



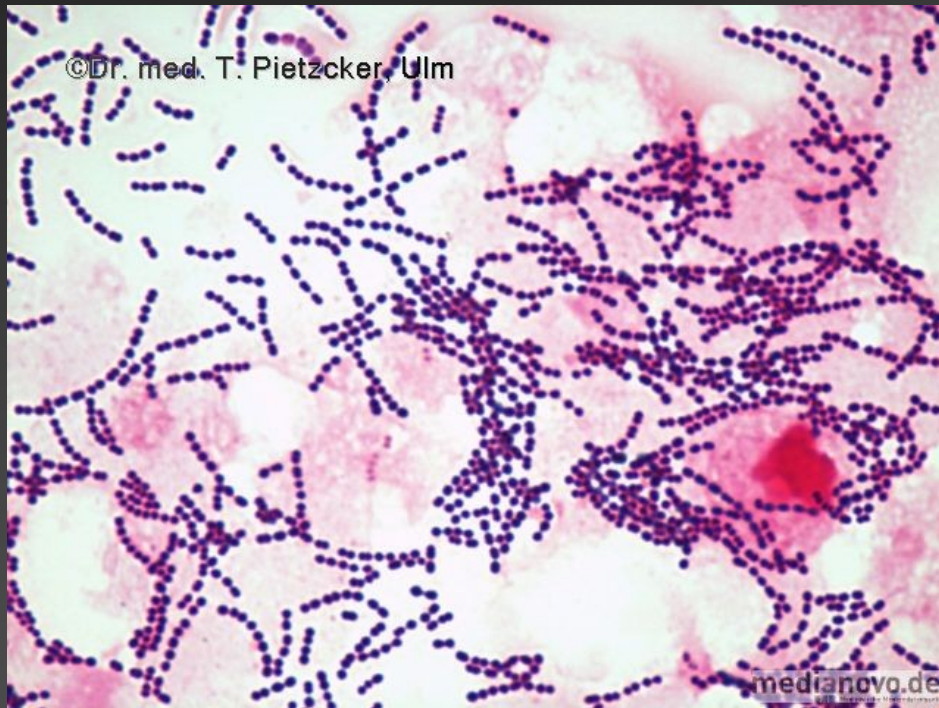
# MIKROSKOPIE



# Gramovo barvení

- Pamatujte na „VLAS“ :
- Violet' 30 s, lugol 30 s, alkohol 15 (až 20) s, oplach vodou, safranin 60 s, oplach
- Gramovo barvivo (= Krystalová violet' je modrá hydrofilní barva – alkoholem odbarvení jen G-bakterií, safraninem zabarvení odbarveného –tj. G-bakterií
- Výsledek: G+ = modré x G- = růžové

# G+ koky

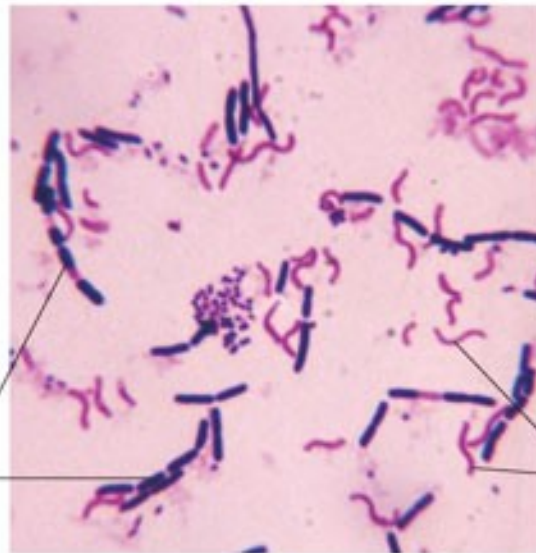
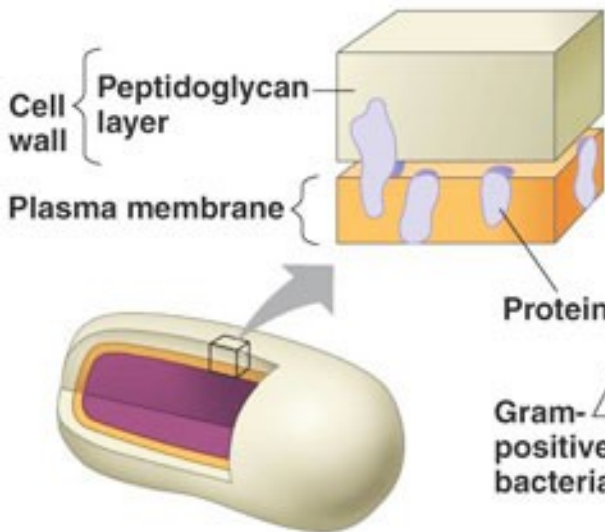


# G- tyčinky

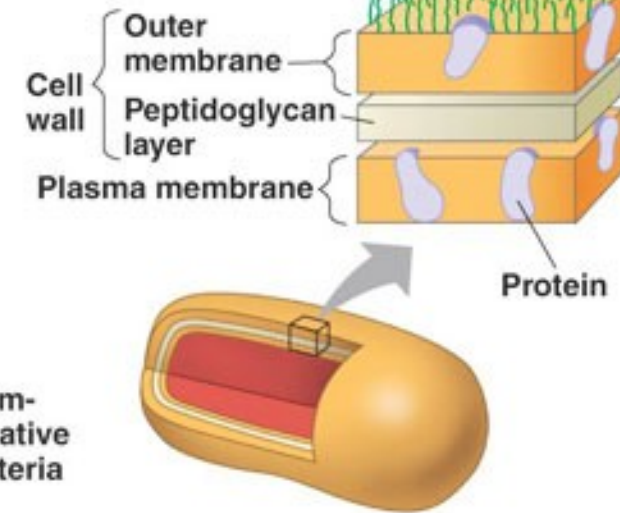


# Rozdíly ve stavbě buněčné stěny G+ a G- bakterií

## purple-black stain



Carbohydrate portion of lipopolysaccharide



Gram-negative bacteria

(b) Gram-negative: crystal violet is easily rinsed away, revealing red dye.

pink-ish stain

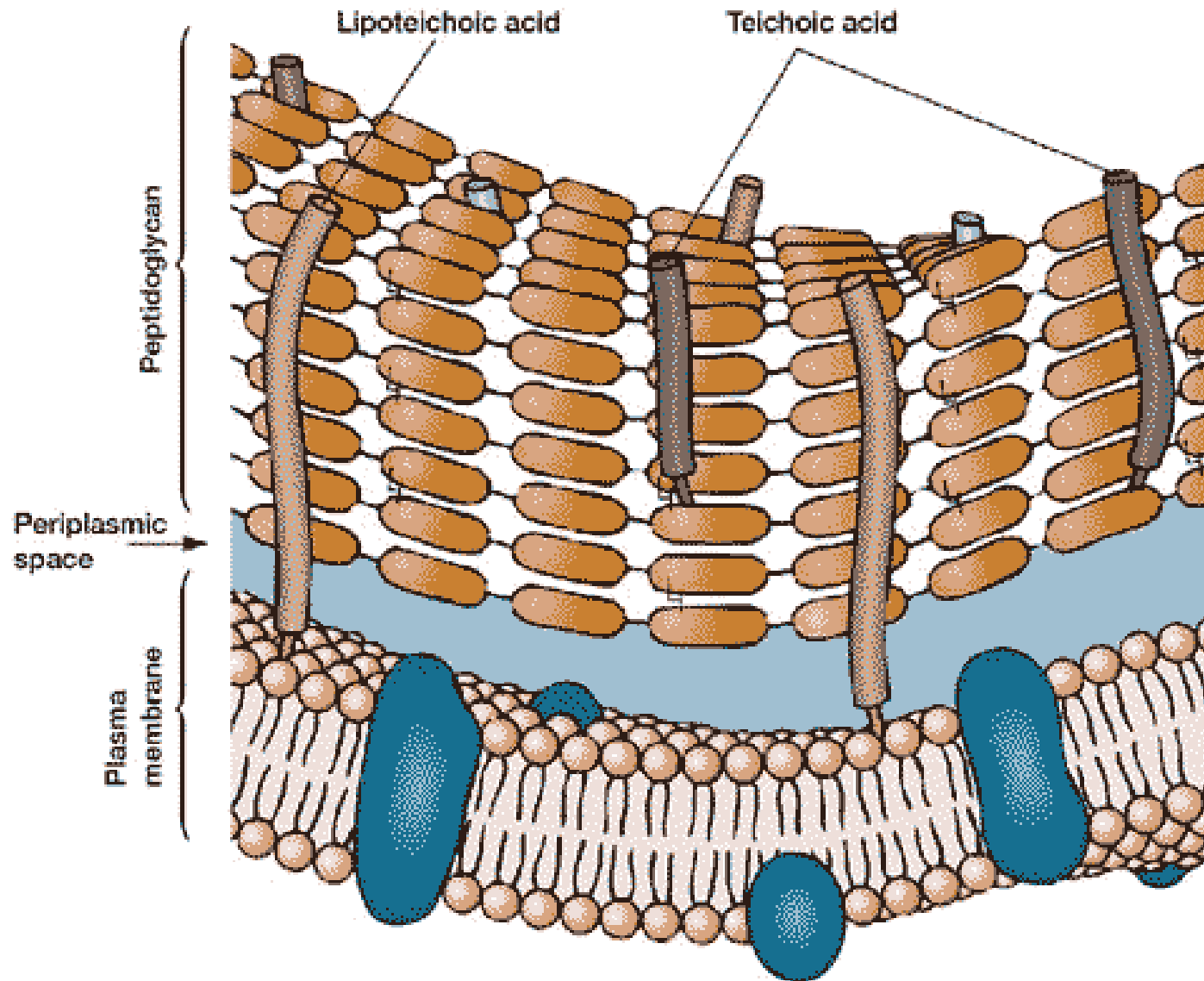
(a) Gram-positive: peptidoglycan traps crystal violet.

**Bacillus anthracis** - anthrax  
**Staphylococcus** - food poisoning  
**Streptococcus** - strept throat  
**Enterococcus** - endocarditis & meningitis  
**Clostridium** - botulism & colitis

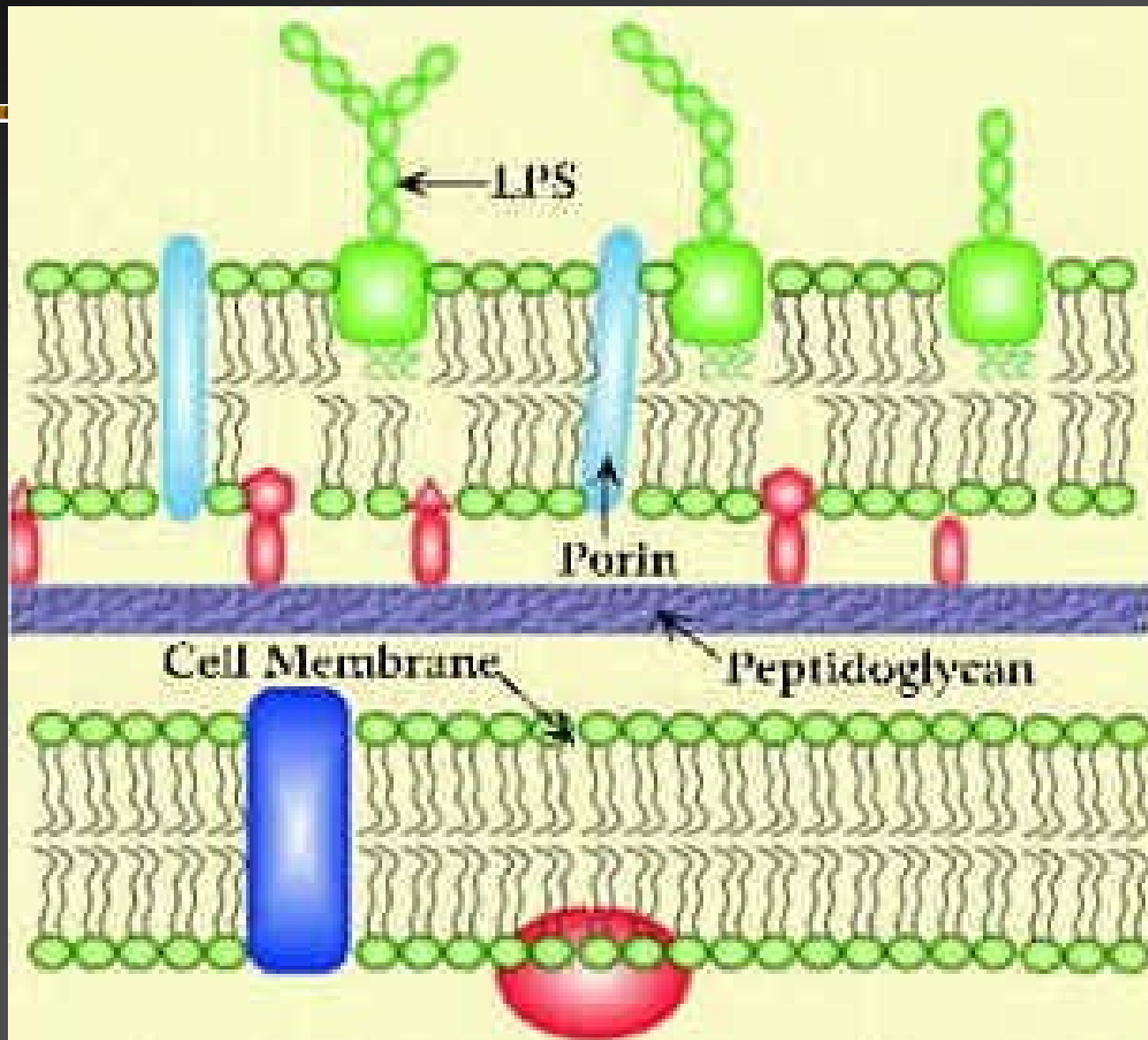
**E. coli** - intestinal bacteria - food poisoning  
**Salmonella** - typhoid fever - food poisoning  
**Helicobacter pylori** - peptic ulcers & gastritis  
**Legionella** - legionnaires pneumonia  
**Cyanobacteria** - blue green algae

# Stěna G+ bakterií

Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc.



# Stěna G- bakterií

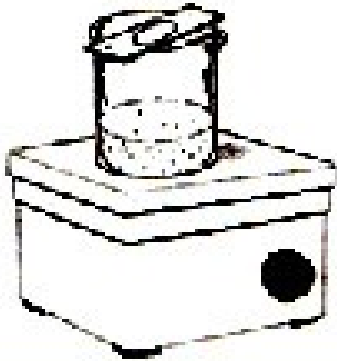


# Barvení preparátu s acidorezistentními tyčinkami

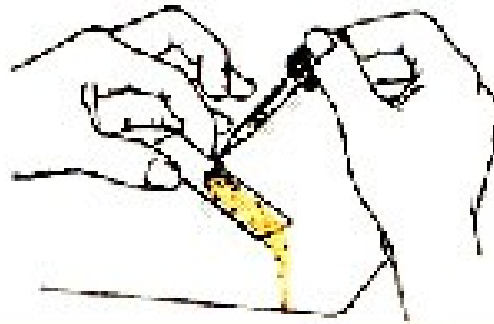
---

- Odolnost vůči kyselinám či alkáliím (hydrofóbní mykolové kyseliny ve vnější membráně mykobakterií)
  - Aby mohly na něco působit kyseliny či alkalie, musí to „něco“ být hydrofilní, tedy komunikovat s vodným prostředím. Pro mykobakteria však tohle neplatí.
  - Většina barviv je hydrofilních, a tudíž se mykobakteria špatně barví, zpravidla je nutno barvit je za horka, aby se vůbec obarvila !!!
-

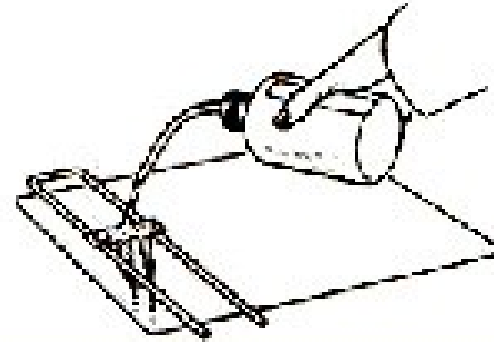
# Ziehl-Neelsenovo barvení



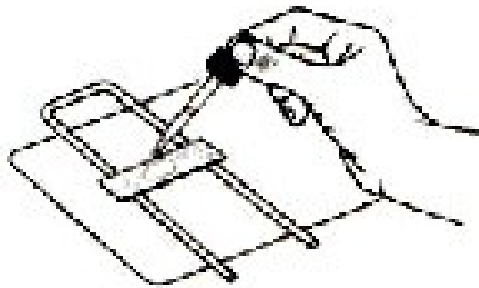
**1** Cover smear with carbolfuchsin. Steam over boiling water for 8 minutes. Add additional stain if stain boils off.



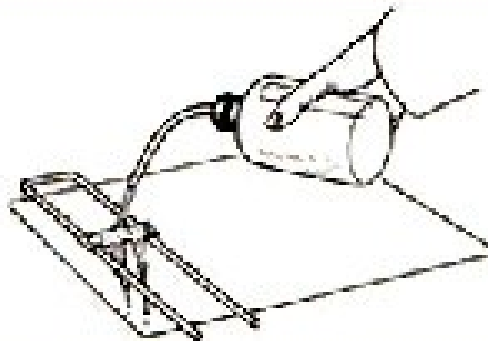
**2** After slide has cooled decolorize with acid-alcohol for 15 to 20 seconds.



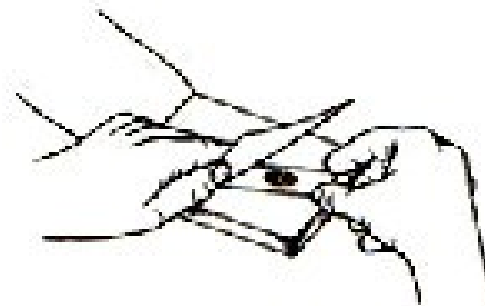
**3** Stop decolorization action of acid-rinsing briefly with water.



**4** Counterstain with methylene blue for 30 seconds.



**5** Rinse briefly with water to remove excess methylene blue.

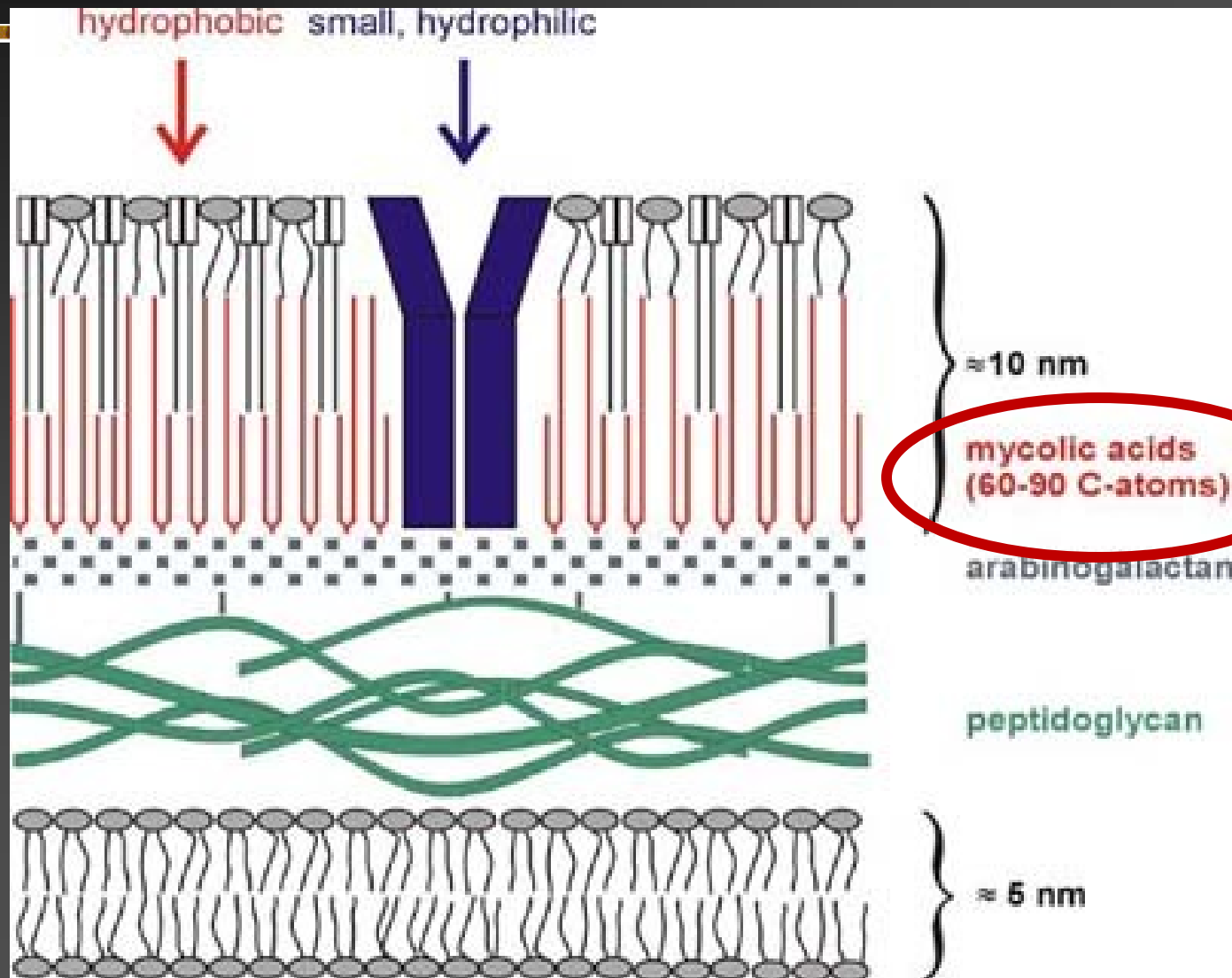


**6** Blot dry with bibulous paper. Examine directly under oil immersion.

Ziehl-Neelsen acid-fast staining procedure



# Mycobacterium, Nocardia, Actinomyces



# Ziehl-Neelsenovo barvení



# ACIDOREZISTENTNÍ BAKTERIE

---

aerobní

*Mycobacterium tuberculosis*, *leprae*

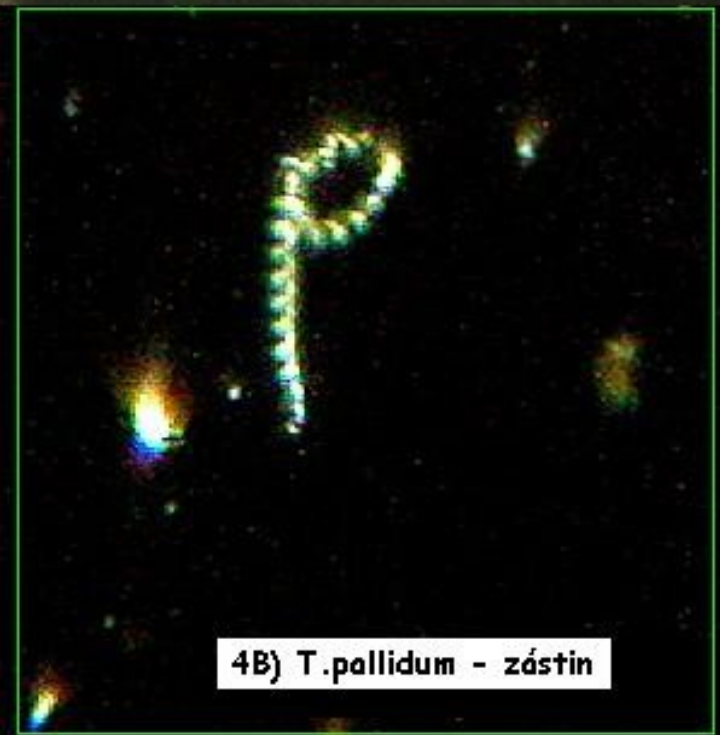
*Nocardia*

anaerobní

*Actinomyces* – vlákna!!

---

# Zástinová mikroskopie - spirochéty



# Princip mikroskopie v zástině

Všechny paprsky dopadají díky kondenzoru šikmo, mimo oko pozorovatele. Pouze paprsky lomící se na preparátu dopadají do oka pozorovatele. A proto oko pozorovatele vidí temné pole\* se zářícím(-i) objektem(-y)

# SPIROCHÉTY – Borrelie, Treponemy, Leptospiry

---

- Nelze kultivovat
  - Přímý průkaz: Využití molekulární mikrobiologie (hledáme DNA v likvoru, krvi, stěru apod.): **PCR**
  - Nepřímý průkaz: Využití serologie (hledáme protilátky v séru) : **ELISA, Western Blot**, popř. screeningové testy: **RRR, TPHA, FTA-ABS**
-

# G+ BAKTERIE (ROZŠÍŘENÉ SCHÉMA)

Rozdělení podle tvaru

## G+ koky

## G+ tyčky

katalázový test (příp. KA s 10%NaCl)

U všech **pozitivní !!!!**  
katalázový test

**Listeria monocytogenes**

Růst při 4°C, s vysokou koncentrací solí, příp. na žluč-eskulinu

Většinou kontaminanty klin. materiálu :

**Corynebacterium** - buňky v palisádě

**Bacillus** - spory

pozitivní

stafylokoky

Koagulázový test (Koa),  
Hyaluronidáza (H)

Koa-, H-

Koa +, H+

**S.epidermidis**

**S.aureus**

negativní

Slanetz - Bartley

Žluč - eskulin

enterokoky

Arabinózový test

**E. Faecalis a E. faecium**

streptokoky

PYR test  
CAMP test  
Optochin test

**S. pneumoniae, S.agalactiae, S.pyogenes**

# G+ koky

– zaměřeno na rozlišení streptokoků

**katalázový test** (alternativně KA s 10%NaCl, kde staf rostou, strep nerostou)

Pozitivní (tj. „šumí“ 😊)

**Stafylokoky**

Negativní (tj. „nešumí“ 😞)

**Streptokoky**

Hlavní diagnostika  
Strep. se opírá o  
způsob hemolýzy na KA  
(Alfa-hemolytické x beta-hemolytické)

a

**Enterokoky**

**Alfa – hemolytické neboli Viridující streptokoky**

**Hemoglobin – verdoglobin**

Př. *S.oralis*, *mitis* aj. ústní streptokoky + *S.pneumoniae*

**Optochinový test**

Odliší pneumokoka od ostatních „alfíků“

+

***S.pneumoniae* = pneumokok**

Ostatní „alfíci“

Neúplná  
Beta-hemolýza  
**Pozitivní CAMP**

***S.agalactiae***

Úplná  
Beta-hemolýza  
**Pozitivní  
PYR**

***S.pyogenes***



# Třídění streptokoků podle hemolýzy

Případ	Na KA	Patogen
1.	(beta) hemo- lýza*	<i>Streptococcus pyogenes</i>
2.		<i>Streptococcus agalactiae</i>
3.		Skupina „non-A-non-B“ streptokoků
4.	viri- dace (alfa)	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
5.		skupina ústních streptokoků : „alfíci“
-	žádná	Streptokoky bez hemolýzy („gamáči“)

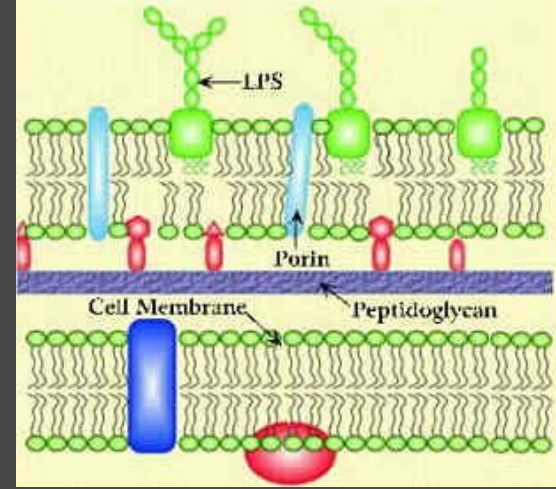
\*u *S. agalactiae* jen částečná hemolýza

# Třídění streptokoků podle Lancefieldové (podle typu antigenu – polysacharid C)

A	<i>S.pyogenes</i>
B	<i>S.agalactiae</i>
nonA-nonB	<i>S.bovis</i> , <i>dysagalactiae</i> , <i>equi</i>
-	<i>S.pneumoniae</i>
-	Ústní streptokoky

# G- BAKTERIE

Mikroskopie



## G- koky

oxidázový test +

INAC test

-

*Neisseria gonorrhoeae*  
*meningitidis*

+

*Moraxella catarrhalis*

## G- tyčinky

Růst na Endo agaru

ANO

Hajna

+

oxidázový test

-

Enterobakterie

+

*Vibria*

NE

Náročné  
G- tyčinky

Nefermentující G- tyčinky

Oxidázový test +/-

# *Enterobacteriaceae* OX-, GLC+ (Hajna)

*Růst na KA, Endo*

*Klebsiella, Salmonella, Shigella, Escherichia, Enterobacter*

## *Vibrionaceae*

*OX+, růst na Endo*

## Nefermentující G-tyčinky

*Stenotrophomonas, Burkholderia, Acinetobacter, Pseudomonas*

## G- tyčinky

## Náročné G- tyčinky

*Helicobacter, Campylobacter, Legionella, Francisella, Brucella, Bordetella, Haemophilus*

# Nefermentující G- „gauneři“ 😊

Tj. mistři v přijímání genů rezistence pro antibiotika, často multirezistentní !!

*Acinetobacter baumannii* *Pseudomonas aeruginosa* *Burkholderia cepacia*



Do téhle party by mohli patřit i např. *Stenotrophomonas maltophilia* a *Alcaligenes faecalis*

# Přehled enterobakterií

my.operal.com

Červeně  
pigmentoaná  
Serratia



Infekce	Patogen
Systemové	<i>Y. pestis</i> , AP** <i>Salmonella</i>
Obligátní	ZP* <i>Salmon.</i> , <i>shigella</i> , <i>Yersinia</i>
Oportunní	<i>E. coli</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Serratia</i> , <i>Proteus</i> , <i>Providencia</i> , <i>Morganella</i> , <i>Citrobacter</i> etc,

\*zoopathogenní \*\*antropopathogenní

---

Štěpení laktózy je důležité pro  
rozdělení enterobakterií mezi  
sebou – obligátní (LAC-) a  
potenciální (LAC+)

---

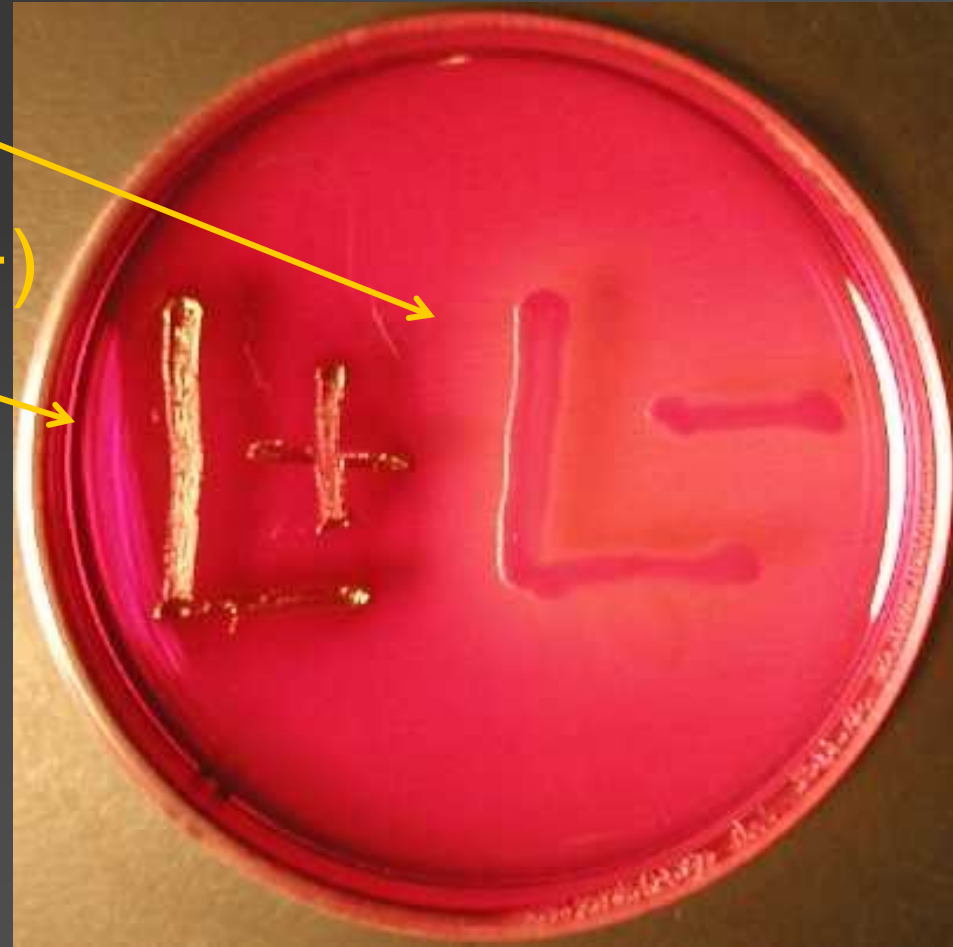
# Na Endu rostou jen G- bakterie !!

- laktóza negativní (Lac-)

(*Salmonella enteritis*, *Proteus vulgaris*)

- laktóza pozitivní (Lac+)

(*K. pneumoniae*, *E.coli*)



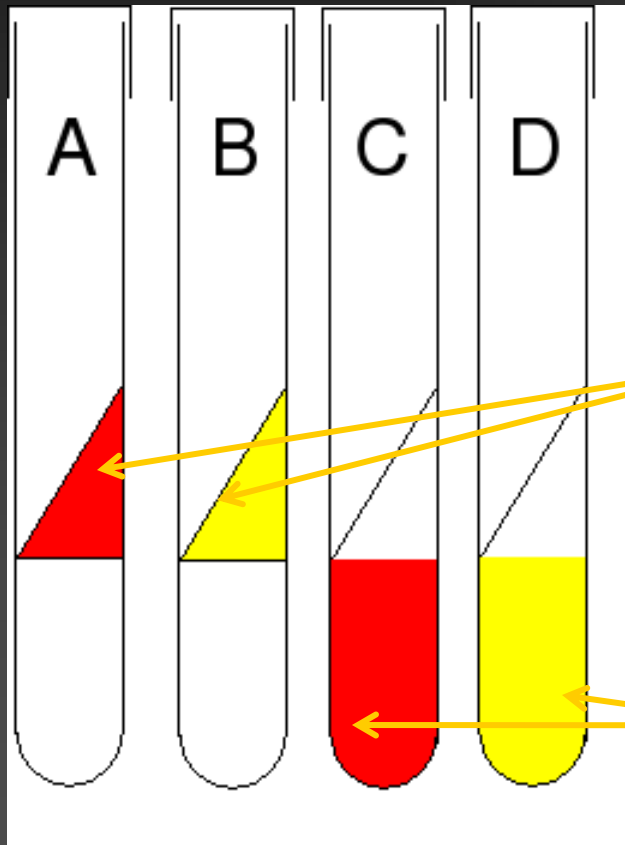


---

Štěpení glukózy je klíčové pro  
zařazení do enterobakterií  
(GLC+) nebo nefermentujících  
G- tyčinek (GLC-).

---

# Hajnova pŭda je testem ťtěpení laktózy(nahoře) i glukózy (dole)



**Laktóza**

**červená – nešťěpí (lac-)**

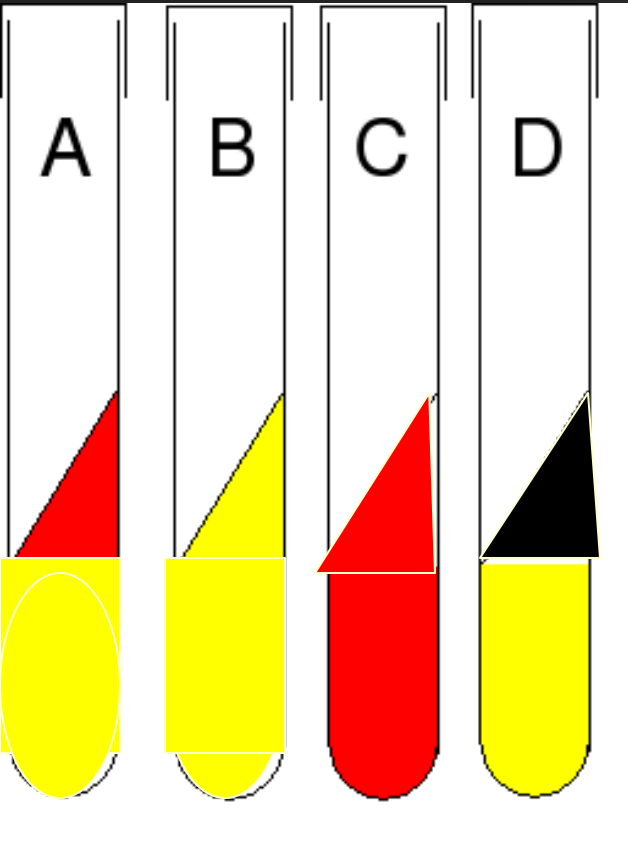
**žlutá – ťtěpí (lac+)**

**Glukóza**

**červená – nešťěpí (GLC-)**

**žlutá – ťtěpí (GLC+)**

# Štěpení (fermentace) cukrů : laktózy a glukózy - Hajna



## Enterobacteriaceae

A (GLC+, LAC-) příp. D (GLC+LAC<sub>(NENÍ VIDĚT)</sub>  
+ produkce sirovodíku (ČERNÁ BARVA)

...obligátně patogenní enterobakterie :  
*Salmonella enteritis, Proteus vulgaris*

B (GLC+, LAC+).. Potenciálně patogenní  
enterobakterie: *Echerichia coli, Klebsiella  
pneumoniae*

C .... (GLC- i LAC-) nefermentující G-  
tyčinky

Při aerobním metabolismu vznikají v buňce toxické hydroxylové radikály a superoxidové aniony, ty přemění superoxiddismutáza na peroxid vodíku, který je ale rovněž pro buňku toxický. V bakteriální buňce fungují dva velmi podobné (leč přece jen mírně odlišné) enzymy, které peroxid vodíku v buňce likvidují. Jsou to **kataláza** a **oxidáza**.

## Co je to (per)oxidáza a k čemu ji bakterie využívají?

Slouží k redukci peroxidu vodíku v buňce oxidoredukční reakcí : donor + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> → oxidovaný donor + 2H<sub>2</sub>O

## Jak se provádí oxidázový test?

Detekčním okénkem na oxidázovém papírku se dotkneme kolonie, pokud papírek **zmodrá**, je kolonie ox +, zůstane-li bílý je kolonie ox -.

## U jakých bakterií je pro diagnostiku klíčový oxidázový test?

Abychom odlišili enterobakteriaceae (OX -) a vibrionaceae (OX +), případně některé nefermentující G- tyčinky (OX +/-) – typicky Pseudomonas je ox+.

## Co je to **kataláza** a k čemu ji bakterie využívají?

= enzym, který stejně jako peroxidáza slouží k odstranění toxického peroxidu vodíku z buňky a to jeho přímým štěpením na molekulu kyslíku a dvě molekuly vody:



## Jak se provádí katalázový test?

V kapce peroxidu rozetřeme kolonii, pozitivní šumí, negativní nešumí.

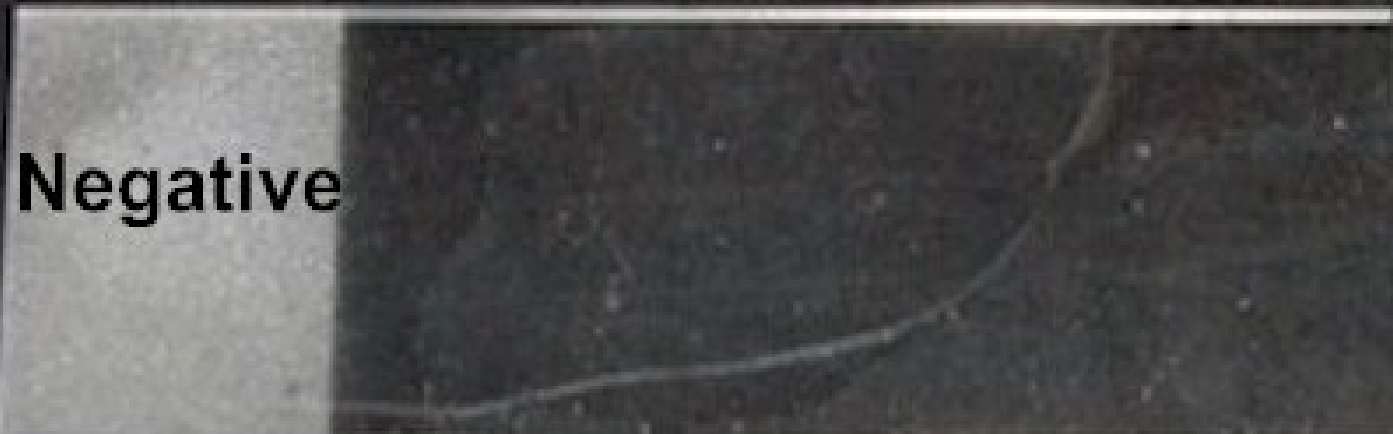
## U jakých bakterií je pro diagnostiku klíčový katalázový test?

U G+ koků k rozlišení **stafylokoků** (kat +) a **streptokoků** (s enterokoků) (kat -)

Do kapky peroxidu rozetřeme testovaný kmen...

## CATALASE TEST

**Negative**

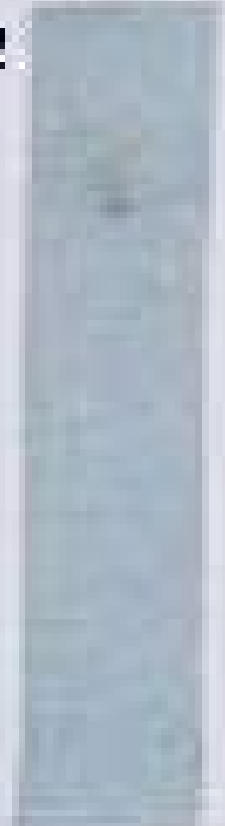


**Positive**



Oxidázový papírek se detekčním okénkem přiloží na testovanou kolonii

Oxidase  
neg.

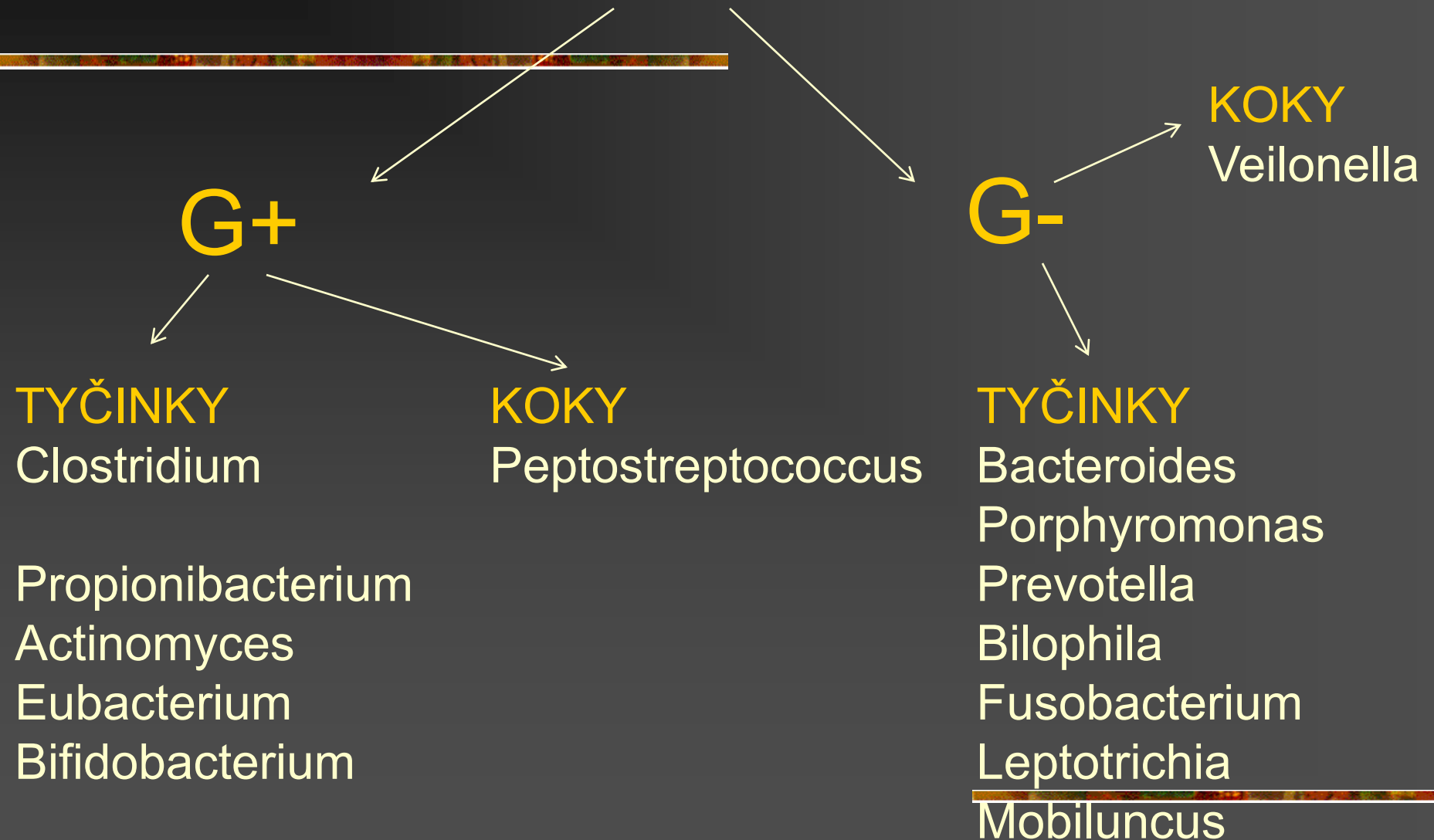


Oxidase  
pos.



Prostředí	Normální	↓ O <sub>2</sub>	↑ CO <sub>2</sub>	Bez O <sub>2</sub>
<b>Striktní aeroby</b> Pseudomonas, Vibrio, Bordetella, kvasinky, plísně	ano	ano	ano	ne*
<b>Fakultativ. Anaeroby</b> Většina klinicky významných bakterií	ano	Ano	ano	ano
<b>Aerotolerantní bakt.</b> Clostridium perfringens				
<b>Mikroaerofilní bakt.</b> Laktobacily, kampylobaktery	ne	Ano	(ano)	ne*
<b>Kapnofilní bakterie</b> Meningokoky, gonokoky	ne	(ano)	ano	ne*
<b>Striktní anaeroby</b> Clostridium, Bacteroides	ne	ne	ne	ano**

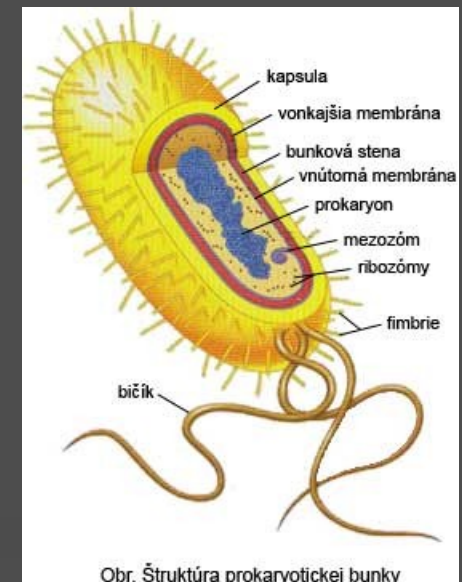
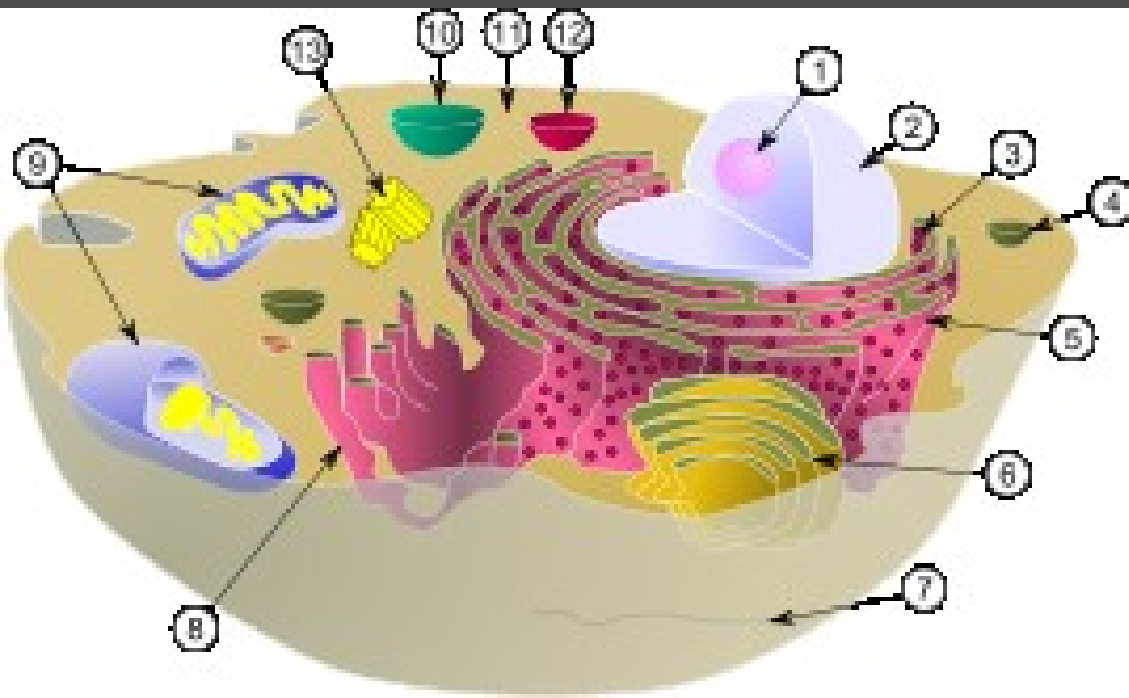
# ANAEROBNÍ BAKTERIE





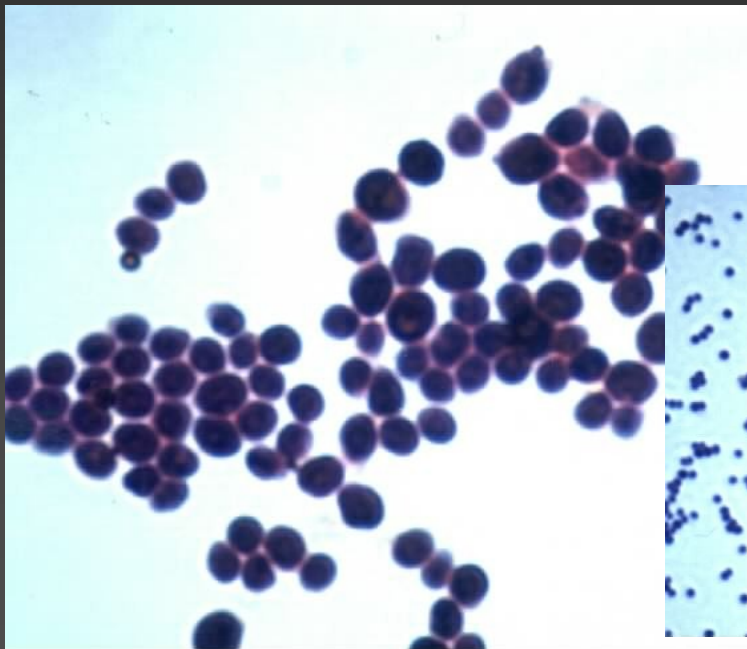
# HOUBY = mikromycety

- eukaryotní organismy x prokaryotní bakterie
- jiná stavba buněčné stěny – antibiotika nezabírají !!!
- pohlavní (spory) a nepohlavní (konidie) stadia

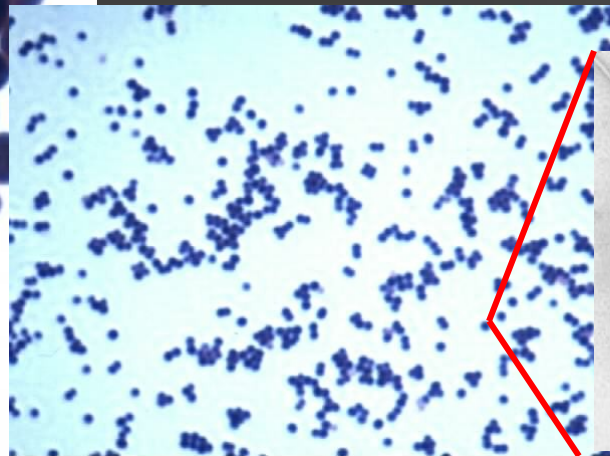


# VELIKOST MIKROBŮ

**Kvasinky** (10-100 $\mu\text{m}$ )

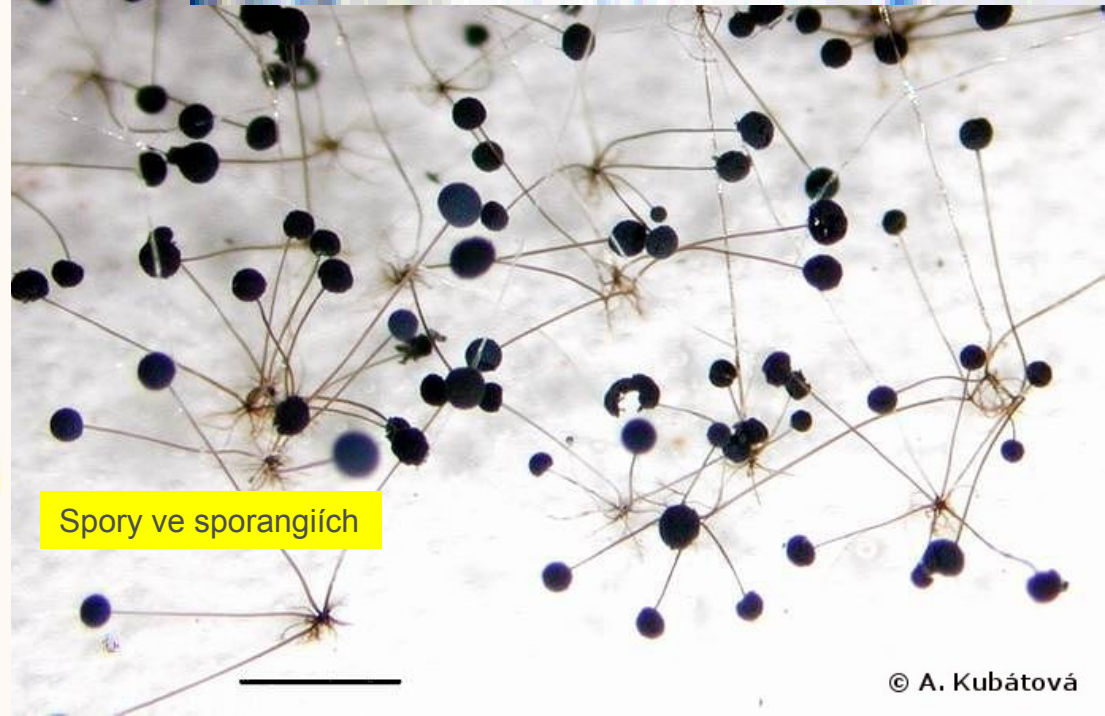
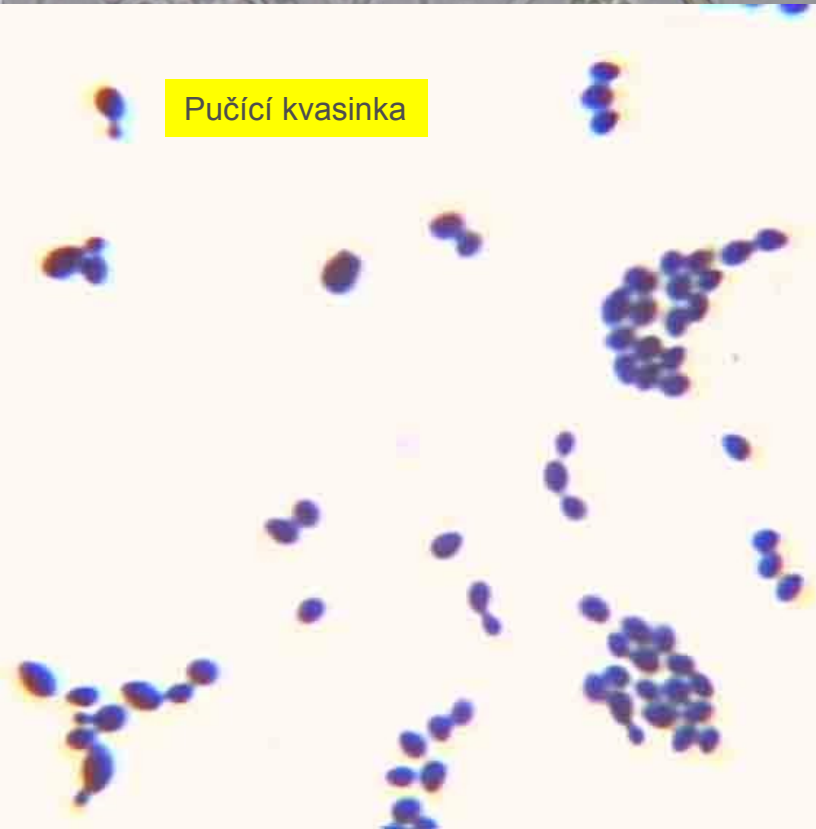
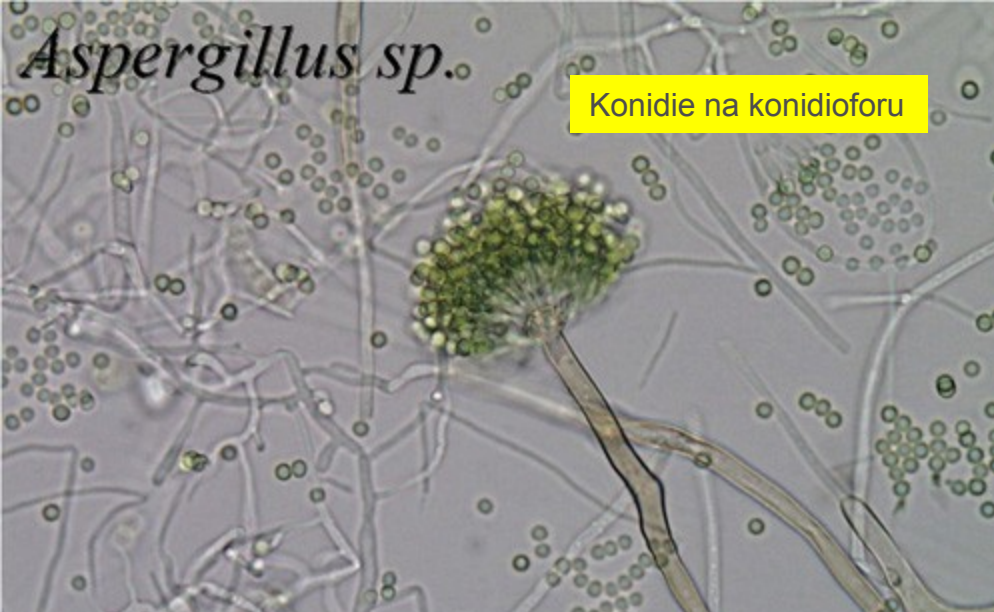


**Bakterie** (0,1-10  $\mu\text{m}$ )



**Viry** (< 0,1 $\mu\text{m}$ )





# Rozdělení mikromycet

Podle morfologie a klinických příznaků:

- A. Kvasinkovité mikromycety – *Candida*, *Saccharomyces*, *Cryptosporidium*..
- B. Dimorfní mikromycety – *Coccidioides*, *Histoplasma*, *Blastomyces*
- C. Zygomycety – *Mucor*, *Rhizopus*
- D. Dermatofyty – *Epidermophyton*, *trichophyton* (pomalu rostoucí)
- E. *Aspergily*, *penicilia* - rychle rostoucí

VLÁKNITÉ

# STAROSTI PARAZITA



- projít všemi vývojovými stádii životního cyklu, najít sexuálního partnera a vyprodukovat nové potomstvo
- strategie vyhledávání hostitelů a mezhospitelů
- schopnost vniknout a zachytit se
- adaptovat se na nové prostředí (být schopen se uživit, ochránit před útočným imunitním systémem apod.)

# EKTOPARAZITÉ

(členovci – přenašeči virů, bakterií a prvoků)

Zákožka (*Sarcoptes scabiei*)



Klíště (*Ixodes ricinus*)



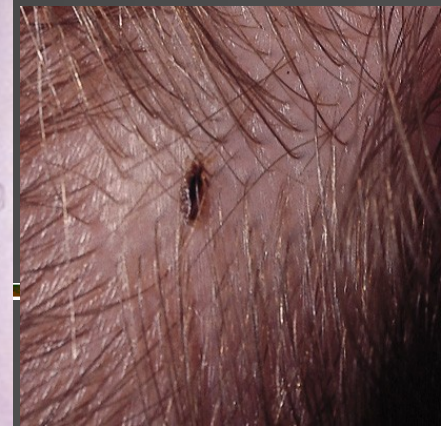
Koutule (*Phlebotomus*)



Veš (*Pediculus humanus*)

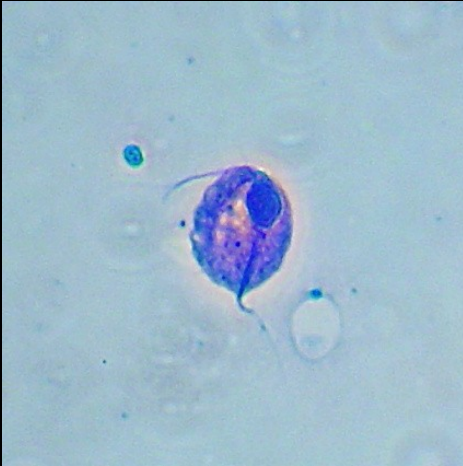


Veš muňka (*Phthirus pubis*)



# PRVOCI - počet roste aniž opuští tělo hostitele

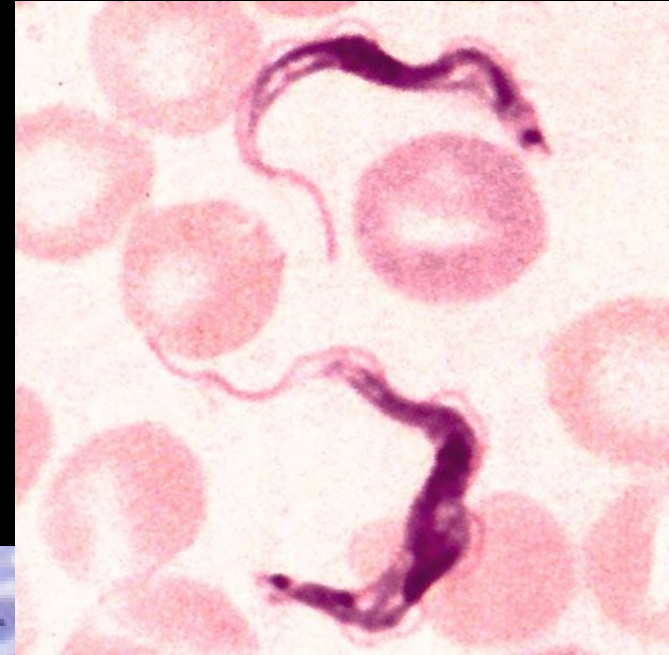
**Bičenka Trichomonas**



**Měňavka Entamoeba**



**Bičivka Trypanosoma**



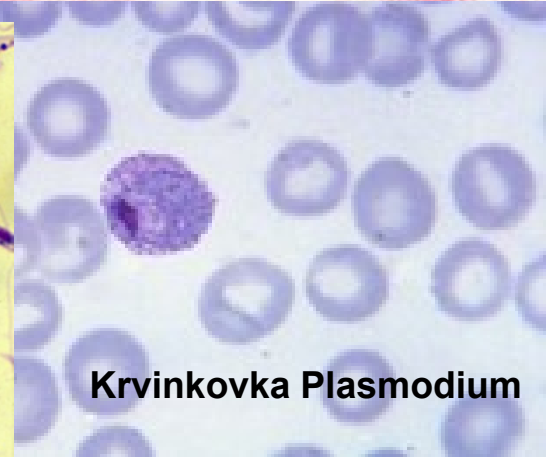
**Zdvojenka Giardia**



**Bičivka Leishmanie**



**Krvinkovka Plasmodium**



# Hlístice – Nematoda

(filárie, svalovec, škrkavky, roupy)

Roup *Enterobius*



Vlasovec *Dracunculus*



Škrkavka *Ascaris* - posterior end  
Male Female



Tenkohlavec *Trichuris*

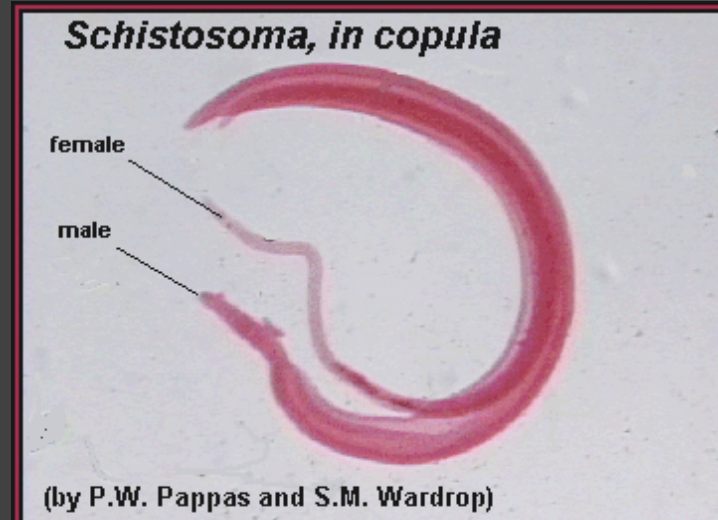


Svalovec *Trichinella*

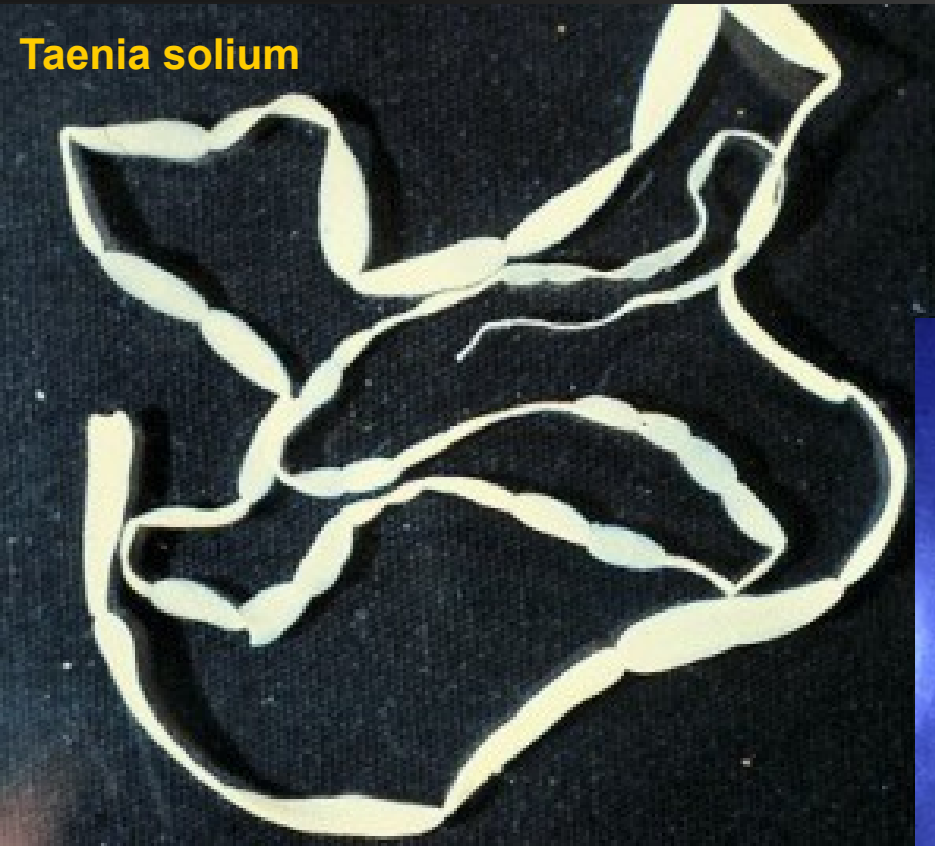




# Motolice a krevničky (Trematoda)



# Tasemnice (Cestoda)



**Taenia saginata**



---

# STŘEVNÍ PARAZITÓZY

Entamoeba histolytica

Giardia intestinalis

Taenia saginata

Enterobius vermicularis

Ascaris lumbricoides

Fasciolopsis buski

---

---

# TKÁŇOVÉ PARAZITÓZY

Toxoplasma gondii

Leishmania

Trichinella spiralis

Taenia saginata - boubele

---

---

# UROGENITÁLNÍ PARAZITI

Krevnička (*Schistosoma heamatobium*)

*Trichomonas vaginalis*

*Phthirus pubis*

---

---

# KREVNÍ PARAZITI

Plasmodium falciparum,  
vivax, malariae

Trypanosoma cruzi, brucei

Dranunculus medinensis

Wuchereria bancrofti

Loa loa

---