

Mikrobiologický ústav uvádí

NA STOPĚ PACHATELE



Díl dvanáctý:

Spolupráce při pátrání aneb
Klinická mikrobiologie I

Mikrobiologický ústav uvádí

NA STOPĚ PACHATELE



Díl třináctý:

Spolupráce při pátrání aneb
Klinická mikrobiologie II

Na úvod (materiál se přijímá i o Vánocích)



Přehled témat

Bonus: Běžná flóra +

Úvod do klinické mikrobiologie

1 Indikace

2 Odběr vzorku (včetně žádanky) 3 Transport vzorku

2A Odběry: hemokultury

2B Odběry: vzorky moče

2C Odběry: další konkrétní případy

4 Rozhodnutí, jak zpracovat 5 Vlastní zpracování

4A Zpracování a vyhodnocení respiračních vzorků

4B Zpracování a vyhodnocení vzorků moče a ran

6 Zaslání výsledku 7 Interpretace

Úvod do klinické mikrobiologie

Příběh první – 1

- Petr pořád kašlal, tak navštívil lékaře. Lékař mu chtěl rovnou předepsat antibiotika, pak si ale vzpomněl, jak ho mikrobiologové nabádali, ať provede vyšetření. Tak udělal výtěr z krku. Našel se v něm *Haemophilus influenzae*, citlivý na cefuroxim. Petr začal užívat ZINNAT (preparát, který cefuroxim obsahuje).

Příběh první – 2

- Petrův stav se však nezlepšoval. Petr se naštvál a navštívil známého lékaře na plicním. Byla provedena **serologie respiračních virů** a nalezeny **vysoké titry protilátek proti *Mycoplasma pneumoniae***. Petr začal **užívat SUMAMED** (azithromycin) a brzo je jeho stav výrazně zlepšil.

Viníkem bylo nejen *Mycoplasma pneumoniae*, ale i

- obvodní lékař X. Y., protože:
 - správně si vzpomněl, že je většinou dobré před nasazením antibiotik zjistit **původce a antibiotickou citlivost**
 - udělal však **chybu v rozhodování, jaké vyšetření je v daném případě indikováno**
 - mělo být zasláno **sputum**, a při negativě kultivace (nebo při indiciích ukazujících spíše na typickou než klasickou pneumonii) případně **srážlivá „krev na serologii respiračních virů“** (včetně chlamydií a mykoplasm, ač to viry nejsou)
- Všimněte si, že jsou i případy, kdy makrolidy jsou správné řešení dané situace (ač jinak autor těchto řádků spíše brojí proti jejich nadužívání)

Příběh druhý

- Nicol škrábalo v krku, a tak zašla k lékaři. Lékař provedl výtěr z krku, ale byla nalezena pouze běžná flóra. Lékaři se to nezdálo, protože dle CRP i zvýšeného počtu polymorfonukleárů vše nasvědčovalo hnisavé bakteriální infekci.
- Lékař věděl, že Nicol často střídá partnery. Na přímou otázku přiznala, že měla orální sex s rizikovým mužem. Lékař provedl nový odběr, tentokrát s poznačením, že jde o vyšetření na kapavku. A nemýlil se.

Viníkem byla pouze *Neisseria gonorrhoeae*

- Obvodní lékař tentokrát nic nezanedbal, gonokoková faryngitida zase není tak běžná, aby se po ní rutinně pátralo při rutinní anamnéze. Pozitivní je, že se nenechal zviklat negativním výsledkem vyšetření.
- Lékař si totiž správně uvědomil, že **každý typ vzorku má v laboratoři své rutinní vyšetřovací schéma**. Toto schéma platí vždy, nejsou-li vyřčeny speciální požadavky. Je-li tedy důvod ke speciálnímu vyšetření, je nutno je vyznačit na průvodce.

Co je to klinická mikrobiologie

- **Klinická mikrobiologie „sensu lato“** je lékařská mikrobiologie – tedy ta část mikrobiologie, která se týká mikrobiálního osídlení člověka a lidských patogenů
- **Klinická mikrobiologie „sensu stricto“** popisuje vlastní procesy mezi klinickým pracovištěm a laboratoří, jakož i organizaci vlastního laboratorního vyšetření

Proces mikrobiologického vyšetřování – na všem záleží!!!

KLINIK

LABORATOŘ

Indikace vyšetření – zda, jaké

P 12

Vlastní provedení odběru

Transport materiálu

P 13

Rozhodnutí, jak zpracovat

Vlastní zpracování materiálu

Zaslání výsledku

Interpretace v kontextu ostat. výsledků a stavu pacienta (léčit vždy **pacienta**, ne nález)



1 Indikace

1A Indikace – ZDA provést

- Hlavním klíčem k úspěchu je zpravidla položit si otázku **co udělám jinak v závislosti na výsledku vyšetření.**
- Pokud zjistím, že ať vyjde vyšetření jakkoli, **bude můj další postup ve vztahu k pacientovi stejný,** je vyšetření pravděpodobně **zbytečné**
- Toto ale neplatí u **epidemiologických indikací** a také u **profylaktických indikací** (jako je skríníng mikrobiálního osídlení pacientů v těžkém stavu)

1B Indikace – CO provést

- Rozhodnutím, že chci provést vyšetření, to zdaleka nekončí. Musím se ještě rozmyslet, **jaké vyšetření se rozhodnu provést.**
- Musím znát **spektrum patogenů a možnosti jejich vyšetření**
- Součástí je také **rozhodnutí o tom, jak technicky se odběr provede, do jaké nádobky či odběrové soupravy a podobně**

Tři typy patogenů (1)

- Patogen typu *Streptococcus pyogenes*. Nemusím vědět, že myslím zrovna na tohoto patogena, ale musím přesně vědět, kde je jeho předpokládaná lokalizace.
- Patogen typu *Mycobacterium tuberculosis*. Musím vědět, kde patogena hledám, a zároveň i to, že hledám právě tuto skupinu patogenů – to tedy musím vyznačit na žádance.
- Patogen typu *Toxoplasma gondii*. Nemusím vědět, kde se patogen v těle nachází, ale musím vědět, že hledám právě jeho.

Tři typy patogenů (2)

- Patogen typu *Streptococcus pyogenes*. Týká se kultivovatelných bakterií a kvasinek, tedy většiny mikrobů z P 01 až P 06 a zčásti P 10
- Patogen typu *Mycobacterium tuberculosis*. Stále je to přímý průkaz, ale speciální postupy, při běžné kultivaci se nezachytí. Týká se zejména mikrobů z P 07, P 08, P 11, část P06.
- Patogen typu *Toxoplasma gondii*. Nepřímý průkaz, event. přímý průkaz virového antigenu. Týká se spirochet z P 09, virů z J 12 a J 13, ale i některých dalších (třeba zrovna toxoplasmy).



2 Odběr vzorku

(včetně žádanky)

3 Transport

2 Vlastní odběr vzorku

3 Transport vzorku do laboratoře

- Tyto fáze nelze oddělit – odběr je nutno činit již se zřetelem na transport materiálu do laboratoře
- V zásadě existují tři typy vzorků:
 - Výtěry a stěry na tamponech
 - Tekuté a kusové vzorky, zasílané v nádobkách (zpravidla sterilních)
 - Jiné a speciální případy, viz dále
- Nelze zapomenout na správné vyplnění průvodky

Výtěrovky



Jiné typy odběrů než „výtěrovky“ a odběrové nádoby

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

Volba „do čeho odebrat“: Tekutý vzorek, nebo výtěr?

- Přednost má zpravidla zaslání tekutého/kusového materiálu před pouhým zasláním stěru/výtěru.
- Existují četné výjimky, např.
 - v bakteriologii se zpravidla používá **výtěr z řitního kanálu** namísto kusové stolice (i když zaslání kusové stolice v zásadě není chyba)
 - **stěr z urethry** je u kapavky doporučován spíše než zaslání vzorku moče

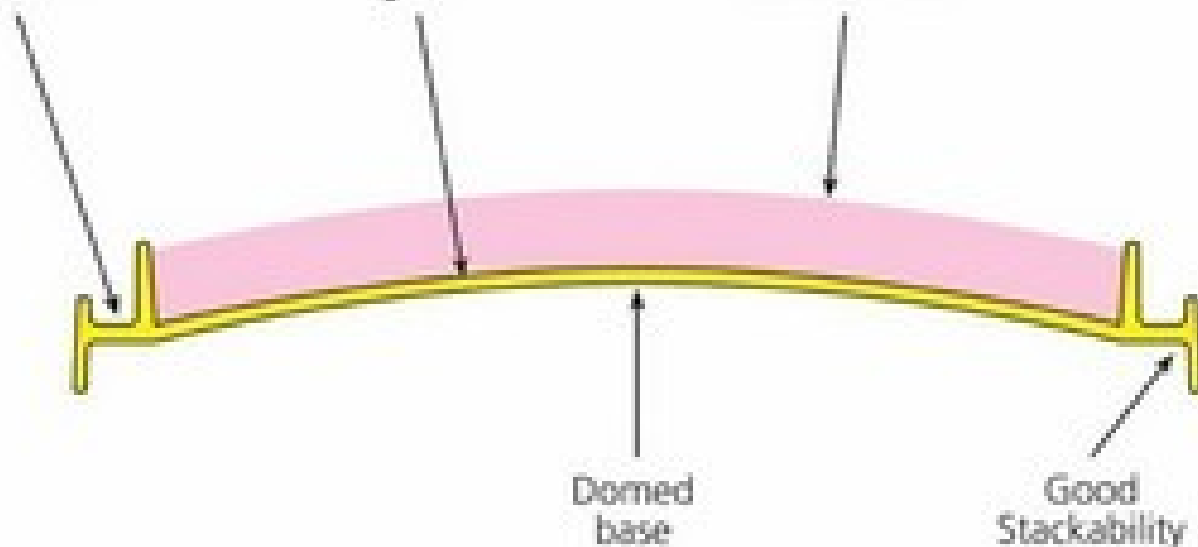
Kontaktní destička



Triple vented

Numbered grid

25cm² surface area



Uricult

www.mediost.com



Některé typy výtěrovek



Suchý tampon www.calgarylabservices.com

Dnes se používá jen pro PCR a průkaz antigenu, ne pro kultivaci!

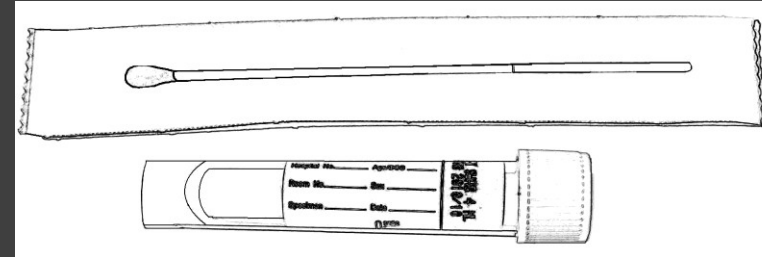


Amiesova půda s aktivním uhlím www.herenz.de

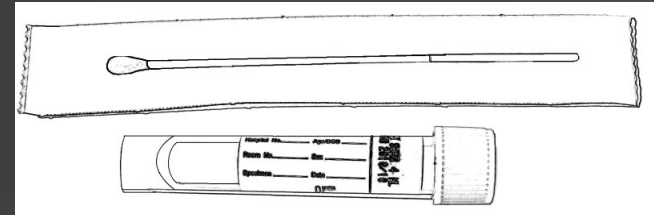
Univerzální transportní půda pro bakteriologii (všechny typy výtěrovek). Drátěná varianta je důležitá, pokud se potřebujeme „dostat za roh“.

Další výtěry

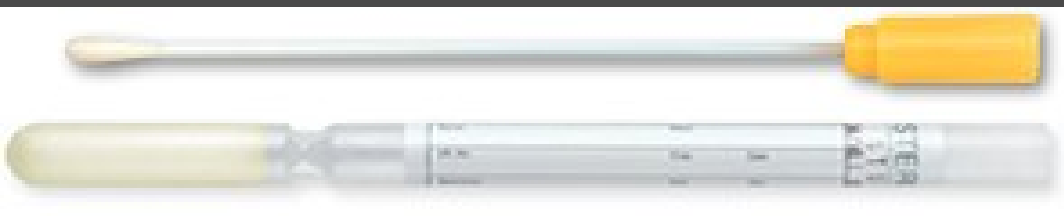
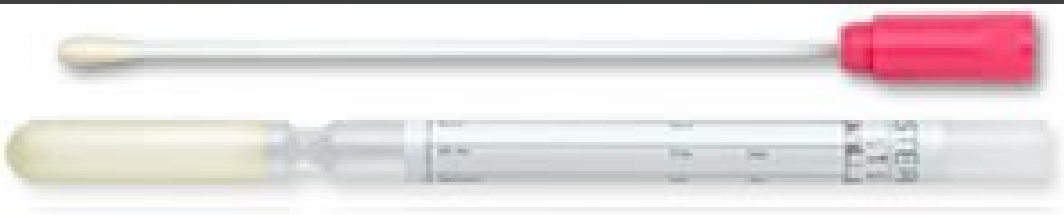
Fungi Quick (na kvasinky a plísně) www.copanswabs.com



Souprava C. A. T. (Candida And Trichomonas, pouze z genitálií) www.copanswabs.com



Na viry www.copanswabs.com



Na chlamydie

www.copanswabs.com

Přehled souprav na výtěry

Suchý tampon na špejli:
průkaz antigenu a DNA

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

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

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

Fungiquick – houby

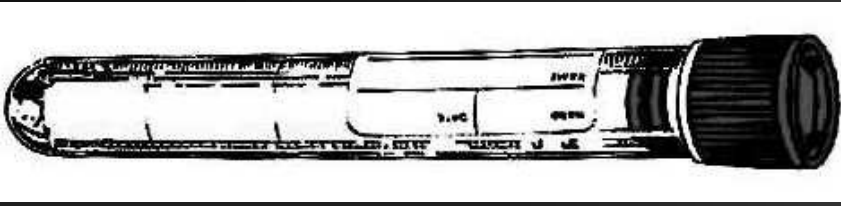
C. A. T. – houby a trichomonády (stěry z pohlaví)

Soupravy s médiem na viry, popř. chlamydie

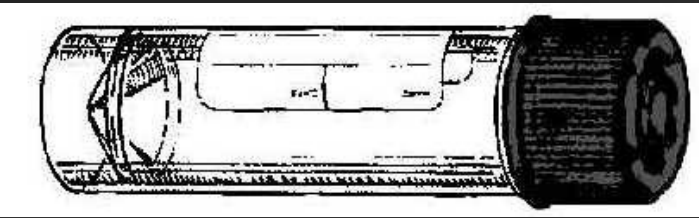
Odběrové nádoby

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

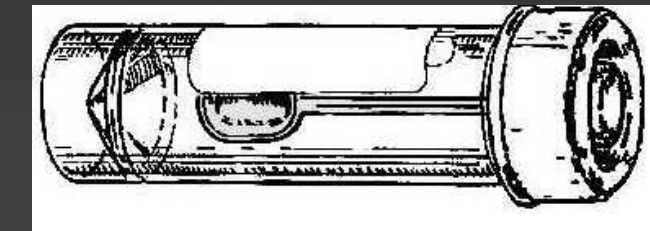
Nádobky



Běžná zkumavka. Universální použití: srážlivá krev (serologie), moč, likvor, hnis, punktát apod.; krevní a močové katetry, menší kousky tkání...



Sputovka. Nejen na sputum, ale např. i na větší kousky tkání



Nádobka na stolice – na parazitologii. Pouze tato nemusí být sterilní!



Nádobka na odběr moče. Je lepší, když pacient močí rovnou do zkumavky, avšak zvláště pro ženy je to obtížné (nejsou-li ve sprše). Mohou tedy močit do této nádobky, a pak sestra moč přelije do zkumavky.

Různé nádobky



Průvodka 1

- Správně vyplněná průvodka je velice důležitá!
- **Osobní údaje:** podstatné kvůli pojišťovně, ale i kvůli identifikaci, komu poslat výsledek apod.
- **Přesný popis materiálu a požadovaného vyšetření**
 - nepsat pouze „výtěr“, když není jasné, odkud
 - ani „stěr z rány“ nestačí (jaká rána, kde lokalizována)
 - Katetrizovaná moč × moč z permanentního katetru
 - uvést, zda je požadováno např. anaerobní vyšetření
 - nepožadovat vyšetření, které nelze provést nebo nemá smysl (např. kultivační vyšetření u syfilis)

Průvodka 2 – co uvést

- **skutečnou diagnózu**, je-li více, napsat tu, která souvisí s vyšetřením, popř. všechny /např. (1) diabetes mellitus, (2) poševní výtok/
- **akutní / chronický stav / kontrola po léčbě**
- uvést stávající nebo uvažovanou **antibiotickou terapii**, případně i alergii na antibiotika

Průvodka 3 – co ještě uvést

- cestovatelská anamnéza – návrat z tropů
- pracovní anamnéza – práce v zemědělství aj.
- u serologických vyšetření datum prvních příznaků, první / druhý vzorek
- u gynekologických materiálů fázi menstruačního cyklu (a při menses raději neodebírat)
- v případě mimořádných vzorků se dohodnout, telefonicky

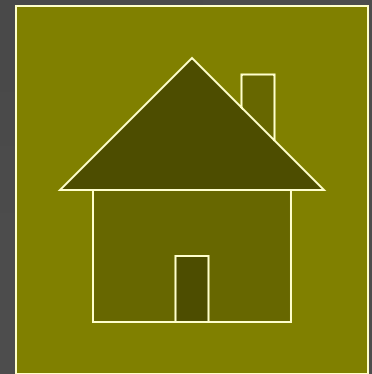
Vyplnění průvodky – shrnutí

Nesmíme zapomenout vyplnit na průvodce všechna důležitá pole:

- **pole popisující pacienta** (jméno, rodné číslo, diagnóza, pojišťovna, oddělení...)
- **pole popisující vzorek** (typ vzorku, lokalizace, okolnosti odběru)
- **a všechny ostatní významné části** (zejména anamnézu)

Chyby při vyplňování žádanek

- Častou chybou je **nedostatečné označení typu vzorku**
- Je také **chybou požadovat vyšetření, které je nevhodné** (například pátrání po protilátkách tam, kde převažuje buněčná imunita a protilátky nemají diagnostický význam)



2A Odběry: hemokultury

Základní pojmy kolem sepsí

- **Sepse** je stav, kdy bakterie vyvolaly infekci krevního řečiště, s vysokými horečkami, rozvratem metabolismu a spoustou dalších klinických projevů
- **Bakter(i)émie** je jakákoli přítomnost bakterií v krvi, tj. i taková, které je přechodná a pro organismus vůbec nic neznamena
- **Pseudobakter(i)émie** je stav, kdy jsou bakterie v krvi přítomny jen zdánlivě (špatně provedené vyšetření krve, zpravidla kožní kontaminace).

Druhy sepsí

- **Primární sepse** – některé bakterie mají sepse „v popisu práce“, třeba tyfové salmonely nebo do jisté míry i meningokoky
- **Sekundární sepse** – sepse následující po předchozím postižení nějakého orgánu
- **Zvláštní typy sepsí:**
 - urosepse – sepse při onemocnění ledvin
 - katetrová sepse jako nozokomiální onemocnění

Sepse – klinický obraz

- nestabilní tělesná teplota
- porucha svalového tonu
- nesnášenlivost stravy, průjem
- poruchy dýchání – zrychlené, nepravidelné, dechové pausy, selhání
- poruchy krevního oběhu – zrychlený či zpomalený puls, pokles TK, apod.
- často žloutenka, hyper/hypoglykemie, metabolický rozvrat, krvácení, nervové příznaky apod.

Definice hemokultivace


- Jedná se o **nesrážlivou krev**, principiálně zcela odlišné vyšetření než vyšetření serologická
- Dnes zpravidla odběr do **speciálních lahviček** pro automatickou kultivaci
- Nutno odebrat **dvě, ale ještě lépe tři hemokultury** při vzestupu teploty
- Ideálně **pokaždé z nového vpichu**, nebo aspoň jedna venepunkce + centrální žíla + periferní žíla (odlišení bakteriémie od kolonizace vstupu)

Zásady odběru krve

- **Odebírat asepticky!!!** Nejen kvůli pacientovi, ale i kvůli vzorku. Nestačí očistit kůži benzinem, nutná desinfekce
- **Desinfekci nechat působit dostatečně dlouho**, u alkoholových prostředků do zaschnutí (nechat skutečně zaschnout)
- **Nejlépe použít tři stejné hemokultivační nádoby**. Případně doplnit např. jednou anaerobní
- **Hemokultury popsat**, nezapomenout na čas odběru a místo odkud bylo odebráno

Druhy kultivačních nádobek

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



Standard
aerobní

Akt. uhlí
anaerobní

Akt. uhlí
aerobní

Bact/ALERT[®] SA

Aerobic, Aérobie, Aeróbica, Aerobisch,
Αερόβια, Aeróbica, Aerobisch, Aerobisch

See instructions. Voir Notice.

Ver las Instrucciones.

Vide Instruções de Uso.

Store / Cons. 15°-30°C

For in vitro diagnostic use.

REG-10774-0025

BIOMÉRIEUX, INC.

Bact/ALERT[®] FN

Microaerobic, Anaerobisch, Anaerobisch,
Anaerobisch, Anaerobisch, Anaerobisch

See instructions. Voir Notice.

Ver las Instrucciones.

Vide Instruções de Uso.

Store / Cons. 15°-30°C

For in vitro diagnostic use.

REG-10774-0025

BIOMÉRIEUX, INC.

Bact/ALERT[®] S

Aerobic, Aérobie, Aeróbica, Aerobisch,
Αερόβια, Aeróbica, Aerobisch, Aerobisch

See instructions. Voir Notice.

Ver las Instrucciones.

Vide Instruções de Uso.

Store / Cons. 15°-30°C

For in vitro diagnostic use.

REG-10774-0025

BIOMÉRIEUX

Fungování kultivátorů

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

Hemokultivátor



www.medmicro.info

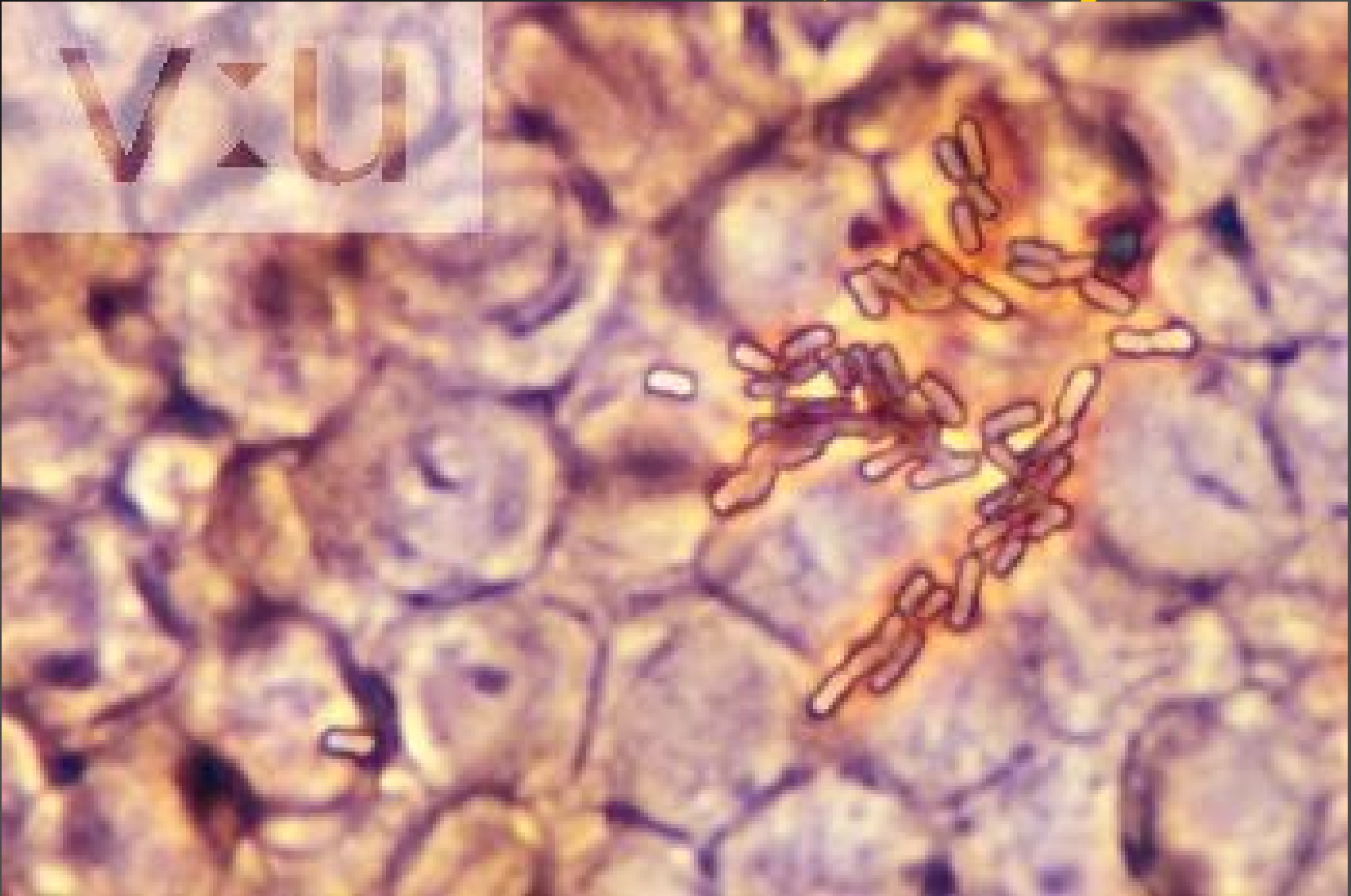
Když je hemokultura pozitivní...

- Lahvička je vyjmuta z přístroje
- Je nutno zaevidovat čas, resp. dobu od příjmu do positivity. Viz další obrázek
- Provádí se vyočkování na pevné půdy, nátěr na sklo barvený Gramem a podle jeho výsledku zpravidla „napřímo“ orientační diskový test citlivosti; místo standardní suspenze se použije přímo tekutina z lahvičky → není spolehlivé

Proč je tak důležité zapsat čas odběru

- **Příklad 1:** Odebraly se tři hemokultury, všechny jsou pozitivní, avšak jedna po 12 hodinách, druhá po 36 hodinách a třetí po 3 dnech. Kmeny jsou fenotypově odlišné → je velmi pravděpodobné, že jde o kožní kontaminanty
- **Příklad 2:** Odebraly se tři hemokultury, všechny jsou pozitivní, všechny po zhruba stejném čase po odběru, kmeny vypadají podobně → je pravděpodobné, že jde o skutečného patogena

E. coli v hemokultuře, fázový kontrast

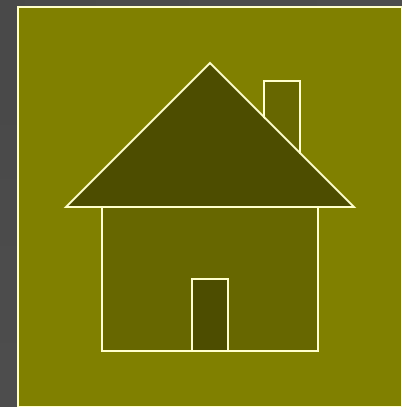


Další postup

- Je třeba počítat s tím, že **testy „napřímo“ jsou jen orientační**, už pro nestandardní obsah bakterií v jednotlivých krvích. Zpravidla se proto v dalším kroku provádí **řádné vyšetření citlivosti** (často pomocí kvantitativních testů)
- Výjimkou jsou **případy, kdy jde asi o kontaminaci** (zejména u koaguláza negativních stafylokoků)

Spolupráce laboratoř – oddělení

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



2B Odběry:
vzorky moče

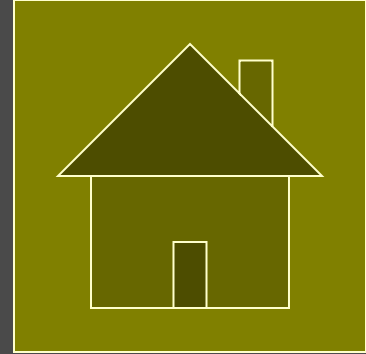
Vyšetření moče (Část první)

- Vyšetření moče je vhodné u nekomplikované a nezbytné u komplikované cystitidy **správně**
- Mikrobiologové doporučují použití katetrizované moč jako rutinní způsob odběru moče na bakteriologické vyšetření **špatně, běžně (ale správně) odebraná moč je dostačující a katetrizace může způsobit iatrogenní cystitidu; katetrizovaná moč je vhodná tam, kde běžně odebraná moč dlouhodobě nestačí**
- Při bakteriologickém vyšetření moče není podstatné, zda se při odběru proud moče dotýká při odběru předkožky (u mužů) či malých stydkých pysků (u žen) **špatně, je nutno, aby žena při močení jednou rukou labia odtáhla, podobně i muž; to že (ze studu) pacienti v tomto smyslu nebývají poučeni je důvodem kontaminací**

Vyšetření moče (Část druhá)

- Zevní ústí uretry je třeba před odběrem na bakteriologické vyšetření pečlivě omýt, případně i lehce desinfikovat **správně**
- Nádobka, do které pacient močí, musí být sterilní **správně, a to at' močí do široké nádobky, z níž se moč přelévá, či přímo do zkumavky (ve sprše)**
- Zkumavka, ve které se posílá moč, musí mít žlutý uzávěr **špatně, je to jedno, ale musí být sterilní. Jiné to může být jen když to laboratoř požaduje např. pro přehlednost**
- Žádanka o vyšetření musí obsahovat informaci, zda jde o moč běžně odebranou, katetrizovanou, punktovanou, nebo zda jde o vzorek z permanentního močového katetru **správně (hlavně katetrizovaná × PMK, viz dále)**

Vyšetření moče (Část třetí)



- Moč z permanentního katetru má v bakteriologické diagnostice stejný význam jako moč katetrizovaná přímo za účelem vyšetření **špatně, moč z PMK je méně validní vzorek než běžně odebraná, katetrizovaná naopak více**
- Vzorek moče musí být dodán do laboratoře do dvou hodin po odběru. Pokud to není možné, je nutno jej uchovat v ledničce **správně (teplotní šok se zde považuje za menší zlo než pomnožená kontaminace)**
- Vzorek moče je při diagnostice kapavky lepší než výtěr z močové trubice **špatně**

2C Odběry:
další konkrétní
případy

Odběr stolice

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

Otisková metoda u plošných ran

- Tato metoda se používá ke **kvantifikaci mikroorganismů, zejména v ranách**. Při použití čtveratých filtračních papírů můžete lépe odlišit skutečného patogena od náhodné kontaminanty
- Vy tuto metodu nebudete používat na ránu, ale vyzkoušíte si ji na vlastní kůži.

Nátěry – poševní/urethrální nátěr

- Sklíčka se používají v různých situacích: u aktinomykózy, anaerobních infekcí apod.
- Sklíčka se také posílají současně s **poševním výtěrem při podezření na poševní infekce.**
 - Posílají se **dvě sklíčka.**
 - Jedno se obarví dle Grama, na bakterie, ale i epitelie, leukocyty apod.
 - Druhé dle Giemsy (hlavně kvůli trichomonádám)
 - Hodnotí se jednak **kvantita jednotlivých útvarů**, jednak **celkový vzhled** preparátu
- U **kapavky** se posílá zpravidla jen jedno sklíčko (urethrální výtěr), nacházíme gramnegativní intraleukocytární diplokoky

Normální mikroflóra: epitelie, laktobacily (Döderleinův bacil)



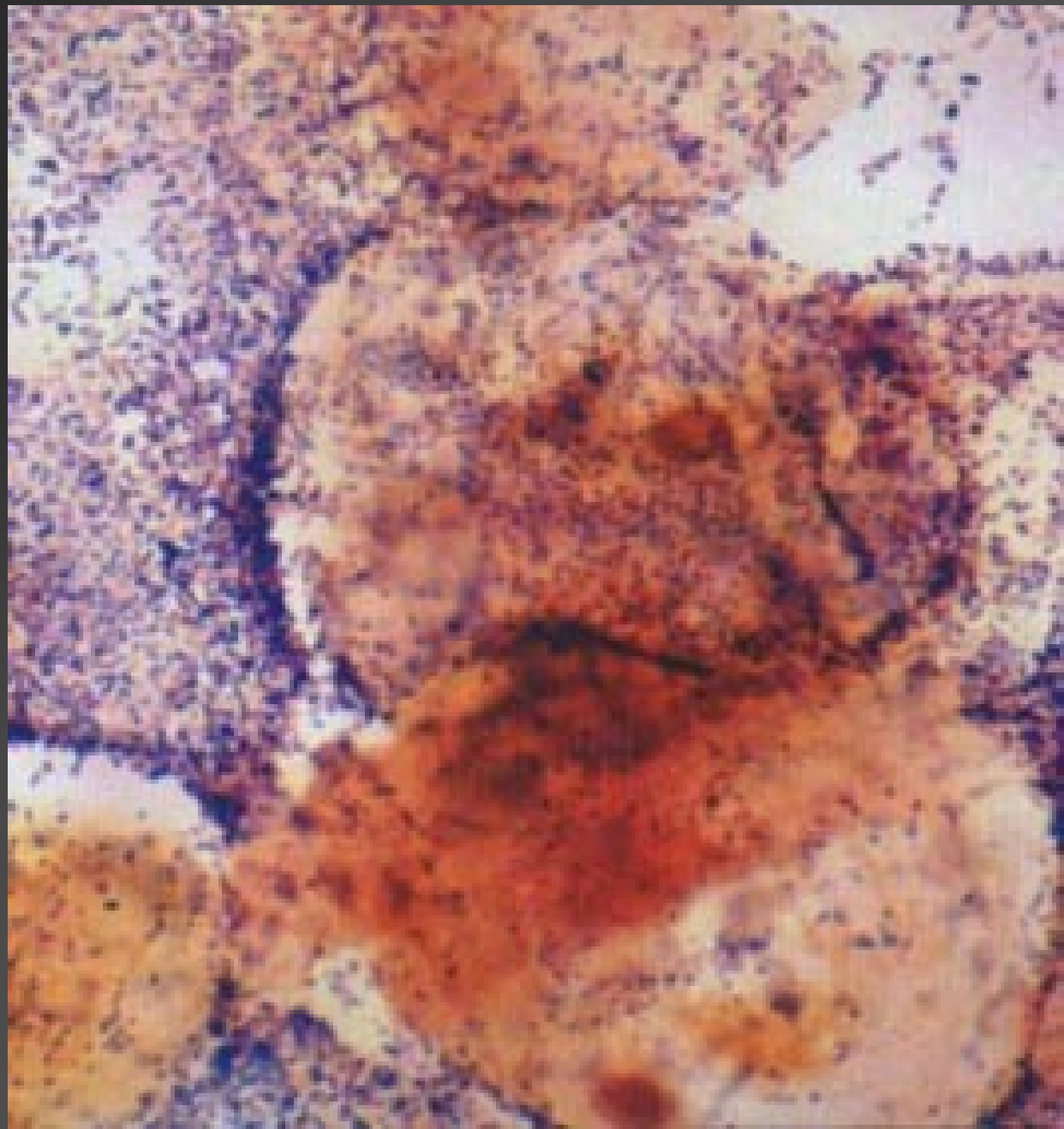
Giemsa

Gram

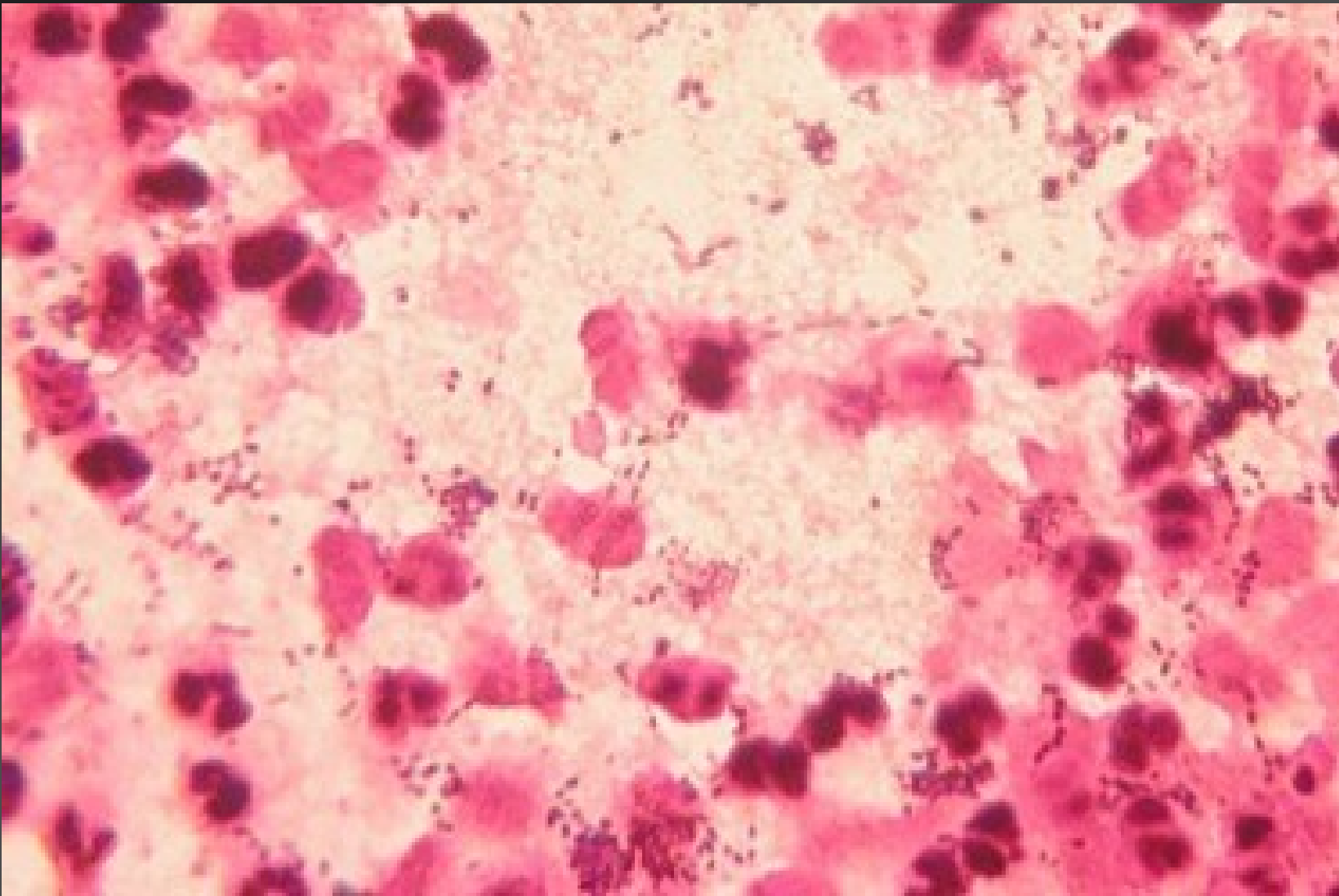
Obraz

bakteriální vaginózy

(laktobacily
nahrazeny
gardnerelami,
popř. mobilunky
a jinými
bakteriemi,
časté clue cells
– bakterie
adherované na
epitelie)



Aerobní vaginitis (na rozdíl od vaginózy jsou tu přítomny leukocyty)

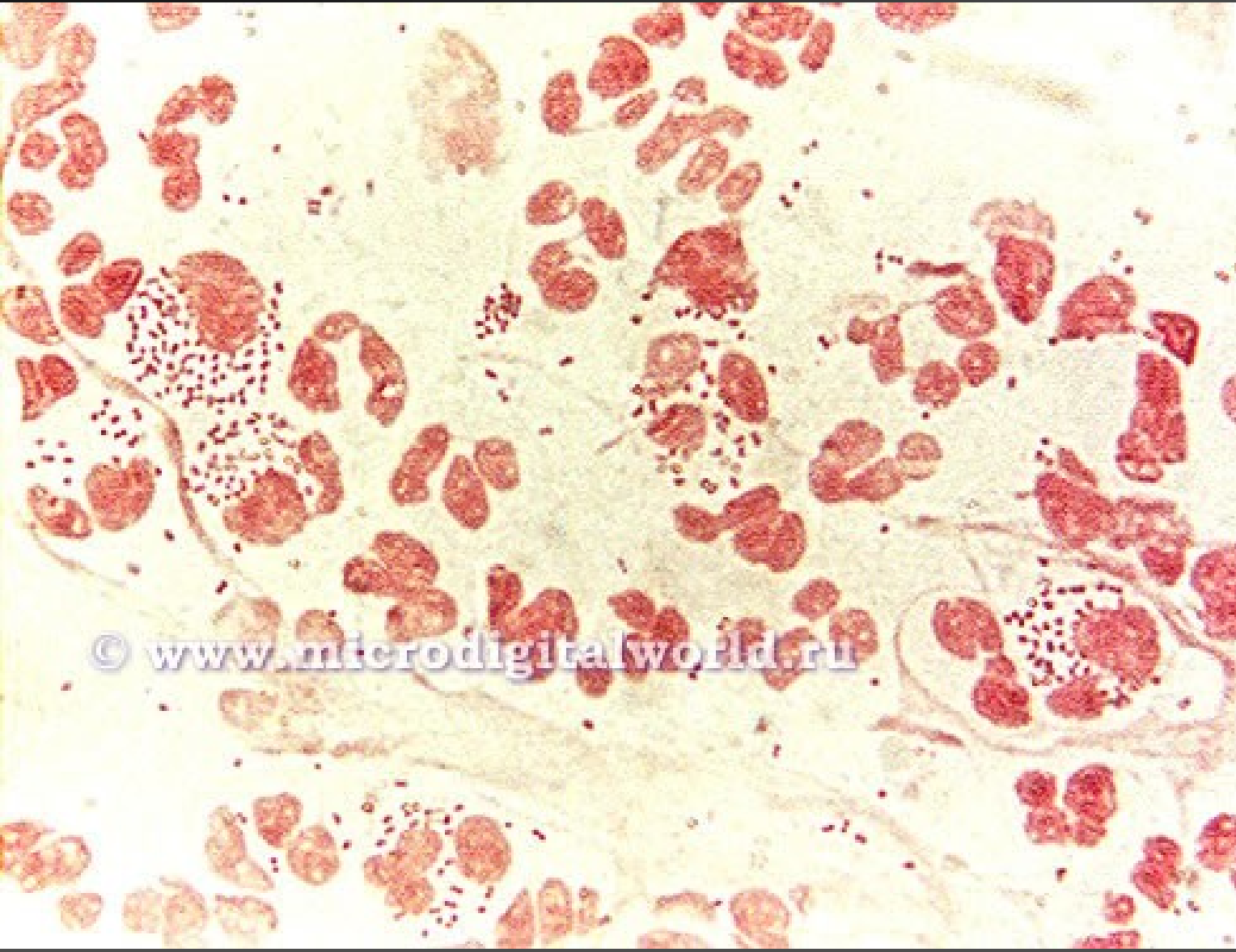


Gram

<http://en.microdi-gitalworld.ru>

Каравка

<http://en.microdigitalworld.ru>



© www.microdigitalworld.ru

Gram

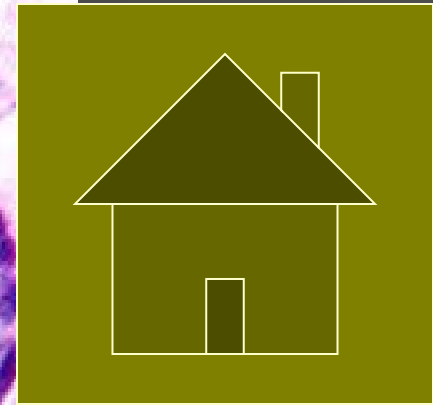
Trichomonóza



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

Vaginální mykóza

<http://en.microdigitalworld.ru>



Giemsa

4 Rozhodnutí
jak zpracovat

5 Vlastní
zpracování

4 Rozhodnutí, jak zpracovat

- Je dáno standardními operačními postupy (SOP). Pro každý typ vzorku je dáno v SOP, jak má být vzorek zpracován a jaké metody na něj mají být aplikovány
- Ne vždy je ovšem vše dáno SOP. Zvláště ve vzácných a mimořádných případech je na rozhodnutí zkušeného laboranta či VŠ mikrobiologa, jak vzorek zpracovat
- V důležitých případech není naprosto chybou zatelefonovat do laboratoře a domluvit se.

5 Vlastní zpracování (1)

- Vlastní zpracování zpravidla zajišťují laboranti, dříve se SŠ vzděláním, nyní s VOŠ nebo Bc. stupněm vysoké školy
- Postupuje se vždy přísně asepticky, aby se omezilo riziko laboratorní kontaminace. Práce v biohazard boxu je zároveň i dobrou prevencí profesionálních nákaz

www.medmicro.info



5 Vlastní zpracování (2)

Zpracování **bakteriologických kultivačních vzorků** obvykle zahrnuje následující

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

■ Zpracování **jiných vzorků** (serologie, PCR, mykologie, parazitologie) je speciální a je dána typem vyšetření a povahou vzorku

Laboratoř klinické bakteriologie



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

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

Laborant 1 zapisuje výsledky

S čím si lze splést patogena

- **S kontaminací:** nejčastěji bakterie rodů *Bacillus*, *Micrococcus*, *Kocuria*, ale i malá množství stafylokoků, plísní a podobně
- **S náhodným nálezem:** u výtěrů z krku mikrob, který se tam dostal s potravou
- **S běžnou flórou:** týká se míst, která svou běžnou flóru mají

Přehled běžné flóry

Více zde:



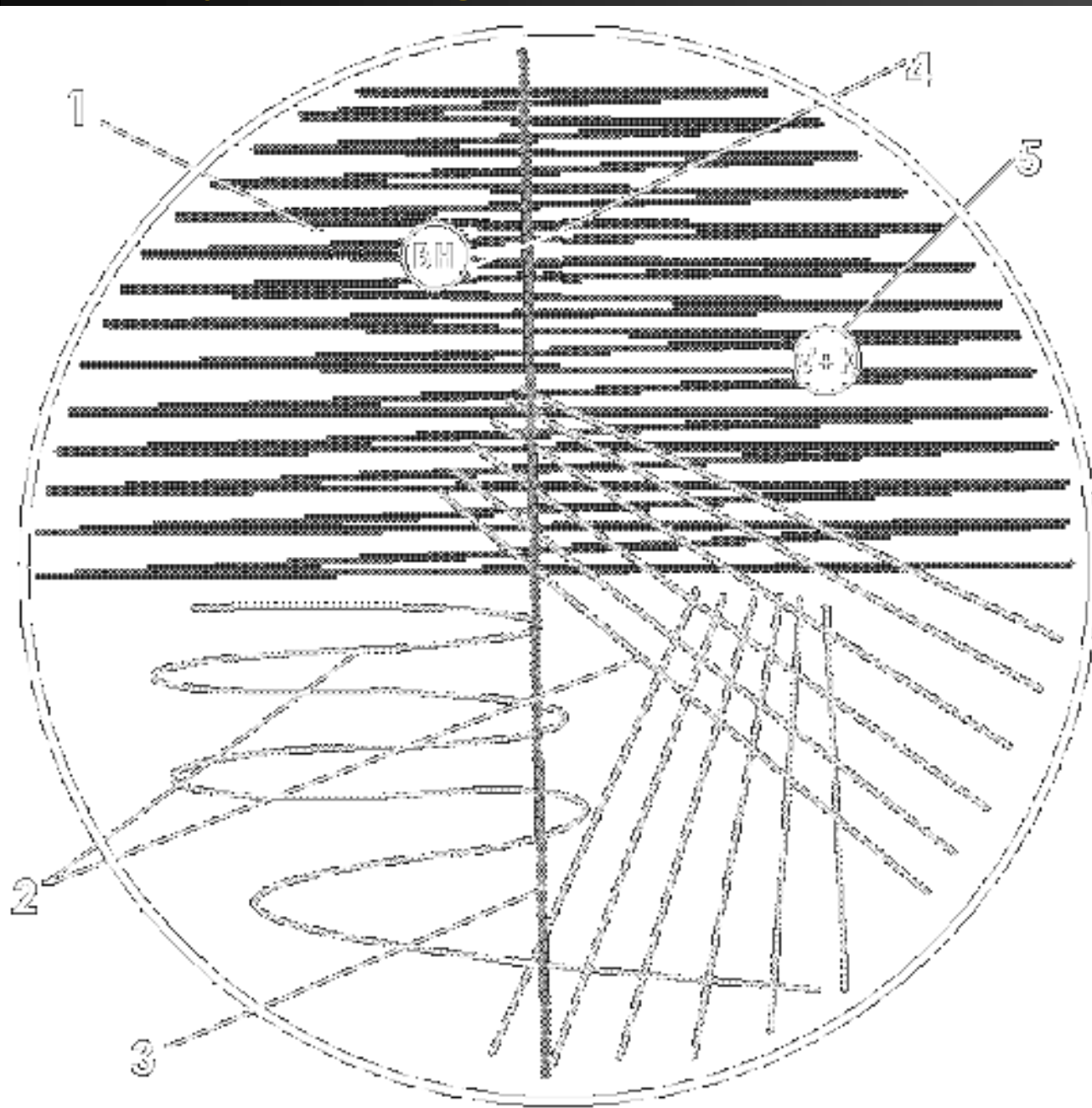
Kůže, nos, boltec, zevní zvukovod, kožní adnexa	Stafylokoky (i zlaté), korynebakteria, kvasinky
Hltan a ústní dutina	Ústní streptokoky a neisserie Hemofily, malá množství pneumokoků, meningokoků, anaeroby, nepat. treponem.
Tlusté (i tenké) střevo	Anaeroby, enterobakterie, enterokoky, <i>Entamoeba coli</i>
Vagina	Laktobacily, malá množství nejrůznějších mikrobů
Přechody (rty apod.)	Směs zástupců obou míst

4A Zpracování a vyhodnocení respiračních vzorků

Jak najít patogena mezi běžnou orofaryngeální flórou

- Běžná orofaryngeální flóra zahrnuje ústní streptokoky (bezbarvé drobné kolonie s viridací) a ústní neisserie (drobné žlutavé kolonie bez hemolýzy). To výrazně ztěžuje hledání možných patogenů. Přesto:
 - Hemolytické streptokoky (ale i zlatý stafylokok) se projeví výraznou hemolýzou na krevním agaru
 - Pro záchyt hemofilů se používá disk s bacitracinem – ve vyšší koncentraci než v bacitracinovém testu (k odclonění běžné flóry)
 - Pro záchyt meningokoků se používá disk se směsí vankomycinu s kolistinem

Záchyt patogena v krku či sputu



1 očkováno tamponem

2 očkováno kličkou

3 stafylokoková čára

4 disk BH (bacitracin pro hemofily)

5 disk VK (vankomycin a kolistin pro meningokoky)

Na celé naočkované ploše pátráme po streptokokích (bezbarvé) a po stafylokokích (spíše bílé či zlatavé)

Kultivační výsledek výtěru z krku s běžnou flórou

Bacitracinový disk může být umístěn buďto na stafylokokovou čáku, nebo cca 1 cm od ní, používají se oba způsoby.

V těchto místech pátráme po hemofilech



Vysvětlivky k dalšímu textu

- **KA** – krevní agar
- **EA** – Endův agar; většinou lze místo něj použít alternativně také McConkeyho agar
- **KA+AMIK** – krevní agar s amikacinem, selektivní pro streptokoky a enterokoky
- **NaCl** – KA s 10 % NaCl, selektivní pro stafylokoky
- **B** – bujón
- **MCh** – močová chromogenní půda (pro identifikaci nejběžnějších močových patogenů)

A white plastic cup filled with a thick, yellowish, foamy substance, likely sputum. The foam is dense and covers most of the cup's volume. The text "Vyšetření sputa" is overlaid in the center of the cup.

Vyšetření sputa

Vyšetření sputa

Diagnostické schéma (1)

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

Vyšetření sputa

Diagnostické schéma (2)

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

Sputum – možné nálezy

- **Běžná flóra:** V DCD sice není, ale při průchodu HCD vždy dochází ke kontaminaci ústními streptokoky a neisseriemi
- **Patogeny:** pneumokoky, pyogenní streptokoky, hemofily (klasické pneumonie). Původci atypických pneumonií většinou nejsou kultivovatelní.
- Jedním z nejčastějších nálezů je ***Staphylococcus aureus***. Lékem volby by měl být oxacilin, ovšem to je generikum a ti parchanti z farmaceutických firem ho momentálně v p. o. formě nevyrábějí. Mohl by se tedy použít např. některý cefalosporin I. gen.

Praktická poznámka

- Malé, našedlé, skoro bezbarvé, s viridací, to jsou **ústní streptokoky**.
- Malé, nažloutlé, bez viridace, bez hemolýzy (nebo s nepatrně naznačenou hemolýzou), oxidáza pozitivní, to jsou **ústní neisserie**
- Pokud na misce vidíme ještě něco jiného, a zvláště pokud to „něco“ má výraznou hemolýzu, bude to asi **kýžený patogen**.

„Odečítání“ bakteriologie



A close-up photograph of a person's mouth. The tongue is held down by a white plastic tongue depressor. A hand on the right side holds a small, round mirror, reflecting the back of the tongue. The person is wearing a red garment. The background is dark.

Výtěr z krku

biology.clc.uc.edu

Výtěr z krku

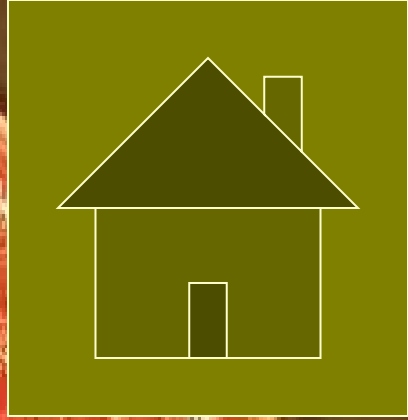
Diagnostické schéma

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

Farynx – možné nálezy

- **Běžná flóra:** Ústní streptokoky a neisserie; hemofily (hlavně *H. parainfluenzae*), za normální se považuje i malé množství aureů, pneumokoků, meningokoků, moraxel apod. Další součásti běžné flóry (anaeroby, spirochety) se při běžné kultivaci neodhalí
- **Patogeny:** pyogenní streptokoky, arkanobakteria; často se nenajde nic a původ je virový (EB viry a jiné)
- Nejvýznamnějším patogenem je *Streptococcus pyogenes*. Lékem volby u nealergických pacientů je jednoznačně – ale to přece víte 😊

Výtěr z krku – běžná flóra
plus pyogenní streptokok



4B Zpracování a vyhodnocení vzorků z ran a vzorků moče

Výtěr z rány



OCT 13 2004

Výtěr z rány

Základní diagnostické schéma

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

Výtěr z rány

- **Běžná flóra:** žádná není, vše, co se najde, se považuje za patogena (pro jistotu i to, o čem máme pochybnosti, není-li to kontaminace)
- **Patogeny:** všechno možné, od stafylokoků přes streptokoky a pseudomonády až po anaeroby u břišních ran a pasterurely u ran po pokousání psem. Proto se doporučuje s atb léčbou vyčkat až po alespoň předběžném výsledku kultivace
- **V našem případě bychom mohli použít k léčbě například ciprofloxacin. Rozhodující je však správná lokální péče o ránu!**

Moč



Moč

Základní diagnostické schéma

- **Den 0:** pouze nasazení kultivace
- **Den 1:** výsledek primokultivace vzorku na KA a EA či MCh, expedice všech negativních, testování patogenů
- **Den 2:** expedice pozitivních, je-li dostatečná citlivost a uspokojivé bližší určení
- **Den 3:** expedice dalších pozitivních výsledků

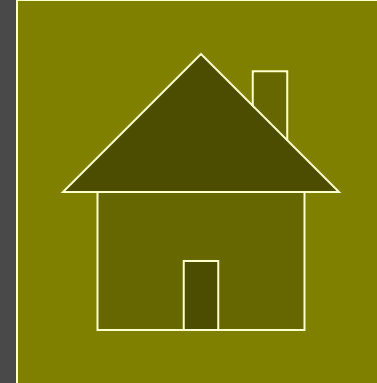
Moč

- **Běžná flóra** sice **není**, ale u starších osob je často přítomna bezpříznaková bakteriurie, kterou u těchto osob není nutno léčit
- Za **pravděpodobnou kontaminaci** (či náhodný nálezn) považujeme vše v množství do 10^4 / ml, vše v množství do 10^5 / ml při dvou různých bakteriích a úplně vše při třech a více bakteriích
- **Z patogenů** jsou nejběžnější enterobakterie, enterokoky, *S. agalactiae*, stafylokoky a další

Semikvantitativní zpracování moče

- Používá se kalibrovaná plastová klička – do oka kličky se zachytí vždy 1 μ l moče
- Tento mikrolitr se rozočkuje většinou na polovinu misky krevního agaru (vy to máte na celé misce)
- Dále se očkuje i na Endovu půdu nebo UR1chrom, zde se však již hodnotí jen kvalitativně
- Samozřejmě, to, že určujeme kvantitu, nijak neznamena, že bychom se vykašlali na určování rodu a druhu patogena
- **U cystitid volíme zpravidla nitrofurantoin, případně ko-trimoxazol, je-li bakterie na ně citlivá**

Semikvantitativní hodnocení moče



Počet kolonií na misce	Počet CFU (bakterií) v 1 μ l moče	Počet CFU (bakterií) v 1 ml moče	Hodnocení (platí pro 1 druh bakt.)
Méně než 10	Méně než 10	Méně než 10^4	Kontaminace
10–100	10–100	10^4 – 10^5	Hraniční
Více než 100	Více než 100	Více než 10^5	Infekce

6 Zaslání

výsledku

7 Interpretace

6 Zaslání výsledku

- Výsledek je **zaslán poté, co je dokončen diagnostický proces**. Někdy je poslán předběžný výsledek („mezivýsledek“) po ukončení aerobní kultivace s tím, že to, co trvá delší dobu (kultivace kvasinek, anaerobů apod.) bude případně zasláno dodatečně
- Výsledek **už v sobě zahrnuje kus interpretace**: mikrobiolog se vyjadřuje k evidentním kontaminacím, náhodným nálezům, běžné flóře, komentuje nálezy v poznámce

7 Interpretace

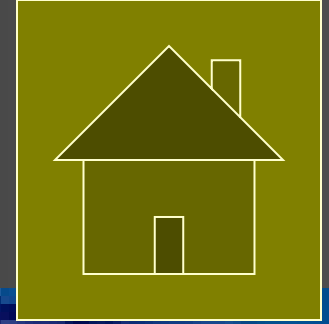
- **Definitivní interpretace nálezu je ovšem v rukou klinika.** Pouze on, nikoli mikrobiolog, totiž drží v rukou vedle mikrobiologického nálezu také biochemický, rentgenový, ultrazvukový, a především zná pacienta – vypáčil z něj anamnézu, vyšetřil jej, popřípadě (u obvodních lékařů) jej zná dlouhodobě.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

Výjev z laboratoře

www.medmicro.info



Konec



Běžná flóra +

BONUSOVÝ MATERIÁL

Normální mikroflóra a její význam

- Na různých místech lidského těla je přítomna tzv. **normální (běžná) flóra či mikroflóra.**
- Je tvořena **komenzálními či saprofytickými mikroby**, které jsou hostiteli více či méně prospěšné:
 - kolonizací příslušné sliznice **brání tomu, aby byla osídlena patogeny**
 - podílejí se na **stavu mikroprostředí**, např. pH
 - ve střevě **likvidují nestravitelné zbytky**
 - mohou mít i **další pozitivní efekty** pro hostitele (např. tvorba vitamínů střevními bakteriemi)

Kde mikroflóra je a kde není

- **Mikroflóra není** ve tkáních, v parenchymu orgánů, v krvi, v mozku ani mozkomíšním moku. Zde je každý nalezený mikrob velmi pravděpodobně patogenem
- **Mikroflóra není** ani v některých dutých orgánech, např. v jícnu, v plicích, v močovém měchýři (kromě starých osob) či v děloze
- **Mikroflóra je** zejména v dutině ústní a hltanu, v tlustém (a zčásti i tenkém) střevě, v pochvě a v menším množství také na kůži

Mikroflóra v průběhu života člověka

- **Plod nemá žádnou běžnou flóru**, po narození zvolna začíná osidlování
- Během prvních měsíců a let života se **běžná mikroflóra vyvíjí** (zejména střevní v souvislosti se změnami potravy)
- **U žen** se mění vaginální mikroflóra v důsledku hormonů při **menarche**, dále při **začátku pohlavního života** a pak v **menopauze**
- **U starších osob** dochází k dalším změnám (např. se často ustanoví „běžná flóra“ v močovém měchýři, dříve sterilním)

Mikroflóra jako ekosystém

- Kdysi lidé mysleli, že všechny škůdce úrody jednoduše zahubí například DDT. Ukázalo se ale, že takový **brutální zásah často nadělá víc škody než užitku**, zvláště když se použije nevhodným způsobem
- Podobně **složitý ekosystém je i třeba střevní mikroflóra**. I proto dnes na střevní infekce většinou nedoporučujeme antibiotika, protože systém „rozhodí“ často ještě víc.

Přehled běžné mikroflóry

Kůže, nos, boltec, zevní zvukovod, kožní adnexa	Stafylokoky (i zlaté), korynebakteria, kvasinky
Hltan a ústní dutina	Ústní streptokoky a neisserie Hemofily, malá množství pneumokoků, meningokoků, anaeroby, nepat. treponem.
tlusté (i tenké) střevo	Anaeroby, enterobakterie, enterokoky, <i>Entamoeba coli</i>
Vagina	Laktobacily, malá množství nejrůznějších mikrobů
Přechody (rty apod.)	Směs zástupců obou míst

Normální osídlení dýchacích cest

- **Nosní dutina** nemá specifickou flóru, přechází tam však mikroflóra z kůže (přední část) a hltanu (zadní část)
- **V hltanu** (stejně jako v ústní dutině) nacházíme ústní streptokoky, neisserie, nevirulentní kmeny hemofilů aj. Mnohé další tam jsou, ale většinou je nevykultivujeme
- **Plíce a dolní dýchací cesty** jsou normálně bez většího množství mikrobů
- **Na ostatních místech** (hrtan) jsou různé přechody (hrtan – jako v hltanu, ale méně)

Normální osídlení trávicích cest

- **Rty** znamenají přechod kožní a ústní flóry
- **V ústní dutině** (stejně jako v hltanu) nacházíme ústní streptokoky, neisserie, nevirulentní kmeny hemofilů aj. Mnohé další tam jsou, ale většinou je nevykultivujeme
- **Jícen a žaludek** jsou za normálních okolností bez většího množství mikrobů
- **V tenkém a zejména tlustém střevě** nacházíme zpravidla asi 1 kg anaerobů, dále enterobakterie, enterokoky, kvasinky, někdy i nepatogenní améby
- **Řiť** je opět místem přechodu střeva a kůže

Normální situace v ústní dutině

- Ústní dutina je i za normální situace velice **složitý ekosystém**, složený z různých druhů bakterií, usazených materiálů, lidských buněk a dalších složek
- Bakterie se v dutině ústní přitom nevyskytují v nějakém chaosu, ale v komplikovaném, **strukturovaném útvaru, zvaném biofilm**.
V daném případě jde o vícedruhový strukturovaný biofilm, ve kterém např. anaeroby jsou přítomny ve větší hloubce než aerobní bakterie

Močové cesty zdravého člověka

Ledviny – normálně bez mikrobů

Pánvičky ledvinné – normálně bez mikrobů

Močovody (uretery) – normálně bez mikrobů

Močový měchýř mladých a středně starých osob – normálně bez mikrobů

Močový měchýř seniorů – i za normálních okolností může být osídlen mikroflórou, která nečiní problémy a stává se „běžnou flórou“

Močová trubice – normálně bez mikrobů, část přilehlá k ústí však může být osídlena zvenčí

Normální stav pohlavních orgánů

- Za normálních poměrů nejsou mikroby
 - **U ženy** v děloze, vejcovodech, vaječnicích
 - **U muže** v prostatě, chámovodech, varlatech
- Specifickou normální flóru má **vagina** (laktobacily, příměs různých aerobních i anaerobních mikrobů)
- **Vulva** tvoří přechod vaginální a kožní flóry
- U muže je specifický **předkožkový vak**, vedle kožní flóry jsou tu i např. nepatogenní mykobakteria apod.

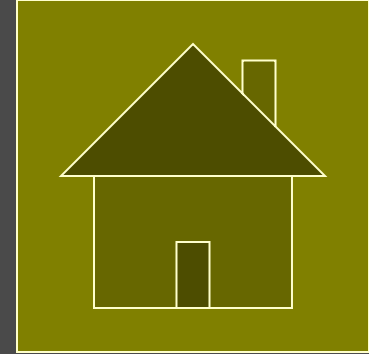
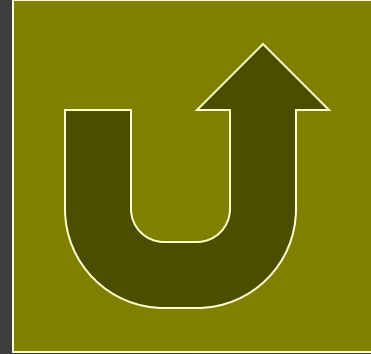
Normální osídlení kůže

- Přestože kůže je pro mikroby nejdostupnější, je její **osídlení mnohem chudší** než v případě např. úst, pochvy či tlustého střeva
- Mikrob, který chce žít na kůži, musí snášet **vyschnutí a vysoké koncentrace solí**
- **Na kůži se tedy normálně vyskytují**
 - koaguláza negativní druhy stafylokoků
 - **zlatý stafylokok** – malé množství je normální
 - **korynebakteria** a příbuzné G+ tyčinky
 - malá množství **kvasinek**

Péče o střevní mikroflóru

- V **rekonvalescenci průjmů**, ale i např. **po celkové antimikrobiální terapii** (kde mohlo dojít k vybití části mikroflóry) je vhodné snažit se o **obnovu normálního stavu**
- Používají se **jogurty** (nesladké, netučné), **kyselé zeli**, různé preparáty (Hylac)
 - Některé obsahují substráty pro „dobré“ bakterie, to jsou **prebiotika**.
 - Některé obsahují přímo ty dobré bakterie, to jsou **probiotika**
 - Některé obsahují oboje, to jsou **symbiotika**

Péče o vaginální mikroflóru



- Také **vaginální ekosystém může být narušen** antimikrobiální léčbou či nějakým onemocněním
- Také zde doporučují „lidové receptury“ např. aplikaci jogurtu do pochvy
- Dnes ovšem lze spíše doporučit **prebiotické či probiotické vaginální čípky**
- Důležitá je také **výživa a úprava hormonálních hladin** (antikoncepce)