Mikrobiologická diagnostika

- Přímý průkaz
  - Mikroskopický průkaz
  - Kultivace
  - Průkaz bakteriálních složek v klinickém materiálu
  - ➢ Bližší stanovení patogena
  - ➢ Stanovení citlivosti k ATB
- Nepřímý průkaz
  - Sérologie

Přímý průkaz

Mikroskopie

- Světelná mikroskopie
  - Zvětšení 10-100x
  - Bakteriologie, mykologie, parazitologie
- Fluorescenční mikroskopie
  - Zvětšení 10-100x
  - Mykobakteriologie, mykologie, virologie
- Elektronová mikroskopie
  - Zvětšení 10-100 000x
  - Především Virologie

Přímý průkaz

Mikroskopie

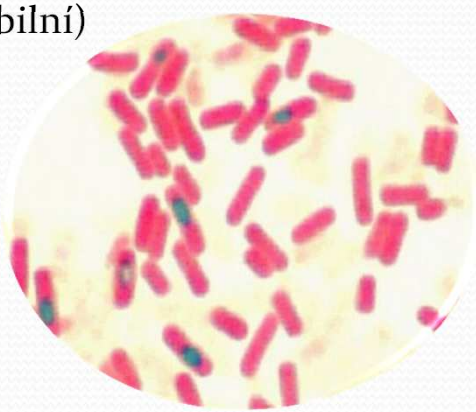
- Světelná mikroskopie
  - Nativní preparát
    - Pozorování živých mikroorganismů
      - Pohyb
    - Parazitologie
      - Pozorování vajíček a cyst parazitů
    - Mykologie
      - Louhové preparáty
  - Fixovaný preparát
    - Použití pro barvící metody
      - Jednoduché barvící metody
        - dle Loefflera
      - Diagnostické barvící metody

Enterobius vermicularis – nativní preparát

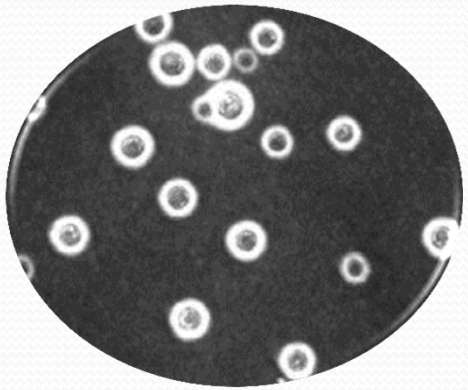
Přímý průkaz

Mikroskopie

- Barvící techniky diagnostické
  - Gramovo barvení
    - Rozdělení na skupiny Gram pozitivní a Gram negativní (popř. labilní)
    - Založené na rozdílné stavbě <u>bakteriální stěny</u>
  - Ziehl-Neelsenovo barvení
    - Pro diagnostiku acidorezistentních mikroorganismů
    - Mykobakterie (mykolové kyseliny)
  - Burriho barvení
    - Barvení pouzdra
    - Negativní znázornění tuší
  - Barvení dle Alberta
    - Průkaz metachnomatických ganulí
  - Barvení dle Writze – Conklina
    - Pro průkaz spór
  - Barvení dle Giemsy
    - Provádí se v krevních nátěrech
    - Parazitologie



Rod *Bacillus* - barvení dle Wirtz-Conklina



Cryptococcus neoformans – Burriho barvení

Příprava preparátů

- Fixovaný preparát z klinického materiálu
  - Klinický materiál rozetřete po celé ploše podložního skla a nechte zaschnout
  - Fixujte protažením v plameni (3x) nebo v methanolu 5 min
- Fixovaný preparát z čisté kultury
  - Na podložní sklo kápněte kapku fyz. roztoku
  - Malé množství kolonie resuspendujte v kapce fyz. roztoku a nechte zaschnout
  - Fixujte protažením v plameni (3x) nebo v methanolu 5 min

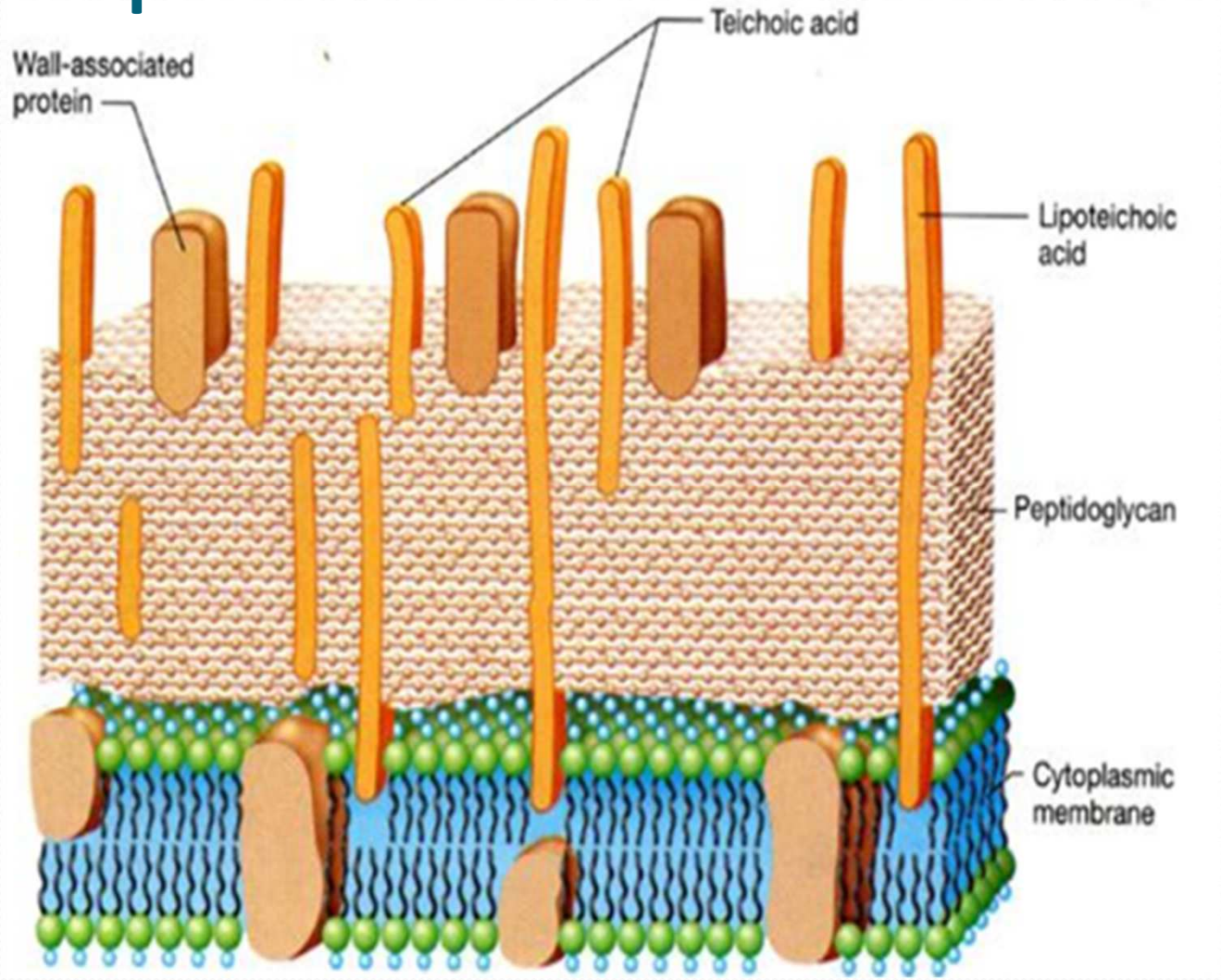
Gramovo barvení

- Základní mikrobiologické barvení
- Rozlišuje bakterie na skupinu Gram pozitivní (modrofialové), Gram negativní (růžovočervené) a Gram labilní
- Založeno na rozdílné stavbě <u>buněčné stěny</u>
- Vznik barevného komplexu
  - Krystalová violeť + Lugol (jód)
  - Komplex je u gram negativních bakterií odbarven acetonem a bakterie jsou dále dobarveny safraninem/karbolfuchsinem

Gram pozitivní bakterie

- Buněčná stěna tvořena mohutnou vrstvou peptidoglykanu
  - Složen z aminosacharidů
    - Kys. N-acetylmuramová
      - Transpeptidy vycházející z kys. se vzájemně vážou – transpeptidace
    - Kys. N-acetylglukosaminu
- Kolmo procházejí řetězce kyseliny teichoové
- Průměr buněčné stěny je cca 20 nm

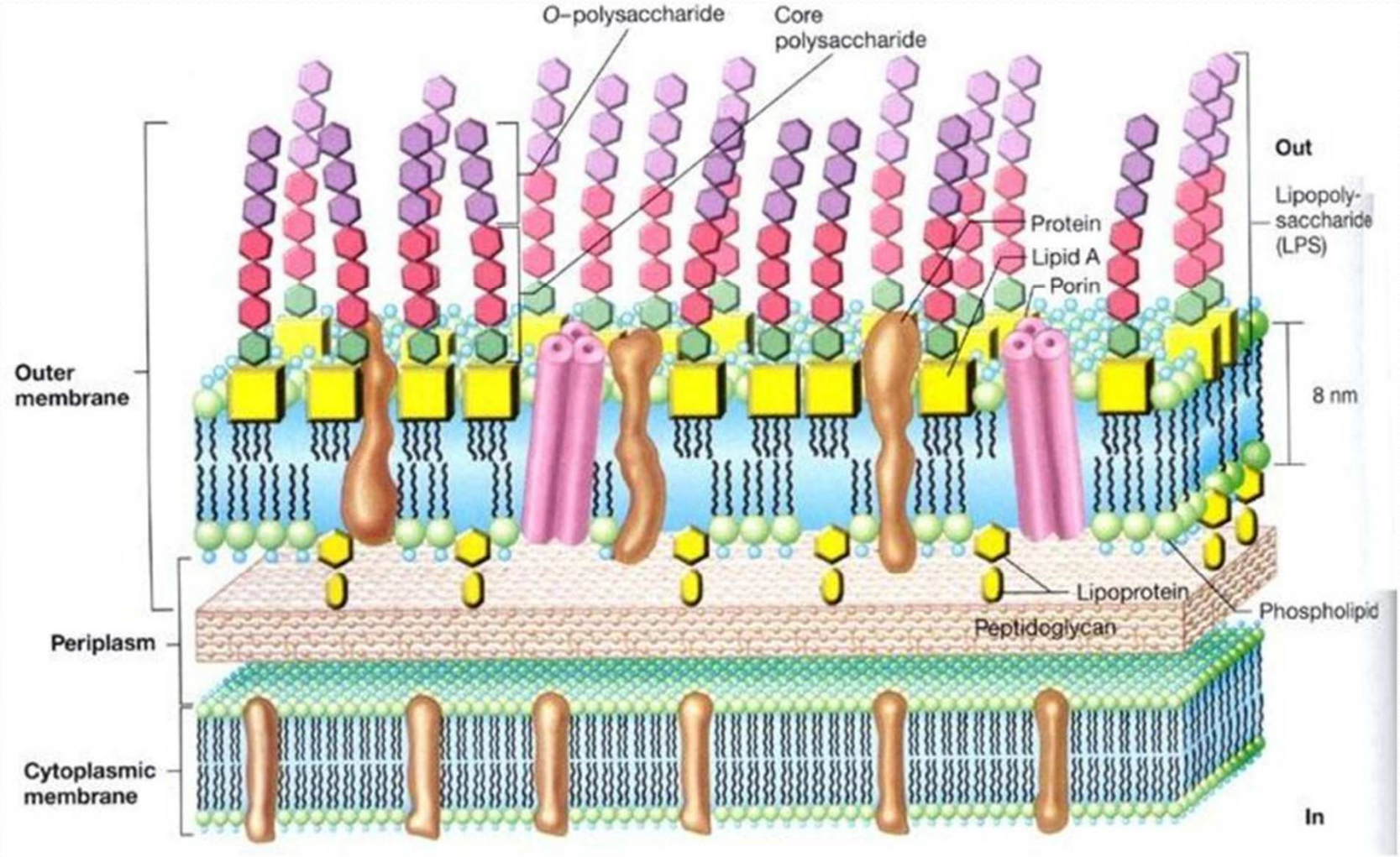
Gram pozitivní bakterie



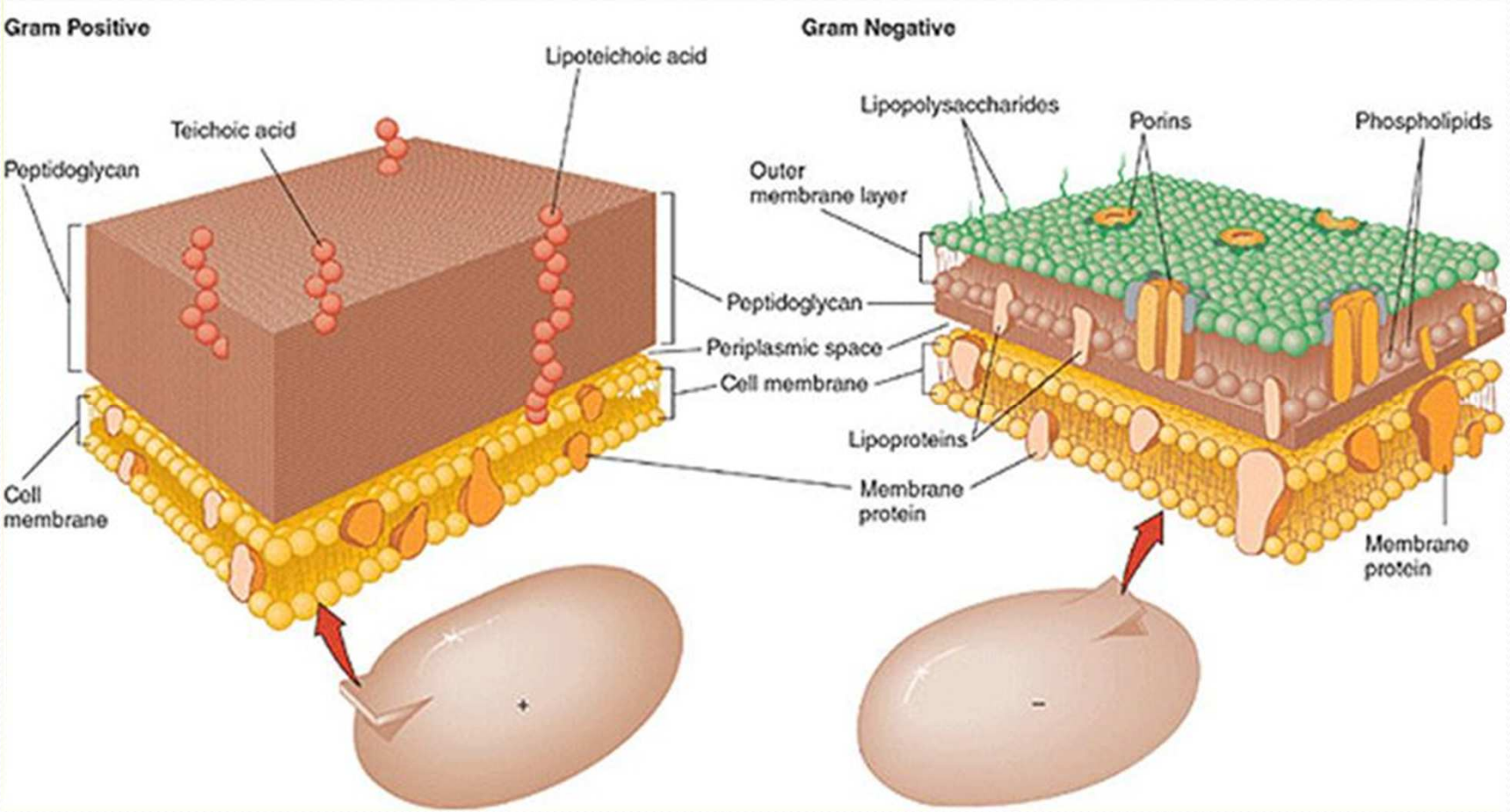
Gram negativní bakterie

- Buněčná stěna je složena ze zevní membrány a periplasmatického prostoru s peptidoglykanem, který je tenký, téměř jednovrstevný a obsahuje kyselinu diaminopimelovou
- Zevní membrána je tvořena fosfolipidovou dvouvrstvou, která obsahuje proteiny a lipopolysacharidy
  - Proteiny
    - Některé z nich tvoří poriny
    - Lipoproteiny zajišťují pevnou vazbu zevní membrány na peptidoglykan
  - Lipopolysacharidy (endotoxin)
    - Lipidová část zanořená v membráně – lipid A
    - Core (sacharidové zbytky) spojující lipid A a antigen O
    - Polysacharidová část vyčnívá z membrány – antigen O
- Zevní membrána brání průniku některým látkám
  - Krystalová violeť
  - Některá ATB, např. erythromycin
  - Žlučové kyseliny
- Periplasmatický prostor obsahuje enzymy
  - Štěpí potravu
  - Zajištění transportu
  - Inaktivace některých ATB (beta-laktamázy)

Gram negativní bakterie



Gramovo barvení



Gramovo barvení

- Fixovaný preparát položte na barvící lavici – nad umyvadlem!
- Přelijte preparát krystalovou violetí – 20 sec
- Převrstvěte barvivo Lugolovým roztokem – 20 sec
- Slijeme a odbarvujeme acetonem, dokud odtéká fialová barva
- Opláchněte pod tekoucí vodou
- Dobarvíme karbolfuchsinem/safraninem – 5 sec
- Opláchněte barvivo pod tekoucí vodou
- Nechte uschnout

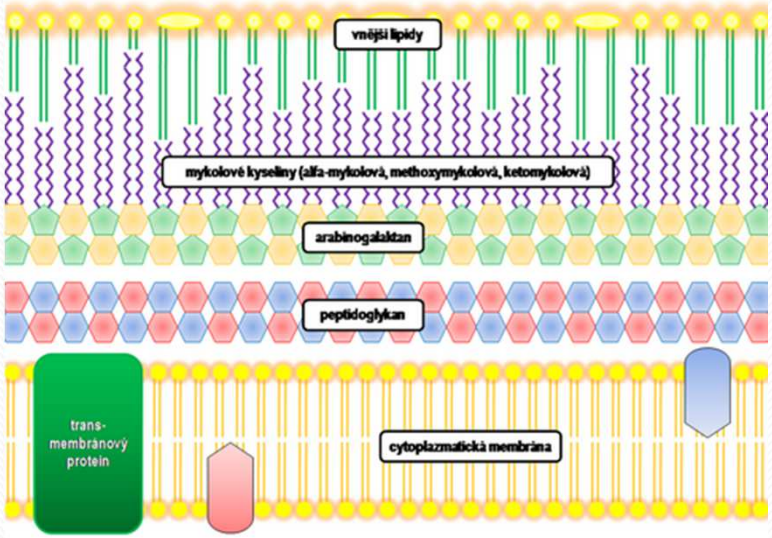
Vlak/Vlas

Ziehl-Neelsenovo barvení

- Pro diagnostiku acidorezistentních mikroorganismů
- Mykobakterie, nokardie
  - Acidorezistence dána vysokým obsahem lipidů v buněčné stěně – mykolové kyseliny
- Princip barvení
  - Tvorba komplexů buněčné stěny s fuchsinem
    - Průnik barviva usnadněn zvýšenou teplotou
  - Komplex neodbarvují kyseliny, zásady či alkohol
  - Pozadí preparátu je dobarveno kontrastním činidlem
  - Acidorezistentní mikroorganismy jsou růžové na modrém/zeleném pozadí

Ziehl-Neelsenovo barvení

- Buněčná stěna mykobakterií je tvořena silnou vrstvou mykolových kyseliny, polysacharidovou vrstvou a peptidoglykanem
  - Mykolové kyseliny (zabránění fagocytózy)
    - Dlouhé mastné kyseliny s cyklopropanovým jádrem, popř. metoxy- či ketoskupiny
  - Polysacharidová vrstva
    - Arabinogalaktan



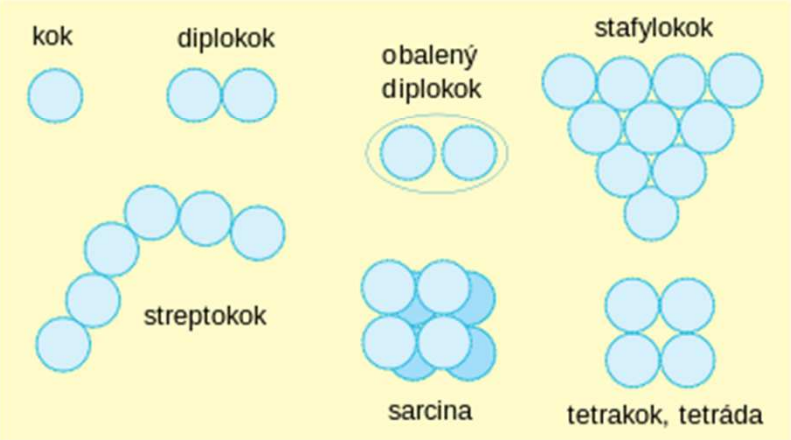
Ziehl-Neelsenovo barvení

- Fixovaný preparát položte na barvící lavici nad umyvadlem!
- Přelijte preparát **koncentrovaným karbolfuchsinem.**
- Zahřívejte plamenem 3x do výstupu par.
- Barvivo nesmí vřít!
- Opláchněte barvivo pod tekoucí vodou.
- Odbarvěte kyselým alkoholem.
- Dobarvěte malachitovou zelení – 3 min.
- Opláchněte barvivo pod tekoucí vodou.
- Nechte uschnout.

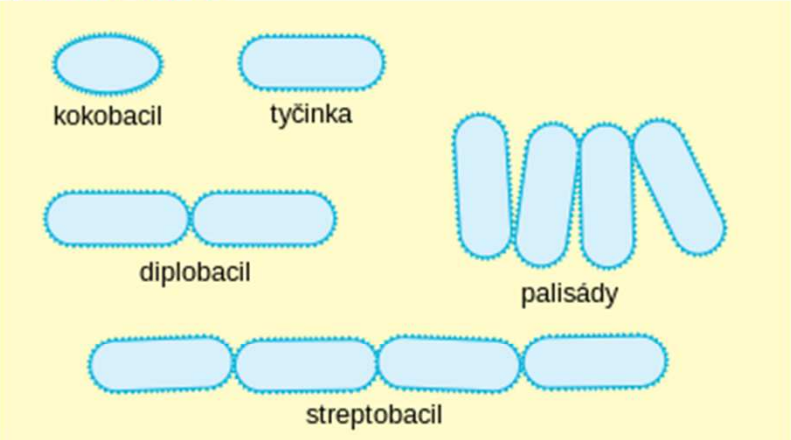
Mikroskopická morfologie

- Velikost
  - Většina kolem 1-3 µm
- Tvar
  - Kulovité, sférické (*kokkos*, jádro)
    - pravidelné, zašpičatělé (*Strep. pneumoniae*), oploštěné (gonokoky, meningokoky)
  - Protáhlé, tyčinky
    - kokobacily, vlákna, prohnuté, kyjovité, spirálovité
- Uspořádání (závislé na rovině dělení)
  - Koky
    - Řetízky (*streptos,* kroucený řetěz), dvojice (*diplós*, dvojitý), sarciny (*sarcina*, balík), shluky (*stafylé,* hrozen)
  - Tyčinky
    - Dvojice (diplobacily*),* krátké řetízky (streptobacily), palisádové (v podobě římských číslic)
- Barva
  - Dle barvení

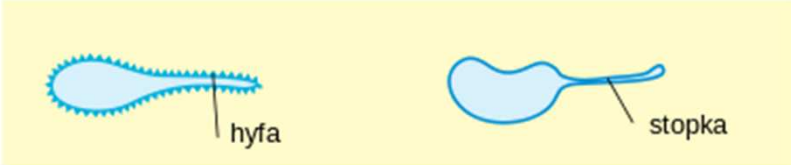
koky



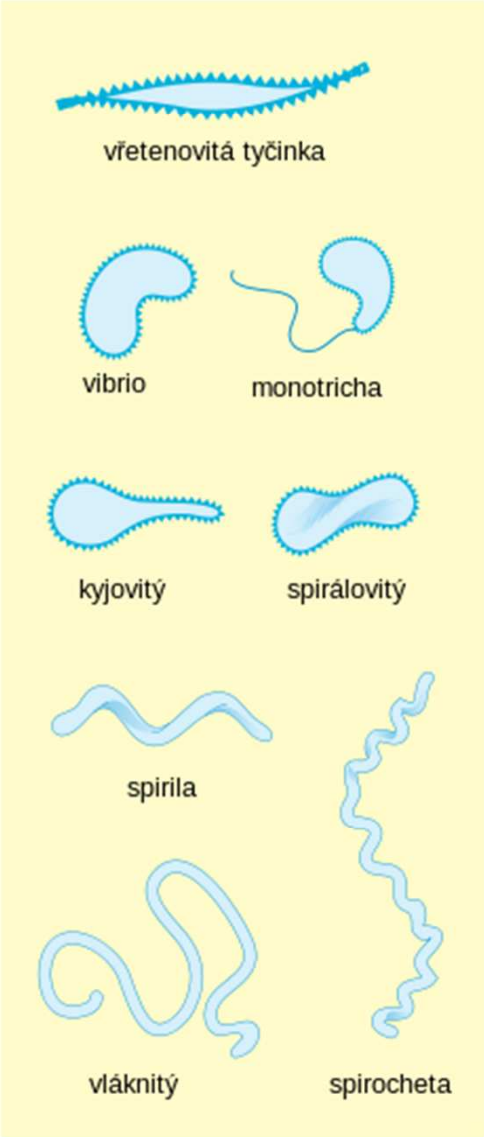
tyčinkovité bakterie



pučící bakterie a bakterie s přívěskem

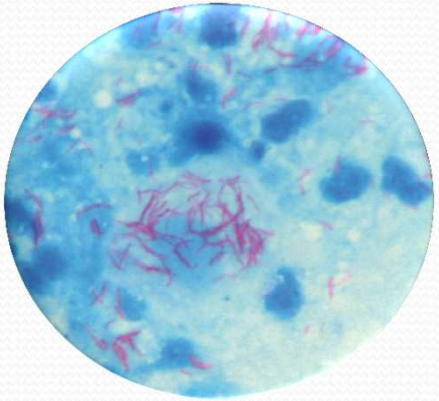


jiné

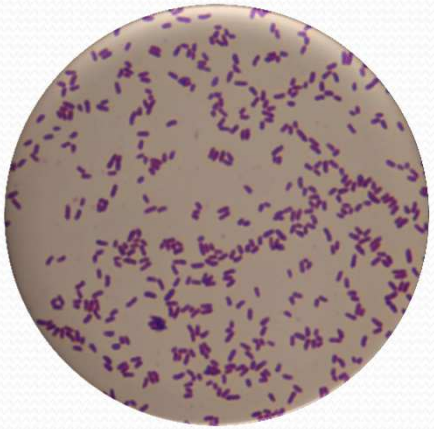


Mikroskopická morfologie

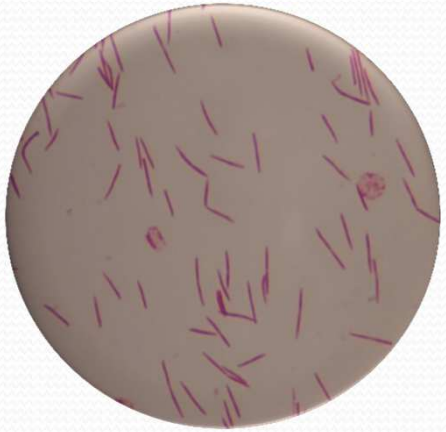
Pseudomonas aeruginosa – Gramovo barvení G-



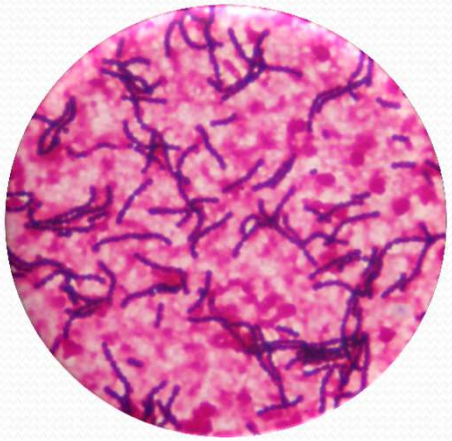
Mycobacterium tuberculosis – Ziehl-Neelsenovo barvení



Corynebacterium sp. – Gramovo barvení G+



Fusobacterium sp. – Gramovo barvení G-



Streptococcus pyogenes v HK – Gramovo barvení G+