



KLINICKÁ MIKROBIOLOGIE- SHRNUTÍ

Klinická mikrobiologie

- Zajišťuje diagnostiku infekčních onemocnění vyvolaných bakteriemi, viry, parazity a mykotickými agens
- Stanovuje citlivost/rezistenci mikrobiálních agens k antimikrobiálním látkám
- Ve spolupráci s klinickými lékaři poskytuje konzultace k mikrobiologického nálezu a konzultace k antimikrobiální terapii

Preanalytická fáze

- Správný výsledek mikrobiologického vyšetření začíná
 - správným odběrem biologického materiálu
 - správným transportem do mikrobiologické laboratoře

Obecné zásady

- Správná volba vzorku
- Správný odběr
 - ze správného místa
 - ve správnou dobu
 - správným způsobem
 - do správných souprav
- Správné označení odběrové nádoby a žádanky
- Správné zasílání do laboratoře

Speciální požadavky

- Likvor
- Sputum
- BAL
- Výtěr z krku, nosu, nosohltanu, laryngeální výtěr
- Hnis, punktát
- Výtěry z ran a hnisavých lézí
- Výtěry z pochvy
- Stolice

Speciální požadavky

- Krev na hemokulturu
 - Doba odběru
 - Čas odběru
 - Místo odběru
 - Množství odebrané krve
 - Počet lahviček

Speciální požadavky

- Vzorky na mykologické vyšetření
 - slizniční a orgánové mykózy
 - povrchové mykózy (kožní šupiny, seškraby z nehtů, vlasy, chlupy)
- Vzorky na parazitologické vyšetření
 - průkaz střevních, krevních parazitů
 - poševní, uretrální sekret

Virologické vyšetření

- Nepřímý průkaz – průkaz protilátek
 - respirační infekce (chřipky, RS, Mycopl. pn.)
 - neuroinfekce (KE, HSV, varicella-zoster)
 - exantematické infekce (zarděnky spalničky, mononukleóza, HSV, varicella-zoster)
 - ostatní (hepatitidy A,B,C, CMV, EBV, parotitida, HIV)
- Přímý průkaz
 - antigenů
 - izolace viru
 - PCR

Speciální požadavky

- Transport materiálu
 - ideálně do 2 hodin po odběru
 - při pokojové teplotě
 - na tajícím ledu
-

Vyšetření biologického materiálu v laboratoři

- Kontrola a zavedení do systému
- Stanovení pravděpodobného původce infekce



Vyšetření biologického materiálu

- Mikroskopie
- Kultivace
- Průkaz antigenů, toxinů
- Průkaz metabolitů *Helicobacter pylorii* (ureáza)
- Průkaz nukleových kyselin (PCR)
- Průkaz protilátek (nepřímý průkaz)

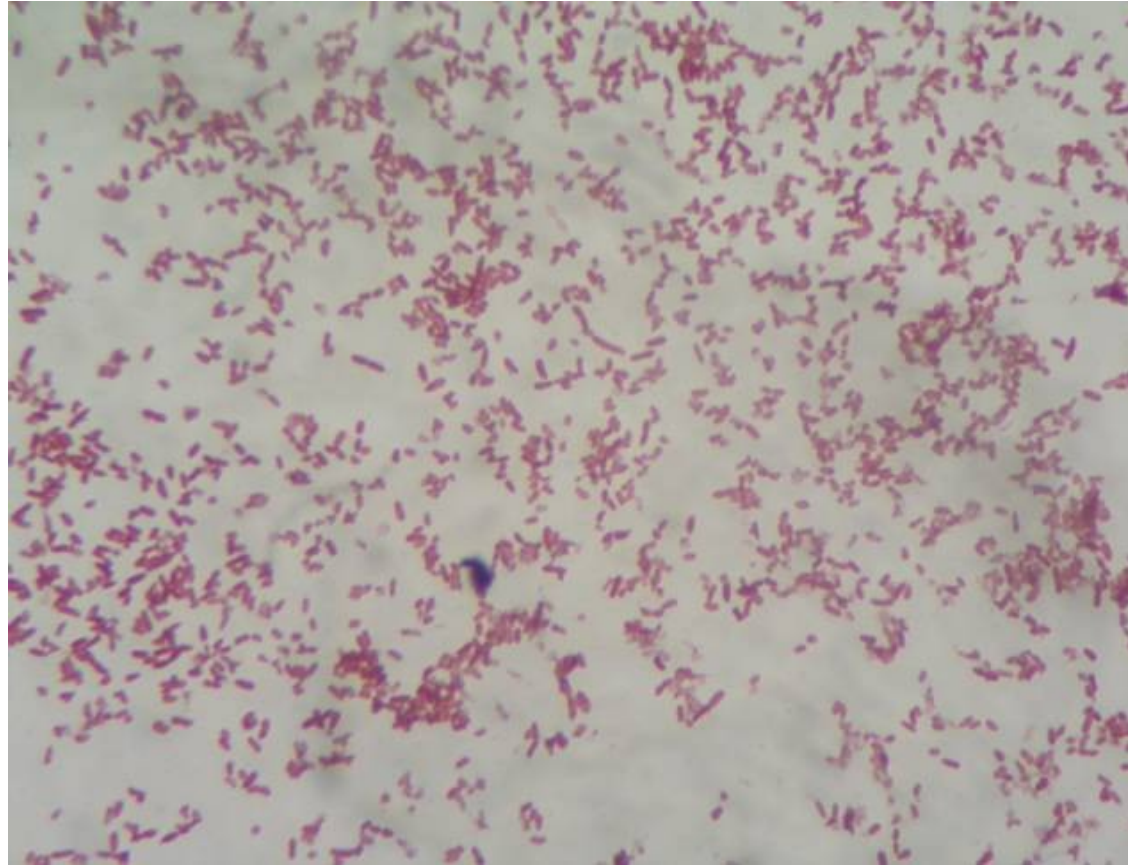
Mikroskopie

- ❖ Nativní preparát
 - Trichomonas vaginalis
- ❖ Barvený preparát
 - Barvení dle Grama
 - Barvení dle Giemsy
 - Barvení dle Ziehl- Nielsena
 - Barvení spor
 - Barvení pouzder
 - Fluorescenční barvení

Barvení podle Grama

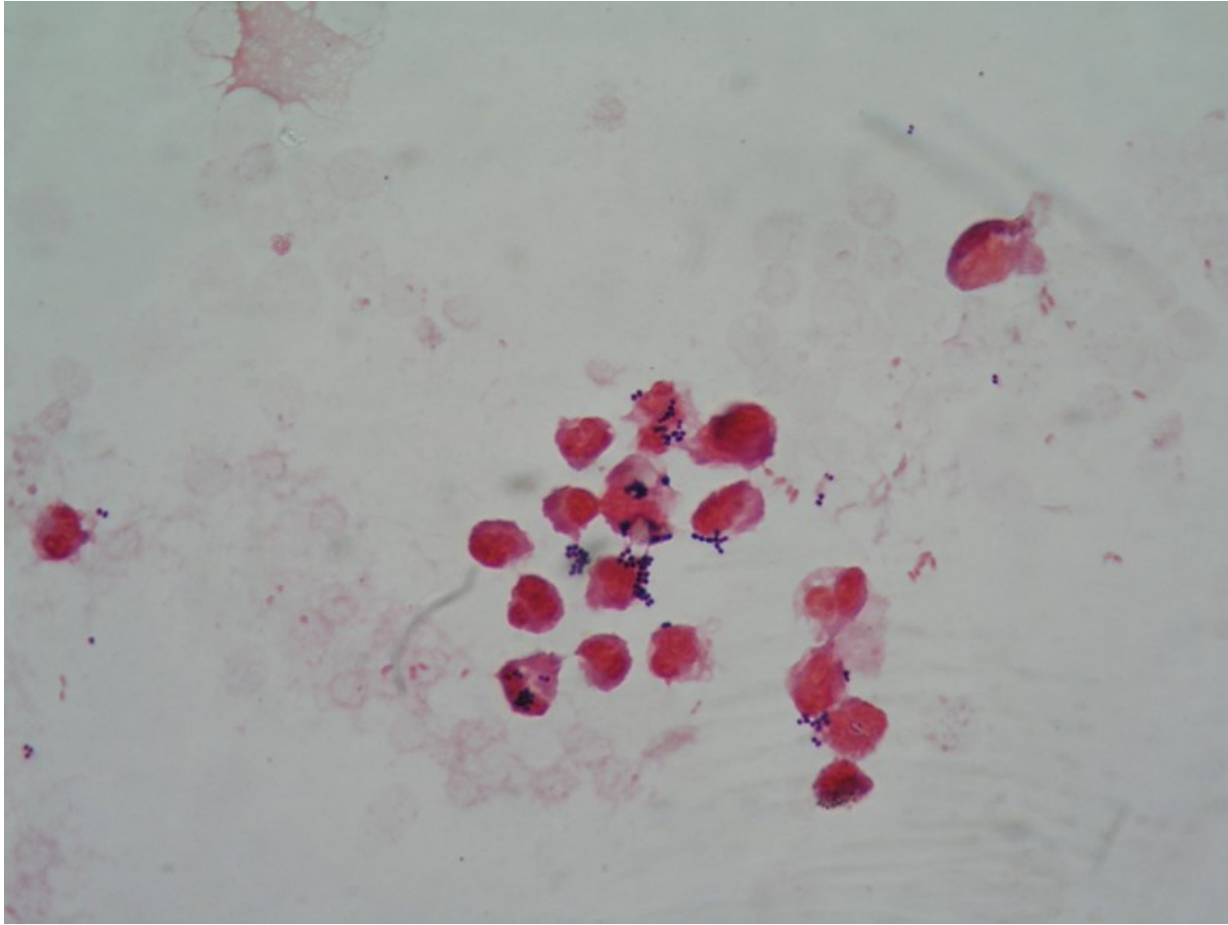
- Hans Christian Joachim Gram, 1884
- Dělí bakterie do dvou základních skupin
 - Grampozitivní G +, modrofialové
 - Gramnegativní G -, růžovočervené

Barvení podle Grama-Gramnegativní



Barvení podle Grama- význam

- Diagnostické barvení – základ klasifikace a taxonomie bakterií
- Možnost okamžité a racionální antibiotické terapie



Fluorescenční barvení

Pomocí fluoreskujícího barviva

- Imunofluorescence

- Na hledaný antigen se naváže protilátka označená fluoreskujícím barvivem


- Pozorování pomocí fluorescenčního mikroskopu

Fluorescenční barvení



Kultivační průkaz

- Základní mikrobiologický postup
- Cílem je získat mikroba z klinického materiálu v čisté kultuře
- Identifikovat ho
- Určit citlivost k antibiotikům

- 
-
- Kultivační půdy (tuhé, tekuté, diagnostické, selektivní, selektivně diagnostické...)
 - Očkování biologického materiálu
 - Diagnostická antibiotika
 - Kalibrované klíčky

Kultivační půdy

- ❖ Tekuté: masopeptonový bujon
- ❖ Tuhé:
 - Krevní agar
 - Čokoládový agar
 - Levinthalův agar
 - Mc Conkey agar (Endova půda)
 - Sabouraudův agar
 - Desoxycholát – citrátový agar
 - Chromagary

Podmínky kultivace

- Dostatečná vlhkost prostředí
- Optimální teplota - 37 °C (4 °C, 40 °C)
- Optimální pH půdy – 7,2 – 7,4
- Dostatek vhodných živin
- Vhodné plynné prostředí (aerobní, anaerobní, mikoraerofilní kultivace, zvýšená tenze CO₂)

Anaerostat



Identifikace bakterií

- Podle morfologie
- Podle růstových vlastností
- Hmotnostní spektrometrie (MALDI)
- Podle biochemických vlastností
 - Selektivní půdy
 - Komerční diagnostické soupravy
- Podle antigenní struktury
 - Latexová aglutinace

Úskalí dokonalé identifikace

- Stafylokoky koaguláza negativní a jejich různá jména
- Jiné- Finegoldia magna

Anaerobní kultivace:

Nález: Finegoldia magna

Stanovení kvalitativní citlivosti na antibiotika:

Augmentin, Unasyn.....C

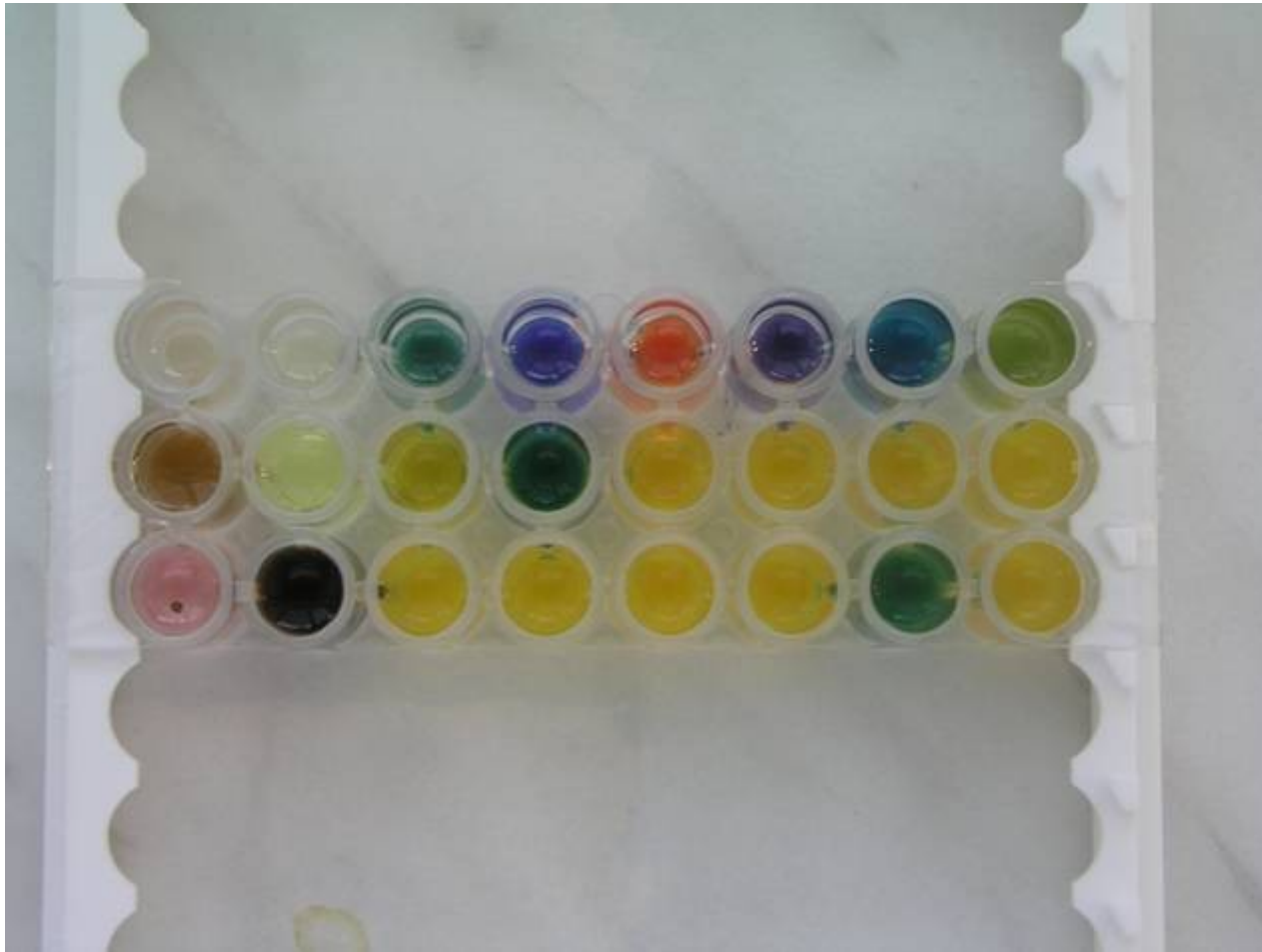
metronidazol.....C

clindamycin.....C

F.magna je grampozitivní anaerobní kok.

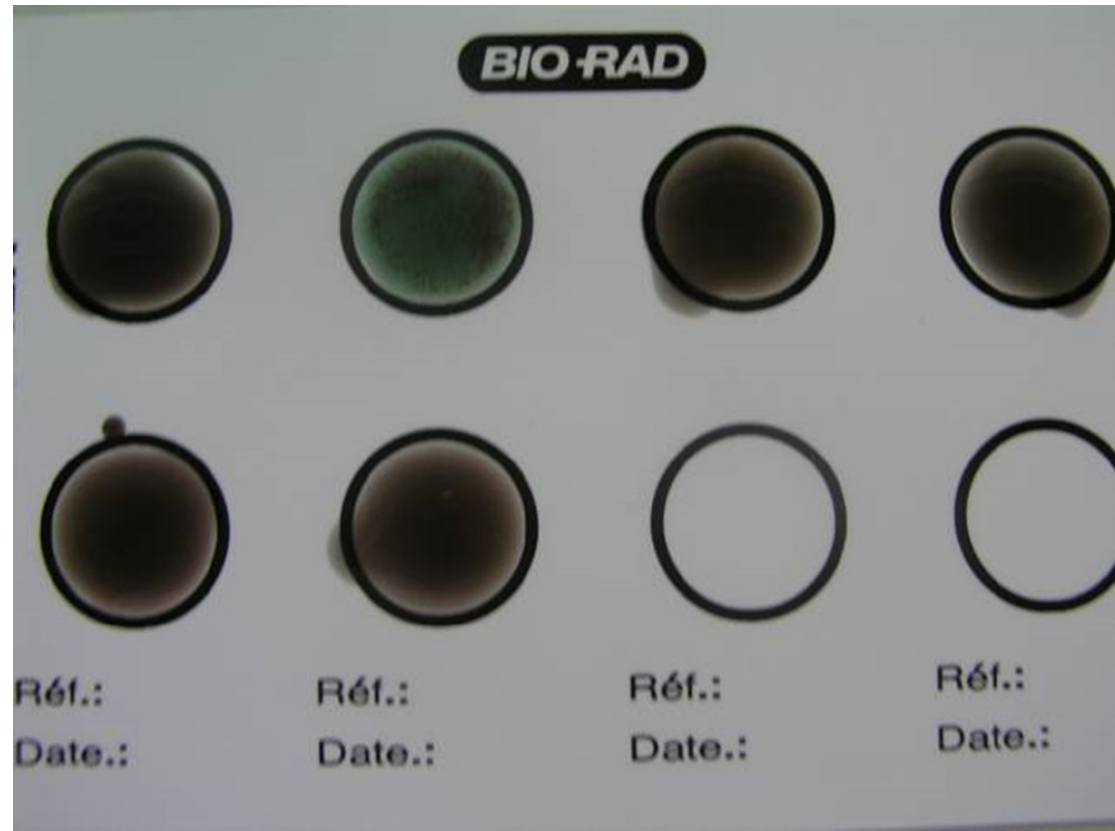
Kódy citlivosti: C=citlivý, R=rezistentní, X=výsledek sdělíme na požádání

Biochemická identifikace bakterií



Průkaz antigenů

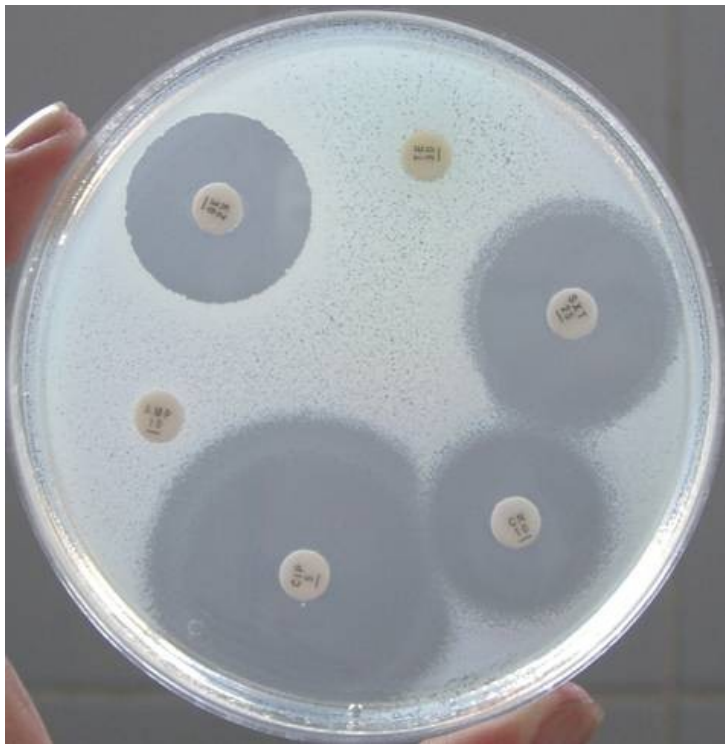
- Latexová aglutinace
- Rychlá vyšetřovací metoda



-
- Nález primárního patogena- většinou jednoznačná situace (*Neisseria gonorrhoeae*)
 - Nález oportunního patogena- nutná komunikace s klinikem!!
častější situace

Stanovení citlivosti k antibiotikům

- Disková difúzní metoda
- Stanovení hodnot MIC antibiotika vůči danému mikroorganismu
- Semikvantitativní metody (mykoplazmata, ureoplazmata)



Průkaz nukleových kyselin (PCR)

- Polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction)
- Možnost průkazu mikroba i při kultivační negativitě (meningitidy, infekce TEP)
- Průkaz nekultivovatelných nebo pomalu rostoucích agens
- Riziko kontaminace

Průkaz protilátek

- Průkaz odezvy makroorganismu na infekční agens
- ELISA, komplementfixační reakce, automaty
- Obtížně kultivovatelné bakterie (chlamydie, borélie)
- mykologie

- **Spolupráce mikrobiologa s klinikem a jejich vzájemná komunikace**

- informace o konkrétním pacientovi
- konzultace mikrobiologického nálezu
- konzultace antibiotické terapie

- **Spolupráce mikrobiologa s epidemiologem**

Septické stavy



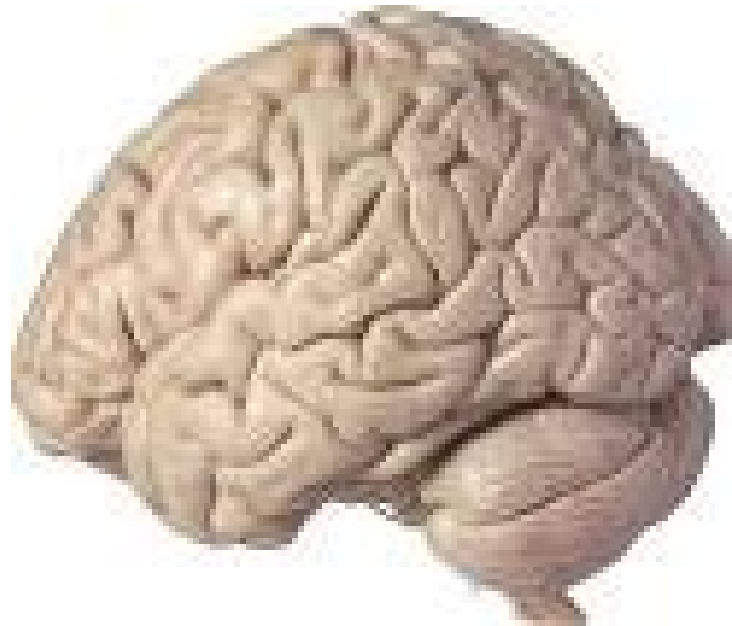
Sepse

- Primární – patogen jen v krevním řečišti – po i.v. aplikaci léčiv, drog
- Sekundární – v těle je primární ložisko a sekundárně se patogeny vyplaví do krevního oběhu
- Katetrové – původce pochází z kolonizace zavedeného cévního katetru

Původci sepse

- Ranné sepse – *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*
- Urosepse – *Escherichia coli*
- Intraabdominální sepse – enterobakterie, anaeroby
- Nosokomiální sepse – *Pseudomonas aeruginosa*, enterobakterie s produkcí beta-laktamáz, kvasinky, *Staphylococcus* koaguláza negativní

Infekce centrálního nervového systému



Infekce centrálního nervového systému

○ Zdroj

- Hematogenní – meningokoky
- Per continuitatem – pneumokoky, hemofily
- Podél nervů – virus herpes simplex, vztekliny
- Přímo – při poranění hlavy

Meningitidy

- Meningitidy aseptické – virové
 - Enteroviry, virus herpes – simplex, varicella-zoster, virus klíšťové menigoencefalitidy
- Meningitidy purulentní
 - *Streptococcus agalactiae*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Listeria monocytogenes*

Meningitidy

- Chronické meningitidy
 - *Mycobacterium tuberculosis* (bazilární meningitida),
 - *Cryptococcus neoformans*
 - *Listeria monocytogenes*

Mozkový absces



Mozkové abscesy

- Akutní – bakteriální
 - Smíšená aerobní a anaerobní flóra, *Staphylococcus aureus*, nokardie
- Chronické – bakteriální, mykotické, parazitární
 - *Mycobacterium tuberculosis*, *Nocardia asteroides*
 - *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus* spp.
 - Cysticerkosa (*Taenia solium*), echinokokosa

Respirační infekce



- Infekce nosu a nosohltanu
 - Rýma, zánět nosohltanu
 - Rhinoviry, koronaviry
 - *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*
- Nosičství
 - *Neisseria meningitidis*

Infekce dutiny ústní a mandlí



- Virové
 - Rhinoviry, koronaviry, adenoviry, EB virová tonsilitida, herpangína
- Bakteriální : angína
 - *Streptococcus pyogenes*,
Corynebacterium diphtheriae, anaerobní
Plautova-Vincentova
- Kvasinkové
 - soor

Infekce středního ucha a vedlejších nosních dutin

- Akutní zánět středního ucha a dutin
 - Respirační viry
 - bakteriální: *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Branhamella catharralis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Bacteroides spp.*, *Peptostreptococcus spp.*

Infekce středního ucha a vedlejších nosních dutin

- Chronické

- bakteriální: *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, peptostreptokoky

Infekce příklopky hrtanové

- Epiglottitis

- *Haemophilus influenzae* typ b

Infekce laryngu a trachey

- Virové
 - Viry influenzy, parainfluenzy, RS virus
- *Chlamydia pneumoniae*,
Mycoplasma pneumoniae
- Bakteriální
 - *Corynebacterium diphtheriae*, ostatní infekce sekundární po virech

Infekce bronchů

- Virové
 - Viry chřipky, adenoviry, RS virus
- Bakteriální
 - primární: *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, *Bordetella pertussis*
 - Sekundární: *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Branhamella catharralis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*

Infekce plic

○ Akutní zánět

- Chřipka A,B, RS virus
- *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*
- *Streptococcus pneumoniae*,
Haemophilus influenzae,
Staphylococcus aureus, *Branhamella catarrhalis*, *Klebsiella pneumoniae*

Infekce plic u oslabených jedinců

- Enterobakterie – *Klebsiella pneumoniae*
- *Legionella pneumophila*
- *Pneumocystis jirovecii*
- *Nocardia asteroides*
- *Aspergillus spp.*
- *Cytomegalovirus*

Ventilátorové pneumonie

○ Časné

- *Streptococcus pneumoniae*,
Haemophilus influenzae,
Staphylococcus aureus, *Branhamella*
catharralis

○ Pozdní

- *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas*
aeruginosa

Infekce ran

- Povrchové zranění – *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*
- Anaerobní traumatosisy – *Clostridium perfringens*, *Clostridium septicum*, *Clostridium tetani* (toxin)

Infekce operačních ran

- Infekce endogenní – z okolí rány, ze střeva:

Staphylococcus aureus, Streptococcus pyogenes, čeled' Enterobacteriaceae, Bacteroides sp.

Infekce endogenní (nozokomiální):

Klebsiella pneumoniae, Enterobacter sp., Pseudomonas aeruginosa

Infekce po kontaktu se zvířetem

- Pokousání - ústní mikroflóra zvířete
 - *Staphylococcus aureus*, *Pasteurella multocida*, *Capnocytophaga canimorsus*
 - Vzteklna
- Kontakt bez kousnutí (zoonózy)
 - *Francisella tularensis*,
Erysipelothrix rhusiopathiae,
Bartonella henselae

Osteomyelitidy

- Akutní: *Staphylococcus aureus*,
Streptococcus pyogenes,
Haemophilus influenzae, *Salmonella*
spp.
- Chronická: *Pseudomonas*
aeruginosa, enterobakterie,
Mycobacterium tuberculosis

Infekce kůže

○ Bakteriální

- Impetigo: *Staphylococcus aureus*,
Streptococcus pyogenes
- Folliculitis : *Staphylococcus aureus*
- Acne vulgaris: *Propionibacterium acne*
- Erysipel: *Streptococcus pyogenes*

Bakteriální infekce projevující se na kůži

- Produkce toxinů způsobujících vyrážky:
 - Spála – *Streptococcus pyogenes*
 - Syndrom toxického šoku – *Staphylococcus aureus*
- *Neisseria meningitidis*
diseminovaná intravaskulární koagulopatie
- Erytema chronicum migrans – *Borrelia spp.*

Virová onemocnění projevující se na kůži

- Exantematické virózy
 - Spalničky, zarděnky, erytema infectiosum (5.dětská nemoc, parvovirus B19), exantema subitum (HHV 6)
- Vesikulární exantém (puchýřky)
 - Herpesviry, poxviry
- Bradavice
 - Papillomaviry
- Petechie
 - Hemoragické horečky (Lassa, Ebola, u nás Hantaan)

Kožní mykosisy

- *Candida albicans* – intertrigo, vulvovaginitida, soor
- Dermatofyta – tinea pedis (*Trichophyton rubrum*)

Parazitární onemocnění kůže

- Svrab
- Pedikulóza – zavšivení
- Poštípání členovci

Infekční průjmy

○ Bakteriální

- Salmonely, shigely, kampylobaktery, yersinie
- Enterotoxická, enteroinvazivní enterohemoragická *Escherichia coli*
- Toxin *Clostridium difficile*
- *Aeromonas spp.*, *Plesiomonas shigelloides*

Infekční průjmy

○ Virové

- Rotaviry, adenoviry, kaliciviry (Norwalk), astroviry, noroviry

○ Parazitární

- *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica*, *Cryptosporidium parvum*

Otravy z potravin

- Bakterie vylučující toxiny
 - *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*,
Clostridium botulinum

Močové infekce

- *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus agalactiae*
- *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis*
- *Candida albicans*
- *Trichomonas vaginalis*

Sexuálně přenosné infekce

○ Bakteriální

- *Neisseria gonorrhoeae, Treponema pallidum, (Haemophilus ducrey, Calymmatobacterium granulomatis)*

○ *Chlamydia trachomatis*

○ Virové

- HIV, HSV 2, papilomaviry, molluscum contagiosum, *Hepadnavirus* (hepatitida B)

○ Parazitární

- *Trichomonas vaginalis*, ektoparazité

Infekce v souvislosti s těhotenstvím

- Virové infekce se závažným průběhem
 - Hepatitida E, chřipka
- Bakteriální infekce
 - *Streptococcus pyogenes* (porod či potrat, horečka omladnic),
Staphylococcus aureus, *Streptococcus agalactiae* (mastitidy)

Infekce plodu a novorozence

○ Vrozené

- Virové: zarděnky, cytomegalovirus, varicella-zoster, HIV
- Bakteriální: syfilis, listeriosa
- Parazitární: toxoplasmosa

Infekce plodu a novorozence

- Perinatální a neonatální
 - Bakteriální: *Neisseria gonorrhoeae*, *Streptococcus agalactiae*, *Listeria monocytogenes*
 - *Chlamydia trachomatis*
 - Virové: hepatitida B, HIV,

Nosokomiální infekce

- Nákazy získané v souvislosti s pobytem ve zdravotnickém zařízení
- Endogenní – infekce vlastní mikroflórou
- Exogenní – infekce zavlečená zvenčí (ruce personálu)

Nosokomiální infekce

○ Bakteriální

- Bakterie citlivé na ATB
- Bakterie rezistentní na ATB
 - Selektce rezistentních kmenů působením ATB na citlivé kmeny
 - MRSA, VRE, *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia*
 - Indukce tvorby betalaktamáz působením ATB
 - Širokospektré batalaktamázy, induktivní betalaktamázy

Nosokomiální infekce

- Virové
 - Hepatitidy, rotaviry, adenoviry
- Parazitární
 - Roupy, svrab

Kasuistika

- Pacient VCH, 1960
- Přijatý v březnu 2015 pro bolesti zad, crp 275, leukocytóza, febrílie
- Paraplegik po autonehodě, kovový materiál na rozhraní Th a L páteře



○ Bolesti zad:

- Ranná infekce
- Spondylodiscitida
- Infekce ledvin
- Infekce v dutině břišní (pankreas)
- Infekce v malé pánvi (gynekologické infekce)

Kasuistika

- Paraplegik po autonehodě, kovový materiál na rozhraní Th a L páteře
- Odběr biologického materiálu:
 - Hemokultivace
 - Moč



Kasuistika

- Diagnostikována spondylodiscitida v oblasti Th páteře
- Hemokultura?
- Empirická antibiotická terapie?

○ Původce?


Staphylococcus aureus představuje nejčastější mikrobiální agens vyvolávající spondylodiscitidu. Lze jej předpokládat zejména u spondylodiscitid anamnesticky spojených se stafylokokovou infekční endokarditidou, u pacientů s předchozí katérovou infekcí krevního řečiště, nebo infekcí kůže a měkkých tkání v anamnéze. Rizikovou skupinu pro spondylodiscitidu vyvolanou *Staphylococcus aureus* představují také nitrožilní narkomani.

U pacientů s touto předpokládanou etiologií je pro empirickou terapii doporučený **oxacilin v kombinaci s gentamicinem.**



○ Anamnéza:

- Infekční fokus (kariézní chrup, abscesy, IE...)
- Předchozí infekce (infekce spojené se zavedením CVK, uroinfekce, jiné infekce spojené a bakterémií...)

- 
-
- Anamnéza:
 - 11-12/2014 hospitalizován pro absces v ledvině
 - Nefrektomie
 - Revize pro krvácení do lůžka po ledvině
 - 11/2014 pozitivní hemokultura s nálezem *Klebsiella pneumoniae* s ESBL produkcí

Kasuistika

- Vstupně nasazený potencovaný aminopenicilin (Augmentin)
- Pro vysokou suspekci na klebsielovou etiologii spondylodiscitidy doporučena terapie meropenemem
- Monoterapie- solitární ledvina s horší funkcí, kreatinin 370 $\mu\text{mol/l}$, alergie na ciprofloxacin

Kasuistika

- Kultivace: půdy, inokulum, antibiotické disky
- Atmosféra, doba kultivace
- Hodnocení: identifikace mikroorganismu a stanovení citlivosti

Kasuistika

- Pozitivní hemokultura s nálezem *Klebsiella pneumoniae* s ESBL produkcí
- Ponechána terapie meropenem + přidáný amikacin v redukováných dávkách
- Pokles hodnot crp i leu, stabilizace stavu

Kasuistika

- Délka terapie?
- Perorální pokračování terapie?
- Ertapenem? (OPAT- zatím ne v ČR)
- P.o. tetracyklin?

Tetracyclines	MIC breakpoint (mg/L)		Disk content (µg)	Zone diameter breakpoint (mm)		Notes Numbers for comments on MIC breakpoints Letters for comments on disk diffusion
	S ≤	R >		S ≥	R <	
Doxycycline	-	-		-	-	1. Tigecycline has poor activity against <i>Morganella</i> spp., <i>Proteus</i> spp. and <i>Providencia</i> spp. 2. For tigecycline broth microdilution MIC determination, the medium must be pre-enriched in selenite F broth.
Minocycline	-	-		-	-	
Tetracycline	-	-		-	-	
Tigecycline ¹	1 ²	2 ²	15	18 ^A	15 ^A	

A. Zone diameter breakpoints validated for *E. coli* only. For other Enterobacteriaceae

Kasuistika

- Hospitalizace pokračuje.....



Sestrol! Skočte na internet, otevřete CHIRURGIE.COM,
sjed'te dolů a klikněte na ikonu "Jste totálně v prdeli?"

Kasuistika


- Opakovaná antibiotická konzultace
- Pacient s crp opět 270, zhoršení stavu
- Klindamicin v terapii osteomyelitidy v kombinaci s amikacinem
- Po CDI (*Clostridium difficile*)
- *Kl.pneumoniae* ESBL ze sputa
- MRSA z hrudních drénů
- Polyrezistentní *Pseudomonas aeruginosa* z moči

Kasuistika

- Původce spondylodicitidy zřejmě ne *S.aureus*, tedy zbytečný klindamycin
- Riziko clostridiové kolitidy
- Amikacin není vhodný v monoterapii plicních infekcí
- Amikacin není vhodný v monoterapii stafylokokových infekcí

Kasuistika

- Opět doporučený do terapie meropenem
- Výhled pacienta?

- 
-
- Klinická mikrobiologie – spolupráce mikrobiologa s klinickým lékařem
 - Na konci/ na začátku každého mikrobiologického vyšetření je nemocný člověk

Děkuji za pozornost

