Čeleď Enterobacteriaceae

Enterobakterie náleží k velice často izolovaným bakteriím z klinického materiálu. Jsou to Gramnegativní tyčinky obligátně patogenní, jiné jsou součástí normální flóry zažívacího traktu, ale mimo zažívací trakt mohou být patogenní.

S enterobakteriemi se můžeme setkat při vyšetření stolice, močí, sputa, hnisu, likvoru, výtěrů z ran, z pochvy. Mohou vyvolávat infekce postihující kterýkoli orgán.

Mikroskopie: mikroskopický průkaz má význam u těch druhů klinických materiálů, kde se enterobekterie běžně nevyskytují (likvor, krev, punktáty, hnis apod.).Stolice se mikroskopicky nevyšetřuje.

Kultivace: kolonie si jsou na krevním agaru velmi podobné. Bývají relativně velké (až 5 i více mm), lehce vypouklé, hladké, lesklé. Část kmenů může vykazovat β hemolýzu. Pokud kmen tvoří pouzdro, např. u klebsiell, mívá kolonie mukózní charakter. Kolnie většiny kmenů rodu Proteus mají charakteristický plazivý růst (Raussův fenomén).

Pro kultivaci používáme krevní agar a selektivně diagnostické půdy, zejména Endova půda, MacConkey agar, půdy MAL (maltóza, arabinóza, laktóza), XLD (xylóza, laktóza, deoxycholát).

Identifikace: Enterobakterie mají velmi pestrou biochemickou aktivitu. Mezi základní biochem.aktivity patří - schopnost fermentace glukózy
- negativní oxidázová a většinou pozitivní katalázová reakce
- schopnost redukovat nitráty na nitrity

Pro hrubé určení stačí Švejcarova izolační plotna.. Je použitelná pro identifikaci bakterií, které neštěpí laktózu. U bakterií štěpících laktózu jsou kolonie červené na celé Endově půdě a nelze hodnotit štěpení manitolu a sacharózy.

Pro podrobnější identifikaci je určen Enterotest Lachema.

Laboratorní diagnostika hemofilů

ROD HAEMOPHILUS

Jedná se drobné gramnegativní tyčinky s vysokými kultivačními nároky. U člověka působí komplikace hlavně virových infekcí dýchacích cest, středního ucha a vedlejších dutin. Jsou významným původcem meningitid.

Mikroskopie: drobné štíhlé, gramnegativní tyčinky, opouzdřené i neopouzdřené.

Kultivace: Hemofily jsou kultivačně velmi náročné. Vyžadují růstové faktory V (nikotinamidadenindinukleotid) a X (hemin), které jsou obsaženy v eytrocytech, ale hemofily je nedokáží sami uvolnit. Kultivují se na čokoládovém nebo Levinthalově agaru, kde jsou růstové faktory z erytrocytů uvolněny teplem. Aby půdy byly selektivní, přidává se bacitracin.

Čokoládový agar – šedé, průhledné kolonie

Levinthalův agar – průhledné lesklé kolonie.

V obou případech se půdy nechávají kultivovat 48 hodin za zvýšené tenze CO_2.

Krevní agar – hemofily je možné kultivovat pouze s kmenem Staphylococcus aureus, který svými hemolyziny uvolní z erytrocytů růstové faktory. Hemofily rostou v zóně hemolýzy nebo v její těsné blízkosti, tomuto jevu se říká satelitový fenomén.

Identifikace: podle růstu na kultivačních půdách. Různé druhy hemofilů lze odlišit podle nároků na růstové faktory. Používáme půdy, které neobsahují ani stopy růstových faktorů, např. živný agar. Půdy se naočkují vyšetřovaným kmenem a na povrch se umístí tři páírové disky. Jeden je nasycen X-faktorem, druhý V-faktorem, třetí směsí faktorů X+V. Pro kontrolu se kmen naočkuje i na krevní agar k ověření, zda skutečně vykáže satelitový fenomén. Po inkubaci se druhý den zjišťuje, kolem kterého z disků kmen vyrostl:

X+V H.influenzae
H.haemolyticus
V H.parainfluenzae
X H.ducreyi
H.aphrophilus (dovede syntetizovat hemin,takže nemá striktní požadavky na růstové faktory)

Haemophilus influenzae vyvolává různě závažné respirační infekce (sinusitidy,otitidy), u dětí hnisavou konjuktivitidu. Z opouzdřených kmenů H.influenzae se nejčastěji izolují serotypy b a f. U dětí do 5 let jsou nejčastějším původcem hnisavé meningitidy a epiglotitidy.
Haemophilus parainfluenzae se považuje za normální mikroflóru horních cest dýchacích. Může však vyvolat sinusitidu, bakteriémii, endokarditidu.
Haemophilus aphrophilus je normálním obyvatelem horních částí respiračního traktu.
Haemophilus ducreyi je původcem klasické pohlavně přenosné choroby, měkkého vředu (ulcus molle). Choroba se projevuje bolestivými vředy na sliznicích urogenitálu.

Nepřímý průkaz: metodou ELISA stanovení hladiny protilátek proti H.influenzae typ b pro sledování protilátkové odpovědi po očkování.

Zpracování hemokultur

Sepse je klinický stav těžké infekce spojený s výskytem bakterií v krvi. Pro vznik sepsí má velký význam i infekce pooperačních ran, vliv poškození tkáně permanentními katetry, popáleniny a infekce podkožních tkání. Sepse se stávají komplikací základního onemocnění, které snížilo celkovou rezistenci organismu (např. tumory, diabetes..).

K bakteriémii dochází v důsledku vytvoření ložiska, ze kterého se občas nebo stále vyplavují bakterie do krve. V případě sepsí vyvolaných grampozitvními bakteriemi je vstupní branou kůže nebo sliznice. U sepsí vyvolaných gramnegativními bakteriemi je ložisko nejčastěji v močovém nebo dýchacím traktu .Gramnegativní bakterie se často usazují na stěnách kanyl, zavedených do žil.

Nejlepší výsledky dávají odběry provedené před nasazením antibiotik. 1.vzorek je třeba odebírat na začátku teploty či třesavky a pokud teplota stoupá pravidelně v určitou denní dobu, pak asi 1 hod. před tímto vzestupem Další vzorky se odebírají podle teplotní křivky.

Kultivace

Kultivaci provádíme v automatickém analyzátoru. Do specielních lahviček pro aerobní nebo anaerobní bakterie naočkují přímo na oddělení injekční stříkačkou asepticky asi 5 ml krve. Lahvičky se umístí do termostatové skříně analyzátoru. Teplota kultivace se pohybuje mezi 35 – 37^{0}C a délka kultivace by měla činit 5 dnů. Při růstu bakterií vzniká CO_2, jehož působením zežloutne ~~terčík na dně~~ UNO lahviček.Tento proces je každých 10 minut monitorován a vyhodnocován. Pozitivní vzorek je signalizován světelně, zvukově, písemně.

Z pozitivní hemokultury se připraví nátěr a obarví dle Grama. Na základě mikroskopického nálezu se očkují vhodné pevné půdy a zakládají orientační diskové citlivosti na vhodná antibiotika.

Etiologické agens infekce představují z běžně izolovaných mikrobů Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, enterokoky a Candida albicans.

Laboratorní diagnostika anaerobních bakterií

Zpracování hnisu

Nejběžnějším vzorkem odebíraným u hnisavých infekcí je stěr z rány či abscesu na tamponu. Stěr z rány musí být zanořen do transportní půdy, jinak během dopravy do laboratoře materiál na tamponu vysychá a hynou v něm anaeroby.

Při odběru materiálu z hnisavého ložiska je nejlepší odebrat injekční stříkačkou **hnis** jako tekutinu, nechat nasazenou jehlu a tu zabodnout do sterilní gumové zátky. Stříkačku s hnisem zaslat do laboratoře.

Z hnisu se připraví mikroskopický preparát, který se obarví dle Grama.Očkuje se na krevní agar se stafylokokovou čárou, selektivně diagnostickou půdu na enterobakterie (raději půdu Mac Conkeyho než Endovu kvůli potlačení plazivého růstu protea) a selektivní půdu pro sta fylokoky (např.krevní agar s 10% NaCl).Na pomnožení se očkuje do tekutého aerobního bujónu. Rozhodně je však třeba hnis kultivovat i anaerobně, a to na krevním agaru obohaceném suplementy pro růst anaerobů (lze na něm odstínit gramnegativní flóru např.amikacinovými disky) a v kvalitním bujonu pro anaeroby (např. VL bujon).

Anaerobní kultivace

Anaerobní bakterie nemají enzym peroxidázy, který by je chránil před toxickými sloučeninami kyslíku. Proto je musíme kultivovat v atmosféře bez kyslíku nebo v médiích obsahujících redukující sloučeniny.

Oxidoredukční potenciál (Eh) je napětí vyjádřené v mV, které vzniká jako výsledek nerovnováhy mezi oxidačními a redukčními produkty v médiu. Měří se milivoltmetrem nebo podle barevných indikátorů.
Masopeptonový bujón má Eh asi +300mV, zatímco anaerobní bakterie začínají růst při hodnotách –100mV.

Půdy pro anaerobní bakterie obasahují redukující látky (cystein,glukózu...). Půdy se před pužitím musí regenerovat. Tekuté půdy povařením, aby se vypudil kyslík, tuhé půdy vložením do anaerostatu. Půdy bývají ve vysokých sloupcích nebo vrstvách.

Anaerobní prostředí pro růst bakterií je možno dosáhnout:

- zabráněním vniknutí kyslíku do média
- nahrazením kyslíku v atmosféře jiným plynem
- vyvázáním kyslíku chemickými nebo biologickými reakcemi

Přístupu kyslíku zabráníme již při odběru materiálu, kdy vzorek k vyšetření zašleme přímo v injekční stříkačce, z níž byl vytlačen vzduch a jejíž jehla je zabodnuta v gumové zátce. Tekuté půdy převrstvujeme malým množstvím sterilního parafinového oleje. Půdy pro kultivaci anaerobních bakterií obsahují redukční činidla, která snižují redox potenciál.
Nahradit vzduch můžeme některým jiným plynem. Ideální je směs 10% CO_2 + 10% H_2 + 1 byt. N_2
Používá se ve zvlášť konstruovaných termostatech, ve kterých rostou bakterie v ideální anaerobní atmosféře.

Kultivace za anaerobních podmínek dnes snadno dosahujeme v tzv. anaerostatech. **Anaerostat** je válcovitá nádoba s víkem, do které vložíme až 12 Petriho misek, sáček s vhodnými chemikáliemi (směs hořčíku, kyseliny vinné a uhličitanu sodného) a katalyzátor. Do sáčku přidáme vodu. Chemickou reakcí vzniká vodík a CO_2. Vodík se za přítomnosti katalyzátoru sloučí s kyslíkem za vzniku vody. Katalyzátor obsahující paladium ukládáme v podobě kovového polštářku pod víko anaerostatu.
Novější soupravy nepotřebují vodu, katalyzátor je již obsažen v sáčku. Další průběh reakce je shodný. Jsou vyráběny také soupravy, kde vkládáme jen jednotlivé Petriho misly do sáčku z plastu a přidáme menší množství uvedených chemikálií.

Zpracování hnisu

Odběr materiálu

Nejběžnějším vzorkem odebíraným u hnisavých infekcí je stěr z rány na odběrovém tampónu. Stěr z rány musí být zanořen do transportní půdy, jinak během dopravy do laboratoře materiál na tampónu vysychá a hynou v něm anaeroby. Stěr zaslaný v transportní půdě se nehodí k přípravě mikroskopického preparátu.Doporučuje se zaslat stěry dva, jeden v transp.půdě ke kultivaci, druhý na suchém tampónu k přípravě mikroskop.preparátu.

Při odběru materiálu z hnisavého ložiska je třeba odebrat injekční stříkačkou hnis jako tekutinu, nechat ve stříkačce s nasazenou jehlou, tu zabodnout do sterilní gumové zátky a stříkačku s hnisem zaslat do laboratoře.

Mikroskopie

Preparát se barví podle Grama

Kultivace

Očkujeme na krevní agar se stafylokokovou čárou, selektivně diagnostickou půdu na enterobakterie (raději půdu MacConkeyho než Endovu kvůli potlačení plazivého růstu protea) a selektivní půdu pro stafylokoky (KA + 10% NaCl) na pomnožení bakterií očkujeme do tekutého aerobního bujónu. Rozhodně je třeba hnis vždy kultivovat i anaerobně a to na krevním aga obohaceném suplementy pro růst anaerobů (lze na něm odstínit gramnegativní flóru např.amikacinovými disky) a v kvalitním bujónu pro anaeroby.

Příčinou infekcí ran bývá především Staphylococcus aureus, beta-hemolytické streptokoky, clostridia. Popáleniny často infikuje Pseudomonas aeruginosa.

Lab.diagnostika TBC,zpracování sputa na BK

Rod *Mycobacterium* zahrnuje acidorezistentní tyčinky často vyžadující dlouhodobou kultivaci. Nejdůležitější pro člověka jsou tuberkulózní mykobakteria ***Mycobacterium tuberculosis*** (bacil Kochův, BK) a ***M.bovis*** a původce malomocenství ***M.leprae.***

Odběr materiálu

TBC je tzv. specifická infekce, která může postihnout prakticky kterýkoli orgán. U nejčastější formy plicní odebíráme sputum nebo laryngeální výtěr. Dále odebíráme různý materiál podle lokalizace infekce, např. moč, punktáty, likvor.

Mikroskopie

Mykobakteria se pro přítomnost velkého množství lipidů ve své stěně nebarví podle Grama. Klasickou technikou barvení na acidorezistentní tyčinky je barvení dle *Ziehla-Neelsena.*

Postup barvení:

1. Příprava fixovaného preparátu
2. Barvení koncentrovaným karbolfuchsinem. Sklíčko s preparátem se přeleje karbolfuchsinem a plamenem kahanu se zahřeje 3x do výstupu par. Nesmí vařit!!Barví se 3-5 minut.
3. Odbarvování kyselým alkoholem (alkohol s kys.sírovou nebo chlorovodíkovou) Sklíčko se drží v ruce šikmo a přelévá se kys.alkoholem. Po odbarvení se preparát opláchne vodou.
4. Kontrastní barvení. Preparát se barví metylenovou modří nebo malachitovou zelení asi 30 s.
5. Opláchnutí vodou a osušení preparátu.

Po obarvení jsou acidorezistentní mikroby a útvary červené. Pozadí je modré nebo zelené (podle použitého barviva).

Kultivace

Vzorky normálně sterilní (likvor, biopsie) lze kultivovat rovnou. Většina vzorků (např. sputum) obsahuje tzv. nespecifickou mikroflóru: rozmanité druhy jiných mikrobů, které by mykobakteria rychle přerostly a půdu znehodnotily. Tyto vzorky musíme ostatních mikrobů zbavit. Tento dekontaminační postup se nazývá *moření vzorku.* Pomořený vzorek se zkoncentruje centrifugací a teprve pak se vyšetřuje mikroskopicky a kultivačně.

Vyšetřovaný materiál homogenizujeme a přelejeme zředěnou HCl na 30 minut. Během této doby usmrtíme včechny ostatní bakterie, zatímco mykobakteria, která jsou acido-alkalirezistentní, přežijí. Po neutralizaci NaOH očkujeme na speciální živné půdy. Kultivujeme současně na 3 - 4 tekutých i pevných půdách. Půda Löwenstein-Jensenova a Ogawova jsou tuhé, zeleně-žluté vaječné půdy, nalévané do zkumavek jako šikmý agar a uzavřené gumovými zátkami, aby během dlouhé kultivace nevyschly.

Mykobakteria na nich vyrůstají v koloniích připomínajících malé růžice květáku. Půdy Šulova a Baničova jsou tekuté nažloutlé půdy, kde mykobakteria rostou v zrnitém sedimentu. Půdy se odečítají za 1, 3, 6, a 9 týdnů kultivace při 37°C.

Pokus na zvířeti

Je indikován zejména tam, kde se jedná o materiál vzácný a neopakovatelný, jako je likvor, hnis nebo bioptické vzorky a o němž se předpokládá, že obsahuje málo Kochových bacilů.

Vzorek se očkuje morčeti pod kůži obou zadních končetin na vnitřní straně stehna pod třísly. Přibližně za 14 dnů se v místech vpichu může vyvinout vřed a asi po 2 měsících zvíře hyne. Při pitvě nalézáme ložiska ve slezině a játrech a někdy i v plicích.

Novější (rychlé) postupy v diagnostice mykobakterií

Dlouhé trvání klasické kultivace na BK vede ke snahám dobu vyšetření co nejvíce zkrátit. Byl vyvinut systém, který v poloautomatickém přístroji dovoluje detekovat pomnožená mykobakteria na základě uvolňovaného radioaktivního CO_2 do 14 dnů, často i mnohem dříve.

Vysoce citlivé, a proto využitelné k průkazu genomu mykobakterií přímo v klinickém materiálu, jsou metody využívající amplifikace nukleových kyselin - *polymerázová řetězová reakce (PCR).*

Nepřímý průkaz tuberkulózy

Průkaz pozdní přecitlivělosti *tuberkulinovým kožním testem* se užívá před očkováním proti tuberkulóze (kalmetizací) jako test dle Mantoux. Tuberkulin se v malém množství vstříkne intradermálně. Jedinci, kteří se s infekcí setkali, zůstávají léta přecitlivělí a v místě podání se u nich vyvine zánětlivá reakce. Očkují se pouze ti, kteří zůstali tuberkulinnegativní. Při pozitivním testu se od očkování musí upustit pro možnost zvýšené reakce po podání BCG-vakcíny.

Lab.diagnostika TBC,zpracování sputa na BK

Rod *Mycobacterium* zahrnuje acidorezistentní tyčinky často vyžadující dlouhodobou kultivaci. Nejdůležitější pro člověka jsou tuberkulózní mykobakteria ***Mycobacterium tuberculosis*** (bacil Kochův, BK) a ***M.bovis*** a původce malomocenství ***M.leprae.***

Odběr materiálu

TBC je tzv. specifická infekce, která může postihnout prakticky kterýkoli orgán. U nejčastější formy plicní odebíráme sputum nebo laryngeální výtěr. Dále odebíráme různý materiál podle lokalizace infekce, např. moč, punktáty, likvor.

Mikroskopie

Mykobakteria se pro přítomnost velkého množství lipidů ve své stěně nebarví podle Grama. Klasickou technikou barvení na acidorezistentní tyčinky je barvení dle *Ziehla-Neelsena.*

Postup barvení:

1. Příprava fixovaného preparátu
2. Barvení koncentrovaným karbolfuchsinem. Sklíčko s preparátem se přeleje karbolfuchsinem a plamenem kahanu se zahřeje 3x do výstupu par. Nesmí vařit!!Barví se 3-5 minut.
3. Odbarvování kyselým alkoholem (alkohol s kys.sírovou nebo chlorovodíkovou) Sklíčko se drží v ruce šikmo a přelévá se kys.alkoholem. Po odbarvení se preparát opláchne vodou.
4. Kontrastní barvení. Preparát se barví metylenovou modří nebo malachitovou zelení asi 30 s.
5. Opláchnutí vodou a osušení preparátu.

Po obarvení jsou acidorezistentní mikroby a útvary červené. Pozadí je modré nebo zelené (podle použitého barviva).

Kultivace

Vzorky normálně sterilní (likvor, biopsie) lze kultivovat rovnou. Většina vzorků (např. sputum) obsahuje tzv. nespecifickou mikroflóru: rozmanité druhy jiných mikrobů, které by mykobakteria rychle přerostly a půdu znehodnotily. Tyto vzorky musíme ostatních mikrobů zbavit. Tento dekontaminační postup se nazývá *moření vzorku.* Pomořený vzorek se zkoncentruje centrifugací a teprve pak se vyšetřuje mikroskopicky a kultivačně.

Vyšetřovaný materiál homogenizujeme a přelejeme zředěnou HCl na 30 minut. Během této doby usmrtíme včechny ostatní bakterie, zatímco mykobakteria, která jsou acido-alkalirezistentní, přežijí. Po neutralizaci NaOH očkujeme na speciální živné půdy. Kultivujeme současně na 3 - 4 tekutých i pevných půdách. Půda Löwenstein-Jensenova a Ogawova jsou tuhé, zeleně-žluté vaječné půdy, nalévané do zkumavek jako šikmý agar a uzavřené gumovými zátkami, aby během dlouhé kultivace nevyschly.

Barvení dle **ZIEHLA – NEELSENA:**

druhé nejrozšířenější barvení
používáme k průkazu **acidorezistentních mikrobů** (TBC)
acidoresistence je vlastnost především mykobacterií, některých aktinomycet, bakteriálních spor a některých kvasinek.

Tyto mikroorg. přijímají barvivo velmi špatně, ale přijaté barvivo si zachovávají i při odbarvování kyselinami, alkoholem a jinými odbarvujícími prostředky
při tomto barvení se používají koncentrované barvící barviva, kterými se barví za tepla odbarvujeme pomocí kyselého alkoholu nebo kyselinou sírovou a pozadí dobarvujeme pomocí kontrastního barviva
acidorezistentní bakterie se **karbolfuksinem** barví do **růžova** a **kontrastují s modrým** nebo **zeleným pozadím**, které tvoří bb. elementy a neacidorezistentní bakterie
prohlížíme 50 zorných polí meandrovitě

postup:
1. preparát přelejeme **koncentrovaným karbolfuksinem** a ze spodu zahříváme až do výstupu par, opakujeme 3x **3 – 5 min.**

oplach vodou

2. odbarvujeme **kyselinou sírovou** a nebo **kyselým alkoholem** dokud odchází barva

oplach vodou

3. dobarvujeme roztokem **metylenové modře** nebo **malachitové zeleně** **10 – 30 sekund**

oplach vodou + osušení

Pozorujeme imerzí, vyšetřujeme 50 zorných polí v pěti různých místech preparátu. Acidorezistentní tyčinky jsou růžové, pozadí preparátu (v případě barvení sputa tvoří pozadí preparátu leukocyty, epitelie, mikroby jiné než acidorezistentní a hlen) modré nebo zelené.

Laboratorní diagnostika kvasinek a plísní

Vyšetřovací metody v lékařské mykologii se odlišují od metod používaných v bakteriologii. Princip mykologické diagnostiky je stejný: **přímý, nepřímý**.
Za infekční agens považujeme takové kmeny mikromycet, které byly u pacienta izolovány opakovaně.

ODBĚR A ZPRACOVÁNÍ MATERIÁLU

Do mykologické laboratoře jsou zasílány nejrůznější materiály – výtěry na tamponech, sputum krev, hnis, punktáty (při podezření na systémové mykózy), šupiny kůže či nehtů, vlasy a chlupy (při podezření na povrchové mykózy).

Kožní šupiny

Materiál je odebírán výhradně **z okrajové části ložiska**, nikoli z jeho středu. V oblasti přechodu zdravé a postižené tkáně je životaschopnost původce největší. Místo odběru dekontaminujeme 70% alkoholem. Odběr provádíme **seškrabáním jemných šupinek** kůže sterilním skalpelem nebo eventuelně tamponem navlhčeným ve fyz. roztoku.

Vlasy a chlupy

Nutné vytáhnout i s kořenovými váčky a vložit do sterilní zkumavky.

Nehty

Odběr provádíme **po odstranění povrchových částí** (bývají kontaminovány). Po desinfekci alkoholem seškrábneme drobné částečky do sterilní zkumavky.

Při zasílání materiálu na původce povrchových mykóz nejsou nutná žádná zvláštní opatření (původci jsou schopni v šupinách přežít řadu dní).
Při zasílání materiálu na původce systémových mykóz platí stejné zásady jako u bakteriolog. vyšetření. Je nutné při odběru zhotovit 2 nátěry (Gram, mykologické či histologické barvení).

PŘÍMÝ PRŮKAZ PŮVODCŮ MYKOTICKÝCH ONEMOCNĚNÍ

Mikroskopické vyšetření

Mikroskopie má v lékařské mykologii velký význam. Umožňuje v krátké době po dodání materiálu do laboratoře rozlišit, zda se jedná o mykózu, případně, ze které skupiny mikromycet původce pochází.

Louhové preparáty

Částečky šupin kůže či nehtů, vlasy, chlupy, umístěné na podložním skle zakápneme 10-40% KOH. Preparát přikryjeme krycím sklíčkem a necháme působit 30-60 min. Tato doba je dostačující na projasnění preparátu, které umožní rozeznání mykotických elementů.

Preparáty s inkoustem Parker

Stejný princip jako u louhových preparátů. Inkoustové barvivo (20% KOH + 10%inkoustu Parker) výrazně probarvuje mykotické elementy, nikoli ostatní materiál. Výsledkem je podstatně snažší a přesnější odlišení probarvených mykotických struktur.

Preparáty s Lugolovým roztokem

Připravují se z tekutých materiálů (sputa, punktáty, likvor) jejich smícháním s Lugolovým roztokem v poměru 1:1 na podložním skle. Po překrytí krycím sklíčkem odečítáme. Vhodné u předpokládané přítomnosti rychle rostoucích vláknitých hub (aspergily, penicilia).

IDENTIFIKACE KVASINKOVÝCH MIKROMYCET

Spektrum druhů kvasinek, které mohou způsobit infekce se rozšiřuje. V současné době je prokázáno alespoň nejméně 16 zástupců rodu **Candida** , ale i některé druhy z rodů **Cryptococcus, Rhodotorula, Sacharomyces, Trichosporon...**

Jednoznační původci onemocnění: Candida albicans, C. crusei, C. tropicalis, C pseudotropicalis, Trichosporon beigelii, T. capitatum.

Mikroskopie
U preparátu barveného dle Grama nalézáme G+ oválné nebo kulaté buňky, často pučící a tvořící pseudomycelia.

Kultivace kvasinek
Je možná na běžných půdách – KA, Sabouraudův agar. Kvasinky tvoří většinou lesklé, vypouklé kolonie bělavé až smetanové barvy. Některé kmeny produkují růžové až červené pigmenty.

Druhová identifikace izolovaných kvasinek není snadná. Rozdíly v biochemických testech jsou někdy poměrně jemné. Při určování izolovaného kmene kvasinkovité houby bývá odlišení nejfrekventovanějšího druhu **Candida albicans.** Kmeny tvoří více než 80% všech nátěrů kvasinek v klinickém materiálu.

K rozlišení C. albicans používáme **Candiselect, Chromagar**.

Klasickou metodou odlišení **C. albicans** se tzv. **germ-tube test** (test tvorby klíčních vaků či zárodečných klíčků). Test provádíme na agarové půdě obsahující **Tween 80,** tence nalité na podložním skle nebo Petrino misce. Zkoumané kmeny se naočkují čarou a přikryjí krycím sklem. Po 3 – 4 hodinách inkubace při 37°C se naočkované čáry prohlíží objektivem bez imerze. Kmeny C. albicans tvoří zárodečné klíčky vyrůstající z kvasinkových buněk. Další možností je kultivace kmene na **kukuřičném nebo rýžovém agaru s Tweenem 80** 3 dny při 28 - 30°C, kde C. albicans opět tvoří zárodečné klíčky.

Ostatní kandidy na půdě s Tweedem 80 zárodečné klíčky netvoří a dourčují se podle biochemické aktivity.

Auxanogram: testování asimilace – využití dusíkatých látek k růstu jako zdrojů uhlíku.
Zymogram: testování štěpení cukrů.

V současné době lze využít i identifikační systémy užívaných k druhovému určování kvasinkových mikromycet – **API 20 C, Auxacolor**.

NEPŘÍMÝ PRŮKAZ MIKROMYCET

Nejčastěji užívanými reakcemi bývají: **aglutinace, vazba komplementu, dvojitá imunodifuse, imunoelektroforéza a ELISA.**

PCR

Lab.diagnostika kvasinek a plísní

Odběr materiálu

Do mykologické laboratoře bývají zasílány nejrůznější materiály - výtěry na tampónech, sputum, krev, hnis, punktáty (při podezření na systémové mykózy) nebo též šupiny kůže či nehtů, vlasy a chlupy (při podezření na přítomnost původců povrchových mykóz).

Mikroskopie

Má v lékařské mykologii velký význam, neboť umožňuje v krátké době po dodání materiálu do laboratoře rozlišit, zda se jedná o mykózu. Nejčastěji se používají následující druhy preparátů.

Louhové preparáty připravíme tak, že částečky šupin na podložním skle zakápneme 10 - 40 % KOH. Preparát přikryjeme krycím sklíčkem a necháme působit 30 - 60 minut. Tato doba je dostačující k dokonalému projasnění preparátu, které umožní rozeznat mykotické elementy v preparátu.

Preparáty s inkoustem Parker. Výhodou je snažší a rychlejší odlišení modře zbarvených mykotických elementů.

Kultivace

Materiál zaslaný na mykologické vyšetření očkujeme převážně na tuhé půdy, šikmo nalité ve zkumavkách. Univerzální půdou je Sabouraudův agar s 2% glukózy a antibiotiky.

Doporučuje se každý vzorek materiálu očkovat nejméně do 2 zkumavek a inkubovat při 28 - 30° C. Délka kultivace závisí na druhu mikromycety. Kvasinky a pravé plísně rostou obvykle 2 - 5 dnů, dermatofyty vyrůstají do 4 týdnů.

Rod Candida

Diagnostika kvasinkových infekcí je poměrně snadná, protože je lze kultivovat i na běžných půdách.

Mikroskopie

Odečítáme z preparátu barveného podle Grama, kde nalézáme oválné nebo kulaté G+ buňky, často pučící a tvořící pseudomycelia.

Kultivace

Je možná na běžných půdách. Zcela postačuje krevní a Sabouraudův agar, na nichž kandidy tvoří většinou lesklé, vypouklé kolonie bělavé až smetanové barvy. Některé druhy produkují růžové nebo červené pigmenty.

Identifikace

Klasickou metodou odlišení *C.albicans* je test *tvorby zárodečných klíčku.*

Na půdu s Tweenem očkujeme čarou test. Kmen, přikryjeme krycím sklíčkem a inkubujeme při teplotě 37°C. Za 3-18 hod. vytvoří většina kmenů C.albicans zárodečné klíčky, které lze pozorovat při zvětšení bez imerze. Ostatní kandidy na půdě s Tweenem 80 zárodečné klíčky nevytvářejí a lze je dourčit podle jejich biochemické aktivity

V současné době je k dispozici několik identifikačních systémů užívaných k druhovému určení kvasinkových mikromycet, např. *Auxacolor* firmy Sanofi-Pasteur.

K DIFERENCIACI KVASINEK LZE POUŽÍT I CHROMAGAR CANDIDA. CANDIDA ALBICANS NA NĚM BUDE V ZELENÝCH AŽ MODROZELENÝCH KOLONIÍCH.

Zpracování vzorků na izolaci viru

V diagnostice virů rozeznáváme ***průkaz přímý***, kam patří izolace viru nebo průkaz jeho antigenů ve vyšetřovaném vzorku, a ***průkaz nepřímý, serologický,*** čili průkaz tvorby protilátek.

Odběr krve na virologickou serologii

K nepřímému průkazu se odebírá asepticky asi 7 ml krve do zkumavky. U dětí 2 - 3 ml. Ke zkumavce se přikládá řádně vyplněná žádanka, z níž musí být patrné, jaké vyšetření se požaduje a příznaky, které k požadavku vedou.
Za 10 - 14 dnů po prvním vzorku se odebírá další vzorek a zřetelně se označí jako druhý. Někdy je výhodné po domluvě s laboratoří za dalších 14 dnů poslat vzorek třetí.

Odběr materiálu k přímému průkazu viru

Vzorky určené k přímému průkazu odebíráme:

- ✓ Jen ve skutečně indikovaných případech. Vyplatí se předem se poradit s laboratoří
- ✓ Ve vhodnou dobu. Naději na úspěch má odběr v prvních dnech příznaků, čím dříve, tím lépe.
- ✓ Z vhodného místa, kde předpokládáme přítomnost největšího množství viru.
- ✓ Asepticky a za použití vhodných odběrových pomůcek. Pokud možno se vyhýbáme použití dezinfekčních prostředků, aby jejich stopy nemohly virus inaktivovat.

Přehled vzorků k virologickému vyšetření

- ✓ Výtěry
- ✓ Výplach z nosohltanu
- ✓ Výplach z nosu
- ✓ Stolice
- ✓ Likvor
- ✓ Tekutina z puchýřků

Zasílání materiálu určeného k izolaci viru

Úspěch izolačního pokusu nezávisí jen na správném odběru, ale i na správném transportu vzorku do laboratoře.
První zásadou při transportu materiálu k izolaci viru je dopravit jej do laboratoře co nejrychleji.
Druhou zásadou je omezit inaktivaci virů snížením teploty. Ideální by bylo ihned po odběru vzorek zmrazit a udržet jej zmrazený až do okamžiku jeho úpravy k očkování.

Hodnocení výsledků virologického vyšetření

Hodnocení serologických nálezů

Nález protilátek svědčí pouze o tom, že se nemocný během svého života s příslušným virem již setkal. Kdy k setkání došlo, zda na začátku choroby nebo dříve, nám poví sledování charakteru protilátek a dynamiky jejich titru.
O protilátkách IgM se domníváme, že se tvoří obvykle na začátku styku s antigenem. Jejich nález tedy většinou svědčí pro nedávnou nebo právě probíhající infekci.

Protilátky IgG se tvoří na začátku imunitní reakce.
Ke sledování dynamiky titru je třeba vyšetřit paralelně dva vzorky séra. Pro diagnózu nedávno proběhlé virové infekce svědčí negativní nález protilátek v prvním vzorku a pozitivní ve druhém nebo nejméně 4x vyšší titr protilátek ve druhém vzorku.

Hodnocení výsledku přímého průkazu viru

Výsledky přímého průkazu viru by měly být doplněny alespoň serologií.
Izolace viru z orgánů za normálních podmínek sterilních svědčí pro etiologickou souvislost mezi izolovaným virem a vyšetřovaným onemocněním (např.infekce CNS - izolace viru klíšť.encefalitidy).

TKÁŇOVÉ (BUNĚČNÉ) KULTURY

Slouží k pěstování většiny virů. Označujeme tak buňky, tkáně a orgány pěstované in vitro a postupy umožňující toto pěstování. V rutinních laboratoří používáme jen buněčných kultur i když přetrvává název kultur tkáňových.
V laboratořích je velmi přísná kontrola pro mytí skla. Technika, kterou se sklo myje je jiná než pro ostatní laboratoře. K vlastní kultivaci používáme silnostěné krátké zkumavky a Roux-láhve (rú) ploché s rovnými stěnami. Mohou být skleněné či umělohmotné na jedno použití.

Živná média pro tkáňové kultury:
Živiny k růstu in vitro dodáváme v podobě tzv. médií pro tkáňové kultury. Jde o pufrované solné roztoky obsahující glukózu, aminokyseliny, vitaminy, růstové faktory a indikátor pH – fenolovou červeň. Pro zamezení bakteriální kontaminace, přidáváme do médií antibiotika (obvykle penicili a gentamicin).
Nejznámější médium je Parkerovo a Eaglovo minimální esenciální (MEM). Dodávají se komerčně jako koncentráty.
K množení buněk je potřeba k médiu přidat 2-20% bovinního prekolostrálního séra. Takové médium se nazývá růstové. Narostlé kultury pěstujeme v médiu udržovacím (bez séra).

Příprava tkáňových kultur:
Buňky smícháme s růstovým médiem, rozplníme do jednotlivých zkumavek a pořádně uzavřou gumovými zátkami. Kultivují se při 35 – 37°C a pod úhlem 5° (téměř leží).
Buňky klesnou ke stěně, přichytí se na ni a pomalu se rozrůstají, až na skle vytvoří souvislý povlak, zvaný **monolayer =buněčný list.**

Druhy buněk

Primární kultury:
Jde o buňky odebrané přímo z orgasnismu. Často se dají několikrát pasážovat = přenášet do nových nádobek, a vznikají z ních kultury sekundární.
Nejčastěji se používají buňky opičích ledvin. Ledviny se vyndají ze zvířete a rozstříhají na kousíčky. Vystaví se účinkům trypsinu, který tkáň rozloží na jednotlivé buňky. Ty se poté zasílají jednotlivým laboratořím.
Použití: izolace enterovirů – polioviry, echoviry, coxackieviry A9, B1-B6, parachřipka, chřipka A,B, parotitis, HSV, vakcinie, RSV.

Buněčné linie:
Dají se pasážovat donekonečna. Mají změněný počet chromosomů (heteroploidní karyotyp) a pocházejí ze tkání maligních i normálních.
Nejznámější jsou HeLa buňky, získané z karcinomu děložního čípku. Izolují se na nich adenoviry, ale mohou na nich růst i některé enteroviry, HSV a vakcinie.
Další známe buňky jsou lidské Hep-2 a opičí Vero.

Diploidní kmeny:
Lze je udržovat po několik desítek pasáží. Mají přitom diploidní karyotyp normálních buněk.
Nejběžněji užíváme buňky z lidských embryonálních plic (LEP).
Použití: izolace enterovirů, adenovirů, HSV, vakcinie, VZV, CMV.

Očkování tkáňových kultur:
Jakmile je vytvořen monolyaer, očkujeme viry nebo zkoumaným materiálem. Inokulum nesmí obsahovat mikroby, proto se přidávají antibiotika (PNC + GEN). Do každé zkumavky očkujeme 0.2ml tekutiny obsahující virus.
Denně se prohlíží při malém zvětšení v mikroskopu a sleduje se změna.
Při množení viru se buňky mění. Tomuto jevu se říká **cytopatický efekt – CEP.**
CEP HAV (pikornavirů) – přítomnost drobných zakulacených buněk, silně světlolomných, rychle hynoucích. Médium je alkalické – změna pH, barva média je fialová.
CEP adenovirů – vznik větších shlukujících se buněk, které médium okyselují – změna barvy média na oranžovou.
CEP RSV – vytváření mnohojaderných útvarů.

Jakmile se objeví CEP, použijeme tekutinu z tkáňové kultury ka dalším pasážím a testům. Zůstanou – li buňky nezměněny, pokusíme se o jednu až dvě pasáže slepé.

Určení zachyceného viru:
Řídíme se podle vzhledu CEP.

Hemadsorpce – jev podobný aglutinaci. Buňky, ve kterých se pomnoží hemadsorpční virus, na svůj povrch nachytají suspenzi přidaných erytrocytů.
Např: virus chřipky, parachřipky, parotitis.

Interference – jev, kdy jeden virus brání množení viru druhého.

IMF – na podložní sklo kápneme suspenzi kultury s pomnoženým virem, necháme zaschnout a po sfixování uděláme imunofluorescenci. Buňky, ve kterých se virus pomnožil, v mikroskopu fluoreskují. Např. HSV1,2 CMV.

LABORATORNÍ DG. INFEKCÍ ŽENSKÉHO GENITÁLU

Vulva, pochva a děložní hrdlo zdravé ženy jsou osídleny tzv. ***normální flórou***. Složení normální flóry pro jednotlivé části těla je charakteristické. To platí i pro osídlení pochvy. Složení flóry je dáno složením kožní mikroflóry, zaž. traktu a mikroby, které jsou vneseny zvenčí.
Děloha, vejcovody a ***vaječníky*** jsou **sterilní**.
Základem normální flóry poševní sliznice je **Doderleinova flóra (laktobacily)**.

LACTOBACILLUS = DŐDERLAINUV BACIL

- G+ tyčinka, netvoří spory
- v pochvě má ochrannou funkci, chrání před množení jiných bakterií, chrání tím, že vytváří kyselé prostředí (nízké pH) v pochvě a to tak, že štěpí cukry na kyseliny
- vysoká odolnost proti kyselému prostředí
- většinou nekultivujeme, růst aerobní nebo anaerobní podle druhu
- častější vyšetření mikroskopické poševního sekretu – MOP

Ochranné mechanismy pochvy jsou v období plodnosti ženy = **fertilní období**, zde jsou tvořeny hormony = **estrogen** , který způsobuje ukládání glykogenu v buňkách poševní sliznice. Ten je mikroby (laktobacily) metabolizován na kyselinu mléčnou (pH nízké 3 – 3,5). Tvorbou kyseliny mléčné a látek antibiotického charakteru tak ovlivňují laktobacily složení vaginální mikroflóry fertilní ženy.

Kyselost poševního sekretu je do určité míry velkým ochranným mechanismem.
V sekretu zdravé fertilní ženy je přítomno až deset na devátou bakteriálních buněk v 1 ml.
Nízké pH – adherence mikrobů ovlivňuje, je horší
Vysoké pH - adherence je lepší.

Pro diagnostiku infekcí ženského genitálu se odebírají materiály ze ***zadní klenby poševní***, ***výtěr z endocervixu*** a materiály odebrané během operací nebo během porodu . Běžně vyšetřovaným materiálem je plodová voda odebíraná v průběhu porodu nebo po arteficiální dirupci plodových blan.

Nejčastěji bývá vyšetřován výtěr z pochvy. Velmi významnou součástí bakteriologického vyšetření pochvy je **MOP** (***mikrobní obraz poševní***). Jedná se o nátěr poševního sekretu na podložním skle. ***Nátěry se připravují dva***. Jeden se barví ***podle Grama*** (bakteriologické vyšetření)a druhý ***podle Giemsy*** (průkaz Trichomonas vaginalis)

MOP I.

- pH pod 4 - 5
- mikrobní obraz se považuje za normální fyziologický ***obraz pochvy zdravé ženy***. Sekret je čirý, hlenovitý a může obsahovat bělavé vločky. V mikroskopu jsou vidět epitelie, leukocyty nejsou přítomny. Z bakterií je možno nalézt pouze G+ tyčky (laktobacily)

MOP II.

- pH nad 4 - 5

- sekret je mléčně zkalený až nažloutlý. Mikroskopicky je možno nalézt epitelie, menší množství leukocytů, různé bakterie a laktobacilů je méně. Jedná se o ***bakteriální výtok nehnisavý***

MOP III.
- pH zásadité
- výtok je hustý, bělavý až žlutavý. Epitelií je málo, leukocyty jsou hojné. Laktobacily obvykle chybí, zato jsou přítomny jiné bakterie. ***Bakteriální výtok hnisavý***.

MOP IV.
- ***obraz u kapavky***. Výtok je hustý, žlutozelený. Hojně jsou zastoupeny leukocyty a gramnegativní diplokoky. Obraz je závislý na tom, zda se jedná o kapavku akutní nebo chronickou

MOP V.
- ***trichomonádový výtok*** je charakterizován řídkým, zpěněným sekretem. Trichomonády jsou dobře zbarveny Giemsovým barvením. Jsou přítomny leukocyty a bakterie (tyčky i koky).Dod. flóra je potlačena

MOP VI.
- u vaginálních mykóz může být obraz hnisavý i nehnisavý. Přítomny jsou leukocyty, epitelie a různé bakterie. Laktobacily mohou být nalezeny
- ***kvasinkový***

Mikroskopické vyšetření i ostatních materiálů pocházejících z ženského genitálu (plodová voda, endocervikální sekret) je důležitou složkou postupu.

Kultivační vyšetření se provádí na běžných půdách za aerobních i anaerobních podmínek, a to na KA (5% CO a staf. čára), ENDO, NaCl, bujón, u těhotných selektivní bujón pro streptokoky, VLA, VLB. Chceme-li kultivovat náročnější mikroby jako jsou mykoplazmata a Gardnerella vaginalis je nezbytné použít speciální půdy.

K záchytu – GO – neselektivní čokoládový agar GC a Č3
- Gard. vaginalis - gardnerelový agar
- mykoplazmat a ureoplazmat - bujón

Za nejvýznamnější původce vybraných ***infekcí ženského genitálu*** jsou považovány:

VAGINITIDA:
- Staphylococcus aureus, streptokoky skupin A, B, a D, Candida albicans, Neisseria gonorrhoae, Trichomonas vaginalis, Listeria monocytogenes

ENDOMETRITIDA
- streptokoky, enterobakterie, STAU, Bacteroides fragilis, Campylobacter fetus, G. vaginalis, chlamydie, mykoplazmata

POPORODNÍ a POOPERAČNÍ INFEKCE
- streptokoky, STAU, enterobakterie, Bacteroides fragilis

SYNDROM TOXICKÉHO ŠOKU

Barvení dle GIEMSY (GIEMSY - ROMANOWSKÉHO)
Používá se při barvení krevních nátěrů, k důkazu prvoků, rickettsií, chlamydií, spirochét, mykoplazmat…
-nefixovaný bakteriální nátěr a zaschlá krev v podobě tlusté kapky se pokape koncentrovaným Giemsovým barvivem **1 - 2 min.**
- přidá se asi 10násobný objem destilované vody a opatrně smíchá s barvivem **2 - 5 min.**
- opatrně opláchneme vodou a nechá se uschnout

Výsledek:
bakterie - tmavě modré
pozdra - světle modré
slizová vrstva - růžová

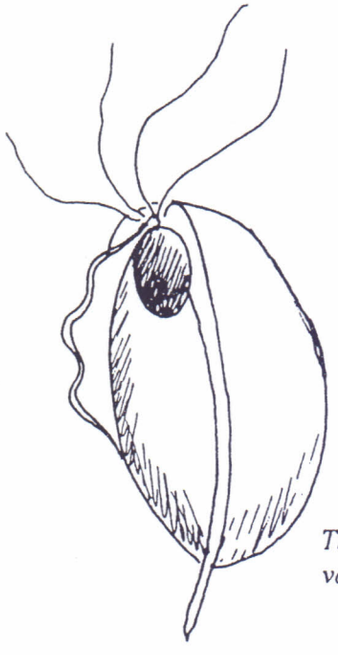
Tlustá kapka se barví Giemsovým roztokem 30-60minut.
Ostatní preparáty (MOP) se fixují 2 min. methanolem a barví čerstvým Giemsou (1:10 s destil. vodou) 30min. - 3hod. u spirochet i přes noc.
Výsledek: jádra parazitů - karmínová jejich cytoplasma - bleděmodrá
jádra leukocytů - fialová cytoplasma - nafialovělá

Trichomonóza

Trichomonas vaginalis (*bičenka poševní*) je bičíkovec u nás hojně rozšířený. Přenáší se pohlavním stykem, klinicky se projeví onemocnění mnohem častěji u žen než u mužů, kteří jsou obvykle bezpříznakovi přenašeči.

U žen odebíráme výtěr z pochvy nebo z uretry, u mužů výtěr z uretry nebo exprimát z prostaty. Trichomonády jsou viditelné v nativním preparátu i bez barvení, výhodná je fázově kontrastní mikroskopie, kde lze pozorovat živé, pohyblivé prvoky. Zasíláme-li materiál do laboratoře, děláme nátěr na 2 podložní skla (jedno pak v laboratoři barvíme podle Giemsy, kde hledáme trichomonády, druhé barvíme podle Grama pro průkaz bakterií a kvasinek). Trichomonády lze také kultivovat ve speciálním *Diamondově médiu*. K dispozici je rovněž *odběrová souprava C.A.T.* obsahující tampon ve zkumavce a v rezervoárku nad zkumavkou pak transportní a kultivační medium pro trichomonády a kvasinky.

V preparátu hledáme prvoky oválného tvaru, obsahující kapkovité jádro, kteří jsou vybaveni *centrální tyčinkou (axostylem)* a *4 dlouhými bičíky*. Velikost trichomonád značně kolísá, u akutních forem činí 10 μm, u chronických forem až 30 μm. Prvok je pohyblivý, po 48 hodinách kultivace však snadno autolyzuje. Po obarvení podle Giemsy nacházíme *červenofialové kapkovité jádro, světle modrou cytoplasmu*, zatímco epitelie pochvy jsou zbarveny tmavěji a mají čtvercovitý tvar. Při barvení často dochází k rozpadu trichomonád, takže v preparátu pak lze vidět pouze fragmenty jejich buněk.



Trichomonas vaginalis

PARAZITI

Parazité jsou nejčastějšími původci inf. onemocnění na světě. V teplém podnebním pásmu vyvolávají vážná, život ohrožující onemocnění. V našich klimatických podmínkách způsobují parazité mírněji probíhající onemocnění. S rozvojem cestovního ruchu se i u nás začínají vyskytovat parazité importované z ciziny.
Identifikace: u exoparazitů lze diagnostikovat dle makroskopického vzhledu. Nejvýznamnější metodou u většiny parazitů je podle ***mikroskopie.*** V nativním preparátu pozorujeme ***prvoky*** a jejich ***cysty***, některé ***červy*** a jejich ***vajíčka***. Lépe jsou ale vidět po obarvení.
Kultivace je možná jen u některých agens (trichomonády, patogenní améby).
Velice výhodnou metodou je ***průkaz antigenu. Průkaz protilátek*** (toxoplasmosa, toxokarosa) má menší diagnostickou hodnotu.

NEJČASTĚJI ODEBÍRANÉ DRUHY MATERIÁLU

STOLICE

Odebíráme velikosti vlašského ořechu do odběrové soupravy. Uchováváme v chladu – nemrazíme!!!
Odběr opakujeme v intervalech 24 – 72 hodin alespoň 3x. Více odběrů v jednom dni není vhodné!
Při podezření na amoebiózu musíme vyšetřit do 30 minut, jinak autolyzují.
Ve stolici hledáme celé červy nebo jejich části (články tasemnice)v nativním nebo obarveném preparátu hledáme vajíčka červů, prvoky nebo jejich cysty.

PERIANÁLNÍ STĚRY A OTISKY, ANÁLNÍ VÝTĚRY

Provádíme výhradně při podezření na infekci vyvolanou roupy nebo tasemnicemi. Je nutné, aby si pacient 8-12hodin (obvykle přes noc) neomýval oblast konečníku. Provedeme otisk pomocí průhledné lepící pásky, na které ulpí vajíčka roupů. Pásku nalepíme na podložní sklo a mikroskopujeme. Tato metoda se nazývá ***Grahamova.***

SPUTUM A BAL

Odebíráme do širokých umělohmotných sterilních zkumavek (kvůli centrifugaci). Hledáme ***larvy*** Ascaris lumbricoides (škrkavka) , Paragonimus sp.(plicní motolice) nebo ***háčky*** Echinococcus granulosus (měchožil zhoubný – tasemnice). BAL odebíráme do několika sterilních větších zkumavek a diagnostikujeme v něm Pneumocystis carinii.

VÝTĚR Z POCHVY, URETRY, EXPRIMÁT Z PROSTATY

Z uretry odebíráme 3 vzorky sterilními tampony na drátě. 2 natřeme skla – jedno barvíme dle Grama druhé dle Giemsy. 3 tampon ponoříme do média (C.A.T. Swab) pro kultivaci Trichomonas vaginalis.

KREV NA SEROLOGICKÁ VYŠETŘENÍ (srážlivá)

Sérum centrifugujeme 3min při 3000ot. Přepipetujeme do sterilní zkumavky, zamrazíme nebo skladujeme při chladničkové teplotě. Ze séra stanovujeme protilátky různých tříd (Toxopl. Toxocar.)

KREV NA MIKROSKOPICKÁ VYŠETŘENÍ

Nativní preparát – kapka krve smíchaná s fyz. roztokem a natřená na podložní sklo – nám slouží pro diagnostiku Trypanosomy (přenos mouchou tse-tse = spavá nemoc) nebo některých mikrofilárií – larvy kolující v krvi.
U barveného preparátu připravujeme ***tenký krevní roztěr*** nebo tzv. ***tlustou kapku.*** Na čisté odmaštěné podložní sklo kápneme kapku periferní krve z bříška prstu a hranou druhého podložního skla ji rovnoměrně roztahneme po celém podložním skle.
Takto pozorujeme např. malárii (odběr nutný v horečnatých záchvatech – parazité jsou vyplavováni do krve), kde pátráme po vývojových stádiích malárie a jiných krevních parazitů.

Zpracování stolice na parazity

Odběr materiálu

Stolici odebíráme velikosti vlašského ořechu do přiměřeně velké odběrové nádobky, např. do zkumavky z umělé hmoty s lopatičkou v zátce. Odběrová souprava nemusí být sterilní. Nelze - li vzorek dodat v krátké době do laboratoře, umístíme jej v chladu. Odběr opakujeme v intervalech 24 - 72 hodin alespoň 3x. Odběr stolice na tampon pro diagnostiku parazitů nestačí.

Ve stolici hledáme celé červy nebo jejich části (např. články tasemnice), v nativním nebo obarveném preparátu hledáme vajíčka červů, prvoky nebo jejich cysty.

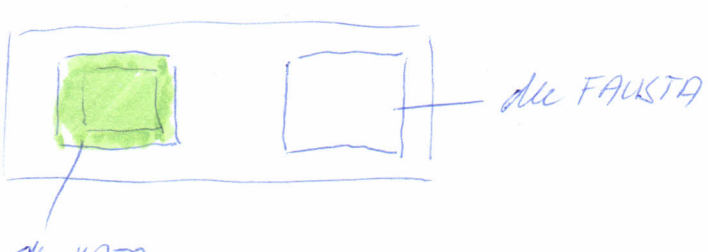
Při podezření na infekci vyvolanou roupy nebo tasemnicemi provádíme perianální stěry a otisky. Okolí análního otvoru se přelepí průhlednou lepicí páskou, na které ulpí vajíčka roupů. Pásku nalepíme na podložní sklo a přes pásku pak mikroskopujeme.

Mikroskopické vyšetřovací metody pro diagnostiku parazitů

Příprava tzv. tlustého nátěru dle Kato

Metoda je vhodná pro diagnostiku střevních prvoků. Do kapky destilované vody na podložním skle rozmícháme malé množství stolice a rozetřeme je do plochy asi 2 x 2 cm. Aby preparát nevyschnul, překryjeme jej celofánovou fólií velikosti asi 3 x 3 cm, namočenou do glycerínu a ~~methylenové~~ MALACHITOVÁ zeleně. V takto připraveném preparátu hledáme v mikroskopu při zvětšení 100x nebo 400x.

Koncentrační metoda dle Fausta

Poněvadž vajíček parazitických červů nebývá v přímých nátěrech mnoho, užívá se koncentračních metod. Stolici nejprve homogenizujeme ve vodě a poté zcentrifugujeme. Pak resuspendujeme sediment v nasyceném roztoku $ZnSO_4$ (asi 33%) a znovu ŠIROU ZINEČNATÝ zcentrifugujeme. Lehčí vajíčka a cysty vyplavou po centrifugaci na povrch. Materiál na povrchu přeneseme na krycí sklíčko a mikroskopujeme při zvětšení 100x až 400x.

DĚLÁME OBĚ METODY