P14

Opakování

Základní informace

- student si vytáhne jeden z **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 informace nejsou přímo součástí zadání úkolů, nicméně studenti na ně mohou být tázáni

J01: Mikroskopie

- znát **principy optické mikroskopie** (světelné pole i tmavé pole)
- znát **přípravu mikroskopických preparátů**:
  - **kmene**
  - **vzorku**
  - **nativního preparátu**
  - **barveného preparátu:**
    - **Gramovo barvení**
    - **Ziehl-Neelsen**
    - **barvení pouzder dle Burriho**

J01: Příprava mikroskopického preparátu

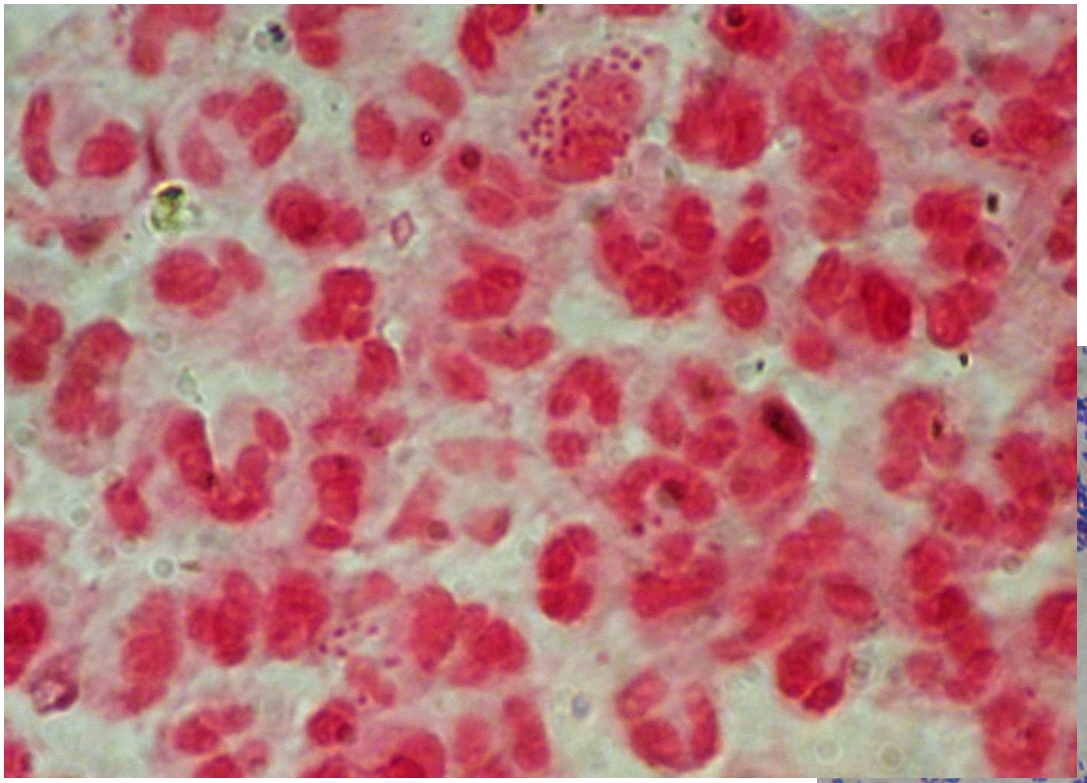
vzorek

- **tekutý vzorek** na podložní sklíčko **kápneme**
- **nátěr na špejli** buď rozmícháme ve fyziologickém roztoku, nebo (pouze u barvených preparátů) přímo natřeme na sklíčko

kmen

- **kápneme** na podložní sklíčko **kapku fyziolog. roztoku**
- **vyžíháme** mikrobiologickou drátěnou **kličku** v plameni
- **po zchladnutí (!) nabereme trochu hmoty bakterií**
- hmotu **rozmícháme** v připravené kapce

J01: Mikroskopie vzorku a kmene



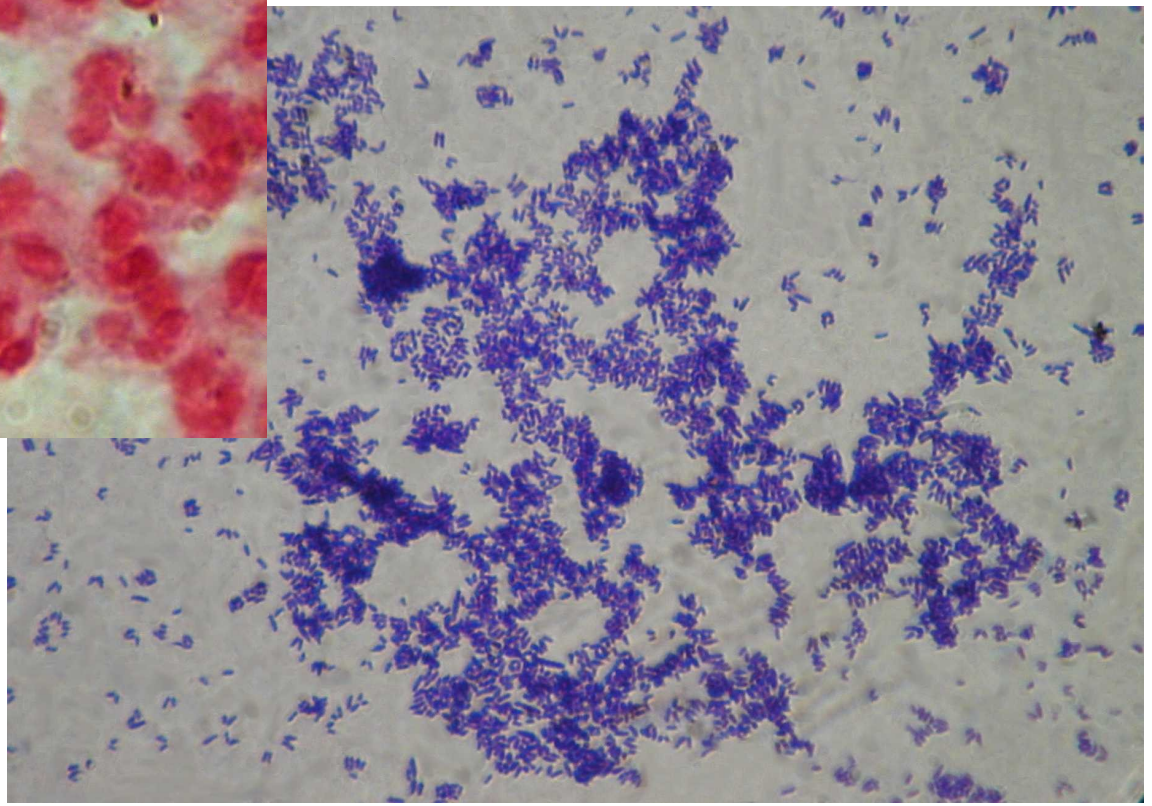


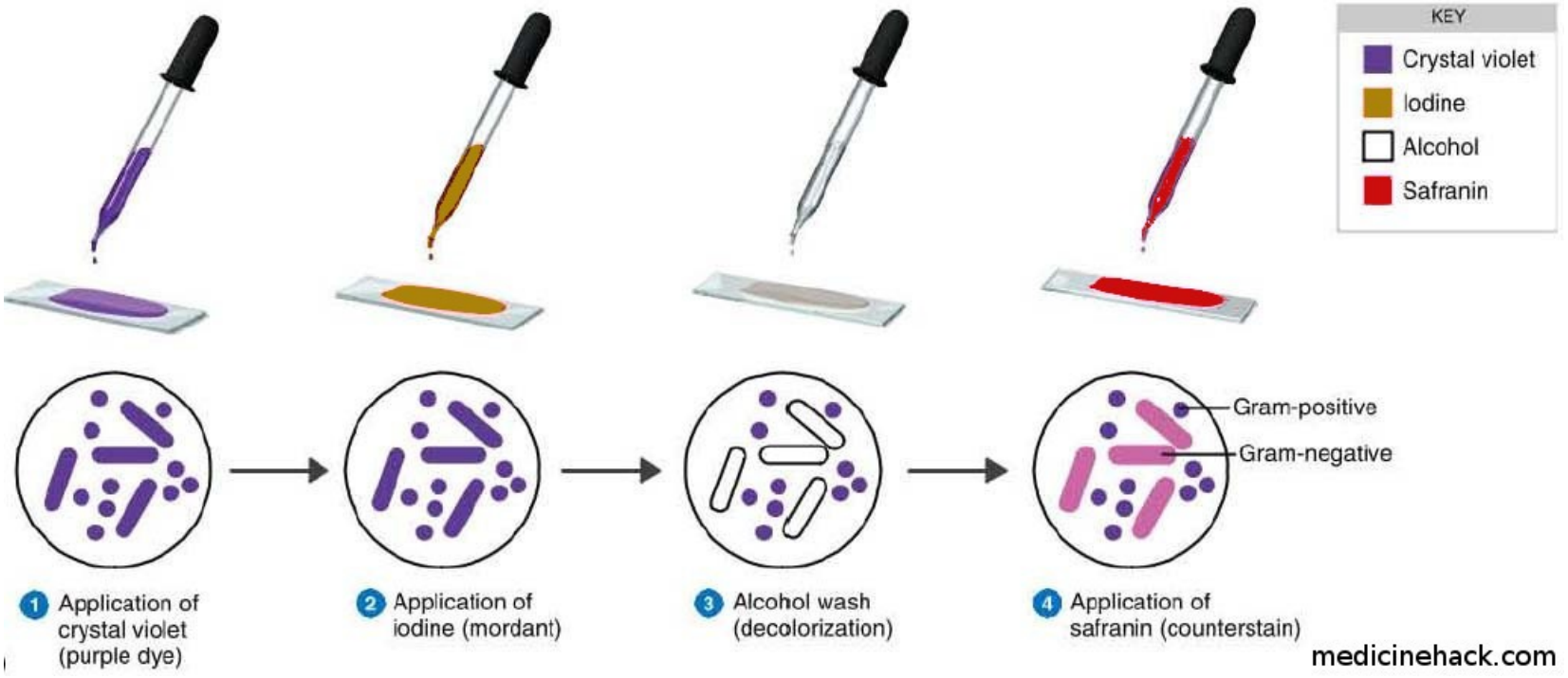
Foto: O. Zahradníček

J01: Příprava nativního preparátu

- kapku, ve které je vzorek či rozmíchaný kmen, **nesušíme**
- **přikryjeme krycím sklíčkem** a **pozorujeme** objektivy, které zvětšují např. 4×, 10× či 40×.
- **nepoužíváme imerzní olej** (!)

J01: Gramovo barvení

Chemikálie	Grampozitivní	Gramnegativní
Krystal. violeť	obarví se fialově	obarví se fialově
Lugolův roztok	vazba se upevní	upevní se méně
Alkohol	neodbarví se	odbarví se
Safranin	zůstanou **fialové**	obarví se **červeně**

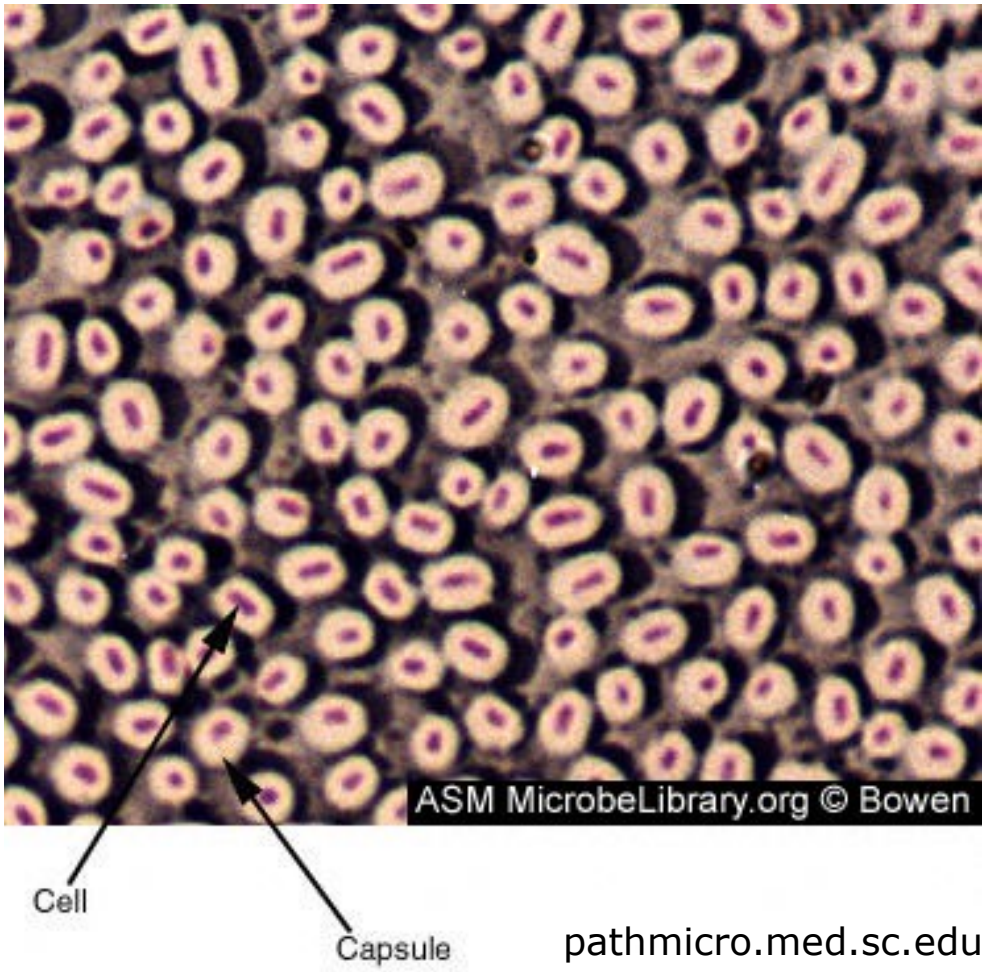


J01: Gramovo barvení (2)

- **krystalová violeť**: (20 –) **30 sekund**
- (opláchnout vodou – lze vynechat)
- **Lugol. roztok**: (20 –) **30 sekund**
- (opláchnout vodou – lze vynechat)
- **alkohol**: **do viditelného výstupu barviva** (cca 15 – 20 sekund)
- opláchnout vodou – nezbytné!!!
- **safranin**: **60 sekund**
- opláchnout vodou
- osušit filtračním papírem (stačí papír z obou stran přiložit)

J01: Barvení pouzder dle Burriho

- v barvení dle Burriho byly nabarveny **bakterie na červeno** a **pozadí dobarveno tuší**
- mikroskopista pak tuší **pouzdro tam, kde se nic neobarvilo**



pathmicro.med.sc.edu

J02: Kultivace bakterií

- znát **nejdůležitější půdy v klinické mikrobiologii** a jejich charakteristiku
- **umět přeočkovat bakteriální kulturu** z jedné pevné půdy na jinou

J02: Půdy v klinické mikrobiologii

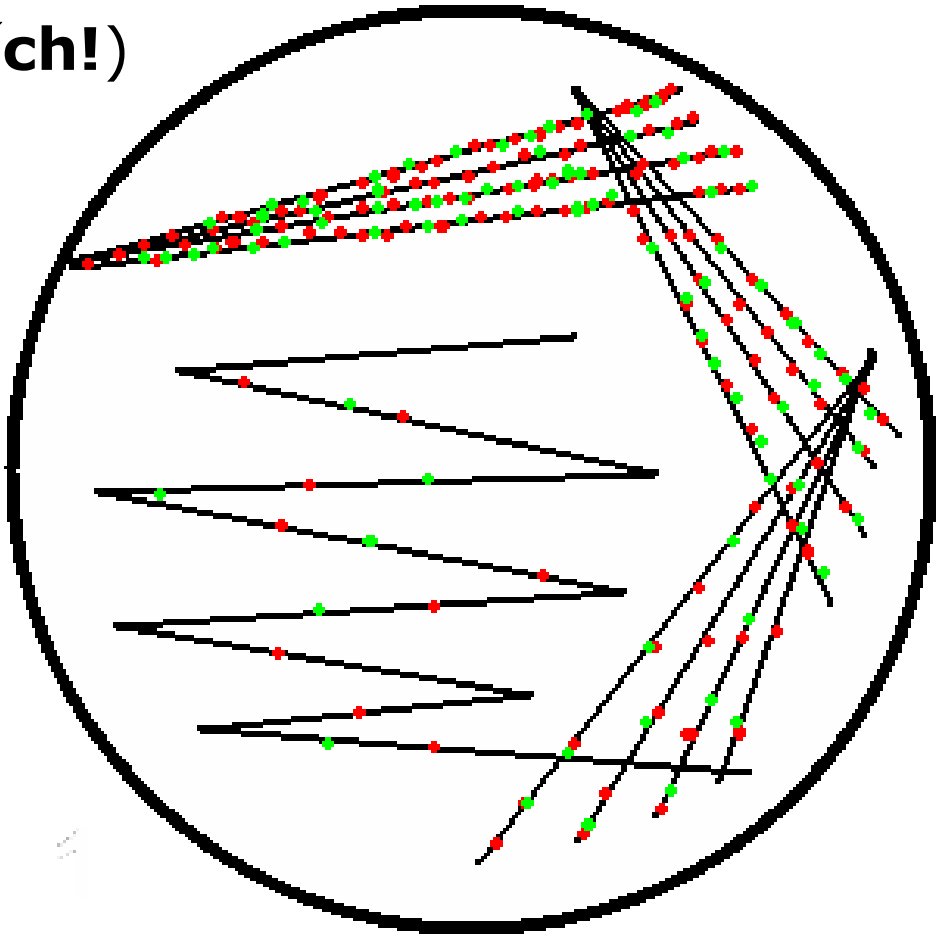
Název	Druh	Barva	Typ	Bakterie
bujon	tekuté půdy	nažloutlá	pomno-žovací	aeroby
VL-bujon				anaeroby
selenitový bujon			selektivně pomnož.	salmonely
Sabourau-dův agar	pevné půdy ve zkumavce	skoro bezbarvá	selektivní*	houby
Löwentein-Jensen		bílá až velmi světle zelená	obohacená	mykobakteria (pův. TBC)
krevní agar	pevné půdy v misce	červená	obohacená diagnostická	většinu bakterií
Endova půda		růžová	selektivně diagnostická	především enterobakterie

J02: Půdy v klin. mikrobiologii (2)

Název	Druh	Barva	Typ	Bakterie
MH	pevné půdy na Petriho miskách	skoro bezbarvá	speciální	atb citlivost
NaCl		červená -hnědá	selektivní	stafylokoky
VL-agar		červená	jako KA	anaeroby
XLD (a blízký MAL)		oranžová	selektivně diagnostická	salmonely
čokoládový agar		hnědá	obohacená	hemofily, neisserie
Levinthalův agar		nažloutlá	obohacená	hemofily
Slanetz-Bartley		světlounce růžová	selektivně diagnostická	enterokoky

J02: Přeočkování agarové kultury

- **vyžíhejte** kličku
- **naberte kmen** (pouze teď, **nikdy znovu v dalších krocích!**)
- **naočkujte** první úsek
- **vyžíhejte** kličku
- **rozočkujte** druhý úsek
- **vyžíhejte** kličku
- **rozočkujte** třetí úsek
- **vyžíhejte** kličku
- **rozočkujte** „hádka“



J02: Přeočkování agar. kultury (2)

- **důležité poznámky**:
  - zapomíná se na **vyžíhání** mezi jednotlivými kroky
  - zapomíná se na to, že **čáry se musí křížit**
  - nehodnotí technická dokonalost čar
  - **jde o pochopení** (a případně i vysvětlení) **principu křížového roztěru**, ne o dokonalé technické provedení

J03: Biochemické identifikace bakterií

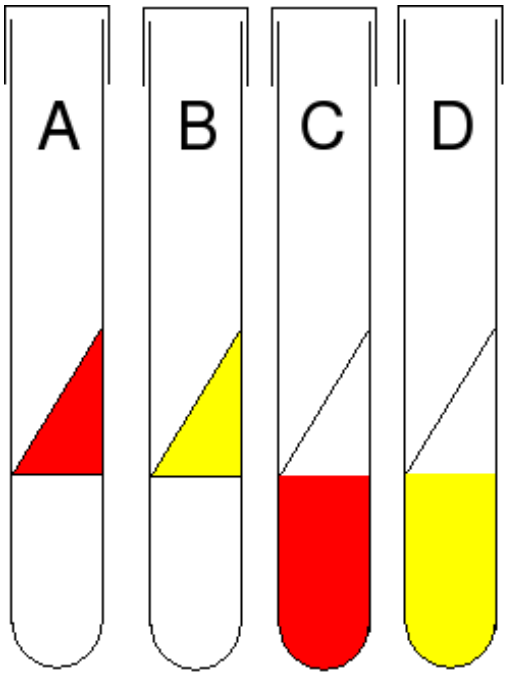
- **umět provést katalázový test, testy s diagnostickými proužky** (oxidáza, PYR, INAC) a **vědět v jakém případě se použijí** (tedy význam pro diagnostiku)
- **umět použít Hajnovu půdu** k odlišení fermentujících a nefermentujících tyček
- **umět odečíst biochemické testy** typu ENTEROtest (k úkoly **dostanete vše potřebné**, **určíte druh** mikroorganismu, **procento pravděpodobnosti** a **index typičnosti**)

J03: Oxidázový test

- **filtrační papírek** na diagnostickém proužku napuštěný příslušným reagens **přitiskněte na kolonie** testovaného kmene
- proužek položte do víčka Petriho misky otisknutými koloniemi nahoru
- **POZ** = **do 30 s** intenzivní **modré** zbarvení
- OPOŽDĚNĚ POZ = do 2 min intenzivní modré zbarvení
- **NEG** = **beze změny** nebo modrání až po uplynutí 2 min

J03: Hajnova půda

- **Hajnova půda**
  - štěpení **laktózy (nahoře)** (A = NEG, B = POZ)
  - štěpení **glukózy (dole)** (C = NEG, D = POZ)
  - produkce **H_2S** (POZ = **zčernání** půdy)
    - v případě pozitivity H_2S v podstatě nelze posoudit fermentaci glukózy!
  - tvorba **plynu** (POZ = **potrhaná** půda, bublinky, půda vysunutá nahoru)



fr.wikipedia.org

J03: Vyhodnocení ENTEROtestu

	1 ONPG	2 H	3 G	4 F	5 E	6 D	7 C	8 B	9 A	10 H	11 G	12 F	13 E	14 D	15 C	16 B	17 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	

kmen 530 063 = ***E. coli***; **99,89 %** (pravděpodobnost s jakou je tento kmen opravdu *E. coli*); **T_{in}=1,00** (míra shody s „ideálním“ kmenem)

J04: Dekontaminační metody

- znát **rozdíl mezi růstovým optimem**, **inhibiční mezí** (mezí růstu) a **baktericidní mezí** (mezí přežití) a možnosti ověření těchto parametrů
  - růsti za extrémních podmínek (inhibiční mez)
  - po působení extrémních podmínek mikroorganismy přemístíme do růstového optima (baktericidní mez)
- **vyhodnocení účinnosti dezinfekce**:
  - vyhodnotit, jaká koncentrace dezinfekce je baktericidní
  - **zdůvodnit proč je baktericidní** a nikoli jen bakteriostatická (inhibiční)

J04: Účinnost horkovzdušné sterilizace

- umět **vyhodnotit účinnost horkovzdušné sterilizace** pro rezistentní sporulující bakterie
  - **160 °C / 60 minut;**
    170 °C / 30 minut;
    180 °C / 20 minut

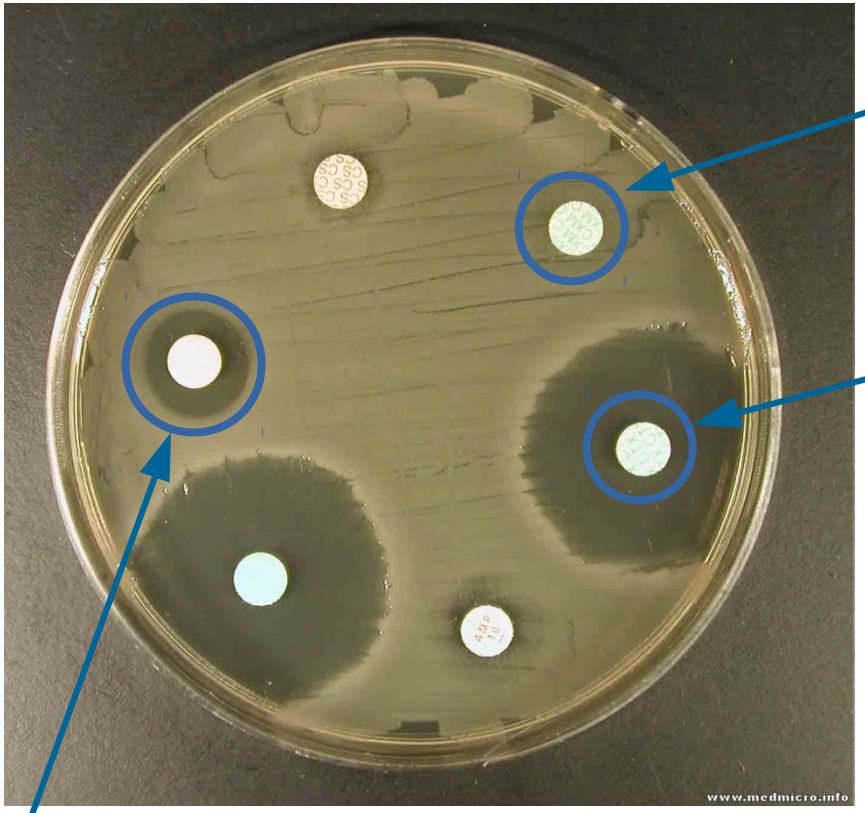
J04: Výběr vhodného dekontaminačního postupu

- dodatkový úkol k předchozím vyhodnocení dezinfekce nebo sterilizace
- vytvoření dvojic z předložených lístečků (například spárovat „sterilizace kovu, který nesnese vlhké teplo“ a „horkovzdušná sterilizace“)

J05: Antimikrobiální látky

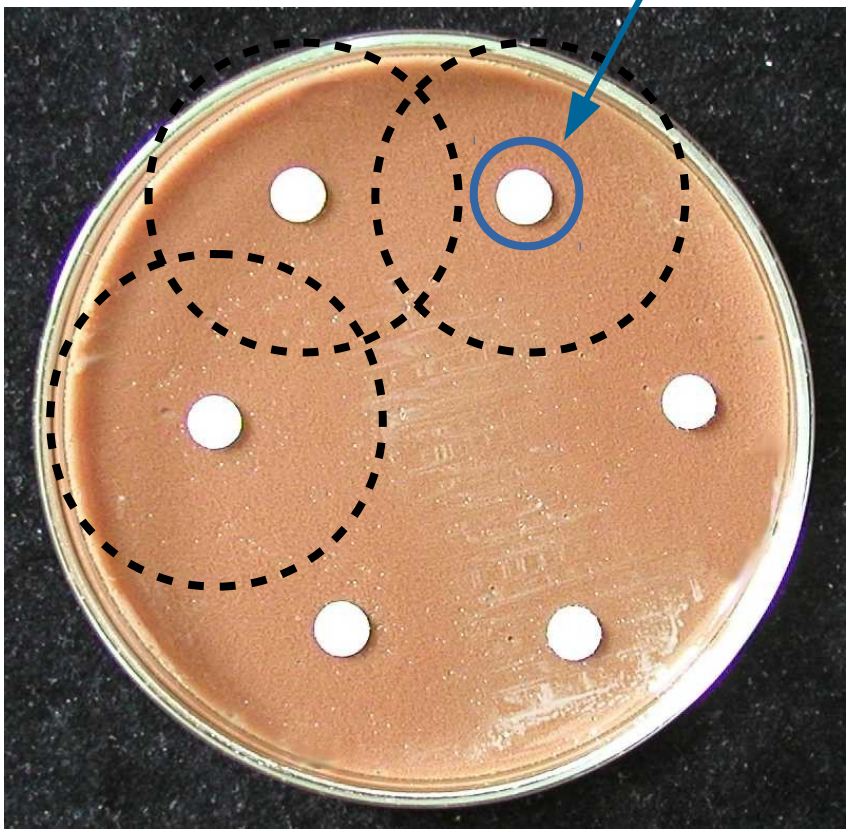
- **znalost kvalitativních i kvantitativních testů:**
  - **difúzní diskový test**
  - E-test (znát teoreticky)
  - **mikrodiluční test**
  - betalaktamázy (běžné i širokospektré jako ESBL a ampC) (znát teoreticky)

J05: Difúzní diskový test



Žádná zóna: **Mikrob je rezistentní**

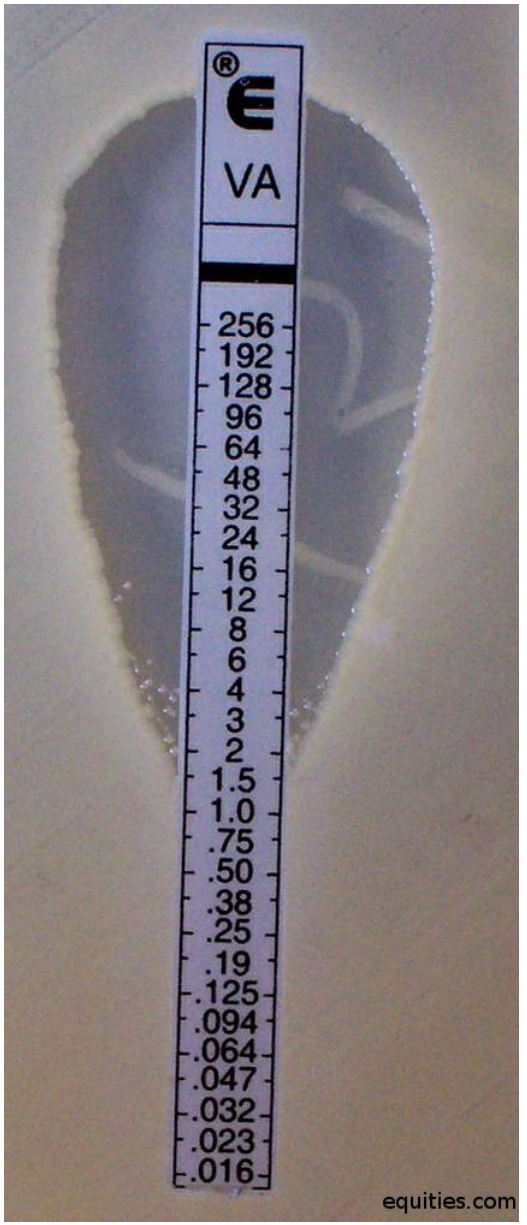
Zóna je větší než hraniční: **Mikrob je citlivý**



Zóna existuje, ale je menší než hraniční: **Mikrob je rezistentní**

J05: E-test

- **kvantitativní test**
- princip podobný difúznímu diskovému testu
- místo disku **proužek**
- v proužku **stoupající koncentrace ATB od jednoho konce ke druhému**
- **zóna** není kruhová, ale **vejčitá**
- na papírku je **stupnice – jednoduché odečítání**



Mikrodiluční test

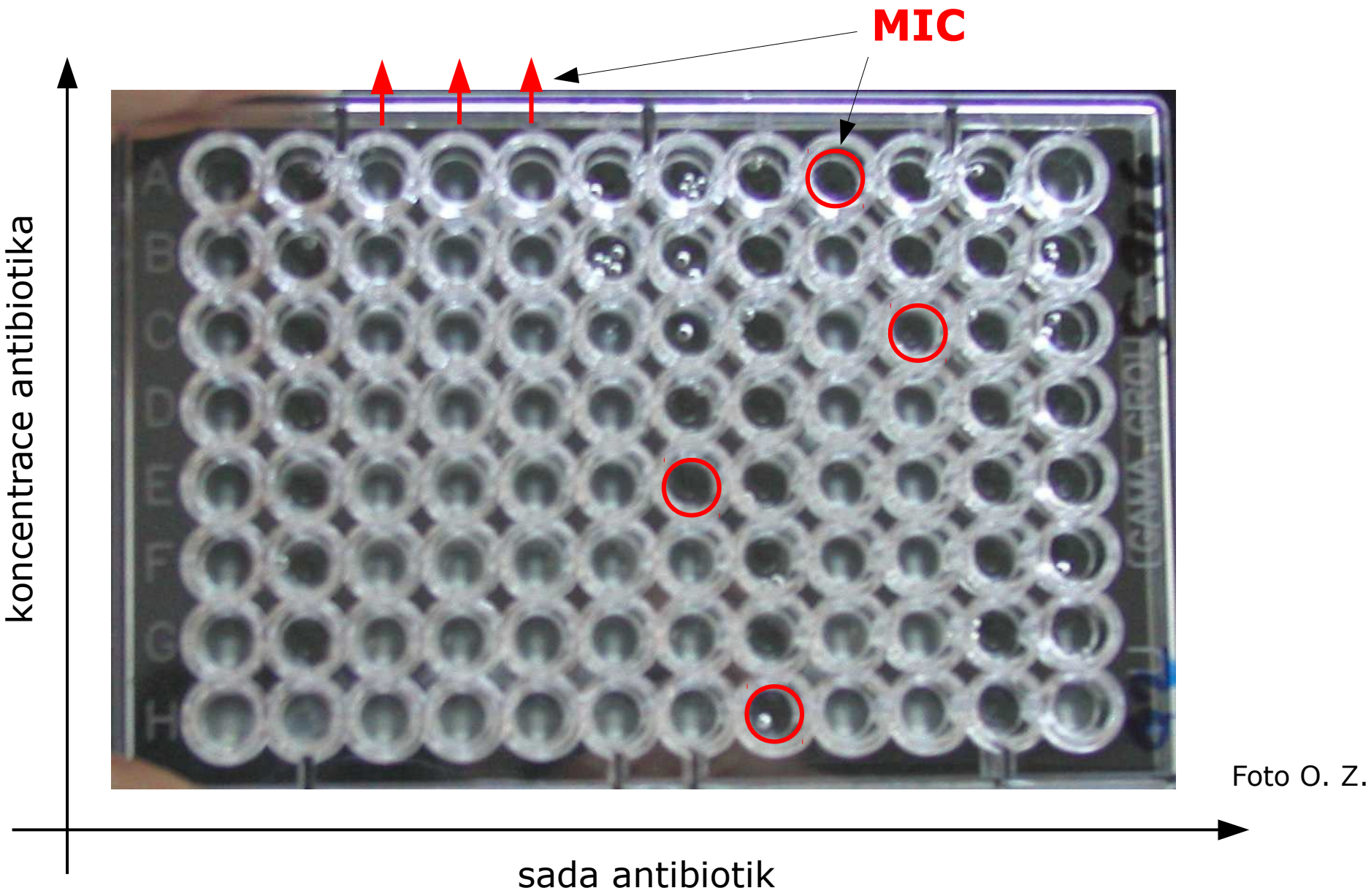


Foto O. Z.

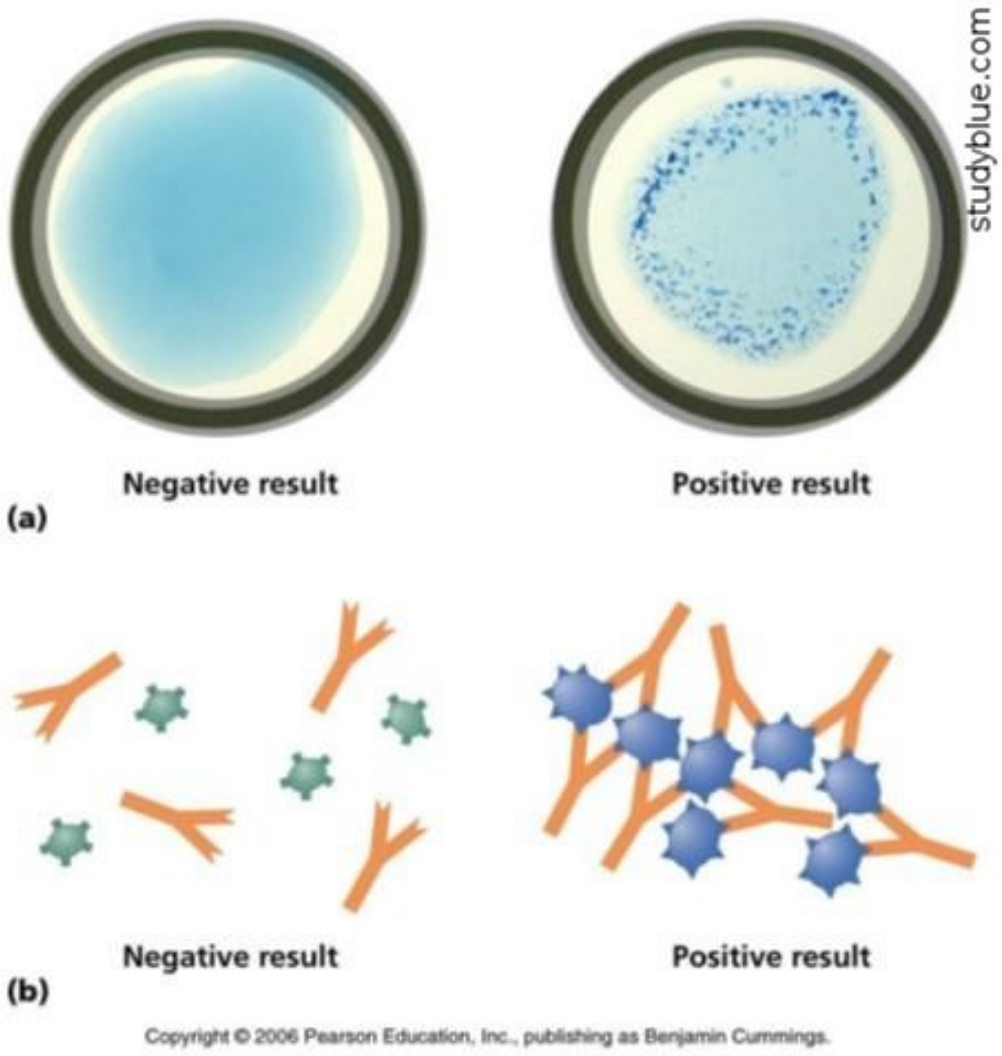
J06 – J08: Serologie
Přímé vs. nepřímé metody

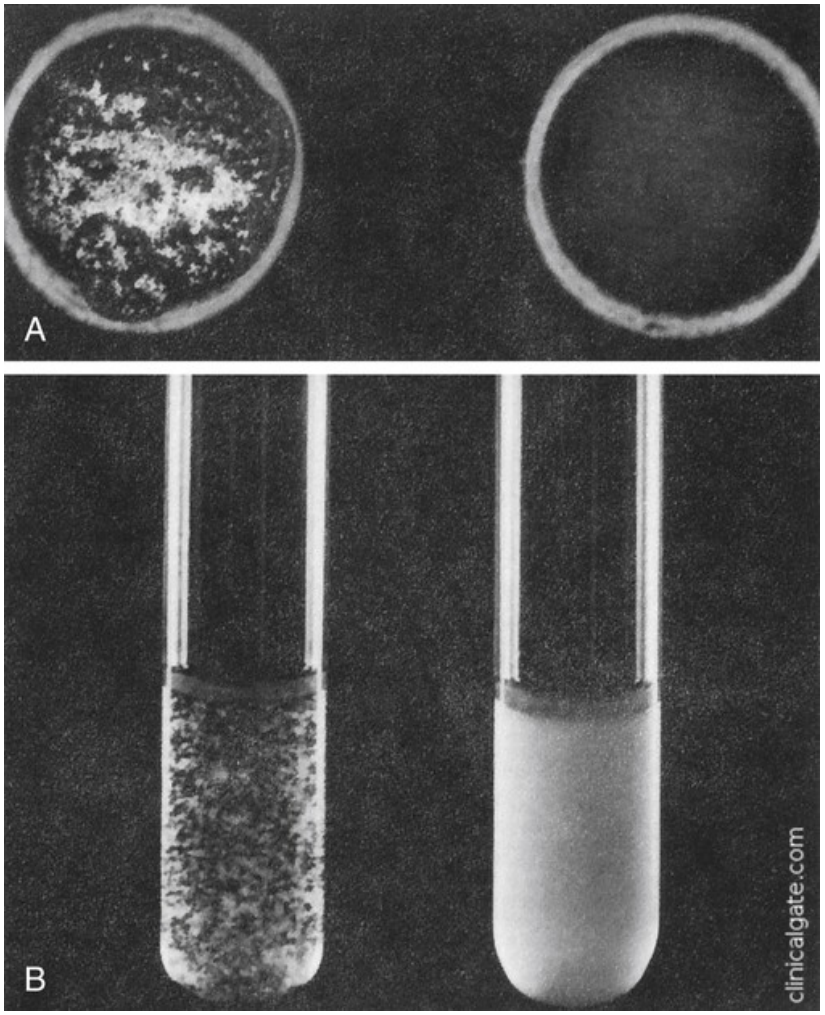
přímé	nepřímé
• **hledáme mikroba, jeho část či jeho produkt** (produktem může být například nějaký bakteriální **antigen** či jed – toxin)	• **hledáme protilátky** • protilátka není součástí ani produktem mikroba (**produkt makroorganismu**, odezvou na činnost mikroba)
• **agens je přítomno nyní**	• **agens bylo přítomno** někdy v minulosti

J06 – J08: Serologie

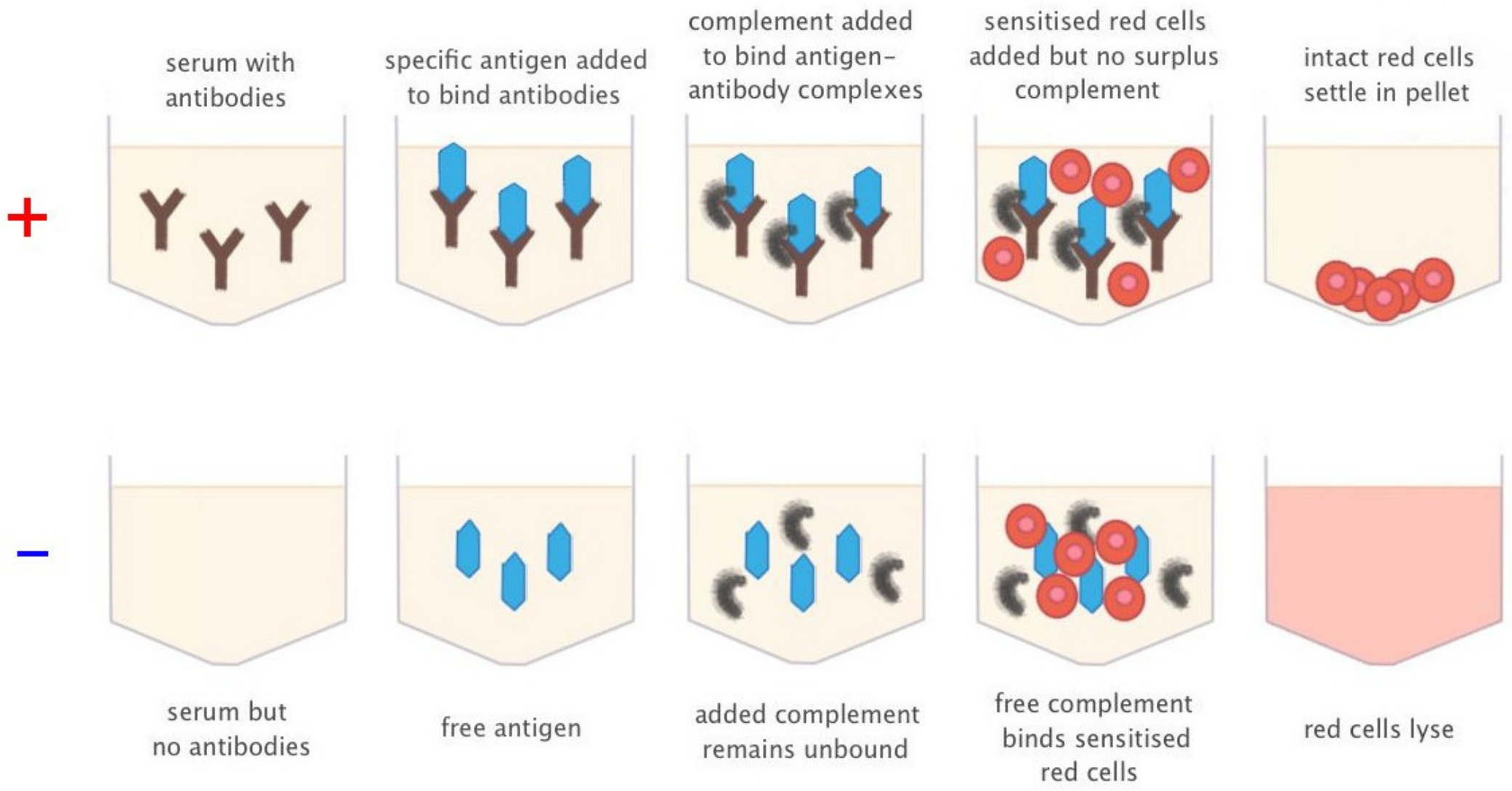
- **umět interpretovat nálezy přímých a nepřímých metod** (**titr protilátek**, **dynamika titru**, **třídy protilátek**, avidita protilátek)
- **znát principy jednotlivých reakcí a vědět jak vypadají jejich výsledky:** precipitace (mikroprecipitace v agaru), aglutinace, aglutinace na nosičích, komplementfixační reakce (KFR), neutralizační reakce (ASLO, HIT, VNT), metody se značenými složkami (imunofluorescence, ELISA, Western blot), imunochromatografické testy
- **umět provést a vyhodnotit sklíčkovou aglitunaci** (např. průkaz EPEC)
- **popsat video aglutinace likvoru** (vědět, proč se tu nikdy neurčují titry, natož IgG a IgM!)

J06: Aglutinace (demontrace různých možností provedení)





J07: KFR (princip reakce)

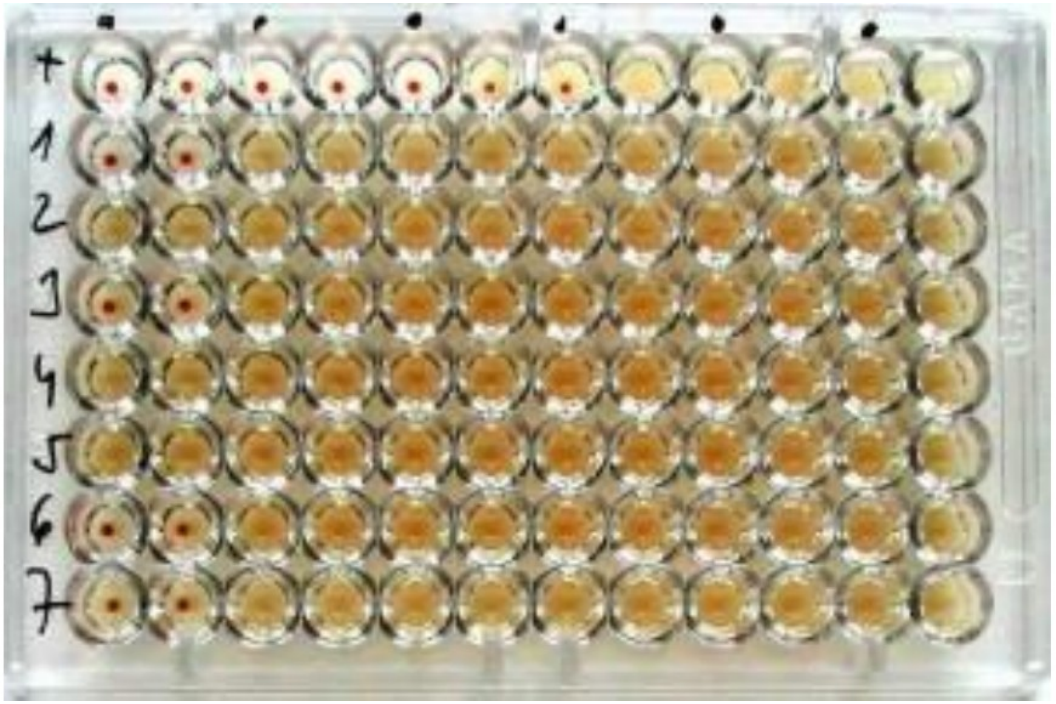


http://microgmome.priobe.net

tjji 2013. Creative Commons

J07: ASLO

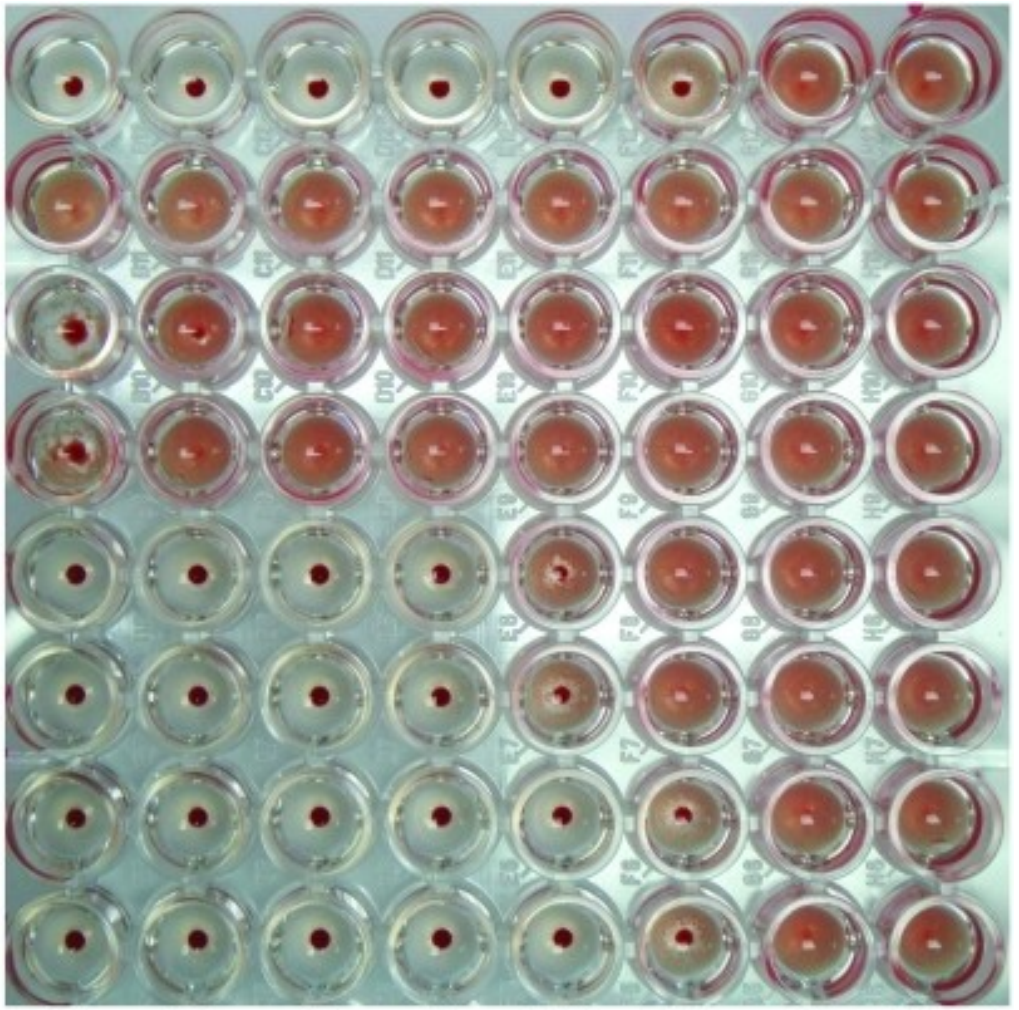
- **zhodnotit význam tohoto testu**
- **vysvětlit princip**
- destička se odečítá naležato, první řádek je pozitivní kontrola



J07: HIT

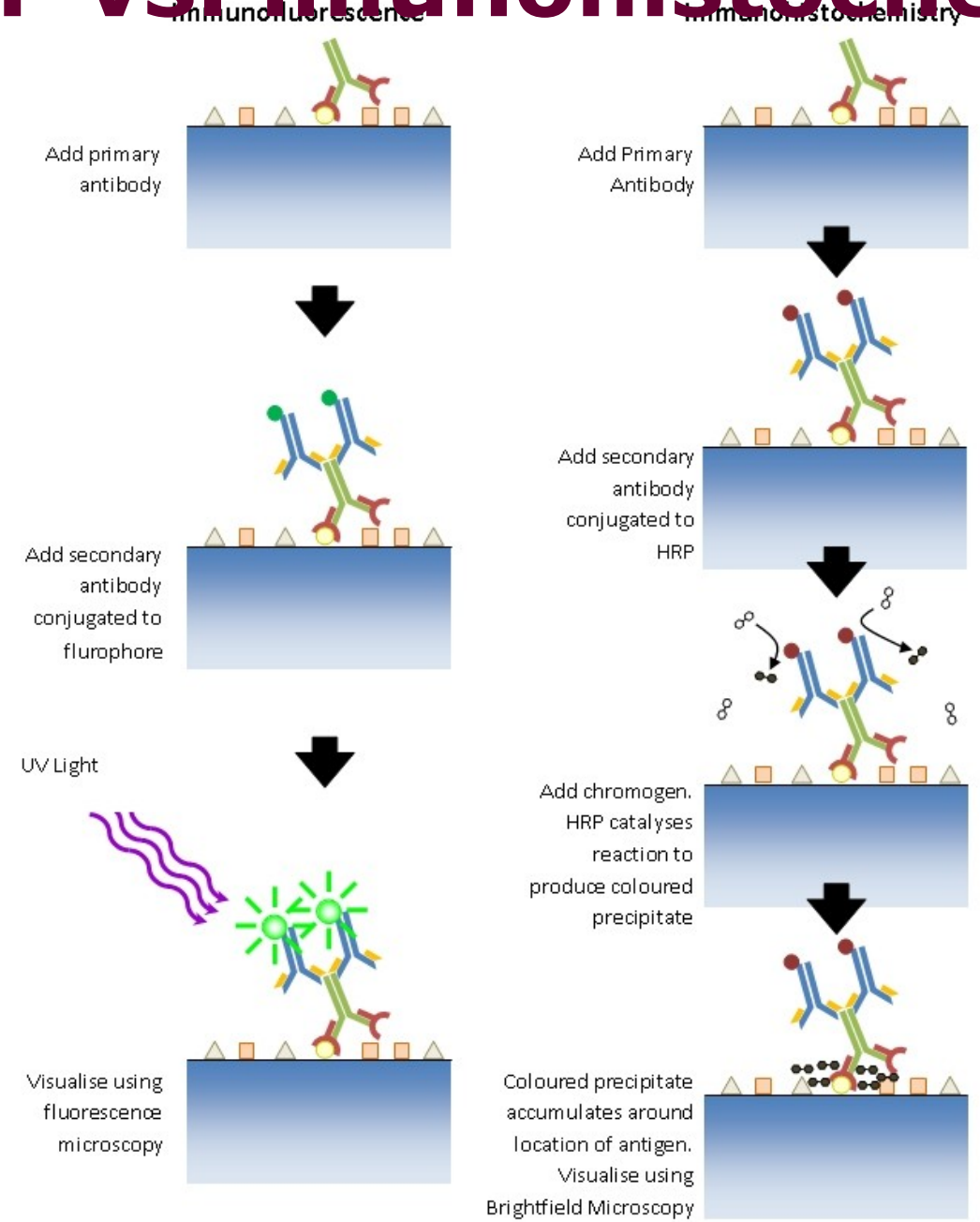
	Components	Interaction	Microtiter Results
A	RBCs		No Reaction
B	Virus + RBCs		Hemagglutination
C	Virus + Antibody + RBCs		Hemagglutination Inhibition

microbeonline.com



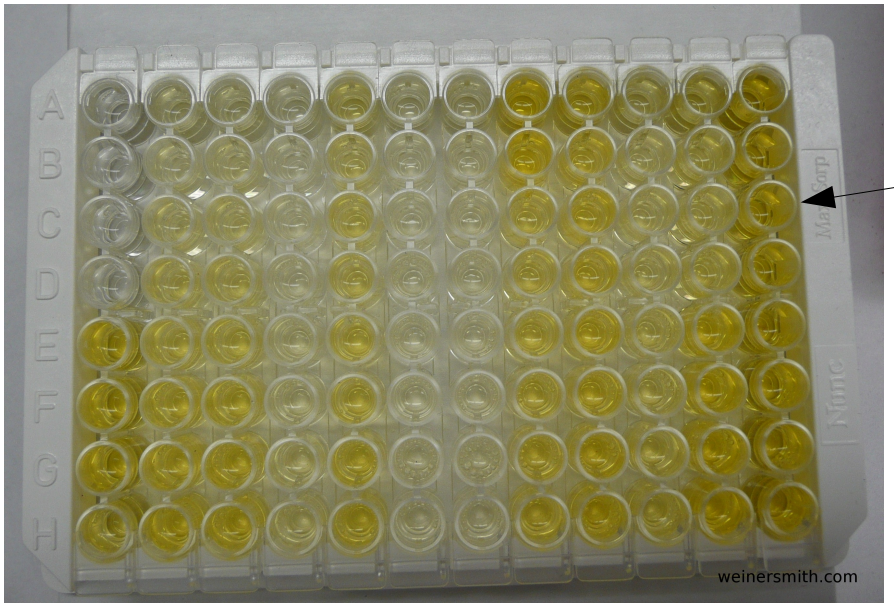
openi.nlm.nih.gov

J08: IMF vs. imunohistochemie

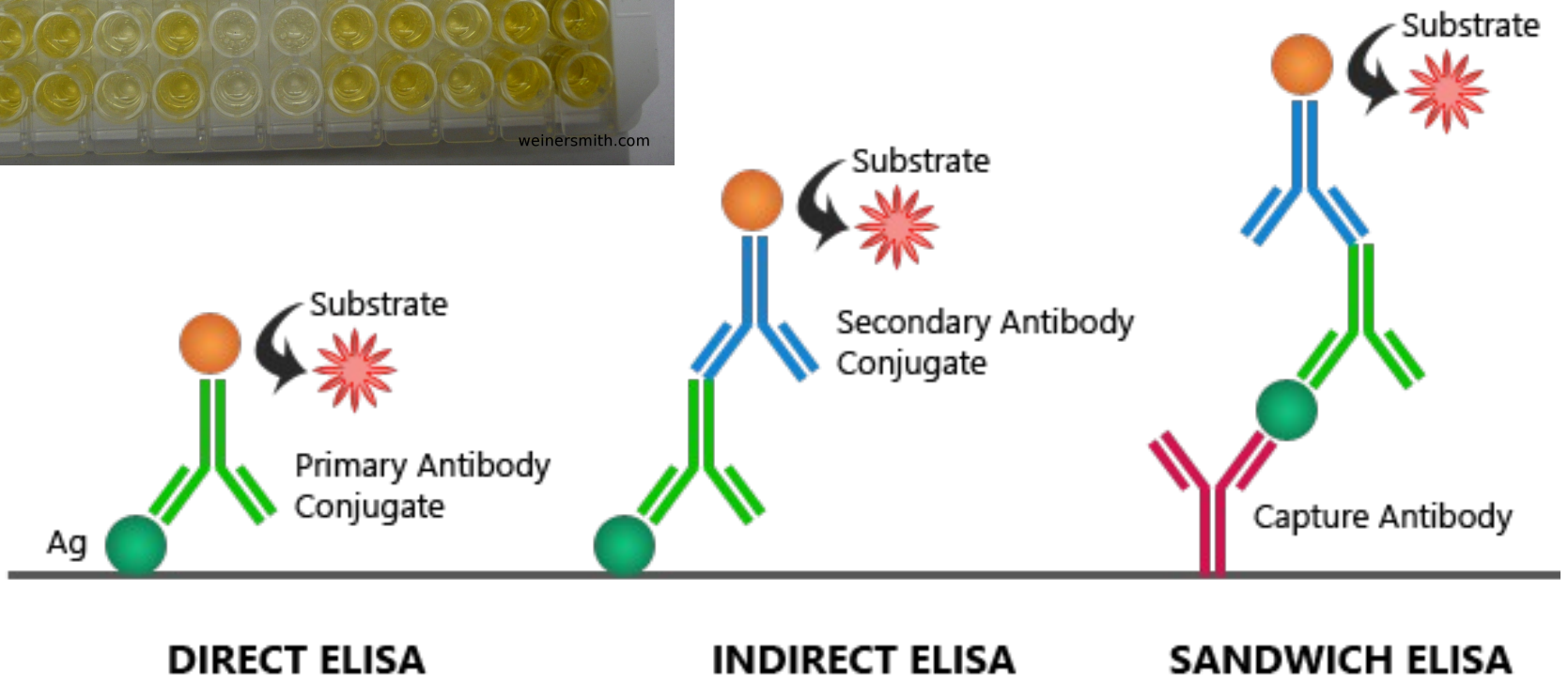


di.uq.edu.au

J08: ELISA



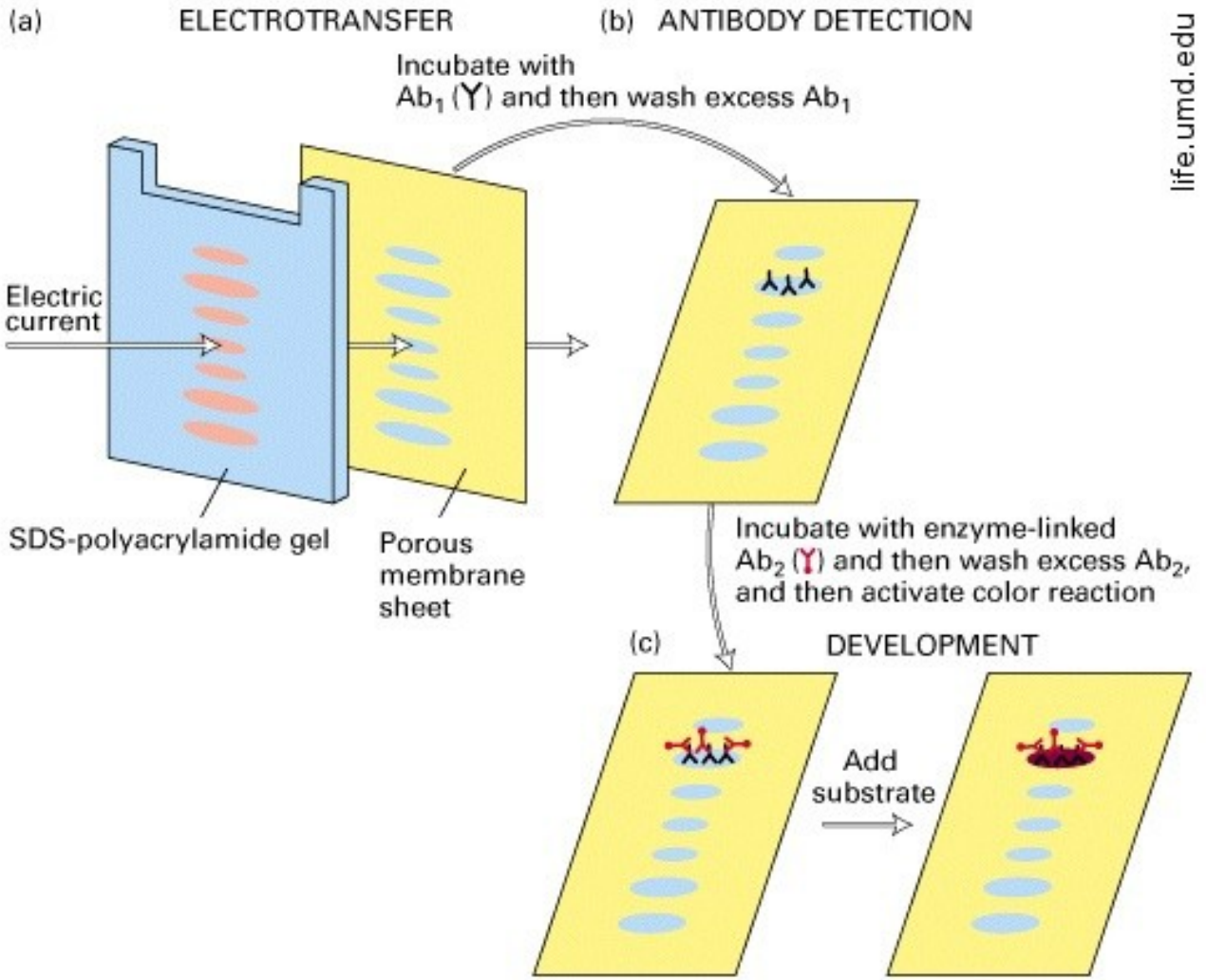
alkalická fosfatáza



J08: ELISA (2)

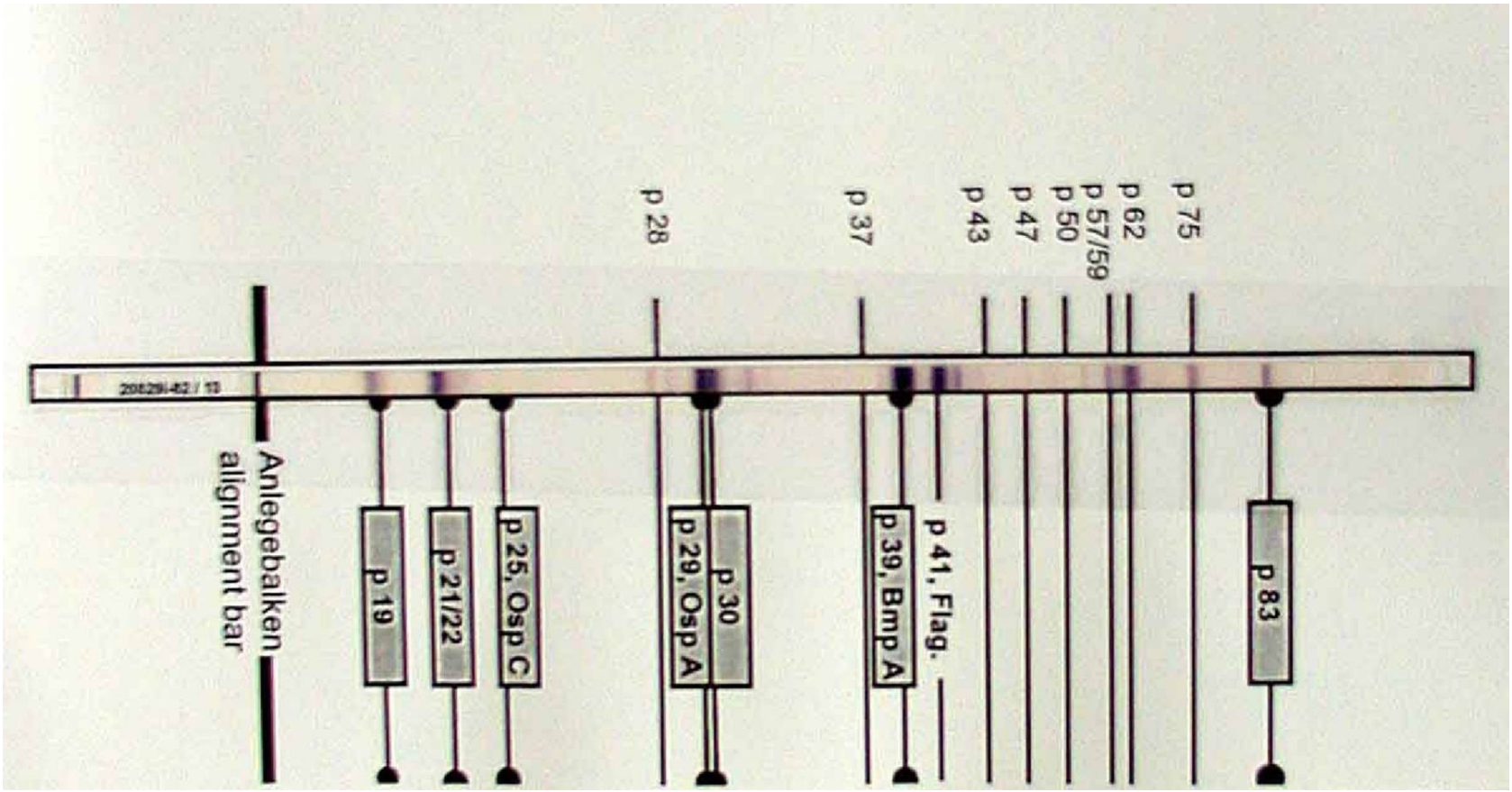
- **umět vyhodnotit reakci ELISA**
- vědět, že destička se odečítá **spektrofotometrem**
- když dostanete informace, jak určit **cut off**, být schopni určit negativní a pozitivní hodnoty a interpretovat (s ohledem na třídy protilátek)
- ze stavebnice **sestavit schéma průkazu** HBsAg a anti-HBs při pozitivním a negativním průběhu reakce
- **umět interpretovat nálezy dohromady** (u borreliózy a toxoplasmózy – vyhodnotit dohromady nejen různé serologické reakce, ale také anamnézu)
- **pacient, který nemá protilátky, není „zdravý pacient", pokud má potíže!**

J08: Western blot



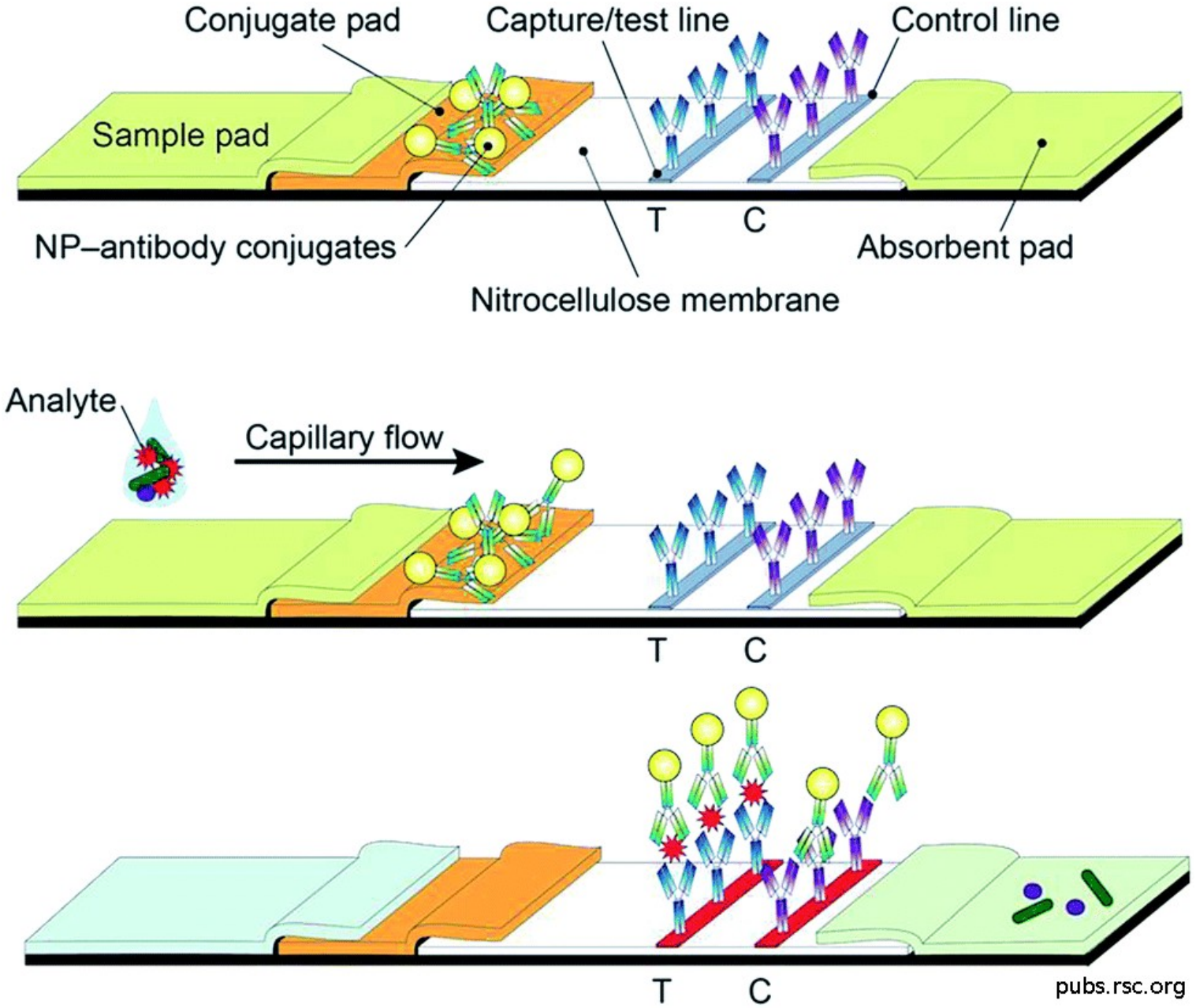
J08: Western blot (2)

- vzhled proužku s přiloženou šablonou



medmicro.info

J08: Imunochromatografické testy



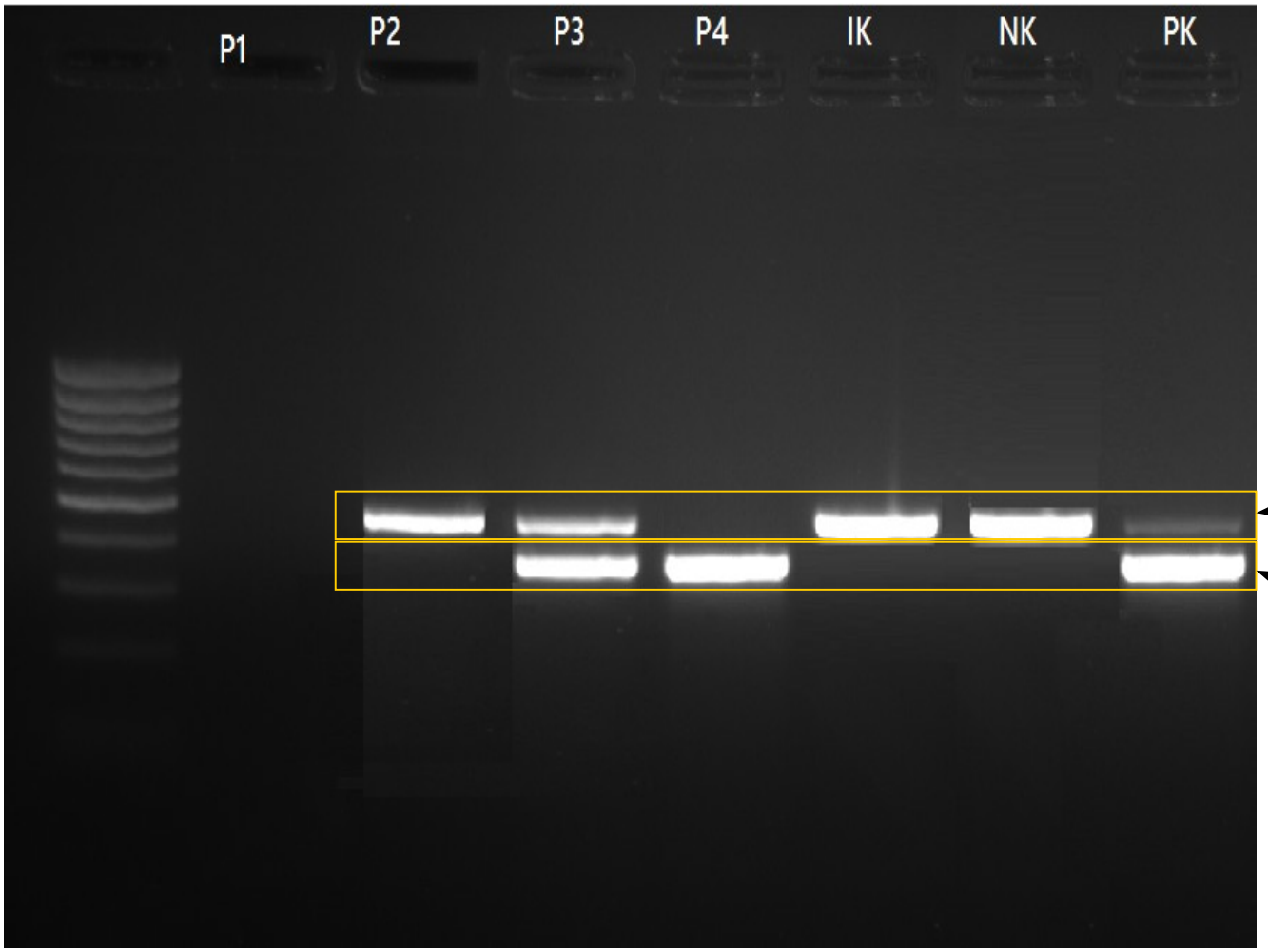
J09: Molekulárně biologické metody

- **vědět, kdy a jak se používají v mikrobiologii** (např. mikroskopický a kultivační průkaz je obtížný nebo není vůbec možný)
- **mít rámcový přehled o principech**, není nutno znát detaily
- **znát interpretaci PCR**

J09: Výsledky PCR s IC

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

J09: Detekce PCR produktu



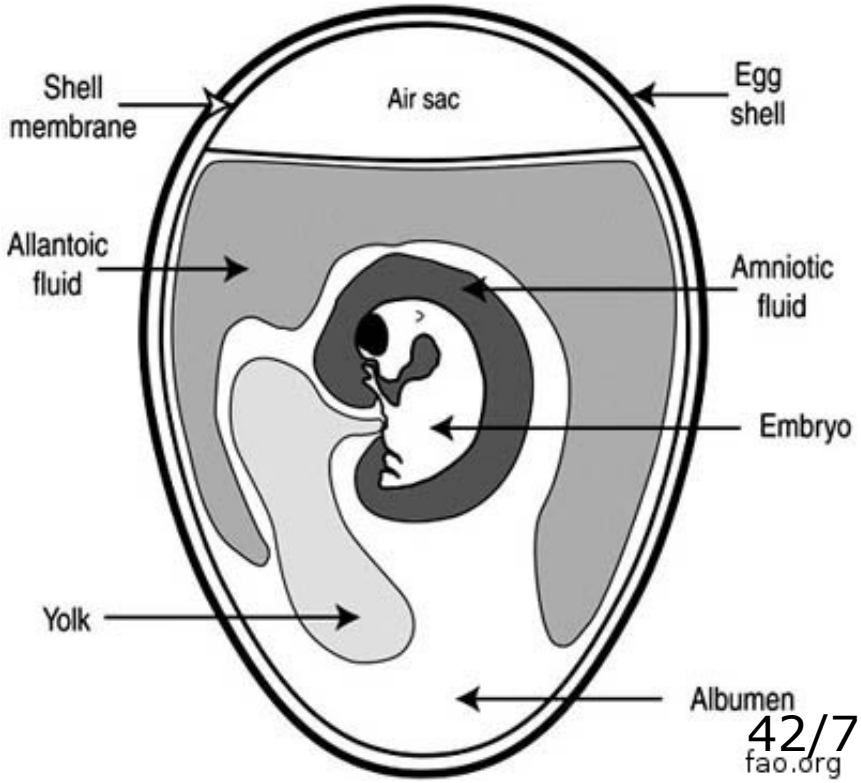
Pacienti P3 a P4 – pozitivní, pacient P2 – negativní, pacient P1 – inhibice reakce. IK = kontrola, PK = pozitivní kontrola, NK = negativní kontrola; zcela vlevo ladder

J10, J11: Virologie

- **větší část virologie totožná se serologií** (např. průkaz HBsAg apod.)
- **přidané úkoly:**
  - **přímý průkaz viru** na vaječných zárodcích a buněčných kulturách (a na sajících myšatech, teoreticky)
  - znát **části oplodněného vejce**
  - **poznat přítomnost cytopatického efektu**
  - **vědět kdy je a kdy není vidět výsledek izolace viru**
  - co se dá dělat, **pokud výsledek vidět není** (**hemaglutinace**, **hemadsorpce**)

J11: Izolace a kultivace virů

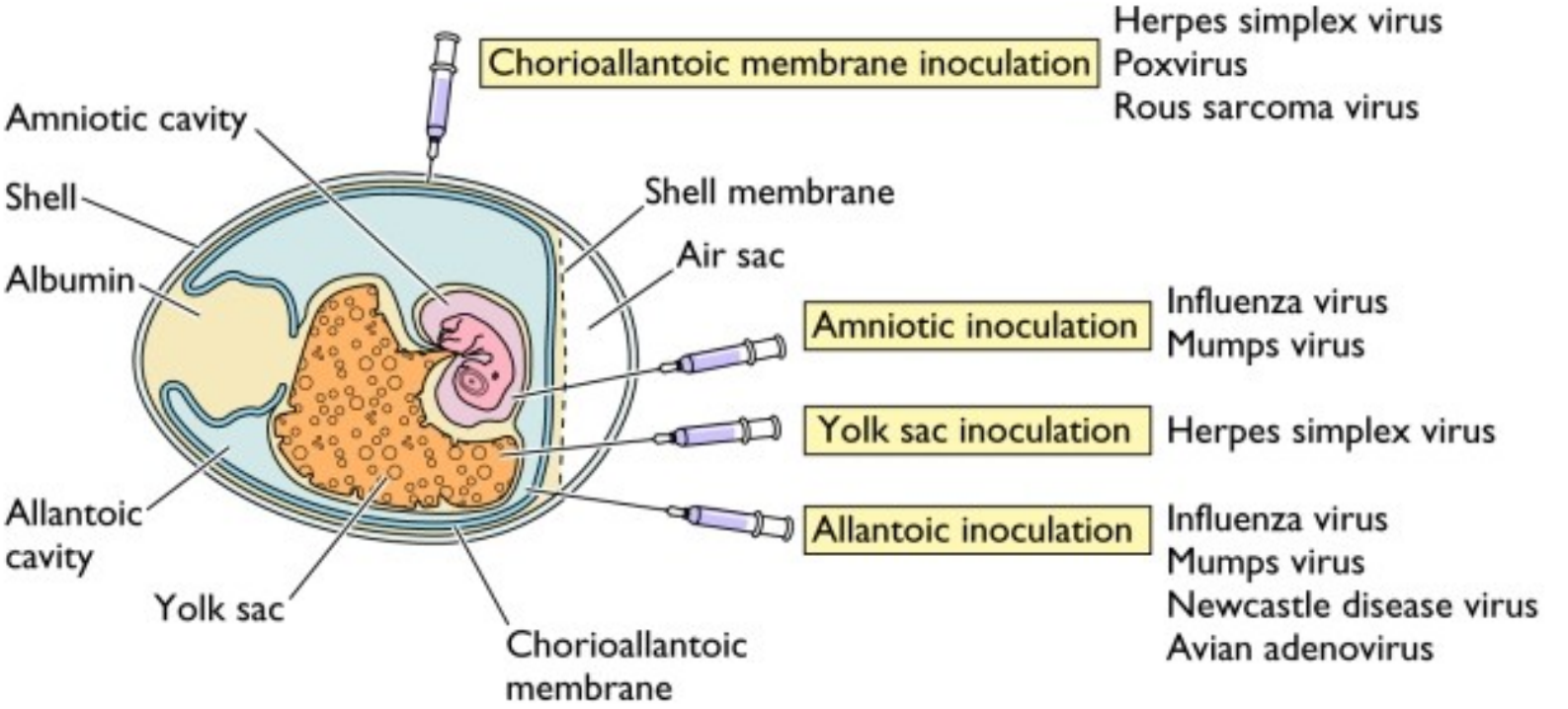
- zvíře se používá dnes již méně často (sající myšata)
- **kuřecí zárodek** (asi 10 dnů staré embryo):
  - pod skořápkou **papírová blanka** (uzavírá vzduchovou bublinu)
  - na papírovou blanku nasedá **chorioalantoidní membrána**, která ohraničuje **allantoidní dutinu**
  - v allantois se vznáší **amniová dutina s vlastním embryem**
  - **žloutkový vak**



fao.org

J11: Izolace a kultivace virů (2)

- směry očkování do jednotlivých struktur

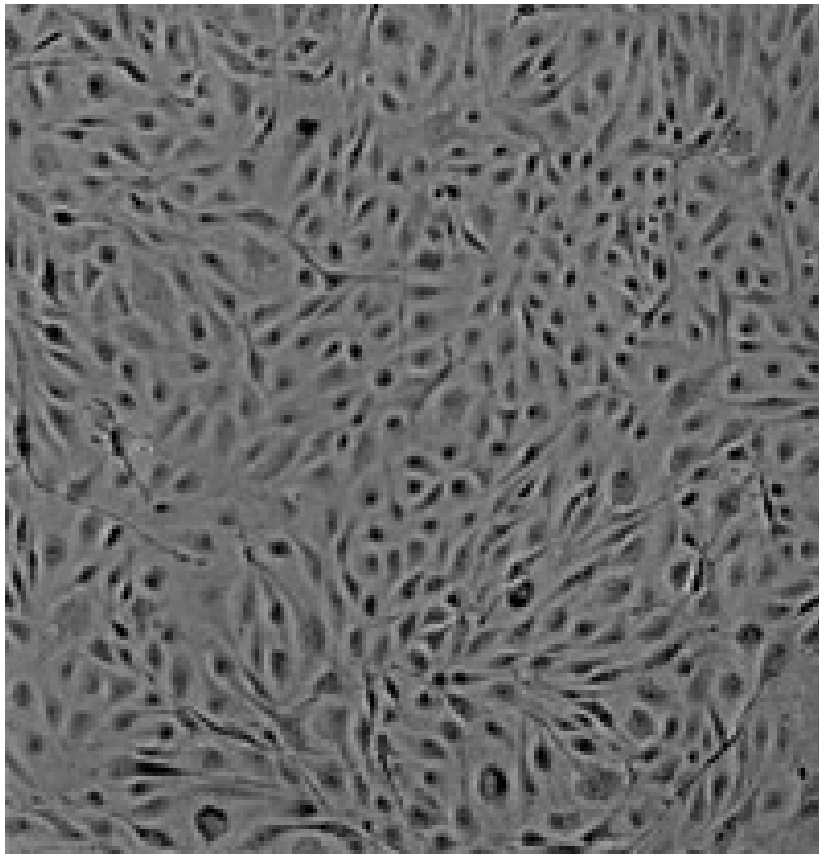


Adapted from F. Fenner et al., *The Biology of Animal Viruses* (Academic Press, New York, N.Y., 1974), with permission.

plus.google.com

J11: Cytopatický efekt

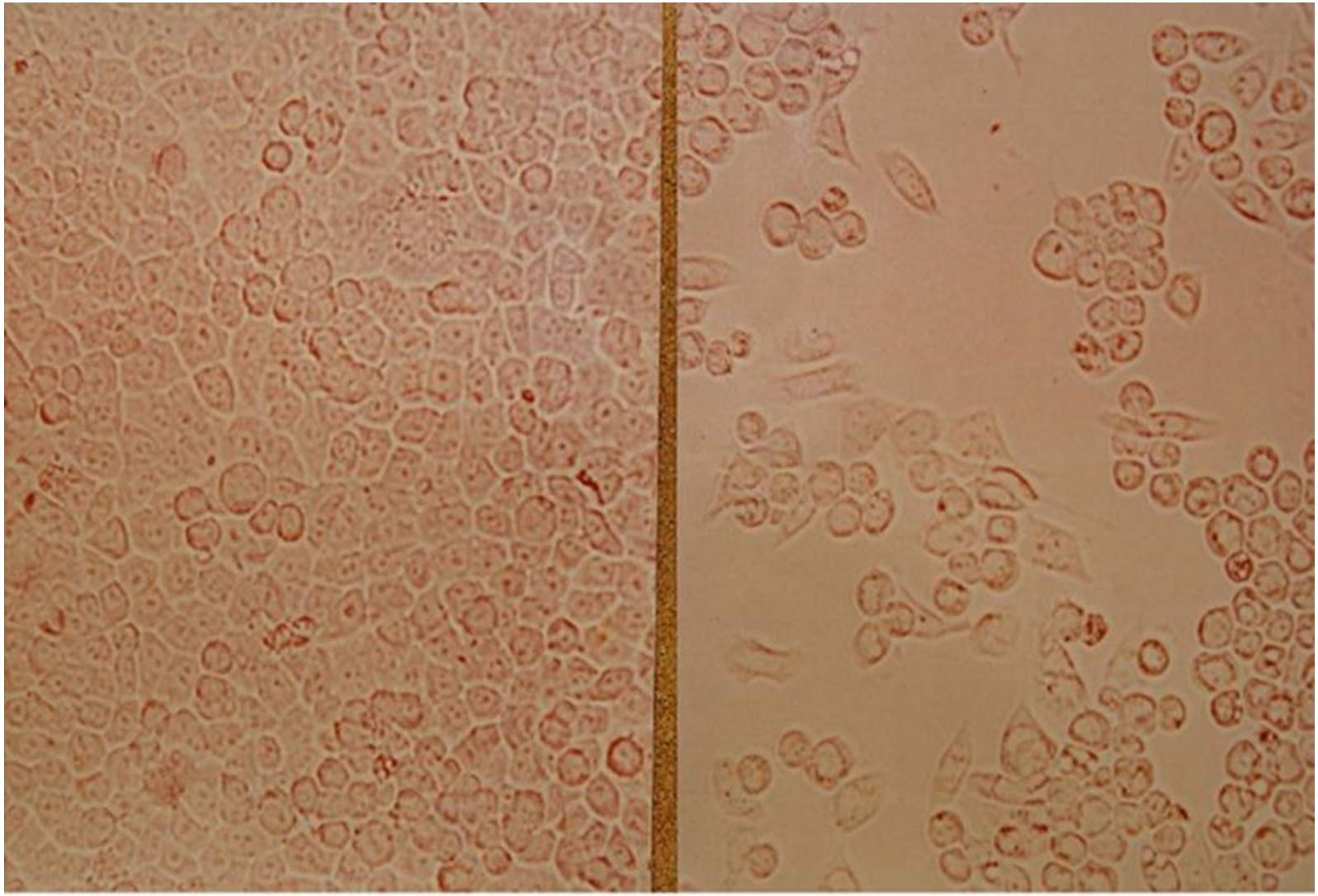
- buněčná kultura bez a s CPE



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

www.herpesdiagnosis.com/diagnose.html

J11: Cytopatický efekt (2)



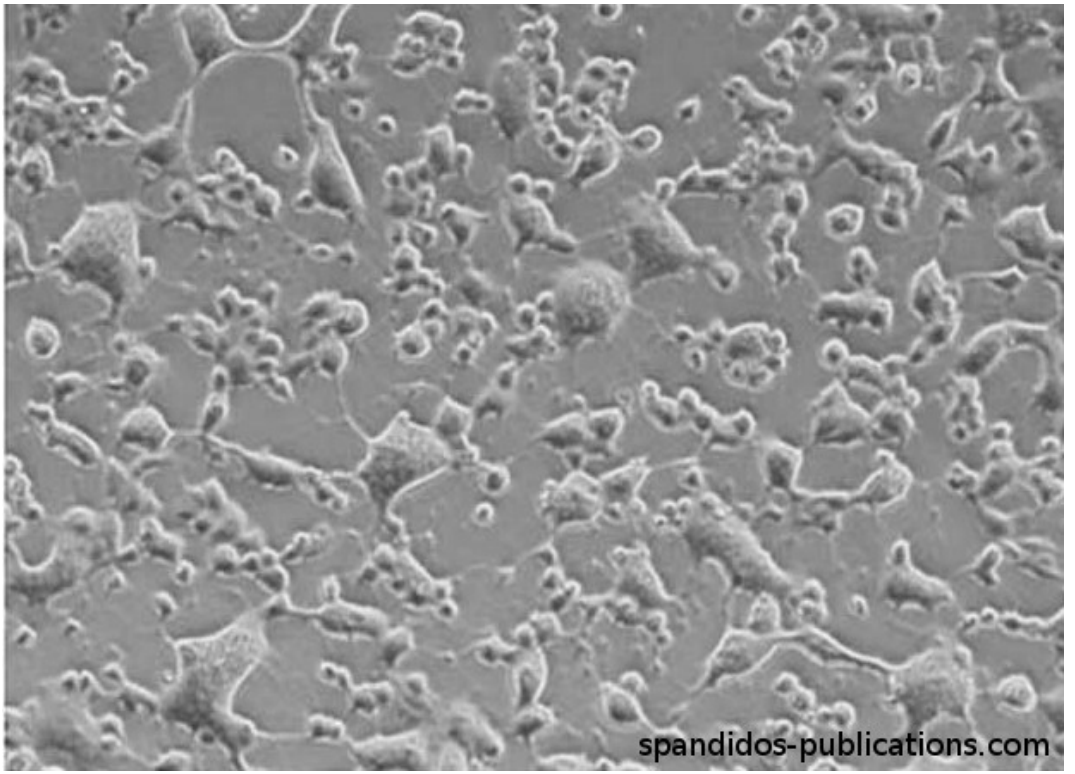
Photographs of normal tissue culture-Left side Photographs of infected tissue-Right side

citybugs.tamu.edu

J11: Cytopatický efekt (3)

J11: Cytopatický efekt (4)

- **swelling and clumping:**
  - infikované buňky se **zvětšují** a postupně **shlukují** do střapcovitých (hroznovitých) útvarů, nakonec se odloučí od podkladu
  - adenoviry



J12: Parazitologie

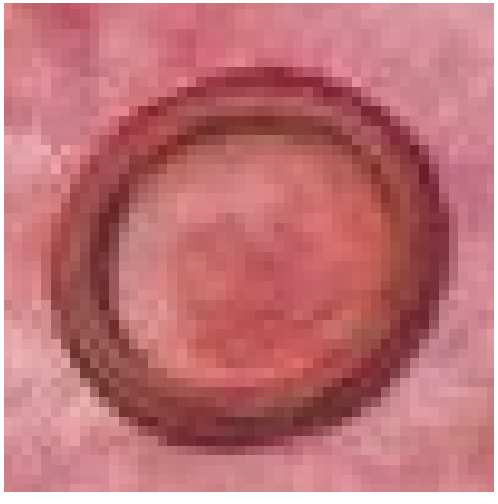
- **poznat následující vajíčka a články tasemnice**

roup (*Enterobius vermicularis*)

tenkohlavec (*Trichuris trichiura*)

škrkavka (*Ascaris lumbricoides*)

tasemnice (*Taenia* sp.)



J12: Parazitologie

- znát metody diagnostiky střevních parazitů:
  - **metoda dle Kato** (dobarvení pozadí **malachitovou zelení**, aby se paraziti zvýraznili)
  - **Faustova metoda** je koncentrační
  - **Grahamova metoda** se používá u roupů
- vědět, že se **u tkáňových parazitů často používá nepřímý průkaz** (toxoplazmóza)
  - popis pacientů dát dohromady s výsledky serologie a vyhodnotit

J13: Mykologie

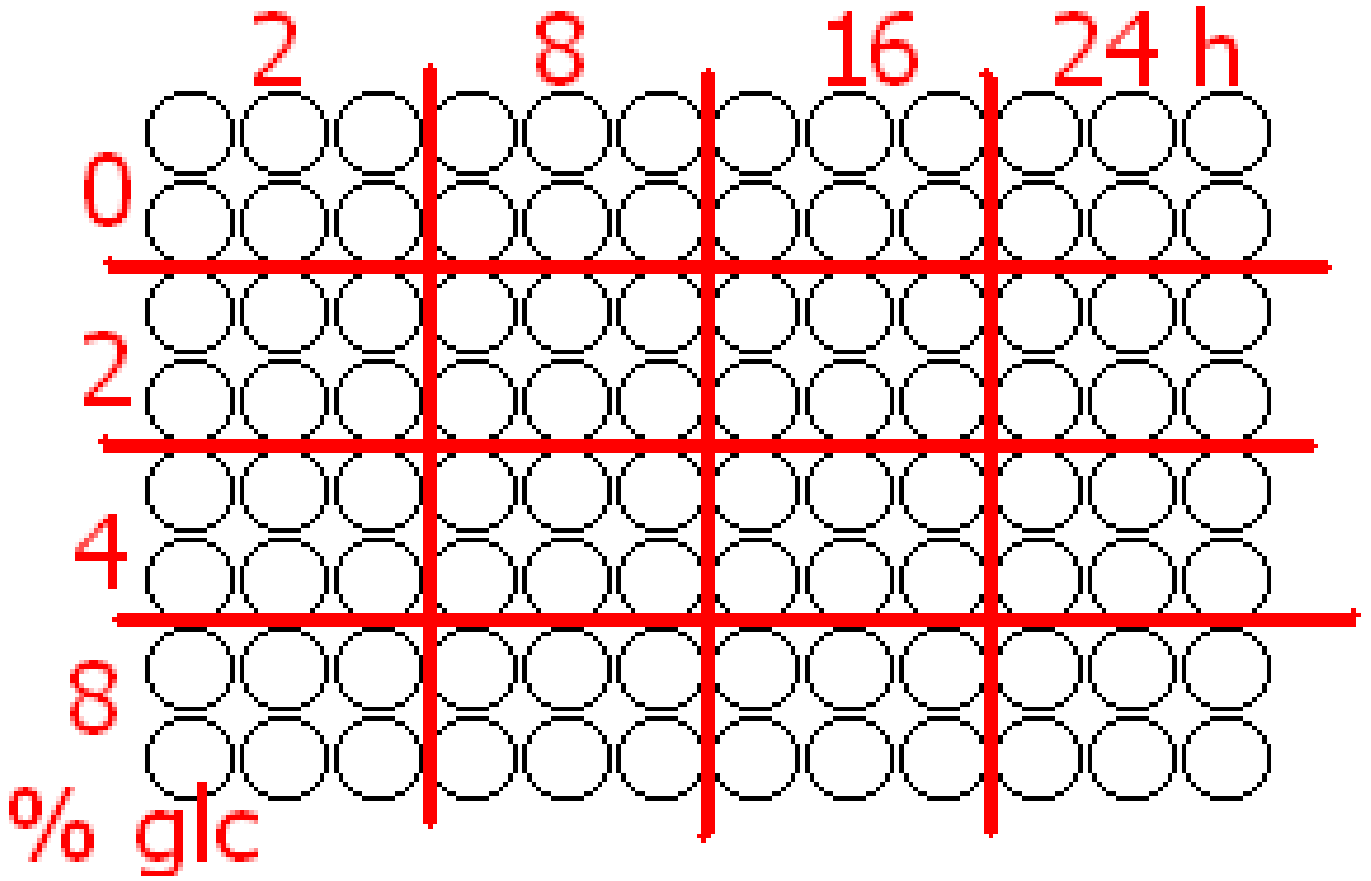
- **zkouší se jako bakterie** (viz dále)
- **morfologie vláknitých hub** (nakreslit a popsat)

J14: Vliv přítomnosti sacharidů na dynamiku růstu biofilmu

- úkol odečíst jako v praktiku, včetně vytvoření grafu
- posuďte vliv příjmu různého množství sacharidů ve stravě na rychlost tvorby biofilmu u kariogenního druhu *Streptococcus mutans*
- jaké závěry vyplývají z tohoto pokusu ohledně množství sacharidů ve stravě, délce jejich setrvání v dutině ústní apod.?

J14: Vliv přítomnosti sacharidů na dynamiku růstu biofilmu (2)

- vyplňte přibližný průměr hodnot absorbance do tabulky a sestrojte prostorový graf; učiňte závěr o množství přidané glukózy a růstu biofilmu *S. mutans*



J14: Citlivost biofilmpozitivních mikrobů k ATB

- **MIC neodpovídá** koncentracím antimikrobiálních látek schopných zasáhnout biofilm
- **MBIC** – minimální biofilm inhibující koncentrace
- **MBEC** – minimální biofilm eradikující koncentrace
- zvýšená odolnost se týká **dezinfekčních i antimikrobiálních látek**
- **hodnoty MBEC leží často nad break pointem pro daná antibiotika** (bakterie jsou k nim rezistentní)
- **rozdíly v citlivosti (MBEC vs. MIC) až několik řádů**

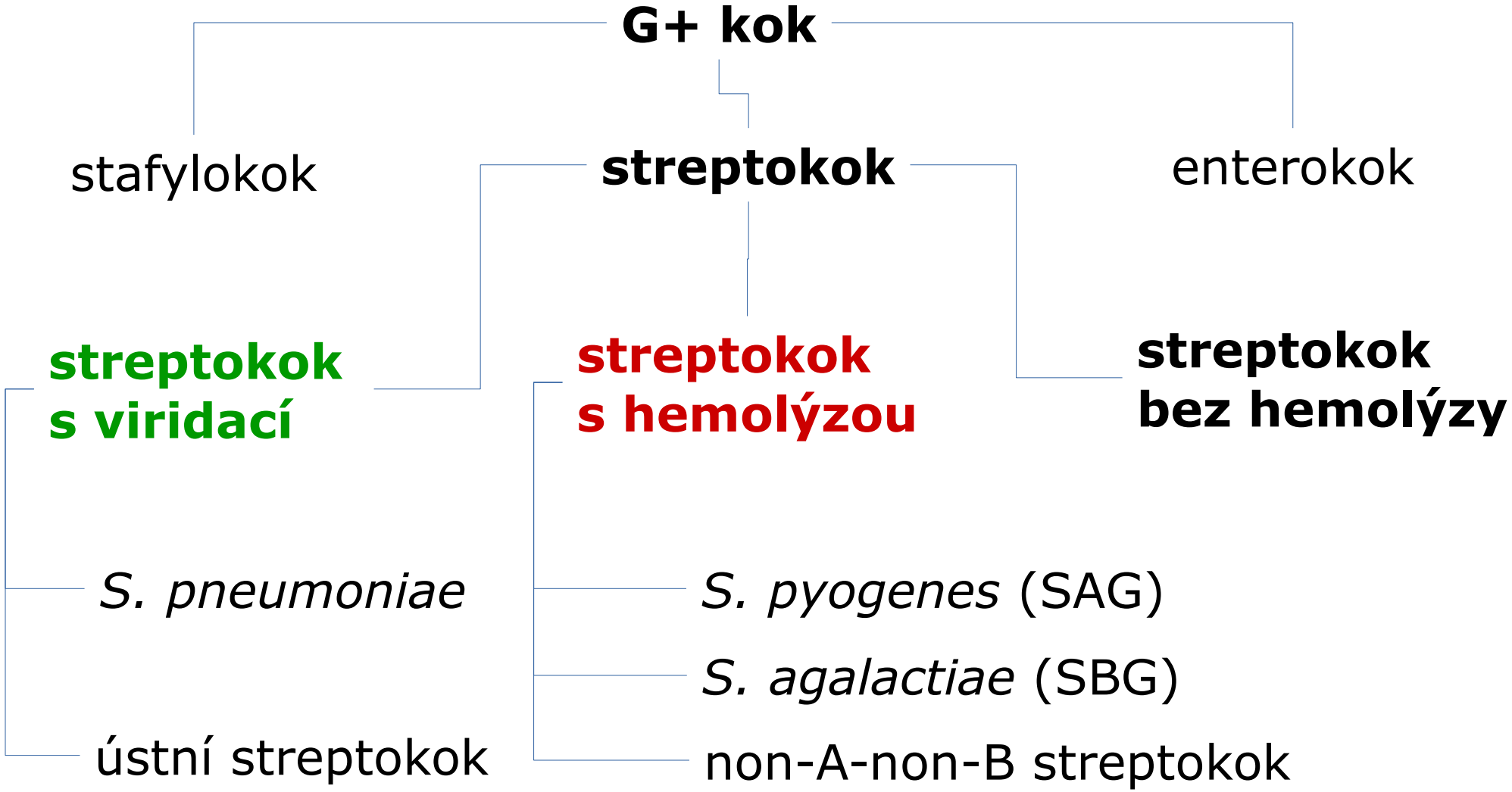
J14: Citlivost biofilmpozitivních mikrobů k ATB (2)

- **zákal/žluté důlky** znamenají **růst** mikrobů
- odečtěte hodnoty **MIC** (planktonická forma) a **MBEC** (biofilm)
- **porovnejte hodnoty** mezi sebou
- **vysvětlete princip metody**

J13, P01 – P06: Kvasinky, speciální bakteriologie

- **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 provede teoreticky), 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

J13, P01 – P06: Příklad diagnostického schématu



J13, P01 – P06: Výjimky

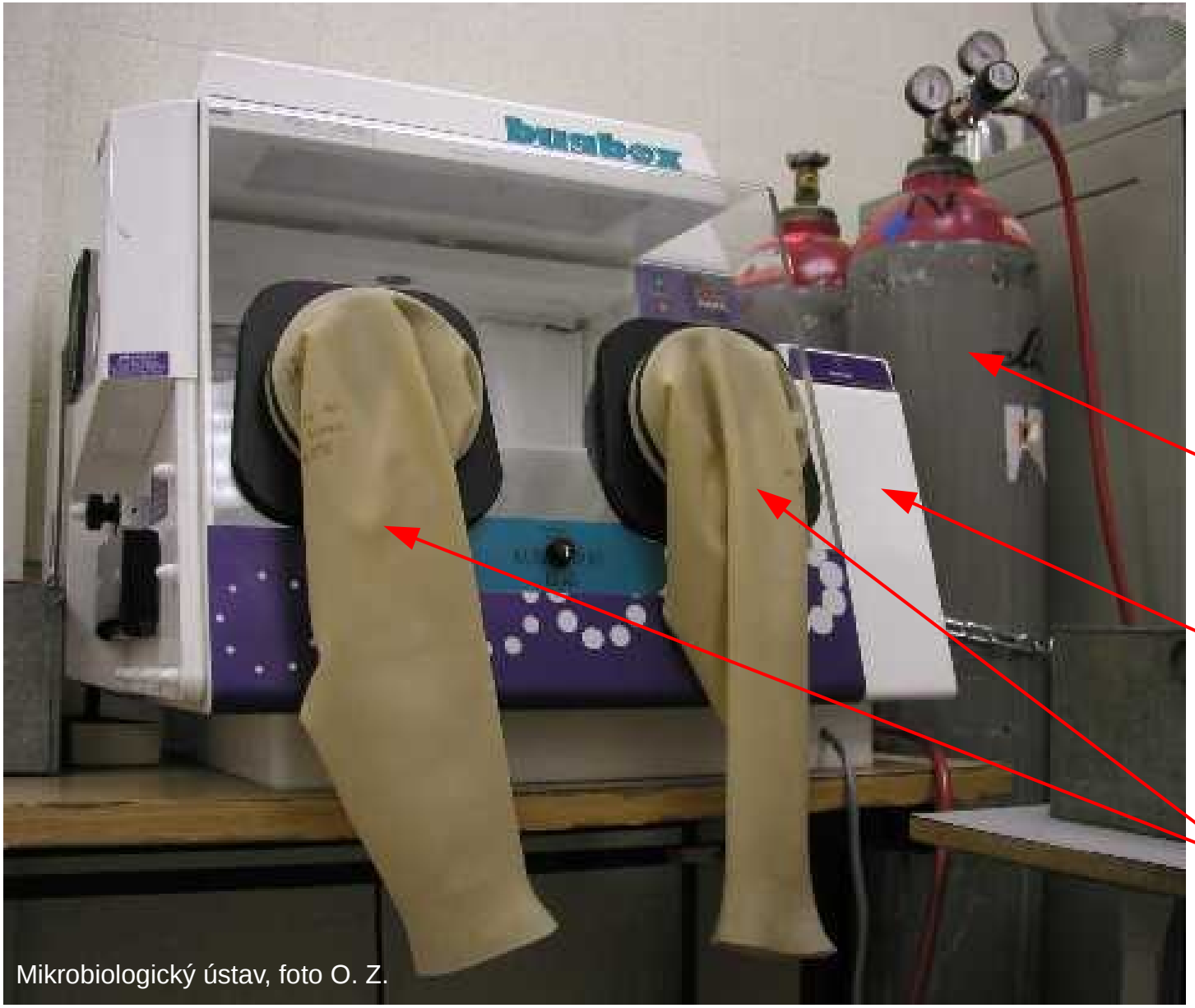
- **ASLO se zkouší jako serologický úkol**, plus znalost specifického významu tohoto testu (viz u serologie)
- **Grampozitivní tyčinky se zkoušejí jinak** – student si **prohlíží obrázky G+ tyčinek** a má určit, který obrázek morfologicky odpovídá **korynebakteriím** a odpoví na **doplňující otázky** (např. „co by to mohlo být, kdyby to nedělalo palisády a rostlo by to při 4 °C?“)
- **zvláštní úkoly se také týkají anaerobů** (P07), **mykobakterií** (P08) a **spirochet** (P09)

P03: *Corynebacterium*

- **G+ nesporulující tyčky kyjovitého tvaru**, někdy pleomorfní
- typické uspořádání v **palisádách** a tzv. **havraních křídlech**

P07: Popis anaerostatu

P07: Popis anaerobního boxu



Mikrobiologický ústav, foto O. Z.

zdroj anaerobních plynů

prostor pro vkládání misek

vstupy pro ruce personálu

P07: Morfologie *Clostridium tetani*

- **G+ tyčka**, anaerobní, rovné, štíhlé, **terminální endospora** („paličky na buben“)
- **poznat na obrázcích od ostatních bakterií**

P07: Anaerobní kultivace, pokus na zvířeti, imunochromatografie

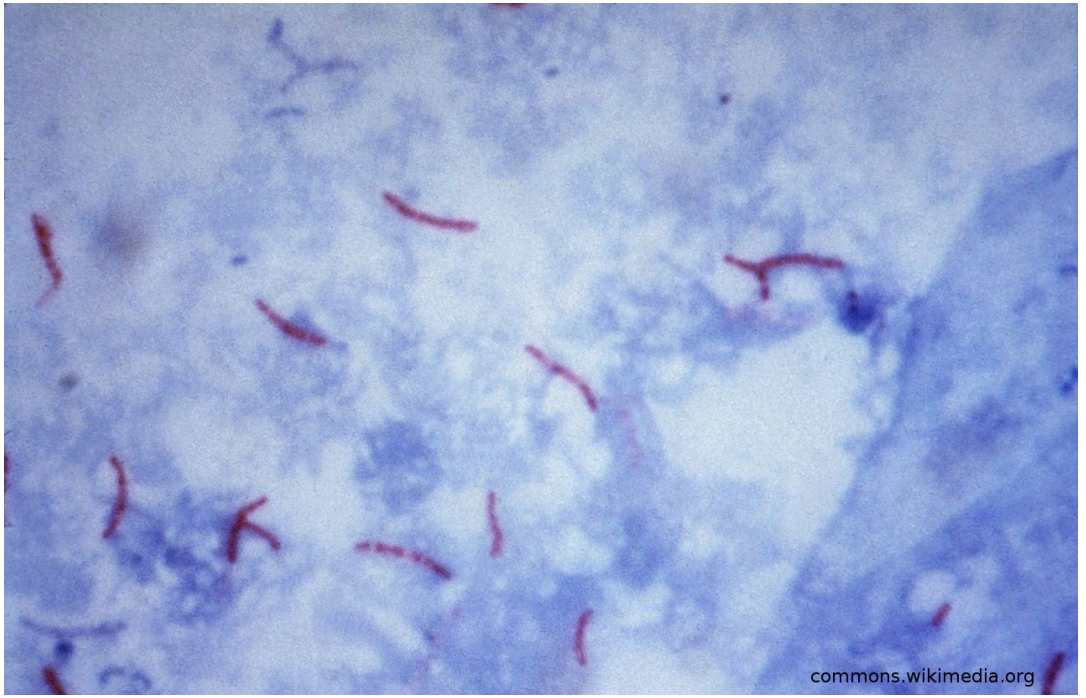
- **pokus na zvířeti se používá u tetanu a botulismu:**
  - u tetanu se myš svíjí v **křeči**,
  - u botulismu patrné **parézy**
  - u toxinu *Clostridium perfringens* se pokus na zvířeti nepoužívá, zde využíváme kultivační průkaz **lecitinázy na žloutkovém agaru**

P08: Barvení dle Ziehl-Neelsena

- barvení dle Ziehl-Neelsena
  - **barvíme karbolfuchsinem** (Gabbet) za horka až do výstupu par (**po odpaření části barviva ho doplníme** a opět zahříváme, opakujeme celkem 3x)
  - zahřívání provádíme v dostatečné vzdálenosti, aby v průběhu neprasklo podložní sklíčko)
  - **odbarvujeme** cca 15 sekund **kyselým alkoholem** (směs ethanolu s HCl nebo H_2SO_4), **opláchneme vodou**
  - dobarvujeme pozadí **malachitovou zelení** nebo **metylénovou modří** **cca 30 sekund**
  - barvení lze použít i pro střevní kokcidie (kryptosporidia a cyklospory)

P08: Barvení dle Ziehl-Neelsena (2)

- **znát postup, vědět jak vypadá pozitivní výsledek** (odlišit od Gramova barvení)
- **znát další postupy dg. TBC (kultivace, PCR, Quantiferon), odlišnosti v testování citlivosti**
- dg. antinomycet a nokardií pro dodatečné dotazy



P08: Kultivace mykobakterií

- vědět, že před kultivací musí být provedeno **moření** (znát postup)
- **znát půdy** (Šula, Banič a vaječné půdy Ogawovu či Löwenstein-Jenssenovu).
- **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 (screening, konfirmace)

- **přehled testů na syfilis**

Historický	BWR – Bordet Wassermann	Netreponemové
Screening	RRR/RPR/VDRL	
	TPHA/TPPA/anti-TP	Treponemové
Konfirmace	ELISA	
	FTA-ABS	
	Western blotting	
Historický (superkonfirmace)	TPIT (Treponema Pallidum Imobilizační Test) = Nelson	

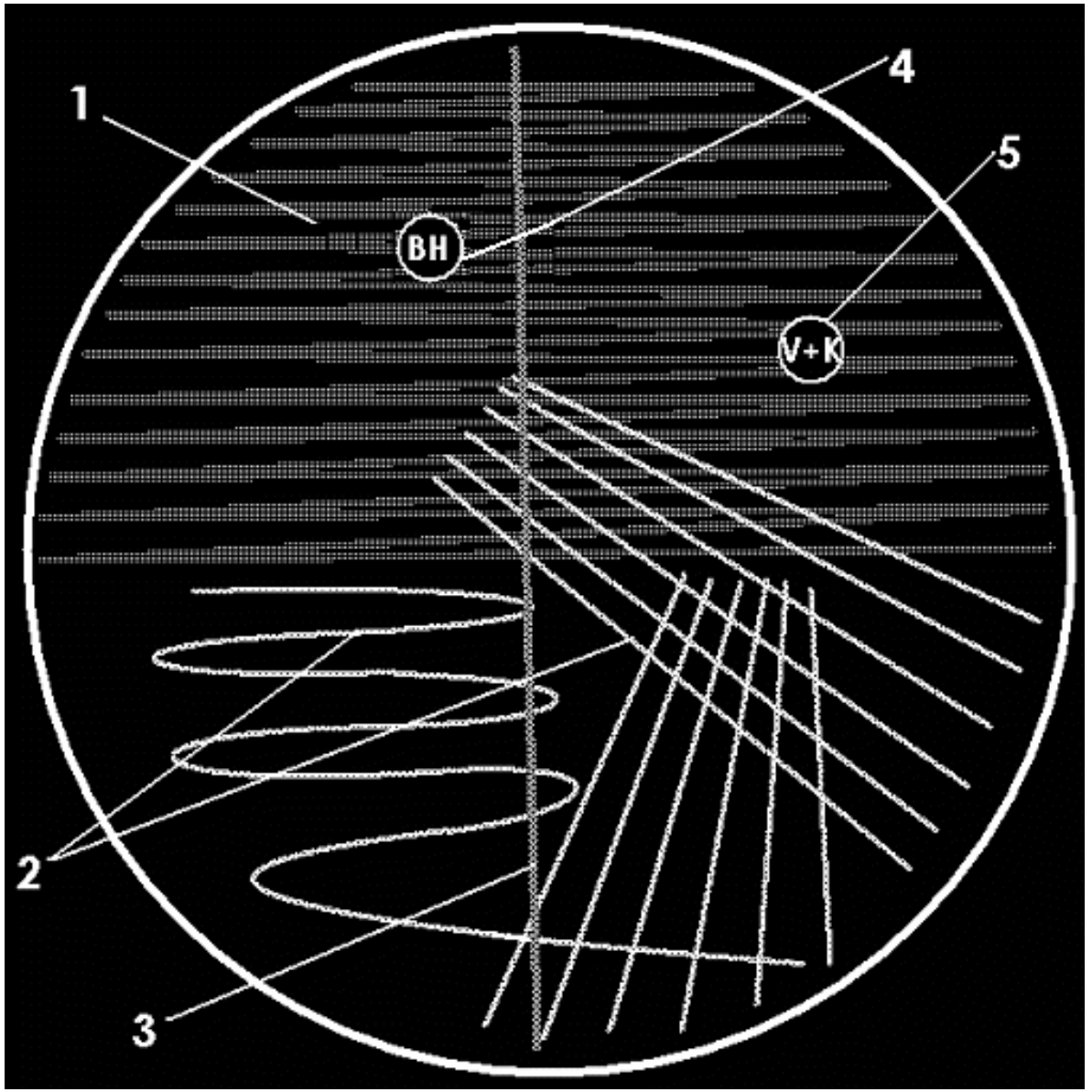
P09: Spirochety (screening, konfirmace)

- **vyhodnotit výsledky v kombinaci s klinickými příznaky, pozor na různé klinické situace:**
  - těhotné s pozitivním RRR nelze říct, že „má asi syfilis“, je potřeba vyšetření konfirmovat
  - negativní nález serologie boreliózy u pacienta s erythema migrans neznamená, že bude považován za zdravého a nebude léčen
  - atp.

P10 – P13: Klinická mikrobiologie

- čtyři úkoly: **lístečky se třemi „minikasuistikami“**
  - úkolem je **rozhodnout se**, jaké **vyšetření** provést a vybrat pro ně **vhodné typy odběrových souprav**
  - rozlišovat krev na hemokultivaci × krev na serologii, vědět, že u vaginálních výtěrů je vhodný CAT, ale také Amies, apod.
- **najít patogeny mezi běžnou orofaryngeální mikroflórou** (nutno vědět, která to je, a jak se tam patogeny hledají)

P11: Vyhledávání respiračních patogenů



1) očkováno tamponem

2) očkováno kličkou

3) stafylokoková čára

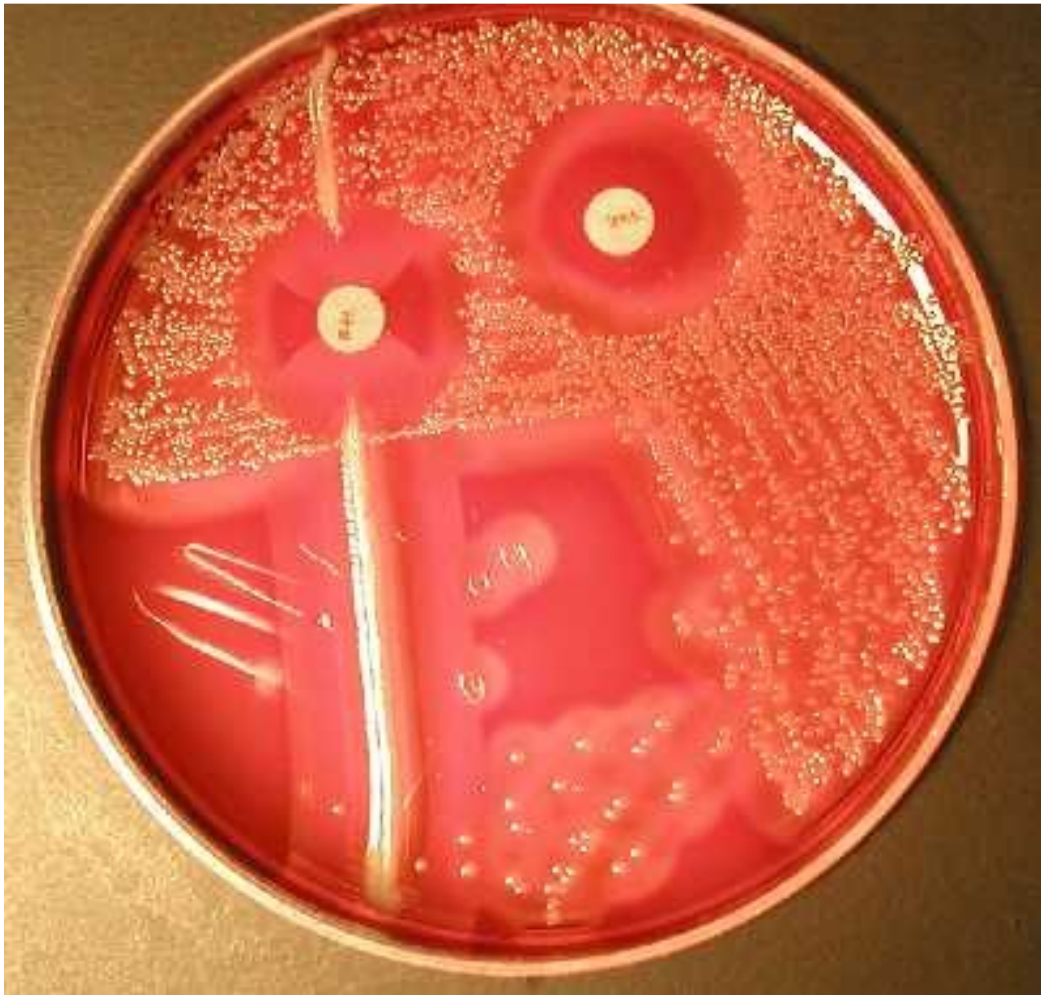
4) disk BH (bacitracin pro hemofily)

5) disk V+K (vankomycin a kolistin pro meningokoky)

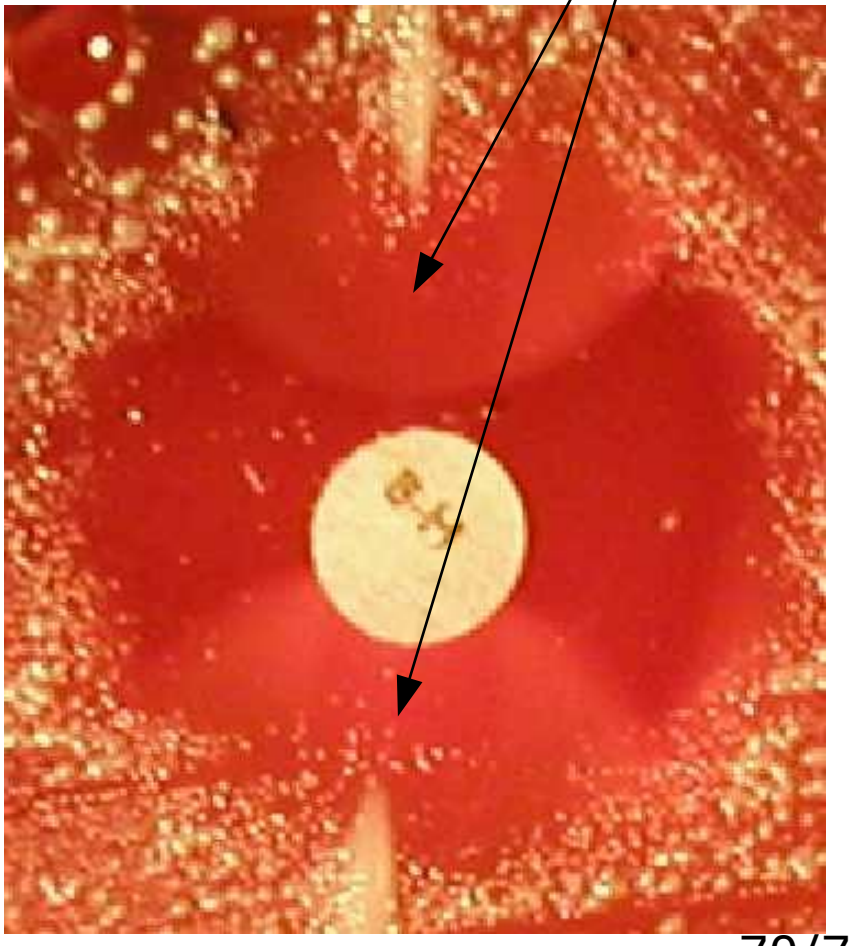
na celé naočkované ploše pátráme po hemolytických streptokocích (bezbarvé) a po stafylokocích (spíše bílé či zlatavé)

P11: Vyhledávání respiračních patogenů (2)

bacitracinový disk může být umístěn buďto na stafylokokovou čáru, nebo cca 1 cm od ní, používají se oba způsoby



v těchto místech hledáme hemofily



P10 – P13: Klin. mikrobiologie (2)

- **odečíst semikvantitativní a kvalitativní vyšetření moče** (určení kvantity je podmínka nutná, ale nikoli dostačující, ještě nutno zjistit druh mikroba)
- **vyhodnotit výsledky tří různých metod zpracování cévních katetrů u dvou pacientů a interpretovat je**
  - kvalitativní metoda
  - semikvantitativní metoda (>15 CFU)
  - sonifikace katetru (>100 CFU)

P12: Vyhodnocení semikvantitativní kultivace moče

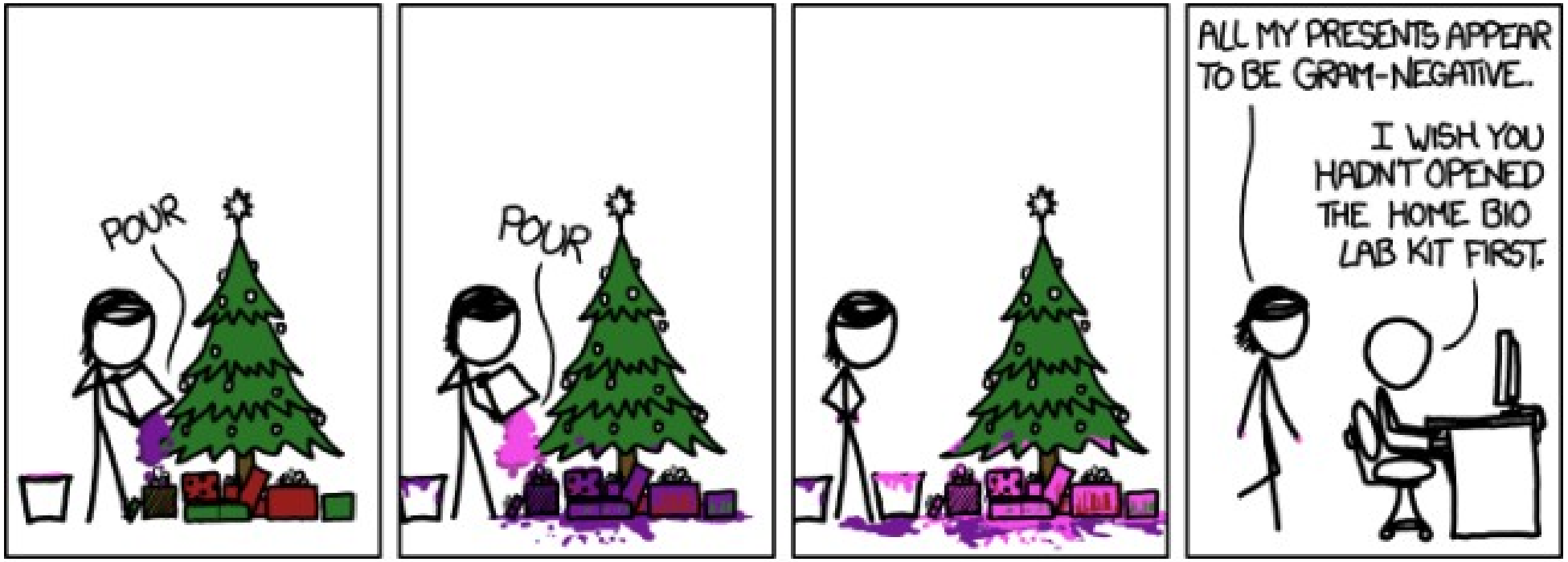
- **vyhodnoťte za předpokladu, že byl v moči nalezen jeden druh mikroba, vyhodnoťte ENTEROtest16 a ATB citlivost**

Počet kolonií	Počet CFU v 1 µl moče	Počet CFU v 1 ml moče	Interpretace (zjednodušeno)
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

P10 – P13: Klin. mikrobiologie (3)

- **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)

Hodně štěstí u zkoušky!



chubbyriceball.files.wordpress.com