

Lékařská mikrobiologie pro ZDRL

Týden 27:

Odběr, transport a zpracování různých typů vzorků k mikrobiologickému vyšetření

Co nás dnes čeká

- Povídání o **diagnostice vzorků z určité lokalizace – společné zákonitosti a zásady**
- Povídání o **odběru a transportu vzorků z jednotlivých lokalizací**
- Povídání o **diagnostice vzorků z jednotlivých lokalizací**

„Odečítání“ bakteriologie



Foto: archiv MÚ

Přehled procesu vyšetření

Laboratorní vyšetření: proč ho vlastně provádíme?

Laboratorní vyšetření je **proces**. Jeho cílem je **získat informaci, použitelnou pro léčení pacienta** (buď bezprostředně nyní, nebo v budoucnu), případně pro ochranu populace (zjištění, zda má významnou chorobu)

Proces **začíná** v okamžiku, kdy se někdo rozhodne vyšetření provést.

Proces **končí** v okamžiku, kdy někdo (dost často tentýž člověk) vyhodnotí výsledek v kontextu ostatních informací a využije ho pro zacházení s pacientem

Odběr vzorku v procesu laboratorního vyšetření

Poté, co se někdo rozhodne vyšetření provést, zpravidla následuje **odběr (primárního) vzorku**. Odběr se zpravidla provede v ordinaci lékaře či v nemocnici, kde je pacient hospitalizován. Lze jej také provést přímo v laboratoři (na odběrovém místě), pak je ale nezbytně nutné, aby laboratoř věděla, jaký odběr je přesně požadován

Po odběru následuje **transport, vlastní zpracování a analýza vzorku a expedice výsledku** požadujícímu lékaři

Proces laboratorního vyšetřování

PACIENT/LÉKAŘ/S
ESTRA

LABORATOŘ

Indikace vyšetření – zda, jaké

Vlastní provedení odběru

Transport materiálu

Rozhodnutí, jak zpracovat

Vlastní zpracování materiálu

Zaslání výsledku

Interpretace výsledku (nikdy
jednotlivě, vždy společně
s ostatními výsledky)

Při provedení odběru v laboratoři

PACIENT/LÉKAŘ/S
ESTRA

LABORATOŘ

Indikace vyšetření – zda, jaké

Odeslání pacienta k odběru

Vlastní provedení odběru

Transport v rámci laboratoře

Rozhodnutí, jak zpracovat

Vlastní zpracování materiálu

Zaslání výsledku

Interpretace výsledku (nikdy jednotlivě, vždy společně s ostatními výsledky)

Proč na odběru tolik záležitostí

- Odběr a transport vzorku je na začátku celého vyšetřovacího procesu. To znamená, že **je-li odběr špatný, je špatná celá další diagnostika**
- Špatně provedený odběr či transport materiálu
 - zbytečné **trápení pacienta**
 - zbytečně **vyhozené prostředky** na vyšetření
 - riziko **chybného výsledku**, který vede léčbu pacienta nesprávným směrem (často k dalším nákladům, např. při zbytečné léčbě antibiotiky)

Odběr s ohledem na vyšetření

- Odběr samozřejmě není oddělená část celého procesu. **To, co a jak se má odebrat, závisí na tom, co bylo požadováno**, a zároveň také na tom, co a jak bude vyšetřeno
- I v případě odběru stejného materiálu (třeba krve či moče) mohou platit **různá pravidla podle toho, co se se vzorkem bude dále dít**
- Laboratoř musí být připravena **poradit klinickému pracovišti**, jak v kterém případě vzorek odebrat

Dva typy laboratorních procesů

- Když se zeptáte manažera, řekne, že není podstatné, co řídí, ale jaké je schéma řídicího procesu. Podobně, i když je mnoho druhů různých laboratoří, lze rozlišit **dva druhy vyšetření, lišící se způsobem práce**
- **První typ je lineární:** máme požadavek, ten je zpracován, a na konci je výsledek
- **Druhý typ je větvený:** máme požadavek, ten je zpracován, a během procesu se dochází k většímu počtu různých závěrů, a podle nich proces pokračuje různými směry

Typ 1: metoda → výsledek

- Pro většinu laboratorních vyšetření (stanovení, či nově „zkoušek“) platí, že **jedna metoda** (například stanovení AST) má pro daný vzorek daného pacienta **jeden výsledek**
- Tento výsledek je **často číselná hodnota** (kvantitativní stanovení)
- Tento způsob práce je **typický pro biochemii, hematologii, imunologii, ale i mikrobiologickou serologii (průkaz protilátek, případně i virových antigenů)**
- **Příklad: Serologie borreliózy, IgM – negativní, IgG – pozitivní, OD = 0,995**

Typ 2: algoritmy

- Zcela jiná je situace **např. u bakteriologického vyšetření výtěru z krku**. Zde jsou na počátku provedeny určité metody, a podle jejich výsledku navazují metody další. Některé metody jsou pouze pomocné a jejich výsledek není uveden v závěrečné zprávě. Na začátku nikdo (ani bakteriolog!) netuší, které všechny metody bude třeba uplatnit (a tím také například netuší, jaká bude u daného vyšetření cena)
- **Algoritmus je ovšem ovlivňován nejen skutečnostmi zjištěnými při diagnostice, ale i tím, co je o pacientovi známo – viz dále**

Jak to například funguje

- U zmíněného výtěru z krku si ukažme dvě extrémní možnosti:
 - **Výtěr byl naočkován na dvě obvyklé kultivační půdy.** Byla nalezena pouze běžná krční mikroflóra. **Po 48 byl expedován negativní výsledek.**
 - **Výtěr byl naočkován na dvě obvyklé kultivační půdy.** Byly nalezeny tři různé možné patogeny, pro které bylo nutno použít několik dalších kultivačních půd, identifikačních testů a setů citlivosti na antibiotika. Protože jde o pacienta v těžkém stavu, byla testována i širokospektrá injekční antibiotika. Vzhledem ke komplikovaným izolacím patogenů **byl výsledek expedován až za pět dnů.**

Důsledky

- **Určitá pravidla platí pouze pro určité typy vzorků a vyšetření**, a pro jiné typy platí jiná pravidla
- Zejména **specifická je v tomto pozice mikrobiologie**, přitom ale serologických vyšetření se to až tolik netýká, protože ta se spíše podobají lineární biochemii (jeden požadavek → jeden výsledek, často číselný)
- **U algoritmických vyšetření záleží mnohem víc na popisu žádanky**, při rozhodování „co teď s tím dál“ se často **bere v potaz diagnóza a další údaje o pacientovi**

Například takhle: Pacient A

V té moči je *E. coli*, v množství víc jak 10^5 /ml. Odkud ten pacient je?

Z urologické ambulance, diagnóza akutní zánět močového měchýře.

Hm, otestujeme základní set antibiotik na močové infekce.



A jindy takhle: Pacient B

V té moči je *E. coli*, v množství víc jak 10^5 /ml. Odkud ten pacient je?

Z interní JIP, je to pacient po transplantaci ledvin s horečkou

Uděláme základní test, rozšířený i vzácná antibiotika.

Proto je důležité, aby údaje na žádance byly úplné a pravdivé!



Foto: archiv MÚ

**Než odběr
provedeme**



<http://www.childrenshospital.org>



<http://www.stronghealth.com>

Otázka: Je vůbec odběr nutný?

- Lékař, ke kterému přišel pacient k vyšetření, by se měl zeptat sám sebe: „**Co udělám jinak v závislosti na výsledku vyšetření?**“
- Pokud zjistí, že ať vyjde vyšetření jakkoli, **bude jeho další postup ve vztahu k pacientovi stejný** (o postupu léčení se již rozhodl a jen si „chce něco ověřit“ nebo „má pocit, že by se to mělo vyšetřit“), je vyšetření pravděpodobně **zbytečné**

Výjimky z pravidla

- Kvůli **prevenci a profylaxi**, například u starších pacientů se monitorují určité hodnoty, před operací se zjišťuje zdravotní stav, u pacientů v těžkém stavu se monitoruje osídlení kůže aj.
- Z **epidemiologických důvodů** (pátrání po začátku epidemie chřipky). Pacient asi nebude léčen jinak podle toho jestli má nebo nemá pravou chřipku, nebo „parachřipku. Zato hygienici budou vědět, jestli mají pokračovat v očkování, nebo ho zastavit. Proto **je pro ně tato informace cenná a má smysl ji zjistit.**

Někdy je lépe nevyšetřovat

- V řadě případů je vyšetření zbytečně zatěžující, a pacientovi nepomůžeme
 - Pacient byl nemocný, nyní však se již jeho stav zlepšil. **Má smysl provést „kontrolní vyšetření“?** Většinou ne. Klinický stav samotný vypovídá o uzdravení zpravidla mnohem lépe, než laboratorní hodnoty. Navíc např. protilátková odpověď má často zpoždění za samotným průběhem nemoci.
 - ***Výjimečně ale kontrolní vyšetření smysl má, zejména tam, kde hrozí relaps, tj. obnovení onemocnění, nebo hrozí, že pacient, ačkoli už klinicky negativní, je infekční a mohl by někoho nakazit***

Musím přece zjistit patogena!

- Opravdu musím?
- Jsou případy, kdy sice existuje **více možností**, čím mohou být potíže pacienta způsobeny, ale léčba je ve všech případech **symptomatická**: typickým příkladem jsou respirační virózy, ale i další, hlavně virová onemocnění
- Mohou to ale být **i bakteriální onemocnění**, pokud je velká pravděpodobnost, že léčba naslepo bude fungovat, a odběr by byl příliš zatěžující pro pacienta
- ***Proč tedy vyšetřovat, když se léčba nezmění?***

Příklad: Zánět středního ucha

- Máme pacienta se zánětem středního ucha. Bubínek není protržen. Co budeme vyšetřovat?
 - **Výtěr z vnějšího zvukovodu?** Špatně. Možná tam najdeme několik zlatých stafylokoků, které se sem tam vyskytují i na kůži. Budeme léčit oxacilinem, který je v daném případě nevhodný.
 - **Provedeme paracentézu?** Špatně. Pokud není klinický důvod (příliš velký tlak ve středním uchu si vynutí paracentézu, aby hnis mohl vytéci ven), je nevhodné perforovat bubínek jen kvůli vyšetřování.
- **Nejlepší řešení je paradoxně nevyšetřovat nic a léčit empiricky, nejlépe amoxicilinem**

Na druhou stranu ale:

- Je řada případů, kdy se naopak často vyšetření opomíjí z důvodu že „je to přece jasné“, a přitom není
- Klasický případ: **tonsilitida („angína“)**. I řada lékařů je přesvědčena, že poznají bakteriální streptokokovou angínu. Studie však dokazují, že realita je jiná. **U tonsilitid a tonsilofaryngitid je tedy potřeba vyšetřovat vždy**, aby se zbytečně neléčila antibiotiky virová infekce hltanu.

Tonsillitis („angína“)

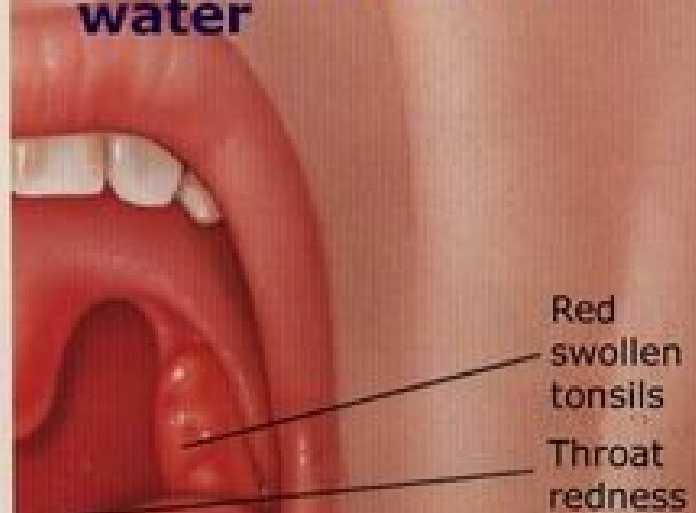
Bacterial

Come to the Health Center



Nonbacterial/Viral

Monitor at home, gargle with salt water



<http://www.medicallook.com>

Rozdíly jsou, ale spoleh na ně bohužel není.

Druhá otázka: jaké vyšetření?

- Rozhodnutím, že lékař chce provést vyšetření, to zdaleka nekončí. Musí se ještě rozmyslet, **jaké vyšetření se rozhodne provést.**
- Pro správné rozhodnutí musí samozřejmě znát, jaké vyšetření je pro kterou situaci určeno
- **Provádět zbytečně „pro jistotu“ všechno možné by byla chyba.**
- Součástí je také rozhodnutí o tom, **jak technicky se odběr provede**, do jaké nádoby či odběrové soupravy a podobně

Co často lékaře nenapadne

- Odebrat **hemokulturu** při pneumoniích, pyelonefritidách, ale i třeba u plošných ran (při vyšetření stěru se najde několik mikrobů, ale většina jsou jen náhodné nálezy).
- Odebrat hemokulturu a **moč** u tyfu
- Odmítnout výtěr z krku při průkazu zánětů plic a požadovat pouze **sputum**

Tři typy mikrobiálních patogenů (1)

- **Patogen typu *Streptococcus pyogenes*.**
Stačí například „výtěr z krku na bakteriologii“
(odběr z místa zánětu, patogen nespecifikován)
- **Patogen typu *Mycobacterium tuberculosis*.**
Nutno například „sputum na průkaz TBC“
(odběr z místa zánětu, patogen specifikován)
- **Patogen typu *Toxoplasma gondii*.** Nutno poslat například „sérum na protilátky proti toxoplasmóze (krev na protilátky = nepřímý průkaz, patogen musí být specifikován!)

Tři typy mikrobiálních patogenů (2)

- **Patogen typu *Streptococcus pyogenes*.** Týká se kultivovatelných bakterií a kvasinek
- **Patogen typu *Mycobacterium tuberculosis*.** Stále je to přímý průkaz, ale speciální postupy, při běžné kultivaci se nezachytí. Patří sem například mykobakteria, gonokoky, legionely, plísně, paraziti apod.
- **Patogen typu *Toxoplasma gondii*.** Nepřímý průkaz, event. přímý průkaz virového antigenu. Spirochety, viry, chlamydie, mykoplasmata aj.

Další otázka: Lze vyšetření provést teď?

- Je řada laboratorních vyšetření, která mohou být provedena **v podstatě kdykoli**, tj. mám-li zrovna v ambulanci pacienta, mohu vyšetření provést.
- Je ale také řada vyšetření, u kterých je nutná **příprava pacienta**, nebo je nutný odběr za spolupráce pacienta
- Je také nutno brát v úvahu **provozní dobu laboratoře**. Mikrobiologické laboratoře zpravidla nefungují nepřetržitě.

Načasování odběru

- Řada vyšetření vyžaduje **doručení do laboratoře do určité doby** (např. do dvou hodin). Je tedy nutno mít zajištěno, že vzorek opravdu včas dorazí, a že laboratoř vzorek přijme a zpracuje.
- V některých případech lze s laboratoří **domluvit přednostní zpracování**
- Některé vzorky vyžadují specifický **čas odběru** ve vztahu k pacientovi a jeho chorobě. Např. odběr hemokultur na vzestupu teploty, či odběr ve dne/v noci u některých tropických parazitóz



Foto: O. Z.

Typy vzorků

Typy vzorků v klinické mikrobiologii

Tekuté a kusové vzorky představují odebrané tkáně, tělní tekutiny, tekutiny, kterými bylo vyplachováno, umělé materiály vyňaté z těla a podobně

Stěry a výtěry jsou odběry vatovým tamponem na špejli či drátku

Ostatní vzorky: otisky, urikulty, sklíčka apod.

Každý typ vzorku vyžaduje jiný přístup, jiné zpracování, jiné hodnocení výsledku.

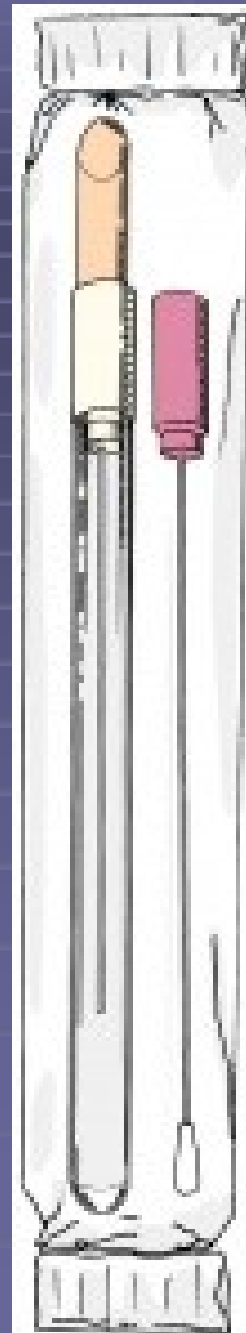
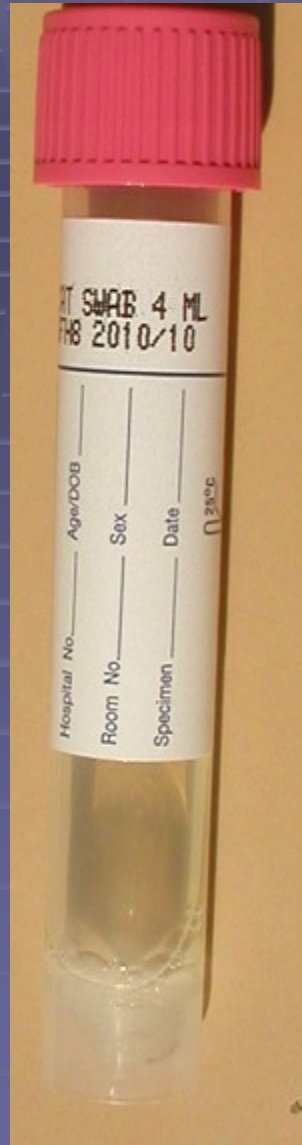
Výtěry a stěry



- Dnes již prakticky **neexistuje kultivační indikace suchého tamponu** bez transportního média. Tento tampon je indikován praktický výhradně pro vyšetření metodou PCR a některé průkazy antigenů
- Používají se tedy **transportní média**. Na bakteriologii je to zpravidla médium Amiesovo (na obrázku)
- **Speciální média** jsou vhodná pro houby (Fungiquick), nutná pro trichomonády (+ houby) z genitálií (C. A. T.), případně viry, chlamydie (v případě izolace viru)
- Potřebují-li se dostat „za roh“, použijí **tampon na drátu a nikoli na špejli.**

Některé odběrové soustavy

- zleva:
 - CAT (*Fungiquick je stejný, ale s modrým vrškem*)
 - souprava na chlamydie
 - suchý tampon s drátem



Novinka:

Tzv. flokované odběrové soupravy

- Existují ve variantě suché i s transportním médiem
- **Tampon pro odběr vzorku** je zakončen **nástřikem měkkých nylonových vláken**. Je vyráběn novou technologií nástřiku rovnoběžně orientovaných nylonových vláken v elektrostatickém poli. Není to tedy námotek jako u klasických souprav. Mikroorganismy jsou při odběru **aktivně zachyceny elektrostatickou silou vláken** (u klasického odběru jen pasivně ulpívají v námotku).

E-swab (1)

Transportní systém E-Swab je sterilní a obsahuje dvě části:

- Polypropylénovou **šroubovací zkumavku** s kapalným Amiesovým transportním médiem
- Vlastní odběrový **flokovaný tampon**
- Odběrový tampon navíc existuje ve více variantách pro různé účely



E-swab (2)

E-swab obsahuje tekuté Amiesovo médium (bez aktivního uhlí, proto není černé).

Médiu je vyrobeno tak, že na rozdíl od klasické soupravy s Amiesovou půdou ho **lze použít i na PCR** (neobsahuje nic, co by mohlo inhibovat amplifikaci)

Přehled „výtěrůvek“

(normálních nebo flokovaných)

Suchý tampon na špejli:
průkaz antigenu a DNA

Suchý tampon na
drátku: totéž, potřebují-li
se dostat na jinak
nedostupné místo

Tampon v Amiesu na
špejli: univerzální pro
bakteriologickou
kultivaci (vč. anaerobů,
kapavky, kampylobakt.)

Tampon v Amiesu na
drátku: totéž, potřebují-li
se dostat na jinak
nedostupné místo

Fungiquick – houby

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

Soupravy s médiem na viry, popř. chlamydie

Vyšetření mikrobiální DNA a RNA

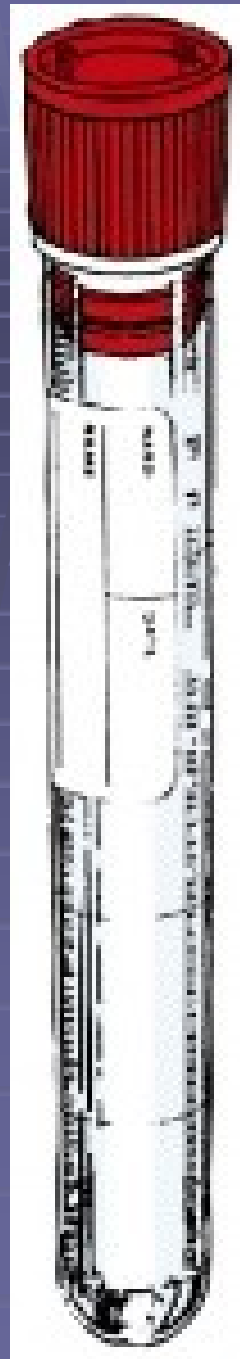
- Toto vyšetření mohou provádět **mikrobiologické laboratoře, ale i laboratoře genetické** (i tak je ale vhodné, aby interpretaci prováděl zkušený mikrobiolog).
- Zde se odebírá v podstatě **cokoli, kde lze předpokládat nález mikrobů**.
- **Požadavky na odběr se mění** (ze začátku bylo nemyslitelné pátrat po DNA v krvi, která byla inhibítorem reakce, dnes již lze krev vyšetřovat)
- Důležité je **vzorek nekontaminovat**, aby nedošlo k inhibici reakce
- Kromě suchých tamponů se dnes používají i soupravy s médiem, které je vyrobeno tak, aby k inhibici nedocházelo (e-swaby)

Odběrové nádoby

- Odběrové nádoby se používají **na kusové a tekuté vzorky**. Na rozměrech fakticky příliš nezáleží, stejně tak barva uzávěru nemá samozřejmě reálný dopad. Má však někdy význam organizační – záleží na dohodě v rámci konkrétní laboratoře
- **U anaerobní kultivace je lépe zaslat stříkačku s kombi zátkou**
- Vzorky se snažíme vždy **dopravit do laboratoře co nejdříve**, zásadní je to však u moče – do dvou hodin

Příklady nádobek

- Vlevo klasická zkumavka, např. na sérum, vpravo kontejner na střevní parazity



Co se například posílá, a jak rychle se to musí dopravit

- **Moč** – do dvou hodin, pokud nelze, nutno dát do ledničky (výjimka!!!)
- **Punktáty, exsudáty, různé podobné tekuté materiály** – co nejrychleji, ale není dán přímo časový limit. Nelze-li zpracovat hned, je lépe nechat při pokojové teplotě, ne do ledničky!
- **Odstřižené katétry** – I zde je vhodné rychlé zaslání event. pokojová teplota.

Jiné typy odběrů než „výtěrovky“ a odběrové nádoby

- **nátěr na podložní sklíčko:** kapavka, aktinomykóza, přímo zasláná tlustá a tenká kapka apod.
- **v kožním lékařství otisky** přímo na kultivační půdu, která je pro tento účel nalita až po okraj Petriho misky, v chirurgii otisky z ran pomocí sterilního čtverečku
- **urikult** – zvláštní způsob zasílání moče na půdu; z různých důvodů se příliš neujalo.
- **rychlé diagnostické soupravy**, většinou založené na přímém průkazu antigenu; jednoduchá manipulace, dostupná i pro nemikrobiologický personál. Při pochybách o výsledku použít klasické zaslání do laboratoře.

Příprava pacienta na některé mikrobiologické odběry

- U mikrobiologických odběrů zpravidla není nutná příprava, přesto v některých případech také není jedno, v jakém stavu se právě nachází pacient
- Při vyšetření stěru z urethry **na kapavku** je nutné, aby pacient **nebyl vymočený**
- Vyšetření **sputa a výtěru z krku** je nejlépe provést **nalačno**, jinak laboratoř vykultivuje mikroby, které se náhodně nalézaly v potravinách (i za normálních okolností se tam mohou vyskytovat)

**Dokumentace
vzorku: žádanka čili
průvodka**

Identifikační význam žádanky

- Jak se neustále v praxi ukazuje, **lidský faktor je všudypřítomný**. Je-li bohužel občas možná záměna dětí v porodnici, lze se divit, že někdy dojde k záměně vzorků?
- Odběrová souprava či **nádobka sice má svůj štítek**, je však nutné, aby **zároveň se vzorkem existovala i žádanka**, přičemž údaje na ní musí souhlasit s údaji na vzorku. Tím se riziko záměny výrazně snižuje.
- Zatímco **zkumavku či výtěrovku nelze archivovat, žádanku archivovat lze** (a je potřeba) pro jakoukoli budoucí pochybnost

Ekonomický význam žádanky

- **Objednávka vyšetření.** Pokud laboratoř nemá žádanku, nemůže provést vyšetření, výjimkou jsou jen akutní stavy objednané předběžně telefonicky. *(Stavební firma vám také nepostaví dům bez smlouvy, jinak by neměla jistotu, že dostane zapláceno.)*
- **Dokument pro plátce vyšetření.** Plátcem vyšetření je zpravidla zdravotní pojišťovna, někdy sám pacient (cizinec samoplátce). V každém případě je podmínkou proplacení řádně vyplněná žádanka.

Právní význam žádanky

- Představte si **situaci, kdy pacient žaluje zdravotnické zařízení** pro pochybení a tvrdí, že mu nebylo provedeno určité nutné vyšetření, které by odhalilo příčinu choroby
- Mezi dokumenty, které by v takovém případě byly prověřovány, by určitě nechyběla **žádanka**, s uvedením, jaká vyšetření a proč byla požadována
- Také proto je potřeba, aby žádanka byla vnímána jako **dokument jako každý jiný**

Medicínský význam žádanky

- V řadě případů žádanka přináší také **cenné medicínské údaje pro vlastní vyšetření.**
- Zde se ovšem **velmi liší jednotlivé typy vyšetření.**
 - Například **běžná biochemická vyšetření** budou jistě provedena úplně stejně bez ohledu na diagnózu a anamnestické údaje
 - Naopak **bakteriologické vyšetření** bude velmi ovlivněno tím, co pacientovi je, jaká je anamnéza apod.

Co nesmí chybět na žádné žádance

- **Identifikace pacienta** (a když tam je, je nutno se žádankou vždy manipulovat tak, aby nedošlo k narušení ochrany osobních údajů pacienta)
- **Identifikace plátce vyšetření (ZP)**
- **Identifikace odesílajícího lékaře a zařízení**, včetně uvedení odbornosti, popř. nákladového střediska, JIP / standardního lůžkového oddělení / ambulance a podobně. Také identifikace osoby, provádějící odběr
- **Razítko a podpis**

Co ještě nesmí chybět

- **Diagnóza.** Je důležitá pro pojišťovnu, pro retrospektivní studie (výskyt zvýšených hodnot parametru X u pacientů s diagnózou Y nelze zkoumat, pokud diagnóza není správně uváděna). U mikrobiologických vyšetření je ještě mnohem důležitější, viz dále
- **Datum a čas odběru.** Zejména v některých případech velmi důležitý údaj (především u hemokultur)
- **Kontakt na objednavatele.** Zvláště u statimových vyšetření je zcela nezbytný telefon
- Uvádění HIV či HBsAg positivity: ??? ochrana personálu × ochrana osobnosti pacienta (úkol k řešení pro spoustu budoucích právníků)

Požadavek STATIM

- Má-li být vyšetření provedeno urychleně (do dvou hodin, statimově), je to **nutno na průvodku uvést**, případně použít zvláštní typ průvodky
- **Požadavek nelze zneužívat**, vyšetření STATIM je dražší a pojišťovny samozřejmě odmítají proplácet vyšetření, které bylo tímto způsobem vyžadováno zbytečně, navíc statimová vyšetření jsou i zátěží pro laboratoř
- **Statimově nelze požadovat vše**, v mikrobiologii jen výjimečné případy (většinou mikroskopie či přímé průkazy antigenu)

STATIM – kam zavolat

- Pokud při statimovém vyšetření lékař chce, aby mu byl výsledek ohlášen telefonicky, je měl by **uvést na žádanku, komu a na jaké číslo má být výsledek hlášen** (uvést takové, na kterém někdo opravdu bude)
- Telefonické hlášení je **právně problematické** (možnost odposlechu – zjištění citlivých osobních údajů), i proto je vhodné používat jen v nutných případech

Jak vypisovat žádanku

- Vyplňujeme-li žádanku textem, je nutno ji vyplnit **čitelně**. Zejména číslice (rodné číslo!) jsou důležité: škaredé písmenko ve slově si lze domyslet z kontextu, škaredou číslici v rodném čísle si nedomyslíte
- Pokud na žádanku lepíme např. **štítek** se jménem pacienta a čárovým kódem, je nutno zabezpečit, že nemohlo dojít k záměně.
- Samozřejmě nesmí chybět **razítko a podpis**

Zaškrtávací a elektronické žádanky

- Tyto žádanky **urychlují zpracování vzorku**, zároveň také **nabízejí volbu** z relevantních vyšetření (takže odpadá možnost, že by omylem bylo požadováno vyšetření, které není relevantní, nebo byl zkomolen název vyšetření a podobně)
- Na druhou stranu svádějí k indikaci zbytečných vyšetření (zaškrtně se i to, co by jinak nikoho nenapadlo udělat)
- Je nutno **vyplnit vždy všechna požadovaná pole**, v opačném případě může laboratoř žádanku odmítnout

Opravy na žádance

- Pro žádanky platí **totéž co pro jakékoli jiné dokumenty**. Nelze přechmrkávat text tak, aby nebyl vidět, **nelze přelepovat či používat bělítka**.
- Pokud dojde k chybě, která přitom nevyžaduje použití nového formuláře, je nutno **chybný text přeškrtnout tak, aby text pod přeškrtnutím zůstal čitelný**. K opravě je nutno přičinit **parafu opravitele a datum opravy**.
- Tím je jasné, že žádanka **nebyla např. pozměněna dodatečně**

Serologická žádanka

- **Není nutná obzvláštní specifikace materiálu (je to jen „obyčejná“ srážlivá krev)**
- **O to více je nutno specifikovat **protilátky proti čemu** chceme vyšetřit**
- **Někdy není nutno vypisovat jednotlivé patogeny, často jsou k dispozici **sestavy** („serologie respiračních virů“, „serologie neurovirů“ a podobně)**
- **Je dobré vědět, jakými metodami bude sérum vyšetřeno (zda klasickými, či např. ELISA)**

„Stará“ a „nová“ serologie

- **Klasické serologické metody** neumějí rozlišit protilátky třídy IgG a IgM. Je pro ně proto důležité zjištění dynamiky titru, a proto je zde vhodné odebrat dva vzorky v odstupu 2–3 týdny. Ideálně tak, že první vzorek je vyšetřen až zároveň se druhým
- Vhodné je tu uvést **datum prvních příznaků**
- **U metod typu ELISA tento problém odpadá**, byť opakování vyšetření samozřejmě není na škodu

Bakteriologická žádanka 1

- **Přesný popis materiálu** a požadovaného **vyšetření** (je-li odlišné od klasické kultivace)
 - **nepsat pouze „výtěr“**, když není jasné, odkud
 - **ani „stěr z rány“ nestačí** (nutno např.: „rána na ruce po pokousání psem“ či „zhnisaná operační rána v gluteální oblasti“ a podobně)
 - **pozor na synonyma** („výtěr z hrdla“ může být z faryngu i z cervixu)
 - Rozlišovat **katetrizovaná moč × moč z PMK**
 - uvést **specifické požadavky** (např. anaeroby)
 - **nepožadovat vyšetření, které nelze provést nebo nemá smysl** (např. serologické vyšetření TBC)

Bakteriologická žádanka 2

- **Skutečná diagnóza**, je-li diagnóz více, napsat tu, která souvisí s vyšetřením, popř. všechny /např. (1) diabetes mellitus, (2) poševní výtok – pro mikrobiologa jsou v daném případě obě informace cenné/
- **Akutní / chronický stav / kontrola po léčbě / preventivní vyšetření**
- Stávající nebo uvažovaná **antibiotická terapie**, případně i alergie na antibiotika

Bakteriologická žádanka 3

- **Cestovatelská anamnéza** – návrat z tropů
- **Pracovní anamnéza** – práce v zemědělství aj.
- U **gynekologických materiálů** fázi menstruačního cyklu (a při menses raději neodebírat)
- V případě **mimořádných vzorků** se dohodnout, telefonicky, což ostatně platí vždycky, nejen u bakteriologických vzorků

Proč je to potřeba

- V bakteriologii, mykologii a parazitologii nastávají situace, kdy se pracovník laboratoře rozhoduje, např. které kultivační půdy použije, kterou sestavu antibiotik využije pro testování citlivosti a podobně.
- Ke **správnému rozhodnutí** jsou tyto anamnestické údaje nezbytně potřeba. Taktáž bakterie, je-li nalezena v krku, je normální flórou a není ji nutno testovat na citlivost, je-li nalezena v ráně, testování je samozřejmé

Zpracování kultivačních vzorků

Zpracování **bakteriologických kultivačních vzorků** obvykle zahrnuje následující

- před vlastním zpracováním se některé vzorky homogenizují, centrifugují či jinak **upravují**
- u některých typů vzorků **rychlé postupy** – mikroskopie, popř. přímý průkaz antigenu
- téměř vždy je základem **kultivace na několika pevných půdách** (KA + Endo + popř. další)
- někdy též **pomnožení v tekuté půdě** (v případě výtěrů ze spojivky POUZE tento bod)

Pro každý typ vzorku je postup jiný, proto je nutno vědět, o jaký typ vzorku jde!

Žádanka a vzorek

- Nejen žádanka, ale i vzorek musí být **čitelně popsán**. Musí být jasné, ke které žádance patří, proto často **nestačí jméno pacienta, ale nutná je i další specifikace** (zejména pokud se např. od jednoho pacienta posílají dva různé výtěry z různých lokalizací)
- U nátěrů na mikroskopii je nutno zajistit, **aby štítek s identifikací nezakrýval oblast na sklíčku, která má být mikroskopována**

Více vyšetření, případně vzorků: kolik žádanek?

- Na tuto otázku **nelze paušálně odpovědět**. Je třeba řídit se uspořádáním a organizací jednotlivých laboratoří. Laboratoře se nicméně zpravidla snaží vycházet vstříc (kopírují si např. žádanky, aby na základě jedné bylo možno provést vše požadované)
- Zpravidla **není nutno** více žádanek u vyšetření, která jsou všechna prováděna **na jednom úseku** laboratoře (např. bakteriologickém). Naopak **je nutno** více žádanek, pokud se vyšetření provádí **na různých místech** (v různých patrech, budovách aj.)

Laboratoř klinické bakteriologie



Laborant 2 „dělá opáčka“: u pozitivních vzorků připravuje testy citlivosti a testy bližšího určení mikroba

Mikrobiolog (VŠ) „odečítá laboratoř“ – prohlíží výsledky kultivací

Laborant 1 zapisuje výsledky

Zasílání výsledků a interpretace Časté chyby při odběru

Výsledek, předběžný výsledek

- Výsledek je **zaslán poté, co je dokončen diagnostický proces.**
- Někdy je poslán **předběžný výsledek** (v bakteriologii např. po provedení aerobní kultivace s tím, že na anaeroby či na kultivaci kvasinek a plísní se ještě čeká). Ne vždy je zaslání předběžného výsledku automatické, zpravidla ho však lze **domluvit.**

Interpretace ve výsledku

- Výsledek **už v sobě velmi často zahrnuje kus interpretace:**
- **mikrobiolog** se vyjadřuje k evidentním kontaminacím, náhodným nálezům, běžné flóře, komentuje nález v poznámce
- **biochemická laboratoř** uvede polohu zjištěné hodnoty vzhledem k referenčním hodnotám
- je ovšem nutno brát v úvahu, že izolovaný výsledek lze interpretovat jen částečně, **definitivní interpretace je vždy na klinickém pracovišti**

Příklady interpretace z mikrobiologie

- Laboratoř **odfiltruje evidentní kontaminace**. To, že výsledek není označen jako kontaminace, ovšem ještě neznamena, že o ni nemůže jít.
- **Poznámka ke kvantitě** („ojediněle“, „masivně“) je užitečná, ale 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 titr a jeho změny v čase
 - u moderních reakcí (ELISA) poměr IgM × IgG; na indexu positivity zase tolik nezáleží

Pozitivní výsledek – ale co znamená?

- **Nalezený mikrob může být**
 - skutečný patogen
 - součást běžné flóry – trvalé či přechodné
 - náhodný nález (např. z potravy u výtěrů z krku)
 - kontaminace
- **Lékaři jsou rádi, když má „jejich laboratoř“ hodně pozitivních výsledků.**
 - Mohou to ale být náhodné kontaminace, kolonizace apod.
 - Lepší je laboratoř, která nevydává za „nález patogena“ to, co patogenem s největší pravděpodobností není
 - **Léčit neexistující infekci je chyba**

Zaslání výsledku – organizace

- zorganizovat tak, **aby nedocházelo ke zbytečným prodlevám**
- dnes zpravidla lze **zasílat výsledky elektronicky** (v rámci zdravotnického zařízení i mezi zařízeními navzájem), tj. LIS → NIS
- lékař dohodne s mikrobiologem (nebo napíše na žádanku), 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

Definitivní interpretace

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

Průběžná spolupráce mezi klinickým pracovištěm a laboratoří

● **Nejde jen o domluvu o konkrétních vzorcích! Spolupráce může mít různé formy**

od občasných konzultací až po součinnost při výzkumné práci

● je **oboustranně užitečná**

● **klinikovi pomáhá při rozhodování**

● **laboratoři zase dává konkrétnější představu o pacientech**, což umožňuje např. navrhnout zkvalitnění diagnostické práce

Nejčastější chyby na žádance

- **Chybí některý údaj** (odbornost, diagnóza, IČZ odesílajícího zařízení)
- Údaj je **neúplný nebo nečitelný**
- Údaje **vzájemně neodpovídají**, je evidentní, že některý z nich je špatně (např. pacientka je žena a diagnóza „hyperplazie prostaty“)
- **Není jasné, o jaký vzorek jde** (závažný problém především na mikrobiologii)
- Není jasné, **jaká vyšetření jsou požadována**

Nejčastější chyby při odběru

- Odběr je **nesprávně (zbytečně) indikován**
- Odběr je proveden **z nevhodného místa** (týká se hlavně bakteriologie, např. je zaslán výtěr z krku u podezření na infekci DCD)
- Odběr je **špatně technicky proveden**, není proveden asepticky a podobně
- Pacient **není správně připraven k odběru** (např. není lačný před odběrem krve)
- Vzorku **není dostatečné množství**, je vyschlý či jinak znehodnocený

Některé mikrobiologické chyby

- **Špatně odebrané sputum** (zaslány sliny)
- Zaslán **vzorek z HCD** u podezření na infekci DCD (*neplatí u chřipky, tam je to v pořádku*)
- Zaslán výtěr z řiti tam, kde je nutná kusová **stolice** (parazitologie, virologie, antigen *Clostridium difficile*)
- **Nedostatečně vyplněná žádanka** (chybí označení typu vzorku, místa na těle, chybí diagnóza, označení zda jde o akutní stav či o kontrolu po léčbě, cestovatelská anamnéza aj.)
- Zaslána **jen jedna hemokultura**

Odběry a zpracování různých typů vzorků

Diagnostika sepsí

Diagnostika sepse

- **hemokultury (viz dále)** a další mikrobiologická vyšetření (vyměněný katetr, sputum, moč dle předpokládaného původního ložiska, lumbální punkce při podezření na meningitidu)
- **biochemická laboratoř** – zánětlivé ukazatele (CRP, prokalcitonin, diferenciální krevní obraz)
- **laboratorní známky diseminované intravaskulární koagulace (DIC):** trombocytopenie, snížení AT III apod.
- **zjištění infekčních ložisek:** RTG srdce a plic, ORL vyšetření, ultrazvuk (jícnový – ložiska na srdci), CT a další
- neurologické vyšetření

Hemokultury – odběr krve

- Jedná se o **nesrážlivou krev**, principiálně zcela odlišné vyšetření než vyšetření serologická (*nejde o průkaz protilátky ani antigenu, mikrob musí zůstat živý a prokazuje se kultivačně*)
- odběr do **speciálních lahviček** pro automatickou kultivaci
- Nutno zabezpečit tak, aby se **minimalizovalo riziko pseudobakteriémie** (viz dále)
- **U dospělých se odebírá 5 až 10 ml krve, u dětí zpravidla jen 1 ml** (odběr je náročný, a také platí, že u dětí má význam i méně bakterií)

Druhy kultivačních nádobek

- Existují **různé typy** podle toho, které mikroby mají být především zachyceny (aerobní, anaerobní, kvasinky)
- **Některé nádobky obsahují aktivní uhlí.** Jsou určeny ke kultivaci krve pacientů, kteří už berou antibiotika (klasická lahvička by mohla dát falešně negativní výsledek – antibiotikum by potlačilo růst)

Nejběžnější jsou aerobní standardní, aerobní s uhlím a anaerobní s uhlím.

Příklady nádobek na hemokultivaci



Pseudobakteriémie – příčiny

- **Nevhodně provedený odběr**, nedostatek asepsy při odběru krve
- **Odběr pouze ze zavedených vstupů** (zachytí se bakterie kolonizující vstup, která však nemusí být původcem skutečné bakteriémie, natož sepse)

Proč vadí pseudobakteriémie? Znamená, že pacient je zbytečně léčen pro neexistující infekci. Je také možné, že infekce existuje, ale místo jejího původce byl nalezen jiný mikrob.

Jak zamezit pseudobakteriemií – I

- Odebírat hemokultury **cíleně**, když je přítomnost bakterií v krvi pravděpodobná, naopak neodebírat „z rozpaků“ když je indikováno jiné vyšetření
- Odebírat hemokultury **v dostatečné kvantitě**: jedna je k ničemu, i dvě jsou málo, tři je optimum
- Odebírat hemokultury **z vhodných míst**: nejméně jednu z nové venepunkce, ideálně tři venepunkce plus odběr z žilního katetru
- Odebírat hemokultury **ve vhodnou chvíli**, u septických stavů typicky při vzestupu teploty

Jak zamezit pseudobakteriémii – II

- Odebírat hemokultury **správně**, velmi důležité a často opomíjené je dodržení aseptického odběru (desinfikovat, ne jen čistit kůži, a desinfekci nechat opravdu zaschnout)
- Odebírat hemokultury **do správné soupravy**: zpravidla není důvod posílat i anaerobní, není-li skutečné podezření na anaeroby (předpokládaný původ sepse v břišní dutině). Odběr do lahviček s aktivním uhlím je nutný přinejmenším tam, kde je pacient již zaléčen antibiotikem
- Doprovodit hemokultury **dobře vyplněnou žádankou**: nutné je nejen datum, ale i čas a místo odběru – pro interpretaci nálezu

Jak zamezit pseudobakteriemií – III

- U podezření na **kontaminovaný cévní katetr** se katetr mění. Starý katetr nevyhazujeme, nýbrž pošleme na bakteriologii. Dnes již existují metody schopné odhadnout, zda jde o skutečné osídlení katetru či náhodný nálezn (viz dále)
- Totéž samozřejmě platí pro **jakékoli implantáty, které se vyjímají z těla** – jejich mikrobiologické vyšetření může přinést podstatnou informaci pro další léčbu

Jak zjistit pseudobakteriémii, když už k ní došlo

- Typické pro pseudobakteriémii (falešnou pozitivitu hemokultury) je, že
 - je pozitivní **jen jedna ze tří hemokultur**
 - nebo jsou pozitivní i všechny, ale **z každé vyroste jiný kmen** (jinak citlivý, jiný vzhled kolonií) a vyroste **za různě dlouhou dobu**
 - klinické **potíže pacienta neodpovídají nálezů**
 - případně se **stejný kmen najde i na kůži pacienta**

Posouzení času positivity

- Čas **od odběru do okamžiku, kdy automat hlásí pozitivitu** (pípá a na monitoru se objeví červený obdélník) je kratší v případě masivní přítomnosti bakterií v krvi a delší tehdy, když je bakterií málo
- U skutečných bakteriemií je čas většinou kratší (do 48 hodin) a **u všech odebraných hemokultur přibližně stejný** (plus minus dvě hodiny)
- Případně může být **kratší u hemokultury z místa, které je zdrojem infekce** (například hemokultura z CVK, když tento CVK je zdrojem katetrové sepsy)
- **Už chápete, proč je tak důležité psát na žádanky čas a místo odběru?**

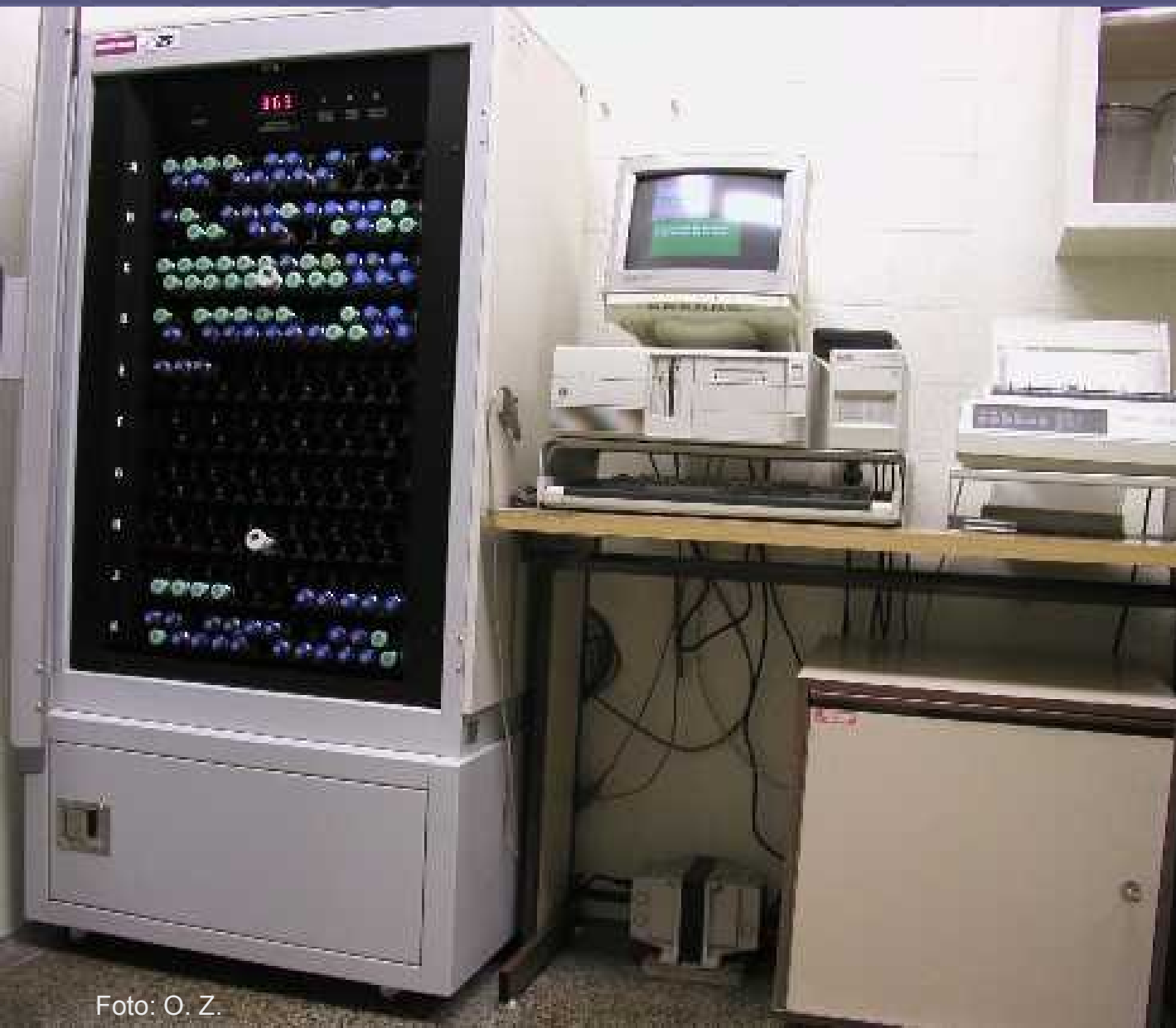
Fungování kultivátorů

- **Kultivátor, napojený na počítač**, automatický udržuje optimální podmínky kultivace, a zároveň vyhodnocuje stav nádoby a indikuje případný růst (např. změna tenze CO_2)
- Růst je **zvukově a opticky signalizován. Pokud ani po týdnu nic neroste**, signalizuje to přístroj také (je třeba expedovat negativní výsledek)

Automat na hemokultury



Hemokultivační automat otevřený



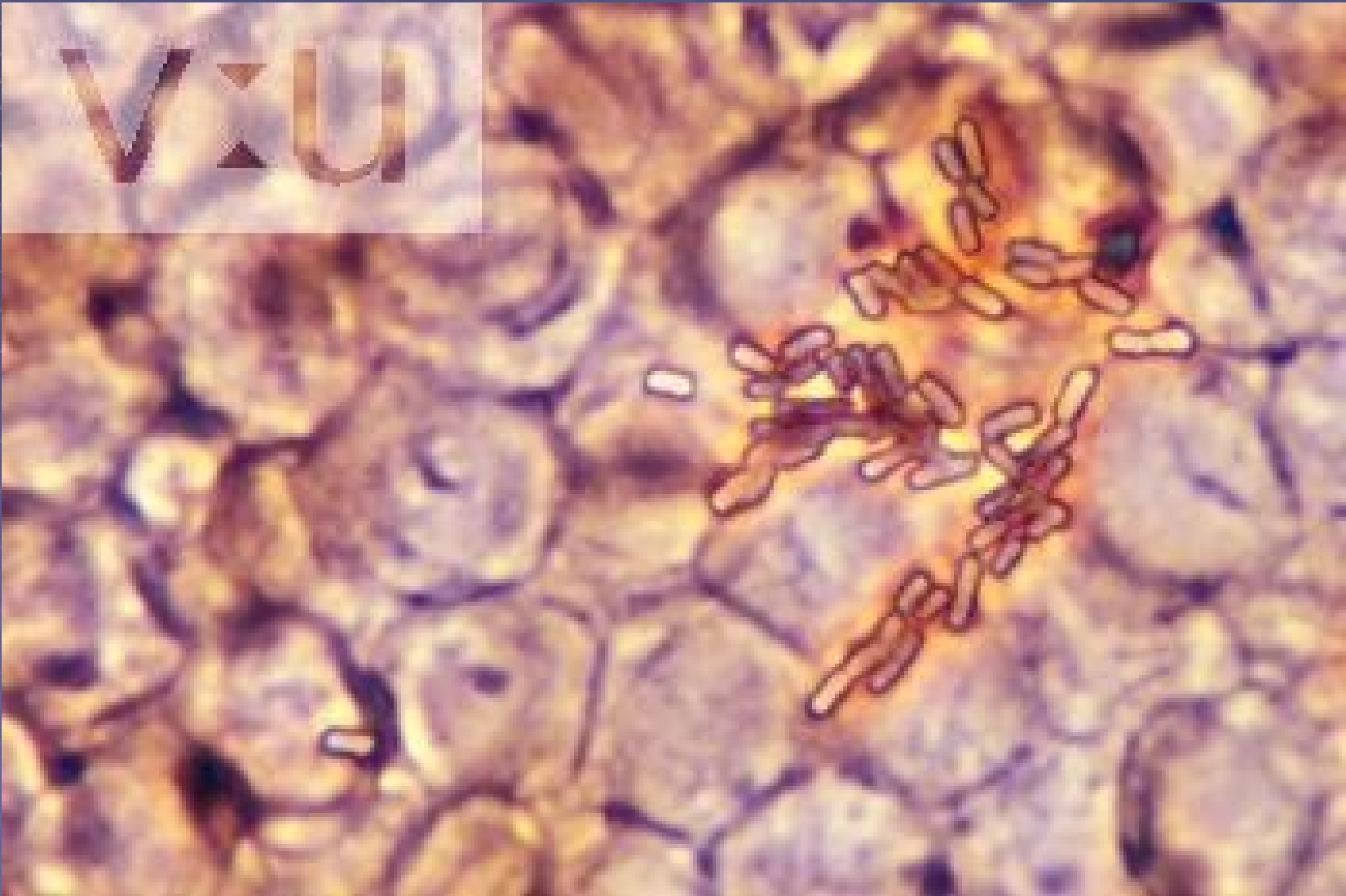
Když je hemokultura pozitivní...

- Lahvička je **vyjmuta z přístroje**
- Je nutno **zaevidovat čas, resp. dobu od příjmu do positivity**. Čím delší je tato doba, tím je pravděpodobnější, že jde o kontaminaci
- Provádí se **vyočkování na pevné půdy, nátěr na sklo barvený Gramem** a podle jeho výsledku zpravidla „**napřímo**“ **orientační diskový test citlivosti**; místo standardní suspenze se použije přímo tekutina z lahvičky → není spolehlivé

Další postup

- Je třeba počítat s tím, že **testy „napřímo“ jsou jen orientační**, už pro nestandardní obsah bakterií v jednotlivých krvích. Zpravidla se proto v dalším kroku provádí **řádné vyšetření citlivosti**. (To také znamená, že předběžně nahlášená citlivost se ještě může změnit!)
- Výjimkou jsou **případy, kdy jde asi o kontaminaci** (pozitivní jen jedna hemokultura ze tří, nebo pozitivní všechny, ale evidentně různé kmeny, pozitivita až za delší dobu, koaguláza negativní stafylokoky), pak se většinou upřesňující testy již neprovádějí

E. coli v hemokultuře, fázový kontrast



<http://www.visualsunlimited.com/browse/vu198/vu19873.html>

Spolupráce laboratoř – oddělení

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

Mikrobiologické vyšetření cévních katetrů

- Katetry se dnes zpravidla posílají **ve sterilní zkumavce**, aniž by se něčím zalévaly. V laboratoři se
 - buďto rozbije biofilm na katetru **ultrazvukem** a uvolní do roztoku (tzv. sonikace)
 - nebo se katetr **poválí po povrchu** agarové půdy
- Obě metody jsou **semikvantitativní**, tj. z výsledku se dá odvodit, zda jde pravděpodobně o významný nálezn, nebo kontaminaci
- Tradiční metoda, kdy se katetr pouze vhodil do bujónu a zde se pomnožovaly bakterie, se již považuje za zastaralou

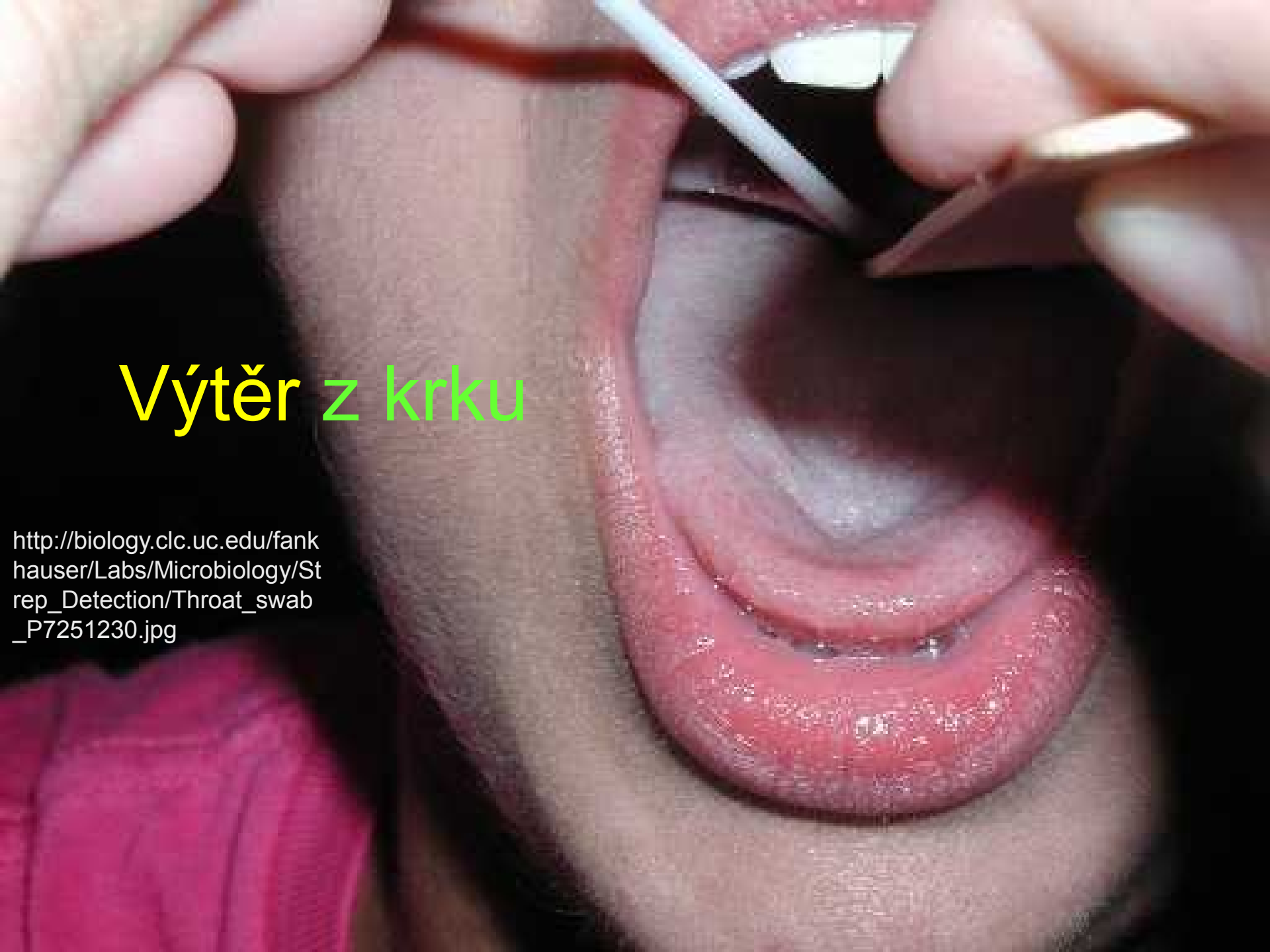
Další mikrobiologické možnosti při vyšetření infekcí krevního řečiště

- Vyšetření **moče, sputa, mozkomíšního moku** apod. se provádí podle podezření na zdroj sepse
- U některých mikrobů je možný **přímý průkaz antigenů** (povrchových struktur bakterií) v krvi bez kultivace, tj. s možností téměř okamžitého získání výsledku: mananové antigeny u kvasinek, případně antigeny původců meningitid, původce tyfu a podobně

Dýchací cesty

Výtěr z krku

http://biology.clc.uc.edu/fankhauser/Labs/Microbiology/Strep_Detection/Throat_swab_P7251230.jpg



Odběr vzorků na vyšetření z dýchacích cest obecně

- Na **bakteriologii** posíláme
 - **výtěry** – (z krku, tonzil, nosu apod.), vždy na tamponu v **transportní půdě** (např. Amiesově), popsat odkud je výtěr
 - **sputum, tracheální aspirát či bronchoalveolární laváž** u bronchitid a pneumonií (**u vyšetření TBC nutno označit!**)
 - **hemokulturu** u pneumonií, **moč** na legionelový antigen
- **Viroví** původci se většinou nevyšetřují. Je-li výjimečně potřeba je vyšetřit, volíme např. výplachy z nosohltanu a bronchoalveolární laváže speciálním médiem, či krev na serologii respiračních virů. **U viru chřipky** se používá výtěr ze zadní stěny faryngu do speciálního transportního média
- Na **mykologické vyšetření** volíme výtěr na tamponu v soupravě FungiQuick

Možná vyšetření u plicních infekcí

- Základem je **klinické vyšetření a rentgen**, důležité je rozlišení klasické × atypické pneumonie (zcela jiné spektrum původců)
- **U klasických pneumonií** má smysl správně odebrané sputum, případně (u septického průběhu) krev na hemokultivaci
- **U atypických pneumonií** serologie mykoplasmat a chlamydií (případně v rámci „serologie respiračních virů“).
- **U nemocničních pneumonií** může připadat v úvahu navíc cílené **vyšetření na legionely**. Kromě kultivačního vyšetření je možné i vyšetření moče na legionelový antigen, případně serologie

<http://www.lumen.luc.edu/lumen/meded/mech/cases/case9/sputum1.jpg>

Vyšetření sputa



Co je potřeba vědět

- **Na žádanku** je nutno uvést, o jaký vzorek jde, jaké vyšetření je požadováno, a případně další podstatné údaje
- Laboratoř má právo **odmítnout špatně odebraný vzorek sputa** (nehnisavý, nejsou tu leukocyty, jen epitelie → jsou to sliny!!!)
- **Kultivace tuberkulózy** musí být požadována zvláště, i když se posílá stejný vzorek sputa
- U **virologie a průkazů různých antigenů** se případně posílají suché tampony, výplachy z nosohltanu (izolace viru) a podobně

Co se se vzorky děje v laboratoři

- Většina výtěrů se kultivuje na **krevním agaru**. Na ten se umisťují disky, jejichž cílem je odclonit běžnou flóru a umožnit záchyt patogenů. Kvůli hemofilovi, který na KA roste jen v přítomnosti např. zlatého stafylokoka, se na agar očkuje stafylokoková čára
- U sput apod. se také provádí **mikroskopie**
- Kromě KA se užívají **další půdy**, např. Endova
- **Virologické vzorky** se izolují na vajíčkách či tkáňových kulturách, nebo se hledá antigen
- V **serologických vzorcích** se hledají protilátky

Vyšetření sputa

Diagnostické schéma (1)

- **Den 0:** mikroskopie (Gramovo barvení)
- **Den 1:** výsledek primokultivace vzorku na KA, EA a NaCl. Je-li přítomna jen běžná flóra, EA se vyhodí a KA a NaCl se prodlužuje do dalšího dne. Případný patogen se určuje a testuje se jeho citlivost; je-li ho málo dělá se jeho izolace (kolonie se opatrně nabere kličkou a naočkuje se na celou misku křížovým roztěrem tak, aby se určitě získal čistý kmen

Vyšetření sputa

Diagnostické schéma (2)

- **Den 2:** expedice negativních výsledků (prohlížení „prodlužek“, jak říkáme u nás, či „dohřívek“, jak říkají v nemocnici na Homolce). Expedice většiny pozitivních výsledků, je-li bližší určení hotovo a test citlivosti uspokojivý. Není-li, nebo je-li hotova teprve izolace, „jede se dál“.
- **Den 3:** expedice většiny zbylých pozitivních výsledků (rezistentní, špatně určitelné, z izolací)
- **Den 4:** výjimečně expedice posledních výsledků

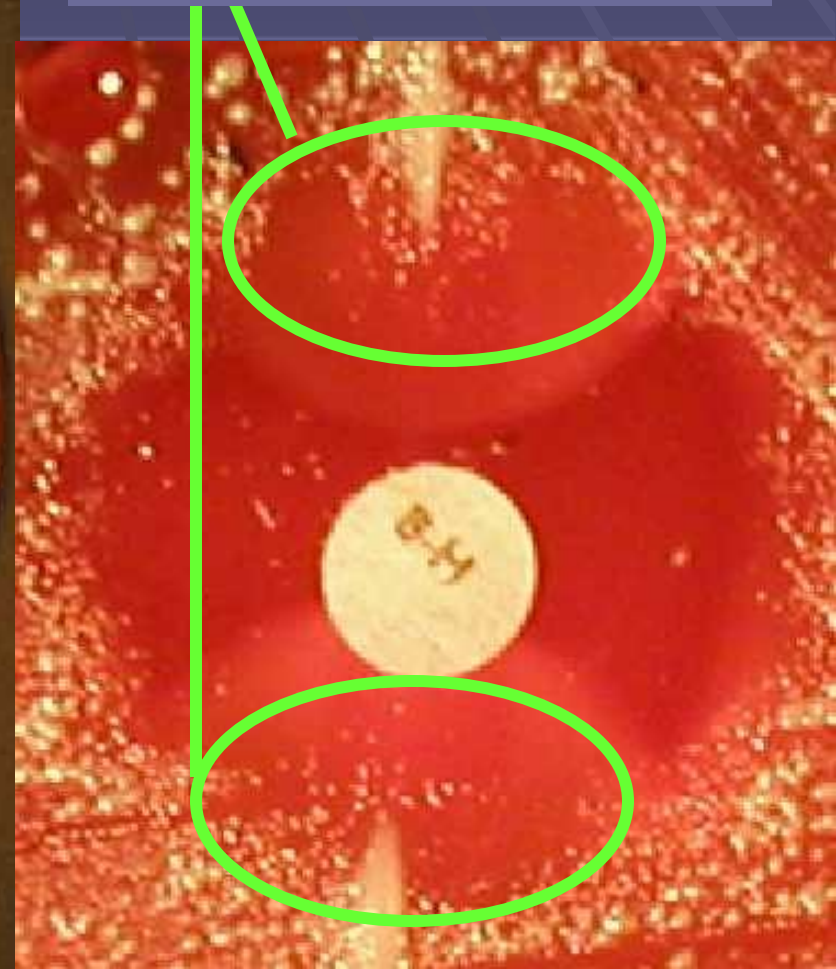
Výtěr z krku

Diagnostické schéma

- **Den 0:** pouze nasazení kultivací
- **Den 1:** výsledek primokultivace vzorku na KA a EA. NaCl se zde nepoužívá. I v tomto případě se KA s běžnou flórou prodlužují
- **Den 2:** expedice všech negativních a většiny pozitivních výsledků
- **Den 3:** expedice téměř všech zbylých pozitivních výsledků

Kultivační výsledek výtěru z krku s běžnou flórou

V těchto místech pátráme po hemofilech



Trávníčí

cesty

Odběr a transport stolice na jednotlivá vyšetření

- **Bakterie** – v Amiesově transportní půdě
- **Kvasinky** – v půdě FungiQuick
- **Viry** – vzorek velikosti lískového oříšku; má-li být provedena izolace viru, je nutno chladit
- **Paraziti** – opět velikosti lískového oříšku, nemusí být sterilní. Označit cestovatelskou anamnézu!
Zpravidla tři vzorky.
- **Toxin *Clostridium difficile*** – opět velikosti oříšku
- **Roupi** – Grahamova metoda – perianální otisk na speciální lepicí pásku, mikroskopuje se
- **Otravy** – zvratky, zbytky jídel

Odběr stolice na bakteriologii

- Odběrový tampon se **opatrně zavede za anální svěrač**, opatrnou rotací se setře povrch anální sliznice a krypt
- Při správném odběru je **stolice makroskopicky zřetelná** na povrchu tamponu.
- Tampon se vloží do nádobky (zkumavky) určené k transportu, v nádobce s transportním médiem tampon musí být **zanořen hluboko do media**. Nádobka musí být dobře uzavřena.
- Uchovávání a transport probíhají **při pokojové teplotě**, lepší je ovšem doručit vzorek ihned
- Na žádanku je **vhodné uvést adresu pacienta**

Proč adresu?

- V případě nálezu obligátního patogena (salmonela, shigela, kampylobakter, yersinie) je laboratoř **povinna hlásit nález na územně příslušné pracoviště hygieny**, takže jednak musí vědět, na které okresní pracoviště volat, jednak při samotném hlášení je adresa vyžadována, aby mohl být pacient osloven
- Pokud na žádance adresa není, zjistí laboratoř adresu **telefonickým dotazem** (což je ovšem zbytečně zdlouhavé)

Odběr kusové stolice (na parazity, toxin *C. difficile*, případně viry)

- Pro odběr se používá **kontejner s lopatkou, sterilita není striktně vyžadována** (hlavně u parazitů)
- Pacient odebere po defekaci **kousek stolice velikosti lískového ořechu** (ne menší), ne z povrchu stolice, ne tak, aby mohlo dojít ke kontaminaci
- Nutno vyšetřit **několikrát za sebou, zpravidla se provádí tři dny po sobě**
- Materiál **lze uchovat v lednici**, ale nesmí zmrznout
- Při vyšetření na lamblie je lépe doručit materiál do laboratoře **čerstvý**; je vhodné domluvit s laboratoří čas odběru. U izolace virů nutno uchovávat při 0 °C

Odběr na roupy (Grahamova metoda)

- Odběr se provádí **ráno bez omytí** (samičky roupů přes noc nakladou vajíčka do perianálních řas)
- Před odběrem **průhlednou (!)** lepicí pásku opatrně odlepit z podložního skla, přiložit na anální otvor a řasy v jeho okolí, stisknout hýždě proti sobě, pak zase rozevřít a pásku opatrně přemístit zpátky na sklo
- U dospělých (bolestivost kvůli ochlupení) se použije **odběr stolice** (je ale menší výtěžnost), případně se použije tzv. **Schüffnerova tyčinka**

Další odběry z trávicích cest

- Výtěr z ústní dutiny (většinou málo výtěžný, protože původci jsou titíž, kteří jsou v ústech i jako běžná flóra)
- Žaludeční šťáva, např. na lamblie
- Vzorky získané při endoskopii s biopsií (například vzorky žaludeční nebo dvanáctníkové stěny na helikobaktera)

Diagnostika bakteriálních původců

- **Přímý průkaz toxinu A (*Clostridium difficile*)** jako antigenu. Průkaz toxinu je důležitější než samotný nálezn klostridia – to mohou mít i zdraví!
 - **Kultivace na různých půdách** (výběr závisí na stáří pacienta a diagnóze) – viz dále
- U cestovatelů přidáváme i méně obvyklé půdy (např. TCŽS na cholery)*



Kultivace stolice

Den 0. (přijatá stolice)

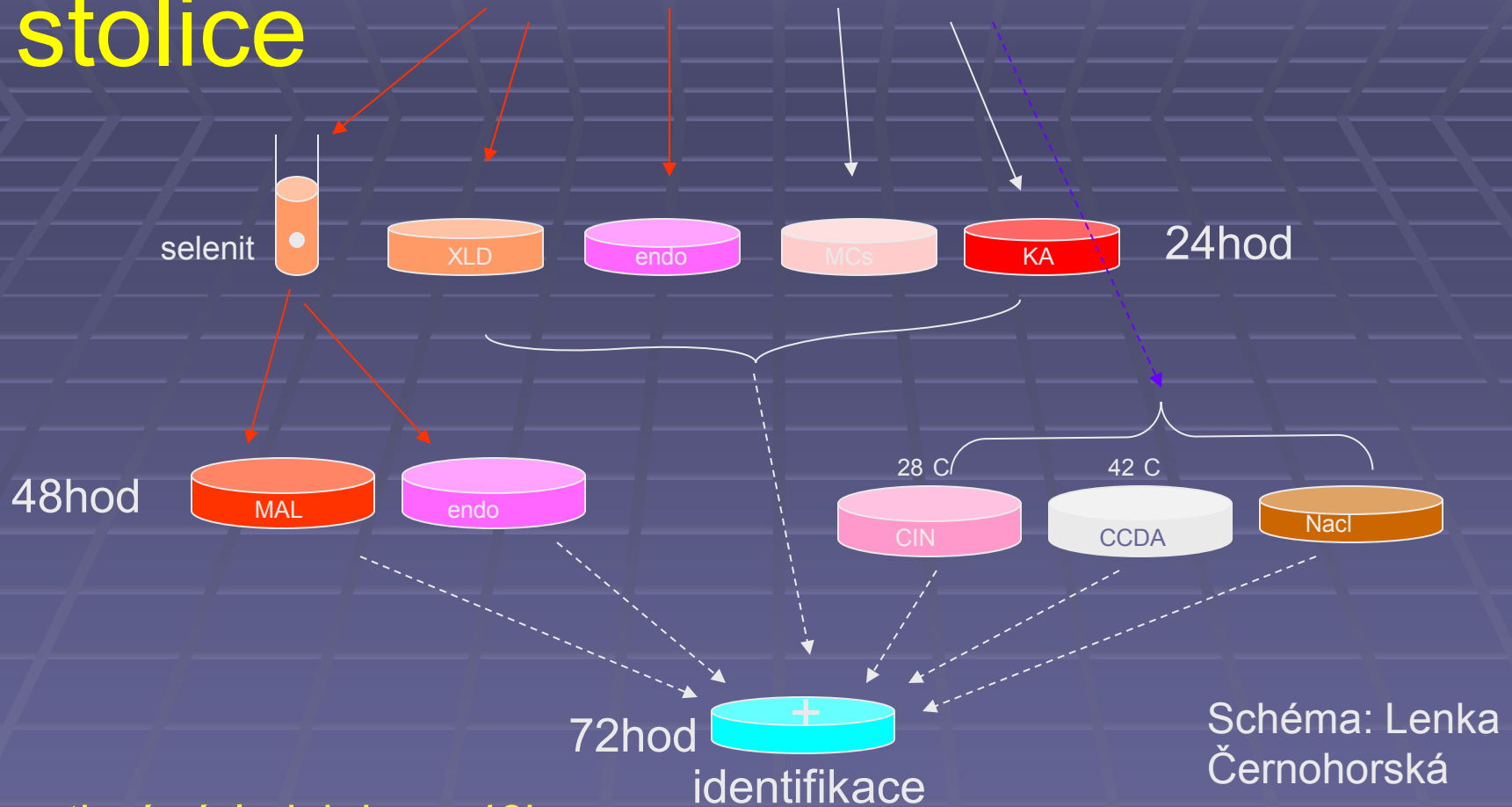


Schéma: Lenka Černohorská

Negativní výsledek je za 48h
Pozitivní za 72h a déle

*Není-li uvedeno jinak kultivace probíhá při 37 C

Identifikace bakterie

- Bakterie **kultivujeme na různých půdách**, na kterých mají charakteristický vzhled
- Bakterie dále identifikujeme **biochemickými testy**
- V některých případech (salmonely, escherichie) je žádoucí **antigenní analýza vypěstovaného kmene**

Proteus mirabilis



Průkaz enterotoxikóz

- V praxi se prokazuje prakticky jen **toxin *Clostridium difficile***
- **Nestačí kultivační průkaz mikroba**
- Vždy **nutný průkaz toxinu**
- Pokud je žádán průkaz např. stafylokokového toxinu a není (což většinou není) dostupný v nejbližší mikrobiologické laboratoři, lze požádat o spolupráci např. referenční laboratoř
- Pokud možno vyšetřit i **vzorek jídla**

Moččóvė cesty

Odběr a transport moče

- Nejspolehlivější je moč získaná **suprapubickou punkcí**. V praxi se ovšem používá málokdy
- Poměrně dobrá je také **katetrizovaná moč** (katetrizace provedená kvůli odběru)
- **Běžně odebraná moč** nemusí být špatným vzorkem, je-li správně odebrána a zaslána
- **Moč z permanentního katetru** je nejhorší z možných vzorků, občas nám ovšem nezbyvá nic jiného

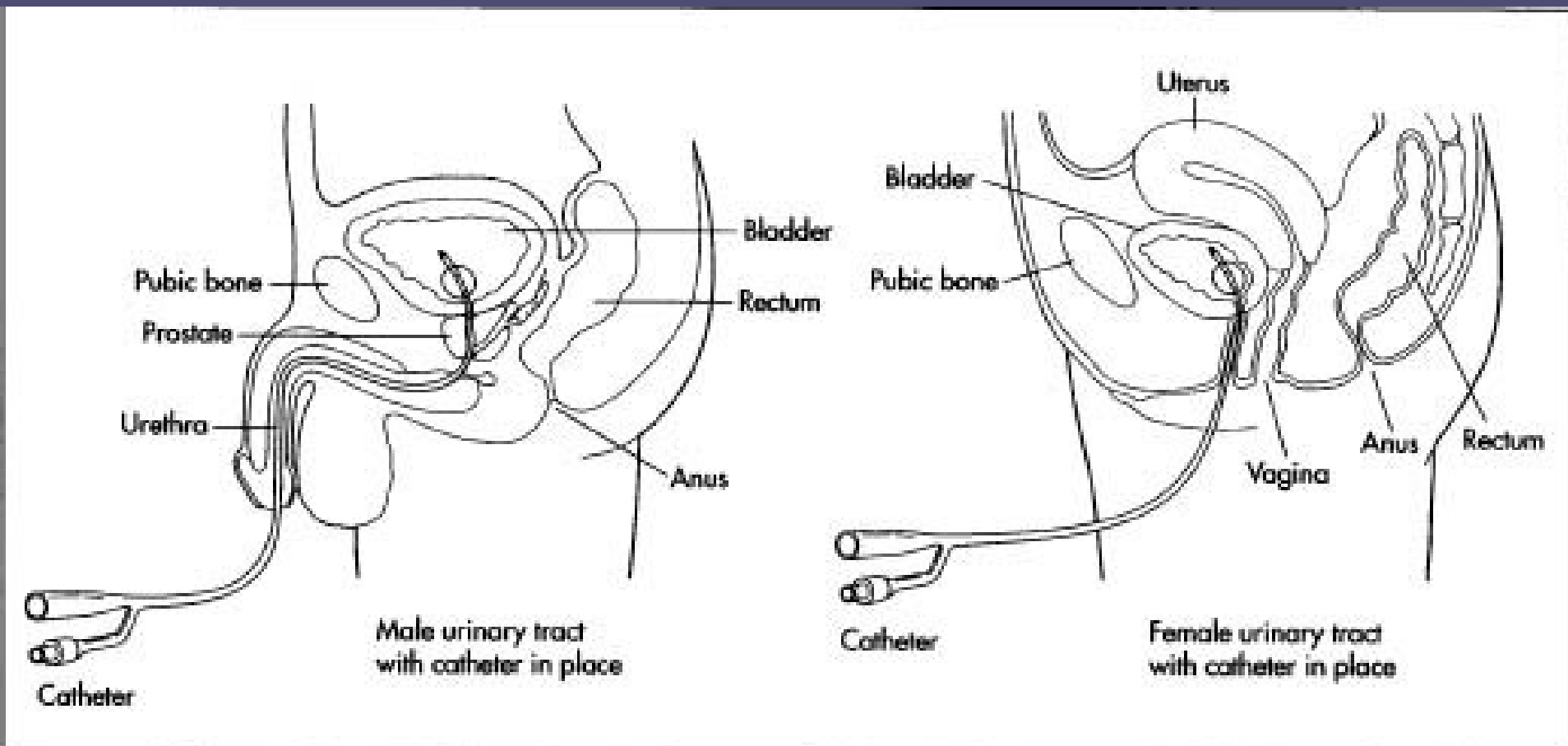
Moč z permanentního katetru

- Pokud je možno **počkat několik dní** např. na výměnu katetru, je to lepší – výsledek z nově vyměněného katetru bude daleko lépe vypovídat o situaci
- Pokud počkat nelze, **moč odebereme, ale musíme počítat s tím, že interpretace je nejednoznačná**
- Musíme vždy zvažovat, **zda vůbec uvažujeme o léčbě antibiotiky**; pokud ne (asymptomatická bakteriurie), je zřejmě odběr zbytečný
- **Mikrobiologické vyšetření samotného katetru** se považuje za nevhodné (výsledky se nedají interpretovat), i když mnohé laboratoře ho provádějí

Permanenční katetry



madehow.com



Odběr moče spontánně vymočené

- ze středního proudu moči spontánně vymočené (*rutinní typ s rizikem sekundární kontaminace během odběru*)
- **postup:** nádoba pro odběr moči musí být sterilní, *se širokým hrdlem (např. kádinka)**, poučený pacient si před odběrem důkladně omyje zevní genitálie vodou a mýdlem a *(případně i)* otře si zevní ústí močové trubice tamponem smočeným v dezinfekčním roztoku (*zejména u dětí se ovšem použití dezinfekčního roztoku nedoporučuje*).

**takto je to psáno v oficiálním doporučení, v praxi ale záleží na situaci; pokud pacient močí přímo do zkumavky, je to lepší*

Výjimky z pravidel o odběru moče

- U podezření na záněty močové trubice se bere **první porce moče** (spláchnou se mikroby ze stěny trubice).
- U zánětů prostaty se naopak hodí **poslední porce moče**
- **Na schistosomósu** se sbírá moč z posledních porcí moče delší dobu, je potřeba zaslat alespoň 20 ml. (V laboratoři se moč nechá usadit a poté se hledají vajíčka parazita v sedimentu na dně). **Transport musí být urychlený.**

Odběr moče u malých dětí

- Moč se získává **sběrem do přilnavých sáčků**
- Metoda je zatížena relativně **vysokým rizikem sekundární kontaminace**
- Sáček by **neměl být nalepen déle než 30 minut**
- Odstraněn by měl být **ihned po vymočení**

Transport moče

- Pro hodnocení močové infekce je důležitá **kvantita** – viz dále. Tu však lze hodnotit pouze v případě, že se mikroby v moči během transportu nepomnoží – pokud se pomnoží, kvantitativní poměry se změni
- Proto je moč bezpodmínečně nutno dopravit do laboratoře **do dvou hodin** po odběru (raději ještě rychleji)
- Pokud zcela výjimečně toto nelze dodržet, je potřeba moč dát **do ledničky** (u jiných vzorků se to naopak nedoporučuje)

Soupravy typu URIKULT

- Smyslem těchto souprav je **odstranit čas** mezi odběrem moče a začátkem kultivace. Moč se odebere a ihned se do ní zanoří speciální destička s kultivačními půdami. Poté se moč vylije a půdy se začínají kultivovat (třeba přímo na oddělení)
- Na těchto destičkách se však mikroby **obtížně diagnostikují**. Tato metoda se proto neujala tak, jak se od ní původně očekávalo
- Pokud už se používají, je nutno bezpodmínečně dodržet **správný postup**

Kvantitativní a semikvantitativní vyšetření moče

- Při **kvantitativním** vyšetření se moč ředí a očkuje se na několik kultivačních půd
- Při **semikvantitativním** vyšetření se moč neředí, avšak používá se kalibrovaná klička na jedno použití. Vyšetření je méně pracné, ale také méně přesné
- Samozřejmě se hodnotí **nejen kvantita**, ale zároveň se normálním způsobem diagnostikuje, o kterého mikroba jde

Semikvantitativní vyšetření I

- Použije se **kalibrovaná klička** o objemu 1 μ l
- To znamená, že při ponoření do vody či tekutiny s podobným povrchovým napětím ulpí v očku kličky **právě jeden mikrolitr**
- Celý objem se **rozočkuje** na půl nebo celou miskou s agarovou půdou
- Poté se **normálně inkubuje** (24 h, 37 °C)
- Druhý den se **spočítají kolonie**. Podle počtu kolonií se interpretuje výsledek
- Používá se zpravidla **krevní agar + jedna další půda**. V naší laboratoři se v poslední době používá chromogenní půda URICHROM.

Bakterie na půdě urichrom



Semikvantitativní vyšetření II

- **Počet kolonií** po inkubaci odpovídá počtu CFU v 1 μ l původní moče
 - CFU = **c**olony **f**orming **u**nit, jednotka tvořící kolonii. Jednotlivý mikrob, dvojice, krátký řetízek, malý shluk. V praxi zanedbáváme rozdíl mezi mikrobem a CFU, říkáme tedy, že počítáme mikroby, i když ve skutečnosti počítáme CFU
- Pokud tedy počet kolonií zhruba odpovídá počtu mikrobů v 1 μ l původní moče, pak počet kolonií \times 1000 odpovídá počtu mikrobů v 1 ml původní moče. 10 kolonií – 10^4 mikrobů v mililitru, 100 kolonií – 10^5 mik/ml

Automatické kultivační systémy

- Některé firmy dnes nabízejí **automatické kultivační systémy**, které detekují pozitivitu již po čtyřech hodinách a hlásí i antibiotickou citlivost (italský systém UroQuick). Některé, zejména soukromé laboratoře takové systémy vítají.
- Pokud je takový systém doplněn možností klasické diagnostiky, nemusí být nutně na škodu. **Je však nepřijatelné používat takový systém bez toho, aby jeho výsledky interpretoval mikrobiolog** (např. umístění přístroje do biochemické laboratoře). Tento přístup je však **velice rizikový**, protože antibiotická citlivost bez dalších údajů je velice zrádná.



Interpretace vyšetření moče I

- **Při nálezu jednoho druhu mikroba platí:**
- **Kvantita nad 10^5** mikrobů v 1 ml se považuje za pravděpodobnou močovou infekci. U starých lidí to ovšem může být kolonizace
- **Kvantita 10^4 – 10^5** je hraniční. Jsou-li pochybnosti o kvalitě odběru (např. u kojenců), považuje se spíše za kontaminaci. Významná je spíše u mužů a u dětí.
- **Kvantita pod 10^4** se považuje za kontaminaci
- Neplatí u punktované a katetrizované moči.

Interpretace vyšetření moče II

- **Při nálezu dvou mikrobů platí**
- **Kvantita do 10^5** je zřejmě kontaminace
- **Kvantita nad 10^5** je sporná (hraniční)
- **Při nálezu tří mikrobů platí**
- V podstatě vždy se považuje **za kontaminaci**
- **Výjimka:** jeden mikrob v kvantitě nad 10^5 , ostatní dva naopak pod 10^4 → první mikrob se považuje za pravděpodobného původce
- V praxi se zohledňuje také **o jaké mikroby jde** apod. (stafylokoky se berou „méně vážně“)

Diagnostika infekcí pohlavních, kožních, očních

Diagnostika infekcí pohlavního systému – obecné shrnutí

- Ke kultivaci se používá transportně kultivační např. **souprava C. A. T.** (kvasinky a trichomonády) a **Amies** (bakterie včetně gardnerel, mykolplasmát a anaerobů). Z CATu se provádí mikroskopie ve formě nativního preparátu
- Doporučuje se také poslat **sklíčko nebo dvě sklíčka** (podle situace) na barvení. Klasické zaslání dvou sklíček je MOP – mikrobní obraz poševní
- V případě běžně **nekultivovatelných patogenů** (viry, chlamydie) je nutný suchý tampon, tekutý materiál (sperma, sekret) sérum či jiný vhodný vzorek

MOP – mikrobiální obraz poševní

- Při klasickém vyšetření MOP se posílají **dvě sklíčka**. Jedno se obarví dle Grama, druhé dle Giemsy (hlavně kvůli trichomonádám)
- Hodnotí se jednak **kvantita jednotlivých útvarů**, jednak **celkový vzhled** preparátu. Staré hodnocení dle šesti typů se postupně přehodnocuje, spíše se hodnotí „BV“ a „AV“.
- Klasické hodnocení jako MOP I až VI se už příliš nepoužívá, přesto ho zde uvedme:
 - *MOP I – tzv. normální obraz zdravé ženy*
 - *MOP II – bakteriální nehnisavý (má ho ale i mnoho zdravých žen, na druhou stranu se vyskytuje při BV)*
 - *MOP III – bakteriální hnísavý (typicky při AV)*
 - *MOP IV – kapavka*
 - *MOP V – trichomonóza*
 - *MOP VI – kvasinková infekce*

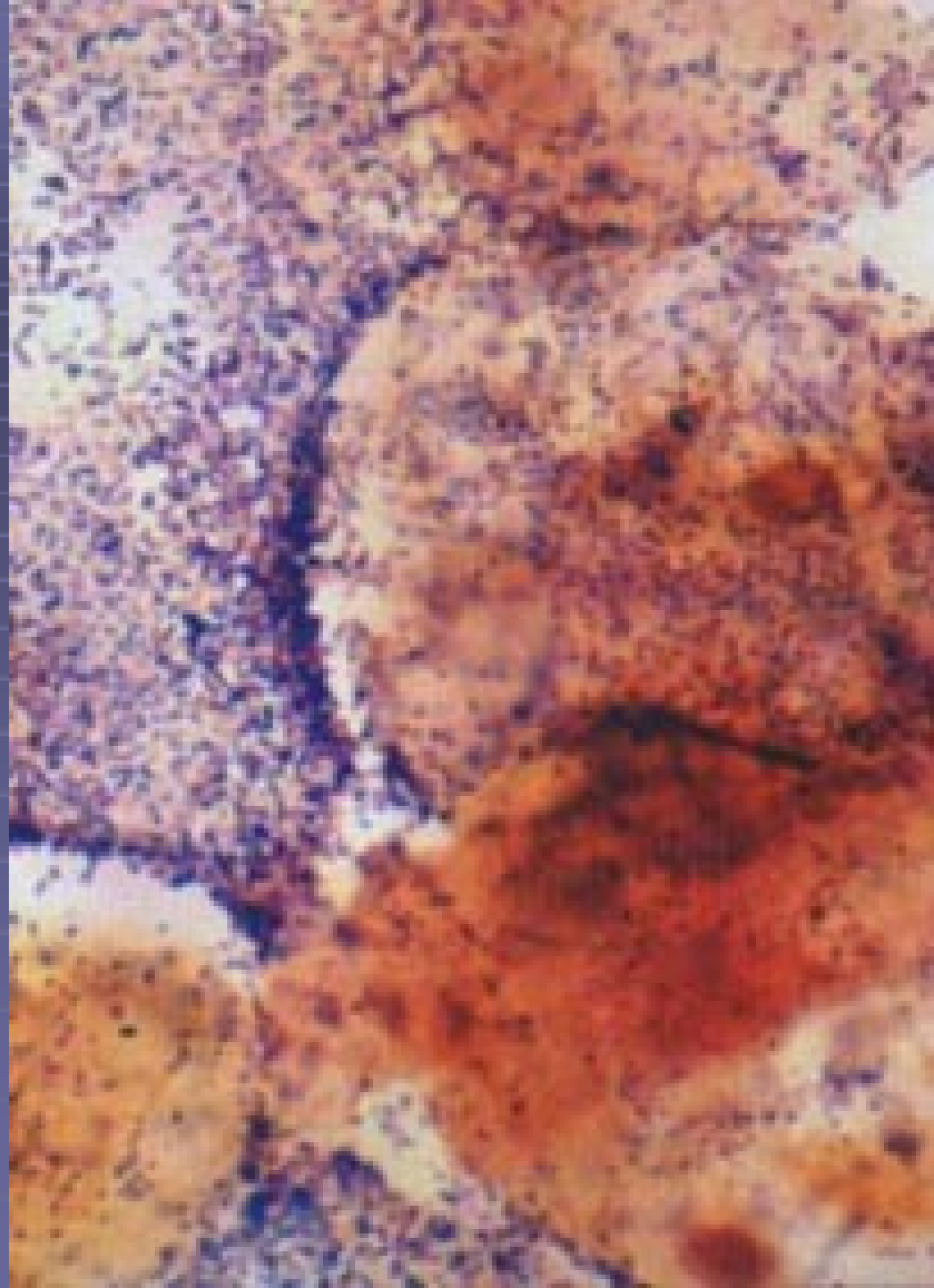
Nugentovo skóre

- Některé laboratoře využívají **mikroskopický obraz poševní** k tomu, že počítají tzv. Nugentovo skóre. Zde se „kladné body“ připočítávají za bakterie tvarově vypadající jako gardnerely (drobné gramlabilní tyčinky) nebo mobilunky (drobné zahnuté G- tyčinky) a odpočítávají za bakterie připomínající laktobacily. **Skóre nad 10 znamená téměř jistou přítomnost vaginózy**

MOP I (Giemsa). Přítomny laktobacily, Nugentovo skóre = 0

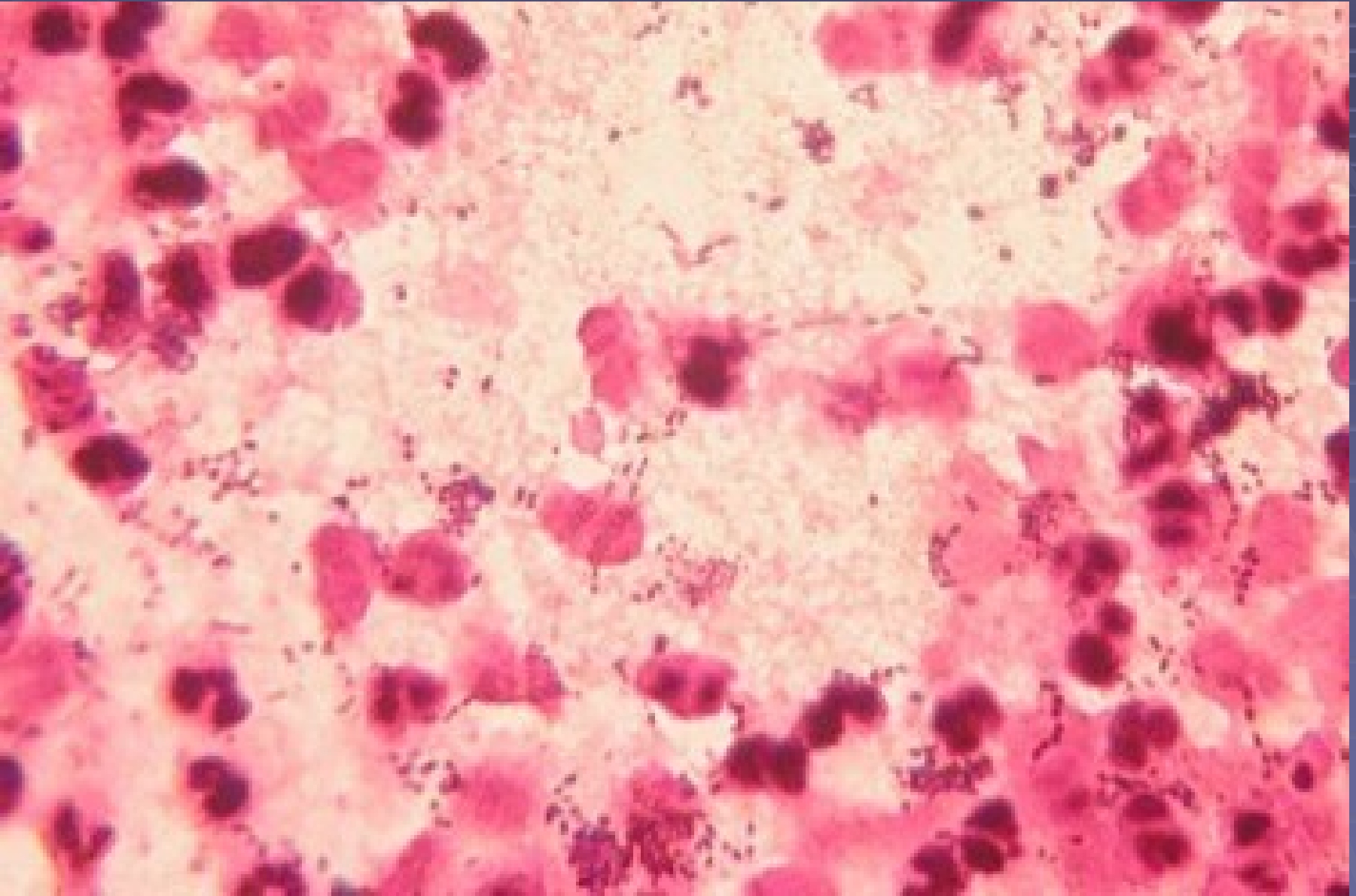


MOP II,
bakteriální
vaginóza.
Laktobacily
nahrazeny
jinými
tyčinkami,
Nugentovo
skóre = cca 8

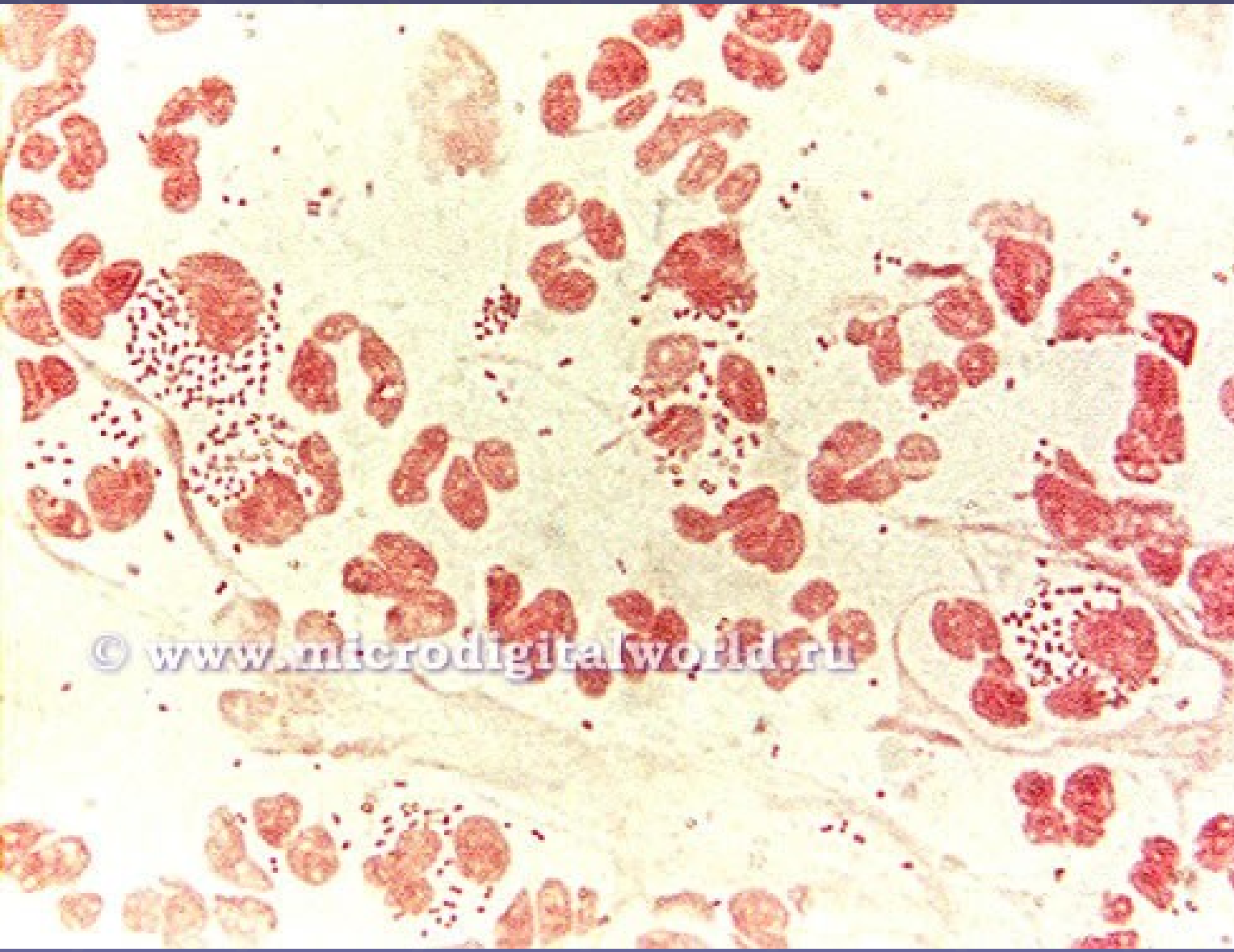


MOP III (odpovídá dnešní AV)

www.medmicro.info



MOP IV (kapavka)



© www.microdigitalworld.ru

MOP V (trichomonóza)

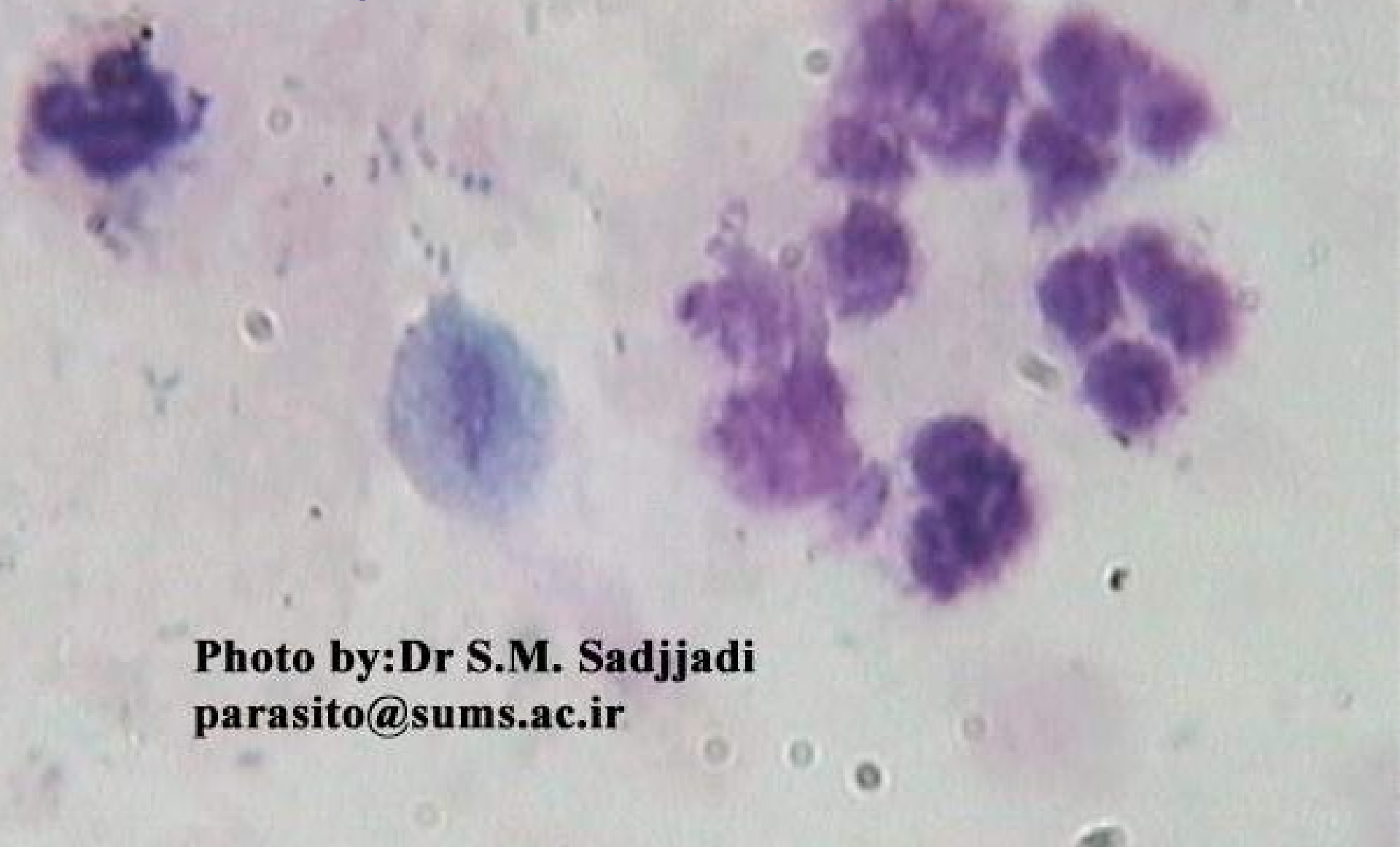


Photo by: Dr S.M. Sadjjadi
parasito@sums.ac.ir

MOP VI (Giemsa) – poševní mykóza



PMN leukocyte - 1
spherical form of Candida - 2
hyphal form of candida - 3

MOP VI – kvasinkový



ASM MicrobeLibrary.org ©Wiedbrauk

Odečítání kultivací z pohlavních orgánů (laboratoř MÚ FN USA)

- Den 0 – odběr a zaslání vzorku, případná mikroskopie zaslání sklíčka
- Den 1 – odečet KA, EA, popř. ČA + GC (kapavka), odečet C. A. T. (trichomonády)
- Den 2 – odečet NaCl, gardnerel, anaerobní kultivace, popř. ČA + GC (definitivně)
- Den 1, 2, 3, 4 – odečet kultivace kvasinek
- Den 5 – odečet kultivace mykoplasm*^{*}

**Mykoplasmata se odečítala šestý den, avšak díky bakalářské práci studentky Radky J. se prokázalo, že pět dní stačí.*

Diagnostika nemocí s kožními projevy

- U řady běžných dětských nemocí **není laboratorní diagnostika nutná**, nemoci jsou poznatelné klinicky
- **Pokud by se měly diagnostikovat**, dělá se to zpravidla serologicky
- U **spály** je podstatné vyšetření výtěru z krku, které odhalí streptokoka
- U **skutečných kožních infekcí** se provádějí stěry, otisky apod.; na mykologii se posílají šupiny aj. Kultivuje se běžným způsobem

Diagnostika očních infekcí

- V případě **povrchových infekcí** se posílají výtěry ze spojivkového vaku. V laboratoři se primokultivují pouze v bujónu
- Při **podezření na akantaméby** je k vyšetření je nutno poslat celé kontaktní čočky v jejich tekutině, popř. provést seškrab rohovky
- V případě **hlubších infekcí** se materiál na přímý průkaz odebírá jen tehdy, je-li to možné bez toho, abychom pacienta vyšetřením poškodili. V některých případech (toxoplasmosa) lze hledat protilátky.

Diagnostika systémových viróz (hepatitid, infekce HIV apod.)

Systemové virózy

- Základem je **průkaz protilátek**, případně také průkaz antigenu a průkaz DNA
- Vyšetřuje se zpravidla **sérum**, a to nejen na průkaz protilátek, ale i virových antigenů
- Na žádanku je vždy nutno přesně uvést, **jaká vyšetření mají být provedena** (nejen který virus, ale i jakými postupy – už kvůli proplácení pojišťovnou)

Diagnostika neuroinfekcí

Bakteriologická diagnostika purulentních meningitid

- **Vzorek:** Mozkomíšní mok (Při odběru měřit tlak likvoru a prohlédnout jeho vzhled)
- **Po přijetí do laboratoře:**
 - mikroskopie (hledají se leukocyty a bakterie)
 - přímý průkaz antigenu ve vzorku likvoru
 - kultivace: obohacené půdy (čokoládový agar)
 - Identifikace kmenů, u meningokoků až na úroveň séroskupiny kvůli očkování
- **Interpretace:** pozor na kožní kontaminaci (koagulasa negativní stafylokoky)

Diagnostika ostatních neuroinfekcí

■ Ostatní bakteriální infekce

- **U abscesů** je nutno získat vzorek z příslušného abscesu, protilátky nemusí být vytvořeny
- **U borreliózy a neurolyues** je diagnostika serologická

■ Virové neuroinfekce

- **Přímý průkaz:** Kultivace virů na tkáňových kulturách a na sajících myšatech; PCR.
- **Nepřímý průkaz:** Dva vzorky krve na „serologii respiračních virů“ - provede se vyšetření protilátek proti nejběžnějším virovým, ale případně i bakteriálním agens.

Diagnostika ranných, pojivových, hnisavých infekcí

Odběry u hlubokých ložiskových infekcí (1)



<http://www.medform.cz/default.asp?nDepartmentID=63&nLanguageID=1>

- Je-li v ložisku přítomen v dostatečném množství hnis či jiná tekutina (výpotek, obsah cysty a podobně), **měla by být poslána tato tekutina ve zkumavce** a nikoli pouze stěr
- U podezření na **anaerobních infekci** (zejména hnis z dutiny břišní) je doporučeno zaslání **ve stříkačce**. **K uzavření stříkačky** (samotné, bez jehly) je vhodné použít tzv. **kombi zátku** (na obrázku)
- Zaslání stříkačky **s jehlou zabodnutou do sterilní gumové zátky**, které bylo doporučováno dříve, je již v podstatě zakázáno z bezpečnostních důvodů (manipulace s jehlou, hrozí ohrožení odebírajícího)

Odběry u hlubokých ložiskových infekcí (2)

- Není-li možno poslat tekutinu (je nedostatek tekutiny), je bezpodmínečně nutné **použití soupravy s transportní půdou**. V poslední době se používají **E-swaby**
- V některých případech je také vhodný **nátěr, případně otisk tkáně na sklíčko** (zachytí se i patogeny, které se nepodařilo vypěstovat)
- **V zvláště závažných případech může chirurg přizvat mikrobiologa i přímo na operační sál**

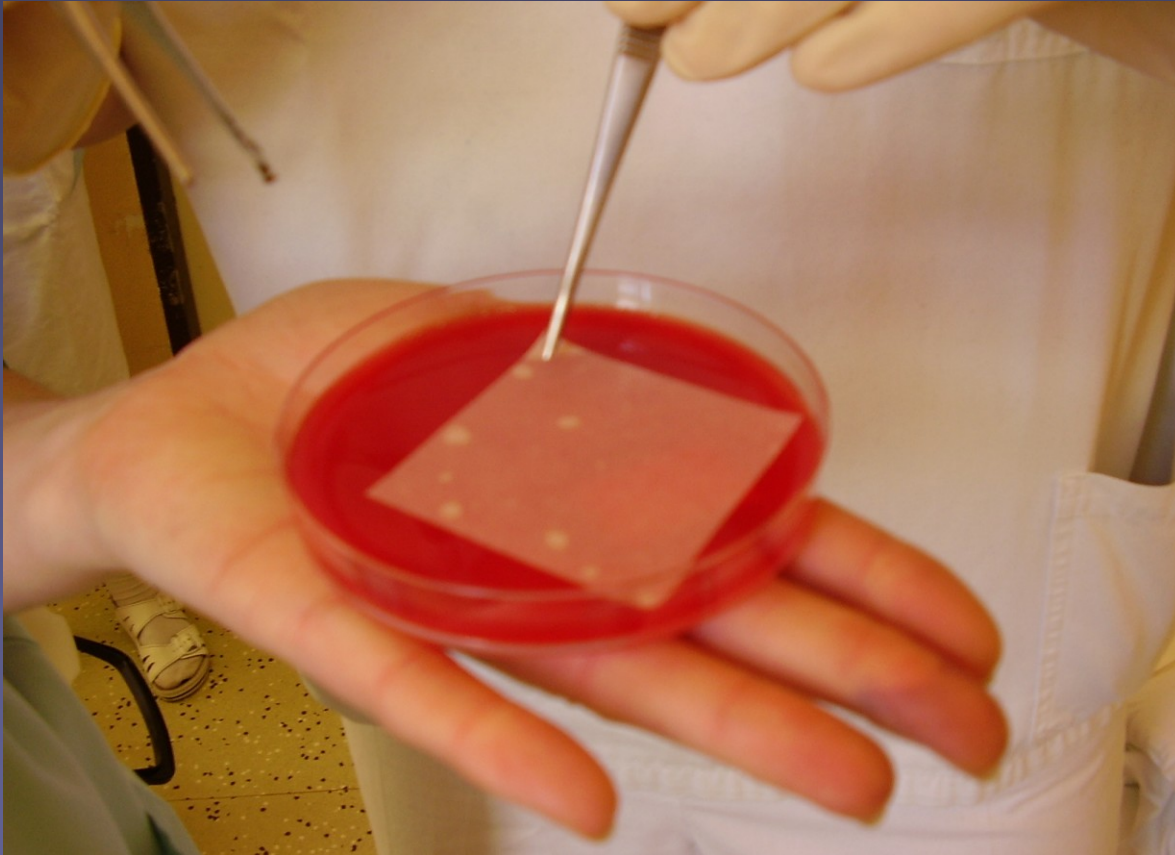
Odběry u povrchových ran

- Klasickou metodou je opět **stěr odběrovou soupravou s transportní půdou**
- Odběr je potřeba provést tak, aby byl **zachycen předpokládaný patogen** (je potřeba se dostat až k ložisku infekce) a zároveň **nebyla zachycena kontaminace z okolí**, zejména z kůže
- Je také možné použití **otiskové metody**: na ránu plošného charakteru (např. diabetický vřed) se na několik vteřin přiloží čtvereček sterilní gázy a ten se pak přenese na kultivační půdu (krevní agar) a v laboratoři se přenese i na další půdy; tím se umožní lepší kvantitativní vyhodnocení nálezu

Stěr nebo otisk?

- Při stěru z rány používáme sterilní tampon na tyčince, který se transportuje ve zkumavce s transportní půdou dle Amiese, výsledek je **kvalitativní**.
- U otisku přenášíme čtverec sterilního filtračního papíru (v našem případě s rozměry 5x5 cm) z krevního agarů na vyšetřovanou plochu a zpět. Výsledek je **semikvantitativní**.

Technika otisku I



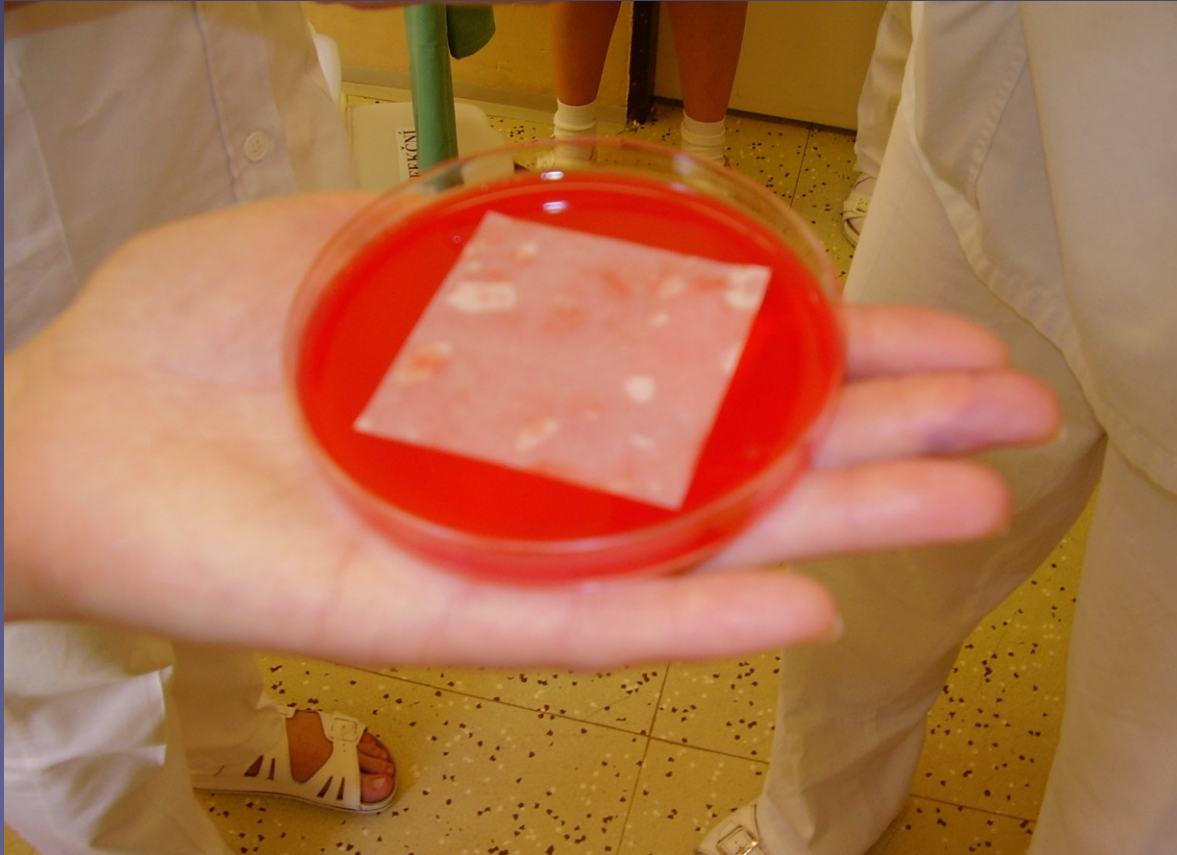
Chirurg dostane už kultivační půdu se
čtverečkem (oboje samozřejmě sterilní)

Technika otisku II



Nyní chirurg nebo i zkušená sestra přemístí čtvereček do rány tak, aby se všude dotýkal, a ponechá asi minutu

Technika otisku III



- Nakonec se čtvereček přemístí zpátky na půdu, z které byl odebrán

Vyplnění žádanky u výtěrů z ran

- Odebírající lékař (sestra) musí vždy pečlivě **vyplnit žádanku**, nestačí „stěr z rány“, ale specifikovat
 - **typ (původ) rány** – operační rána, rána po pokousání, bodná rána apod.
 - **lokalizaci rány na těle**
 - případně i **požadovaná speciální vyšetření** (i když např. u ran z břišní dutiny se anaerobní kultivace provede vždy, i pokud to na žádance napsáno není)
- Také důležité **anamnestické údaje** (návrat ze zahraničí, práce v zemědělství) je užitečné na průvodku uvést

Diagnostika infekcí ran

- V laboratoři je u tekutých vzorků provedena **mikroskopie vzorku**, vždy pak jeho **kultivace**, **bližší určení** odhalených patogenů a vyšetření jejich **citlivosti na antibiotika**
- U mikroskopie se hodnotí **nejen mikroby, ale i množství leukocytů** apod.
- Při kultivaci je užitečné využívat **pomnožovací tekuté půdy** (kdyby bylo mikrobů málo) a také **selektivní půdy** (s NaCl na stafylokoky, s amikacinem na streptokoky), zejména u dekubitů apod.

Výtěr z rány (bez anaerobní kultivace): Možné diagnostické schéma

(Podle okolností se může v praxi lišit)

- **Den 0:** pouze nasazení kultivací
- **Den 1:** výsledek primokultivace vzorku na KA, EA, NaCl a KA+AMI. V případě negativity všech pevných půd se prohlíží B, je-li zakalený, vyočkovává se (subkultivace)
- **Den 2:** expedice všech negativních a mnohých pozitivních výsledků – pro komplikace, rezistence apod. ovšem zdaleka ne všech
- **Den 3:** expedice dalších pozitivních výsledků

Výtěr z rány – interpretace nálezu

- **Běžná flóra:** žádná tu není, takže vše, co se najde, se považuje za patogena (pro jistotu i to, o čem máme pochybnosti, není-li to náhodou kontaminace)
- **Patogeny:** za patogena je považována v podstatě jakákoli bakterie nebo kvasinka, která je vykultivována, snad s výjimkou koagulázanegativních stafylokoků a korynebakterií u povrchových kožních ran

Závěr

- Jak je vidět, **u různých typů infekcí se posílají různé vzorky, a jsou tu různé požadavky na průvodky**
- Nemůžeme chtít po klinických lékařích ani po zdravotnických sestrách, aby se ve všem neomylně vyznali. **Mikrobiologové i laboranti v mikrobiologických laboratořích jsou povinni být nápomocni, posloužit spíše dobrou radou než nadáváním „zase jste to odebrali blbě“.**

Nashledanou příště!

www.medmicro.info

