

Co chybí ve skriptech „Vybrané kapitoly z klinické mikrobiologie“

Doplňkový výukový materiál pro bakalářské obory Všeobecná sestra, Porodní asistentka, Ošetrovatelství

OBSAH

Téma 1 Přehled mikrobů. Patogenita a virulence. Jednotlivé skupiny mikrobů

Jednotlivé skupiny mikrobů

Patogenita a virulence

Průběh infekčního procesu a faktory, které se na něm podílejí

Téma 2. Přehled mikrobiologických vyšetřovacích metod

Cíle a základní rozdělení mikrobiologických metod. Pojmy kmen a vzorek

Metody přímého průkazu mikrobů (přehled a charakteristika)

Metody nepřímého průkazu mikrobů (přehled a charakteristika)

Téma 3 Desinfekce a sterilizace

Mikroby a prostředí, chování mikrobů při změnách jednotlivých faktorů v prostředí

Zásady praktického použití dekontaminačních metod

Přehled nejdůležitějších dekontaminačních metod

Téma 4 Antimikrobiální látky

Peniciliny, cefalosporiny, glykopeptidy a chinolony (mechanismy účinku, nežádoucí účinky, příklady)

Aminoglykosidy, makrolidy, tetracykliny, linkosamidy a chloramfenikol (mechanismy účinku, nežádoucí účinky, příklady)

Primární a sekundární rezistence mikrobů, ESBL, MRSA, VRE a jejich význam. Atb střediska

Kvalitativní a kvantitativní testy citlivosti na antibakteriální látky, význam MIC

Týden 9 Sepse, endokarditidy, neuroinfekce, systémové infekce – část (zbytek je ve skriptech)

Infekční hepatitidy a AIDS

Etiologie a dg. virových infekcí CNS a boreliózy

Téma 11 Hnisavé a anaerobní infekce – část (zbytek je ve skriptech)

Anaerobní infekce - původci, transport materiálu, zásady diagnostiky

Téma 12 Zásady odběru a transportu materiálu k mikrobiologickému vyšetření, průvodky

Obecné zásady odběru a transportu infekčního materiálu

Přehled základních odběrových souprav a nádobek

Správně vyplněná průvodka a její význam

Téma 13 Základy klinické mykologie a parazitologie

Původci mykóz, vyšetřovací metody v mykologii

Střevní paraziti a jejich vyšetřování

Paraziti a jejich diagnostika – kromě střevních

Ostatní témata jsou probrána ve skriptech „Vybrané kapitoly z klinické mikrobiologie“

Téma 1 Přehled mikrobů. Patogenita a virulence.

Jednotlivé skupiny mikrobů

Jednotlivé skupiny mikrobů

1. Priony (neobsahují nukleovou kyselinu, např. původce „nemoci šílených krav“)
2. Viry (DNA a RNA, obalené a neobalené)
3. Bakterie (tyčinky, koky, spirochety; grampozitivní, gramnegativní)
4. Mikroskopické houby (kvasinky a plísňe) *Houby a paraziti jsou probrány zvlášť*
5. Paraziti (živočišné patogeny): vnější (členovci) a vnitřní (prvoci, oblovci, ploštěnci)

Ad 2: Viry dělíme na DNA-viry RNA-viry.

DNA VIRY: například mezi ně patří

herpesviry – virus prostého oparu, virus pásového oparu + neštovic, EB virus,

cytomegalovirus, virus šesté dětské nemoci

adenoviry – zodpovědné např. za některé respirační virózy

papovaviry – například urogenitální papilomaviry

parvoviry – například původce páté dětské nemoci

virus žloutenky B

RNA viry: například mezi ně patří

enteroviry – viry dětské obrny a tzv. coxsackieviry a ECHOviry, dělající různé infekce

rhinoviry – viry rýmy

viry chřipky, parachřipky, spalniček, zarděnek, příušnic

viry žloutenek A, C, D, E

různé viry klíšťových encefalitid, tropických viróz, vztekliny, horeček Lassa a Ebola

virus HIV

Viry také můžeme dělit na obalené a neobalené.

Ad 3: Bakterie dělíme například

- podle tvaru a uspořádání
 - koky – kulovité, mohou tvořit dvojice, řetězky, shluky...
 - tyčinky – protáhlé, mohou být rovné, zahnuté...
 - kokotýčinky (kokobacily) – přechod mezi koky a tyčinkami
 - spirochety – ve tvaru spirály
 - bez tvaru – mykoplasmata nemají buněčnou stěnu, a tedy ani tvar
- podle tzv. Gramova barvení (je to dáno typem buněčné stěny)
 - grampozitivní – barví se modře (tlustá, jednoduchá buněčná stěna)
 - gramnegativní – barví se červeně (tenká, zato složitá buněčná stěna)
 - Gramem se nebarvící – jiný typ stěny (mykobakteria) nebo stěnu nemají (mykoplasmata), jsou příliš tenké a proto se nebarví (spirochety) apod.
- podle vztahu ke kyslíku
 - striktně aerobní (rostou pouze v přítomnosti kyslíku)
 - striktně anaerobní (vyžadují atmosféru bez kyslíku)
 - fakultativně anaerobní (dokáží „přepínat metabolismus“ a přizpůsobit se)
 - aerotolerantní (metabolismus „nepřepínají“, ale také se přizpůsobí, v praxi neodlišitelné od předchozích)

- mikroaerofilní (potřebují kyslík, ale musí ho být málo)
- kapnofilní (potřebují kyslík, ale také zvýšený podíl CO₂ v atmosféře)
- *pro praxi se používá často jen dělení na aerobní (rostou za normální atmosféry) a anaerobní (vyžadují atmosféru bez kyslíku)*

Nejdůležitější grampozitivní koky:

Staphylococcus: *S. aureus*, ostatní jsou tzv. koaguláza-negativní stafylokoky

Streptococcus: hemolytické (betahemolytické) streptokoky (*S. pyogenes*, *S. agalactiae*, takzvané „non-A-non-B“ streptokoky), viridující (alfahemolytické) streptokoky (*S. pneumoniae* = pneumokok a takzvané „ústní“ streptokoky)

Enterococcus: *E. faecalis*, *E. faecium*

Nejdůležitější grampozitivní tyčinky:

Listeria, Corynebacterium (nejen *C. diphtheriae*), Bacillus (ten je sporulující)

Nejdůležitější gramnegativní koky:

Neisseria (*N. gonorrhoeae* – gonokok, *N. meningitidis* – meningokok, „ústní“ neiss.)

Branhamella catarrhalis – také *Moraxella catarrhalis*

Nejdůležitější gramnegativní tyčinky:

Enterobakterie: *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Proteus*, *Providencia*, *Morganella*, *Serratia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*

Gramnegativní nefermentující tyčinky: *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter*, *Burkholderia*, *Stenotrophomonas*

Ostatní: *Haemophilus*, *Pasteurella*; *Campylobacter*, *Helicobacter*; *Vibrio*

Nejdůležitější anaeroby:

Clostridium (*C. tetani*, *C. botulinum*, *C. difficile*, *C. perfringens* a jiná tzv. „klostridia plynatých snětí“)

Actinomyces – původce aktinomykózy (pozor, neplést s houbovou infekcí – mykózou)

Ostatní anaeroby většinou působí ve směsi. Jejich názvy nejsou zvlášť důležité

Nejdůležitější spirochety:

Treponema (*T. pallidum* – původce syfilis), Borrelia, Leptospira

Nejdůležitější z ostatních bakterií:

Mycobacterium (*M. tuberculosis*, *M. leprae*), Mycoplasma (*M. pneumoniae*, *M. hominis*), Ureaplasma (*U. urealyticum*), rickettsie, chlamydie

Patogenita a virulence.

Průběh infekčního procesu a faktory, které se na něm podílejí

Patogenních mikrobů je ze všech mikrobů vlastně velice málo.

PATOGENITA je vlastnost určitého bakteriálního druhu ve vztahu k danému makroorganismu

(v našem případě člověku, jindy zvířeti, rostlině). Z hlediska patogenity existují tři skupiny mikrobů:

- 1) **Nepatogenní: nejsou schopni** vyvolat nemoc, většinou proto, že se vůbec neumějí v makroorganismu (= člověku) uchytit.

Opačná možnost – tedy že jsou naopak tak dobře adaptované na člověka, že s ním dokáží soužít, aniž by vyvolávaly nemoc - je také možná, jenže většinou je tu vždycky alespoň někdy možné, že rovnováha poruší a nemoc nastane. Pak tyto mikroby patří pod bod 2).

2) **Potenciální (oportunističtí) patogeni** jsou takové mikroby, které vyvolávají chorobu jen někdy, jindy jsou "hodné". Například *Escherichia coli* je běžnou flórou ve střevě, ale zároveň nejčastějším původcem močových infekcí.

3) **Obligátní (primární) patogeni** jsou mikroby, které vyvolávají nemoc vždy, když se setkají s makroorganismem. Toto "vždy" je ale tak trochu relativní (záleží na počtu mikrobů, způsobu, jakým se člověk s mikroblem setká, apod.)

Patogenita (ať už se týká obligátních nebo potenciálních patogenů) je podmíněna třemi vlastnostmi mikroba:

1) **Přenosnost** z hostitele (zdroje) na další organismus (osobu)

2) **Nakaživost** - schopnost narušit obranu hostitele

3) **Virulence** - schopnost mikroba nějak poškodit hostitele .

Na rozdíl od patogenity představuje **VIRULENCE** okamžitou vlastnost konkrétního kmene mikroba.

Dalo by se také říci, že

1) nepatogenní mikroby jsou takové, jejich žádný kmen není virulentní

2) potenciálně (oportunně) patogenní jsou ty, které mají kmene avirulentní (nevirulentní) a pak kmene virulentní (případně i méně a více virulentní).

3) obligátně patogenní jsou ty, jejichž kmene jsou vždy virulentní; nemusí být ale vždycky stejně virulentní.

FAKTORY VIRULENCE:

1. Ty, které se podílejí na **kolonizaci hostitele**: řasinky (latinsky pili či fimbrie), bičík, různé další tzv. adhesiny. **BIČÍK** umožňuje pohyblivost bakterií.

2. Ty, které u některých mikrobů zabezpečí **invazi** (vniknutí mikroba do tkání). Jsou to různé enzymy, štěpící vazivo, faktory, zabezpečující virům a některým bakteriím vstup přímo buněk, a podobně.

3. **Toxiny** (jedy), které bakterie (případně houba či prvok - viry jsou na to moc malé) produkuje navenek. Důležité z nich jsou zejména:

A. **Neurotoxiny**, které ovlivňují nervovou soustavu. Například tetanický toxin působí křeče, botulotoxin naopak obrny.

B. **Enterotoxiny**, které působí ve střevě (výsledkem je průjem, popř. i zvracení).

C. **Místní (lokální) toxiny**, které nepůsobí v celém organismu, ale jen místně ve tkáni.

D. Zvláštním případem je tzv. **endotoxin**, což není volná molekula, ale povrchová struktura gramnegativních bakterií. Uplatní se zpravidla až po rozpadu bakterie ("Pravé" toxiny, uvolňované bakteriemi do prostředí, se někdy označují jako exotoxiny).

V některých případech působení mikroba vůbec nemá charakter nákazy (infekce), nýbrž se vlastně jedná o toxikózu (otravu jedem): do organismu nevnikne mikrob, ale jen jeho toxin. Tak tomu je např. u botulismu, stafylokokové enterotoxikózy apod.

4. Faktory, které se podílejí na **boji s obrannými mechanismy hostitele**: např. pouzdra čili kapsuly, které zabraňují pohlcení mikroba buňkou makroorganismu, různorodost antigenních variant (u chřipky) aj.

VSTUPNÍ BRÁNA INFEKCE je pojem, který označuje místo, kudy mikrob do těla pronikl. Málokdy je to kůže, mnohem častěji různé sliznice. Těsně souvisí s cestou přenosu nákazy.

FORMA INFEKCE

Podle rozsahu postižení organismu:

A. **LOKÁLNÍ** (omezená na jednu sliznici, tkáň orgán)

B. **CELKOVÁ** (systémová, celotělová)

Podle vyjádření příznaků:

1. **bezpříznaková** (asymptomatická, inaparentní)

2. **příznaková** (symptomatická):

2.1 **abortivní průběh**: nemoc proběhne, ale namísto typických příznaků dojde jen

k nespecifickým celkovým („chřipkovým“) příznakům – teplota, svalové bolesti apod.

2.2 typický průběh („učebnicový“)

2.3 komplikovaný průběh (těžší, než obvykle)

V průběhu infekce může dojít k SUPERINFEKCI jiným mikroben. Může také dojít ke KOINFEKCI dvěma různými mikroby.

VYLUČOVÁNÍ MIKROBA Z TĚLA se u místních infekcí děje zpravidla jen jedním způsobem (u dýchacích infekcí vzduchem, u střevních stolicí apod.), u celkových se způsoby kombinují a zpravidla se mění v průběhu infekce.

CO OVLIVŇUJE FORMU INFEKCE.

faktory na straně mikroba: zejména vybavenost jednotlivými faktory virulence – je u každého mikrobiálního kmene jiná

faktory na straně makroorganismu: stav imunity, stav anatomických bariér – kůže, sliznice (např. zda není oslabena kouřením), stav funkčních mechanismů – kýčání, střevní peristaltika, vypuzování mikrobů z močové trubice proudem moče)

faktory týkající se setkání mikroba a makroorganismu: za jakých okolností k němu došlo, jakou infekční dávkou a podobně

Téma 2. Přehled mikrobiologických vyšetřovacích metod

Metody přímého a nepřímého průkazu mikrobů

Mikrobiologická diagnostika směřuje k odhalení původce nemoci. Skutečného původce je přitom často potřeba odlišit od běžné flóry - tedy mikrobů (hlavně bakterií), které se v některých tělních dutinách vyskytují normálně, od náhodného nálezu, který se např. do úst zatoulal s potravou, a také od kontaminace, tedy od mikrobů, které se do vzorku přilepily omylem cestou. Toto odlišení probíhá částečně v laboratoři a částečně na klinickém pracovišti.

V některých případech (u většiny bakterií a kvasinek, ne však u ostatních mikrobů) existuje vedle určení původce další úkol - určení "in vitro" citlivosti na antimikrobiální látky. "In vitro" citlivost (určená v laboratoři) ovšem o skutečné "in vivo" citlivosti u pacienta vypovídá jen částečně. Je to dáno mimo jiné tím, že v laboratoři se mikroby chovají poněkud jinak než ve tkáních.

Metody, kterými určíme mikroby, si můžeme rozdělit na:

METODY PŘÍMÉ, pomocí kterých **hledáme mikroba jako takového, jeho součást nebo jeho produkt** ve vzorku pacienta; vzorkem v takovém případě bývá např. moč, stolice, hnis, mozkomíšní mok, výtěry z nejrůznějších tělních povrchů a otvorů.

Metody přímé si můžeme dále rozdělit:

- A. Pokud hledáme mikroba bezprostředně ve vzorku, používá se zpravidla pojem přímý průkaz. Je potřeba vzít v úvahu, že vzorek zpravidla obsahuje buňky makroorganismu a že předem nevíme, kolik různých druhů mikrobů je ve vzorku obsaženo (pokud nějaké)
- B. Kvůli nevýhodám přímého vyšetřování vzorku často potřebujeme získat **kmen**. Kmen získáme kultivací mikroba na pevné půdě. Práce s kmenem mikrobiologům nahrazuje práci s jedincem, tak jak ji znají zoologové či botanici. Pokud máme k dispozici kmen a určujeme jeho vlastnosti, hovoříme o identifikaci mikroba. Některé metody identifikace jsou tytéž, které se používají i k přímému průkazu (například lze mikroskopovat vzorek – přímý průkaz – i kmen – identifikace)

METODY NEPŘÍMÉ, kterými **hledáme protilátky**. Rozdíl je v tom, že protilátka není součástí ani produktem mikroba - je produktem makroorganismu, i když by bez podráždění daným mikroben (resp. jeho antigenem) nevznikla. Nevýhodou nepřímých metod je, že nejsou důkazem toho, že je mikrob v těle právě přítomen – svědčí jen o tom, že se s ním tělo někdy setkalo (anebo se setkalo s očkovací látkou, která obsahovala části těla toho mikroba).

Přehled přímých metod

Název metody	K přímému průkazu	K identifikaci
Mikroskopie)	ano	ano
Kultivace (pěstování na půdách)	ano	ano
Biochemické a podobné identifikační metody	ne	ano
Pokus na zvířeti	ano	lze použít, ale nedělá se to
Průkaz antigenu/antigenní analýza	ano	ano
Průkaz nukleové kyseliny	ano	lze použít, ale nedělá se to

MIKROSKOPIE

Nativní preparát

Nejjednodušší druh mikroskopie: mikroby se pozorují neobarvené, jen rozmíchané v kapce fyziologického roztoku a přikryté krycím sklíčkem. Nepoužívá se imerze. Nativní preparát se hodí
a) na mikroby (baktérie, prvoky), kteří se pohybují
b) na velké mikroby - především tedy parazity a houby

Mikroskopie v zástínu

Je to zvláštní druh nativního preparátu. V důsledku jiného směrování paprsků je výsledkem světlý objekt na tmavém pozadí. Používá se především u spirochet.

Barvené preparáty

Preparáty, které mají být nějak obarvené, musí být nejprve vysušeny a poté zfixovány - obvykle protažením plamenem. Poté proběhne vlastní barvení. Preparát se vysuší (např. filtračním papírem) a pozoruje se tzv. imersním objektivem bez krycího sklíčka; mezi objektiv a preparát se kápne kapka imersního oleje.

- *Jednoduché barvení* - používá se například metylénová modř. Dá se provádět i přímo v klinickém pracovišti jako nouzové orientační vyšetření.
- Mikrobiologové provádějí většinou *Gramovo barvení*. Je to nejdůležitější barvení v mikrobiologii. Rozliší baktérie podle typu buněčné stěny. Má čtyři kroky, po každém z nich se preparát oplachuje vodovodní vodou. Po posledním oplachu se vysuší.
- Různá *speciální barvení* se používají např. na tuberkulózu, na plísně, některé parazity apod.
- Ke speciálním účelům se používá *fluorescenční barvení*.

Interpretace mikroskopie. Použijeme-li mikroskopii jako přímý průkaz, nevidíme jenom mikroby samotné, ale také různé jiné věci, například epitelie a leukocyty makroorganismu. Jejich přítomnost a vzájemný poměr má velký význam při hodnocení nálezu. Například velké množství neutrofilů svědčí o bakteriální hnisavé záněť.

Množství jednotlivých elementů (baktérií, epitelí, leukocytů apod.) se hodnotí zpravidla semikvantitativně na jeden až tři (nebo čtyři) křížky.

Samozřejmě, je-li mikroskopie použita k identifikaci, vidíme už jednom příslušného mikroba.

Elektronová mikroskopie se používá u virů, ale nehodí se k rutinní diagnostice, spíše k výzkumu.

KULTIVACE (u virů se používá pojem IZOLACE)

Kultivace je pěstování mikrobů, zpravidla na umělých půdách. Mikroskopie je sice nejklasičtější mikrobiologickou metodou, avšak kultivace je zdaleka nejdůležitější (alespoň v případě bakterií a kvasinkovitých hub). Její význam spočívá především v tom, že umožňuje ze **vzorku** (obsahujícího často směs mikrobů a téměř vždy buňky pacienta) izolovaný čistý **kmén** ve formě tzv. **kolonií**. To ovšem platí jen pro tzv. **pevné půdy**. Důležité jsou ale i **půdy tekuté**, sloužící zejména k pomnožení mikrobů tam, kde jich bylo získáno málo.

KMEN je populace mikrobů, vzešlá z jedné buňky, bez ohledu na formu. Všichni jedinci v rámci kmene mají stejné vlastnosti.

KOLONIE je označení konkrétního útvaru, který bakterie a kvasinky vytvářejí při kultivaci na pevných půdách. U většiny mikrobusů vyroste za den. Pokud odtud mikroba přemístíme, přestává být kolonií, zůstává však kmenem.

KULTIVAČNÍ PODMÍNKY zahrnují teplotu, vlhkost, složení atmosféry a podobně. Zpravidla se laboratoř snaží vytvořit mikrobusům podmínky blízké těm, které jsou v organismu.

Tekuté půdy (pomnožovací). Nejdůležitější je:

- Peptonová voda - obsahuje bílkovinný hydrolyzát (to jest: produkt rozkladu bílkoviny na aminokyseliny a polypeptidy). Samotná se používá zřídka, je však mezistupněm k další:
- Bujón (masopeptonový bujón) je peptonová voda s vývarem. Je to základní pomnožovací půda, běžně používaná v laboratoři hlavně tam, kde předpokládáme malé množství mikrobusů, jež chceme namnožit.
- VL-bujón je bujón s přísadkou kvasnic (francouzsky *viande-levure* = maso-kvasnice). Hodí se pro anaeroby. Aby se mikroby při kultivaci nedostaly do styku se vzdušným kyslíkem, přelévá se VL-bujón při kultivaci vrstvou parafinového oleje.
- Selenitový bujón je příkladem půdy selektivně pomnožovací. Taková pomnoží jen některé mikroby - v případě selenitového bujónu salmonely (a několik dalších rodů).

Pevné (většinou agarové) půdy. Jsou to půdy, jejichž základem je zpravidla živý agar - to je bujón, do kterého je přidán výtazek agarové řasy. Tím se stane, že z tekutiny se stane hmota připomínající pudink nebo želatinu. Fyzikálně vzato je to ovšem pořád tekutina: jakákoli chemická látka, kterou umístíme na povrch agarové půdy, začne touto půdou poměrně rychle pronikat (difundovat).

Na agarových půdách je báječná jedna věc: bakterie (a také kvasinky) na nich tvoří kopečky, kterým říkáme **kolonie**. Každý druh bakterie tvoří na konkrétní půdě specifické kolonie charakteristické velikosti, barvy, tvaru apod., což velmi usnadňuje diagnostiku.

Jedna kolonie zpravidla vyrůstá z jedné bakterie (nanejvýš z jedné dvojice, jednoho řetězku, jednoho shluku - používá se tu anglický termín CFU = colony forming unit = jednotka tvořící kolonii). Z toho také logicky vyplývá, že pokud na agarovou půdu naočkujeme směs dvou bakterií, a pokud tato směs není příliš hustá, vytvoří každý z těchto druhů své vlastní charakteristické kolonie. Ty pak můžeme přeočkovat (= odebrat a nechat znovu kultivovat) a různými metodami identifikovat.

Živý agar se v praxi nepoužívá. Když už se totiž v laboratoři vaří agarová půda, vždycky se do ní něco přidává, co usnadňuje rozpoznání jednotlivých druhů.

U kolonií se dají popisovat různé znaky - velikost, barva, tvar, zápach a podobně.

Pevné půdy rozlišujeme podle účelu.

Diagnostické půdy jsou takové, na kterých "roste kdeco, ale každé jinak". Jinak řečeno - určitá vlastnost bakterie se projeví na vzhledu kolonie. Do této skupiny patří i půda, která je mezi klinikomikrobiologickými půdami úplně nejdůležitější:

- Krevní agar je živý agar s přísadkou ovčích červených krvinek. Využívá se toho, že patogenní druhy bakterií většinou rozkládají červené krvinky (úplná nebo neúplná beta-hemolýza) nebo aspoň mění červený hemoglobin na zelené barvivo (viridace, někdy také alfa-hemolýza). Méně patogenní druhy krvinek nemění (žádná hemolýza, také "gamma-hemolýza").
- VL-agar je pozměněný krevní agar pro anaerobní bakterie.

Selektivní půdy jsou takové, na kterých "roste jenom něco". (Podobně jako u tekutých, selektivně pomnožovacích půd). Patří sem např.:

- Krevní agar s 10 % NaCl - je selektivní pro stafylokoky. Ostatní klinicky významné bakterie tak vysokou koncentrací NaCl nesnášejí. Je to logické - stafylokoky žijí na (zpotené) kůži.

Selektivně diagnostické půdy v sobě spojují vlastnosti obou předchozích. Jinak řečeno, jedny bakterie na nich nerostou, druhé bakterie rostou v určitých koloniích další zase v koloniích jiného vzhledu.

- Endova půda má svoji selektivní vlastnost. Ta spočívá v tom, že na ní rostou pouze gramnegativní (G-) bakterie. Má ale také diagnostickou vlastnost. Bakterie, které štěpí

laktózu, na ní mají tmavočervené kolonie a tmavočervená je i půda v okolí kolonií. Laktózu neštěpící bakterie tvoří kolonie bledé. Příčinou je indikátor – Schiffovo činidlo

- Půdy XLD a MAL se používají k diagnostice salmonel.

Obohacené půdy jsou bohaté na živiny. Jsou určeny k pěstování náročných bakterií, které hned tak na něčem nevyrostou - například hemofily nebo původce kapavky.

- Čokoládový agar je vlastně krevní agar zahřátý asi na 80 °C. Přestože se do něj oproti krevnímu agaru nic nepřidává, je obohacený tím, že různé látky z krve v něm volně plavou a jsou tedy pro bakterie mnohem lépe dostupné.
- Levinthalův agar je přefiltrovaný čokoládový agar. Je téměř bezbarvý, přesto je funkčně hodně podobný předchozímu.

Speciální půdy mají své zvláštní určení.

- Müllerův-Hintonové agar je určen k testování citlivosti bakterií in vitro na antibiotika.

Jak se kultivuje na pevných půdách

1. Na povrch půdy naneseme část vzorku nebo několik kolonií z předchozí kultivace.
2. Bakteriologickou kličkou toto místo "roztaháme" (rozředíme) po celé misce.
3. Nyní misku umístíme do termostatu, většinou při 37 °C. Většinou kultivujeme 16 - 28 hodin (tedy do druhého dne), někdy ale déle (dva, tři i více dní). Po vyjmutí vidíme na misce kolonie, které můžeme popisovat nebo s nimi provádět další identifikační pokusy.

BIOCHEMICKÁ IDENTIFIKACE

je založena na skutečnosti, že každý druh bakterie produkuje jinou sestavu enzymů. A tak třeba máme bakterii, která třeba umí rozštěpit (pomocí příslušných enzymů) maltózu a sacharózu, ale ne trehalózu, a jinou, která umí štěpit sacharózu a trehalózu, ale ne maltózu. Kombinace vhodného počtu znaků může určit bakterii nejen na úroveň rodu, ale často i druhu.

PRINCIP těchto reakcí je takový, že bakterii je předložen substrát (substráty). Pokud bakterie produkuje enzym(y), dojde k přeměně substrátu (substrátů) na produkt (produkty). V případě, že se produkt(y) liší od substrátu(-ů) barvou, skupenstvím apod., můžeme změnu přímo pozorovat. Pokud změna není viditelná, musí být v reakci přítomen indikátor. Nelze-li indikátor mít v reakci od začátku, přidává se až po proběhlé reakci ve formě činidla.

Katalázová reakce je velmi jednoduchá biochemická reakce, založená na průkazu enzymu katalázy (štěpí peroxid vodíku). Používá se k rozlišování rodů bakterií, např. stafylokoky jsou kataláza pozitivní, streptokoky kataláza negativní. **Provedení:** kolonie bakterie je smíchána s kapkou peroxidu vodíku. V případě positivity kapka šumí - vznikají bublinky kyslíku. Výhodou je, že výsledek je viditelný během několika vteřin. Indikátor není třeba (bublinky jsou viditelné).

Reakce na diagnostických proužcích (stripech). Tyto reakce se také dají odečíst velmi rychle - během vteřin či nejpozději minut. Používá se plastových diagnostických proužků, jejichž reakční ploška se zvlhčí a přitiskne na kolonie testované bakterie. Po určité době (a někdy ještě po přikápnutí činidla) se pak sleduje, jestli na reakční plošce dojde k vývoji typického zbarvení (např. modrého, modrozeleného, červeného).

Testy ve zkumavkách. Jednoduché testy obsahují substrát (např. cukr) a indikátor. Do substrátu se vmíchá suspenze bakterie a inkubuje se přes noc. Když je reakce pozitivní, dojde k barevné změně; když je negativní, ke změně nedojde. Složitější testy využívají vícesubstrátových směsí. Barevná změna pak může být např. jiná u hladiny (prsteneček určité barvy) a jiná v hloubce.

Testy v plastové mikrotitrační destičce („panelu“)

V podstatě jde o sérii miniaturizovaných jednoduchých zkumavkových testů. Bez ohledu na konkrétní podobu jednotlivých destičkových testů (liší se podle výrobce, nové výrobky od starších apod.) je princip prakticky vždy stejný: na dně důlků jsou lyofilizované substráty (případně substráty s indikátorem), do důlků se přikápnou suspenze bakterie a destička se nechá inkubovat (obvykle přes noc). Poté se hodnotí, u kterých testů došlo ke změně barvy. Hodnotí se to pouhým okem nebo automaticky - čtecím zařízením na principu spektrofotometru. Hodnotí se zpravidla najednou 8 – 30 různých biochemických reakcí.

POKUS NA ZVÍŘETI

Pokus na zvířeti býval důležitou součástí diagnostiky v začátcích mikrobiologie. Šlo tehdy i o to, prokázat, zda příslušný mikrob vůbec je původcem nemoci – naočkoval se tedy pokusnému zvířeti a čekalo se, zda také u zvířete propuknou příznaky podobné těm u pacienta.

V některých případech se podobně postupuje dodnes. Nejčastěji se používají myši, morčata, potkani, králíci. Význam pokusu na zvířeti klesá s rozvojem modernějších metod i s tím, jak si lidé stále více uvědomují, jak je jeho využívání eticky problematické.

Zvířata (hl. hospodářská) se ovšem v mikrobiologické diagnostice uplatňují i jinak, např. jejich séra jsou zdrojem protilátek, z jejich krvinek se připravují krevní agary (nejčastěji s ovčími, ale i např. s hovězími či koňskými erytrocyty) apod.

PRŮKAZ ANTIGENU

Jedná se o metodu přímého průkazu, avšak způsob provedení je shodný s nepřímým průkazem (průkazem protilátek) - v obou případech se hovoří o tzv. sérologických reakcích. Ty budou proto probrány v další části diagnostiky.

PRŮKAZ NUKLEOVÉ KYSELINY

Průkaz nukleové kyseliny (většinou průkaz DNA, občas i RNA) je moderní metoda, která umožňuje identifikovat i malá množství mikrobů, mikroby usmrcené, nebo dokonce mikroby, u kterých se nezachovala kompletní buňka či virová částice. Někdy je ovšem tento zvýšený záchyt spíše na škodu. Navíc je to metoda pořád ještě hodně drahá a náročná. Používá se proto jen u mikrobů, u kterých klasické metody nelze použít, nebo jsou příliš pomalé.

Průkaz NA se dělí na **metody bez amplifikace** (klasické genové sondy) a **metody s amplifikací (namnožením) určité sekvence nukleové kyseliny**. Nejpoužívanější je dnes POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE (PCR). Podrobnější popis zde neuvádíme, neboť metoda se široce využívá i mimo mikrobiologii.

METODY NEPŘÍMÉHO PRŮKAZU (průkazu protilátek) A PRŮKAZU ANTIGENU

Tyto takzvané sérologické metody jsou metody pracující s reakcí ANTIGEN - PROTILÁTKA (za vzniku komplexu). V užším slova smyslu se někdy za sérologické považují pouze ty reakce, kde se jako vzorek používá sérum, popřípadě reakce, kde se hledá protilátka.

Jednotlivé sérologické metody se od sebe liší pouze způsobem, jak je detekován komplex antigenu s protilátkou. Všechny se však dají použít ke všem účelům, dále uvedeným:

- **Průkaz antigenu pomocí protilátky** - použije se laboratorní protilátka (ze séra pokusného zvířete) a smíchá se
 - buďto se vzorkem pacienta, ve kterém hledáme antigen – jde o **přímý průkaz antigenu**
 - nebo s kmenem, vypěstovaným z pacientova vzorku – jde o **identifikaci, antigenní analýzu**
- **Průkaz protilátky pomocí antigenu** - použije se laboratorní antigen a smíchá se s pacientovým sérem

VE VŠECH PŘÍPADECH PLATÍ, ŽE:

- pokud vznikl komplex antigen-protilátka, je reakce pozitivní
- pokud komplex nevznikl, je reakce negativní, něco v ní chybí

Přehled sérologických metod

- Precipitace
- Aglutinace
- Komplementfixační reakce
- Neutralizace
- Reakce se značenými složkami:
 - Imunofluorescence (IMF)
 - Radioimunoanalýza (RIA)
 - Enzymová imunoanalýza (EIA, ELISA)
 - Imunoblotty

Nespecifické antigeny a heterofilní protilátky. U většiny serologických reakcí se pracuje se specifickými antigeny - například s antigenem spalniček u protilátek proti spalničkám, se stafylokokovým antigenem u protilátek proti stafylokokům apod. Někdy je ale výhodné při nepřímém průkazu použít místo skutečného mikrobiálního antigenu nějakou levnější a bezpečnější látku, o které je známo, že je také schopna vázat příslušnou protilátku: používají se např. červené krvinky všelijakých zvířat při průkazu infekční mononukleózy (Paul-Bunnellova reakce). Hovoří se pak o nespecifickém antigenu.

Někdy se také prokazují protilátky, které nejsou namířeny přímo proti mikrobu, ale proti nějaké molekule, která se uvolňuje z tkání změněných infekcí. Takovou látkou může být například kardiolipin - extrakt z hovězích srdcí při průkazu syfilis. Protilátky, které se s takovým nemikrobiálním antigenem spojují, se označují jako heterofilní protilátky.

Jak zjistit u nepřímého průkazu, jestli se jedná o akutní infekci?

Zatímco přímý průkaz (včetně průkazu antigenu a antigenní analýzy!!!) vždy dokazuje přítomnost mikroba, u nepřímého průkazu tomu tak není. Přítomnost protilátek pouze svědčí o tom, že se organismus někdy s mikroblem setkal. Přesto je možné aspoň s určitou pravděpodobností říci, jestli se o akutní infekci jedná, nebo jestli jsou protilátky nalezené v séru pacienta jen následkem infekce překonané dříve. Je potřeba využít některého z následujících tří způsobů:

- **Zjišťujeme, jaké je množství protilátek v séru a jestli se mění.** Využívá se toho, že v akutní fázi infekce množství protilátek prudce stoupá, pak zase klesá, a nakonec se udržuje na stálé, nízké hladině. Je ovšem těžké zjistit množství protilátek v séru absolutně (v gramech, v molech). Logicky ale - pokud je v séru hodně protilátek, můžeme takové sérum mnohonásobně zředit a pořád ještě bude reagovat s antigenem. Pokud je protilátek málo, bude reagovat jenom neředěné či málo ředěné sérum. Proto se připravují různá ředění séra (většinou geometrickou řadou: 1 : 10, 1 : 20, 1 : 40, 1 : 80 atd.) a všechna se míchají s antigenem. Tím získáme číslo zvané TITR, které udává, kolikrát se dá sérum zředit, aby ještě reagovalo s antigenem. Důležitý ale nebývá samotný titr, ale jeho změna během dvou či tří týdnů. Pokud během se během této doby titr zvýší aspoň čtyřikrát (= o dvě ředění, například z 20 na 80), jde velmi pravděpodobně o akutní infekci. Pouhé dvojnásobné zvýšení (= o jedno ředění) může být náhodné.
- **Zjišťujeme, k jaké třídě patří nalezené protilátky** - to ovšem umožňují pouze reakce se značenými složkami. Převaha IgM nad IgG svědčí pro akutní infekci
- **Zjišťujeme tzv. aviditu**, to je síla vazby protilátky na antigen. Čerstvé protilátky (u akutní infekce) bývají nízkavidní. Tato metoda je poměrně nová a zatím se příliš nepoužívá.

Precipitace a aglutinace jsou nejjednodušší metody, protože kromě antigenu a protilátky už v systému nemusí být nic jiného. Bývají ale méně přesné a dají se použít jen v některých případech. Komplex se projeví sám jako sraženina (precipitát nebo aglutinát).

Rozdíl mezi precipitací a aglutinací spočívá v tom, že u **precipitace** je antigen povahy koloidní (jako antigen vystupují jednotlivé makromolekuly), kdežto u **aglutinace** je povahy částicové - korpuskulární (jako antigen vystupují větší částičky, například celé bakterie). **Aglutinace na nosičích** je zvláštní případ, vlastně precipitace převedená na aglutinaci. Používá se tam, kde máme koloidní antigen, ale potřebovali bychom korpuskulární. Řeší se to tak, že antigen navážeme na vhodnou částici. Jako částice se používají latexové částice - pak se jedná o latexaglutinaci nebo červené krvinky - pak se jedná o hemaglutinaci (např. TPHA na syfilis).

Komplementfixační reakce je mnohem složitější než předchozí dvě. Používá se při ní komplement, což je **přirozená složka humorální nespecifické, ale vlastně i specifické imunitní reakci**. Každé sérum obsahuje komplement. Pro komplementfixační reakci se ovšem nedá použít vlastní komplement pacienta, protože jeho množství je nejisté. Proto se vlastní pacientův komplement před reakcí inaktivuje, a do reakce se přidává komplement morčecí.

V **první fázi** ke dvěma složkám (laboratorní antigen plus sérum od pacienta - nebo laboratorní protilátka plus vzorek, ve kterém předpokládáme antigen) přidáme komplement. Pokud je reakce pozitivní, komplement se naváže na komplex antigenu s protilátkou. Pokud je reakce negativní, komplement je volný. Na komplementu je zajímavé to, že se neváže ani na samotnou protilátku, ani na samotný antigen - pouze na komplex, který z antigenu a protilátky vznikl. Právě proto se používá v rámci diagnostiky - pokud se komplement naváže, je jisté, že došlo ke vzniku komplexu. Problém je ale v

tom, že navázání komplementu na komplex antigen-protilátka není samo o sobě vidět. Proto musí mít komplementfixační reakce ještě **druhou fázi**.

Nyní přidáme do reakce tzv. indikátorový systém. Je to soustava známého antigenu (beraní erytrocyty) a známé protilátky (takzvaný amboceptor - králičí protilátka proti beraním erytrocytům). Tato soustava má jednu zajímavost: když se na ni naváže komplement, dojde k hemolýze erytrocytů. No a v tom je právě onen vtip: pokud se v první fázi všechny komplement vyvázel na soustavu antigen - protilátka, nezbyl žádný volný komplement a indikátorový systém zůstane nedotčen. Pokud ale byla reakce negativní, zůstal komplement volný, váže se na indikátorový systém a hemolyzuje ho. Znamená to, že hemolýza svědčí o negativitě reakce, nepřítomnost hemolýzy o pozitivitě.

KFR je běžně používaná zejména ve virologii, případě též v diagnostice hub a parazitů, méně často i bakterií. Ve virologii je to jedna z nejběžnějších metod u většiny běžných virů.

Neutralizační reakce. V případě VIRŮ, které jsou malé, protilátka kromě různých dalších mechanismů účinku působí i přímo: virus má zásluku na nějakou buňku či krvinku, které by rád provedl nějakou neplechu (u krvinok např. hemolýzu nebo hemaglutinaci), ale protilátka mu v tom zabrání. BAKTERIE jsou příliš velké na to, aby je mohla protilátka přímo inaktivovat. Co však protilátka nezmůže s bakteriemi, zmůže s jejich toxiny.

Neutralizační reakce se tedy používají nejčastěji ve VIROLOGII. Dají se použít také v BAKTERIOLOGII, ale většinou jenom v případě, že bakterie produkuje nějaký toxin; neutralizováno je působení toxinu, nikoli působení samotné bakterie. Výjimkou může být např. neutralizace pohyblivosti bakterie (u jedné ze starších diagnostických reakcí u syfilis).

Antigenem v neutralizační reakci je tedy zpravidla virus nebo bakteriální toxin.

Některé příklady:

- **ASLO - antistreptolysin O.** Prokazujeme protilátku proti streptokokovému toxinu. V tomto výjimečném případě nám nejde ani tak o toxin, ale o protilátku jako takovou - ona totiž často nespecificky reaguje s endokardem či ledvinnými glomeruly, vedouc tak k revmatické horečce či glomerulonefritidě. Antistreptolysin O neutralizuje lýzu červených krvinek, kterou by normálně provedl streptolysin O: to znamená, že v případě pozitivit (protilátka JE přítomna) nedojde k hemolýze, v případě negativit (protilátka NENÍ přítomna) k hemolýze dojde.
- **Hemaglutinačně inhibiční test a virusneutralizační test** se používají ve virologii, i když jejich význam klesá s rozvojem jiných metod.

Reakce se značenými složkami. Principem těchto reakcí je nepřerušovaný řetězec, jehož články jsou antigeny a protilátky; ne vždy je to jen jeden antigen a jedna protilátka. Řetězec začíná nějakým pevným povrchem (sklíčko, dno důlku) na který se naváže některá složka reakce, a končí - v pozitivním případě - nějakým "značidlem", které pak může být detekováno. Poslední složka, na kterou je "značidlo" navázáno (nakonjugováno - bývá to obvykle protilátka), se zpravidla označuje jako **konjugát**. V případě negativním jeden článek řetězku chybí, a proto všechny další, nejsou pevně svázány s povrchem, mohou být - a také jsou - vyplaveny při takzvaném "promývání". Promývání se dělá po každém novém kroku. Tímto způsobem nakonec skončí ve výlevce i to "značidlo". Jako „značidla“ se používají:

- Fluorescenční barvivo. V takovém případě je povrchem zpravidla podložní sklíčko a výsledný efekt je detekován prostřednictvím fluorescenčního mikroskopu. Výhodou je, že vidíme např. tvar bakterie. Hovoříme o imunofluorescenci.
- Radioizotop. V tom případě se efekt pozoruje pomocí vhodného přístroje k detekci radioaktivity. Metoda je náročná, vyžaduje laboratoř vybavenou pro práci s radioaktivním materiálem. Používá se dnes poměrně málo. Metoda se nazývá radioimunoassay či radioimunoesej, zkráceně RIA
- Enzym. V tom případě musí následovat ještě další fáze, ve které se přidá substrát reakce. Pokud je "značidlo" v podobě eznyu přítomno, dojde k rozštěpení substrátu na produkt, který se buďto liší barvou, nebo jej lze identifikovat s využitím indikátoru. Povrchem tu bývá dno důlku v panelu a celá reakce se dá snadno automatizovat: čím silněji reakce proběhla, tím intenzivnější je barevná změna, a tato intenzita barevné změny je měřitelná jako absorbance ve spektrofotometru. Nejběžnější variantou této reakce je reakce ELISA - je to zkratka a znamená enzym linked immuno sorbent assay.

ELISy se postupně staly standardními vyšetřovacími metodami u velkého množství mikrobů, nahradily starší a méně přesné metody.

Imunobloty jsou vlastně speciálním případem reakce ELISA. Od klasické ELISy se výrazně liší metodou přípravy antigenu.

U klasické ELISy se prostě použije celý mikrob, a s ním pak mají možnost reagovat všechny protilátky, které jsou kompatibilní s kterýmkoli z antigenů, který se na povrchu mikroba nalézá. Takových antigenů tam může být mnoho.

Někdy je ale výhodné pracovat se skutečnými jednotlivými antigeny. Je to především tehdy, kdy máme několik příbuzných mikrobů, které mají některé antigeny shodné a jiné odlišné.

Imunoblotová technika nám umožní antigeny navzájem oddělit a dopídit se zjištění, který z nich vlastně reagoval.

Antigeny jsou uvolněny z povrchu mikroba, rozděleny elektroforézou podle své hmotnosti a pak, opět elektroforeticky, přeneseny na speciální fólii. V tu chvíli pak začnou fungovat jako "běžný" antigen v reakci ELISA, dále už je to tedy všechno stejné.

Metoda se používá například u borrelií - existuje jich několik druhů, které jsou antigenně příbuzné, ale ne totožné.

Automatizace u serologických metod. Velkou výhodou zejména moderních metod, jako jsou ELISy a Western bloty, je možnost automatizace. Dnes již existují automaty, které jsou schopny celou reakci provést samy - hlídají potřebné časy reakcí, přidávají činidla, promývají apod. *Takto funguje např. přístroj "Elisamat", kterému se na mikrobiologii u sv. Anny začalo říkat "Kryštofek", protože jedna jeho část je od firmy Columbus. Ze začátku s ním byly jisté problémy, např. do reakce omylem přidal etanol namísto kyseliny sírové. Toto dokumentuje následující píseň s názvem "Kryštofek".*

1. Ten den všechno chystalo se na velikou slávu
jako kdyby měli přivést posvátnou nám krávu
Chyběly jen prapory a duo Lábus - Kaiser
když měl přijít na serolku slavný minilyzer
Škatulata hejbala se v nebývalé míře
neboť místo dělalo se pro posvátné zvíře
Od těch dob co dorazilo to památné ráno
Všichni se s ním spřátelili, Kryštofek je zváno.

**R. Kryštofek nám denně mění všední chvíle v svátky
neobjeví Ameriku, zato protilátky.**

**/:Bez Kryštofa byli bychom ubožáci málem
Kryštofek je našim velkým elisovým králem!:/**

2. Bohužel se naše zvíře z kovu skla a plastu
oddávati začalo nám z ničeho nic chlastu.

Zkrátka místo vitriolu líh mu lépe chutná
Serolka i virolka je z toho celá smutná.

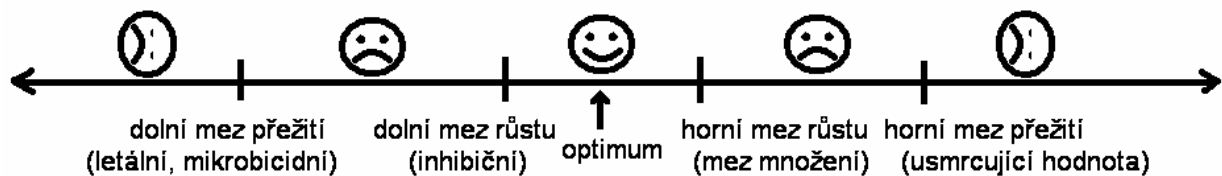
Kryštofek je náročný a ošidit se nedá
a ta jeho obsluha je učiněná věda

Ti co máme rodiny to celkem dobře chápem

S Kryštofkem je stejná práce jak má žena s chlapem **Refrén**

Téma 3 Desinfekce a sterilizace

Baktérie a vnější prostředí



Baktérie (a podobně i ostatní mikroby) jsou velmi citlivé na změny vnějšího prostředí. Na ose, znázorňující kvantitu nějakého faktoru (třeba pH či teplotu), můžeme určitou hodnotu definovat jako optimální. To je hodnota, při níž se baktériím daří nejlépe. Když se hodnota zvyšuje nebo snižuje, narazíme nejprve na inhibiční mez, kdy je inhibován (zastaven) růst baktérií, a nakonec na baktericidní mez, kdy jsou mikroby nevratně ničeny (usmrceny). Faktorem, o němž je řeč, může být kromě teploty také třeba tlak, vlhkost, koncentrace nějaké chemické látky apod. Pokud hovoříme o nějaké chemické látce, která baktériím škodí (desinfekční činidlo, antibiotikum – viz dále), používají se pro výše uvedené meze pojmy minimální inhibiční koncentrace a minimální baktericidní koncentrace.

Faktory se navzájem kombinují; přinejmenším se vždycky kombinují s časem. Proto vyšší teploty ničí baktérie za kratší dobu, než teploty nižší. - Lékařsky významné baktérie jsou obvykle nastaveny na podmínky, jaké mohou naleznout v lidském (nebo zvířecím) organismu: 37 °C, 0,9 % NaCl apod. Baktérie s optimem kolem 37 °C se nazývají mezofilní, ty, které mají optimum vyšší, termofilní, pokud nižší, jsou psychrofilní.

Praktický význam těchto mezí:

- 1. Baktericidní meze** jsou významné pro boj s mikroby (sterilizace, desinfekce) - hodnoty působících faktorů musí být nastaveny tak, aby byly baktérie usmrceny.
- 2. Inhibiční meze a optimální hodnoty** jsou důležité pro pěstování (kultivaci) baktérií. Je důležité vědět, že různé baktérie se liší (často velmi podstatně) ve svých nárocích na teplotu, vlhkost, koncentrace solí apod. Jednak je při kultivaci konkrétní baktérie důležité vytvořit jí vhodné podmínky, jednak lze rozdílů mezi druhy a rody baktérií použít také při jejich určování (roste na půdě s vysokou koncentrací solí? je to stafylokok; neroste tam? není to stafylokok). Inhibiční mez u antimikrobiálních látek (minimální inhibiční koncentrace) je důležitá pro antimikrobiální léčbu.

Dekontaminační metody

jsou fyzikální a chemické postupy určené především k likvidaci zdraví ohrožujících organismů - mikrobů (sterilizace, vyšší stupeň desinfekce, desinfekce), hmyzu (desinsekce) a hlodavců (deratizace). Některými metodami se ovšem zlikvidují všechny (mikro)organismy. Při použití všech těchto metod je důležité dodržení několika zásad. Je nutno především:

- Vybrat **vhodnou sterilizační/desinfekční metodu nebo prostředek**. Pojem "vhodný" znamená:
 - musí bezpečně ničit ty organismy, které připadají v daném prostředí v úvahu
 - nesmí ničit desinfikovaný či sterilizovaný materiál (povrch, pokožku...)
 - musí být prakticky použitelný (z ekonomických hledisek, provozních apod.)
- Použít **dostatečnou intenzitu faktoru** - dostatečnou teplotu, intenzitu záření, dostatečnou koncentraci přípravku apod.
- Příslušný **faktor musí působit dostatečně dlouho** (často se nedodržuje - sestra potřebuje kůži desinfekcí a hned už píchá injekci!).

Protože koncentrace, teploty a působení jsou u každé metody a u každého prostředku jiné, je vhodné mít po ruce dostatečně čerstvý přehled těchto čísel. Vhodná je např. knížka Desinfekce a sterilizace, vydaná před časem nakladatelstvím Grada. Dobré je také mít k dispozici platnou vyhlášku. Je potřeba zjistit, zda se metoda hodí pro účel, pro který ji chceme použít, jaké se

užívají hodnoty působícího faktoru (teploty, koncentrace) a jaký čas je předepsán pro jeho působení (u desinfekce je někdy místo přesného časového údaje udáno „do zaschnutí“ – to ovšem znamená, že prostředek je skutečně nutno nechat zaschnout!). U desinfekce je velice důležitý údaj o spektru účinku – např. A = bakterie a kvasinky, B = bakteriální spory, C = viry apod. U sterilizace není údaj nutný, protože z principu sterilizace musí být vždyničeno všechno. **STERILIZACE.** Je to postup (obvykle fyzikální), kterým jsou zničeny všechny mikroby (včetně virů, hub a bakteriálních spor). Nejčastěji se používá:

1. Sterilizace **horkou parou pod tlakem** (autoklávování). Pára musí být právě nasycená (to znamená, že kdyby obsahovala jen nepatrně více vody, začala by se voda srážet). Hodí se na předměty ze skla, kovu, keramiky, kameniny, porcelánu, textilu, gumy a některých plastů. Teploty kolem 115 – 134 °C.
2. Sterilizace **horkou vodou pod tlakem** - pouze u chirurgických nástrojů k okamžitému použití. Málo se používá také sterilizace **horkým olejem**.
3. Sterilizace **horkým vzduchem** (u přístrojů s nucenou cirkulací vzduchu 180 °C 20 minut nebo 170 °C 30 minut nebo 160 °C hodinu). Hodí se na kovy, sklo, porcelán a kameninu.
4. Sterilizace **ohněm** se používá prakticky jen u mikrobiologických klíčků, protože většinu materiálů silně poškozuje. Spalování se hodí u odpadů.
5. Sterilizace **gama zářením**: používá se pouze při průmyslové výrobě, např. rukavic na jedno použití.
6. **Chemická sterilizace parami** formaldehydu nebo ethylenoxidem (musí být přesně dodržen postup). Používá se tam, kde nelze použít fyzikální metody.
7. **Paskalizace** je sterilizace tlakem v potravinářství
8. **Ostatní metody: frakcionovaná sterilizace, filtrace roztoků aj.** jsou speciální, používají se výjimečně

VYŠŠÍ STUPEŇ DESINFEKCE je nový pojem, který znamená "něco mezi sterilizací a desinfekcí". Tento postup na rozdíl od sterilizace nemusí zničit například cysty prvoků nebo vajíčka červů. Používá se **glutaraldehydu, Sekuseptu** nebo **Persterilu** (vyhláškou je dáno, jaké koncentrace je potřeba použít - vždy jsou vyšší než pro běžnou desinfekci). Vyšší stupeň desinfekce slouží například k ošetřování flexibilních endoskopů s vláknovou optikou, popř. i jiných přístrojů, u kterých nelze použít žádné metody sterilizace.

DESINFEKCE. Je to chemický nebo i fyzikální postup, kterým se ničí původci nemocí. Obvykle však nejsou ničeny všechny mikroby. Dobrá desinfekce je taková, která ničí všechny PATOGENNÍ mikroby, které se v daném prostředí vyskytují. Dobrá desinfekce tedy nemusí postihovat původce tuberkulózy, pokud se v daném místě nevyskytuje. Stejně provedená desinfekce v tuberkulózní léčebně by ovšem byla desinfekcí špatnou.

A. FYZIKÁLNÍ METODY

1. Var: a) za normálního tlaku - ve zdravotnictví alespoň 30 minut. V kuchyni i méně, ale jídlo se musí provařit (i uvnitř!), b) v tlakových hrncích - zkrácení času - ani v tom případě však nejde o sterilizaci!!!
2. Jiné fyzikální metody - filtrace, žhání, slunění, UV záření apod.

B. DESINFEKČNÍ PROSTŘEDKY

- **Oxidační činidla**
3. Výborné jsou **peroxydy**, zvláště kyselina peroctová (CH_3COOOH , u nás Persteril). Působí i na spory, houby, a tuberkulózu; 0,5 % roztok spadá pod pojem vyšší stupeň desinfekce. Nevýhodou je agresivita na sliznice i materiály, např. kovy, odbarvování textilií a nestabilita roztoků.
 4. Peroxid vodíku (H_2O_2) - podobný, méně agresivní, také ale méně účinný.
 5. Dobré jsou i **halogenové preparáty**. Z chlorových je to chlornan sodný (NaOCl), u nás Savo s všestranným použitím. Také chlornany jsou bělidlem. Chlornan vápenatý ($\text{Ca}(\text{OCl})_2$; chlorové vápno) se hodí k hrubé desinfekci velkých ploch. Dříve se sypal do suchých záchodů, avšak hygienický přínos byl sporný a ekologický negativní.
 6. Chloramin je prášek (Chloramin B; Chloraminy BM a BS jsou s přísadami).

7. Jodovou tinkturou se ošetřovaly drobných rány. Pak se zjistilo, že alergizuje a je agresivní, dnes se ale ukazuje, že to zase není tak hrozné. Přesto lepší jsou prostředky jako je Jodonal B a Jodisol, kde je jód vázán v komplexu. Jodonal B by měl dostat u nealergických pacientů před Ajatínem při ošetřování chirurgických ran.
8. Manganistan draselný se již neužívá.
 - **Alkoholy, fenoly a aldehydy**
9. Formaldehyd se samotný používá spíše jako konverzační činidlo a k uchování očkovacích látek. Často se však aldehydy (vedle formaldehydu především glutaraldehyd) používají ve směsích, např. s tenzidy.
10. Kresol (lysol) je účinný, pro zápach a agresivitu se již téměř neužívá.
11. Ethylalkohol není příliš účinný; když už, tak nejúčinnější je asi 70 % vodný roztok, koncentrovaný je neúčinný. Ani zapálením etanolu není dostatečně účinné a navíc hrozí požárem.
 - **Kvarterní amonné soli a tenzidy**
12. Orthosan BF 12 k desinfekci např. povrchů - pozor, některé jiné Orthosany nejsou desinfekční prostředky, např. Orthosan BF 40 je na vši!
13. Ajatin - běžný pro desinfekci pokožky. Není agresivní a nealergizuje. Jeho účinnost nedosahuje parametrů oxidačních činidel.
14. Septonex se užívá na kůži, nejen jako desinfiens, ale také jako antiseptikum. Při dlouhodobém používání je ale pravděpodobně karcinogenní.
 - **Anorganické kyseliny a louhy** - hrubá df. v zemědělství a průmyslu
 - **Těžké kovy** - zřídka, např. k ochraně budov před plísněmi - Lastanox
 - **Kombinované přípravky**

Např. Incidur, Spitaderm, Sterilium, jinak nemá smysl uvádět konkrétně, neboť se stále mění. Nových desinfekčních prostředků se objevuje stále mnoho. Upoutávají moderními obaly a vůní, ne všechny jsou ale účinné, někdy jde vlastně jen o tekuté mýdlo a ne o desinfiens. Je vždycky potřeba zjistit konkrétní údaje o tom, k čemu se prostředek hodí, na které mikroby je účinný, v jaké koncentraci se používá. V případě pochyb se lze obrátit o radu na nejbližší hygienickou stanici.

Desinsekce a deratizace se někdy také řadí k dekontaminačním metodám.

Příprava před dekontaminací a uchování dekontaminovaných předmětů

Před dekontaminací. Chirurgické nástroje jsou často mechanicky znečištěny a musí se před desinfekcí umýt. Pozor!!! Mytí = odplavení nečistot, kdežto desinfekce = usmrcení patogenů! Mechanická očista obvykle předchází před desinfekcí. Výjimkou je desinfekce rukou kde je to naopak (jinak by se infekční částice rozprašovaly proudem vody).

Po dekontaminaci. Při použití par (formaldehydových, persterilových...) je nutno předměty řádně odvětrat. Je také nutno dbát na omezenou trvanlivost různých dekontaminačních postupů. Například v papírových sáčcích vydrží předměty sterilní 3 měsíce, je-li sáček uzavřen lepením, avšak jen 4 týdny, je-li uzavřen pouze sešíváčkou. To vše stanoví vyhláška.

Kontrola účinnosti dekontaminace

Orientačně - smyslově - např. pomocí charakteristického zápachu

Stanovení skutečné koncentrace desinfekčních prostředků (chemicky)

Chemická kontrola sterilizace využívá indikátorů, které při určité teplotě mění vlastnosti (např. zbarvení). Způsob biologický užívá odolné kmeny *Bacillus subtilis* či *B. stearothermophilus*.

Mechanická očista (omývání)

nemůže nahradit desinfekci, ale také naopak desinfekce nemůže nahradit omytí. Mechanické nečistoty brání prostupu desinfekčního prostředku či třeba par formaldehydu na správné místo, proto je sterilizace či desinfekce bez omytí zbytečná. Viz též "Příprava před/po dekontaminací".

Asepsa a antisepsa jsou pojmy, které souvisejí s pojmy jako desinfekce, sterilizace apod., ale nesou v sobě jiný úhel pohledu. Nejde tu o to, který škodlivý organismus (všechny mikroby, patogenní mikroby...) má být zničen, ale o to zda jde o pasivní či aktivní přístup.

ASEPSE vychází z toho, že dané prostředí je primárně sterilní či přinejmenším zbavené patogenů. Aseptické postupy jsou tedy takové, které pasivně brání vniknutí infekce do takového prostředí. Patří sem vše od stavebního uspořádání operačních traktů (odděleně od ostatního nemocničního provozu) přes používání důsledně jednorázových nebo sterilizovaných nástrojů a materiálů až po režimová opatření. Asepticky se ale musí pracovat nejen na oddělení u pacienta, ale i v laboratoři při zpracování vzorků - cílem je nekontaminovat vzorek mikroby z prostředí, což by znamenalo falešné (falešně pozitivní) výsledky

ANTISEPSE zahrnuje postupy, které aktivně zasahují proti infekci. Mohu sem patřit postupy desinfekce a sterilizace, ale v podstatě i používání antiseptik, které jinak řadíme spíše mezi používání antimikrobiálních látek než mezi dekontaminační postupy.

Téma 4 Antimikrobiální látky

Přehled antimikrobiálních látek

- **Antibiotika** - proti bakteriím, produkty bakterií nebo hub
- **Antibakteriální chemoterapeutika** - proti bakteriím, syntetická
- **Antituberkulotika** - proti bacilům tuberkulózy (ty se hodně liší od jiných bakterií)
- **Antivirotika** - proti virům
- **Antimykotika** - proti houbám
- **Antiparazitární látky** - proti parazitům
- **Antiseptika** - k lokální léčbě různých infekcí
- LÁTKY (primárně) BAKTERICIDNÍ - při běžně používaných koncentracích mikroby zabíjejí. Používají se i u těžkých stavů
- LÁTKY (primárně) BAKTERIOSTATICKÉ - při běžně používaných koncentracích inhibují růst, zbylé mikroby pak postupně hynou

Rozdělení antimikrobiálních látek

- PENICILINY působí na buněčnou stěnu bakterií, jsou baktericidní (bakterie zabíjejí), dobře se kombinují s aminoglykosidy, nesmějí se kombinovat s makrolidy, tetracykliny, chloramfenikolem a linkosamidy (navzájem snižují svůj účinek). Nejsou téměř toxické, ale mohou vyvolávat alergie. Toto vše platí i pro cefalosporiny a nové penemy.
 - *Klasické*: **penicilin** - účinný například na angíny
 - *Protistafylokokové*: **oxacilin** - pouze na stafylokoky
 - *Širokospektré* - působí i na gramnegativní tyčinky. Nejstarší z nich je **ampicilin**. Podobný je také **amoxycilin** (AMOCLEN, DUOMOX).
 - *Kombinace s inhibítořem betalaktamáz* – viz dále, např. kyselina klavulanová v kombinaci s amoxycilinem (AUGMENTIN, AMOKSIKLAV).
 - *Protipseudomonádové* např. **tikarcilin**
- CEFALOSPORINY jsou účinné proti G+ kokům (hlavně první generace) a G- tyčinkám (hlavně třetí generace)
 - *I. generace*: **cefalotin** (injekční), **cefalexin** (CEFACLEN - tabletový)
 - *II. generace*: nejznámější **cefuroxim axetil** (ZINNAT, ZINACEF)
 - *III. generace*: například **ceftriaxon** (ROCEPHIN, LENDACIN), **cefoperazon** (CEFOBID);
 - *III. generace s inhibítořem betalaktamáz*: **cefoperazon se sulbaktamem**, (působí obdobně jako kyselina klavulanová - SULPERAZON)
 - *IV. generace*: např. **cefepim** (MAXIPIME)
 - *cefamyciny* - příbuzné cefalosporinům: **cefexitin** (MEFOXIN)
- NOVÉ BETALAKTAMY mají velice široké spektrum a používají se jako rezervní, když už nic nepomáhá (zejména karbapenemy)
 - *monobaktamy*, např. **aztreonam**
 - *karbapenemy*, např. **imipenem** (TIENAM)

- AMINOGLYKOSIDY jsou baktericidní. Nevýhodou je, že jsou jedovaté pro sluch a ledviny. Některé se pro jedovatost užívají jen lokálně (**neomycin** - tvoří spolu s bacitracinem FRAMYKOIN). Patří sem např. **gentamicin**, a **amikacin**. Hodí se hlavně na G- mikroby.
- TETRACYKLINY jsou pouze bakteriostatické. (Totéž platí i o dalších třech skupinách.) Jsou jedovaté pro játra a vyvolávají nevolnost. Nesmějí se kombinovat s alkoholem a s mlékem (vápník), ale ani s preparáty Mg, Fe a Zn. Nepodávají se u dětí do osmi let (kvůli vývoji kostí a zubů), těhotných a kojících. Dnes se používají méně, ale na některé mikroby jsou pořád nejlepší. Používá se **tetracyklin**, či **doxycylin**
- CHLORAMFENIKOL je jedovatý pro krvetvorbu, ale má dobrý průnik do mozkomíšního moku.
- MAKROLIDY jsou účinné prakticky jen na G+ bakterie (azithromycin i na hemofily). Nevolnost při užívání I. generace se u II. generace snížila. Používají se mj. při alergiích na peniciliny.
 - I. generace: **erythromycin**
 - II. generace: **clarithromycin** (KLACID), **roxithromycin** (RULID), **azithromycin** (SUMAMED) /stačí znát jeden z nich/
- LINKOSAMIDY jsou rezervní antibiotika. Používají se jen v nemocnici při infekcích kostí a měkkých tkání. Patří sem např. **linkomycin**
- CHINOLONY jsou vlastně chemoterapeutika, nikoli antibiotika. I. a II. generace se hodí jen pro močové infekce (v moči se koncentrují, ve tkáních málo). Od II. generace se nesmějí podávat dětem do 15 let (mají asi vliv na chrupavku).
 - I. generace - **kyselina oxolinová** (DESUROL)
 - II. generace - **norfloxacin** (NOLICIN, GYRABLOCK)
 - III. generace - **ciprofloxacin** (CIPROBAY, CIPRINOL), **ofloxacin** (TARIVID, OFLOXIN)
- OSTATNÍ ANTIBIOTIKA A CHEMOTERAPEUTIKA
 - Sulfonamidy mají omezené použití. Používá se hlavně **sulfametoxazol kombinovaný** s jiným chemoterapeutikem trimetoprimem jako **kotrimoxazol** (SEPTRIN, BISEPTOL). Při léčbě ve stravě zákaz konzumace kyselin (citron) - nebezpečí krystalizace v ledvinách.
 - **Nitrofurantoin** se používá pouze k léčbě močových infekcí. Barví moč na žluto (upozornit pacienta!)
 - **Rifampicin** se používá pouze v kombinaci. Dnes zůstává jako rezervní a k léčbě tuberkulózy
 - **Vankomycin** a **teikoplanin** jsou rezervní antibiotika na G+ mikroby. Jsou značně toxické (ucho, ledviny, krev)
 - **Polymyxiny (polymyxin B a colistin)** jsou značně jedovaté - ten první tak moc, že se používá pouze lokálně (v ORL). Druhý se používá zejména na rezistentní G- tyčinky.
- ANTITUBERKULOTIKA jsou např. **izoniazid** nebo **etambutol**. Vždy se používá kombinace tří nebo čtyř látek, dlouhodobá léčba
- ANTIMYKOTIKA
 - Imidazolová a triazolová: **flukonazol** (DIFLUCAN), **ketokonazol** (NIZORAL) k celkovému, popř. i lokálnímu podání; **kotrimazol** (CANESTEN) pouze k lokálnímu podání. Navzájem se značně liší v účinnosti na různé houby
 - Polyenová: **amfotericin B** - vysoce toxický, pro těžké mykózy - k celkovému podání; **nystatin** (FUNGICIDIN) - k lokálnímu podání
 - Analoga pyrimidinů (látky příbuzné některým cytostatikům **flucytosin** (ANCOTIL) - nutno vždy v kombinaci!!, i u dětí.
- ANTIVIROTIKA
 - proti herpesvirům: např. **acyklovir** (ZOVIRAX, HERPESIN)
 - proti chřipce: např. **amantadin**
 - proti HIV: např. **zidovudin**, další jsou nyní ve vývoji - na vývoji nadějných preparátů se podílí mj. český vědec dr. Holý
- ANTIPARAZITÁRNÍ LÁTKY

- *proti prvokům*: nitroimidazoly - např. **metronidazol** (AVRAZOR); **chinin** a **chlorochin** (na malárii) a spousta dalších
- *proti plochým červům*: např. **niklosamid**
- *proti oblým červům*: např. **pyrvinium**
- ANTISEPTIKA A LOKÁLNÍ ANTIBIOTIKA. Vedle již zmíněného bacitracinu s neomycinem (FRAMYKOIN) se používá mupirocin (BACTROBAN), různé formy SEPTONEXu, ale také spousta dalších látek, používaných jako desinficiencia: JODONAL B, JODISOL. PERSTERIL, **peroxid vodíku**, nebo **chlorhexidin**.

(Poznámka: Názvy látek jsou uváděny jako **generické**, tedy název účinné látky, a případně FIREMNÍ - název konkrétního preparátu; z firemních názvů jsou vybrány jen ty nejběžnější - například kotrimoxazol je dnes u nás registrován pod čtrnácti názvy!)

Mechanismus účinku, vylučování, toxicita – přehled

Působí na: buněčnou stěnu	Peniciliny	baktericidní	vylučování převážně močí (u jednotlivých se může lišit)	Toxicita: nepatrná, zato mohou vyvolávat alergie
	Cefalosporiny			
	Nové b-laktamy			
	Vankomycin			
syntézu proteinů	Aminoglykosidy	bakteriostatické	vylučování převážně žlučí	značná - ušní, močová, popř. nervová
	Tetracykliny			játra, trávení; !zuby!
	Makrolidy			malá (játra, trávení)
	Linkosamidy			malá (trávicí obtíže)
	Chloramfenikol		vylučování převážně ledvinami	!!krvetvorba, tráv., nerv.
nukleové kyseliny	Chinolony	baktericidní		malá, tráv., CNS. !věk!
cytop. membránu	Polymyxiny			velká: nervy, moč. syst.
metabolismus	Sulfonamidy	bakteriostatické		ledviny, GIT a jiné

Pojem MIC

U antimikrobiálních látek platí totéž, co u jiných chemických látek (a podobně i v případě fyzikálních charakteristik): pokud zvyšujeme koncentraci, dosáhneme hodnoty **MIC - minimální inhibiční koncentrace**. Jedná se o koncentraci, při které se bakterie přestanou množit. Jinak řečeno, je to bakteriostatická koncentrace (resp. fungistatická, virustatická).

Pokud koncentraci zvyšujeme dále, dostaneme se na hodnotu **MBC - minimální baktericidní koncentrace**. Při této koncentraci jsou bakterie (či analogicky jiné mikroby) usmrceny.

U **primárně baktericidních antibiotik** je MIC a MBC prakticky totožná, tj. téměř se nestává, že by bakterie nerostly, ale přitom nebyly usmrceny. Naopak u **primárně bakteriostatických antibiotik** je MBC velmi vysoká, mnohem vyšší než MIC. Pro praxi tedy u těchto antibiotik používáme koncentrací, které jsou jen bakteriostatické. Nevadí to, protože se zbylými mikroby si poradí organismus pacienta. Nesmí ale jít o těžký stav, poruchu imunity apod. – tam je nutno vždy používat antibiotika primárně baktericidní.

Při **praktickém používání antibiotik** je známo, že při určitém běžném dávkování se u pacienta vytvoří určitá koncentrace antibiotika. Jde o to, jestli tato koncentrace je alespoň inhibiční. Musíme tedy znát koncentraci antibiotika, které je při běžném dávkování dosaženo v krvi a ve tkáních (s určitou rezervou a zahrnutím individuálních rozdílů) – **breakpoint**. S ním porovnáváme zjištěnou hodnotu MIC. Pokud je breakpoint vyšší než MIC, plyne z toho, že breakpointová

koncentrace je inhibiční a antibiotikum lze použít. Pokud je koncentrace dosahovaná v krvi nižší než MIC, říkáme, že antibiotikum je na danou látku rezistentní - dosahovaná koncentrace není inhibiční. Je-li rozdíl jen malý, dá se problém vyřešit zvýšeným dávkováním; je-li větší, je nutno použít jiné antibiotikum.

Koncentrace dosahovaná v krvi je ovšem určující jen pro některé infekce. U opouzdřených procesů (abscesů) nebo třeba meningitid je nutno počítat s tím, že do místa infekce pronikne méně antibiotika, než do krve. U močových infekcí nemá vůbec smysl brát v úvahu koncentraci antibiotika v krvi - místo toho se MIC porovnává s koncentrací antibiotika v moči.

Problémem také je, že mnohé bakterie žijí na sliznicích ve formě biofilmu. K rozbití biofilmu zpravidla nestačí MIC. Používá se pojem MBEC – minimální biofilm eradikující koncentrace. V praxi se však MBEC (alespoň zatím) nestanovuje, vzhledem k extrémní pracnosti a náročnosti metod, kterými by se to dalo provádět.

Typy rezistencí na antibiotika a jejich mechanismy

Primární a sekundární rezistence

Primární (konstituční) rezistence je společná vždy všem kmenům daného druhu. Je zpravidla dána tím, že stavba mikroorganismu vylučuje, aby na něj dané antibiotikum působilo. Například betalaktamová antibiotika, působící na buněčnou stěnu, nelze použít k léčbě infekcí způsobených mykoplazmaty, protože ta žádnou buněčnou stěnu nemají. Některá antibiotika účinkují jen na grampozitivní nebo naopak jen na gramnegativní bakterie apod.

Sekundární (získaná) rezistence se vyskytuje jen u některých kmenů. Z toho také plyne, že není předvídatelná a musíme ji zjišťovat u každého kmene zvlášť. Sekundární rezistence je umožněna mutacemi na bakteriálním chromosomu nebo plasmidu. Za normálních okolností by se mutace neuplatnila. Pokud ale používáme určité antibiotikum, stane se „umění být necitlivá“ pro bakterii výhodnou a taková bakterie logicky vyhrává v soutěži s ostatními. Nadměrným a zejména nesprávným používáním antibiotik tedy zvýhodňujeme (selektujeme) rezistentní kmeny bakterií. Proto je tak důležité používat antibiotika s rozvahou.

Příklady mechanismů rezistence

Znehodnocení antibiotika ještě než vnikne do buňky (rozštěpení důležité části molekuly, navázání bočního řetězce, který mění antibiotikum v neúčinný metabolit, apod.)

Nevpuštění antibiotika do buňky, například změnou cytoplasmatické membrány

Změnou cílového místa pro působení antibiotika

Betalaktamázy a jejich inhibitory

Asi nejznámějším i nejvýznamnějším příkladem faktoru rezistence jsou různé typy betalaktamáz – jsou to enzymy, které produkují nejrůznější typy baktérií. Betalaktamázy štěpí betalaktamový kruh penicilinových, cefalosporinových a ostatních betalaktamových antibiotik – většinou ale jen některých z nich.

Pro překonání některých typů betalaktamáz se používají takzvané inhibitory betalaktamázy.

Inhibitor betalaktamázy je „falešné antibiotikum“ – málo účinná betalaktamová látka, která je však silně atraktivní pro betalaktamázy. Betalaktamáza se vsyť tím, že rozštěpí betalaktamový kruh inhibitoru, zatímco skutečně účinné antibiotikum zůstává nepoškozené a může působit.

Nejběžnějšími kombinacemi antibiotika + inhibitoru betalaktamázy jsou amoxicilin + kyselina klavulanová, ampicilin + sulbaktam, tikarcilin + kyselina klavulanová, cefoperazon + sulbaktam.

Některé významné typy polyrezistentních kmenů, způsobující často nemocniční infekce

MRSA – methicilin rezistentní stafylokoky. Kvůli změně cytoplasmatické membrány nepouštějí tyto bakterie do svých buněk oxacilin (či methicilin, používaný v některých zemích tak jako oxacilin u nás). Oxacilin je přitom klasické protistafylokokové antibiotikum. Mnohé MRSA jsou rezistentní také na další antibiotika (makrolidy, linkosamidy) a pak už k léčbě zůstávají prakticky jen velmi drahé a toxické glykopeptidy (vankomycin, teikoplanin). Ve světě se bohužel objevily i stafylokoky částečně nebo úplně rezistentní na glykopeptidy (VISA, VRSA).

VRE – vankomycin rezistentní enterokoky. Kmeny enterokoků, které jsou necitlivé na glykopeptidy a zpravidla nejsou citlivé ani na většinu ostatních antibiotik. Léčba je obtížná či nemožná.

Producenti ESBL – gramnegativní bakterie (enterobakterie a gramnegativní nefermentující bakterie), které produkují takzvané širokospektré betalaktamázy. Ani účinek inhibitorů na ně není dostatečný. I v tomto případě zůstává jen velmi omezená škála účinných léčiv. Navíc tyto kmeny často v rámci nemocničních infekcí postihují oslabené jedince, kteří mnohá antibiotika nemohou dostávat vzhledem ke své základní chorobě.

Zjišťování citlivosti na antimikrobiální látky in vitro

Metody zjišťování citlivosti

Zjišťovat citlivost in vitro je vhodné u většiny nálezů patogenních bakterií, pokud se dají kultivovat. Je sice třeba brát v úvahu, že laboratorní výsledky nemusí z různých důvodů stoprocentně souhlasit s výsledky u pacienta, ale přesto je testování in vitro zpravidla mnohem lepší, než nedělat nic.

Nejběžněji se používá difúzní diskový test, který se snadno provádí, ale je pouze kvalitativní a nehodí se pro kmeny od závažných pacientů. U těch se používají kvantitativní testy – E-test anebo mikrodiluční test.

Difúzní diskový test

Na Müllerův-Hintonové agar (nebo jiný agar) se štětičkou plošně naočkuje suspenze bakterie. Pak se nanášejí tzv. antibiotické disky – papírky napuštěné antibiotikem. Pokud mikroob roste až k disku, je rezistentní (necitlivý). Pokud je kolem disku zóna citlivosti, v níž mikroob neroste, a je větší než předepsaná, je citlivý.

V principu jde o to, že antibiotikum difunduje (prostupuje) z disku agarem dál, přičemž jeho koncentrace klesá. Každé vzdálenosti od disku by bylo možno přiřadit určitou koncentraci. "Předepsaná zóna" je vlastně taková, kde koncentrace odpovídá danému breakpointu, tj. koncentraci antibiotika v krvi (viz výše).

(Pro jednoduchost zde mluvíme jen o baktériích; u kvasinek se tento test dělá zředěním, u ostatních mikroobů vůbec.)

E-testy

Jsou to podobné testy, ale místo disku se použije proužek se stoupající koncentrací antibiotika od jednoho konce proužku ke druhému. Antibiotikum opět difunduje, ale zóna tu není kruhová, ale vejčitá. Na rozdíl od předchozího testu se E-testem dá určit MIC (minimální inhibiční koncentrace - tedy nejnižší koncentrace, která zastavuje růst mikroba). Odečítání je jednoduché - na papírku je stupnice, a MIC se odečítá v místě, kde okraj zóny kříží papírek.

Mikrodiluční test

Antibiotikum je v řadě důlků v plastové destičce v klesající koncentraci. Nejnižší koncentrace, která inhibuje růst, je MIC. Jedna destička se zpravidla použije pro jeden kmen - testování např. 12 antibiotik, každé v 8 různých koncentracích. Pokud například v koncentracích 0,25 - 0,5 - 1 - 2 je přítomen zákal a v koncentracích 4 - 8 - 16 - 32 (vše v mg/l) zákal není, říkáme, že koncentrace 4 mg/l a vyšší jsou inhibiční - tedy koncentrace 4 mg/l je minimální inhibiční koncentrace (MIC).

Pokud důlky bez zákalu (tj. s inhibicí) vyočkujeme do půdy bez antibiotika, můžeme pozorovat, jestli bakterie byly pouze inhibovány, nebo usmrceny. Tím zjistíme hodnotu MBC. Tento postup se ale v praxi používá výjimečně.

Mikrodiluční test se používá místo difúzního diskového testu zejména u pacientů těžce nemocných, v ohrožení života.

Zjišťování faktorů rezistence

Ne vždycky stačí výše uvedené zjišťování citlivosti či rezistence na antibiotika. Někdy je lépe speciálními metodami zjišťovat přítomnost konkrétních faktorů rezistence, např. betalaktamáz. Může se jednat o diagnostické proužky (chemický průkaz daného enzymu) nebo testy na jiném principu.

Antibiotická politika, antibiotická střediska

Vzhledem k tomu, že antimikrobiální látky působí složitým způsobem jak na mikroba, tak i na makroorganismus, nelze jejich používání nechat nějaké libovůli. Státy, u kterých je předepisování antibiotik poměrně volné, se v současnosti potýkají s velkými problémy, neboť stoupá míra rezistence bakterií. Proto neustále mezi lékaři i mezi pacienty probíhá osvěta: antibiotika **nejsou** antipyretika, nelze je používat u virových infekcí (s výjimkou úzce vymezených případů prevence bakteriálních komplikací), u nemocí neinfekčního původu, a pokud možno by se neměla používat bez *in vitro* ověření citlivosti (až na výjimečné případy, např. klasická povlaková angína).

U antibiotik „třetí volby“, tj. širokospektrých rezervních látek určených výhradně k léčbě závažných pacientů a k potírání velmi rezistentních kmenů není lékařům umožněno předepisování těchto preparátů bez konzultace s antibiotickým střediskem. **Antibiotická střediska** jsou zřizována při mikrobiologických pracovištích větších nemocnic a působí jako „poradny“ pro klinické lékaře, kteří v antibiotické problematice nemusí být zblbělí. Především však potvrzují ona širokospektrá antibiotika. Těmto antibiotikům se říká „vázaná antibiotika“ na rozdíl od „volných antibiotik“, která smí předepisovat každý lékař – i zde to však musí být lékař, antibiotika nelze nikdy schválit k volnému prodeji. Schvalování antibiotik může mít papírovou podobu (formulář, který lékař vyplní a mikrobiolog z antibiotického střediska jej opatří razítkem, podpisem, případně poznámkou), lepší je však elektronická podoba – lékař vypíše elektronický formulář včetně zdůvodnění, proč chce dané antibiotikum použít. Mikrobiolog má v ideálním případě možnost zkontrolovat správnost předepsání i tím, že nahlédne do aktuálních nálezů pacienta, které má zpravidla k dispozici ve svém informačním systému (pokud se tedy jedná o pacienta, jehož vzorky byly příslušnou mikrobiologickou laboratoří analyzovány).

V současnosti probíhá snaha vytvořit **celostátní koncepci** používání a povolování antibiotik (i dalších antimikrobiálních látek) zejména v léčbě a profylaxi nozokomiálních infekcí.

Téma 9 - Sepse, endokarditidy, neuroinfekce, systémové infekce (část, zbytek je ve skriptech)

Hepatitidy a AIDS

A. PŮVODCI VIROVÝCH ŽLOUTENEK

Tyto viry nejsou navzájem příbuzné. Viry se označují jako HXV (X = A, B, C, D, E), žloutenky jako VHx (virová hepatitida X).

Význam, rozdělení a přenos

Všechny viry žloutenek vyvolávají žloutenku čili hepatitidu (zánět jater). Nemoc začíná po inkubační době (různě dlouhé, u VHA 2 - 7 týdnů, u VHB 2 - 6 měsíců) většinou nespecificky, později začíná žloutenka (nejprve na bělímě oka), bolesti, trávicí obtíže apod. Někdy, zejména u VHD, může být průběh fulminantní (=velmi rychlý). U některých hepatitid se objevuje různá forma chronicity (od přetrvávání bezpříznakové infekce až po trvalé potíže).

Nejdůležitější hepatitidy:

Typ	Nukleová kyselina	Čeleď – není předmětem zkoušky	Přenos (převažující)	Možnost přech. do chronicity
VHA	RNA	Enteroviridae	Fekálně-orální	Ne
VHB	DNA	Hepadnaviridae	Sexuální, krví	Ano
VHC	RNA	Flaviviridae	Krví, snad sexuální	Ano
VHD	RNA	viroid	jako B	Ano
VHE	RNA	Caliciviridae	Fekálně-orální	Asi ne

K přenosu hepatitidy A, E: poslední větší epidemie VHA proběhla v 70. letech. Nakaženy byly polské jahody, hnojené lidskými fekáliemi. Nyní se VHA vyskytuje mezi obyvateli s malým hygienickým povědomím. VHA i VHE si také Češi a Moravané přivážejí z ciziny.

K přenosu hepatitidy B (a s ní i D): dříve typická profesionální infekce zdravotníků, nyní díky očkování mnohem méně častá, proto relativně je teď větší podíl sexuálně přenesených žloutenek. Významný je také podíl narkomanů, velké riziko představují jehly pohozené narkomany na ulicích a v parcích, jejichž prostřednictvím se mohou nakazit při hře dětí.

Přenos hepatitidy C je především krví - narkomani apod. Není jasné, jak se přenášela v době, kdy žádní narkomani nebyli. Snad je možný i pohlavní přenos, ale není to jasné.

Antigenní struktura viru hepatitidy B

U studentů bakalářského stupně zpravidla nevyžaduje povědomost o jednotlivých mikrobiálních antigenech. U hepatitidy B je však základní povědomí o této věci důležité pro diagnostiku. Virus hepatitidy B (kompletní virová částice) je 42 nm velké tělíčko (tzv. Daneho tělíčko), které se skládá z obalu (kromě hostitelských lipidů virový antigen, tzv. "australský antigen" - HBsAg, písmenko "s" znamená "surface" = povrchový), kapsidy a jádra. Kapsida obsahuje další dva důležité antigeny: HBcAg a HBeAg. - HBsAg se vyskytuje v krvi i jako prázdné obaly (v tomto případě měří obal jen 22 nm) anebo jako útočiště vnitřních struktur HDV (v tom případě měří 35 nm). HDV je zvláštní "viru-nevirus", který může existovat pouze v prázdných obalech - HBsAg. Proto nákaza HDV vzniká pouze jako současná infekce (koinfekce) nebo následná infekce (superinfekce) po žloutence B. Bez žloutenky B nemůže žloutenka D nastat.

Diagnostika hepatitid

- **HAV:** Klinika, jaterní testy. Přímá i nepřímá ELISA, RIA.
- **HBV:** Klinika, jaterní testy. Antigeny HBsAg, HBeAg; protilátky anti-HBs, -HBe, -HBc; PCR. Antigen HBcAg se v krvi nevyskytuje. Protilátky se v krvi zásadně objeví až po vymizení antigenu. HBeAg vymizí dříve (v té době pacient přestává být infekční, nastává útlum), HBsAg později (vymizení znamená ukončení infekce). Protilátky anti-HBc jsou velmi cenné v době tzv. "diagnostického okna", kdy ani pomocí HBsAg, ani pomocí JT nelze diagnostiku spolehlivě provést. Kombinací několika vyšetření antigenů a protilátek ("markery hepatitid") se dá odhadnout, v jakém stádiu se onemocnění nachází.
- **HCV:** vedle kliniky hlavně nepřímá ELISA.
- **HDV:** diagnóza VHB; nepřímá ELISA apod.
- **HEV:** nepřímá ELISA (u nás se zatím ne všude provádí)

Léčba, profylaxe, prevence

V léčbě se používají hepatoprotektiva. Dříve se používalo také podání antiséra (léčebná pasivní imunizace), ale upouští se od ní. VHB se kromě toho léčí interferonem.

V prevenci se používá očkování proti VHA (inaktivovaná) a VHB (používá se často rekombinantní očkovač látka, tj. geneticky připravená vakcína). V současné době je v Česku zařazeno očkování proti VHB do pravidelného očkovacího kalendáře. Očkování proti VHA je doporučováno zejména při výjezdech do zahraničí (včetně středomoří).

B. VIRUS HIV a jím způsobené infekce

Virus HIV je RNA virus, 100 - 120 nm velký. Virus HIV je velmi málo odolný. Může být přenesen pouze krví a pohlavně. Riziko přenosu klesá v pořadí anální styk - vaginální styk - orální styk, což ale neznamená, že by i ten posledně jmenovaný nebyl rizikový, a to zejména pro příjemce spermatu či vaginálních sekretů. U análního styku riziko zvyšuje množství drobných poranění na sliznici konečníku (konečník je méně pružný).

Význam

AIDS (Acquired ImmunoDeficiency Syndrome) je vrcholným stádiem infekce HIV. Infekce však začíná nespecifickými "chřipkovými" příznaky. Pak začne období latence, trvající měsíce až mnoho let. Po této době se objeví **PGL** - perzistentní generalizovaná lymfadenopatie (zvětšené uzliny, únava, pocení, zvýšené teploty), **ARC** (AIDS-Related Complex - příznaky podobné AIDS, ale méně vyjádřené) a pak vlastní AIDS. Choroba postihuje jeden druh lymfocytů (tzv. CD4) a projevuje se především zvýšeným výskytem infekcí, a to i takových, které se u HIV-negativních

téměř nevyskytují (infekce parazitem *Pneumocystis carinii*, atypickými mykobakteriemi apod.); mimo to se objevují také nádory, zejména Kaposiho sarkom (viz HHV 8). Ten vychází z endotelu kapilár a je charakterizován hnědočervenými uzly na kůži (zejména bérců) a sliznicích.

Diagnostika

Provádí se serologie - ELISA; prokazují se specifické protilátky proti určitým antigenům. U pozitivních se provádí (v národní referenční laboratoři) ověření tzv. Western blotem (imunoelektroforéza). V poslední době se prosazuje přímý průkaz pomocí PCR.

Léčba a prevence

I když AIDS nelze vyléčit, lze ho léčit. Vedle symptomatické léčby a terapie oportunních infekcí se dnes používá řada antivirotik: azidothymidin (AZT), didanosin (= ddI, dideoxuridin), zalcitabin. Na vývoji léčby AIDS se podílí i český vědec dr. Holý. Jeho preparát Cidofovir účinkuje především při oportunním zánětu oční sítnice, způsobeném CMV, ale novější Adefovir a zejména PMPA jsou velmi nadějně i v boji se samotným virem HIV. Mimo to se pracuje i na vakcínách, ovšem výsledky jsou sporné. Proto stále platí důraz na prevenci: dodržování bezpečnosti práce ve zdravotnictví, prevence užívání nitrožilních drog, tzv. "bezpečnější sex" apod. Při vší osvětě je nutno brát v úvahu, že i HIV pozitivní člověk zůstává člověkem a neměl by stát mimo společnost.

Borreliové neuroinfekce

Borrelia burgdorferi sensu lato je bakterie spirálovitého tvaru (spirocheta). Pokud způsobuje infekce CNS, je charakter infekcí blízký spíše virovým infekcím než bakteriálním. Proto také borreliové neuroinfekce tvoří společnou otázku s virovými.

Význam a rozdělení

Rod *Borrelia* nezahrnuje jen původce lymeské nemoci – klíšťové borreliózy: *Borrelia recurrentis* a *Borrelia duttoni* způsobují návratnou horečku

Nám se však jedná o druh *Borrelia burgdorferi sensu lato*. Tento druh „v širším slova smyslu“ (to je vyjádřeno tím „sensu lato“) vlastně zahrnuje několik klíšťaty přenášených druhů, způsobující lymeskou nemoc. Nejdůležitější jsou *Borrelia burgdorferi sensu stricto* (= v užším slova smyslu), *B. garinii* a *B. afzelii*. U nás se vyskytuje hlavně druhá a třetí z nich; jejich příznaky bývají nervové. V USA se vyskytuje spíš první z nich a příznaky bývají kloubní. Nemoc má tři stádia, od nespecifických ke specifickým. Klasickým příznakem jsou stěhovavé červené skvrny (erythema chronicum migrans). Příznaky neuroborreliózy jsou podobné příznakům virových onemocnění CNS (o těch je zmínka ve skriptech). V zásadě mohou být různé, podle toho, která část (nebo části) CNS je zasažena (jsou zasaženy).

Diagnostika

Z přímých metod je možná MIKROSKOPIE z krve je možná pomocí zástinové či fluorescenční mikroskopie. KULTIVACE je možná, ale tak obtížná, že se nepoužívá. Rozvíjejí se GENETICKÉ METODY.

Základem diagnostiky je však nepřímý průkaz – SEROLOGIE. Ten zahrnuje vedle nepřímé imunofluorescence především různé varianty metody ELISA a Western blottingu.

U borreliózy také nelze tak docela spoléhat na IgG a IgM protilátky - sice se zjišťují, nicméně často nález neodpovídá (IgM přítomny u staré infekce, chybějí u aktuální apod.)

Léčba

Amoxycilin, tetracykliny a jiné.

Téma 11 Hnisavé a anaerobní infekce – část tématu

Anaerobní infekce - původci, transport materiálu, zásady diagnostiky

Striktní anaeroby nesnášejí kyslík (některé hynou i v přítomnosti jeho velmi nízkých koncentrací). Tomu se musí přizpůsobit i odběr materiálu (obvykle stříkačka s jehlou zabodnutou do gumové zátky; u výtěrů stačí běžná souprava s Amiesovou půdou, ale tekutý materiál je vždy cennější pro diagnostiku než pouhý výtěr).

Nesporulující anaeroby se mezi lidmi přenášejí zřídka, většina infekcí je endogenních. Z míst, kde se anaeroby přirozeně nacházejí (tj. ústa, střevo a pochva), se mohou dostat do sousedních tkání, anebo krví do celého těla.

Naproti tomu **sporulující anaeroby** – Clostridia se díky sporám mohou šířit mnohem snáz.

NESPORULUJÍCÍ ANAEROBY.

Rozdělení a význam

Infekce způsobené nesporulujícími anaeroby jsou téměř vždy smíšené, účastní se mnoho různých druhů anaerobů, případně i ve směsi s fakultativními anaeroby. Nejčastěji jsou postiženy tkáně, které leží v okolí orgánů, kde se anaeroby vyskytují fyziologicky. Z dutiny ústní se mohou anaeroby např. při zubním kazu, úrazu apod. dostat do měkkých tkání v okolí čelisti či krku.

Střevní anaeroby při perforaci způsobují peritonitidu, poševní pak záněty malé pánve.

Nedá se říci, že by nesporulujícími anaeroby byl nějaký zvlášť významný. Jejich patogenita je velmi podobná; vyšší je však u aktinomycet, naopak nižší např. u bifidobakterií.

G+ TYČINKY: *Actinomyces* – způsobuje aktinomykózu. *Bifidobacterium* - uplatňuje se při zubním kazu, jinak využití v mléčném průmyslu (je v jogurtech, i běžných!) *Propionibacterium* - *P. acnei* má význam při vzniku akné. **G- TYČINKY:** *Bacteroides*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Fusobacterium* (podílí se na tzv. Plaut-Vincentově angíně). *Mobiluncus* - účastní se nespecifických zánětů pochvy, označovaných jako "vaginózy". Dříve byl označován jako "poševní vibrio". **G+ KOKY:** *Peptococcus* a *Peptostreptococcus* **G- KOKY** *Veillonella*

Diagnostika MIKROSKOPIE je velice užitečná - mnohé anaeroby jsou různotvaré. KULTIVACE: anaerobní kultivace, viz dále. BIOCHEMICKÁ IDENTIFIKACE.

Léčba. Používá se hlavně klindamycin nebo metronidazol, často v kombinaci s dalším antibiotikem, které pokryje doprovodnou fakultativně anaerobní flóru.

CLOSTRIDIUM.

Oproti ostatním, nesporulujícím anaerobům je u rodu *Clostridium* jeden zásadní rozdíl: ve formě spor vydrží nejen na kyslíku, ale dokonce i v hodně extrémních podmínkách. Proto se klostridia přenášejí nejen v rámci organismu. Při práci v zemi, při úrazech znečištěných zeminou apod. se mohou spory dostat do těla. V některých případech je ale přenos fekálně-orální, anebo vůbec nejde k infekci, nýbrž k bakteriální intoxikaci (člověk se nenakazí, jen zkonsumuje toxin).

Rozdělení a význam.

CLOSTRIDIUM BOTULINUM produkuje botulotoxin. Nedochozí k infekcím, onemocnění má charakter alimentární intoxikace (otravy). Člověk se většinou otráví podomácku vyrobenými konzervami, hlavně masovými, případně u některých druhů konzervované zeleniny. Ovoce je méně rizikové, protože je kyselé, a nízké pH toxin ničí. Onemocnění se projevuje hlavně obrnami (parézami). CLOSTRIDIUM TETANI způsobuje tetanus. V tomto případě sice dochází k infekci, ale důležité je zase působení toxinu. Člověk se zraní např. o špinavý trn, zemědělský nástroj (nejrizikovější jsou vidle, protože těmi se přehazuje hnůj) a do rány si vnese klostridia. Vznikne nevelké ložisko infekce, samo o sobě nevýznamné. Významné ale je, že z ložiska se šíří tetanický toxin. Stejně jako botulotoxin je to neurotoxin, ale působí opačně: ne obrny, ale naopak křeče svalstva. KLOSTRIDIA PLYNATÝCH SNĚTÍ, například *Clostridium perfringens* (ale i několik dalších druhů) mají na svědomí dva typy lidských onemocnění: a) Plynatá sněť je především válečné onemocnění. V míru se může přihodit např. při zemětřesení a podobných katastrofách. Úraz jednak přesekne zásobenou tkáň krví (a tedy i kyslíkem), jednak zároveň vnese do tkáně klostridia. Vznikne rozsáhlé ložisko, které kromě klostridií obsahuje také plynné produkty. Když se na postižené místo (obvykle končetinu) klepne prstem, ozve se zvuk praskání bublin plynu b) Různé formy zánětů tenkého a tlustého střeva, které jsou způsobené enterotoxiny. Ovšem pozor! Tato klostridia se vyskytují ve střevě i za normálních podmínek, důležité tedy není, jestli

tam jsou, ale jestli ten kmen, co tam je, produkuje nebo neprodukuje toxin. CLOSTRIDIUM DIFFICILE způsobuje také zánět tlustého střeva, takzvanou pseudomembránovou kolitidu. Nejčastěji k ní dojde tak, že se jedná o pacienta, který má toto klostridium v malém množství ve střevě. Když potom pacient - třeba kvůli zánětu kloubů - pojídá linkosamidová antibiotika, vybijí všechnu běžnou flóru kromě *Clostridium difficile* (to je jako jeden z mála anaerobů rezistentní).

Diagnostika.

MIKROSKOPIE prokáže dlouhé a tlusté tyčinky. Spóry mohou a nemusí být viditelné - některá klostridia tvoří spory jen tehdy, když se dostanou do nepříznivých podmínek. - Umístění spory na konci ("palička na buben") je typické pro *Clostridium tetani*. KULTIVACE anaerobní. Některá klostridia se kultivovat téměř nedají, protože jim vadí i maličká troška kyslíku. Takovým klostridiím říkáme EOS ("extremely oxygen sensitive", extrémně citlivá na kyslík). BIOCHEMICKÁ IDENTIFIKACE se také používá. POKUS NE ZVÍŘETI připadá stále ještě v úvahu u tetanu a botulismu. PRŮKAZ ANTIGENU se používá hlavně jako průkaz toxinů *C. perfringens* a *C. difficile* ve stolici. Je totiž u nich důležitější než samotný nálezný klostridia: klostridia se totiž vyskytují běžně, ale ne vždy produkují toxin.

Léčba a prevence. U tetanu a botulismu se v léčbě a profylaxi používá především pasivní imunizace specifickým antitoxinem. U tetanu se provádí prevence očkováním - v dětství jako čtyřkombinace, v dospělosti po deseti letech jednotlivé očkování. V léčbě plynatě sněti se používá chirurgický zásah (otevření a okysličení ložiska, desinfekce) a samozřejmě antibiotika, například penicilin, ampicilin se sulbaktamem, linkosamidy. V profylaxi se používá specifický antitoxin. Enterotoxikózy se řeší antibiotiky. U *C. difficile* se používá vankomycin. Je k dispozici jen v injekčních ampulích, ale v tomto případě se dá pacientovi ampule vypít. Vankomycin se nevstřebává a působí ve střevě místně.

ANAEROBNÍ KULTIVACE.

Pro kultivaci striktně aerobních (= pouze v kyslíkovém prostředí rostoucích) a fakultativně anaerobních (= na kyslíku nezávislých) bakterií není potřeba vytvářet zvláštní podmínky. Zato striktně anaerobním bakteriím musíme vytvořit speciální bezkyslíkové podmínky, chceme-li je pěstovat na pevných půdách.

ANAEROSTAT je nádoba, která má těsně přiléhavé víko. Před použitím si nachystáme sáček se speciální směsí chemikálií, a do anaerostatu vložíme (pokud už tam není) platinový katalyzátor. Když se do anaerostatu umístí naočkované misky, sáček se směsí se otevře, u některých typů se ještě zalije vodou. Tím začne běžet reakce, která během několika desítek minut spotřebuje kyslík a nahradí ho směsí vodíku a oxidu uhličitého.

ANAEROBNÍ BOX je modernější způsob kultivace. Je to velká prosklená bedna, do které je anaerobní směs vháněna z bomby. Můžeme v ní pracovat pomocí dvou otvorů v přední stěně, na kterých jsou připevněny gumové rukávy. Pracovník tedy prostrčí ruce, aniž by anaerobní směs unikala ven. To, co přece unikne, se zase doplní z bomby. I tak ovšem anaerostat i anaerobní box neumožňují růst těch anaerobů, které jsou na kyslík nejháklivější.

Téma 12 Zásady odběru a transportu materiálu k mikrobiologickému vyšetření, průvodky

Obecné zásady odběru a transportu infekčního materiálu + Správně vyplněná průvodka a její význam

1. Indikace mikrobiologického vyšetření.

Často se provádí mikrobiologické vyšetření zbytečně, a naopak, že se neprovede tam, kde by bylo účelné.

Při úvaze o mikrobiologickém vyšetření (stejně jako třeba vyšetření biochemickém) by se měl praktický lékař zamyslet nad tím, jak bude postupovat v případě různých výsledků vyšetření. Dojde-li k závěru, že bez ohledu na výsledek bude léčit pacienta stejným způsobem, je vyšetření pravděpodobně zbytečné.

V některých případech si musí kliník ujasnit nejen zda se rozhodne pro vyšetření, ale také pro jaké konkrétní vyšetření. To se týká hlavně serologických a virologických vyšetření (protilátky proti kterému mikrobiu?), ale často také bakteriologických vyšetření (například požadavek anaerobní kultivace, popřípadě současného vyšetření bakteriologického a mykologického).

Vedle indikací ze strany pacienta existují také indikace ze strany populace, to jest indikace epidemiologické. Příkladem je průkaz viru chřipky (přímý či nepřímý). Pro léčbu daného pacienta je jeho význam pochybný, zato je cílem je příprava co nejkvalitnější vakcíny pro další rok; jinak řečeno, i tady jde nakonec o zdraví lidí.

2. Odběr vzorku – problém má několik částí:

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

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

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 tonzil, je výsledek značně zkreslený.

Použití vhodné odběrové soupravy (v případě výtěrů a stěrů)

- suchý tampon je zpravidla nevhodný, s výjimkou PCR a některých průkazů virových antigenů
- používá se transportních půd, univerzální (pro bakteriologii) je půda Amiesova.
- pro mykologii souprava Fungiquick, zvláštní soupravy také u izolace virů a chlamydií
- u poševních a uretrálních výtěrů nejlépe kombinace Amies + C. A. T., kde Amies je na bakterie a C. A. T. na kvasinky a trichomonády

Použití vhodné nádobky (v případě tekutých a kusových materiálů)

- ve většině případů nezáleží na typu nádobky, ale jen na tom, aby nádobka byla sterilní
- 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 zabodnutou do sterilní zátky
- u hemokultur se dnes používají speciální transportně-kultivační lahvičky pro automatickou kultivaci; lze je použít i pro některá další vyšetření
- u dermatomykóz se zasílají nehty, vlasy, šupiny a podobně
- u izolace virů nutno nádobku vložit do systému udržujícího teplotu kolem 0 °C

Použití dalších způsobů vyšetření: například lze provést přímo v ordinaci nátěr na podložní sklíčko a to poslat (aktinomykóza, kapavka...), v kožním lékařství se používají otisky přímo na kultivační půdu... možností je mnoho, lze se informovat přímo v laboratoři.

Nelze omlouvat vzorek odebraný non lege artis snahou "šetřit pacienta", protože nesprávný odběr může často znamenat nesprávný výsledek, tím i nesprávné léčení a mnohem větší zlo pro pacienta než důkladné provedení odběru.

3. Vyplnění průvodky.

- nutné precizní vyplnění osobních údajů (pacienta, pojišťovna aj. – kvůli platbě)
- ještě větší pozornost nutno věnovat pozornost také údajům odborného rázu:

Základem přesný popis materiálu a požadovaného vyšetření. 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.

Z dalších důležitých údajů:

- vyplnění skutečné diagnózy: mikrobiologovi může hodně napovědět a urychlit či zpřesnit diagnostiku. Má-li pacient více diagnóz, je třeba uvést tu, která má vztah k předpokládané infekci, popřípadě zmínit všechny.
 - uvést, zda jde o kontrolu po léčbě, upozornit na komplikovaný zdravotní stav pacienta apod.
 - uvést stávající nebo uvažovanou antibiotickou terapii, případně i alergii na antibiotika
 - některé anamnestické údaje – návrat z tropů, práce v zemědělství, v lese
 - u serologických vyšetření datum prvních příznaků a zda se jedná o první či druhý vzorek
 - u gynekologických materiálů není od věci uvést fázi menstruačního cyklu
- V případě mimořádných vzorků je dobré upozornit laboratoř i telefonicky.

4. Zaslání materiálu do laboratoře

- materiál je vždy třeba dopravit do laboratoře co nejdříve
- u moči ještě více než u ostatních – nutno do dvou hodin, jinak hrozí pomnožení kontaminant
- nelze-li materiál dodat ihned, uchovat s tím, že citlivé mikroby nemusí být zachyceny
- když už se materiál uchovává, je zpravidla je lepší nechat vzorek při pokojové teplotě na místě chráněném před sluncem, než uchovávat jej v chladničce; důvodem je tepelný šok, který může citlivější organismy postihnout.
- u virologických materiálů, jak již bylo řečeno, je vhodný transport na tajícím ledu

5. Vlastní zpracování materiálu v laboratoři

I tuto fázi může klinické pracoviště ovlivnit, např.:

- dohodnout s mikrobiologem některé detaily zpracování
- telefonicky zjistit předběžné výsledky vyšetření (celé vyšetření trvá v případě bakteriologie zpravidla dva až sedm dní, předběžný výsledek ovšem může být k dispozici už za 24 hodin)

6. Zaslání výsledku

- zorganizovat tak, aby nedocházelo ke zbytečným prodlevám
- dnes zpravidla možnost využít zasílání vzorků elektronicky (v rámci zdravotnického zařízení i mezi zařízeními navzájem)
- dohodnout s mikrobiologem, 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 výsledku a použití při terapii

- laboratoř zpravidla odfiltruje zcela evidentní kontaminanty z prostředí a náhodné nálezy
- v méně jednoznačných případech ovšem konečné rozhodnutí leží na klinickém pracovišti
- vodítkem může být poznámka ke kvantitě („ojediněle“, „masivně“), 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 titer a zejména jeho dynamika.

Obecně je třeba upozornit, že není nejlepší laboratoř, která má hodně pozitivních nálezů, ale taková laboratoř, která dokáže odlišit skutečnou pozitivitu od náhodné kontaminace. Léčit neexistující infekci je totiž jen o málo menší chyba než neléčit infekci existující, a to z mnoha důvodů, narušením přirozené mikroflóry pacienta počínaje a zvyšováním rezistence mezi populací mikroorganismů konče.

8. Kontinuální spolupráce mezi klinikem a laboratoří

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.

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 zkumavek a odběrovek. Přednost má zpravidla zaslání tekutého/kusového materiálu před pouhým zasláním stěru/výtěru. Existují ale i četné výjimky: výtěr z řitního kanálu namísto stolice, stěr z urethry u kapavky apod.

VÝTĚROVKY.

Souprava s bakteriologickou transportní půdou (nejčastěji Amiesovou) je základem všeho. Hodí se prakticky k jakémukoli bakteriologickému kultivačnímu vyšetření.

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 mykologické vyšetření

Soupravy pro viry a pro chlamydie se používají výjimečně (jen pro izolaci agens), u virů a chlamydií totiž výrazně převažuje nepřímý průkaz (zasílání séra) anebo když už přímý průkaz, tak přímá detekce antigenu nebo nukleové kyseliny

C. A. T. je souprava pouze pro gynekologické (popř. andrologické) vyšetření. Transportní půda je zároveň i půdou kultivační. Slouží jen k průkazu kvasinek a trichomonád, pro bakterie se nehodí, proto je zpravidla potřeba poslat kromě C. A. T. i klasický Amies.

Zkumavky mohou mít různé rozměry, ale musí být sterilní. (Výjimkou je souprava na odběr stolice na parazitologii, ta sterilitu nevyžaduje.) Širší samostojačí zkumavce říkáme **spuťovka**, 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. Je potřeba rozlišovat mezi odběrem krve na serologii (srážlivá krev, nepřímý průkaz nebo průkaz některých antigenů, např. HBsAg) a odběrem krve na hemokultivaci (nesrážlivá krev, kultivační průkaz živých bakterií a kvasinek)

Skříčko: přímým nátěrem na skříčko se v některých případech doprovodí zaslání výtěrovky. Například u kapavky je bohužel velké riziko, že případný patogen navzdory veškeré snaze nepřežije transport: proto ho hledíme zachovat alespoň mikroskopicky. Další zpracování (fixace, barvení) skříčka si už provede laboratoř.

Urikult byl jednu dobu zvláštním způsobem zasílání moče. Moč se přímo na klinickém pracovišti nalila do nádobky s pevnou kultivační půdou a zase vylila. Neposílala se tedy už moč, ale rovnou kultivační půda. Vyšetření mělo zkrátit dobu mezi vymočením pacienta a nasazením na půdu prakticky na nulu. Z různých praktických důvodů se však příliš neujalo.

Téma 13 Základy klinické mykologie a parazitologie

HOUBY OBECNĚ. Houby jsou eukaryotní organismy, tvoří samostatnou říši vedle říše živočišné a rostlinné. Z organel hub má význam buněčná stěna, tvořená chitinem a úplně jiná než buněčná stěna bakterií. Houby se mohou množit nepohlavně (např. pučením), ale také pohlavně.

K tomuto účelu si tvoří spory a konidie. Některé spory ovšem slouží i k nepohlavnímu množení. Vědecká klasifikace hub se pořád vyvíjí. Situaci komplikuje fakt, že spousta hub má dvě formy - jednu třeba kvasinkovou, druhou pohlavní, která vypadá úplně jinak.

Pro praxi hovoříme většinou o kvasinkách (spíše jednobuněčné, biochemicky hodně aktivní) a vláknitých houbách. Není to ovšem přesné.

Přenos hub může být různý, většinou se ovšem snadno přenášejí vzduchem ve formě spor a konidií.

Význam. Mikroskopické houby jsou velmi různorodá skupina. Někdy se dělí do šesti tříd podle míry adaptace. Na jednom konci jsou ty, které jsou adaptované tak špatně, že nemají jak škodit (některé půdní houby), na druhém ty, které jsou adaptované tak dokonale, že téměř neškodí a spíše kolonizují sliznice (kandidy). Nejhorší infekce dělají "ty uprostřed".

Houby způsobují mykózy (houbové záněty), mykotoxikózy (houbové otravy, v širším slova smyslu sem patří i otravy velkými houbami, např. muchomůrkami), mykoalergózy (alergie na houby) a mycetismy (houba je přítomna v organismu, ale škodí jen mechanicky utlačováním okolních tkání).

Mykóz přibývá, šíří se následkem "zmenšování světa", změny životního stylu a také antibiotické léčby, která zlikviduje bakterie, které houbám konkurují.

Mykózy dělíme většinou takto:

MYKÓZY POVRCHOVÉ (*Trichophyton*, *Epidemrophyton*), a podkožní (*Sporothrix*)

MYKÓZY ORGÁNOVÉ (*Cryptococcus*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Histoplasma*, *Coccidioides*, *Blastomyces*, *Paracoccidioides*),

KANDIDÓZY mají zvláštní postavení

Diagnostika. MIKROSKOPIE. Houby jsou asi desetkrát větší než bakterie, proto jsou dobře viditelné i v nativním preparátu. Dají se ale barvit i podle Grama (zejména kvasinky), barví se modře, přestože jejich buněčná stěna nemá nic společného s buněčnou stěnou grampozitivních bakterií. - Někdy se používají také speciální barvení, např. barvení Parkerovým inkoustem

KULTIVACE. Základem je Sabouraudův agar. Většinou se nalévá jako šikmý agar do zkumavek, takže i při dlouhodobé kultivaci (vláknitých hub) půda nevyschne.

BIOCHEMICKÁ IDENTIFIKACE.

NEPŘÍMÝ PRŮKAZ má význam u systémových mykóz, např. aspergilózy.

TESTOVÁNÍ IN VITRO CITLIVOSTI NA ANTIMYKOTIKA připadá v úvahu u kvasinek, nikoli u vláknitých hub. Difusní diskový test se dělává, ale není spolehlivý. Spolehlivější je např. tzv. FUNGItest.

Léčba. Používají se antimykotika několika skupin:

AMFOTERICIN B je vysoce účinné, ale zároveň také velmi jedovaté rezervní antimykotikum k léčbě velmi závažných infekcí. Menší toxicitu má zvláštní léková forma - amfoter. B v intralipidu.

AZOLOVÁ ANTIMYKOTIKA, jako je intrakonazol (SPORANOX), flukonazol (DIFLUKAN), ketokonazol, mikonazol aj., se používají k běžné léčbě celkové i lokální. U flukonazolu je problémem primární rezistence některých druhů kandid.

5-FLUOROCYTOSIN (flucytosin) je moderní rezervní antibiotikum, velmi drahé, hodí se pro léčbu v kombinacích.

PŮVODCI KOŽNÍCH MYKÓZ jsou houbové organismy, způsobující onemocnění kůže, popřípadě sliznic. Zvlášť je probrán rod *Candida* - kandidy mohou vyvolat jak povrchové, tak hluboké mykózy.

Význam. Tyto houby mohou způsobovat onemocnění různých částí kůže, obvykle označených latinsky jako *tinea* - např. *tinea capitis* (hlavová kůže), *corporis* (nechlupaté části těla), *barbae*

(vousů), pedis (nohy). Používá se také pojmů dermatomykóza (dermatofytóza) pro onemocnění kůže, trichomykóza/fytóza pro onemocnění chlupů a onychomykóza pro onemocnění nehtů. Nejvýznamnější je tzv. skupina dermatofyt, tvořená třemi rody: *Trichophyton*, *Epidermophyton* a *Microsporum*. Mimo to způsobují kožní mykózy další houby, například *Malassezia furfur* způsobuje onemocnění zvané pityriasis versicolor, při které vznikají na kůži odbarvené okrsky. Z hlediska **přenosu** lze původce kožních mykóz rozdělit na antropofilní (čistě lidské, přenos člověk-člověk), zoofilní (přenos především zvíře-člověk, vzácně člověk-člověk) a geofilní (obvyklý přenos prostředí-člověk). Přenos se děje kontaktem a přes předměty.

Diagnostika: mikroskopie (obvykle v nativním preparátu). Dále se užívá KULTIVACE na Sabouraudově agaru (SA).

Léčba. K léčbě kožních mykóz se hodí griseofulvin (Gricin) a terbinafin (Lamisil). Opomíjený, ale dobře účinný je jodid draselný.

CANDIDA. Kandidy jsou velmi běžnými kvasinkami. U člověka jsou běžné jednak jako původce onemocnění, ale ještě častěji jako bezpříznaková kolonizace (zejména střevo, ale i jinde). Člověk a *Candida* si na sebe v průběhu evoluce velice dobře "zvykli" - onemocnění vzniká při porušení rovnováhy.

Význam. Nejvýznamnější je druh *Candida albicans*, důležité jsou ale i některé další - *C. tropicalis*, *C. crusei*, *C. parapsilosis*. U závažných onemocnění je druhové určení užitečné - některé druhy mají přirozenou rezistenci vůči některým antimykotikům.

Všechny druhy bývají nalézány ve střevě, v ústech a krku, v močových cestách, na kůži, avšak u oslabených osob také ve tkáních (plíce, trávicí orgány aj.). S výjimkou nálezů ve tkáních nelze jednoznačně říci, kdy je *Candida* spíše patogenem a kdy kolonizací. Pomocí může mikroskopická charakteristika. Eliptické buňky jsou typické pro saprofytickou, neinvazivní formu, řetízky až vlákna pro invazivní.

Velká většina kandidóz je endogenního původu, tj. že pacient je sám sobě zdrojem onemocnění (například žena si zanesou kvasinky z řiti do pochvy, nebo vůbec nejde o přenos, jen o porušenou rovnováhu). V poslední době ale přibývá také nemocničních kandidóz, přenášených mezi pacienty navzájem.

Kandidy jsou dosti odolné, zejména proti zásaditému pH. Milují cukry, a proto s oblibou osidlují pochvy diabetiček a mlsných žen, mimo to jsou častější u těhotných v závislosti na hormonálních změnách.

Diagnostika. MIKROSKOPICKY v nativním nebo barveném (Gram) preparátu vidíme eliptické buňky, někdy pučící, nebo jejich řetízky až vlákna. KULTIVACE na krevním nebo Sabouraudově agaru. SA. Od kolonií *Staphylococcus epidermidis* nebo *Corynebacterium* sp. se odliší někdy kvasnicovou vůní, ale někdy teprve nátěrem. K rozlišení všech kandid lze použít BIOCHEMICKÉ VLASTNOSTI. PRŮKAZ ANTIGENŮ A PROTILÁTEK se provádí u těžkých forem a sepsí (precipitace, aglutinace)

Léčba. U slizničních forem se užívá clotrimazol (Canesten) v různých lékových formách, u systémových forem pak klasická antimykotika, jako je nystatin, amfotericin B a imidazolová antimykotika (mikonazol, ketokonazol, novější flukonazol, itrakonazol a vorikonazol).

PŮVODCI SYSTÉMOVÝCH MYKÓZ jsou houby, které zpravidla nepostihují člověka často a u zdravého člověka k infekci nedochází, nebo proběhne bez příznaků či mírně. Nákaza je častá u pacientů s postiženou imunitou včetně postižených AIDS. Zvláštní podskupinou jsou houby, které se vyskytují běžně v prostředí (známe je jako "plísně" napadající potraviny), které ve výjimečných případech způsobují závažná onemocnění (*Mucorales*, *Aspergillus*)

Význam a rozdělení.

ASPEGILLUS (plíseň štětičková) je velmi běžný v prostředí. Může jednak produkovat jedy (aflatoxiny), jednak působí záněty plic, astma, nejruznější dýchací i jiné komplikace. Občas se vyskytne ohraničené ložisko - aspergilom.

MUCORALES (zástupce *Mucor* = plíseň hlavičková) jsou pravé plísně (to se pozná podle toho, že jejich "podhoubí" není rozdělené přepážkami). Velmi rychle se šíří a mají afinitu k cévám. I

v dnešní době končí naprostá většina onemocnění smrtí a diagnostika se provádí teprve na pitevně.

Přenos: zpravidla vzduchem, zdrojem může být prach, zvířecí trus apod.; u aspergilů a Mucorales jsou spory všudypřítomné.

Vedle přímého mikroskopického a kulturačního **průkazu** se zpravidla provádí nepřímý (serologický) průkaz. Např. u aspergilů je to nezbytné už proto, že jinak není zaručeno, že nalezený *Aspergillus* není kontaminací z prostředí. Využívá se např. KFR či precipitace (u aspergilů mikroprecipitace v agaru).

Léčba: antimykotika k celkové léčbě (viz *Candida*)

Paraziti

Paraziti jsou mikrobiální patogeny živočišného původu. Někteří paraziti nesplňují definici mikroba (jsou pozorovatelní pouhým okem), ale z praktických důvodů se zařazují do mikrobiologie.

Paraziti mohou způsobovat nemoci prakticky všech orgánových soustav. To je dáno mj. jejich různorodostí. Parazity je možno členit podle různých kritérií. Souhrnem nejběžnějších členění je následující schéma:

- **Paraziti vnitřní** (působí jako patogeny uvnitř těla)
 - *Prvoci* (bičíkovci, výtrusovci, améby...) - např. toxoplasma
 - *Červi ploší* (ploštěnci)
 - *Tasemnice* (Cestoda) - např. tasemnice dlouhočlenná
 - *Motolice* (Trematoda) - např. motolice jaterní
 - *Červi oblí* (oblovci) - Nematoda čili hlístice - např. škrkavka
- **Paraziti vnější** (hmyz a roztoči) - např. veš muška

Existuje ale také možnost členit parazity podle orgánů, které napadají:

střevní paraziti – nejčastější (giardie/lamblie, entaméby, škrkavky, roupy, tasemnice apod.)

urogenitální paraziti – například trichomonády

krevní paraziti – například malarická plasmodia

tkáňoví paraziti – například toxoplasma

Paraziti vydrží zpravidla méně než bakterie, zato se mohou často aktivně cíleně pohybovat (skrz kůži, napříč našim tělem). Přenos je nejčastěji fekálně-orální, kontakt apod.

Diagnostika. Nejčastěji mikroskopická (průkaz prvoků, vajíček červů), méně často kulturační (např. *Trichomonas*) či nepřímá (serologická – hlavně u tkáňových parazitóz, kupříkladu u toxoplasmózy). Bývají též zvýšené protilátky třídy IgE. Z mikroskopických metod se u střevních parazitů (hlavně červů) používá zejména

- Faustova koncentrační metoda (několikastupňové odstředění)
- Tlustý nátěr podle Kato (pouze jedno odstředění)
- Grahamova metoda - speciálně pro roupy (speciální lepicí páska)
- Barvicí metody (Gomoriho trichrom)

Léčba. Bohužel, ne u všech parazitóz známe adekvátní léčbu. Až na výjimky se používají speciální léky, které neúčinkují na jiné mikroby (bakterie, plísňe).

PRVOCI. Jako jednobuněčné organismy mají přece jen blíže bakteriím než červi. Někteří způsobují velmi závažné choroby

Giardia lamblia. Lze pozorovat dvě formy prvoka: trofozoit má dvě jádra a vypadá jako dětský dráček. Cysta má čtyři jádra a je značně odolná. Šíří se fekálně orálně. Jde o průjmové onemocnění, celosvětově velmi časté. Ve vyspělých zemích je častost menší, ale o to horší bývají příznaky.

Entamoeba histolytica. Jedná se o amébu - měňavku. Lze pozorovat trofozoity, ale častěji cysty, které mají zpravidla 4 jádra. (To je důležitý poznávací znak - vcelku neškodná *Entamoeba coli* jich má více). Za určitých okolností napadá střevní sliznici a tudíž se dostává do nejrůznějších orgánů těla.

Trichomonas vaginalis. Na rozdíl od giardií netvoří cysty. Postihuje pochvu, vulvu, děložní hrdlo, někdy močovou trubici. Typický je žlutozelený, sladce páchnoucí výtok a mikroskopický obraz (MOP V). U mužů se často klinicky neprojevuje. Přenos zpravidla pohlavní, vzácně poševními sekrety či močí.

Toxoplasma gondii. Tento parazit má dvě možnosti: buďto prodělá celý vývoj v kočce, nebo pro jeho část použije mezihostitele, přičemž nepohrdne člověkem. Bez kočky se ovšem neobejde. V přenosu hrají roli i potraviny. Naprostá většina případů je bezpříznakových, ale mohou nastat komplikace oční, CNS aj. Nebezpečné je onemocnění těhotných.

Malarická plasmodia. Jsou čtyři: jedno vyvolává tzv. tropickou malárii, dvě vyvolává malárii třídenní a čtvrté čtyřdenní. Malárie je nejvýznamnější tropické onemocnění. Přenáší se komárem *Anopheles*. Člověk je mezihostitelem - parazit v něm prodělává nepohlavní část svého vývoje. Parazit je závislý na teplotě, proto se v Evropě malárie nešíří. Může tu ale dojít k tzv. "letištní malárii" Malárie postihuje erythrocyty. Projevuje se bolestmi hlavy a svalů, nevolností, později mrazením, třesavkou, horečkou a pocením. Záchvaty se pravidelně opakují po týdny až měsíce, zpravidla postupně slábnou. Komplikace jsou časté hlavně u tropické malárie.

Pneumocystis jiroveci. Je to pozoruhodný organismus - něco mezi prvokem a houbou. Přenáší se zřejmě i vzduchem. Trofozoiti mají mnoho povrchových výběžků. Těmi se nalepí na stěnu plicní buňky. Častý je nález u imunokompromitovaných osob (včetně AIDS).

Léčba. Na mnohé prvoky (včetně trichomonád) platí metronidazol (Avrazor) a podobné preparáty. Na malárii platí chinin. Dnes se používá dalších derivátů (Chlorochin apod.). U malárie se také doporučuje prevence. Ta spočívá jednak v ochraně před komáry (dlouhé nohavice aj.), jednak v užívání antimalarik (zcela výjimečný případ, kdy se antimikrobiální lék užívá preventivně!) U *Pn. carinii* je výjimka - používají se antibiotika.

MOTOLICE jsou ploší „červi“ měřící několik mm až cm. Mají přísavky, někdy i trny. Na rozdíl od tasemnic se vyskytují po celém těle.

Schistosomy. Způsobují schistosomózy - dříve bilharziózy v subtropích a tropech..

Jaterní, plicní a střevní motolice. Člověk se nakazí od mezihostitele, což může být vodní rostlina, ryba, krab apod. Příznaky velmi různé (horečky, žloutenky, postižení CNS a růz. jiné). - Dg. motolic: mikroskopická. Léčba: praziquantel.

TASEMNICE mohou být mnohem větší než motolice, ne ale všechny.

Tasemnice dlouhočlenná - *Taenia solium* (2 - 3 m) a **tasemnice bezbranná** - *Taenia saginata* (3 - 10 m) jsou klasické tasemnice: dlouhočlenná prasečí, *saginata* hovězí. U svých hlavních hostitelů dělají ve tkáních boubele (cysticerky). Prasečí je může u dělat i u člověka, hovězí nikoli. Obě jinak žijí s mírnými příznaky ve střevě. Člověk se nakazí obvykle sněžením boubele.

Škulovec široký - *Diphyllobothrium latum* (až 10 m) - rybí tasemnice. Mírné příznaky, může být přítomna anemie (tasemnice bojuje s hostitelem o vitamin B 12).

Tasemnice dětská - *Hymenolepis nana* (7 - 40 mm) žije v tenkém střevě. Ve střevě bývá i několik desítek. Přenáší se hlavně v dětských kolektivech. Nespecifické příznaky.

Měchožil zhoubný - *Echinococcus granulosus* (2 - 10 mm) je malá, leč nebezpečná tasemnice. Hlavním hostitelem je pes..

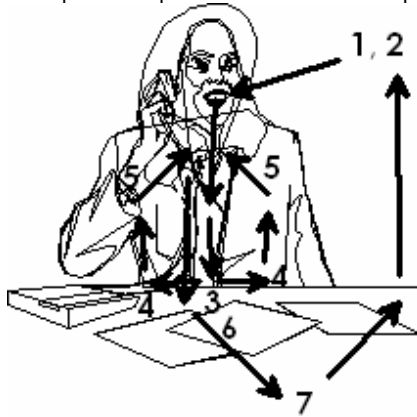
Diagnostika: mikroskopie, u měchožila serologie; léčba: praziquantel, niklosamid, u měchožila mebendazol.

HLÍSTICE. Na rozdíl od „červů“ plochých (se kterými nejsou vůbec příbuzní) mají kruhový průřez. Nejsou článkované, mají oddělená pohlaví a mají ústa a střevo (na rozdíl od plochých červů, kteří přijímají potravu celým tělem).

Háďátko střevní - *Strongyloides stercoralis* - v ČR vyskytuje ojediněle. Larva migruje tělem, proto příznaky od kožních přes plicní až po trávicí a jiné. Diagnostika mikroskopí a ELISou.

Měchovci - rody *Ancylostoma* a *Necator*. Rovněž v ČR ojediněle. Kožní a plicní příznaky, anemie, deficit proteinů aj.

Roup dětský - *Enterobius vermicularis*. Jeden z nejčastějších parazitů i u nás. Samička klade vajíčka do řas v okolí řiti dítěte. Zde vajíčka rychle dozrávají. Jsou-li pořížena (dítě se škrábe a pak si cucá prsty - autoinfekce), dospívají pak ve střevě. Projevuje se hlavně neklidem a nespavostí. Komplikací mohou být dívčí poševní výtoky. Diagnostika LEPEXem, který se nalepí na řiť a pak na podložní sklíčko. Při profylaxi nutná dekontaminace osobních věcí.



Škrkavka dětská - *Ascaris lumbricoides*. Dlouhá 10 - 30 cm. Životní cyklus: (1) vajíčko ve vnějším prostředí - (2) v něm se vyvine larva, čímž se vajíčko stane infekčním - (3) po požití se larva uvolní - (4) proniká střevní stěnou - (5) lymfatickými a krevními cévami se dostane do plic - (6) odtud vzhůru do hltanu a trávicím ústrojím do střeva - (7) zde dospívají a jsou vylučovány, kruh se uzavírá. Potíže mohou vznikat při migraci larev (kašel, bolesti hrudníku, krev ve sputu; ev. postižení mozku, ledvin) či při pobytu ve střevě - možnost ucpání žlučovodu a vývodů pankreatu. Ve stolici se prokazují vajíčka.

Škrkavka psí a kočičí - rod *Toxocara*. Životní cyklus je podobný jako u šk. dětské, avšak člověk je nevhodným

hostitelem, a proto se šk. obvykle nedostanou do střeva a bloudí různými orgány s příslušnými příznaky. Jen serologická diagnostika.

Léčba nálezů vyvolaných oblovci. Nejdůležitější jsou benzimidazolové preparáty - mebendazol, thiabendazol, levamisol. Na roupky se používá Pyrvinium, na škrkavky vedle benzimidazolů také piperazin.

EKTOPARAZITI – ČLENOVCI. Členovci vlastně nepatří do mikrobiologie, protože jsou pozorovatelní pouhým okem nebo lupou. Z praktických důvodů jsou ale do učebnic zařazováni.

Členovci mají význam 1) jako obtěžující 2) jako vyvolávající druhotně choroby (alergie, ekzémy, bakteriální infekce poškozené kůže, zhnisání rány pro přisátí), 3) jako přenašeči infekcí. Někteří členovci se projevují jako pasivní přenašeči infekce, aniž by byli parazity v pravém slova smyslu.

Klíšťáci - čeleď *Argasidae*. Asi centimetroví členovci Napadají hlavně holuby. Svých hostitelů se nedrží. Přenášejí některé choroby. Napadení se projevuje začerváním a svěděním.

Klíšťata - čeleď *Ixodidae*. Měří 5 až 10 mm. Larvy mají tři páry nohou, dospělci čtyři. I larvy a nymfy sají s oblibou krev. Vyskytují se zpravidla ve smíšených a listnatých lesích s křovinami. Zpravidla se nevyskytují na horách. Rezervoárovými zvířaty jsou drobní hlodavci. V oblastech s výskytem klíšťat je třeba často se prohlížet. Odstranění klíštěte se dnes doporučuje provádět pinzetou se skosenými konci nebo opatrně nehty v gumových rukavicích. Vhodné je desinfikovat ránu jódovým preparátem. Následkem štipnutí může být drobné zarudnutí, které je třeba odlišit od (plošně mnohem většího) zarudnutí u lymeské boreliózy. Ta je klíšťaty přenášena stejně jako klíšťová encefalitida a klíšťová ehrlichioza.

Zákožka svrabová - *Sarcoptes scabiei*. Veliká 0,2 až 0,5 mm. Samičky si vyvrtávají chodbičky v kůži. Přenáší se mezilidským kontaktem (často v kolektivech - domovy důchodců, útulky pro bezdomovce apod.). Ekzém je prakticky nedílnou součástí choroby. Zákožky se s oblibou vyskytují na svrastělé kůži. Diagnóza je nesnadná (odlišení svrabového ekzému od ekzému jiného původu) a provádí ji zkušený dermatolog. Lze také provádět seškrab po rozvolnění kůže 5 - 10 % KOH. Seškrab se pozoruje pod mikroskopem. Léčba: potírání kůže Jacutinem.

Sametka podzimní - *Neotrombicula autumnalis*. Není závažná, vyskytuje se na podzim. Působí začerváním a svěděním. Po 2 - 3 dnech odpadne. Léčba nebývá nutná.

Trudníci - *Demodex*. Drobní roztoči (0,3 mm), ucpávající chlupové folikuly. Jejich význam je nejasný. Mají nápadně protažený zadeček. Léčba není nutná.

Vši - *Anoplura*. Veš dětská (hlavová) je běžná u dětí, které se snadno nakazí v kolektivu (školka, tábor). Nákaza není pro rodinu ostudou, pokud je včas řešena. Veš šatní nežije na těle, ale v

šatstvu. U nás se často vyskytuje v útulcích bezdomovců apod. Veš muňka (lidově filcka) se vyskytuje výhradně v pubickém ochlupení a její nákaza je vlastně pohlavně přenosnou chorobou. Jiný přenos (prádlem) je značně nepravděpodobný. Vši vyvolávají pupence, otoky, muňka namodralé skvrnky. Některé vši přenášejí choroby. K léčbě a prevenci se t. č. používá Diffusil H92M, ale může se vyvinout rezistence.

Štěnice - *Cimex lectularius*. Je to vlastně ploštice. Ráda se ukrývá ve škvírách. Živí se výhradně krví. Viz obr.

Dvoukřídlí - *Diptera*. Komáři, komárci, muchničky apod. působí jako přenašeči různých chorob, obvykle pasivní. Při prevenci je důležité zničení přirozených lůhnišť (zejména u komárů). Některé mouchy kladou larvy do ran či tělních dutin. Tomu se říká myiáze.

Blechy - *Siphonaptera*. Blechy se významně uplatnily při morových epidemiích. Kromě typického lidského druhu *Pulex irritans* napadají někdy člověka i zvířecí druhy.

Ke **KROUŽKOVČŮM** patří např. žížaly. Parazitem je pijavka lékařská, která se dříve používala k "pouštění žilou". Lékařský zájem k použití pijavek se nyní vrací. Moderní medicínu zajímá hirudin - látka s antikoagulačním účinkem.

Tento materiál byl vytvořen as. MUDr. Ondřejem Zahradníčkem jako interní výukový materiál pro studenty bakalářských oborů. Lze jej využívat pouze k účelu, ke kterému byl vytvořen, tj. ke studiu klinické mikrobiologie a přípravě na zkoušku z ní.