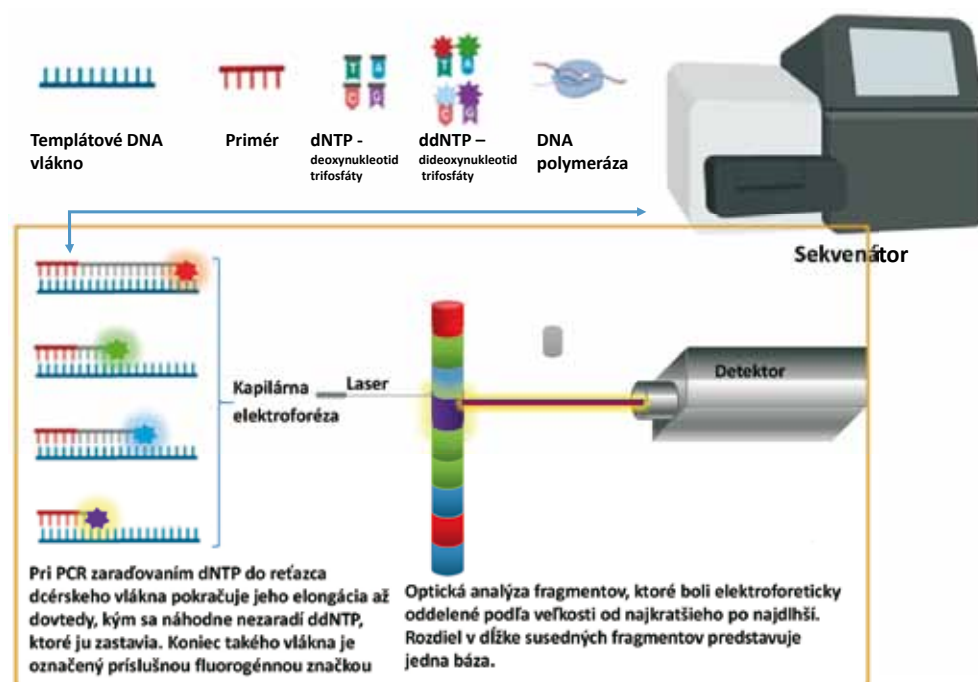
Obr. 1.20.13. Princíp Sangerovej metódy je ilustrovaná ukočením syntézy vlákn DNA pomocou ddNTP označených fluorochrómami. Použitím ddNTP sa môže vytvoriť zmes DNA fragmentov rôznych veľkostí, ktoré po elektroforetickom delení v kapiláre tvoria pod sebou uložené pásiky. Tie sa jeden od druhého líšia dĺžkou iba o jeden nukleotid. Každý pás môže byť detegovaný fluorescenčným detektorom (upravené podľa: <https://courses.lumenlearning.com/wm-biology1/chapter/reading-dna-sequencing/>).

Každý fragment je modifikovaný na oboch koncoch pridaním (ligáciou) templátového vlákna tzv. „A“ a „B“ adaptérov, čo sú sekvencie DNA, na ktoré sa v ďalších krokoch viažu priméry. Adaptér „B“ nesie biotínovú skupinu, cez ktorú je fragment DNA potom imobilizovaný na streptavidínovej mikroperličke (mikrogulička, bead). Dvojvláknový fragment je potom denaturovaný (rozpojený na jednoreťazcové vlákna) a amplifikovaný pomocou PCR za použitia primérov, navrhnutých na anealing (hybridizáciu) s adaptérmi. Perlička obsahuje množstvo kópií týchto DNA fragmentov, naviazaných na jej povrch cez „B“ adaptéry. Každý z týchto komplexov (fragmenty NK ukotvené na perličke) sa potom zmieša s emulzným olejom. Kombinácia oleja s vodou a pretrepávanie spôsobuje, že voda tvorí okolo perličiek kvapôčky, čím vznikne emulzia (a preto sa následný proces nazýva emulzná PCR). Každá perlička sa potom umiestni do samostatnej jamky (rozmer jamky umožňuje pozíciu len jednej perličky v nej), obsahujúcej sekvenčné enzýmy. Jamky vytvárajú povrch na tzv. pikotitračnej platničke. Do jamky sa postupne pridáva jeden zo štyroch nukleotidov, a to jeden po druhom v každom sekvenáčnom cykle. Keď je niektorý z nich pomocou DNA polymerázy začlenený do novovznikajúceho vlákna, uvoľní sa pyrofosfát ako posledný produkt polymerizácie:



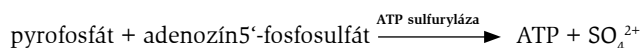
Ak nie je nukleotid zaradený do vlákna, je degradovaný apyrázou na príslušný nukleotid monofosfát.



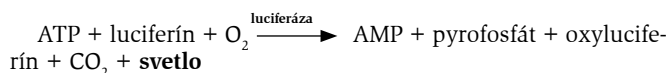


Obr. 1.20.14. Metóda sekvenovania podľa Sangera s použitím ddNTP označených fluorochrómom a kapilárnou gélovou elektroforézou (upravené podľa: <https://courses.lumenlearning.com/wm-biology1/chapter/reading-dna-sequencing/>).

Pyrofosfát, ktorý vznikol po zakomponovaní správneho nukleotidu do novosyntetizovaného vlákna podľa sekvenčného poradia na templáte, je premenený ATP sulfurylázou v prítomnosti adenoín5'-fosfosulfátu na adenoíntrifosfát (ATP):



Ten umožní pomocou luciferázy konvertovať luciferín na oxyluciferín a pritom vzniká svetelný signál, ktorý je zaznamenaný detektorom:



To znamená, že ak v kroku, kde bol pridaný určitý nukleotid, vznikne svetelný signál, bol tento konkrétny nukleotid práve začlenený do vznikajúceho vlákna. Tak sa zistí poradie nukleotidov inkorporovaných do nového reťazca. Tieto technológie používajú softvér na zostavenie všetkých osekvenovaných fragmentov do správneho poradia. Vývoj technológie rýchlo postupuje, znižujú sa náklady na sekvenovanie a rýchlo sa zvyšuje dostupnosť sekvenačných údajov o širokej škále organizmov. Na identifikáciu osekvenovaných úsekov sa používajú databázy genetických sekvencií, napr. GenBank, kde výskumníci ukladajú genetické informácie pre verejnosť. Po overení údajov o sekvenciách sa tieto načítajú do databáz a poskytnú sa tak ostatným pracoviskám, vrátane klinických laboratórií. Cieľová sekvenácia kratších častí nukleových kyselín, rovnako ako celogenómové sekvenovanie mikroorganizmov, sa čoskoro stane finančne dostupné aj pre rutinnú diagnostiku na pracoviskách klinickej mikrobiológie. Jednou z aplikácií sekvenovania v klinickej mikrobiológii je vyhľadávanie cieľových miest v génope, ktoré boli dostatočne charakteristické pre daný taxón a teda použiteľné pre diagnostické účely. V súčasnosti sa k identifikácii prokaryontov bežne používa sekvenovanie génov pre 16S rRNA, ale čoraz viac aj rMLST (angl. ribosomal multilocus sequence typing), pričom sa využíva porovnanie sekvencií génov kódujúcich ribozomálne proteíny. Stanovenie ribozomálnej multilokusovej sekvencie (rMLST) detekuje alely 53 génov kódujúcich bakteriálne ribozomálne proteínové podjednotky (gény rps). Rps lokusy sú ideálnym cieľom univerzálnej schémy charakterizácie, pretože sú:

- prítomné vo všetkých baktériách,
- uložené na chromozóme,
- kódujú proteíny, ktoré boli pri selekcii počas evolúcie vzhľadom na ich funkciu konzervované.

Rps lokusy vykazujú variabilitu, ktorá rozdeľuje baktérie do skupín na všetkých taxonomických úrovniach. Ich určenie umožňuje rýchlu a počítačmi sprostredkovateľnú identifikáciu fylogenetickéj úrovne akejkoľvek baktérie na úrovni domény, kmeňa, triedy, radu, čeľade, rodu, druhu a kmeňa. Využíva sa tak na identifikácia prokaryot, ako aj na porovnanie dvoch a viac genómov, pričom poskytuje kvalitnejšie výsledky ako sekvenovanie génov pre 16S rRNA. Vírusový genóm (najmä genóm RNA vírusov) je viac náchylný k vzniku náhodných mutácií, preto sa k ich štúdiu väčšinou používa celogenómové sekvenovanie. Sekvenovanie sa využíva aj v epidemiológii, a to pri genotypovaní patogénov a sledovanie ich šírenia. Celogenómové sekvenovanie má vysokú presnosť a dokáže identifikovať aj jednonukleotidové polymorfizmy, čím sa dá dosiahnuť rozlíšenie až na úroveň kmeňa. Týmto spôsobom je umožnené aj sledovanie ciest prenosu a zistiť pôvodný zdroj patogéna. Ďalšia aplikácia sekvenovania je štúdium rezistencie na antibiotiká a antivirotiká, escape mutantov (unikajúcich možnostiam bežnej virologickej diagnostiky, napr. VHB), faktorov virulencie (napr. tvorba biofilmu, produkcia toxínov atď.).

1.20.4.4 ANALÝZA FRAGMENTOV ENZÝMOVÉHO ŠTIEPENIA NK MIKROORGANIZMOV

Sú to metódy, ktoré jednak používajú enzýmové štiepenie NK špecifickými enzýmami (nukleázami) a následné rozdelenie vzniknutých fragmentov v gélovej elektroforéze (pozri subkapitolu 10, separácia NK). Veľkosť fragmentov závisí od počtu druhov použitých nukleáz – pri použití jedného alebo dvoch budú fragmenty veľké, pri vyššom počte sa bude veľkosť znižovať a počet zvyšovať. Vo vzniknutom elektroforetogramе sa po vizualizácii objavia typické vzory (**reštrikčný profil, fingerprint**), ktoré vytvorili štiepne fragmenty NK. Reštrikčný profil NK baktérii toho istého klonu bude pri rovnakom enzýmovom štiepení vždy identický, zatiaľ čo iné klony (napr. zmutovaný v mieste štiepenia) budú mať po štiepení tými istými enzýmami odlišný vzor usporiadania fragmentov. Tieto metódy sa používajú najmä na epidemiologické a taxonomické účely, napr. ob-



jasnenie výskytu nozokomiálnych, vysokorezistentných kmeňov baktérií. V minulosti sa využívali aj na celogenómové sekvenácie baktérií. Ďalšiu perspektívu týchto metód môže v budúcnosti ovplyvniť rozvoj spektrometrie (pozri subkap. 1.17) a sekvenácie, ktoré ich po zlacnení hardvéru (hmotnostných spektrometrov, sekvenátorov) a doplnení databáz dokážu reštrikčné metódy úplne nahradiť.

Polymorfizmus dĺžky reštrikčného fragmentu (RFLP)



Polymorfizmus (alebo variabilita) v nukleotidovej sekvencii je prítomný vo všetkých organizmoch, vrátane mikróbov. RFLP technika umožňuje napríklad sledovať zmeny básových párov v reštrikčných miestach, ktoré vznikajú v dôsledku mutácií. Reštrikčné enzýmy (RE) štiepia DNA na špecifických rozpoznávacích miestach, teda sekvenciách tvorených 4 – 8 pámi báz a vzniknuté fragmenty NK sú oddelené podľa molekulovej veľkosti pomocou gélovej elektroforézy. DNA na štiepenie a analýzu je získaná po kultivácii daného bakteriálneho kmeňa a hore uvedenými postupmi izolácie NK. Na detekciu fragmentov sa používa farbenie etídiumbromidom a iluminácia UV (260 nm), čo vedie k emisii viditeľného svetla, alebo po prenose na membránu (Southern blot) sa vizualizujú pomocou značených sond. Touto technikou môžu byť detegované rozdiely vznikajúce v dôsledku substitúcie báz, adícií, delcií alebo sekvenčných preskupení v rozpoznávacích sekvenciách RE, tak ako sa napr. sledovali zmeny v génome izolovaného kmeňa *M. tuberculosis*.

Prokaryotický gén pre 16S rRNA má dĺžku asi 1600 básových párov a celý ho možno amplifikovať univerzálnymi prímami pre koncové sekvencie, ohraničujúcich tieto gény. Použitím vhodnej reštrikčnej endonuklázy sa amplifikované gény štiepia na fragmenty rôznej dĺžky a v rozdielnom počte, v závislosti od bakteriálneho druhu či kmeňa. Jedným z variantov reštrikčnej analýzy je aj **ribotypizácia**. Pozostáva z enzymatického štiepenia chromozomálnej DNA a následnej Southern hybridizácie pomocou sond, ktoré sú komplementárne ku génom, kódujúcim konzervované domény sekvencií ribozomálnej RNA (16S rRNA alebo 23S rRNA). Keďže ribozomálne gény majú všetky baktérie, sledujú sa touto analýzou rozdiely a podobnosti v ich distribúcií v rámci rôznych kmeňov. Umožňuje diferenciáciu subtypov bakteriálnych izolátov na úrovni druhov a poddruhov, napr. genotypizáciu nozokomiálnych kmeňov *Clostridioides difficile*.

Gélová elektroforéza s pulzným poľom (PFGE)



Pri konvenčnej elektroforéze sa fragmenty NK pohybujú priamočiaro od katódy k anóde a rýchlosť ich pohybu je nepriamo úmerná ich veľkosti, preto sú najmenšie fragmenty najvzdialenejšie od štartu a najväčšie naopak. Tento pohyb v elektrickom poli platí pre fragmenty do veľkosti cca 50 kb. Väčšie fragmenty sa síce pohybujú všetky spolu rovnakou rýchlosťou, ale nerozdelia sa, lebo uviaznu v sieťovej štruktúre gélu. Preto sa na ich separáciu používa pulzná gélová elektroforéza, kde je gél vystavený elektrickému poľu, ktorý sa v pravidelných intervaloch mení pod určitým uhlom (90 – 180°). Na pohyb v novom smere sa molekuly DNA musia reorientovať. Pri väčších molekulách táto **reorientácia** trvá dlhšie ako pri menších fragmentoch, čo umožní ich vzájomnú separáciu.

Pri PFGE sa DNA mikroorganizmu získava inak, ako pri iných MG metódach. Najprv sa mikrobiálne bunky kultivujú do určenej hustoty suspenzie, ktorá sa zmieša s roztopenou agarózou a vyleje do bločku, kde stuhne. V agarózovom bločku sa pomocou enzýmov vykoná jednak lýza buniek, jednak ich deproteinizácia a očistenie od zvyškov (vrátane proteináz) a až následne sa DNA baktérií zachytená v bločku štiepi reštrikčnými endonukleázami. Bločky sú potom nanesené do gélu a vystavené pôsobeniu premenlivého elektrického poľa, ktoré sa mení alternatívne z rôznych uhlov. To spôsobí ešte výraznejšie oddelenie fragmentov DNA na základe ich veľkosti a oddelí od seba aj fragmenty, ktoré sa vzájomne líšia len o niekoľko báz.

Tie sa potom sa detegujú rôznymi metódami, napr. hmotnostnými štandardmi, metódou Southern blot a pod.

1.20.4.5 GENÓMOVÉ ČIPY – GENOMIC MICROARRAY

Princíp genotypových mikročipov

Genotypové mikročipy (NK čipy – DNA čipy a RNA čipy) sú súbory mikroskopických bodov nanesených na pevný povrch podobne, ako je to pri proteomických čipoch. Každý bod (spot) je tvorený plochou s imobilizovanými, synteticky vytvorenými génovými sondami, to znamená krátkymi špecifickými vláknami NK (oligonukleotidy) so známou sekvenciou nukleotidov. Sondy sú naviazané na pevný povrch (napr. na sklo s nylonovým filmom, silikónovú membránu). Sondy sa pripravujú buď pomocou PCR a potom sa nanášajú na pevný povrch (podobne ako pri PC tlačiarňi) alebo sa tvoria priamo na povrchu pomocou fotolitografie (podobne ako pri 3D tlačiarňi). Každá sonda predstavuje komplementárny úsek pre niektorú cieľovú sekvenciu, ktorú dokazujeme vo vzorke. Vzorku predstavujú špecifické úseky dokazovanej mikrobiálnej NK. Sú to buď amplifikáciou pomnožené produkty v PCR (amplikóny) alebo DNA vlákna získané prepisom mRNA z natívneho materiálu pomocou reverznej transkriptázy alebo DNA polymerázy. Princíp reakcie je rovnaký ako pri metódach Southern blot a reverznej hybridizácii (reverznej preto, lebo je fixovaná sonda – a nie dokazovaný úsek NK). Po naviazaní amplikónu na imobilizovanú sondu sa v ďalšom kroku použije druhá sonda, ktorá je značená fluorescenčne alebo chemiluminiscenčne (značka). Vzorku možno označiť aj priamo, bez druhej sondy. Buď sa označí pri prepise z mRNA pomocou reverznej transkriptázy, pričom sa značka (napr. fluorofór Cy3) zabuduje na začiatku novosyntetizovaného vlákna DNA alebo sa pri syntéze nového DNA vlákna pomocou DNA polymerázy na template natívnej mRNA použijú značené nukleotidy. V závislosti od zostavenia čipu možno použiť viac značiek s rozdielnymi fluorofórmami alebo chemiluminiscenčnými zdrojmi svetelného signálu, čo umožňuje napríklad odlíšenie prítomnosti alebo naopak, neprítomnosti génov porovnaním genotypov dvoch mikroorganizmov. Napríklad fluorofór Cy3 má emisné maximum pri 570 nm a emituje zelený signál, fluorofór Cy5 má emisné maximum pri 670 nm a emituje červený signál, preto sa spoty snímajú pomocou dvojkanálového skenera a pri vyhodnocovaní sa porovnáva pomer intenzít emisií Cy3/Cy5. Hustota spotov na mikročipe môže byť až jeden milión na cm². Preto je detekcia signálu možná len elektronicky, rovnako ako aj vyhodnotenie zosímaných signálov. Iným spôsobom využitia mikročipov je sekvenovanie DNA (pozri obr. 1.21.16), pričom je fluorescenčne označený fragment analyzovanej DNA hybridizovaný s DNA sondami na čipe, na ktorom sondy tvoria všetky kombinácie oligonukleotidov s konštantnou dĺžkou. Analýza pomocou genotypových čipov môže byť kvalitatívna (detekcia génov) alebo kvantitatívna (expresia génov). V súčasnosti narastá počet komerčných genotypových mikročipov, určených pre rýchlu klinickú diagnostiku, napr. pre diagnostiku pôvodcov invazívnych mykóz z krvi alebo simultánneho stanovenia faktorov virulencie a rezistencie *C. difficile*. Rovnako veľmi významné možnosti poskytujú biočipy pri zisťovaní prítomnosti a kontrole možnej mikrobiálnej kontaminácie pri riziku použitia biologických bojových prostriedkoch, resp. bioterorizmu. Používajú sa vo výskume na identifikáciu nových cieľových štruktúr pre dizajn liekov a určenie mechanizmu ich účinku a navrhovanie mikroskopickej detekcie patogénov. Umožňujú aj komplexnejšie analýzy, ako sú analýzy mikrobioty.

LITERATÚRA

- Šmarda J.J., Doškař R., Pantuček V., Ružičková A., Koptíková J.: Metody molekulární biologie. Brno: MU Brno, 2005. ISBN 80-210-3841-1.
- Zhen-Yu F., Xiao-Ran L., Dan-Ping M., Gen-Feng Z., Sheng-Yue W., Q Zhe-Xue A.: Could nested PCR be applicable for the study of

- microbial diversity? World journal of microbiology, 2009, 25(8): 1447-1452. ISSN 0959-3993
3. Liptáková A. et al.: Mikrobiologická diagnostika pôvodcov infekčných ochorení pre študentov medicíny. Bratislava: Univerzita Komenského, 2018.
 4. Deurenberg R.H., Bathoorn E., Chlebowicz M.A. et al.: Application of next generation sequencing in clinical microbiology and infection prevention. J Biotechnol, 2017, 10, 243: 16-24. doi: 10.1016/j.jbiotec.2016.12.022. Epub 2016 Dec 29.
 5. Valones M.A.A. et al.: Principles and applications of polymerase chain reaction in medical diagnostic fields: a review. Brazilian Journal of Microbiology, 2009, 40(1): 1-11. doi:10.1590/S1517-83822009000100001.
 6. Cobo F.: Application of Molecular Diagnostic Techniques for Viral Testing. The Open Virology Journal, 2012, 6:104-114. doi:10.2174/1874357901206010104.
 7. Behzadi P. et al.: Nucleic Acid-Based Approaches for Detection of Viral Hepatitis. Jundishapur Journal of Microbiology, 2015, 8(1): e17449. doi:10.5812/jjm.17449
 8. Speers DJ. Clinical Applications of Molecular Biology for Infectious Diseases. Clinical Biochemist Reviews, 2006, 27(1): 39-51.
 9. Tagini F., Greub G.: Bacterial genome sequencing in clinical microbiology: a pathogen-oriented review. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 2017, 36(11): 2007-2020. doi:10.1007/s10096-017-3024-6.
 10. Opota O., Croxatto A., Prod'homme G. et al.: Blood culture-based diagnosis of bacteraemia: state of the art. Clin Microbiol Infect, 2015, 21: 313-322. doi: 10.1016/j.cmi.2015.01.003
 11. Bertelli C. et al.: Rapid bacterial genome sequencing: methods and applications in clinical microbiology. Clinical Microbiology and Infection, 2015, 19(9): 803 - 813.
 12. Frickmann H. et al.: Fluorescence in situ hybridization (FISH) in the microbiological diagnostic routine laboratory: a review. Crit Rev Microbiol, 2017, 43:1.
 13. Eckert C., Holscher E., Petit A., Lalande V., Barbut F.: Molecular Test Based on Isothermal Helicase-Dependent Amplification for Detection of the Clostridium difficile Toxin A Gene. Journal of Clinical Microbiology, 2014, 52(7): 2386-2389. doi:10.1128/JCM.00353-14.
 14. Jolley K.A., Bliss C.M., Bennett J.S., Bratcher H.B., Brehony C., Colles F.M., Wimalaratna H., Harrison O.B., Sheppard S.K., Cody A.J., Maiden M.C.: Ribosomal multilocus sequence typing: universal characterization of bacteria from domain to strain. Microbiology, 2012, 158(Pt4):1005-1015. doi: 10.1099/mic.0.055459-0.
 15. Amy L. Leber, Kathy Everhart, Joan-Miquel Balada-Llasat et al., Multicenter Evaluation of BioFire FilmArray Meningitis/Encephalitis Panel for Detection of Bacteria, Viruses, and Yeast in Cerebrospinal Fluid Specimens, Journal of Clinical Microbiology Aug 2016, 54 (9) 2251-2261; DOI: 10.1128/JCM.00730-16



Imunologickými, resp. imunochemickými technikami v lekárskej mikrobiológii vykonávame priamu aj nepriamu diagnostiku. V rámci **priamej diagnostiky** vykonávame predovšetkým imunochemický dôkaz alebo kvantifikáciu špecifických mikrobiálnych antigénov v biologickom materiáli pomocou diagnostických protilátok, napr. prítomnosť voľných antigénov v klinickom materiáli. Na identifikáciu alebo sérotypizáciu izolovaného mikroorganizmu, resp. na detekciu mikrobiálnych antigénov v inom ako klinickom materiáli (produkcia bakteriálnych toxínov v kontaminovaných potravinách a pod.) sa používajú tiež špecifické diagnostické protilátky.

V rámci **nepriamej diagnostiky** infekčného ochorenia analyzujeme imunochemickými metódami jednak tvorbu špecifických protilátok (sérológické vyšetrenia) alebo špecifickú aktiváciu T lymfocytov (IGRA testy) ako následok kontaktu imunitného systému s mikróbami a ich antigénmi. Imunochemické metódy sa využívajú aj pri sledovaní priebehu infekcií na stanovenie reaktantov zápalu, ktoré odrážajú dynamiku mikrobiálnych ochorení, pričom viac či menej špecificky odlišujú bakteriálne, resp. vírusové infekcie a ostatné ochorenia spojené so zápalom.

1.21.1 Infekcia a protilátková odpoveď, sérológické vyšetrenia

Mikroorganizmy, ktoré vnikli do organizmu a navodili tak tvorbu protilátok, pozostávajú z komplexu antigénov. Každý antigén má viac epitopov, voči ktorým vznikajú špecifické protilátky. Preto sú sérové protilátky zmesou imunoglobulínov, namierených proti rôznym štruktúram buniek patogénu, napr. pri baktériách voči puzdrovým, telovým, bičkovým a v prípade rozkladu baktérií aj cytoplazmovým antigénom. Sú to teda **polyklonálne protilátky**. Ako prvé sa vytvárajú protilátky proti povrchovým antigénom mikroorganizmov, až po ich lýze sa imunitnému systému odhalia aj intracelulárne antigény a začne tvorba protilátok voči nim. Podobne sa tvoria protilátky aj proti imunogénnym antigénom uvoľňovaným baktériou, hubou alebo parazitom z ich metabolizmu do okolia (exotoxíny, enzýmy). Vírusy v ľudskom organizme môžu navodiť tvorbu protilátok buď proti antigénom na povrchu viriónu, alebo proti antigénom, ktorých syntéza bola navodená vírusom pri replikácii v infikovanej bunke a nachádzajúcich sa na cytoplazmatickej membráne hostiteľskej bunky. Pri lýze infikovanej hostiteľskej bunky sa navodí aj syntéza protilátok proti antigénom vírusu z cytoplazmy a v jadre (napr. EBNA antigén pri EBV infekcii). Krátkodobé, povrchové alebo lokálne ochorenia najčastejšie nevedú k dokázateľnej tvorbe protilátok, preto sa niektoré povrchové infekcie nedajú dokázať stanovením protilátok a vhodnejšie je buď kultivačné vyšetrenie alebo dôkaz antigénov vo výtere, výplachu alebo aspiráte (napr. dôkaz niektorých respiračných vírusov). Účinnú protilátkovú tvorbu vyvolávajú systémové infekcie s prienikom patogénov alebo ich antigénov (napr. toxínov) do krvi, lymfatických ciest a do likvoru. Vytvorené špecifické protilátky majú niekoľko imunitných funkcií – môžu byť **protektívne** (bránia množeniu patogénu a šíreniu infekcie), **neutralizačné** (bránia biologickým funkciám mikrobiálneho faktoru virulencie, napr. toxínu, alebo schopnosti vírusu infikovať bunku), **viazúce** a **aktivizujúce komplement** (len

triedy IgG a IgM), **opsonizujúce** a pod. Dôležitý je **diagnostický význam** vzniknutých protilátok, a to aj v prípade, že nemajú protektívny význam, napr. pri infekcii intracelulárnymi patogénmi (chlamýdie), pri syfilise alebo pri niektorých mykózach. Na druhej strane, najmä pri hypersenzitivite 1 – 3 typu môžu protilátky človeku aj škodiť **navodením imunopatologických stavov, spojených s infekciou** (reumatická horúčka, reaktívna artritída a pod.).

Pre protilátkovú odpoveď imunitného systému na infekciu je charakteristická postupnosť tvorby štyroch tried protilátok – **IgM, IgA, IgE a IgG**, ktoré sa dajú využiť diagnosticky na dôkaz a sledovanie priebehu ochorenia (pozri obr. 20.1). Pre mikrobiologickú diagnostiku je významné najmä to, že vo fáze primárnej protilátkovej odpovede sa tvoria ako prvé protilátky triedy IgM a IgA. Na začiatku infekcie sa začne aj tvorba IgE, ktorého dynamika, čiže vzostup alebo pokles hladiny protilátok v sére, však na rozdiel od ostatných tried imunoglobulínov menej koreluje s priebehom infekcie (okrem parazitóz). Po niekoľkých dňoch od začiatku tvorby IgM, IgA a IgE sa v krvi objavia aj nízkoavidné protilátky triedy IgG, ktoré postupne dosiahnu vyššie hladiny, ako sú hladiny ostatných tried imunoglobulínov a rovnako sa zvyšuje aj ich avidita ku komplementárnym antigénom. IgG protilátky pretrvávajú v cirkulácii rôzne dlhý čas (mesiace, roky, celý život), podľa druhu antigénu a stavu imunity. Naopak, tvorba IgM a IgA v ďalších fázach infekcie pomerne rýchlo klesá (väčšinou do jedného mesiaca). Prítomnosť a dynamika protilátok IgM, IgA a IgE tak pomáha pri väčšine prípadov určiť včasnú, aktívnu fázu infekcie. Interpretácia výsledkov stanovenia protilátok takisto zohľadňuje to, že sekundárna stimulácia tvorby protilátok, ktorá je vyvolaná opätovným kontaktom s mikrobiálnymi antigénmi, predstavuje omnoho rýchlejšiu a intenzívnejšiu tvorbu imunoglobulínov v triede IgG, a naopak, triedy protilátok IgM a IgA sa buď nevytvoria, alebo sa vytvoria v nižších hladinách ako pri primoinfekcii. Protilátky triedy IgD nemajú pri diagnostike infekcií význam. Protilátky tried IgG, IgM a IgA môžeme stanovovať nielen z krvi, resp. séra, ale aj z likvoru, očnej komorovej tekutiny, sklovca, slín, materského mlieka a iných telesných tekutín.

Purifikáciou polyklonálnych protilátok vytvorených v makroorganizme možno získať špecifické diagnostické séra (**polyklonálne antiséra**). Pomocou nich možno dokazovať komplementárne antigény, ktoré vyvolali ich tvorbu. Tvorba protilátok za účelom využitia v diagnostike sa vyvolá opakovaným očkovaním produkčných zvierat (králik, myš, morča, ovca a pod.) purifikovanými, resp. rekombinantnými antigénmi s adjuvansom. Protilátky zo séra takto hyperimunizovaných zvierat sa získavajú postupmi, opísanými v subkapitole 10 v časti o separácii bielkovín (afinitná chromatografia). Iným – dnes už klasickým – prístupom získania diagnostických sér je získavanie **monoklonálnych protilátok**, ktoré sú komplementárne voči jednému konkrétnemu epitopu, pomocou tzv. **hybridomových buniek**. Ide o bunky, ktoré vznikli chemicky navodenou **fúziou myelómových buniek a B lymfocytov, resp. plazmatických buniek (imortalizácia)** zo sleziny laboratórnych myši imunizovaných zvoleným antigénom. Myelómové bunky, ktoré sa používajú na získanie hybridómov, sú nádorové bunky a nepodliehajú tak apoptóze. Na rozdiel od plazmatických buniek sú deficitné pre enzým hypoxantín fosforibozyl transferázu. Zmes oboch bu-

niek sa kultivuje v selektívnom, tzv. **HAT** médiu (hypoxantín, aminopterín a tymidín). Enzymový deficit spôsobí, že nefúzo- vané myelómové bunky v tomto selektívnom médiu od- umrú. Nesfúzované plazmatické bunky po niekoľkých cykloch delenia *in vitro* uhynú v dôsledku apoptózy. V kultivačnom médiu sa nakoniec množia len hybridómy, ktoré jednak od my- elómových buniek získali „nesmrteľnosť“ (sú immortalizované), a jednak vďaka B-bunkovému prekursoru produkujú množstvo protilátok do média. Supernatant z média nad jednotlivými hybridómami sa potom testuje na výber hybridómovej línie s optimálnymi vlastnosťami protilátok. Takto získané hybridó- move línie sa inokulujú buď myšiam do peritoneálnej dutiny, kde vyvolajú tvorbu nádorov a ascitesu s príslušnými monoklo- nálnymi protilátkami, alebo sú pestované ako planktonická tka- nivová kultúra, uvoľňujúca do prostredia monoklonálne proti- látky. Monoklonálne protilátky sa potom získavajú buď z ascitu (*in vivo*), alebo z média, v ktorom sa kultivujú hybridómy (*in vitro*). Najnovšie rekombinantné biotechnológie na výrobu mo- noklonálnych protilátok už nepoužívajú metódu hybridómov, ale produkciu fragmentov, resp. celých molekúl protilátok, zís- kaných pomocou fágov a permissívnych baktérií (napr. *E. coli*) metódou **fágového displeja** a **proteínovej knižnice**. Ide o tech- nológiu výroby monoklonálnych protilátok, využiteľných v diagnostike, ale predovšetkým v terapii (biomodulácia, biote- rapia). Za jej objav bola udelená Nobelova cena za chémiu pre rok 2018. Jej princíp spočíva v rekombinácii neúplnej fágovej DNA s úsekmi cDNA (transkriptovanej z mRNA plazmatických buniek, kódujúcej refazce protilátok s rozličnou afinitou). Tieto úseky sú ligované do vhodného čítacieho rámca fágovej DNA, čím vznikne tzv. „fagemid“. Ten sa vpraví do bunky permissívnej baktérie. Následne sa táto infikuje pomocným fágom, ktorý vy- volá tvorbu kompletných fágov v baktérii s funkčnými integro- vanými génmi pre protilátky a exprimovanými protilátkami (proteínmi) na svojom povrchu (fágový displej). Na purifikova- ný antigén s cieľovými epitopmi, naviazaný na pevnú fázu, sa aplikujeme zmes **rekombinatných fágov**. Tým, že sa protilátky na povrchu fága viažu na konkrétny komplementárny epitop, dokážeme po inkubácii a premytí vyloviť z veľkého množstva rekombinovaných fágov s génmi pre protilátky s rozdielnou afi- nitou (fágový koktail, tzv. proteínové, resp. protilátkové kniž- nice) ten fág, ktorý kóduje hľadanú protilátku voči tomuto epito- pu. Po premytí zostanú na imobilizovaný antigén naviazané len fágy s protilátkami komplementárnymi voči zvolenému epito- pu. Proces premývania roztokmi určitej iónovej sily sa musí niekoľko krát opakovať tak, aby na konci zostali naviazané už len fágy s protilátkami s najvyššou afinitou voči zvolenému an- tigénu na svojom povrchu. Z týchto fágov sa získa DNA, ktorá sa osekvenuje (identifikujú sa presne sekvencie, ktoré kóduje nami hľadanú protilátku) a následne sa použije na produkciu tejto protilátky pomocou fágov a baktérií. Je potrebné podot- knúť, že takto možno získať takmer akýkoľvek proteín, nielen protilátky, čo otvára obrovský potenciál tak v diagnostike, ale aj v liečbe celej palety ochorení.

Purifikácia monoklonálnych protilátok je jednoduchšia ako polyklonálnych. Využitie oboch typov protilátok (poly- a mo- noklonálnych) sa čiastočne líši, napr. na aglutinačné a precipi- tačné reakcie sú vhodné polyklonálne antiséra, pre časť imuno- analýz zase viac monoklonálne protilátky. Niekedy dochádza ku nespecifickým väzbám diagnostických IgG protilátok na an- tigény cez ich Fc fragment, preto sa tento odstraňuje odštiepe- ním pomocou enzýmu pepsínu a následnou purifikáciou. Takto upravené F(ab) fragmenty sa po naviazaní na signálne značky (enzýmy, fluorofór a iné) používajú ako konjugáty v imunoana- lýzach.

Imunochemické reakcie, ktoré sa využívajú na mikrobiolo- gickú diagnostiku, sa konvenčne nazývajú **sérologické metódy**, nakoľko v medicíne sa pôvodne začali využívať na dôkaz urči- tých zložiek v krvnom sére. **Sérologickými metódami** možno dokazovať, resp. kvantifikovať **tak mikrobiálne antigény, ako aj špecifické antimikrobiálne protilátky** (priamy aj nepriamy

dôkaz). V rámci nepriamej diagnostiky okrem špecifických pro- tilátok sa dajú analyzovať aj **reaktanty zápalu, iné markery infekcií** a špecificky aktivované lymfocyty, ktoré vznikajú alebo proliferujú v makroorganizme ako reakcia na infekciu. V klinic-kej mikrobiológii sa sérologické vyšetrenia využívajú najmä v prípadoch, kedy sa konkrétny patogén nedá kultivovať v pod- mienkach klinických laboratórií (napr. pôvodcovia syfilisu, ví- rusových hepatitíd A až E a pod.), patogén je vysoko virulentný (napr. pri riketsiózach), kultivačné techniky nie sú bežne do- stupné (napr. HIV alebo EBV) alebo kultivačné techniky sú zdĺ- havé a náročné (napr. respiračné mykoplazmy a chlamýdie). Dôkaz mikrobiálnych antigénov v krvi, resp. inom biologickom materiáli od chorých potvrdzuje aktuálnu prítomnosť mikrobi- álnych antigénov v organizme, ale nedávajú informácie o vita- lite a niektorých iných vlastnostiach príslušných mikroorganiz- mov. Preto, najmä pri bakteriálnych a fungálnych patogénoch, môžu poskytnúť čiastkový rýchly výsledok pre skoré nasadenie iniciálnej liečby, ale nemôžu nahradiť priame, teda kultivačné, resp. molekulárno – genetické vyšetrenie. **Stanovenie špecifi- kých protilátok (nepriamy dôkaz) dokazuje možnú, ale nie istú prítomnosť daného mikróba v organizme vyšetrovanej osoby**, nemusí znamenať infekciu, ale len tvorbu protilátok. Ich nález vo vzťahu k novej infekcii si vyžaduje expertnú inter- pretáciu laboratórneho výsledku pre ošetrojúceho lekára a sami o sebe nepredstavujú diagnózu infekcie. Výnimka je skonfirmo- vaný dôkaz anti HIV protilátok.

Ako príklad sérologického vyšetrenia za účelom **priamej diagnostiky je dôkaz celulózných a extracelulárnych mikro- biálnych produktov** (napr. pneumokokový antigén, stafyloko- vý toxín, kandidový manán, povrchový antigén HB vírusu) po- mocou špecifických protilátok, alebo bližšia charakterizácia už izolovaných a druhovo identifikovaných patogénov (napr. na určenie sérotypu druhov enterobaktérií (*Salmonella enterica*, *E. coli*, šigel), vibrií, pneumokokov, meningokokov a iných, ale aj vírusov a ďalších taxónov, čiže **sérotypizácia**).

Reaktanty zápalu (napr. C – reaktívny proteín) a iné markery infekcií, ktoré okrem protilátok vytvára telo človeka ako **hu- morálnu odpoveď na infekciu**, napr. prokalcitonín, neopterín, presepsín, s – TREM-1 (rozpuštný spúšťač receptor na myelo- idných bunkách), niektoré cytokíny a pod., sa tiež vyšetrujú sérologickými metódami. Hoci nie sú vytvárané vždy len vý- hradne v spojitosti s infekciou (reaktanty zápalu sú prítomné v sére aj pri iných zápalových ochoreniach, napr. autoimunit- ných procesoch) a nie sú špecificky vytvorené len pri konkré- nej infekcii, sú veľkým prínosom pre diagnostiku a liečbu mik-robiálnych infekcií. Jednorazové stanovenie hladiny napr. CRP alebo neopterínu napomáha odlíšiť napr. bakteriálnu a vírusovú infekciu. Opakované (sériové) stanovenie týchto markerov na- pomáha určiť dynamiku mnohých mikrobiálnych ochorení, lebo odráža priebeh a závažnosť infekcie (v zmysle progresie od kolonizácie → lokalizovanej infekcie → systémovej infekcie, resp. SIRS → sepsa). Sú do určitej miery aj prognostickými znakmi možného vyústenia ochorenia (rekonvalescencia, chro- nický priebeh, progresia, reaktivácia) a sú aj indikátory správ- nosti zvolenej antimikrobiálnej liečby. Preto je ich stanovenie pri infekciách integrálnou súčasťou mikrobiologickej diagnosti- ky. Počet humorálnych faktorov, ktoré sú využívané pre diag- nostiku a sledovanie liečby infekcií, rastie z roka na rok. Na- príklad nový marker na diagnostiku a monitorovanie neuroboréliózy je chemokín atrahujúci B-lymfocyty (BCA, resp. BCL-1, translačný produkt CXCL13 génu, ktorý atrahuje B-lym- focyty a naviguje ich do miesta infekcie) má zvýšenú hodnotu v likvore pri pacientoch s lymskou boreliózou postihujúcou CNS, najmä v jej skorých štádiách, často už pred začatím intra- tekálnej tvorby anti-boréliových protilátok. Tento nárast hladiny je významný – je 100 až 1000-krát vyšší ako pri kontrolnej sku- pine neinfikovaných osôb. Pri účinnej liečbe jeho koncentrácia v likvore klesá v priebehu niekoľkých týždňov. BCA hladiny v likvore sú ale rovnako vysoké pri niektorých iných ochore- niach, napr. lymfómoch v CNS, tuberkulóze meningov alebo

neurosyfilise a táto nešpecifická musí byť pri interpretácii pozitívneho výsledku jeho stanovenia zohľadnená komplexne v súvislosti s výsledkami ostatných klinických, laboratórnych a fyzikálnych vyšetrení. Jeho výhoda je teda dobrá dynamika, ktorá koreluje s rozvojom neuroinfekcie a účinnosťou liečby (lepšie ako pri sledovaní terapeutického výsledku pomocou špecifických protilátok, kde to nie je vždy možné, lebo úprava protilátkového indexu do referenčného rozmedzia po účinnej ATB terapii je omnoho pomalšie, často aj niekoľko rokov) a jeho nevýhodou spomínaná nešpecifická. Tieto dva aspekty sérologickej diagnostiky všetkých humorálnych faktorov infekcií platia univerzálne.

Popri využití sérologických metód na klinickú diagnostiku ochorenia pacientov sa v rámci lekárskej mikrobiológie vykonávajú vyšetrenia z preventívnych a epidemiologických dôvodov, napr. za účelom vytvorenia imunologických prehľadov a na vytváranie stratégií očkovania.

1.21.2 Sérologický dôkaz pri diagnostike ochorenia – indikácie

Vyšetrenie na dôkaz mikrobiálnych antigénov a špecifických protilátok (či v zmysle stanovenia ich prítomnosti alebo určenie ich množstva a avidity) patrí medzi indikované mikrobiologické laboratórne vyšetrenia, lebo musí byť vykonané v rámci aktuálnych uzákonených a/alebo *lege artis* definovaných diagnostických algoritmov, certifikovanými diagnostickými systémami a najmä interpretované špecialistom. Pri **indikácii** a **interpretácii výsledkov** mikrobiologického, *nota bene* sérologického vyšetrenia, sa musí brať do úvahy:

- **druhovú charakteristiku** suspektného infekčného agens,
- **patogenézu** daného infekčného ochorenia,
- **individuálny fyziologický stav** (napr. gravidita),
- **vek a imunologická reaktivita** vyšetrovanej osoby,
- **komorbiditu,**
- **údaje o aktuálnej terapii** (napr. o antibiotickej, antivirovej, imunomodulačnej, radiačnej alebo chemoterapii, o hemoterapii, resp. o podaní hyperimúnných imunoglobulínov, transplantácii),
- **údaje o dobe trvania** infekčného ochorenia,
- **epidemiologické súvislosti** (napr. cestovateľská, profesijná, sociálna alebo behaviorálna anamnéza) a **informácie o očkovaní,**
- **vhodný výber biologického materiálu a spôsob odberu,**
- **vhodný výber a rôznorodé charakteristiky použitých mikrobiologických metódik, vrátane ich nadväznosti na iné laboratórne metodiky, resp. ďalšie nelaboratórne vyšetrenia.**

Ak by sa tieto zásady porušili, napr. vyšetrením vzorky v inak profilovanom laboratórnom pracovisku (biochémia, imunológia a pod.), hoci s podobnou a dokonca modernejšou prístrojovou technológiou (napr. novšia generácia multifunkčných automatizovaných imunoanalýzátorov), bez mikrobiologickej erudície personálu hrozí riziko, že klinik môže výsledok analýz interpretovať chybné. Lekárovi a pacientovi nestačí len sériová produkcia laboratórnych výsledkov polyfunkčným automatom, potrebujú ich individualizovanú interpretáciu. Pozitívny nález protilátok sa môžu interpretovať v zmysle, že potvrdzuje práve prebiehajúcu infekciu a naopak – že ju vylučuje. Zjednodušeným príkladom potreby mikrobiologickej interpretácie je vyšetrenie špecifických protilátok u tehotných v rámci prenatálneho skríningu alebo po kontakte s infikovanou osobou (rubeola, CMV), či kontaktom so zvieratom, zeminou, resp. konzumáciou tepelne neupraveného mäsa (toxoplazma). Ak sa laboratórnym vyšetrením (napr. pomocou komplement viažucej reakcie) v krvi ženy v prvom trimestri tehotenstva dokázu vyššie titre protilátok proti niektorému z uvedených patogénov a sérologickou analýzou sa ďalej potvrdia vyššie hladiny špecifických IgG protilátok s vysokou aviditou, je vysoko pravdepodobné, že žena

je imúnna a jej plod je chránený, a to aj napriek prípadnej prítomnosti mikróba v jej organizme (napr. CMV, *Toxoplasma gondii* a pod.), resp. aj napriek prítomnosti špecifických IgM v jej krvi. Množstvo situácií v rámci laboratórnej diagnostiky infekčných ochorení je veľmi pestré a vyžadujú si dlhoročnú expertnú prax. Laboratórne výsledky musia byť interpretované mikrobiológom, ktorý ich vie zároveň skonzultovať s klinikom tak, aby sa zabránilo diagnostickým omylom. Výnimkou z nevyhnutnosti interpretácie vyšetrení mikrobiológom je sérologické vyšetrenie darcov krvi, kedy mikrobiologické vyšetrenie slúži špecifickému účelu – skríningu markerov pôvodcov závažných infekčných ochorení v krvi darcov tak, aby sa eliminovalo, resp. znížilo riziko podať pacientovi kontaminovanú krv. Tu platí, že prípadný pozitívny sérologický nález (ale aj molekulárno-genetický, napr. HIV RNA) pri vyšetrovaní vzorky darcu je ultimátom pre hematológa-transfuziológa na vyrazenie kontaminovanej krvi z použitia, respektíve vylúčiť suspektné infikovaného darcu z darcovstva. Čo sa však týka následného riešenia pozitívneho výsledku mikrobiologického skríningu vzorky samotného darcu, je ďalší postup (konfirmácia a prípadné celkové laboratórne doriešenie nálezu) výlučne kompetenciou špecialistu, teda mikrobiológa. Sú aj iné prípady terénnej mikrobiologickej diagnostiky, ktoré môže vykonať terénny pracovník v rizikovej komunite s obtiažnou spoluprácou (napr. intravenózní narkomani) alebo ošetrojúci lekár v ambulancii bez nutnosti asistencie mikrobiológa. Ide o **rýchle testy**, ktoré majú jednoduchý užívateľský formát (napr. plastové imunochromatografické kazety alebo malé stolové jednodúčelové imunochémické analyzátor alebo MG). Môže to byť buď priamy dôkaz humánneho patogéna vo vzorke, ktorý umožňuje zväčša jednoduchú interpretáciu pozitívneho výsledku (napr. antigény *S. pyogenes*, *C. trachomatis*, vírusu chrípky), alebo rýchle stanovenie reaktantu zápalu (CRP), resp. niekedy aj dôkaz protilátok (napr. antiHIV v slinách). Niektoré sa tak môžu používať nielen ako terénne skriningové testy, ale aj ako „Point-of-care testy“ (POCT) alebo „bedside testy“, ktoré sú definované ako lekárske diagnostické testovanie na mieste starostlivosti alebo v jeho blízkosti – to znamená v čase a mieste bezprostrednej starostlivosti o pacienta (ambulancie, nemocničné oddelenia a pod.). Takéto testovanie má len orientačný charakter s cieľom začať cieľnú liečbu bezprostredne po vyšetrení pacienta s tým, že vo väčšine prípadov si vyžadujú následnú komplexnú diagnostiku v mikrobiologickom laboratóriu. Treba zároveň uviesť, že na Slovensku zatiaľ zdravotné poisťovne nie sú takej diagnostike naklonené (nie sú uhrádzané z verejného zdravotného poistenia), s výnimkou stanovenia CRP v ambulanciách pediatrov.

Sérologické vyšetrenia na dôkaz prítomnosti špecifických protilátok (anti HIV, anti HBc, anti HCV, protilátky tried IgG a IgM proti HSV, CMV, VZV a EBV, špecifické a nešpecifické antitreponémové protilátky, protilátky tried IgG a IgM proti *Toxoplasma gondii*, resp. aj anti HTLV, JC a BK a iné) **sú vhodné na predtransplantačný mikrobiologický skríning** tak darcu, ako aj príjemcu (získovanie ich imunostatusu a tomu zodpovedajúcu vzájomnú kompatibilitu), **nie sú ale väčšinou vhodné na potransplantačný monitoring príjemcu.**

DÔKAZ MIKROBIÁLNYCH ANTIGÉNOV PRI DIAGNOSTIKE PŮVODCOV INFEKCIÍ V KLINICKOM MATERIÁLI A JEHO INTERPRETÁCIA

Dôkaz špecifických mikrobiálnych antigénov patrí spolu s mikroskopiou, kultiváciou a s dôkazom ďalších mikrobiálnych molekulárnych zložiek, ako sú proteínové spektrá pomocou MALDI TOF a špecifických sekvencií mikrobiálnych nukleových kyselín, napr. pomocou hybridizačných sond alebo polymérazovej reťazovej reakcie (PCR), k metódam priameho dôkazu infekčného agens. Dôkaz mikrobiálnych antigénov sa najčastejšie využíva pri laboratórnej diagnostike vírusových infekcií z krvného séra (antigény HBV, HCV a HIV). Je možný aj z bielych krviniek (z tzv. buffy coat), napr. pri sledovaní antigenémie (hladina antigénu pp65 CMV) v rámci monitoringu aktivity cytomegaloví-

rusu u transplantovaných pacientov. V krvi sa dá urobiť aj terénne testovanie na prítomnosť parazitárnych antigénov, napr. špecifických antigénov plazmódii pri podozrení na maláriu. Stanovenia mikrobiálnych antigénov je možné aj v inom biologickom materiáli, napr. v likvore, vo výteroch, v moči, stolici, slzách a pod. Najčastejšie mikrobiologické vyšetrenia na dôkaz antigénov mikróbov v klinickom materiáli sú uvedené v tab. 1.21.1.

Tab. 1.21.1. Dôkaz antigénov mikrobiálnych pôvodcov ochorení v klinickom materiáli – príklady.

Mikrobiálni pôvodcovia	Materiál a ochorenie	Metóda
<i>Streptococcus pyogenes</i>	výter z krku pri tonziloaryngitíde (napr. v rámci ambulantných vyšetrení), t. č. sa u nás nevykonáva	ICH
<i>Streptococcus agalactiae</i>	výter z vagíny	ICH
vírusy chrípky A alebo B	výter z nosa alebo krku pri respiračných infektoch	
HBsAg, HBeAg, HBcAg HCVcAg (core antigén) HIV p24 CMV pp65 a iné	sérum	ELISA i IA
Respiračné vírusy – respiračný syncytiálny vírus, adenovírusy z respiračného traktu a očí	zo slz pri epidemickej keratokonjunktivitíde alebo z výterov horných dýchacích ciest pri respiračných infektoch pre všetky uvedené vírusy	ICH
pneumokoky, <i>Legionella pneumophila</i>	v moči pri pneumóniach	ICH
<i>Aspergillus</i> spp., <i>C. neoformans</i> , <i>Candida</i> spp. <i>Pneumocystis jirovecii</i>	BAL krv	ELISA, LA IF
<i>Chlamydia trachomatis</i>	vo vzorkách z urogenitálneho traktu alebo vo výtere z konjunktív (napr. pri novorodencoch)	IF
pôvodcovia hnisavých meningítid (<i>Streptococcus agalactiae</i> , <i>H. influenzae</i> typ b, <i>S. pneumoniae</i> , <i>N. meningitidis</i> skup. A, C, Y, W135, <i>N. meningitidis</i> sk. B, <i>E. coli</i> K1, <i>Cryptococcus neoformans</i>)	v likvore	RPLA
rotavírusy, norovírusy a adenovírusy pri gastroenteritídach	stolica*	ICH
<i>Clostridioides difficile</i> (antigén alebo toxíny A a B)	v stolici pri hnačke *	ICH
<i>Helicobacter pylori</i>	v stolici*	ICH
<i>Cryptosporidium</i> spp., <i>Entamoeba histolytica</i> , <i>Giardia intestinalis</i>	koproantigén zo stolice*	ELISA
Enterohemoragické <i>E. coli</i> EHEC	Shiga toxín v stolici	ELISA, RPLA

Vysvetlivky: * nie tampón rektu, ICH – imunochromatografia, ELISA – enzýmová imunoanalýza, IA – iná imunoanalýza, LA – latexová aglutinácia, RPLA – nepriama spätná latexová aglutinácia, IF – imunofluorescencia.

Dôkaz mikrobiálnych antigénov v klinických vzorkách patrí väčšinou medzi rýchlu diagnostiku (tzv. rapid test). Imunochemické metódy, ktorými dokazujeme antigén v biologických vzorkách sú rôzne – precipitácia v géli, latexová aglutinácia,

ELISA, IF a imunochromatografia. Na rozdiel od hore uvedeních bed side a terénnych testov, pri laboratórnej diagnostike niektorých antigénov je interpretácia výsledkov testov náročná, napr. pri dôkaze **antigénov mikromýcét – galaktomananu**, resp. **mananu** (*Aspergillus* spp., *Candida* spp.), prípadne **1,3 β -glukánu** (panfungálny antigén) cirkulujúcich v krvi rámci sledovania invazívnych mykóz u imunokompromitovaných pacientov. Diagnostickým problémom tu môže byť odlíšenie bezvýznamnej mykoantigenémie (antigény pochádzajúce z mikrobioty pacienta; z antibiotík podaných pacientovi, ktoré boli vyprodukované kultúrami vlákňitých húb) od invazívnej infekcie. Pri systémových mykózach a negatívnom výsledku testu na prítomnosť mykoantigénu v sére môže byť naopak príčinou aj nepravidelné uvoľňovanie mykotického antigénu do cirkulácie a jeho rýchla eliminácia retikuloendotelovým systémom. Tu možno riešiť problém sériovými odbermi krvi a tým zvýšiť pravdepodobnosť získať vzorku séra s antigénom (podobne ako pri hemokultúrach). Dôkaz antigénu v klinickom materiáli sa začal používať aj mykobakteriologickú diagnostiku, napr. v posledných rokoch sa využíva imunochromatografický test na dôkaz proteínu MPT 64, ktorého produkcia je špecifická pre druh *M. tuberculosis* komplexu.

Prítomnosť antigénov (vrátane toxínov a enzýmov špecifických pre daný patogén) svedčí pre to, že príslušný mikrób je v odobratom materiáli a to buď živý, devitalizovaný alebo rozpadnutý a s vysokou pravdepodobnosťou zodpovedá za klinické príznaky, kvôli ktorým chorého vyšetrujeme. Negatívny výsledok testu na dôkaz prítomnosti antigénu však nemusí vždy znamenať, že infekčný agens sa v organizme nenachádza, resp. nevyvoláva aktuálne symptómy ochorenia. Jeho antigén môže byť prítomný v imunokomplexoch, môže byť vo veľmi nízkej hladine mimo detekčného limitu danej diagnostickej metódy alebo ide o pozmenený antigén zmutovaného kmeňa (napr. tzv. escape mutanty VHB) a tak nie je obvyklými metódami diagnosticky detegovateľný.

Pri chronickej VHB navyše vďaka mutáciám počas chronického priebehu infekcie alebo z iných dôvodov (imunitný tlak, pôsobenie antivirov) môže daný kmeň vírusu prestať tvoriť antigén. Príčinou sú predovšetkým spontánne mutácie v dôsledku nízkej reparačnej schopnosti polymerázy vírusu hepatitídy B. Tie sa prejavujú najčastejšie v oblasti precore a core promotora. Frekvencia mutácií precore a core promotorov sa líšia v závislosti od genotypu HBV. Najčastejšie sa vyskytujúca mutácia v precore (G1896A) vedie k vytvoreniu stop kodónu a to potom vedie k strate HBeAg pri takto zmutovaných kmeňoch VHB s genotypom D. Takto podmienená HBeAg negatívna VHB vedie nielen ku problémom v jej diagnostike, ale predovšetkým zhoršuje priebeh ochorenia.

V posledných rokoch sa vďaka pokroku v diagnostike využitie stanovenia mikrobiálnych antigénov posunulo ďalej, ako bol len **priamy dôkaz patogénov** kvalitatívnymi metódami (kvalitatívna ELISA, imunochromatografia a pod). Ich **kvantitatívnym stanovením sa zdokonalilo sledovanie progresie alebo stratifikácie ochorenia a lepšie menežment terapie** (na rozhodnutie o jej začatí, pokračovaní alebo ukončení). Príkladom je HBsAg pri vírusovej hepatitíde typu B. Jeho kvalitatívne stanovenie po desaťročia slúžilo len na odhalenie infekcie. Po zavedení terapie chronickej HBV modernými antivirovými liekmi sa zistilo, že kvantitatívne stanovenie HBsAg spolu s kvantitatívnym stanovením HBV-DNA (resp. aj HBV-RNA) umožňuje zásadným spôsobom menežovať jej liečbu. Bol objavený aj nový marker chronickej HBV infekcie, HBcAg, ktorý sa dá stanoviť kvantitatívne v sére. Jeho dynamika v krvi koreluje významne s množstvom intrahepatálnej HBV cccDNA a tým sa HBcAg stal potenciálnym alternatívnym markerom cccDNA (ktorá sa dá získať len biopsiou pečene). Je užitočným markerom na monitorovanie ochorenia, prognostickým markerom odpovede na liečbu a progresie ochorenia chronickej hepatitídy B aj v prípadoch, kedy množstvo HBV-DNA v sére poklesne pod detegovateľné množstvo. Podobným príkladom klinického využitia

kvantitatívneho stanovenia vírusového antigénu je aj spomínané stanovenie antigenémie pri CMV infekcii pri transplantovaných pacientoch, nakoľko jej zvýšenie v periférnej krvi predchádza klinickým príznakom a umožňuje predísť závažným komplikáciám.

SÉROLOGICKÁ IDENTIFIKÁCIA IZOLOVANÝCH MIKROORGANIZMOV URČENÍM ICH ANTIGÉNOVEJ SKLADBY. SÉROLOGICKÉ DŮKAZY FAKTOROV VIRULENCIE A ATB REZISTENCIE

Dôkaz antigénov v inom ako klinickom materiáli sa používa aj na identifikáciu izolovaného mikroorganizmu, na bližšiu charakteristiku druhovo identifikovaného kmeňa mikroorganizmu alebo pri potrebe určiť jeho virulenciu. Pre identifikáciu sa používa sérotypizácia, ktorá sa väčšinou vykonáva ako nadstavbová diagnostika buď na špecializovaných pracoviskách, alebo v referenčných laboratóriách v rámci zdravotníctva a na niektorých pracoviskách iných rezortov (napr. veterinárnej a potravinovej inšpekcie). Výsledky ich sérologických analýz často slúžia najmä pre preventívne protiepidemické opatrenia (pri salmonelózach, pneumokokových infekciách, poliomyelitíde), vrátane prípravy očkovacích látok (chrípka). Vykonávajú aj bližšie určenie patogénneho potenciálu izolovaných kmeňov, predovšetkým tvorba bakteriálnych toxínov (*S. aureus*, *C. difteriae* a pod.).

Sérologickými metódami na dôkaz antigénov (latexová aglutinácia, imunochromatografia, ELISA) sa dajú dokázať aj niektoré molekulárne markery rezistencie na antibiotiká.

V súčasnosti je sérologický dôkaz markerov virulencie a rezistencie na antibiotiká postupne nahrádzaný molekulárno-genetickými metódami, založenými na dôkaze špecifickej sekvencie nukleových kyselín.

Sérotypizácia

Určením sérotypu alebo sérovaru sa zisťuje antigénová premenlivosť v rámci druhov a poddruhov baktérií alebo vírusov, ktorú možno identifikovať sérologickými metódami. Sérotyp je taxonomické zaradenie izolovaného kmeňa v podrobnejšej klasifikácii baktérií a vírusov na molekulárnej úrovni, ktoré je podmienené rozličnou skladbou antigénov na ich povrchu. Sérotypizácia patrí medzi priame mikrobiologické diagnostické metódy. Najčastejšie nasleduje po izolácii a biochemickej identifikácii bakteriálneho druhu, nakoľko väčšinou si vyžaduje čistú kultúru. Sérotypizácia sa využíva tam, kde bežné morfológické, kultivačné a biochemické diagnostické postupy neumožňujú dostatočne charakterizovať najmä klinicky a epidemiologicky významné kmene. Identifikujú sa ňou baktérie buď na druhovú úroveň (napríklad *Streptococcus pyogenes*, *S. agalactiae* a iných druhov β -hemolytických streptokokov, *Salmonella enterica*), alebo na poddruhovú úroveň – ako sú séroskupiny, napr. sérotypizácia rodu *Shigella* spp. na séroskupiny A-D, resp. druhy (A – *Shigella dysenteriae*, B – *Shigella flexneri*, C – *Shigella boydii* a D – *Shigella sonnei*) a na sérotypy (napríklad salmonely a enterovirulentné *E.coli*, shigely, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Vibrio cholerae* a *Campylobacter jejuni*). Sérotypizácia sa používa aj pri patogénoch ako sú *Legionella pneumophila*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* alebo *Clostridium perfringens*.

Podstatou sérotypizácie je imunochemická reakcia medzi protilátkami (so známou antigénnou komplementaritou), obsiahnutých v špecifických diagnostických antiséroch, a antigénmi identifikovanej baktérie. Ako antigénny komplex sa používa suspenzia baktérií z izolovaného kmeňa (napr. *E. coli*), alebo ich antigénny extrakt (druhy β -hemolytických streptokokov). Ak je pri danom bakteriálnom druhu známy veľký počet sérotypov (napr. v prípade *Salmonella enterica* je ich asi 2500), vyšetřované vzorky sa najprv testujú sadami polyspecifických antisér, ktoré obsahujú zmes viacerých protilátok proti jednotlivým antigénovým typom

daného druhu baktérie. Ak je výsledok reakcie pozitívny s niektorým z polyspecifických antisér, baktérie sa aglutinujú s jednotlivými monospecifickými antiséroami, ktoré tvorili zmes protilátok v pozitívne reagujúcom polyspecifickom antiséro.

Voľba sérologickej techniky a príprava testovanej baktérie závisí od charakteru vyšetřovaného antigénu a jeho uloženia v bakteriálnej bunke. V mikrobiologickej diagnostickej praxi sa najčastejšie sérotypizujú baktérie pomocou skľíčkovej aglutinácie (somatické a bičíkové antigény salmonel, shigel, *E.coli*, atď.), ale k dispozícii sú aj komerčné testy založené na princípe latexovej aglutinácie (napr. polysacharidové skupinové antigény streptokokov, puzdrové antigény *S. pneumoniae*). Menej často sa používa precipitácia (pôvodná reakcia použitá na sérotypizáciu streptokokov Lancefieldovou), imunodifúzia a imuno fluorescencia.

Neufeldova reakcia

Neufeldova reakcia („napučiavanie puzdra“, v nemeckom jazyku qellung) sa používa pri sérotypizácii baktérií na základe ich puzdrového antigénu (*N. meningitidis*, *H. influenzae*, *S. pneumoniae*), kde naviazanie špecifických protilátok vyvolá zmenu optické hustoty okolo baktérií komplementárneho sérotypu, pozorovanej zmenou lomu svetla pod mikroskopom (tzv. halo efekt).

Sérotypizácia vírusov (vírusy chrípky, enterovírusy, adenovírusy, parvovírusy a pod.) sa robí klasickými virologickými metódami (napr. hemaglutinačno-inhibičný test pri chrípke, vírus-neutralizačný test pri arbovirózach) a inými sérologickými metódami (ELISA, imuno fluorescencia a pod.).

Sérologické dôkazy bakteriálnych toxínov (faktorov virulencie)

Na dôkaz produkcie toxínov niektorým druhom baktérie nie je vždy potrebná jeho čistá kultúra, možno ich dokázať aj v inom ako klinickom materiáli (potravinách, nápojoch a pod.). Toxín sa dokáže priamo v homogenizovanej vzorke potravinu alebo v nápoji citlivou imunochemickou metódou (napr. ELISA). Medzi faktory, ktoré sa laboratórne testujú pri určitých už izolovaných a identifikovaných sérotypoch baktérií, napr. na *E. coli*, sérotyp O 157 : H7(EHEC) sú Shiga like toxíny 1 a 2. Pri kmeňoch ETEC sa dokazujú labilné enterotoxíny (LT) a tepelne stabilné enterotoxíny (ST). *E. coli*. Pri alimentárnych enterotoxikózach sa vykonáva sérologická detekcia enterotoxínov *Bacillus cereus*, enterotoxínov A až D produkovaných toxikogénnymi kmeňmi *S. aureus* a enterotoxínov *Clostridium perfringens* pomocou reverznej pasívnej latexovej aglutinácie (RPLA) alebo inými imunochemickými testami. Pri klinicky závažných stafylokokových infekciách pacientov sa vyšetřuje produkcia príslušných toxínov (napr. TSST-1, stafylokokových exfoliačných toxínov, Panton-Valentine leukocidínu) kmeňom *S. aureus* získaného z klinického materiálu.

Tab. 1 21. 2. Príklady imunochemicky dokazovaných bakteriálnych toxínov v klinickom materiáli alebo v potravinách

Mikroorganizmus	Vyšetrovaný materiál	Metóda
<i>Staphylococcus aureus</i>	potraviny na stafylokokový enterotoxín A –D izolát na produkciu TSST, EXT	RPLA
Alimentárne náklady vyvolané baktériami <i>Escherichia coli</i> , <i>Clostridium perfringens</i> , <i>Bacillus cereus</i>	potraviny na prítomnosť <i>Vibrio cholerae</i> enterotoxín (CT) a termolabilný alebo termostabilný enterotoxín (LT, ST) <i>Escherichia coli</i> , <i>Clostridium perfringens</i> enterotoxín, <i>Bacillus cereus</i> enterotoxín atď.	RPLA, ELISA

Vysvetlivky: ELISA – enzýmová imunoanalýza, RPLA – nepriama spätná latexová aglutinácia.

Imunochemické dôkazy antigénnych štruktúr faktorov rezistencie na ATB

Konfirmácia (potvrdenie identity) *MecA* génu pri suspektom MRSA kmeni (suspektom na základe určenia inhibičnej zóny cefoxitínu pri diskovej metóde stanovenia citlivosti) molekulárno-genetickým vyšetrením vyžaduje čas niekoľko hodín a pomerne dobré vybavenie laboratória. Jednoduchší je v tomto prípade fenotypový dôkaz prítomnosti zmutovaného bakteriálneho proteínu viažúceho penicilín 2a (PBP2) v izolovanom kmeni zlatého stafylokoka pomocou latexovej aglutinácie alebo inou imunochemickou metódou. Dokazovaný zmenený proteín, resp. dokazovaný enzým pri týchto metódach predstavuje svojou štruktúrou epitopový cieľ, ktorý rozpoznávajú špecifické diagnostické protilátky a viažu sa naň. Vzniknutý imunokomplex sa potom vizualizuje spôsobom, ktorý je charakteristický pre zvolenú diagnostickú metódu (napr. pri latexovej aglutinácii je to vznik zrazeniny – aglutinátu). Sem patria aj metódy na dôkaz karbapenemáz a iných enzýmov štiepiacich antibiotiká pri izolovaných bakteriálnych kmeňoch z klinického materiálu pomocou diagnostických protilátok v imunochromatografických metódach.

1.21.3 Metodické základy dôkazu tvorby protilátok, stanovenie ich hladín a sledovanie ich dynamiky pri infekciách

Dôkaz prítomnosti protilátok sa vykonáva buď za účelom potvrdenia alebo vylúčenia infekcie spôsobenej príslušným agens alebo za účelom zistiť, či vyšetovaná osoba má protilátky proti príslušnému agens (napríklad po imunizácii). Metodiky stanovenia protilátok musia byť kvantitatívne (stanovenie konkrétneho množstva, napr. metódy kvantitatívnej ELISA) alebo semikvantitatívne (riedenie séra alebo titru, napr. KVR, nepriama imunofluorescencia a iné), aby sa dala sledovať ich dynamika v krvi (nárast či pokles tvorby). V mikrobiológii, na rozdiel od iných laboratórnych odborov v určitom časovom úseku, pri stanovovaní špecifických protilátok väčšinou neexistuje populačná norma (okrem niekoľkých výnimiek). Problém je aj s medzilaboratórnou porovnateľnosťou výsledkov sérologických analýz získaných rôznymi metodikami na rôznych pracoviskách. Je to tým, že existuje málo medzinárodných kalibračných materiálov, to znamená kvalitatívnych aj kvantitatívnych štandardov jednotlivých mikrobiálnych antigénov a príslušných antisér. Pri niektorých mikrobiálnych markeroch také medzinárodné kalibrátory sú, napr. anti-HBsAg, protilátky proti toxínu *B. pertusis*, ASLO a pod. Na ich základe sa dal zjednotiť systém merných jednotiek koncentrácie, resp. množstva antigénu alebo špecifických protilátok (podobne ako je systém SI vo fyzike). Pri metodikách, kde existuje medzinárodný štandard, majú výrobcovia diagnostík väčšinu svojich testov kalibrovaných na tieto štandardy. Preto sú pri nich výsledky analýz udávané v medzinárodných jednotkách (International Unit – IU) a tieto sú aj medzilaboratórne porovnateľné. Pretože väčšina sérologických parametrov nie je štandardizovaná a výrobcovia diagnostík na stanovenie protilátok proti jednotlivým patogénom používajú rôzne typy antigénov (natívne, celotelové, subjednotkové, syntetické, rekombinantné atď.) a rôzne typy protilátok (polyklonálne antiséra rôzneho živočíšneho pôvodu, monoklonálne protilátky), je heterogenita v diagnostických súpravách, ktorými sa jednotlivé parametre stanovujú, veľká. Preto sa výsledky udávajú v rôznych jednotkách – titre, arbitrárne jednotky, ELISA jednotky a pod., alebo sa uvádzajú indexy pozitivity (pomerná nameraná hodnota vzorky voči hodnote pozitívnej kontroly), cut off (priemer hodnôt pozitívnych kontrol), optické denzity (intenzita signálu v spektrofotometrickom meraní a pod. Tieto rozdielnosti musí riešiť mikrobiológ tým, že jednak na svojom pracovisku zabezpečí optimálne nastavenie metodík a overí ich validitu, jednak odhalí chybové výsledky a aj tým, že klinikovi zinterpretuje vo výsledku, resp. pri konzultácii,

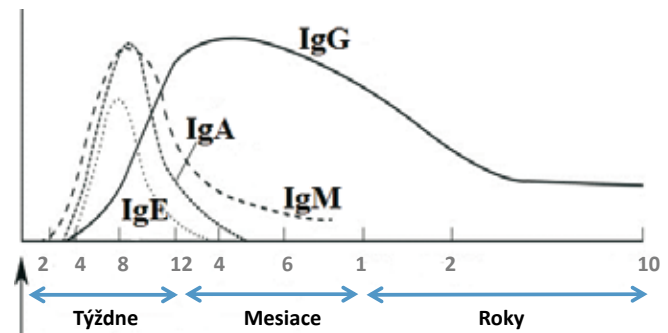
analytické údaje vo vzťahu k ochoreniu konkrétneho pacienta. Interpretácia laboratórneho výsledku má klinikovi poskytnúť informáciu, do akej miery sa zhodujú výsledky analýz vyšetrovaného séra pacienta s interpretačným kľúčom výrobcu *in vitro* diagnostika pre danú diagnózu a odborný názor mikrobiológa, ktorý metodiku garantuje, na laboratórny nález vo vzťahu k predpokladanej diagnóze. Vydávanie analytických údajov v sérologii bez interpretácie (len „nejaké čísla“, resp. pozit. alebo negat.) je veľmi insuficientná informácia a hrubá odborná nedbalosť laboratória, ktoré analýzu vykonalo (pozri subkapitolu 1.24. Výsledok laboratórnej diagnostiky).

Optimalizácia metodík v sérologickom laboratóriu musí vychádzať z jeho postavenia – ak je určené na vyhľadávanie (skrining) infikovaných (napr. HIV, vírusovými hepatitídami, syfilisom) transfúznou službou, musí mať v základom testovacie metódy alebo diagnostiká s čo najvyššou citlivosťou, aby zachytil akýkoľvek prípad možnej infekcie. Naopak, pracovisko nadstavbovej diagnostiky (napr. referenčné pracoviska pre dané infekcie) musí používať diagnostiká a metódy s vysokou špecificitou tak, aby vedeli odlíšiť skutočne infikované osoby od osôb, ktorých vzorky boli v skriningu reaktívne, ale nie sú v skutočnosti infikované. Medzi senzitivitou (citlivosťou, schopnosť testu odhaliť medzi vzorkami tie, ktoré pochádzajú od pacientov s určitým ochorením alebo podozrením, že majú dané ochorenie) a špecifickosťou (schopnosť určitej diagnostickej metódy potvrdiť alebo vylúčiť konkrétne ochorenie) laboratórnych testov je nepriamo úmerný vzťah – čím je test citlivejší, tým je menej špecifický a naopak. Moderné pracovisko klinickej mikrobiológie musí spĺňať často obe požiadavky a musí byť pri nastavovaní diagnostiky pripravené na riešenie prípadov väčšiny infekcií komplexne a poskytovať výsledky diagnostiky v reálnom, resp. v čo najkratšom čase. Preto by malo používať na vyhľadávanie citlivé testy (napr. KVR) a zároveň vykonávať aj špecifické metodiky na doriešenie pozitívnych výsledkov (kvalitné ELISA testy pre rôzne triedy imunoglobulínov, testy avidity, western bloty, ale aj molekulárno-genetické testy pre priamy dôkaz patogéna a pod.) tak, aby dokázali potvrdiť, resp. vylúčiť infekciu. Mikrobiologické laboratórium napr. zabezpečí aj to, že pri sledovaní dynamiky protilátok z dvoch následných alebo sériových odberov krvi jedného pacienta sa vykoná stanovenie hladiny protilátok rovnakou kvantitatívnou (resp. semikvantívnou) metodikou. Je najlepšie vykonať ich paralelne. To, že výsledky vyšetrení pacienta získané dvomi rozdielnymi metódami sa nedajú porovnať a ani sa nedá posúdiť dynamika protilátok, si musí byť lekár vedomý v prípade, že sa rozhodne zaslať vzorky z dvoch následných odberov krvi pacienta do dvoch rozdielnych laboratórií. Na diagnostické účely je potrebné zvyčajne vyšetriť dve vzorky séra (ale aj iných telesných tekutín), odobraných v odstupe zvyčajne 10 – 14 dní a je potrebné preukázať významné (významné) zmeny hladiny. Optimálna dĺžka intervalu medzi oboma odbermi sa však líši podľa okolností. Pri akútnych infekciách (chrípka, infekčná mononukleóza) stačí niekedy odstup len jeden týždeň. Pri chronicky prebiehajúcich infekciách, napr. pri lymfkej borelióze, by interval medzi odbermi mal byť 4 – 6 týždňov. Pri kvantitatívnych metodikách, ktorými stanovujeme presnú výšku hladín jednotlivých tried špecifických imunoglobulínov pomocou moderných a štandardizovaných imunoanalýz (napr. anti-HBsAg pomocou EIA a iných) na základe kalibračnej krivky možno stanoviť presnú hodnotu a tým omnoho presnejšie sledovať zmeny v dynamike tvorby protilátok. To znamená, že nie je potrebné na zhodnotenie zmeny dynamiky dosiahnuť až štvornásobný nárast hladiny v sére, ako je to pri semikvantitatívnom stanovení titra. Stačí zaznamenať aj nárast o 25 – 50 % oproti hodnote v prvej vzorke. Tým sa skráti potrebná doba odstupe medzi dvoma odbermi. Stanovenie titra protilátok (čo je obrátená hodnota riedenia séra) pri semikvantitatívnych metodikách (napr. pri komplement viažucej reakcii – KVR) je jednak menej presnejšie (chyba riedenia najmä pri mikrometódach) a týka sa zväčša stanovenia

IgG a IgM naraz, teda stanovenie zmesi špecifických protilátok, pritom ale nedeteguje špecifické IgA. Musí byť dodržaný odstup 12 – 14 dní tak, aby bol nárast titra signifikantný (zvýšenie o dve riedenia séra). Zvýšenie o jedno riedenie by mohlo byť iba dôsledkom laboratórnej chyby v postupe riedenia), preto je nevyhnutné potvrdiť recentnú infekciu až na základe štvornásobného zvýšenia hladiny protilátok. Vzhľadom na potrebu pomôcť pacientovi čo najskôr, nasadiť mu terapiu alebo urobiť potrebné preventívne opatrenia, je taký interval priveľmi dlhý a vyšetrenie má väčšinou už len retrospektívnu hodnotu. Pri niektorých ochoreniach možno diagnostikovať infekciu zo sérologických výsledkov komplexného vyšetrenia jednej vzorky (úplný izotypový a kvantitatívny profil špecifických protilátok voči celotelovým alebo jednotlivým antigénom, avidita špecifických IgG atď.) napr. pomocou sady kvantitatívnych ELISA, LIA alebo FIA testov, Western blotu a iných testov, čo ale zvýši cenu vyšetrenia pacientovej vzorky. Ojedinele sa ako doplnkové vyšetrenie analyzujú protilátky jednoduchým dôkazom pomocou metód, ako je protismerná imunodifúzia v jednej vzorke séra v spojení s klinickým obrazom, epidemiologickou anamnézou, kultivačným a mikroskopickým vyšetrením (napr. pri infekciách primárne patogénnymi mikromycétami – *Coccidioides immitis*, *Paracoccidioides brasiliensis* a pod.).

Dôkaz protilátok ako diagnostických markerov prebiehajúcej infekcie

Stratégia sérologického vyšetrenia protilátok v mikrobiológii vychádza zo stanovenia profilu protilátok (IgG, IgM, IgA, resp. aj IgE) voči patogénu či jeho antigénom, ich vzájomnej konštelácie a sledovania ich dynamiky, teda nie z referenčného rozsahu rôznych parametrov, ako je to pri biochemických, hematologických alebo imunologických parametroch. Z jednoduchého nálezu protilátok nemožno väčšinou stanoviť úplnú diagnózu, a to niekedy ani stanovením množstva protilátok, čiže ich hladiny alebo titrov. Nález protilátok svedčí jednoznačne len o tom, že vyšetovaná osoba prišla niekedy v živote s príslušným agens do kontaktu, resp. presnejšie do kontaktu s antigénom príslušného agens. Aj pri metodikách, kde sa zaviedol systém referenčného rozsahu, tzv. pozitívny alebo signifikantný titer, zostáva to len štatistický parameter a nedá sa mechanicky použiť pri všetkých konkrétnych prípadoch. Rovnako platí, že osoba s vysokým titrom alebo hladinou protilátok v krvi môže byť úplne zdravá a naopak, osoba s nízkym alebo hraničným titrom (resp. hladinou) môže práve prekonávať akútne štádium ochorenia. K diagnóze práve prebiehajúcej infekcie je potrebné dokázať jednu z dvoch možností kvalitatívnych a kvantitatívnych zmien v sére, ktoré sú typické pre primárnu alebo sekundárnu protilátkovú odpoveď pri danom ochorení. V prvom prípade to znamená, že v kritickom období došlo buď ku sérokonverzii alebo k nástupu tvorby včasných protilátok. **Sérokonverziou** sa nazýva zmena markerov infekcie v krvi, napr. zmena antigenémie (vtedy antigén patogénu cirkuluje v krvi v dokázateľnom množstve) na dôkaz prítomnosti špecifických protilátok IgM alebo IgA (resp. aj IgE) a postupný nárast hladiny nízkoavidného špecifického IgG (včasné protilátky, obr. 1.21.1). Tieto protilátky sa nazývajú **včasné (skoré) protilátky** a ich hladina sa zvyšuje pomalšie, ako pri sekundárnej protilátkovej odpovedi. V niektorých prípadoch možno dokázať aj pokles či fluktuáciu špecifických protilátok IgM alebo IgA pri zvyšovaní hladiny IgG. V testoch, ktoré zachytávajú špecifické protilátky IgM a IgG naraz (KVR), možno dokázať len začiatok tvorby a/alebo nárast titrov zmesi špecifických protilátok. Oba prípady sú charakteristické pre primoinfekciu. Pri detekcii antigénov aj protilátok sa ukázalo, že existujú významné rozdiely medzi testami, či už na základe metódy alebo pôvodu diagnostického setu (výrobky jednotlivých dodávateľov diagnostík), takže výrobok jedného dodávateľa môže detegovať sérologický parameter skôr, ako test iného výrobcu. To je potrebné zohľadniť v stratégii voľby času odberu vzoriek, voľby diagnostického postupu a tiež v interpretácii.



Obr. 1.21.1. Priebeh primárnej protilátkovej odpovede pri infekcii *T. gondii* (upravené podľa: Joynson DHM, Guy EC. Joynson DHM, Wreghitt TG, editors. Laboratory diagnosis of toxoplasma infection. Toxoplasmosis: a Comprehensive Clinical Guide. 2001. Cambridge, UK: Cambridge University Press; p. 296–318.).

Samozrejme, že taký profil, ako aj zistené hladiny (titre) odrážajú situáciu v čase odberu, preto by mal byť odber čo najviac optimalizovaný voči suspektnému ochoreniu a s ohľadom na známy priebeh príslušnej protilátkovej odpovede voči infekcii predpokladným patogénom. Napr. protilátky voči HIV a *T. pallidum* sú detegovateľné až v 2 – 3 týždni po vniknutí infekčného agens do ľudského organizmu, sérologické vyšetrenie v prvých dvoch týždňoch po rizikovom kontakte bude väčšinou zbytočné. Výnimkou je povinnosť vykonať čo najskôr odber krvi zdravotníckemu pracovníkovi pri poranení s hrozbou kontaktu s krvou pacienta, to je však primárne z pracovnoprávných dôvodov (pozri subkapitolu 1.6).

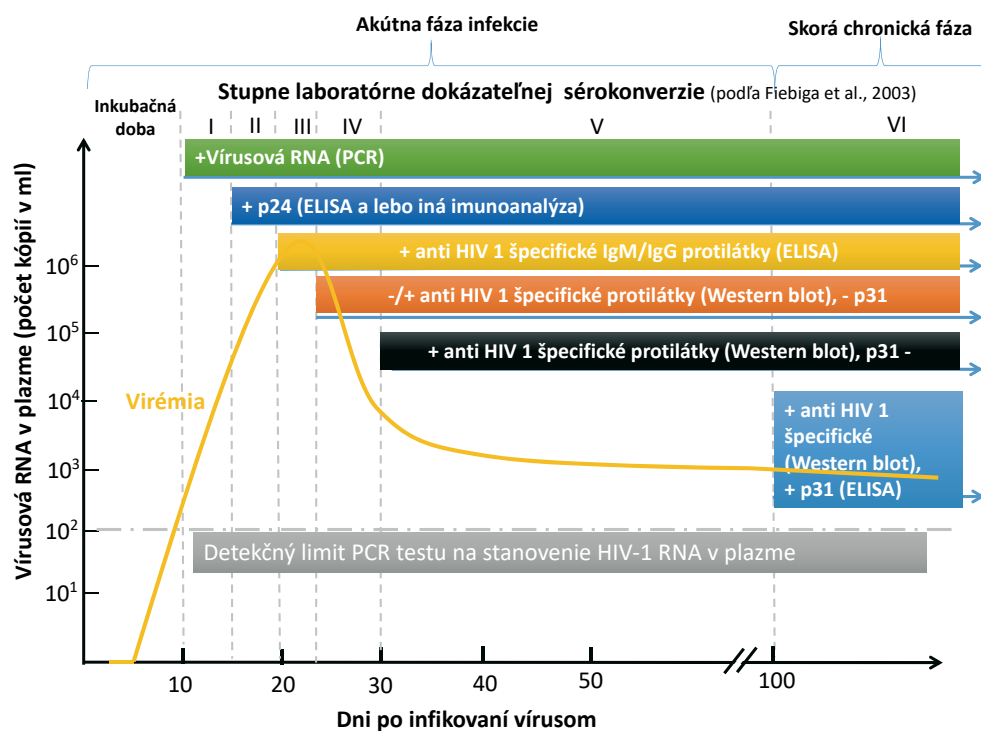
Pri sekundárnej protilátkovej odpovedi (reinfekcia, reaktivácia) dochádza najčastejšie k výraznejším a rýchlejším zmenám hladiny špecifických protilátok ako pri primoinfekcii, ale môže dôjsť aj k zmene ich profilu (napr. EBV reaktivácia – tab. 1.21.2.) oproti primoinfekcii. Sú ale aj ojedinelé prípady, kedy sa v dynamike sérových protilátok neudeje nič signifikantné (napr. pertusis u niektorých pacientov) a vyšetrenie sa musí zväčša doriešiť inými, často už nie sérologickými metódami.

Pri zasielaní materiálu na sérologické vyšetrenie musí lekár zohľadniť to, o aké ochorenie a o akého pacienta ide. Pri akútnych respiračných vírusových infekciách, akým je napr. chrípka, bude nástup protilátok vzhľadom na krátku inkubačnú dobu omnoho rýchlejší ako pri chronických ochoreniach (pričom vyšetreniu protilátok z krvi by v praxi mal v tomto prípade predchádzať priamy dôkaz antigénu z výteru alebo výplachu z nosohltanu). Významný zostup protilátok sa určite zistí skôr u dospelého, ktorý sa už v živote pravdepodobne s týmito alebo príbuznými patogénmi dostal do kontaktu a jedná sa tak o možnú sekundárnu protilátkovú odpoveď (napr. pri mykoplazmových a iných respiračných infekciách). Opačne to bude u novorodenca (tam je v prípade pozitivity potrebné zvažovať to, či nejde o protilátky prenesené od matky), ale aj u detí do dvoch rokov, ktoré horšie tvoria protilátky a rovnako aj u osôb s oslabenou imunitou. Preto je dobré, aby klinik zvážil, či pri tak malých alebo imunodeficientných pacientoch nie je lepší priamy dôkaz, napr. pomocou molekulárno-genetického testu. V spomínaných skupinách pacientov býva nález aj nízkych hodnôt protilátok diagnosticky dôležitejší ako u dospelého, resp. imunokompetentného človeka. Pri niektorých infekciách s rizikom prechodu do chronicity, napr. pri vírusovej hepatitíde typu B, je potrebné sledovať dlhodobu kvalitatívnu zmenu a dynamiku antigenémie (HBsAg, HBeAg, resp. HBcrAg) a súčasne hladinu príslušných protilátok v IgM a IgG triedach s viacerými možnými sérokonverziami tak, aby sa dalo zistiť, či ide o postupné prekonávanie infekcie vedúce ku rekonvalescencii, alebo ochorenie progreduje k chronickému štádiu s rizikom reaktívácie či neskoršieho malígneho zvratu (obr. 1.21.3).

Tab. 1.21.2. Sérologický profil jednotlivých štádií EBV infekcie.

Fáza EBV infekcie	Profil protilátok						
	anti VCA IgM	anti VCA IgG	anti VCA IgA	anti EBNA1 IgM	anti EBNA1 IgG	anti EA IgM	anti EA IgG
primárna	+/+++	++ avidita ↓	+++	++	-	++	++
latentná	-	++ avidita ↑	+/-	-	++	-	+/-
reaktivácia	+	+++ avidita ↑	+++	+/-	+++	+/-	+++
aktívna chronická	Nemá typický profil sérových protilátok, dôkaz je možný pomocou molekulárno – genetických metód – zistená vysoká hladina vírusovej nálož v periférnej krvi a infiltrácia EBV infikovaných lymfocytov v postihnutých lymfatických orgánoch dôkazom EBER metódou <i>in situ</i> hybridizácie (pri lymfoproliferatívnych ochoreniach).						

Vysvetlivky: VCA – vírusový kapsidový antigén, EBNA 1 – Epstein-Barrovej vírus nukleárny antigén, EA – včasný antigén, EBER – Epstein-Barr virus encoded RNA.



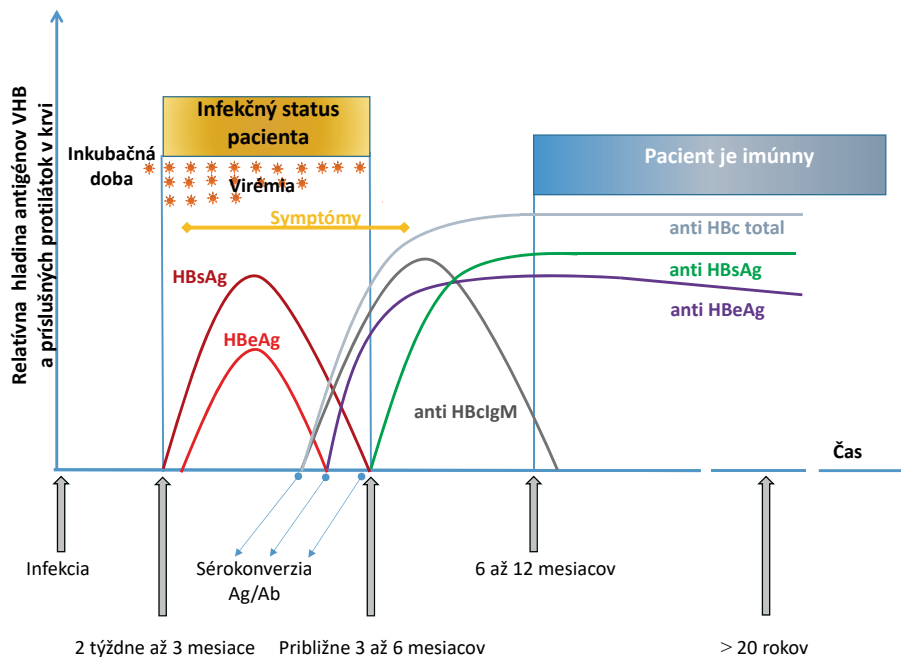
Obr. 1.21.2 Priebeh a laboratórne sledovanie sérokonverzie pri infekcii HIV (upravené podľa: McMichael, AJ, et. al. (2010) Nature Reviews Immunology; 10(1))

Existujú aj výnimky pri niektorých chronických infekciách (napr. syfilis, toxoplazmóza a HIV), kedy sa pri stanovení diagnózy môže vychádzať z analýzy protilátok už z jednej vzorky. V týchto prípadoch má dôkaz protilátok v jednej vzorke mimoriadny význam a ak je predpísaným postupom potvrdený, čiže konfirmovaný, je základným dôkazom, o ktorý sa opiera diagnóza. V niektorých prípadoch má diagnostický význam vysoká hladina protilátok v jednej vzorke, ktorá je významne vyššia, ako je bežná hladina týchto protilátok v bežnej populácii (tzv. referenčná hodnota). Takým je stanovenie hladiny ASLO štandardizovanou metódou v medzinárodných jednotkách pri sledovaní poststreptokokových sterilných následkov. Hodnota do 200 IU platí ako norma pre dospelú populáciu (hoci aj tam sú geografické rozdiely, napr. v Škandinávii je vyššia), pri vekovej skupine 5 až 10 rokov, v ktorej bývajú streptokokové infekcie najčastejšie, možno za normálny nález považovať hodnotu až do 400 IU. Práve na tomto parametri, ktorý ako jeden z mála v sérológii má medzinárodné uznaný referenčný rozsah, sa dá poukázať na to, že rigidné používanie referenčných hodnôt v sérologickej interpretácii nemožno hodnotiť ako univerzálny štatistický parameter. Sú pomerne časté prípady dlhodobého pretrvávajúcich vysokých hodnôt ASLO (800 IU a viac) najmä u starších detí aj napriek riadnej antibiotickej profylaxii a zároveň bez klinických a labo-

ratórnych známkov aktivity ochorenia (napr. normálnej hladiny CRP a pod.). A naopak, u malých detí po potvrdení streptokokovej infekcie sú hodnoty a zmeny hladín práve v oblasti do 200 IU.

Individuálna reaktivita v tvorbe protilátkovej odpovede je dôvod, že niekedy pri konkrétnej osobe vôbec nedochádza k tvorbe niektorého izotypu protilátok (predovšetkým IgM), alebo je táto tvorba spomalená. Naopak, niekedy dochádza k dlhodobému pretrvávaniu tvorby IgM, napr. pri RS-viróze alebo infekcii *H. pylori* (to je jeden z dôvodov, prečo sa pri diagnostike infekcie touto baktériou už nemajú vyšetrovať protilátky). Aj pri borelióze sa protilátky anti *B. burgdorferi* IgM bežne nachádzajú v krvi aj tri mesiace a viac po infekcii. Pri niektorých chronických infekciách, ako je syfilis, je tvorba špecifického IgM permatentná počas celej doby infekcie, čo môžu byť roky. Latentná infekcia organizmu sa môže reaktivovať rôznymi stresovými podnetmi (imunosupresia, superinfekcia) a to môže stimulovať imunitný systém k novej produkcii IgG, IgM alebo IgA protilátok (napr. pri latelnej EBV infekcii).

Polyklonálna alebo oligoklonálna tvorba protilátok, nešpecificky reagujúcich s mikrobiálnymi antigénmi, môže nastať aj pri iných, neinfekčných, zväčša autoimunitných ochoreniach, napr. *sclerosis multiplex*, kedy sa pravidelne navodí tvorba pro-



Obr. 1.21.3. Zmeny sérologického profilu (sérokonzervie) v priebehu nekomplikovanej vírusovej hepatitídy B a jeho ustálenie smerom ku rekonvalescencii približne rok po jej prekonaní (upravené podľa: https://www.wikidoc.org/index.php/Hepatitis_B_laboratory_tests).

tilátok voči antigénom vírusov morbill, rubeoly a varicela zoster v likvore. Podobne, aj u niektorých tehotných žien sa môže počas gravidity začať nešpecifická tvorba protilátok, ktoré reagujú v testoch protilátok proti mikrobiálnym antigénom.

Vekom podmienená imunitná reaktivita ovplyvňuje takisto tvorbu určitých protilátok. Príkladom je primoinfekcia EBV. Ochorenie (infekčná mononukleóza) sa kumuluje najmä v dvoch populačných skupinách – adolescenti a malé deti do veku 5 rokov. Ochorenie sa laboratórne potvrdzuje sérologicky, a to jednak dôkazom tvorby nešpecifických (heterofilných) protilátok alebo tvorbou špecifických protilátok proti EBV. **Heterofilné protilátky** sa od špecifických líšia tým, že sú schopné viazať sa na heterológne antigény (napríklad antigény rôznych cicavčích erytrocytov), teda antigény, ktoré nevyvolali ich tvorbu, na rozdiel od špecifických, ktoré sa viažu len na antigény vírusu Epstein-Barrovej. Pri dôkaze heterofilných protilátok sa stanovujú pomocou jedného z troch používaných testov. Podľa druhu testovaných erytrocytov a pracovného postupu sa rozlišuje aglutinácia baraních erytrocytov (Paul-Bunnelova reakcia), hemolýza hovädzích erytrocytov (OCH – Ericsonov test) a aglutinácia konšských erytrocytov (IM-test). Najšpecifickejšia je Paulova-Bunnelova reakcia (PBR), OCH a IM-test sú len orientačné. U dospievajúcej mládeže, kde je infekčná mononukleóza najčastejšia, je tvorba heterofilných protilátok regulérna a PBR je pri potvrdení diagnózy vysoko špecifická aj citlivá laboratórna metóda. Hladina heterofilných protilátok v sére začne väčšinou asi po mesiaci trvania choroby klesať. Jej stanovenie v signifikantnom titri v sére pacientov tak potvrdzuje aktuálne ochorenie. U malých detí tieto testy stanovenia heterofilných protilátok zlyhávajú. Deti do 2 rokov heterofilné protilátky prakticky netvoria, deti do 5 rokov ich tvoria nespôľahivo, preto je namiesto nich diagnosticky vhodnejšie dokazovať špecifické protilátky proti jednotlivým antigénom EB-vírusu (VCA, EA a EBNA-1).

Iným príkladom infekčného ochorenia, kedy sa pri určitých osobách napriek prebiehajúcej infekcii nevytvárajú protilátky, je séronegatívna borelióza. V týchto prípadoch je potrebné diagnostiku doplniť o vyšetrenie špecifickej bunkovej imunity pomocou laboratórnych testov na dôkaz aktivácie T-lymfocytov (IGRA testy, viď nižšie).

Dalšími hodnotiacimi kritériami, ktoré je pri interpretácii výsledkov sérologických testov potrebné zohľadniť, je pasívny alebo aktívny prenos protilátok. Pasívny prenos protilátok triedy IgG sa uskutočňuje z matky na dieťa, lebo prechádzajú placen-

tou, na rozdiel ostatných imunoglobulínov. U novorodencov a dojčiat tak možno detegovať pasívne prenesené matkine protilátky, ktoré postupne do pol roka vymiznú (to je potrebné zohľadniť napr. pri hodnotení sérologického vyšetrenia detí od HIV pozitívnych matiek a pri iných infekciách v gravidite). Prenos špecifických protilátok, ktoré môžu ovplyvniť detekciu a interpretáciu výsledkov sérologických vyšetrení, sa deje najmä po podaní krvi alebo plazmy pri hemotrapii (transfúziou) a profylaktickým (pasívnou imunizáciou), alebo terapeutickým podaním polyvalentných gamaglobulínových koncentrátov vyšetrovanej osobe, ktoré môžu ako akcesorickú zložku obsahovať aj protilátky proti nami detegovanému patogénu.

Pri diagnostike **serózných meningitíd a meningoencefalitíd** sa protilátky stanovujú kvantitatívne, zásadne aj v likvore, aj v sére naraz, pričom vzorky likvoru a krvi pacienta musia byť odobraté paralelne. Po stanovení hladiny protilátok v oboch telesných tekutinách a pomocou zhodnotenia funkcie hemato-likvorovej bariéry sa vypočíta **protilátkový index** (antibody index, AI) a vyhodnotí sa autochtónna tvorba v jednotlivých triedach imunoglobulínov. Základným predpokladom pre jeho výpočet je presné kvantitatívne stanovenie albumínu, celkových protilátok príslušnej triedy (IgG, IgM, IgA) a špecifických protilátok stanovovaných tried v oboch telesných tekutinách a zhodnotenie funkcie hematoencefalickej bariéry. Jej priepustnosť je ovplyvnená viacerými faktormi (napr. zápalom) a to musí byť pri výpočte AI zohľadnené. Vyhodnotenie autochtónnej tvorby pomocou AI umožňuje určiť, aký podiel špecifických protilátok, zistených v likvore sa vytvoril stimuláciou B-lymfocytov intratekálne (teda v kompartmentoch infikovaného CNS) v porovnaní s protilátkami toho istého typu a špecificity, ktoré sa do likvoru dostali pasívne z krvi. Tak možno odlíšiť infekciu CNS od infekcie iných orgánov tým istým patogénom (napr. pri lymskej borelióze, CMV alebo VZV infekcie a pod.).

Na **zhodnotenie funkcie bariéry** je potrebné porovnanie albumínu v oboch materiáloch výpočtom **kvocientu albumínu Qalb** = Alb CSF/Alb sérum. Albumín je na rozdiel od protilátok syntetizovaný len v pečeni a preto sa do likvoru dostáva len zo séra prechodom cez hematoencefalickú bariéru. Albumínový kvocient Qalb je vekovo špecifický a jeho normálne hodnoty sa udávajú pre danú vekovú skupinu, napr. v skupine pacientov od 23 do 32 rokov je to $6,0 \times 10^3$, u pacientov v skupine 53 – 60 rokov je to $8,0 \times 10^3$ atď., pričom táto hodnota môže byť u zdravých jedincov vo veku nad 70 rokov maximálne 9×10^3 . Vždy



je teda potrebné hodnotiť hodnotu kvocientu albumínu vo vzťahu k veku. Ak sa zistí hodnota vyššia o 1,5-násobok hodnoty typickej pre danú vekovú skupinu, hovoríme o ľahšom poškodení hematoencefalitickej bariéry, ak o 2-násobok, hovoríme o jej ťažkom poškodení a to významne mení pomery v likvore, vrátane koncentrácie špecifických protilátok.

Pomery proteínov v sére a likvore ovplyvňujú viaceré faktory – vysoká priepustnosť hematoencefalitickej bariéry (acidóza, zápal), porušená cirkulácia likvoru pri obštrukcii likvorových dráh a pod.

Koncentrácie celkových protilátok danej triedy, napr. IgG, v likvore korelujú s albumínom v likvore, a preto je ich vzájomný pomer v zdravej populácii daný lineárnou závislosťou. Pri zápalových ochoreniach sa mení ultrafiltračná schopnosť bariéry a zároveň sa mení tento vzťah v dôsledku intratekálnej produkcie protilátok, pričom v grafickom vyjadrení sa lineárna závislosť (priamka) mení na hyperbolickú (krivka) (obr. 1.21.4).

Uvedené patologicko-fyziologické pomery v CNS najlepšie vyjadruje kvocient Q (IgG, IgM, IgA)_{lim}, pričom ide o **prepočet kvocientu imunoglobulínu danej triedy (napr. Q celkového IgG v likvore/ sére) na základe hodnoty kvocientu albumínu a hodnoty empiricky stanovených koeficientov daných pre túto triedu imunoglobulínov**. Inak povedané, pri poruche bariéry sa pomocou albumínového kvocientu a koncentrácie protilátok danej triedy v sére dá vypočítať, aký by mal byť ich podiel v likvore. Koeficienty pre jednotlivé triedy imunoglobulínov sú uvedené v tabuľke 1.21.3.

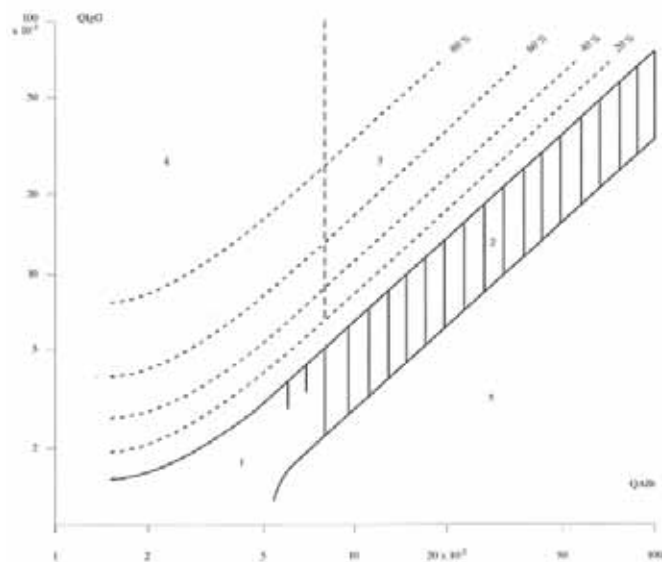


Diagram kvocientov albumínu a IgG (Reiber a Felgenauer, 1987)

1. referenčná oblasť zdravej populácie,
2. hodnoty pri izolovanej poruche hematolikorovej bariéry bez lokálnej tvorby IgG,
3. hodnoty pri poruche hematolikorovej bariéry a s lokálnou tvorbou IgG,
4. hodnoty pri intaktnej bariére a s intratekálnou tvorbou IgG,
5. oblasť hodnôt nevalidých meraní (chyby pri odbere, analýze, poruche cirkulácie likvoru a pod.).

Obr. 1.21.4. Vzťah medzi kvocientmi protilátok Q_{Ig} (G, M, A) a albumínu Q_{Alb} .

$$Q_{(IgX)lim} = a/b \sqrt{Q_{Alb}^2 + b^2} - c$$

X = G, A, M;

a/b, b^2 , c = koeficienty na výpočet intratekálnej tvorby IgG, IgA a IgM

Tab. 1.21.3. Koeficienty na výpočet výpočet intratekálnej tvorby IgG, IgA a IgM.

	a/b	b^2	c
IgG	0,93	6×10^{-6}	$1,7 \times 10^{-3}$
IgA	0,77	23×10^{-6}	$3,1 \times 10^{-3}$
IgM	0,67	120×10^{-6}	$7,1 \times 10^{-3}$

Hodnotu Q_{lim} potom porovnávame s hodnotou kvocientu príslušnej triedy imunoglobulínov, zistenej reálnym stanovením vhodnou a dostatočne citlivou metódou (napr. nefelometriou). Až potom je možný výpočet protilátkového indexu špecifických protilátok, teda protilátok, ktorých tvorba bola vyvolaná prítomnosťou daného mikrobiálneho patogénu v CNS. Potom napr. pre IgG platí:

$$Q \text{ špecifických IgG} = \frac{\text{špecifické IgG} - \text{koncentrácia v likvore}}{\text{špecifické IgG} - \text{koncentrácia v sére}}$$

ak $Q \text{ IgG} < Q \text{ IgG}_{lim}$: AI = Q špecifické IgG / Q IgG celkové

ak $Q \text{ IgG} > Q \text{ IgG}_{lim}$: AI = Q špecifické IgG / Q IgG lim

Referenčná oblasť AI: 0,7 – 1,3

AI patologický: $\geq 1,5$ (dokázaná intratekálna tvorba špecifických protilátok).

Podobným spôsobom stanovenia a výpočtu protilátkového indexu sa musí postupovať pri niektorých očných infekciách (napr. očná toxoplazmóza). Stanovenie hladiny protilátok v sére alebo likvore bez výpočtu a udania protilátkového indexu je diagnostickou chybou.

Dôkaz avidity protilátok

Avidita je sila, ktorou polyvalentné protilátky interagujú s polyvalentným antigénom. V prvých týždňoch imunitnej reakcie nie je väzba medzi protilátkami IgG a antigénom dostatočne silná. Hovoríme, že včasné IgG protilátky sú nízkoavidné. Nález protilátok s nízkou aviditou teda môže potvrdiť prebiehajúcu primoinfekciu. Diagnosticky spoľahlivejší je nález protilátok s vysokou aviditou, ktorý dokazuje, že k infekcii došlo už pred dlhšou dobou. Dôkaz avidity sa vykonáva pomocou kvantitatívnych testov, najčastejšie metódami ELISA. Pri nich sa v paralelnom testovaní porovnáva množstvo naviazaných protilátok v testovanej vzorke jednak bez prídania chemickej látky, ktorá rozrušuje väzbu protilátok s antigénom, s množstvom protilátok, ktoré boli takto chemicky ovplyvnené. Látky, ktoré rozrušujú väzbu nízkoavidných protilátok a antigénom, sú močovina (6 – 8 mol/l) a iné (dietylamín, guanidín a tiokyanát). Avidita sa vyjadruje v percentách, a vypočítava sa z nameraných optických hodnôt (OD). Pri použití močoviny (urea, U) je výpočet a interpretácia nasledovná:

$$\frac{\text{Hodnota séra (OD) s roztokom močoviny (U+)}}{\text{Hodnota séra (OD) s premývacím roztokom (U-)}} \times 100 = \text{relatívny index avidity v \%}$$

Ak sa zistí nízka avidita (< 40%), jedná sa pravdepodobne o čerstvú infekciu (< cca. 3 týždne), ak sa zistí vysoká avidita (> 60%), ide o staršiu infekciu (> 6 týždňov) alebo ide o infekciu po zlyhaní očkovania. Pri hodnotách medzi oboma uvedenými intervalmi sa výsledok nedá interpretovať a je vhodné ho s odstupom cca 2 – 3 týždňov zopakovať.

Využitie stanovenia avidity IgG je už bežné pri rôznych infekciách, napr. vírusmi CMV, VZV, EBV, HIV, pri rubeole, klieštovej encefalitíde, toxoplazmóze a iných.

1.21.4 Neutralizácia

Pri neutralizácii ide o sérologickú reakciu, v ktorej sa uplatňuje schopnosť protilátok špecificky neutralizovať alebo inhibovať biologické vlastnosti uvoľňovaného antigénu (napr. účinok toxínu na bunku) alebo celého mikroorganizmu, ako sú infek-



nosť vírusu, schopnosť vírusu aglutinovať erytrocyty, pohyb baktérií a podobne. Príkladom metodiky, ktorá sa stále využíva v diagnostike je vírus neutralizačná reakcia. Diagnostických testov, ktorými sa v dokazuje neutralizačná schopnosť protilátok na živých systémoch (bunky, krvinky, zvieratá) je veľa, ale stále viac ich nahrádzajú automatizovateľné imunochemické a molekulárno-genetické metódy. V minulosti sa napr. neutralizácia využívala aj na semikvantitatívne stanovenie antistreptolyzínu O pri sledovaní sterilných následkov streptokokových infekcií. Streptolyzín O, čo je faktor virulence produkovaný streptokokmi skupiny A a spôsobujúci hemolýzu erytrocytov, je v reakcii neutralizovaný sérovými protilátkami ASLO in vitro a tak nedochádza k hemolýze erytrocytov pridaných v teste. Ak neboli v sére obsiahnuté protilátky, alebo boli obsiahnuté len v stopovom množstve, streptolyzín narušil membrány erytrocytov a došlo ku hemolýze, ktorá bola viditeľná voľným okom. Išlo o semikvantitatívnu metódu, neštandardizovanú a udávanú len v titroch. Iným exoproduktom týchto streptokokov je DNáza B, ktorý je tiež imunogénny a protilátky proti nej sú spolu s ASLO diagnostické pre sledovanie poststreptokokových sterilných následkov. V súčasnosti sa ASLO aj anti DNáza B protilátky stanovujú kvantitatívne zákalomernými metódami na automatoch (nephelometria, turbidimetria) a udávajú sa v medzinárodných jednotkách.

Vírus neutralizačný test (VNT) je sérologická metóda buď dôkazu protilátok, alebo identifikácie druhu vírusu vo virológii. Deteguje sa ňou prítomnosť špecifických protilátok v sére, homologným voči konkrétnemu druhu, resp. sérotypu vírusu. Tieto protilátky sa naviažu na vírus a efektívne zablokujú infekciu vírusu – po pridaní ku permissívnej bunkovej kultúre mu znemožnia naviazať sa na bunky a preto v nich nedokáže vyvolať cytopatický efekt. Ak sa nachádzajú špecifické protilátky v rekonvalescentnom sére pacienta, zabraňujú jeho reinfekcii tým istým druhom, resp. sérotypom vírusu. Pokiaľ sa dokazujú pomocou známeho vírusu homologne protilátky a ak sa test vykoná v rade riedení séra so známym počtom viriónov (pozri titráciu vírusu), možno stanoviť aj ich titer. Hoci sa táto metódika stále vykonáva v referenčných a vedeckých laboratóriách, v laboratóriách klinickej mikrobiológie sa už nevyužíva.

1.21.5 Imunochemické metodiky

Sú to in vitro metodiky založené na reakcii **antigén** (jeho imunodominantná časť sa nazýva epitop) – **protilátka** (jej imunorekognoskačná oblasť, ktorá sa špecificky viaže s antigénom sa nazýva paratop) a vzniká imunokomplex. Vážba je reverzibilná a na silu interakcie má vplyv prostredie elektrolytu, v ktorom imunochemické reakcie prebiehajú, ako aj afinita (sila väzby paratopov jednej protilátky na konkrétny epitop daného antigénu).

Patria do reakcií typov receptor – ligand. V imunochemických reakciách je receptor protilátka, ligandom je antigén. Pri niektorých imunoanalýzach (napr. ELISA) sa jednak využíva 2- až 3-krokové prepojenie signálnej koncovky na detekciu väzby receptora s ligandom (tab. 1.21.4.), rovnako aj to, že heterológna protilátka môže byť zároveň antigénom (napr. ľudský IgG) pre inú protilátku.

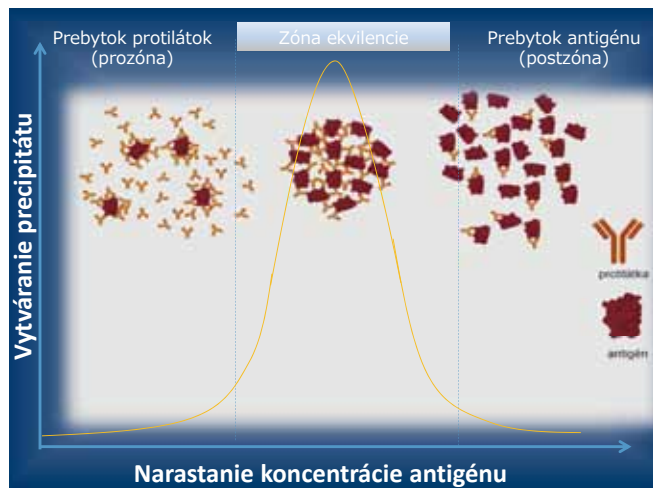
Tab. 1.21.4. Príklady väzieb ligand – receptor, ktoré sa uplatňujú v sérologických reakciách a sila ich väzby (afinita).

Receptor	Ligand	Afinita (K_D – disociačná konštanta*)
protilátka	antigén	$10^{-7} - 10^{-11}$
enzým	substrát	$10^{-3} - 10^{-6}$
hemaglutinín (napr. lektín)	glykoproteín	$10^{-3} - 10^{-5}$
avidín	biotín	10^{-15}

* K_D , čím menšia je disociačná konštanta, tým pevnejšia je väzba medzi proteínom a ligandom

Voľba použitej metodiky závisí od vlastností antigénu (veľkosti, počtu a štruktúr antigénových determinánt – epitopov) a korešpondujúcej protilátky (avidita a špecificita, teda schopnosť tvoriť väzbu len so špecifickým antigénom) a množstva určovanej látky (analyt).

Na stanovenie neznámeho množstva antigénu sa v imunochemických reakciách sa používa známa koncentrácia protilátky a naopak, neznáma koncentrácia protilátky sa stanovuje známym množstvom antigénu. Dôkazom je vytvorenie komplexu antigén-protilátka. Protilátky a antigény sa zúčastňujú imunochemickej reakcie v určitých kvantitatívnych pomeroch a v prítomnosti elektrolytu (0,85 % roztoku NaCl). Hmotnostné a koncentračné pomery antigénu a protilátok ako aj prostredie elektrolytu sú určujúce pre vytvorenie podmienok na vytvorenie pevnej siete v dôsledku prepojenia antigénov navzájom prostredníctvom protilátok. Vytvorenie tejto väzby sa prejaví buď vznikom zákalu (precipitátu), tvorbou viditeľných konglomerátov – napr. vločiek (aglutinát) s vyjasnením okolitého roztoku alebo optickým signálom z reportérskej molekuly v imunoanalýzach (chromogén, fluorofór, chemilumínofór a pod.). Ak by bol v reakcii použitý prebytok protilátok, potom sú väzobné miesta antigénov nahusto pokryté naviazanými protilátkami, a len málo – alebo žiadna z nich – je schopná viazať sa na viac ako na jeden antigén. To bráni regulárnemu zosieťovaniu antigénov a protilátok do väčšieho konglomerátu, vytvárajú sa len dočasné a rozpustné imunokomplexy. Ide o tzv. fenomén prozóny. Pridávaním antigénu sa vytvorí optimálny pomer antigénu a protilátky a vytvorí sa stabilné konglomeráty. Pri prebytku antigénu, keď sú protilátky vyviazané vysokou koncentráciou antigénu dochádza opäť k rozpušťaniu komplexov. V takom prípade tiež nedôjde k vzájomnému premosteniu členov reakcie navzájom a nemôže sa vytvoriť sieť medzi rôznymi molekulami protilátok a viacerými homolognými antigénmi. Hovoríme o tzv. fenoméne postzóny. V tých prípadoch sa antigén musí nariadiť tak, aby sa dosiahol ekvivalentný pomer voči koncentracii protilátok (zóna ekvivalencie). Zatiaľ čo pri precipitačných a aglutinačných reakciách je výhodou použitie polyvalentných zmesí špecifických protilátok aj viacerých tried s vyššou kapacitou krížových väzieb voči danému antigénu, pri imunoanalýzach sa často uplatňujú monoklonálne protilátky, ktoré zvyšujú ich špecifickosť metódy. V sérologii sa riedenie zapisuje postupom, ktorý sa líši od napr. biochemických pravidiel, preto ak riedime 1 diel séra s 9 dielmi fyziologického roztoku, zápis riedenia bude 1 : 10 (v biochémii by bol zápis toho istého riedenia 1 : 9).



Obr. 1.21.5. Priebeh reakcie protilátky (s konštantnou, vysokou koncentráciou) a antigénu (stúpajúca koncentrácia) v roztoku alebo géli (podľa Heidelbergera a Kendalla).

Imunochemické metodiky určovania a kvantifikácie antigénov alebo protilátok sa delia na:

- precipitačné,
- aglutinačné,
- membranolytické reakcie pomocou komplementu, resp. zábrane lýze membrány pomocou protilátkovej neutralizácie iných membranolytických biomolekúl (streptolýzín O),
- imunoanalýzy - dôkaz pomocou značenia jedného z partnerov reakcie (kvalitatívne a kvantitatívne imunoanalýzy).

Imunochemické reakcie sú buď heterogénne v zmysle fyzikálno-chemického oddelenia naviazaných komplexov Ab-Ag od nenaviazaných protilátok a antigénov v jednotlivých fázach reakcie, alebo homogénne, pri ktorých zostávajú všetky reakčnej zložky počas celej doby trvania reakcie spolu.

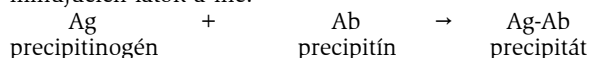
Pri precipitačných a aglutinačných metódach dochádza vzájomným prepojením antigénov pomocou protilátok ku vzniku siete z reakčných členov, pozostávajúcich z antigénov a protilátok, teda množstva jednotlivých (napr. trimérnych) a vzájomne naviazaných imunokomplexov. Každý má veľkosť rádovo niekoľko Angströmov a sú samé o sebe nezaznamenateľné. Ich vznik je potrebné nepriamo identifikovať pomocou označenia jedného reakčného člena v imunokomplexe signálnou molekulou (napr. pomocou enzýmu, fluorofórov a iných). Intenzita takto špecificky vytvoreného celkového signálu v reakcii priamo závisí od počtu vzniknutých imunokomplexov a to umožňuje nielen dôkaz, ale aj presnú kvantifikáciu stanovovaného analytu.

Pri membranolytických reakciách sa využíva schopnosť niektorých biomolekúl (napr. komplement) viazať sa na imunokomplexy, alebo imunochemická neutralizácia (napr. streptolýzín O je neutralizovaný protilátkami ASLO). V oboch prípadoch sa tak zabráni perforácii membrány erytrocytov a v reakcii nedôjde ku hemolýze.

Pri imunoanalýzach dôjde v postupnom slede niekoľkých čiastkových imunochemických reakcií k vytvoreniu väčšinou 3 členných reťazcov, pozostávajúcich z antigénov a protilátok, teda množstva jednotlivých (napr. trimérnych) a vzájomne naviazaných imunokomplexov. Každý má veľkosť rádovo niekoľko Angströmov a sú samé o sebe nezaznamenateľné. Ich vznik je potrebné nepriamo identifikovať pomocou označenia jedného reakčného člena v imunokomplexe signálnou molekulou (napr. pomocou enzýmu, fluorofórov a iných). Intenzita takto špecificky vytvoreného celkového signálu v reakcii priamo závisí od počtu vzniknutých imunokomplexov a to umožňuje nielen dôkaz, ale aj presnú kvantifikáciu stanovovaného analytu.

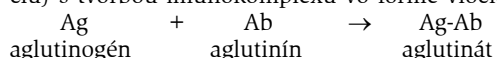
PRECIPITAČNÉ METODIKY

Nakoľko je antigén **solubilný** (rozpuštný), nízkovaleนต์ný, sú tieto metodiky limitované možnosťami zaznamenania vytvorenia imunokomplexu vo forme zákalu – precipitáciu. Metodiky sú prstencová reakcia v skúmavke (ring test), radiálna imunodifúzia, imuno elektroforéza, nefelometria a turbidimetria. Precipitačné metódy charakterizuje tvorba precipitátu (zákalu) v mieste styku rozpustného antigénu a protilátky. Reakcia je ovplyvňovaná viacerými faktormi – typom reagujúcej protilátky, pH, iónovým zložením roztoku, teplotou, prítomnosťou kontaminujúcich látok a iné.



AGLUTINAČNÉ METODIKY

Priame metodiky dôkazu antigénu alebo protilátok majú pri precipitácii svoje limity vo vizualizácii vzniku imunoprecipitátu. Ak sú antigény **korpuskulárne (priame metódy)**, alebo ak sú antigény, resp. protilátky naviazané na **korpuskulárny nosič (nepriame metódy)**, zabezpečí sa multivalentnosť pre vznik omnoho väčšieho počtu väzieb. Tak sú korpuskulárne častice schopné vytvoriť viditeľnú imunochemickú reakciu (aglutináciu) s tvorbou imunokomplexu vo forme vločiek – aglutinátu.



METODIKA DÔKAZU POMOCOU ZNAČENIA JEDNÉHO Z PARTNEROV REAKCIE (IMUNOANALÝZA)

Tieto techniky sa používajú na stanovenie nízkych koncentrácií antigénu alebo protilátok. Jeden z partnerov imunochemickej reakcie, antigén alebo protilátky, sú značené reportérskou molekulou:

1. **enzýmom** (enzýmové imunoanalýzy, EIA),
2. **rádioizotopom** (rádioimunoanalýza, RIA),
3. **fluorofórom** (fluorescenčná imunoanalýza, FIA),
4. **luminiscenčnou látkou** – chemoluminofórom (luminiscenčná imunoanalýza, LIA),
5. **koloidnými časticami kovov, farebné latexové častice** (imunochromatografia).

1.21.6 Priame metodiky dôkazu antigénu alebo protilátok

Treba na tomto mieste upozorniť, že ide o **priame metodiky v zmysle chemickej analýzy, nie mikrobiologického dôkazu** pôvodcu ochorenia alebo imunitnej odpovede na infekciu. Medzi priame metodiky patrí aglutinácia korpuskulárnych antigénov a imunoprecipitácia.

AGLUTINÁCIA KORPUSKULÁRNYCH ANTIGÉNOV

Widalová reakcia – používa sa na dôkaz protilátok v sére pacienta pri brúšnom týfuse a paratyfúse. Suspenzia s predpísanou hustotou devitalizovaných baktérií sa inkubuje so sérom pacienta, ktoré je sériovo riedené, aby bolo možné nielen dokázať prítomnosť protilátok, ale aj stanoviť ich titer a sledovať dynamiku. Dôkazom je vznik viditeľných zhlukov v skúmavke, resp. v mikrotitračnej platničke.

Podobne sa dokazovali aj protilátky v sére pacientov s podozrením na rickettsiózu (infekcie *Rickettsia prowazekii*, *R. africae*, *R. japonica* a pod) a na infekcie spôsobené baktériou *Orientia tsutsugamushi* – (horúčka tsutsugamushi – japonská riečna horúčka, „scrub typhus“). Bola nazvaná podľa autorov **Weilova-Felixova reakcia** a požívala sa na diagnostiku pri epidemickom škvrnitom týfuse. Podstatou tohto testu je skrížená reaktivita medzi antigénmi *Rickettsia* spp. a antigénmi niektorých nepohyblivých sérotypov *Proteus* spp., čo spôsobuje, že protilátky v sére pacientov aglutinujú s baktériami určitých sérotypov tohto rodu enterobaktérií. Ide teda o heterofilné protilátky, a preto sa sa aj táto reakcia nazýva ako **heterofilná aglutinácia**. Protilátky od chorých, ktorých infekciu vyvolali rickettsie zo skupiny týfus (*Rickettsia prowazekii*, *R. typhi*) reagujú so sérotypom *P. vulgaris* OX19, pri infekcii *Orientia tsutsugamushi* reagujú vytvorené protilátky s *P. mirabilis* OXK. Protilátky proti skupine rickettsiae (*R. rickettsii*, *R. africae*, *R. japonica* atď.) reagujú s *P. vulgaris* sérotypov OX2 a OX19 v rôznej miere, v závislosti od druhu. V súčasnosti sa už táto reakcia na diagnostiku ochorenia neodporúča, nakoľko sú k dispozícii možnosti špecifickej priamej aj nepriamej diagnostiky rickettsióz.

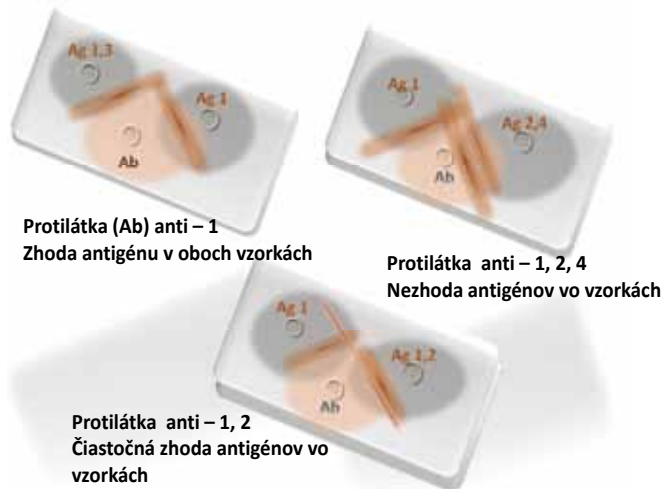
Gruberova reakcia – na dôkaz antigénov rôznych sérotypov (sérotypizácia), napr. druhu *Salmonella enterica*, kedy sa suspenzia kmeňa testovanej baktérie v čistej kultúre inkubuje s diagnostickými typizačnými sérami. Je analogický postup sérotypizácie na podložitých sklíčkach (klasifikácie a typizácie baktérií), ale s inkubáciou v skúmavkách (makrometóda), resp. v jamkách mikrotitračných platničiek (mikrometóda).

IMUNOPRECIPITÁCIA

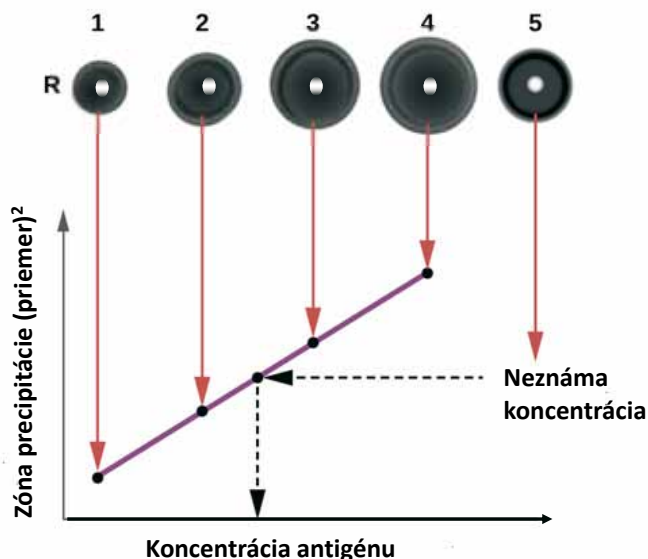
Priebeha v buď v roztoku, alebo v géli, resp. na fólii. Princíp je založený na tom, že antigén buď difunduje tuhým gélom, v ktorom je rovnomerne vmiešaná štandardná koncentrácia imobilizovaných homológnych protilátok (radiálna imunodifúzia), alebo oba členy imunochemickej reakcie (antigén aj sérum) difundujú médium proti sebe (dvojitá imunodifúzia – napr. Ouchterlony). Antigén tak pozdĺž smeru difúzie vytvára koncentračný spád a v zóne ekvivalencie sa vytvorí viditeľný precipitát.

Pri imunodifúzii podľa Manciniovej (radiálna imunodifúzia – RID) ide o kvantitatívne stanovenia, kde sú Ab v určitej koncentrácii primiešané a imobilizované rovnomerne v géli, v ktorom difunduje antigén od štartu, kde je koncentrácia najvyššia až po oblasť ekvivalencie, kde sa postup antigénu zastaví, lebo je úplne viazaný prítomnými protílťkami, imobilizovanými

v géli. V zóne ekvivalencie vznikne viditeľný precipitát, pričom tým, že antigén postupuje centrifugálne, precipitačná zóna má kruhový tvar (preto názov radiálna imunodifúzia). Jej polomer je priamo úmerný koncentrácii antigénu vo vzorke. Ak si vytvoríme pomocou napr. šiestich kalibrátorov so vzostupnou známou koncentráciou antigénu (alebo viacnásobné riedenia známej koncentrácie koncentráty antigénu) rad precipitačných zón, ktorých priemer odmeriame, vnesením týchto hodnôt do grafu vytvoríme kalibračnú priamku, kde na ordináte budú koncentrácie analytu a na abscise priemer príslušnej zóny, umocnený na druhú. Pomocou nej dokážeme vypočítať koncentráciu antigénu vo vyšetrovanej vzorke pomocou priemeru precipitačnej zóny, ktorú v géli vytvoril (obr. 1.21.7).



Obr. 1.21.6. Precipitácia v géli: dvojité protismerná imunodifúzia (podľa Ouchterlonyho).



Obr. 1.21.7. Stanovenie koncentrácie antigénu pomocou radiálnej imunodifúzie (podľa Manciniovej) (upravené podľa: [https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Microbiology/Book%3AMicrobiology_\(OpenStax\)/20%3A_Laboratory_Analysis_of_the_Immune_Response/20.2%3A_Detecting_Antigen-Antibody_Complexes_in_vitro](https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Microbiology/Book%3AMicrobiology_(OpenStax)/20%3A_Laboratory_Analysis_of_the_Immune_Response/20.2%3A_Detecting_Antigen-Antibody_Complexes_in_vitro)).

Pri protismernnej imunodifúzii podľa Ouchterlonyho ide o kvalitatívne určenie homológneho antigénu ku známemu diagnostickému antiséru (napr. Elekov test pri detekcii toxikogénnych kmeňov *C. difteriae*), alebo naopak, určenie prítom-

nosti homológnych protilátok vo vyšetrovanom materiáli na základe reakcie so známym antigénom (pri niektorých systémových mykózach).

Pri imunoelktroforetických metódach je princíp rozdelenia sérových proteínov pohyb v elektrickom poli určený elektrickým nábojom a ich vizualizácia pomocou antisér. Vykonávajú sa nimi hlavne stanovenia sérových proteínov a imunoglobulínov v 1% agarózovom géli, pri pH cca 8,6 a v elektrickom poli. Ide o metódy:

- imunoelktroforetická analýza podľa Grabara a Williamsa,
- imunoelktrodifúzia (raketová),
- imunoelktrosyneréza (stretná),
- dvojrozmerná (krížová),
- imunofixácia po elektroforéze.

Po rozdelení zložiek séra pôsobením elektrického poľa sa pomocou diagnostických antisér vytvorili viditeľné charakteristické precipitačné línie, ktorý sa v prípade, že sa elektroforetogram vysuší ako trvalý preparát, môže zvýrazniť pomocou farbiva Coomassie blue.

Uvedené imunoprecipitačné a imunoelktroforetické metódy sa dnes v klinickej mikrobiológii používajú ojedinele, väčšinou pri dôkaze zriedkavých patogénov či protilátok proti nim, ale napr. v 70. rokoch 20. storočia – pred tým, ako boli vyvinuté komerčné sety na báze enzýmoimunoanalýz (ELISA) – bola imunoelktroforéza základná metóda pri dôkaze HBsAg v krvi pacientov. Boli aj metodickými predchodcami moderných molekulárnych postupov, akými je imunoblot pri proteínových analýzach, fingerprinting a blotovanie nukleových kyselín a pod.

STANOVENIE ANTIGÉNU VO FORME ROZPUSTNÝCH KOMPLEXOV (PRECIPITÁTOV)

Princíp je založený na tom, že v roztoku prítomné imuno-komplexy absorbujú alebo rozptyľujú dopadajúce svetlo. Na stanovenie sa použije definovaná koncentrácia špecifického antiséra (diagnostických protilátok). Fotometricky sa meria odrazené svetlo (nefelometria) a absorbované svetlo (turbidimetria) na alebo v čiastočkách zákalu, ktorý je spôsobený vznikajúcimi imunokomplexami. Na ich stabilizáciu v roztoku sa pridáva polyetylén glykol. Pri nefelometrii po vyslaní laserového lúča do reakčnej zmesi dôjde k jeho rozptylu, pričom rozptýlené svetlo je pod určitým uhlom naorientované systémom šošoviek na fotodetektor, ktorý zaznamená optický signál. Pri turbidimetrii sa meria úbytok intenzity svetelného lúča (vlnová dĺžka svetla je 334 – 340 nm), prechádzajúceho reakčnou zmesou v dôsledku jeho absorpcie vznikajúcimi imunokomplexami (pozri aj subkapitolu 1.19 Optické analýzy).



Obr. 1.21.8. Princíp turbidimetrie (meranie úbytku svetla prechádzajúceho precipitátom – komplexom Ag+Ab, vytvárajúceho zákal) a nefelometrie (meranie odrazeného svetla na precipitáte) pri imunochemickom stanovení sérových proteínov.

Ide o kvantitatívne metodiky, pri ktorých sa optická hodnota nameranej vzorky porovnaná s kalibračnou krivkou, vytvorenú sériovým meraním optických hodnôt kalibračného materiálu so známymi hodnotami analyzovaného antigénu. Koncentrácia analytu vo vzorke sa zistí pomocou kalibračnej krivky a to v lineárnom úseku, vyjadrujúcom závislosť medzi absorbanciou a koncentráciou látky v roztoku.

PRECIPITÁCIA V SKÚMAVKE, NA SKLÍČKU ALEBO NA PAPIEROVEJ KARTE

Po navrstvení séra s komplementárnymi protilátkami na glycerínovú suspenziu antigénu sa po inkubácii vytvára precipitát v skúmavke vo forme prstenca v mieste ekvivalencie protilátky a antigénu. Hladina protilátok sa dá semikvantitatívne určiť. Sérum pacienta sa pritom titrovalo v rade skúmaviek v dvojkovom riedení (1 : 1, 1 : 2, 1 : 4...). Výsledný titer je obrátenou hodnotou toho najvyššieho riedenia séra, pri ktorom ešte možno vidieť vznik prstenca. Najznámejším testom tohto typu bol Ascoliho prstencový test, ktorým sa pomocou antisér z imunizovaných králikov dokazoval antrax, resp. termostabilný antigén *Bacillus anthracis* v biologických vzorkách tkaniva infikovaných zvierat..

Ak sa reakcia uskutoční na sklíčku, vznik precipitáciu (zhluky, vločky) sa sleduje pod mikroskopom, lebo samotná precipitácia nie je dostatočne zreteľná. Príkladom je zisťovanie nešpecifických antifosfolipidových protilátok pri syfilise metódou VDRL (odporúčaná metóda CDC v USA). Antigénmi sú zmes kardiolipínu, lecitínu a cholesterolu. Po pridaní vzorky tepelne inaktivovaného séra pacienta sa mikroskopicky zisťuje precipitácia, ktorá označuje prítomnosť antifosfolipidových protilátok. V dennej rutine laboratórií klinickej mikrobiológie sa u nás využíva jeho modifikácia, ktorá umožňuje vizuálne odčítanie – RRR (rýchla reagínová reakcia), resp. RPR (rapid plasma reagin) precipitáciu na papierových kartách. Pri nej sa vzniknutý precipitát vizualizuje pridanou suspenziou čiastočiek uhlika, ktorý s ním tvorí viditeľné zhluky jasne odčítateľné oproti bielemu pozadiu papierového podkladu.

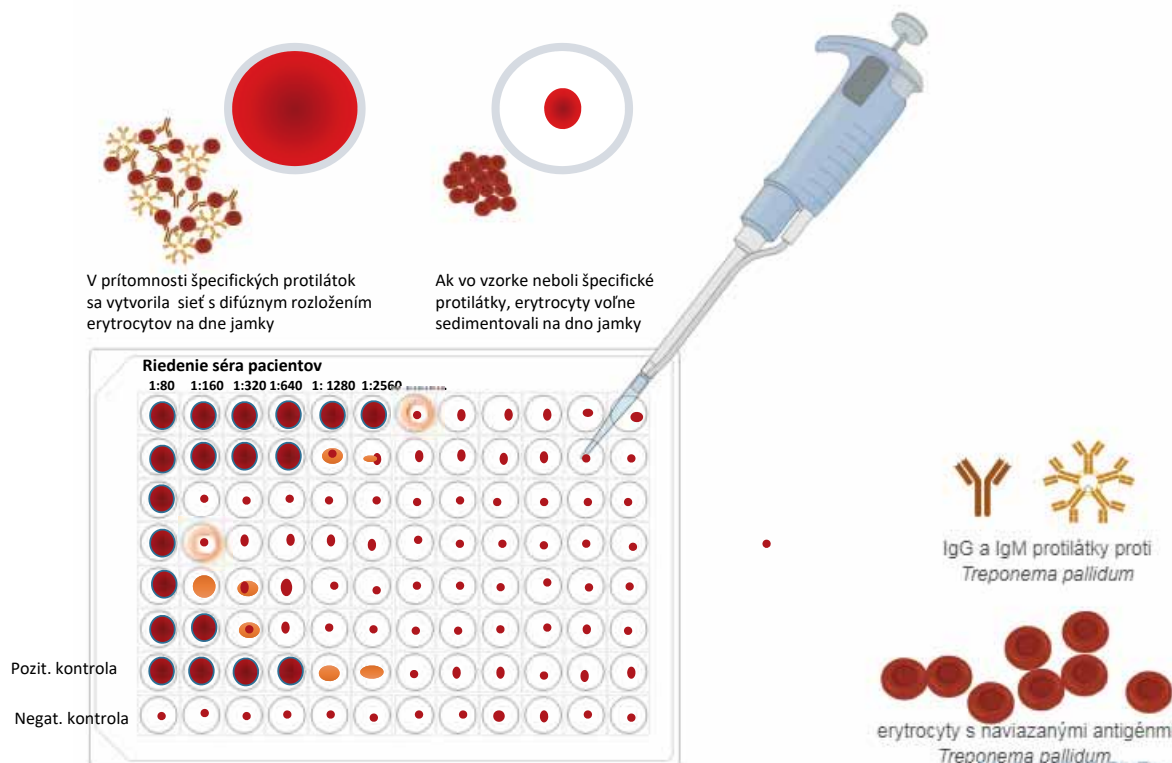
1.21.7 Nepriame metodiky dôkazu antigénu alebo protilátok

Sú to reakcie s naviazaným reakčným partnerom, t.j. špeciická protilátka alebo antigén na nosiči, ktorým býva latexová častica, živočíšne a ľudské erytrocyty, bakteriálna bunka, bentonit a pod. V názve týchto reakcií, kde je reaktant naviazaný na nosič, sa uvádza prívlastok **nepriama (pasívna)** aglutinácia. Na odlíšenie toho, že na nosiči je reaktantom naviazaná protilátka a nie antigén, je názov reakcie **nepriama reverzná (spät-ná) aglutinácia**. Metódy s naviazanými protilátkami alebo antigénmi sú latexová aglutinácia, koaglutinácia, nepriama (pasívna) hemaglutinácia a hemaglutinačno-inhibičný test. Radíme sem aj komplement viažucu reakciu (KVR) na dôkaz protilátok vo vyšetrovanom sére pacientov. Hoci pri nej nepozorujeme vznik špecifického imunokomplexu medzi pacientovými protilátkami a komplementárnym solubilným antigénom, jeho prítomnosť je zaznamenaná na princípe zábrany lýzy erytrocytov vyviazaním komplementu vzniknutým imunokomplexom, teda nepriamo. Pri uvedených reakciách je pre prípad pozitívneho výsledku potrebné vykonať aj kontrolnú reakciu s niektorými nosičmi, napr. latexovými časticami či živočíšnymi krvinkami bez naviazaných reakčných partnerov, aby sa vylúčila možnosť nešpecifickej reakcie (napr. reaktivita vyšetrovaného séra so samotným latexom alebo testačnou krvinkou).

Všetky uvedené metódy, pri ktorých sa stanovujú protilátky, možno vykonať kvalitatívne (neriedené alebo len raz nariedené sérum) pri vyhľadávacích reakciách (skrining), alebo semikvantitatívne v rade násobných riedení, kde posledné riedenie, v ktorom možno zaznamenať reakciu, udáva titer (sledovanie dynamiky).

LATEXOVÁ AGLUTINÁCIA

Veľmi často používanými imunochemickými reakciami, pri ktorých nosiče rozpustných antigénov, alebo naopak protilátok používajú latexové častice (ale aj iné syntetické materiály, napr. polystyrén). Ak je vo vzorke príslušný analyt, dôjde k vzniku



Obr. 1.21.9. Nepriama hemaglutinácia pri sérologickom stanovení prítomnosti protilátok proti *T. pallidum* testom TPHA (Treponema Pallidum Hem Agglutination).

viditeľných imunokomplexov (zhlukov, vločiek). Ak sú latexové častice nosičmi antigénov a používajú sa na dôkaz protilátok, reakciu nazývame **nepriama (pasívna) latexová aglutinácia**, ak sú na latexe naviazané špecifické protiátky, hovoríme o **nepriamej (pasívnej) spätnej (reverznej) latexovej aglutinácii (RPLA)**. RPLA sa často používa na dôkaz bakteriálnych toxínov. Testy majú formát buď na mikrotitračnej platničke – taký, ako na obr. 1.20.10 znázornený TPHA test (RPLA), alebo ako sklíčková aglutinácia, resp. aglutinácia na papierovej karte.

NEPRIAMA A NEPRIAMA PASÍVNA HEMAGLUTINÁCIA

Pri nepriamej aglutinácii sú **solubilné antigény naviazané na povrch krviniek** (ľudské erytrocyty skupiny 0 rh negat., živočíšne erytrocyty a pod.) a tak vstupujú do reakcie. Jednou z najčastejšie vykonávaných metód nepriamej hemaglutinácie je **TPHA** (obr. 1.20.10). Antigény získané z Nicholsonovho kmeňa *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* alebo analogické rekombinantné antigény sú naviazané na erytrocyty, ktoré sa inkubujú so sérom pacienta v rade dvojnásobných riedení. Ak sú v sére prítomné špecifické protilátky, vytvoria medzi erytrocytmi krížové väzby, ktoré spôsobia ich difúzny rozptyl na dne testickej jamky (pozitívna reakcia). V prípade, že v sére sa antitreponémové protilátky nenachádzajú, sedimentujú erytrocyty do stredu jamky v tvare gombíka.

Ak sú na erytrocyt naviazané protilátky, hovoríme o **nepriamej pasívnej (syn. reverznej, spätnej) hemaglutinácii**. V prípade, ak je dokazovaný analyt prítomný, dôjde k difúznej aglutinácii (homológny antigén), ktorá na dne skúmavky vytvorí rovnomerný povlak, ak prítomný nie je, sedimentujú erytrocyty na dno jamky a vytvoria gombík alebo prstenec.

Osobitnou sérologickou metódou medzi aglutinačnými technikami je **koaglutinácia**. Princíp je založený na využití schopnosti buniek *Staphylococcus aureus* viazať cez proteín A protilátky triedy IgG cez ich Fc fragment. Ak sú devitalizované a stabilizované bunky zlatého stafylokoka inkubované so špecifickými protilátkami, naviažu sa tieto cez svoj Fc koniec na bunku stafylokoka (senzibilizácia). Ak sa k nim pridá v roztoku homológny antigén z patientskej vzorky (stolica, likvor, sérum) alebo z izolovanej kultúry, dôjde k vzájomnému zosie-

ťovaniu komplexu troch členov reakcie (bunky stafylokoka, špecifické protilátky a antigénu hľadaného patogénu) a vzniknú viditeľné zhluky, ktoré potvrdia prítomnosť konkrétneho patogénu vo vzorke, resp. potvrdia druhovú identitu vyšetrovaného izolátu.

HEMAGLUTINÁČNO-INHIBIČNÝ TEST (HIT)

Niektoré vírusy, napr. vírus rubeoly, vytvárajú na povrchu viriónu aglutiníny, ktoré sú schopné aglutinovať erytrocyty, napr. kuracie. Ak sú vo vyšetrovanom sére protilátky proti týmto aglutinínom, dôjde k inhibícii aglutinácie (obr. 1.21.10).

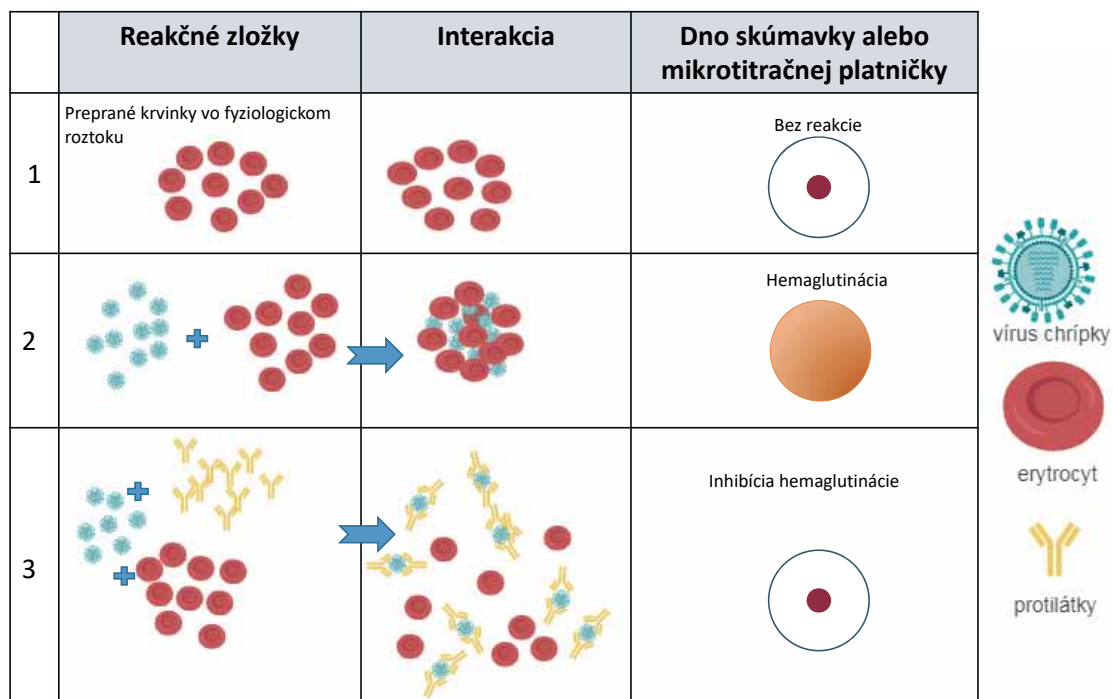
NEPRIAMY HEMAGLUTINÁČNO-INHIBIČNÝ TEST

Do reakcie sa použijú stabilizované krvinky s naviazanými homológnymi antigénmi a korešpondujúce protilátky, vyšetrovaný materiál (napríklad lyzát bunkovej kultúry, infikovanej neznámym sérotypom vírusu). Ak sa vo vyšetrovanom materiáli nenachádza komplementárny antigén, dôjde ku aglutinácii erytrocytov (tzn. negatívny výsledok). Ak tam antigén je, obsadí väzobné miesta na protilátkach a nedôjde k hemaglutinácii (vytvorenie prstenca alebo gombíka znamená pozitívny výsledok reakcie) (obr. 1.21.10).

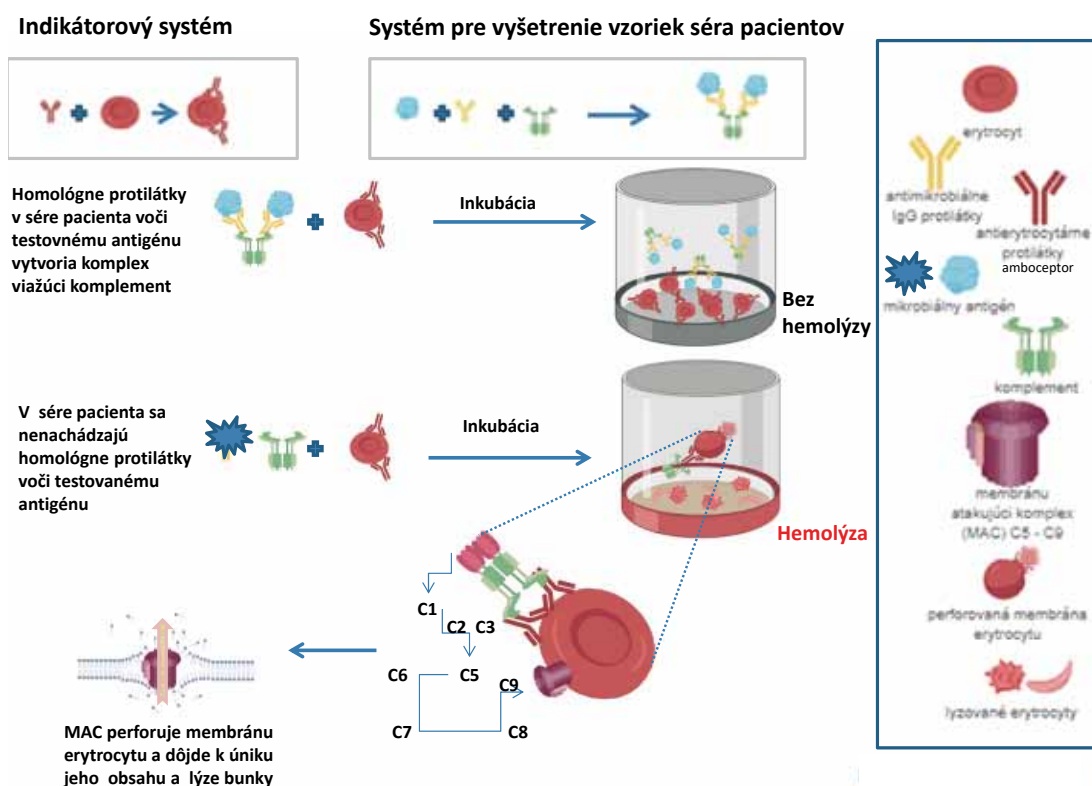
KOMPLEMENT VIAŽUCA REAKCIA (KVR)

Je to sérologická reakcia, pri ktorej sa diagnostický antigén viaže s homológnymi protilátkami a následne sa výsledok reakcie deteguje pomocou komplementu a hemolytického systému. Pokiaľ sú vo vzorke príslušné protilátky, je komplexom antigénu a špecifických protilátok komplement v reakcii vyviazaný a spotrebovaný, a to buď úplne, alebo čiastočne. Ak sa potom do reakcie pridá indikátorový hemolytický systém, pozostávajúci z komplexu erytrocytov s naviazanými antierytrocytárnymi protilátkami (amboceptor), nedôjde k lýze erytrocytov a krvinky sedimentujú na dno jamky (pozitívna reakcia). Ak vo vyšetrovanom materiáli nie sú homológne protilátky, je výsledok reakcie negatívny. To sa prejaví lýzou krviniek (obr. 1.21.11).

KVR má teda špecifickú a nešpecifickú fázu – v prvej sa komplement viaže na vznikajúce komplexy antigén-protilátka. Ak v prvej fáze nedošlo k väzbe komplementu, tento ostáva k dispozícii pre druhú fázu, keď sa komplement môže viazať s ďal-



Obr. 1.21.10. Hemaglutinácia krviniek vírusom chrípky (2) a hemaglutináčno inhibičný test (3) po pridaní protilátok proti príslušnému sérotypu vírusu.



Obr. 1.21.11. Princíp komplement viažúcej reakcie na stanovenie špecifických protilátok tried IgG a IgM v sére.

ším antigén-protilátkovým komplexom pridaným do reakcie (indikátorový, hemolytický systém). Hemolytický systém sa skladá z baraných erytrocytov a králičích protilátok proti týmto erytrocytom (komerčne sa dodávajú pod názvom amboceptor). Výsledok reakcie hodnotíme podľa hemolýzy baraných erytrocytov v hemolytickom systéme. Ak nedôjde k hemolýze, znamená to, že protilátky vo vyšetrovanom sére reagovali s diagnostickým antigénom a komplement sa spotreboval (neostal k dispozícii pre druhú fázu reakcie). Ak dôjde k hemolýze, znamená to, že dokazované protilátky nie sú prítomné, komplement ostal voľný a v druhej fáze spôsobí lýzu ovčích erytrocytov v indikátorovom systéme. Jednotlivé zložky KVR predstavujú diagnostický antigén (možno použiť solubilné alebo suspenzné antigény, pre každý antigén je potrebné vopred určiť optimálnu koncentráciu), pufovací roztok, vyšetrované sérum (musí byť číre a vopred sa inaktívuje 30 minút pri 56 °C, aby sa v ňom inaktivovali zložky komplementu pacienta), vodný kúpeľ 37 °C, komplement (čerstvé, hlboko zmrazené morčacie sérum), baranie erytrocyty, amboceptor. Pred každým pokusom sa musí robiť titrácia komplementu (rad analogického riedenia), pretože jeho nesprávne množstvo by mohlo viesť k nesprávnym výsledkom. Pri nedostatku komplementu by v druhej fáze nedošlo k úplnej hemolýze ani vtedy, ak by vyšetrované sérum neobsahovalo špecifické protilátky. Pri nadbytku komplementu by naopak došlo k hemolýze aj pri prítomnosti špecifických protilátok vo vyšetrovanom sére. Do reakcie pridáme dvojnásobok hemolytickej jednotky zvýšenej o 0,05 ml. Ako hemolytickú jednotku označujeme množstvo komplementu, ktoré spôsobí úplnú hemolýzu štandardného množstva baraných erytrocytov opsonizovaných homológnyimi protilátkami. Ak titrácia zistíme napríklad 1 hemolytickú jednotku v 0,15 ml morčacieho séra, do reakcie použijeme 0,40 ml uvedeného séra: $(0,15 + 0,05) \times 2 = 0,40$.

Príprava hemolytického systému spočíva v tom, že sa 2 % suspenzia 3-krát premytých ovčích erytrocytov zmieša s rovnakým objemom optimálne riedeného amboceptoru. Ku krvinkám sa amboceptor pridáva v množstve 2 – 4 minimálnych hemolytic-

kých dávok (MHD). 1 MHD je najvyššie riedenie amboceptoru, ktoré pri nadbytku komplementu umožní úplnú hemolýzu použitého množstva baraných erytrocytov. Pri komerčne dodávanom amboceptore výrobca toto riedenie udáva pre každú šaržu.

Komplement-viažúca reakcia sa môže uskutočňovať v modifikácii kvalitatívnej alebo kvantitatívnej, v makro- alebo mikro-modifikácii. Kvalitatívna reakcia sa robí s neriedeným sérom – určuje sa prítomnosť alebo neprítomnosť protilátok. Pri semikvantitatívnej reakcii sa vyšetrenie robí v rade skúmaviiek (alebo v mikrotitračnej platničke) s postupne riedeným sérom.

Výsledok reakcie sa hodnotí voľným okom, pričom v každej skúmavke sa zábrana hemolýzy semikvantitatívne určí od 0 po 4 krížiky, úplnej hemolýze zodpovedajú 4 krížiky. Za titer protilátok sa označí najvyššie riedenie séra, pri ktorom sa ešte pozoruje 50 % zábrana hemolýzy (hodnotenie na 2 krížiky).

KVR sa používa na dôkaz protilátok v sére a likvore. Do KVR vstupujú špecifické protilátky typu IgG a IgM (obe sú schopné aktivizovať komplement). Reakcia sa v praxi široko používala na nepriamu diagnostiku mnohých infekčných chorôb, ktorých antigény pôvodcu bolo možné získať v purifikovanej forme, napr. pri syfilise (Bordetova-Wassermanova reakcia, BWR), stanovení protilátok proti patogénnym baktériám (bordetelám, brucelám, boréliám, kampylobakterom, pôvodcom horúčky Q, epidemického škvrnitého týfusu a iným), proti takmer všetkým pôvodcom vírusových nákaz (napr. adenovírusom, cytomegalovírusom, EBV, a iné) a taktiež patogénnym prvkom a iným parazitom (toxoplazma, echinokoky).

Niekedy sú problémom falošne pozitívne výsledky, ktoré môžu byť podmienené prítomnosťou neželaných bunkových prímies, ktoré pochádzajú napríklad z bunkových línií, na ktorých boli kultivované vírusy pre účely získania vírusových antigénov. Tie môžu reagovať s protilátkami v pacientovom sére a viazať komplement. Preto je žiaduce robiť kontrolu s pridaním kontrolného antigénu (materiálu z neinfikovaných bunkových línií). Rovnako problematické môžu byť aj nešpecificky reagujúce protilátky v krvi pacienta, napr. typu reumatického faktora, ktoré sú schopné aktivovať komplement. V takom prí-

pade sa falošne pozitívne reakcie dajú odhaliť testovaním pacientovho séra bez pridania antigénu.

V súčasnosti čoraz viac klesá miera používania tejto metódy a obmedzuje sa čoraz viac len na vyhľadávanie pozitívnych pacientov, ktorí sú potom následne sérologicky vyšetrení inými, voči ochoreniu špecifickejšími metódami.

1.21.8 Stanovenie antigénu alebo protilátok označením reakčného partnera

IMUNOFLUORESCENČNÉ METODIKY

Spájajú v sebe histologické a imunologické techniky. Majú za cieľ dôkaz antigénu v tkanivách, bunkách a mikroorganizmoch, alebo dôkaz špecifických protilátok v krvi, likvore a pod. Delíme ich na metódy priamej a nepriamej imunofluorescencie. Pri **priamej imunofluorescencii je dokazovaný antigén** vo vyšetrovanom materiáli nanesený a fixovaný na podložné sklíčko a pomocou špecifických protilátok, označených fluorochrómom, je vizualizovaný. Pri **nepriamej imunofluorescencii sa dokazujú protilátky** vo vzorke, ktoré po inkubácii so špecifickým antigénom, naviazaným na sklíčko, vytvoria imunokomplex. Ten sa v ďalšom kroku vizualizuje pomocou fluorochrómom značeného antihumánneho séra – konjugátu (sekundárna cicavčia protilátka proti niektorej dokazovanej triede ľudských protilátok). Protilátky možno sériovo riediť (titrovať) a koncový titer bude predstavovať to riedenie, pri ktorom bude ešte zreteľná fluorescencia s typickou mikroskopickou textúrou.

Vizualizácia sa dosiahne v oboch prípadoch indukovaním fluorescence svetlom určitej vlnovej dĺžky (UV), ktoré vyvolá emisiu dobre viditeľného svetla. Viac sa uvádza v subkap. 11 Mikroskopické techniky v klinickej mikrobiológii.

IMUNOCHROMATOGRAFICKÉ TESTY

Konvenčné imunochromatografické metódy, ktoré sa v súčasnosti veľmi široko uplatňujú v mikrobiológii najmä na dôkaz antigénov (ale aj protilátok), slúžia len na kvalitatívny dôkaz. Sú založené na princípe chromatografickej separácie zložiek vzorky a postupného sledu reakcií antigénu a protilátok s ich imunofixáciou na nitrocelulózovej membráne. Po nakvapkaní vzorky na štartovaciu pozíciu sa tekutina jednosmerne šíri ďalej od štartu smerom k opačnému koncu membrány (dôsledkom pôsobenia kapilárnych síl). Za štartom (miesto nanesenia vzorky) je úsek s voľne rozpusteným konjugátom (protilátka označená naviazaným koloidným Au, Ag alebo farebnou latexovou časticou, ktoré slúžia ako reportérska značka). Vo vlhkom prostredí, ktoré vytvorí kvapalná vzorka v matrix nitrocelulózy dôjde k reakcii homológneho antigénu (pokiaľ bol prítomný vo vyšetrovanej vzorke) s konjugátom za vzniku komplexu antigén-konjugát. Vzniknutý voľný imunokomplex difunduje ďalej v poréznej membráne až po sekundárne protilátky, imobilizované v jednej línii kolmo na smer difúzie. Tie sa viažu na iný epitop dokazovaného antigénu v difundujúcom imunokomplexe. Ak bol vo vyšetrovanej vzorke homológny antigén, vznikne v mieste naviazania komplexu imobilizovaná protilátka-antigén-konjugát, čo sa prejaví farebným pásikom (nahromadenie kovu alebo farebného latexu v jednej línii), signalizujúci pozitívny výsledok. Nadbytok nenaviazaného konjugátu migruje ďalej membránou v smere difúzie a viaže sa na inú imobilizovanú protilátku, umiestnenú v druhom pásiku kolmo na smer difúzie, pričom vznikne druhý farebný pásik, ktorý signalizuje riadny priebeh reakcie.

1.21.9 Analýzy väzby ligandu

Použitím značeného partnera pri reakcii antigén – protilátka vhodnou reportérskou molekulou (značkou) možno významne zvýšiť citlivosť metódy. Tieto metódy sa preto nazývajú **imunoanalýzy**.

Pri väzbe stanovovanej látky sa v analýzach používajú špecifické receptory a ligandy. Pokiaľ označíme antigén alebo protilátku

(napr. enzýmom, rádionuklidom, fluorofórom, luminofórom) stáva sa značeným ligandom. Na naviazanie označeného ligandu sa okrem polyklonálnych a monoklonálnych protilátok používajú aj iné viažuce biomolekuly (biotín – streptavidín, avidín a iné). Kvantitatívne stanovenie značeného ligandu po naviazaní v imunochemickej reakcii môže prebehnúť vo vodnej fáze a podiel nenaviazaného ligandu sa meria v prítomnosti naviazaného (**homogénne analýzy**) a naopak, po oddelení viazaného ligandu od nenaviazaného sa meria buď jeho naviazaná frakcia, alebo naopak nenaviazaná (v oboch prípadoch ide o **heterogénne analýzy**).

HETEROGÉNNE ANALÝZY

Sem zaraďujeme **kompetitívne analýzy**, **sendvičové analýzy na stanovenie antigénu** (antigen capture assay) a **sendvičové analýzy na stanovenie protilátok** (antibody capture assay, napr. capture assay). Tieto metódy mali najčastejšie formát enzýmovej imunoanalýzy (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA), v súčasnosti ju čoraz viac nahrádzajú iné formáty LIA a FIA na uzatvorených automatoch, kde pevnú fázu tvoria magnetické guľičky.

a) Kompetitívne analýzy

Označený ligand v konštantnej koncentrácii konkuruje s rovnakým, ale neoznačeným analytom vo vzorke o väzbové pozície na antigénoch či protilátkach, ktoré sú takisto v konštantnej koncentrácii. Čím viac je stanovovaného analytu (buď antigénu alebo protilátok) vo vzorke pacienta, tým viac vytlačí značený ligand z väzieb a o to viac sa zníži zaznamenávaný signál. Vzniká teda nepriamo úmerný vzťah medzi známym množstvom značeného ligandu a množstvom analytu vo vzorke, ktorý umožňuje výpočet množstva analytu vo vzorke na základe kalibračnej krivky meraním signálu z reportéra.

Analyt je v reakcii naviazaný priamo alebo nepriamo na pevnú fázu, ktorou môže byť mikrotitračná platnička, dno skúmavky, magnetické častice, plastikové perličky a pod. Táto väzba umožňuje oddeliť naviazaný a nenaviazaný ligand.

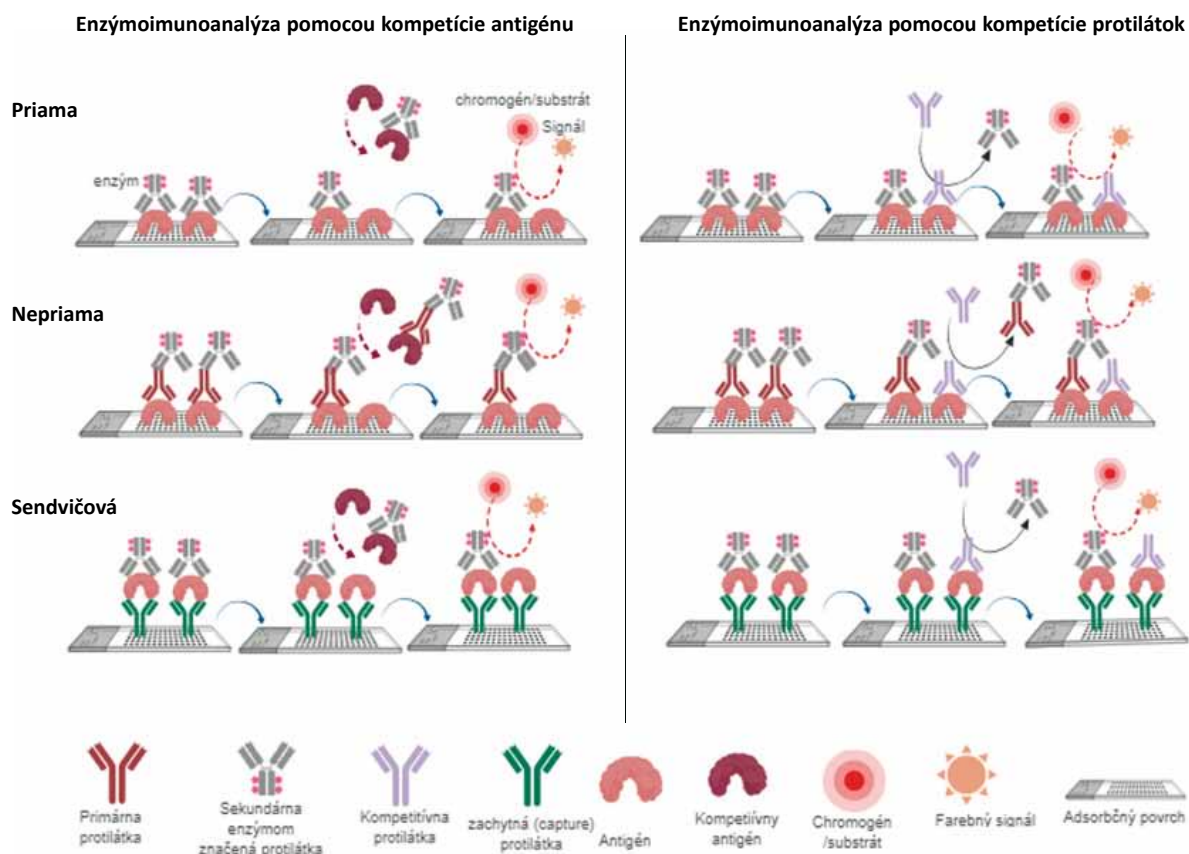
b) Sendvičové analýzy na dôkaz protilátok

Na dne platničky je adsorbovaný buď antigén, alebo záchytná protilátka pre stanovovaný typ protilátok vo vzorke séra. Ak je na dne jamky imobilizovaný antigén, po pridaní vzorky séra pacienta sa naň počas inkubácie naviažu homológne protilátky (ak boli v sére prítomné). Nenaviazané protilátky sa spolu so sérom odstránia premytím. V ďalšom kroku sa pridá do jamky konjugát, čo je značený antihumánny imunoglobulín a po jeho naviazaní na zachytenú protilátku dôjde k vytvoreniu sendvičovej väzby. Množstvo naviazanej značenej protilátky je proporcionálne voči naviazanému množstvu pacientových protilátok. Pri stanovovaní špecifických IgM protilátok sa ako konjugát použije špecifické antisérum proti μ -retazcu, ktoré vytvorí väzbu len s naviazaným IgM zo séra pacienta.

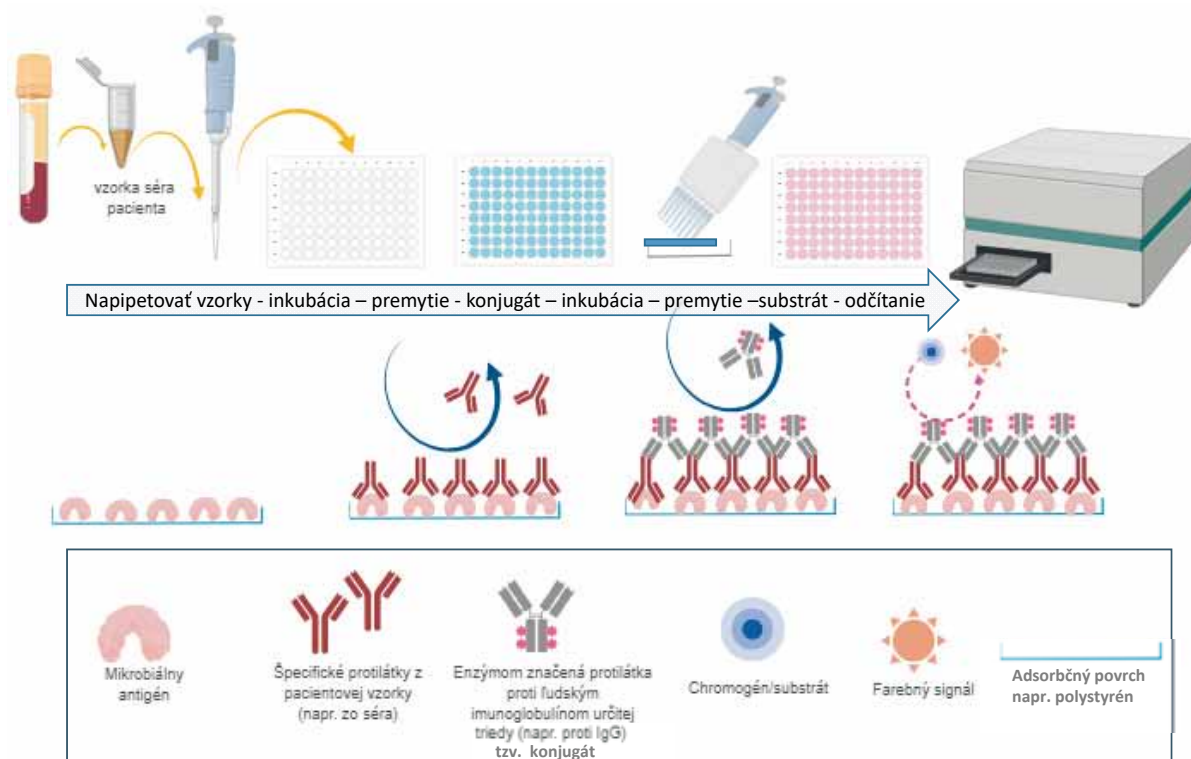
Ak sa na zachytenie protilátok vo vzorke na dne jamky imobilizuje protilátka, zväčša ide o testy na dôkaz IgM (μ -capture assay). Ako záchytné protilátky sa použijú zvieracie IgG s afinitou voči Fc regiónu ľudského IgM. Po pridaní patientského séra sa počas inkubácie na tieto viažu akékoľvek IgM protilátky, bez ohľadu na ich antigénnu špecificitu. Po skončení inkubácie sa jamka niekoľkokrát premyje puľom tak, aby sa odstránili všetky nenaviazané zložky séra. Potom sa do jamky pridá korešpondujúci antigén a znova sa premyje. Následne sa pridá konjugát so špecifickým IgG, značeným enzýmom (resp. inou reportérskou molekulou). Množstvo naviazanej značenej protilátky je proporcionálne voči naviazanému množstvu pacientových IgM protilátok. Existuje aj verzia tejto metódy, kedy sa ako ligand nepoužije značená protilátka, ale značený je homológny antigén (enzyme labeled antigen assay), čím sa zníži počet krokov.

HOMOGENNÉ IMUNOANALÝZY

Tieto metódy sú koncipované tak, aby nebolo medzi jednotlivými krokmi potrebné oddeľovať nenaviazané ligandy od naviazaných. Existuje viac konceptov, pre názornosť uvedieme dva postupy.



Obr. 1.21.12. Rôzne formáty kompetitívnej enzýmoimunoanalýzy (ELISA) na dôkaz antigénu alebo protilátok v biologickom materiáli.



Obr. 1.21.13. Postup pri vyšetrení vzorky séra na prítomnosť špecifických antimikrobiálnych protilátok pomocou ELISA (enzýmovej imunosorbent analýzy).

EMIT (enzyme multiplied immunoassay) prebieha podľa kompetitívneho princípu, pričom si konkurujú enzýmom značený homológny antigén (ligand) a antigén obsiahnutý vo vzorke o obmedzený počet väzobných protilátok. Enzým naviazaný na ligand je aktívny len vo voľnej, neviazanej forme. Po pridaní substrátu je jeho premena priamo úmerná množstvu antigénu vo vzorke. Táto technika sa využíva najmä na stanovenia analytov s malými molekulami, napr. na stanovenie hladín niektorých antibiotík (gentamicín, tobramycín alebo vankomycín) v telesných tekutinách.

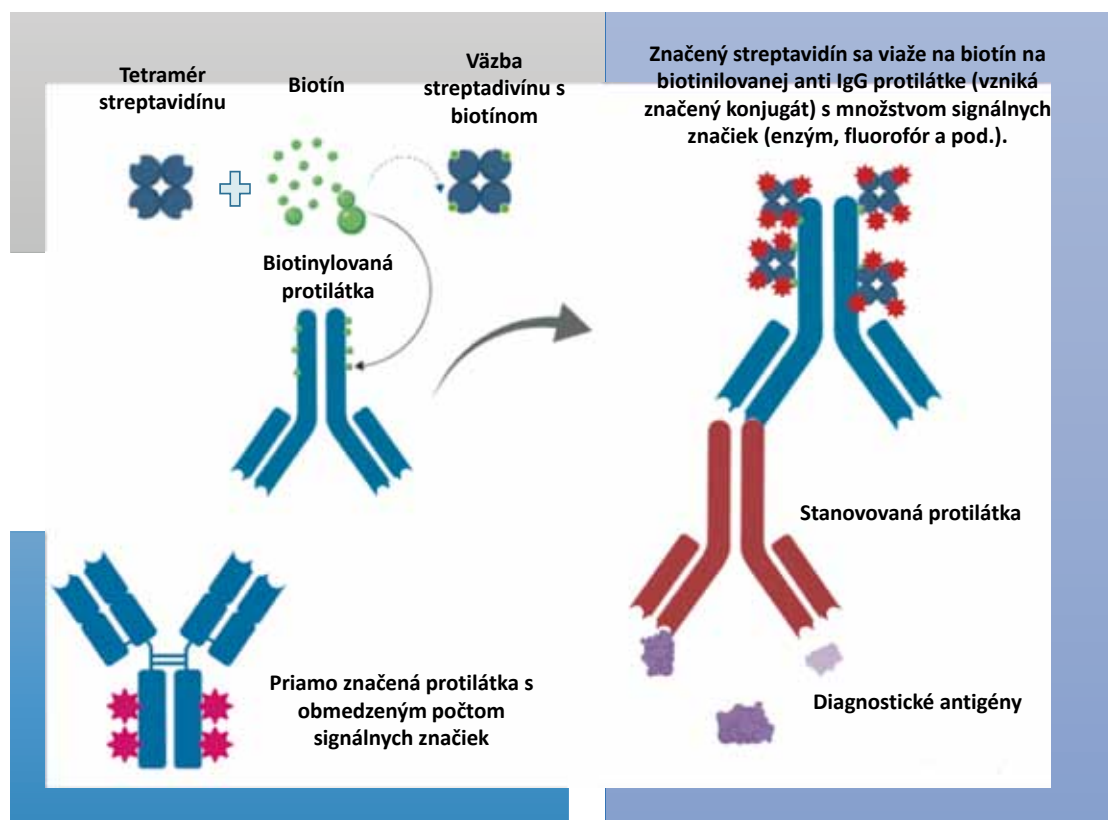
CEDIA (cloned enzyme donor immunoassay) je enzýmová imunoanalýza pomocou klonovaného enzýmového donora, pri ktorom je enzým (napr. β -galaktozidáza) rozdelený na 2 neaktívne časti, a to na enzýmového donora (darcu, 5% veľkosti enzýmu) a enzýmového akceptora (95% veľkosti enzýmu). Donor je viazaný na arteficiálny antigén, ktorý je identický s tým, ktorý chceme dokázať vo vzorke. Oba fragmenty enzýmu sú zároveň viazané na molekulu protilátky v takej vzájomnej pozícii, aby nebolo možné utvoriť aktívny enzým. Ak je v analyzovanej vzorke hľadaný voľný antigén, súťaží o pozíciu s viazaným antigénom na protilátke, a ak ho na princípe kompetície vytlačí, uvoľní sa arteficiálny antigén s naviazaným donorom a oba fragmenty enzýmu sa spoja do funkčného enzýmu s enzýmovou aktivitou, ktorý so substrátom vytvorí farebný produkt.

Jeden z variantov imunochromatografických testov bol tiež zostavený ako homogénna imunoanalýza. Na membráne je naviazaná protilátka pre stanovovaný antigén. Ak sa na membránu kvapne pacientova vzorka a enzýmom značený antigén (ligand). Oba antigény navzájom konkurujú o obmedzený počet imobilizovaných väzobných protilátok. Nenaviazaný antigén je chromatograficky premiestnený z reakčnej zóny a tam sa stanoví jeho katalytická aktivita pridaním substrátu. Je priamo úmerná množstvu antigénu vo vzorke.

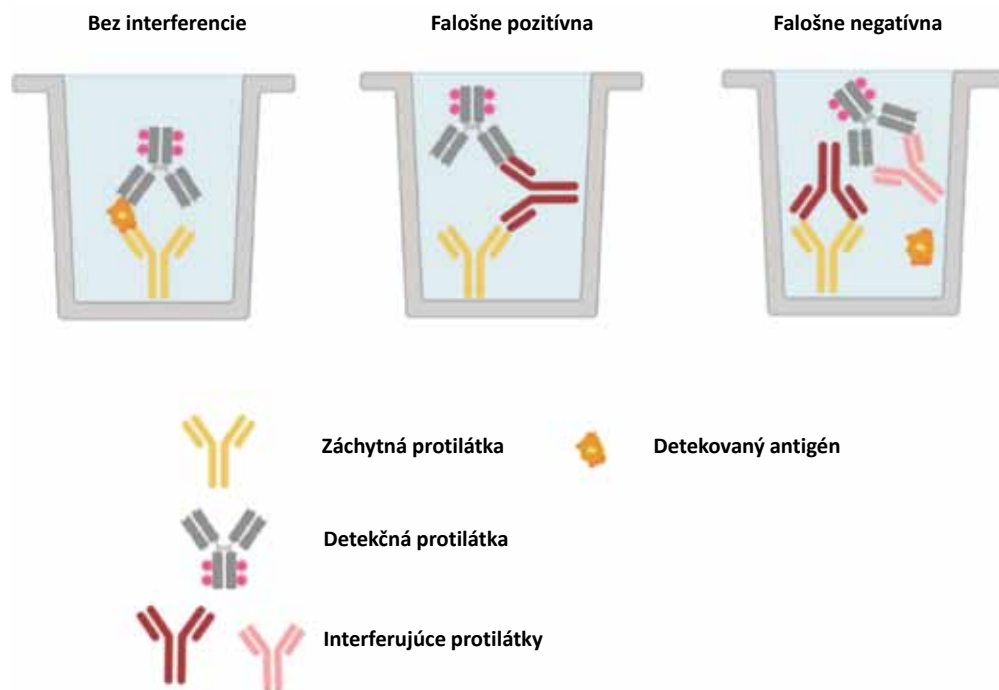
1.21.9.3 ZNAČENIE REAKČNÝCH PARTNEROV V IMUNOANALÝZACH

Na značenie antigénov alebo protilátok pri imunoanalýzach sa používajú ako reportérske molekuly (značky):

- 1. rádioizotopy** (rádioimunoanalýza), používa sa najčastejšie gama žiarič – izotop ^{125}I , alebo beta žiariče, ^3H alebo ^{14}C , v našom teritóriu sa v rámci klinickej mikrobiológie už nepoužívajú,
- 2. enzýmy** (enzýmová imunoanalýza – EIA), najčastejšie enzýmy ako alkalická fosfatáza, chrenová peroxidáza alebo glukóza – 6 fosfát-dehydrogenáza, ku ktorým sa pridáva špecifický substrát pre daný enzým a vytvorí sa farebný produkt, ktorého intenzita zafarbenia sa spektrofotometricky sa meria súčasne pri dvoch vlnových dĺžkach svetla. Pri enzýmovej analýze sa môžu použiť ako substrát aj prekursor fluorofórov, ktoré sa aktivitou enzýmu menia na opticky aktívnu stabilnú formu, ktorej fluorescencia sa potom meria,
- 3. fluorescenčné farbivá** – fluorofóry (metodika fluorescenčná imunoanalýza), sú to molekuly, ktoré absorbujú energiu a následne ju uvoľnia v podobe vyžiarovania fotónu s posunom vlnovej dĺžky a vytvára tak signál; komerčne úspešné sú metódy fluorimetrie sú TR-FIA (Time-Resolved Fluorescence Immuno-Assay) a FPIA (Fluorescence Polarization Immuno-Assay),
- 4. luminiscenčné látky** (metodika luminiscenčná imunoanalýza), ktoré po dodaní energie uvoľnia žiarenie. Podľa spôsobu indukcie sa delia na:
 - chemiluminiscenčné látky (luminol, akridíniumester, oxalát), ktoré uvoľnia svetlo po pridaní katalyzátorov, napr. chrenovej peroxidázy a peroxidu vodíka,
 - bioluminiscenčné látky (luciferín-luciferázový systém z hmyzu, húb, rias alebo baktérií), pri ktorých uvoľneniu energie predchádza chemická reakcia, napr. uvoľnenie ATP pyruvátkinázou a následne dôjde ku oxidácii luciferín enzýmom luciferázou na komplex, ktorý pri rozpade uvoľňuje svetlo,
 - elektroluminiscenčné luminofóry, ktoré sú oxidované na elektróde po indukcii elektrickým impulzom, pričom imunokomplex je na elektróde viazaný cez magnetické guľičky.



Obr. 1.21.14. Amplifikácia signálu viacnásobnou väzbou značkových molekúl na komplex biotín – avidín.



Obr. 1.21.15. Interferencia reagujúcich protilátok pri imunoanalýzach.

Patria sem viaceré komerčné formáty s vysokou analytickou citlivosťou, ktorá ich začína favorizovať medzi ostatnými imunoanalýzami, napr. LIA (Lumino Immuno Assay), ILMA (Immuno Lumino Metric Assay), CLIA (Chemi-Luminescent Immuno Assay), ECLIA (Electro Chemi Luminescence Immuno Assay).

AMPLIFIKÁCIA SIGNÁLU VÄZBOU BIOTÍN – AVIDÍN (STREPTAVIDÍN)

Formát niektorých imunoanalýz zahŕňa okrem imunochemickej reakcie aj zosilnenie (amplifikáciu) meraného signálu z reportérskych značiek, čím zvyšuje jej citlivosť. Najbežnejšie sa využíva vysoká väzobná schopnosť biotínu a streptavidínu. Biotín (vitamín B7) sa prirodzene nachádza aj v čreve, kde viaže avidín (nachádza sa v surovom vajecnom bielku) a bráni tak jeho absorpcii. Molekulu, takmer identickú avidínu a s rovnakou afinitou k biotínu tvoria aj streptomycéty. Je to streptavidín. Vzájomná afinita biotín – avidín sa využíva na detekciu biomolekúl (protilátky, antigény, nukleové kyseliny a pod.) pomocou reportérskych značiek. Biotinylizácia týchto molekúl (naviazanie biotínu na protilátky, antigény) je jednoduchá a neovplyvňuje ich imunochemické vlastnosti. Jedna taká molekula avidínu na seba viaže viac molekúl biotínu. V imunoanalýzach sa biotinylizuje antigén alebo protilátka, molekula avidínu zase na seba ľahko viaže reportérské molekuly. Jedna molekula avidínu je schopná viazať až štyri molekuly reportérskej molekuly, čo signál ešte viac zosilní. Afinita biotínu ku avidínu, resp. streptavidínu sa využíva nielen v imunoanalýzach, ale aj v platformách ako sú biočipy, v afinitnej chromatografii, v imunoblottingu, v prietokovej cytometrii a pod.

FAKTORY, KTORÉ MÔŽU RUŠIŤ PRIEBEH A VÝSLEDOK IMUNOANALÝZ

Faktorov, ktoré ovplyvňujú priebeh a môžu zapríčiniť nesprávny výsledok imunoanalýz môže byť viac. Mali by byť vopred riešené vhodným postupom, najmä tie predvídateľné, a tým systémovo odstrániť možné analytické chyby.

Prebytok antigénu (tzv. High-dose „hook“ efekt) sa vyskytuje najmä v sendvičových imunoanalýzach s jednou inkubáciou, po počiatočnom narastaní signálu proporcionálne k množstvu naväzovaného antigénu až po fázu, kedy vzniká prebytok antigénu, čo oslabuje väzbu a signál klesá. To spôsobí nespráv-

ne určenie hladiny stanovovaného analytu. Predchádzať možno tým, že sa vzorka nariedi (najmä pri titračných metódach, pri ktorých treba aj v skríningu použiť aspoň dve riedenia), resp. sa použije pri metóde s dvojistou inkubáciou (s premytím medzi jednotlivými inkubáciami).

Interferencia s reumatoidným faktorom (RF). RF sú auto-protilátky viažúce Fc časť IgG (sú imunoglobulíny väčšinou IgM izotypu, ale aj IgG a IgA). Reumatoidný faktor triedy IgM spôsobuje v sendvičovej imunoanalýze na dôkaz špecifických IgM protilátok falošne pozitívne výsledky v prípade, že sa vo vzorke nachádzajú aj špecifické IgG protilátky. Tie sa naviažu na komplementárny antigén a keďže ich Fc fragment viaže reumatoidný faktor, bude zase RF viazať konjugát na dôkaz ľudských IgM protilátok a tak vyjde test pozitívny na dôkaz prítomnosti špecifických IgM aj v prípade, že tam nie sú prítomné. Tomu sa dá predísť tým, že do vzorky na stanovenie špecifických IgM v prvom kroku pridáme protilátky proti ľudským IgG (tzv. RF absorbens) alebo izolujeme IgM od IgG pri ultracentrifugácii v sacharózovom gradiente v 19S frakcii (IgM sú ťažšie ako IgG, pozri kap. 1.10). Tieto situácie sú kritické najmä pri sérologickom obhajňovaní intrauterinných infekcií plodu (napr. syfilis, CMV infekcia, rubeola, toxoplazmóza a iné) alebo dôkaze recentného syfilisu u dospelých. Podobné situácie, vyvolané prítomnosťou **interferujúcich protilátok**, môžu nastať aj pri niektorých autoimunitných (autoprotiátky) alebo infekčných ochoreniach (napr. prítomnosť heterofilných protilátok pri infekčnej mononukleóze), ale aj pri fyziologických stavoch, napr. v gravidite. Interferujúce protilátky sa vytvárajú v makroorganizme aj pri jeho expozícii imunogénom z iných živočíšnych druhov, napr. myším – tvoria sa HAMA (Human Anti Mouse Antibodies) protilátky. Tie potom reagujú s diagnostickými myšimi protilátkami v diagnostických súpravách a vytvárajú falošne pozitívne alebo negatívne výsledky. Na interferenciu je potrebné myslieť vždy, ak sa výsledok analýzy nezhoduje s inými výsledkami, resp. predchádzajúcimi vyšetreniami alebo klinickou diagnózou pacienta.

Krížovo reagujúce protilátky. Niektoré baktérie, ale aj vírusy či parazity rozdielnych druhov tvoria antigény, ktorých štruktúra je tak vzájomne podobná, že v makroorganizme navodia tvorbu protilátok nešpecificky reagujúcich s antigénmi iného mikrobiálneho druhu. Tento fenomén je známy napr. pri dokazovaní špecifických protilátok proti *T. pallidum* alebo

B. burgdorferi sensu lato. Systémovo sa to rieši vysýtením krížovo reagujúcich protilátok pomocou sonikátu z *Treponema phagedenis* (pre človeka nepatogénnej spirochety). Vysýtenie krížovo reagujúcich protilátok je tak súčasťou niektorých štandardných metodík, napr. v fluorescenčnom teste absorpcie antitreponemálnych protilátok (FTA ABS, Fluorescent treponemal antibody absorption test) v rámci dôkazu špecifických protilátok proti *T. pallidum* pri syfilise. Ako bolo už uvedené, tento fenomén sa v niektorých testoch dokonca využíval v diagnostike niektorých infekcií, napr. antigény *Proteus* spp. na dôkaz protilátok proti riketsiám alebo kardiolipín (hovädzí) na dôkaz nešpecifických protilátok pri syfilise (rýchla reagínová reakcia).

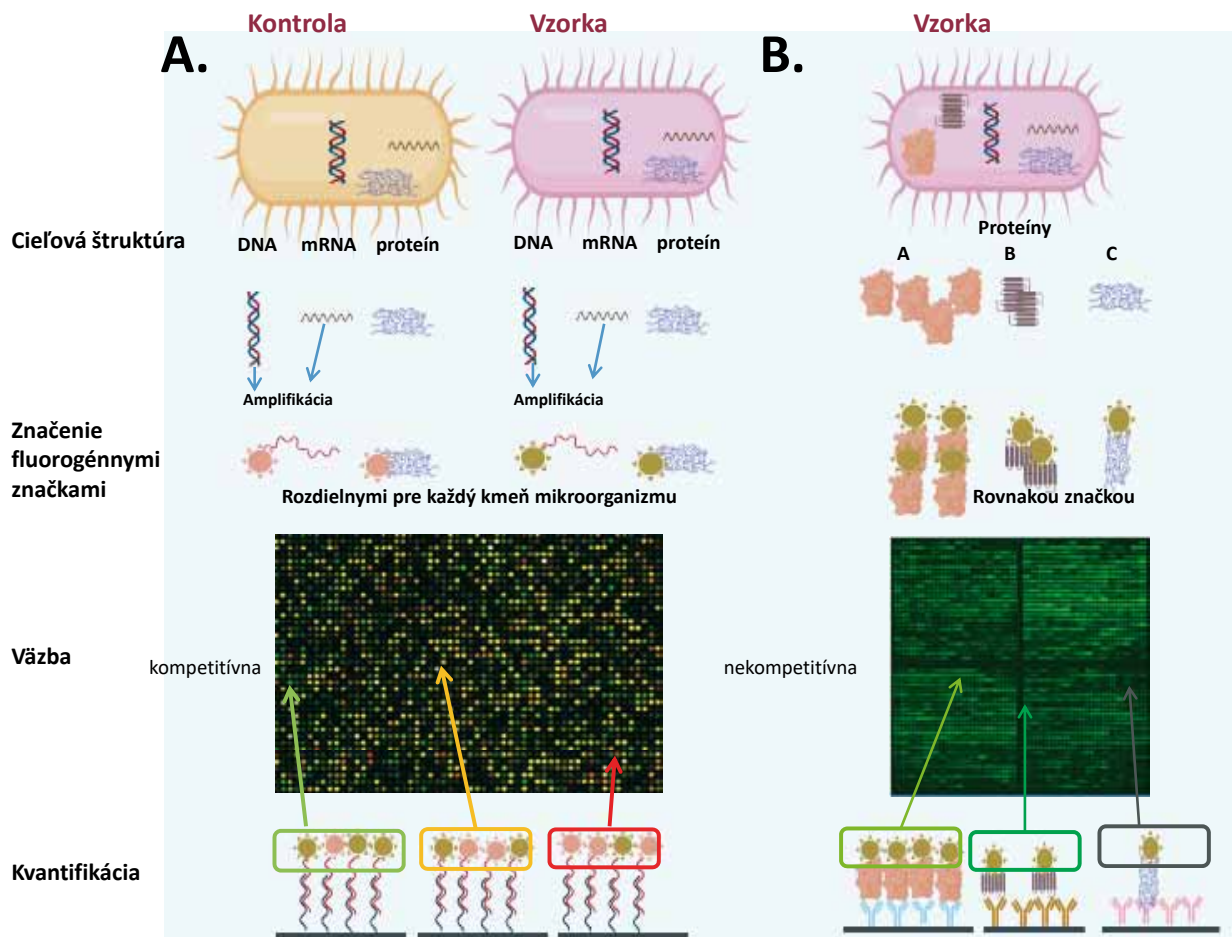
1.21.10 Imunoblot

Blotovanie znamená prenos látok (proteíny, nukleové kyseliny), ktoré boli predtým elektroforeticky rozdelené v polyakrylamidovom géli, na pevnú matrix (napr. nitrocelulóзовé membrány). Táto metodika umožňuje pracovať s identickou kópiou vzorca elektroforeticky rozdelených molekúl v imobilizovanej podobe na pevnej fáze vykonať rozličné metódy identifikácie jednotlivých molekúl, ktoré nemožno vykonať v géli. Pri western blote (WB, imunoblot, proteínový blot) sa väčšinou pomocou prenesených proteínov dokazuje prítomnosť špecifických protilátok proti jednotlivým antigénom daného mikrobiálneho agens vo vzorke séra pacienta. Používajú sa zväčša na potvrdenie pozitívnych výsledkov vyšetrenia sér inou metódou

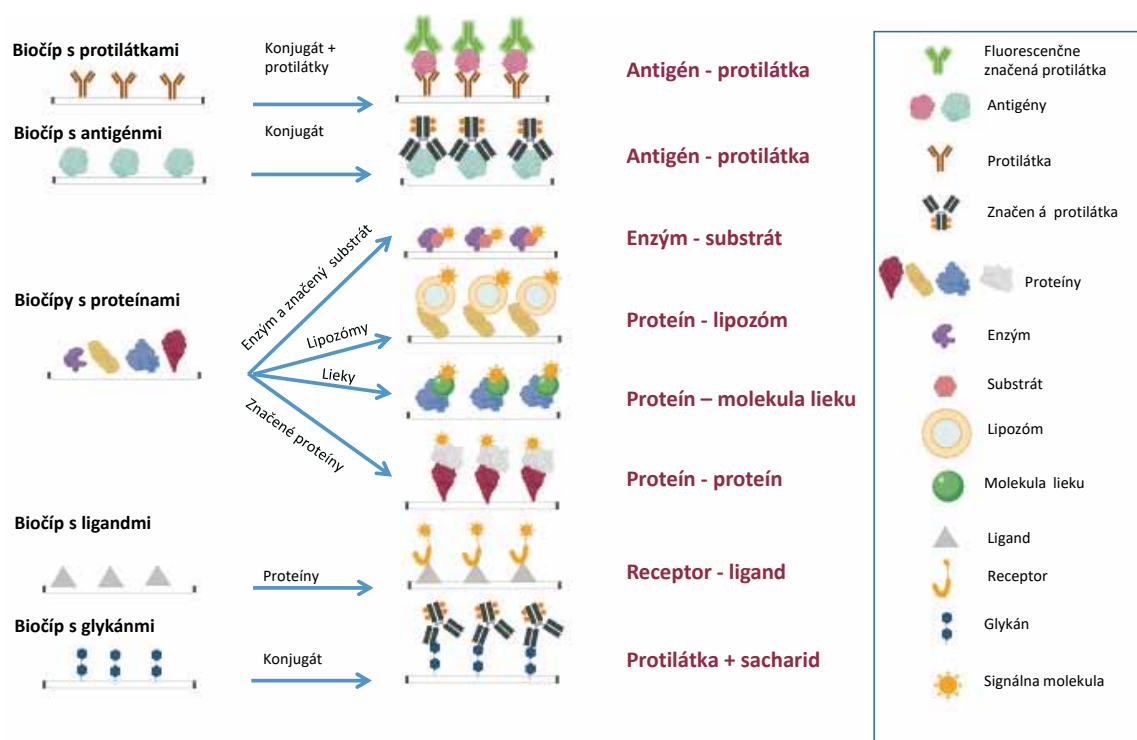
imunoanalýzy alebo nadstavbovú diagnostiku. Po pridaní pacientovho séra do inkubačnej komory s WB pásikom (striptom) dôjde naviazaniu tam prítomných špecifických protilátok na jednotlivé antigény na WB. Po ich naviazaní sa pridajú enzýmom značené sekundárne protilátky proti ľudským imunoglobulínom (proti IgG, IgM a IgA), a do reakcie sa po inkubácii a premytí pridá substrát, spôsobujúci farebnú zmenu. Tak sa v mieste naviazaných protilátok vytvorí tmavý pruh (band). Vzorec pruhov na stripe sa porovná voči štandardu (kľúču) a vyhodnotí sa (bandy s protilátkami voči špecifickým antigénom indikujú infekciu daným mikroorganizmom, bandy pri nešpecifických antigénoch môžu v určitých prípadoch objasniť predchádzajúcu reaktivitu vzorky v inej imunoanalýze a pod.).

1.21.11 Proteínové čipy (proteome microarrays)

Čipy predstavujú moderné molekulárno-biologické systémy, ktoré umožňujú paralelne realizovať tisíce reakcií v malom množstve biologického materiálu na malom priestore, preto ich zaraďujeme do multiplexových analýz. Pre klinickú mikrobiológiu sú perspektívne najmä dva typy – proteínové a genetické. Proteínové čipy boli vyvíjané z technológií pôvodne určených na analýzu DNA. Princíp metód, na ktorom pracujú, je rovnaký ako pri ostatných imunoanalýzach, ich podstata je len v miniaturizácii, automatizácii, koncepte detekčných techník (napr. laser, hybridizácia a iné), v softvérovom riadení procesu a vyhod-



Obr. 1.21.16. Biočipy (microarray) na zistenie génovej variability (DNA sekvencie), resp. porovnanie alebo určenie génovej expresie mikroorganizmov (mRNA, proteíny). A. genómový a proteomický s kompetíciou. Zelené spoty označujú preferenčnú väzbu sekvencií NK, resp. antigénov klonu mikroorganizmu zo skúmanej vzorky, červené spoty naopak, preferenčne viažu špecifické sekvencie kontrolného mikroorganizmu. Žlté spoty označujú sekvencie, resp. antigény, s rovnakou afinitou k sekvenciám (resp. antigénom) oboch klonov. B. proteomický; proteíny mikroorganizmu, ktoré sú najviac exprimované, tak viažu najviac chromatofórov a dané spoty žiaria najintenzívnejšie. Naopak, najmenej exprimované proteíny žiaria najmenej intenzívne (upravené podľa: <https://ai2-s2-public.s3.amazonaws.com/figures/2017-08-08/d85ad5b2315933da3523075a263bfe2741dde61f/3-Figure3-1>).



Obr. 1.21.17. Príklady využiteľných väzieb na výrobu proteomických biočipov.

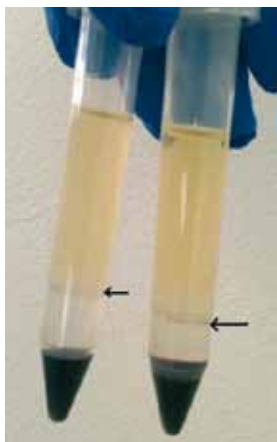
notenia. Vďaka veľkému počtu testov, ktoré možno uskutočniť súčasne – a dobrým možnostiam automatizácie – sa táto technológia rýchle vyvinula ako dôležitá súčasť výskumu v oblasti farmácie, medicíny, biochémie a molekulárnej biológie a postupne sa uplatňuje aj v klinickej mikrobiológii. Podobne ako počítačový čip poskytujú mnohé informácie na malom priestore. Proteínové čipy (podobne ako DNA čipy) obsahujú množstvo testovacích bodov na malej ploche, pričom na každom testovacom bode sú nanosené a fixované malé množstvá proteínov. Protilátky alebo antigény sa nanášajú (naspotujú) na planárne povrchy, ktorými sú silikónové čipy alebo sklenené sklíčka s nitrocelulózovou membránou (FAST slides). Čipy tak predstavujú priestorovo usporiadané reagenty na pevnom povrchu, každý bod (spot) obsahuje definovanú protilátku (antibody microarrays) alebo antigén (antigen array). Presná pozícia bodu so špecifickou protilátkou/antigénom na čipe definuje typ analyzovanej látky, ktorá je stanovovaná. Nanášanie vzoriek na čip vyžaduje vysokú presnosť a možno ho uskutočniť prostredníctvom špeciálneho prístroja. Každé políčko, v ktorom nedôjde ku žiadnej interakcii, ostane po premytí prázdne. Detekčná metóda umožní následne rozlíšenie medzi bodmi, na ktorých došlo ku proteín-proteínovej interakcii a tými, pri ktorých nedošlo k reakcii. Analyzované proteíny sú kvantifikované na základe rôznych princípov, ktoré vytvárajú meraný signál – napr. enzýmovými reakciami, fluorescenciou, chemiluminiscenciou, rádioaktivitou, kolorimetricky a intenzita signálu je detegovaná určeným typom skeneru (kamery). Na vyhodnotenie sa používa špeciálny softvér, ktorý vyhodnotí intenzitu signálu v danom bode a porovná ho s kalibračnou krivkou, ako aj s pozitívnou a negatívnou kontrolou. Pri čipoch priamej technológie je analyzovaná vždy len jedna vzorka a môže byť tak stanovené paralelne veľké množstvo proteínov v nej. Na reverzných čipoch je imobilizované väčšie množstvo rôznych vzoriek a dá sa tak paralelne stanoviť jeden konkrétny proteín vo veľkom množstve vzoriek. Proteínové čipy možno rozlíšiť v závislosti od typu interakcie (aptaméry, proteín-DNA, proteín-RNA, proteín-lektín, proteín-lipid, proteín-glykán, antigén-protilátka, enzým-substrát, receptor-proteín a iné).

1.21.12 Dôkaz špecifickej bunkovej imunitnej odpovede testami in vitro

Diagnostika infekcií pomocou dôkazu špecifickej bunkovej imunity je založená na stanovení produkcie interferónu γ aktivovanými T-lymfocyty po ich expozícii druhovo špecifickými antigénmi pôvodcu. Preto sa nazývajú IGRA testy (Interferon gamma release assay). IFN- γ je produktom aktivovaných Th1, cytotoxických T-lymfocytov a NK buniek. V rutinej praxi sa využívajú IGRA testy predovšetkým pre diagnostiku latentnej tuberkulózy a iných intracelulárnych patogénov, vyvolávajúcich oneskorenú, bunkovú imunitnú reakciu (IV typ hypersenzitívnej reakcie). Používajú sa dva typy testov – QUANTIFERON (napr. QuantiFeron®-TB Gold Plus) a ELISPOT (napr. T-SPOT® TB). V testoch QUANTIFERON sa kvantitatívne stanovuje hladina interferónu v plnej krvi kvantitatívnou sendvičovou ELISA metódou. Princípom testu ELISPOT (napr. T-SPOT® TB) je metóda, založená na dôkaze špecifických efektorových T-buniek odpovedajúcich na stimuláciu tvorbou IFN- γ . Oba spomenuté testy sú vhodné pre nepriamu diagnostiku latentnej aj aktívnej infekcie kmeňmi *M. tuberculosis* komplexu, T-SPOT® TB test je určený predovšetkým ako test druhej voľby u pacientov s nejasnými, resp. nejednoznačnými výsledkami testu QuantiFeron®-TB Gold Plus a u pacientov so závažnou poruchou imunity. Ani jeden z testov nereaguje skrížene v prípade, že pacient bol očkovaný BCG vakcínou. Pri tuberkulóze vyvolanej *M. tuberculosis* sa v rámci bunkovej imunitnej odpovede na infekciu selektuje populácia pamäťových buniek senzibilizovaných špecifickými mykobakteriálnymi antigénmi. Pokiaľ sú tieto bunky znovu stimulované prítomnosťou rovnakých antigénov, začnú produkovať Th1 cytokín – interferón γ , a to aj in vitro. V testoch QUANTIFERON aj ELISPOT sa pracuje s odobranou plnou heparinizovanou krvou pacienta a purifikovanými antigénmi *M. tuberculosis*. Postupuje sa dvoma spôsobmi. V teste QUANTIFERON sa odoberie periférna krv do štyroch špeciálnych skúmaviek, vo dvoch sú antigény *M. tuberculosis* (ESAT-6, CFP-10 a TB 7,7), v tretej je mitogén – t. j. pozitívna kontrola, štvrtá označená ako NIL – negatívna kontrola s fyziologickým

roztokom. Tým možno sledovať aktivitu CD4+ aj CD8+ T lymfocytov. Potom sa inkubuje plná krv s antigénmi po dobu 18 – 24 hodín, po inkubácii sa produkcia cytokínu v lymfocytoch ukončí zastavením reakcie a krv sa scentrifuguje. Po odstránení krvných elementov sa meria množstvo interferónu γ v supernatante metódou ELISA a porovnáva sa s hodnotami kontrol, ktoré boli nešpecificky stimulované (mitogén), resp. neboli stimulované. Pri druhom postupe ELISpot sa stanovuje počet buniek, produkujúcich interferón γ z izolovanej suspenzie periférnych mononukleárov, inkubovaných s antigénmi *M. tuberculosis* (ESAT-6, CFP-10) podobne vo dvoch jamkách, ktoré majú na dne imobilizované protilátky proti interferónu γ . Pri inkubácii najprv špecifické pamäťové T-lymfocyty začnú secernovať interferón γ a ten sa *in situ* viaže na imobilizované protilátky. Po odstránení buniek sa použije konjugát, ktorým sa vizualizuje miesto, na ktorom bol lymfocyt secernujúci interferón γ . Konjugát sa naviaže na protilátkami imobilizovaný interferón γ a po pridaní substrátu sa objaví farebný bod (spot), vyznačujúci pozíciu špecificky stimulovaného T-lymfocyту. Následne sa spočíta počet spotov v testovacej jamke a tým sa stanoví, koľko T-lymfocytov pacienta v určenom objeme krvi bolo aktivovaných stimuláciou antigénmi *M. tuberculosis* a počet sa po odčítaní počtu spotov z negatívnej kontroly porovná s normou.

Pomocou tejto metodiky možno doplniť diagnostiku niektorých iných ochorení, ako je tuberkulóza. Ide najmä o prípady, kde ostatné diagnostické metódy narazili na svoje limity, akými sú pri dôkazoch protilátok napríklad séronegatívna lymská borelióza. Takýto test (Lyme spot) má odlišný princíp ako metódy stanovujúce protilátky (ELISA, WB) a doplnia tak často zle interpretovateľné výsledky sérologickej diagnostiky, napr. v neskorých štádiách lymskej boreliózy. Používa sa rovnako ako QUANTIFERON (QuantiFeron®-CMV) aj na sledovanie reaktívacie cytomegalovírusu pri pacientoch po transplantáciách, pri EBV infekciách a pod.



Obr. 1.21.18. T-SPOT separácia monocytov (foto: Monika Poľanová).

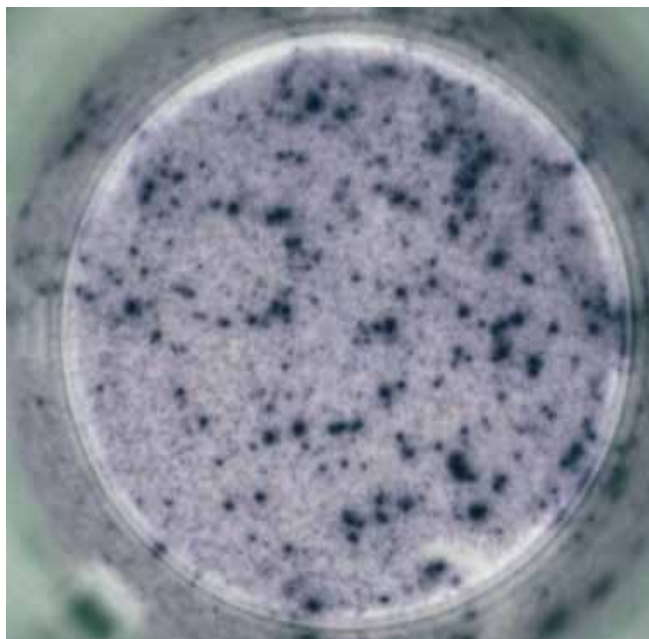
Vývoj v týchto metodikách neustále pokračuje a tak sa vyvíjajú nové testy, napr. pre simultánne stanovenie dvoch a viac typov cytokínov, produkovaných aktiváciou špecifickej populácie lymfocytov pomocou fluorescenčne značených protilátok. Nahradenie enzýmového značenia fluorescenčnými značkami zvyšuje špecificitu analýz. ELISpot v novej generácii už môže byť použitý aj na rozlíšenie medzi podskupinami aktivovaných T lymfocytov. Napríklad bunky Th1 sú charakterizované ich produkciou IFN- γ , IL-2 a TNF- α , zatiaľ čo Th2 bunky produkujú iné cytokíny, ako sú IL-4, IL-5 a IL-13. Rovnako tieto technológie rozširujú svoje diagnostické portfólio aj na analýzu B-lymfocytov. ELISpot B-lymfocytov je nová metóda používaná na analýzu protilátkovej imunity. Hlavné aplikácie zahŕňajú detekciu odpovede B-lymfocytov jednak na infekciu, ale aj odpovede vyvolanej očkovaním. ELISpot B-lymfocytov je test zameraný priamo na bunky tvoriace protilátky (plazmatické bunky).

Umožňuje identifikovať plazmatické bunky vo vzorke a zmerať ich celkový počet, rovnako ako kvantifikovať tie, ktoré produkujú protilátky proti určitému antigénu. S pomocou ELISpotu pre B-lymfocyty možno dokázať prítomnosť a množstvo pamäťových B-lymfocytov v krvi, ktoré je ťažké určiť inými spôsobmi.

Veľmi perspektívne je u všetkých spomenutých metodík spojenie s technológiou prietokovej cytometrie.



Obr. 1.21.19. T-SPOT web kamera na odčítanie testu (foto: Monika Poľanová).



Obr. 1.21.20. T-SPOT výsledok.

LITERATÚRA

1. De Paschale M., Clerici P.: Sérological diagnosis of Epstein-Barr virus infection: Problems and solutions. *World J Virol*, 2012, 12, 1(1): 31-43. doi: 10.5501/wjv.v1.i1.31.
2. Hučková D., Predný J., Holečková K., Ondrkálová M.: Stanovenie protilátok v likvore a ich využitie pre diagnostiku neuroinfekcií. *Klinická mikrobiológia a infekčný lékafství*, 1999, 5(6): 192-197.
3. Thomas L.: Labor und Diagnose – Indikation und Bewertung von Laborbefunden für die medizinische Diagnostik. 8. Auflage 2012. ISBN 978-3-9805215-8-1.
4. Solovič I.: Latentná tuberkulózná infekcia a biologická liečba. *Via pract*, 2013, 10(3-4): 105-108.

5. Schubert O. et al.: The Mtb Proteome Library: A Resource of Assays to Quantify the Complete Proteome of Mycobacterium tuberculosis. *Cell Host & Microbe*, 2013, 13(5): 602-612.
6. Koedel U., Fingerle V., Pfister H.W.: Lyme neuroborreliosis-epidemiology, diagnosis and management. *Nat Rev Neurol*, 2015, 11: 446-456.
7. Sanavio B., Krol S.: On the slow diffusion of point-of-care systems in therapeutic drug monitoring. *Front Bioeng Biotechnol*, 26 February 2015. | <https://doi.org/10.3389/fbioe.2015.00020>
8. Chotiyaputta W, Lok AS. Hepatitis B virus variants. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2009;6:453-62.
9. <http://www.antimicrobe.org/v22.asp#t4>
10. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2015.00020>



Prietoková cytometria umožňuje rýchlu analýzu jednotlivých buniek v zmesi, a to tak mikrobiálnych (bakteriálnych, mikromycét, parazitov), ako aj živočíšnych a ľudských (vrátane infikovaných, napr. vírusom). V mikrobiológii prietoková cytometria umožňuje spoľahlivú a rýchlu **detekciu jednotlivých alebo viacerých druhov mikróbov, ich kvantifikáciu a môže poskytnúť informácie o ich distribúcii sledovaných vlastností v populáciách buniek**. Prietoková cytometria môže pomôcť k rýchlejšiemu zisťovaniu životaschopnosti mikroorganizmov a zároveň k lepšiemu určeniu všetkých bakteriálnych buniek v danej populácii. Možnosti mikrobiologickej diagnostiky pomocou prietokovej cytometrie sa výrazne rozšírili jej **prepojením s inými molekulárno-biologickými metódami**, predovšetkým imunochemickými reakciami, fluorometriou a využitím technológií mikropartikulárnych nosičov záchytných molekúl (antigénov, protilátok, génových sond a pod.).

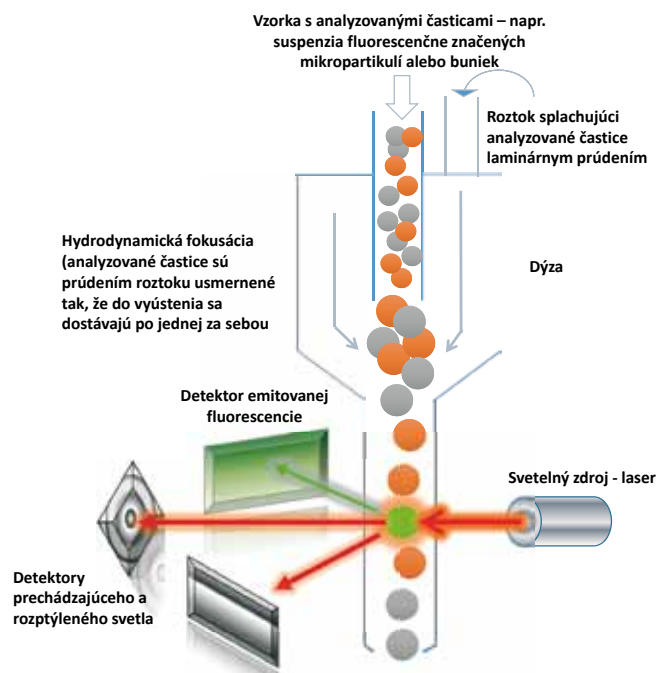
Táto analytická metóda umožňuje rýchle simultánne meranie **dvoch veličín na jednej cieľovej štruktúre** (bunka, umelý sférický nosič a pod.) pomocou vyslaného svetelného lúča. Meria jednak **svetlo rozptýlené na tejto štruktúre**, jednak **fluorescenčnú emisiu**, produkovanú fluorescenčnými alebo chromogénnymi molekulami, viazanými na skúmaných štruktúrach po zásahu svetelným lúčom vhodnej vlnovej dĺžky. Bunky alebo častice (napr. mikrosféry s naviazanými mikrobiálnymi antigénmi alebo antimikrobiálnymi protilátkami) sú suspendované v kvapaline. Na nich sú špecificky naviazané farbivá, ktoré vytvárajú merateľný signál. Ten sa zaznamená pri prechádzaní jednotlivých buniek alebo častíc cez lúč svetla (obr. 1.22.1). Samostatné meranie rozptýleného svetla alebo indukovaného optického signálu každej bunky či častice je zabezpečené prietokom buniek (častíc) cez dýzu na dne plného kužeľa, ktorý zabezpečí rovnomerné rozloženie kvapaliny a rozptýl meraných častíc v nej. Každá bunka tak v danom čase prechádza lúčom jednotlivo. Optický systém zaostrí dopadajúce svetlo na bunku, ktorá je práve v svetelnom ohnisku, čím sa vytvorí rozptyl svetla na štruktúre bunky a zároveň je zaznamenaná aj fluorescencia, emitovaná fluorochrómami naviazaných na pretekajúcich bunkách. Oba optické signály sú smerované na príslušné fotonásobiče. Elektronický systém transformuje dopadajúce svetlo z fluorescence a rozptýleného svetla na elektrické impulzy. Rozptýlené svetlo merané v rovnakom smere ako dopadajúce svetlo súvisí s veľkosťou bunky a rozptýlené svetlo zozbierané pod uhlom 90° udáva tvar a zloženie častíc. Zaznamenané hodnoty súvisia so štruktúrou povrchu bunky a počtom organel, prítomných v bunke. Veľkosť, povrch a zloženie bunky sa považujú za **vnútorné parametre**, pretože sa dajú získať bez nutnosti farbenia vzorky.

Na získanie ďalších informácií sa vzorky sa musia označiť pomocou rôznych fluorochrómov, resp. chromogénov. Fluorochrómy sa dajú klasifikovať podľa ich mechanizmu aktivácie:

- fluorescencia analyzovaných buniek vytvorená väzbou rôznych flórescenčných farbív** na špecifické bunkové zloženie, ako sú proteíny (napr. fluoresceín izotiokyanát FITC), nukleové kyseliny (propídiumpodjodid - PI) a lipidy (nilska červen); (pozri aj kap. 1.19 Optické metódy),
- fluorescencia závislá od bunkových fyziologických parametrov** (pH, membránový potenciál atď.),

- fluorescencia** alebo fotomerateľný signál závislý od enzymatickej aktivity (fluorogénne, resp. chromogénne substráty), ako sú napríklad esterázy, peroxidázy a peptidázy.

Fluorochrómy môžu byť tiež konjugované s protilátkami alebo nukleotidovými sondami na priamu detekciu mikrobiálnych antigénov alebo sekvencií DNA a RNA. Pretože merania svetlom indukovaného signálu každej bunky alebo častice sa získavajú samostatne, výsledky merania v určenom objeme kvapaliny (suspenzie) predstavujú kumulatívny súčet individuálnych cytometrických charakteristík všetkých analyzovaných buniek. Signály zaznamenané detektormi sú odoslané do počítača, kde je po spracovaní nameraných údajov znázornená distribúcia populácie buniek či častíc vzhľadom na rôzne parametre. Dôležitou analytickou vlastnosťou prietokových cytometrov je aj ich schopnosť merať viaceré bunkové parametre (analytické prietokové cytometre). Niektoré prietokové cytometre dokážu fyzicky oddeliť bunkové podskupiny na základe ich cytometrických vlastností (triedenie buniek), táto schopnosť sa ale zatiaľ v mikrobiológii neuplatnila.



Obr. 1.22.1 Meranie mikrobiálnych markerov pomocou prietokovej cytometrie (upravené podľa: <https://thefinancialstrategy.com/global-flow-cytometry-market-opportunities-competitive-benchmarking-company-market-shares-and-market-forecasts-by-2027/>).

V súčasnosti sa na trhu postupne objavujú komerčné formáty prietokovej cytometrie, vyvinuté pre laboratória klinickej mikrobiológie na priamu detekciu baktérií. Príkladom je automat na rýchlu a plnoautomatickú analýzu moča a telových tekutín. Umožňuje detekciu baktérií a ich diferenciáciu s vysokou negatívnou predikčnou hodnotou (výsledok analýzy vzorky moča

vylúči uroinfekt) a sú tak vhodné najmä na vylúčenie vzoriek z ďalšej diagnostiky pomocou kultivácie. V súčasnosti sa štandardizuje ich použitie aj na iný klinický materiál – krv, likvor, synoviálna tekutina, amniotická tekutina a pod.

Prietoková cytometria umožňuje tak priamu diagnostiku, ako aj nepriamu. Priamu diagnostiku predstavuje detekcia mikroorganizmov (vrátane detekcie a kvantifikácia vírusových antigénov na infikovaných cieľových bunkách – napr. CMV matricového fosfoproteínu pp65, pri stanovení antigenémie, detekcia a kvantifikácia vírusových nukleových kyselín). Nepriamu diagnostiku predstavuje jednak detekcia a kvantifikáciu protilátok, ale aj aktivovaných T-lymfocytov. Na trh sa už dostali komerčné formáty na kvantitatívne stanovenie jednotlivých tried špecifických protilátok – napr. na stanovenie IgG a IgM proti *T. pallidum*, subsp. *pallidum* pomocou mikrosfér s naviazanými rekombinantnými antigénmi treponém a prietokovej cytometrie. Ukazuje sa, že niektoré systémy založené na prietokovej cytometrii dosahujú analytické parametre lepšie ako iné, tradične imunoanalýzy (napr. ELISA). Veľmi perspektívne je využitie cytometrie na testovanie antibiotík a iných látok na ich antimikrobiálne účinky. Účinok antimikrobiálnej látky môže byť stanovená na základe merania rozptylu svetla a obsahu DNA za použitia fluorescenčného farbiva, alebo tiež podľa zmeny tvaru alebo iných vlastností bunky. Schopnosť detekcie intaktných buniek od zmenených a dokonca mŕtvych pomocou prietokovej cytometrie umožňujú aj **analýzy účinku látok na mikroorganizmy**, ako je napríklad rýchle **stanovenie citlivosti**. Životaschopné, nenarušené baktérie môžu byť pritom rozlíšené bočným rozptylovým lúčom od elektronického šumu, intermediárnych zložiek a bunkového debris. V cytoplazme baktérií s depolarizovanou cytoplazmatickou membránou v dôsledku vplyvu antibiotika sa akumuluje farbivo z extracelulárneho roztoku. Farbivo sa viaže na intracelulárne proteíny alebo membrány a výsledkom je zvýšená fluorescencia. Bakteriálne bunky citlivých kmeňov po pridaní daného antibiotika majú vzhľadom na kontrolnú vzorku testovaného kmeňa bez antibiotika zvýšenú fluorescenciu, ktorá je závislá od koncentrácie testovaného antibiotika. Bunky rezistentných kmeňov farbivo neakumulujú. V dôsledku toho je ich intenzita fluorescencie podobná intenzite fluorescencie baktérií v kontrolnej vzorke bez ATB.

Rozptyl svetla je užitočným ukazovateľom antimikrobiálnych účinkov, bez ohľadu na ich mechanizmus účinku. Metodiky pomocou prietokovej cytometrie oproti klasickým kultivačným technikám majú mnoho potenciálnych výhod – urýchlenie stanovenia citlivosti (napr. mykobaktérie, čas analýzy 1 – 3 dni), stanovenie citlivosti a rezistencie na antimikrobiálne látky pri ťažko kultivovateľných organizmoch a takisto aj intracelulárnych bakteriálnych patogénov (mykoplasmy, vírusy – HSV, CMV, HBV a HIV, parazity – plazmódiá, lajšmánie). Ako veľká výhoda prietokovej cytometrie sa ukázala možnosť testovania citlivosti baktérií priamo z hemokultúr v čase do 4 hodín. Cytometria poskytuje možnosti širšej analýzy v rámci konkrétneho kmeňa baktérií oproti súčasnosti. Napr. stanovenie diskovej

citlivosti a minimálnej inhibičnej koncentrácie sú dnes jediné rutinne vykonávané metódy na určovanie citlivosti v klinických laboratóriách, ale **stanovenie minimálnej baktericídnej koncentrácie**, ktorá baktérie usmrť, sa robí len zriedka. Rovnako aj stanovenie **postantibiotických a subinhibičných účinkov v reálnom čase v rámci postantibiotickej fázy terapie** nie je t.č. možné, pričom pomôcť môže práve prietoková cytometria. Pomocou techniky prietokovej cytometrie možno kvantifikovať vírusové antigény, nukleové kyseliny, rovnako aj ďalšie parametre, ktoré sa vzťahujú k vírusovým infekciám (CD4 lymfocyty). **Testovanie citlivosti na antivírusové látky in vitro** nie je v klinických mikrobiologických laboratóriách bežné, ale v súvislosti so stále rozvíjajúcimi postupmi v liečbe viróz je vývoj rýchlych a presných testov pre monitorovanie nových antivírusových látok a testovanie citlivosti na antivirotiká nevyhnutné. Vznik rezistencie vírusov na používané látky vyžaduje potrebu používať rýchle automatizovaných a cielené testy. Konvenčné metódy sú pracné a časovo náročné. Prietoková cytometria umožňuje rýchle vyšetrenie a posúdenie nových antivírusových látok a ich mechanizmu účinku. Rýchla a ľahká metóda skríningu pomocou prietokovej cytometrie pri analýze pôsobenia antivírusových látok, napríklad proti HSV, je založená na sledovaní nimi vyvolaných zmien v bunkovej DNA. Pri analýze je meraný obsah DNA pomocou propidium jodidu, čím nižšia je antivírusová účinnosť, tým väčšie je množstvo DNA a tým intenzívnejšia je fluorescencia propidium jodidu. Hodnotenie antivírusových látok *in vitro* pomocou prietokovej cytometrie sa úspešne potvrdilo aj pri CMV, ktorý pri infekcii poškodzuje cytoplazmatickú membránu a dochádza k uvoľneniu cytoplazmatickej cholinesterázy, ktorá je meraná pomocou fluoresceín diacetátu. Rozdiel vo fluorescencii umožňuje rozlíšiť medzi infikovanými a neinfikovanými bunkami a vyhodnotiť tak účinnosť látky. Prietoková cytometria umožnila kvantifikovať inhibíciu expresie vírusového antigénu v ľudských bunkách infikovaných vírusom HIV-1. Antivírusová aktivita niekoľkých látok proti tomuto vírusu sa sledovala prietokovou cytometriou a získané údaje boli porovnateľné s výsledkami získanými tradičnými metódami.

Kritickým pre uvádzanie nových formátov prietokovej cytometrie do laboratórií klinickej mikrobiológie je štandardizácia metodík, cena a dostupnosť farbiacich látok, konjugátov, resp. sond pre rutinnú diagnostiku.

LITERATÚRA

1. Álvarez-Barrientos A., Arroyo J., Cantón R., Nombela C., Sánchez-Pérez M.: Applications of Flow Cytometry to Clinical Microbiology. *Clinical Microbiology Reviews*, 2000, 13(2): 167-195.
2. Davey H.M.: Flow cytometric techniques for the detection of microorganisms. *Methods Cell Sci*, 2002, 24(1-3): 91-97.
3. Gomez E., Jespersen D.J., Harring J.A., Binnicker M.J.: Evaluation of the Bio-Rad BioPlex 2200 syphilis multiplex flow immunoassay for the detection of IgM- and IgG-class antitreponemal antibodies. *Clin Vaccine Immunol*, 2010, 17(6): 966-968. doi: 10.1128/CVI.00086

1.23 BIOSENZORY

Predný J.



Biosenzory obsahujú **biodetekčný prvok** (biorekogničný, rozpoznávajúci biomolekuly), ktorý je pripojený k nejakej forme **meniča**, ktorý konvertuje špecifickú väzbu medzi analytom a bioreceptorom na merateľný signál. Analyt je buď celý mikroorganizmus (baktéria, vírus, parazit) alebo jeho špecifická súčasť, získaná jeho lýzou, napr. nukleové kyseliny, proteíny (predovšetkým enzýmy), ale aj exoprodukty, napr. toxíny. Pre biologické rozpoznávanie celých baktérií môžu pôsobiť ako rekogničné ciele ich rôzne povrchové štruktúry, predovšetkým antigény prezentované na bunkovom povrchu, vrátane proteínov, glykoproteínov, lipopolysacharidov a peptidoglykánov. Na ich rozpoznanie sa používajú bioreceptory schopné viazať sa špecificky iba na jednu konkrétnu molekulu zo spomenutých skupín. Najbežnejšie bioreceptory používané pre detekciu celých buniek baktérií sú polyklonálne protilátky proti špecifickým bakteriálnym kmeňom. Rovnako aj lektíny (proteíny viažuce konkrétne sacharidy, napr. manan) môžu byť použité ako bioreceptory pre rozpoznanie a naviazanie sa na špecifické povrchové sacharidy baktérií. Na identifikáciu celých buniek baktérií sa ako bioreceptory používajú aj bakteriofágy, teda vírusy, ktoré sa viažu na špecifické bakteriálne proteínové receptory na povrchu hostiteľských buniek.

Biosenzory sa dajú rozčleniť rôznymi spôsobmi, ale najčastejšie je to podľa:

1. Typu bioselektívnej väzby

- a) **katalytickej** (premena špecifického substrátu pomocou príslušného enzýmu),
- b) **afinitnej**, to znamená špecifickej väzby cieľovej štruktúry mikroorganizmu a komplementárneho biodetekčnej štruktúry, napr. protilátky, lektínu, bakteriofága, aptaméru⁵ atď. Oba typy väzieb možno kombinovať aj navzájom.

2. Metódy prenosu signálu zaznamenaného meničom, ktorý vznikol ako dôsledok interakcie (katalýza, afinitná väzba) medzi analytom a komplementárnym biosenzorom. Tieto fyzikálne metódy sú rôzne, napr. optická, mechanická, elektrická a pod.

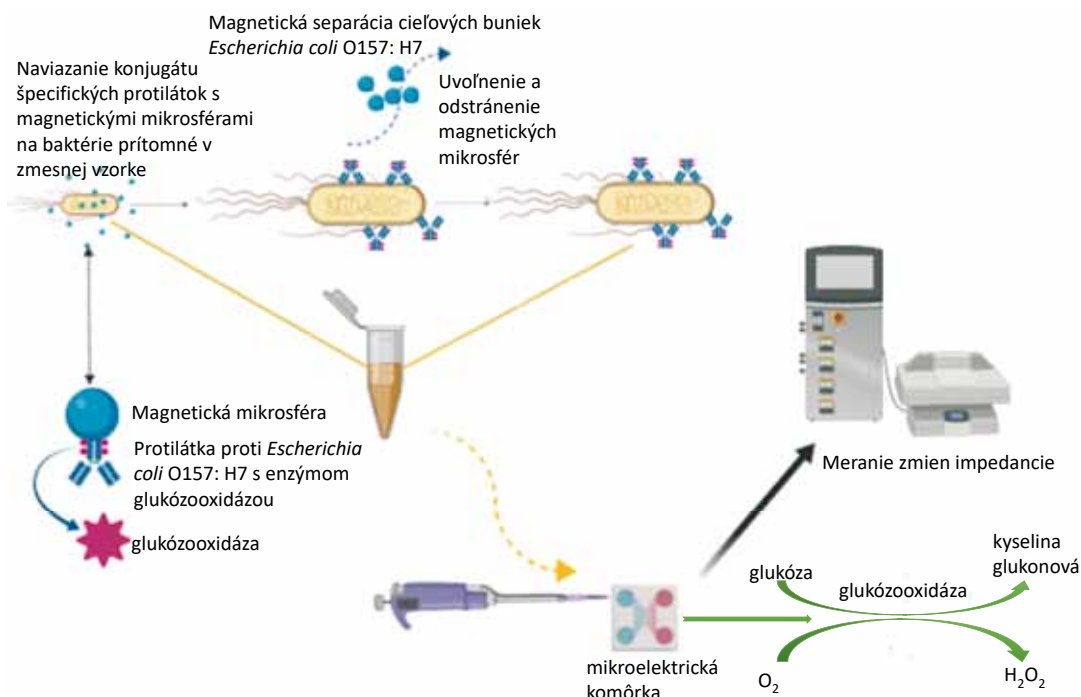
Z hľadiska praktického uplatnenia sa v súčasnosti využívajú predovšetkým biosenzory, využívajúce afinitnú väzbu a prenos signálu buď pomocou **impedancie** alebo **optických vlákien**. Integrácia impedancie s technológiou biologického rozpoznávania na detekciu baktérií viedla k vývoju impedančných biosenzorov, ktoré v posledných rokoch nachádzajú široké využitie. Ich princípom je detekcia, selekcia a imobilizácia baktérií pomocou protilátok v miniaturizovaných čipoch, kde sa potom pomocou mikroelektrod meria impedancia v živnom roztoku alebo tlmivom roztoku obtekajúceho ich bunky. Vplyv metabolismu živých buniek baktérií a elektrické pomery na povrchu buniek sú kontinuálne zaznamenávané pomocou sady elektrod a prevádzané na elektrický signál, ktorý je zase digitálne vyhodnocovaný. Ako príklad možno uviesť do praxe uvedený impedimetrický imunosenzor, založený na použití miniatúrnych magnetických guľčiek na separáciu bakteriálnych buniek a mikroelektrody na rýchlu detekciu baktérií sérotypov *Escherichia coli* O157: H7 a *Salmonella Typhimurium* v potravinách.

Na streptavidínom obalené magnetické guľôčky sú naviazané zodpovedajúce biotinylované protilátky, ktoré zachytávajú cieľové baktérie vo vzorke analyzovanej potraviny. V ďalšom kroku sa na komplex cieľových baktérií a magnetických guľôčok naviaže konjugát protilátok proti stanovovaným patogénom a glukózooxidázy (enzým štiepiaci glukózu). Takto vytvorený komplex sa napipetuje do mikroelektrickej komôrky s roztokom glukózy na vyvolanie enzymatickej reakcie, v ktorej sa produkuje kyselina glukonová, ktorá na rozdiel od elektroneutrálnej glukózy nesie elektrický náboj. Zvyšuje sa iónová sila roztoku, čím sa znižuje impedancia roztoku meraná na mikroelektóde (obr. 1.23.1).

Optické biosenzory využívajú zmeny optických vlastností na povrchu senzora indukované naviazaním mikrobiálnej štruktúry na afinitnú molekulu receptora, ktoré sú potom prevedené na detektor. Optické biosenzory sa delia do dvoch kategórií, s použitím fluorescenčného farbiva alebo bez použitia farbiva. Pri prvej z nich sa meria zmena fluorescencie (menej často absorbanca alebo luminiscencia) na povrchu biosenzora pri rozpoznaní cieľovej štruktúry. Princíp je podobný sendvičovej imunoanalýze, kedy imobilizovaná protilátka rozpozná a viaže cieľovú molekulu. V ďalšom kroku sa iná značená protilátka potom viaže na takto selektovanú molekulu a po naviazaní a indukcii emisie fotónov vygeneruje optický signál, ktorého intenzita je proporčná k množstvu naviazaného analytu. Biosenzory s optickými vláknami majú zdroj svetla, ktoré prechádza cez optické vlákna s imobilizovanými bioreceptormi a je merané na fotónovom detektore. V prípade naviazania analytu na bioreceptory a po následnom pridaní príslušnej značenej protilátky dôjde k zaznamenanému signálu na detektore (obr. 1.23.2). Pri druhej kategórii je príkladom využitia optického biosenzoru bez farbiva povrchová plazmonová rezonancia (SPR – Surface Plasmon Resonance). Pri SPR sa po naviazaní cieľovej molekuly v analyte na receptor imobilizovaný v tenkej vrstve na zlatej fólii, zmení uhol odrazu emitovaného svetelného lúča. Takáto zmena uhla odrazu sa pomocou meniča transformuje na elektrický signál (obr. 1.23.3.)

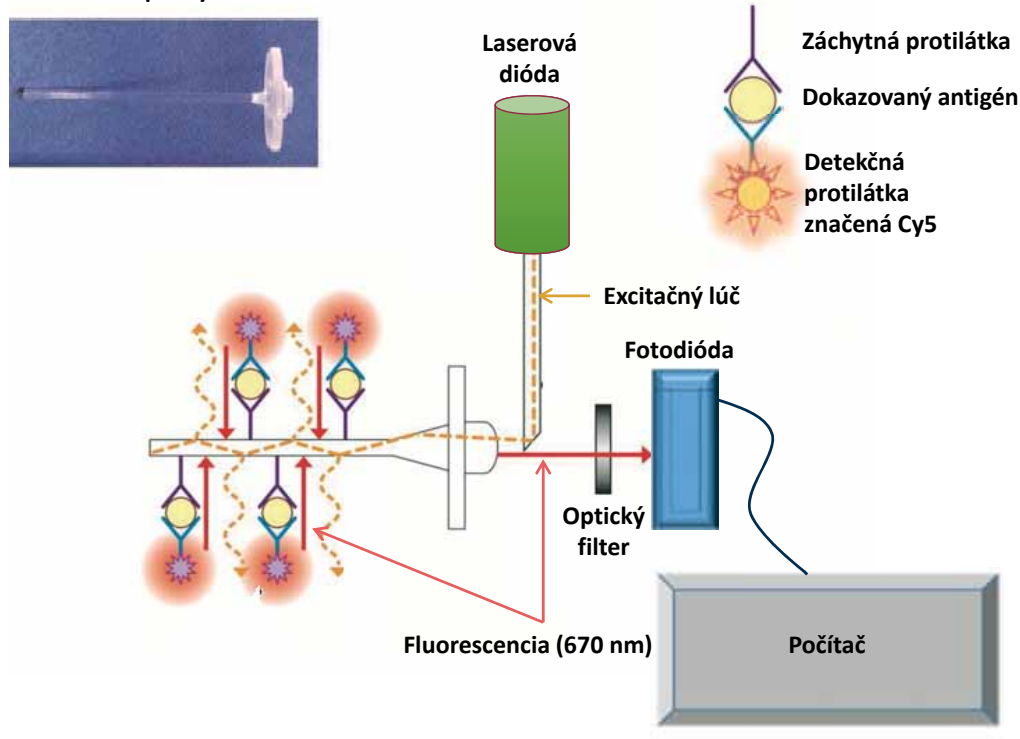
Základné požiadavky na vlastnosti komerčne ponúkaných biosenzorov pri detekcii baktérií, ale aj iných mikroorganizmov sú konštantné – musia byť lacné, malé, ľahké, s jednoduchým postupom spracovania, s minimálnou nutnosťou predanalytickej prípravy vzoriek, ich analytická kvalita (najmä špecifita a senzitivita) musí byť vyššia alebo prinajmenšom porovnateľná s vyšším štandardom iných metód používaných v súčasnej praxi a analýzy musia poskytnúť výsledok s výrazne kratším časom ako doteraz. Vytvorenie prvých biosenzorov a ich zdokonaľovanie až k dnešným vyrábaným biosenzorom, použiteľných ako komerčné diagnostiká, trval približne 30 rokov. V súčasnosti zaznamenáva ich vývoj a výroba, ako aj ich využitie, exponenciálny nárast. Cieľom je vždy to, aby sa dosiahli uvedené požiadavky na široké uplatnenie. Konfigurácia biosenzorov (formát) sa môže líšiť v závislosti od spôsobu použitia, napr. biosenzory pre klinické použitie v diagnostike a liečbe pri urgentnej diagnostike („bedside“ testy), ako súčasť metód používaných v laboratóriách lekárskej mikrobiológie, pri kontrole potravín, na pravidelné používanie v teréne pri sledovaní mikrobiálnej kontaminácie (napr. vody alebo účinnosti úpravy odpadovej vody), na sledovanie hrozby použitia biologických zbraní (bioterrorizmu), ale čoraz viac aj na osobné po-

⁵ Aptaméry sú jednovláknové DNA alebo RNA molekuly s jedinečnú trojdimenzionálnu štruktúru, ktorá im umožňuje selektívne sa viazať extracelulárne na cieľové molekuly, *in vivo* sa podieľajú na regulácii expresie génov v závislosti od faktorov prostredia.

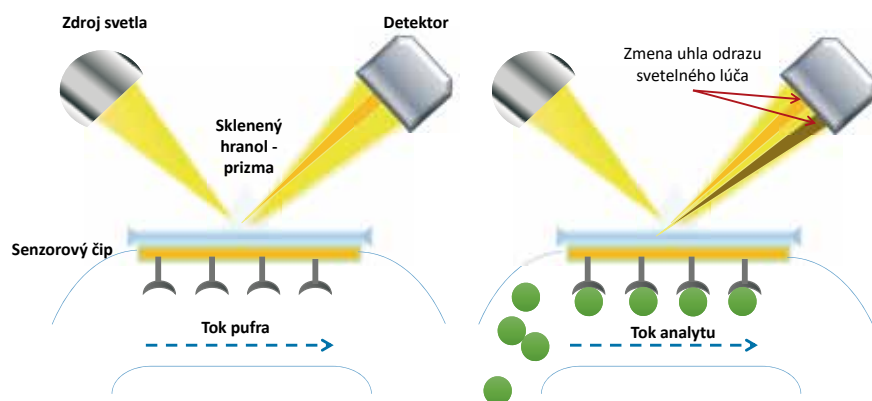


Obr. 1.23.1. Využitie mikrobiologických techník v impedančnom biosenzore na sledovanie kontaminácie potravín baktériou *Escherichia coli* O157: H7.

Biosenzor s optickými vláknami



Obr. 1.23.2. Biosenzor s optickými vláknami, na ktorom sú na biodetekčnej časti naviazané záchytné protilátky. Ak je v skúmanej vzorke dokazovaný analyt (napr. antigén), dôjde k imunochemickej reakcii a analyt sa naviaže na povrch senzora prostredníctvom záchytných protilátok. Biosenzor je potom premytý pušom a následne kojugátom s detekčnými protilátkami. Detekčné protilátky sú komplementárne voči ďalším epitopom dokazovaného antigénu a sú značené fluorescenčným farbivom, v tomto prípade Cy5, ktoré po excitácii emitujú svetlo s vlnovou dĺžkou 670 nm. Excitačné lúče svetla z diódy prechádzajú pozdĺž vláknien po celej dĺžke rekognoznačnej časti a v prípade, že je vo vzorke prítomný hľadaný analyt, vyvolajú na ňom naviazanom fluorofóre emisiu svetla - fluorescenciu. Emitovaná fluorescencia je vedená optickými vláknami cez optický filter na fotodiódu, ktorá zmení optický signál na elektrický. Ten je spracovaný a vyhodnotený počítačom (upravené podľa: <https://www.mdpi.com/2079-6374/3/1/120>).



Obr. 1.23.3. SPR biosenzory obsahujú zdroj rovinné polarizovaného svetla, ktoré prechádza cez sklenený hranol, ktorého báza je v kontakte s povrchom snímača s funkcionalizovaným bioreceptorom, ktorý obsahuje tenký zlatý film s naviazanými biorekogničnými molekulami. Vázba analytu na povrch mení jeho index lomu, ktorý zase mení uhol odrazeného svetla vychádzajúci z hranolu (uhol SPR) (upravené podľa: https://www.researchgate.net/profile/Linnea_Nygren_Babol2/publication/30073004/figure/fig1/AS:302119874777108@1449042399459/Surface-plasmon-resonance-SPR-biosensor-principle-The-binding-of-biomolecules-to-the.png).

užitie v domácnosti. Vďaka možnosti automatizácie bolo vyvinuté aj niekoľko komerčne dostupných prístrojov, založených na impedančnej mikrobiológii. Medzi tieto systémy napríklad patrí Bactometer (Bio Merieux), Bactrac® od Sy-Lab a RABIT® od Don Whitley Scientific.

LITERATÚRA

1. Lillehoj P.B., Kaplan C.W., He J., Shi W., Ho C.M.: Rapid, electrical impedance detection of bacterial pathogens using immobilized antimicrobial peptides. *J Lab Autom*, 2014, 19(1): 42-49. doi: 10.1177/2211068213495207. Epub 2013 Jul 12.
2. Wang R., Lum J., Callaway Z., Lin J., Bottje W., Li Y.: A Label-Free Impedance Immunosensor Using Screen-Printed Interdigitated Electrodes and Magnetic Nanobeads for the Detection of *E. coli* O157:H7. *Biosensors*, 2015, 5(4): 791-803. doi:10.3390/bios5040791.
3. Shabani C.A., Marquette R., Mandeville M., Lawrence F.: Modern probe-assisted methods for the specific detection of bacteria. *J Biomed Sci Eng*, 2015, 8: 104-121.
4. Buckland S., Kessock-Philip S., Bascomb S.: Early detection of bacterial growth in blood culture by impedance monitoring with a Bactometer model 32. *J Clin Pathol*, 1983, 36: 823-828.
5. Settu K., Chen C.J., Liu J.T., Chen C.L., Tsai J.Z.: Impedimetric-method for measuring ultra-low *E. coli* concentrations in human urine. *Biosens Bioelectron*, 2015, 66: 244-250.
6. Yang L., Li Y.: Interdigitated Array microelectrode-based electrochemical impedance immunosensor for detection of *Escherichia coli* O157:H7. *Anal Chem*, 2004, 15; 76(4):1107-1113.
7. Perinoto A.C., Maki R.M., Colhone M.C., Santos F.R., Migliaccio V. et al.: Biosensors for efficient diagnosis of leishmaniasis: Innovations in bioanalytics for a neglected disease. *Anal Chem*, 2010, 82: 9763-9768.
8. Jain P., Chakma B., Patra S., Goswami P.: Potential biomarkers and their applications for rapid and reliable detection of malaria. *BioMed Res Int*, 2014, 852645: 20.
9. <https://docplayer.cz/30344506-Masarykova-univerzita.html>.
10. Asif Ahmed, Jo V. Rushworth, Natalie A. Hirst, Paul A. Millner, Biosensors for Whole-Cell Bacterial Detection. *Clinical Microbiology Reviews* Jun 2014, 27 (3) 631-646; DOI: 10.1128/CMR.00120-13.



1.24.1 Kritériá hodnotenia výsledkov laboratórnej analýzy

Kritéria sú dané použitou metódou. Metóda by mala byť spoľahlivá, stabilná, presná, správna, mala by mať požadovanú analytickú špecifickosť a senzitivitu.

Spoľahlivosť laboratórnej metódy

Spoľahlivosť metódy je kvalitatívne označenie pre mieru priblíženia sa výsledku merania danou metódou k deklarovanej hodnote, ktorá bola získaná meraním a uznaná dohodou ako skutočná a očakávaná. Je to teda pojem, ktorý zahŕňa správnosť a presnosť naraz.

Stabilita metódy

Stabilita je schopnosť metódy, udržať spoľahlivosť reprodukovateľných výsledkov počas dlhšieho časového obdobia.

Presnosť metódy

Presnosť opisuje vzájomnú mieru priblíženia od seba nezávislých výsledkov, ktoré boli získané opakovaným použitím merania tou istou metódou. Pritom sa rozlišuje:

- presnosť opakovaných meraní, teda miera zhody výsledkov získaných sériovým meraním vzorky,
- presnosť porovnávaním výsledkov, tzn. miera zhody výsledkov analýzy toho istého materiálu, získaných v rozdielnych podmienkach, napr. výsledkov medzilaboratórnych kontrol,
- presnosť medzi sériami, merania tej istej vzorky v tom istom laboratóriu v po sebe nasledujúcich dňoch.

Správnosť metódy

Správnosť metódy je zhoda priemernej hodnoty z opakovaných meraní kontrolnej vzorky a jej skutočnou alebo deklarovanou hodnotou.



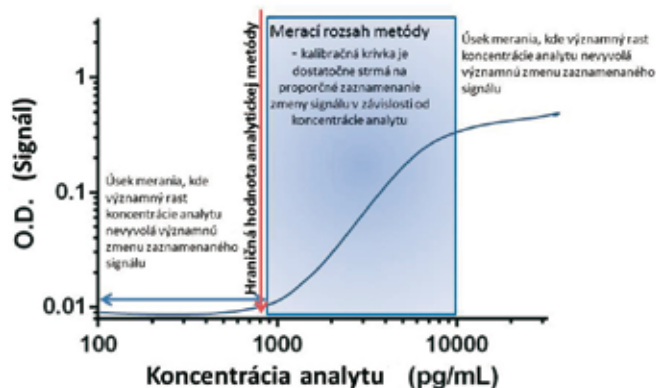
Obr. 1.24.1. Príklady presnosti a správnosti, stred terča je deklarovaná cieľová hodnota.

Analytická špecifickosť

Analytická špecifickosť je schopnosť metódy dokázať len hľadaný analyt. Iné zložky vzorky by nemali ovplyvniť výsledok analýzy.

Analytická senzitivita (citlivosť)

Analytická citlivosť udáva schopnosť metódy odlíšiť blízke hodnoty analytu (napr. koncentráciu, aktivitu a pod.), určuje mieru toho, ako sa mení hodnota merania vzorky v závislosti od meraného signálu. Dá sa kvantifikovať na základe strmosti kalibračnej krivky (viď obr. 1.24.2).



Obr. 1.24.2. Príklad rozsahu merania kvantitatívnu imunochemickou metódou. Pri nízkych hodnotách fenomén prozóny spôsobil takmer žiadny nárast signálu (OD), pri vysokých hodnotách fenomén postzóny a vysoká koncentrácia antigénu rovnako zamedzil ďalšiemu nárastu signálu.

Hraničná hodnota analytickej metódy

Hraničná hodnota analytickej metódy súvisí s analytickou senzitivitou. Je to najnižšia koncentrácia analytu, ktorú možno danou metódou dokázať a odlíšiť od vzorky, ktorá analyt neobsahuje.

1.24.2 Plauzibilita a validácia výsledku

Kontrola plauzibility sa týka kontroly súboru výsledkov analýz vzorky jedného pacienta pred tým, ako laboratórium vydá záverečný výsledok (správu) navonok. Kontroluje nielen odchýlky a extrémne hodnoty výsledných hodnôt, ale aj vzájomnú konšteláciu výsledkov analýz jednotlivých parametrov, vzťah ku hodnotám kontrolných materiálov (denné alebo sériové meranie pozitívnych a negatívnych kontrol), zhodnotenie výsledkov analýz voči veku, fyziologickému stavu, diagnóze a prebiehajúcej liečbe pacienta, voči komorbiditám, zohľadňuje preanalytické podmienky, zhodu voči empirickým znalostiam o výsledkoch analýz kontrolovaného parametra na danom pracovisku, zhodu s interpretáciou výsledku s odporúčaním výrobcu diagnostickej súpravy alebo znením hodnotenia výsledkov podľa použitej metódy a iné parametre laboratórnej analýzy. V prípade nezhody alebo významného nálezu je analýza vzorky zopakovaná, resp. aj potvrdená. Ak je to potrebné, validujúci mikrobiológ pridá k výsledkom laboratórnej diagnostiky vzorky komentár s interpretáciou, alebo odporúčaním tak, aby zvýšil využiteľnosť laboratórneho nálezu, teda diagnostickú relevanciu (validitu). Takto súborne kontrolovaný a interpretovaný výsledok sa môže považovať za validovaný.

1.24.3 Diagnostická senzitivita a špecificita testu

Hodnota laboratórneho vyšetrenia ako výkonnostného kritéria je daná jeho diagnostickou senzitivitou a špecificitou. Diagnostická senzitivita udáva mieru pravdepodobnosti, že pozitívny výsledok laboratórneho testu potvrdí správnosť danej diagnózy pacienta. Diagnostická špecificita udáva pravdepodobnosť, že negatívny výsledok laboratórneho testu potvrdí neprítomnosť diagnózy pri zdravej vyšetrenej osobe. Situáciu, aká pri hodnotení testu vzniká, možno uviesť pomocou hodnotenia výkonnosti výsledkov diagnostického testu použitím 2x2 tabuľky. Čísla v zátvorke predstavujú výsledky diagnostického testu na hypotetickej populácii tvorenej počtom 100 osôb (tab. 1.24.1).

Tab. 1.24.1. Rozloženie výsledkov testovania určitého laboratórneho markeru ochorenia pri sledovaní ochorenia v hypotetickej populácii.

Výsledok laboratórneho testu	Prítomnosť ochorenia		
	áno	nie	
pozitívny	A (18)	B (8)	A + B (26)
negatívny	C (2)	D (72)	C + D (74)
	A + C (20)	B + D (80)	A + B + C + D (100)

Vysvetlivky: A -- počet pravdivo pozitívnych výsledkov (true positive), t. j. počet osôb, ktoré boli choré a súčasne mali pozitívny výsledok diagnostického testu. B – počet falošne pozitívnych výsledkov (false positive), t. j. počet osôb, ktoré nemali dané ochorenie, avšak výsledok diagnostického testu mali pozitívny. C – počet falošne negatívnych výsledkov (false negative), t. j. počet osôb, ktoré boli choré, avšak výsledok diagnostického testu mali negatívny. D – počet pravdivo negatívnych výsledkov (true negative), t. j. počet osôb, ktoré neboli choré a súčasne mali negatívny výsledok diagnostického testu. A+B – celkový počet osôb, ktoré mali pozitívny výsledok diagnostického testu. C+D – celkový počet osôb, ktoré mali negatívny výsledok diagnostického testu. A+C – celkový počet testovaných osôb, ktoré boli choré. B+D – celkový počet testovaných osôb, ktoré nemali dané ochorenie.

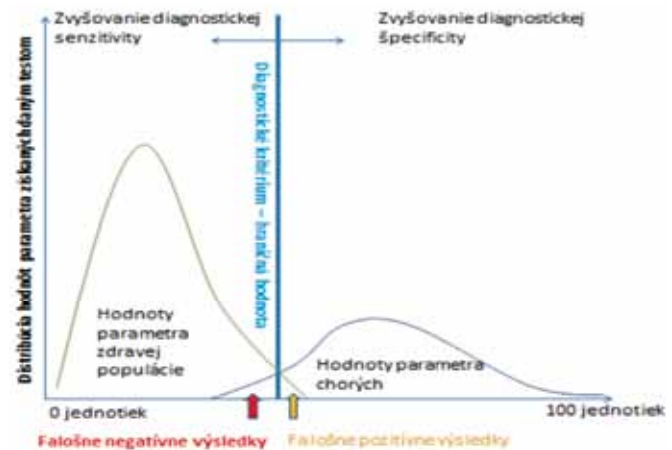
Výpočet oboch parametrov sa uskutočňuje podľa vzorcov:

$$\text{Diagnostická senzitivita (\%)} = \frac{\text{počet pravdivo pozitívnych výsledkov}}{\text{počet pravdivo pozitívnych} + \text{počet pravdivo negatívnych výsledkov}} \times 100$$

$$\text{Diagnostická špecificita (\%)} = \frac{\text{počet pravdivo negatívnych výsledkov}}{\text{počet pravdivo negatívnych} + \text{počet falošne pozitívnych výsledkov}} \times 100$$

Pri kvantitatívnych analýzach je ich klinický význam daný určením hraničnej hodnoty daného parametra, ktorá oddeľuje populáciu zdravých od populácie chorých. Jej ustanovenie si vyžaduje určiť pravdepodobnostné krivky hodnôt daného parametra v referenčnej populácii zdravých a populácii chorých. Medzi oboma populáciami väčšinou dochádza k čiastočnému prekryvaniu (viď obr. 1.24.3).

Hraničnú hodnotu možno stanoviť dvoma spôsobmi – na základe optimálnej diagnostickej senzitivity, alebo optimálnej diagnostickej špecificity. Posuny hraničnej hodnoty jedným alebo druhým smerom zväčša určuje účel diagnostického testu – skríningový test by mal byť vysoko senzitívny, naopak, konfirmačný test by mal byť vysoko špecifický. K optimalizácii diagnostickej senzitivity a špecificity testov a tým aj čo najlepšie oddelenie hodnôt daného parametra pri chorých a zdravých sa používajú niektoré štatistické analytické metódy, napr. ROC analýza (Receiver Operating Characteristic analysis).



Obr. 1.24.3. Distribúcia kvantitatívneho znaku v zdravej a chorej populácii.

1.24.4 Prediktívna hodnota testu

Senzitivita a špecificita predstavujú jeden zo spôsobov kvantifikovania „schopností“ diagnostického testu. V klinickej praxi platí, že ak poznáme výsledok testu, tak nás zaujíma, ako spoľahlivý je daný test pri predpovedaní prítomnosti ochorenia. Prediktívna hodnota je parameter, ktorý udáva odpoveď na dve otázky:

- **pozitívna prediktívna hodnota** (positive predictive value, PPV): ak je test pozitívny, aká je pravdepodobnosť, že pacient má dané ochorenie (?);
- **negatívna prediktívna hodnota** (negative predictive value, NPV): ak je test negatívny, aká je pravdepodobnosť, že pacient nemá dané ochorenie (?).

Výpočet prediktívnej hodnoty je možný dvoma spôsobmi – na základe známeho počtu pozitívnych a negatívnych výsledkov získaných daným testom, alebo pomocou známej senzitivity a špecificity daného testu a prevalencie (pomer chorých ku zdravým v patientskom kolektíve v určenom čase).

Výpočet pozitívnej prediktívnej hodnoty (PPV) a negatívnej prediktívnej hodnoty (NPV) pomocou základe známeho počtu pozitívnych a negatívnych výsledkov získaných daným testom:

$$\text{PPV (\%)} = \frac{\text{počet správne pozitívnych výsledkov} \times 100}{\text{celkový počet pozitívnych výsledkov (správne a falošne pozitívnych)}}$$

$$\text{NPV (\%)} = \frac{\text{počet správne negatívnych výsledkov} \times 100}{\text{celkový počet negatívnych výsledkov (správne a falošne negatívnych)}}$$

Výpočet pozitívnej prediktívnej hodnoty (PPV) a negatívnej prediktívnej hodnoty pomocou známej senzitivity a špecificity daného testu a prevalencie (všetky tri hodnoty v %)

$$\text{PPV (\%)} = \frac{\text{prevalencia} \times \text{senzitivita} \times 100}{\text{prevalencia} \times \text{senzitivita} + (100 - \text{prevalencia}) \times (100 - \text{špecificita})}$$

$$\text{NPV (\%)} = \frac{(100 - \text{prevalencia}) \times \text{špecificita} \times 100}{(100 - \text{prevalencia}) \times \text{špecificita} + \text{prevalencia} \times (100 - \text{senzitivita})}$$

LITERATÚRA

1. Thomas L.: Labor und Diagnose – Indikation und Bewertung von Laborbefunden für die medizinische Diagnostik. 8. Auflage. 2012, ISBN 978-3-9805215-8-1.
2. <http://www.catmedia.sk/radiologia/files/pdf/17-2-2010/r10.pdf>