

Co není (nebo je nedostatečně) ve skriptech „Vybrané kapitoly z klinické mikrobiologie“

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

OBSAH

Témata 1 + 2 Přehled mikrobů. Patogenita a virulence. Přehled mikrobiologických metod

Jednotlivé skupiny mikrobů

Patogenita a virulence

Průběh infekčního procesu a faktory, které se na něm podílejí

Metody přímého průkazu mikrobů

Metody nepřímého průkazu

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 11 Hnisavé a anaerob. infekce

Anaerobní infekce - původci, transport materiálu, zásady diagnostiky

Téma 6 Desinfekce a sterilisace

Sterilizace - přehled metod

Dezinfekce - přehled metod

Sterilizace a dezinfekce - zásady praktického použití

Téma 7 Antimikrobiální látky

Hlavní skupiny a mechanismy účinku antimikrobiálních látek

Peniciliny, cefalosporiny a chinolony

Aminoglykosidy, makrolidy, tetracykliny, chloramfenikol

Kvalitativní a kvantitativní testy citlivosti na antibakteriální látky, význam MIC

Téma 13 Základy klinické mykologie a parazitologie

Původci mykóz

Původci parazitárních infekcí

Vyšetřovací metody v parazitologii a mykologii

Témata 1 + 2 Přehled mikrobů. Patogenita a virulence. Přehled mikrobiologických metod

Jednotlivé skupiny mikrobů

1. Priony

2. Viry
3. Bakterie
4. Mikroskopické houby (kvasinky a plísně)
5. Paraziti (živočišné patogeny)

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, parainfluenzy, spalniček, zarděnek, příušnic
viry žloutenek A, C, D, E
viry různých klíšťových encefalitid, tropických viróz, vztekliny, horeček Lassa a Ebola
virus HIV

Viry také můžeme dělit na obalené a neobalené.

Ad 3: Bakterie dělíme nejčastěji podle tvaru (koky, tyčinky, případně spirochety) a tzv. Gramova barvení (grampozitivní – v Gramově barvení modré, gramnegativní – červené; je to dáno buněčnou stěnou). Také je dělíme na aerobní (rostou v normální atmosféře) a anaerobní (vyžadují atmosféru bez kyslíku). Některé se nedají zařadit podle tvaru (například mykoplasmata – nemají buněčnou stěnu) nebo podle barvení (například původci TBC – podle Grama se nebarví vůbec, mají odlišnou buněčnou stěnu od grampozitivních i gramnegativních).

Nejdůležitější grampozitivní koky:

Staphylococcus: *S. aureus*, ostatní tzv. koaguláza-negativní stafylokoky
Streptococcus: betahemolytické streptokoky (*S. pyogenes*, *S. agalactiae*, takzvané „non-A-non-B“ streptokoky), alfa-hemolytické streptokoky (*S. pneumoniae* = pneumokok a takzvané „ústní“ či „viridující“ 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 za určitých podmínek 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) **Nakažlivost** - 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 tkáni). 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 bodílejí 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 může být jednak A. LOKÁLNÍ nebo B. CELKOVÁ, jednak 1. bezpříznaková (asymptomatická, inaparentní) nebo 2. příznaková (symptomatická).

Symptomatická infekce může mít

abortivní průběh: nemoc proběhne, ale namísto typických příznaků dojde jen k nespecifickým celkovým ("chřipkovým") příznakům.

typický průběh

komplikovaný průběh

V průběhu infekce může dojít k SUPERINFEKCI jiným mikrobem. 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.

Jsou to *faktory na straně mikroba* (zejména vybavenost jednotlivými faktory virulence – je u každého mikrobiálního kmene jiná) a také *faktory na straně makroorganismu* (stav imunity, stav anatomických bariér – kůže, sliznice, stav funkčních mechanismů – kýčání, střevní peristaltika, vypuzování mikrobů z močové trubice proudem moče).

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, a také od kontaminace, tedy od mikrobů, které se do vzorku přilepily omylem cestou.

V některých případech (u bakterií skoro vždycky) existuje vedle určení původce další úkol - určení "in vitro" citlivosti na antibiotika. "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 určujeme mikroby, si můžeme rozdělit na:

METODY PŘÍMÉ, pomocí kterých hledáme mikroba jako takového, jeho součást nebo jeho produkt ve vzorku od pacienta; vzorkem v takovém případě bývá např. moč, stolice, hnis, mozkomíšní mok, výtěry z nejrůznějších tělních povrchů a otvorů. Pokud hledáme mikroba bezprostředně ve vzorku, používá se zpravidla pojem přímý průkaz; tam, kde jsme již konkrétního mikroba vypěstovali na pevné kultivační půdě (ve formě **kmene**) a dále si s nimi "hrajeme", hovoří se o identifikaci mikroba.

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 mikroblem 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. - Nepřímé metody probereme později.

Přehled přímých metod

Název metody	K přímému průkazu	K identifikaci
Mikroskopie (optická, elektronová)	ano	ano
Kultivace (pěstování na půdách)	ano	ano
Biochemická identifikace	ne	ano
Pokus na zvířeti	ano	výjimečně
Průkaz antigenu/antigenní analýza	ano	ano
Průkaz nukleové kyseliny	ano	výjimečně

MIKROSKOPIE

Nativní preparát

Nejjednodušší druh mikroskopie: mikroby se pozorují neobarvené, jen rozmíchané v kapce fyziologického roztoku a popřípadě přikryté krycím sklíčkem. Nepoužívá se imerze. Nativní preparát se hodí

- a) na mikroby (baktérie, prvoky), které se pohybují
- b) na velké mikroby - především eukaryota

Mikroskopie v zástinu

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. imerzním objektivem bez krycího sklíčka; mezi objektiv a preparát se kápne kapka imerzního oleje. *Jednoduché barvení* - používá se například metylénová modř. Dá se provádět i přímo v klinickém pracovišti. Mikrobiologové provádějí většinou *Gramovo barvení*. Je to nejdůležitější barvení v mikrobiologii. Rozliší baktérie podle typu buňčné stěny. Má čtyři kroky, po každém z nich se preparát oplachuje vodovodní vodou. Po posledním oplachu se vysuší. Kromě gramozitivních a gramnegativních jsou ještě baktérie gramem se nebarví - mají jiný typ buněčné stěny nebo buněčnou stěnu nemají. Takové se neobarví. Různá *speciální barvení* se používají např. na tuberkulózu, na plísně, některé parazity apod. Budou postupně probírána v rámci speciální mikrobiologie. Ke speciálním účelům se používá *fluorescenční barvení*.

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

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

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

KULTIVACE.

Kultivace je pěstování mikrobů. 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 **kmen** 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.

Tekuté půdy (pomnožovací). Nejdůležitější je:

- **Peptonová voda** - obsahuje bílkovinný hydrolyzát (to jest: produkt rozkladu bílkoviny na aminokyseliny a polypeptidy). Sama o sobě se používá zřídka, je však mezistupněm k další:
- **Bujón** je peptonová voda s vývarem. Je to základní pomnožovací půda, běžně používaná v laboratoři hlavně tam, kde předpokládáme malé množství mikrobů, jež chceme namnožit.
- **VL-bujón** je bujón s přídavkem 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 půda selektivní (někdy se také říká selektivně pomnožovací). To znamená, že na ní roste jen něco - v našem případě jen salmonely (a pár 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 klinickomikrobiologickými půdami úplně nejdůležitější:

- **Krevní agar** je živý agar s přídavkem 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". Mohou být i tekuté (□□selenitový bujón). Z pevných půd 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 (zpacené) kůži.

Selektivně diagnostické půdy v sobě spojují vlastnosti obou předchozích. Jinak řečeno, jedny bakterie na nich nerostou, druhé bakterie rostou v určitých koloniích a jiné bakterie 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 krvinek 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.

- Müller-Hintonův 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" 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

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.

Katalázová reakce je velmi jednoduchá biochemická reakce, založená na průkazu peroxidázy (katalázy). 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 pozitivity kapka šumí - vznikají bublinky kyslíku. Výhodou je, že výsledek je viditelný během několika vteřin.

Reakce na diagnostických proužcích (stripech). Tyto reakce se také dají odečíst velmi rychle - během vteřin či nejspíše minut. Používá se *plastových diagnostických proužků*, jejichž reakční ploška se zvlhčí a přitiskne na kolonie testované bakterie. Po určité době 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 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 usmrčené, 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 - pak jde o **přímý průkaz antigenu**
 - nebo s kmenem, vypěstovaným z pacientova vzorku - pak 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)
 - Imunobloty

Specifické a nespecifické antigeny. 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

použit místo skutečného mikrobiálního antigenu nějakou levnější a bezpečnější látku, o které je známo, že je také schopna vázat příslušnou protilátku (někdy ale jen např. určitou třídu protilátek). Takovou látkou může být například kardiolipin - extrakt z hovězích srdcí při průkazu syfilis, nebo červené krvinky všelijakých zvířat při průkazu infakční mononukleózy (Paul-Bunnellova reakce). Hovoří se pak o nespecifickém antigenu a protilátky, které se s takovým 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 ale 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 reakce**. 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 - králíčí protilátky 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 vyvázal 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.

Antigenem v neutralizační reakci je tedy virus nebo bakt. 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 pozitivity (protilátka JE přítomna) nedojde k hemolýze, v případě negativity (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, nejspíše pevně svázané 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 enzymu 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.

Imunoblotty 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 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.

Tato otázka je ve skutečnosti mnohem složitější, než se zdá. Není výjimkou, že se provádí mikrobiologické vyšetření zbytečně, a naopak, že se neprovede tam, kde by bylo účelné. Je samozřejmě obtížné stanovit nějaké obecné indikační zásady, přesto se dá říci, že 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. Je třeba myslet i na to, že pro staršího pacienta je odběr vzorku mnohdy nepříjemný a jeho správné provedení je obtížné, čímž ovšem klesá výtěžnost takového vyšetření (viz dále). Při všech těchto úvahách je ovšem třeba mít na paměti, že je dobré znát mikrobiálního (v tomto případě především bakteriálního) původce i tam, kde se prozatím neuvažuje o antimikrobiální léčbě, a to vzhledem k možným komplikacím. Na druhé straně by bakteriologické vyšetření mělo vždy předcházet antibiotické léčbě, s výjimkou takových infekčních onemocnění, u kterých je původce jednoznačný nebo alespoň vysoce pravděpodobný (např. akutní tonsillitis - *Streptococcus pyogenes*). Samozřejmě je také nutno vzít v úvahu případné nebezpečí z prodlení čekáním na výsledek. 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, ale často také bakteriologických vyšetření (například požadavek anaerobní kultivace, popřípadě současného vyšetření bakteriologického a mykologického). - K bodu indikace mikrobiologického vyšetření je třeba dodat ještě jednu důležitou doušku. Jde o to, že 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 má značnou hodnotu epidemiologickou. Je to samozřejmě značný problém eticko-ekonomický, logicky vzato by takové vyšetření mělo být hrazeno ze zvláštních fondů, nikoli ze zdravotního pojištění, možná včetně odškodnění pacienta za strpěné nepohodlí. Bohužel je to hudba vzdálené budoucnosti. Prozatím lze apelovat na dobrou vůli klinika i pacienta. Vždyť to, že epidemiologové chtějí mít zmapován výskyt chřipkových virů není nějaký administrativní nesmysl, konkrétním cílem je příprava co nejkvalitnější vakcíny pro další rok, jinak řečeno, i tady jde nakonec o zdraví lidí.

2. ODBĚR VZORKU.

Tento problém lze rozdělit do tří částí: volba vhodného vzorku, správné načasování a správné provedení odběru. Volba vhodného vzorku není tak jednoduchou záležitostí, jak by se mohlo stát. Stále ještě se mikrobiologové setrávají s tím, že u infekcí DCD je volen výtěr z krku, kde výtěžnost je malá. Daleko lepší je vzorek sputa (nesmí ovšem jít o sliny), popřípadě - to se týká spíše hospitalizovaných pacientů - bronchoalveolární laváž. Vhodným vzorkem není roztok borové vody u výplachu paranasálních dutin, protože borová voda neumožňuje přežití patogenů. - Co se týče správného načasování, je nutno zdůraznit potřebu odebrat vzorek před zahájením antibiotické léčby. U serologických vyšetření je nutno provést nejméně dva odběry, přičemž interval by měl být nejméně dva až tři týdny. U některých parazitóz je vhodné načasování prodiskutovat s mikrobiologem, respektive parazitologem. K problému správného provedení odběru je třeba říci, že tady bývá často zakopaný pes neúspěchu vyšetření. Jestliže se odebere moč nesterilně, zachytí se místo patogenů kontaminanta. Jestliže je odebrán výtěr z kořene jazyka namísto z tonzil, je výsledek značně zkreslený. U geriatrických pacientů bývá odběr obtížný a často spojený s etickými problémy (sterilní odběr moči - bývá nutnost pomoci sestry; právě u starších osob je riziko kontaminace vyšší než u jiných věkových skupin!). Nelze ovšem 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. - Velice důležité je použití vhodné odběrové soupravy. Dnes už by prakticky neměl existovat odběr na suchý tampon, s výjimkou případů, kdy jde o pouhé ověření přítomnosti konkrétního patogena a dotýčný patogen je odolný vůči

vyschnutí. Výjimečně lze připustit odběr na suchý tampon tam, kde je záruka dodání materiálu do laboratoře v čase řádově desítek minut. Jinak se používá transportních půd, přičemž univerzální je půda Amiesova. Odběrové soupravy s Amiesovou půdou existují ve dvou variantách - tampon na plastové tyčince a na drátku. Soupravu s Amiesovou půdou lze použít pro výtěry a stěry ze všech přirozených i arteficiálních tělních otvorů a povrchů, včetně vyšetření na anaeroby, vyšetření stolice na *Campylobacter jejuni* nebo třeba i vyšetření na kapavku. Nelze ji použít ve speciálních případech, například při vyšetření genetickou sondou nebo metodou PCR. Zde je potřeba konzultovat vhodný způsob odběru s laboratoří. Zásadně by se neměly soupravy s Amiesovou půdou používat při mykologickém vyšetření. Kliničtí lékaři často hřeší na skutečnost, že mnohé kvasinky mohou být zachyceny i v takovém případě. Je však pochybné používat pro mykologické vyšetření bakteriologickou transportní půdu, když existuje souprava se speciální transportní půdou právě pro mykologii. U nás se používá souprava Fungiquick od firmy Dispolab. V případě použití této soupravy je nezbytné paralelní zaslání výtěru v Amiesově půdě, jinak nelze provést běžnou bakteriologickou kultivaci. Speciální transportní půdy existují i pro viry a chlamydie, tady je ovšem zásadně potřeba konzultovat způsob odběru s virologem. - Odlišnou problematiku zahrnuje zasílání tekutých, případně kusových vzorků, tedy sputa, hnisu, exsudátu, nekrotických tkání apod. V takovém případě je nutno dbát o reprezentativnost vzorku. U vzorků z povrchových afekcí (běrcové vředy apod.) je nutné v mezích možností zabránit kontaminaci běžnou kožní mikroflórou. Samozřejmě je vhodná sterilní nádobka. U hnisu a podobných materiálů, kde je nutné též anaerobní vyšetření, je ideální zaslání přímo v injekční stříkačce bez vzduchu s jehlou zabodnutou do sterilní zátky. - U dermatomykóz se zasílají nehty, vlasy, šupiny a podobně, přičemž je nutno použít dostatečné množství. Svá specifika mají také virologické materiály, které je většinou vhodné zasílat na tajícím ledu, a materiály parazitologické. U stolice spočívá rozdíl v tom, že zatímco na bakteriologii postačí výtěr na tamponu s Amiesovou půdou, u virů i parazitů je nutný skutečný vzorek stolice o objemu 1 - 2 mm³.

3. VYPLNĚNÍ PRŮVODKY.

Také tato záležitost není tak triviální, jak se zdá. Vedle nutnosti precizního vyplnění osobních údajů pacienta, pojišťovny a podobně je nutno věnovat pozornost také údajům odborného rázu. Základem je přesný popis materiálu a požadovaného vyšetření. Není výjimkou, kdy do laboratoře přijde materiál označený "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, tak, aby výtěžnost byla maximální. Ani označení "stěr z rány" není dostačující, není-li uvedeno, zda jde o ránu operační, traumatickou, zhnisanou, zda je lokalizována na břicho, na končetině či třeba perianálně. Podobně je-li zasílána "katetrizovaná moč", mělo by být uvedeno, zda byla moč katetrizována kvůli odběru (v tom případě se snižuje riziko kontaminace a mikrobiolog tudíž považuje za významný i nález malého množství mikrobů) nebo zda jde o moč z permanentního katetru (kdy je naopak kontaminace pravděpodobnější než u moči odebrané běžným způsobem). - Pokud nejde o běžné bakteriologické vyšetření, je nutno specifikovat, že je požadováno např. anaerobní vyšetření, současná mykologická kultivace a podobně. - Velice důležité je vyplnění skutečné diagnózy. Příslušná kolonka nemá rozhodně význam jen pro pojišťovnu. 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. Vhodné je uvést, zda jde o kontrolu po léčbě, recidivu či relaps, upozornit na komplikovaný zdravotní stav pacienta, na nemožnost podávání antibiotik vylučovaných játry apod. - Tam, kde nebylo možno vzorek odebrat *lege artis*, například pro nespůlupráci pacienta, je velmi užitečné upozornit na to mikrobiologa na průvodce, aby vzal tuto skutečnost v úvahu. Klinik by si měl vždy uvědomit, že práce klinického mikrobiologa není nějaké mechanické přečtení výsledků, ale zahrnuje už v sobě jistou dávku předběžné interpretace na základě zkušeností ohledně patogenetického významu jednotlivých mikroorganismů. To však nelze provést bez znalostí okolností odběru. - Nezbytné je uvést stávající nebo uvažovanou

antibiotickou terapii, případně i alergii na antibiotika, aby mohla být pro testování in vitro citlivosti užita antibiotika jiná. - Mikrobiologa také zajímají některé anamnestické údaje. Návrat ze zahraničí, zejména z tropů, práce v zemědělství, v lese, při údržbě kanalizace a další údaje by na průvodce rozhodně chybět neměly, jinak je šance na zachycení skutečného původce minimální. Jde-li o výjimečný případ, neměl by praktický lékař váhat a vedle vypsání údajů na průvodku také na zasláný materiál telefonicky laboratoř upozornit. - U serologických vyšetření nesmí chybět datum prvních příznaků a údaj, zda se jedná o první či druhý, případně další vzorek. U gynekologických materiálů není od věci uvést fázi menstruačního cyklu. - Čím více je toho na průvodce napsáno, tím lépe pro mikrobiologa. Není v jeho silách věnovat se detailně věnovat každému vzorku a je tedy třeba dát mu najevo, který vzorek si zvýšenou pozornost zasluží, ale také kam má svou pozornost napřít.

4. ZASLÁNÍ MATERIÁLU DO LABORATOŘE

je také významným momentem. Materiál je třeba dopravit do laboratoře co nejdříve, u močí do dvou hodin, jinak hrozí pomnožení kontaminujících mikrobů z prostředí. Nelze-li materiál dodat ihned, lze jej uchovat, v případě potřeby i přes noc, s výhradou, že zvláště citlivé mikroby pak již nemusí být zachyceny. 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, který zajišťuje stálou teplotu okolo 0 °C.

5. VLASTNÍ ZPRACOVÁNÍ MATERIÁLU V LABORATOŘI

probíhá bez účasti klinika. I tuto fázi ovšem může praktický lékař ovlivnit. Zpravidla není problémem dohodnout s mikrobiologem některé detaily zpracování, např. antibiotika preferovaná k in vitro testování, požadovaná hloubka vyšetření a podobně. Někdy může být pro klinika důležité přesné druhové určení mikroba, jindy je rozhodující rychlost i za cenu toho, že mikrob bude určen jen skupinově. Kromě toho může klinik telefonicky zjistit předběžné výsledky vyšetření. U bakteriologického vyšetření bývá zpravidla za 24 hodin znám alespoň přibližně patogen ve vzorku přítomný, zatímco přesnější dourčení a testování citlivosti na antibiotika trvá další jeden až dva dny, výjimečně i více. S delší dobou vyšetření je třeba počítat u anaerobů, kvasinek či helikobakterů. Několik týdnů trvá zpravidla vyšetření u tuberkulózy a u vyšetření na vláknité houby.

6. ZASLÁNÍ VÝSLEDKU

je potřeba zorganizovat tak, aby nedocházelo ke zbytečným prodlevám. Mnohdy se stává, že vyšetření je dávno hotové, ale výsledek vázne mezi laboratoří a klinikem. Dnešní doba dává nové možnosti zasílání výsledků například prostřednictvím faxu či počítačové sítě. Užitečné může být dohodnout s mikrobiologem, zda má být zaslán až konečný výsledek nebo i mezivýsledek, zda mají být uvedena všechna antibiotika nebo jen výběr těch, která by nejspíše měla být použita apod. Grafická podoba výsledku je dnes zpravidla dána počítačovým systémem, který laboratoř používá, nicméně pokud je některá část výsledkové listiny pro klinika nepřehledná, je vhodné na to mikrobiologa upozornit - mnohé nedostatky lze odstranit.

7. INTERPRETACE VÝSLEDKU A POUŽITÍ PŘI TERAPII

je logickým dovršením celého procesu. Klinický mikrobiolog zpravidla odfiltruje při své práci zcela evidentní kontaminanty z prostředí a náhodné nálezy, v méně jednoznačných případech ovšem konečné rozhodnutí leží na klinikovi, protože ten má pacienta před sebou a je na něm, aby zhodnotil, zda nalezený mikroorganismus lze považovat za skutečného patogena či ne. Vodítkem může být poznámka ke kvantitě („ojediněle“, „masivně“), je ale třeba mít na zřeteli, že pokud nejde o skutečné (semi)kvantitativní vyšetření, je onen „masivní“ či „ojedinělý“ růst na

kultivační půdě ovlivněn příliš velkým množstvím faktorů. U geriatrických pacientů je často značně obtížné určit hranici mezi infekcí a kolonizací (např. v močových cestách). U vzorků z dutin normálně osídlených běžnou flórou je nezbytné chápat ekosystém mikrobů v celé jeho souvztažnosti. Infekce tu bývá často endogenní, vlastně ani nejde o infekci v pravém slova smyslu, ale o porušení rovnováhy mezi mikroby. V takových případech nemusí být vždy nejlepší léčba antibiotiky - typickým příkladem jsou poševní "vaginózy", u starších osob připadají v úvahu průjmy při střevní dysmikrobii. V řadě případů je vhodné terapii konzultovat telefonicky s mikrobiologem. Některé laboratoře uvádějí v poznámkách k výsledku interpretaci antibiotických citlivostí, např. možnost vztáhnout výsledek pro jedno antibiotikum na antibiotikum příbuzné. Často se objevuje otázka, zda léčit bezpříznakovou kolonizaci potenciálně patogenním mikrobem (např. streptokokem v krku). Obecně vzato antibiotická léčba indikována není, ovšem mohou existovat četné výjimky tam, kde z jakéhokoli důvodu (imunodeficit, porušená anatomická bariéra) hrozí šíření daného organismu dále (do tkání, krevního oběhu, či dokonce CNS; u fertilních žen navíc tam, kde existuje riziko infekce pro novorozence). Praktický lékař či geriatr by ovšem měl mít v této oblasti také přehled. Je třeba mít na paměti, že žádné vyšetření nemá stoprocentní spolehlivost. Velice důležitá je správná interpretace serologických vyšetření. Samotná přítomnost protilátek není zpravidla významná, důležitější je titr a zejména jeho dynamika. V některých případech ovšem může být číselná hodnota titru zavádějící. Týká se to metod, které nejsou natolik citlivé, aby je bylo možno považovat za kvantitativní, a proto nelze uvádět jiný výsledek než "pozitivní", "hraniční" či "negativní". Někdy ovšem klinici přesto tvrdošijně vyžadují číselné hodnoty titrů. Pokud jim některá laboratoř vyhoví, a to se stává hlavně u soukromých laboratořích, jedná se vlastně o postup non lege artis. 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,

kteřá není vázána pouze na konkrétní vzorky, je velmi užitečná. 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/výteru. 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 se naproti tomu používá dnes už jen výjimečně. Většinou slouží při odběru pro reakci 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, u virů a chlamydií totiž výrazně převažuje nepřímý průkaz (zasílání séra).

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 samostojací zkumavce říkáme **sputovka**, ale zdaleka nemusí sloužit jen k zaslání sputa.

Hemokultivační nádobka dnes obsahuje nejen protisrážlivou látku, ale i transportně-kultivační médium. Slouží pro automatickou kultivaci krve. 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 výtěrky. 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 11 Hnisavé a anaerob. infekce

Anaerobní infekce - původci, transport materiálu, zásady diagnostiky

Anaeroby jsou více nebo méně citlivé na kyslík. Tomu se musí přizpůsobit i odběr materiálu (obvykle stříkačka s jehlou zabodnutou do gumové zátky). **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 **sporující anaeroby** – Clostridia se díky sporám mohou šířit mnohem snáz.

NESPORULUJÍCÍ ANAEROBY.

Rozdělení a význam

Infekce způsobené nesporujícími anaeroby jsou téměř vždy smíšené, účastní se mnoho různých druhů anaerobů, případně i ve směsi s fakultativními anaeroby.

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, nesporujícími 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 zkonzumuje toxin).

Rozdělení a význam.

CLOSTRIDIUM BOTULINUM produkuje botulotoxin. Nedochází 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 projeví 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 zemědělení a podobných katastrofách. Úraz jednak přeseke zásobením tkáně 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 malá 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 nálezk 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 plynatých snětí 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) platínový 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 přeče unikne, se zase doplní z bomby. I tak ovšem anaerostat i anaerobní box neumožňují růst těch anaerobů, které jsou na kyslík nejháklivější.

Téma 6 Desinfekce a sterilisace

(Sterilizace - přehled metod. Dezinfekce - přehled metod. Sterilizace a dezinfekce - zásady praktického použití)

Baktérie a vnější prostředí

Baktérie (a podobně i ostatní mikroby) jsou velmi citlivé na změny vnějšího prostředí. Na ose, znázorňující kvantitu nějakého faktoru (třeba 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; především 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 optikem kolem 37 °C se nazývají mezofilní, ty, které mají optimum vyšší, termofilní, pokud nižší, jsou psychofilní.

Praktický význam těchto mezí:

1. Baktericidní meze jsou významné pro boj s mikroby (sterilisace, 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).

Dekontaminační metody

jsou fyzikální a chemické postupy určené především k likvidaci zdraví ohrožujících organismů - mikrobů (sterilizace, 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 nedodrží - sestra potře 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. Důležité je také mít k dispozici platnou vyhlášku (v současné době platí vyhláška číslo 207 z roku 1992).

STERILIZACE. Je to postup (obvykle fyzikální), kterým jsou zničeny všechny mikroby (včetně virů, hub a bakteriálních spor). Nejčastěji se používá:

4. 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.
5. Sterilizace **horkou vodou pod tlakem** - pouze u chirurgických nástrojů k okamžitému použití. Málo se používá také sterilizace **horkým olejem**.
6. 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.
7. Sterilizace **ohněm** se používá prakticky jen u mikrobiologických klíčků, protože většinu materiálů silně poškozuje. Spalování se hodí u odpadů.
8. Sterilizace **gama zářením**: používá se pouze při průmyslové výrobě, např. rukavic na jedno použití.
9. **Chemická sterilizace parami** formaldehydu nebo ethylenoxidem (musí být přesně dodržena postup). Používá se tam, kde nelze použít fyzikální metody.
10. **Paskalizace** je sterilizace tlakem v potravinářství
11. **Odstatní 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 nemoci. 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 Ajatinem 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 neúčinnější 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. stearotherophilus*.

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 7 Antimikrobiální látky

(Hlavní skupiny a mechanismy účinku antimikrobiálních látek. Peniciliny, cefalosporiny a chinolony. Aminoglykosidy, makrolidy, tetracykliny, chloramfenikol. Kvalitativní a kvantitativní testy citlivosti na antibakteriální látky, význam MIC)

Přehled antimikrobiálních látek

- **Antibiotika** - proti bakteriím, produkty bakterií nebo hub
- **Antibakteriální chemoterapeutika** - proti bakteriím, syntetická
- **Antituberkulotika** - proti bacilům tuberkulózy (hodně se liší)
- **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 inhibitorem betalaktamázy*. Některé bakterie rozkládají peniciliny pomocí beta-laktamázy. Je proto dobré nabídnout bakterii látku, která je jako antibiotikum málo účinná, ale zato ji bakterie rozloží přednostně. Skutečné účinné antibiotikum pak "nechá na pokoji". Používá se 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 inhibitorem betalaktamázy*: **cefoperazon se sulbaktamem**, (působí obdobně jako kyselina klavulanová - SULPERAZON)

- IV. generace: např. **cefepim** (MAXIPIME)
- *cefamyciny* - příbuzné cefalosporinům: **cefotaxim** (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 **doxycyklin**
- 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** (SEPTIN, 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 ko-trimoxazol 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. Nopak u primárně baktericidních antibiotik je MBC velmi vysoká, mnohem vyšší než MIC.

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.

Všechny metody zjišťování MIC v podstatě srovnávají koncentraci dosahovanou v krvi (breakpoint) a MIC. Pokud je koncentrace dosahovaná v krvi vyšší než MIC, 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.

Zjišťování citlivosti na antimikrobiální látky

Difúzní diskový test

Na Müller-Hintonův agar (nebo jiný agar) se štětičkou plošně naočkuje suspenze bakterie. Pak se nanáší tzv. antibiotické disky - papírky napuštěné antibiotikem. Pokud mikrob roste až k disku, je rezistentní (necitlivý). Pokud je kolem disku zóna citlivosti, v níž mikrob 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 bakteriích; u kvasinek se tento test dělá zředka, u ostatních mikrobuů 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, a z velikosti se 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.

Pokud důlky bez zákalu (tj. s inhibicí) vyučujeme 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 difusního 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. Konkrétní metody jsou uvedeny u konkrétních bakterií. Může se jednat o diagnostické proužky nebo testy na jiném principu.

Téma 13 Základy klinické mykologie a parazitologie

(Původci mykóz. Původci parazitárních infekcí. Vyšetřovací metody v parazitologii a mykologii)

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 přenáší 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 gram pozitivních 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 dělá, 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 (flucytozin) 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 pojmy *dermatomykóza* (*dermatofytóza*) pro onemocnění kůže, *trichomykóza*/*fytoza* 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. Pomoci 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 *Staph. 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 (miconazol, ketoconazol, novější fluconazol a itraconazol).

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, nejrůznější 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

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

Diagnostika. Nejčastěji mikroskopická (průkaz prvoků, vajíček červů), méně často kulturační (např. *Trichomonas*) či nepřímá (serologická - kupříkladu u toxoplasmózy). Bývají též ↑ IgE. Z mikroskop. 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 červí. 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.

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.

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.

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 meziphostitelem - 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 carinii*.** 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 platíval 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 loší „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 meziphostitele, což může být vodní rostlina, ryba, krab apod. Příznaky velmi různé (horečky, žloutenky, poškození 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. Nеспецифické příznaky.

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

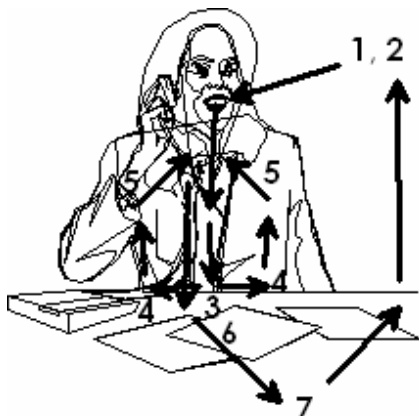
Diagnostika: mikroskopie, u měchožila serologie; léčba: praziquantel, niklosamid, u měchožila mebendazol.

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 mikroskopii 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 požitá (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 žlučových 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 Pyrinium, 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 klíšťatou přenášena stejně jako klíšťová encefalitida a klíšťová ehrlichioza.

Zákožka svrabová - *Sarcoptes scabiei*. Veliká 0,2 až 0,5 mm. Samičky si vyrtávají chodbičky v kůži. Přenáší se mezilidským kontaktem (často v kolektivech - domovy důchodců, útulky pro bezdomovce apod.). Ekzém je prakticky neodlučnou součástí choroby. Zákožky se s oblibou vyskytují na svraštělé 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 filčka) 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 ploštica. Ráda se ukrývá ve škvírách. Živí se výhradně krví. Viz obr.

Dvoukřídílí - *Diptera*. Komáři, komárci, muchničky apod. působí jako přenašeči různých chorob, obvykle pasivní. Při prevenci je důležité zničení přirozených líhnišť (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. Viz obr.

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. Viz obr.