

Přímá diagnostika – mikroskopie

II

Jan Tkadlec

Ústav lékařské mikrobiologie 2.LF UK

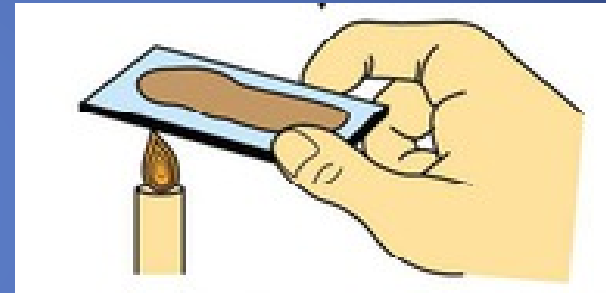
Opakování na úvod

Než můžeme mikroskopovat:

1. Usušení preparátu



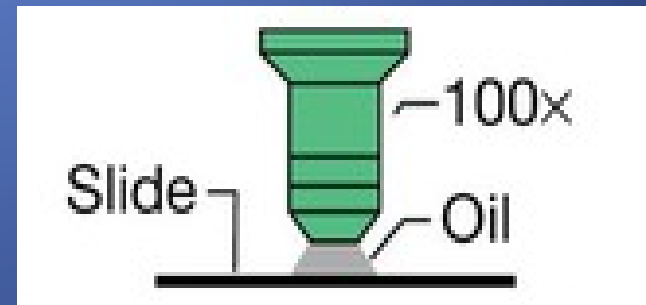
2. Fixace



3. Barvení



4. Imerze

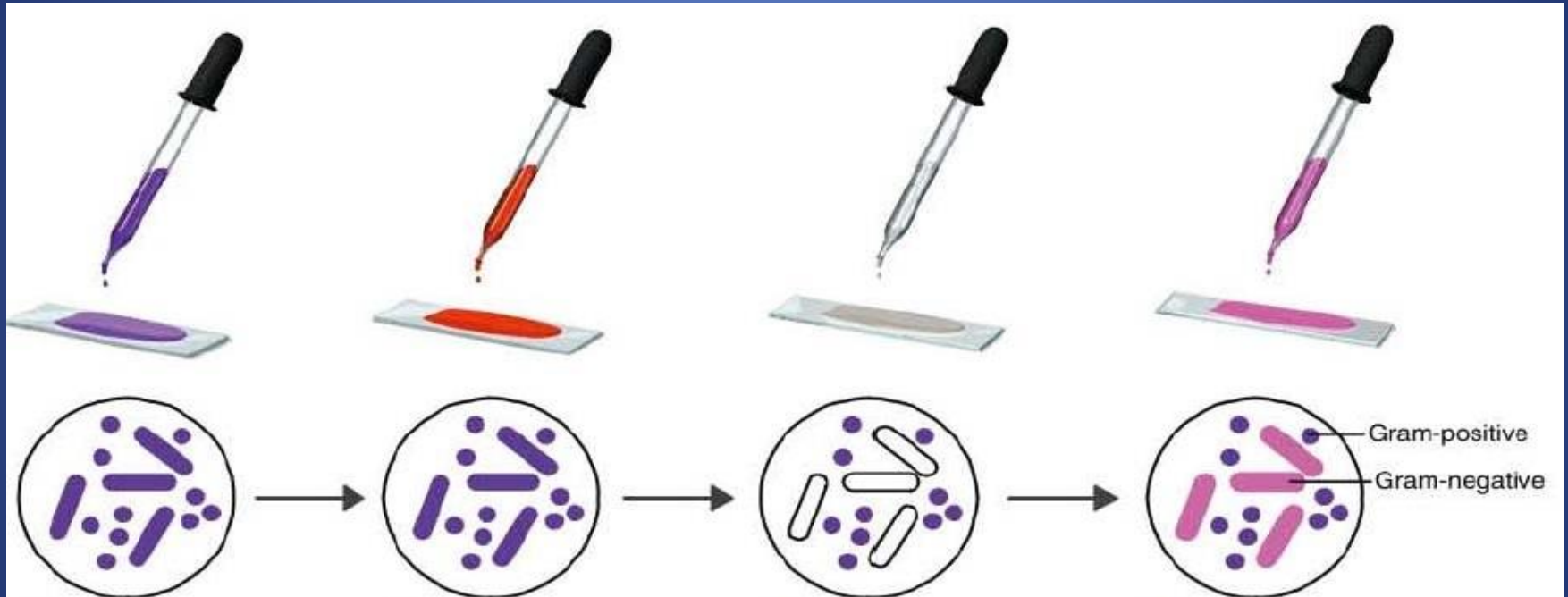


Jaká znáte barvení?

- Gramovo barvení
 - grampozitivní x gramnegativní
- Burriho barvení
 - Pouzdro (Pneumokok)
- Ziehl-Nielsen (Acid fast)
 - Mykobakterie (TBC)

Gramovo barvení

Postup



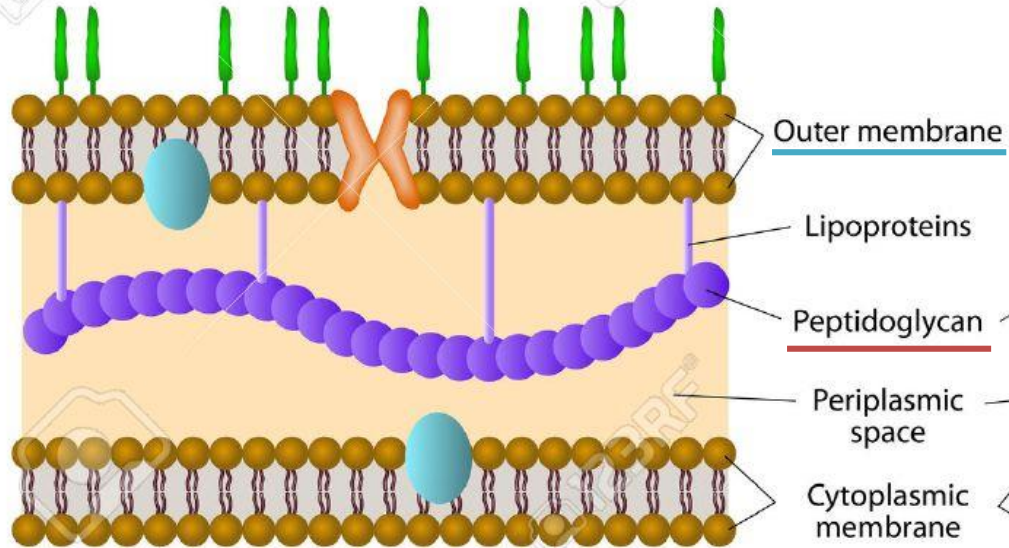
Violet

Lugol

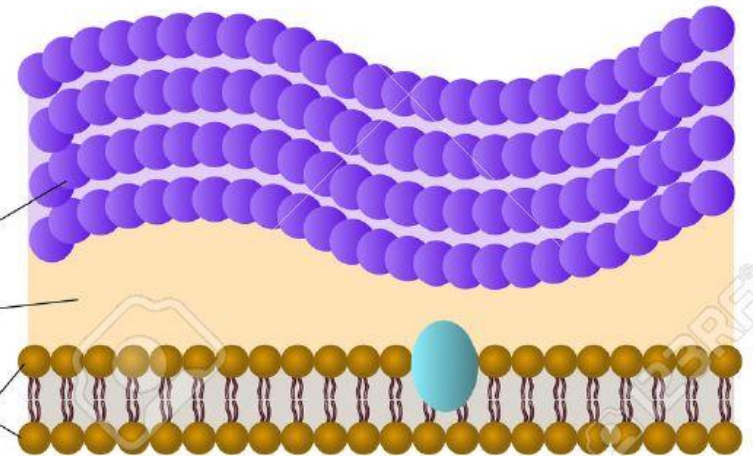
Alkohol

Karbolfuchsin

GRAM-NEGATIVE



GRAM-POSITIVE



Gramovo barvení - princip

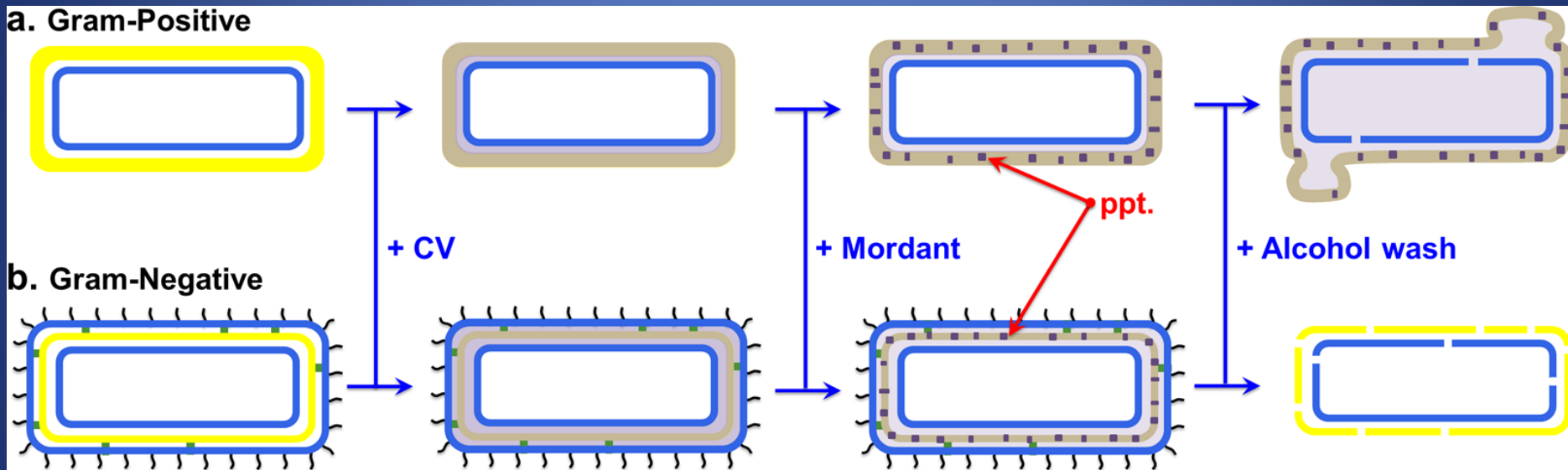
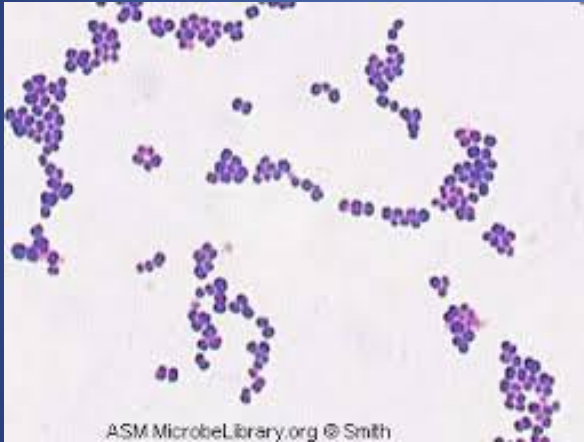
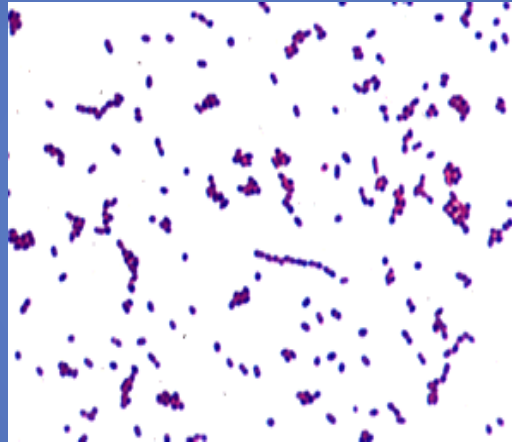


Figure 5. Cartoon schematic of the updated molecular mechanism of the Gram-stain protocol for cross sections of (a) Gram+ and (b) Gram- bacteria. The addition of **Crystal violet** (CV) and mordant (**Lugol**) results in the generation of a precipitate (ppt.) which is largely isolated in the cell wall. Following the destructive **alcohol wash**, the intact cell wall of the Gram+ cell retains the ppt. within the cell while the perforated cell wall of the Gram- cell allows the ppt. to be washed away.

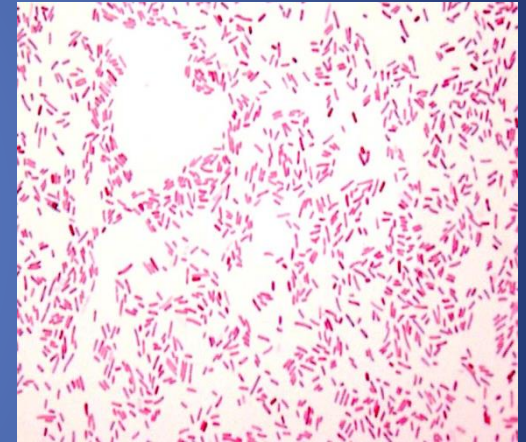
Gramovo barvení



G+ *S. aureus*



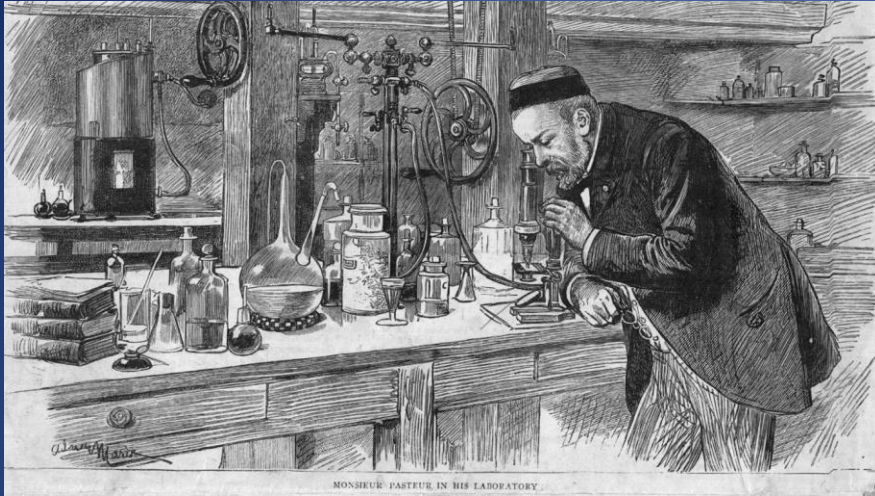
G+ *S. pyogenes*



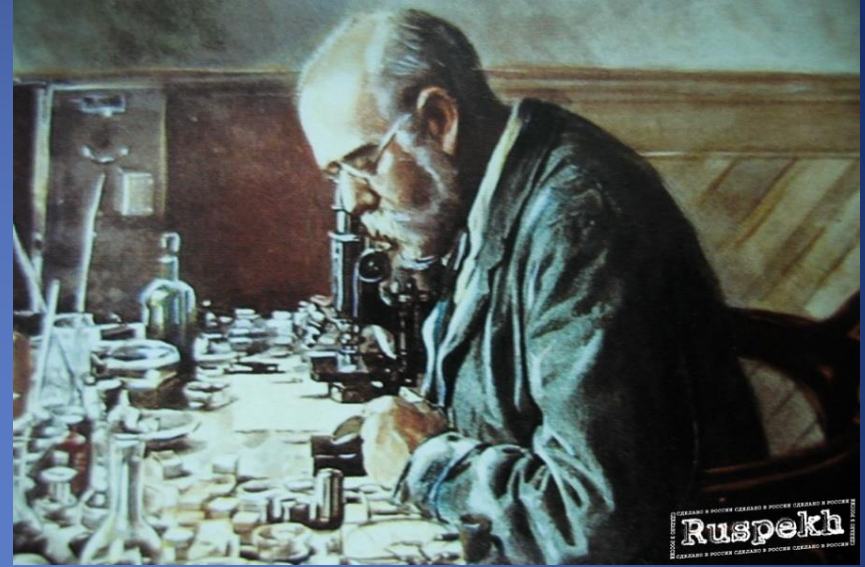
G- *E. coli*

Uplatnění mikroskopie v lékařské mikrobiologii

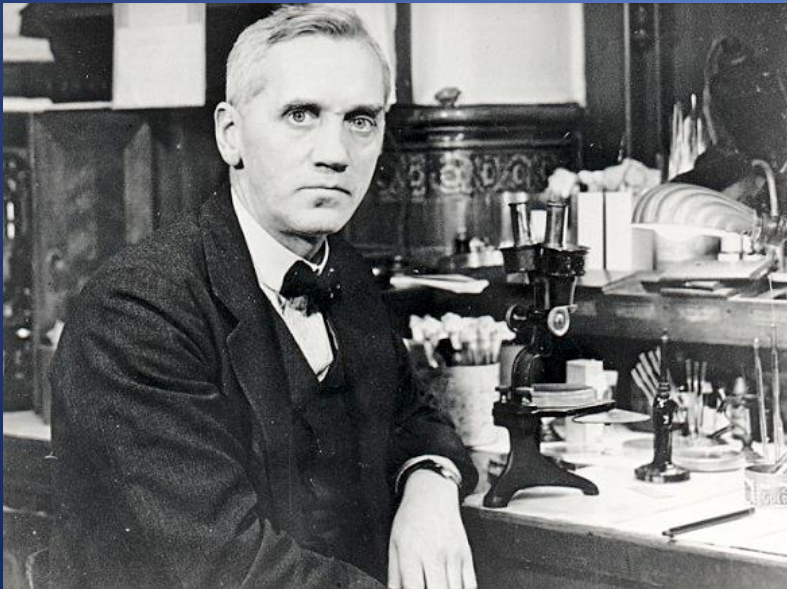
Pasteur



Koch



Fleming



Mikroskop je základní nástroj mikrobiologa

Mikroskopie

Výhody

Rychlost

Cena vybavení i provozu

Přímé pozorování

Nekultivovatelné organismy

Nevýhody

Subjektivnost

Reprodukovatelnost

Nelze určit přímo druh organismu

(ale typická morfologie některých patogenů)

Nízká senzitivita

↓bakterií ↑pozorování ↓citlivost

Příklady uplatnění mikroskopie

Algorithmus vyšetření hemokultur

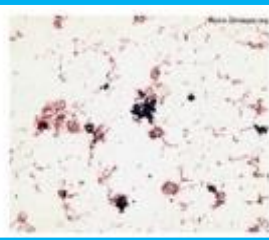
5-24h

Inkubace



Vyočkování pozitivní HMK + mikroskopie

18-24h



90 min

Detekce patogenů a genů rezistence pomocí PCR



Dourčení narostlých kolonií

18-24h



15 min

Rychlé testy na geny rezistence



MRSA (PBP2a, Alere)



3GCR (β LACTA test, Bio-Rad)

Testování ATB citlivosti



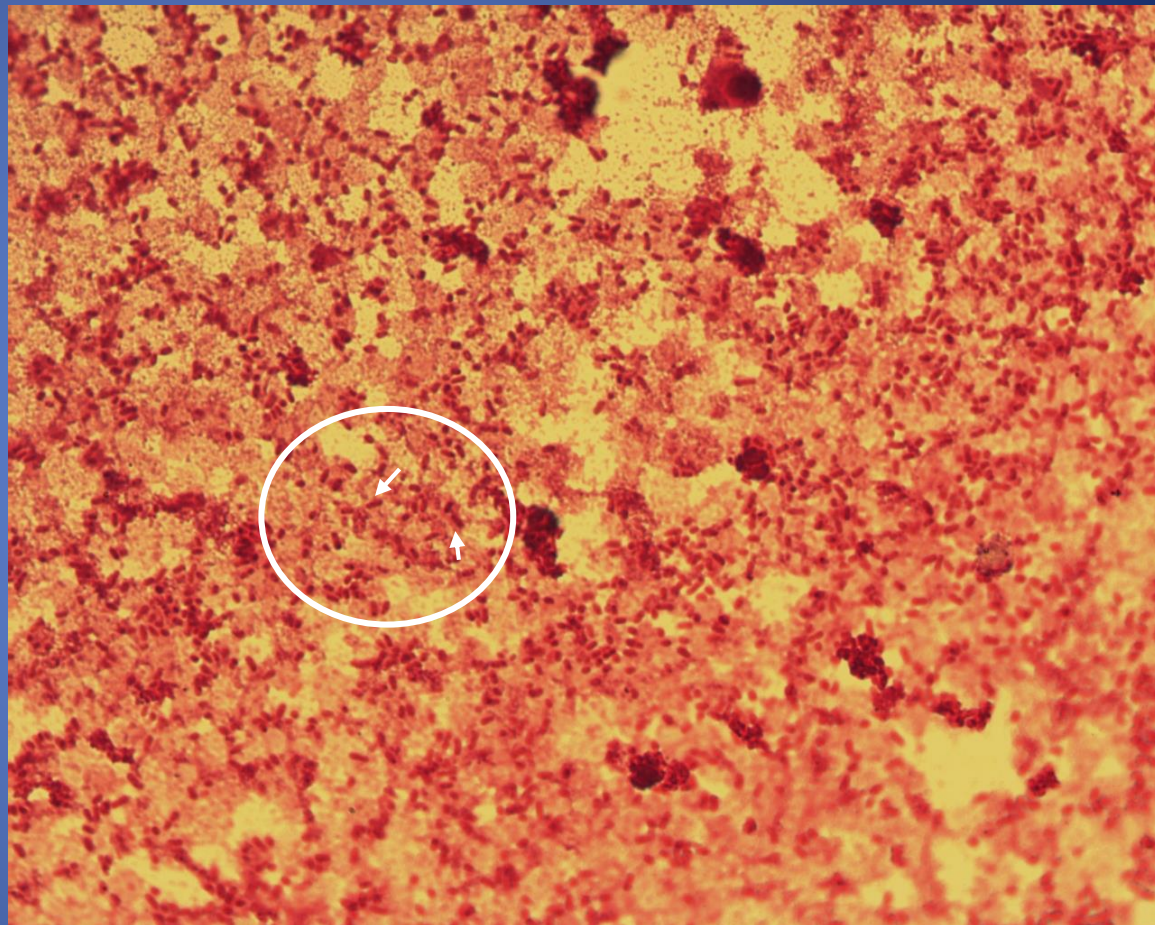
Klebsiella pneumoniae

Materiál: hemokultura

Pacient: muž 40 let

Dg: sepse nejasného původu

Mikroskopie: gramnegativní tyčinky
(granulocyty)



Autor: MUDr. Petra Kabelíková

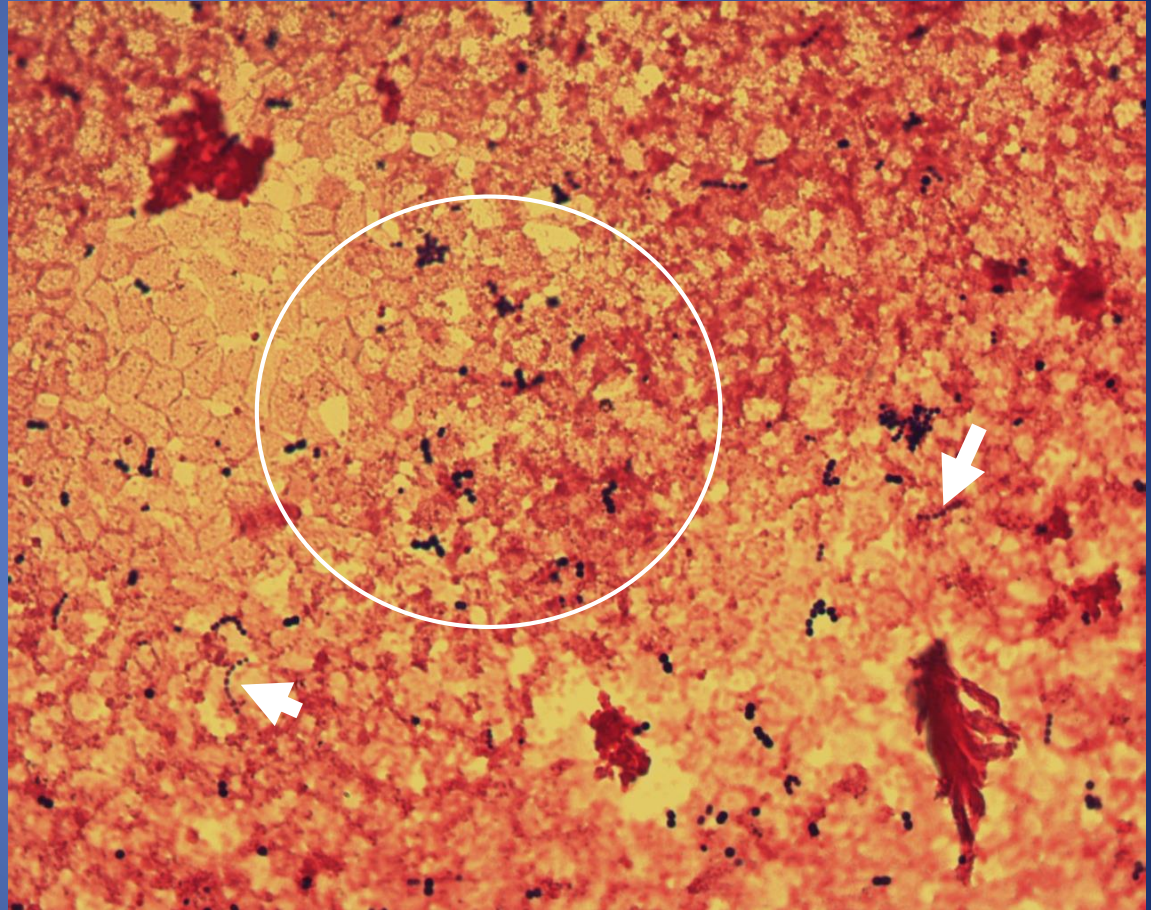
Enterococcus faecalis

Materiál: hemokultura

Pacient: žena 71 let

Dg: cholangenní seps (recidivující
cholangitis)

Mikroskopie: grampozitivní koky v krátkých
řetízcích (granulocyty)



Autor: MUDr. Petra Kabelíková

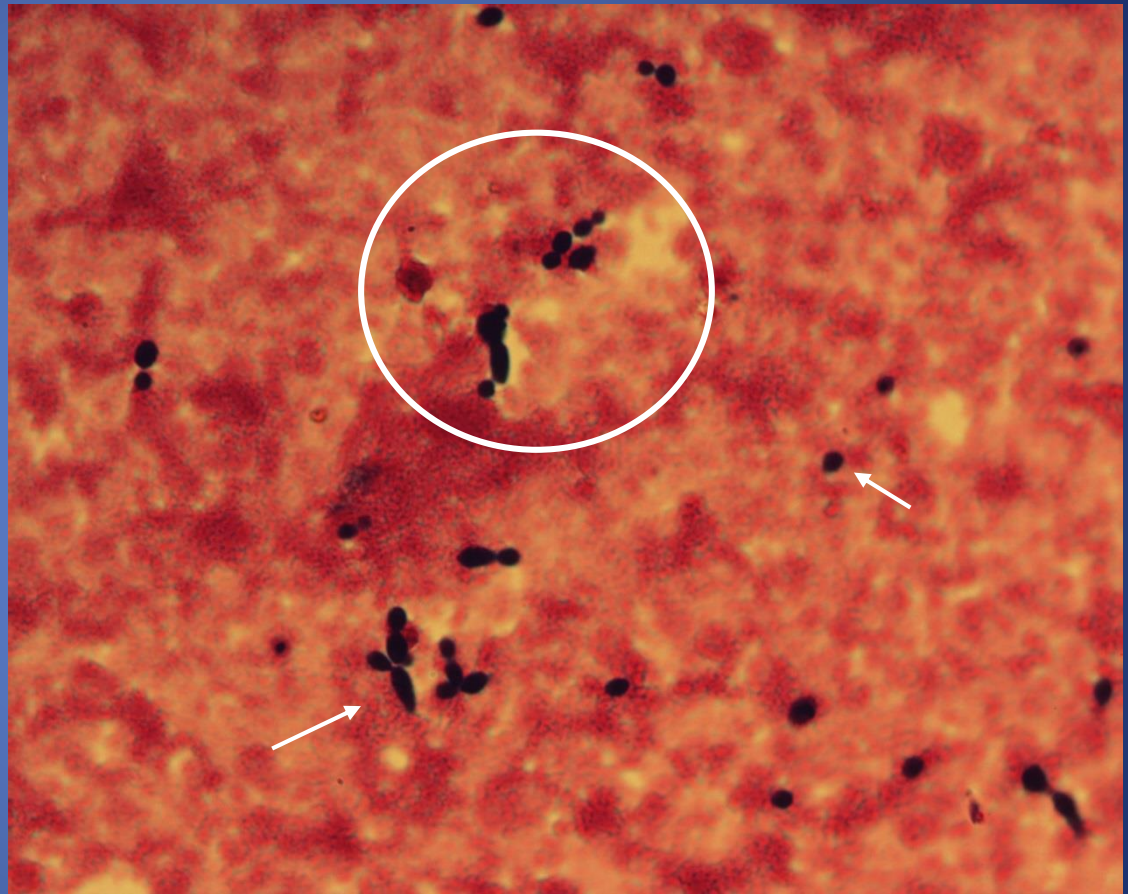
Candida albicans

Materiál: hemokultura

Pacient: žena 9 let

Dg: katetrová sepse

Mikroskopie: blastospory kvasinek



Autor: MUDr. Petra Kabelíková

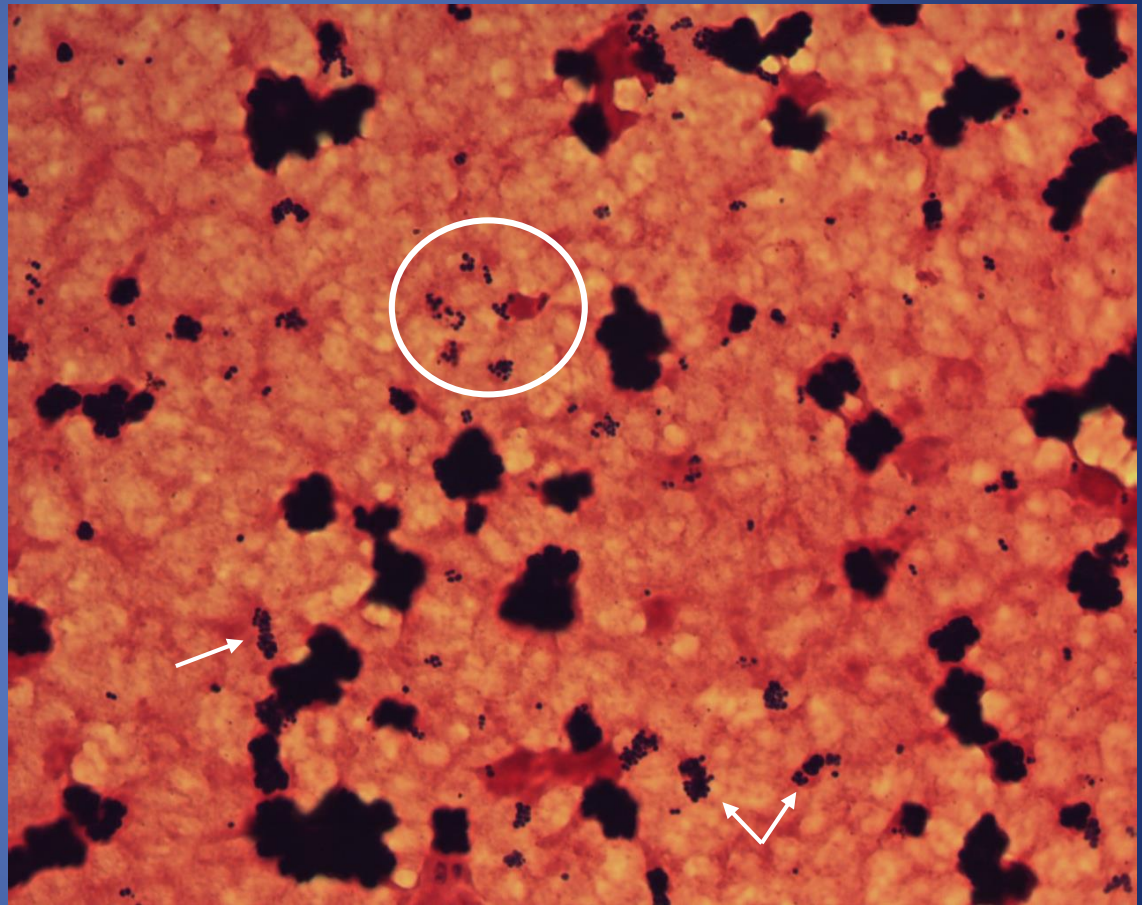
Staphylococcus aureus

Materiál: hemokultura

Pacient: žena 84 let

Dg: endokarditida

Mikroskopie: grampozitivní koky tvořící hrozny



Autor: MUDr. Petra Kabelíková

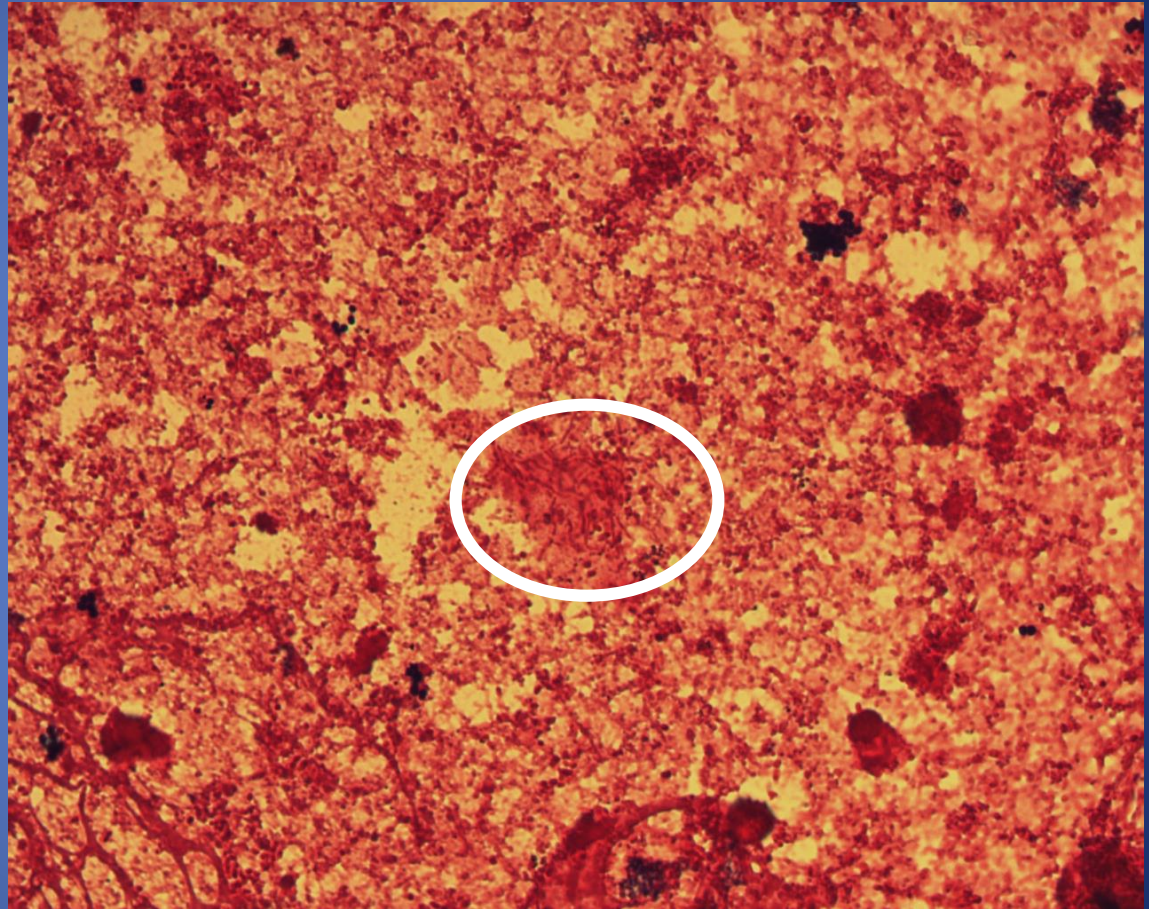
Escherichia coli
Proteus mirabilis

Materiál: hemokultura

Pacient: žena 89 let

Dg: urosepse

Mikroskopie: gramnegativní tyčinky, v moči
nález *E. coli* a *P. mirabilis*



Autor: MUDr. Petra Kabelíková

Vyšetření likvoru

Cytologie a biochemie

zákal

↑WBC count (PMN)

↓glukóza

↑bílkoviny

Mikrobiologie

Centrifugace vzorku

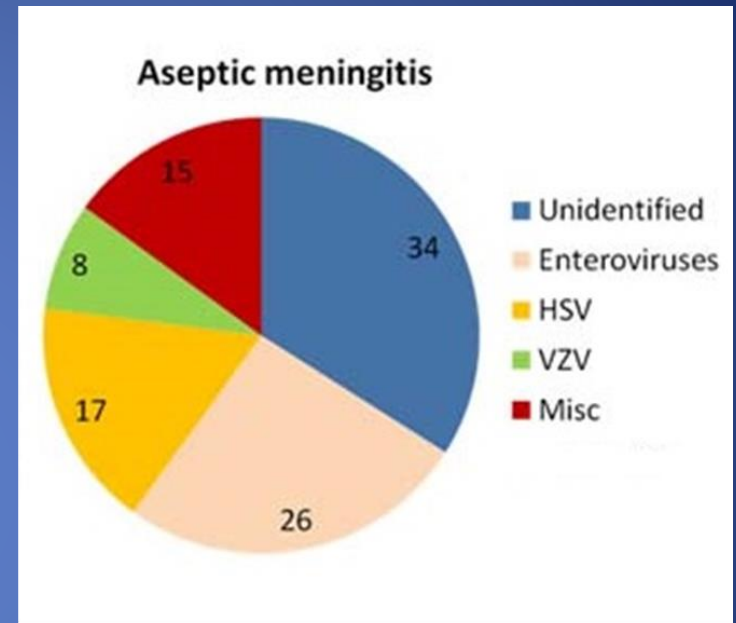
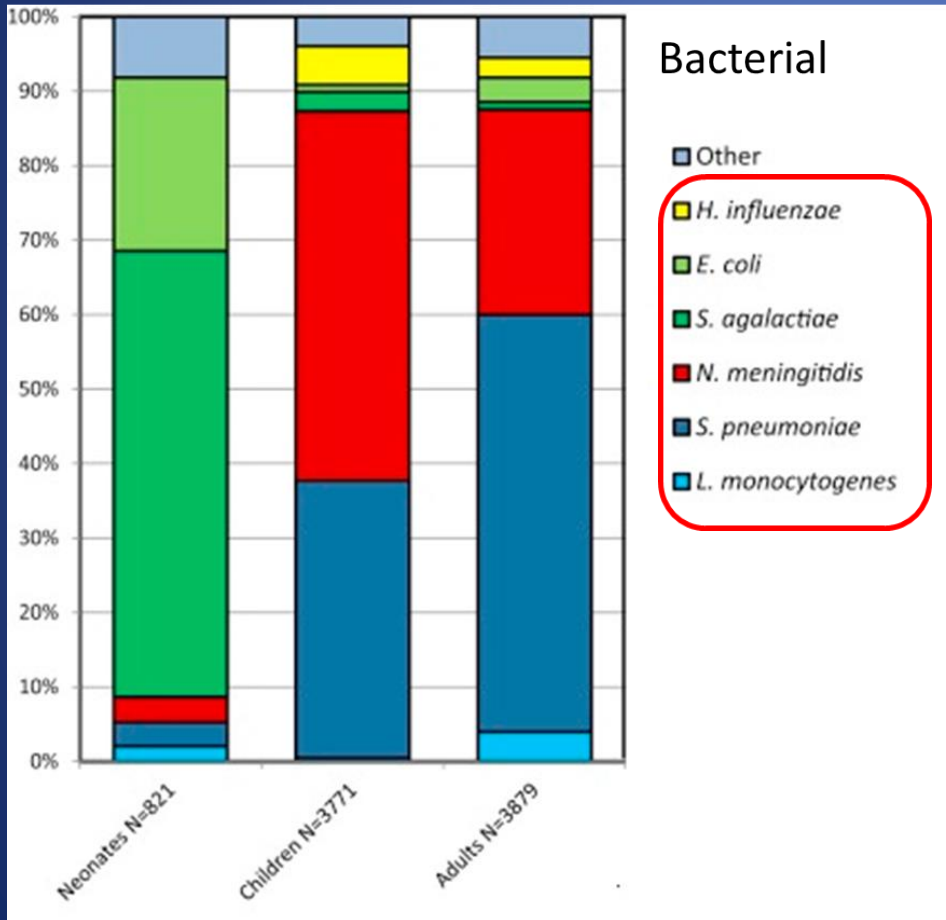
Vyočkování sedimentu

PCR

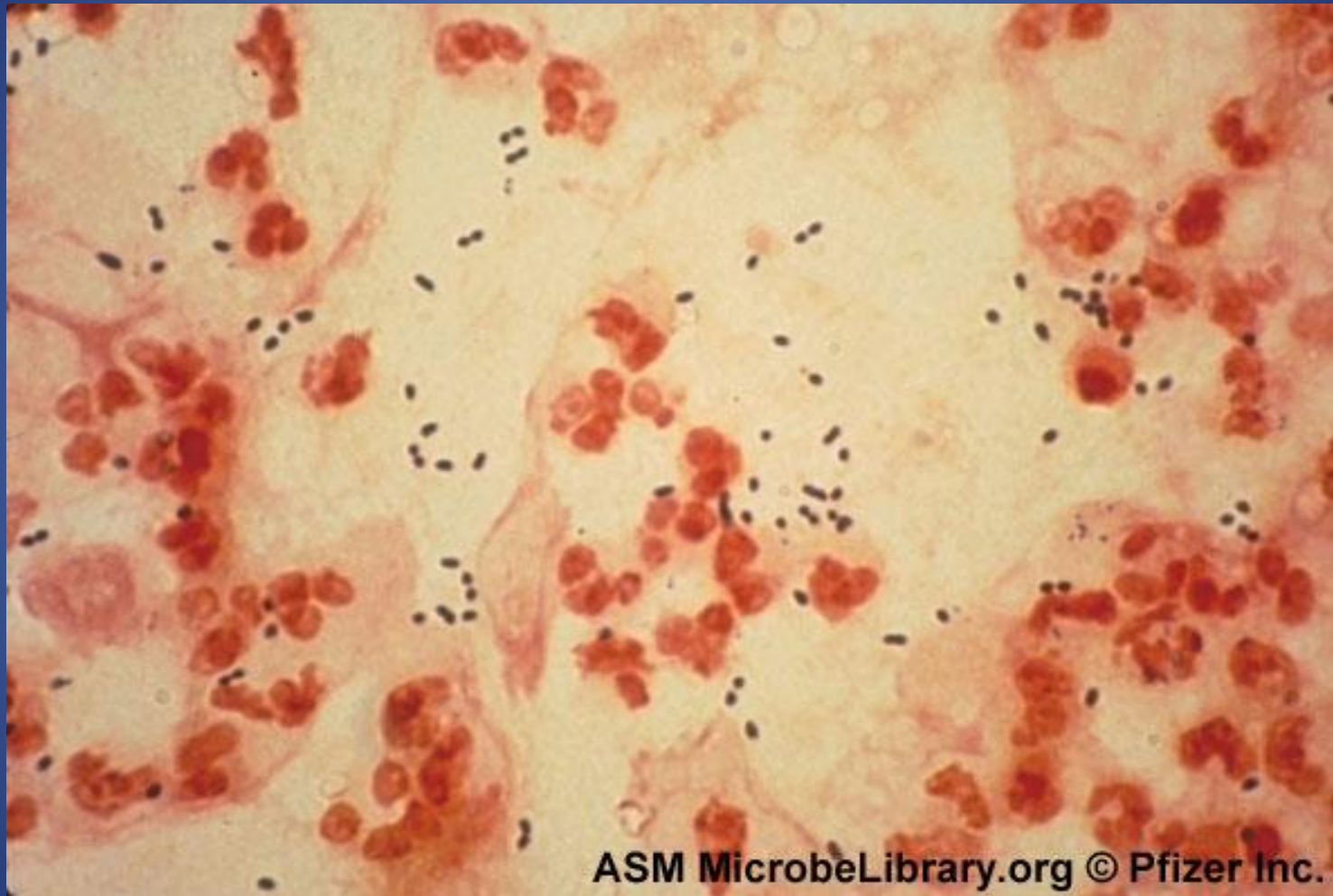
Průkaz antigenu

Mikroskopie sedimentu

Neuroinfekce



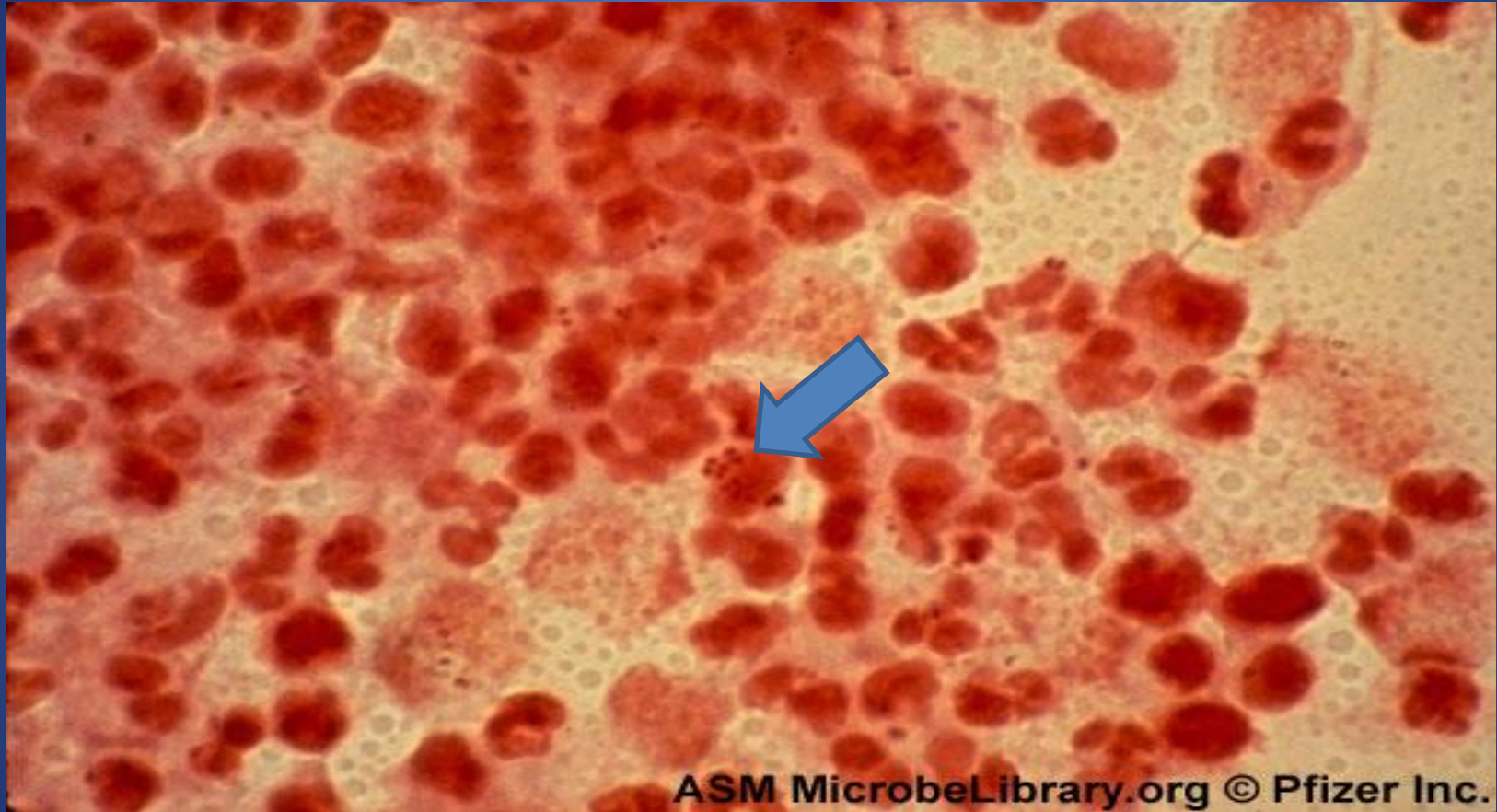
Streptococcus pneumoniae



ASM MicrobeLibrary.org © Pfizer Inc.

This cerebrospinal fluid from a child with meningitis contains many neutrophils and oval gram-positive cocci singly and in pairs.

Neisseria meningitidis



This cerebrospinal fluid contains a high concentration of neutrophils and many gram-negative diplococci singly and in pairs

Haemophilus influenzae



This cerebrospinal fluid contains many neutrophils and gram-negative coccobacilli, primarily in the cytoplasm of the white cells

Listeria monocytogenes



ASM MicrobeLibrary.org © Pfizer Inc.

This cerebrospinal fluid contains a few neutrophils and two slender gram-positive bacilli. Although Gram stains of cerebrospinal fluid are positive in specimens from about 80% of all patients with bacterial meningitis, organisms are detected in the cerebrospinal fluid of only about 40% of patients with *Listeria* meningitis. Even when specimens reveal bacteria, only a small number may be visible.

Kazuistika kultivačně negativní meningitida *N. meningitidis*

- Holčička, 5 měsíců, dosud zdravá přijata na pohotovost s horečkou a rudou vyrážkou šířící se po těle (purpura fulminans) – podezření na meningokokovou sepsi/meningitidu
- Zahájena empiricky léčba Ceftriaxonem (cefalosporin)
- Odebrány vzorky na HMK a lumbální punkce
- Mikrobiologie :
 - HMK negativní
 - Mikroskopicky z likvoru i krve diplokoky typické pro *N. meningitidis*
 - PCR potvrdila *N. meningitidis*



Mikroskopické vyšetření vzorků z dýchacích cest

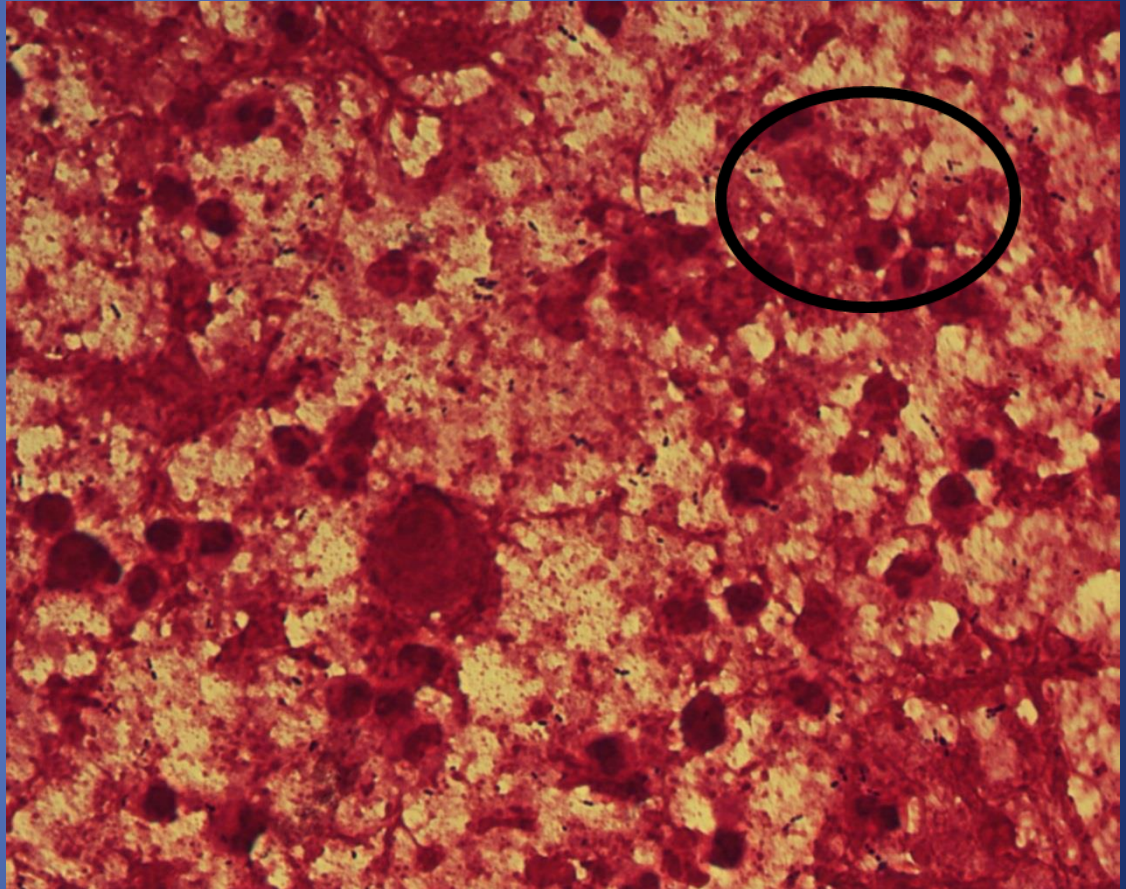
Streptococcus pneumoniae

Materiál: sputum

Pacient: muž 42 let

Dg: exacerbace při bronchiektázii plic

Mikroskopie: grampozitivní diplokoky lancetovitého tvaru (purulentní sputum)



Autor: MUDr. Alena Píšová

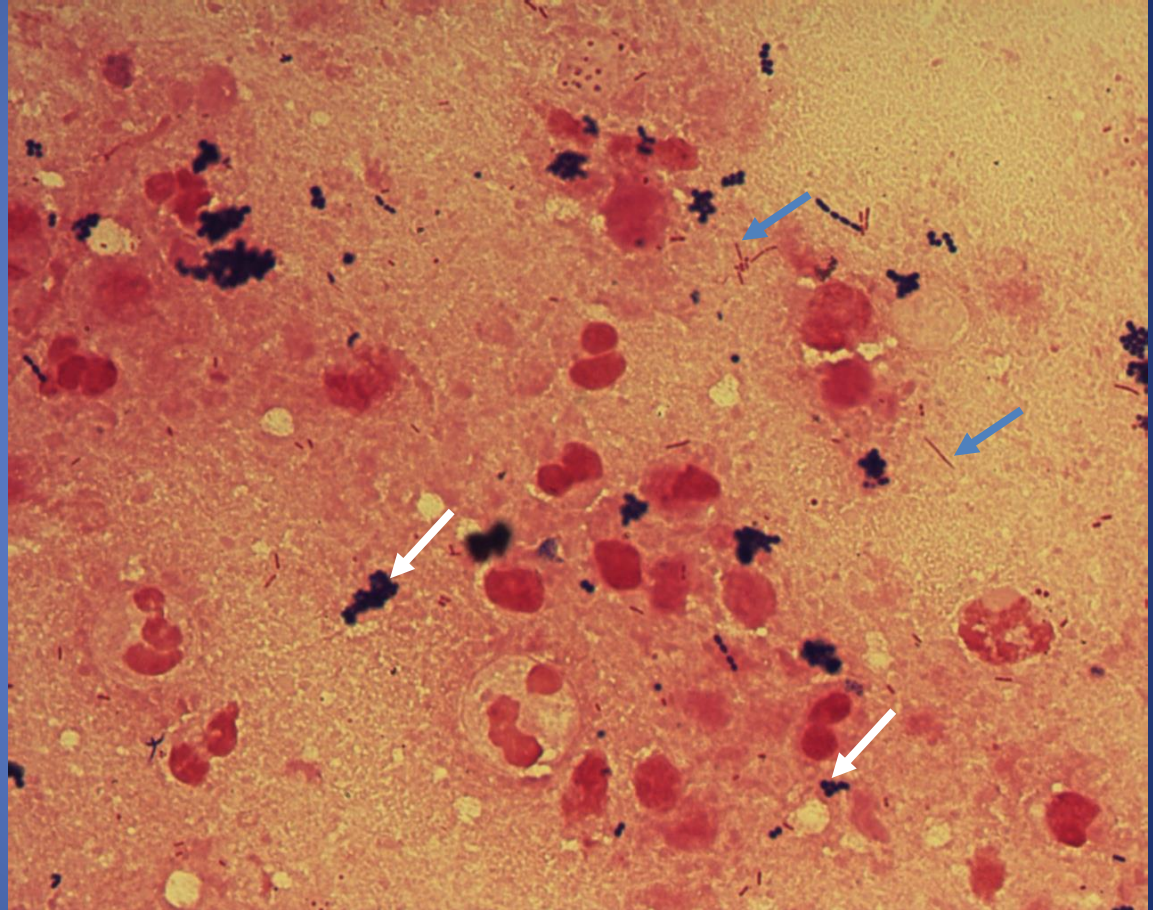
***Staphylococcus
aureus,
Pseudomonas
aeruginosa***

Materiál: sputum

Pacient: muž 17 let

Dg: cystická fibróza

Mikroskopie: grampozitivní koky tvořící hrozna; gramnegativní podlouhlé tyčinky



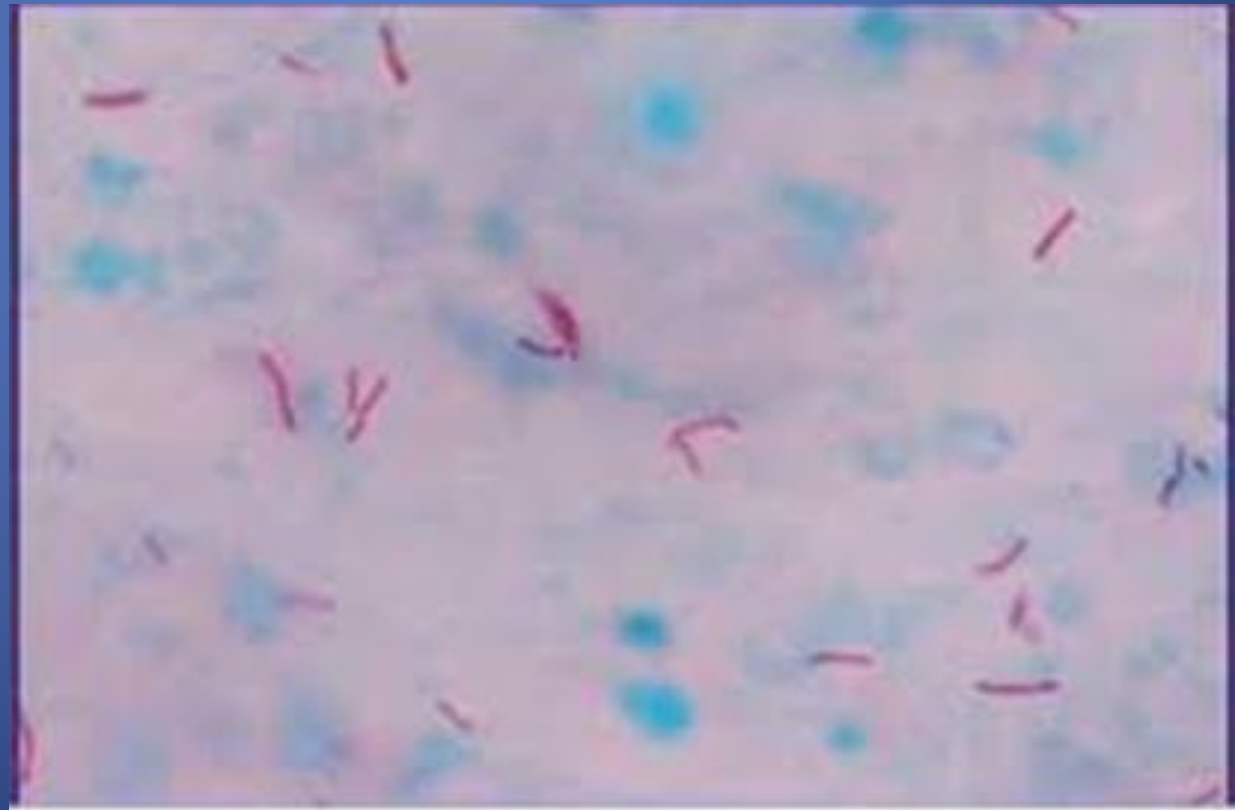
Autor: doc. MVDr. Otto Melter, PhD.

Tuberkulóza

- *Mycobacterium tuberculosis* – extrémně dlouhá kultivace – až 6 týdnů
- Mikrobiologický průkaz – mikroskopie (Ziehl-Nielsen) nebo PCR

Barvení mykobakterií podle Ziehl-Neelsena

- Znázornění acidorezistentních tyčinek (mykolová kyselina v buněčné stěně zabraňuje odbarvení kyselým alkoholem)
- Tyčinky jsou růžové, ostatní struktury světle zelené až bezbarvé



- Preparát ze zubního plaku – Gram
- Ukázkové preparáty – Streptokok – řetízky
- Sbírka preparátu z klinického materiálu

Salivary microbiome

Source: Nasidze. 2009. *Genome Research*, 19, 636-43.



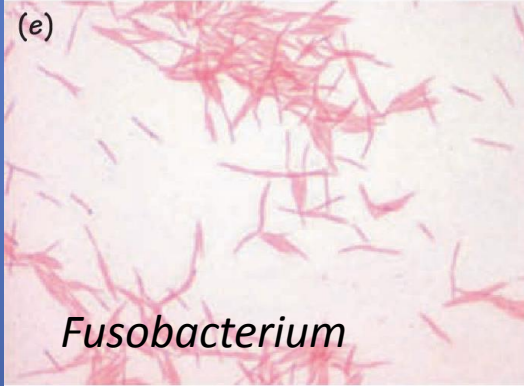
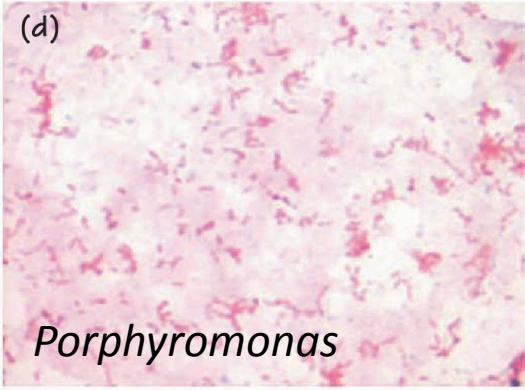
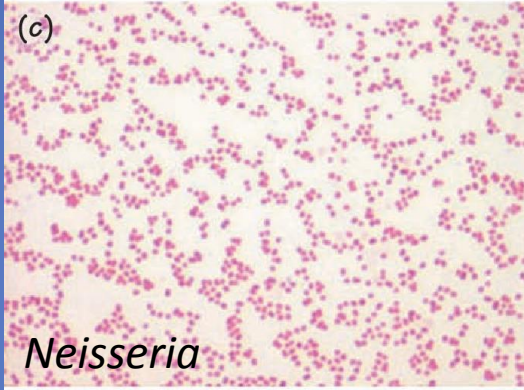
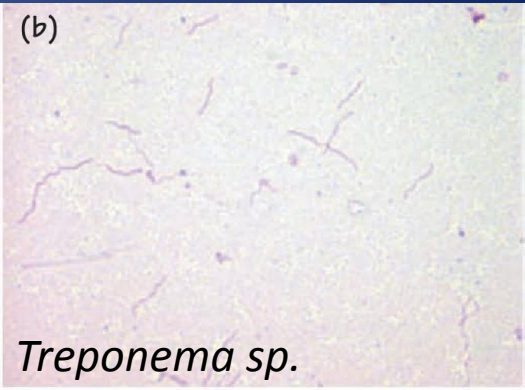
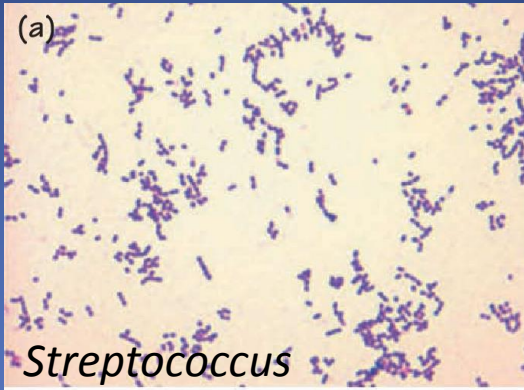
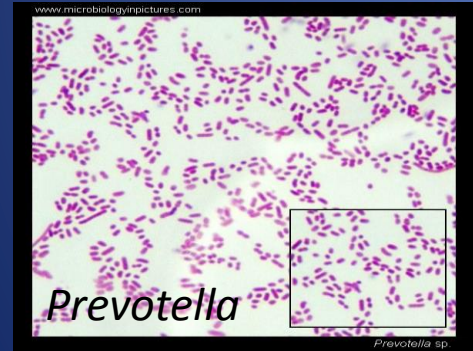


Figure 21 Gram stains of important oral bacteria observed by microscopy: (a) *Streptococcus* *gordoni*; (b) *Treponema* *denticola*; (c) *Neisseria* sp.