



*Corynebacterium
diphtheriae*

Kresbu vytvořil

as. MUDr. Petr Ondrovčík, CSc.,
kterého zde již nenajdete, neboť
je v invalidním důchodu.

**Vítejte na
mikrobiologickém
ústavu!**

Pátráme po mikrobech
Díl I.

Úvod do diagnostiky mikrobů
Mikroskopie mikrobů I

Ondřej Zahradníček

K praktickému cvičení pro VLLM0421c

Kontakty na mne:

777 031 969

zahradnicek@fnusa.cz

ICQ 242-234-100

Pohádka

- Sešel se jednou **vlk**, **medvěd** a **virus HIV**. **Vlk** povídá: Chtěl jsem zakousnout člověka, ale on měl pušku, a tou by mě byl zastřelil. Tak tak, že jsem utekl. Ale ty, medvěde jsi větší, třeba by sis poradil.
- **Medvěd** zavrtěl hlavou: Kdepak, člověk má silné pušky, kterými snadno zabije i mě.
- Vtom se zachechtalo něco, co ani nebylo vidět. Ale já ho dostanu, uvidíte!

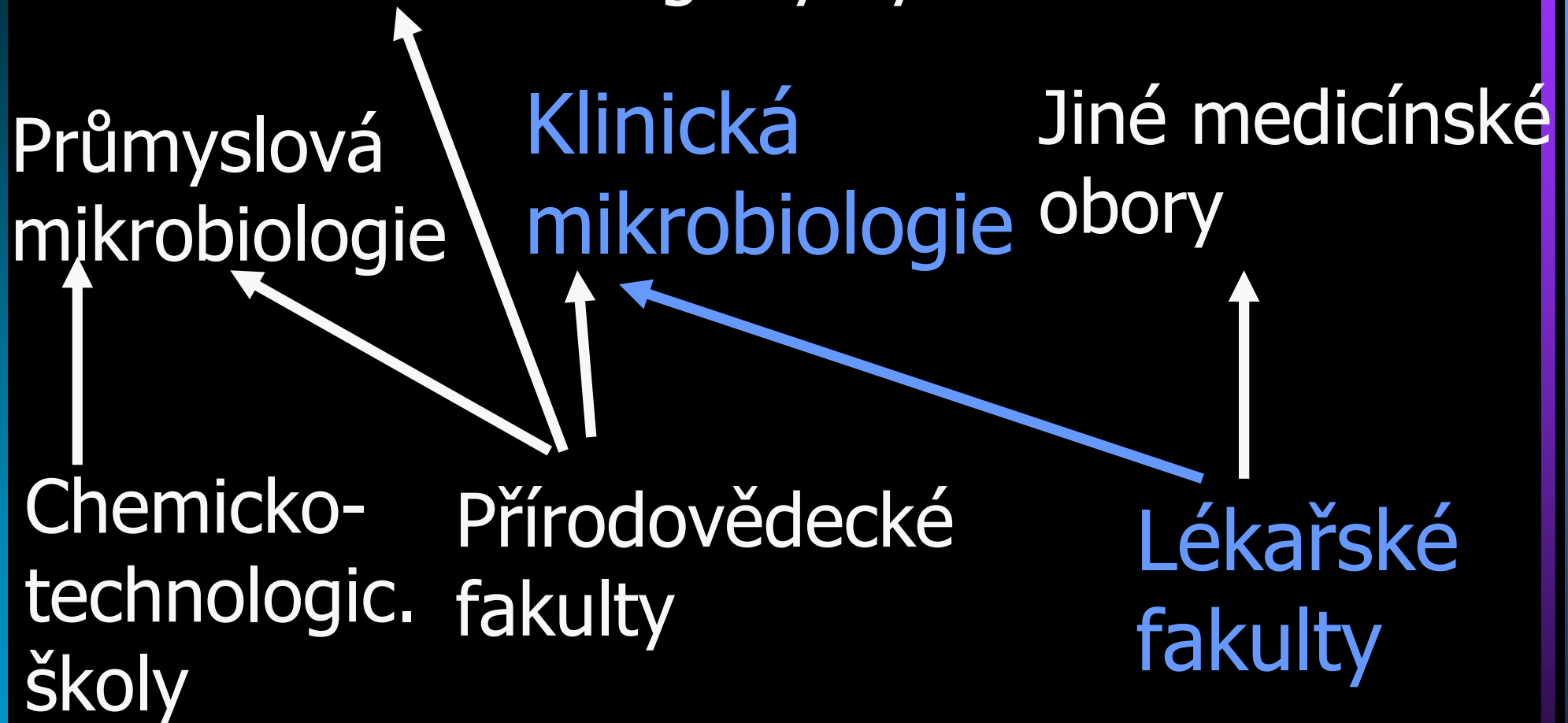
Byl to virus HIV...

Abych se představil

- MUDr. Ondřej Zahradníček
- povolání: **klinický mikrobiolog**, asistent
- **učím mediky** a zkouším praktika
- kromě studentů všeobecného lékařství u nás učíme i **zubaře, bakalářské obory** (všeobecná sestra, porodní asistentka, zdravotní laborant) a studenty z **přírodovědecké fakulty**

Jak se k tomu člověk dostane

Základní mikrobiologický výzkum



Moje cesta je ta modrá.

Než doopravdy začneme

- **Šatní skříňky pro studenty** jsou 1., 2. a 4. od okna. **Nepoužívejte 3. skříňku, i kdyby byla otevřená.** Je to skříňka studentů střední zdravotnické školy.
- **Klíče od šatních skříňek** nechávejte vždy na stolku vedle klávesnice počítače
- **Nad tímto stolkem** vždy visí klíček od WC. Když si ho půjčíte, vždy ho tam vraťte.
- **Vstup studentů do prostor ústavu za praktikárnou je zakázán.**

Bezpečnost práce – úkol č. 1

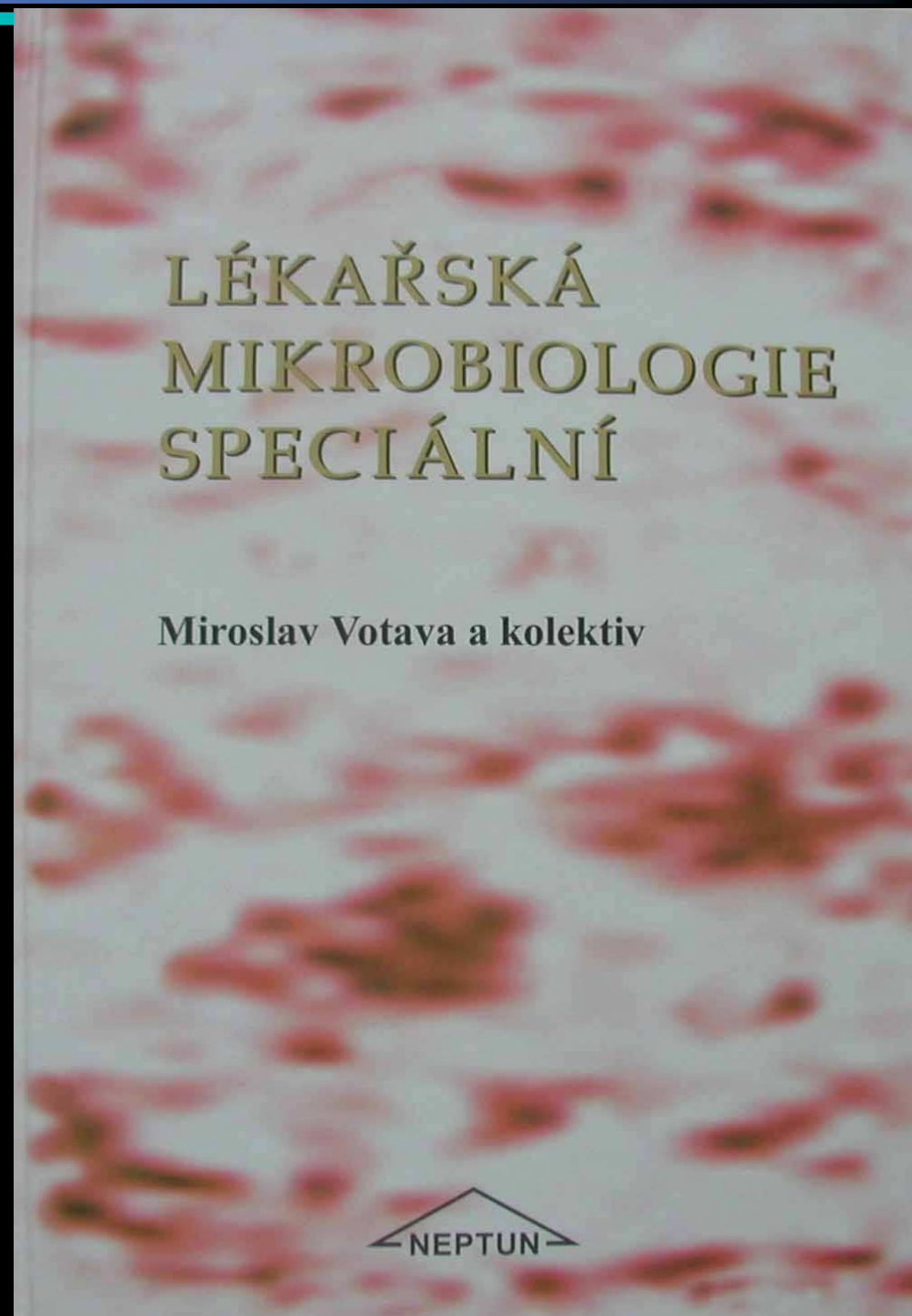
- **Hlavní rizika práce v laboratoři** jsou riziko požáru a riziko infekce
- V laboratoři je **zakázáno jíst, pít a kouřit**
- Studenti jsou povinni **používat pláště**, a to **pouze ústavní (nikoli svoje)** pláště
- Studenti **dělají jen to, co mají** podle protokolů a pokynu asistenta

Literatura

- Bezpodmínečně potřebujete **Protokoly k praktickým cvičením** (Neptun)
- Časem budete potřebovat **Lékařskou mikrobiologii obecnou** a **Lékařskou mikrobiologii speciální**
- Hodí se i **Lékařská mikrobiologie II – vyšetřovací metody**

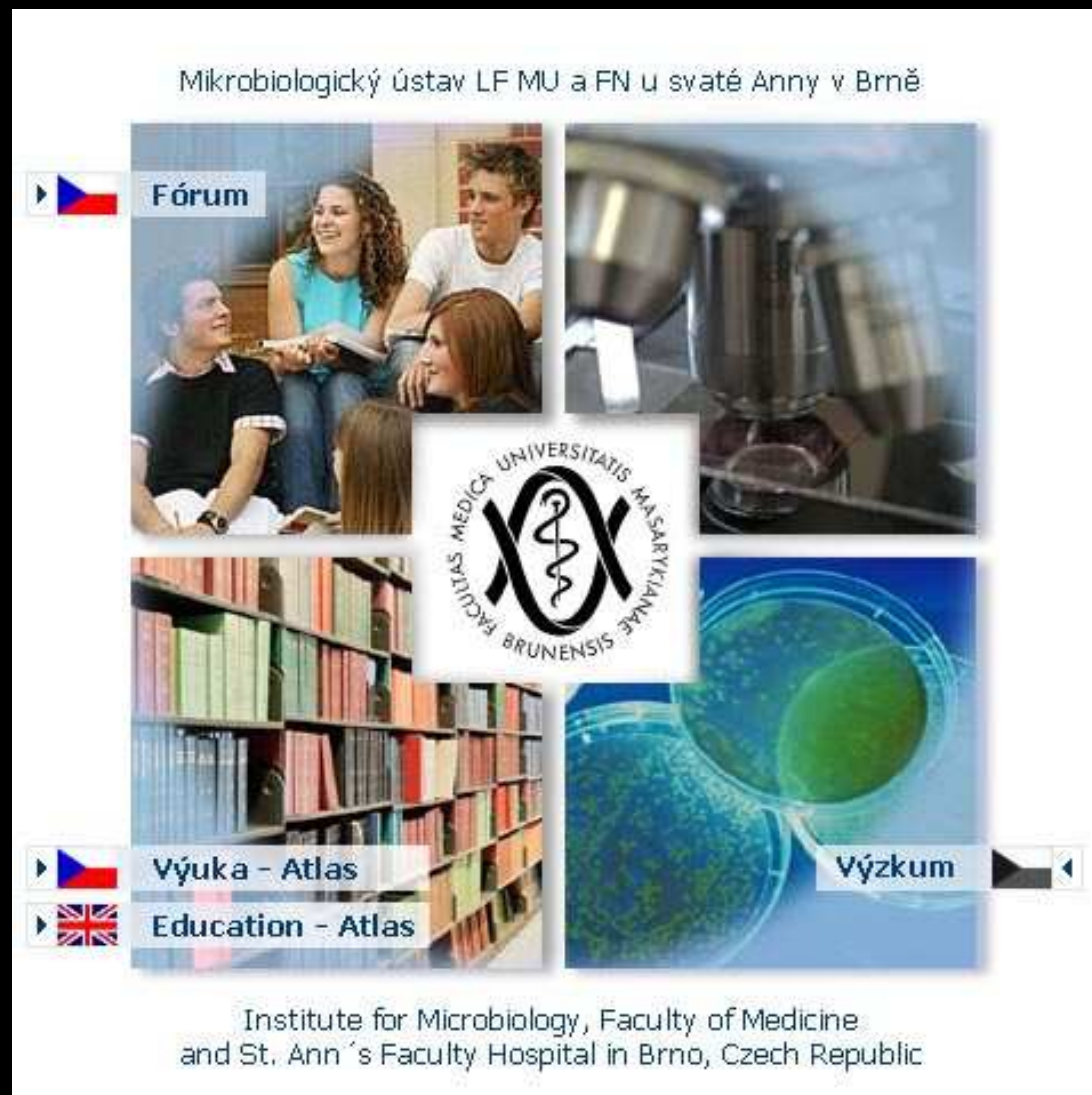
Učebnice Lékařská
mikrobiologie
speciální (obecná
je tenčí a modrá)

Foto: archiv MÚ





(Nejen)výukové stránky ústavu: www.medmicro.info


Mikrobiologický ústav LF MU a FN u svaté Anny v Brně



The screenshot displays a website interface with a central collage of images. The collage includes: a group of students in a classroom setting; laboratory glassware and equipment; a bookshelf filled with books; a petri dish with a green bacterial culture; and the official logo of the Faculty of Medicine at Masaryk University in Brno, which features a caduceus and the Latin text 'FACULTAS MEDICA UNIVERSITATIS MASARYKIANAE BRUNENSIS'. Navigation menus are located on the left and right sides of the collage. The left menu includes a Czech flag icon and the text 'Fórum', 'Výuka - Atlas', and 'Education - Atlas'. The right menu includes a 'Výzkum' button with a right-pointing arrow.

►  Fórum

►  Výuka - Atlas

►  Education - Atlas

Výzkum ►

Institute for Microbiology, Faculty of Medicine
and St. Ann's Faculty Hospital in Brno, Czech Republic

Foto: archiv MÚ

Přítomnost v praktiku

- Účast v praktiku by měla být **pokud možno stoprocentní**
- Ojedinelé absence (jedna až dvě) jsou tolerovatelné, pokud jsou **předem domluvené** nebo **dodatečně omluvené**
- Kromě přítomnosti v praktiku bude ještě podmínkou zápočtu **zápočtový test** či jiná forma prokázání bdělosti

Další pokyny

- **Obrázky opravdu kreslete** (nakreslete koky, nepište „vidím koky“)
- **Obrázky kreslete barevně**, noste pastelky
- **Kreslete to, co vidíte** (pokud vám koky v mikroskopu splývají, kreslete je splývající)
- **Pokud nevidíte to, co máte vidět**, upozorněte asistenta
- **Protokoly jsou kontrolovány u zkoušky a mají vliv na výslednou známku!**

Důkaz, že na protokoly se opravdu hledí

Semestr: jarní

Započteno: 22.5.2006

Vyučující: [signature]

Poznámky: 8/8

Semestr: podzimní

Započteno: 22.12.2006

Vyučující: [signature]

Poznámky: 12/12

Zkouška dne: 14.2.2004

Termín: řádný

| Otázka | Dílčí známka |
|--|-------------------------|
| Praktikum Určete, kdo pán to endokrinolog. | B |
| A: Makroskopie a histologie | A |
| B: Cl. difficile | A-B |
| C: Alfabetický seznam | A |
| Protokoly: + (velmi pěkné!) | |
| Výsledek: výborně (A) | Examínátor: [signature] |

Když je řeč o kartě: kartu si vyplňte podle vzoru

MIKROBIOLOGICKÝ ÚSTAV LF MU, PEKAŘSKÁ 53, 656 91 BRNO

Rok: 2007/08 Stud. sk.: 1.

Směr: všeob. - stom. - ošetř. - Bb - BMB

JMÉNO A PŘÍJMENÍ: Escherichia coli

Státní příslušnost:
(u zahraničních studentů) u slovenských není potřeba

Trvalé bydliště:
(včetně PSČ) STAFYLOKOKOVÁ 4, 123 45 CHŘIPKOV Tel.: 567 890 123

Přechodné bydliště:
(včetně PSČ) BRIT ŽURKOV 5; 617 00 BRNO Tel.: 765 432 109

e-mail: především používáte-li jiný než ISový

Koky v mikroskopu opravdu splývají



©Dr. med. T. Pietzcker, Ulm

Zařazení našeho oboru

Molekulární
biologie a
genetika

Mikrobiologie
rostlin

Infekční
lékařství

Obecná
mikrobiologie

**Humánní
klinická
mikrobiologie**

Epidemiologie
infekčních
nemocí

Buněčná
biologie

Veterinární
klinická
mikrobiologie

Dermato-
venerologie

Co je to mikrob

- **Musí to být živé.** Zrníčko prachu není mikrob, i když je mikroskopické
- **Musí to být mikroskopické.** Žirafa není mikrob, i když je živá

Z druhé podmínky se připouštějí výjimky. Třeba tasemnice patří do mikrobiologie přesto, že mohou mít deset metrů. Ale jejich vajíčka jsou mikroskopická.

Co jsou všechno mikroby

- Mikroby jsou tedy například **mikroskopické řasy a sinice, archea** (dříve archeobaktérie), různé organismy schopné vydržet hluboko **pod mořem** nebo v extrémních podmínkách **horkých pramenů**
- Jako klinického mikrobiologa mne tyto mikroby neživí, přesto musím uvést, že jsou zajímavé a úžasné

Co tyhle mikroby umí

- Přežívají v moři **v hloubce** 10 km
- Přežijí i **teploty** kolem 110 stupňů Celsia
- Vydrží značnou **radioaktivitu**
- Jsou schopny místo kyslíku „dýchat“ síru či dusík (zkrátka, mají jiný akceptor elektronů než atom kyslíku)
- Mnoho věcí ovšem umějí i mikroby lékařsky významné, jak si povíme dále

[www.meningitis.de/erreger/
meningokokken.html](http://www.meningitis.de/erreger/meningokokken.html)

Neisserie



Třídění živých organismů

- **Priony** – *neobsahují DNA, většinou se vůbec nepovažují za živé organismy*
- **Viry a bakteriofágy**
- **Buněčné organismy**
 - **Archea** (archeobakterie)
 - **Eubacteria** (eubakterie)
 - **Eucarya** (eukaryotní organismy)
 - jednobuněčné
 - mnohobuněčné

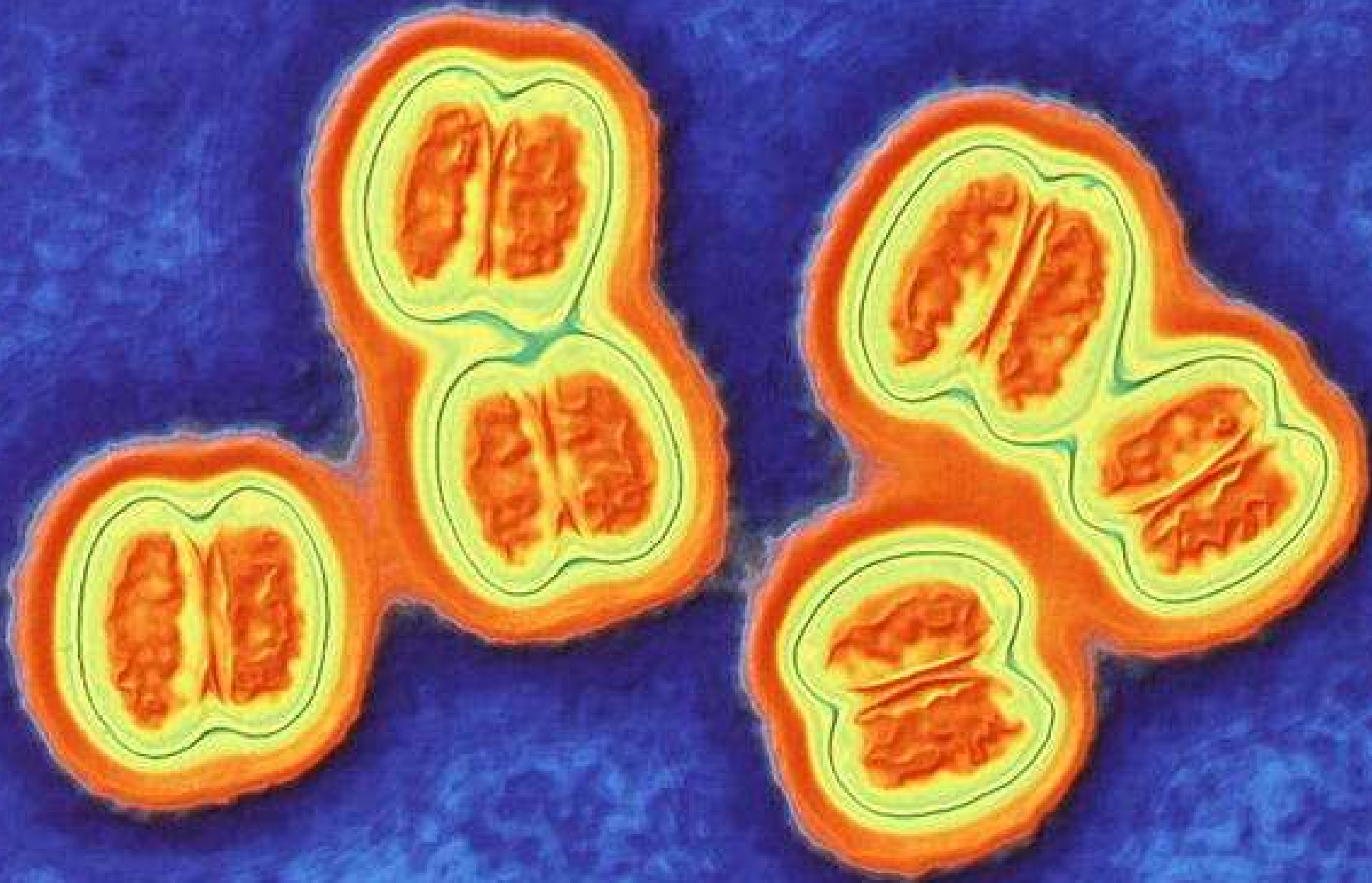
Klinicky významné mikroby 1

- Klinicky významné mikroby jsou takové, které jsou **významné pro lidské tělo** (ne tedy pro člověka = tvůrce, ale pro člověka = objekt)
- „Významné pro tělo“ ani zdaleka není totéž jako „tělu škodlivé“. Naopak, **mnohé jsou neškodné, nebo dokonce pomáhají**

Klinicky významné mikroby 2

- **Každý organismus má své klinicky významné mikroby:** člověk, každý druh zvířete či rostliny.
- Dokonce i některé mikroby (třeba bakterie) mají své mikroby (bakteriofágy).

Neisseria gonorrhoeae



http://medicine.plosjournals.org/archive/1549-1676/2/1/figure/10.1371_journal.pmed.0020024.g001-M.jpg

Hlavní klinicky významné mikroby

- **Viry** (a priony)
- **Bakterie** (třeba streptokok nebo *Escherichia*)
- **Houby** (kvasinky a plísně)
- **Paraziti** – přesahují pojem mikrob:
 - **Vnitřní paraziti**
 - **Prvoci** (třeba původce malárie)
 - **Motolice** (třeba motolice jaterní)
 - **Hlístice** (třeba roup nebo škrkavka)
 - **Tasemnice** (třeba tasemnice dlouhočlenná)
 - **Vnější paraziti** (vši, blechy, štěnice)

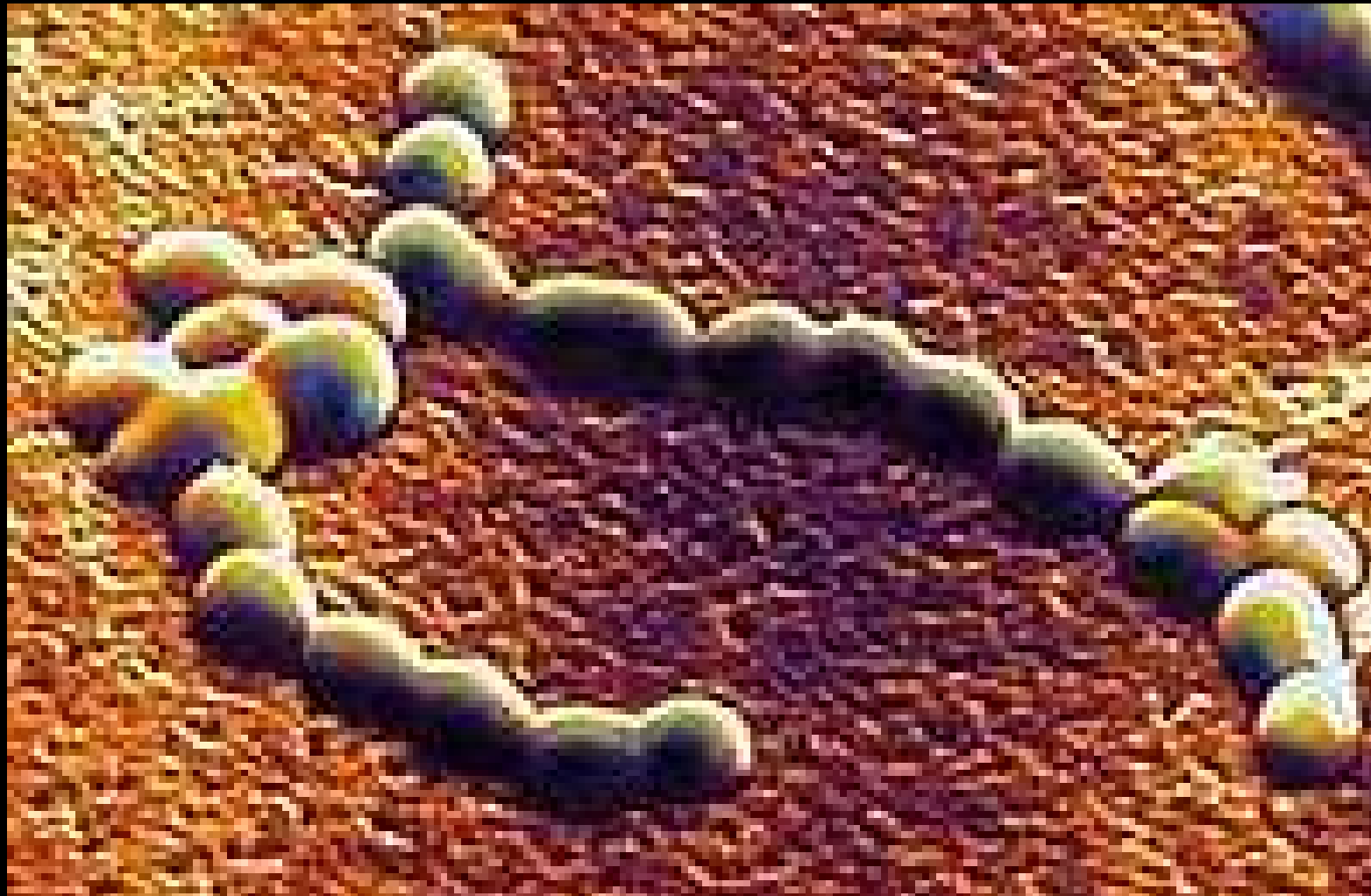
Morfologie vybraných klinicky významných mikroorganismů

- **Viry, vláknité houby** a **parazitiy** zatím ponechme stranou
- **Kvasinky** jsou vejčité buňky, dlouhé kolem deseti mikrometrů, někdy pučící, někdy tvořící vlákna – pseudomycelia
- **Bakterie** najdete na další stránce

Morfologie bakterií

- **Koky** ve dvojicích (diplokoky), v řetězcích a ve shlucích (neříkejme raději „streptokoky“ a „stafylokoky“, bylo by to matoucí)
- **Tyčinky** rovné či zahnuté (vibria), případně několikrát zahnuté (spirily), krátké nebo dlouhé, tvořící až vlákna či rozvětvená vlákna; konce mohou být oblé či špičaté a i tyčinky mohou být různě uspořádané
- **Kokobacily** (někdo říká i kokotyčinky)
- **Spirochety** – tenké spirálovité bakterie
- **Beztvaré bakterie**, například mykoplasmata (nemají buněčnou stěnu, takže nemají tvar)

Koky v řetízcích (elektronová mikrofotografie *Enterococcus* sp.)



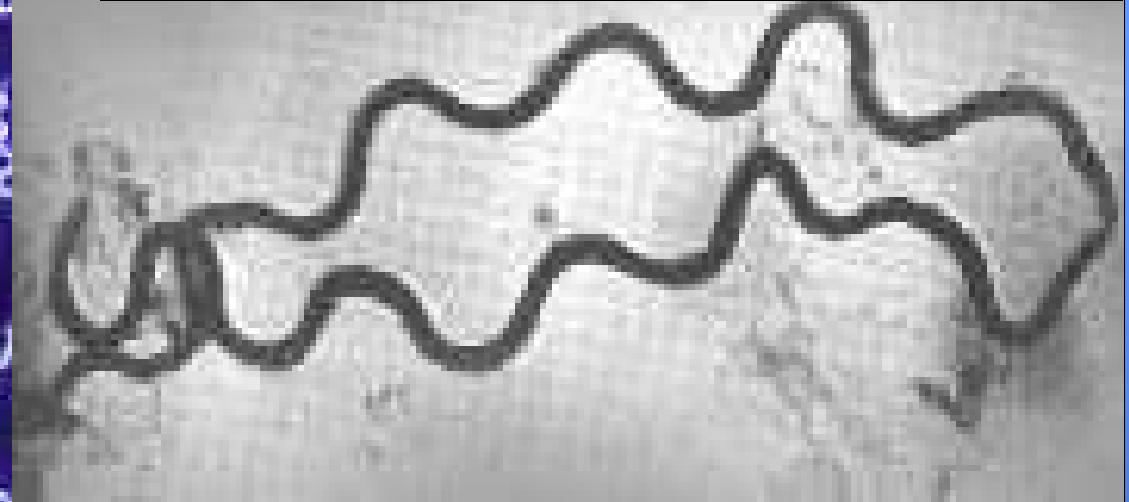
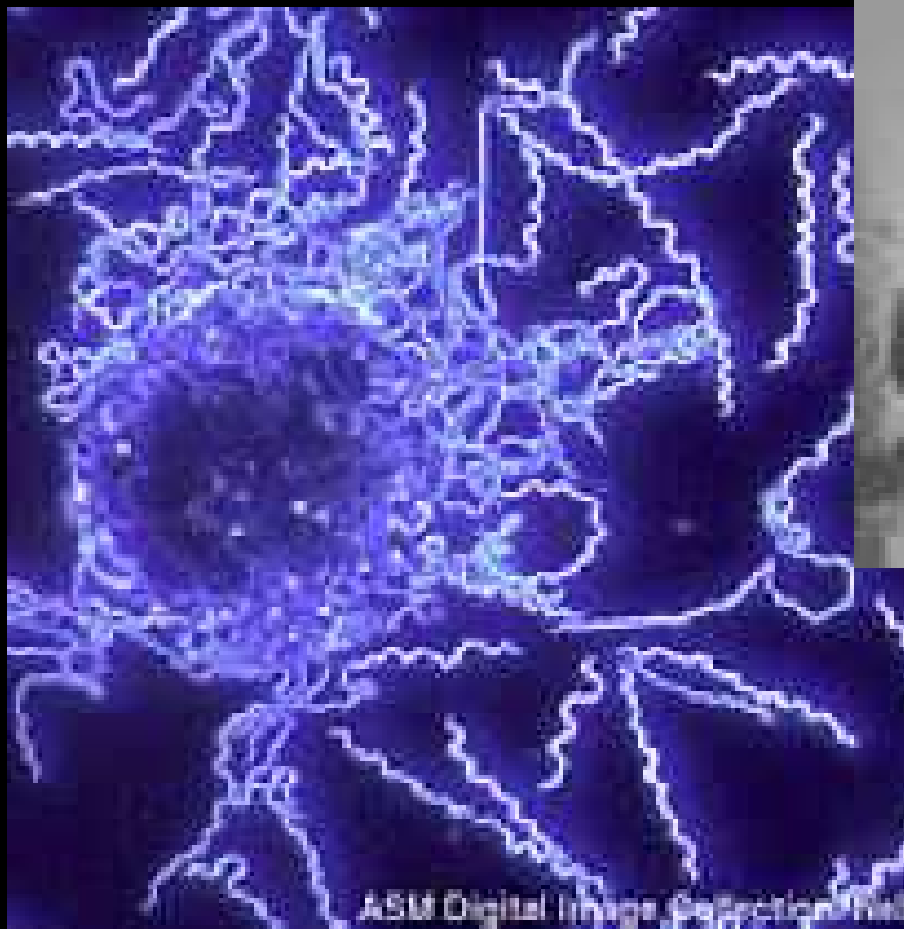
<http://www.morgenwelt.de/typo3temp/5ce14d39b5.jpg>

Zprohýbaná tyčinka – helikobakter

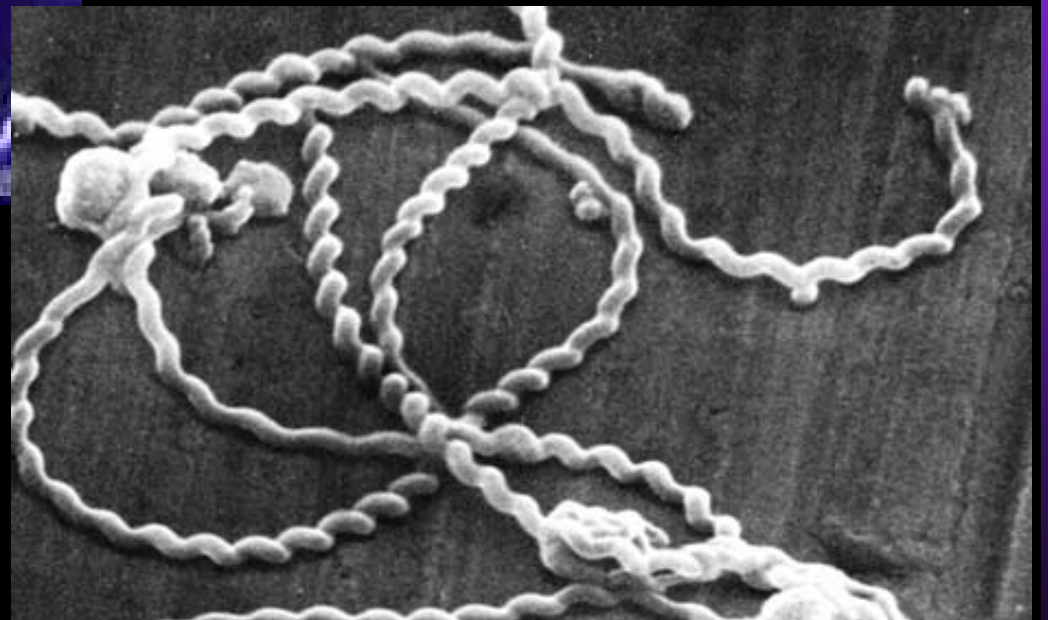


[http://vietsciences.free.fr/nobel/medecine
/images/helicobacter%2520pylori.JPG](http://vietsciences.free.fr/nobel/medecine/images/helicobacter%2520pylori.JPG)

www.primer.ru/std/gallery_std/treponema.htm

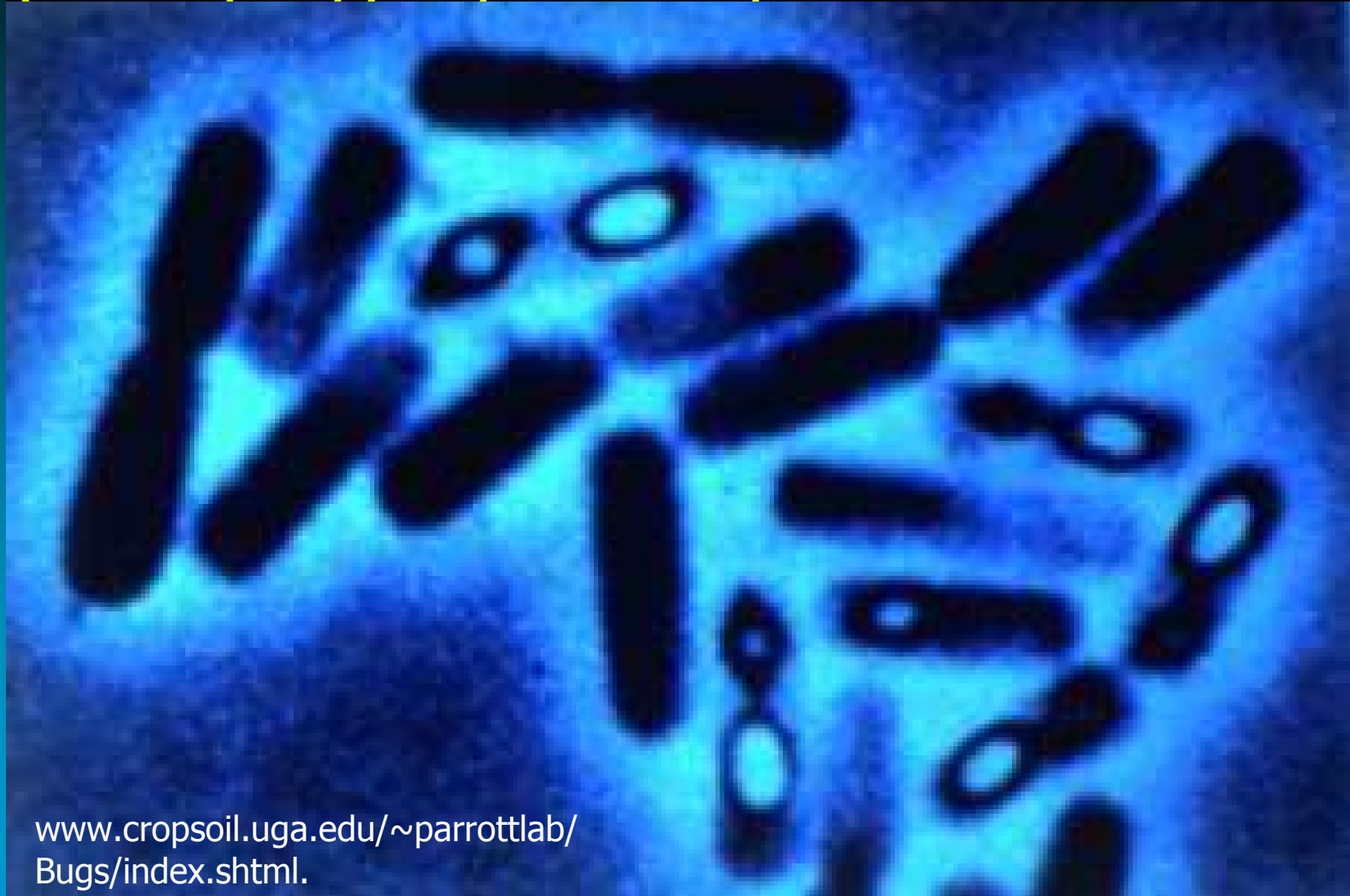


Spirochety



<http://nl.wikipedia.org/wiki/Afbeelding:TreponemaPallidum.jpg>

Některé tyčinky mohou obsahovat spory (endospory). Ty se samy o sobě nebarví.



www.cropsoil.uga.edu/~parrottlab/Bugs/index.shtml

Diagnostika: průkaz a určování bakterií

- **Klinická mikrobiologie v praxi** spočívá v tom, že **lékař** (ať už je to obvodní lékař, ambulantní specialista či lékař z kteréhokoli oddělení nemocnice) **pošle do laboratoře vzorek**
- **Úkolem klinickomikrobiologické laboratoře** je **prokázat** v takovém vzorku případnou **přítomnost mikrobů** a pokud tam jsou, tak je také **určit**.
- Určení nemusí být přesné, ale musí poskytnout **dostatek informací pro léčbu**

Co je to vzorek

Vzorek je to, co je odebráno pacientovi a přichází na vyšetření do laboratoře:

- **kusový či tekutý materiál ve zkumavce** či jiné nádobce (krev, sérum, moč...)
- **stěr či výtěr na vatovém tamponu**, obvykle zanořeném do transportního média.

Při diagnostice někdy pracujeme s celým vzorkem. Jindy je nutno získat ze vzorku kmen nebo kmeny patogenních mikrobů.

Co je to kmen

Kmen je čistá kultura („výpěstek“) jednoho druhu mikroba

Kmen získáme jedině kultivací (pěstováním) mikroba na pevné půdě.

Kochův objev, že bakterie lze takto pěstovat, měl zásadní význam v dějinách mikrobiologie.

Přehled metod

- **Metody přímé: Hledáme mikroba, jeho část či jeho produkt** (produktem může být například nějaký bakteriální jed – toxin)
 - **Přímý průkaz ve vzorku** – pracujeme s celým vzorkem (močí, krví, výtěrem z krku a podobně)
 - **Identifikace kmene** – určení vypěstovaného izolátu
- **Metody nepřímé: Hledáme protilátky.**
Protilátka není součástí ani produktem mikroba – je produktem makroorganismu, odezvou na činnost mikroba

Přehled metod přímého průkazu

| Metoda | Průkaz ve vzorku | Identifikace |
|--------------------------|------------------|--------------|
| Mikroskopie | ano | ano |
| Kultivace | ano | ano |
| Biochemická identifikace | ne | ano |
| Průkaz antigenu | ano | ano |
| Pokus na zvířeti | ano | v praxi ne |
| Molekulární metody | ano | v praxi ne* |

*netýká se molekulární epidemiologie – sledování příbuznosti kmenů

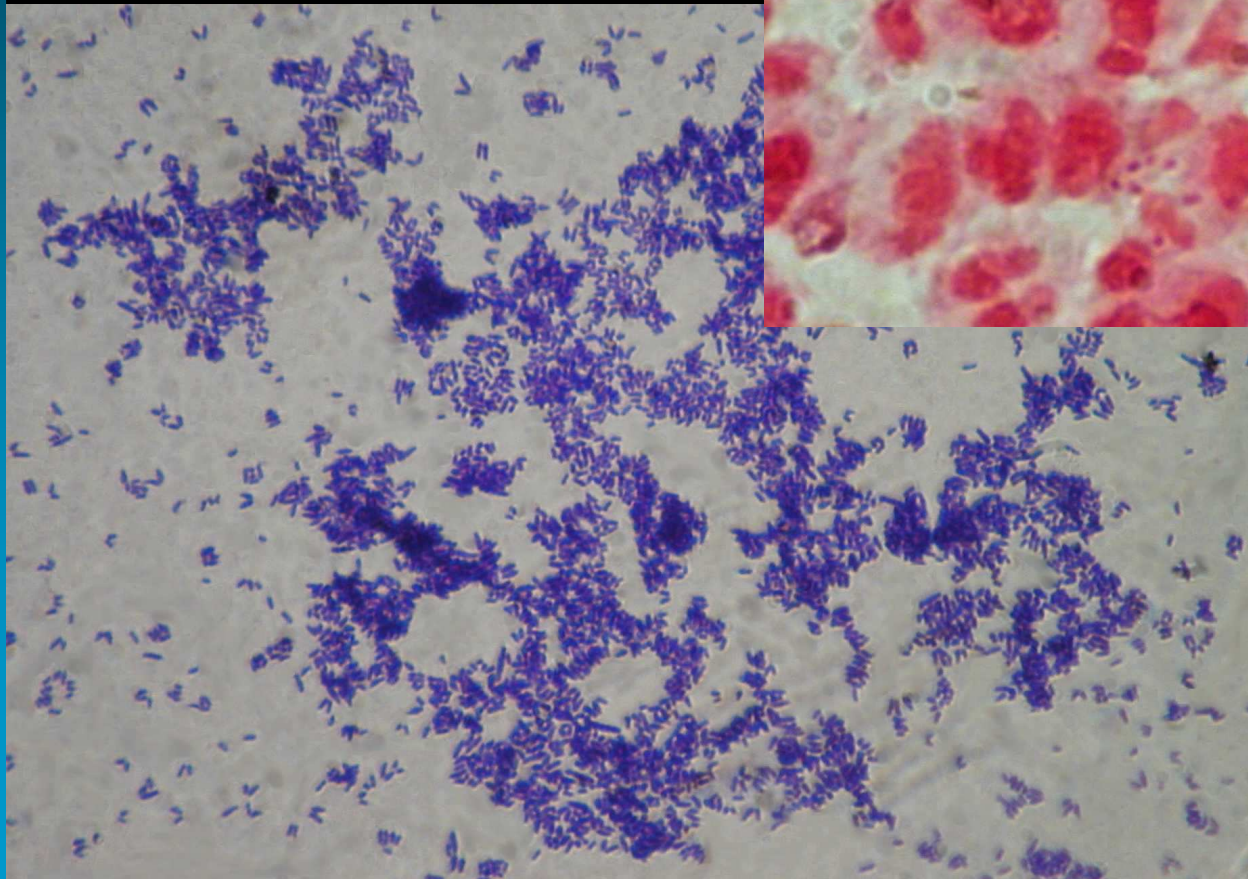
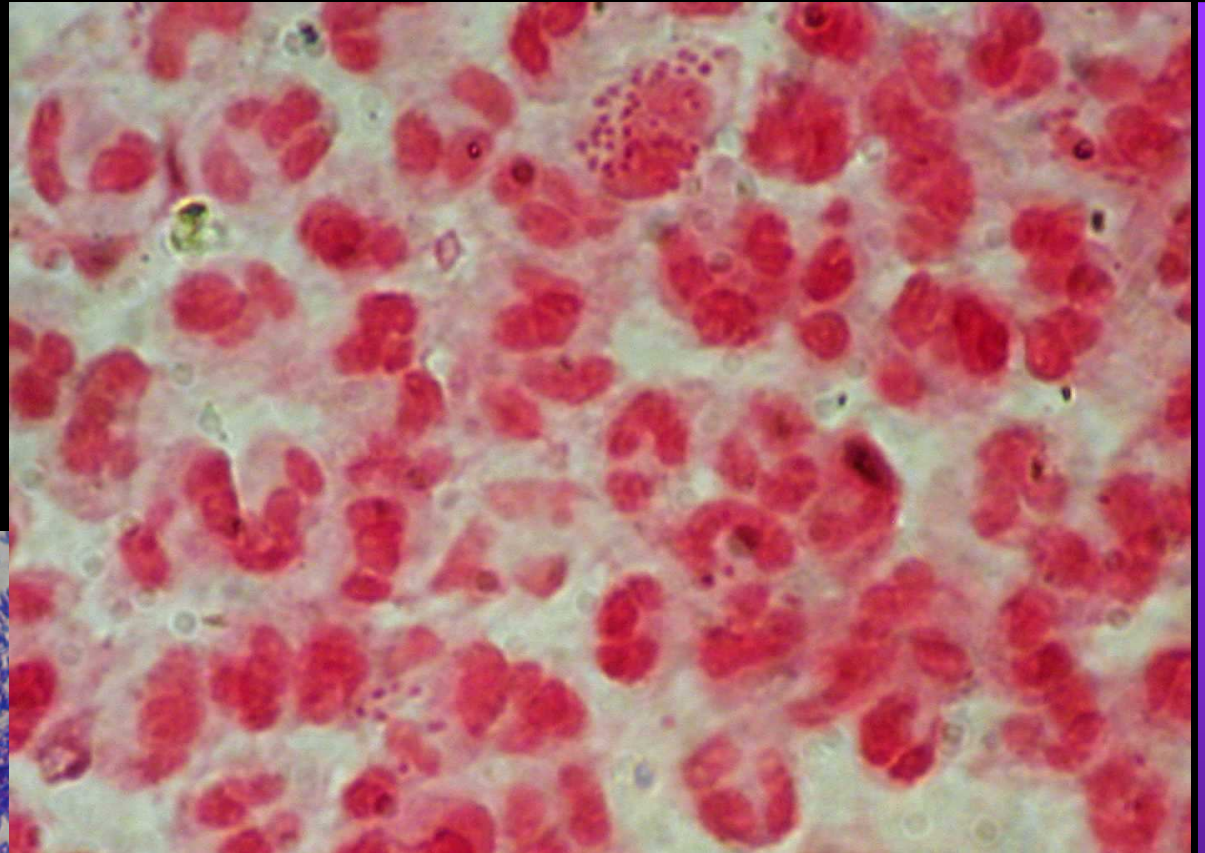
Mikroskopie

- **Pozorujeme mikroby, u vzorku i buňky hostitelského organismu** (epitelie, leukocyty a podobně)
- **Nativní preparát** - na velké a/nebo pohyblivé mikroby (parazity, houby, pohyblivé bakterie)
- **Nativní preparát v zástinu** (hlavně spirochety)
- **Fixované a barvené preparáty** – barvení podle Grama, podle Giemsy, podle Ziehl Neelsena (použití pro různé skupiny bakterií, hub či parazitů)
- **Elektronová mikroskopie** – u virů; spíše výzkum než při běžném průkazu virů

Než začneme mikroskopovat:

- Objektivy se utírají **zásadně gázou**. Jednou použitá gáza se vyhodí a nepoužívá znovu.
- Mikroskopický stolek lze otřít **buničitou vatou**. I ta se po použití vyhodí.
- Na stolech máte **nádobky na drobný odpad**.

Mikroskopie
vzorku



Mikroskopie
kmene

Hlavní mikroskopické metody v klinické mikrobiologii

| | Sušení a fixace | Krycí sklíčko | Imerzní systém |
|---------------------------------------|--------------------|------------------|-------------------|
| Nativní preparát | NE | ANO | NE |
| <i>Nativní zástinový preparát</i> | NE | ANO | ANO |
| Barvené preparáty | ANO | NE | ANO |

Příprava mikroskopického preparátu

- **Pokud máme kmen:**
 - kápneme na podložní sklíčko kapku fyziol. roztoku.
 - vyžeháme mikrobiologickou drátěnou kličku v plameni
 - po zchladnutí nabereme trochu hmoty bakterií
 - hmotu rozmícháme v připravené kapce
- **Pokud máme vzorek:**
 - tekutý vzorek na podložní sklíčko kápneme
 - nátěr na špejli buď rozmícháme ve fyziologickém roztoku, nebo (pouze u barvených preparátů) přímo natřeme na sklíčko

Příprava nativního preparátu

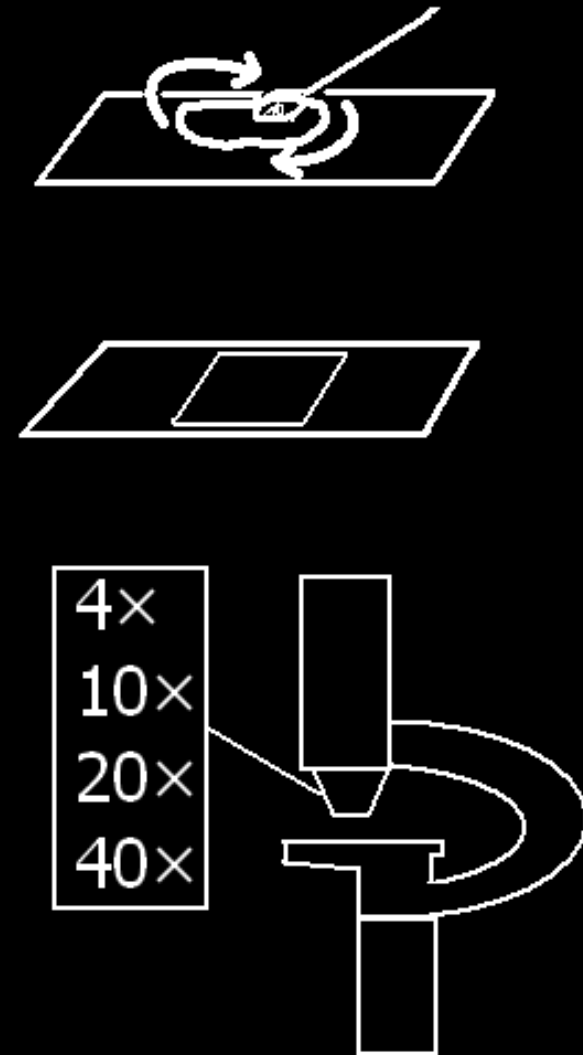
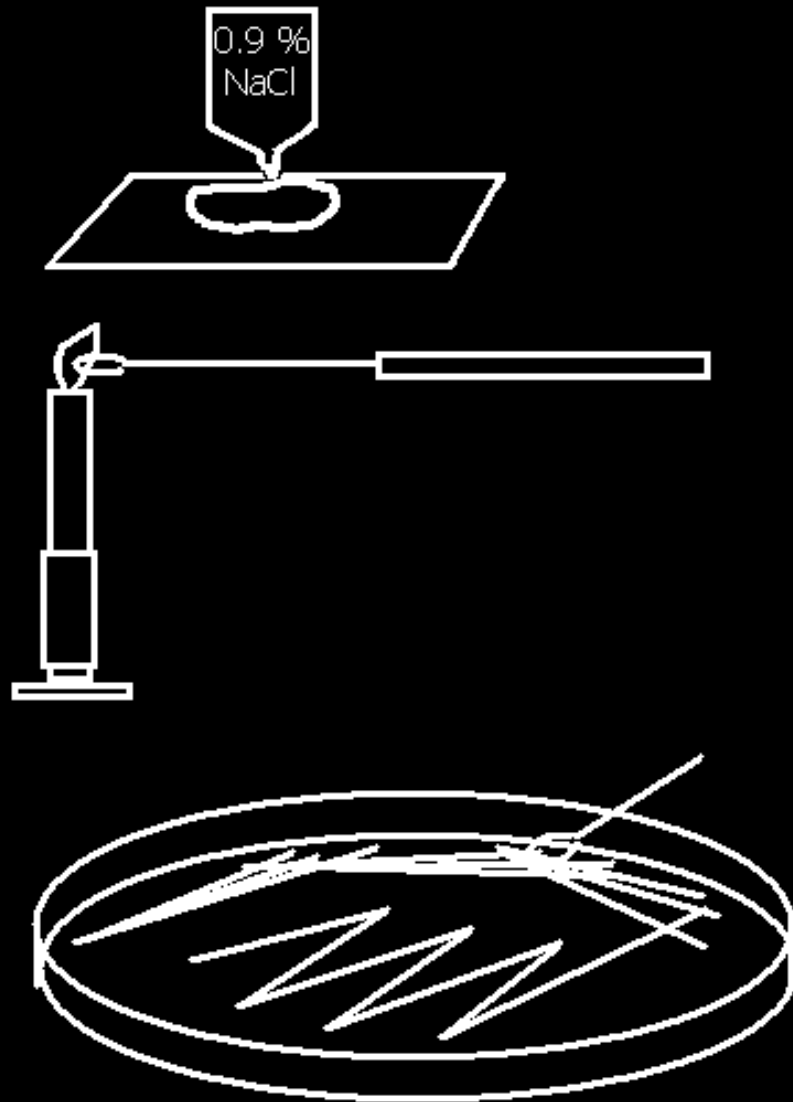
- V případě nativního preparátu kapku, ve které je vzorek či rozmíchaný kmen, **nesušíme**. Pouze **přikryjeme krycím sklíčkem** a pozorujeme objektivy, které zvětšují např. 4 ×, 10 × či 40 ×.
- Nepoužíváme imerzní olej

2a: nativní preparát kmene kvasinky

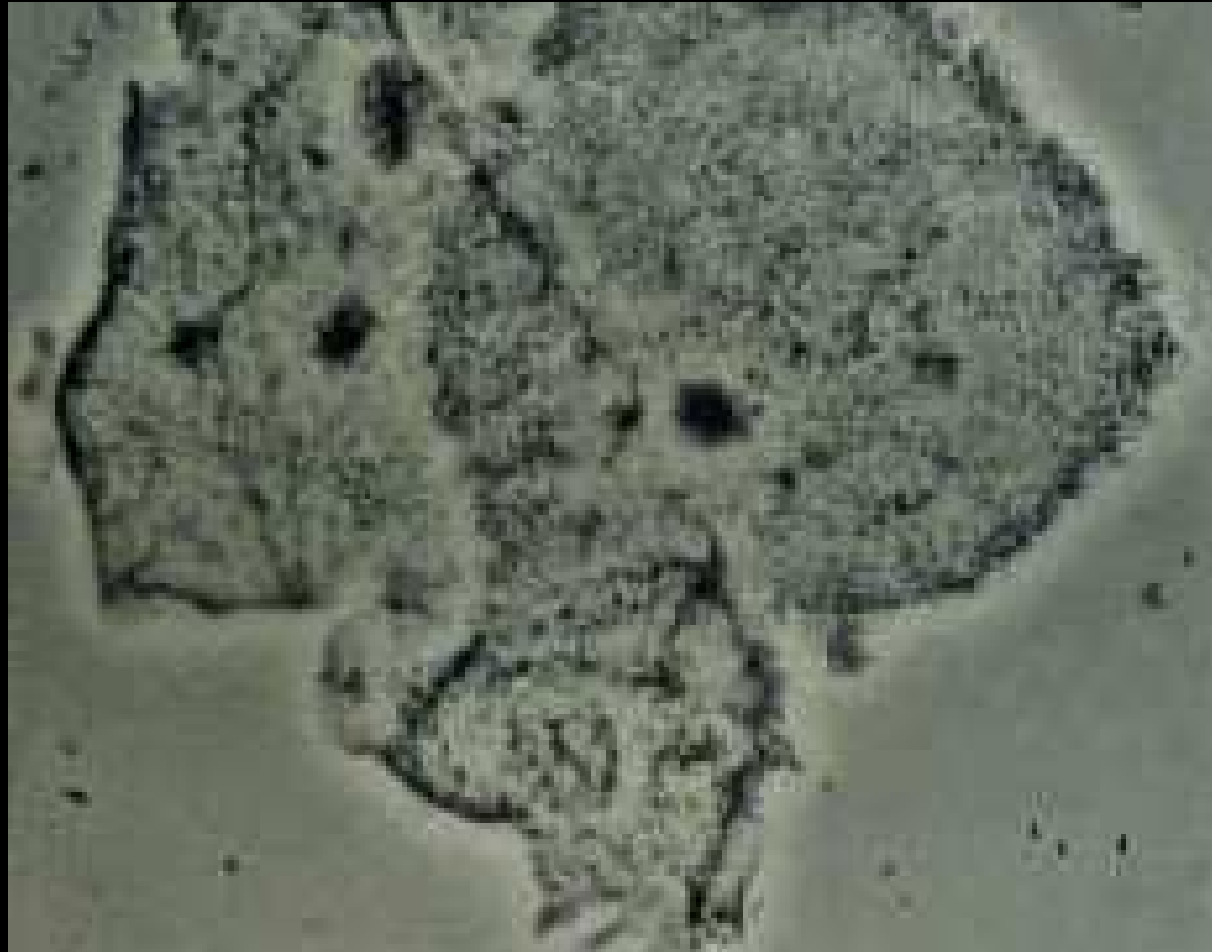
2b: nativní preparát vzorku od pacienta

- **Úkol 2a:** Provádíte pouze s kmenem A, je to kvasinka. Vyžíhanou kličkou naberete, rozmícháte, kličku opět vyžiháte, kapku překryjete sklíčkem a pozorujete – pouze kvasinky.
- **Nový úkol 2b:** Plastové zkumavky obsahují výtěry rozmíchané v médiu. Kápněte na sklíčko a pozorujte epitelie, popř. leukocyty, a mezi nimi mikroby.

Nativní preparát – postup (u kmene)



Ukázka nativního preparátu C. A. T.



Vidíme epitelie,
malé tečky jsou
možná mikroby,
možná artefakty
(z obrázku se to
nedá spolehlivě
poznat)

<http://www.kcom.edu/faculty/chamberlain/Website/lectures/lecture/image/clue3.jpg>

Příprava barveného preparátu

- Vycházíme opět z kapky vzorku nebo kmene rozmíchaného ve fyziologickém roztoku. V tomto případě je lépe, když je kapka malá.
- Kapku necháme zaschnout. Můžeme tomu pomoci umístěním **poblíž** kahanu.
- Po zaschnutí vzorek fixujeme tím, že sklíčko několikrát protáhneme **skrz** plamen kahanu, kontrolujícíe hřbetem ruky teplotu.

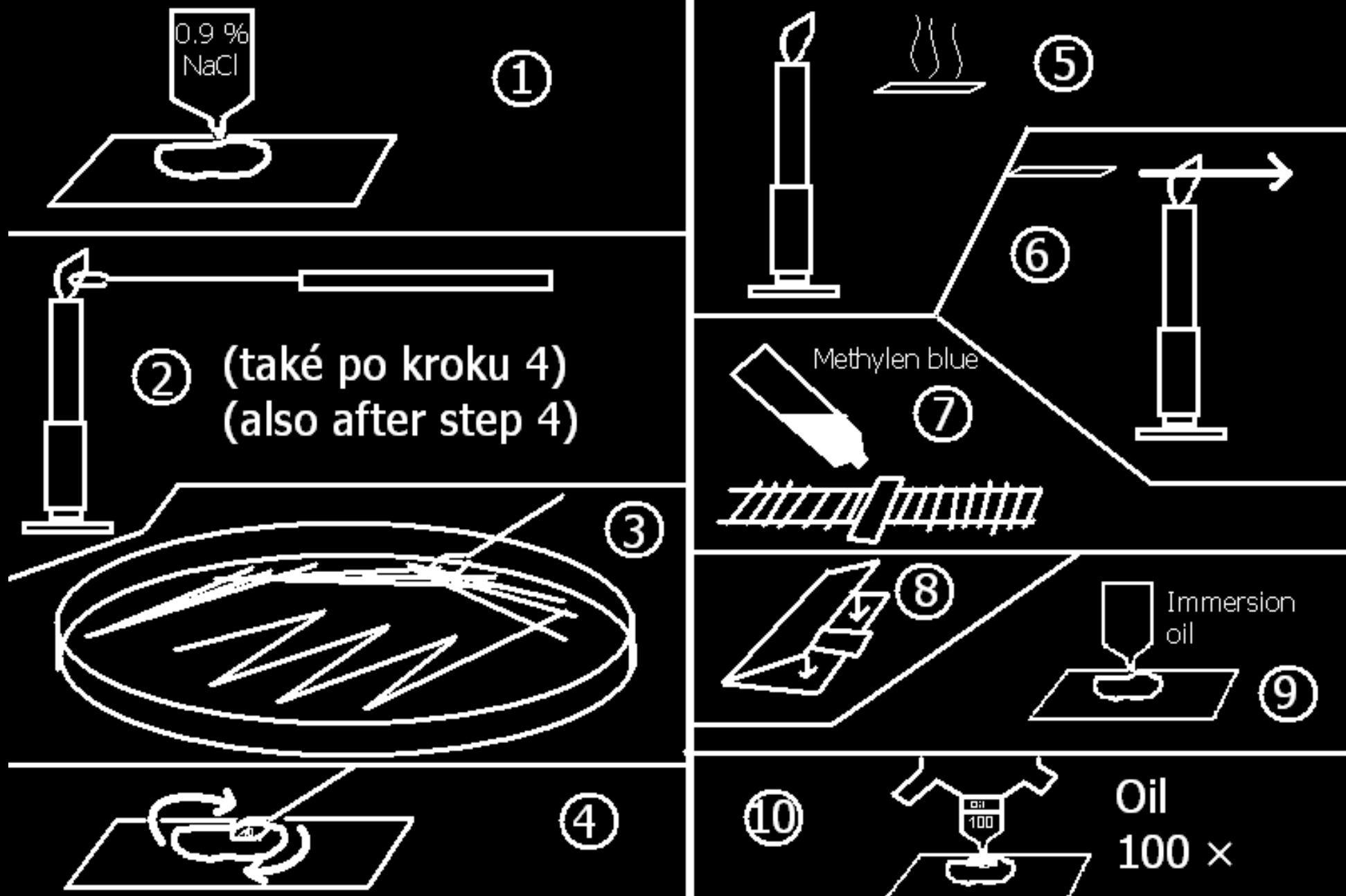
Jednoduché barvení

- Může ho použít **v nouzi např. obvodní lékař**, který má daleko mikrobiologa a je vybaven methylenovou modří a mikroskopem.
- **V praxi se příliš nepoužívá**
- Můžeme si ale znázornit **velikost, tvar a uspořádání mikrobů**

Úkol 3 – jak ho prakticky provést

- Fixovaný **preparát umístěte na Kramerovu dlahu do dřezu** a **přelijte methylenovou modří**
- Nechte **asi dvě minuty** přelité
- Poté **opláchněte vodovodní vodou**, a osušte filtračním papírem
- Na preparát kápněte **malou kapku imerzního oleje** a pozorujte objektivem zvětšujícím 100 ×

Jednoduché barvení



Takhle může vypadat
výsledek
(kvasinky):



http://biology.clc.uc.edu/fankhauser/Labs/Microbiology/Yeast_Plate_Count/09_Yeast_Meth_Blue_P7201177.jP7201179.jpg

Po skončení mikroskopování VŽDY (tedy nejen dnes):

- Pokud pracujete imerzí, očistěte imerzní objektiv gázou s benzínem
- Případně takto očistěte i další objektivy, pokud jste je znečistili
- Mikroskopický stolek otřete buničínovým čtverečkem, případně také s benzínem
- Mikroskop vypněte a zakryjte

Přeji Vám
hezký
zbytek
dne...

