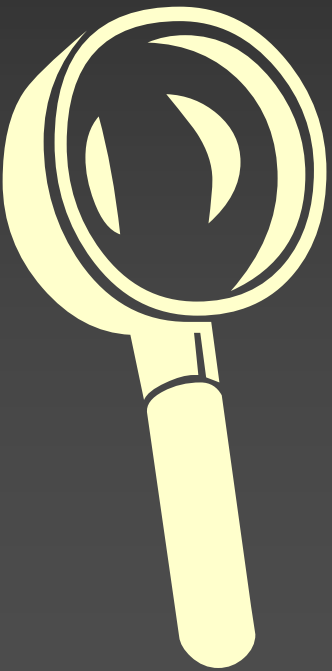


Mikrobiologický ústav uvádí

NA STOPĚ PACHATELE

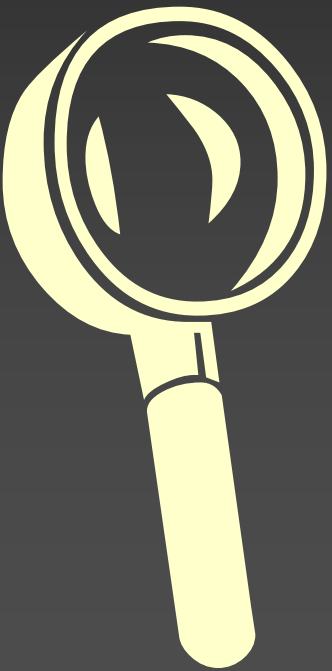


Díl dvanáctý:

Spolupráce při pátrání aneb
Klinická mikrobiologie I

Mikrobiologický ústav uvádí

NA STOPĚ PACHATELE



Díl třináctý:

Spolupráce při pátrání aneb
Klinická mikrobiologie II

Na úvod (materiál se přijímá i o Vánocích)



Přehled témat

Bonus: Běžná flóra +

Úvod do klinické mikrobiologie

1 Indikace

2 Odběr vzorku (včetně žádanky) 3 Transport vzorku

2A Odběry: hemokultury

2B Odběry: vzorky moče

2C Odběry: další konkrétní případy

4 Rozhodnutí, jak zpracovat 5 Vlastní zpracování

4A Zpracování a vyhodnocení respiračních vzorků

4B Zpracování a vyhodnocení vzorků moče a ran

6 Zaslání výsledku 7 Interpretace

Úvod do klinické mikrobiologie

Příběh první – 1

- Petr pořád kašlal, tak navštívil lékaře. Lékař mu chtěl rovnou předepsat antibiotika, pak si ale vzpomněl, jak ho mikrobiologové nabádali, ať provede vyšetření. Tak udělal výtěr z krku. Našel se v něm *Haemophilus influenzae*, citlivý na cefuroxim. Petr začal užívat ZINNAT (preparát, který cefuroxim obsahuje).

Příběh první – 2

- Petrův stav se však nezlepšoval. Petr se naštval a navštívil známého lékaře na plicním. Byla provedena **serologie respiračních virů** a nalezeny **vysoké titry protilátek proti *Mycoplasma pneumoniae***. Petr začal **užívat SUMAMED** (azithromycin) a brzo je jeho stav výrazně zlepšil.

Viníkem bylo nejen *Mycoplasma pneumoniae*, ale i

- obvodní lékař X. Y., protože:
 - správně si vzpomněl, že je většinou dobré před nasazením antibiotik zjistit **původce a antibiotickou citlivost**
 - udělal však **chybu v rozhodování**, jaké vyšetření je v daném případě indikováno
 - mělo být zasláno **sputum**, a při negativě kultivace (nebo při indiciích ukazujících spíše na typickou než klasickou pneumonii) případně **srážlivá „krev na serologii respiračních virů“** (včetně chlamydií a mykoplasmat, ač to viry nejsou)
- Všimněte si, že jsou i případy, kdy makrolidy jsou správné řešení dané situace (ač jinak autor těchto řádků spíše brojí proti jejich nadužívání)

Příběh druhý

- Nicol škrábalo v krku, a tak zašla k lékaři. Lékař provedl výtěr z krku, ale byla nalezena pouze běžná flóra. Lékaři se to nezdálo, protože dle CRP i zvýšeného počtu polymorfonukleárů vše nasvědčovalo hnisavé bakteriální infekci.
- Lékař věděl, že Nicol často střídá partnery. Na přímou otázku přiznala, že měla orální sex s rizikovým mužem. Lékař provedl nový odběr, tentokrát s poznačením, že jde o vyšetření na kapavku. A nemýlil se.

Viníkem byla pouze *Neisseria gonorrhoeae*

- Obvodní lékař tentokrát nic nezanedbal, gonokoková faryngitida zase není tak běžná, aby se po ní rutinně pátralo při rutinní anamnéze. Pozitivní je, že se nenechal zviklat negativním výsledkem vyšetření.
- Lékař si totiž správně uvědomil, že **každý typ vzorku má v laboratoři své rutinní vyšetřovací schéma**. Toto schéma platí vždy, nejsou-li vyřčeny speciální požadavky. Je-li tedy důvod ke speciálnímu vyšetření, je nutno je vyznačit na průvodce.

Co je to klinická mikrobiologie

- **Klinická mikrobiologie „sensu lato“** je lékařská mikrobiologie – tedy ta část mikrobiologie, která se týká mikrobiálního osídlení člověka a lidských patogenů
- **Klinická mikrobiologie „sensu stricto“** popisuje vlastní procesy mezi klinickým pracovištěm a laboratorii, jakož i organizaci vlastního laboratorního vyšetření

Proces mikrobiologického vyšetřování – na všem záleží!!!

KLINIK

LABORATOŘ

Indikace vyšetření – zda, jaké

P 12

Vlastní provedení odběru

Transport materiálu

P 13

Rozhodnutí, jak zpracovat

Vlastní zpracování materiálu

Zaslání výsledku

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



1 Indikace

1A Indikace – ZDA provést

- Hlavním klíčem k úspěchu je zpravidla položit si otázku **co udělám jinak v závislosti na výsledku vyšetření.**
- Pokud zjistím, že ať vyjde vyšetření jakkoli, **bude můj další postup ve vztahu k pacientovi stejný,** je vyšetření pravděpodobně **zbytečné**
- Toto ale neplatí u **epidemiologických indikací** a také u **profylaktických indikací** (jako je skrining mikrobiálního osídlení pacientů v těžkém stavu)

1B Indikace – CO provést

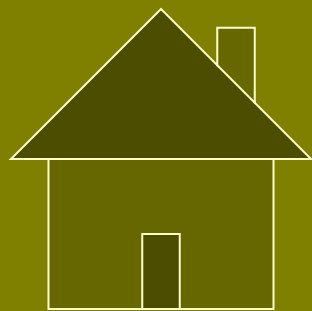
- Rozhodnutím, že chci provést vyšetření, to zdaleka nekončí. Musím se ještě rozmyslet, **jaké vyšetření se rozhodnu provést.**
- Musím znát **spektrum patogenů a možnosti jejich vyšetření**
- Součástí je také **rozhodnutí o tom, jak** technicky se odběr provede, do jaké nádobky či odběrové soupravy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

Tři typy patogenů (1)

- Patogen typu *Streptococcus pyogenes*.
Nemusím vědět, že myslím zrovna na tohoto patogena, ale musím přesně vědět, kde je jeho předpokládaná lokalizace.
- Patogen typu *Mycobacterium tuberculosis*.
Musím vědět, kde patogena hledám, a zároveň i to, že hledám právě tuto skupinu patogenů – to tedy musím vyznačit na žádance.
- Patogen typu *Toxoplasma gondii*. Nemusím vědět, kde se patogen v těle nachází, ale musím vědět, že hledám právě jeho.

Tři typy patogenů (2)

- Patogen typu *Streptococcus pyogenes*. Týká se kultivovatelných bakterií a kvasinek, tedy většiny mikrobů z P 01 až P 06 a zčásti P 10
- Patogen typu *Mycobacterium tuberculosis*. Stále je to přímý průkaz, ale speciální postupy, při běžné kultivaci se nezachytí. Týká se zejména mikrobů z P 07, P 08, P 11, část P06.
- Patogen typu *Toxoplasma gondii*. Nepřímý průkaz, event. přímý průkaz virového antigenu. Týká se spirochet z P 09, virů z J 12 a J 13, ale i některých dalších (třeba zrovna toxoplasmy).



2 Odběr vzorku

(včetně žádanky)

3 Transport

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
- V zásadě existují tři typy vzorků:
 - Výtěry a stěry na tamponech
 - Tekuté a kusové vzorky, zasílané v nádobkách (zpravidla sterilních)
 - Jiné a speciální případy, viz dále
- Nelze zapomenout na správné vyplnění průvodky

Výtěrovky



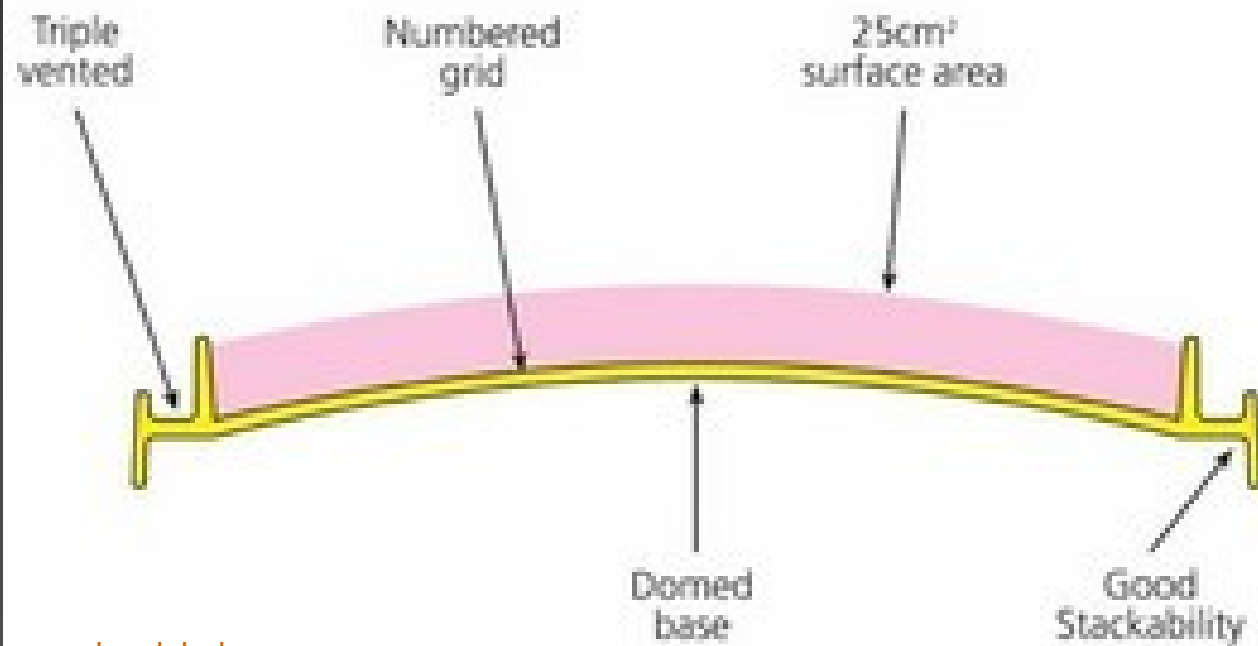
Jiné typy odběrů než „výtěrovky“ a odběrové nádoby

- **nátěr na podložní sklíčko:** kapavka, aktinomykóza, přímo zasláná tlustá a tenká kapka apod.
- **v kožním lékařství a v epidemiologii otisky** přímo na kultivační půdu, která je pro tento účel nalita až po okraj Petriho misky; **v chirurgii otisk na filtrační papír**
- **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.

Volba „do čeho odebrat“: Tekutý vzorek, nebo výtěr?

- Přednost má zpravidla zaslání tekutého/kusového materiálu před pouhým zasláním stěru/výtěru.
- Existují četné výjimky, např.
 - v bakteriologii se zpravidla používá výtěr z řitního kanálu namísto kusové stolice (i když zaslání kusové stolice v zásadě není chyba)
 - stěr z urethry je u kapavky doporučován spíše než zaslání vzorku moče

Kontaktní destička



Uricult

www.mediost.com



Některé typy výtěrovek



Suchý tampon www.calgarylabservices.com

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

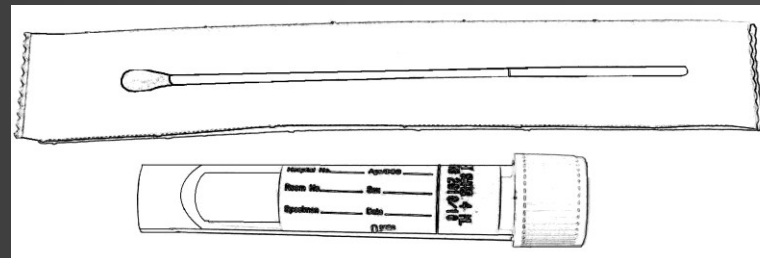


Amiesova půda s aktivním uhlím www.herenz.de

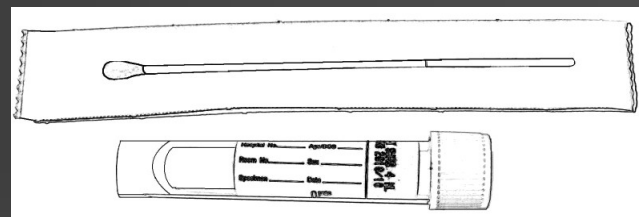
Univerzální transportní půda pro bakteriologii (všechny typy výtěrovek). Drátěná varianta je důležitá, pokud se potřebujeme „dostat za roh“.

Další výtěry

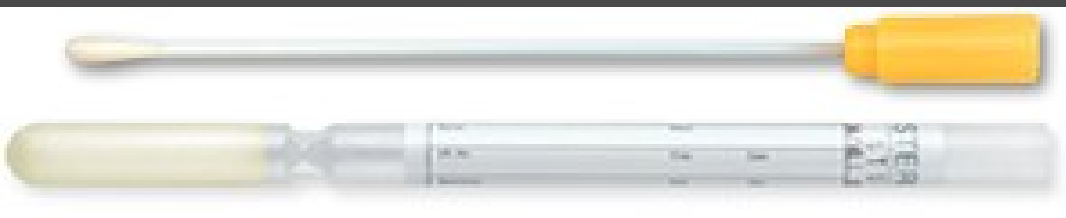
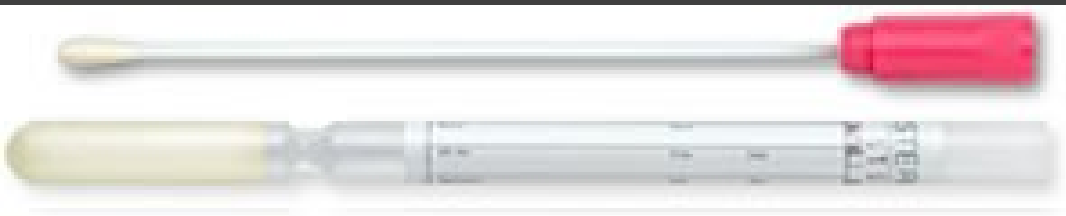
Fungi Quick (na kvasinky a plísně) www.copanswabs.com



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



Na viry www.copanswabs.com



Na chlamydie
www.copanswabs.com

Přehled souprav na výtěry

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

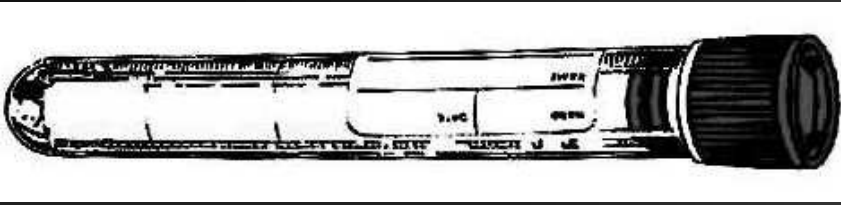
C. A. T. – houby a trichomonády (stěry z pohlaví)

Soupravy s médiem na viry, popř. chlamydie

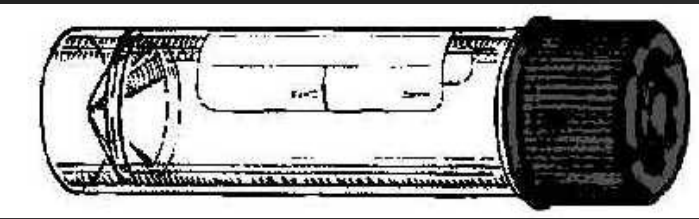
Odběrové nádoby

- 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

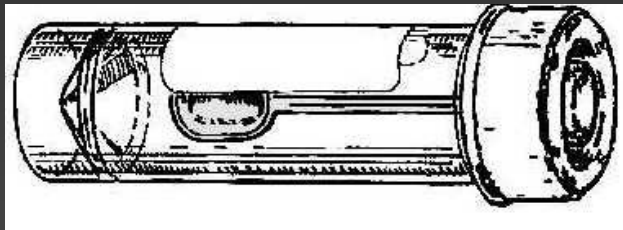
Nádobky



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 močí 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.

Různé nádoby



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. kultivační vyšetření u syfilis)

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

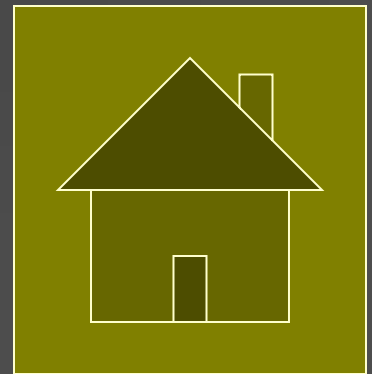
Vyplnění průvodky – shrnutí

Nesmíme zapomenout vyplnit na průvodce všechna důležitá pole:

- **pole popisující pacienta** (jméno, rodné číslo, diagnóza, pojišťovna, oddělení...)
- **pole popisující vzorek** (typ vzorku, lokalizace, okolnosti odběru)
- **a všechny ostatní významné části** (zejména anamnézu)

Chyby při vyplňování žádanek

- Častou chybou je **nedostatečné označení typu vzorku**
- Je také **chybou požadovat vyšetření, které je nevhodné** (například pátrání po protilátkách tam, kde převažuje buněčná imunita a protilátky nemají diagnostický význam)



2A Odběry: hemokultury

Základní pojmy kolem sepsí

- **Sepse** je stav, kdy bakterie vyvolaly infekci krevního řečiště, s vysokými horečkami, rozvratem metabolismu a spoustou dalších **klinických projevů**
- **Bakter(i)émie** je jakákoli přítomnost bakterií v krvi, tj. i taková, které je přechodná a pro organismus vůbec nic neznamená
- **Pseudobakter(i)émie** je stav, kdy jsou bakterie v krvi přítomny jen zdánlivě (špatně provedené vyšetření krve, zpravidla kožní kontaminace).

Druhy sepsí

- **Primární sepse** – některé bakterie mají sepse „v popisu práce“, třeba tyfové salmonely nebo do jisté míry i meningokoky
- **Sekundární sepse** – sepse následující po předchozím postižení nějakého orgánu
- **Zvláštní typy sepsí:**
 - urosepse – sepse při onemocnění ledvin
 - katetrová sepse jako nozokomiální onemocnění

Sepse – klinický obraz

- nestabilní tělesná teplota
- porucha svalového tonu
- nesnášenlivost stravy, průjem
- poruchy dýchání – zrychlené, nepravidelné, dechové pausy, selhání
- poruchy krevního oběhu – zrychlený či zpomalený puls, pokles TK, apod.
- často žloutenka, hyper/hypoglykemie, metabolický rozvrat, krvácení, nervové příznaky apod.

Definice hemokultivace

- 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 a místo odkud bylo odebráno

Druhy kultivačních nádobek

- Existují **různé typy** podle toho, které mikroby mají být především zachyceny (aerobní, anaerobní)
- **Některé nádoby („FAN“)** 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)



Standard
aerobní

Akt. uhlí
anaerobní

Akt. uhlí
aerobní

Bact/ALERT® SA

Aerobic. Aérobic. Aeróbico. Aeróbica.
Aerob. Αερόβιος. Aeroba. Aeróbica.
See instructions. Voir Notice.
Ver las Instrucciones.
Vide Instruções de Uso.
Store / Cons. 15°-30°C.
For in vitro diagnostic use.
BIO-MÉRIEUX, INC.

Bact/ALERT® FN

Anaerobic. Anaérobic. Anaeróbico. Anaeróbica.
Anaerob. Αναερόβιος. Anaeroba. Anaeróbica.
See instructions. Voir Notice.
Ver las Instrucciones.
Vide Instruções de Uso.
Store / Cons. 15°-30°C.
For in vitro diagnostic use.
BIO-MÉRIEUX, INC.

Bact/ALERT® S

Aerobic. Aérobic. Aeróbico. Aeróbica.
Aerob. Αερόβιος. Aeroba. Aeróbica.
See instructions. Voir Notice.
Ver las Instrucciones.
Vide Instruções de Uso.
Store / Cons. 15°-30°C.
For in vitro diagnostic use.
Reg. MS-101774-0034
BIO-MÉRIEUX, INC.

Fungování kultivátorů

- Kultivátor, napojený na počítač, automaticky udržuje optimální podmínky kultivace, a zároveň vyhodnocuje stav nádoby 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)

Hemokultivátor



www.medmicro.info

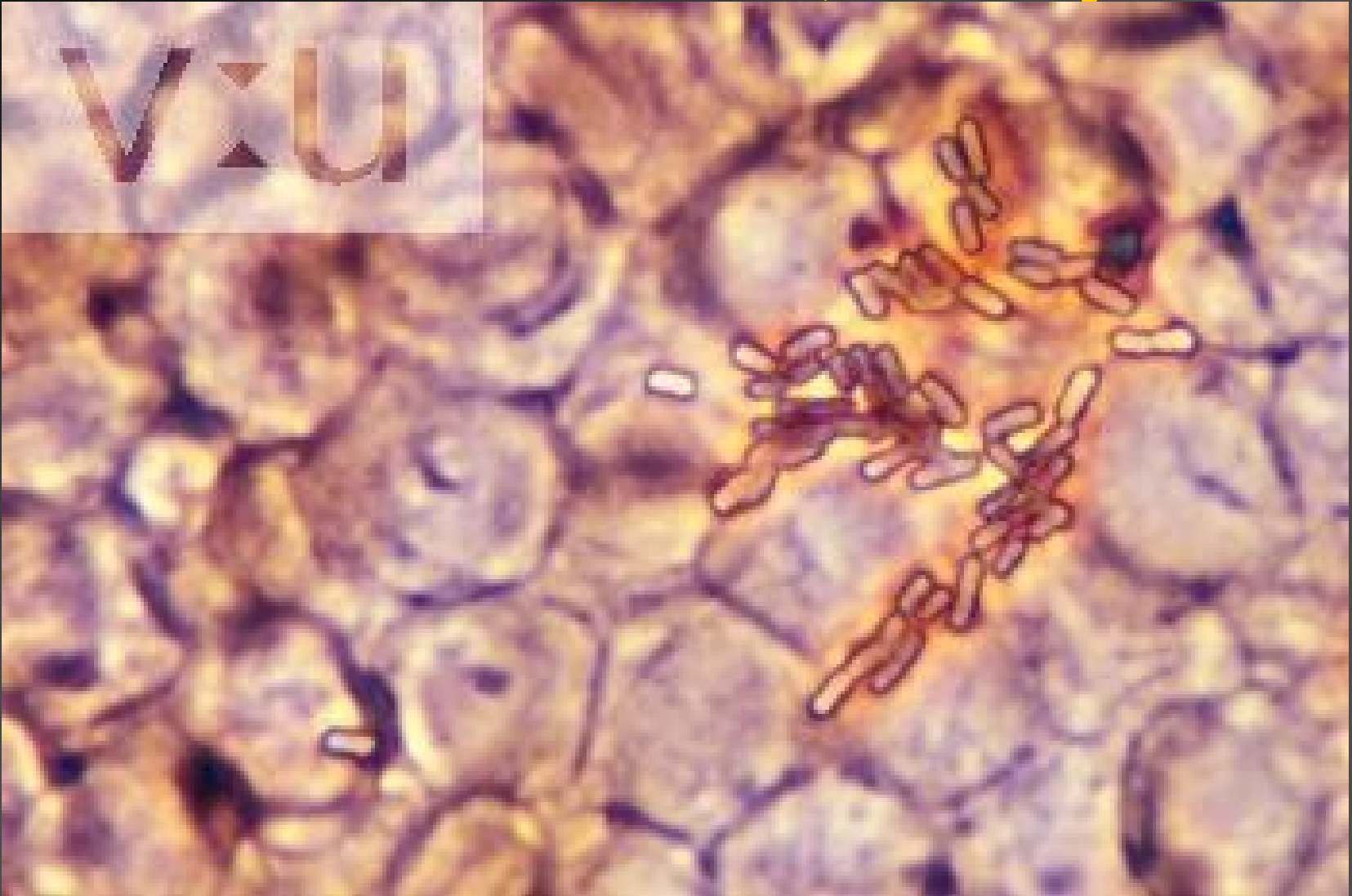
Když je hemokultura pozitivní...

- Lahvička je vyjmuta z přístroje
- Je nutno zaevidovat čas, resp. dobu od příjmu do positivity. Viz další obrázek
- 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

Proč je tak důležité zapsat čas odběru

- **Příklad 1:** Odebraly se tři hemokultury, všechny jsou pozitivní, avšak jedna po 12 hodinách, druhá po 36 hodinách a třetí po 3 dnech. Kmeny jsou fenotypově odlišné → je velmi pravděpodobné, že jde o kožní kontaminanty
- **Příklad 2:** Odebraly se tři hemokultury, všechny jsou pozitivní, všechny po zhruba stejném čase po odběru, kmeny vypadají podobně → je pravděpodobné, že jde o skutečného patogena

E. coli v hemokultuře, fázový kontrast

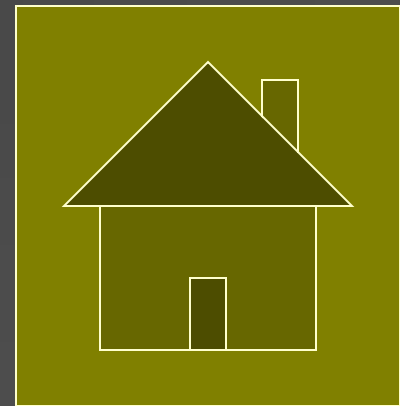


Další postup

- 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** (často pomocí kvantitativních testů)
- Výjimkou jsou **případy**, kdy jde asi o **kontaminaci** (zejména u koaguláza negativních stafylokoků)

Spolupráce laboratoř – oddělení

- Laboratoř se snaží v průběhu hemokultivace **spolupracovat s oddělením**, nejlépe formou telefonického hlášení, zasílání mezivýsledků (i v případě negativních hemokultur) apod.
- Užitečná je také **dlouhodobá evidence pozitivních nálezů** v rámci soustavného sledování nozokomiálních nákaz.
- **Konkrétní formy spolupráce** je třeba dohodnout vždy individuálně



2B Odběry:
vzorky moče

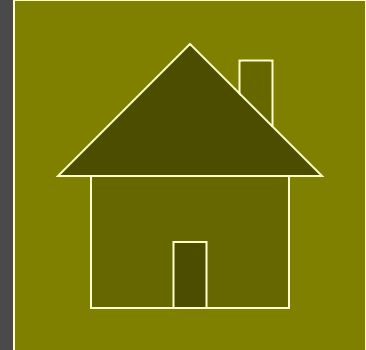
Vyšetření moče (Část první)

- Vyšetření moče je vhodné u nekomplikované a nezbytné u komplikované cystitidy **správně**
- Mikrobiologové doporučují použití katetrizované moč jako rutinní způsob odběru moče na bakteriologické vyšetření **špatně, běžně (ale správně) odebraná moč je dostačující a katetrizace může způsobit iatrogenní cystitidu; katetrizovaná moč je vhodná tam, kde běžně odebraná moč dlouhodobě nestačí**
- Při bakteriologickém vyšetření moče není podstatné, zda se při odběru proud moče dotýká při odběru předkožky (u mužů) či malých stydkých pysků (u žen) **špatně, je nutno, aby žena při močení jednou rukou labia odtáhla, podobně i muž; to že (ze studu) pacienti v tomto smyslu nebývají poučeni je důvodem kontaminací**

Vyšetření moče (Část druhá)

- Zevní ústí uretry je třeba před odběrem na bakteriologické vyšetření pečlivě omýt, případně i lehce desinfikovat **správně**
- Nádobka, do které pacient močí, musí být sterilní **správně, a to at' močí do široké nádobky, z níž se moč přelévá, či přímo do zkumavky (ve sprše)**
- Zkumavka, ve které se posílá moč, musí mít žlutý uzávěr **špatně, je to jedno, ale musí být sterilní. Jiné to může být jen když to laboratoř požaduje např. pro přehlednost**
- Žádanka o vyšetření musí obsahovat informaci, zda jde o moč běžně odebranou, katetrizovanou, punktovanou, nebo zda jde o vzorek z permanentního močového katetru **správně (hlavně katetrizovaná × PMK, viz dále)**

Vyšetření moče (Část třetí)



- Moč z permanentního katetru má v bakteriologické diagnostice stejný význam jako moč katetrizovaná přímo za účelem vyšetření **špatně, moč z PMK je méně validní vzorek než běžně odebraná, katetrizovaná naopak více**
- Vzorek moče musí být dodán do laboratoře do dvou hodin po odběru. Pokud to není možné, je nutno jej uchovat v ledničce **správně (teplotní šok se zde považuje za menší zlo než pomnožená kontaminace)**
- Vzorek moče je při diagnostice kapavky lepší než výtěr z močové trubice **špatně**

2C Odběry:
další konkrétní
případy

Odběr stolice

- **Bakterie** – v Amiesově transportní půdě
- **Kvasinky** – stejně, ale lépe 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
- **Toxin *Clostridium difficile*** – jako na parazity

Otisková metoda u plošných ran

- Tato metoda se používá ke **kvantifikaci mikroorganismů, zejména v ranách**. Při použití čtveratých filtračních papírů můžete lépe odlišit skutečného patogena od náhodné kontaminanty
- Vy tuto metodu nebudete používat na ránu, ale vyzkoušíte si ji na vlastní kůži.

Nátěry – poševní/urethrální nátěr

- Sklíčka se používají v různých situacích: u aktinomykózy, anaerobních infekcí apod.
- Sklíčka se také posílají současně s **poševním výtěrem při podezření na poševní infekce.**
 - Posílají se **dvě sklíčka.**
 - Jedno se obarví dle Grama, na bakterie, ale i epitelie, leukocyty apod.
 - Druhé dle Giemsy (hlavně kvůli trichomonádám)
 - Hodnotí se jednak **kvantita jednotlivých útvarů**, jednak **celkový vzhled** preparátu
- U **kapavky** se posílá zpravidla jen jedno sklíčko (urethrální výtěr), nacházíme gramnegativní intraleukocytární diplokoky

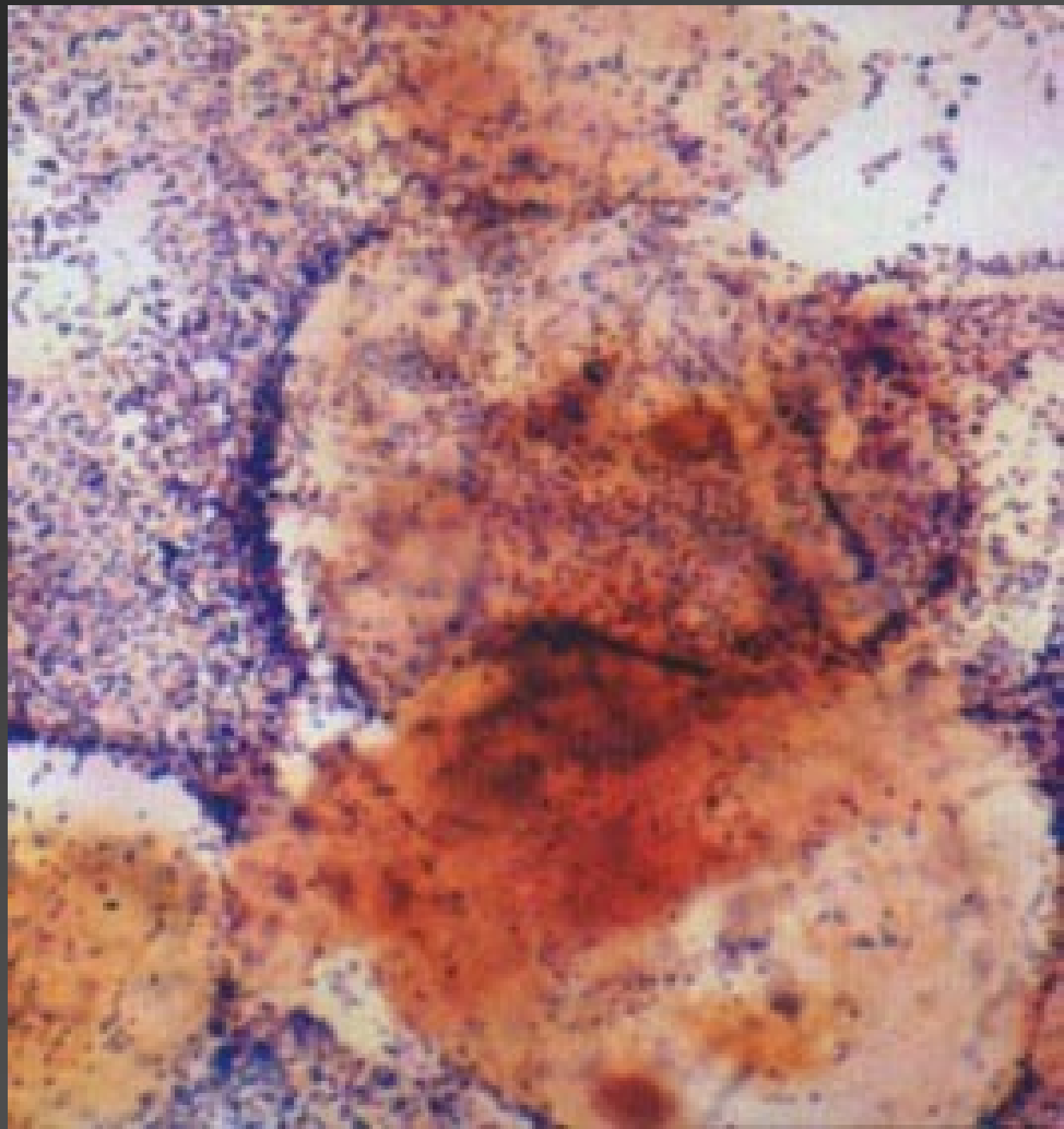
Normální mikroflóra: epitelie, laktobacily (Döderleinův bacil)



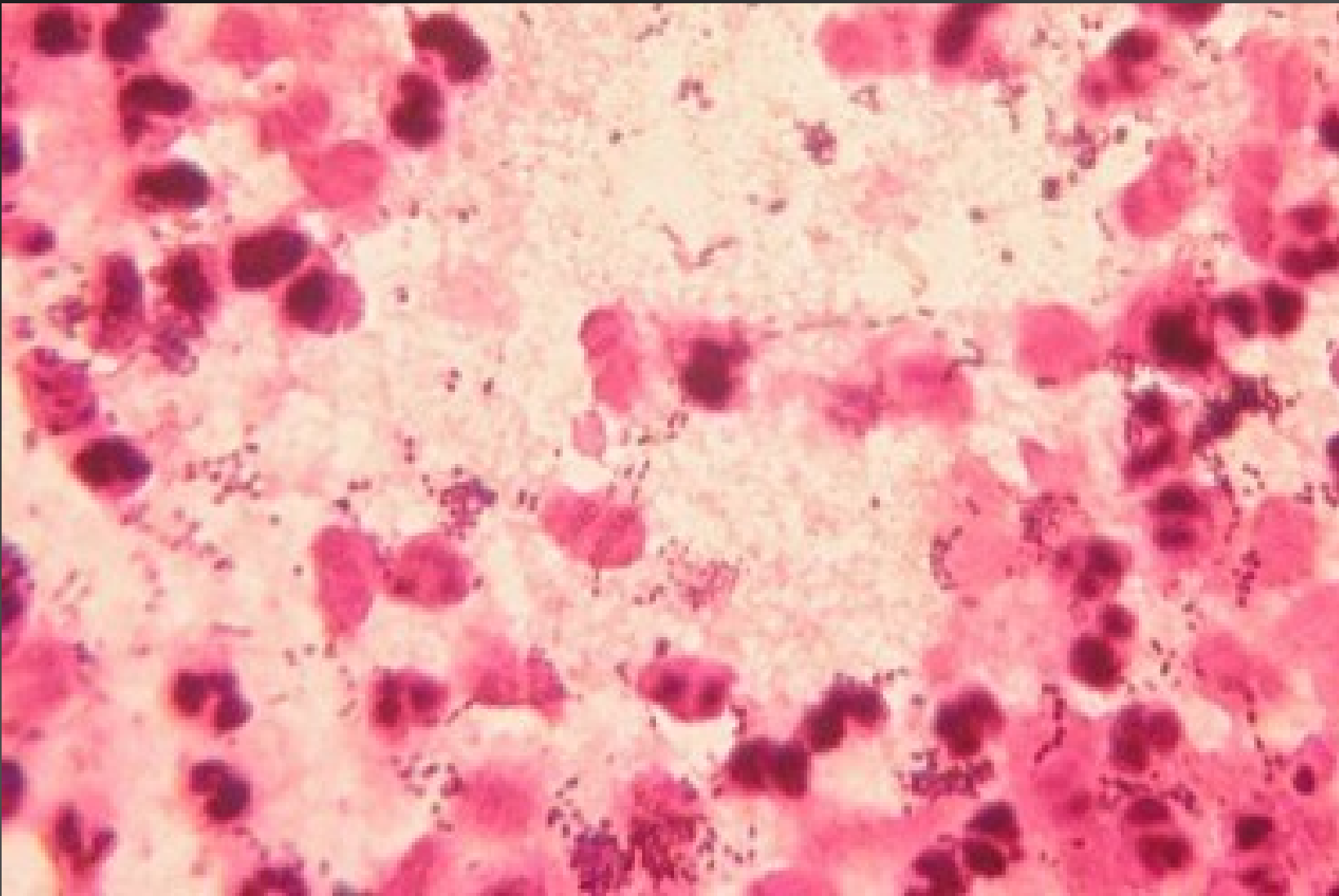
Giemsa

Gram

Obraz
bakteriální
vaginózy
(laktobacily
nahrazeny
gardnerelami,
popř. mobilunky
a jinými
bakteriemi,
časté clue cells
– bakterie
adherované na
epitelie)



Aerobní vaginitis (na rozdíl od vaginózy jsou tu přítomny leukocyty)

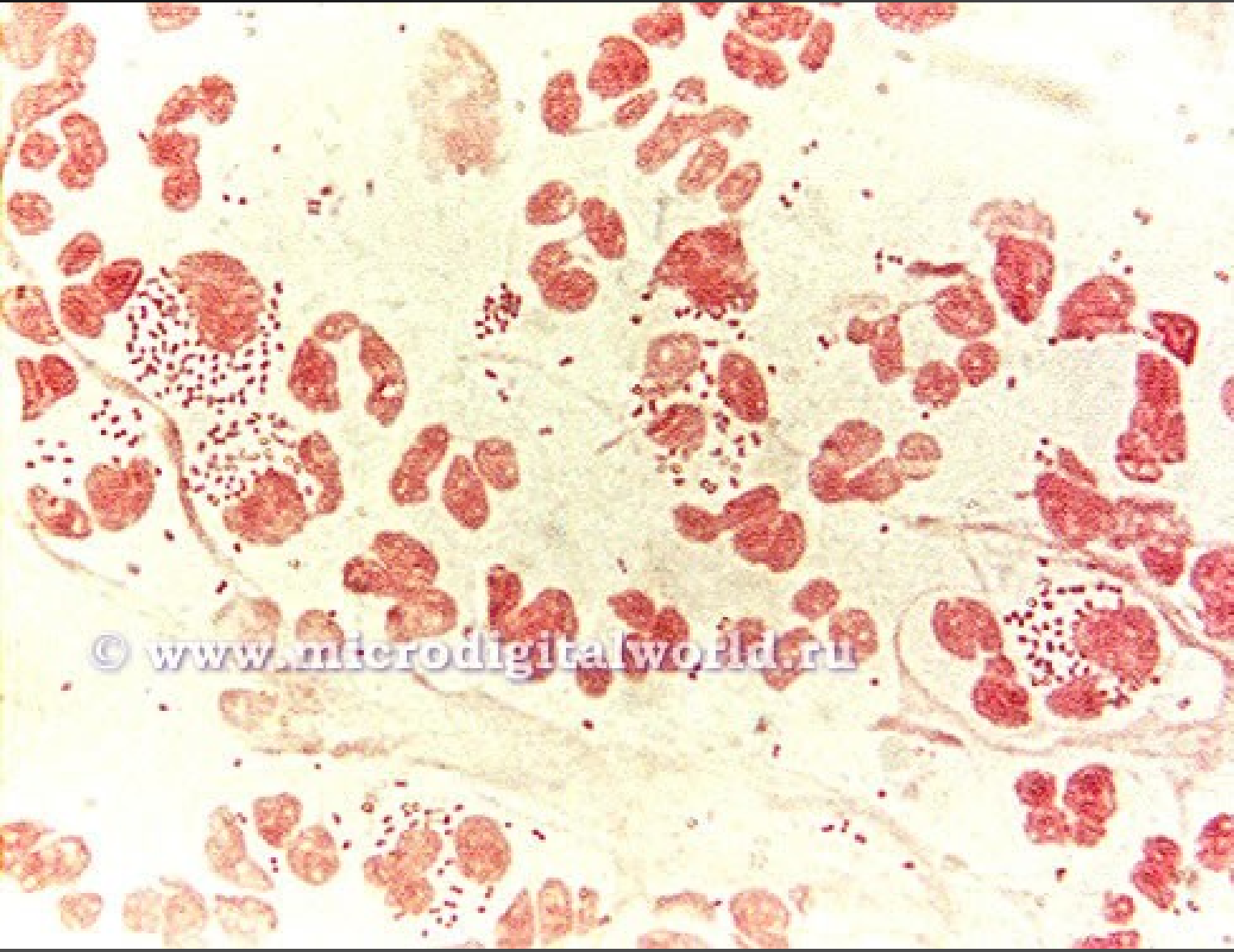


Gram

<http://en.microdi-gitalworld.ru>

Kapavka

<http://en.microdigitalworld.ru>



Gram

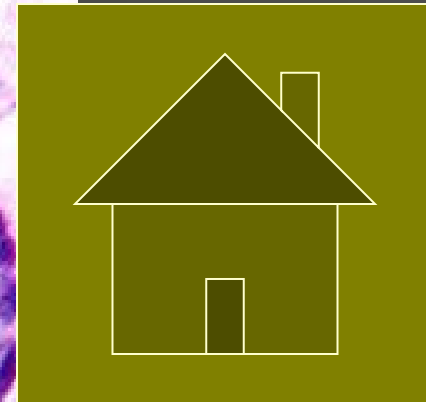
Trichomonóza



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

Vaginální mykóza

<http://en.microdigitalworld.ru>



Giemsa

4 Rozhodnutí
jak zpracovat

5 Vlastní
zpracování

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

www.medmicro.info



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

S čím si lze splést patogena

- **S kontaminací:** nejčastěji bakterie rodů *Bacillus*, *Micrococcus*, *Kocuria*, ale i malá množství stafylokoků, plísní a podobně
- **S náhodným nálezem:** u výtěrů z krku mikrob, který se tam dostal s potravou
- **S běžnou flórou:** týká se míst, která svou běžnou flóru mají

Přehled běžné flóry

Více zde:



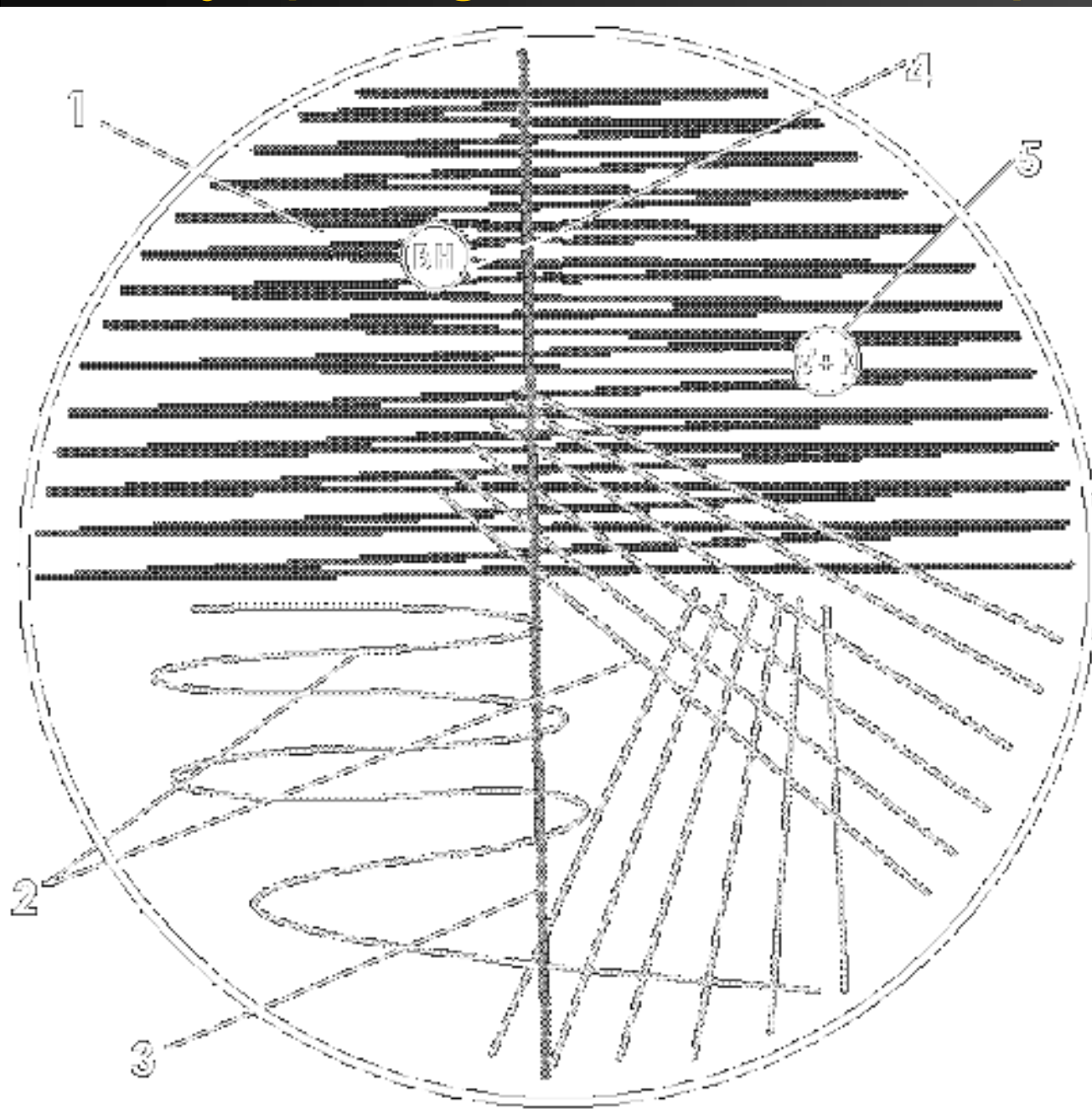
Kůže, nos, boltec, zevní zvukovod, kožní adnexa	Stafylokoky (i zlaté), korynebakteria, kvasinky
Hltan a ústní dutina	Ústní streptokoky a neisserie Hemofily, malá množství pneumokoků, meningokoků, anaeroby, nepat. treponem.
Trusté (i tenké) střevo	Anaeroby, enterobakterie, enterokoky, <i>Entamoeba coli</i>
Vagina	Laktobacily, malá množství nejrozličnějších mikrobů
Přechody (rty apod.)	Směs zástupců obou míst

4A Zpracování a vyhodnocení respiračních vzorků

Jak najít patogena mezi běžnou orofaryngeální flórou

- Běžná orofaryngeální flóra zahrnuje ústní streptokoky (bezbarvé drobné kolonie s viridací) a ústní neisserie (drobné žlutavé kolonie bez hemolýzy. To výrazně ztěžuje hledání možných patogenů. Přesto:
 - Hemolytické streptokoky (ale i zlatý stafylokok) se projeví výraznou hemolýzou na krevním agaru
 - Pro záchyt hemofilů se používá disk s bacitracinem – ve vyšší koncentraci než v bacitracinovém testu (k odclonění běžné flóry)
 - Pro záchyt meningokoků se používá disk se směsí vankomycinu s kolistinem

Záchyt patogena v krku či sputu



1 očkováno tamponem

2 očkováno kličkou

3 stafylokoková čára

4 disk BH (bacitracin pro hemofily)

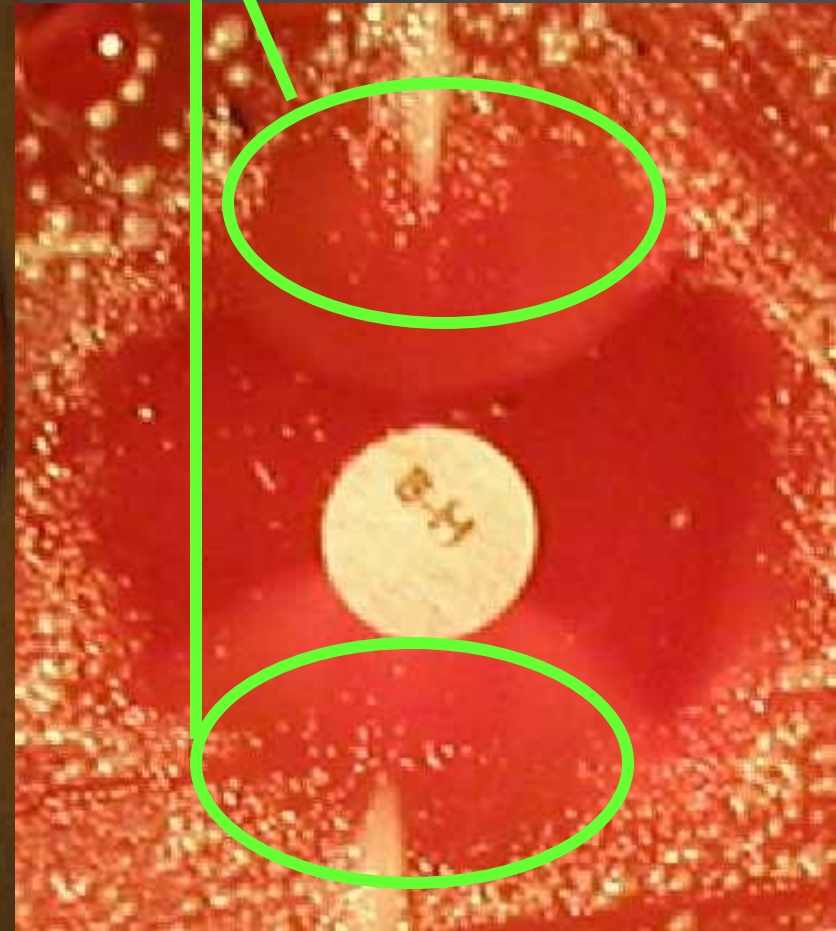
5 disk VK (vankomycin a kolistin pro meningokoky)

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

Kultivační výsledek výtěru z krku s běžnou flórou

Bacitracinový disk může být umístěn buďto na stafylokokovou čáku, nebo cca 1 cm od ní, používají se oba způsoby.

V těchto místech pátráme po hemofilech



Vysvětlivky k dalšímu textu

- **KA** – krevní agar
- **EA** – Endův agar; většinou lze místo něj použít alternativně také McConkeyho agar
- **KA+AMIK** – krevní agar s amikacinem, selektivní pro streptokoky a enterokoky
- **NaCl** – KA s 10 % NaCl, selektivní pro stafylokoky
- **B** – bujón
- **MCh** – močová chromogenní půda (pro identifikaci nejběžnějších močových patogenů)



Vyšetření sputa

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

Sputum – možné nálezy

- **Běžná flóra:** V DCD sice není, ale při průchodu HCD vždy dochází ke kontaminaci ústními streptokoky a neisseriemi
- **Patogeny:** pneumokoky, pyogenní streptokoky, hemofily (klasické pneumonie). Původci atypických pneumonií většinou nejsou kultivovatelní.
- Jedním z nejčastějších nálezů je ***Staphylococcus aureus***. Lékem volby by měl být oxacilin, ovšem to je generikum a ti parchanti z farmaceutických firem ho momentálně v p. o. formě nevyrábějí. Mohl by se tedy použít např. některý cefalosporin I. gen.

Praktická poznámka

- Malé, našedlé, skoro bezbarvé, s viridací, to jsou **ústní streptokoky**.
- Malé, nažloutlé, bez viridace, bez hemolýzy (nebo s nepatrně naznačenou hemolýzou), oxidáza pozitivní, to jsou **ústní neisserie**
- Pokud na misce vidíme ještě něco jiného, a zvláště pokud to „něco“ má výraznou hemolýzu, bude to asi **kýžený patogen**.

„Odečítání“ bakteriologie



A close-up photograph of a person's open mouth. A dental mirror is held by a hand on the right, reflecting the back of the tongue and the throat. A dental probe is held by a hand on the left, pointing towards the throat. The tongue is visible, and the throat area is the focus of the examination.

Výtěr z krku

biology.clc.uc.edu

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

Farynx – možné nálezy

- **Běžná flóra:** Ústní streptokoky a neisserie; hemofily (hlavně *H. parainfluenzae*), za normální se považuje i malé množství aureů, pneumokoků, meningokoků, moraxel apod. Další součásti běžné flóry (anaeroby, spirochety) se při běžné kultivaci neodhalí
- **Patogeny:** pyogenní streptokoky, arkanobakteria; často se nenajde nic a původ je virový (EB viry a jiné)
- Nejvýznamnějším patogenem je *Streptococcus pyogenes*. Lékem volby u nealergických pacientů je jednoznačně – ale to přece víte 😊

Výtěr z krku – běžná flóra
plus pyogenní streptokok



4B Zpracování a vyhodnocení vzorků z ran a vzorků moče

Výtěr z rány



OCT 13 2004

Výtěr z rány

Základní diagnostické schéma

- (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 negativity 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

- **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
- **V našem případě bychom mohli použít k léčbě například ciprofloxacin. Rozhodující je však správná lokální péče o ránu!**

Moč



Moč

Základní diagnostické schéma

- **Den 0:** pouze nasazení kultivace
- **Den 1:** výsledek primokultivace vzorku na KA a EA či MCh, expedice všech negativních, testování patogenů
- **Den 2:** expedice pozitivních, je-li dostatečná citlivost a uspokojivé bližší určení
- **Den 3:** expedice dalších pozitivních výsledků

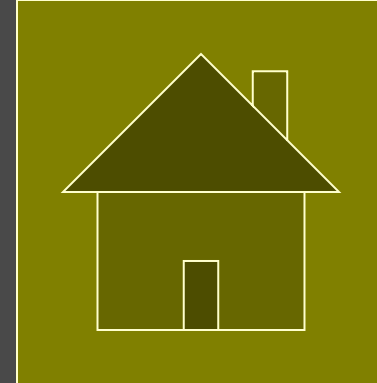
Moč

- **Běžná flóra** sice **není**, ale u starších osob je často přítomna bezpříznaková bakteriurie, kterou u těchto osob není nutno léčit
- Za **pravděpodobnou kontaminaci** (či náhodný nález) považujeme vše v množství do 10^4 / ml, vše v množství do 10^5 / ml při dvou různých bakteriích a úplně vše při třech a více bakteriích
- **Z patogenů** jsou nejběžnější enterobakterie, enterokoky, *S. agalactiae*, stafylokoky a další

Semikvantitativní zpracování moče

- Používá se kalibrovaná plastová klička – do oka kličky se zachytí vždy 1 μ l moče
- Tento mikrolitr se rozočkuje většinou na polovinuisky krevního agaru (vy to máte na celé misce)
- Dále se očkuje i na Endovu půdu nebo URlchrom, zde se však již hodnotí jen kvalitativně
- Samozřejmě, to, že určujeme kvantitu, nijak neznamená, že bychom se vykašlali na určování rodu a druhu patogena
- **U cystitid volíme zpravidla nitrofurantoin, případně ko-trimoxazol, je-li bakterie na ně citlivá**

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

6 Zaslání

výsledku

7 Interpretace

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

7 Interpretace

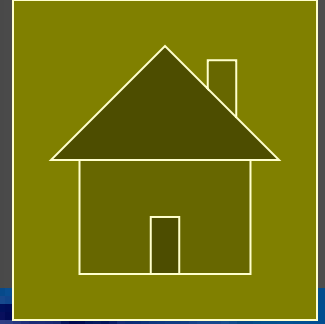
- **Definitivní interpretace nálezu je ovšem v rukou klinika.** Pouze on, nikoli mikrobiolog, totiž drží v rukou vedle mikrobiologického nálezu také biochemický, rentgenový, ultrazvukový, a především zná pacienta – vypáčil z něj anamnézu, vyšetřil jej, popřípadě (u obvodních lékařů) jej zná dlouhodobě.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

Výjev z laboratoře

www.medmicro.info



Konec



Běžná flóra +

BONUSOVÝ MATERIÁL

Normální mikroflóra a její význam

- Na různých místech lidského těla je přítomna tzv. **normální (běžná) flóra či mikroflóra**.
- Je tvořena **komenzálními či saprofytickými mikrobi**, které jsou hostiteli více či méně prospěšné:
 - kolonizací příslušné sliznice **brání tomu, aby byla osídlena patogeny**
 - podílejí se na **stavu mikroprostředí**, např. pH
 - ve střevě **likvidují nestravitelné zbytky**
 - mohou mít i **další pozitivní efekty** pro hostitele (např. tvorba vitamínů střevními bakteriemi)

Kde mikroflóra je a kde není

- **Mikroflóra není** ve tkáních, v parenchymu orgánů, v krvi, v mozku ani mozkomíšním moku. Zde je každý nalezený mikrob velmi pravděpodobně patogenem
- **Mikroflóra není** ani v některých dutých orgánech, např. v jícnu, v plicích, v močovém měchýři (kromě starých osob) či v děloze
- **Mikroflóra je** zejména v dutině ústní a hltanu, v tlustém (a zčásti i tenkém) střevě, v pochvě a v menším množství také na kůži

Mikroflóra v průběhu života člověka

- **Plod nemá žádnou běžnou flóru**, po narození zvolna začíná osidlování
- Během prvních měsíců a let života se **běžná mikroflóra vyvíjí** (zejména střevní v souvislosti se změnami potravy)
- **U žen** se mění vaginální mikroflóra v důsledku hormonů při **menarche**, dále při **začátku pohlavního života** a pak v **menopause**
- **U starších osob** dochází k dalším změnám (např. se často ustanoví „běžná flóra“ v močovém měchýři, dříve sterilním)

Mikroflóra jako ekosystém

- Kdysi lidé mysleli, že všechny škůdce úrody jednoduše zahubí například DDT. Ukázalo se ale, že takový **brutální zásah často nadělá víc škody než užitku**, zvláště když se použije nevhodným způsobem
- Podobně **složitý ekosystém je i třeba střevní mikroflóra**. I proto dnes na střevní infekce většinou nedoporučujeme antibiotika, protože systém „rozhodí“ často ještě víc.

Přehled běžné mikroflóry

Kůže, nos, boltec, zevní zvukovod, kožní adnexa	Stafylokoky (i zlaté), korynebakteria, kvasinky
Hltan a ústní dutina	Ústní streptokoky a neisserie Hemofily, malá množství pneumokoků, meningokoků, anaeroby, nepat. treponem.
tlusté (i tenké) střevo	Anaeroby, enterobakterie, enterokoky, <i>Entamoeba coli</i>
Vagina	Laktobacily, malá množství nejrůznějších mikrobů
Přechody (rty apod.)	Směs zástupců obou míst

Normální osídlení dýchacích cest

- **Nosní dutina** nemá specifickou flóru, přechází tam však mikroflóra z kůže (přední část) a hltanu (zadní část)
- **V hltanu** (stejně jako v ústní dutině) nacházíme ústní streptokoky, neisserie, nevirulentní kmeny hemofilů aj. Mnohé další tam jsou, ale většinou je nevykultivujeme
- **Plíce a dolní dýchací cesty** jsou normálně bez většího množství mikrobů
- **Na ostatních místech** (hrtan) jsou různé přechody (hrtan – jako v hltanu, ale méně)

Normální osídlení trávicích cest

- **Rty** znamenají přechod kožní a ústní flóry
- **V ústní dutině** (stejně jako v hltanu) nacházíme ústní streptokoky, neisserie, nevirulentní kmeny hemofilů aj. Mnohé další tam jsou, ale většinou je nevykultivujeme
- **Jícen a žaludek** jsou za normálních okolností bez většího množství mikrobů
- **V tenkém a zejména tlustém střevě** nacházíme zpravidla asi 1 kg anaerobů, dále enterobakterie, enterokoky, kvasinky, někdy i nepatogenní améby
- **Řiť** je opět místem přechodu střeva a kůže

Normální situace v ústní dutině

- Ústní dutina je i za normální situace velice **složitý ekosystém**, složený z různých druhů bakterií, usazených materiálů, lidských buněk a dalších složek
- Bakterie se v dutině ústní přitom nevyskytují v nějakém chaosu, ale v komplikovaném, **strukturovaném útvaru, zvaném biofilm**.
V daném případě jde o vícedruhový strukturovaný biofilm, ve kterém např. anaeroby jsou přítomny ve větší hloubce než aerobní bakterie

Močové cesty zdravého člověka

Ledviny – normálně bez mikrobů

Pánvičky ledvinné – normálně bez mikrobů

Močovody (uretery) – normálně bez mikrobů

Močový měchýř mladých a středně starých osob – normálně bez mikrobů

Močový měchýř seniorů – i za normálních okolností může být osídlen mikroflórou, která nečiní problémy a stává se „běžnou flórou“

Močová trubice – normálně bez mikrobů, část přilehlá k ústí však může být osídlena zvenčí

Normální stav pohlavních orgánů

- Za normálních poměrů nejsou mikroby
 - **U ženy** v děloze, vejcovodech, vaječnicích
 - **U muže** v prostatě, chámovodech, varlatech
- Specifickou normální flóru má **vagina**
(laktobacily, příměs různých aerobních i anaerobních mikrobů)
- **Vulva** tvoří přechod vaginální a kožní flóry
- U muže je specifický **předkožkový vak**,
vedle kožní flóry jsou tu i např.
nepatogenní mykobakteria apod.

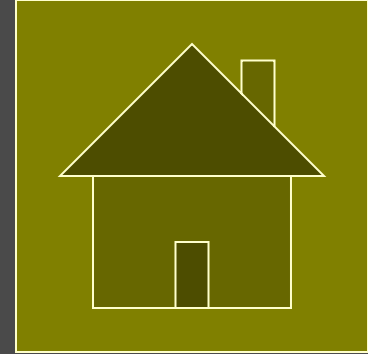
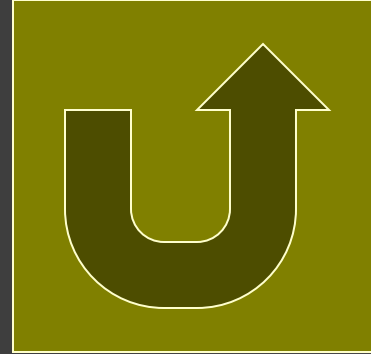
Normální osídlení kůže

- Přestože kůže je pro mikroby nejdostupnější, je její **osídlení mnohem chudší** než v případě např. úst, pochvy či tlustého střeva
- Mikrob, který chce žít na kůži, musí snášet **vyschnutí a vysoké koncentrace solí**
- **Na kůži se tedy normálně vyskytují**
 - koaguláza negativní druhy stafylokoků
 - **zlatý stafylokok** – malé množství je normální
 - **korynebakteria** a příbuzné G+ tyčinky
 - malá množství **kvasinek**

Péče o střevní mikrobiótu

- V rekonvalescenci průjmů, ale i např. **po celkové antimikrobiální terapii** (kde mohlo dojít k vybití části mikrobióty) je vhodné snažit se o **obnovu normálního stavu**
- Používají se **jogurty** (nesladké, netučné), **kyselé zelí**, různé preparáty (Hylac)
 - Některé obsahují substráty pro „dobré“ bakterie, to jsou **prebiotika**.
 - Některé obsahují přímo ty dobré bakterie, to jsou **probiotika**
 - Některé obsahují oboje, to jsou **symbiotika**

Péče o vaginální mikroflóru



- Také **vaginální ekosystém může být narušen** antimikrobiální léčbou či nějakým onemocněním
- Také zde doporučují „lidové receptury“ např. aplikaci jogurtu do pochvy
- Dnes ovšem lze spíše doporučit **prebiotické či probiotické vaginální čípky**
- Důležitá je také **výživa a úprava hormonálních hladin** (antikoncepce)