

## Topic P10+P11: Základy klinické mykologie a parazitologie

K nastudování: Houby ☺, paraziti

Z jarního semestru: Mikroskopie, kultivace, antibiotická citlivost, precipitace

### Tabulka pro hlavní výsledky úkolů 1 až 3 (k postupnému vyplnění):

| Kmen                                                         |          | K | L | M | N |
|--------------------------------------------------------------|----------|---|---|---|---|
| Gramovo barvení – Úkol 1                                     |          |   |   |   |   |
| Kultivace (krevní agar) Úkol 2a                              | Velikost |   |   |   |   |
|                                                              | Barva    |   |   |   |   |
|                                                              | Tvar     |   |   |   |   |
|                                                              | Profil   |   |   |   |   |
|                                                              | Hemolýza |   |   |   |   |
|                                                              | Povrch   |   |   |   |   |
|                                                              | Zápach   |   |   |   |   |
| Úkol 2b: Růst na Sabouraudově agaru s chloramfenikolem (+/-) |          |   |   |   |   |
| Úkol 2c: růst na chromogenní půdě                            |          |   |   |   |   |
| <b>KONEČNÝ ZÁVĚR (dle úkolů číslo 2c a 3)</b>                |          |   |   |   |   |

### Úkol 1: Mikroskopie kmenů bakterií a kvasinek

Obarvíte Gramem dané kultury mikroorganismů. **Použijte imerzní mikroskopii (imerzní objektiv 100× zvětšující).** Výsledky запиšte do tabulky. Povšimněte si velikostních rozdílů mezi kvasinkami a bakteriemi.

### Úkol 2: Kultivace bakterií a kvasinek

#### a) Kultivace na krevním agaru

Popište kolonie daných kmenů na krevním agaru a запиšte do hlavní tabulky. Nezapomeňte popsat zápach. Všimněte si, že kolonie kvasinek (dle výsledků Úkolu 1) jsou podobné některým bakteriím (zejména G+ kokům, které dle morfologie kolonií asi budou stafylokoky).

#### b) Kultivace na Sabouraudově agaru s chloramfenikolem

Zhodnoťte nárůst daných kmenů na selektivním agaru pro kvasinky a plísně (Sabouraudův agar s chloramfenikolem). Sabouraudův agar sám o sobě není selektivní, ale jeho selektivita je zajištěna přidávkem širokospektrého antibiotika (chloramfenikol).

#### c) Kultivace na chromogenní půdě

Chromogenní půdy pro kvasinky umožňují rozlišení nejdůležitějších druhů rodu *Candida*. Pomocí kontrolních kmenů se pokuste určit druh kandidy pomocí chromogenní půdy. Jsou-li kolonie bílé (není tedy přítomno žádné barvivo), znamená to, že kmen touto chromogenní půdou nelze určit.

### Úkol 3: Auxacolor

Odečtěte výsledek auxacoloru u kmene, který se nepodařilo identifikovat chromogenní půdou. V tomto případě se nepočítá kód, nýbrž se výsledek porovnává s tabulkou. (Může se stát, že vyjde více taxonů. V tom případě mějte na paměti, že např. *C. albicans* by byla v úkolu 2c) zelená a *Rhodotorula* by na 2b) měla červený pigment.)

|                        |       |       |       |       |       |        |       |
|------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|-------|
| C Neg*                 | Glu** | Mal** | Sac** | Gal** | Lac** | Raf**  | Ino** |
| Cel**                  | Tre** | Ado** | Mel** | Xyl** | Ara** | Act*** | Pox#  |
| Výsledek identifikace: |       |       |       |       |       |        |       |

\*normálně modré

\*\*\*žlutá pozitivní, bezbarvá negativní

\*\*žluté pozitivní, modré negativní

#hnědé pozitivní, bezbarvé negativní

### Úkol 4: Určení citlivosti na antimikrobiální látky

K léčbě mykotických infekcí nelze použít antibiotika. Musíme použít speciální léky – antimykotika. Ta zase na druhou stranu nejsou účinná u bakteriálních infekcí.

#### a) Určení citlivosti na antimykotika.

Odečtete in vitro citlivost daných kmenů na antimykotika. Zapište do tabulky plný název antimykotika podle kartičky, a pro všechny testované kmeny vyhodnoťte jako citlivé nebo rezistentní. U amfotericinu B je referenční zóna 10 mm. Pro jiná antimykotika je to 20 mm, zato však není nezbytné, aby uvnitř zóny nebyly přítomny vůbec žádné kolonie.

| Kmen →                     |             |              |             |              |
|----------------------------|-------------|--------------|-------------|--------------|
| Antimykotikum (celé jméno) | Ø zóny (mm) | Interpretace | Ø zóny (mm) | Interpretace |
|                            |             |              |             |              |
|                            |             |              |             |              |
|                            |             |              |             |              |
|                            |             |              |             |              |

Kmeny \_\_\_ a \_\_\_ (tj. kmeny \_\_\_\_\_) jsou rezistentní na všechny preparáty.

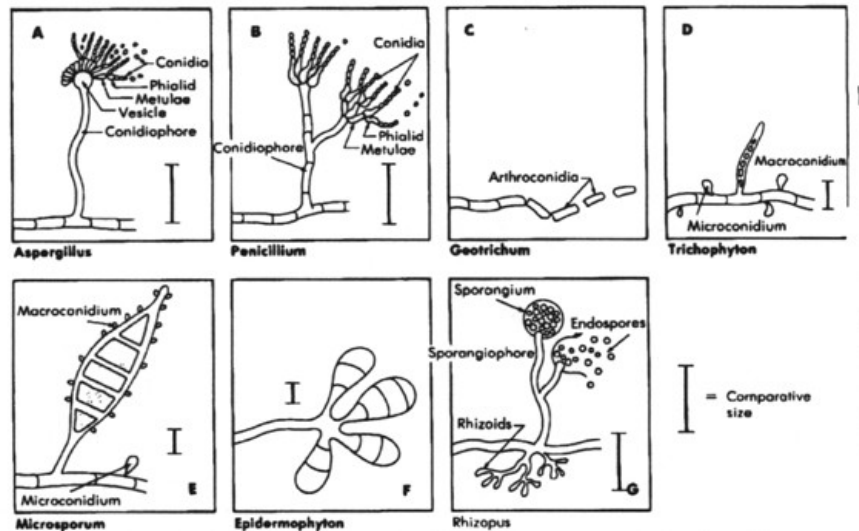
#### b) Určení citlivosti na antibiotika.

Úkol se ve spojeném praktiku neprovádí. Je logické, že bakteriální kmeny budou na antibiotika citlivé, kdežto houbové kmeny budou rezistentní.

### Úkol 5: Mikroskopie plísní

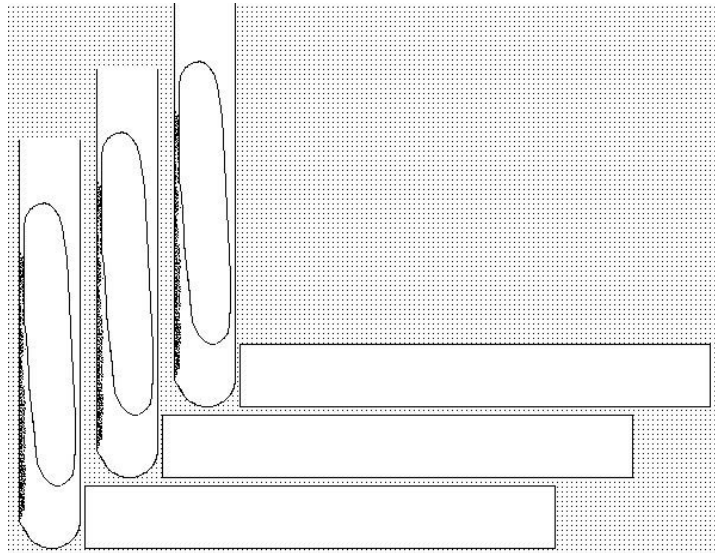
Plísně jsou zpravidla mikroskopovány jinak než kvasinky. Gramovo barvení se užívá zřídka. Zpravidla se užívá **nativní preparát bez imerze, zvětšení objektivu 10 až 40×**.

V tomto spojeném praktiku nebudete plísně mikroskopicky pozorovat. Místo toho si prohlédněte obrázky z webu (adresa: <http://www.atsu.edu/faculty/chamberlain/Website/Lects/Fungi.htm>)



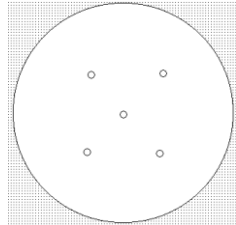
### Úkol 6: Kultivace plísní

Plísně zpravidla vyžadují delší čas k růstu. Z tohoto důvodu pro kultivaci zpravidla nepoužíváme Petriho misky, protože by kultury vyschly a kontaminovaly by se. Zakreslete kultivační výsledky daných plísní do obrázku vpravo.



### Úkol 7: Nepřímá diagnostika aspergilózy

Vyhodnoťte výsledky precipitace v agaru pro průkaz protilátek proti aspergilóze. Zakreslete výsledek.



### Úkol 8: Odběr na mykózy

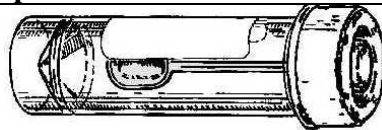
V rámci tohoto dvojitého praktika jsou již zásady odběru kožních mykóz sepsány.

Odebírají se šupiny z kůže, ústřížky nehtů, vlasů apod.; vždy je potřeba odebrat vzorek tak, aby bylo zachyceno místo, kde je zánět aktivní, a zároveň nezachytit kontaminace; doporučuje se i povrchová desinfekce (likvidace kontaminant z povrchu kůže)

### Úkol 11: Odběr na parazity

#### a) Odběry u střevních parazitů

Prohlédněte a zakreslete nádobku pro parazitologické odběry. Zapamatujte si, že v parazitologii nelze použít výtěry z řiti

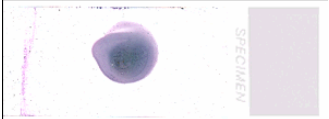



Vzorek stolice není příliš vhodný pro diagnostiku (jméno červa):

V tomto případě se doporučuje spíše (název metody):

#### b) Odběry u krevních parazitů

Prohlédněte si videoklipy a popište jednou či dvěma větami, jak se zhotovuje tlustá kapka a tenký roztěr. U tenkého roztěru také schematicky zakreslete polohu sklíček při přípravě.

|                                                                                                          |                                                                                                                      |                                                                                                                    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>Tlustá kapka:</p>  | <p>Tenký roztěr – popis<br/>kápnot kapku, druhým sklíčkem nejprve rozprostřít do šířky a pak roztáhnout do délky</p> | <p>Tenký roztěr – obrázek</p>  |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

#### c) Další odběrové metody

Propojte čarami metody z levého sloupce a diagnostické postupy v pravém sloupci.

diagnostika toxoplasmózy  
diagnostika trichomonózy  
diagnostika močové schistosomózy  
diagnostika giardiázy  
diagnostika akanthamébiázy

zaslání použitých kontaktních čoček  
zaslání žaludeční šťávy (+ stolice)  
histologický vyšetření tkáně močového měchýře  
zaslání soupravy C. A. T. + sklíčko  
zaslání krve na serologické vyšetření

### Úkol 12: Mikroskopie střevních parazitů

#### a) Metoda dle Kató (stolice zdravého člověka)

Preparát byl zhotoven metodou dle Kató, což je tlustý nátěr stolice překrytý celofánem napuštěným glycerolem s malachitovou zelení pro zlepšení viditelnosti ureitých struktur. Preparát připravený touto metodou si prohlédněte v mikroskopu při zvětšení objektivu 20× (bez imerze). Všimněte si tukových částic a granul, připomínajících vajíčka parazitů. Zapamatujte si tyto struktury a zakreslete je do protokolu

**b) Faustova koncentrační metoda (stolice zdravého člověka)**

Prohlédněte si preparáty a запиšte princip Faustovy koncentrační metody. Preparát připravený touto metodou si prohlédněte v mikroskopu při zvětšení objektivu 20× (bez imerze). Zakreslete výsledek.

**c) Grahamova metoda (vajíčka roupů přítomna)**

Přítomnost roupích vajíček se prověřuje Grahamovou metodou. Páska se nalepí na řasy v okolí řiti a pak se přilepí na podložní sklíčko. Hledejte roupí vajíčka v mikroskopu při zvětšení objektivu 20× (bez imerze). Zakreslete výsledek.

|                 |                 |                                                 |                  |
|-----------------|-----------------|-------------------------------------------------|------------------|
| Metoda dle Kató | Faustova metoda | Faust – princip                                 | Grahamova metoda |
|                 |                 | <hr/> <hr/> <hr/> <hr/> <hr/> <hr/> <hr/> <hr/> |                  |

**Úkol 13: Demonstrace parazitů, jejich vajíček a životních cyklů**

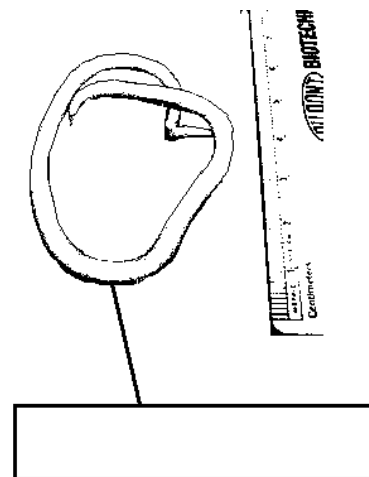
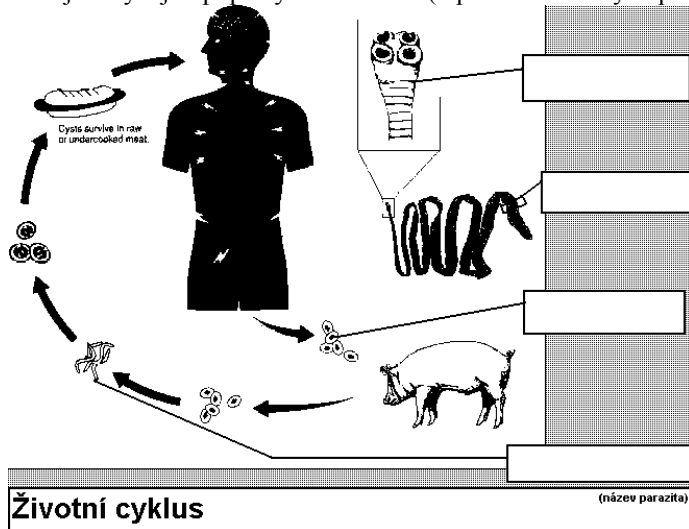
**a) Ukázka parazitů**

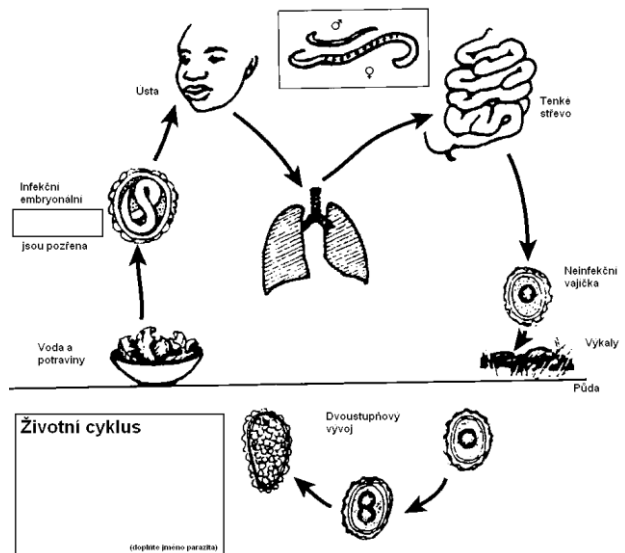
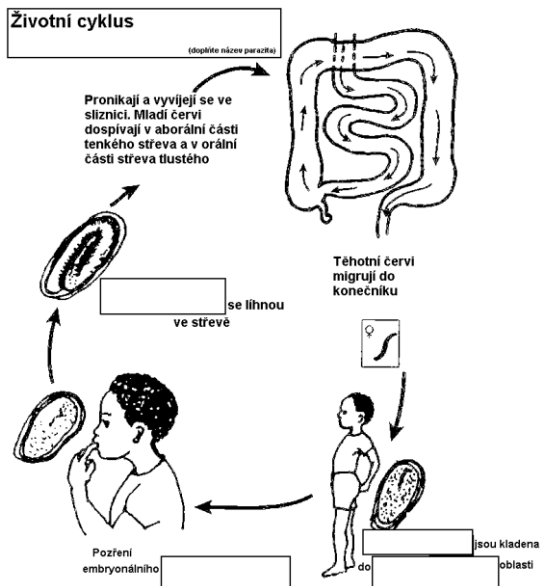
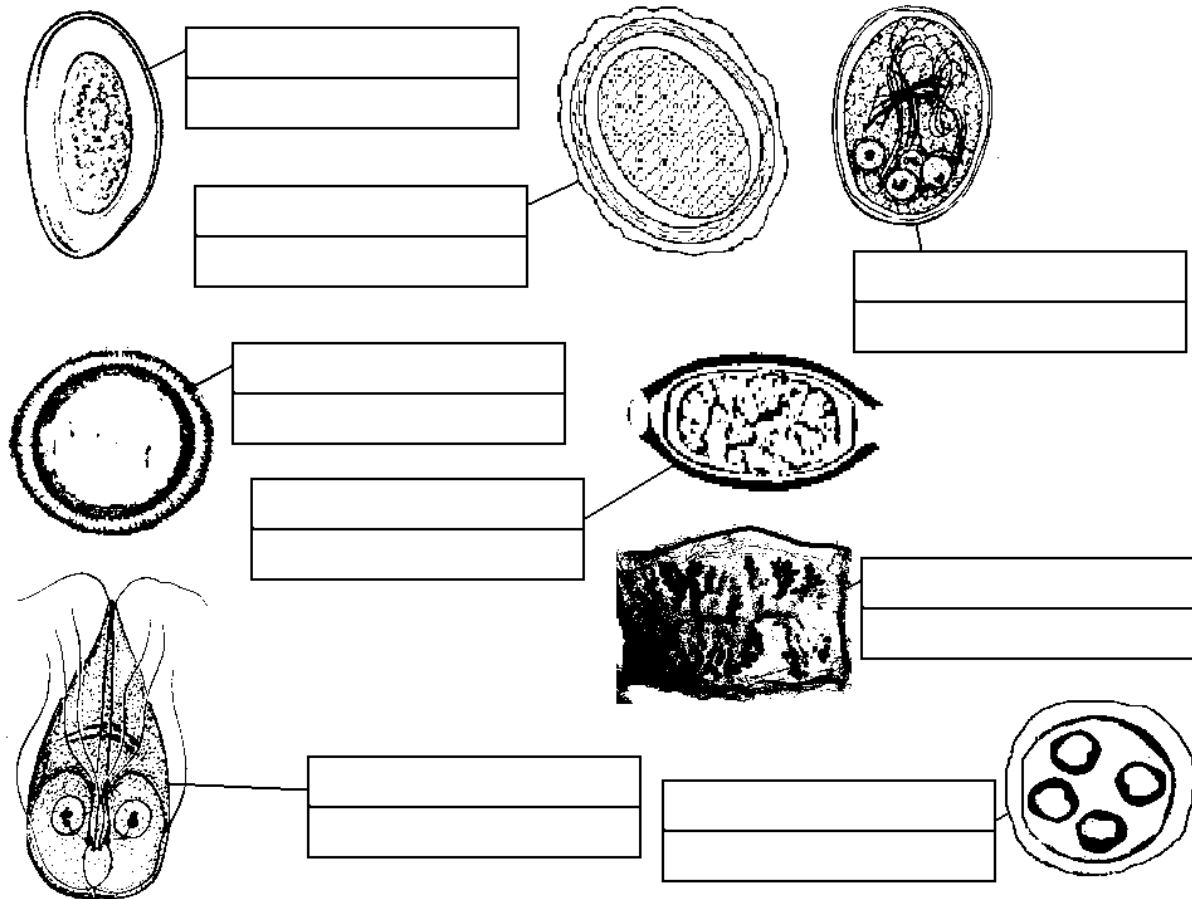
Prohlédněte si preparáty parazitů naložených v lihu a dva z nich popište.

|                         |                         |
|-------------------------|-------------------------|
| <hr/> <hr/> <hr/> <hr/> | <hr/> <hr/> <hr/> <hr/> |
|-------------------------|-------------------------|

**b) Demonstrace obrazů parazitů, jejich vajíček a životních cyklů**

Přidejte chybějící popisky k obrázkům (v první části vždy napište název parazita a stádium)





**Úkol 14: Mikroskopie *Trichomonas vaginalis***

Prohlédněte si výtěr z pochvy barvený podle Giemsky. V preparátu naleznete prvoka *Trichomonas vaginalis*. Prvok je vejčitého tvaru, cca 10× větší než bakterie, světle modré barvy s protáhlým karmínově červeným jádrem. Je třeba odlišit jednak epiteliální buňky, jednak leukocyty. Popište další pozorované útvary (kvasinky, bakterie – zapište jejich morfologii), epiteliie, leukocyty. Zakreslete.

*T. vaginalis*

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

### Úkol 15: Diagnostika malárie

#### a) Mikroskopie malarického tenkého roztěru

Tato část úkolu je ve spojeném praktiku zrušena

#### b) Hodnocení stádií parazita

Vyplňte pole popisků k jednotlivým obrázkům. Použijte termíny: schizont, časný trofozoit, gametocyt, merozoiti, pozdní trofozoit.



### Úkol 16: Diagnostika *Toxoplasma gondii* serologickými testy

Pracujeme s následujícími séry, přicházejícími k serologickému vyšetření:

P: screening u 29leté těhotné ženy, bez klinických potíží, doma dvě kočky

Q: screening u jiné, 24leté těhotné ženy, rovněž bez klinických potíží, kočky nemá

R: 21letá studentka, trávící svůj volný čas putováním po lese, žádné kočky, před dvěma týdny únavnost, zvětšené lymfatické uzliny

S: 65letý důchodce, žije na vesnici, jeho koníčkem je práce na zahradě, přes kterou často chodí kočky; symptomatologie chorioretinitidy, jiní v úvahu přicházející původci kromě *Toxoplasma* již vyloučeni

#### a) Komplementfixační test

Odečtete titry KFR v sérech klientů P, Q, R, S testovaných na protilátky proti *Toxoplasma gondii*. První ředění je 1:5 a následuje ředění geometrickou řadou. Pečlivě vyhodnoťte kontrolu antikomplementarity. Zakreslete výsledek a zapište titry.

#### b) ELISA pro průkaz protilátek IgA

Výsledky reakce ELISA – protilátky třídy IgA proti *T. gondii* v sérech pacientů jsou demonstrovány na serologické destičce a je k nim připojen výsledek měření absorbance. Dle pokynů učitele. Spočtete cut off (průměr hodnot obou důlků „c. o.“), odečtete hodnoty optické density u negativní (B1) a pozitivní (E1) kontroly. Zapište interpretaci pro obě části úkolu (a + b)

|    |       |               |               |
|----|-------|---------------|---------------|
| a) |       | b)            |               |
|    | 1:5   | C. o. =       | C. o. =       |
|    | 1:10  | K+ OK? K- OK? | K+ OK? K- OK? |
|    | 1:20  |               |               |
|    | 1:40  |               |               |
|    | 1:80  |               |               |
|    | 1:160 |               |               |
|    | TITR  |               |               |
| K+ |       | IgA           | IgG           |
| P  |       | ABSORBANCE    | ABSORBANCE    |
| Q  |       |               |               |
| R  |       |               |               |
| S  |       |               |               |
|    |       |               | Z á v ě r     |
|    |       |               |               |
|    |       |               |               |
|    |       |               |               |

Technická poznámka: V případě nedostatku času dodělejte úkoly 13, 15 a 17 doma.

Obrázky v tomto protokolu vytvořil O. Z. s využitím obrázků z následujících stránek:

<http://creatures.ifas.ufl.edu>  
<http://www.apartmenttherapy.com>  
<http://www.bed-bug.org>  
<http://www.dkimages.com>  
<http://www.aaainsectpestcontrol.com>  
<http://encyklopedie.divoch.info>

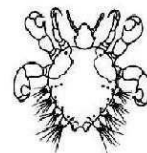
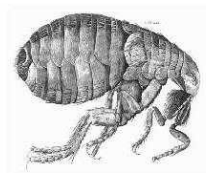
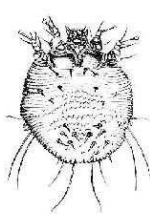
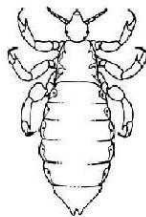
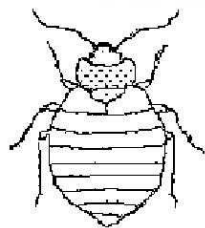
<http://www.wikieducator.org>  
<http://pedagogie.ac-montpellier.fr>  
<http://www.humanillnesses.com>  
<http://upload.wikimedia.org>  
<http://www.wadsworth.org>  
<http://teaching.path.cam.ac.uk>

<http://www.wikieducator.org>  
<http://www.cmpt.ca>  
<http://pathmicro.med.sc.edu>  
<http://www.bushwalking.org.au>  
<http://picasaweb.google.com>

## Úkol 17: Diagnostika ektoparazitů

### a) Přehled ektoparazitů

Spojte obrázky s odpovídajícími vědeckými, českými a anglickými názvy ektoparazitů (nebo je zakroužkujte stejnou barvou, označte shodnými čísly apod.)



Blecha

Klíště

Veš hlavová

Zákožka svrabová

Štěnice

Muňka

Hard tick

Flea

Itch mite

Head louse

Bed bug

Crab louse

*Phthirus  
pubis*

*Ixodes  
ricinus*

*Cimex  
lectularius*

*Pediculus  
capitis*

*Pullex  
irritans*

*Sarcoptes  
scabiei*

### b) Poznámka k myiázám

V tomto spojeném praktiku si pouze přečtete definici pojmu myiáza.

Onemocnění způsobené parazitováním larev některých much v lidském těle, vyskytuje se zejm. v tropických oblastech

### Kontrolní otázky:

1. Uveďte názvy antimykotik, která lze použít na povrchové mykózy.
2. Uveďte názvy antimykotik, která se hodí k léčbě generalizovaných kandidóz a jiných systémových mykóz.
3. Při jakých teplotách a na které půdě se kultivují patogenní houby?
4. Jaké choroby způsobuje protozoární rod *Leishmania*?
5. Znáte nějaké jiné krevní parazity než malarická plasmodia?
6. V učebnici, na webu či jinde najděte alespoň dvě barvicí metody pro diagnostiku střevních protozoí.
7. Jaký je význam *Cyclospora cayatanensis* a *Cryptosporidium parvum*? Jaké lze u těchto organismů použít barvicí metody?
8. Znáte příklad arteficiální (iatrogenní) myiázy používané v léčbě?