

Lékařská mikrobiologie pro ZDRL

Týden 27:

Odběr, transport a zpracování různých typů vzorků k mikrobiologickému vyšetření

Ondřej Zahradníček 777 031 969

zahradnicek@fnusa.cz ICQ 242-234-100

Co nás dnes čeká

- Povídání o **diagnostice vzorků z určité lokalizace – společné zákonitosti a zásady**
- Povídání o **odběru a transportu vzorků z jednotlivých lokalizací**
- Povídání o **diagnostice vzorků z jednotlivých lokalizací**

„Odečítání“ bakteriologie



Foto: archiv MÚ

Přehled procesu vyšetření

Proces mikrobiologického vyšetřování – na všem záleží!!!

PACIENT/LÉKAŘ

LABORATOŘ

Indikace vyšetření – zda, jaké

Vlastní provedení odběru

Transport materiálu

Rozhodnutí, jak zpracovat

Vlastní zpracování materiálu

Zaslání výsledku

Interpretace v kontextu ostat. výsledků a stavu pacienta (léčit vždy pacienta, ne nález)

1A Indikace – ZDA provést

- Lékař, ke kterému přišel pacient k vyšetření, by se měl zeptat sám sebe: „**Co udělám jinak v závislosti na výsledku vyšetření?**“
- Pokud zjistí, že ať vyjde vyšetření jakkoli, **bude jeho další postup ve vztahu k pacientovi stejný**, je vyšetření pravděpodobně **zbytečné**
- Toto ale neplatí u **epidemiologických indikací** (třeba začátek epidemie chřipky) a také u **profylaktických indikací** (jako je screening mikrobiálního osídlení pacientů v těžkém stavu)

1A Indikace – CO provést

- Rozhodnutím, že lékař chce provést vyšetření, to zdaleka nekončí. Musí se ještě rozmyslet, **jaké vyšetření se rozhodne provést.**
- Musí znát **spektrum patogenů a možnosti jejich vyšetření**
- Součástí je také **rozhodnutí o tom, jak** technicky se odběr provede, do jaké nádobky či odběrové soupravy a podobně

Tři typy patogenů (1)

- **Patogen typu *Streptococcus pyogenes*.**
Nemusí se vědět, že se myslí zrovna na tohoto patogena, ale musí se přesně vědět, kde je jeho předpokládaná lokalizace.
- **Patogen typu *Mycobacterium tuberculosis*.**
Musí se vědět, kde patogena hledat, a zároveň i to, že se hledá právě tato skupina patogenů.
- **Patogen typu *Toxoplasma gondii*.** Nemusí se vědět, kde se patogen v těle nachází, ale musí se vědět, že se hledá právě on.

Tři typy patogenů (2)

- **Patogen typu *Streptococcus pyogenes*.**
Týká se kultivovatelných bakterií a kvasinek
- **Patogen typu *Mycobacterium tuberculosis*.**
Stále je to přímý průkaz, ale speciální postupy, při běžné kultivaci se nezachytí.
Mykobakteria, gonokoky, legionely, plísně, paraziti apod.
- **Patogen typu *Toxoplasma gondii*.** Nepřímý průkaz, event. přímý průkaz virového antigenu. Spirochety, viry, chlamydie, mykoplasmata aj.



Foto: O. Z.

2 Vlastní odběr vzorku

3 Transport vzorku do laboratoře

- Tyto fáze nelze oddělit – odběr je nutno činit již se zřetelem na transport materiálu do laboratoře
- Jednotlivé typy vzorků budou probrány dále
- Nelze zapomenout na správné vyplnění průvodky

Průvodka

- **Správně vyplněná průvodka** je základ dobré diagnostiky – je vodítkem, jaké vyšetření se má provést a jak
- **Laborant není pasivním prvkem**, který trpně opíše to, co je na průvodce napíše. Naopak – dobrý laborant si umí všimnout chybně vyplněné průvodky, volat na oddělení a požadovat doplnění

Průvodka 1

- Správně vyplněná průvodka je **velice důležitá!**
- **Osobní údaje:** podstatné kvůli pojišťovně, ale i kvůli identifikaci, komu poslat výsledek apod.
- **Přesný popis materiálu** a požadovaného vyšetření
 - **nepsat pouze „výtěr“**, když není jasné, odkud
 - ani „stěr z rány“ nestačí (jaká rána, kde lokalizována)
 - Katetrizovaná moč **×** moč z permanentního katetru
 - uvést, **zda je požadováno např. anaerobní vyšetření**
 - **nepožadovat vyšetření, které nelze provést nebo nemá smysl** (např. serologické vyšetření TBC)

Průvodka 2 – co uvést

- **skutečnou diagnózu**, je-li více, napsat tu, která souvisí s vyšetřením, popř. všechny /např. (1) diabetes mellitus, (2) poševní výtok/
- **akutní / chronický stav / kontrola po léčbě**
- uvést stávající nebo uvažovanou **antibiotickou terapii**, případně i alergii na antibiotika

Průvodka 3 – co ještě uvést

- cestovatelská anamnéza – návrat z tropů
- pracovní anamnéza – práce v zemědělství aj.
- u serologických vyšetření datum prvních příznaků, první / druhý vzorek
- u gynekologických materiálů fázi menstruačního cyklu (a při menses raději neodebírat)
- v případě mimořádných vzorků se dohodnout, telefonicky

4 Rozhodnutí, jak zpracovat

- Je dáno standardními operačními postupy (SOP). Pro každý typ vzorku je dáno v SOP, jak má být vzorek zpracován a jaké metody na něj mají být aplikovány
- Ne vždy je ovšem vše dáno SOP. Zvláště ve vzácných a mimořádných případech je na rozhodnutí zkušeného laboranta či VŠ mikrobiologa, jak vzorek zpracovat
- V důležitých případech není naprosto chybou zatelefonovat do laboratoře a domluvit se.

5 Vlastní zpracování (1)

- **Vlastní zpracování zpravidla zajišťují laboranti, dříve se SŠ vzděláním, nyní s VOŠ nebo Bc. stupněm vysoké školy**
- **Postupuje se vždy přísně asepticky, aby se omezilo riziko laboratorní kontaminace. Práce v biohazard boxu je zároveň i dobrou prevencí profesionálních nákaz**



Foto: archiv MÚ

5 Vlastní zpracování (2)

Zpracování **bakteriologických kultivačních vzorků** obvykle zahrnuje následující

- před vlastním zpracováním se některé vzorky homogenizují, centrifugují či jinak **upravují**
- u některých typů vzorků **rychlé postupy** – mikroskopie, popř. přímý průkaz antigenu
- téměř vždy je základem **kultivace na několika pevných půdách** (KA + Endo + popř. další)
- někdy též **pomnožení v tekuté půdě** (v případě výtěrů ze spojivky POUZE tento bod)

▪ Zpracování **jiných vzorků** (serologie, PCR, mykologie, parazitologie) je speciální a je dána typem vyšetření a povahou vzorku

Laboratoř klinické bakteriologie



Laborant 2 „dělá opáčka“: u pozitivních vzorků připravuje testy citlivosti a testy bližšího určení mikroba

Mikrobiolog (VŠ) „odečítá laboratoř“ – prohlíží výsledky kultivací

Laborant 1 zapisuje výsledky

6 Zaslání výsledku

- Výsledek je zaslán poté, co je dokončen diagnostický proces. Někdy je poslán předběžný výsledek („mezivýsledek“) po ukončení aerobní kultivace s tím, že to, co trvá delší dobu (kultivace kvasinek, anaerobů apod.) bude případně zasláno dodatečně
- Výsledek už v sobě zahrnuje kus interpretace: mikrobiolog se vyjadřuje k evidentním kontaminacím, náhodným nálezům, běžné flóře, komentuje nález v poznámce

Zaslání výsledku – organizace

- zorganizovat tak, aby nedocházelo ke zbytečným prodlevám
- dnes zpravidla možnost využít zasílání vzorků elektronicky (v rámci zdravotnického zařízení i mezi zařízeními navzájem)
- lékař dohodne s mikrobiologem (nebo napíše na průvodku), zda má být zaslán až konečný výsledek nebo i mezivýsledek
- dohodnout, kam má být výsledek poslán, je-li při odběru známo, že bude pacient přeložen

7 Interpretace

- **Definitivní interpretace nálezu v rukou lékaře.** Pouze on, nikoli mikrobiolog, totiž drží v rukou vedle mikrobiologického nálezu také biochemický, rentgenový, ultrazvukový, a především zná pacienta – vypáčil z něj anamnézu, vyšetřil jej, popřípadě (u obvodních lékařů) jej zná dlouhodobě.
- Samozřejmě, **konzultace klinika a mikrobiologa je u závažných případů velice vhodná.** Na druhou stranu nelze konzultovat každý nálezu.

Interpretace – příklady

- Laboratoř **odfiltruje evidentní kontaminace**. To, že výsledek není označen jako kontaminace, ovšem ještě neznamena, že o ni nemůže jít.
- **Poznámka ke kvantitě** („ojediněle“, „masivně“) je užitečná, ale nesmí se ale přecenit
- **U vzorků z dutin normálně osídlených běžnou flórou** je nezbytné chápat ekosystém mikrobů jako celek, nemoc je často porušením rovnováhy mezi mikroby a léčba antibiotiky nemusí být nutná
- **Interpretace serologických vyšetření**
 - samotná přítomnost protilátek není zpravidla významná
 - důležitější je titr a jeho změny v čase
 - u moderních reakcí (ELISA) poměr IgM × IgG; na indexu positivity zase tolik nezáleží

Pozitivní výsledek – ale co znamená?

- **Nalezený mikrob může být**
 - skutečný patogen
 - součást běžné flóry – trvalé či přechodné
 - náhodný nálezn (např. z potravy u výtěrů z krku)
 - kontaminace
- **Lékaři jsou rádi, když má „jejich laboratoř“ hodně pozitivních výsledků.**
 - Mohou to ale být náhodné kontaminace, kolonizace apod.
 - Lepší je laboratoř, která nevydává za „nálezn patogena“ to, co patogenem s největší pravděpodobností není
 - **Léčit neexistující infekci je chyba**

Průběžná spolupráce mezi klinickým pracovištěm a laboratoří

- Nejde jen o domluvu o konkrétních vzorcích!
Spolupráce může mít nejrůznější formy

od občasných konzultací až po součinnost při výzkumné práci

- je oboustranně užitečná

- klinikovi pomáhá při rozhodování

- mikrobiologovi zase dává konkrétnější představu o pacientech, jejichž vzorky mu procházejí rukama.

Typy vzorků

Typy vzorků v klinické mikrobiologii

Tekuté a kusové vzorky představují odebrané tkáně, tělní tekutiny, tekutiny, kterými bylo vyplachováno, umělé materiály vyňaté z těla a podobně

Stěry a výtěry jsou odběry vatovým tamponem na špejli či drátku

Ostatní vzorky: otisky, urikulty, sklíčka apod.

Každý typ vzorku vyžaduje jiný přístup, jiné zpracování, jiné hodnocení výsledku.

Jak různé typy vzorků ovlivňují vyšetření

Vzorky typu výtěr ze spojivkového vaku. U zdravého člověka mikroby nejsou, i malá množství mohou být významná. Není vhodné nebo možné přímo očkovat na pevné půdy, proto se nejprve pomnoží v půdách tekutých

Vzorky typu rána. Opět u zdravého člověka mikroby nejsou, i malá množství mohou být významná, zároveň je však třeba rychle zachytit případná velká množství. Očkuje se zároveň na tekuté i pevné půdy, často různorodé pevné půdy.

Vzorky typu výtěr z krku. U zdravého člověka obsahují běžnou flóru. Pomnožení v tekuté půdě nemá smysl, dává se na různé pevné půdy.

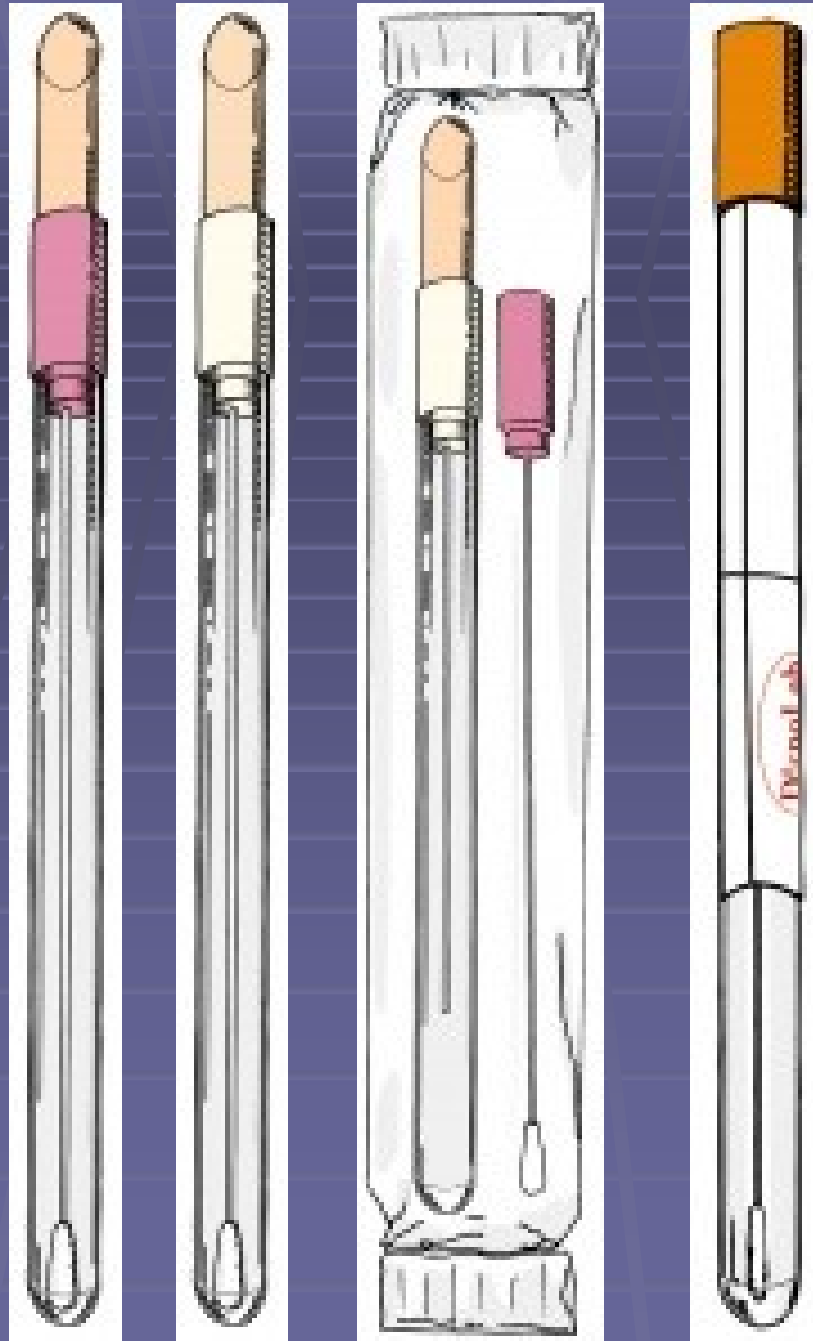
Výtěry a stěry



- Dnes již prakticky **neexistuje kultivační indikace suchého tamponu** bez transportního média. Tento tampon je indikován prakticky výhradně pro vyšetření metodou PCR a některé průkazy antigenů
- Používají se tedy **transportní média**. Na bakteriologii je to zpravidla médium Amiesovo (na obrázku)
- **Speciální média** vyžadují houby (Fungiquick), houby + trichomonády z genitálií (C. A. T.), viry, chlamydie
- Potřebuji-li se dostat „za roh“, použiji **tampon na drátu a nikoli na špejli**.

Některé odběrové soupravy

- zleva:
 - CAT
 - FungiQuick
 - souprava na chlamydie
 - suchý tampon s drátem



Odběrové soupravy ještě jednou

Foto O. Z.



Přehled „výtěrovek“

Suchý tampon na špejli:
průkaz antigenu a DNA

Suchý tampon na
drátku: totéž, potřebuji-li
se dostat na jinak
nedostupné místo

Tampon v Amiesu na
špejli: univerzální pro
bakteriologickou
kultivaci (vč. anaerobů,
kapavky, kampylobakt.)

Tampon v Amiesu na
drátku: totéž, potřebuji-li
se dostat na jinak
nedostupné místo

Fungiquick – houby

C. A. T. – houby a trichomonády (stěry z pohlaví)

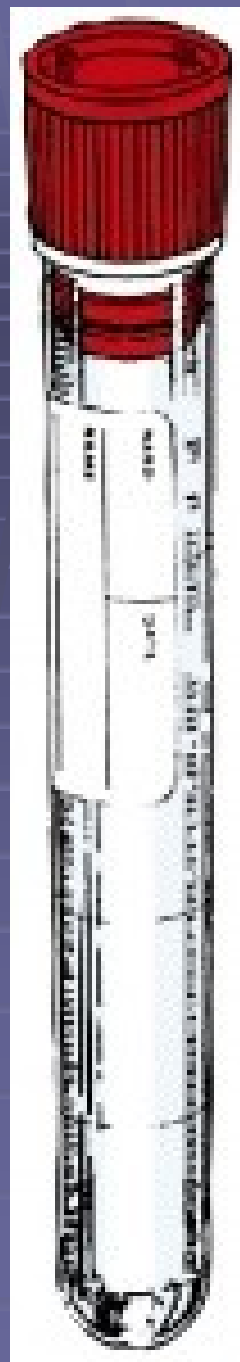
Soupravy s médiem na viry, popř. chlamydie

Odběrové nádoby

- Odběrové nádoby se používají **na kusové a tekuté vzorky**. Na rozměrech fakticky příliš nezáleží, stejně tak barva uzávěru nemá samozřejmě reálný dopad. Má však někdy význam organizační – záleží na dohodě v rámci konkrétní laboratoře
- U anaerobní kultivace je lépe zaslat přímo stříkačku s jehlou zabodnutou do sterilní gumové zátky
- Vzorky se snažíme vždy **dopravit do laboratoře co nejdříve**, zásadní je to však u moče – do dvou hodin

Příklady nádobek

- Vlevo klasická zkumavka, např. na sérum, vpravo kontejner na střevní parazity



Co se například posílá, a jak rychle se to musí dopravit

- **Moč** – do dvou hodin, pokud nelze, nutno dát do ledničky (výjimka!!!)
- **Sérum (srážlivá krev)** – na čase tolik nezáleží, ani na teplotě (ale lépe nechat v ledničce)
- **Punktáty, exsudáty, různé podobné tekuté materiály** – co nejrychleji, ale není dán přímo časový limit. Nelze-li zpracovat hned, je lépe nechat při pokojové teplotě, ne do ledničky!
- **Odstřižené katétry** – vhodné zalít bujonem či fyziologickým roztokem, aby nevyschly. I zde je vhodné rychlé zaslání event. pokojová teplota.

Jiné typy odběrů než „výtěrovky“ a odběrové nádoby

- **nátěr na podložní sklíčko:** kapavka, aktinomykóza, přímo zasláná tlustá a tenká kapka apod.
- **v kožním lékařství otisky** přímo na kultivační půdu, která je pro tento účel nalita až po okraj Petriho misky
- **urikult** – zvláštní způsob zasílání moče na půdu; z různých důvodů se příliš neujalo.
- **rychlé diagnostické soupravy**, většinou založené na přímém průkazu antigenu; jednoduchá manipulace, dostupná i pro nemikrobiologický personál. Při pochybách o výsledku použít klasické zaslání do laboratoře.

Odběry a zpracování různých typů vzorků

Dýchací cesty



Výtěr z krku

http://biology.clc.uc.edu/fankhouser/Labs/Microbiology/Strep_Detection/Throat_swab_P7251230.jpg

Odběr vzorků na vyšetření z dýchacích cest

- Na **bakteriologii** se posílají
 - **výtěry** – (z krku, tonzil, nosu apod.), vždy na tamponu v transportní půdě (např. Amiesově)
 - **sputum, tracheální aspirát či bronchoalveolární laváž** u bronchitid a pneumonií
 - **hemokultury** u pneumonií
- **Viroví** původci se většinou nevyšetřují. Je-li výjimečně potřeba je vyšetřit, volíme např. výplachy z nosohltanu a bronchoalveolární laváže speciálním médiem, či krev na serologii respiračních virů
- Na **mykologické vyšetření** volíme výtěr na tamponu v soupravě FungiQuick

<http://www.lumen.luc.edu/lumen/meded/mech/cases/case9/sputum1.jpg>

Vyšetření sputa



Co se se vzorky děje v laboratoři

- Většina výtěrů se kultivuje na **krevním agaru**. Na ten se umisťují disky, jejichž cílem je odclonit běžnou flóru a umožnit záchyt patogenů. Kvůli hemofilovi, který na KA roste jen v přítomnosti např. zlatého stafylokoka, se na agar očkuje stafylokoková čára
- U sput apod. se také provádí **mikroskopie**
- Kromě KA se užívají **další půdy**, např. Endova
- **Virologické vzorky** se izolují na vajíčkách či tkáňových kulturách, nebo se hledá antigen
- V **serologických vzorcích** se hledají protilátky

Vyšetření sputa

Diagnostické schéma (1)

- **Den 0:** mikroskopie (Gramovo barvení)
- **Den 1:** výsledek primokultivace vzorku na KA, EA a NaCl. Je-li přítomna jen běžná flóra, EA se vyhodí a KA a NaCl se prodlužuje do dalšího dne. Případný patogen se určuje a testuje se jeho citlivost; je-li ho málo dělá se jeho izolace (kolonie se opatrně nabere kličkou a naočkuje se na celou miskou křížovým roztěrem tak, aby se určitě získal čistý kmen

Vyšetření sputa

Diagnostické schéma (2)

- **Den 2:** expedice negativních výsledků (prohlížení „prodlužek“, jak říkáme u nás, či „dohřívek“, jak říkají v nemocnici na Homolce). Expedice většiny pozitivních výsledků, je-li bližší určení hotovo a test citlivosti uspokojivý. Není-li, nebo je-li hotova teprve izolace, „jede se dál“.
- **Den 3:** expedice většiny zbylých pozitivních výsledků (rezistentní, špatně určitelné, z izolací)
- **Den 4:** výjimečně expedice posledních výsledků

Výtěr z krku

Diagnostické schéma

- **Den 0:** pouze nasazení kultivací
- **Den 1:** výsledek primokultivace vzorku na KA a EA. NaCl se zde nepoužívá. I v tomto případě se KA s běžnou flórou prodlužují
- **Den 2:** expedice všech negativních a většiny pozitivních výsledků
- **Den 3:** expedice téměř všech zbylých pozitivních výsledků

Záchyt patogena v krku či sputu

Kultivační výsledek výtěru z krku s běžnou flórou

V těchto místech pátráme po hemofilech



Co je potřeba vědět

- **Na průvodku** je nutno uvést, o jaký vzorek jde, jaké vyšetření je požadováno, a případně další podstatné údaje
- Laboratoř má právo **odmítnout špatně odebraný vzorek sputa** (nehnisavý, neobsahuje leukocyty, jen epitelie → jsou to sliny!!!)
- **Kultivace tuberkulózy** musí být požadována zvláště, i když se posílá stejný vzorek sputa
- U **virologie a průkazů různých antigenů** se případně posílají suché tampony, výplachy z nosohltanu (izolace viru) a podobně

Trávníci

cesty

Odběr a transport stolice na jednotlivá vyšetření

- **Bakterie** – v Amiesově transportní půdě
- **Kvasinky** – v půdě FungiQuick
- **Viry** – vzorek velikosti lískového oříšku; má-li být provedena izolace viru, je nutno chladit
- **Paraziti** – opět velikosti lískového oříšku, nemusí být sterilní. Označit cestovatelskou anamnézu!
Zpravidla tři vzorky.
- **Roupi** – Grahamova metoda – perianální otisk na speciální lepicí pásku, mikroskopuje se
- **Otravy** – zvratky, zbytky jídel

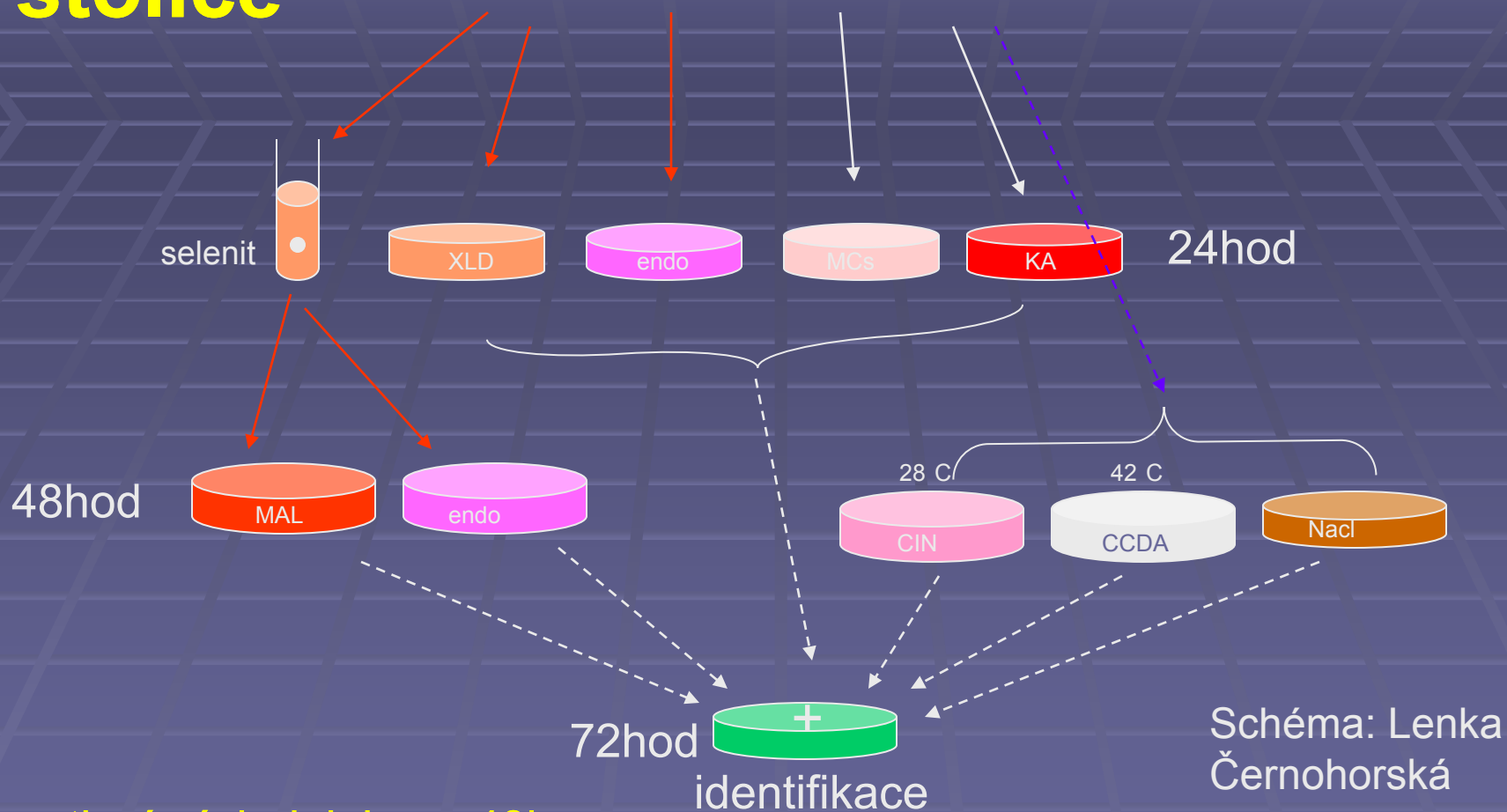
Diagnostika bakteriálních původců

- Přímý průkaz toxinu A (*Clostridium difficile*) jako antigenu. Průkaz toxinu je důležitější než samotný nálezný klostridia – to mohou mít i zdraví!
- Kultivace na různých půdách (výběr závisí na stáří pacienta a diagnóze)
- U cestovatelů přidáváme i méně obvyklé půdy



Kultivace stolice

Den 0. (přijatá stolice)



Negativní výsledek je za 48h
Pozitivní za 72h a déle

*Není-li uvedeno jinak kultivace probíhá při 37 C

Identifikace bakterie

- Bakterie **kultivujeme na různých půdách**, na kterých mají charakteristický vzhled
- Bakterie dále identifikujeme **biochemickými testy**
- V některých případech (salmonely, escherichie) je žádoucí **antigenní analýza vypěstovaného kmene**

Proteus mirabilis



Průkaz enterotoxikóz

- **Nestačí kultivační průkaz mikroba**
- Vždy **nutný průkaz toxinu** (pokud není dostupný v nejbližší mikrobiologické laboratoři, lze požádat o spolupráci např. referenční laboratoři)
- Pokud možno vyšetřit i **vzorek jídla**

Moččóvė cesty

Odběr a transport moče

- Nejspolehlivější je moč získaná **suprapubickou punkcí**. V praxi se ovšem používá málokdy
- Poměrně dobrá je také **katetrizovaná moč** (katetrizace provedená kvůli odběru)
- **Běžně odebraná moč** nemusí být špatným vzorkem, je-li správně odebrána a zaslána
- **Moč z permanentního katetru** je k ničemu, s výjimkou případu, kdy chceme zjistit osídlení katetru

Permanentní katetr (lepší obrázek jsem na internetu nenašel)



www.globalrph.com/antibiotic/uti.htm.

Odběr moče spontánně vymočené

- ze středního proudu moči spontánně vymočené (*rutinní typ s rizikem sekundární kontaminace během odběru*)
- **postup:** nádoba pro odběr moči musí být sterilní, se širokým hrdlem (např. kádinka)*, poučený pacient si před odběrem důkladně omyje zevní genitálie vodou a mýdlem a otře si zevní ústí močové trubice tamponem smočeným v dezinfekčním roztoku (u dětí se použití dezinfekčního roztoku nedoporučuje).

**pokud ale pacient močí přímo ve sprše, může močit přímo do zkumavky, a poté se omyje pacient i zkumavka zvenku, a odpadá další manipulace*

Odběr moče u muže a ženy

- **Muži** jedním krouživým tahem
- **Ženy** zaujmou široký postoj nad klozetovou mísou, jednou rukou oddálí labia a druhou rukou tamponem oťrou genitálie předozadním pohybem. Poté pacient odmočí první porci moče a **do sterilní nádoby bez přerušení močení zachytí střední proud**. Odebraná moč se přelije do sterilní nádobky určené k transportu.

(Česká lékařská společnost Jana Evangelisty Purkyně, DOPORUČENÉ POSTUPY PRO PRAKTICKÉ LÉKAŘE, Projekt MZ ČR zpracovaný ČLS JEP za podpory grantu IGA MZ ČR 5390-3)

Odběr moče u ženy

Důležité je prsty
odtáhnout malé stydké
pysky od proudu moče
tak, aby moč nebyla
kontaminována
mikroflórou vulvy



Výjimky z pravidel o odběru moče

- U podezření na záněty močové trubice se bere **první porce moče** (spláchnou se mikroby ze stěny trubice).
- U zánětů prostaty se naopak hodí **poslední porce moče**
- **Poslední porce moče** se zasílá také v případě podezření na parazitární infekci (např. schistosomózu)

Transport moče

- Pro hodnocení močové infekce je důležitá **kvantita** – viz dále. Tu však lze hodnotit pouze v případě, že se mikroby v moči během transportu nepomnoží – pokud se pomnoží, kvantitativní poměry se změni
- Proto je moč bezpodmínečně nutno dopravit do laboratoře **do dvou hodin** po odběru (raději ještě rychleji)
- Pokud zcela výjimečně toto nelze dodržet, je potřeba moč dát **do ledničky** (u jiných vzorků se to naopak nedoporučuje)

Soupravy typu URIKULT

- Smyslem těchto souprav je **odstranit čas** mezi odběrem moče a začátkem kultivace. Moč se odebere a ihned se do ní zanoří speciální destička s kultivačními půdami. Poté se moč vylije a půdy se začínají kultivovat (třeba přímo na oddělení)
- Na těchto destičkách se však mikroby **obtížně diagnostikují**. Tato metoda se proto neujala tak, jak se od ní původně očekávalo
- Pokud už se používají, je nutno bezpodmínečně dodržet **správný postup**

Kvantitativní a semikvantitativní vyšetření moče

- Při **kvantitativním** vyšetření se moč ředí a očkuje se na několik kultivačních půd
- Při **semikvantitativním** vyšetření se moč neředí, avšak používá se kalibrovaná klička na jedno použití. Vyšetření je méně pracné, ale také méně přesné
- Samozřejmě se hodnotí **nejen kvantita**, ale zároveň se normálním způsobem diagnostikuje, o kterého mikroba jde

Semikvantitativní vyšetření I

- Použije se **kalibrovaná klička** o objemu 1 μ l
- To znamená, že při ponoření do vody či tekutiny s podobným povrchovým napětím ulpí v očku kličky **právě jeden mikrolitr**
- Celý objem se **rozočkuje** na půl nebo celou miskou s agarovou půdou
- Poté se **normálně inkubuje** (24 h, 37 °C)
- Druhý den se **spočítají kolonie**. Podle počtu kolonií se interpretuje výsledek
- Používá se zpravidla **krevní agar + jedna další půda**. V naší laboratoři se v poslední době používá chromogenní půda URICHROM.

Bakterie na půdě urichrom



Semikvantitativní vyšetření II

- **Počet kolonií** po inkubaci odpovídá počtu CFU v 1 μ l původní moče
 - CFU = **c**olony **f**orming **u**nit, jednotka tvořící kolonii. Jednotlivý mikrob, dvojice, krátký řetízek, malý shluk. V praxi zanedbáváme rozdíl mezi mikrobem a CFU, říkáme tedy, že počítáme mikroby, i když ve skutečnosti počítáme CFU
- Pokud tedy počet kolonií zhruba odpovídá počtu mikrobů v 1 μ l původní moče, pak počet kolonií \times 1000 odpovídá počtu mikrobů v 1 ml původní moče. 10 kolonií – 10^4 mikrobů v mililitru, 100 kolonií – 10^5 mik/ml

Automatické kultivační systémy

- Některé firmy dnes nabízejí **automatické kultivační systémy**, které detekují pozitivitu již po čtyřech hodinách a hlásí i antibiotickou citlivost (italský systém UroQuick). Některé, zejména soukromé laboratoře takové systémy vítají.
- Tento přístup je však **velice rizikový**, protože antibiotická citlivost bez určení druhu bakterie je velice zrádná. Pokud je takový systém doplněn možností klasické diagnostiky, nemusí být nutně na škodu. **Je však nepřijatelné používat takový systém bez toho, aby jeho výsledky interpretoval mikrobiolog** (např. umístění přístroje do biochemické laboratoře)



Interpretace vyšetření moče I

- Při nálezu jednoho druhu mikroba platí:
- **Kvantita nad 10^5** mikrobů v 1 ml se považuje za pravděpodobnou močovou infekci. U starých lidí to ovšem může být kolonizace
- **Kvantita 10^4 – 10^5** je hraniční. Jsou-li pochybnosti o kvalitě odběru (např. u kojenců), považuje se spíše za kontaminaci. Významná je spíše u mužů a u dětí.
- **Kvantita pod 10^4** se považuje za kontaminaci
- Neplatí u punktované a katetrizované moči.

Interpretace vyšetření moče II

- Při nálezu dvou mikrobů platí
- Kvantita do 10^5 je zřejmě kontaminace
- Kvantita nad 10^5 je sporná (hraniční)
- Při nálezu tří mikrobů platí
- V podstatě vždy se považuje za kontaminaci
- **Výjimka:** jeden mikrob v kvantitě nad 10^5 , ostatní dva naopak pod 10^4 → první mikrob se považuje za pravděpodobného původce
- V praxi se zohledňuje také o jaké mikroby jde apod. (stafylokoky se berou „méně vážně“)

Diagnostika infekcí pohlavních, kožních, očních

Odběry z genitálií

- Ke kultivaci se používá transportně kultivační **souprava C. A. T.** (kvasinky a trichomonády) a **Amies** (bakterie včetně gardnerel, mykoplasmát a anaerobů). Z CATu se provádí mikroskopie ve formě nativního preparátu
- Doporučuje se také poslat **sklíčko nebo dvě sklíčka** (podle situace) na barvení. Klasické zaslání dvou sklíček je MOP – mikrobiální obraz poševní
- V případě průkazu kapavky, syfilis, chlamydií, papilomavirů se užívají zvláštní postupy

Odečítání kultivací z pohlavních orgánů (laboratoř MÚ FN USA)

- Den 0 – odběr a zaslání vzorku, případná mikroskopie zaslání sklíčka
- Den 1 – odečet KA, EA, popř. ČA + GC (kapavka)
- Den 1 – 2 – odečet C. A. T. (trichomonády)
- Den 2 – odečet NaCl, gardnerel, anaerobní kultivace, popř. ČA + GC (definitivně)
- Den 1, 2, 3, 4 – odečet kultivace kvasinek
- Den 5 – odečet kultivace mykoplasmat*

**Mykoplasmata se odečítala šestý den, avšak díky bakalářské práci studentky Radky J. se prokázalo, že pět dní stačí.*

MOP – mikrobiální obraz poševní

- Posílají se **dvě sklíčka**. Jedno se obarví dle Grama, druhé dle Giemsy (hlavně kvůli trichomonádám)
- Hodnotí se jednak **kvantita jednotlivých útvarů**, jednak **celkový vzhled** preparátu. Staré hodnocení dle šesti typů se postupně přehodnocuje, spíše se hodnotí „BV“ a „AV“.
 - MOP I – tzv. normální obraz zdravé ženy
 - MOP II – bakteriální nehnisavý (i fyziologický)
 - MOP III – bakteriální hnisavý
 - MOP IV – kapavka
 - MOP V – trichomonóza
 - MOP VI – kvasinková infekce

Bakteriální vaginózy (BV)

- **Bakteriální vaginóza** je stav, kdy normální flóra poševní je narušena a v pochvě se nacházejí ve větší míře bakterie rodů např. *Gardnerella*, *Mobiluncus*, a anaerobní bakterie. Ty mohou být v pochvě i normálně, ale bývá jich méně
- **Nedá se určit jednoznačný původce**
- **Téměř nejsou přítomny leukocyty** (hnis). Některé bakterie totiž blokují jejich migraci do místa zánětu. V mikroskopii zato vidíme epitelie pokryté bakteriemi – clue cells
- **Léčba:** metronidazol, úprava flóry

Nugentovo skóre

- Některé laboratoře využívají **mikroskopický obraz poševní** k tomu, že počítají tzv. Nugentovo skóre. Zde se „kladné body“ připočítávají za bakterie tvarově vypadající jako gardnerely (drobné gramlabilní tyčinky) nebo mobilunky (drobné zahnuté G- tyčinky) a odpočítávají za bakterie připomínající laktobacily. **Skóre nad 10 znamená téměř jistou přítomnost vaginózy**

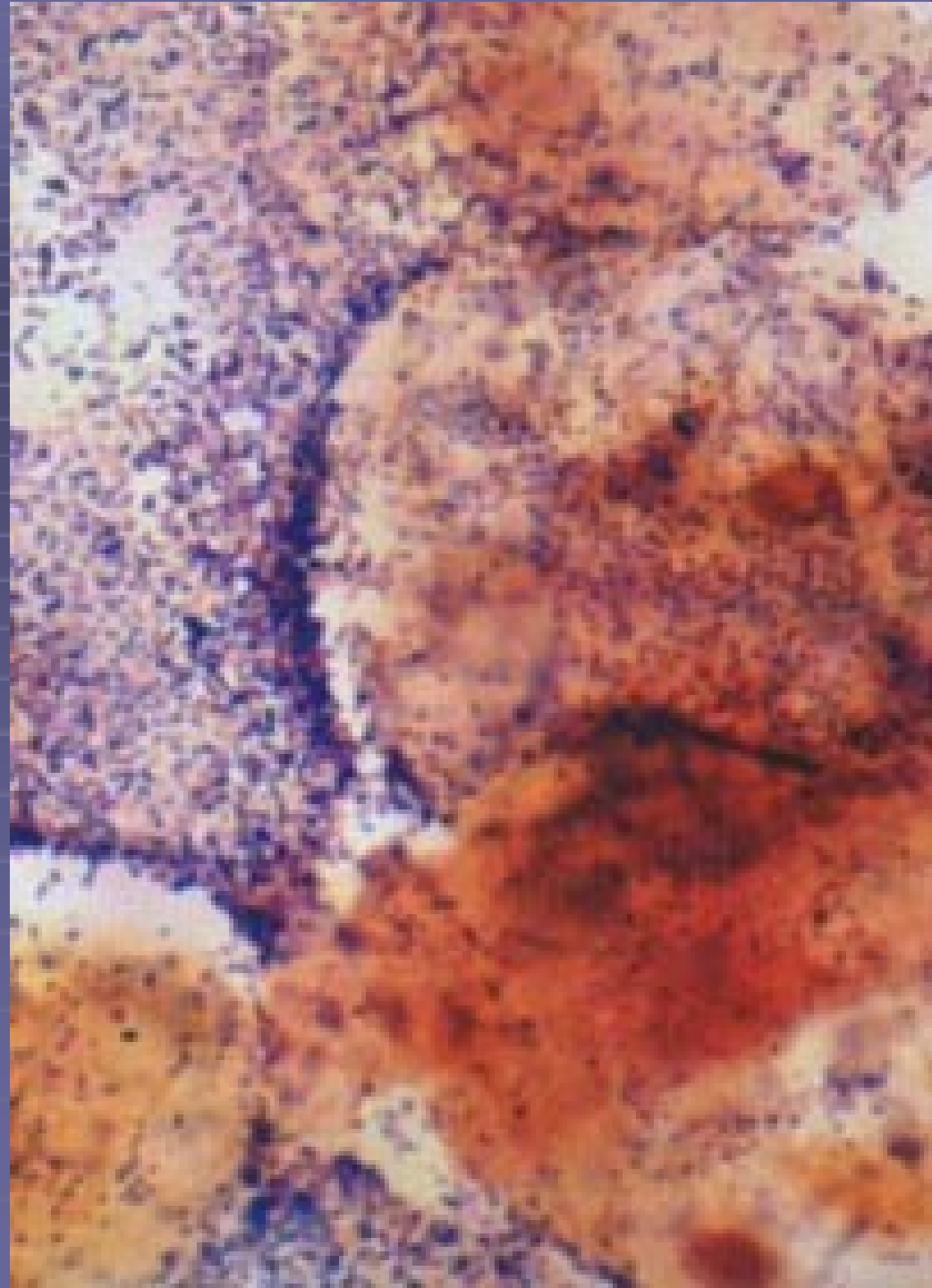
Aerobní vaginitidy (AV)

- Vedle bakteriální **vaginózy** jsou možné i klasické (tj. leukocyty naopak obsahující) bakteriální záněty pochvy (**kolpitivity**; nesprávně utvořený pojem vaginitida se bohužel oficializoval)
- Je však velmi **obtížné odlišit původce zánětu** od náhodného nálezu nebo kolonizace pochvy
- **Nejčastěji** nalézáme enterobakterie, enterokoky, *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*
- **Léčba** závisí na přítomnosti příznaků, s výjimkou *Streptococcus agalactiae* (zde se mimo těhotenství doporučuje spíše ženu přeléčit, kvůli přenosu na novorozence; v těhotenství už se ale nepřeléčuje)

MOP I (Giemsa). Přítomny laktobacily, Nugentovo skóre = 0

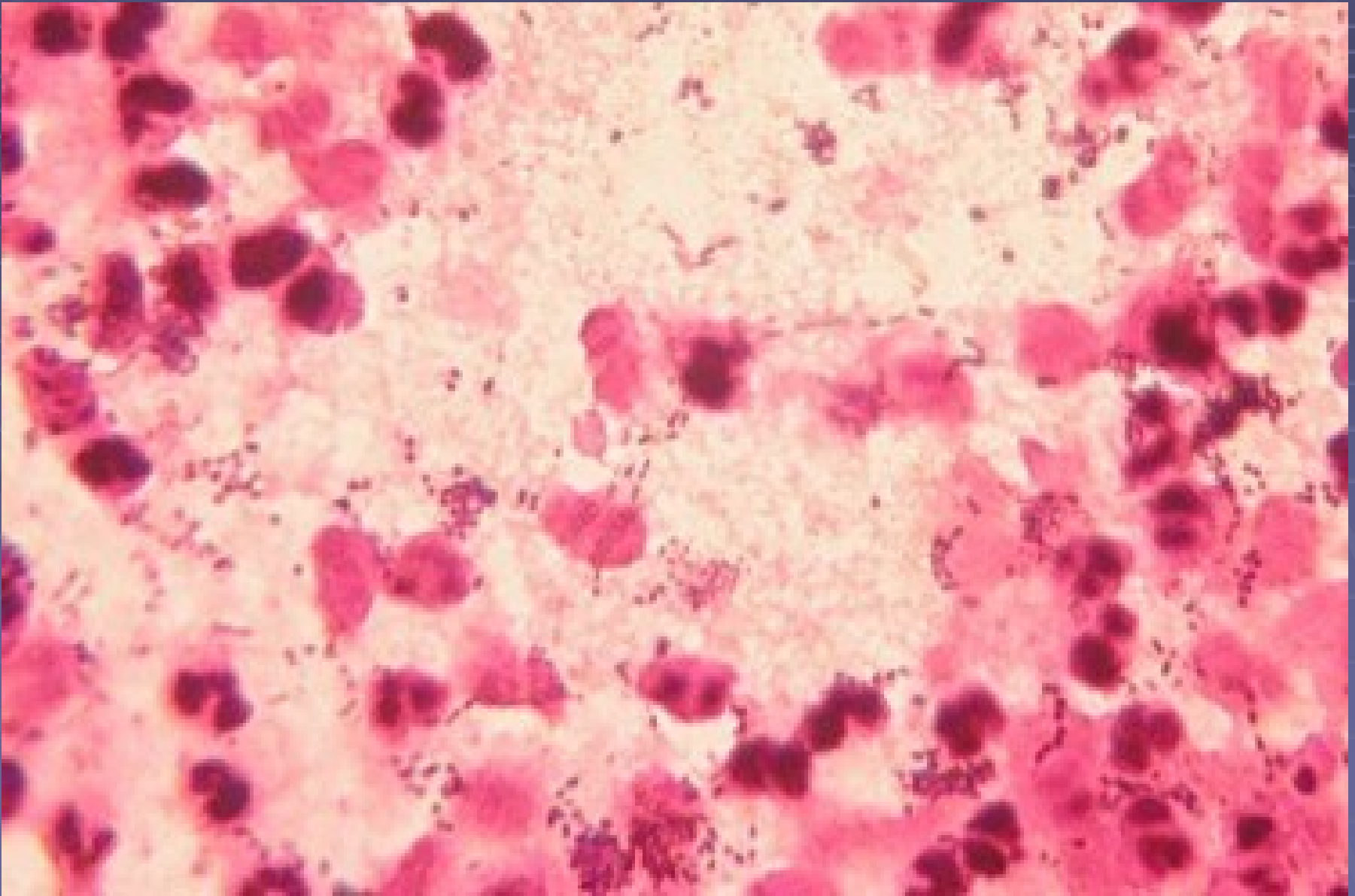


MOP II,
bakteriální
vaginóza.
Laktobacily
nahrazeny
jinými
tyčinkami,
Nugentovo
skóre = cca 8

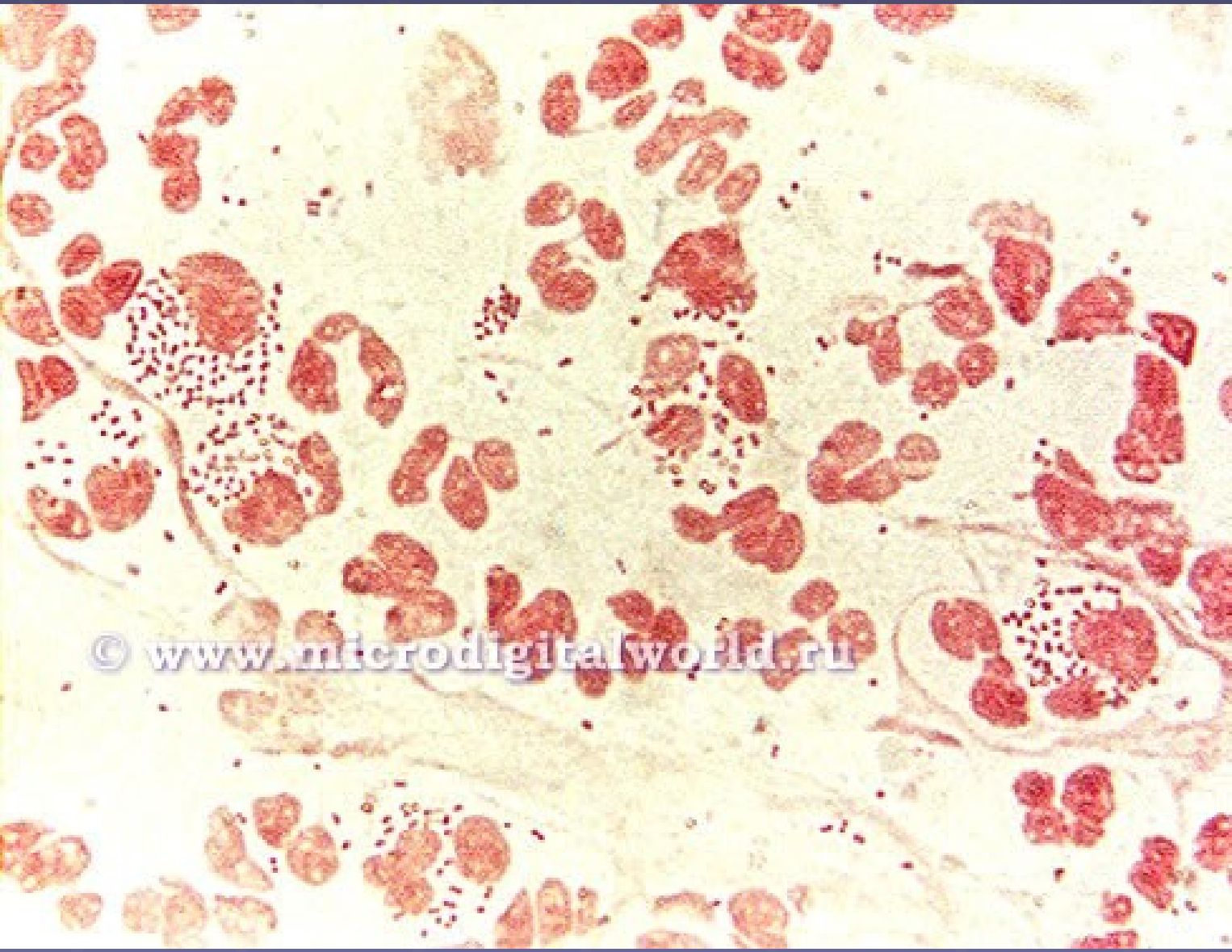


MOP III (odpovídá dnešní AV)

www.medmicro.info



MOP IV (kapavka)



© www.microdigitalworld.ru

MOP V (trichomonóza)

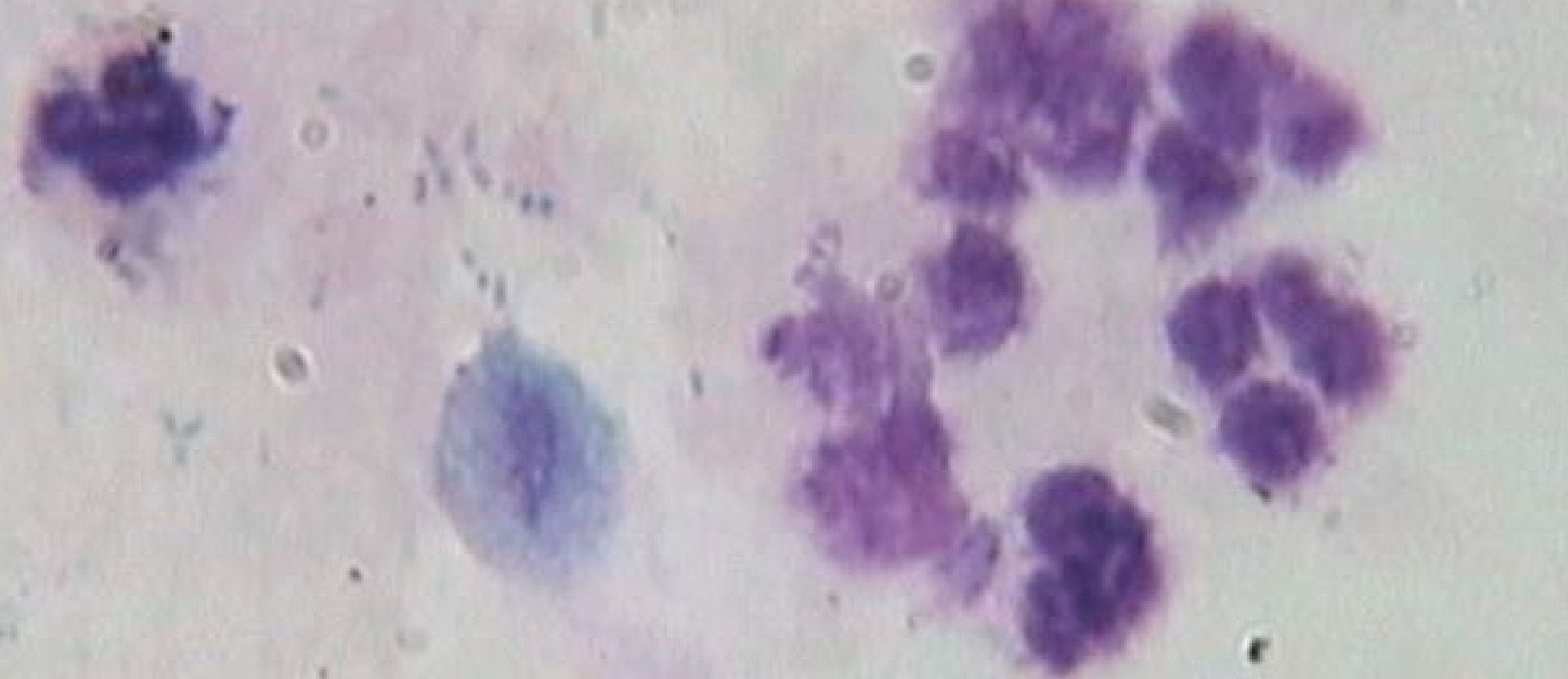


Photo by: Dr S.M. Sadjjadi
parasito@sums.ac.ir

MOP VI (Giemsa) – poševní mykóza



PMN leukocyte - 1
spherical form of Candida - 2
hyphal form of candida - 3

MOP VI (Gram)



ASM MicrobeLibrary.org ©Wiedbrauk

Diagnostika nemocí s kožními projevy

- U řady běžných dětských nemocí **není laboratorní diagnostika nutná**, nemoci jsou poznatelné klinicky
- **Pokud by se měly diagnostikovat**, dělá se to zpravidla serologicky
- U **spály** je podstatné vyšetření výtěru z krku, které odhalí streptokoka
- U **skutečných kožních infekcí** se provádějí stěry, otisky apod.; na mykologii se posílají šupiny aj. Kultivuje se běžným způsobem

Diagnostika očních infekcí

- V případě **povrchových infekcí** se posílají výtěry ze spojivkového vaku. V laboratoři se primokultivují pouze v bujónu
- Při **podezření na akantaméby** je k vyšetření je nutno poslat celé kontaktní čočky v jejich tekutině, popř. provést seškrab rohovky
- V případě **hlubších infekcí** se materiál na přímý průkaz odebírá jen tehdy, je-li to možné bez toho, abychom pacienta vyšetřením poškodili. V některých případech (toxoplasmosa) lze hledat protilátky.

Diagnostika sepsí

Hemokultury – odběr krve

- Jedná se o **nesrážlivou krev**, principiálně zcela odlišné vyšetření než vyšetření serologická
- Dnes zpravidla odběr do **speciálních lahviček** pro automatickou kultivaci
- Nutno odebrat **dvě, ale ještě lépe tři hemokultury** při vzestupu teploty
- Ideálně **pokaždé z nového vpichu**, nebo aspoň jedna venepunkce + centrální žíla + periferní žíla (odlišení bakteriémie od kolonizace vstupu)

Zásady odběru krve

- **Odebírat asepticky!!!** Nejen kvůli pacientovi, ale i kvůli vzorku. Nestačí očistit kůži benzinem, nutná desinfekce
- **Desinfekci nechat působit dostatečně dlouho**, u alkoholových prostředků do zaschnutí (nechat skutečně zaschnout)
- **Nejlépe použít tři stejné hemokultivační nádoby**. Případně doplnit např. jednou anaerobní
- **Hemokultury popsat**, nezapomenout na čas odběru

Pseudobakteriémie – příčiny

- Nevhodně provedený odběr, nedostatek asepse při odběru krve
- Odběr pouze ze zavedených vstupů (zachytí se bakterie kolonizující vstup, která však nemusí být původcem skutečné bakteriémie, natož sepse)

Jak zamezit pseudobakteriemií – I

- Odebírat hemokultury **cíleně**, když je přítomnost bakterií v krvi pravděpodobná, naopak neodebírat „z rozpaků“ když je indikováno jiné vyšetření
- Odebírat hemokultury **v dostatečné kvantitě**: jedna je k ničemu, i dvě jsou málo, tři je optimum
- Odebírat hemokultury **z vhodných míst**: nejméně jednu z nové venepunkce, ideálně tři venepunkce plus odběr z žilního katetru
- Odebírat hemokultury **ve vhodnou chvíli**, u septických stavů typicky při vzestupu teploty

Jak zamezit pseudobakteriémii – II

- Odebírat hemokultury **správně**, velmi důležité a často opomíjené je dodržení aseptického odběru (desinfekci nechat doopravdy zaschnout)
- Odebírat hemokultury **do správné soupravy**: zpravidla není důvod posílat aerobní a anaerobní, není-li skutečné podezření na anaeroby. Odběr do lahvíček s aktivním uhlím je nutný přinejmenším tam, kde je pacient již zaléčen antibiotikem
- Doprovodit hemokultury **dobře vyplněnou průvodkou**: nutné je nejen datum, ale i čas odběru – pro interpretaci nálezu

Jak zamezit pseudobakteriemií – III

- U podezření na **kontaminovaný cévní katetr** se katetr mění. Starý katetr nevyhazujeme, nýbrž pošleme na bakteriologii. Dnes již existují metody schopné odhadnout, zda jde o skutečné osídlení katetru či náhodný nálezn
- Totéž samozřejmě platí pro **jakékoli implantáty, které se vyjímají z těla** – jejich mikrobiologické vyšetření může přinést podstatnou informaci pro další léčbu

Druhy kultivačních nádobek

- Existují **různé typy** podle toho, které mikroby mají být především zachyceny (aerobní, anaerobní, kvasinky)
- **Některé nádobky obsahují aktivní uhlí.** Jsou určeny ke kultivaci krve pacientů, kteří už berou antibiotika (klasická lahvička by mohla dát falešně negativní výsledek – antibiotikum by potlačilo růst)

Nejběžnější jsou aerobní standardní, aerobní s uhlím a anaerobní s uhlím.

Příklady nádobek na hemokultivaci



BacT/ALERT® SA

Aerobic, Aérobie, Aeróbico, Aeróbica,
Αερόβια, Αναερόβια, Anaerobica, Anaeróbica

See instructions. Voir Notice.
Ver las Instrucciones.

Vide Instruções de Uso.
Store / Cons. 15°-30°C.

For in vitro diagnostic use.
Reg. No. 1077940225

BIOMÉRIEUX, INC.

BacT/ALERT® FN

Aerobic, Anaerobic, Anaeróbica, Anaeróbica,
Αερόβια, Αναερόβια, Anaeróbica, Anaeróbica

See instructions. Voir Notice.
Ver las Instrucciones.

Vide Instruções de Uso.
Store / Cons. 15°-30°C.

For in vitro diagnostic use.
Reg. No. 1077940225

BIOMÉRIEUX, INC.

BacT/ALERT® FN

Aerobic, Aérobie, Aeróbico, Aeróbica,
Αερόβια, Αναερόβια, Anaeróbica, Anaeróbica

See instructions. Voir Notice.
Ver las Instrucciones.

Vide Instruções de Uso.
Store / Cons. 15°-30°C.

For in vitro diagnostic use.
Reg. No. 1077940225

BIOMÉRIEUX, INC.

Fungování kultivátorů

- Kultivátor, napojený na počítač, automatický udržuje optimální podmínky kultivace, a zároveň vyhodnocuje stav nádobky a indikuje případný růst (např. změna tenze CO_2)
- Růst je **zvukově a opticky signalizován**. Pokud ani po týdnu nic neroste, signalizuje to přístroj také (je třeba expedovat negativní výsledek)

Automat na hemokultury



Hemokultivační automat otevřený



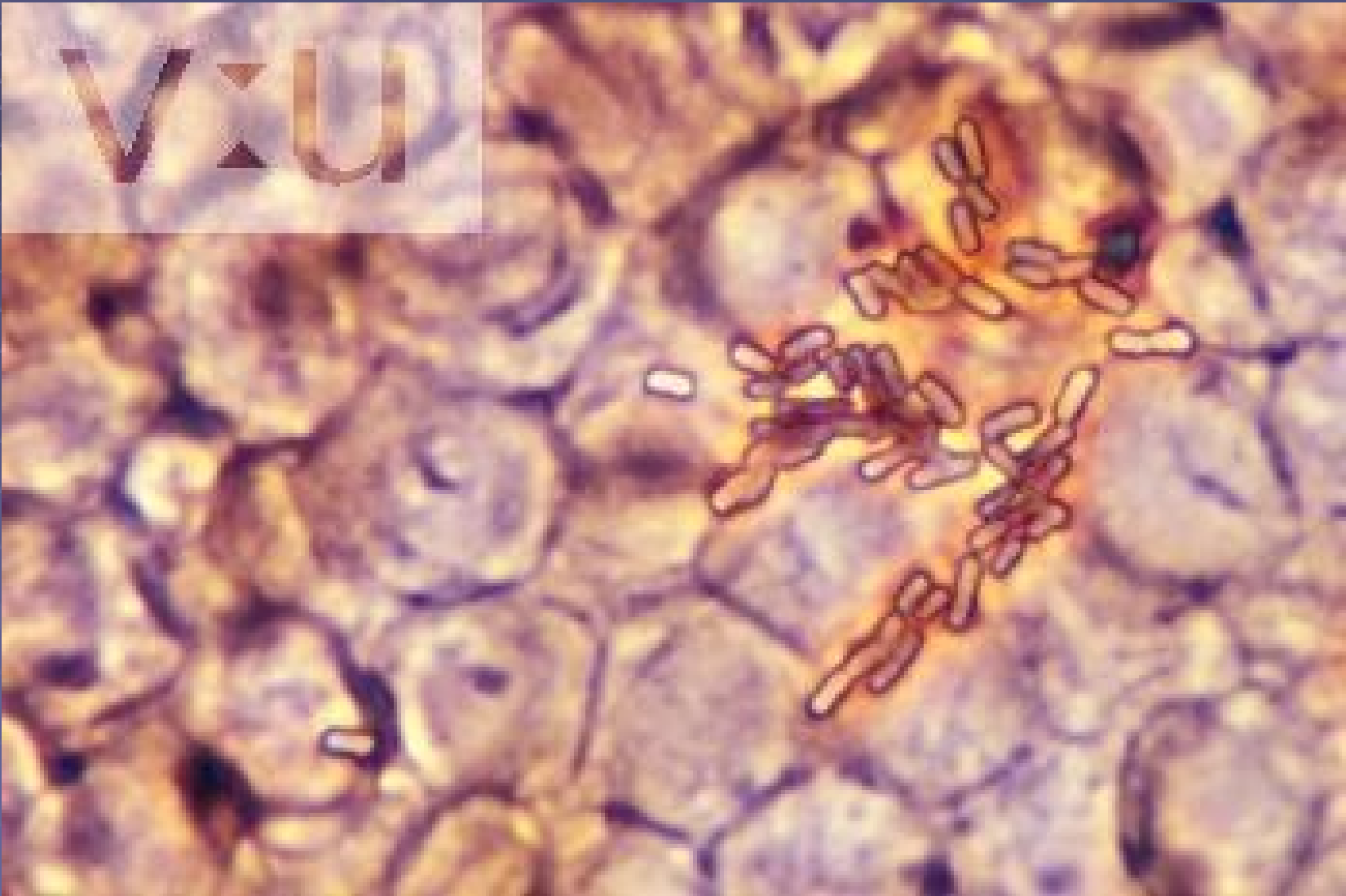
Když je hemokultura pozitivní...

- Lahvička je vyjmuta z přístroje
- Je nutno zaevidovat čas, resp. dobu od příjmu do positivity. Čím delší je tato doba, tím je pravděpodobnější, že jde o kontaminaci
- Provádí se vyočkování na pevné půdy, nátěr na sklo barvený Gramem a podle jeho výsledku zpravidla „napřímo“ orientační diskový test citlivosti; místo standardní suspenze se použije přímo tekutina z lahvičky → není spolehlivé

Další postup

- Je třeba počítat s tím, že **testy „napřímo“ jsou jen orientační**, už pro nestandardní obsah bakterií v jednotlivých krvích. Zpravidla se proto v dalším kroku provádí **řádné vyšetření citlivosti**
- Výjimkou jsou **případy, kdy jde asi o kontaminaci** (pozitivní jen jedna hemokultura ze tří, nebo pozitivní všechny, ale evidentně různé kmeny, pozitivita až za delší dobu, koaguláza negativní stafylokoky)

E. coli v hemokultuře, fázový kontrast



Cévní katetry

- V případě pacientů se zavedenými katetry je vždy podezření na katetrový původ sepse
- V takovém případě je nutno odebírat hemokultury jak z katetru, tak i ze zvláštních odpichů
- **Posílají se také odstřižené části katetrů, a je velmi důležité, jak budou vyšetřeny.**

Klasické zpracování cévních katetrů

- **Klasická kultivace v bujonu:** katetr se vloží do tekuté půdy a kultivuje 24 h. Je-li po této době bujon zakalený, je vyočkován na pevnou půdu a případné bakterie identifikovány.
- **Co se stane:** Uvolní se bakterie v planktonické formě. Bakterie ve formě biofilmu se uvolní málo nebo vůbec.
- Vzhledem k použití bujónu jako pomnožovací půdy **nevíme nic o kvantitě** (kontaminace × infekce).

Nové možnosti zpracování katetrů

- **Semikvantitativní metoda:** Bujon se oválí po povrchu pevné půdy. **Co se stane:** zmapujeme povrch katétru a semikvantitativně posoudit nález, nevypovídá však o bakteriích uvnitř a bakterie se nemusí uvolnit z biofilmu.
- **Sonifikace:** biofilm rozbijeme ultrazvukem. **Co se stane:** rozrušíme biofilm na povrchu i uvnitř katétru. Vyočkování určitého objemu vzorku je kvantitativní metoda, takže dává možnost posoudit množství mikrobů.

Diagnostika systémových viróz (hepatitid, infekce HIV apod.)

Systemové virózy

- Základem je **průkaz protilátek**, případně také průkaz antigenu a průkaz DNA
- Vyšetřuje se zpravidla **sérum**, a to nejen na průkaz protilátek, ale i virových antigenů
- Na průvodku je vždy nutno přesně uvést, **jaká vyšetření mají být provedena** (nejen který virus, ale i jakými postupy – už kvůli proplácení pojišťovnou)

Diagnostika neuroinfekcí

Bakteriologická diagnostika purulentních meningitid

- **Vzorek:** Mozkomíšní mok (Při odběru měřit tlak likvoru a prohlédnout jeho vzhled)
- **Po přijetí do laboratoře:**
 - mikroskopie (hledají se leukocyty a bakterie)
 - přímý průkaz antigenu ve vzorku likvoru
 - kultivace: obohacené půdy (čokoládový agar)
 - Identifikace kmenů, u meningokoků až na úroveň séroskupiny kvůli očkování
- **Interpretace:** pozor na kožní kontaminaci (koagulasa negativní stafylokoky)

Diagnostika ostatních neuroinfekcí

■ Ostatní bakteriální infekce

- U abscesů je nutno získat vzorek z příslušného abscesu, protilátky nemusí být vytvořeny
- U borreliózy a neurolyues je diagnostika serologická

■ Virové neuroinfekce

- **Přímý průkaz:** Kultivace virů na tkáňových kulturách a na sajících myšatech; PCR.
- **Nepřímý průkaz:** Dva vzorky krve na „serologii respiračních virů“ - provede se vyšetření protilátek proti nejběžnějším virovým, ale případně i bakteriálním agens.

Diagnostika ranných, poživových, hnisavých infekcí

Odběry u hnisavých infekcí a infekcí ran

- V diagnostice hnisavých infekcí má vždy **větší význam tekutý materiál** (hnis) než pouhý výtěr z hnisavého ložiska
- U podezření na **anaerobních infekci** je nutno zajistit přežití anaerobů (viz dále)
- Je nezbytné pečlivě **vyplnit průvodku**, nestačí „stěr z rány“, ale specifikovat původ rány i její lokalizaci na těle
- Také důležité **anamnestické údaje** (návrat ze zahraničí, práce v zemědělství) je užitečné na průvodku uvést

Výtěr z rány



OCT 13 2004

Diagnostika hnisavých infekcí

- V laboratoři je provedena **mikroskopie vzorku**, dále jeho **kultivace**, **bližší určení** odhalených patogenů a vyšetření jejich **citlivosti na antibiotika**
- U mikroskopie se hodnotí **nejen mikroby**, **ale i množství leukocytů** apod.
- Při kultivaci je užitečné využívat **pomnožovací tekuté půdy** (kdyby bylo mikrobů málo) a také **selektivní půdy** (s NaCl na stafylokoky, s amikacinem na streptokoky), zejména u dekubitů apod.

Výtěr z rány: Základní diagnostické schéma (bez anaerobů, kvasinek aj.)

(Liší se dle lokalizace rány a dalších okolností)

- **Den 0:** pouze nasazení kultivací
- **Den 1:** výsledek primokultivace vzorku na KA, EA, NaCl a KA+AMI. V případě negativy všech pevných půd se prohlíží B, je-li zakalený, vyočkovává se (tzv. subkultivace)
- **Den 2:** expedice všech negativních a mnohých pozitivních výsledků – pro komplikace, rezistence apod. ovšem zdaleka ne všech
- **Den 3:** expedice dalších pozitivních výsledků

Výtěr z rány – interpretace

- **Běžná flóra:** žádná není, vše, co se najde, se považuje za patogena (pro jistotu i to, o čem máme pochybnosti, není-li to kontaminace)
- **Patogeny:** všechno možné, od stafylokoků přes streptokoky a pseudomonády až po anaeroby u břišních ran a pasterurely u ran po pokousání psem. Proto se doporučuje s atb léčbou vyčkat až po alespoň předběžném výsledku kultivace

Závěr

- Jak je vidět, u různých typů infekcí se posílají různé vzorky, a jsou tu různé požadavky na průvodky
- Nemůžeme chtít po klinických lékařích ani po zdravotnických sestrách, aby se ve všem neomylně vyznali. **Mikrobiologové i laboranti v mikrobiologických laboratořích jsou povinni být nápomocni, posloužit spíše dobrou radou než nadáváním „zase jste to odebrali blbě“.**

Nashledanou příště!

www.medmicro.info

