

Vyšetřovací metody v bakteriologii

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

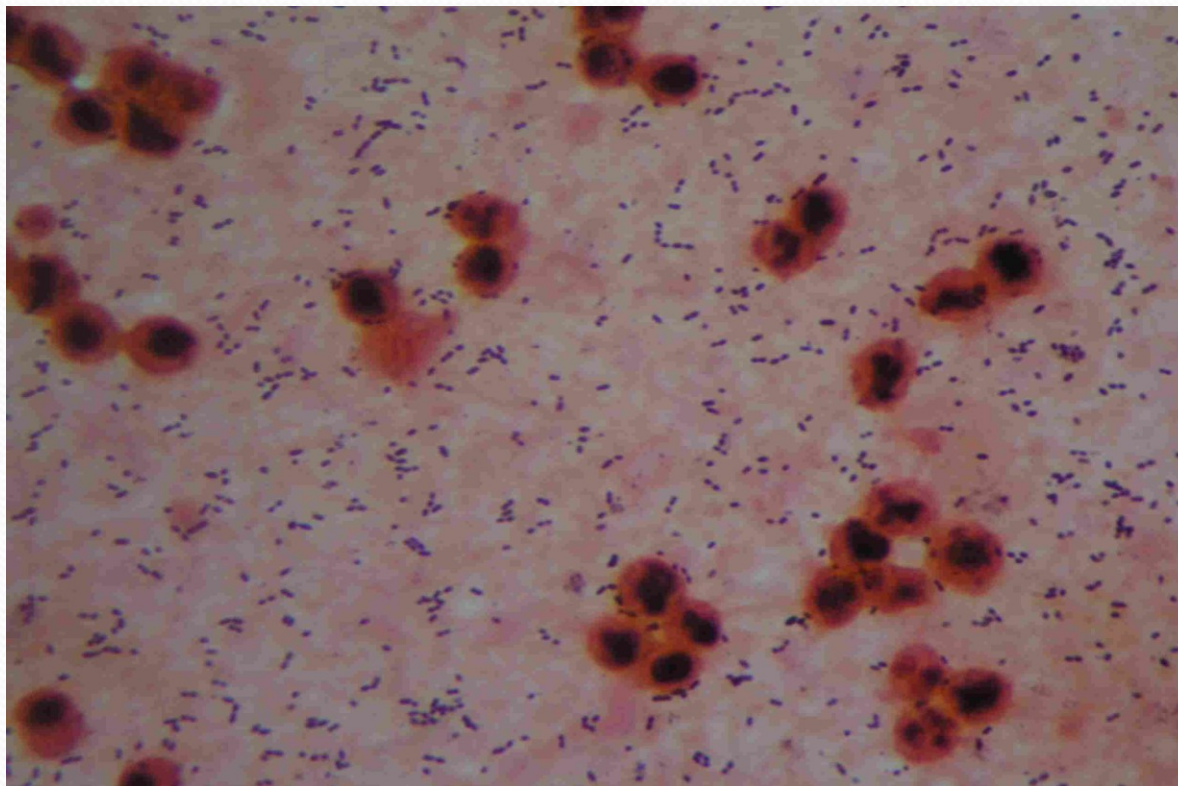
- Barvitelnost podle složení buněčné stěny
- Fixace plamenem nebo metanolem
- Postup barvení:
 - Krystalová violet – 20 s
 - Lugolův roztok – 20 s
 - Oplach vodou
 - Odbarvení acetonalkoholem – 10 s
 - Safranin – 1 min

Barvení podle Grama

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

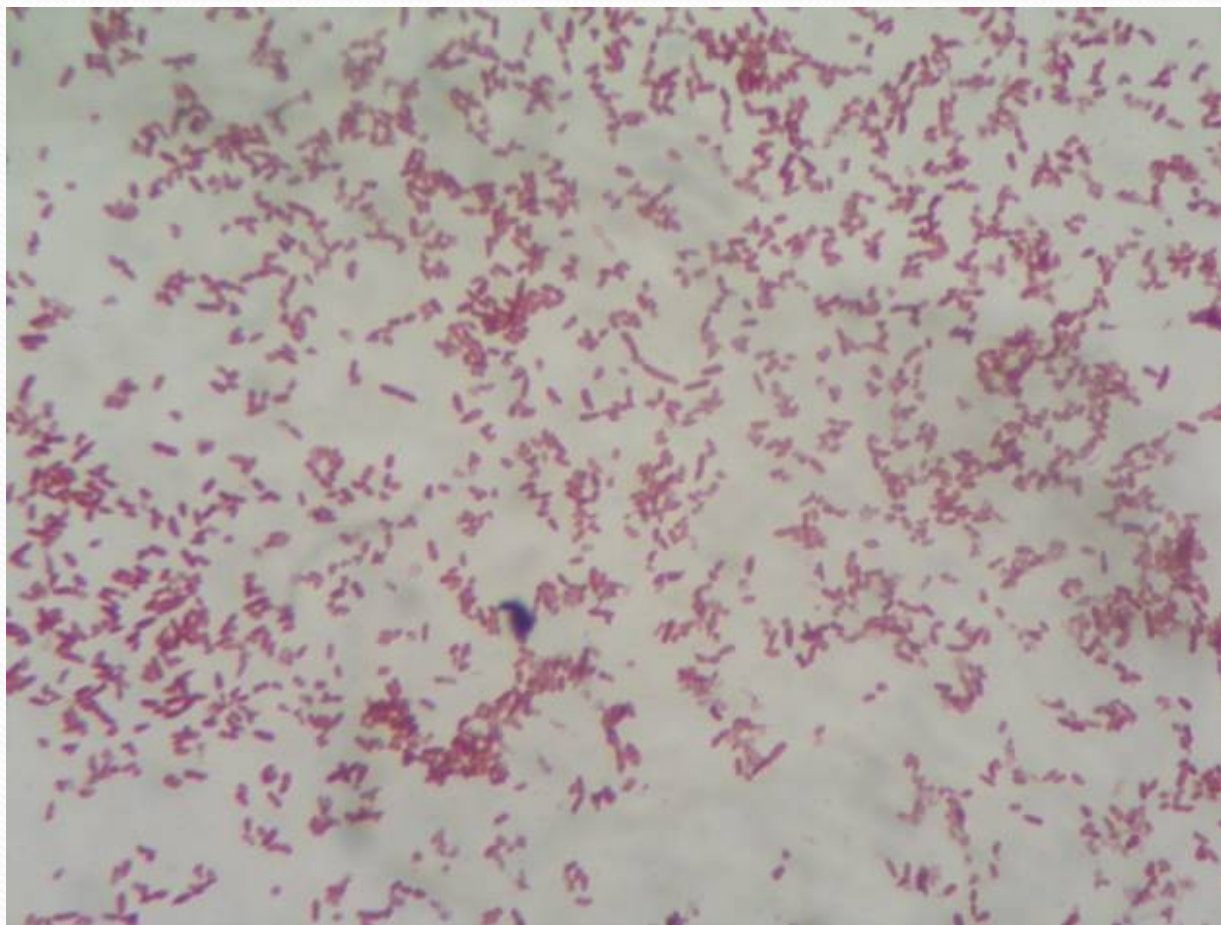
Barvení podle Grama

Grampozitivní



Barvení podle Grama

Gramnegativní



Barvení podle Grama

Význam

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

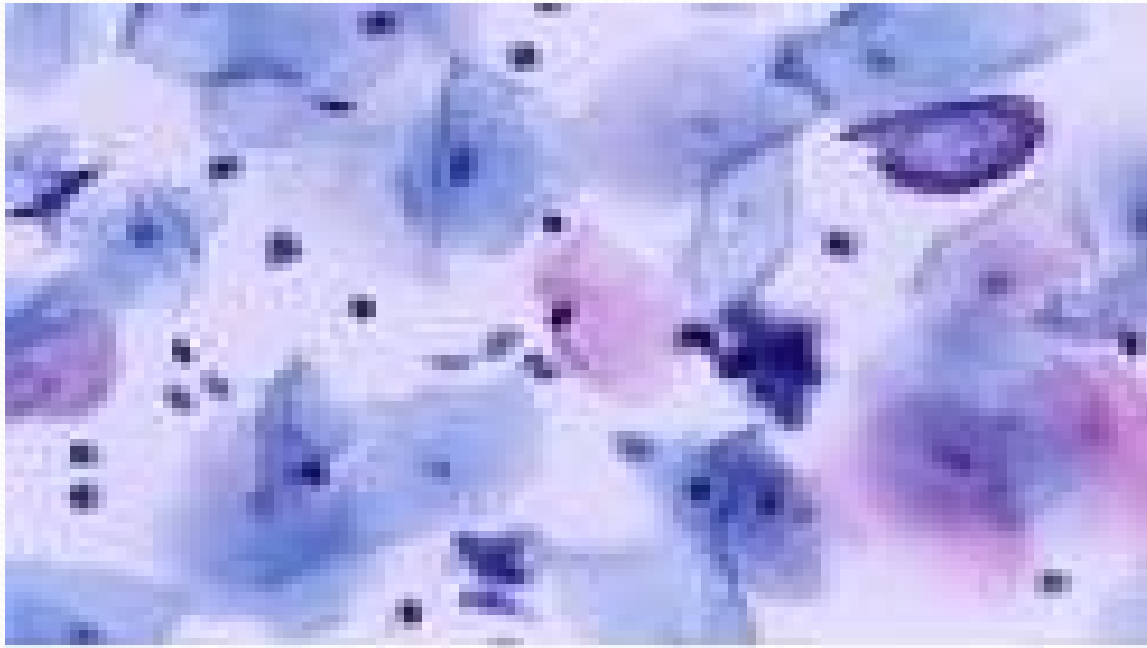
Barvení podle Giemsy

- 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



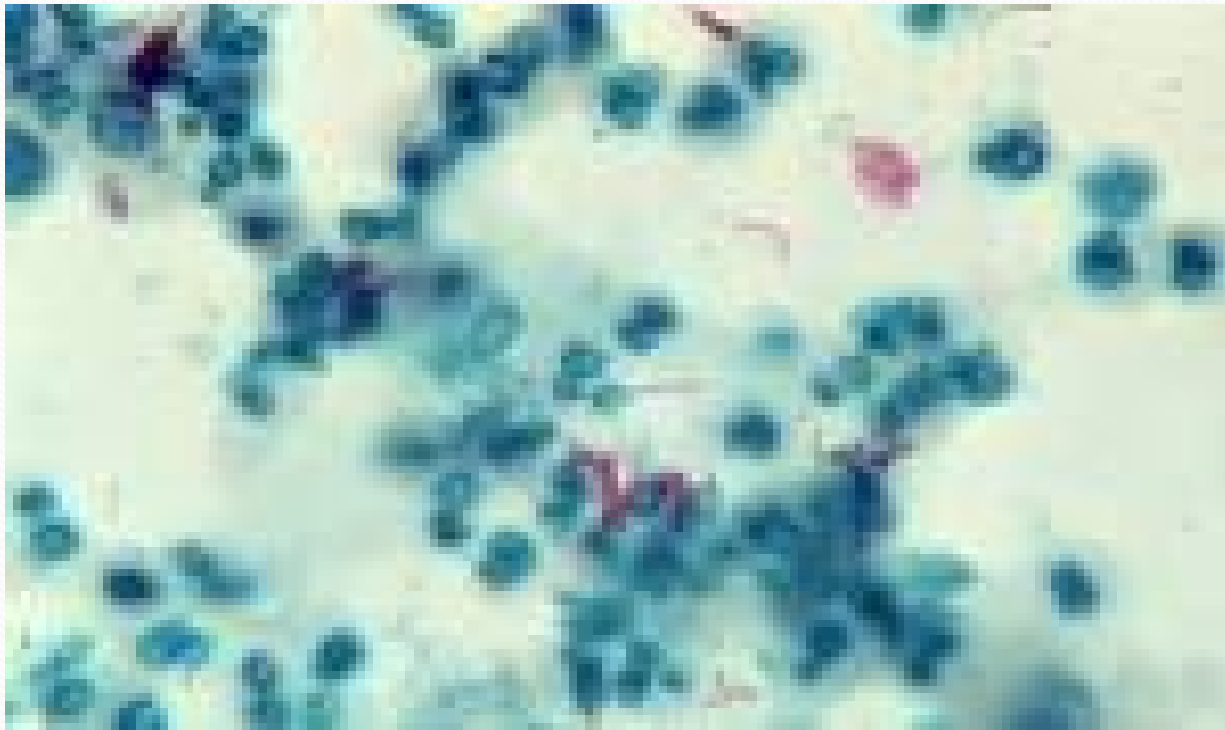
Barvení podle Ziehl - Nielsena

- 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

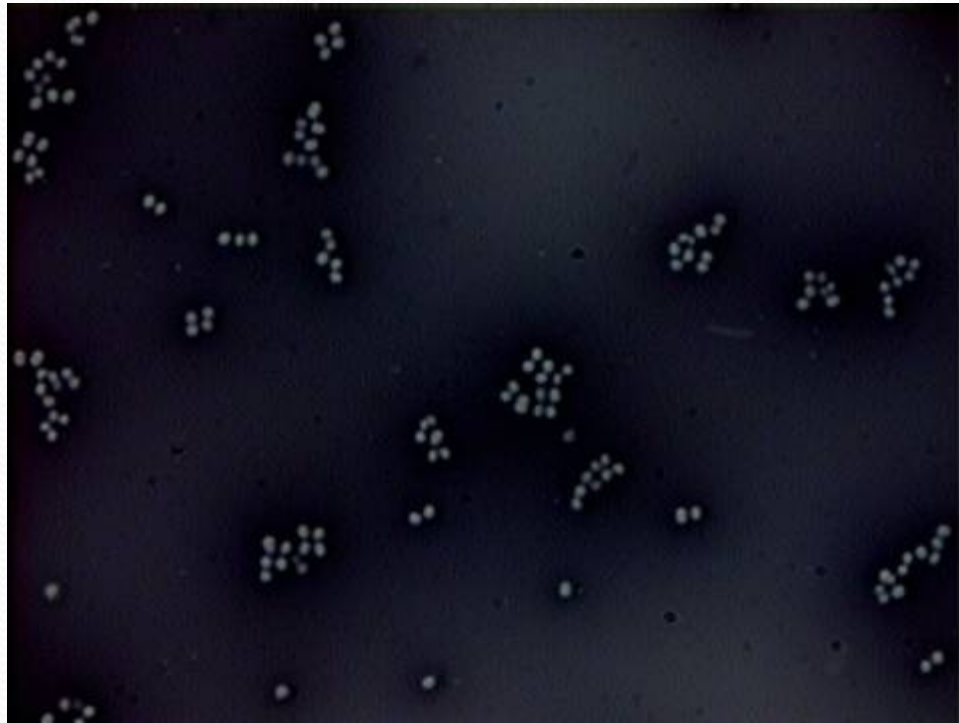
Barvení podle Ziehl - Nielsena



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

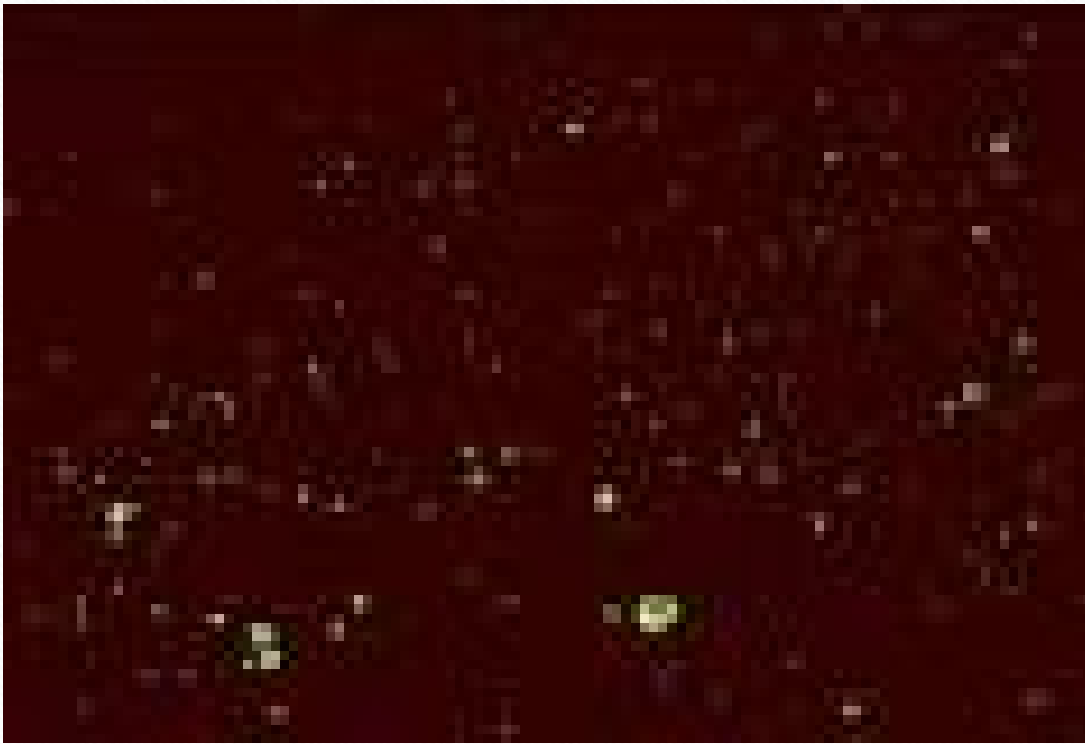


Fluorescenční barvení

Pomocí fluoreskujícího barviva

- Imunofluorescence
 - 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 CO₂



Kultivační půdy

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

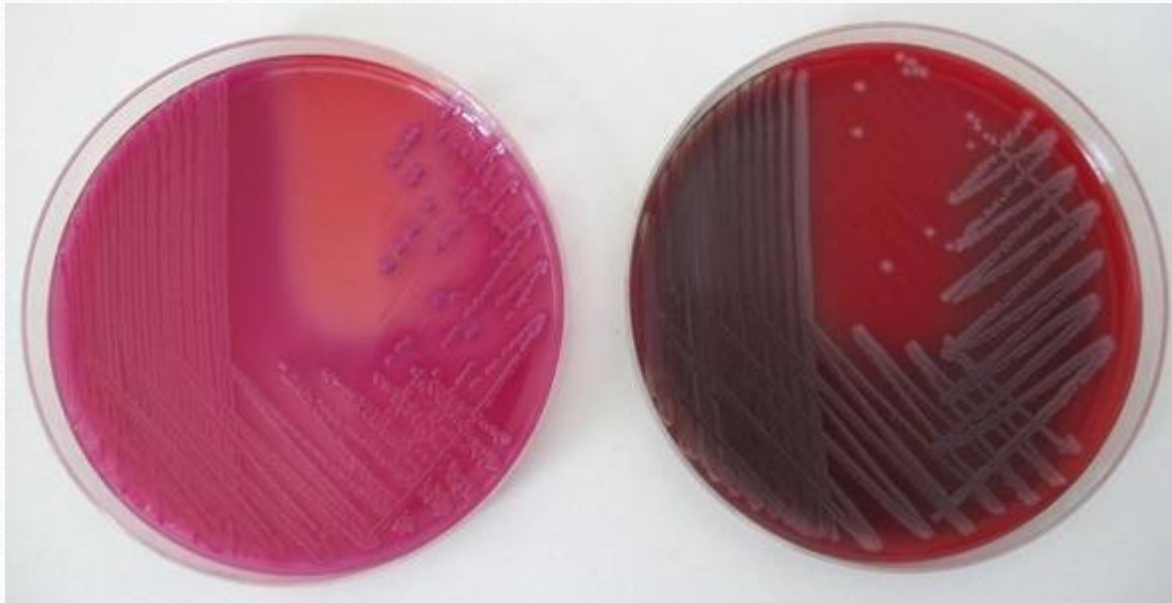
Pomnožovací bujóny



Krevní agar – nárůst *S.aureus*



McConkey agar a krevní agar nárůst *E.coli*



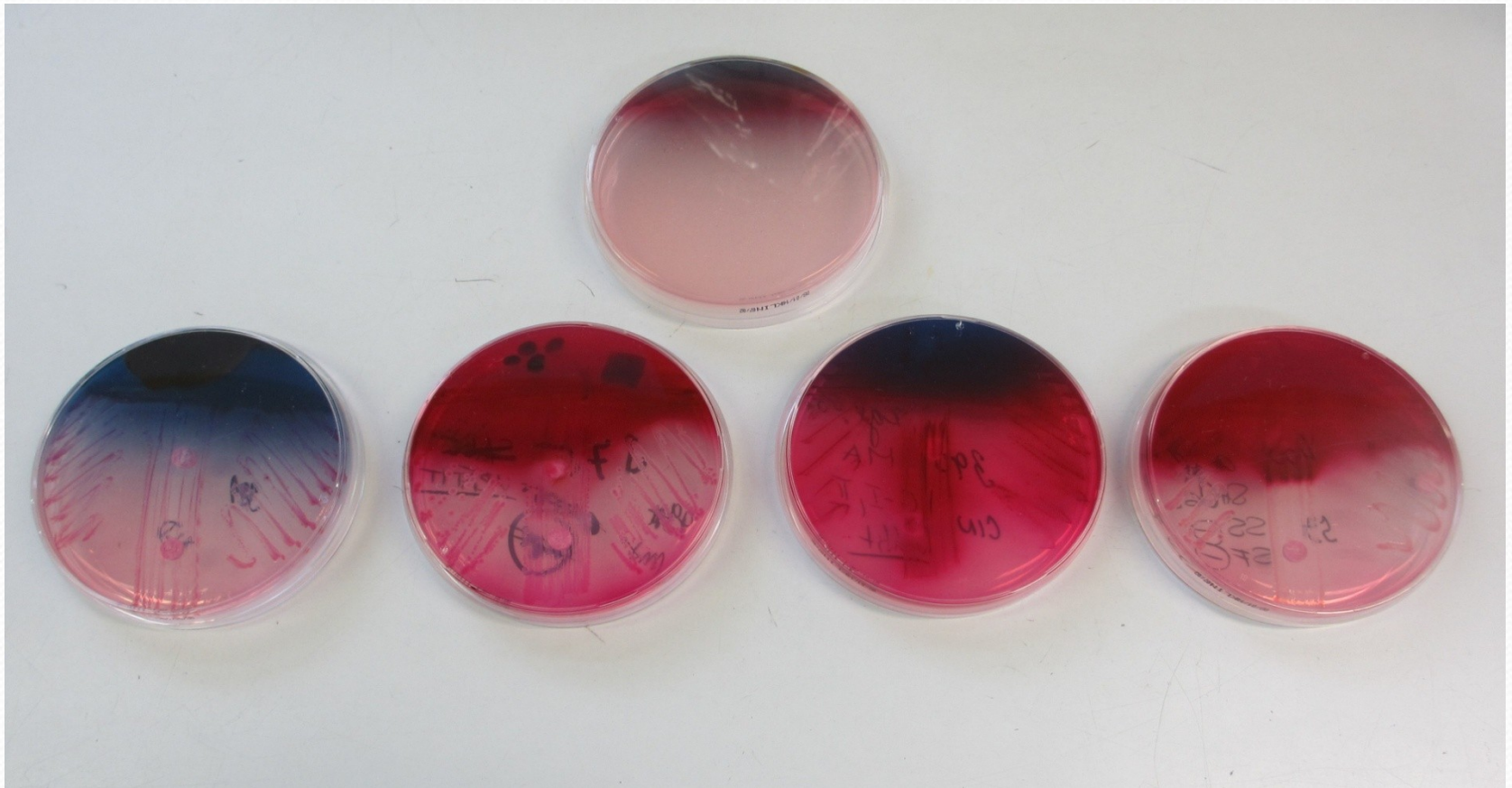
Karmali agar - nárůst *Campylobacter* sp.



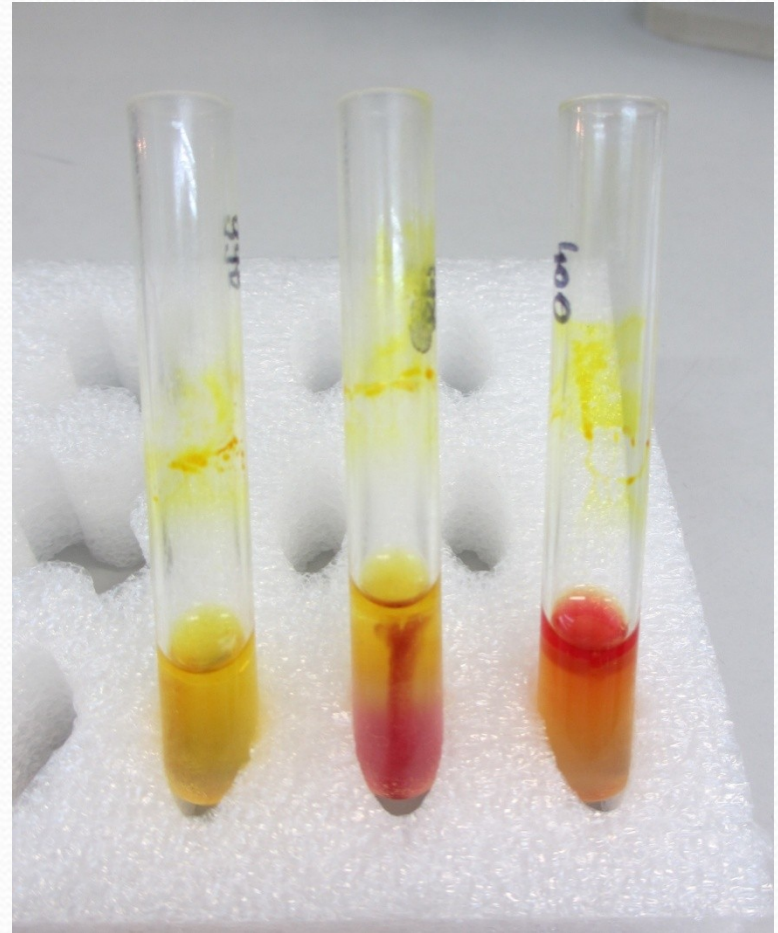
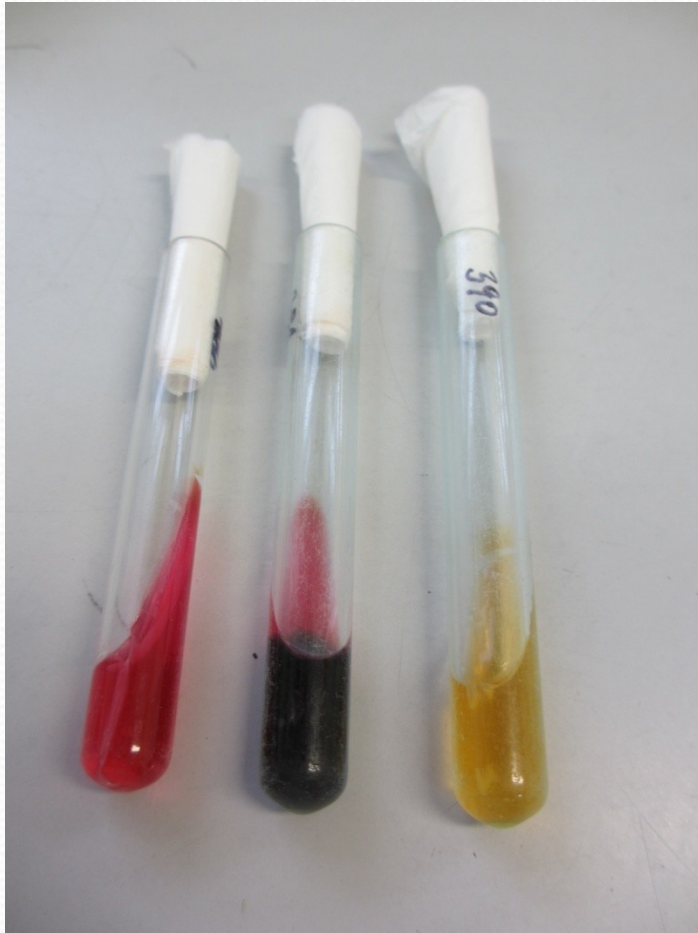
Identifikace bakterií

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

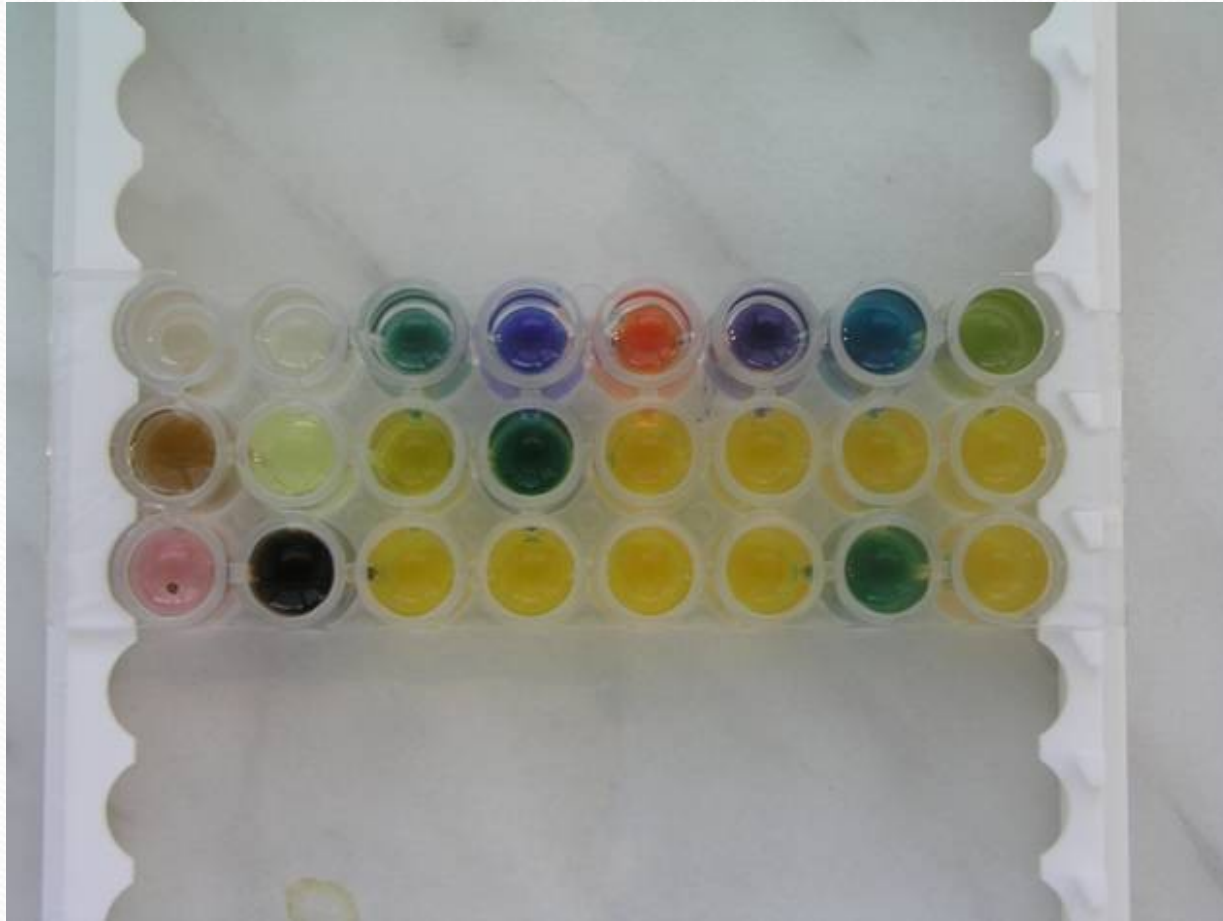
Biochemické určení bakterií



Biochemické určení bakterií



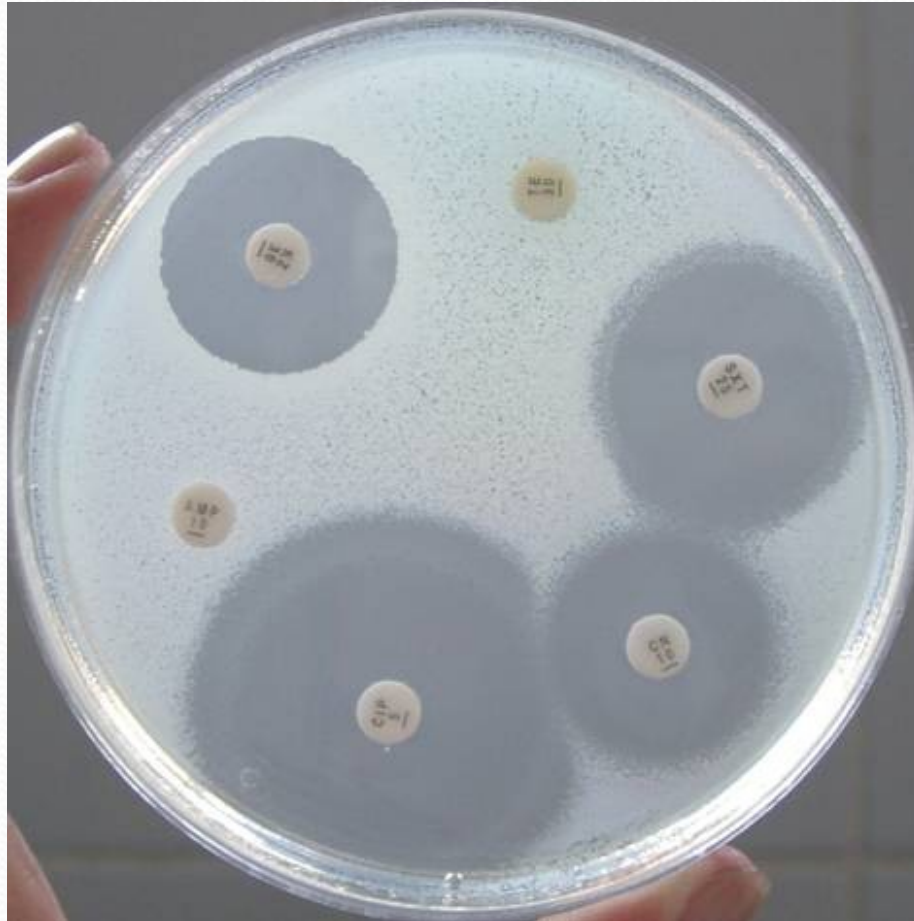
Biochemické určení bakterií



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

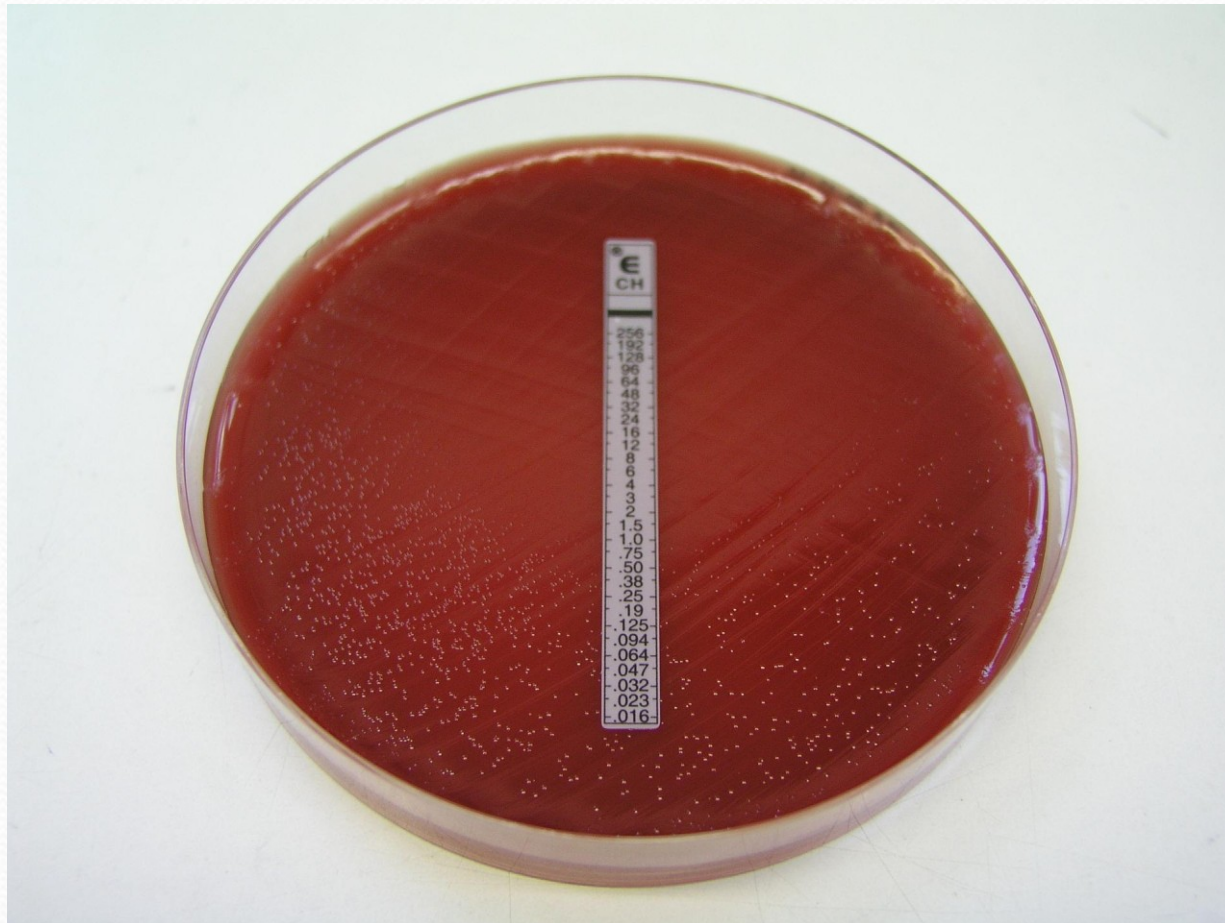
Disková difúzní metoda



Diluční metoda – mikrotitrační destičky



Diluční metoda – E-test



Průkaz antigenů z materiálu

- Latexová aglutinace

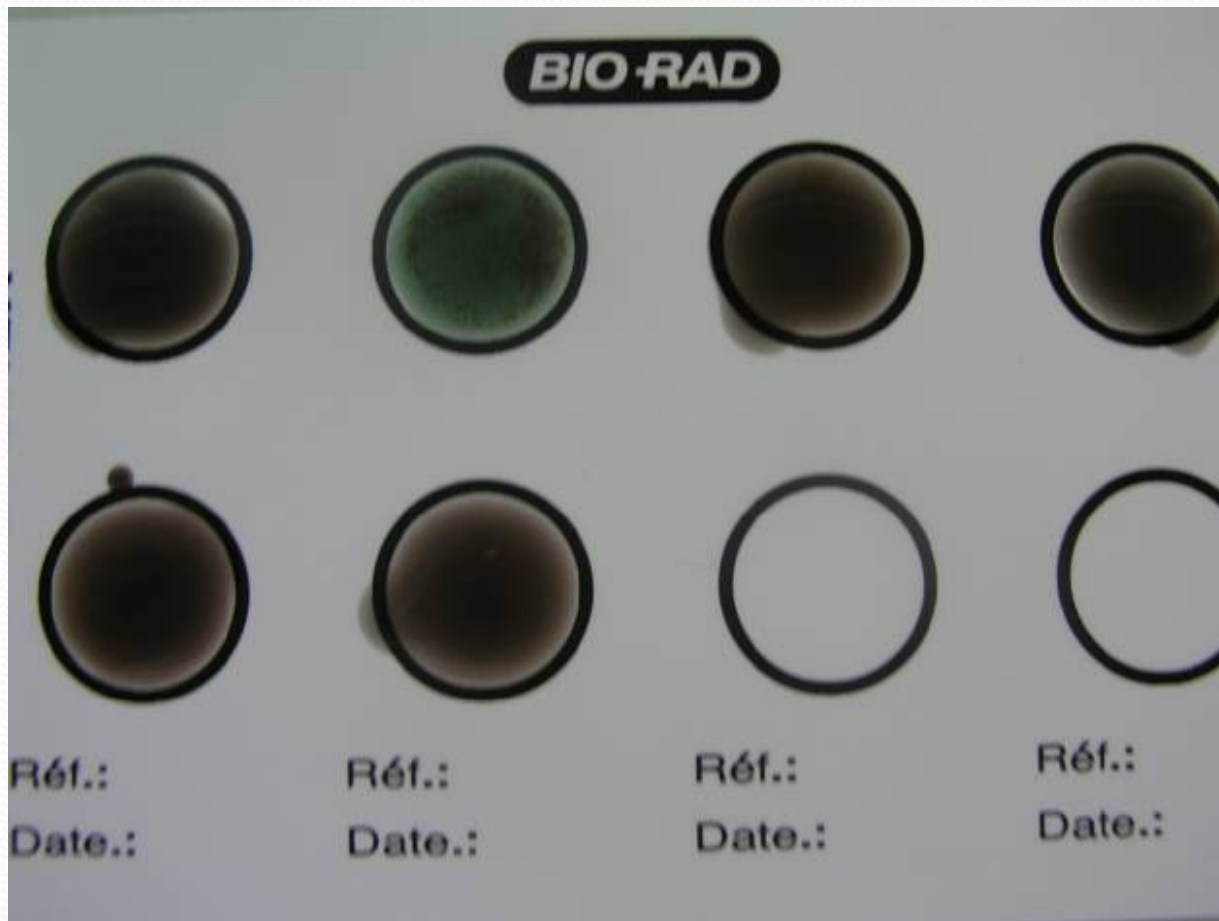
vyšetření likvoru, moče

- 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