

Mikrobiologický ústav uvádí

NA STOPĚ PACHATELE

Díl čtrnáctý:

Opakování

Autor prezentace: Ondřej Zahradníček (kontakt: zahradnicek@fnusa.cz). K praktickému cvičení pro Bi7170c

Základní informace

- Student si vytáhne **jeden z 50–60 úkolů**
- Ke každému z praktik jarního a podzimního semestru přináleží **cca dva až čtyři úkoly**.
Některé úkoly náležejí k více praktikům (např. ASLO k neutralizaci i ke streptokokům)
- Některé části praktik jsou sice mimo úkoly, nicméně studenti na ně **mohou být tázáni**
- **Následující přehled je sestaven dle témat mediků, která jste ovšem (byť zkráceně a zhuštěně) probrali také.**

J01: mikroskopie.

Musíte znát přípravu mikroskopického preparátu.

- **Pokud máme kmen:**

- kápneme na podložní sklíčko kapku fyziolog. 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, nesusíme. **Pouze přikryjeme krycím sklíčkem a pozorujeme objektivy, které zvětšují např. 4 ×, 10 × či 40 ×.**
- **Nepoužíváme imerzní olej**
- **Pozor! Kdo namočí neimerzní objektiv do imerzního oleje, okamžitě končí a u zkoušky neuspěl!!!**

Nativní preparát – postup (u kmene)

1 x

10 x

20 x

10 x

Příprava barveného preparátu

- **Nezapomeňte na přípravu před barvením, nezaměňujte fixaci a sušení 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, kontrolující hřbetem ruky teplotu.

Příprava barvených preparátů

→ (A 60 20 100 1)
(A 50 20 100 1)

3

7a: voda

8

9

1

2

4

5 X

Gramovo barvení – princip

Chemikálie	Grampozitivní	Gramnegativní
Krystal. violet'	Obarví se fialově	Obarví se fialově
Lugolův roztok	Vazba se upevní	Upevní se méně
Alkohol	Neobarví se	Odbarví se
Safranin	Zůstanou fialové	Obarví se červeně

Gramem se nebarvící bakterie se neobarví v prvním kroku kvůli absenci buněčné stěny (*Mycoplasma*) nebo proto, že jejich stěna je vysoce hydrofobní (*Mycobacterium*).

Spirochety by se barvily gramnegativně, ale jsou velmi tenké, takže i je lze také vlastně považovat za „Gramem se nebarvící“ a Gram se v jejich diagnostice nepoužívá.

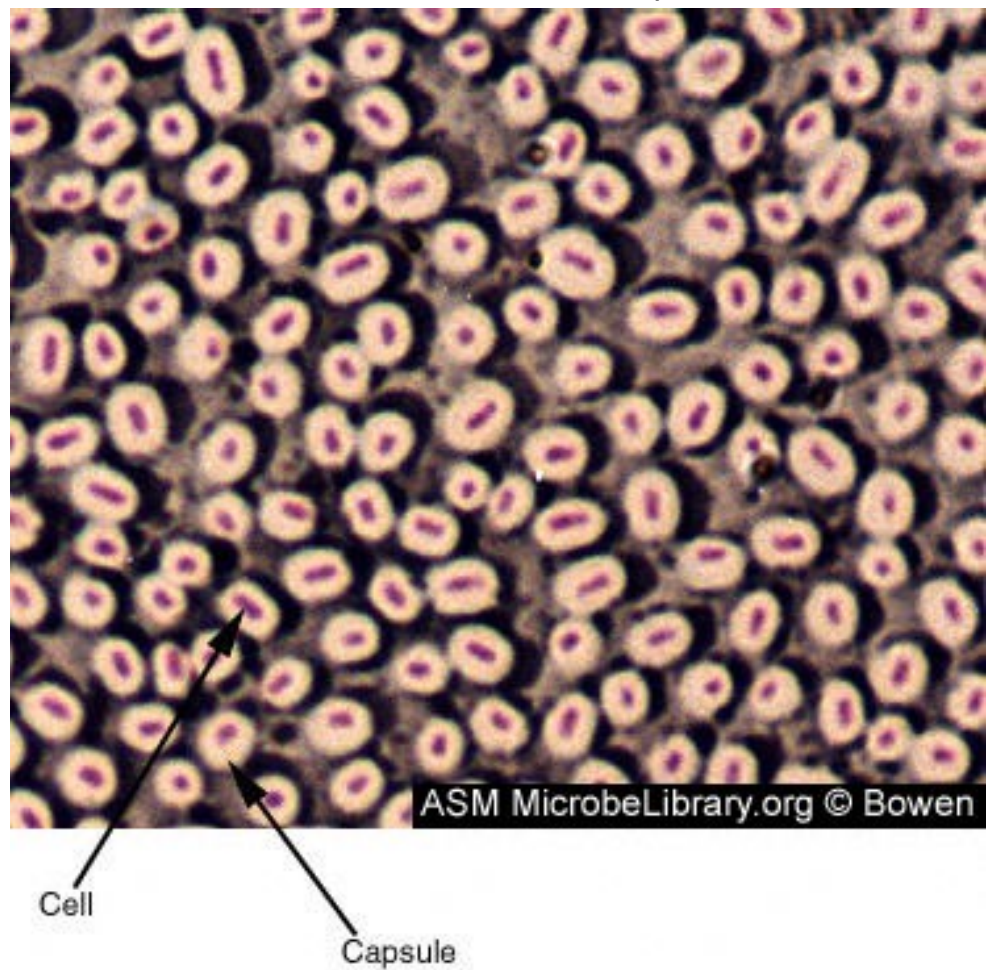
Gramovo barvení – postup

- **Genciánová violet' = Sol. Gram-Nowy (20 –) 30 vteřin**
- **Lugol (20 –) 30 vteřin**
- **Alkohol 15 (– 20) vteřin**
- opláchnout vodou – nezbytné!!!
- **Safranin 60 – 120 vteřin**
- opláchnout vodou
- osušit sušítkem* z filtračního papíru
- mikroskopovat jako v prvním úkolu

Barvení pouzder sice není v úkolech, ale můžeme se vás na ně také zeptat!

pathmicro.med.sc.edu

V barvení dle Burriho
byly nabarveny
bakterie na červenou a
pozadí dobarveno tuší;
mikroskopista pak tuší
pouzdro tam, kde se nic
neobarvilo.



Co ještě vědět

- Kromě zhotovení nativního preparátu a Gramem barveného preparátu se po vás také může chtít **odečíst již několik hotových sklíček** (nátěry ze vzorků).
- Zde se očekávají také vaše **znalosti z pozdějších praktik** (např. interpretace nálezu leukocytů ve sputu a obecně v klinickém materiálu, nález intraleukocytárních diplokoků v uretrálních výtěrech apod.)

Mikroskopie vzorku

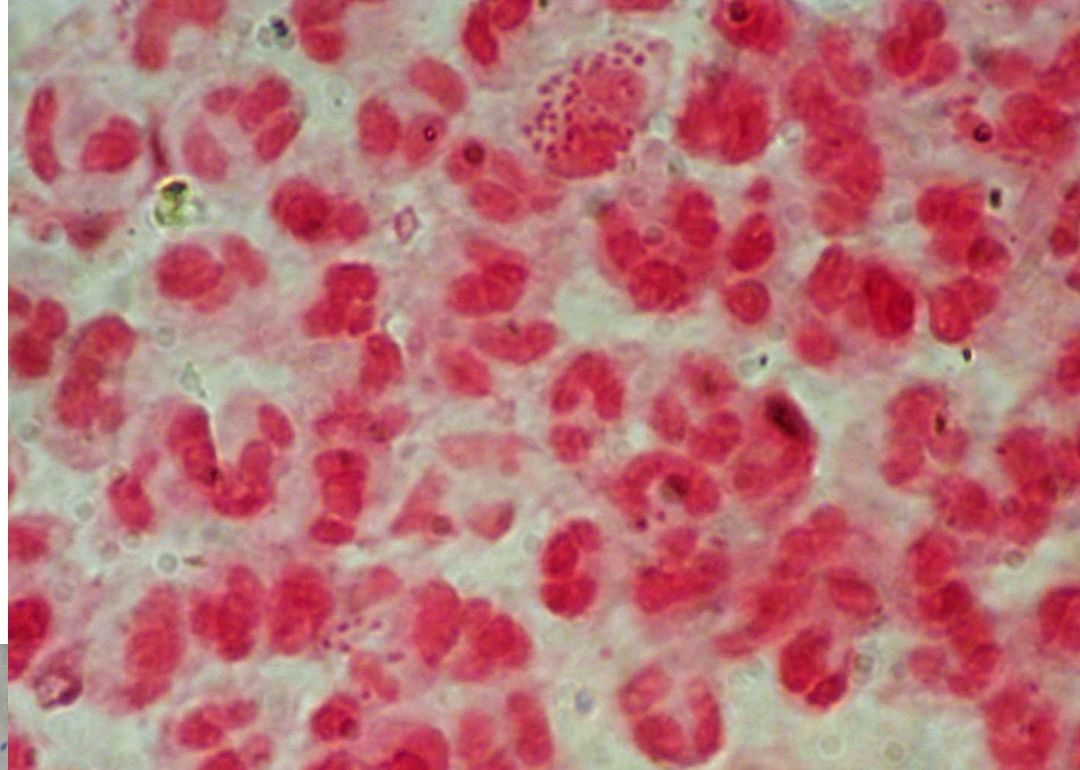
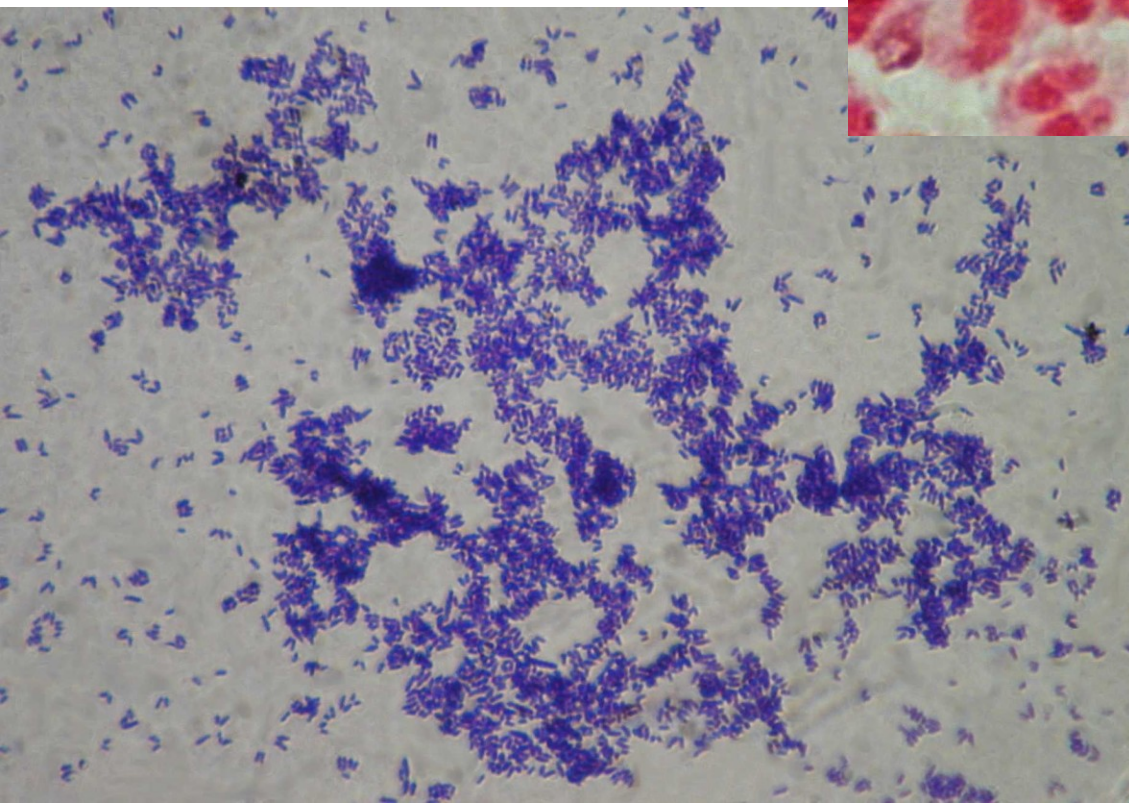


Foto O. Z.



Mikroskopie kmene

J02: Kultivace

Přeočkování agarové kultury

Vyžíhejte kličku

Naberte kmen

Naočkujte první úsek

Vyžíhejte kličku

Už znovu nenabírejte kmen

Naočkujte druhý úsek

Vyžíhejte kličku

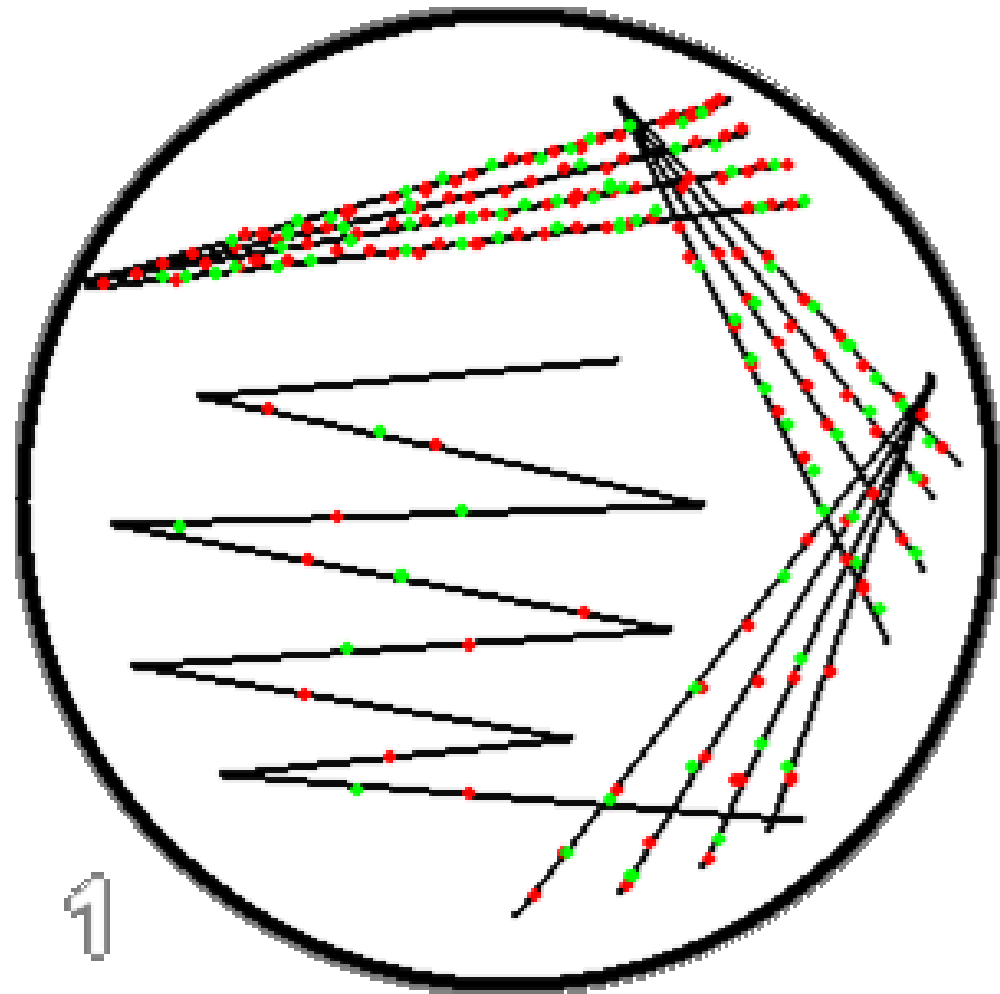
Už znovu nenabírejte kmen

Naočkujte třetí úsek

Vyžíhejte kličku

Už znovu nenabírejte kmen

Naočkujte „hádka“



Pozor!

- Úkol je těžší, než se zdá (zapomíná se na **vyžihání** mezi jednotlivými kroky, nebo se zapomene na to, že čáry se musí **křížit**)
- Naopak se **nehodnotí technická dokonalost čar** (je nám jasné, že nejste zkušení mikrobiologové ani laboranti)
- Jde tedy o pochopení (a případně i vysvětlení) **principu křížového roztěru**, ne o dokonalé technické provedení

Půdy po vás chceme primárně tyto (z praktika J02)

1. bujon
2. VL-bujon
3. selenitový bujon
4. Sabouraud
5. Löwenstein-Jenssen
6. KA
7. Endo
8. MH
9. NaCl
10. VLA
11. XLD (a MAL)
12. ČA
13. Levinthal
14. Slanetz-Bartley

S některými dalšími půdami se případně můžete u praktické zkoušky setkat také, ale spíše výjimečně a u jiných úkolů (speciální bakteriologie)

J03: biochemická identifikace

- **V rámci jiných úkolů (speciální bakteriologie a mykologie) určitě musíte být schopni provést:**
 - Katalázový test a testy s diagnostickými proužky (oxidáza, INAC, PYR) + znát kdy který použít
 - Hajnovu půdu použít k odlišení nefermentujících od fermentujících tyčinek; další přesné vlastnosti Hajnovy půdy a MIU se nepožadují, i když jejich znalost není na škodu
- **Jediný úkol čistě patřící k J03 je**
 - odečtení biochemického testu typu ENTEROtest (dostanete vše potřebné a test odečtete; nic více, ale také nic méně; důležité je určit i procento pravděpodobnosti a index typičnosti)

Provedení oxidázového testu



Foto: archiv MÚ

ENTEROtest 16

(530 063 = E. coli, 99,89 %, $T_{in}=1,00$)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	
	ONPG	H	G	F	E	D	C	B	A	H	G	F	E	D	C	B	A	
		První řádek panelu								Druhý řádek panelu								
+																		
-																		
?																		
?	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	
	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	
	5			3			0			0			6			3		

J04 Dekontaminační metody

Nutná znalost metodologického rozdílu

- Pokud chceme ověřit **mez přežití** bakterií, musíme je po odstranění testovaných extrémních parametrů přemístit do podmínek růstového optima a nechat je tam dostatečně dlouho.
- V opačném případě bychom ověřili pouze **mez růstu**, nikoli mez přežití.

Úkol: Vyhodnocení účinnosti desinfekce

- Nestačí jen říci, kolikaprocentní desinfekce je výsledkem testu, je také potřeba říci (a zdůvodnit!) že **jde o baktericidní, nikoli bakteriostatickou koncentraci desinfekce.**
- (V agaru, na kterém se bakterie pěstuje, už žádná desinfekce není.)

Další úkol

Vyhodnocení účinnosti horkovzdušné sterilizace

Rezistentní, sporulující bakterie	160 °C	170 °C	180 °C
20 min	přežívá	přežívá	hyne
30 min	přežívá	hyne	hyne
60 min	hyne	hyne	hyne

K oběma úkolům navíc

- patří **vytvoření dvojic z předložených lístečků** (například spárovat „sterilizace kovu, který nesnese vlhké teplo“ a „horkovzdušná sterilizace“)
- lístečky jsou v praktikárně k dispozici

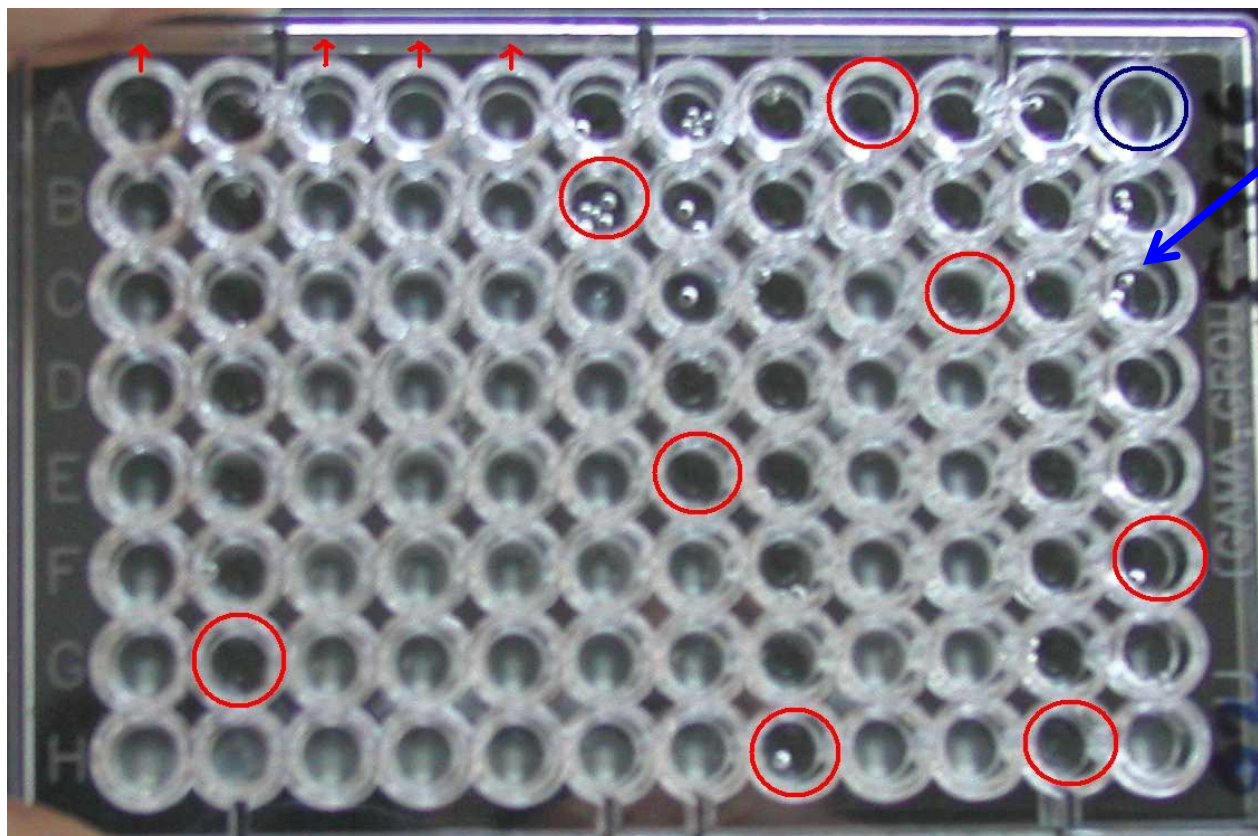
J05: Antimikrobiální látky

Nutná znalost kvalitativních i kvantitativních testů



Difusní diskový test:
odečíst, vysvětlit, že je
kvalitativní

Mikrodiluční test – odečtení



Někdy se v důlcích mohou objevit bublinky – při odečítání si jich nevšímejte

○ **MIC** ○ **growth control – kontrola růstu**

- Včetně porovnání s breakpointy a vysvětlení interpretace

E-test – není samostatným úkolem, ale znát byste ho měli

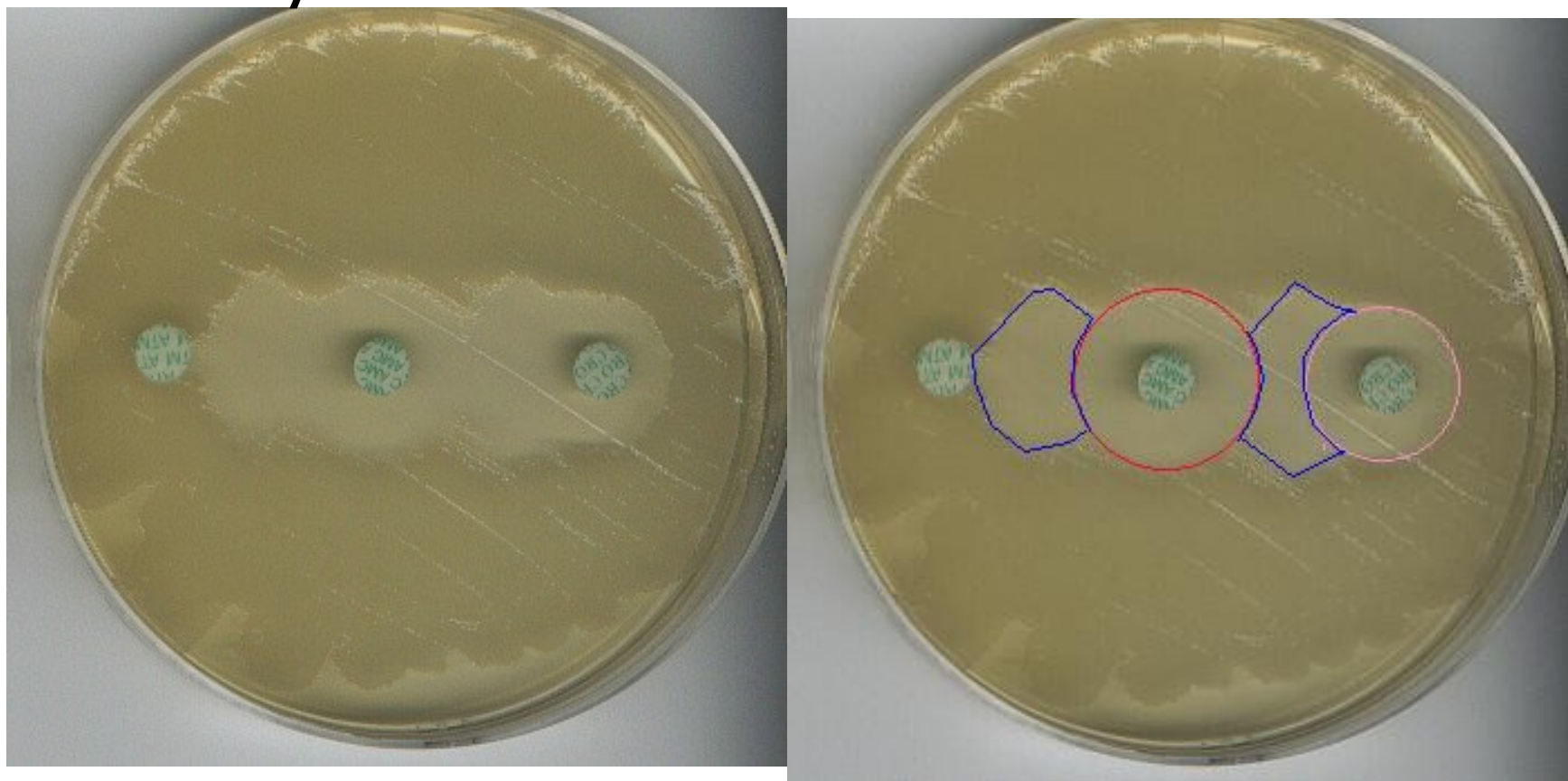
www.uniklinik-ulm.de

Hodnota MIC se
odečítá přímo na
proužku –
v místě, kde okraj
zóny protíná
daný proužek



Betalaktamázy běžné i širokospektré

Opět platí – nejsou přímo v úkolech, ale dotaz na ně být může



Druhý způsob testování ESBL

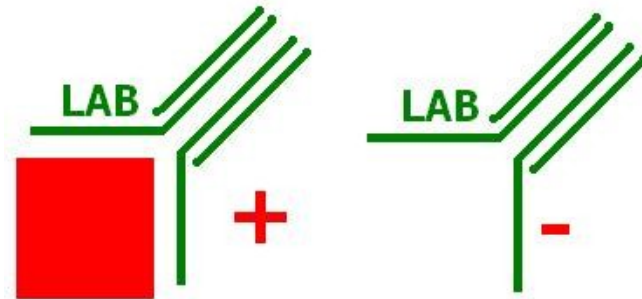
Činí-li rozdíl mezi zónami kolem disků cefotaximu bez inhibitoru : cefotaximu s klavulanátem s ním více než pět milimetrů, je kmen považován za producenta (širokospektré) β -laktamázy. Totéž platí pro ceftazidim.



Serologie – praktika J06 až J08

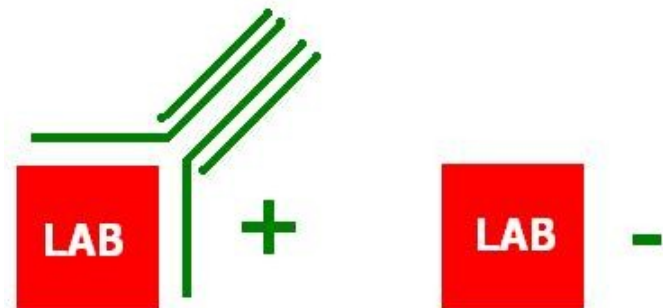
Průkaz antigenu: laboratorní protilátky (zvířecího původu) + vzorek pacienta nebo kmen mikroba.

Přímá metoda



Průkaz protilátky: laboratorní antigen (mikrobiální) + sérum (výjimečně sliny, likvor) pacienta

Nepřímá metoda



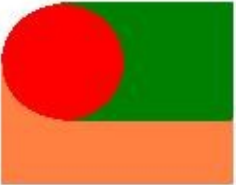









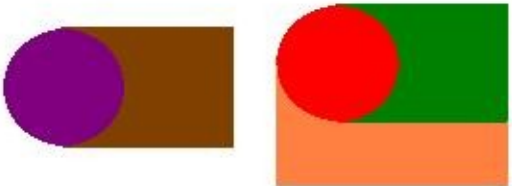
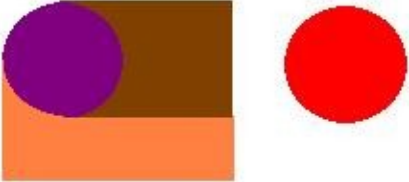








Interpretace – důležité znát!

- **Průkaz antigenu** je přímá metoda. Pozitivní výsledek znamená přítomnost mikroba v těle pacienta
- **Průkaz protilátek:** je to nepřímá metoda. Nicméně jsou způsoby, jak alespoň odhadnout, kdy přibližně se mikrob s.tělem pacienta setkal:
 - Množství protilátek (relativní – titr) a jeho změny v čase (dynamika titru)
 - Třída protilátek: IgM/IgG (pouze u reakcí se značenými složkami!)
 - (*Avidita protilátek*)

Musíte znát principy jednotlivých reakcí

- **Precipitace:** Antigeny jsou ve formě izolovaných makromolekul (jde tedy o **koloidní antigen**)
- **Aglutinace:** Antigen je součástí buňky mikroba (pracujeme tedy s.celými mikroby, říkáme, že **antigen je korpuskulární**)
- **Aglutinace na nosičích:** Původně izolované antigeny jsou navázány na cizí částici – nosič (latex, erytrocyt, polycelulóza)

Komplementfixace

+	-	
1 	1 	 antigen  
 vázaný 	 volný 	protilátka 
2 	2 	complement  
 NENÍ HEMOLÝZA	 HEMOLÝZA	beraní ery 
		amboceptor 

Neutralizace

- Protilátka (Ig) brání efektu toxinu/viru na buňku / krvinku



Buňka ve tkáňové kultuře či červená krvinka

Protilátka

Toxin či virus



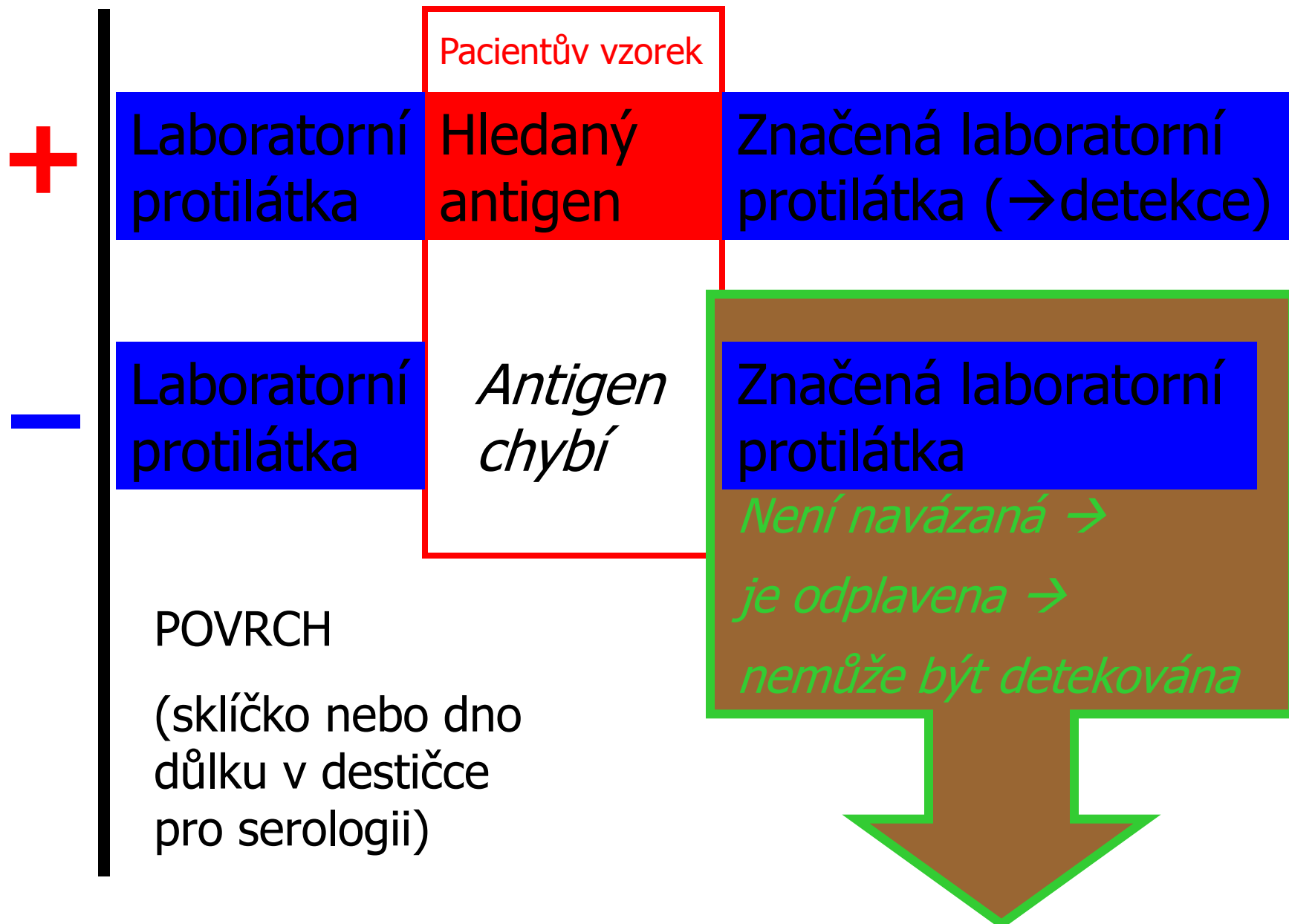
Buňka ve tkáňové kultuře či červená krvinka

Toxin či virus

Příklady neutralizačních reakcí

Neutralizován	Objekt	Reakce
Toxin bakterie (hemolyzin)	Erytrocyt hemolýza	ASLO
Virus	Erytrocyt shlukování	HIT
Virus	Buňka efekt metabolický	VNT

Reakce se značenými složkami



Western blotting – princip

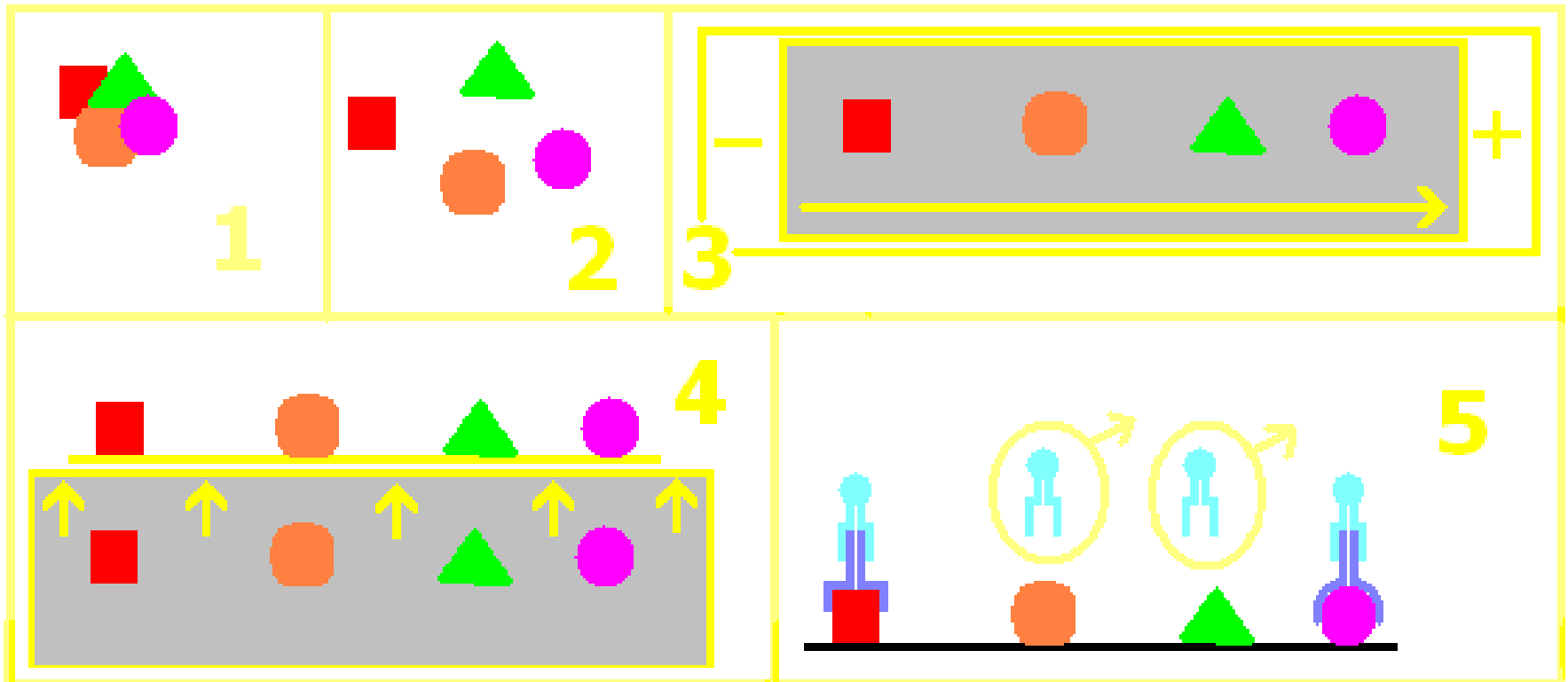
1: původní antigen (směs)

2: uvolnění jednotlivých antigenů detergentem

3: elektroforetické rozdělení antigenů

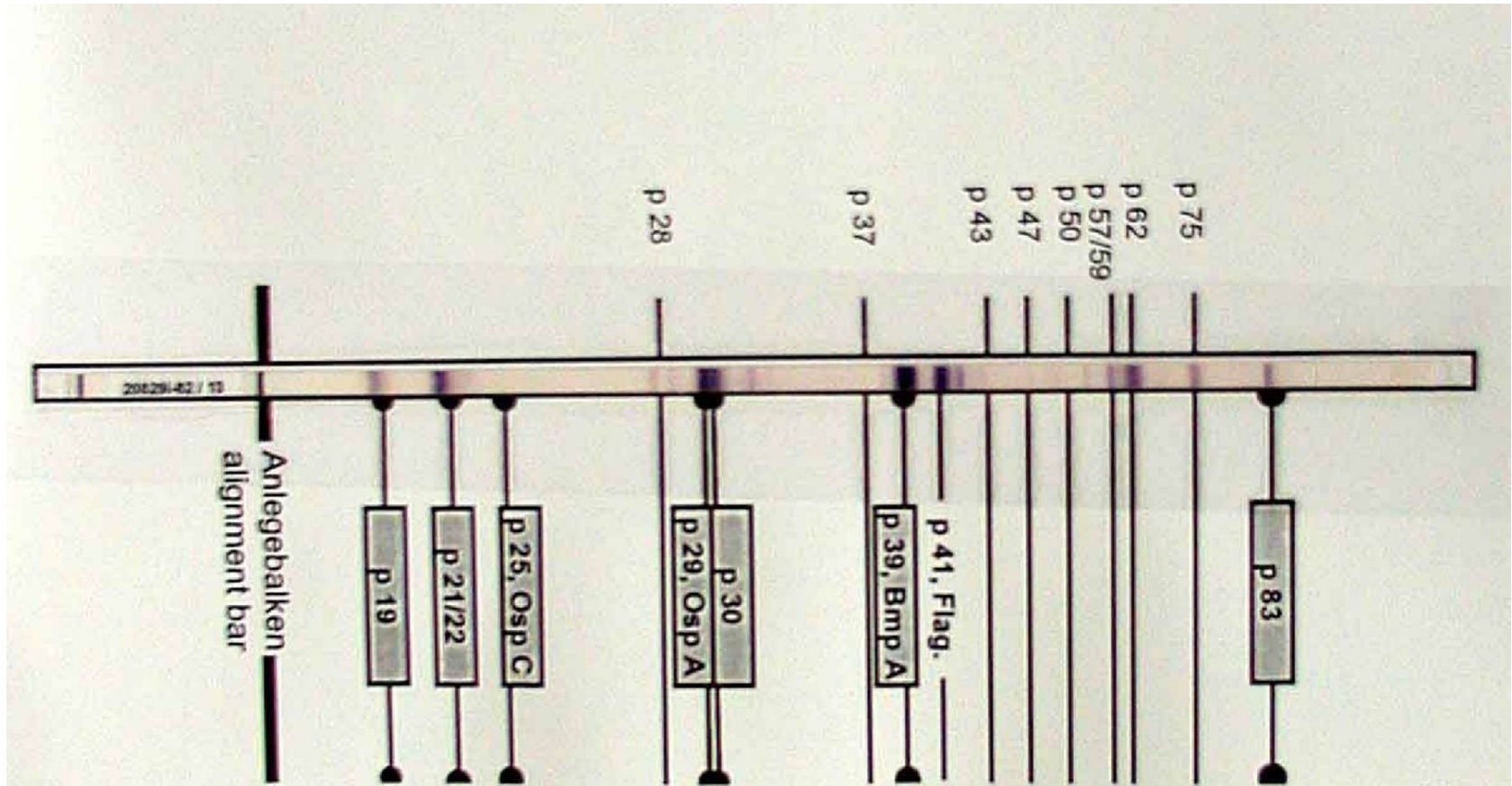
4: „přesátí“ rozdělených antigenů na nitrocelulózu

5: reakce ELISA (přítomny jsou jen některé protilátky)



Western blot – vzhled

(obrázek z www.medmicro.info)



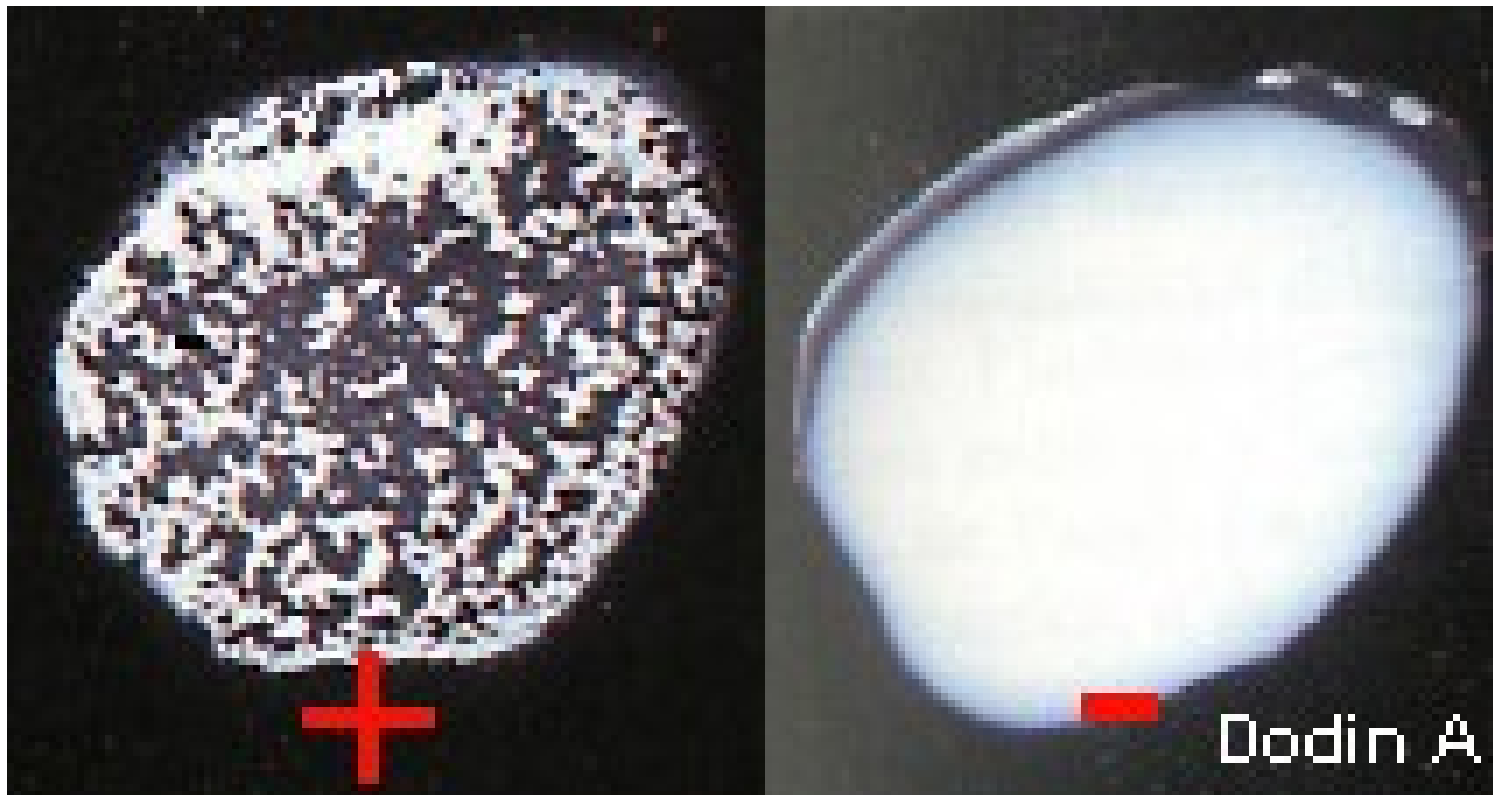
Imunochromatografické testy

- Imunochromatografické testy jsou založeny na **navazování jednotlivých komponent** podobně jako předchozí
- Důležitým rozdílem je, že zde **není promytí**. Některé komponenty jsou navázány na povrch na určitých místech (testovací a kontrolní místo), další se hned naváží na testovanou složku a spolu s ní **cestují porézní vrstvou**. V pozitivním případě je zpravidla pozorován proužek u testu i u kontroly, v negativním jen u kontroly.

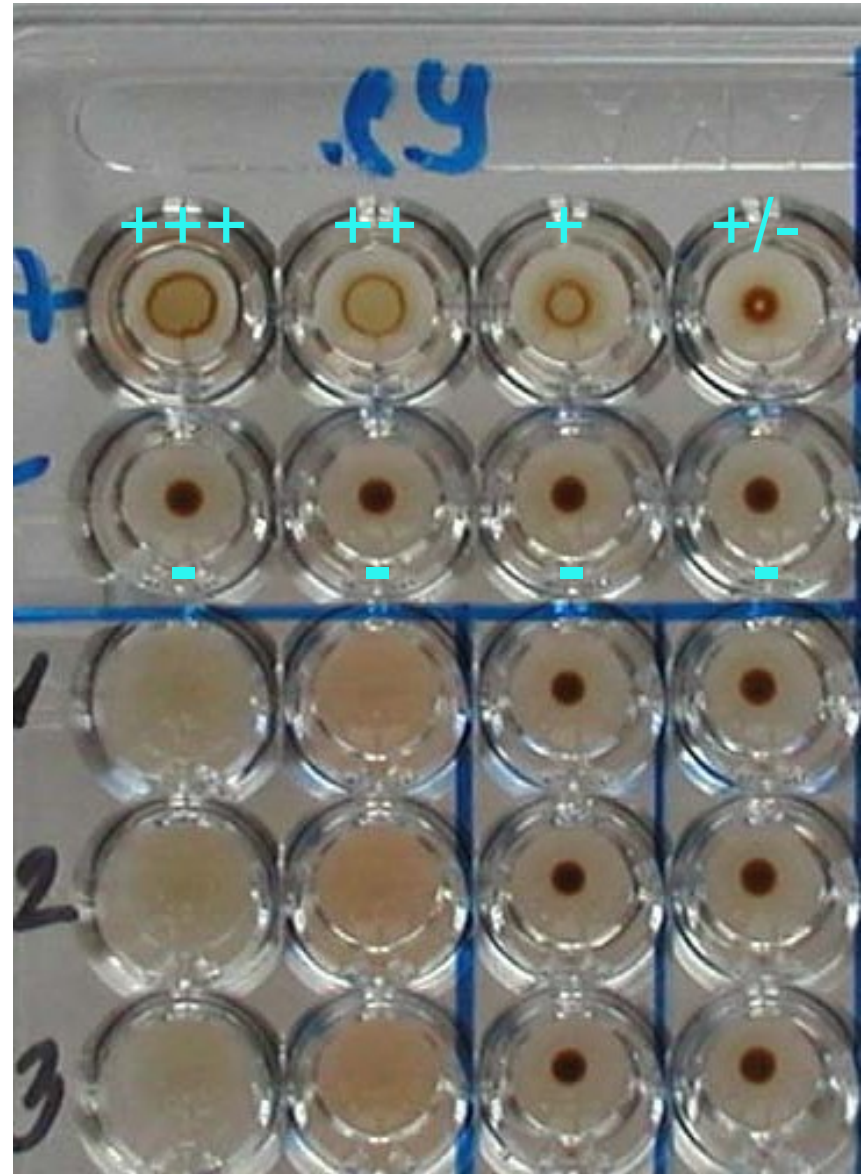
U průkazů antigenů

- Umět provést a vyhodnotit **sklíčkovou aglutinaci (například průkaz EPEC)**; u průkazu EPEC vysvětlit, za jakých okolností a proč se test provádí; uvést další příklady aglutinace k antigenní analýze
- **Popsat video „aglutinace likvoru“**, ale především vysvětlit, kdy, jak a proč se používá, jaká je další rychlá metoda průkazu původců meningitid, a které naopak trvají delší dobu
- *Hlavně vědět, že (a proč) se tu nikdy neurčují titry, natož IgG a IgM!*

Sklíčková aglutinace



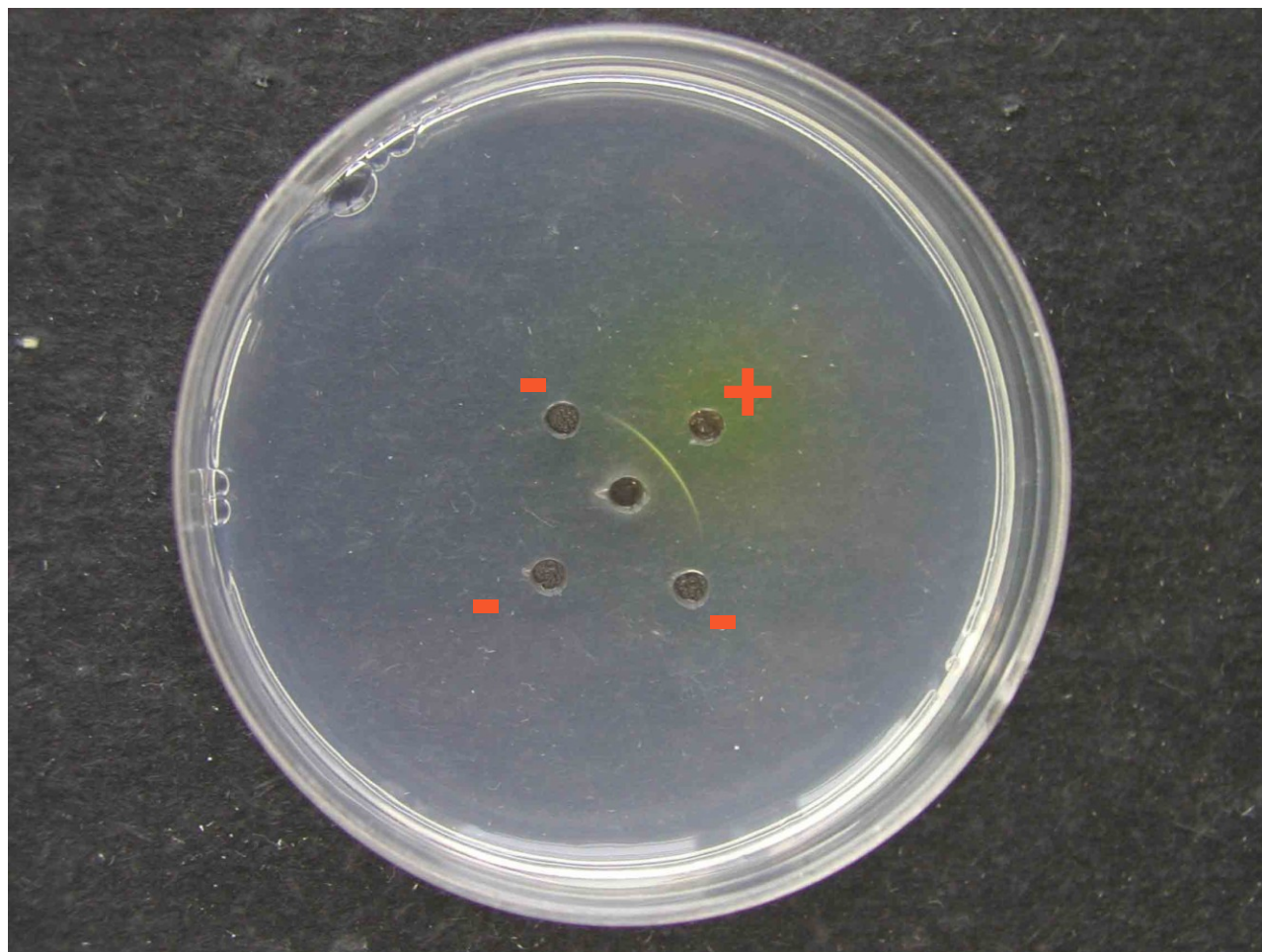
U průkazů protilátek:
Vědět, jak vypadají
výsledky (např. u
aglutinace
v mikrotitrační
destičce bramborák
je pozitivita, tečka
negativita)



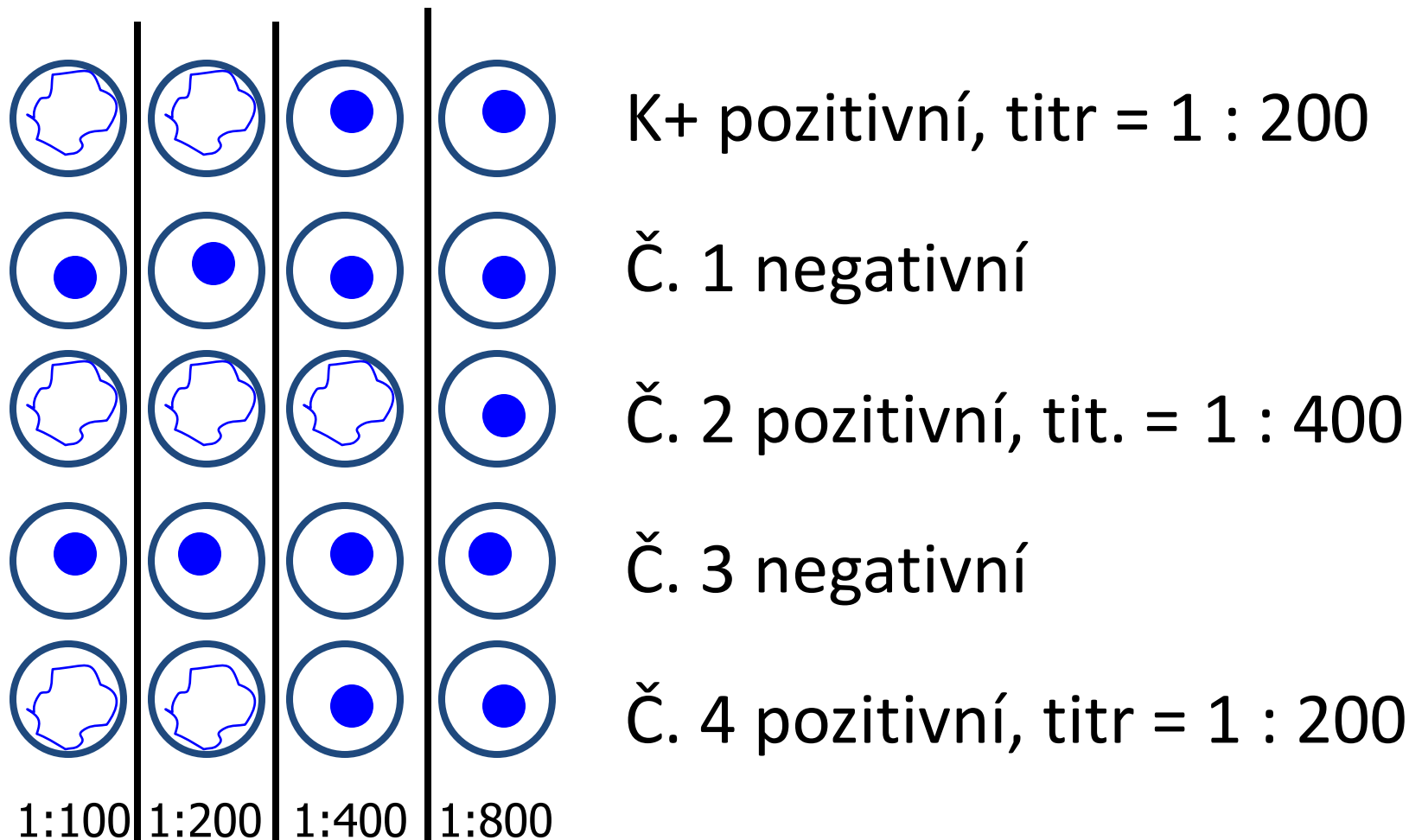
Mikroprecipitace

Tzv. mikroprecipitace v agaru dle Ouchterlonyho

Do důlku uprostřed je nalita tekutina obsahující antigen. Ten difunduje agarem. Obsahuje-li sérum protilátky, difundují proti němu a na jejich styku vznikne precipitační linie.



Musíte vědět, jak určit titr, případně dynamiku titru, a vyhodnotit



(a také kdy se titry neurčují a proč)

U reakcí se značenými složkami

- Umět **vyhodnotit reakci ELISA**; vědět, že destička se odečítá spektrofotometrem; když dostanete informace, jak určit cut off, být schopni určit negativní a pozitivní hodnoty a interpretovat (s ohledem na třídy protilátek)
- Ze stavebnice **sestavit schéma průkazu HBsAg a anti-HBs** při pozitivním a negativním průběhu reakce

Například umět vyhodnotit

BL	4	BL	4
K-	5	K-	5
K-	6	K-	6
K+	7	K+	7
K+	8	K+	8
1	9	1	9
2	10	2	10
3	11	3	11
IgA		IgG	

$$\text{c. o. (IgA)} = (0,107 + 0,137)/2 + 0,320$$

$$\text{c. o. (IgA)} = 0,122 + 0,320 = 0,442$$

$$90 \% \text{ c. o.} = 0,398 \quad 110 \% \text{ c. o.} = 0,486$$

hodnoty pod 0,398 jsou negativní

hodnoty nad 0,486 jsou pozitivní

$$\text{c. o. (IgG)} = (0,034 + 0,029)/2 + 0,320$$

$$\text{c. o. (IgG)} = 0,032 + 0,320 = 0,352$$

$$90 \% \text{ c. o.} = 0,317 \quad 110 \% \text{ c. o.} = 0,387$$

hodnoty pod 0,317 jsou negativní

hodnoty nad 0,387 jsou pozitivní

**HLEDEJTE POZITIVNÍ A HRANIČNÍ
PACIENTY JAK V IgA, TAK I V IgG!**

A navíc ještě

- umět **interpretovat nálezy dohromady** (u borreliózy a toxoplasmózy – vyhodnotit dohromady nejen různé serologické reakce, ale také anamnézu)
- pamatujte si – **pacient, který nemá protilátky, není „zdravý pacient“, pokud má potíže!** je třeba např. odebrat znovu, odebrat protilátky proti jiné chorobě, provést jinou reakci apod.

Pozor – ASLO a co o něm znát

- Po každé streptokokové infekci se objevují protilátky, často včetně protilátek proti streptokokovému toxinu – streptolyzinu O.
- Někdy se však stane, že množství těchto protilátek po infekci neklesá, naopak stoupá. Protilátky se totiž vážou na některé struktury hostitelského organismu (autoimunita), roztáčejíce „bludný kruh“.
- V takovém případě jsou tedy paradoxně nebezpečnější protilátky než patogen, proti kterému nás měly chránit.

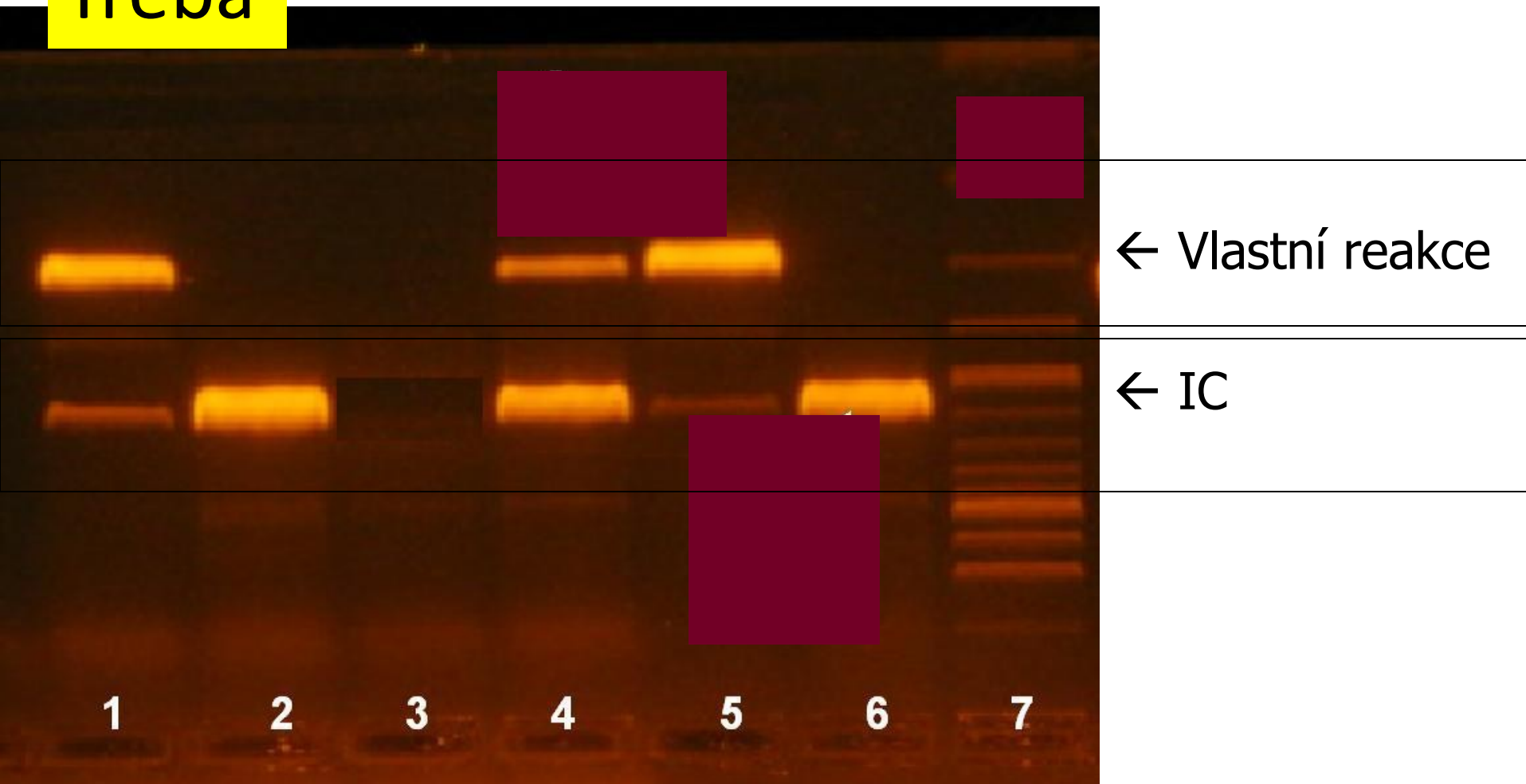
J09: PCR a jiné průkazy DNA/RNA

- **Není nutno znát detaily principu, ale je potřeba vědět, kdy a jak se používají v mikrobiologii**
- Tyto metody používáme zpravidla tam, kde mikroskopický a kultivační průkaz je obtížný nebo není vůbec možný
- Nehodí se příliš pro běžné patogeny přítomné ubikvitárně. Pro svou velkou citlivost by ruče vyčlenily kdejakou molekulu přilétlou z vnějšího prostředí
- Metody nejsou ani neužitečné, jak si někdo myslí, ani samospasitelné, jak si myslí pro změnu jiní

Nutno znát interpretaci PCR

Vlastní reakce	Interní kontrola	Interpretace
negativní	pozitivní	negativní
negativní	negativní	inhibice reakce
pozitivní	pozitivní	pozitivní
pozitivní	negativní	(vysoce) pozitivní

Třeba



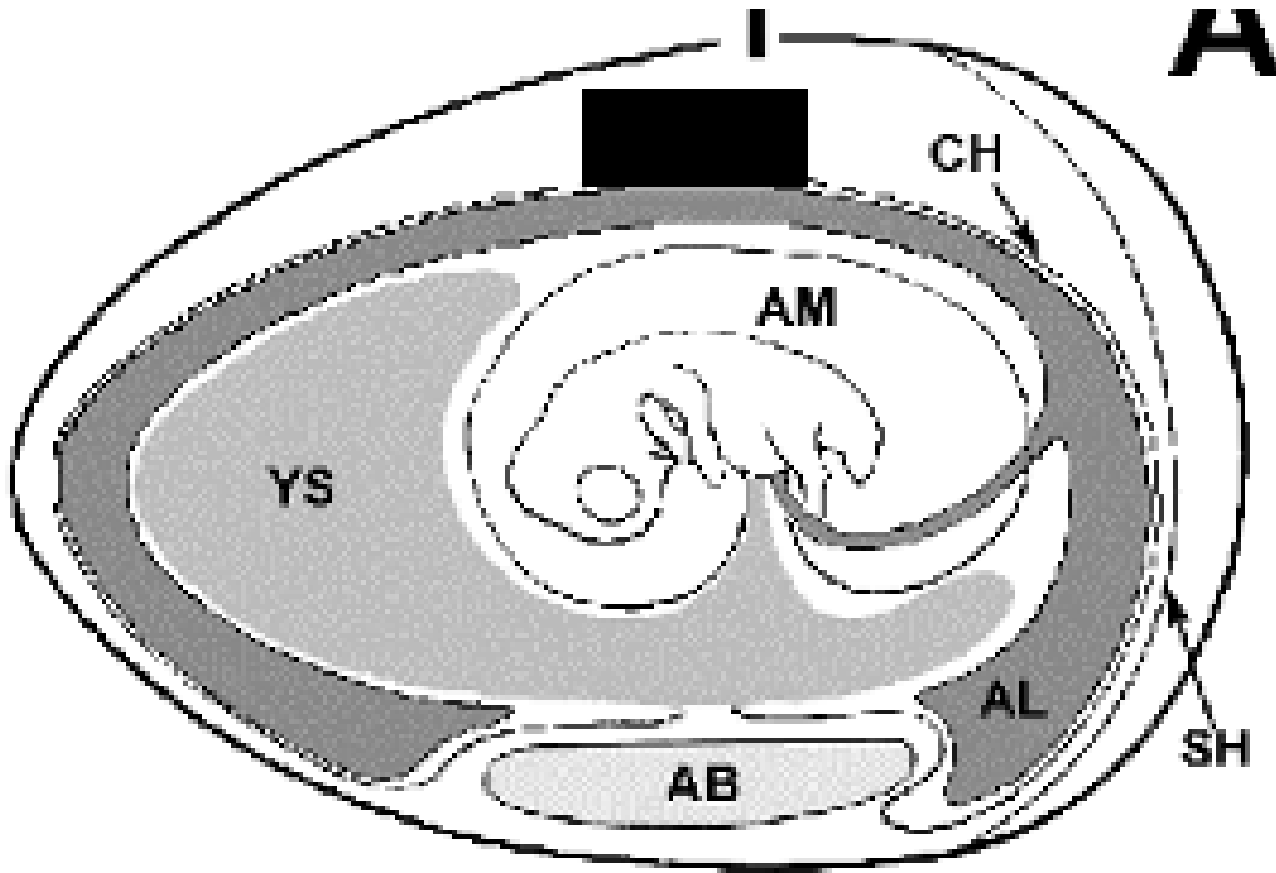
Pacienti 1 a 4 – pozitivní, pacient 2 – negativní, pacient 3 – inhibice reakce. 5 – pozitivní kontrola, 6 – negativní kontrola, 7 – ladder

J10+J11

Virologie

- Větší část virologie je **totožná se serologií** (průkaz HBsAg a podobně)
- Navíc: **přímý průkaz viru na vaječných zárodcích a buněčných kulturách** (a na sajících myšatech, teoreticky)
- Nutno znát: **kdy je a kdy není vidět výsledek izolace viru**, a co se dá dělat, když výsledek vidět není (hemaglutinace, hemadsorpce)

Nutno znát části oplodněného vejce...



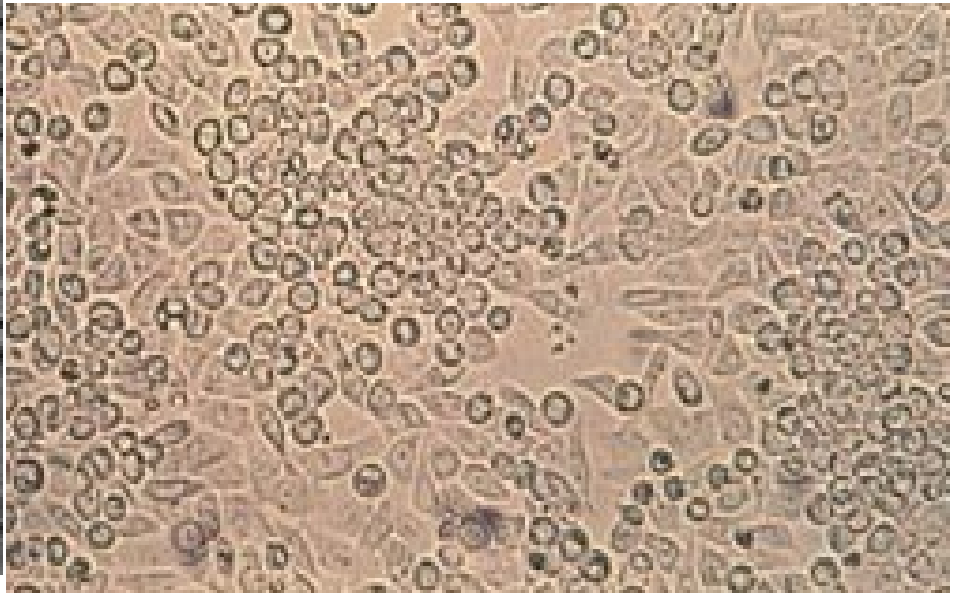
SH –
skořápková
(papírová)
membrána

AB – bílek
<http://www.scielo.cl/fbpe/imag/bres/v38n4/fig02.gif>

AM – amniový vak, YS – žloutkový vak, AL – allantois
CH – chorioallantoidní membrána (CAM)

HSV Growing in Tissue Culture

Takže tady CPE je...



...a tady není

http://cmir.mgh.harvard.edu/cellbio/cellculture.php?menuID_=122

www.herpesdiagnosis.com/diagnose.html

...a zhruba tušit něco o CPE

(HSV je virus prostého oparu – HSV 1 způsobuje zpravidla herpes labialis, HSV 2 herpes genitalis)

J12: Parazitologie. Znáť tato vejce:

Alespoň tyto tvary byste měli znát ke zkoušce



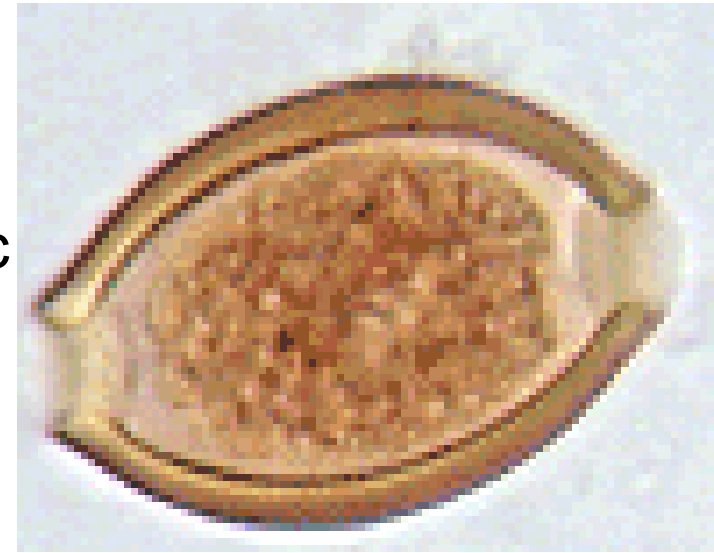
Roup

Mrľa

Enterobius

Tenkohlavec

Trichuris



Škrkavka

Hlísta

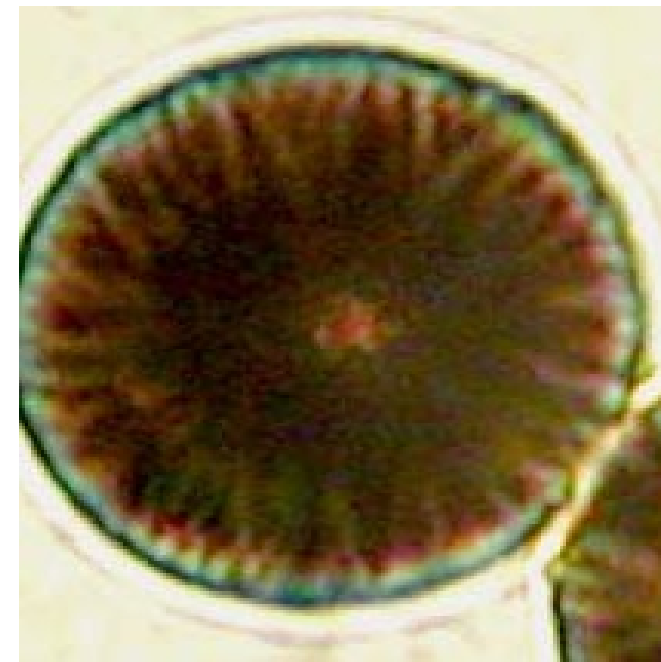
Ascaris

Tasemnice

Pásomnica

Taenia

+ články!



Obrázky převzaty z CD-ROM „Parasite-Tutor“ – Department of Laboratory Medicine, University of Washington, Seattle, WA

Znát metody diagnostiky střevních parazitů

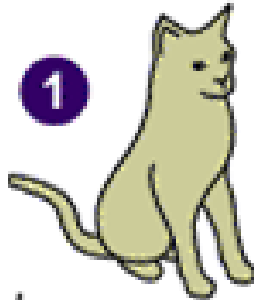
- Jako základ se používají metody, které představují v podstatě **nativní preparát v různých modifikacích**
 - **U metody dle Kato** se používá dobarvení pozadí malachitovou zelení, aby se paraziti zvýraznili
 - **Faustova metoda** je koncentrační (viz dále)
- **Grahamova metoda** se používá jen u roupů (umět odečíst i prakticky)
- *Nativní preparát „sensu stricto“ a barvené preparáty (např. trichromem) se použijí u zvýšeného podezření na střevní prvoky (buďto primárně, nebo po prohlédnutí Fausta a Kato)*

Pozor – také dg. *Toxoplasma gondii* serologickými testy

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

Popis pacientů dát dohromady s výsledky serologie a vyhodnotit

- P: zdravá těhotná žena, doma kočky
- Q: jiná těhotná žena, bez koček
- R: mladá dáma toulající se v lesích; bez koček, zato však v kontaktu s prostředím kontaminovaným trusem divokých zvířat
- S: senior, pracující v zahradě, po které se procházejí kočky

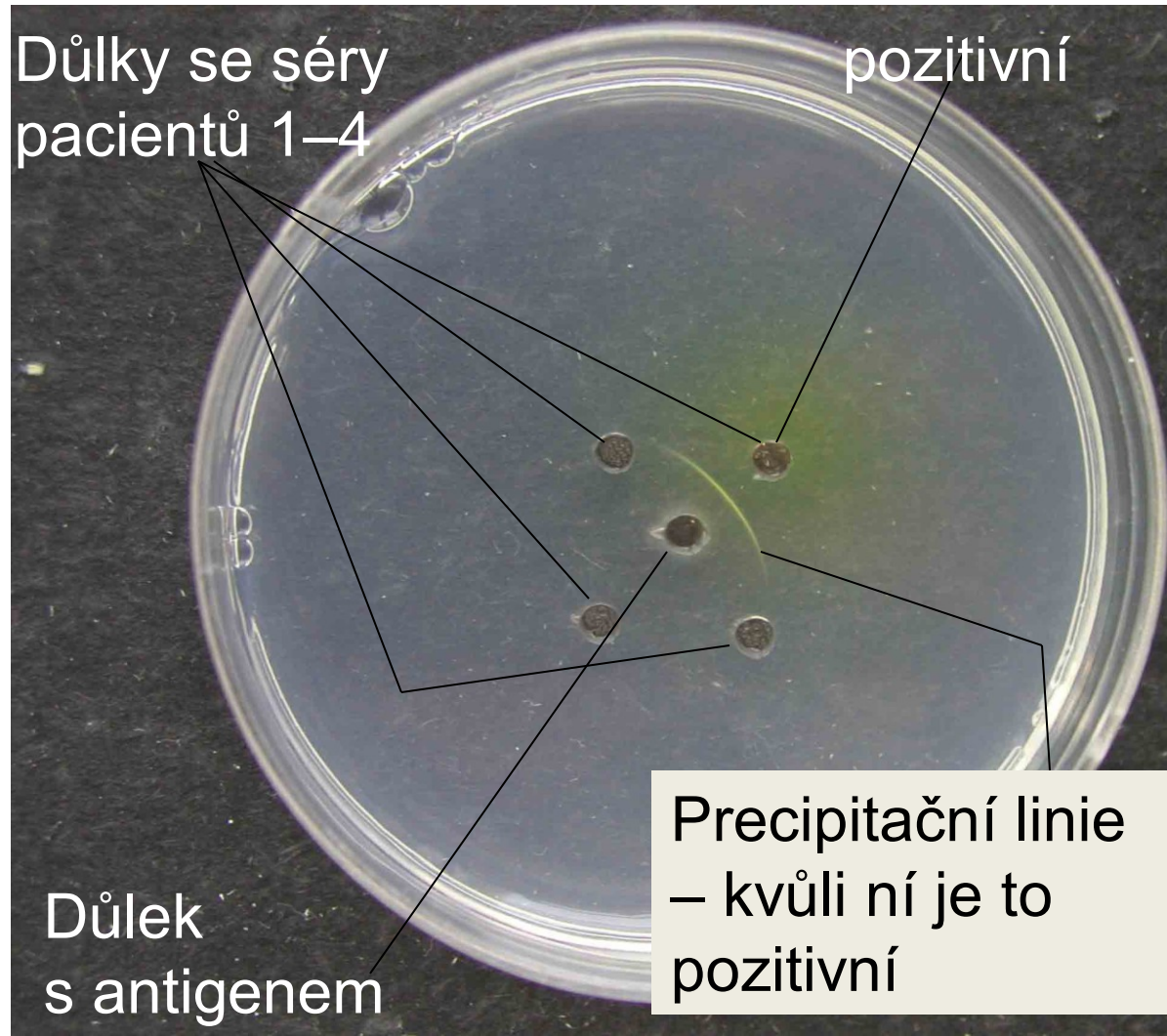


J13 mykologie

Zkouší se jako bakterie z P01 až P06 – vizte dále

Plus další úkol je mikroprecipitace v agaru

Morfologie vláknitých hub není přímo v úkolech, ale můžete na ni být také tázáni



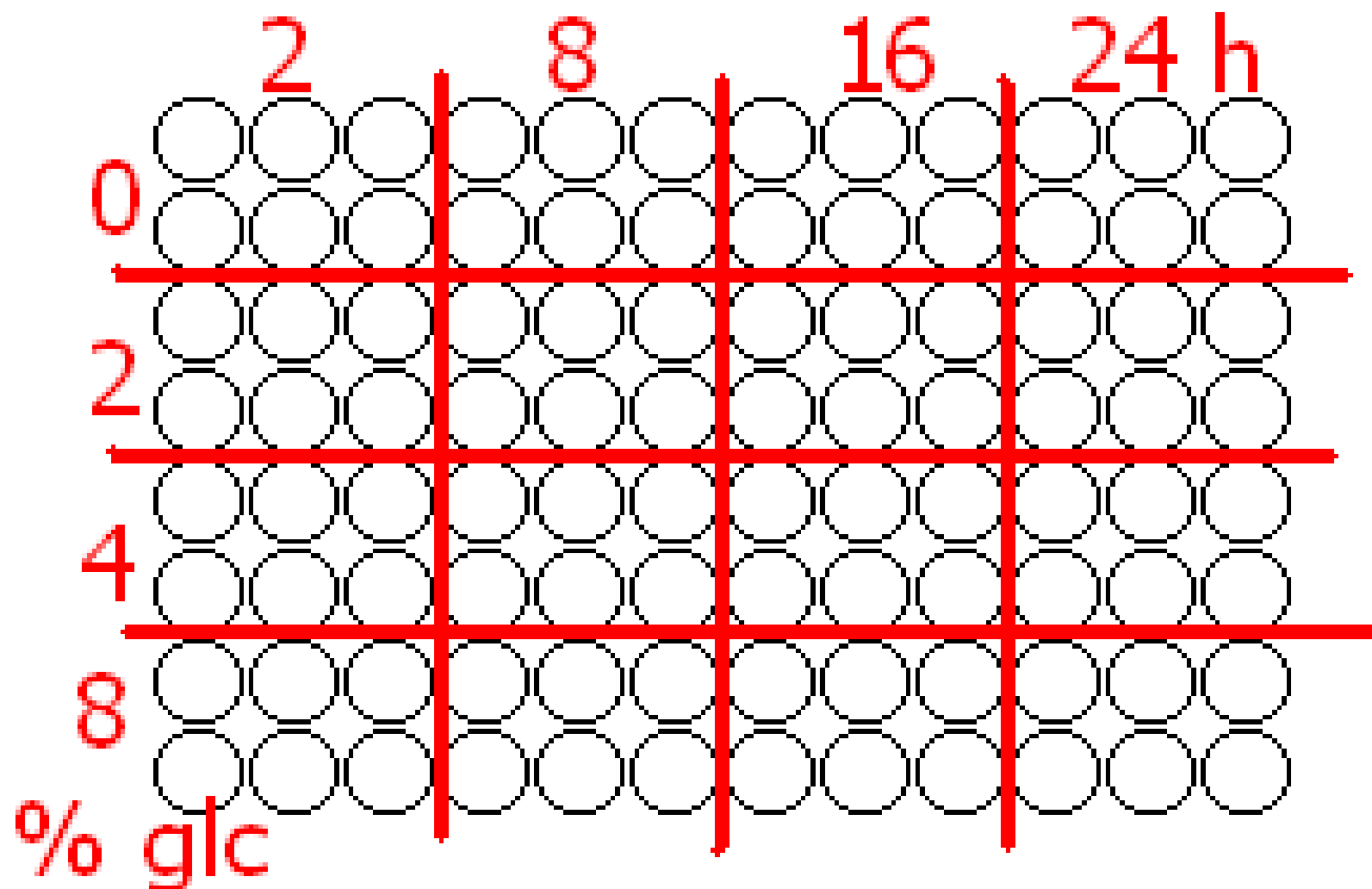
J14 Biofilm

Úkol posouzení vlivu sacharidů a času na biofilm

- **Jako v praktiku, ale včetně vytvoření grafu**
- Posudte vliv příjmu různého množství sacharidů ve stravě na rychlost tvorby biofilmu u kariogenního *Streptococcus mutans*.

Jaké závěry vyplývají z tohoto pokusu ohledně množství sacharidů ve stravě, délce jejich setrvání v dutině ústní apod.?

Schema důlků



Další úkol – stanovení MBEC

Neplést zkratky

MIC – minimální inhibiční koncentrace je pojem, který se u antibiotik používá pro označení meze růstu (množení) mikroba

MBC – minimální baktericidní koncentrace se používá pro mez přežití bakterie. U virů by se použil pojem „minimální virucidní“ a podobně.

MBEC – minimální biofilm eradikující koncentrace

MIC versus MBEC

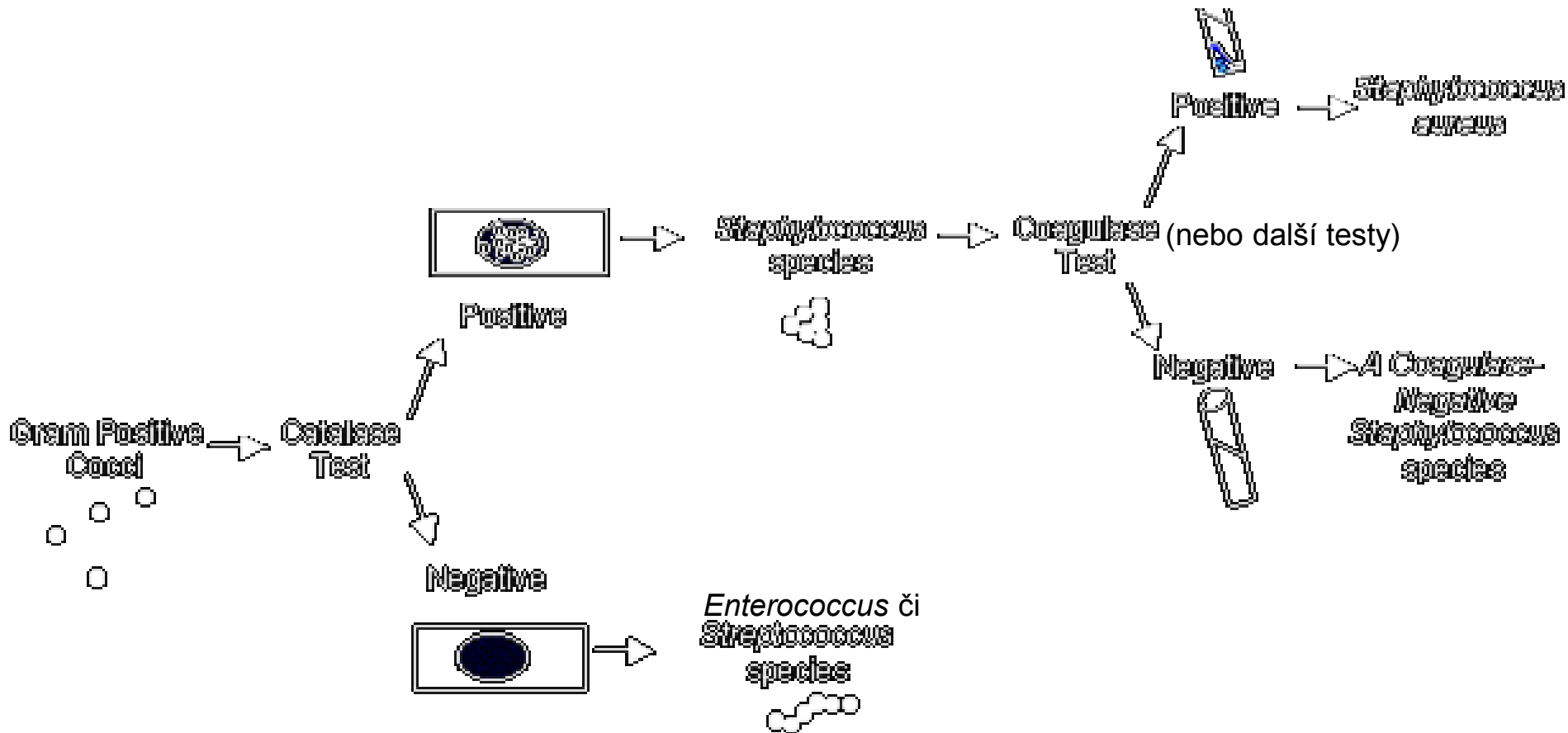


- Zatímco MIC je metoda určující minimální inhibiční koncentraci ATB u planktonické formy, MBEC zjistí eradikaci bakteriálního biofilmu. Vypovídá tedy lépe o skutečném účinku antibiotika na bakterie žijící ve formě biofilmu.
- MBEC odpovídá **nejnižší koncentraci antibiotika, kde ještě prokážeme eradikaci biofilmu** (nepřítomnost živých buněk, nedochází ke změně pH média, důlek tedy zůstává červený)

P01 až P06 a J13 (většina speciální bakteriologie a kvasinky)

- **Jednotný typ úkolů: „Z předložených kmenů vyberte kmen ... (např. stafylokoka), blíže určete, popř. také určete test citlivosti na antibiotika“**
- Úkol z větší části teoretický (Gramovo barvení se nedělá, jen se o něm hovoří), ale některé části (kataláza, oxidáza) se mohou provést i prakticky, je-li na to čas
- Důležité je znát a dodržet algoritmus – postupovat od obecného k detailnímu

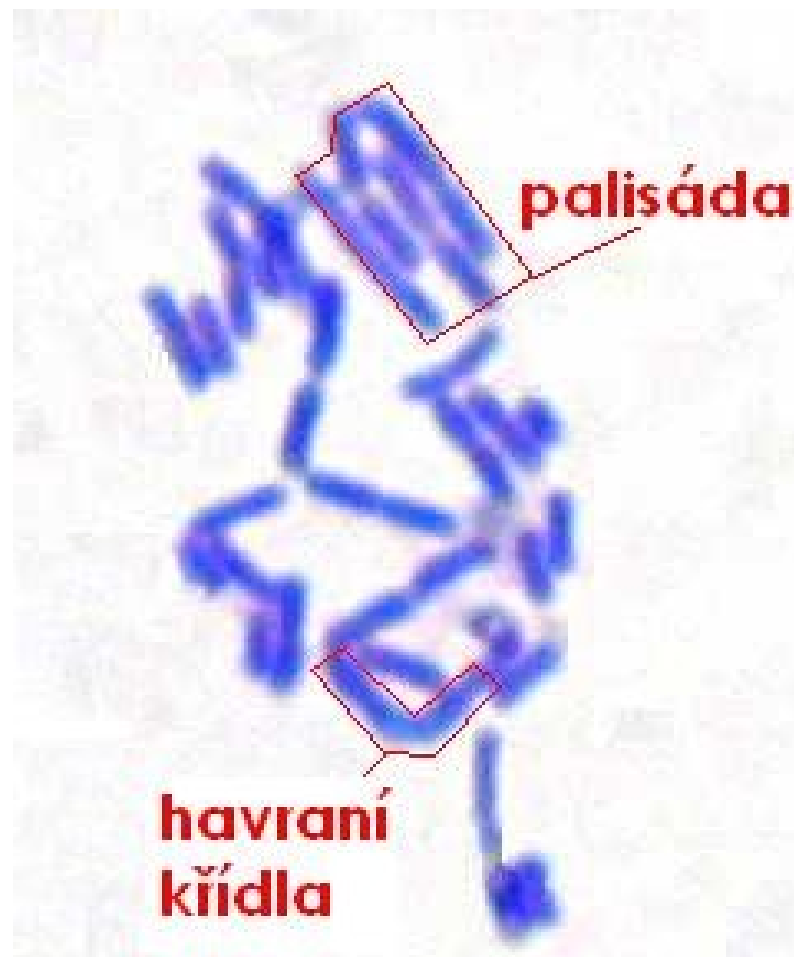
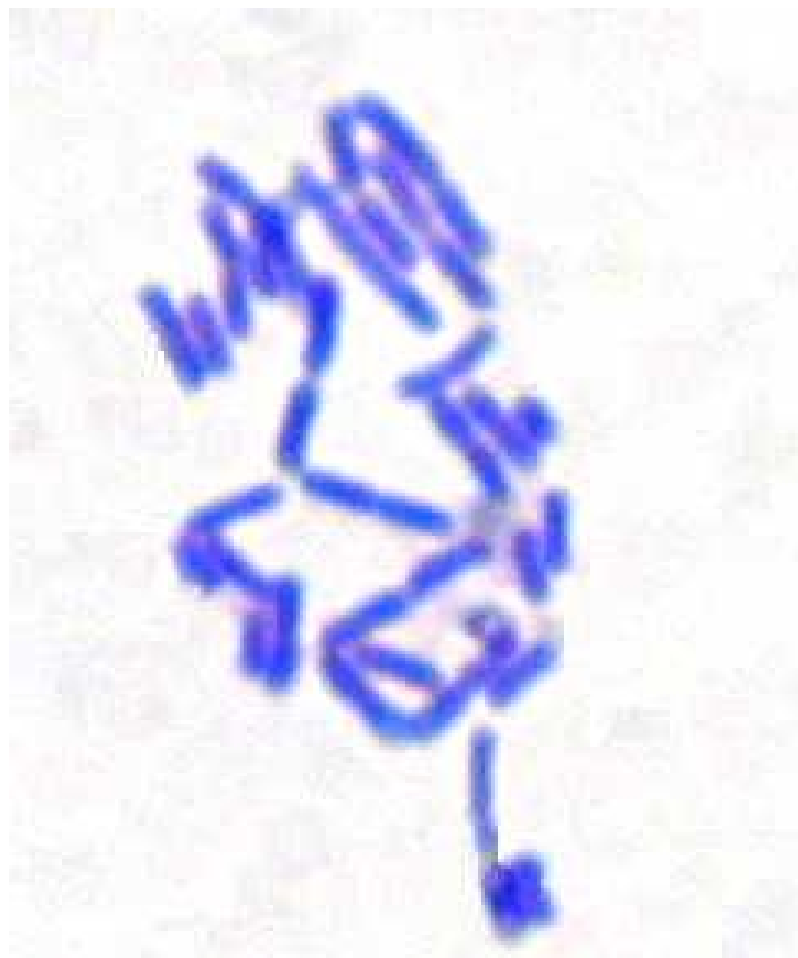
U stafylokoků například začít Gramovým barvením a pokračovat dále až k určení *S. aureus*



Výjimky:

- **ASLO se zkouší jako serologický úkol**, plus znalost specifického významu tohoto testu (viz u serologie)
- **Grampozitivní tyčinky se zkoušejí jinak** – student si prohlíží obrázky G+ tyčinek a má určit, který obrázek morfologicky odpovídá korynebakteriím, plus odpoví na doplňující otázky (např. „co by to mohlo být, kdyby to nedělalo palisády a rostlo by to při 4 °C?“)
- **Zvláštní úkoly se také týkají anaerobů, mykobakterií a spirochet**

Korynebakteria, tvary



P08: Anaeroby

popis anaerostatu

vzduchotěsné víčko

palladiový kalalyzátor
(pod víčkem)

konstrukce pro
ukládání Petriho misek

Generátor anaerobiózy
(sáček s chemikáliemi)



Anaerobní box (znát ho zhruba také)



Morfologie *Clostridium tetani* (praktické poznání od jiných bakterií)

<http://www.geocities.com>



Plus: znát i další metody, znát půdy pro anaerobní kultivaci aj.

- Pokus na zvířeti se používá u tetanu a botulismu. U tetanu se myš svíjí v křeči, u botulismu jsou naopak patrné parézy. U toxinu *Clostridium perfringens* se pokus na zvířeti nepoužívá, zde využíváme kultivační průkaz lecitinázy na žloutkovém agaru.



U toxinu *Clostridium difficile* využíváme imunochromatografický test.

Tetanická myš

P08: Acidorezistentní bakterie

Znát Ziehl-Neelsena

- **V prvním kroku** barvíme karbolfuchsinem (Gabbetem) za horka až do výstupu par. Bez zahřívání by mykobakteria nešlo obarvit, leda při použití koncentrovanějšího karbolfuchsinu.
- **V druhém kroku** odbarvujeme cca 15 s „kyselým alkoholem“, což je směs alkoholu s minerální kyselinou, nejčastěji kyselinou chlorovodíkovou, poté opláchneme vodou
- **Ve třetím kroku** dobarvujeme pozadí, tj. vše, co jsme ve druhém kroku odbarvili. Dobarvujeme cca 30 s **malachitovou zelení** nebo **metylenovou modří**. Opět opláchneme, osušíme a pozorujeme imerzí.
- **Výsledkem** jsou červené acidorezistentní tyčinky na **modrém** nebo **zeleném** pozadí

Jak se zkouší

- Měli byste **znát postup, plus vědět, jak vypadá pozitivní Ziehl-Neelsen** a na základě toho umět odlišit jeho obrázek od jiných (například Gramem barvených preparátů)
- Plus (stejně jako u dalšího úkolu) **znalost ostatních metod u TBC, testování citlivosti**, diagnostika aktinomycet a nokardií (rámcově) pro dodatečné dotazy

Ziehl-Neelsenovo barvení



Další úkol: Kultivace mykobakterií

- Vědět, že před kultivací musí být provedeno moření
- Znat **půdy (Šula, Banič a vaječné půdy Ogawovu či Löwenstein-Jenssenovu).**
- **I pevné půdy se nalévají do zkumavek a uzavírají zátkou.** Není to jen kvůli ohrožení personálu, ale především kvůli vyschnutí půdy.
- Výsledky **se odečítají po 1 (kontrola kontaminace) 3, 6 a pro jistotu i 9 týdnech kultivace.** (Pozitivní výsledky se obvykle nacházejí po šesti týdnech)

P09 Spirochety: serologie + znát screening × konfirmaci, hlavně u syfilis

Historický	BWR – Bordet Wassermann	Netr.
Screeningové	RRR – Rapid Reagin Test	
	TPHA/TPPA	Treponemové
Konfirmační	ELISA	
	FTA-ABS (nepř. imunofluor.)	
	Western Blotting	
<i>Historický, popř. superkonfirmace</i>	<i>TPIT (Treponema Pallidum Imobilizační Test) = Nelson</i>	

Pozor!

- Těhotné s pozitivním RRR nelze říct, že „má asi syfilis“, **je potřeba vyšetření confirmovat**
- Negativní nález serologie boreliózy u pacienta s erythema migrans **neznamená, že bude považován za zdravého a nebude léčen**

P10–13 Klinická mikrobiologie I–IV

- Zde jsou **čtyři stejné úkoly**: dostanete lísteček se třemi „minikasuistikami“. Vaším úkolem je rozhodnout se, jaké vyšetření provést a vybrat pro ně vhodné typy odběrových souprav.
- Důležité je rozlišovat krev na hemokultivaci × krev na serologii, vědět, že u vaginálních výtěrů je vhodný CAT, ale také Amies, apod.

Některé typy výtěrovek



Suchý tampon

www.calgarylabservices.com

Dnes se používá jen pro PCR a průkaz antigenu, ne pro kultivaci!



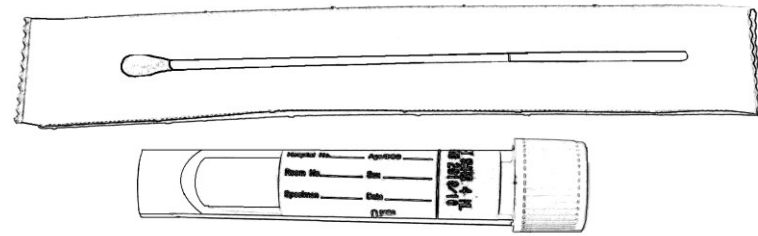
Amiesova půda s aktivním uhlím www.herenz.de

Univerzální transportní půda pro bakteriologii (všechny typy výtěrovek). Drátěná varianta je důležitá, pokud se potřebujeme „dostat za roh“.

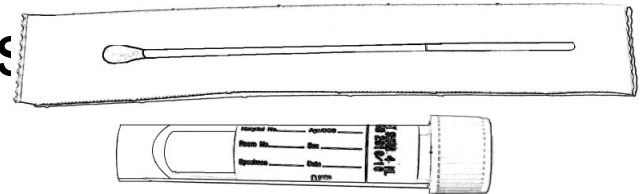
Další výtěry

Fungi Quick (na kvasinky a plísně)

www.copanswabs.com



Souprava C. A. T. (Candida And Trichomonas, pouze z genitálií www.copanswabs.com)



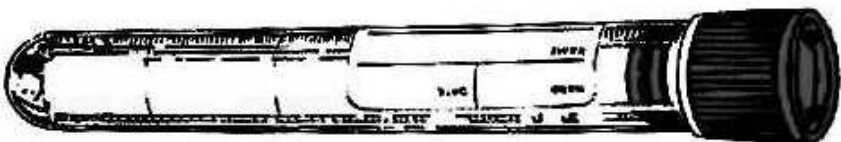
Na viry

www.copanswabs.com

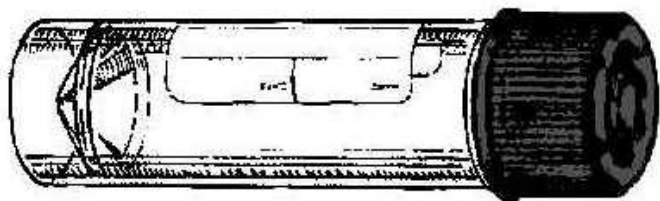
Na chlamydie

www.copanswabs.com

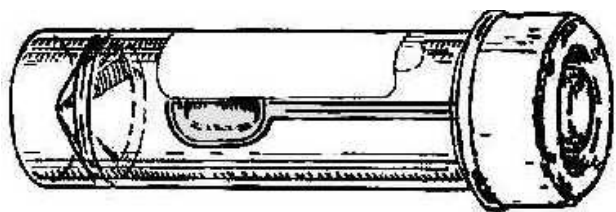
Nádobky



Běžná zkumavka. Universální použití: srážlivá krev (serologie), moč, likvor, hnis, punktát apod.; krevní a močové katetry, menší kousky tkání...



Sputovka. Nejen na sputum, ale např. i na větší kousky tkání



Nádobka na stolice – na parazitologii. Pouze tato nemusí být sterilní!



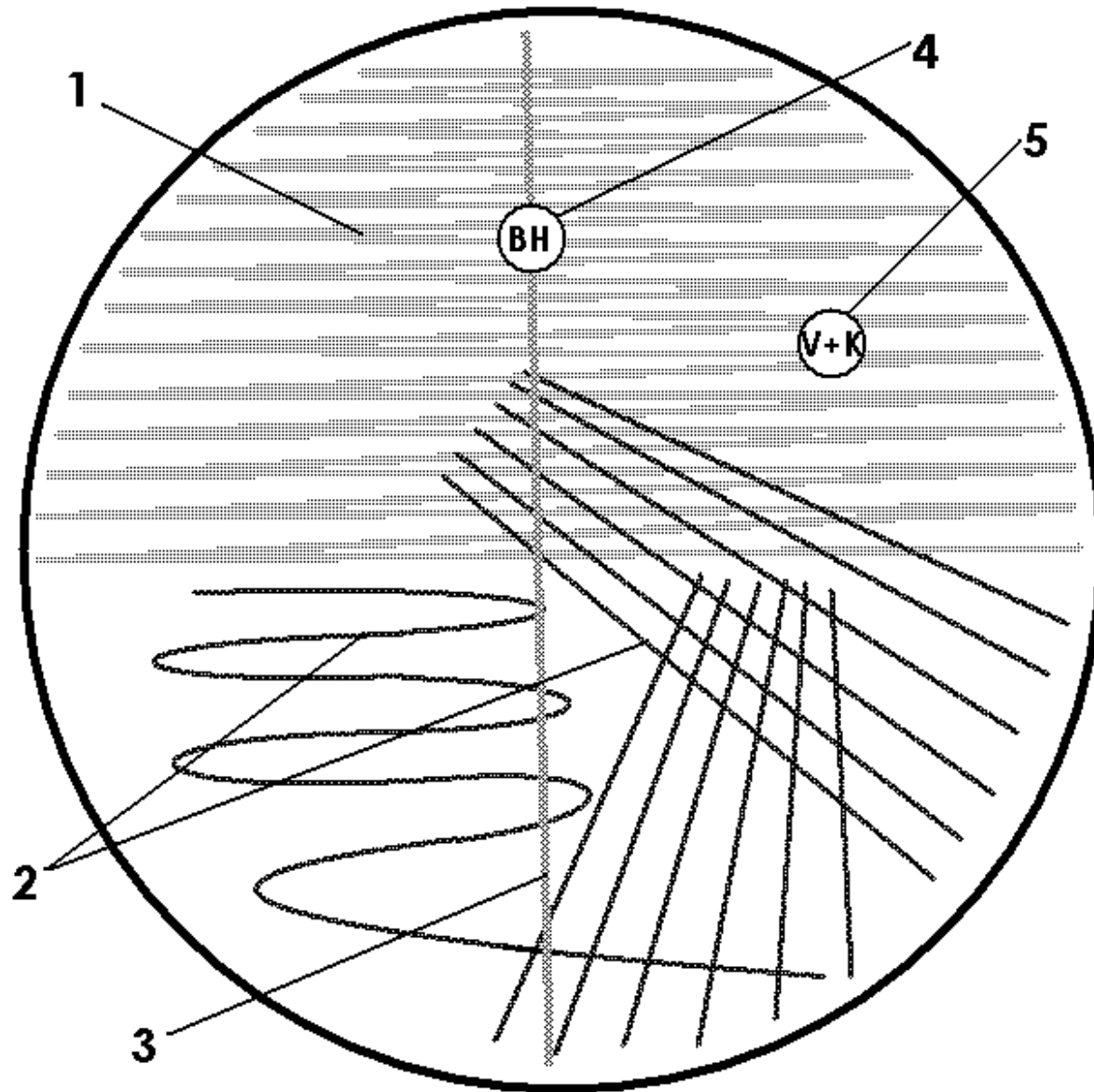
Nádobka na odběr moče. Je lepší, když pacient čurá rovnou do zkumavky, avšak zvláště pro ženy je to obtížné (nejsou-li ve sprše). Mohou tedy močit do této nádobky, a pak sestra moč přelije do zkumavky.

P11–13 Klinická mikrobiologie II–IV

Zahrnuje řadu zrádných úkolů:

- **Najít patogeny mezi běžnou orofaryngeální mikroflórou** (nutno vědět, která to je, a jak se tam patogeny hledají)
- **Odečíst semikvantitativní a kvalitativní vyšetření moče** – nezapomenout, že určení kvantity je podmínka nutná, ale nikoli dostačující (je totiž ještě nutno zjistit, co to je za mikroba)
- **Odečíst hemokulturu (mikroskopicky i kultivačně), poševní nátěr a výtěr, výtěr z rány, výtěr z řiti**

Záchyt patogena v krku či sputu



1 očkováno tamponem

2 očkováno kličkou

3 stafylokoková čára

4 disk BH (bacitracin pro hemofily)

5 disk VK (vankomycin a kolistin pro meningokoky)

Na celé naočkované ploše pátráme po streptokokích (bezbarvé) a po stafylokokích (spíše bílé či zlatavé)

Kultivační výsledek výtěru z krku s běžnou flórou

V těchto místech
pátráme po hemofilech



Semikvantitativní zpracování moče

- Používá se kalibrovaná plastová klička – do očka kličky se zachytí vždy 1 μl moče
- Tento mikrolitr se rozočkuje většinou na polovinu misky krevního agaru (vy to máte na celé misce)
- Kolonie není třeba přesně spočítat, stačí odhadnout je-li jich více než 100, méně než 10 nebo „něco mezi“

Semikvantitativní hodnocení moče

Počet kolonií na misce	Počet CFU (bakterií) v 1 μ l moče	Počet CFU (bakterií) v 1 ml moče	Hodnocení (platí pro 1 druh bakt.)
Méně než 10	Méně než 10	Méně než 10^4	Kontaminace
10–100	10–100	10^4 – 10^5	Hraniční
Více než 100	Více než 100	Více než 10^5	Infekce

Několik dalších úkolů

- Vyšetření stolice (sledování výsledku na různých půdách)
- Prohlédnutí poševního nátěru, počítání Nugentova skóre
- Prohlédnutí poševního výtěru (kultivace)
- Prohlédnutí výtěru z rány (odběry, otisková metoda)
- Prohlédnutí hemokultur (mikroskopie + kultivace)

Nashledanou u zkoušky!

