

# Vyšetřovací metody v bakteriologii

Jana Juránková

OKM

FN Brno

# Vyšetřovací metody v mikrobiologii

- Přímý průkaz – průkaz přítomnosti bakterií nebo virů – bakteriologie, virologie
- Nepřímý průkaz – průkaz reakce makroorganismu na přítomnost bakterií nebo virů - sérologie

# Vyšetřovací metody v bakteriologii

- Mikroskopie
- Kultivace
- Průkaz antigenů
- Průkaz metabolitů
- Průkaz nukleových kyselin

# Mikroskopie

- Preparát nativní
- Preparát barvený
  - Barvení podle Grama
  - Barvení podle Giemsy
  - Barvení podle Ziehl – Nielsena
  - Barvení spor
  - Barvení pouzder
  - Fluorescenční barvení



# Nativní preparát

- Suspenze materiálu nebo kultury ve fyziologickém roztoku
- Pro pozorování živých mikroorganismů, posouzení jejich pohyblivosti
- 100 – 400násobné zvětšení

# Nativní preparát - využití

- Bakteriologie – sledování typického pohybu bakterií (listerie)
- Parazitologie – průkaz střevních parazitů ve stolici
- Mykologie – sledování růstu a množení kvasinek

# Nativní preparát





# Barvení podle Grama

- Hans Christian Joachim Gram, 1884
- Dělí bakterie do dvou základních skupin
  - Grampozitivní G +, modrofialové
  - Gramnegativní G -, růžovočervené



# Barvení podle Grama

- Barvitelnost podle složení buněčné stěny
- Fixace plamenem nebo metanolem
- Postup barvení:
  - Krystalová violet – 20 s
  - Lugolův roztok – 20 s
  - Oplach vodou
  - Odbarvení acetonalkoholem – 10 s
  - Safranin – 1 min

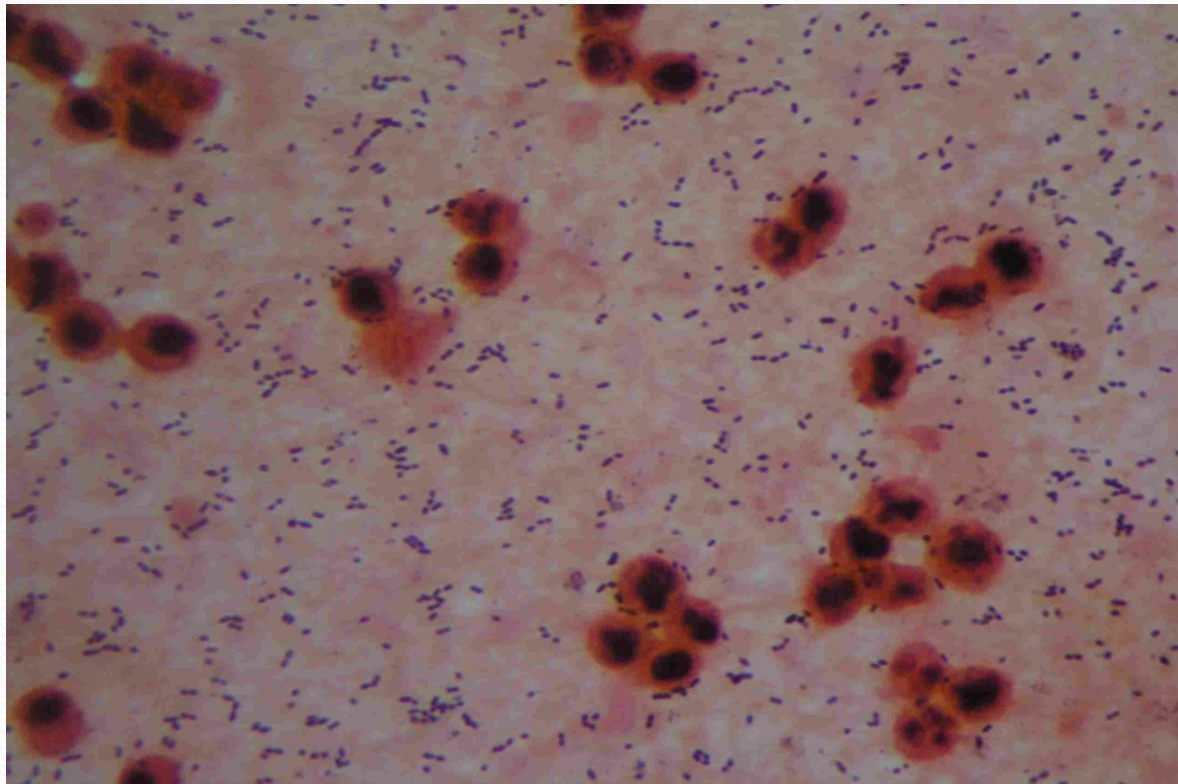
# Barvení podle Grama

- Mikroskopie při 1000násobném zvětšení
- Pozorování pomocí imerzního oleje mezi preparátem a objektivem



# Barvení podle Grama

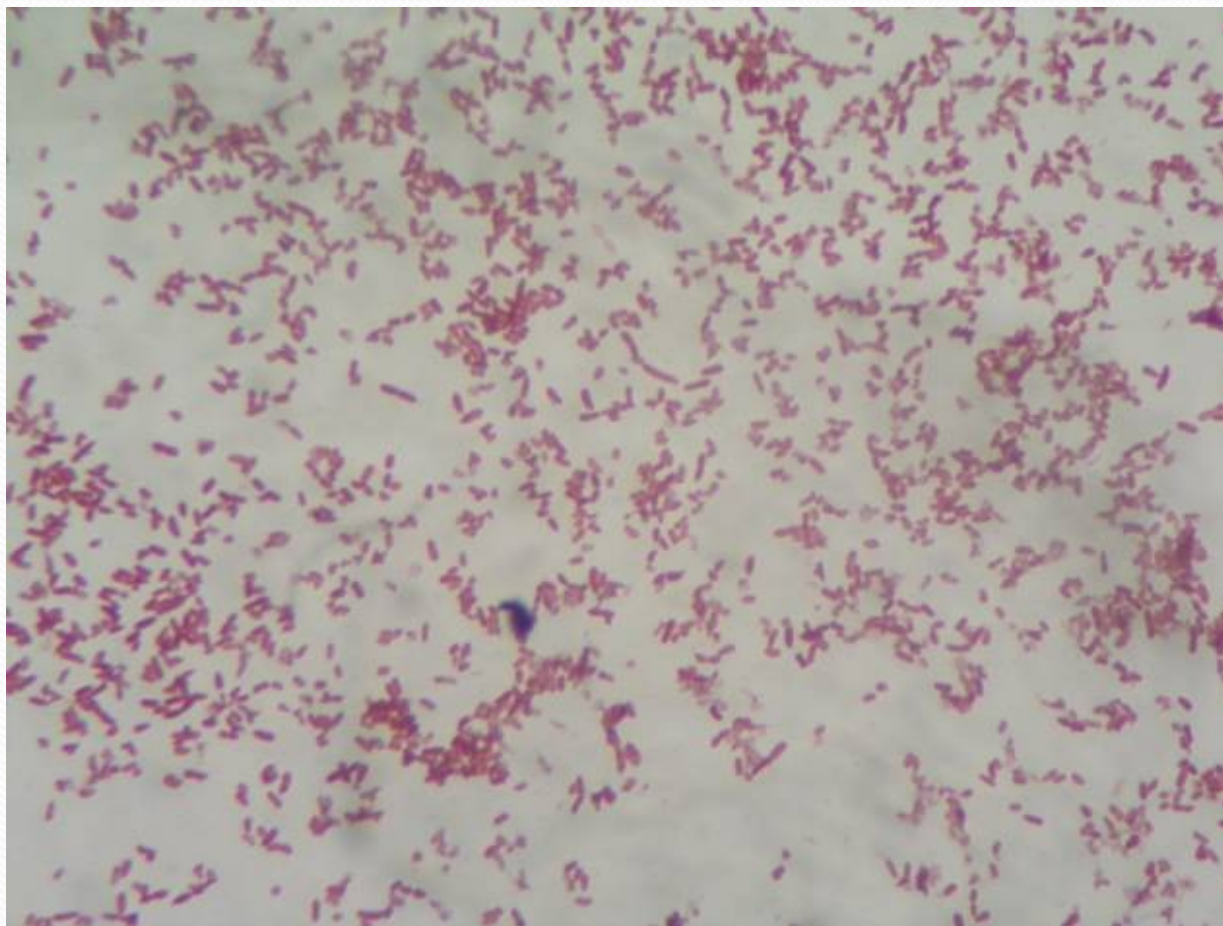
## Grampozitivní





# Barvení podle Grama

## Gramnegativní



# Barvení podle Grama

## Význam

- Diagnostické barvení – základ klasifikace a taxonomie bakterií
- Možnost okamžité a racionální antibiotické terapie



# Barvení podle Giemsy

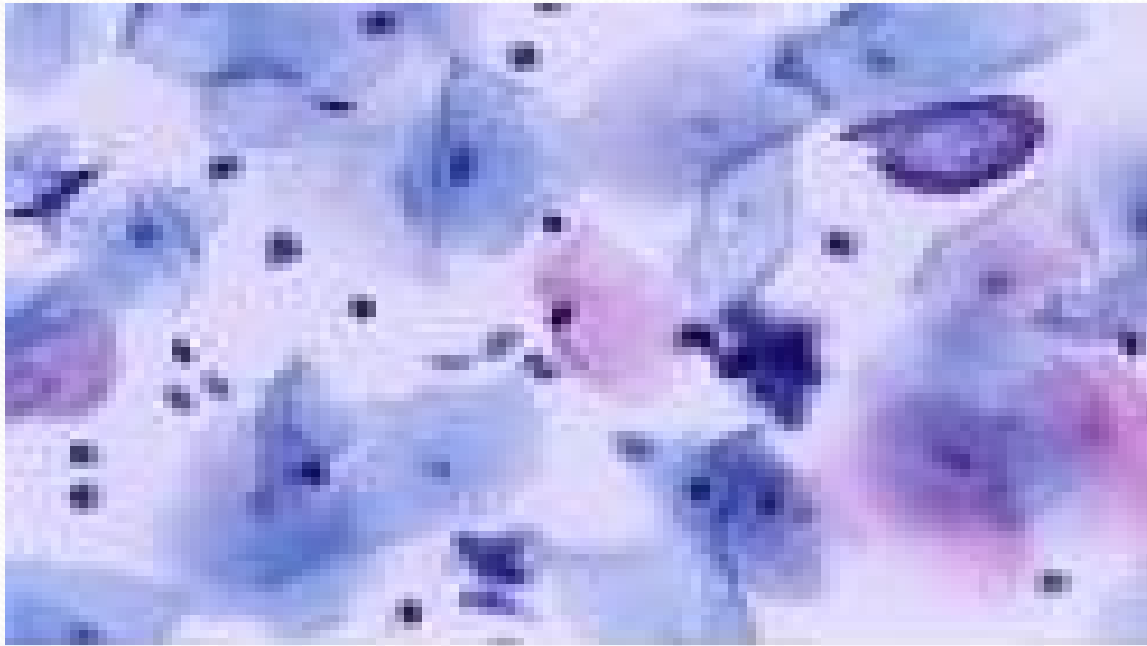
- Původně podle Giemsy – Romanovského
- Slouží k diferenciaci buněčných struktur
- Použití hlavně v parazitologii:
  - Mikrobiální obraz poševní – průkaz *Trichomonas vaginalis*
  - Diagnostika malárie
- Barvení obtížně barvitelných mikroorganismů
- Fixace metanolem



# Barvení podle Giemsy

- Azur a eosin rozpuštěný ve směsi glycerinu a metanolu
- Ředěn neutrální destilovanou vodou
- Roztok není stabilní, používá se vždy čerstvý

# Barvení podle Giemsy



# Barvení podle Ziehl - Nielsena

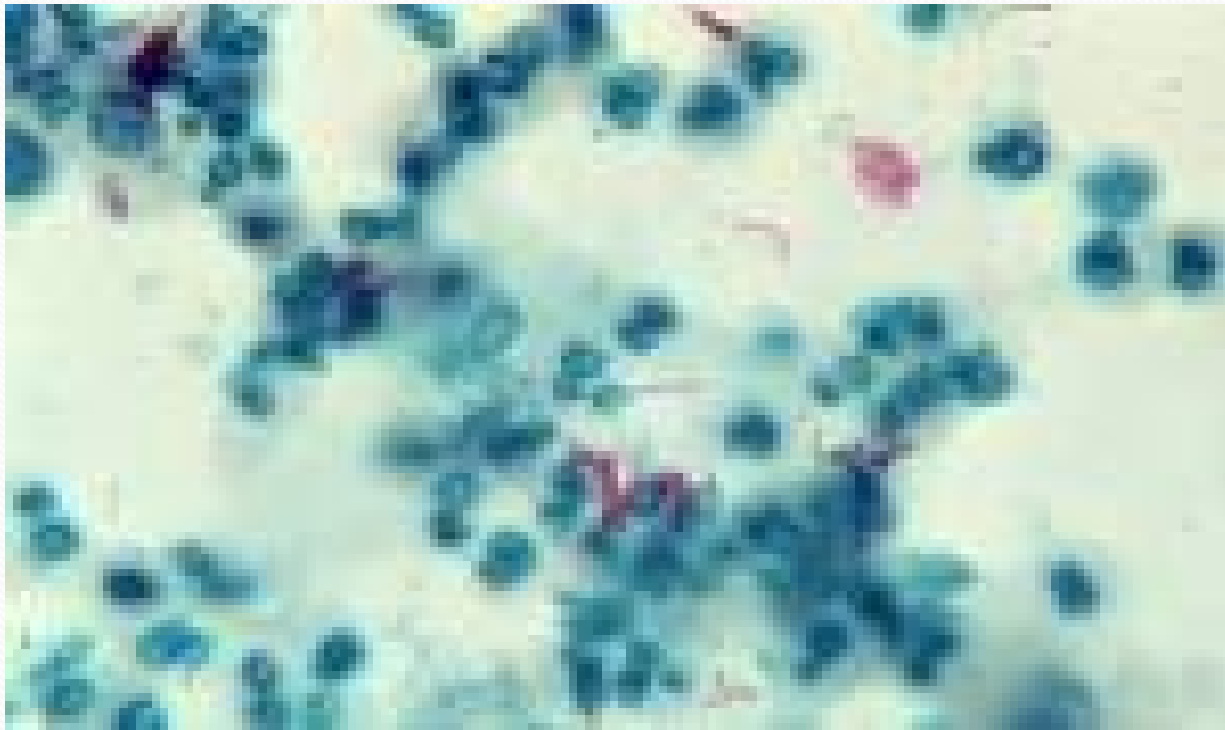
- Barvení acidorezistentních tyčinek
  - Špatně barvitelné
  - Vysoký obsah lipidů v buněčné stěně
- Nejčastěji *Mycobacterium sp.*



# Barvení podle Ziehl - Nielsena

- Fixace teplem
- Barvení karbolfuchsinem
- Zahřátí
- Odbarvení kyselým alkoholem
- Oplach
- Dobarvení malachitovou zelení

# Barvení podle Ziehl - Nielsena

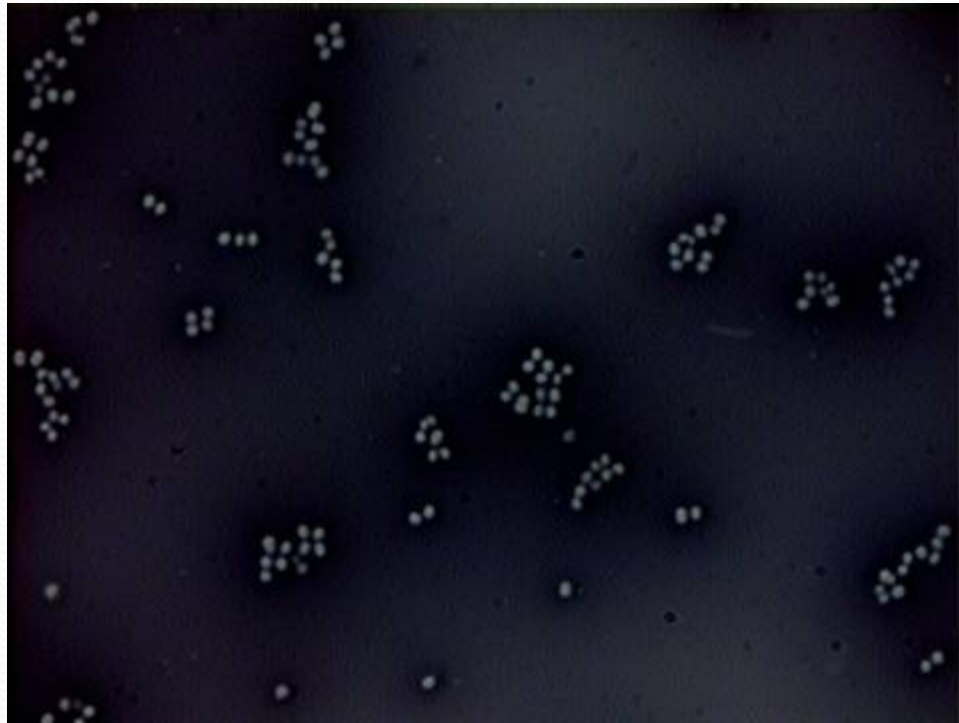


# Barvení pouzder

- Pouzdra pevně lnou k buněčné stěně
- Faktor virulence
- Nepřijímají běžná barviva
- Negativní barvení tuší
- Na tmavém pozadí světlé dvorce pouzder
- Význam pro posouzení virulence bakterií (pneumokoky)



# Negativní barvení



# Fluorescenční barvení

Pomocí fluoreskujícího barviva

- Immunofluorescence
  - Na hledaný antigen se naváže protilátka označená fluoreskujícím barvivem
- Pozorování pomocí fluorescenčního mikroskopu

# Fluorescenční barvení





# Kultivační průkaz

- Základní mikrobiologický postup
- Cílem je získat mikroba z klinického materiálu v čisté kultuře
- Identifikace mikroba
- Určit citlivost k antimikrobním přípravkům

# Kultivační půdy

- Dělení podle konzistence
  - Tekuté – k pomnožení bakterií
  - Polotuhé – ke sledování pohybu bakterií
  - Tuhé, pevné

# Kultivační půdy

- Dělení podle funkce
  - Základní – masopeptonový bujon, krevní agar
  - Diagnostické – obsahují látky, které se mění vlivem metabolismu bakterií (např. štěpení laktózy)
  - Selektivní – k výběrovému růstu bakterií, obsahují látky, které potlačují některé bakterie
  - Selektivně diagnostické



# Kultivační půdy

- Dělení podle funkce (pokračování)
  - Transportní - k transportu bez množení – umožňují přežití bakterií při transportu
  - Pomnožovací – tekuté, k pomnožení bakterií ve vzorku, mohou být i selektivní

# Podmínky kultivace

- Dostatečná vlhkost prostředí
- Optimální teplota: 37 C (4 C, 42 C)
- Optimální pH půdy: 7,2 – 7,4
- Vhodná izotonie média: 0,5 – 1% NaCl
- Dostatek vhodných živin
- Vhodné plynné prostředí

# Dělení bakterií podle vztahu ke kyslíku

- Striktně aerobní
- Fakultativně anaerobní
- Striktně anaerobní
- Anaerobní aerotolerantní
- Mikroaerofilní
- Kapnofilní



# Anaerostat



# Nádoba pro anaerobní kultivaci



# Termostat se zvýšenou tenzí CO<sub>2</sub>





# Kultivační půdy

- Masopeptonový bujon
- Krevní agar
- Čokoládový krevní agar
- Levinthalův agar
- MacConkey agar
- Sabouraudův agar
- Desoxycholát – citrátový agar
- Chromagary

# Pomnožovací bujóny



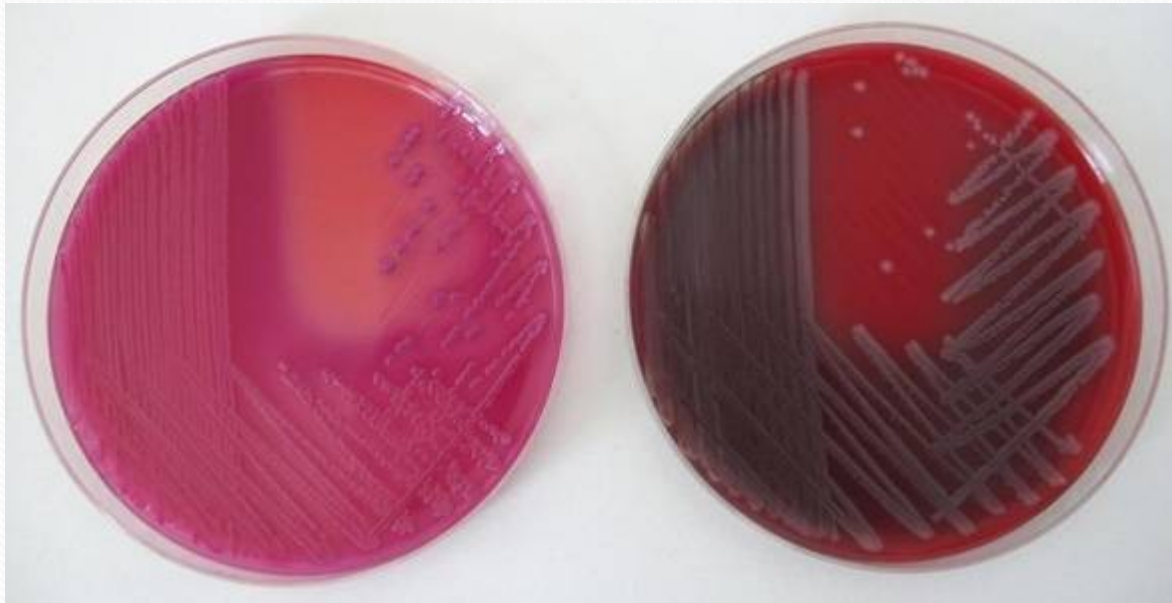


# Krevní agar – nárůst *S.aureus*





# McConkey agar a krevní agar nárůst *E.coli*



# Karmali agar - nárůst *Campylobacter* sp.

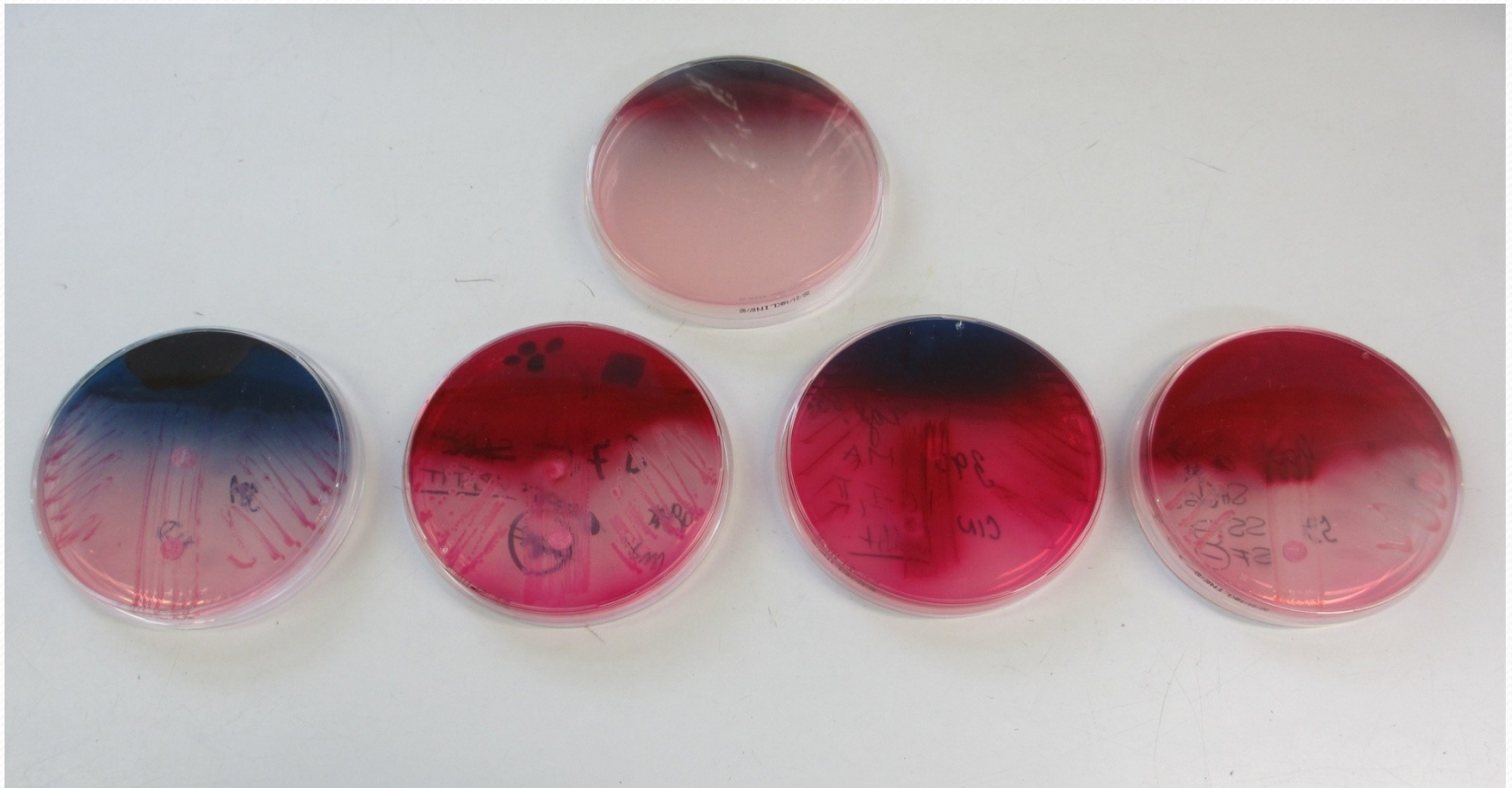


# Identifikace bakterií

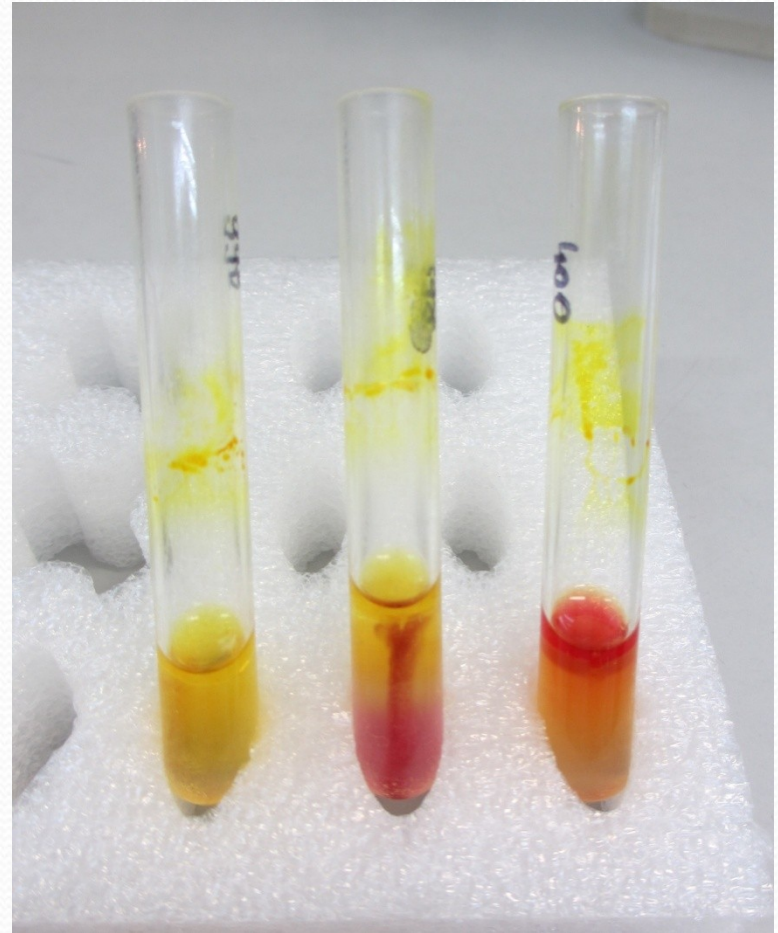
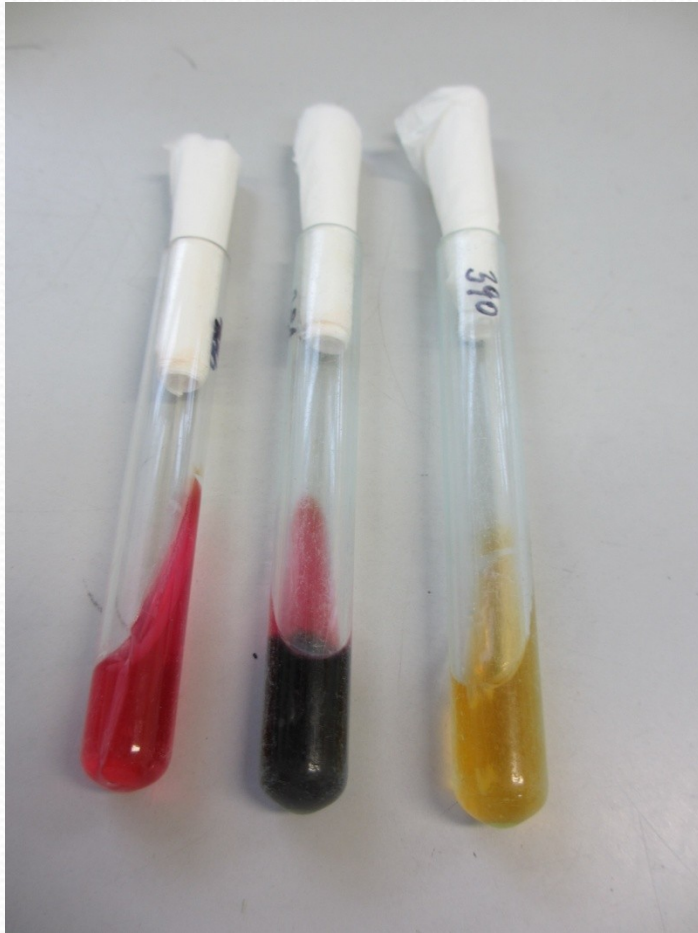
- Podle morfologie
- Podle růstových vlastností
- Hmotnostní spektrometrie – metoda MALDI TOF
- Podle biochemických vlastností
  - Selektivní půdy
  - Komerční diagnostické soupravy
- Podle antigenní struktury
  - Latexová aglutinace



# Biochemické určení bakterií

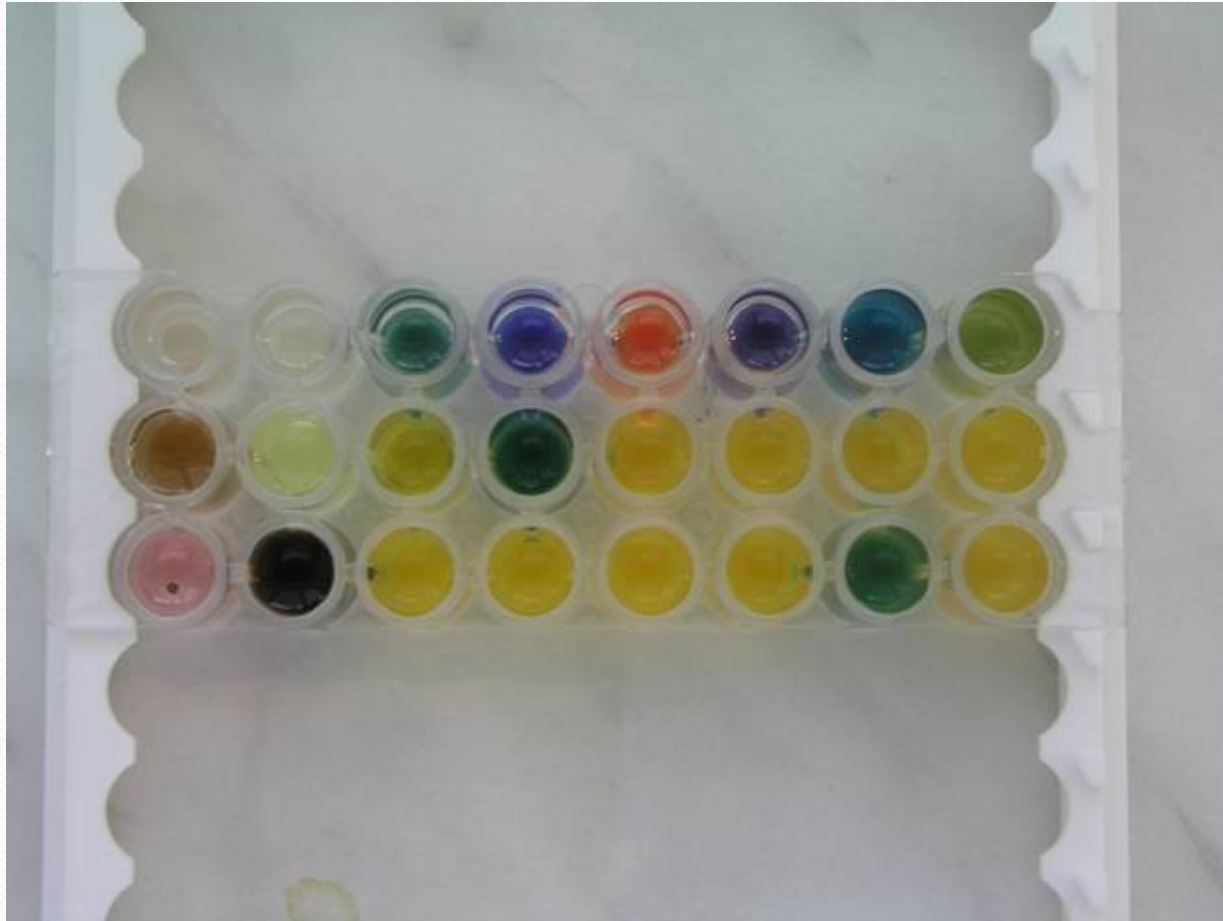


# Biochemické určení bakterií





# Biochemické určení bakterií

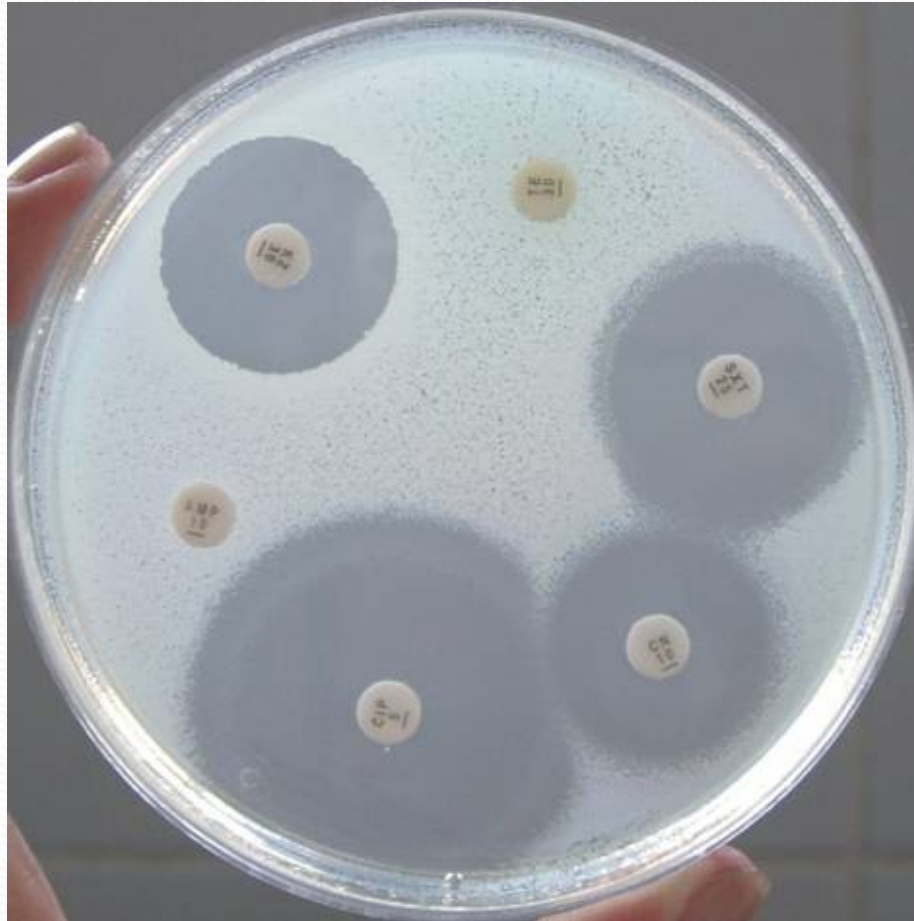




# Stanovení citlivosti na antibiotika

- Disková difúzní metoda
  - Difuze antibiotik z disků do půdy a zábrana růstu bakterií
- Diluční testy
  - Stanovení koncentrace antibiotika, která je ještě na mikroba účinná

# Disková difúzní metoda



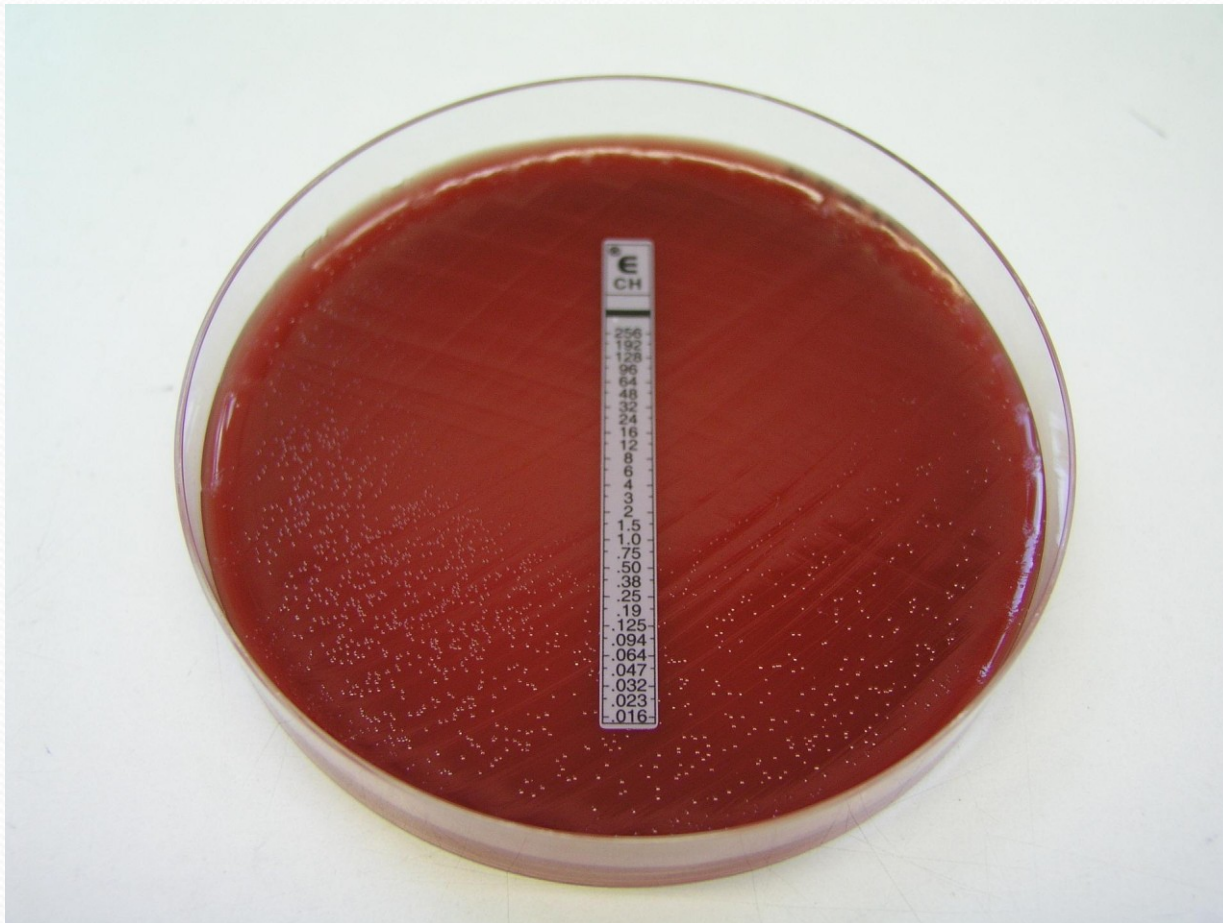


# Diluční metoda – mikrotitrační destičky





# Diluční metoda – E-test



# Průkaz antigenů z materiálu

- Latexová aglutinace

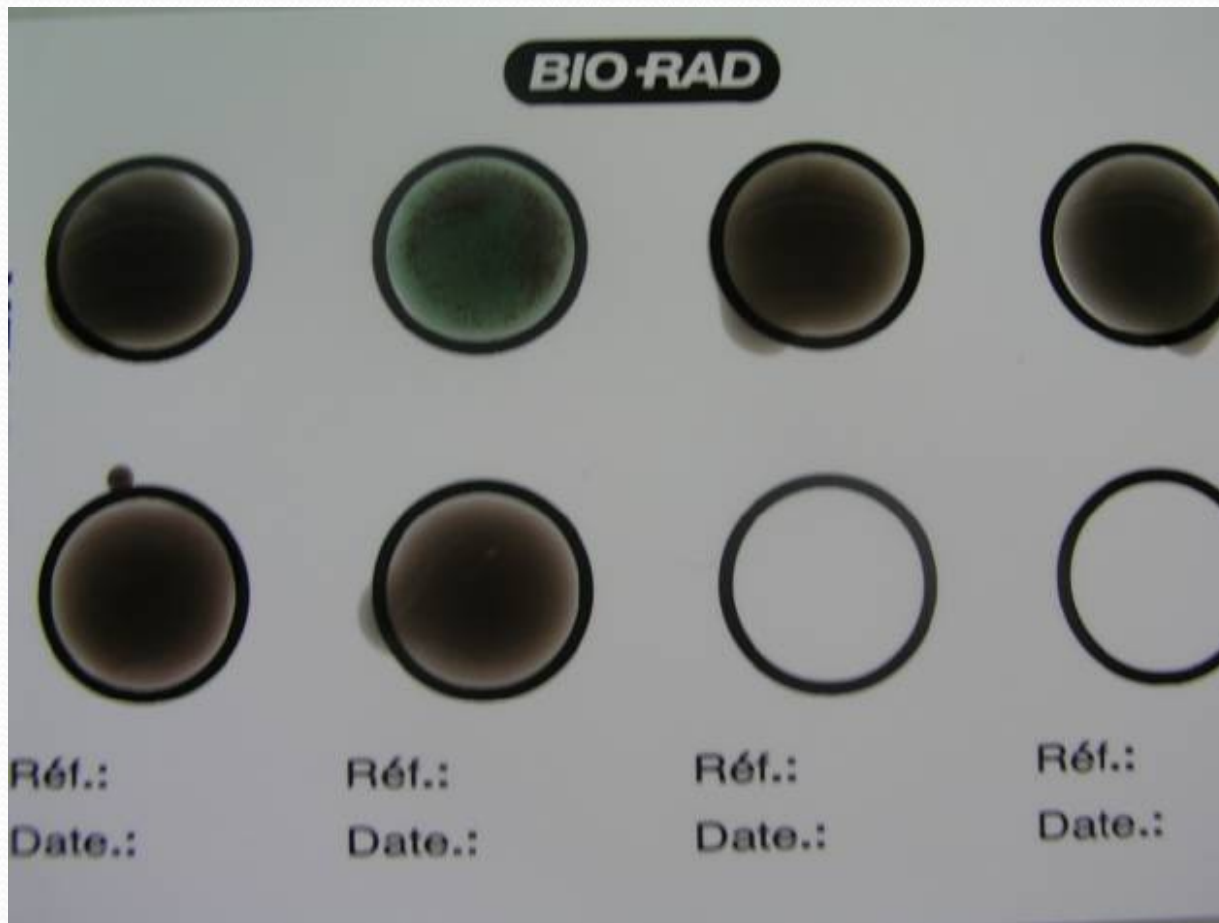
vyšetření likvoru, moče

- Imunochromatografie

vyšetření moče – *Legionella pneumophila*,  
*S. pneumoniae*

vyšetření stolice – *Clostridium difficile*, střevní  
viry, *Helicobacter pylori*

# Latexová aglutinace





# Průkaz metabolitů

- Těžko kultivovatelné bakterie
- Rychlý průkaz
  - Např. infekce *Helicobacter pylori*  
průkaz produkce ureázy

# Průkaz nukleových kyselin

- Průkaz přítomnosti mikroorganismu v klinickém vzorku
- Druhové identifikace izolovaného mikrobiálního kmene