

Téma 11A Zásady odběru a transportu materiálu k mikrobiologickému vyšetření, průvodky

11A.1 Obecné zásady odběru a transportu infekčního materiálu

Při odběru a transportu infekčního materiálu je potřeba dbát určitých pravidel, aby vyšetření mělo co největší smysl.

11A.1.1 Indikace mikrobiologického vyšetření.

V některých případech si musí klinik ujasnit nejen **zda** se rozhodne pro vyšetření, ale také **pro jaké konkrétní vyšetření**. To není jednoduché, v praxi se řada vyšetření provádí zbytečně, a naopak spousta vyšetření, která by měla být provedena, provedena nejsou, anebo jsou provedena chybně. Vyšetření by mělo mít nějaký konkrétní smysl.

11A.1.2 Odběr vzorku

Problém má několik částí:

11A.1.2.1 Volba vhodného vzorku

Příklady:

- u infekcí DCD není vhodný výtěr z krku, daleko lepší je vzorek sputa (ne sliny)
- nevhodný je roztok borové vody u výplachu dutin, neumožňuje přežití patogenů

11A.1.2.2 Správné načasování:

- odebrat vzorek před zahájením antibiotické léčby
- u serologických vyšetření je nutno provést nejméně dva odběry, druhý za dva až tři týdny
- u některých parazitóz je vhodné načasování prodiskutovat s mikrobiologem

11A.1.2.3 Správné provedení odběru

Tady bývá často zakopaný pes neúspěchu vyšetření – například

- jestliže se odebere moč nesterilně, zachytí se místo patogenů kontaminanta
- jestliže je odebrán výtěr z kořene jazyka namísto z mandlí, je výsledek značně zkreslený.

11A.1.3 Vyplnění průvodky.

Správné vyplnění průvodky je uvedeno ve zvláštní kapitole.

11A.1.4 Zaslání materiálu do laboratoře

- materiál je vždy třeba dopravit do laboratoře **co nejdříve**
- některé materiály mají zvláštní zásady zpracování

11A.1.5 Vlastní zpracování materiálu v laboratoři

I tuto fázi může klinické pracoviště ovlivnit, např.:

- dohodnout s mikrobiologem některé **detaily zpracování**
- telefonicky zjistit **předběžné výsledky**

11A.1.6 Zaslání výsledku

- zorganizovat tak, aby **nedocházelo ke zbytečným prodlevám**
- dnes zpravidla možnost využít **zasílání vzorků**

11A.1.7 Interpretace výsledku a použití při terapii

- laboratoř zpravidla odfiltruje zcela **evidentní kontaminanty** z prostředí a náhodné nálezy

- v méně jednoznačných případech ovšem v každém případě **konečné rozhodnutí leží na klinickém pracovišti**

11A.2 Přehled základních odběrových souprav a nádobek

Pro **nepřímý průkaz** používáme prakticky vždy zkumavku na sérum, neboť vzorkem je v tomto případě vždy srážlivá krev.

Pro **přímý průkaz** naopak můžeme použít nejrůznější typy odběrů. Zpravidla se jedná buďto o různé typy odběrových souprav („výtěrovek“) pro výtěry a stěry, nebo o různé nádobky, ve kterých se posílají tekuté a kusové materiály (moč, hnis, exsudát, mozkomíšni mok apod.)

11A.2.1 Zásady pro použití odběrových souprav („výtěrovek“)

(v případě výtěrů a stěrů)

- **suchý tampon je zpravidla nevhodný**, s výjimkou některých průkazů virových (případně chlamydiových) antigenů, popř. PCR (ale i tam se prosazují speciální transportní média)
- používá se **transportních půd**, univerzální (pro bakteriologii) je půda Amiesova.
- pro **mykologii** se dá také použít Amiesova půda, případně zvláštní souprava FungiQuick; zvláštní soupravy se používají také u **izolace virů a chlamydií**
- u **poševních a uretrálních výtěrů** je nejlepší kombinace Amies + C. A. T., kde Amies je na bakterie a C. A. T. na kvasinky a trichomonády

11A.2.2 Zásady pro použití odběrových nádobek

(v případě tekutých a kusových materiálů)

- ve většině případů **nezáleží na typu nádobky**, ale jen na tom, aby nádobka byla sterilní
- je ovšem nutno respektovat požadavek případný požadavek na označení z důvodu usnadnění třídění vzorků
- nesterilní nádobky jsou přípustné jen u parazitologického vyšetření stolice
- u materiálů, kde je nutné též **anaerobní vyšetření**, je ideální zaslání **přímo v injekční stříkačce bez vzduchu** s jehlou nahrazenou speciálním uzávěrem
- u **hemokultur** (kultivace vzorku krve) se dnes používají speciální transportně-kultivační lahvičky pro automatickou kultivaci; lze je použít i pro některá další vyšetření
- u **dermatomykóz** (kožních plísňových onemocnění) se zasílají nehty, vlasy, šupiny apod.
- u **izolace virů** nutno nádobku vložit do systému udržujícího teplotu kolem 0 °C

11A.2.3 Jednotlivé typy odběrových souprav a nádobek

Souprava s bakteriologickou transportní půdou (nejčastěji Amiesovou) je základem všeho

Suchý tampon jen výjimečně: PCR nebo některé průkazy antigenu, kde nepotřebujeme živého patogena, ale jen jeho antigen či DNA, a transportní půda by byla spíše na škodu.

FungiQuick je souprava na vyšetření kvasinek. Většinou ale kvasinky vyrostou i z Amiesovy půdy.

Soupravy pro viry a pro chlamydie se používají výjimečně.

C. A. T. je souprava pouze pro gynekologické (popř. andrologické) vyšetření.

Zkumavky mohou mít různé rozměry a označení uzávěrů. Širší samostojací zkumavce říkáme **sputovka**, ale zdaleka nemusí sloužit jen k zaslání sputa.

Hemokultivační nádobka dnes obsahuje nejen protisrážlivou látku, ale i transportně-kultivační médium. Slouží pro automatickou kultivaci krví. Odběrové nádobky podobné hemokultivačním, rovněž sloužící pro automatickou kultivaci, se používají také u **vyšetření na tuberkulózu**.

11A.2.4 Jiné typy odběrů než „výtěrovky“ a odběrové nádobky

V některých případech se doporučuje přímo v ordinaci **nátěr na podložní sklíčko** a to poslat.

V kožním lékařství se používají **otisky přímo na kultivační půdu**, která je pro tento účel nalita až po okraj Petriho misky (zpravidla se používá menších Petriho misek). Jiný typ otisků, přes sterilní čtvereček filtračního papíru, se používá v chirurgii. – **Urikult** je zvláštním způsobem zasílání moče.

11A.3 Správně vyplněná průvodka (žádanka) a její význam

11A.3.1 Osobní údaje

Precizní vyplnění **osobních údajů** (jméno, číslo pojištěnce, číslo odesílajícího zařízení, pojišťovna aj.) je velmi důležité. V případě chyb může dojít nejen ke zpoždění platby za vyšetření, ale může se také stát, že výsledek je omylem zaslán na jiné oddělení nebo přiřazen k jinému pacientovi.

11A.3.2 Přesný popis materiálu a požadovaného vyšetření

11A.3.2.1 Příklady častých chyb:

- **označeno pouze „výtěr“**, aniž by bylo zřejmé, zda se jedná o výtěr z krku, pochvy či odjinud; přitom v laboratoři se každý typ materiálu zpracovává poněkud odlišně
- **ani označení „stěr z rány“ nestačí** (je rozdíl, jde-li o ránu operační, traumatickou, zhnisanou, zda je lokalizována na břiše, na končetině či třeba perianálně).
- u „katetrizované moče“ rozlišit **katetrizaci kvůli odběru** (citlivější než moč běžně odebraná) od **moče z permanentního katetru** (naopak vyšší pravděpodobnost kontaminace)
- není uvedeno, zda je požadováno např. **anaerobní vyšetření** apod.

11A.3.3 Diagnóza

Naprostě nezbytné je vyplnění skutečné diagnózy-

11A.3.4 Další údaje

- uvést, zda jde o **akutní či déletrvající stav či kontrolu po léčbě**
- upozornit na **komplikovaný zdravotní stav pacienta**
- uvést **stávající nebo uvažovanou antibiotickou terapii**, případně i alergii na antibiotika
- **cestovatelská anamnéza** a **pracovní anamnéza**: práce v zemědělství, v lese aj.
- případně další důležité informace

V případě mimořádných vzorků nebo jakýchkoli pochyb je vždy dobré upozornit laboratoř i telefonicky

11A.4 Další osudy odebraného vzorku

Odesláním vzorku se žádankou do laboratoře a jeho přijetím laboratoří končí takzvaná **preanalytická fáze** vyšetření. Poté následuje vlastní analýza vzorku v laboratoři.

Po vyhodnocení vzorku je výsledek vyšetření odeslán pracovišti, které vzorek odebralo. Tím začíná **postanalytická fáze**, která je také velmi důležitá a spočívá především ve správné interpretaci výsledku v kontextu všech ostatních nálezů.

Téma 11B Mikrobiální osídlení ústní dutiny, ekologie dutiny ústní

11B.1 Mikrobiom dutiny ústní

Mikrobiom dutiny ústní tvoří společně s mikrobiomem střeva a mikrobiomem ženské pochvy jedno ze tří nejrozsáhlejších mikrobiálních společenství v lidském těle. Zahrnuje více než 700 rodů mikroorganismů, z nichž některé dosud nebyly popsány a klasifikovány.

Mikrobiom dutiny ústní se skládá ze **stálé složky**, kterou představují komenzálové (tj. bakterie, které se s námi dělí o naše zdroje živin), a ze **složky přechodné**, což jsou bakterie, které se do ústní dutiny dostávají například s potravou zvenčí.

Mikroflóru ústní dutiny je nutno vnímat jako **ekologický systém** se vším všudy. Při pochopení jeho fungování je mimo jiné důležité vzít v úvahu, že bakterie (a další organismy, například kvasinky) při životě v ústní dutině nevykazují stejné vlastnosti jako když je pěstujeme na umělých kultivačních půdách. Zásadní je v této souvislosti tvorba biofilmu.

Mikrobiom ústní dutiny má významný vliv na **její zdraví** – poruchy tohoto ekosystému ovlivňují jak zubní kaz, tak také gingivitidu a parodontitidu, tedy zánět dásně a závěsného aparátu zubu, a případně i další onemocnění v oblasti ústní dutiny (záněty měkkých tkání v okolí úst, záněty slinných žláz a podobně). Ústní mikroby ale ovlivňují také **celkové zdraví organismu**; jak bude uvedeno dále, mají vliv na řadu celkových onemocnění.

11B.1.1 Mikrobiom dásňového žlábků (sulcus gingivalis)

Bakterie dásňového žlábků hrají klíčovou roli při vzniku a vývoji onemocnění závěsného aparátu zubů. Přestože prostředí anatomicky souvisí s ústní dutinou, neproniká do něj kyslík, což umožňuje výskyt řady druhů anaerobních bakterií. Žlábek je omýván tzv. sulkární tekutinou, která dodává bakteriím sulku příslušné živiny.

11B.1.1.1 Anaerobní bakterie gingiválního sulku

V gingiválním sulku mají velký význam anaerobní bakterie. Je ovšem třeba říci, že některé z nich ve skutečnosti nejsou pravé anaeroby. To platí i o **vláknitých grampozitivních mikroaerofilních bakteriích rodu *Actinomyces*** – *A. gerencseriae*, *A. georgiae*. Mikrobiologové je ale často po praktické stránce za anaeroby považují s ohledem na to, že jejich potřeba kyslíku je malá a dobře rostou v nedokonalé anaerobióze, kterou laboratoře zpravidla poskytují (vizte též kapitulu 3.5.2). Časté jsou také **gramnegativní anaerobní tyčinky**. Aktinomycety často doprovází (a podle toho se i jmenuje) bakterie s dlouhým názvem *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Dále nacházíme bakterie rodů *Prevotella* a *Porphyromonas* (zejména *Porphyromonas gingivalis* a *P. endodontalis*), významná je také *Tannerella forsythia*. Vřetenovitý tvar mají fusobakteria, například *Fusobacterium nucleatum*. Ze **spirochet** se vyskytuje zejména *Treponema denticola*, ale také další druhy, jako je *T. vincentii*, *T. pectinovarium* či *T. socranskii*.

11B.1.1.2 Aerobní bakterie gingiválního sulku

Z bakterií, které jsou aerobní (přesněji fakultativně anaerobní) se v gingiválním sulku vyskytují především streptokoky. Nejčastěji jde o streptokoky s viridací (neboli alfa-hemolýzou). Ty lze dále rozdělit na jednotlivé skupiny.

Skupina *Streptococcus mutans*. Z této skupiny bývá izolován nejčastěji samotný *S. mutans*, méně často *S. sobrinus*, vzácně *S. cricetus* a *S. rattus*. Ze sacharózy tyto streptokoky tvoří lepkavé glukany a fruktany, rychle tvoří kyseliny ze sacharidů.

Skupina *Streptococcus salivarius* zahrnuje druhy *S. salivarius*, *S. vestibularis* – ve slinách a na povrchu jazyka. Sacharózu metabolizuje na fruktan levan, na půdách s tímto cukrem roste v mukózních koloniích, může vyvolat endokarditidu.

Skupina *S. mitis/S. sanguinis* představuje streptokoky druhů *S. mitis*, *S. oralis* a *S. peroris* – všechny se vyskytují na sliznici i v zubním plaku. Do této skupiny patří také *S. sanguinis* a *S. gordonii* –

najdeme je na jazyku, na bukalní sliznici a v zubním plaku. *S. sanguinis* dovede štěpit sekreční IgA. Většina druhů této skupiny se může podílet na vzniku subakutní bakteriální endokarditidy (loudavá sepe – sepsis lenta).

Skupina *S. anginosus* se vyznačuje růstem v drobných koloniích. Patří do ní zejména *S. anginosus* (v britské literatuře *S. milleri*), *S. constellatus* se dvěma poddruhy, *S. c. constellatus* a *S. c. pharyngis*, a *S. intermedius*. Kromě nosohltanu se nalézají zejména v gingiválních sulcích. Působí dentoalveolární a endodontické infekce.

11B.2 Zubní plak

Zubní plak je typickým příkladem **mikrobiálního biofilmu**. Je to přilnavá mikrobiální vrstva na povrchu zubu. Je tvořena bakteriemi (živými i mrtvými), jejich produkty (zejména polysacharidovými hmotami) i hostitelskými složkami (ze slin). Zubní plak se nedá opláchnout, **odstranit jej lze pouze mechanicky** (praktickým dopadem je skutečnost, že při čištění zubů je podstatně důležitější mechanické působení kartáčku než složení zubní pasty, popřípadě ústní vody). Složení plaku závisí na jeho stáří a lokalizaci. Podle lokalizace se rozlišuje **supragingivální** a **subgingivální plak**.

11B.1.1 Subgingivální plak

Existují dva druhy subgingiválního plaku – adherentní a neadherentní. **Adherentní plak** nasedá na kořen zubu, je to vlastně obdoba plaku supragingiválního. Obsahuje převážně grampozitivní tyčinky a vlákna (aktinomycety) a také grampozitivní koky. **Neadherentní plak** se vyskytuje mezi adherentním plakem a povrchem měkké tkáně dásně. Jeho typickou složkou jsou gramnegativní anaerobní bakterie.

11B.1.2 Mikroorganismy v zubním plaku

V supra- i subgingiválním plaku je nejčastěji zastoupeným rodem *Actinomyces* sp., tedy vláknitá, částečně acidorezistentní mikroaerofilní bakterie. Přesto existují rozdíly mezi oběma typy plaku:

Supragingivální plak obsahuje významně vyšší množství některých druhů aktinomycet, neisserií, streptokoků, celkově bakterií takzvaného „zeleného“ (green) a „fialového“ (purple) komplexu.

Subgingivální plak naproti tomu obsahuje významně vyšší množství gramnegativních anaerobních tyčinek rodu *Prevotella* a především bakterií druhů *Tannerella forsythia* a *Porphyromonas gingivalis*, což jsou bakterie „červeného“ (red) a „oranžového“ (orange) komplexu se vztahem k paradontitidě. V neadherentním plaku se ovšem vyskytují i u zdravých osob – záleží na množství a vzájemných poměrech k jiným bakteriím.

Periodontální patogeny jsou ovšem někdy přítomny jen v supragingiválním plaku. Supragingivální plak tedy funguje jako rezervoár infekce nebo reinfekce subgingiválního prostoru

11B.1.3 Vývoj zubního plaku

11B.1.3.1 Vznik a zrání zubního plaku

Vývoj zubního plaku začíná vytvořením takzvané **pelikuly** (anglicky acquired pellicle). Je to tenká (0,5 až 1 μ m) vrstvička, vytvářející se na očištěném povrchu zubů během několika minut až hodin. Tvoří ji glykoproteiny, které jsou adsorbované ze slin. Působí zprvu jako ochranná vrstva, která chrání sklovinu před vlivem volných kyselin, postupně je ale **osídlována mikroorganismy**. Dochází k **adhezi** bakterií, zejména grampozitivních koků a různých tyčinek. Následně se tyto bakterie shlukují – dochází k jejich **agregaci** a je produkována hlavní složka mezibuněčné matrix, kterou jsou **polysacharidy**. Postupně se do plaku zapojují další bakterie. Zrání plaku **urychluje sacharóza**, ale je možné i bez ní – streptokoky, které jsou v plaku zapojené, totiž samy produkují polysacharidy i v období, kdy nemají přísun sacharidů zvenčí. Ve spodních vrstvách mezitím dochází k **mineralizaci plaku**. Tvoří se **zubní kámen**, který obsahuje 80 % minerálů. Vlivem bakteriálního metabolismu se ale zároveň snižuje pH (vznikají kyseliny mléčná, propionová a různé další). Pokud pH poklesne z původní hodnoty kolem 6,5 na hodnotu 5,5 a

méně, začne docházet k demineralizaci skloviny, což je proces, který může postupně vést ke vzniku **zubního kazu** (jak o tom bude řeč dále).

Subgingivální kámen (tzv. konkrement) obsahuje gramnegativní mikroorganismy. Je porézní.

Jeho porozita je dána tím, že vláknité bakterie přiléhají palisádovitě k povrchu zubu a dochází k ukládání mikrobiálních složek působících toxicky na tkáň paradontu.

11B.1.3.2 Druhé změny v zubním plaku v průběhu času

Do 24 hodin v plaku převládají **streptokoky**, a to především ze skupin *mutans*, *sanguis* a *mitis*

Během prvních dnů přibývá **grampozitivních tyčinek** a **vláknitých mikroorganismů** – laktobacily a aktinomyceety

Za týden nalezneme **sloupcovité mikrokolonie koků**, na něž při povrchu plaku nasedají tyčinky až vlákna

Za tři týdny se v plaku objevuje **převaha vláknitých mikrobů**, na povrchu nalézáme útvary vzhledu kukuřičných klasů, kde je centrální vlákno (grampozitivní anaerobní nespíralující tyčinky, například *Eubacterium yurii*) obklopeno grampozitivními koky.

V jedné studii (Al-Ahmad, J Med Microbiol, 2007) bylo zjištěno, že tloušťka biofilmu stoupá z asi 15 µm po jednom dni až na asi padesát µm po týdnu. Přitom podíl streptokoků byl zásadní v jednodenním plaku, po 7 dnech jeho podíl klesal. Podíl *Fusobacterium nucleatum* klesal po 2 dnech, naopak po sedmi dnech začal stoupat. Během prvního týdne klesá také podíl aktinomyceet.

11B.1.4 Plak na zubních náhradách

Plak na zubních náhradách má složení odlišné oproti plaku na zubech, navíc je toto složení poměrně kolísavé.

V oblastech dotýkajících se sliznice převládají i tady **streptokoky** skupiny *mutans* a *sanguinis*, častým nálezem jsou ale také **kvasinky** rodu *Candida*.

Z **anaerobních bakterií** nalézáme nejčastěji grampozitivní tyčinky včetně vláknité bakterie *Actinomyces israelii* a *veillonely*.

Poměrně často se objevují také **stafylokoky**, hlavně *Staphylococcus aureus*.

11B.1.5 Zubní plak v dětství

Děti před prořezáním prvních mléčných zubů zubní plak v pravém slova smyslu nemají. Je to dáno tím, že streptokoky, které mají při jeho vzniku zásadní význam, potřebují ke svému dlouhodobému usídlení povrch, která je pevný a na kterém neprobíhá tzv. deskvamace (odlupování povrchových vrstev epitelu). To dásňová sliznice neumožňuje. Ke kolonizaci pak dochází zpravidla od matky. Je tedy důležité, jakou mikroflórou je osídlena ústní dutina matky.