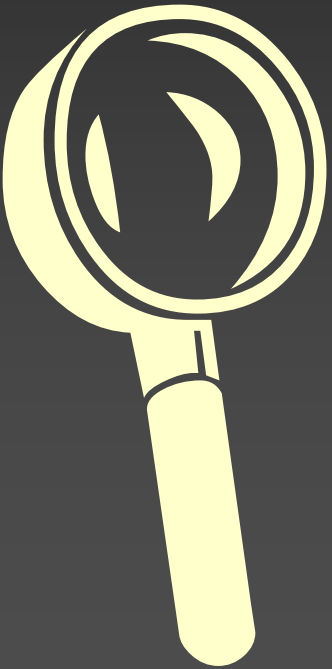


Mikrobiologický ústav uvádí

NA STOPĚ PACHATELE



Díl desátý:

Pachatelé orální

Příběh první

- Pan Kazizub měl **zubní kaz**. Navštívil svého zubního lékaře. Ten kaz ošetřil a dal panu Kazuzubovi zdarma amalgámovou plombu, za kterou mu – prozatím – zákon zakazuje požadovat platbu. Zároveň pana Kazizuba poučil o správné dentální hygieně.
- Jak je dnes již známo, na vzniku zubního kazu se **významně podílejí mikroby**, zejména tím, že vytvářejí kyseliny a snížené pH se podílí na rozrušování skloviny
- Za významné bakterie se považuje ***Streptococcus mutans***, případně též **ústní laktobacily**
- Význam má také **pufrovací kapacita slin**

Příběh druhý

- Pan Parodontoubek si na rozdíl od pana Kazizuba zuby čistil, ale zanedbával **přechod mezi zubem a dásní**.
- V gingiválním sulku se mu **přemnožily rizikové bakterie**, hlavně *Porphyromonas gingivalis*, *Tanerella forsythia* a *Treponema denticola*.
- Zvýšené pH a další množení porfyromonád způsobilo, že pan Parodontoubek měl najednou místo gingiválního sulku **parodontální chobot**.
- A tak se u pana Parodontoubka vyvinula gingivitida a nakonec **parodontitida**

Orální mikroby

- Orální mikroby představují **velmi složitý ekosystém**. Zubní plak představuje poměrně složitý biofilm.
- Je přitom nutno rozlišovat **supragingivální a subgingivální plak**, protože jejich složení se liší a ovlivňuje rozvoj různých patologických procesů
- V případě patogenních procesů (zubní kaz, gingivitida, parodontitida) zpravidla nelze jmenovat jednoho původce, ale je třeba chápat celý proces jako **poruchu rovnováhy mezi nimi**

Jiné mikroby v ústech

- To, že se někdy naruší rovnováha mezi mikroby, které tvoří normální mikroflóru v ústní dutině, neznamená, že by se zde jako patogeny nemohly občas projevit i jiné mikroorganismy, zejména **kvasinky**. Mohou se podílet na plaku na zubních náhradách a mohou vytvářet orální kandidózu zvanou **soor**.
- Zvenčí se mohou dostávat do úst i **bakterie**, ale častěji je jako patogeny nalézáme v přilehlé dutině faryngeální. Významné mohou být například **zlaté stafylokoky**, **pyogenní streptokoky** či některé **hemofily**.

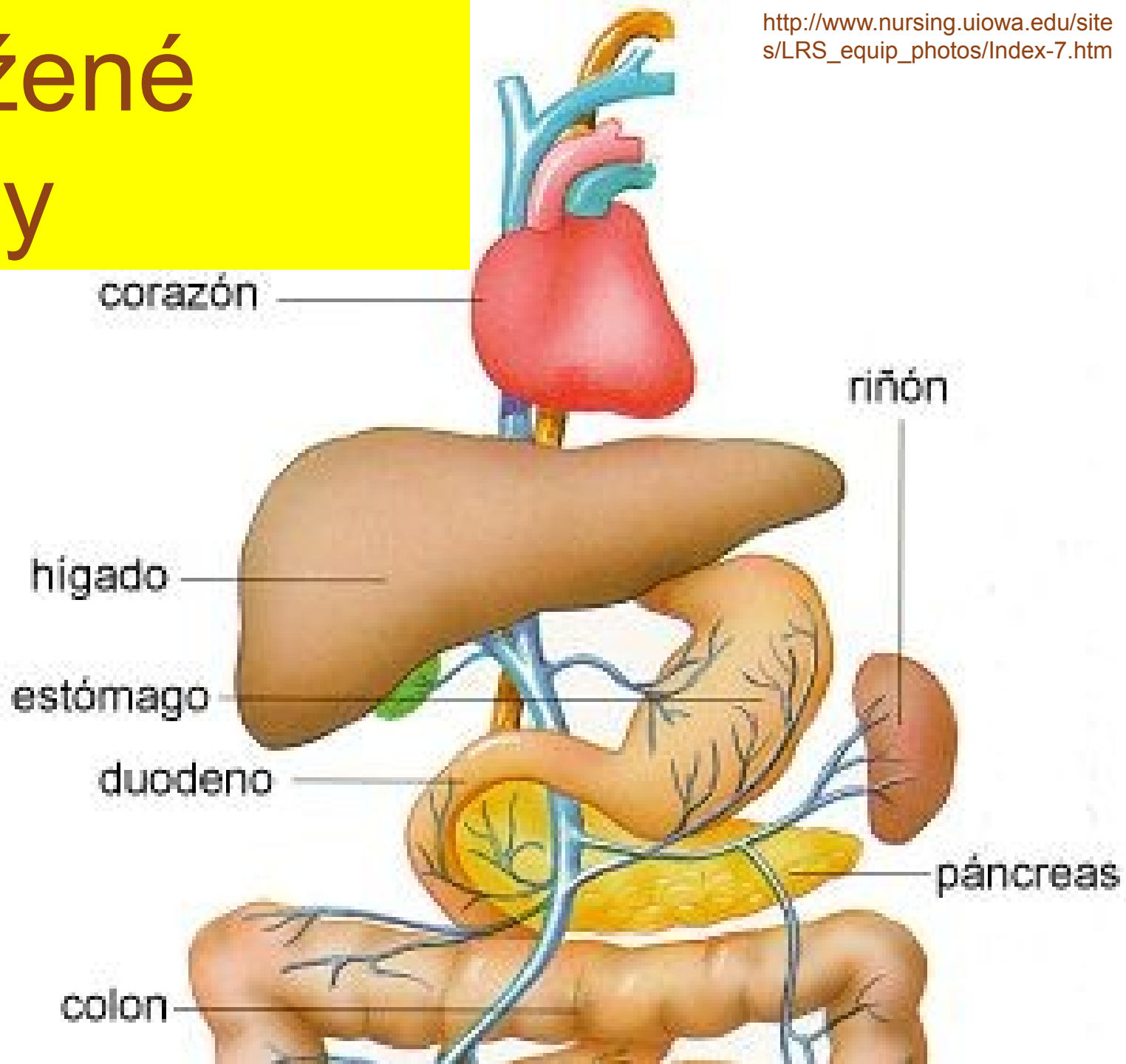
Hepatitidy

- Součástí dnešního praktika jsou také **hepatitidy**, které zubní lékaři mohou získat jako profesionální onemocnění
- Jde o **infekční záněty jater**, lidově zvané žloutenky. Je ovšem nutno odlišit žloutenku jako přenosné virové onemocnění a žloutenku jako příznak, který je přítomen nejen při hepatitidě, ale i např. při obstrukci žlučových cest kameny
- **Pacient** má horečky, trávicí potíže, může být přítomno zežloutnutí skléry či kůže, změna barvy moče a stolice atd. Hepatitidy B, C a D mohou přecházet do chronicity, a někdy i být prekancerózou

Přehled hepatitid

Virus	Skupina virů	Přenos
HAV	<i>Picornaviridae</i>	fekálně-orální
HBV	Zvláštní skupina DNA virů	sexuální, kreví
HCV (a HGV)	<i>Flaviviridae</i>	kreví
HDV	Delta agens – viroid	sexuální, kreví
HEV	Příbuzný kalicivirům	fekálně-orální

Postižené orgány



Úkol 1: Určení předložených patogenů

- **Gramovým barvením** rozlišíme kvasinky, grampozitivní a gramnegativní tyčinky i grampozitivní a gramnegativní koky
- Dále se můžeme pokusit provést **orientační určení těchto mikrobů** různými dříve probíranými testy (kataláza, hyaluronidáza, PYR test, satelitový fenoména podobně)
- Můžeme se také vyjádřit, **které další testy bychom potřebovali** k přesnějšímu určení těchto mikroorganismů

Upozornění (nechci strašit, ale...):



- Neznalost postupu Gramova barvení (a vysvětlení jeho principu) může být důvodem k vyhození dotyčného jedince od praktické zkoušky!
- Další podobné otázky:
 - základní kultivační půdy (KA, Endo, MH, NaCl)
 - oxidázová a katalázová reakce (provedení)
 - znalost, které běžné bakterie jsou G+ / G-

(Toto je obecný přehled, jednotliví asistenti mohou případně klást větší či menší důraz na různé další věci



Než přejdeme k úkolu 2: Co jsou to vlastně chromogenní půdy?

- **CHROMOGENNÍ** půdy obsahují látku, která je původně nebarevná (chromogen)
- Barevnost se objeví jen při specifické reakci (odštěpení substrátu)
- Půda může obsahovat více chromogenů s navázanými substráty specifickými pro různé bakterie nebo houby
- **FLUOROGENNÍ** půdy jsou principiálně podobné, ale s fluorescenčním barvivem

Úkol 2 – chromogenní půda při diagnostice kandid

- Používají se různé chromogenní půdy. Některé odliší pouze *Candida albicans* od ostatních, jiné rozliší vzájemně několik druhů kandid.
- Na půdě, kterou máme k dispozici, je **C. albicans zelenavá**, **C. tropicalis modrá**, **C. glabrata hladká růžová** a **C. krusei drsná růžová**.
- Pokud se některý kmen nepodaří určit chromogenní půdou, musíme použít jiný způsob, např. biochemické určení

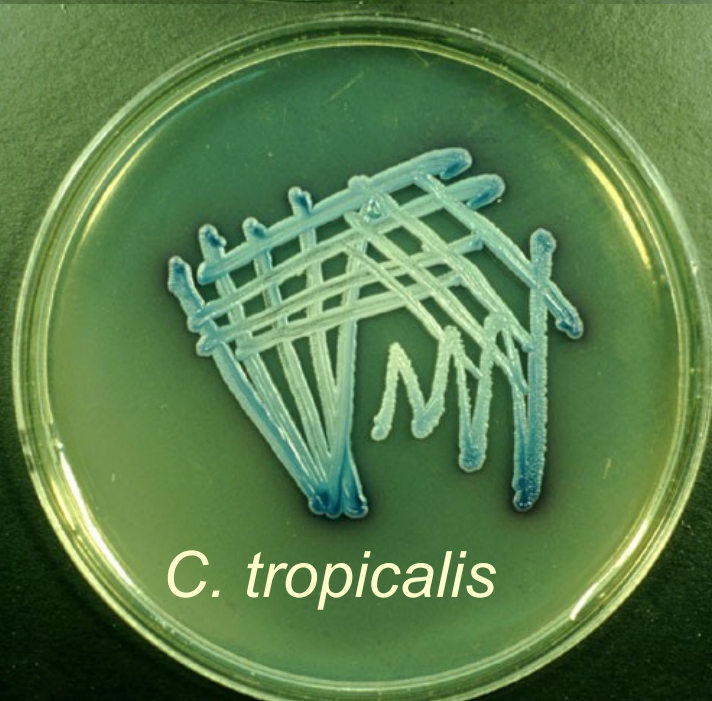
C. albicans



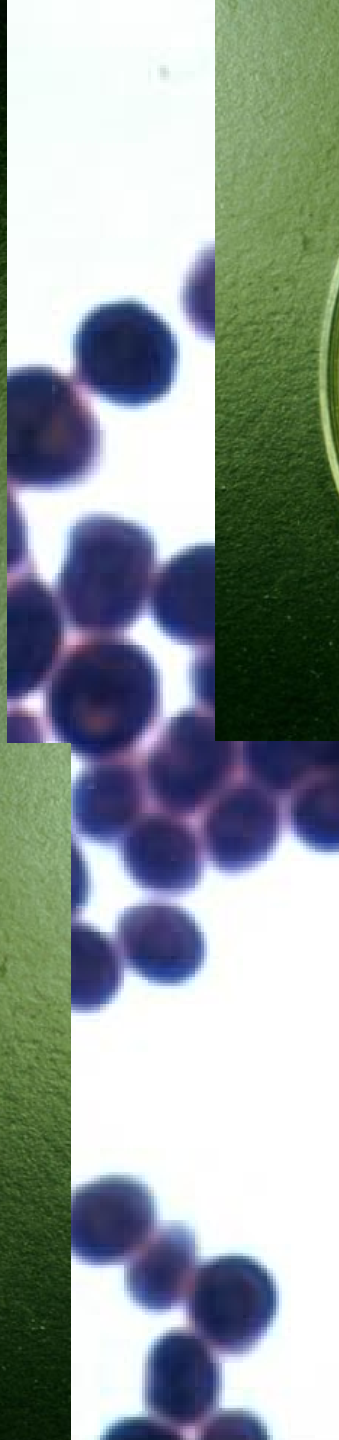
C. glabrata



C. tropicalis



C. krusei



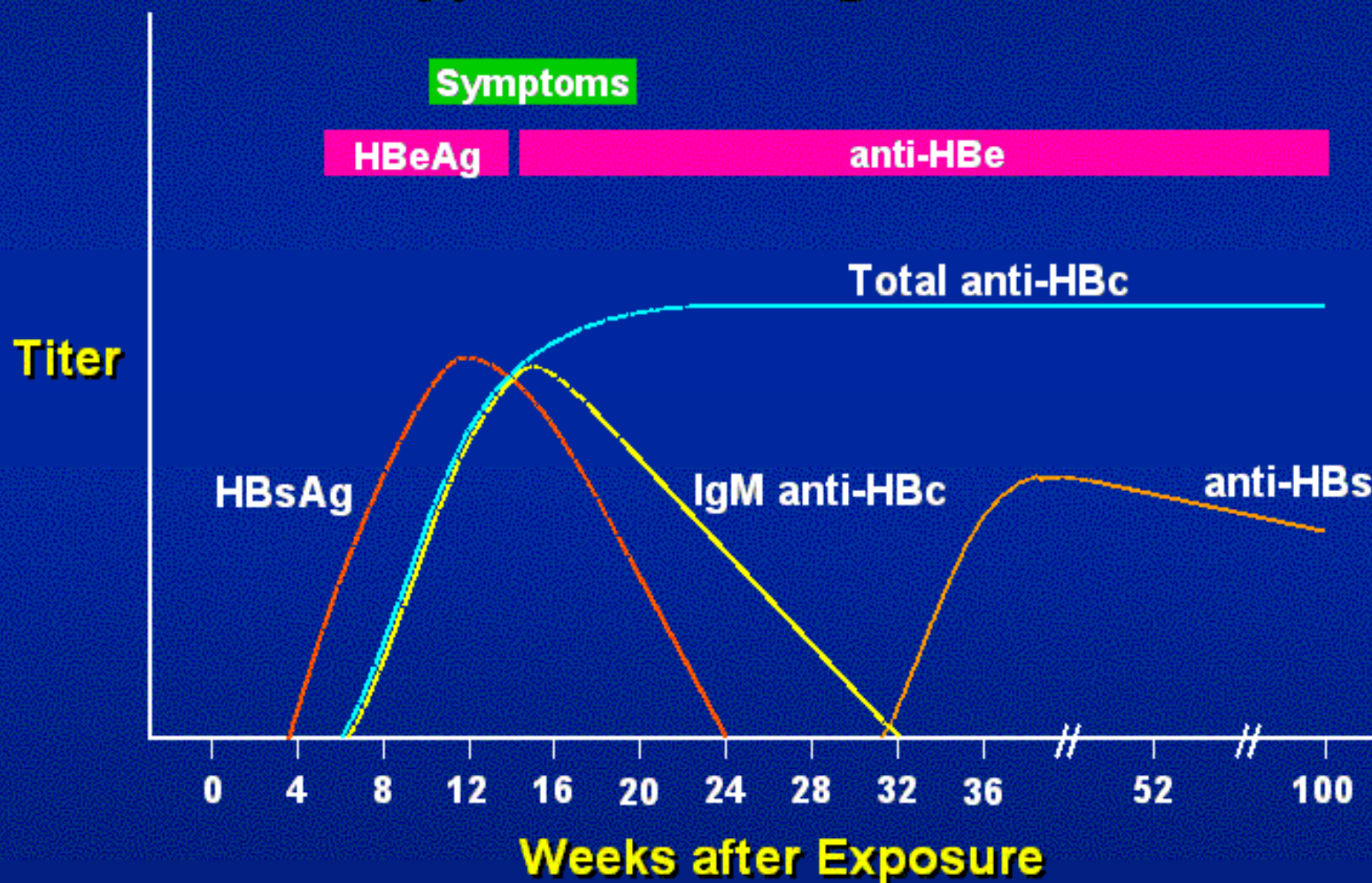
ELISA k průkazu hepatitid

- Hepatitida **může být profesionálním onemocněním u stomatologů**, proto se jí v tomto praktiku zabýváme. Zároveň jde o malou část praktika, které v jarním semestru měli studenti všeobecného, avšak nikoli zubního lékařství
- K průkazu hepatitid se používá zpravidla **ELISA, někdy také PCR**. Zvláštností je, že v séru nehledáme jen protilátky, ale i antigeny.
- U hepatitidy B jde o dva specifické antigeny a tři protilátky

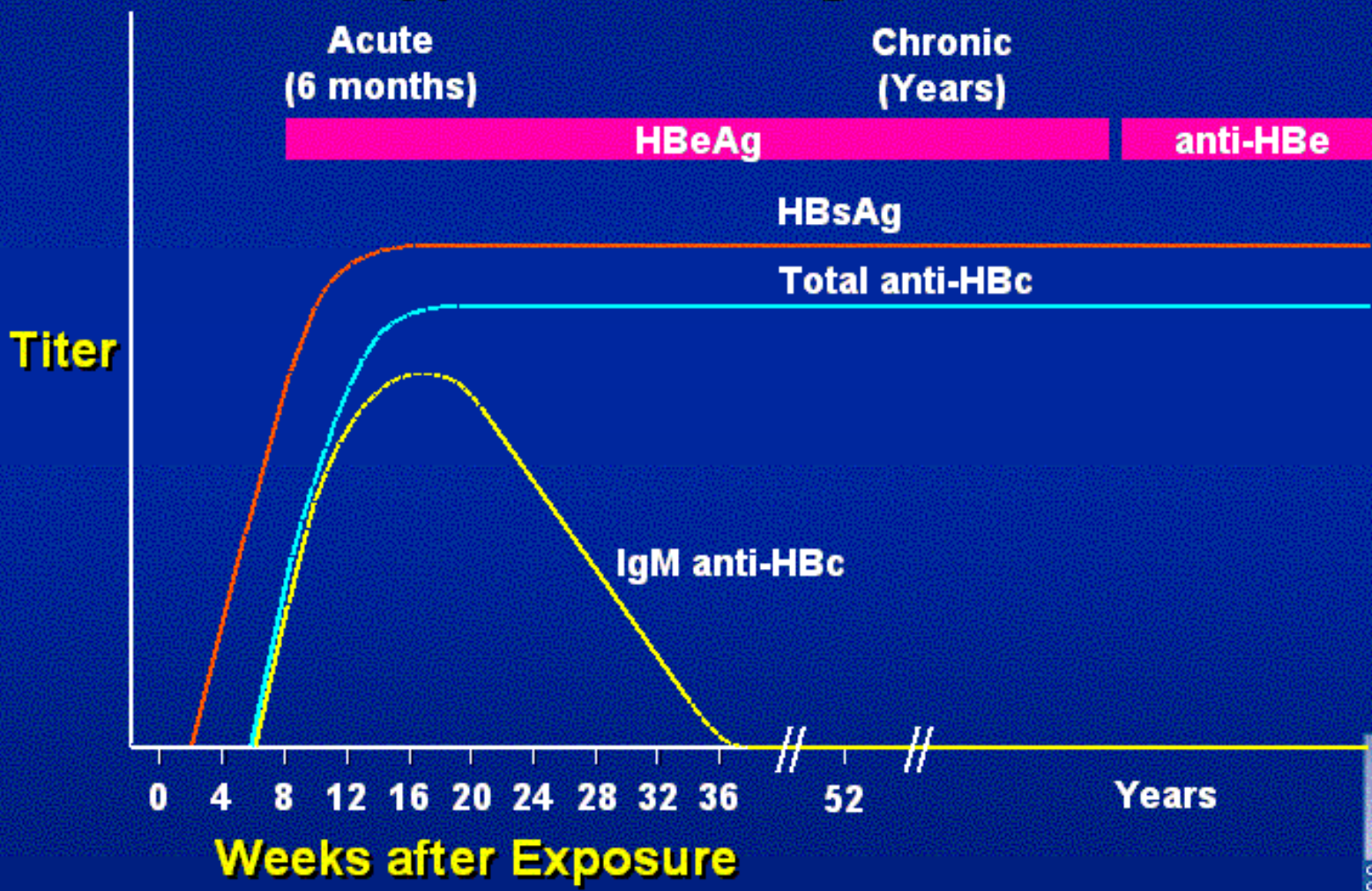
Diagnostika HBV

- HBV má **tři pro diagnostiku významné antigeny**. Jen dva z nich však nalézáme v séru: **HBsAg** a **HBeAg**.
- **HBsAg se tvoří v nadbytku**, takže je ho vždy v séru hodně, proto se hodí pro screening
- Protilátky naopak můžeme stanovovat proti všem třem z nich: **anti-HBs**, **anti-HBe** i **anti-HBc**.
- Diagnostiku případně doplní **PCR**, průkaz **jaterních enzymů** aj.
- Z kombinace vyšetření plyne interpretace

Acute Hepatitis B Virus Infection with Recovery Typical Serologic Course

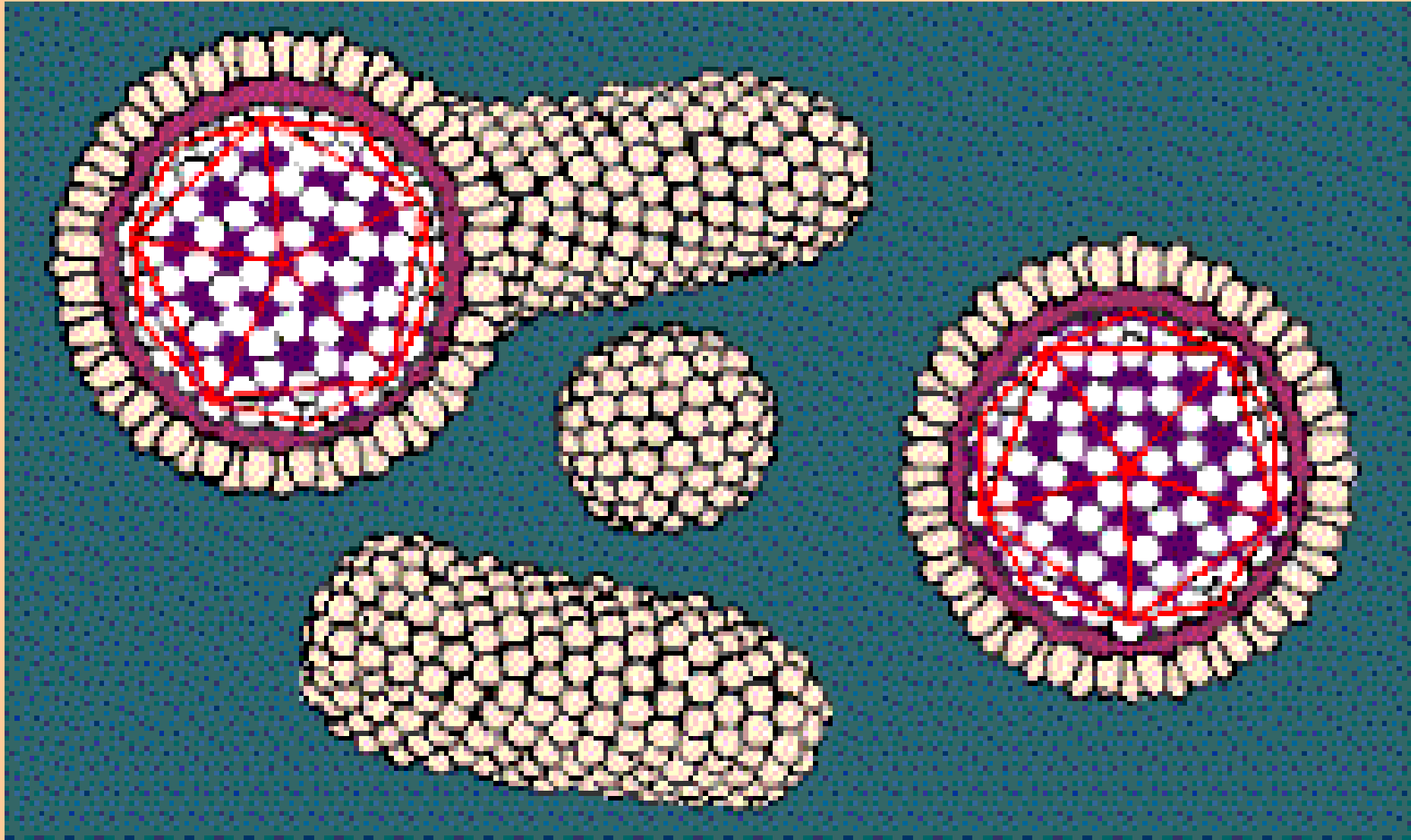


Progression to Chronic Hepatitis B Virus Infection Typical Serologic Course

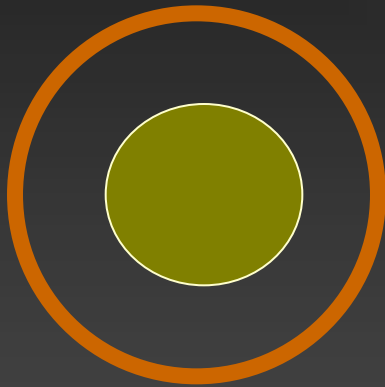


Virus hepatitis B

www.uct.ac.za/depts/mmi/stannard/hepb.html



Virus hepatitidy B



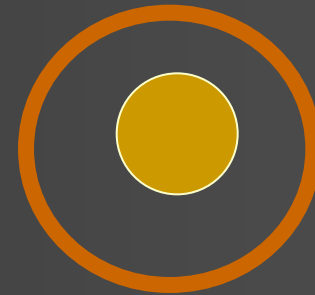
Kompletní
virion
(Daneho
tělísko)

42 nm



Pouhý
prázdný
HBsAg

22 nm



HBsAg,
uvnitř delta
agens
(VHD)

35 nm

Úkol 3: Stanovení markerů hepatitid

- 3a + b) Stanovení HBsAg a HBeAg
- 3c + d) Stanovení anti-HBs a anti-HBe
- **Výpočet cut off** (úkol 3a i úkol 3b): průměr C1 a D1.

Pozitivní je to, co je vyšší, než cut off + 10 %

Negativní je to, co je nižší než cut off – 10 %

Hraniční je jsou hodnoty cut off \pm 10 %

Úkol č. 4: Průkaz *Streptococcus mutans* v zubním plaku (1)

Použijeme test **Dentocult SM Strip Mutans**, který je určen ke zjištění přítomnosti *Streptococcus mutans*. Přítomnost a množství mikroorganismů se zjišťuje ve stimulované slině a plaku. **Reálně provedeme jen odečtení hotových testů**, seznámíme se ale i s pracovním postupem:

- 1. Příprava kultivačního média.** Asi 5 minut před odběrem vzorku vložíme do lahvičky s kultivačním médiem bacitracinový disk a jemně promícháme.

Úkol č. 4: Průkaz *S. mutans* v zubním plaku (2)

2. Odběr vzorku

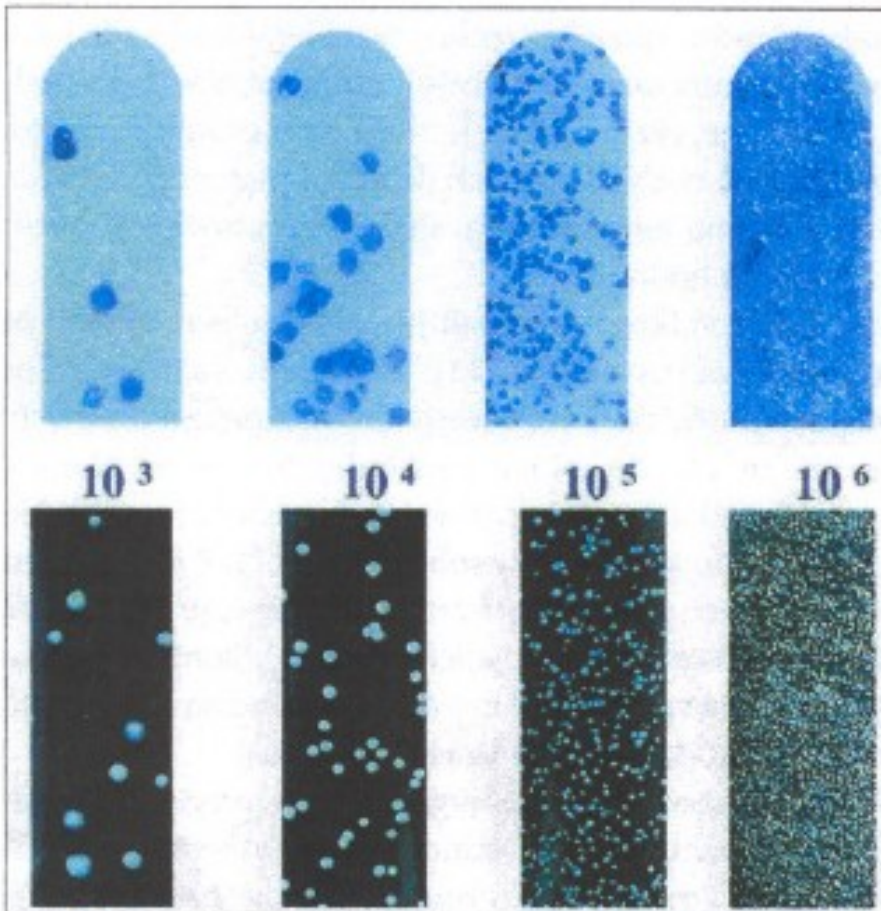
- a) **Stimulovaná slina.** Pacient žvýká po dobu 1 minuty parafinovou kuličku a poté vyplivne přebytek slin do sběrné nádobky. Testovací proužek (s kulatým koncem) se přitiskne na hřbet jazyka po dobu 10 s.
- b) **Zubní plak.** Plak odebíráme ze všech 4 kvadrantů z vybraného mezizubního prostoru). K odběru používáme sondu, mezizubní nit nebo tyčinku mikrobrush. Vzorek plaku rozetřeme na jednotlivá políčka na testovacím proužku s hranatým koncem.

Úkol č. 4: Průkaz *S. mutans* v zubním plaku (3)

- 3. Kultivace.** Spojené testovací proužky upevníme do víčka a vložíme do lahvičky se selektivním roztokem. Vzorky kultivujeme v kultivátoru 48 hodin při teplotě 37 °C.
- 4. Hodnocení.** *Streptococcus mutans* vytváří při kultivaci tmavě modré kolonie vyvýšené nad povrch testovacího proužku. Množství mikroorganismů odečítáme dle vzorníku na modelové tabulce. Za rizikové se považují hodnoty 10^5 a více bakterií na 1 ml sliny.

Odečítání Dentocultu

Obr. 1: Tabulky k odečítání kultivace *Streptococcus mutans* a *Lactobacillus acidophilus*.



Text i obrázky převzaty z publikace:

VYUŽITÍ MIKROBIÁLNÍCH TESTU
V PREVENCI ZUBNÍHO KAZU

Praktické sdelení

Hana Hecová, Vlasta Merglová, Jaroslava Stehlíková
Stomatologická klinika, Lékařská fakulta v Plzni,
Univerzita Karlova v Praze
a Fakultní nemocnice Plzeň

Další podobné dostupné testy

- **Dentocult LB.** Test je určen ke zjištění přítomnosti *Lactobacillus acidophilus*. Ke kultivaci se používá destička, která je po obou stranách potažena modifikovaným Rogosovým médiem.
- **Dentobuff Strip.** Test je určen ke stanovení pufrovací kapacity sliny. Testovací proužek se vloží do nádoby se stimulovanou slinou a po 1 minutě se odečítá. Žlutá barva znamená nízkou, zelená barva střední a modrá barva vysokou pufrovací schopnost sliny

Úkol 5 – nátěr mikroflóry dutiny ústní

- Na podložní sklo natřete **stěry z bukální sliznice nebo hřbetu jazyka**
- **Fixujte plamenem**, obarvěte dle Grama a pozorujte obvyklým způsobem, tj. imerzí
- Všimněte si přítomných **bakterií i dalších útvarů**
- Gramovo barvení **zachytí bakterie**, ale nezachytí sacharidové intercelulární hmoty. K tomu mohou sloužit jiná barvení, například barvení alciálnovou modří (příště)

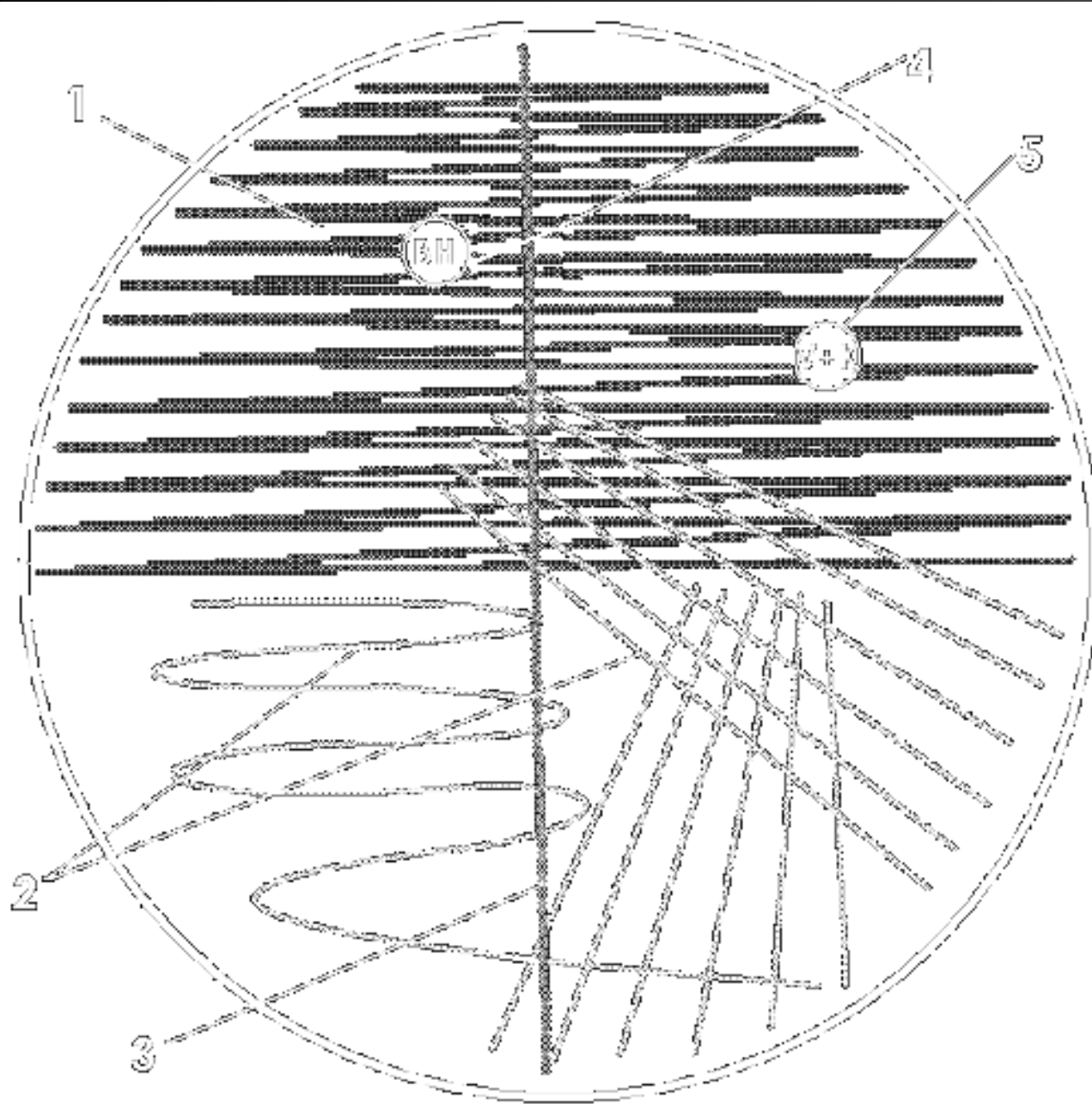
Úkol 6 – kultivace ústních mikrobů

- Zakreslete **výsledky kultivace** z ústní dutiny.
- Drobné, nažloutlé kolonie bez hemolýzy budou pravděpodobně **ústní neisserie**
- Také drobné, šedé, s viridací, budou **ústní streptokoky**
- **Mimo to můžeme hledat patogeny – vizte na dalším obrázku:**

Úkol 6 – hledání patogenů

- 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**

Úkol 6: Záchyt patogena v ústní dutině



1 očkováno tamponem

2 očkováno kličkou

3 stafylokoková čára

4 disk BH (bacitracin pro hemofily)

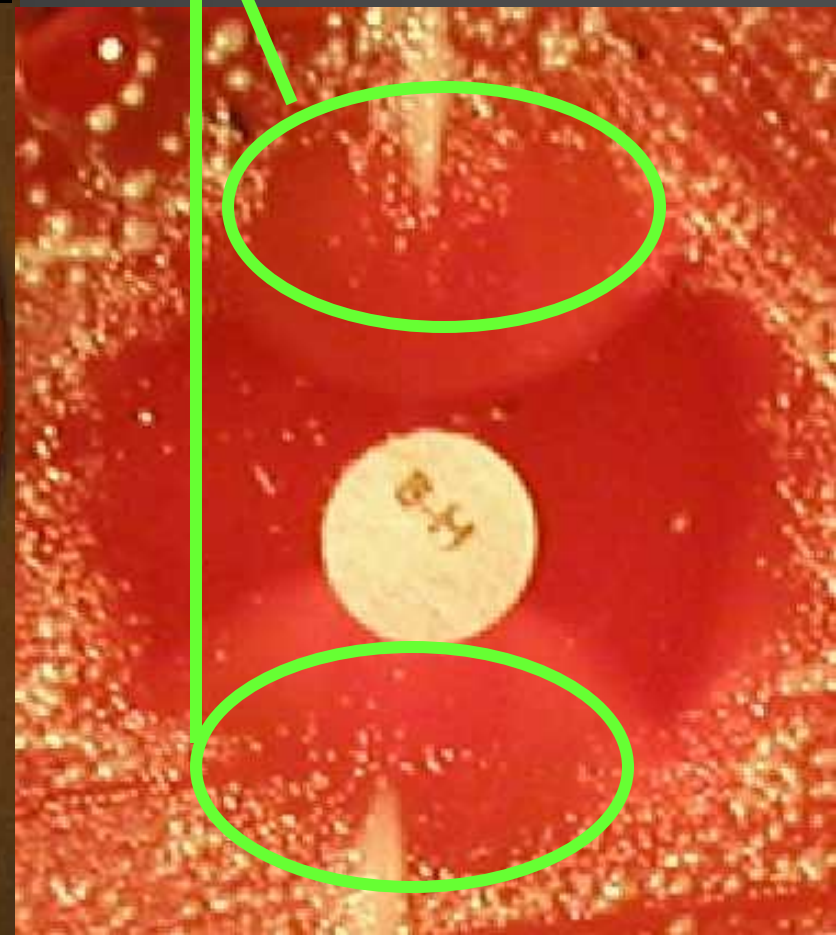
5 disk VK (vankomycin a kolistin pro meningokoky)

Na celé naočkované ploše pátráme po streptokokách (bezbarvé) a po stafylokokách (spíše bílé či zlatavé)

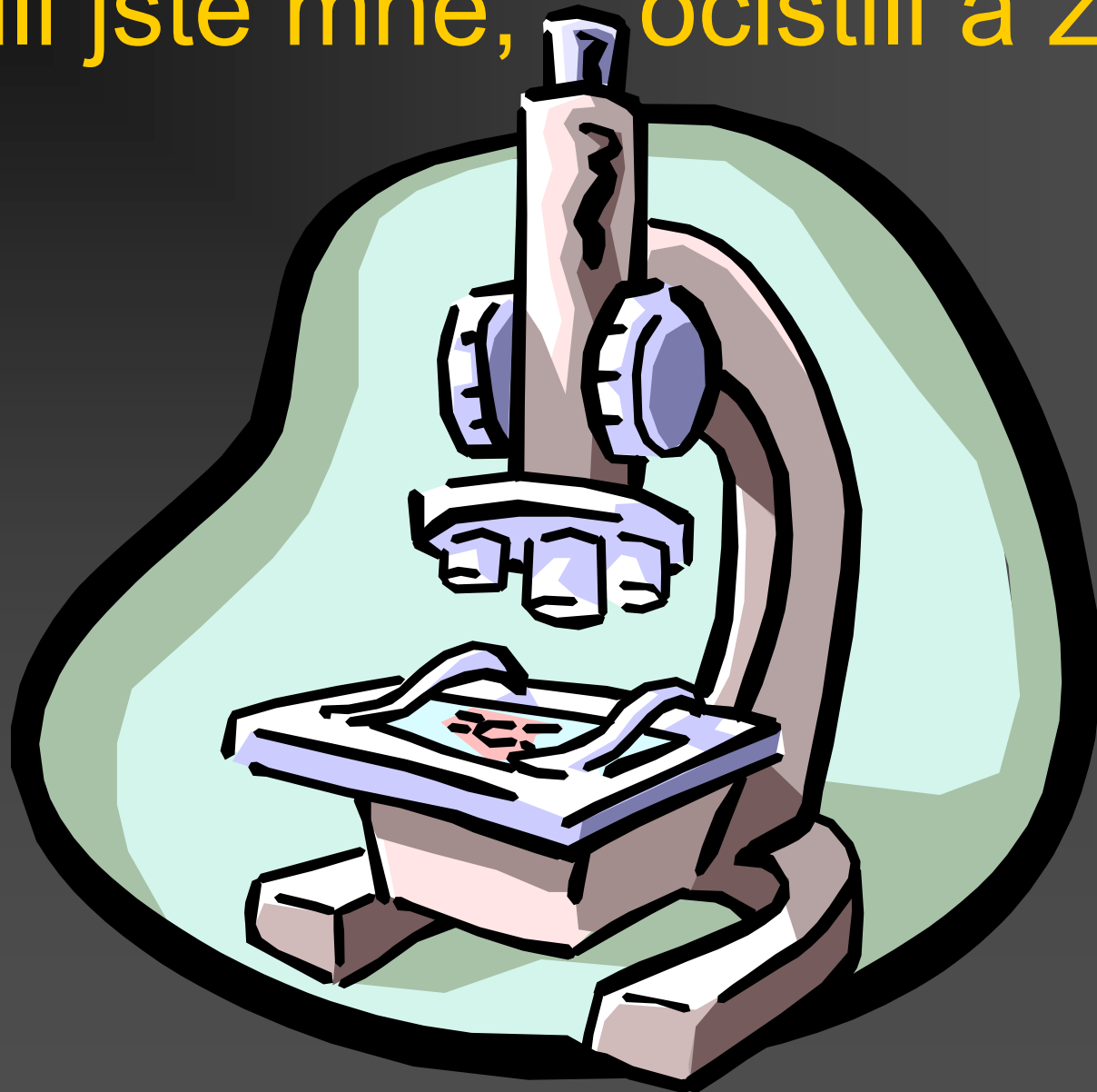
Kultivační výsledek výtěru z ústní dutiny s běžnou flórou

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



Už mne nebudete potřebovat!
Vypnuli jste mne, očistili a zakryli?



Než opustíte
praktikárnu...



...pláště laskavě nepohazujte po
praktikárně, nýbrž je pověste na
věšák tak, aby nespadly a
desinfikujte pracovní stoly!

Nashledanou při
dalším dílu!

