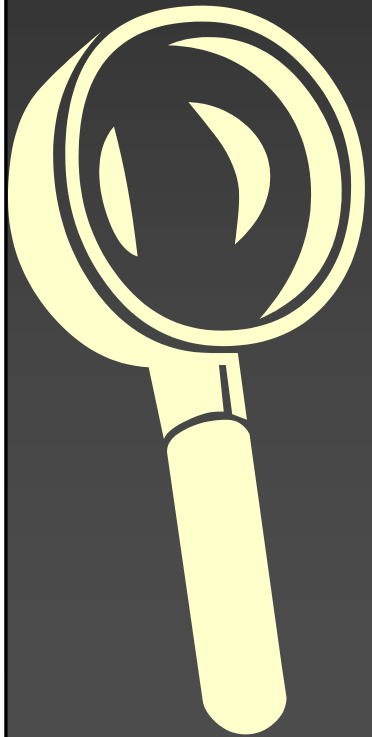


Mikrobiologický ústav uvádí

NA STOPĚ PACHATELE



Díl jedenáctý:

Pachatelé – paraziti

Opět začneme testíkem...

- Které mikroby se dají pozorovat nativně?

Dostatečně velké (eukaryota) a pohyblivé

- Které barvicí metody v mikrobiologii znáte?

Gramovo, Ziehl-Neelsenovo barvení a další

- Jak se barví kvasinky dle Grama a proč?

Modrofialově – tlustá vrstva polysacharidů

- Které houby způsobují povrchové mykózy?

Candida; Trichophyton, Epidermophyton,

Microsporum

Testík pokračuje... a končí

- Jak vypadá kandida na krevním agaru?

Bílé kolonie podobné stafylokokovým, liší se vůní po chlebu (a jsou trochu menší)

- Jak lze odlišit kvasinku od stafylokoka?

Vůní, nátěrem, růstem na selektivní půdě

- Jak se vzájemně rozlišují kandidy?

Chromogenními půdami, biochemickými testy

- Proč se Sabouraud nalévá do zkumavek?

Některé vláknité houby rostou pomalu.

V miskách by půda během kultivace vyschla.

Na úvod...



„Ty si opravdu myslíš, že tvůj nový kelon obří
štěnice naplňuje moje představy o skvělém dárku
k životnímu jubileu?!“

A ještě jeden slovní:

Víte, jaký je rozdíl mezi
českým vědcem a
tasemnicí?

No přece – žádný! Oba
jsou v... , a občas jim
vyjde článek!

Příběh první

- Nikolka se pořád škrabala v zadečku, že už to bylo nápadné rodičům i učitelkám ve školce. Zároveň byla neklidná a roztěkaná. A tak jí nalepili na zadek průhlednou lepicí pásku a poslali do laboratoře. A výsledek nikoho nepřekvapil. Nikolka tedy začala užívat léky, a zanedlouho byla zase úplně v pořádku...
-

Viníkem byl



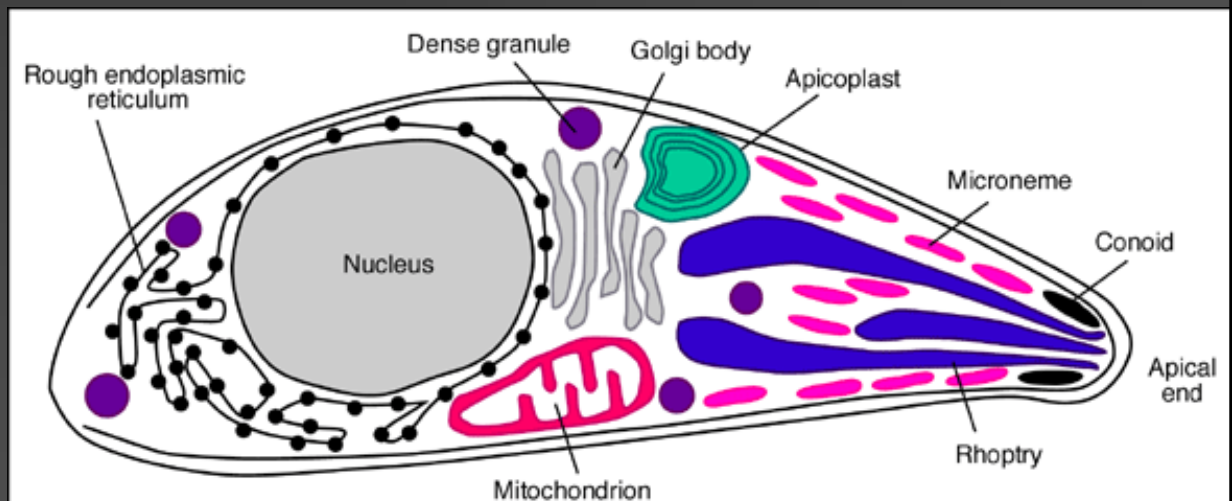
- *Enterobius vermicularis* neboli roup dětský (mrľa ľudská). Je to drobná hlístice, která se zdržuje ve střevě. Vajíčka klade v perianálních řasách. Vyskytuje se zejména v dětských kolektivech. U malých dětí často dochází k autoinfekci.
- Příbuznou hlísticí je také **škrkavka dětská** – *Ascaris lumbricoides* (hlísta). Je trochu podobná žížale (*Lumbricus terrestris*), ale přece jen se trochu liší. Škrkavky mohou působit různé obtíže, od alergického dráždění až po mechanické ucpání vývodů žlučovodu a pankreatu.

Příběh druhý

- Blanka, chovatelka několika koček, měla delší dobu **zvětšené uzliny**, a pořád se nemohlo přijít na to, co jí je. Výtěry z krku nic neukázaly, ani výsledky dalších vyšetření nebyly průkazné
- Blanka se **chystala otěhotnět**, a tak měla obavy. Jak se ukázalo, byly oprávněné: viník, zodpovědný za její uzlinový syndrom, totiž **opravdu bývá těhotným nebezpečný...**

Viníkem totiž byla

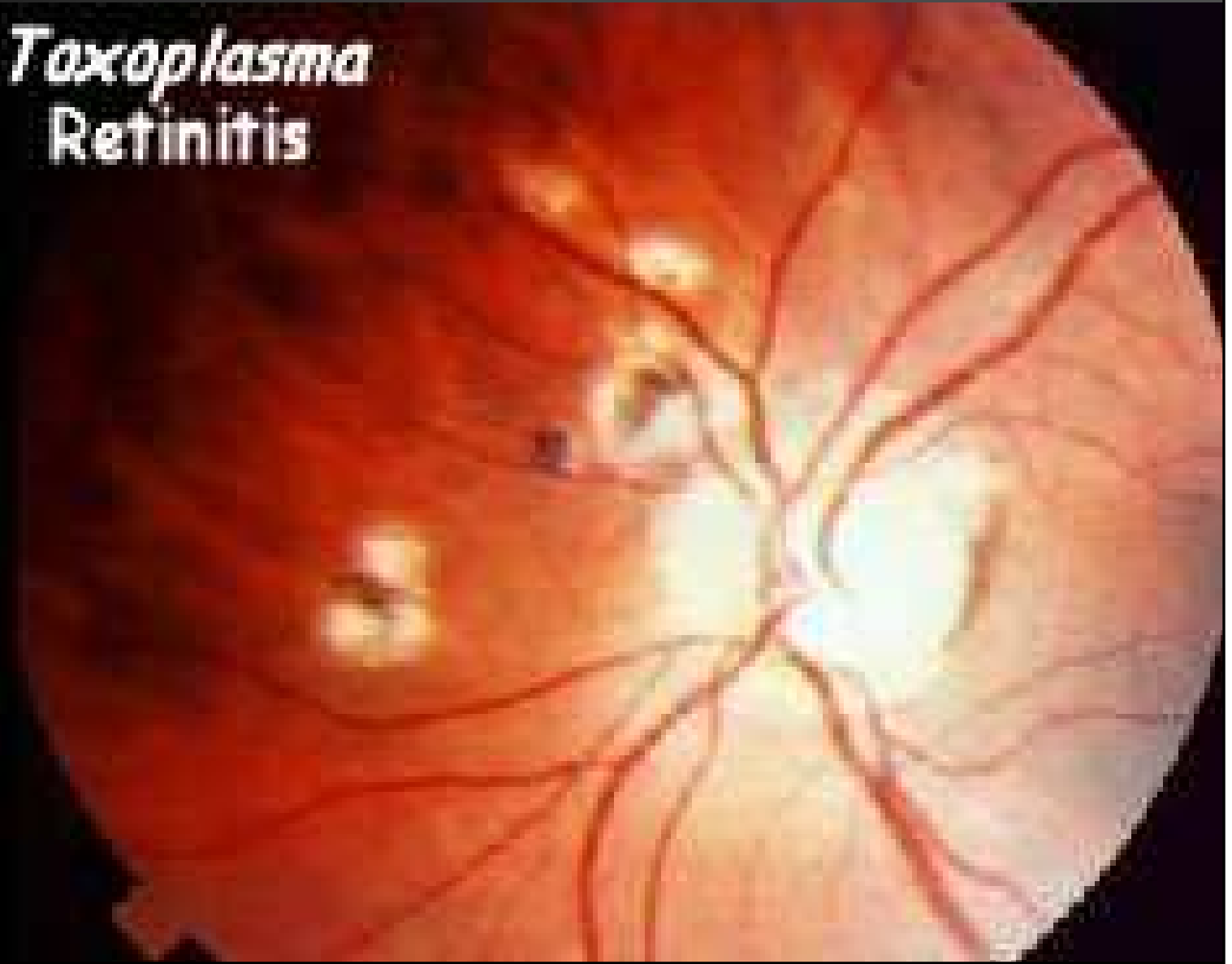
- *Toxoplasma gondii*, prvok, který je přenášen kočkami, i když se tvrdí, že chovatelé psů jsou ve větším riziku (protože na srsti donesou domů částičky kočičího trusu)
- Většina infekcí u imunokompetentních osob je bez příznaků



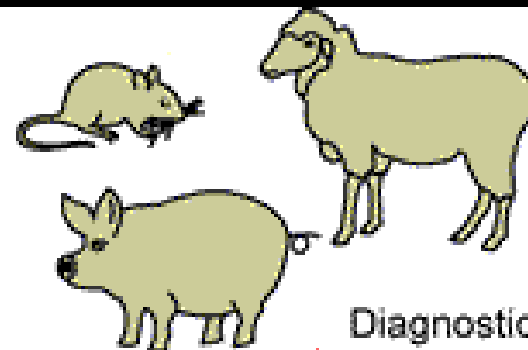
Ultrastructure of a *Toxoplasma gondii* tachyzoite

U některých
osob ovšem
může
vzniknout
například
toxoplasmová
retinitida...

Toxoplasma
Retinitis



Definitive Host

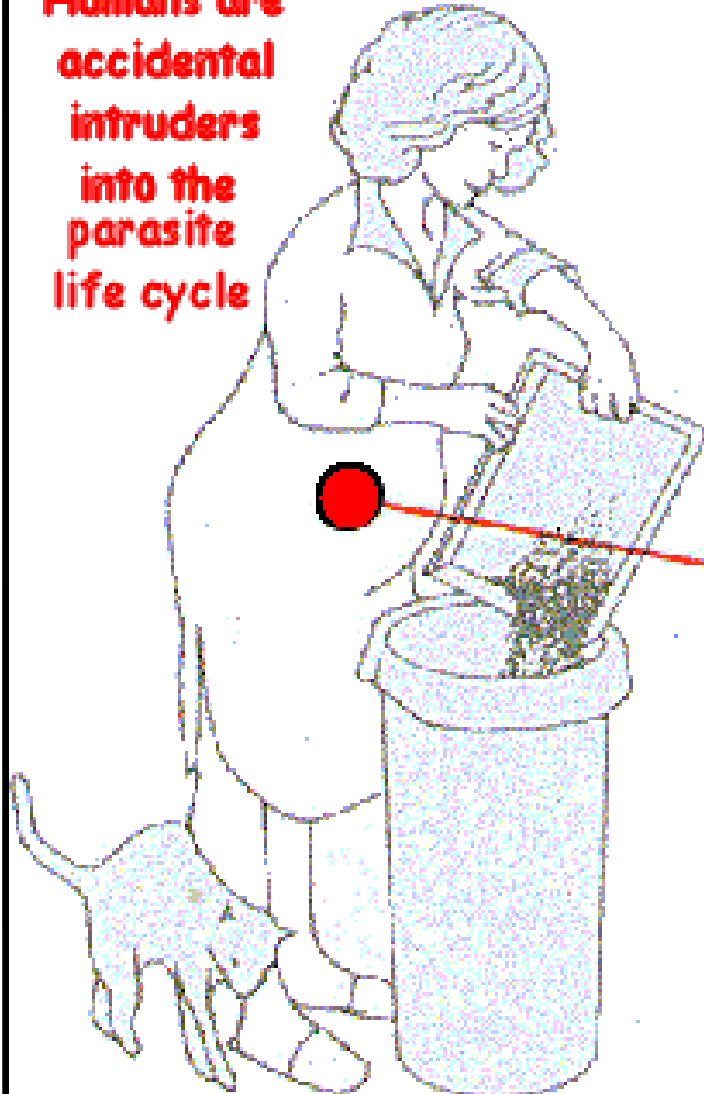


Diagnostic Stage

Tissue Cysts

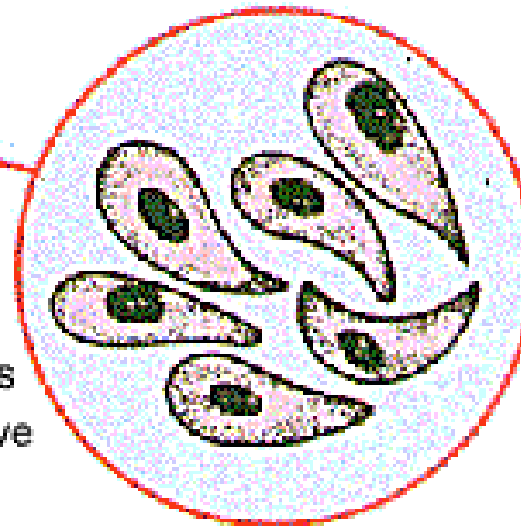


Humans are accidental intruders into the parasite life cycle



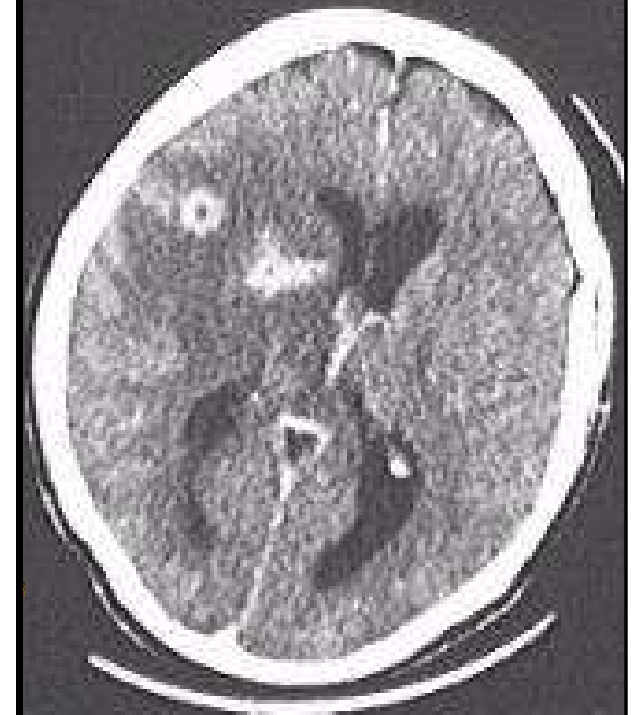
Both oocysts and tissue cysts transform into tachyzoites shortly after ingestion. Tachyzoites localize in neural and muscle tissue and develop into tissue cyst bradyzoites. If a pregnant woman becomes infected, tachyzoites can infect the fetus via the bloodstream.

Fecal Oocysts = Infective Stage



Životní cyklus toxoplasem

**Dole:
toxoplasmová cysta v mozku**

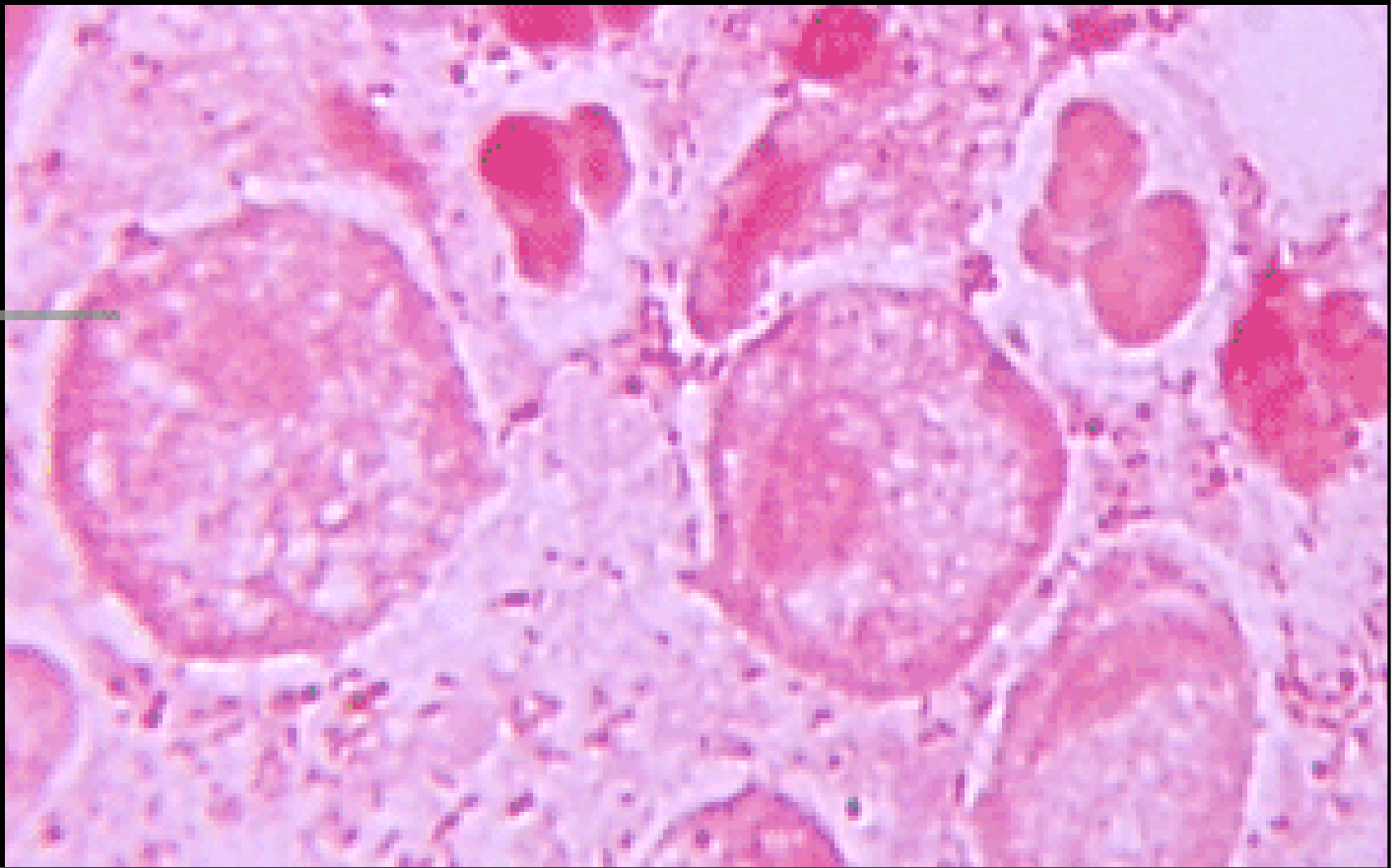


Příběh třetí

- **Jolana** už zase měla jakési potíže „tam dole“. Nebylo divu, když spala každou chvíli s někým jiným. Tentokrát však bakteriologické vyšetření nepomohlo. Lékařka tedy zaslala k vyšetření soupravu C. A. T., a konečně byl na světě výsledek.



Viníkem zde byla

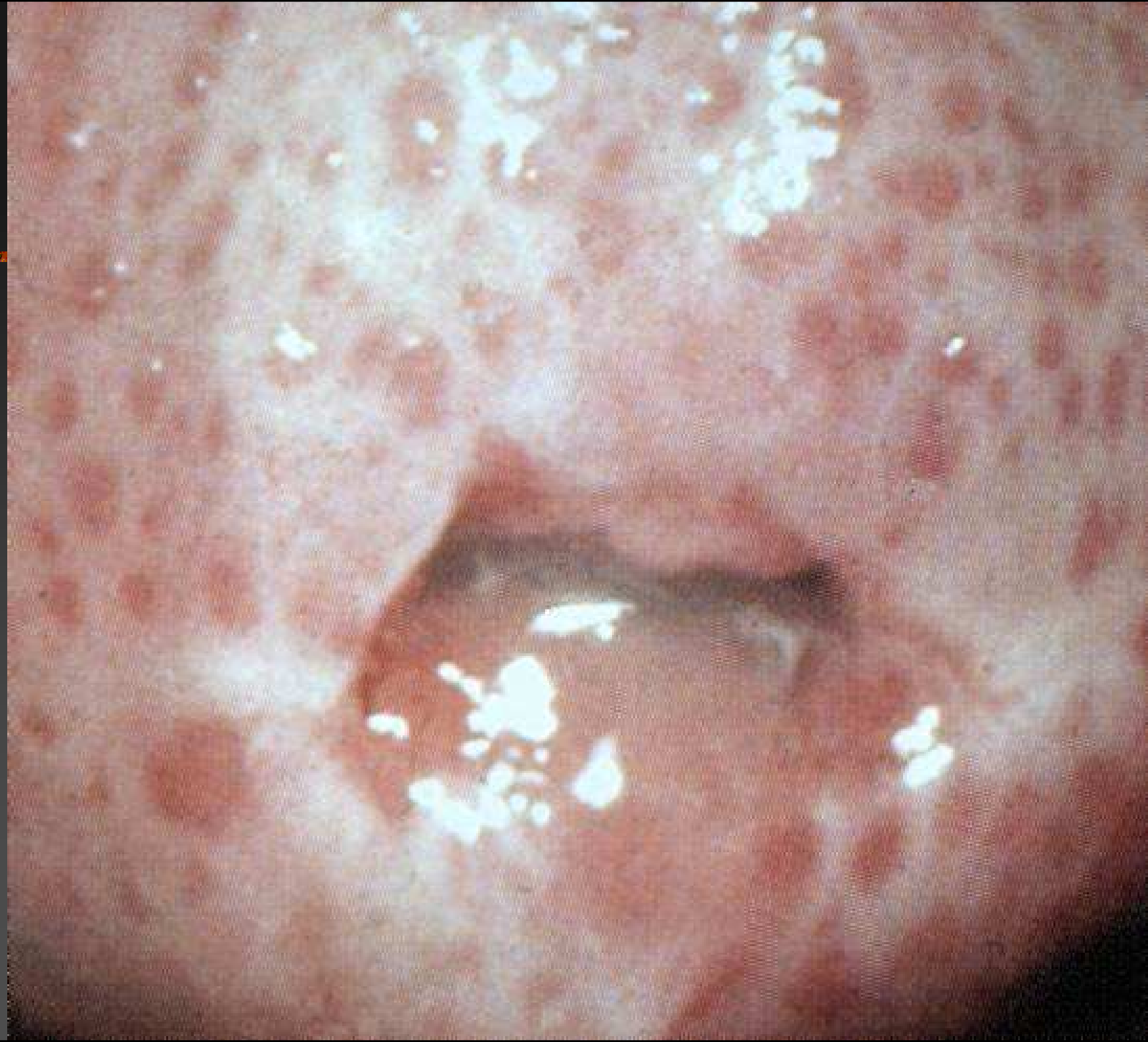


- *Trichomonas vaginalis*, česky bičenka poševní, bičíkovec, který se přenáší téměř výhradně sexuálně, i když výjimečně je možný i jiný způsob přenosu

Trichomonádový výtok



Tzv. jahodový cervix



Příběh čtvrtý

- **Cestomil** rád jezdil křížem krážem po celém světě. Po návratu z poslední cesty mu začalo být nějak divně, měl horečku, pak ho to přešlo, ale **za tři dny** se mu to celé zase vrátilo. Obvodní lékař ho poslal na **infekční oddělení**. Tam mu vzali krev a natřeli ji na dvě sklíčka – na každé jinak. Všichni tušili, kdo by mohl být pachatelem. A opravdu...

Viníkem zde bylo

- *Plasmodium vivax*, jeden ze čtyř druhů malarických plasmodií.
- **Malárie** je celosvětově jednou z těch úplně nejzávažnějších chorob. Onemocní na ni denně mnoho lidí, včetně cestovatelů z Evropy.
- Nejhorší průběh má „tropika“ neboli „maligní terciána“, působená *P. falciparum*. Mírnější jsou obě „benigní terciány“, působené *P. vivax* a *P. ovale*. Kvartána, působená *P. malariae*, je vzácná

Klasifikace parazitů

- Parazité jsou klinicky významní živočiši, ne vždy mikroskopičtí. Lze je členit dle umístění v organismu, zoologických kritérií a dalších vlastností.
- Mezi **endoparazity (vnitřní parazity)** patří:
 - **Prvoci** (améby, bičíkovci a další)
 - **Hlístice** (roup, škrkavka dětská, tenkohlavec, škrkavka psí a kočičí)
 - **Motolice** (motolice jaterní, schistosoma)
 - **Tasemnice** (tasemnice bezbranná a dlouhočlenná, škulovec, tasemnice dětská a rybí)
- Mezi **ektoparazity** patří různí **členovci**

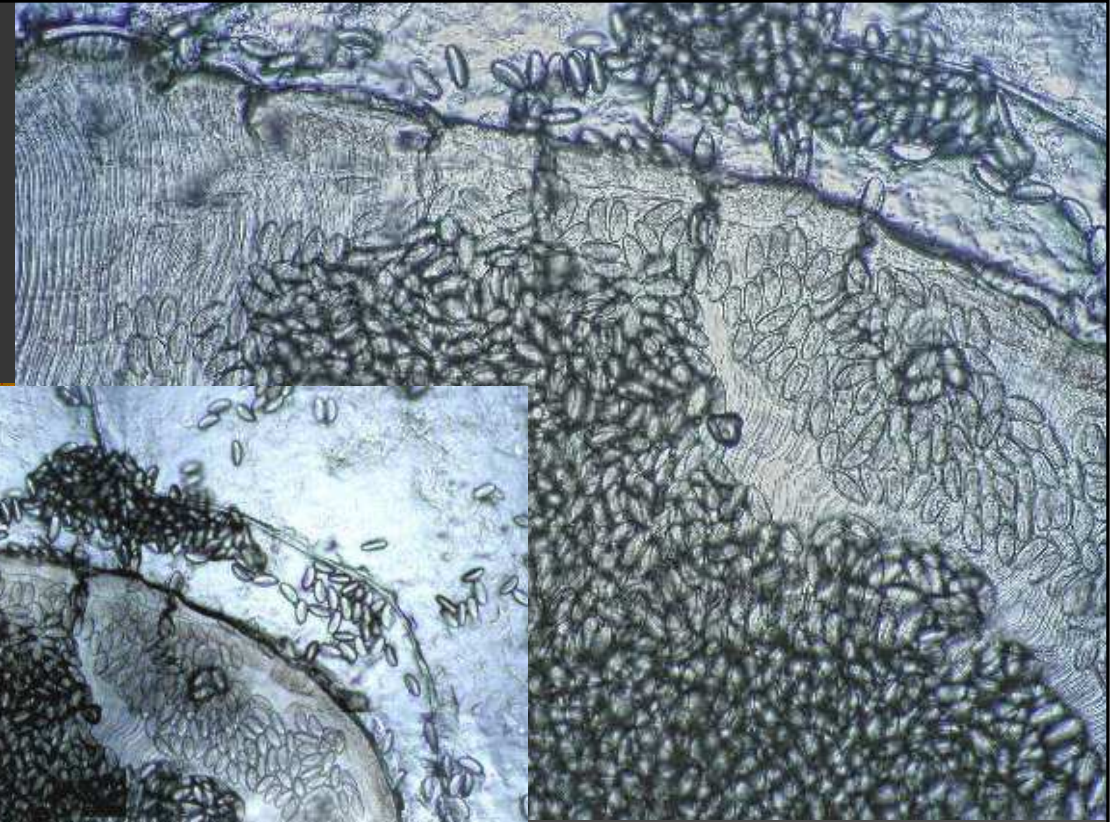
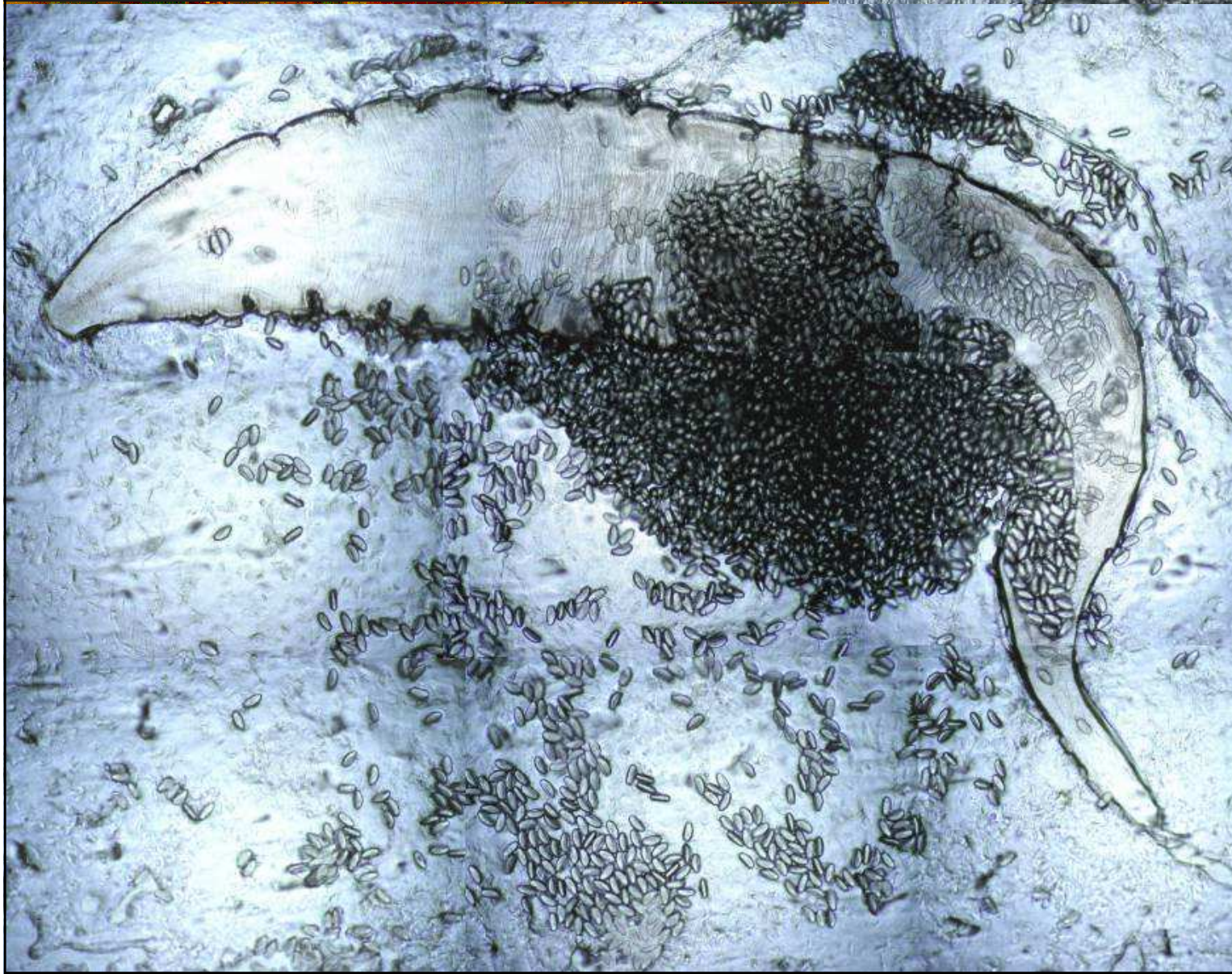
Jiná klasifikace parazitů

- Také bývá zvykem členit parazity podle orgánových soustav:
 - Paraziti **střevní** (od lamblíí po tasemnice)
 - Paraziti **krevní** (intra- a extraerytrocytární)
 - Paraziti **urogenitální** (například bičenky)
 - Paraziti **tkáňoví** (například toxoplasma)

Toto členění má **význam i pro diagnostiku**. U **tkáňových parazitů** má například logicky mnohem větší význam **nepřímý průkaz** – pro přímý průkaz nelze nalézt vhodný vzorek, který by měl být odebrán

Střevní paraziti I

Roup



Střevní paraziti II

Vajíčko škrkavky



Fertile egg (wet mount 400X)



Střevní paraziti III

Ancylostoma duodenale

méně běžná střevní hlístice

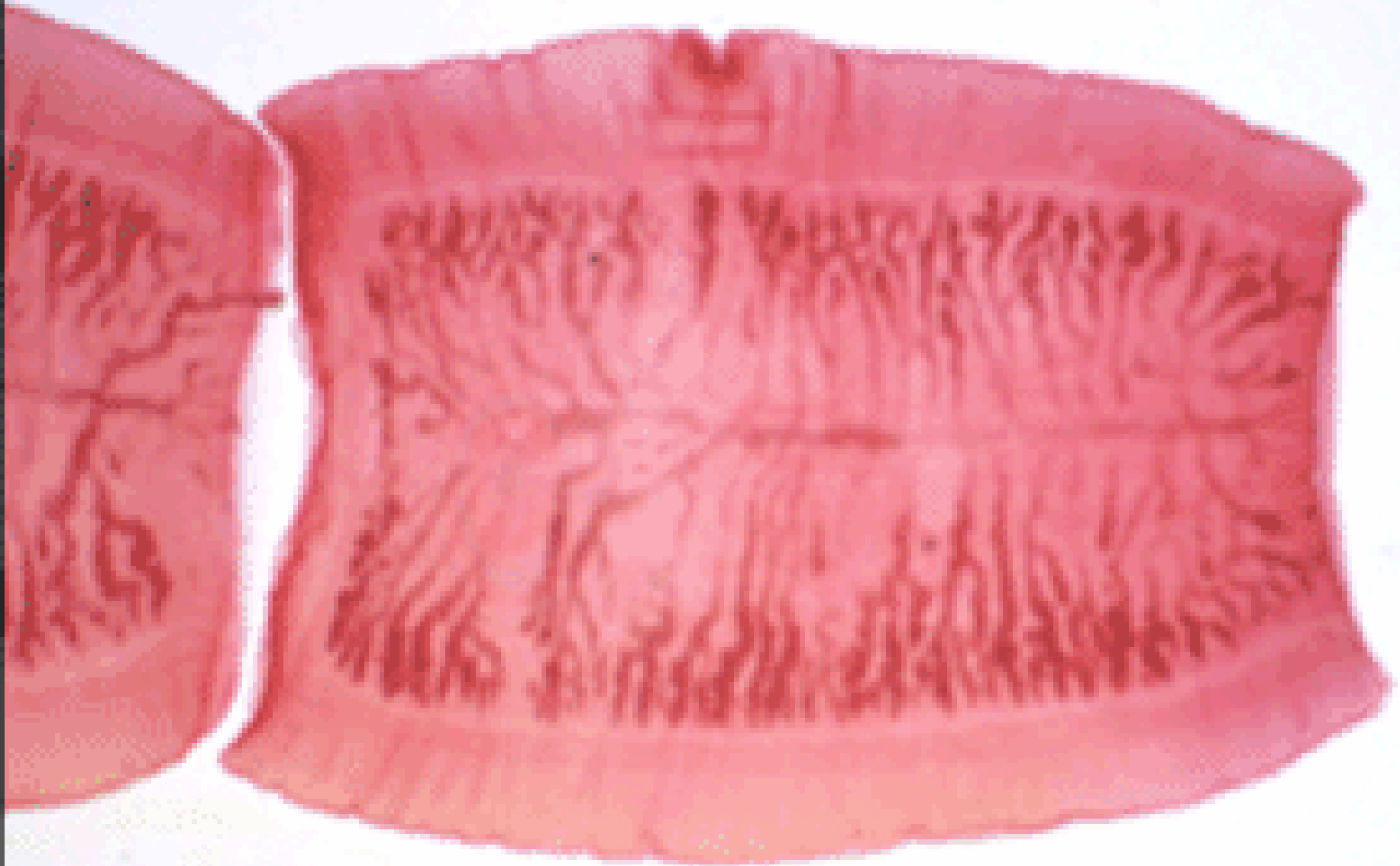


Střevní paraziti IV – tasemnice (vajíčka)

Pozor, na základě vajíček nelze rozlišit *T. solium* od *T. saginata*, k tomu jsou nutné články!



Střevní paraziti V – tasemnice, článěk



Taenia saginata gravid proglottid (stained)

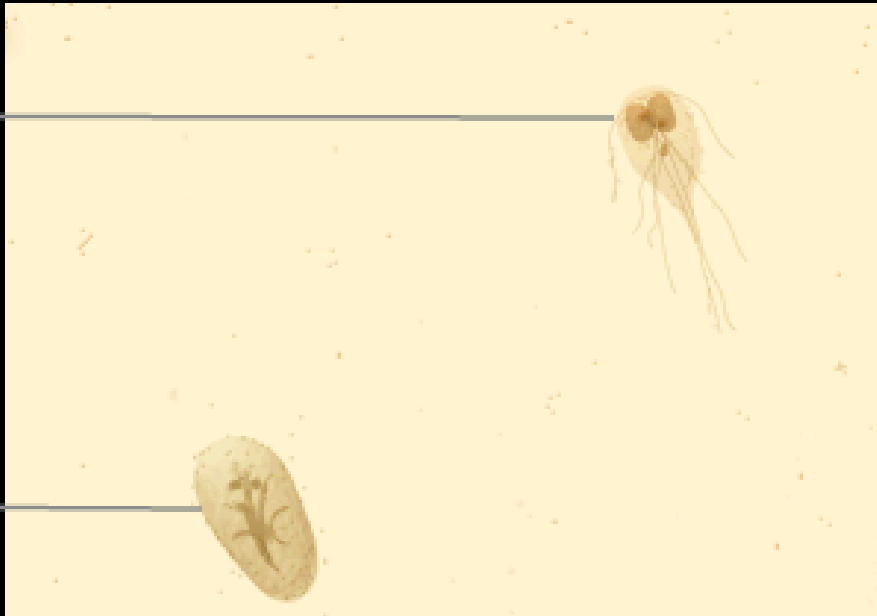
Střevní paraziti VI – *Diphylobotrium*
latum (škulovec široký) – méně
běžná střevní tasemnice



Střevní paraziti VII – lamblie

Trophozoite

Cyst

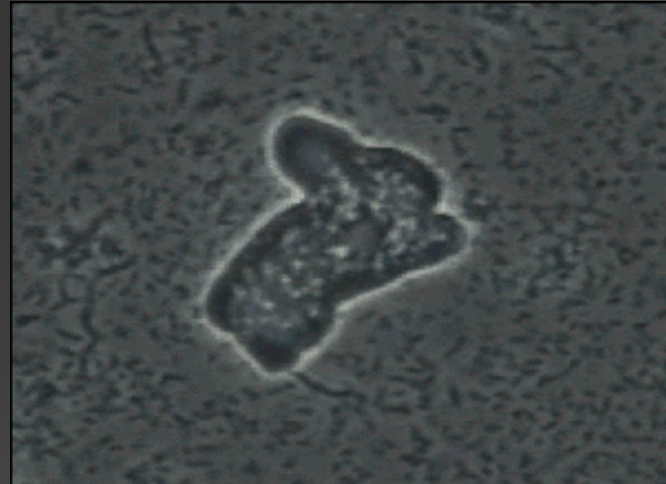


Giardia
lamblia –
střevní
parazit,
prvok





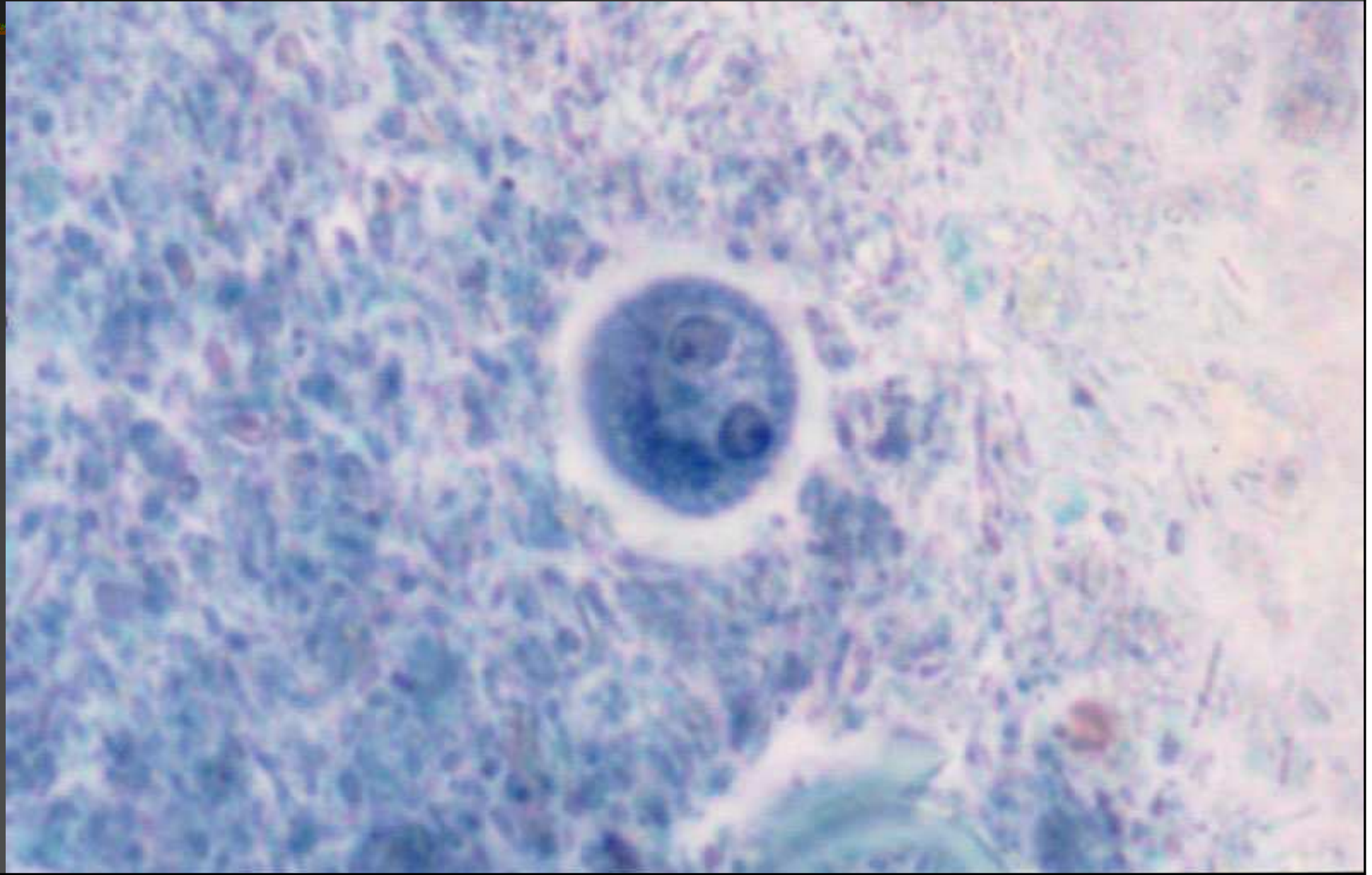
lamblia.mov



ameba.mov



Střevní paraziti VIII – měňavky (zde *Entamoeba histolytica*, trichrom)



O. Zahradníček: V menze

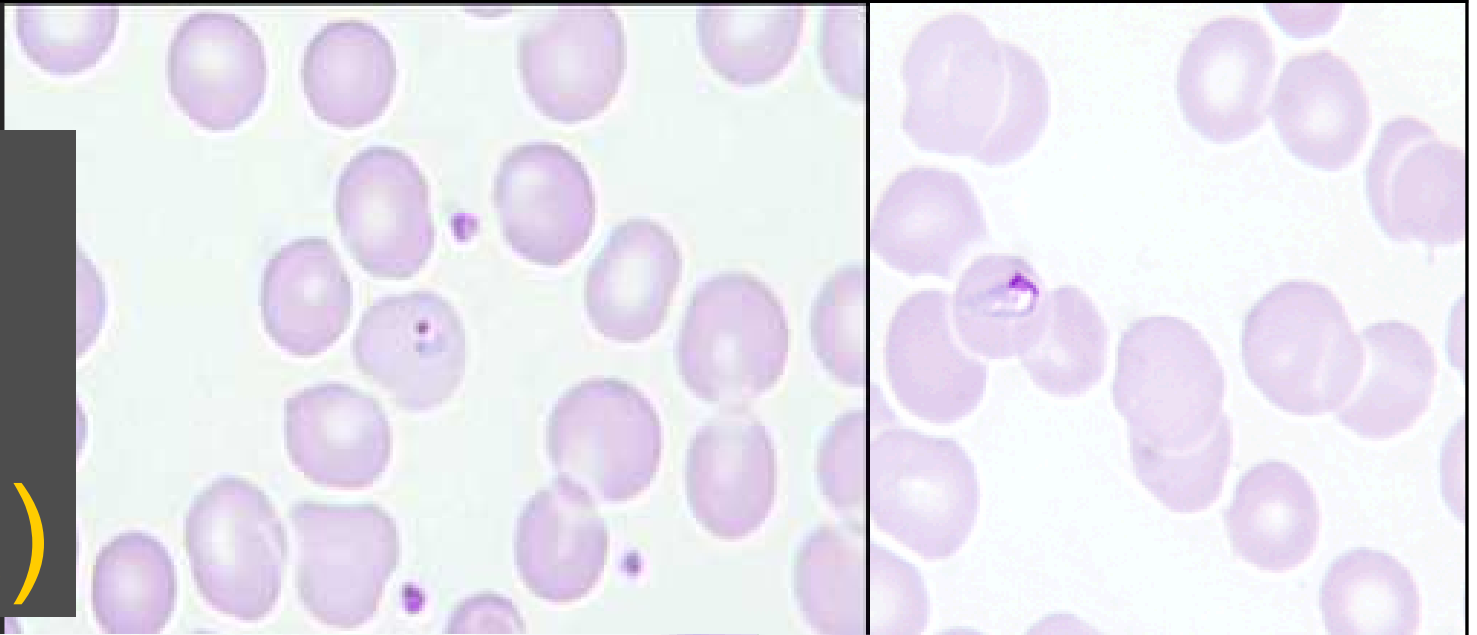
Šel jsem oběd naraziti

V menze byli paraziti

Škrkavky a lamblie

Spolužáčka tam...

Krevní paraziti I (plasmodia)

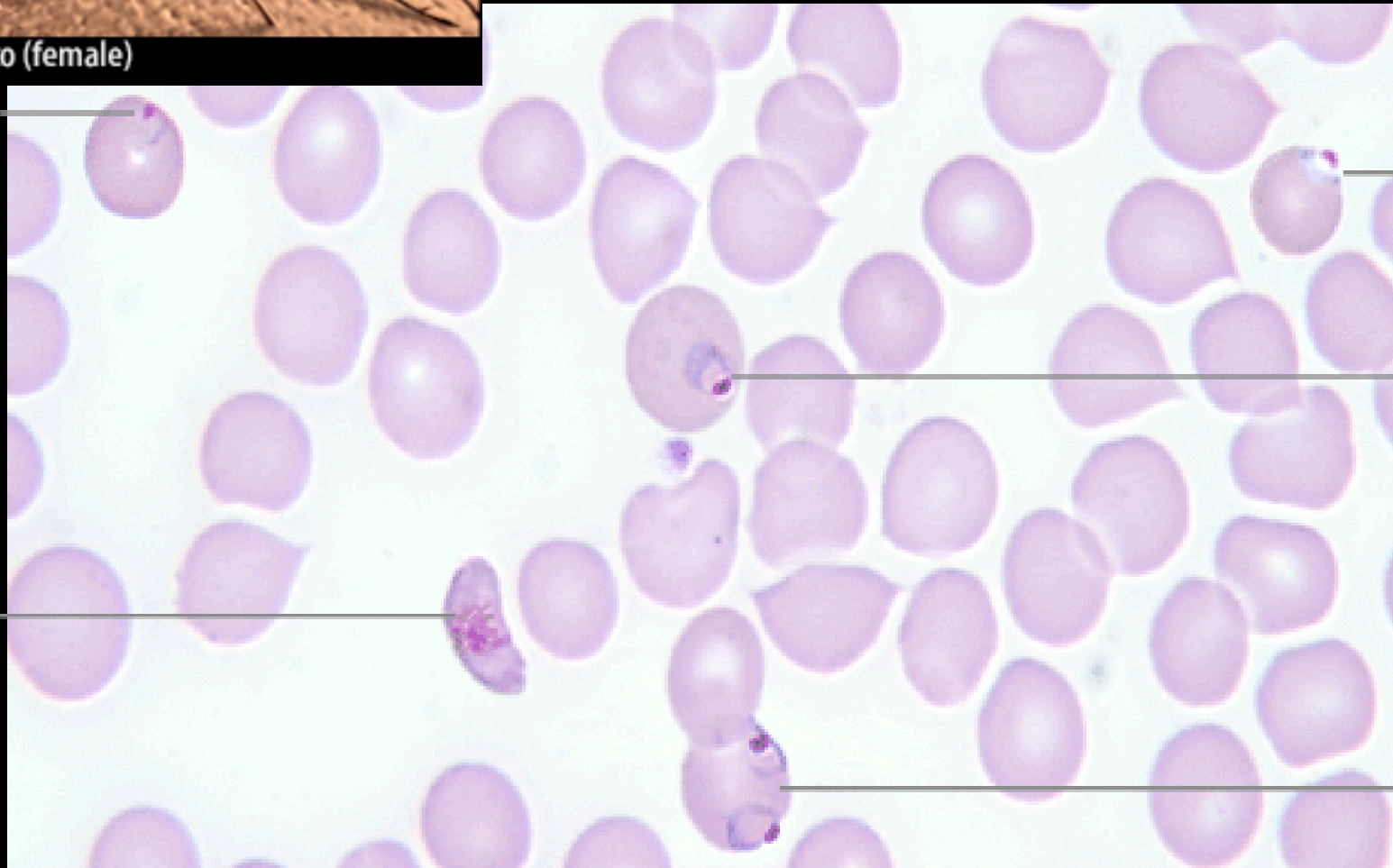


Různá vývojová stádia plasmodií

Krevní paraziti II a III (přenašeč malárie, různá stádia, na další straně vývojový cyklus plasmodií)



Anopheles mosquito (female)



Early trophozoite

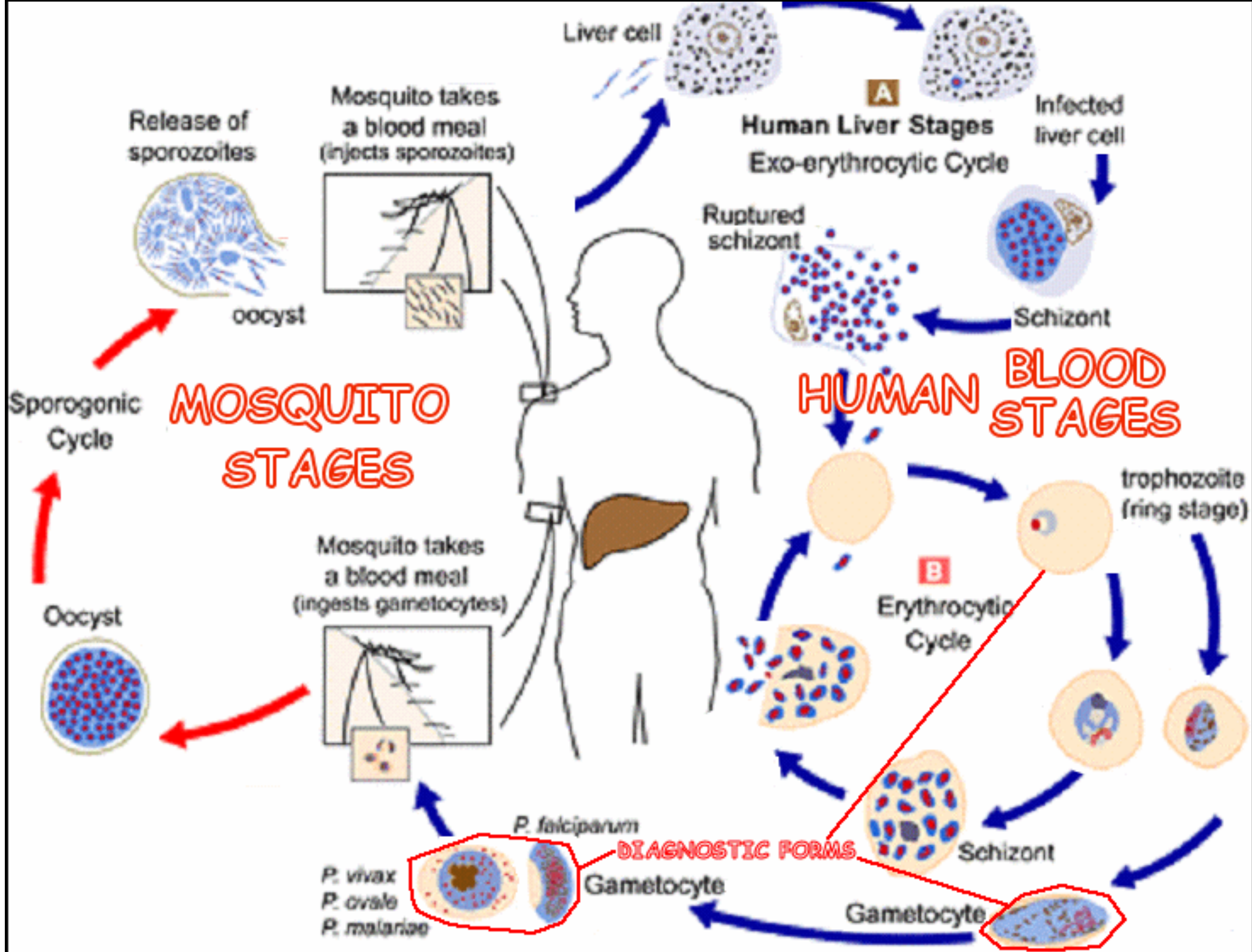
Appliqué form

Late trophozoite

Gametocyte

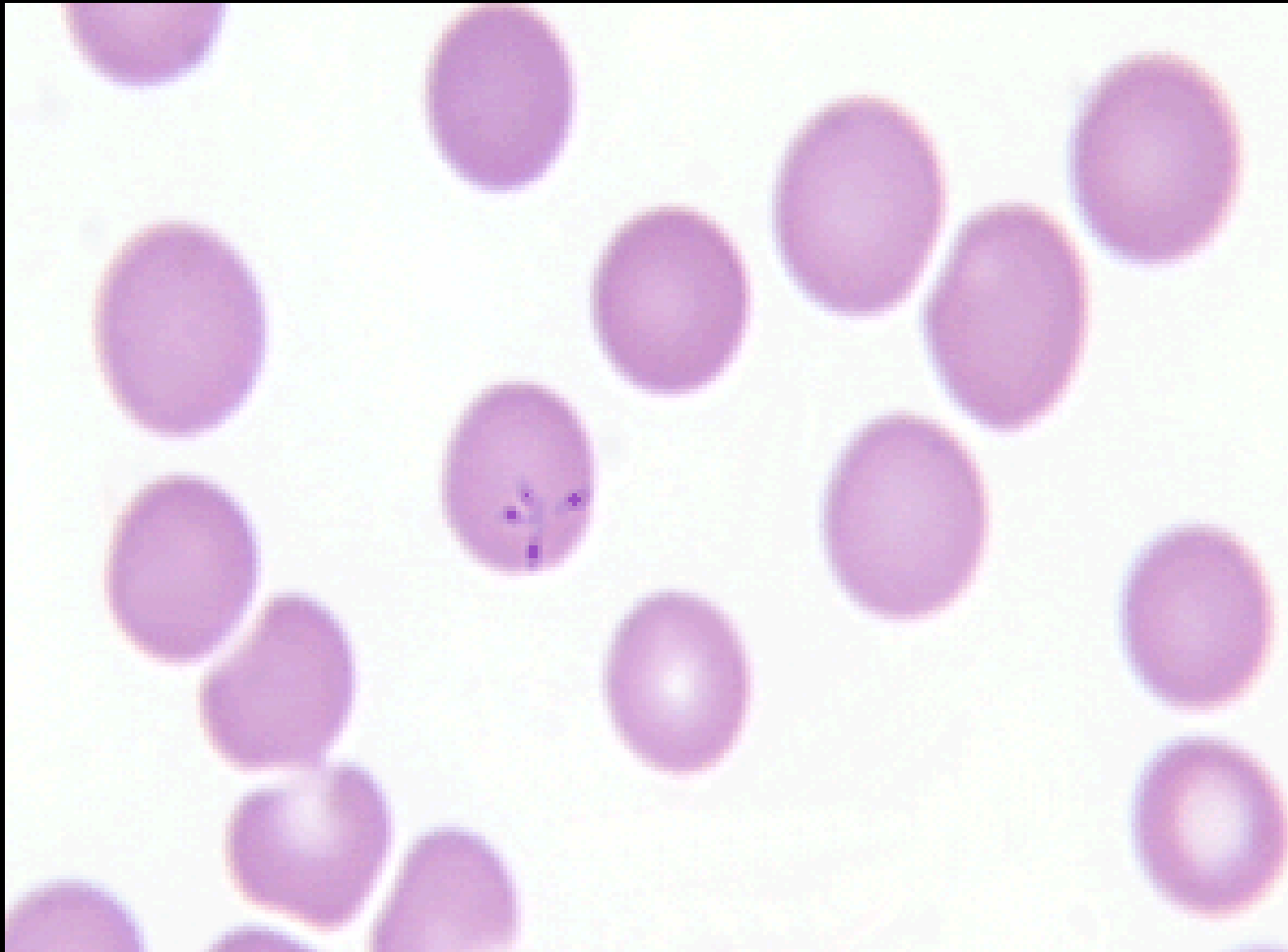
Double infection

Wright's stain (1000X)



Krevní paraziti IV – Babesie

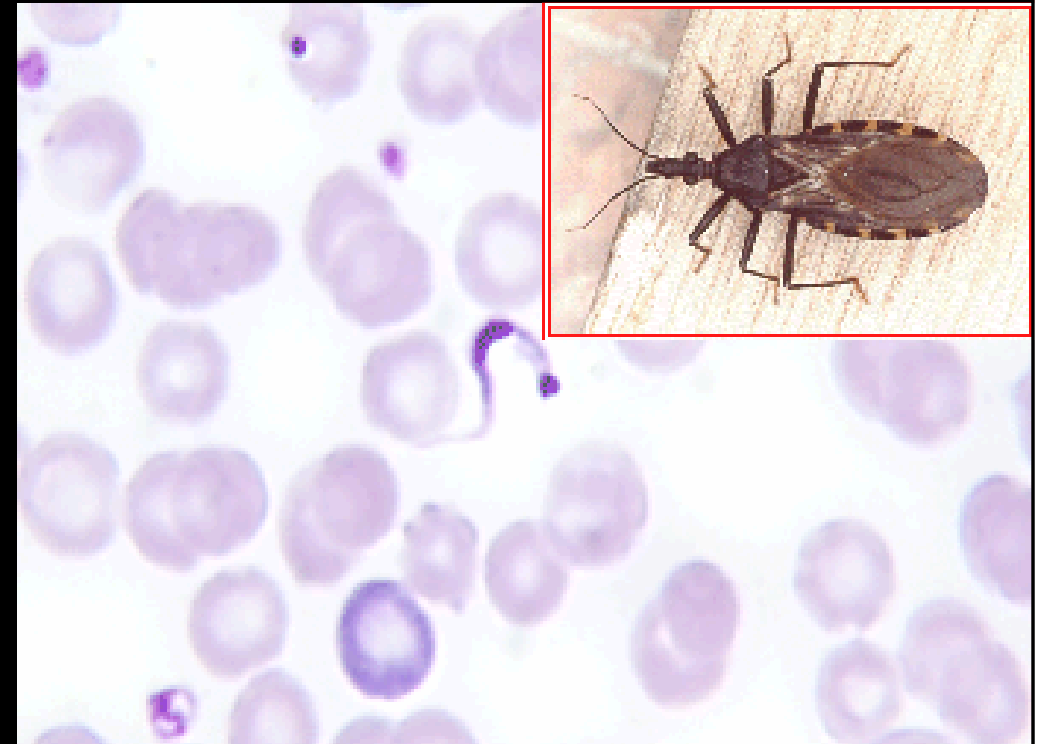
(příbuzní malárií, vyskytují se i v Evropě)



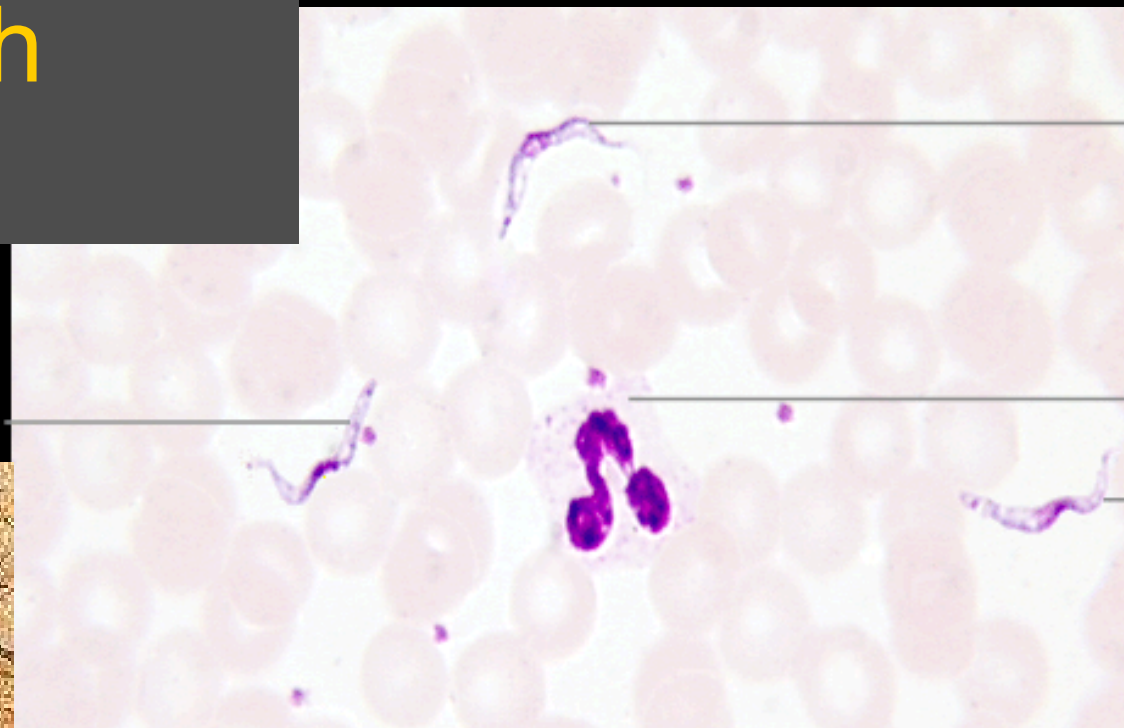
Wright's stain (1000X)

Typické jsou tetrády ve tvaru maltézského kříže

Krevní paraziti V
Trypanosoma sp.
– prvok
(bičíkovec),
Nahoře *T. cruzi*, dole
T. brucei, a jejich
přenašeči



Giemsa stain (1000X)



Trypomastigote

White blood cell

Trypomastigote

Trypomastigote

Giemsa stain (1000X)



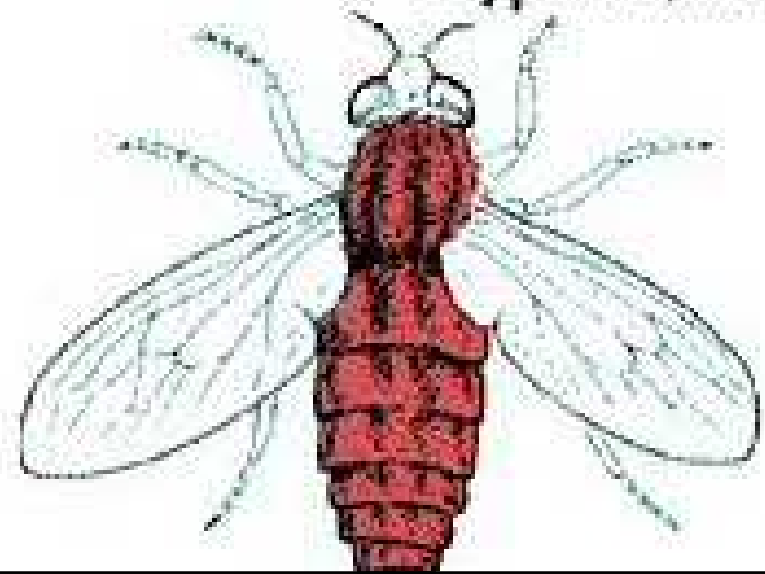
O. Zahradníček: Vánoce v Africe

Veselé Vánocece
Přeje mi ráno tse-tse



Glossinia
Tsetse Fly

Insect
Vector
for African
Trypanosomiasis



Krevní paraziti VI

Filárie – extraerytrocytární krevní paraziti

A – *Wuchereria bancrofti*

B – *Brugia malayi*

C – *Loa loa*

D – *Mansonella perstans*

E – *Mansonella ozardi*



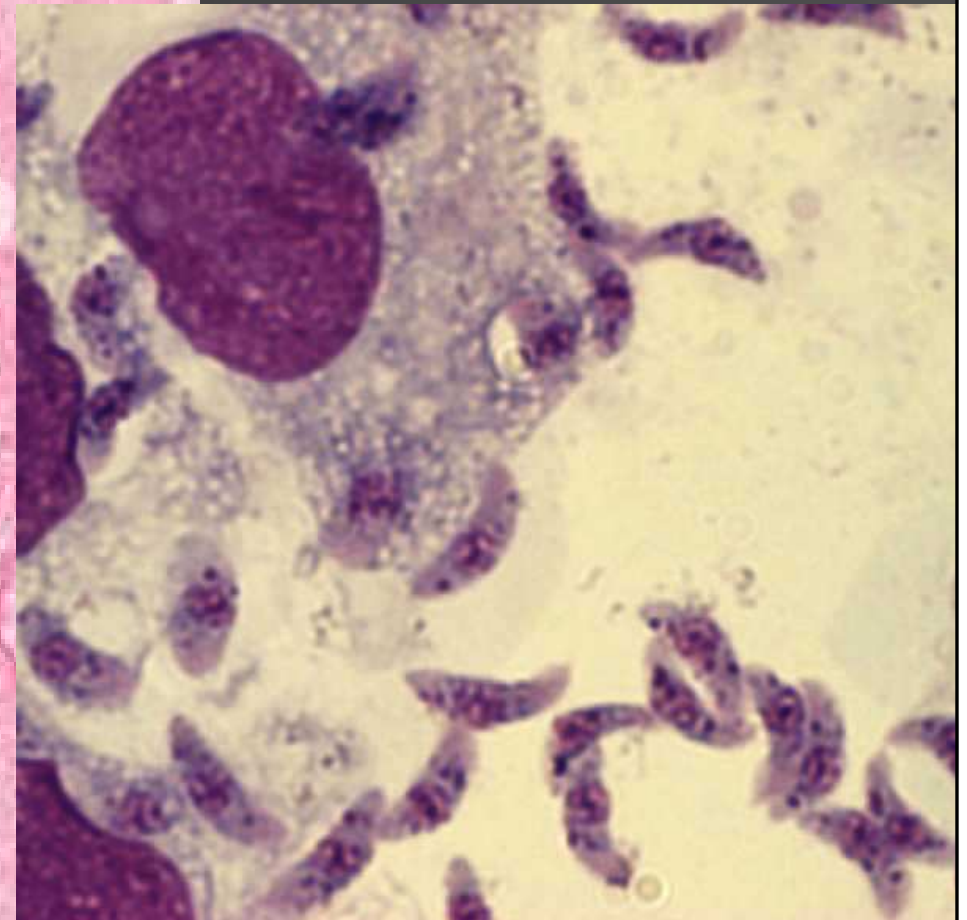
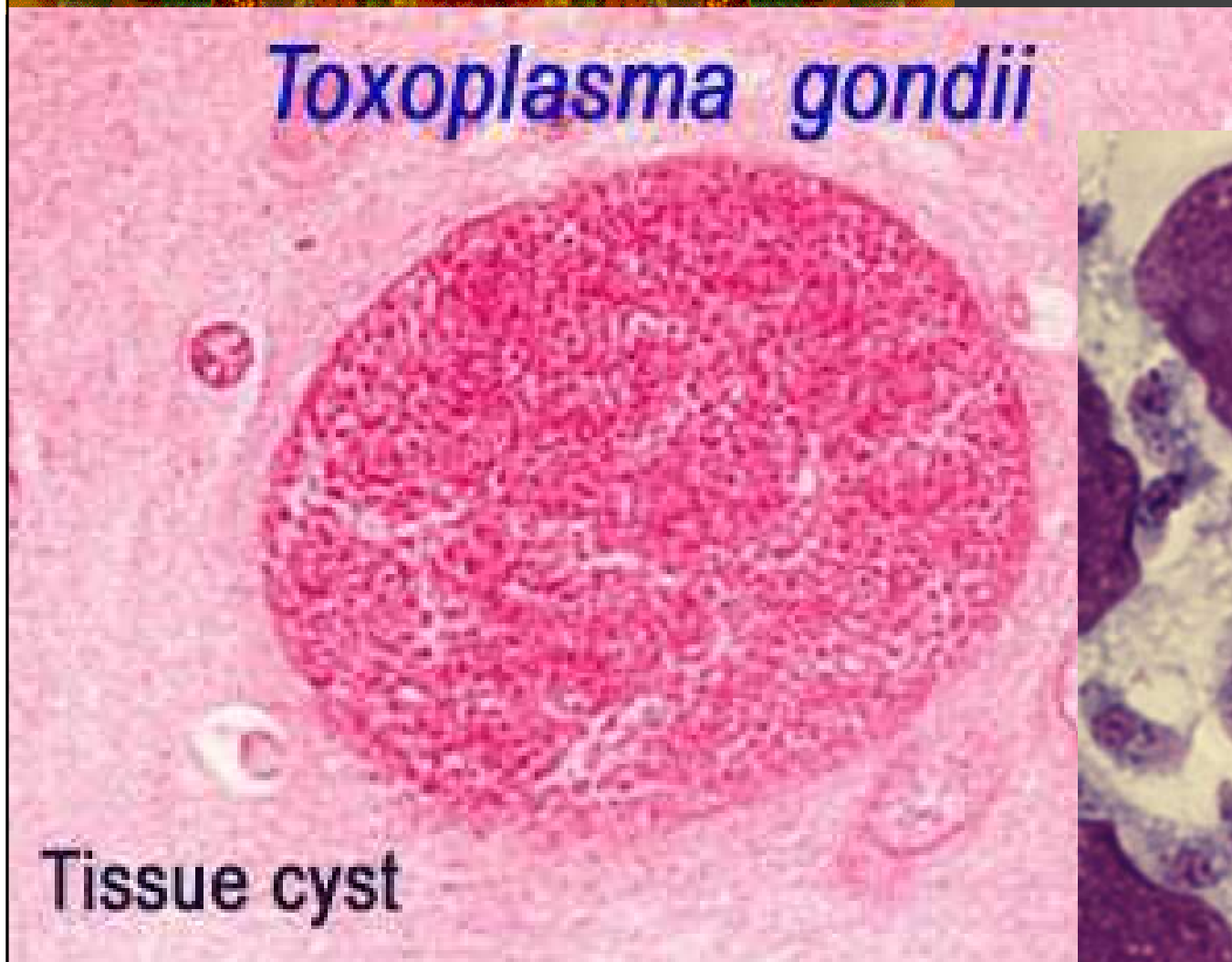
Krevní paraziti VII Filárie a trypanosoma – velikostní porovnání (ta kolečka jsou erythrocyty)



Tkáňoví paraziti I

Toxoplasma gondii

Vánoce jsou, padá vločka
toxplasmu nese kočka
(z básně O. Z.)



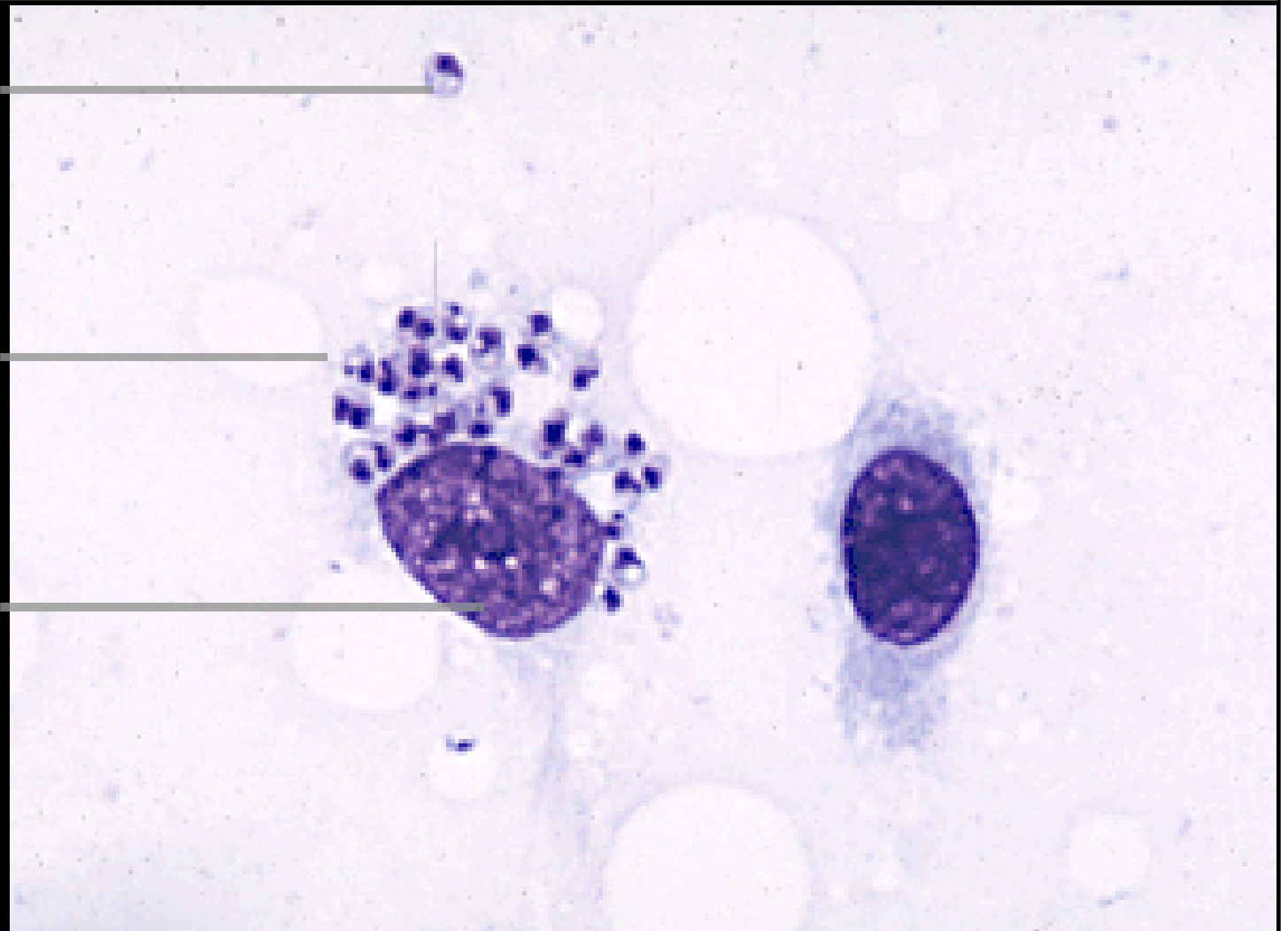
Tkáňoví paraziti II a III

Leishmania sp. (na další stránce životní cyklus parazita a různé kožní i viscerální formy nemoci)

Free amastigote

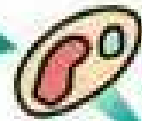
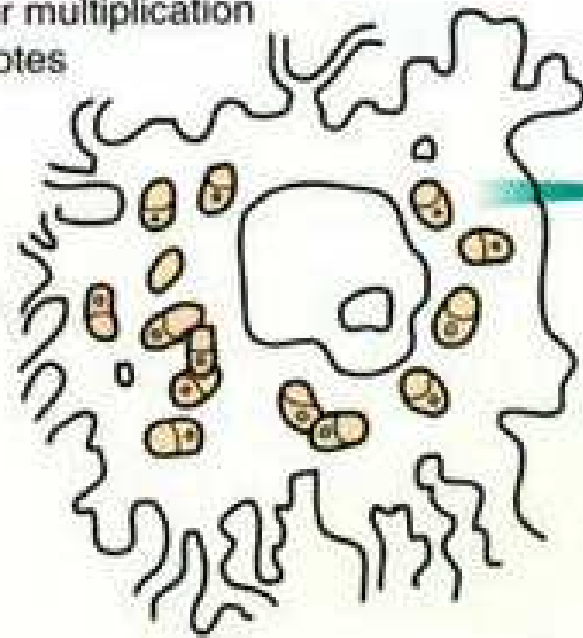
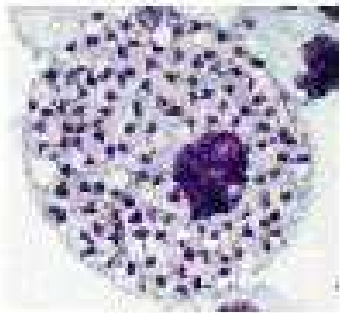
Amastigotes

Histiocyte
nucleus

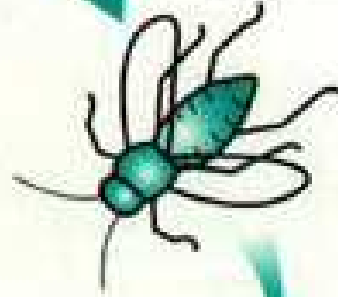


Imprint smear (Giemsa stain 1000X)

Intracellular multiplication of amastigotes

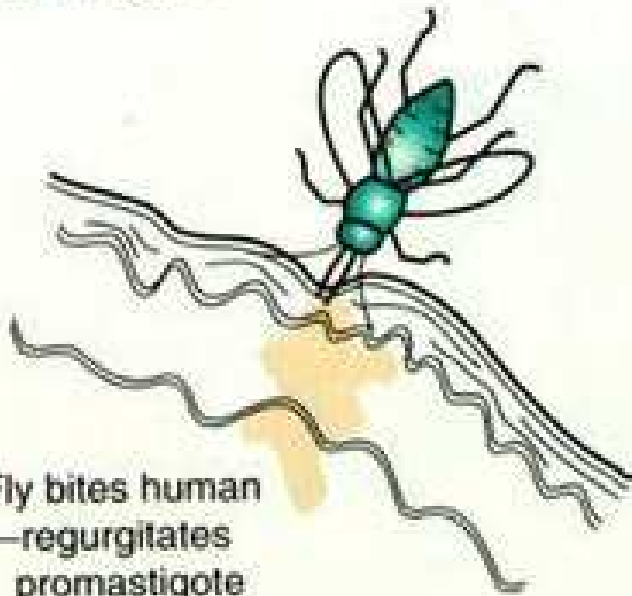


Sand fly ingests amastigote

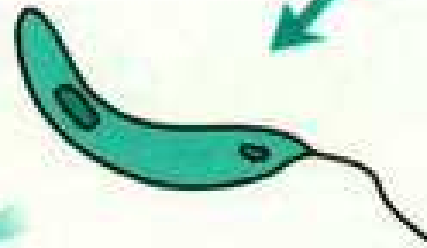


Phagocytosed by macrophage, transformed into amastigote

Transforms into promastigote in midgut of fly



Fly bites human — regurgitates promastigote



Leishmania
Species
Life Cycle



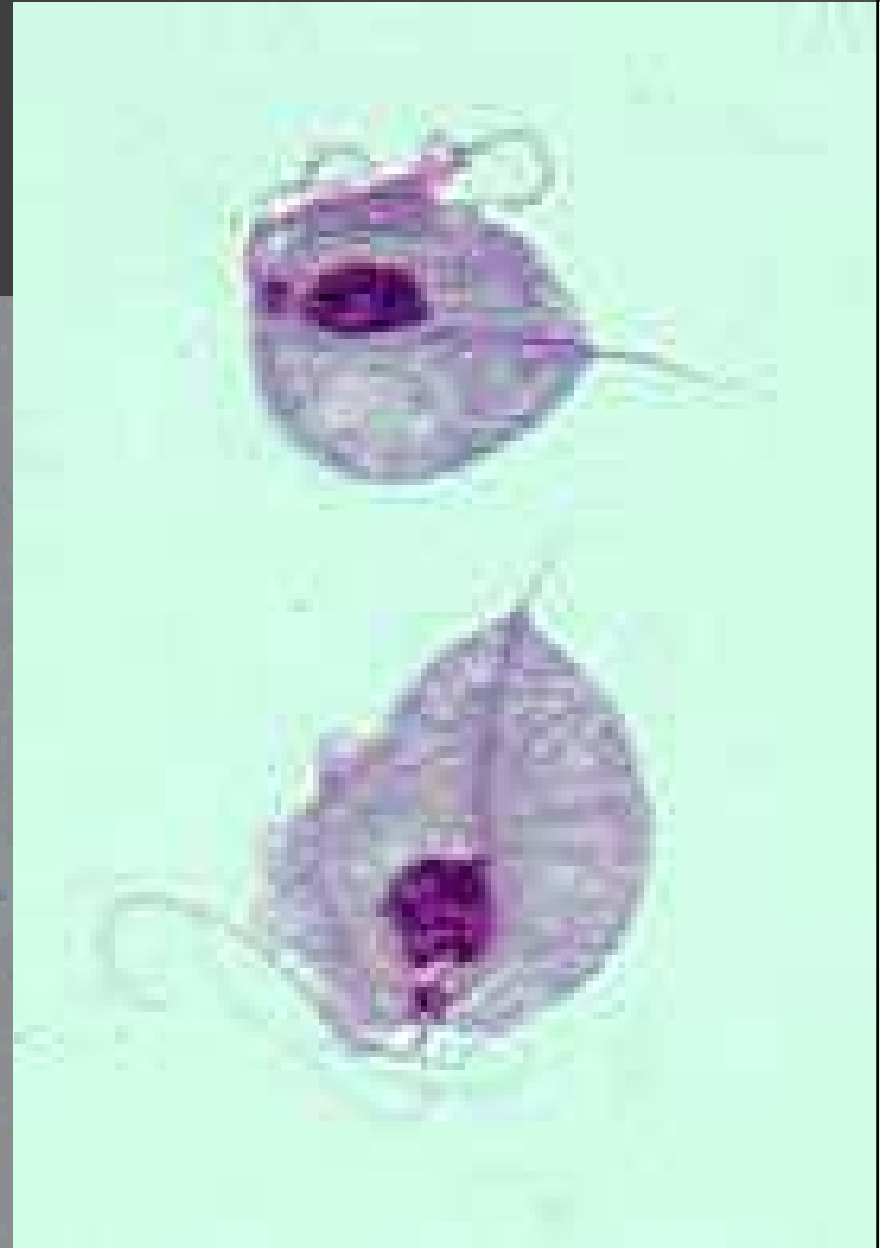
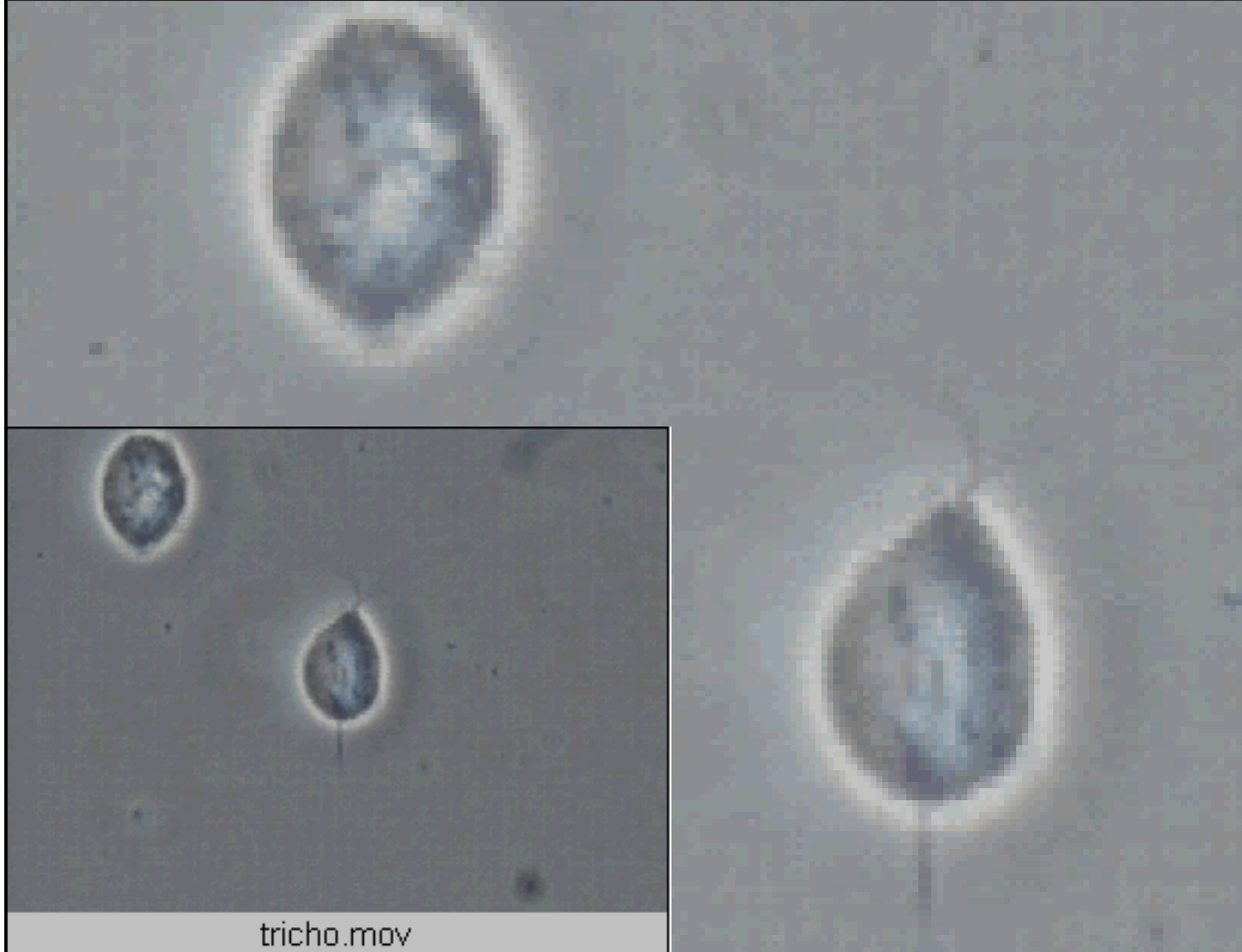
Tkáňoví paraziti IV – Tenkohlavec
bičíkový – *Trichuris trichiura* (vajíčko),
tkáňová škrkavka

Plug

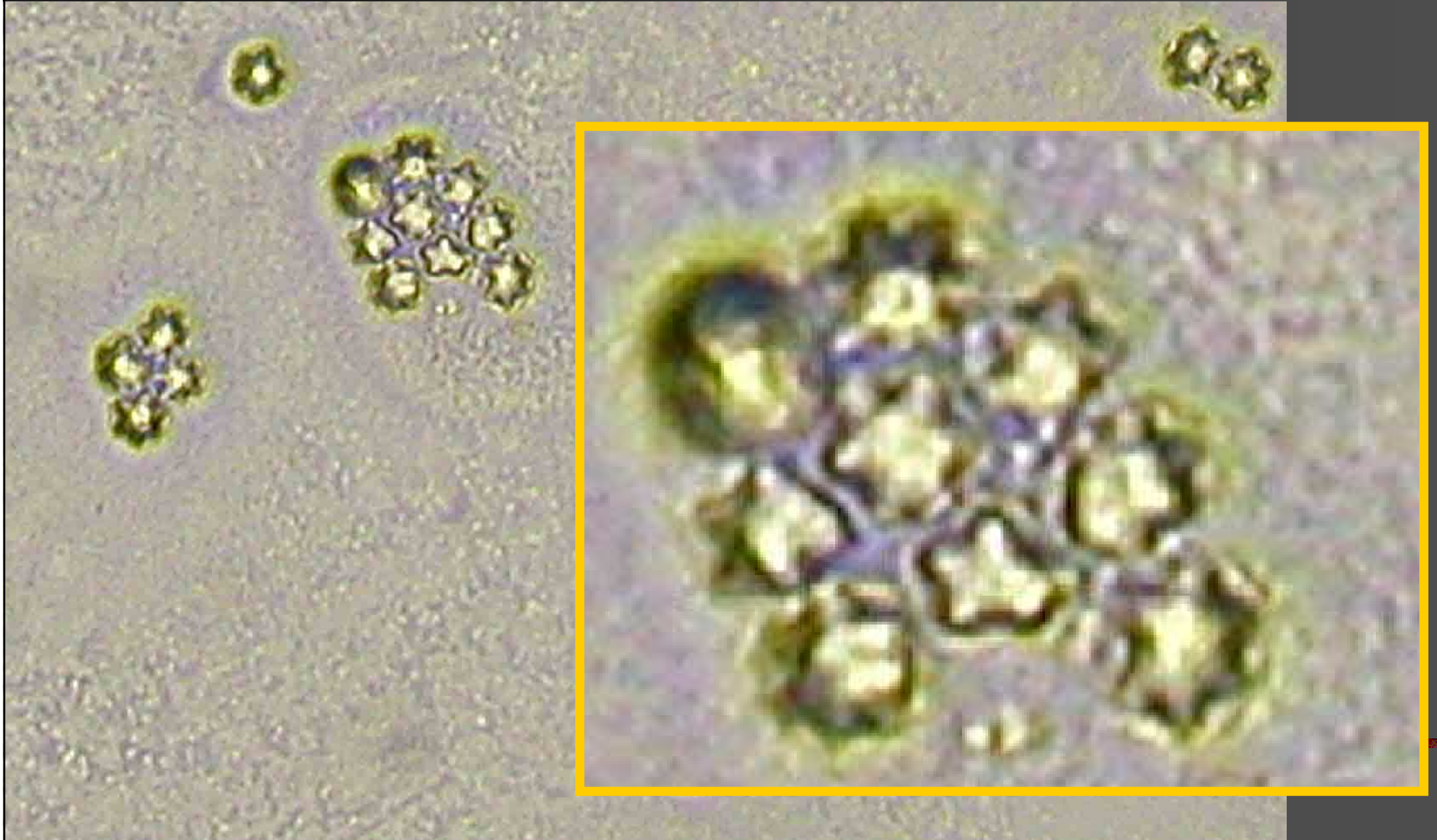


Wet Mount (400X)

Ostatní paraziti I *Trichomonas vaginalis*, česky bičenka poševní



Ostatní paraziti II *Acantamoeba* sp. – prvok, oční



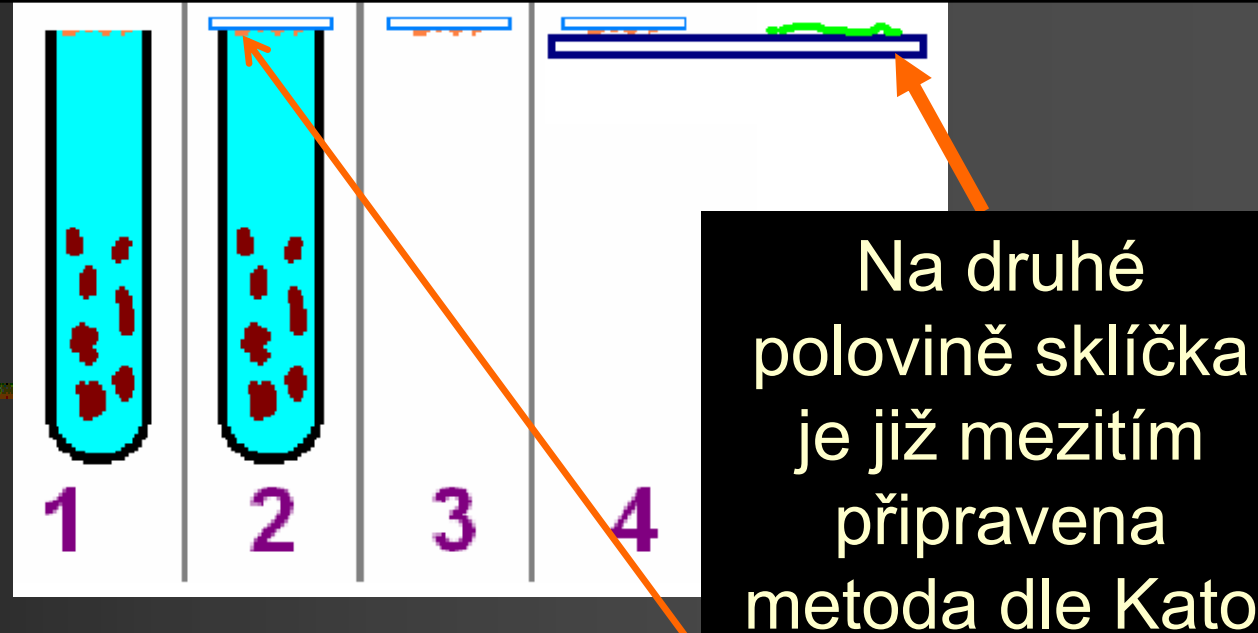
Paraziti: diagnostické metody obecně

- Důležitá je mikroskopie, buď nativní preparát. nebo **barvení** (trichrom, Giemsovo barvení)
- **Kultivace** se používá zřídka, prakticky jen u trichomonád a akantaméb.
- Z jiných metod **přímého průkazu** se prosazuje v poslední době PCR
- **Nepřímý průkaz** se používá u tkáňových parazitóz, zejména toxoplasmózy, larvální toxokarózy a dalších

Diagnostika střevních parazitů

- Mikroskopie je v každém případě základem
- Diagnostika vajíček červů, popř. článků tasemnic:
 - Používá se nativní preparát v různých modifikacích
 - U metody dle Kato se používá dobarvení pozadí malachitovou zelení, aby se paraziti zvýraznili
 - Faustova metoda je koncentrační (viz dále)
 - Grahamova metoda se používá jen u roupů (viz dále)
- Diagnostika střevních prvoků (améb, lamblíí)
 - Nativní preparát nestačí, používá se barvení, nejčastěji tzv. Gomoriho trichrom

Faustova metoda



- Princip spočívá v tom, že se **stolice opakovaně smíchá s roztokem síranu zinečnatého a centrifuguje**. Nakonec se roztokem doplní až po vršek zkumavky, překryje krycím sklíčkem, a to se pak opatrně přenese na podložní sklíčko, kde je již na druhé polovině nachystán preparát připravený dle Kato. Paraziti ulpívají na krycím sklíčku zespodu (viz obrázek)

Poznámka k odběru stolice při vyšetření na střevní parazity

- Posílá-li se stolice na parazitologické vyšetření (obvykle realizované kombinací metod Kato a Faust), je nutno – na rozdíl od bakteriologie – zaslat **vzorek stolice velikosti lískového ořechu**. Nádobka, ve které je zasílán, nemusí být výjimečně sterilní. Na rozdíl od virologického vyšetření není nutno chladit.
- *Vzorek velikosti kokosového ořechu (jak občas tvrdí někteří studenti) se nedoporučuje 😊*

Grahamova metoda v diagnostice roupu

- Spočívá v tom, že pacient se předkloní, roztáhne „půlky“, načež je mu na anální otvor (a hlavně perianální řasy) nalepena **speciální průhledná lepicí páska**. Ta je pak odlepena a **nalepena na podložní sklíčko**
- **Průhlednost pásky je zásadní**, jinak dost dobře nelze mikroskopovat (Jsou i experti, kteří zasílají pásku neprůhlednou, anebo ji celou přelepí štítkem)
- Je **jednodušší než vyšetření stolice**. Používá se však častěji u dětí – dospělí totiž mívají příliš chlupatou řiť, takže provedení metody by bylo obtížné a bolestivé

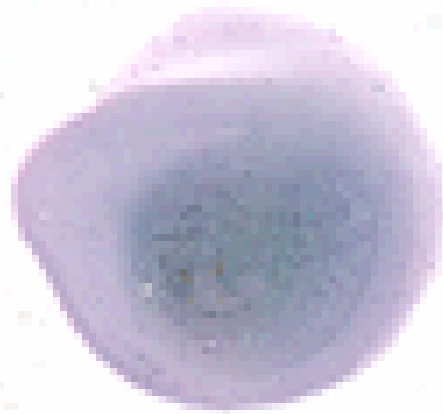
Diagnostika krevních parazitů: Tlustá a tenká kapka

- V diagnostice krevních parazitů je důležité provedení nátěru metodami tzv. **tenkého nátěru a tlusté kapky**.
- Pro obě metody se používá čerstvá, nebo (provádí-li se nátěr až v laboratoři) nesrážlivá krev. Tenký roztěr se fixuje, tlustá kapka ne. Oboje se pak barví **Giemsovým barvením**.
- Prohlédněte si obrázky na následující obrazovce a krátké videoklipy, z CD-ROMu „Parazite Tutor“.



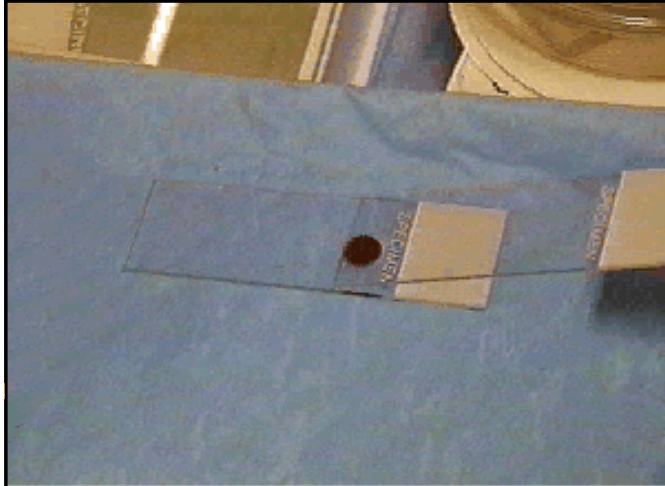
SPECIMEN

Tenký nátěr

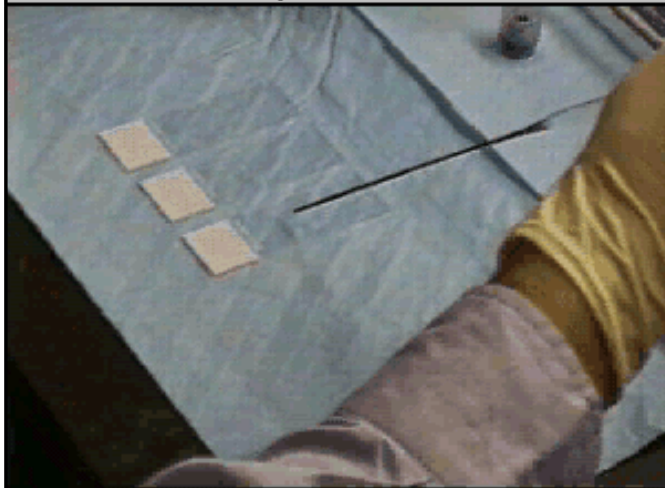


SPECIMEN

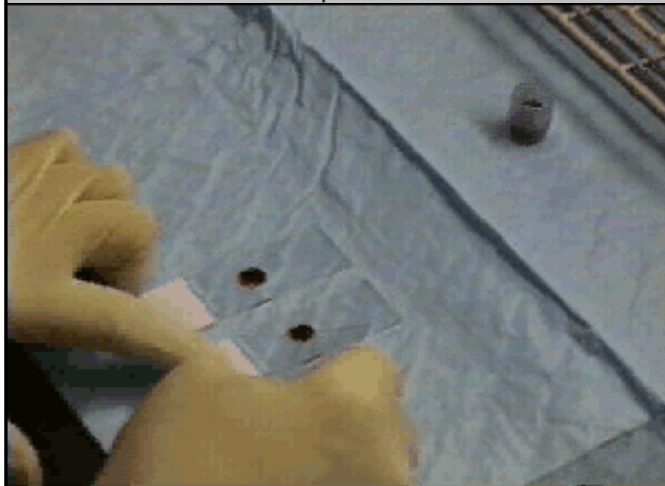
Tlustá kapka



tenky rozter.mov

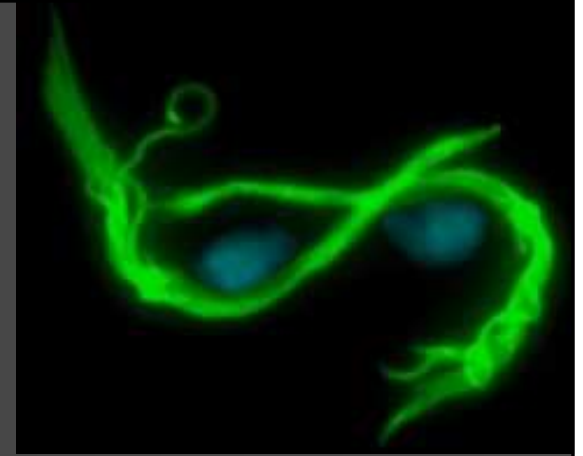


tlusta kapka 1.mov



tlusta kapka 2.mov

Diagnostika trichomonád



- Trichomonády se v poslední době diagnostikují zejména **kultivačně-mikroskopickým vyšetřením**:
 - odebere se **výtěr na tamponu zanořeném do média C. A. T.**
 - médium se nechá **kultivovat** do druhého dne
 - kapka média se **mikroskopuje jako nativní preparát.**
- Tyto preparáty však **nelze uchovat**
- Proto v praxi máme druhý možný způsob – **nátěr na sklíčku barvený dle Giemsy**. Je-li součástí MOP, označuje se jako MOP V.
- Jiné možnosti (např. fluorescenční barvení jako na obrázku) se používají jen výjimečně.

Diagnostika ostatních parazitárních nákaz

- U **ektoparazitů** leží diagnostika z větší části mimo rámec mikrobiologie – vši spatří i laik, zákožky případně dermatolog
- U **tkáňových parazitů** se zasílá zpravidla sérum
- V některých případech, zejména tropických parazitóz, je lépe **konzultovat odběr a jeho provedení s laboratoří**

U některých filarióz se doporučuje provádět odběr pouze v noci, popř. pouze ve dne

Ú 1: Prohlédněte si mikroskopické preparáty trichomonád

Pozor, nečekejte učebnicově krásné prvoky!

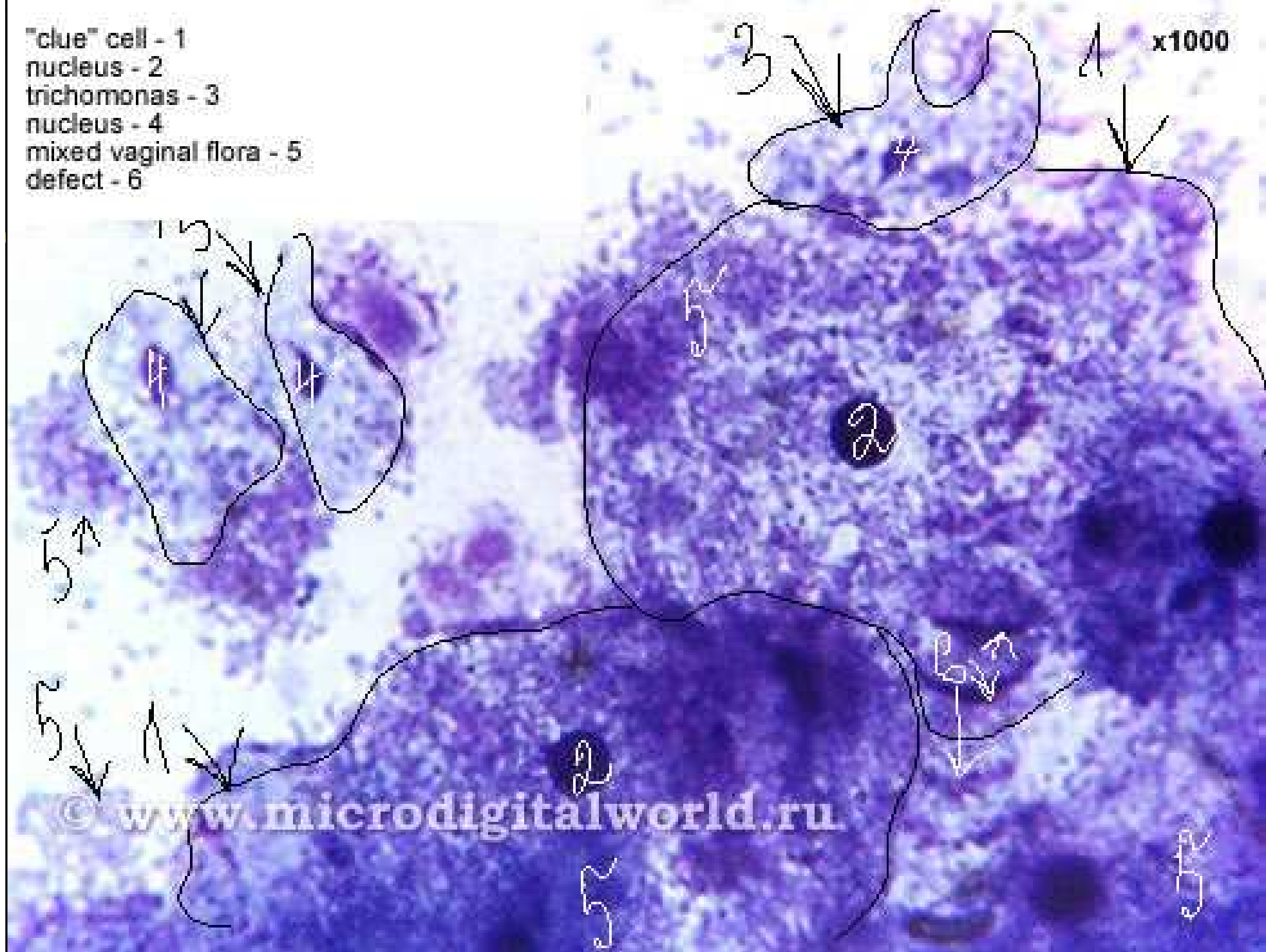
- Mikroskopujte **s imerzí** (objektiv 100×, imerzní olej)
- V některých preparátech mohou být kromě trichomonád **i kvasinky**, nenechte se tím zmást!
- To, co většinou najdete na internetu, jsou ideální případy, často navíc speciálním způsobem barvené, případně jsou obrázky počítačově upravené.
- Reálný vzhled MOP V barveného Giemsou ukazují následující obrázky.



Photo by: Dr S.M. Sadjjadi
parasito@sums.ac.ir

- "clue" cell - 1
- nucleus - 2
- trichomonas - 3
- nucleus - 4
- mixed vaginal flora - 5
- defect - 6

x1000



© www.microdigitalworld.ru

Úkol 2: Morfologie vajíček střevních parazitů

Obkreslete si vajíčka odtud nebo z obrazů na svých pracovních stolech



Roup

Enterobius

Tenkohlavec

Trichuris



Škrkavka

Ascaris

Tasemnice

Taenia



Úkoly 3, 4 a 6: Mikroskopie střevních parazitů

- Na bočním stole máte sklíčka, která obsahují Faustovu metodu a metodu dle Kato.
- Sklíčko k **Faustově** koncentrační metodě bylo **přemístěno pinzetou** na jednu polovinu podložního sklíčka
- *(Na bočním stole máte na ukázkou i původní zkumavky s dalšími sklíčky)*
- Na druhé polovině sklíčka je již nachystán preparát dle **Kato (to je ten zelený)**

Úkoly 3, 4 a 6: Mikroskopie střevních parazitů - pokračování

- Obě mikroskopujte společně, bez imerze, objektivy 10×, 20×, 40×. To, co uvidíte, je obraz normální stolice – sklíčka jsou negativní.
- Prohlédněte si také sklíčko s lepicí páskou – vyšetření roupů Grahamovou metodou.
- Zde jsou některá sklíčka pozitivní, obsahují vajíčka roupů.

Už mne nebudete potřebovat!
Vypnuli jste mne, očistili a zakryli?



Úkol 5 – diagnostika *Toxoplasma gondii* serologickými testy

- Jak již bylo řečeno, u tkáňových parazitů se často používá nepřímý průkaz
- **Část 5a) je KFR – boční stůl.** První důlek je test antikomplementarity séra (viz J09), ve druhém ředění 1 : 5, dále geometrickou řadou (1 : 10, 1 : 20, 1 : 40, 1 : 80 atd.) . Pozitivní je nepřítomnost hemolýzy, negativní je hemolýza
- **Část 5b) je ELISA** – způsob výpočtu: co je vyšší než $(C1 + D1) : 2$, je pozitivní. A1 je blank, B1 negativní, E1 pozitivní kontrola.

Úkol 7 – demonstrace lihových preparátů

- Prohlédněte si na bočním stole naše tasemnice, škrkavky a roupy, naložené v lihu*

Úkol 8 – demonstrace životních cyklů některých parazitů

- Prohlédněte si obrázky životních cyklů parazitů na pracovních stolech, a aspoň jeden si přeneste do protokolu. Nezapomeňte si zapsat název „svého“ parazita!

**poznámka: zatímco sami se raději přestaňte nakládat do lihu a začněte se učit mikrobiologii! 😊*



Než opustíte
praktikárnu...

...pláště laskavě nepohazujte po
praktikárně, nýbrž je pověste na
věšák tak, aby nespadly.

Pokud jste otevřeli nějaké okno...

...tak ho nezapomeňte zase zavřít



Nashledanou při dalším dílu!

Obrázek na této stránce – toxoplasmóza v uměleckém ztvárnění

Dnes použity obrázky z CD-ROM „Parasite-Tutor“ – Department of Laboratory Medicine, University of Washington, Seattle, WA

www.medmicro.info

- 01 http://depts.washington.edu/nnptc/online_training/std_handbook/gallery/images/trichomonasDschg.JPG
- 02 holebi.info/gids.php
- 03 <http://webmedia.unmc.edu/intmed/general/demo/wh/vsdx4001.htm>
- 04 <http://medschool.sums.ac.ir/users/parasto/Intestinal%20and%20luminal%20protozoa/Trichomonas%20vaginalis1.JPG>
- 05 http://en.microdigitalworld.ru/imgs/en_gard+tr_1_b_ink.jpg
- 06 http://www.microdigitalworld.ru/imgs/4tr_b.jpg
- 07 http://www.bu.edu/cme/std/images/slide7-vwp_g420.jpg
- 08 http://www.ncl.ac.uk/microbial_eukaryotes/christophej_no_euml_l.html
- 09 <http://www.smittskyddsinstitutet.se/upload/Analyser/ToxoplasmaSB-a.jpg>
- 10 http://fullmal.hgc.jp/tg/icons/Toxo_ultrastructure.gif
- 11 http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/images/Parasitelimages/S-Z/Toxoplasmosis/Toxoplasma_LifeCycle.gif
- 12 http://tn3-2.deviantart.com/300W/fs7.deviantart.com/i/2005/189/1/9/toxoplasma_by_chocko.jpg
- 13 http://webdb.dmasc.moph.go.th/ifc_nih/applications/pics/Toxoplasma.jpg
- 14 - 24 http://web.indstate.edu/thcme/micro/parasitology/toxoplasma_lifecycle.gif
- 25 http://www.antoranz.net/CURIOSA/ZBIOR3/C0311/03-QZC08043-3_Toxoplasma.jpg

