

Odběr a transport biologického materiálu, vyšetřovací metody v bakteriologii

Martin Vrba
OKMI FN Brno

Specifika odběrů pro bakteriologická vyšetření

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

Odběr biologického materiálu

- Ze správného místa – např. z okraje rány, z místa akutně probíhajícího zánětu apod.
- Ve správnou dobu – např. hemokultury při třesavce, před podáním antibiotik
- Opakovaně – zvýší se pravděpodobnost záchytu infekčního agens
- Zabránění kontaminace

Odběr biologického materiálu

- Odběry do komerčních odběrových souprav
- Pro různé materiály různé odběrové soupravy
- Správná identifikace materiálu

Obecné zásady transportu

- Co nejrychleji po odběru do laboratoře
 - Stěry na suchém tampónu a moče do 2 hodin po odběru

Uchování materiálu

- **Pokožková teplota:**
 - Stěry a výtěry v transportní půdě
 - Hemokultury
 - Likvory
 - Hnisy a punktáty
- **Chladničková teplota (4-8 C):**
 - Moč
 - Stolice na průkaz toxinu *C.difficile*
 - Krev na sérologická vyšetření

Stěry a výtěry

- Výtěr z krku, nosu, ucha, oka, z rány, z kůže, z konečníku, z uretry, z pochvy atd.
- **Sterilní vatový tampon**
 - **Suchý** – zpracování do 2 hodin po odběru
 - **S transportní půdou**
 - bez aktivního uhlí
 - s aktivním uhlím
 - Možnost uchování až 24 hodin při pokojové teplotě

Stěry a výtěry

- Co nejdříve zpracovat v laboratoři
- Bez mikroskopie
- Anaerobní kultivace



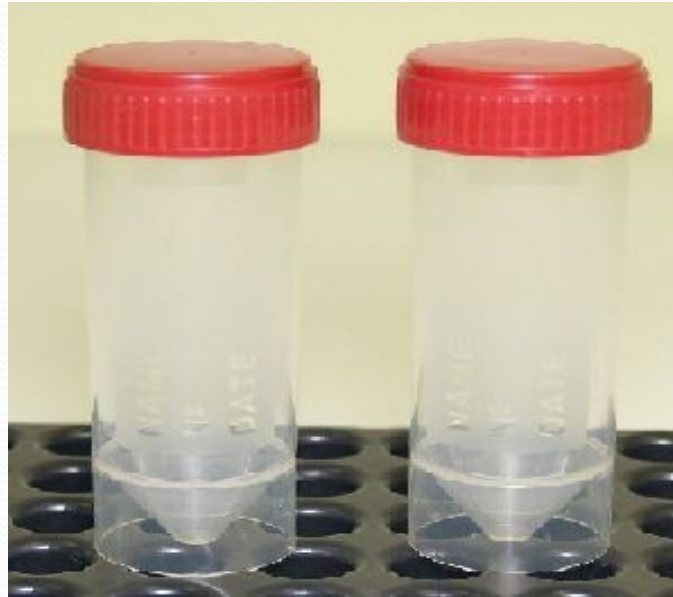
Odběrová souprava



Sputum

- Odběr ráno, na lačno, někdy po provokaci expektorace
- Sterilní široká zkumavka „sputovka“
- Ne sliny, ale sputum z dolních cest dýchacích
- Nutno zpracovat do 2 hodin po odběru
- Uchování při pokojové teplotě

Odběrová souprava



Sputum - zpracování

- Mikroskopie
- Kultivace semikvantitativní
- Postupné ředění sputa
- Signifikantní nález v ředění 10^{-7}
- pro semikvantitativní vyšetření se nehodí sliny – zavádějící výsledek

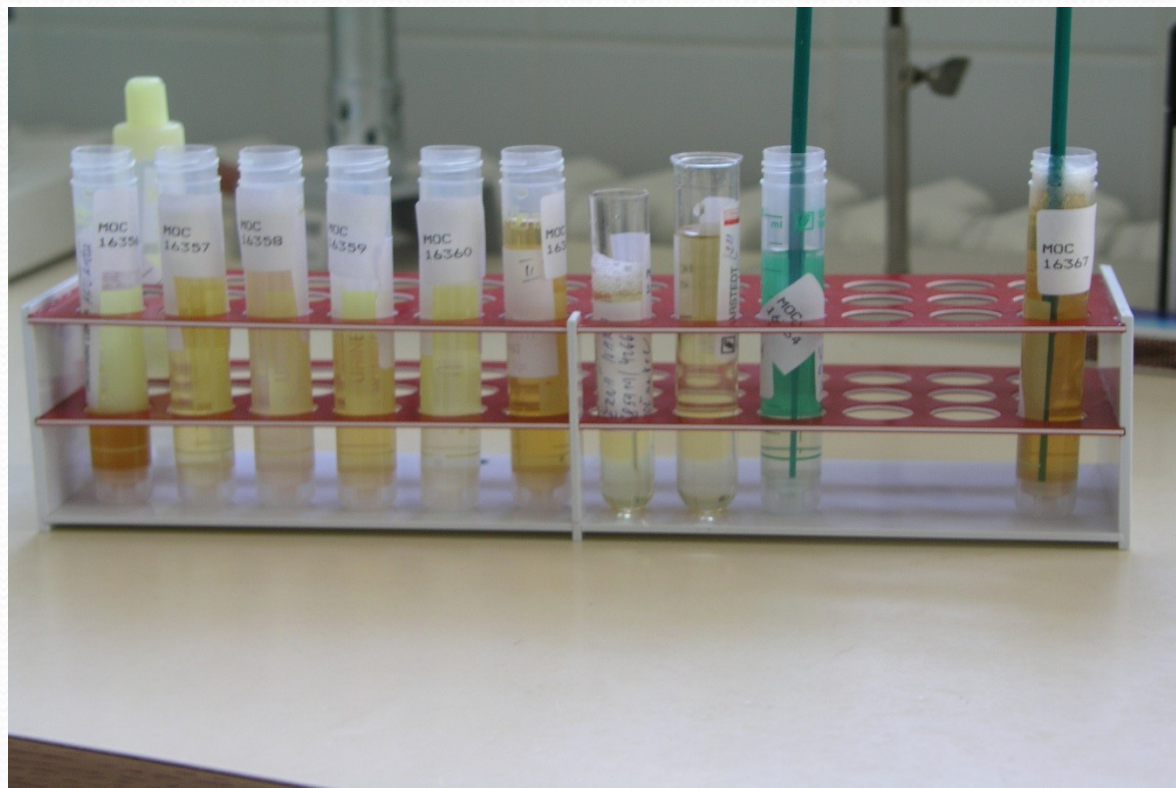
Moč

- Odběr většinou ráno
- Odběr za aseptických podmínek po předchozím umytí, případně dezinfekci do sterilní užší zkumavky
 - První porce při zánětech močové trubice
 - Střední proud při infekci močového měchýře
 - Poslední porce při infekcích prostaty a vyšších etážích močové soustavy

Odběr moče

- 5 – 7 ml moči
- Uchování při chladničkové teplotě
- Zpracovat do 2 hod po odběru
- Vysoké riziko kontaminace

Zkumavky na odběr moče



Vyšetření moče

- Semikvantitativní
- Vyočkování kalibrovanou kličkou 1 μl
- Postupné ředění a vyočkování moče
- Přístrojové vyhodnocení množství leukocytů a bakterií
- Signifikantní množství $10^5/\text{ml}$

Hnis, punktát

- Tekutý materiál vždy, pokud je to možné
 - Mikroskopie
 - Širší škála kultivačních půd
- Odběr pomocí stříkačky
- Transport
 - Ve stříkačce bez přístupu vzduchu
 - Ve sterilní zkumavce
- Uchování při pokojové teplotě

Odběr tkáně

- Odběr za aseptických podmínek
- Odběr do sterilní širší zkumavky
- Uchování při pokojové teplotě



Likvor (mozkomíšní mok)

- Odběr asepticky lumbální punkcí nebo z drénů
- Transport ve sterilní zkumavce s pevným uzávěrem
- Odběr 2 – 3 ml likvoru
- Uchování při pokojové teplotě
- Možnost odběru a transportu v lahvičce na hemokultury

Krev

- Hemokultivace
- Odběr pro sérologická vyšetření průkazu protilátek

Odběr krve na hemokultivaci

- Diagnostika sepse
- Odběr
 - při nárůstu teploty, při třesavce
 - Při kontinuální teplotě kdykoli
- Vždy venepunkcí
 - Při přítomnosti katetru zároveň venepunkcí i z katetru, možnost diagnostiky katetrových sepsí
- Odběr za aseptických podmínek

Odběr krve pro hemokultivaci

- Počet odběrů: 2x – 3x denně
- Kultivace aerobní a anaerobní
- 5 – 10 ml krve u dospělých
- 0,5 – 3 ml krve u dětí
- Uchování při pokojové teplotě

Lahvičky pro odběr, transport a kultivaci hemokultur



Stolice

- Výtěr z konečníku do transportní pŕdy na obligátní střevní patogeny
- Kousek stolice pro parazitologické vyšetřeni do širší zkumavky, nemusí být sterilní
- Odběr kousku stolice pro průkaz toxinu *Clostridium difficile*
- Lepex – otisk perianálních řas na lepící pásku, průkaz vajíček roupŕ

Urogenitální trakt

- Výtěr z uretry
- Výtěr z pochvy
- Výtěr z cervixu
- Při podezření na GO i výtěr z rektu a krku (transportní půda)

Urogenitální trakt

- Výtěr do transportní půdy
 - Běžná aerobní kultivace
 - Anaerobní kultivace
 - Kultivace na GO
 - Diagnostika *Ureaplasma urealyticum* a *Mycoplasma hominis*
 - Kultivace kvasinek

Urogenitální trakt

- Výtěr z pochvy doplnit nátěrem na 2 skla
 - Nátěr nechat zaschnout, nefixovat, nelepit
 - Mikroskopický průkaz infekce nebo změny ve složení vaginální flóry
 - Přítomnost leukocytů
 - Přítomnost laktobacilů
 - Možnost barvení na *Trichomonas vaginalis*

Odběry pro mykologická vyšetření

- Šupiny kůže z okraje ložiska sterilním skalpelem do sterilní zkumavky
- Mokvající plochy – stěr do transportní půdy
- Nehty – seškrab sterilním skalpelem z okraje ložiska

Odběr k vyšetření molekulárně – genetickou metodou (PCR)

- Tekutý materiál
- Stěr suchým vatovým tampónem
- Odběr bez příměsí chemických látek (heparin, agar)

Vyšetřovací metody v mikrobiologii

- Přímý průkaz – průkaz přítomnosti bakterií nebo virů– bakteriologie, virologie
- Nepřímý průkaz – průkaz reakce makroorganismu na přítomnost bakterií nebo virů - sérologie

Vyšetřovací metody v bakteriologii

- Mikroskopie
- Kultivace
- Průkaz antigenů
- Průkaz metabolitů
- Průkaz nukleových kyselin

Mikroskopie

- Preparát nativní
- Preparát barvený
 - Barvení dle Grama
 - Barvení dle Giemsy
 - Barvení dle Ziehl – Nielsena



Nativní preparát

- Suspenze materiálu nebo kultury ve fyziologickém roztoku
- Pro pozorování živých mikroorganismů, posouzení jejich pohyblivosti
- 100 – 400násobné zvětšení
- **Využití:**
- bakteriologie – sledování typického pohybu bakterií (listerie, cholera)
- parazitologie – průkaz střevních parazitů ve stolici
- mykologie – sledování růstu a množení kvasinek

Nativní preparát – pučení kvasinek



Barvení podle Grama

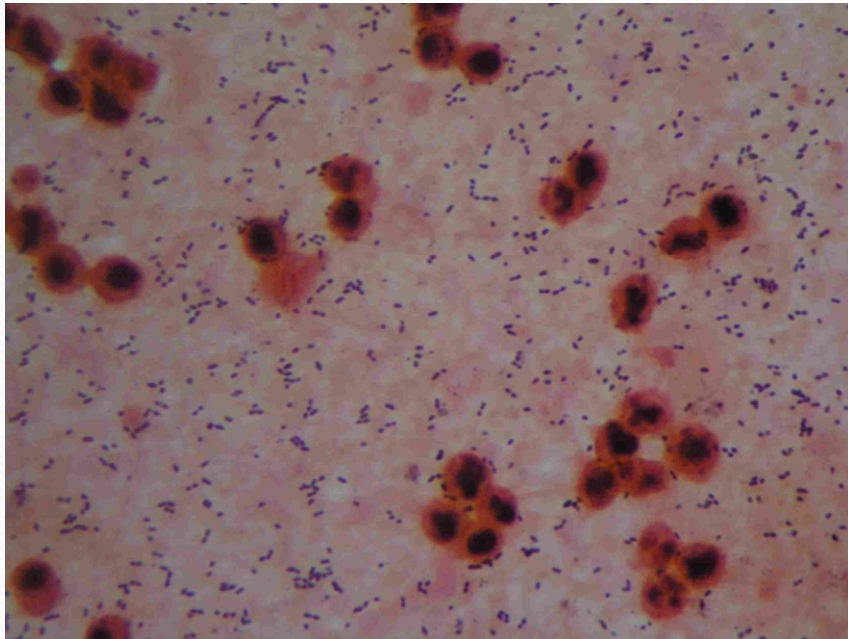
- Hans Christian Joachim Gram, 1884
- Dělí bakterie do dvou základních skupin dle složení buněčné stěny (Gram pozitivní a Gram negativní)
- Mikroskopie při 1000násobném zvětšení s použitím imerzního oleje mezi preparátem a objektivem

Barvení podle Grama - postup

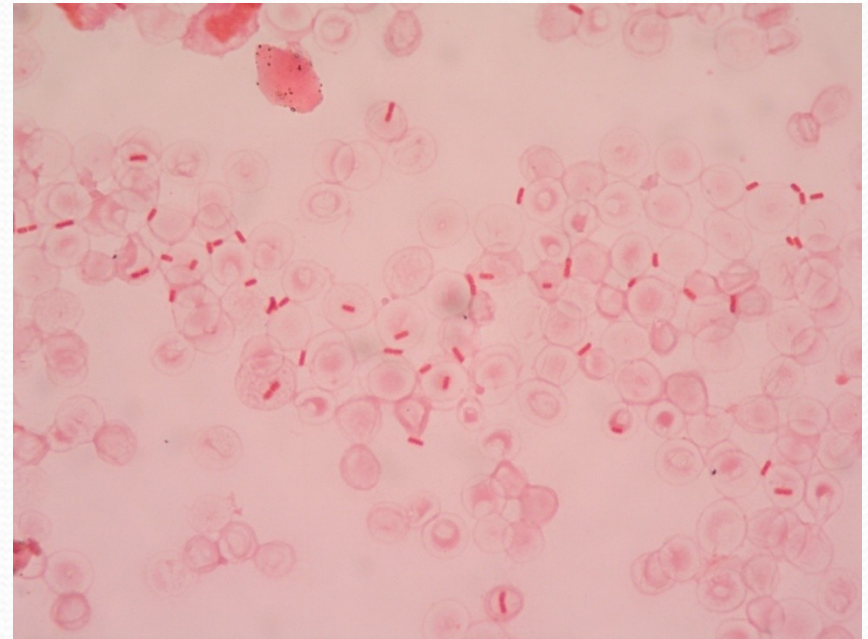
- Zhotovení nátěru na sklíčko
- Fixace plamenem nebo metanolem
- Barvení:
 - Krystalová violet' (20 - 30 s)
 - Lugolův roztok (20 - 30 s)
 - Oplach vodou
 - Odbarvení acetonalkoholem (10 s)
 - Safranin (1 min)

Barvení podle Grama

G+ koky ve dvojicích



G- tyčinky



Barvení podle Grama - význam

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

Barvení podle Giemsy

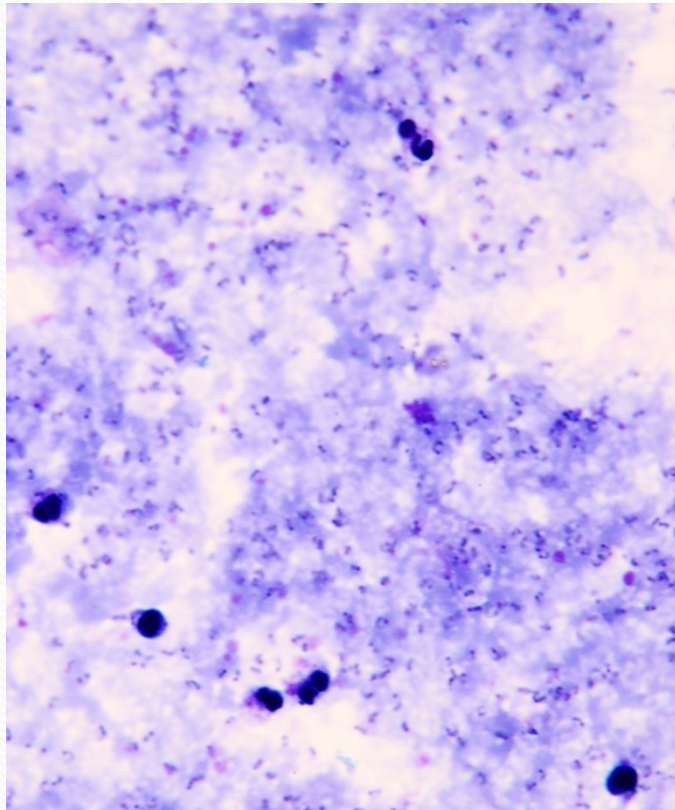
- Slouží k diferenciaci buněčných struktur
- Použití hlavně v parazitologii:
 - Mikrobiální obraz poševní – průkaz *Trichomonas vaginalis*
 - Diagnostika malárie
- Barvení obtížně barvitelných mikroorganismů
- Fixace metanolem

Barvení podle Giemsy

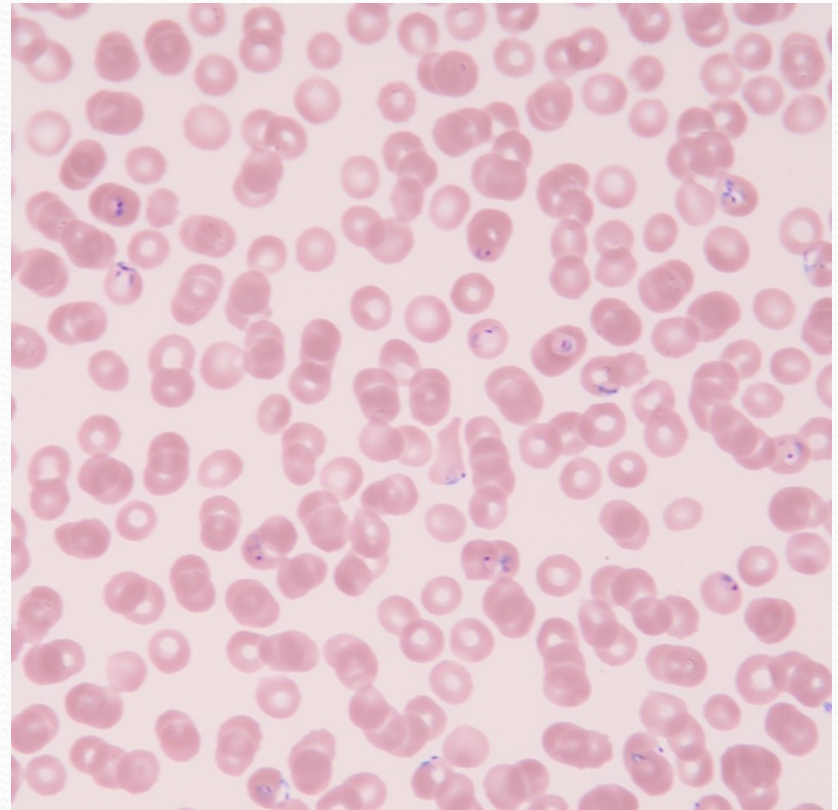
- Azur a eosin rozpuštěný ve směsi glycerinu a metanolu
- Ředěn neutrální destilovanou vodou
- Roztok není stabilní, používá se vždy čerstvý

Barvení podle Giemsy

Plasmodium falciparum – tlustá kapka



Plasmodium falciparum – tenký roztěr



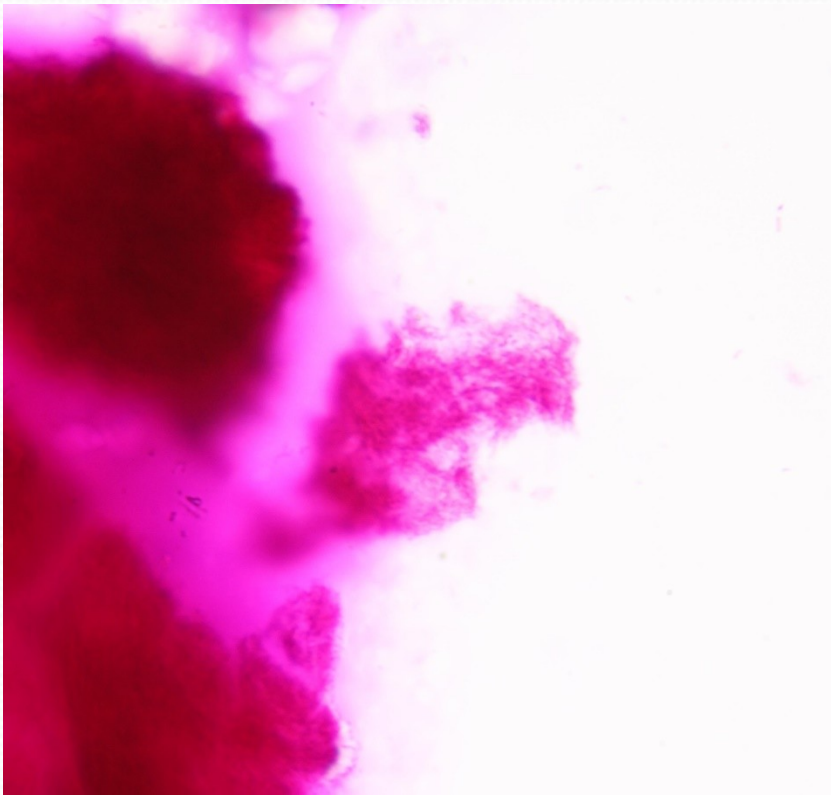
Barvení podle Ziehl - Nielsena

- Barvení acidorezistentních tyčinek
 - Špatně barvitelné
 - Vysoký obsah lipidů v buněčné stěně
- Nejčastěji *Mycobacterium sp.*

Barvení podle Ziehl - Nielsena

- Fixace teplem
- Barvení karbolfuchsinem
- Zahřátí
- Odbarvení kyselým alkoholem
- Oplach vodou
- Dobarvení malachitovou zelení

Barvení podle Ziehl - Nielsena



- *Mycobacterium tuberculosis*

Kultivační průkaz

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

Kultivační půdy

- Dělení podle konzistence:
 - Tekuté – k pomnožení bakterií
 - Polotuhé – ke sledování pohybu bakterií
 - Tuhé, pevné

Kultivační půdy

- Dělení podle funkce:
 - Základní – masopeptonový bujon, krevní agar
 - Diagnostické – obsahují látky, které se mění vlivem metabolismu bakterií (např. štěpení laktózy)
 - Selektivní – k výběrovému růstu bakterií, obsahují látky, které potlačují některé bakterie
 - Selektivně diagnostické

Kultivační půdy

- Dělení podle funkce (pokračování)
 - Transportní - k transportu (bez množení) – umožňují přežití bakterií při transportu
 - Pomnožovací – tekuté, k pomnožení bakterií ve vzorku, mohou být i selektivní

Podmínky kultivace

- Dostatečná vlhkost prostředí
- Optimální teplota: 37 C (4 C, 42 C)
- Optimální pH půdy: 7,2 – 7,4
- Vhodná izotonie média: 0,5 – 1% NaCl
- Dostatek vhodných živin
- Vhodné plynné prostředí

Dělení bakterií podle vztahu ke kyslíku

- Striktně aerobní
- Fakultativně anaerobní
- Striktně anaerobní
- Anaerobní aerotolerantní
- Mikroaerofilní
- Kapnofilní

Nádoba pro anaerobní kultivaci



Anaerostat



Termostat se zvýšenou tenzí CO₂



Hlavní druhy kultivačních pŮd

- Masopeptonový bujon
- Krevní agar
- Čokoládový krevní agar
- MacConkey agar
- Sabouraudův agar
- XLD agar (xylóza – lyzin - deoxycholát)
- Mueller – Hintonův agar
- Chromagary

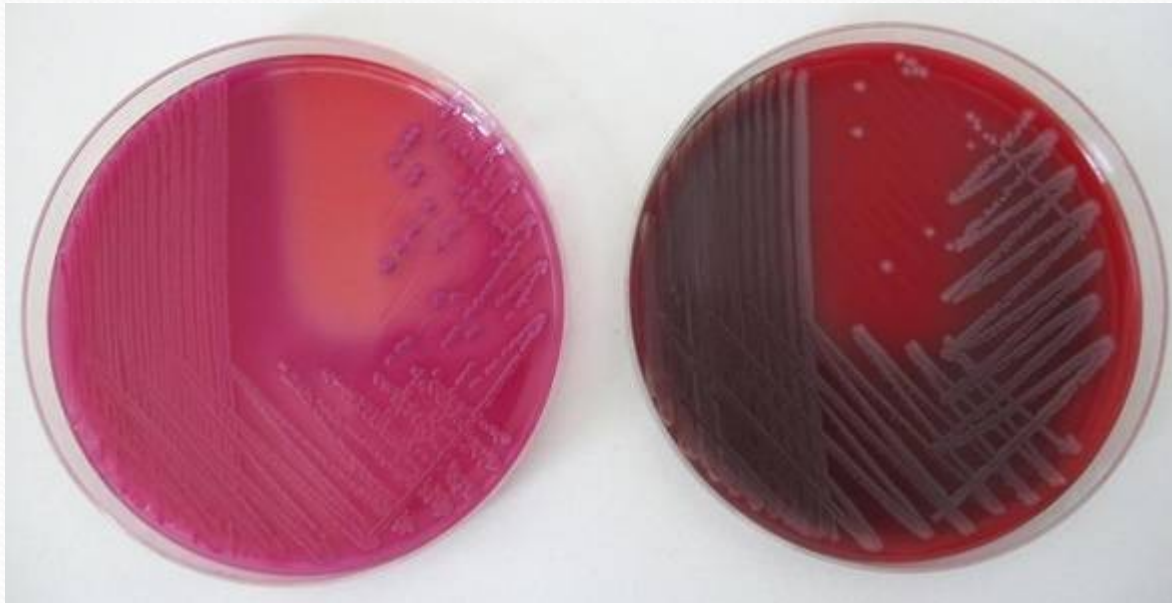
Masopeptonový bujón



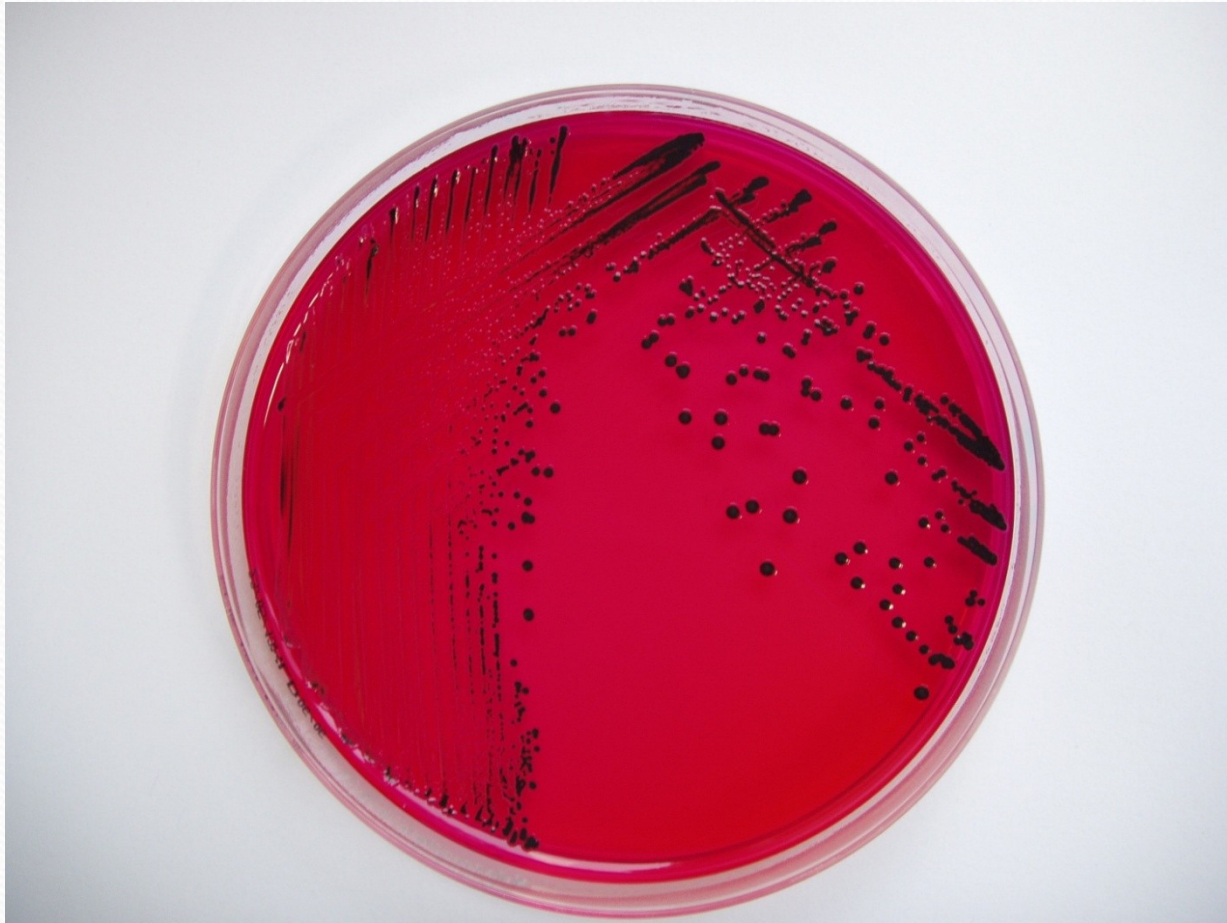
Krevní agar – nárůst *S.aureus*



MacConkey agar a krevní agar nárůst *E.coli*



XLD agar – nárůst *Salmonella* sp.



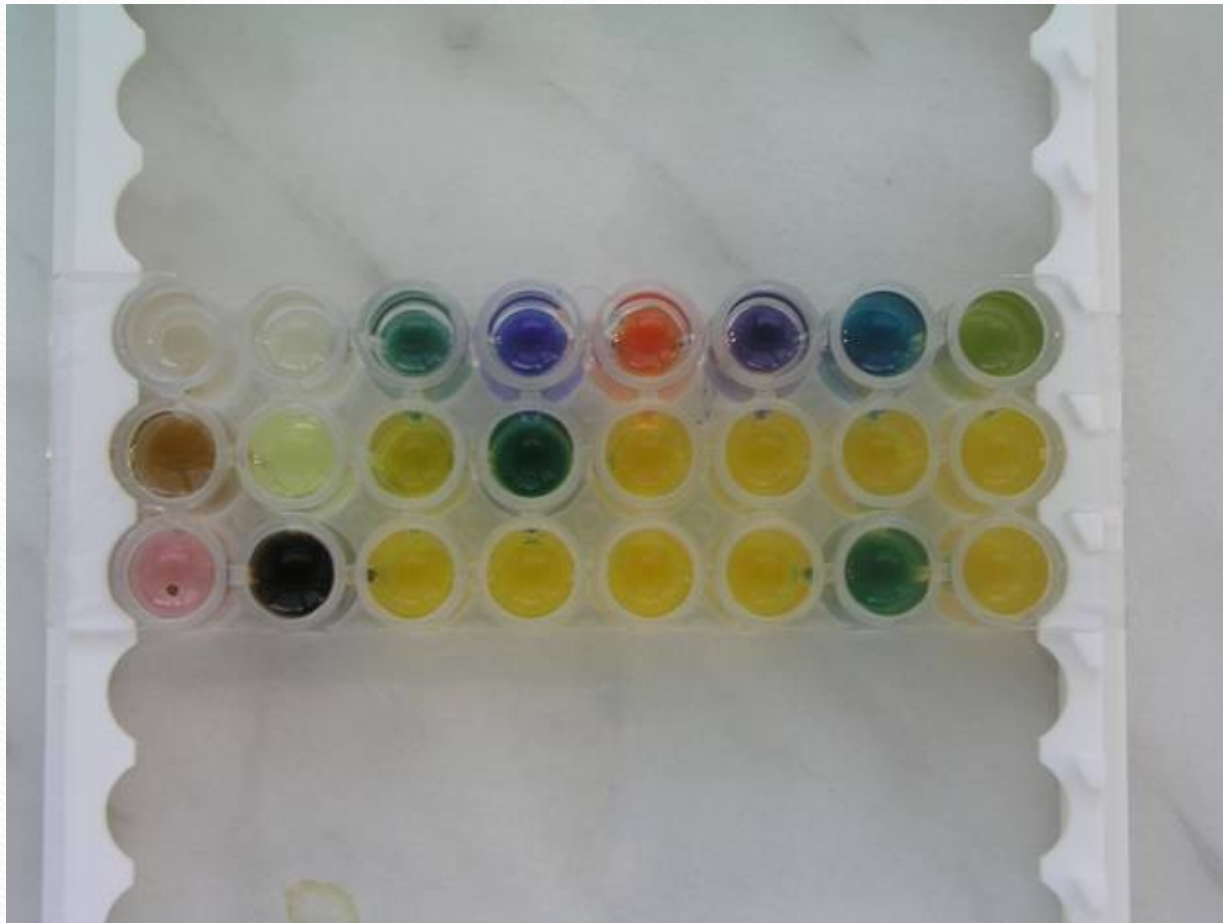
Karmali agar - nárůst *Campylobacter* sp.



Identifikace bakterií

- Podle morfologie
- Podle růstových vlastností
- Hmotnostní spektrometrie – metoda MALDI TOF
- Podle biochemických vlastností
 - Selektivní půdy
 - Komerční diagnostické soupravy
- Podle antigenní struktury
 - Latexová aglutinace

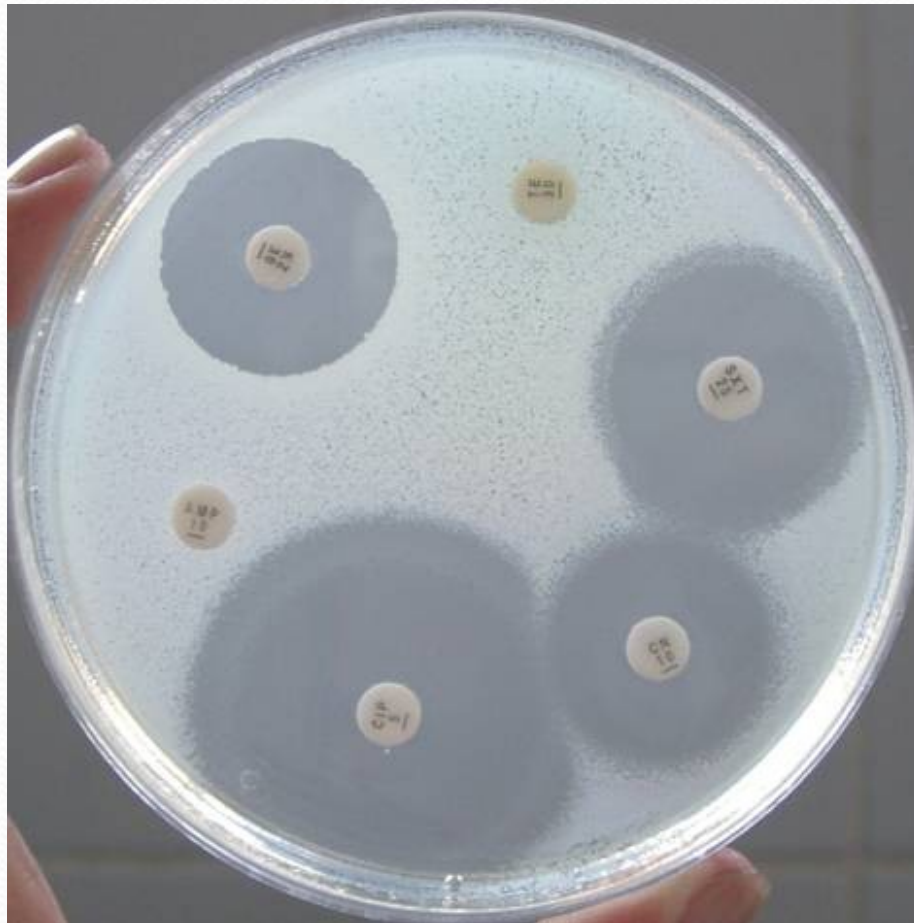
Biochemické určení bakterií



Stanovení citlivosti na antibiotika

- Disková difúzní metoda
 - Difuze antibiotik z disků do půdy a zábrana růstu bakterií
- Diluční testy
 - Stanovení koncentrace antibiotika, která je ještě na mikroba účinná

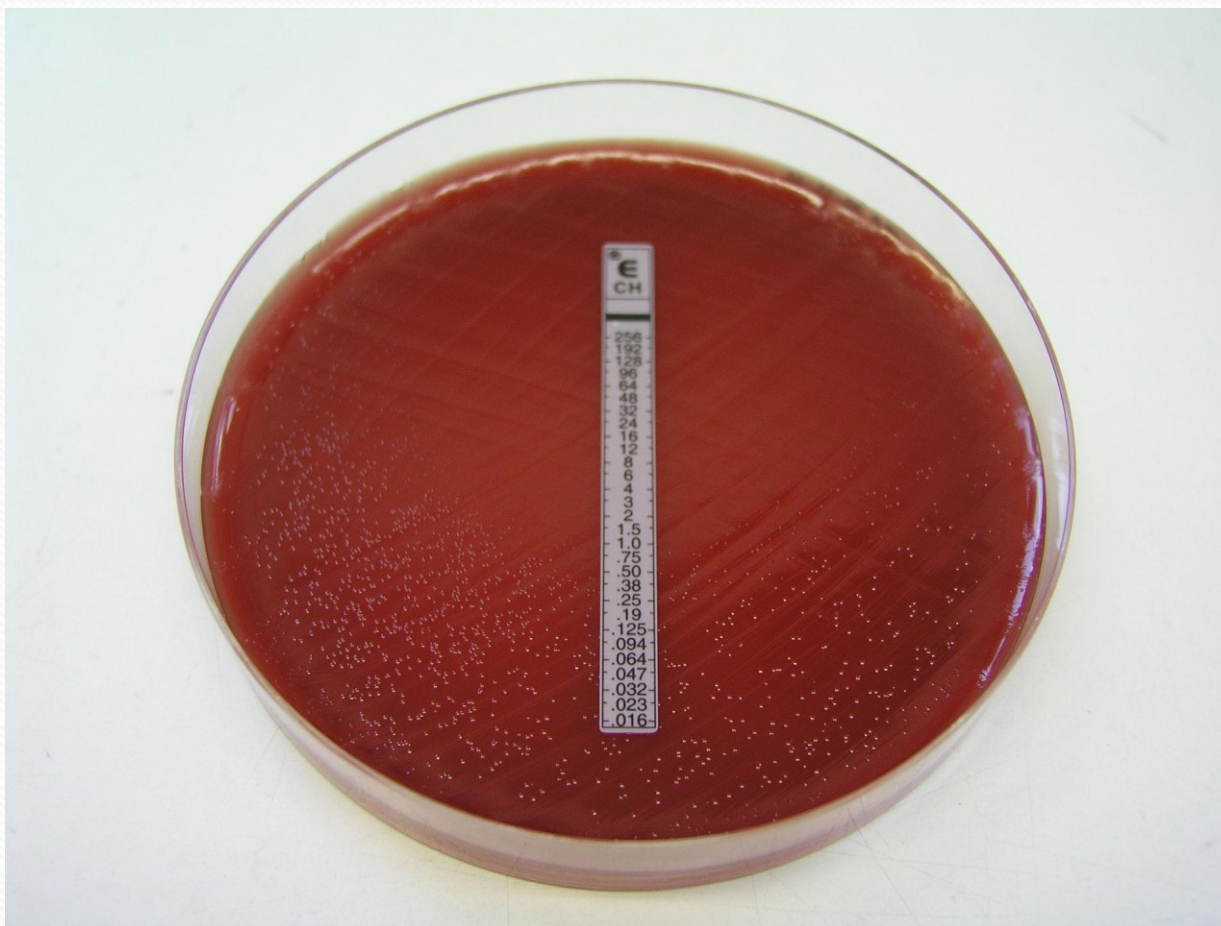
Disková difúzní metoda



Diluční metoda – mikrotitrační destičky



Diluční metoda – E-test



Průkaz antigenů z materiálu

- Latexová aglutinace

vyšetření likvoru, moče

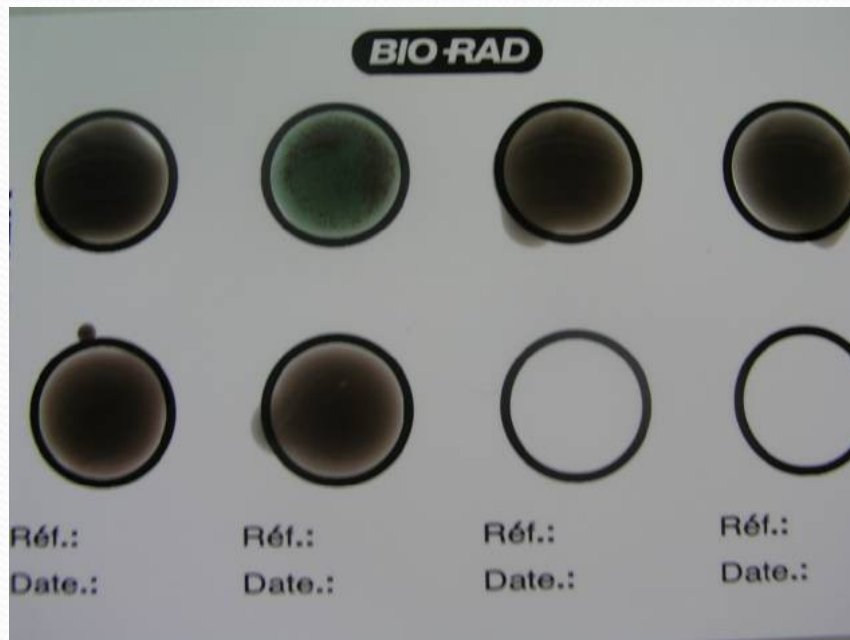
- Imunochromatografie

vyšetření moče – *Legionella pneumophila*,

Streptococcus pneumoniae

vyšetření stolice - *Clostridium difficile*, střevní viry, *Helicobacter pylori*

Latexová aglutinace



Imunochromatografie



Průkaz metabolitů

- Těžko kultivovatelné bakterie
- Rychlý průkaz
 - Např. infekce *Helicobacter pylori*
průkaz produkce ureázy

Průkaz nukleových kyselin

- Průkaz přítomnosti nukleové kyseliny mikroorganismu v klinickém vzorku
- Druhovú identifikace izolovaného mikrobiálního kmene