

# Repetitorium podzimního semestru praktických cvičení z lékařské mikrobiologie – diagnostika jednotlivých skupin mikrobů

## Sepsal: Ondřej Zahradníček.

Autorská poznámka: tento text navazuje na repetitorium jarního semestru a k jeho pochopení je nezbytně potřebná znalost metodologie, v jarním semestru probíraná; zde už metody nejsou vysvětlovány. Stejně jako jarní repetitorium text opět není kompletním přehledem toho, co se v podzimním semestru v praktiku probíralo, zejména v něm nenajdete popisy konkrétních úkolů (ovšem ne že by po vás někdo chtěl znát zpaměti, kdy se kam pipetuje kolik mililitrů).

Text chce být spíše teoretickým základem, který ovšem student bezpodmínečně musí doplnit svými poznámkami z jednotlivých praktických cvičení. Vřele také doporučuji nahlédnout na naše webové stránky [www.medmicro.info](http://www.medmicro.info).

Vzhledem k tomu, že část textu (především poslední dvě kapitoly) vznikla úpravou jiných textů, sloužících původně k jiným účelům, možná, že v něm najdete i informace nadbytečné, za což se omlouvám.

Text je autorským vlastnictvím Ondřeje Zahradníčka a je určen k výukovým účelům, jeho použití k jiným účelům je třeba konzultovat s autorem.

Kapitolu P09 recenzovala as. MUDr. Vladana Woznicová, PhD., kapitolu P08 MUDr. Jana Svobodová, kapitolu P11 MUDr. Filip Růžička; ostatní kapitoly recenzí neprošly.

## Použité zkratky:

ČA – čokoládový agar

EA – Endův agar

KA – krevní agar

MH – Müllerův – Hintonové agar

Další zkratky jsou vysvětleny přímo u jednotlivých kapitol

## P01 – Stafylokoky

### Úvod

Stafylokoky jsou vedle streptokoků a enterokoků klinicky nejvýznamnější grampozitivní koky. Všechny stafylokoky jsou potenciální, oportunní patogeny, ale:

### ***Staphylococcus aureus* („zlatý stafylokok“, dále STAU)**

- Je „častěji zlý, méně často hodný“.
- V malém množství může být u zdravých osob na kůži, případně v nosní dutině apod.
- Je ale původcem abscesů v kůži i jinde, infekcí HCD, sepsí, enterotoxikóz,

- Někdy také původcem vzácnějších infekcí (syndrom toxického šoku často v souvislosti s menstruačními tampony)
- Posledně jmenované případy se týkají kmenů produkujících specifické faktory virulence – takových je ovšem ze všech kmenů druhu *S. aureus* výrazná menšina

### **Koagulázanegativní stafylokoky (dále STKN)**

- Jsou „častěji hodné, méně často zlé“
- Normálně jsou součástí běžné flóry na kůži (včetně zevního zvukovodu, přední třetiny nosní dutiny, velkých stydkých pysků, zevní části rtu apod.)
- Patogenem se stávají méně často (močové infekce, katetrové sepse)
- Při nálezu v hemokultuře je potřeba prokázat, že nejde o kožní kontaminaci – za významný se považuje opakovaný nálezkem se stejnými vlastnostmi ve více hemokulturách, přičemž automat hlásí pozitivitu ve všech případech po zhruba stejném čase

Bystří studenti si povšimli, že pro jednoduchost zde nehovoříme o koagulázapozitivních stafylokocích jiných než STAU. Jejich praktický význam je minimální.

## **Diagnostika**

### **Mikroskopie**

- Grampozitivní koky
- Měly by být ve shlucích (stafylé = hrozen)
- Avšak zejména při barvení kolonií narostlých na pevných půdách to není moc vidět
- U STAU jsou zpravidla shluky větší než u STKN.

### **Kultivace**

#### **KREVNÍ AGAR**

- Ploché, máslovité kolonie, bílé nebo (hlavně u STAU) nažloutlé
- To je rozdíl oproti streptokokům a enterokokům, které jsou „bezbarvější“
- Nikdy viridace, může být částečná či úplná hemolýza, častěji u STAU

#### **PŮDA S 10 % NaCl**

- Tato půda je pro stafylokoky selektivní
- Je to logické, vždyť si libují v kůži, často zpcené
- Pokud v laboratoři uvidíte půdu s nápisem „NaCl“ bez bližšího údaje o koncentraci, vězte, že jde právě o (nejběžnějších) 10 %

#### **MH**

- Stafylokoky jsou schopny růst na MH.
- To mají společné s enterokoky, naopak streptokoky na MH bez krve zpravidla nerostou (ovšem podstatné je to „zpravidla“, nelze to použít pro diferenciaci!)

### **Biochemické a podobné identifikační metody**

- Všechny kataláza pozitivní, oxidáza negativní\*
- Průkaz volné plasmakoagulázy („plasma ve zkumavce“): STAU pozitivní, STKN negativní
- Průkaz clumping faktoru (= vázané plasmakoagulázy, „plasma na sklíčku“), STAU pozitivní, STKN negativní
- Průkaz hyaluronidázy, STAU pozitivní, STKN negativní

- Vzájemné rozlišení STKN testem v panelech
- v Česku se používá STAPHYtest (Pliva – Lachema).

\*negativní oxidázou se stafylokoky liší od trochu podobných mikrokoků, kocurií a kytokoků – ty se vzácně mohou vykultivovat, zpravidla jako kontaminace z prostředí, jejich škodlivost je minimální).

## Antigenní analýza

Moderní latexové testovací soupravy opět k odlišení STAU od ostatních. Prokazují clumping faktor a zároveň další antigenní determinanty STAU

## Testování citlivosti

- běžným difusním diskovým testem, mikrodilučním testem či E-testem.
- Všimneme si, že STAU je zpravidla citlivější než STKN (to „horší patogeny“ zpravidla bývají).

## Diferenciálně diagnostický algoritmus

### KROK 1: NEZNÁMÝ KMEN

- obarvíme Gramem, abychom vyloučili jiné bakterie než G+ koky

### KROK 2: G+ KOKY

- V praxi potřebujeme odlišit stafylokoky od streptokoků a enterokoků
  - Katalázový test: stafylokoky +, streptokoky -, enterokoky –
  - Nebo růst na NaCl (vhodné i při izolaci ze směsi). Rostou pouze stafylokoky
- Enterokoky také snášejí vyšší koncentraci NaCl, leč jen do 6,5 %

### KROK 3: STAFYLOKOKY

rozlišíme na STAU a STKN

- Orientačně využijeme toho, že STAU mívá nažloutlé a hemolytické kolonie a v mikroskopii větší shluky.
- Pro spolehlivé rozlišení ale tohle všechno nestačí
- Použijeme proto průkaz volné plasmakoagulázy, clumping faktoru (dnes místo nich zpravidla komerční testy antigenní analýzy), případně hyaluronidázy, štěpení manitu či DNAsy.

### KROK 4: VZÁJEMNÉ ROZLIŠENÍ STKN

V praxi se to většinou nedělá, výsledek „STKN“ je považován za dostačující.

- Vzájemně rozlišíme biochemickým testem v panelu (STAPHYtest)

## Popis speciálních testů

Neuvádíme zde popis diagnostických postupů obecně známých, jako je Gramovo barvení, ba ani STAPHYtest, který je úplně stejný jako všechny ostatní biochemické testy v panelech

### Volná plasmakoaguláza

Prokazuje se koagulací králičí plasmy. Nevýhodou je, že test se dá orientačně odečíst až po několika hodinách, definitivně druhý den. Pozitivní (STAU) je koagulace, tj. tekutina se změní v „želé“.

### Clumping faktor (vázaná plasmakoaguláza)

se prokazuje pomocí sklíčkové aglutinace králičí plasmy. Kmen se smíchá s kapkou plasmy, v pozitivním případě (STAU) vzniknou hrudky.

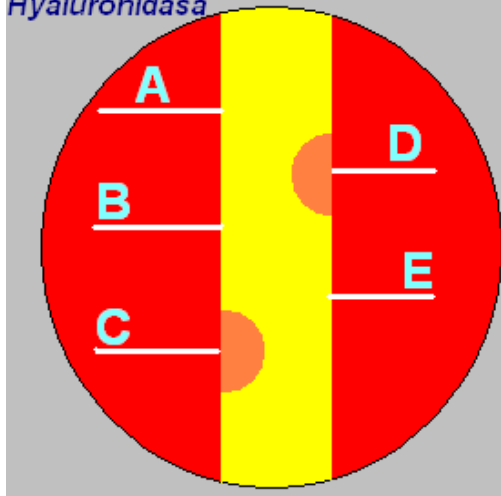
## Dnešní rozlišovací testy (typu Pastorex, Stafaurex)

jsou vlastně latexovou aglutinací na katronové kartičce. Test je spolehlivější než původní clumping faktor, ale i než průkaz volné plasmakoagulázy – soupravy totiž využívají kombinace různých antigenů

## Hyaluronidáza (test dekapsulace)

levný a elegantní test. Potřebujeme opouzdřený kmen, např. *Streptococcus equi*.

Hyaluronidasa



Žlutě "soplovitý" nárůst,  
oranžově suché kolonie.

Bíle testované kmeny  
stafylokoků.

Hodnocení:

Kmeny C, D patří k druhu  
*Staphylococcus aureus*

Kmeny A, B, E patří mezi  
koagulázanegativní  
stafylokoky

Naočkujeme jej na agar jako pás. K němu kolmo testované kmeny. Kmen normálně vypadá jako sopel. V případě positivity v místě, kde přiléhá kmen stafylokoků, vidíme půlkruhovitou zónu, kde kmen sice roste, ale ztrácí „soplovitost“.

## Použití stafylokoků v diagnostice jiných mikrobů

- 1) V diagnostice hemofilů se STAU využívá při satelitovém fenoménu – viz dále
- 2) V diagnostice streptokoků se využívá STAU při CAMP testu. Pozor! STAU může produkovat několik typů hemolyzinů, nejběžnější alfa, beta, delta. Pro CAMP test potřebujeme kmen, který produkuje beta hemolyzin, ale ne alfa a ne beta. Proto také nelze CAMP test použít zpětně k diagnostice stafylokoků: jen málo „divokých“ kmenů STAU jsou čistí beta-producenti.

## Píseň

1. Kdo líbá dívku na ouška a na bělostnou šíji  
ten líbá vlastně stafouška jenž do kůže se vpíjí  
Vždyť každá dívka na oušku krom něžné dívčí vůně  
má spoustu malých stafoušků at' zdravá je či stůně
2. Ach dívka s vůní nad růže pojd' se mnou hned a začni  
pro stafoušky z té tvé kůže chystat test kultivační  
Pojd' otestujem stafoušky na jejich hemolýzu  
a vřadíme je do zkoušky zda umí tvorbu slizu
3. Kdo šeptá něžná slovíčka své divukrásné dámě  
a pak ji líbá na víčka a nabízí jí rámě  
At' ví, když líbá bez roušky a když se mají rádi,  
že tak i její stafoušky se s jeho skamarádí

## P02 – Streptokoky

### Úvod

Mezi streptokoky je nejvýraznějším patogenem *Streptococcus pyogenes*. Avšak i ten může být nalézán v krku zdravých osob. Ostatní streptokoky se vyznačují různou mírou patogenity.

#### ***Streptococcus pyogenes* (jediný zástupce sk. A dle Lancefieldové)**

- Způsobuje angínu, spálu, spálovou angínu, růži, flegmóny
- V případě napadení fágem ještě závažnější stavy, např. nekrotizující fasciitidy
- Protilátky mohou tvořit imunokomplexy a způsobovat autoimunitní onemocnění – revmatickou horečku a akutní glomerulonefritidu

#### ***Streptococcus agalactiae* (jediný zástupce sk. B u člověka)**

- Způsobuje urogenitální infekce
- Přítomen v pochvách i zdravých žen, i tehdy ale nebezpečí – pro případného novorozence
- U jiných živočichů jiné typy infekcí (u krav záněty mléčné žlázy, odtud název!)

#### **Streptokoky „non-A-non-B“ (hemolytické streptokoky jiných skupin)**

- Poměrně časté nálezy ve faryngu, potenciální patogeny
- Občas i jinde, např. v ranách

#### ***Streptococcus pneumoniae* (pneumokok)**

- U zdravých osob nalézán ve faryngu; není-li ho moc, je to v pořádku
- Původce pneumonií, sinusitis, zánětů středního ucha, meningitid apod.
- Významný u splenektomovaných

#### **Ústní streptokoky (streptokoky s viridací jiné než pneumokok)**

- Vedle ústních neisserií hlavní součást běžné flóry v ústech a faryngu
- Podíl na zubním kazu (spíše ve smyslu dysbalance běžné flóry)
- Při průniku do krevního řečiště u zdravých nic neudělá, ale u predisponovaných osob (revmatická horečka, cévní implantáty) mohou vytvářet vegetace (biofilm) – endocarditis lenta (sepsis lenta)

#### **Nehemolytické streptokoky**

- Občas nalézány v ranách či jinde, malý význam

Dělení dle Lancefieldové se vlastně týká všech streptokoků, ale v praxi se uplatňuje jen u hemolytických. Beztak velká část viridujících žádný antigen dle Lancefieldové nevládní

## Diagnostika

### Mikroskopie

- Grampozitivní koky
- Název praví, že jsou v řetězcích. Avšak některé jsou ve dvojicích (pneumokok) a u nátěrů z pevných půd opět na uspořádání nelze spoléhat
- Dlouhé řetězce tvoří zejména *S. pyogenes*

## Kultivace

### KREVNÍ AGAR

- Téměř bezbarvé kolonie, většinou drobnější než mají enterokoky a stafylokoky. Větší kolonie (na úrovni enterokoků a stafylokoků) má jen *S. agalactiae*.
- Významným diagnostickým znakem hemolýza × viridace × žádná změna
- Hemolytické jsou *S. pyogenes* (SRPY), *S. agalactiae* (SRAG) a non-A-non-B (SRNO), viridující je *S. pneumoniae* (SRPN) a ústní streptokoky (SRUS)
- *S. pyogenes* má natolik výraznou hemolýzu, že díky tomu nehrozí záměna s enterokoky; to je významné, protože má jako jediný pozitivní PYR test

### PŮDA S AMIKACINEM

- Tato půda je selektivní pro streptokoky a enterokoky
- Stafylokoky a gramnegativní bakterie nerostou

### MH

- Streptokoky zpravidla nejsou schopny růst na MH.
- Citlivost na antibiotika se zjišťuje pomocí MH s krví, anebo přímo KA.

## Biochemické a podobné identifikační metody

- Všechny kataláza a oxidáza negativní
- PYR test negativní s výjimkou *S. pyogenes*
- V některých případech se využívá hemolytických interakcí a citlivosti na antibiotika (viz dále)
- Biochemický test v panelu (STREPTOtest Pliva – Lachema) se využívá prakticky jen k rozlišení viridujících streptokoků, protože ostatní streptokoky jsou biochemicky málo aktivní

## Antigenní analýza

Moderní latexové testovací soupravy využívají antigenní soustavu podle Lancefieldové. Nedají se použít u viridujících streptokoků, které tyto antigenní determinanty nemají. Nejčastěji se používá k vzájemnému rozlišení uvnitř skupiny non-A-non-B streptokoků.

## Testování citlivosti

- Běžným difusním diskovým testem či E-testem na vhodných půdách; nedá se provádět vyšetření MIC mikrodilučním testem
- Zejména u *S. pyogenes* je základním lékem volby klasický penicilin

## Diferenciálně diagnostický algoritmus

### KROK 1: NEZNÁMÝ KMEN

- obarvíme Gramem, abychom vyloučili jiné bakterie než G+ koky

### KROK 2: G+ KOKY

- V praxi potřebujeme odlišit streptokoky od stafylokoků a enterokoků
- Katalázový test: streptokoky -, stafylokoky +, ovšem enterokoky také –
- Žluč-eskulinová půda nebo Slanetz-Bartleyho agar (enterokoky rostou v koloniích specifické barvy, stafylokoky ani streptokoky nerostou)
- Alternativou je PYR test: enterokoky +, streptokoky – s výjimkou *S. pyogenes*

### KROK 3: STREPTOKOKY

Rozlišíme dle hemolýzy

- Streptokoky s úplnou či částečnou hemolýzou – viz krok 4A
- Streptokoky s viridací – viz krok 4B
- Streptokoky bez hemolýzy zpravidla dále neidentifikujeme

#### **KROK 4A: VZÁJEMNÉ ROZLIŠENÍ HEMOLYTICKÝCH STREPTOKOKŮ**

- Provedeme PYR test či bacitracinový test (SRPY +, SRAG -, SRNO -)
- Provedeme CAMP test (SRAG +, SRPY -, SRNO -)

#### **KROK 5A: VZÁJEMNÉ ROZLIŠENÍ NON-A-NON-B**

- V případě potřeby rozlišíme latexovou aglutinací
- V praxi se to většinou nedělá, výsledek „STKN“ je považován za dostačující.

#### **KROK 4B: VZÁJEMNÉ ROZLIŠENÍ VIRIDUJÍCÍCH STREPTOKOKŮ**

- Provedeme optochinový test (SRPN +, SRUS -)
- Alternativou je test „rozpuštění“ kolonie v práškové žluči a test patogenity pro myš.
- Orientačně lze také použít vzhled kolonií (u SRPN ploché, penízkovité či miskovité, anebo u opouzdřených kmenů mukózní kolonie) a mikroskopii (u SRPN charakteristické dvojice protáhlých koků kopíčkovitého – lancetovitého – tvaru)

#### **KROK 5B: VZÁJEMNÉ ROZLIŠENÍ ÚSTNÍCH STREPTOKOKŮ**

- Vzájemně rozlišíme biochemickým testem v panelu (STREPTOtest)
- V praxi se to většinou nedělá, výsledek „ústní streptokok“ je považován za dostačující.

## **Popis speciálních testů**

### **Bacitracinový test a optochinový test**

Je to prachspřstý difusní diskový test citlivosti, jen s tím, že antibiotika bacitracin a optochin se dnes léčebně zpravidla nevyužívají (bacitracin jen v kombinaci s neomycinem = framykoin). Je ovšem třeba zdůraznit, že i zde je nutno použít půdu s krví, jinak by streptokoky nevyrostly.

U bacitracinového testu se využívá primární citlivosti SRPY na bacitracin. Test se v současnosti považuje za nespolehlivý a proto ho vytlačil PYR test

U optochinového testu se využívá primární citlivosti SRPN na optochin. Test se využívá, protože nic lepšího nemáme; o jeho spolehlivosti jsou ovšem také pochyby.

### **CAMP test**

Nemá nic společného s cyklickým adenosinmonofosfátem, proto se také píše CAMP a ne cAMP. Jde o zkratku jmen objevitelů (Christie – Atkinsen – Munch – Petersenová). Je příkladem takzvaných hemolytických interakcí.

#### **OBECNÝ PRINCIP HEMOLYTICKÝCH INTERAKCÍ**

Jde o to, že dvě bakterie produkují hemolyziny, které mají částečný efekt na krvinky; pokud je přiočkujeme k sobě (například naočkujeme jednu jako čáru a druhou jako jednu či dvě čáry kolmé k první čáře), mohou nastat různé efekty. Synergismus znamená, že se hemolyziny vzájemně potencují, v řadě případů ovšem jen tehdy, dostanou-li se k membráně krvinky ve správném pořadí, což ovlivňuje tvar zóny synergismu. Antagonismus naopak znamená, že celkový hemolytický efekt je menší než efekt samotného jednoho z hemolyzinů.

Kromě CAMP testu se hemolytické interakce využívají také v diagnostice korynebakterií, listerií, arkanobakterií a dalších.

#### **VLASTNÍ PRINCIP CAMP TESTU**



Jde o synergismus mezi beta hemolyzinem STAU a hemolyzinem SRAG. V praxi se používá laboratorní kmen STAU, který je ověřeným producentem beta hemolyzinu prakticky bez produkce alfa a delta hemolyzinu. Takový kmen má jen částečnou hemolýzu, stejně jako *S. agalactiae*.

Na misku tedy naočkujeme čáru laboratorního kmene STAU a kolmo k ní čáru testovaného kmene, kterou přerušíme v místě křížení, abychom nekontaminovali kličku stafylokokem. Necháme inkubovat v termostatu. Druhý den v případě positivity vidíme zónu úplné hemolýzy. Poetické duše vidí tvar motýlích křídel, kdežto odporní skeptici pouze dva trojúhelníky ☺.

CAMP test se používá pouze v diagnostice streptokoků, nikoli v diagnostice stafylokoků, vysvětlení je v předchozí kapitole.

## Latexové aglutinace

Jsou úplně stejně jako obdobné testy u stafylokoků, neisserií či hemofilů.

## ASLO

Jde o neutralizační průkaz protilátek. Nemá součásti průkazu streptokoka, má význam výhradně při sledování pozdních následků. Bližší vysvětlení viz jarní semestr

## Použití streptokoků v diagnostice jiných mikrobů

V diagnostice stafylokoků se používá *Streptococcus equi*. Je to zvířecí, pro člověka téměř nepatogenní druh. Studenty, kteří si ho budou plést s *Rhodococcus equi*, budeme tahat za uši.

## Píseň – „Půda s amikacinem“

Zhnisanou má ránu Dáša  
A je vážně na mašli  
/:Pod kobercem proteáša  
beťáka jí nenašli:/

Pak udělal tóčo Lacin  
Za pomocí zeťáka  
Vyzkoušeli amikacin  
našli toho beťáka

Není to zas tak moc peněz  
Tak nebudíme lenoši  
Najde se tam pyogenes  
zvládneme ho penoši

## P03A – Enterokoky

V praktiku P3 došlo ke „sňatku z rozumu“ dvou vcelku nesouvisejících témat: enterokoků coby dokončení G+ koků, a pak celých G+ tyčinek. Zde je však z praktických důvodů uvádíme zvlášť.

## Úvod

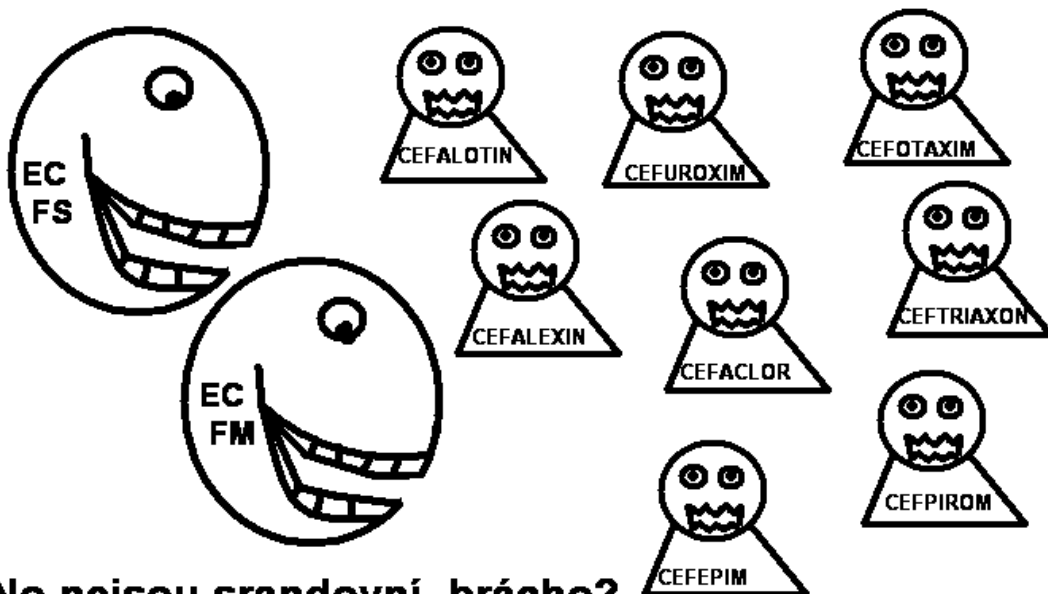
I průměrně inteligentní studenti v názvu enterokoků slyší řecké „enteron“ čili střevo. Tam se opravdu vyskytují jako součást běžné flóry. Pokud však enterokoka život ve



střevě omrzí, opustí své rodné střevo a vydá se „na návštěvu“ do sousedních otvorů ☺. Enterokok je tedy poměrně běžným urogenitálním patogenem.

*E. faecalis* (ECFS) je o něco více patogenem, *E. faecium* (ECFM) zase o něco více běžnou flórou, ale rozdíl mezi nimi není velký. Kromě nich existuje spousta dalších, méně důležitých. Moravské patrioty jistě potěší existence *E. moraviensis*.

Enterokoky jsou rezistentnější než streptokoky nebo stafylokoky. Všechny jsou primárně rezistentní ke všem cefalosporinům, linkosamidům, málo účinné jsou i makrolidy a nižší koncentrace aminoglykosidů. ECFM je ještě rezistentnější (např. je primárně rezistentnější k ampicilinu).



**No nejsou srandovní, brácho?**

## Diagnostika

### Mikroskopie

- Grampozitivní koky
- Zpravidla v krátkých řetězcích, nelze na to spoléhat

### Kultivace

#### KREVNÍ AGAR

- Kolonie šedo-bezbarvé, ale větší než u streptokoků kromě *S. agalactiae*, který má kolonie hodně podobné
- Na rozdíl od streptokoků není u enterokoků běžná hemolýza, ale není ani vyloučena. Častější je viridace, zejména u ECFM.

#### KREVNÍ AGAR S AMIKACINEM

- Tato půda je selektivní pro streptokoky a enterokoky

#### ŽLUČESKULINOVÝ AGAR (ŽE) A SLANETZ-BARTELYHO AGAR (SB)

Jde o půdy využívané k diagnostice enterokoků. Jsou selektivně diagnostické. Na první z nich rostou enterokoky v černých koloniích, na Slanetz-Bartleyho agaru v hnědo-rezavých. Obě půdy jsou selektivně diagnostické – nejenže na nich enterokoky vypadají

typicky, ale také by na těch půdách nemělo (skoro) nic jiného růst; výjimkou jsou grampozitivní tyčinky – listerie.

## **MH**

- Enterokoky jsou schopny růst na MH.

## **Biochemické a podobné identifikační metody**

- Všechny kataláza a oxidáza negativní
- Arabinóza (štěpení): ECFM +, ECFS –  
*(pozor, ve „Vyšetřovacích metodách“ je to špatně, správně je to tady!)*
- Pokud chceme odhalit i méně běžné enterokoky, použijeme biochemický test v panelu, například ENCOCCUStest.

## **Testování citlivosti**

- Běžným difusním diskovým testem, mikrodilučním testem či E-testem.
- Je-li kmen citlivý na ampicilin a zároveň byl určen jako ECFM, je někde chyba.

## **Diferenciálně diagnostický algoritmus**

### **KROK 1: NEZNÁMÝ KMEN**

- obarvíme Gramem, abychom vyloučili jiné bakterie než G+ koky

### **KROK 2: G+ KOKY**

- V praxi potřebujeme odlišit enterokoky od streptokoků a stafylokoků
- Katalázový test: stafylokoky +, streptokoky -, enterokoky –
- ŽE nebo SB (enterokoky rostou v typických koloniích), anebo PYR test (neodliší stafylokoky, z nichž mnohé jsou také PYR +, ale ze streptokoků je PYR + pouze *S. pyogenes* a ten má výrazně odlišnou morfolologii kolonií)

Říkáte si možná, proč k odlišení streptokoků nepoužijeme růst na MH. Je pravda, že streptokoky na MH většinou nerostou, na rozdíl od streptokoků. Některé streptokoky ale mohou na MH špatně sice, ale přesto růst, takže k diagnostice se růst na MH nehodí.

### **KROK 3: ENTEROKOKY**

rozlišíme dva nejběžnější druhy, v běžné praxi neuvažujeme o ostatních

- Využijeme arabinózový test.

### **KROK 4: PŘESNĚJŠÍ ROZLIŠENÍ ENTEROKOKŮ**

Protože podíl jiných enterokoků než je ECFS a ECFM je zanedbatelný, zpravidla se spokojíme s arabinózovým testem. Pokud ale chceme mít jistotu, musíme použít kombinaci více reakcí

- Enterokoky rozlišíme biochemickým testem v panelu (ENCOCCUStest, Pliva – Lachema)

## **Popis speciálních testů**

### **Arabinóza**

Zkumavka obsahuje arabinózu a indikátor. Původní barva zkumavky je zelená. Je-li arabinóza štěpena (ECFM), zkumavka zežloutne. Pokud štěpena není (ECFS), zůstane zelená.

## P03B – Grampozitivní tyčinky

### Úvod

Jejich význam je daleko menší, než je tomu v případě grampozitivních koků. Nesmíme je ale podcenit.

#### ***Listeria monocytogenes* (a případně další zástupci listerií)**

- Často bezpříznakové infekce, nebezpečné u těhotných
- Významná svou schopností přežívat při nízkých teplotách a vysokých koncentracích soli – proto se také vyskytuje např. v sýrech

„Hysterie kolem listerie“ bývají často na pořadu dne v západoevropských zemích. Hrozba listeriózy bývá uměle zveličována, aby se zdůvodnila zákazů dovozu konkurenčních mlékařských výrobků.

#### ***Corynebacterium* sp. a „koryneformní tyčinky“**

- Dříve závažné *Corynebacterium diphtheriae* (původce záškrtu) už dnes tolik nehrozí. Studentům zato hrozí problémy, pokud si nezapamatují pravopis „-phth-“.
- Ostatní korynebakterie se vyskytují jako součást běžné flóry na kůži a jsou občasnými patogeny např. v ranách nebo v případech sepsí
- „Koryneformní tyčinky“ je název pro bakterie nejen rodu *Corynebacterium*, ale i několika dalších: *Rhodococcus*, *Dermatophilus*, *Rothia* či *Arcanobacterium*. Všechny jsou občasnými původci zejména kožních infekcí. Výjimkou je *Arcanobacterium*, občasný původce tonsilitid (oproti SRPY ovšem velmi vzácně).

V Brně byl objeven *Rhodococcus jostii*, a to přímo na ostatcích markraběte Jošta.

#### ***Bacillus* sp.**

- Výrazné patogeny *B. anthracis* (antrax – sněť slezinná, hrozba bioterorismu) a *B. cereus* (potravinové toxikózy z obilných výrobků)
- Ostatní bacily se vyskytují zpravidla jako kontaminace na misce

Pokud spatříte nick Bacil na literárním serveru Písmák, pak vězte, že jde o autora těchto řádků.

#### **Laktobacily**

Budou probrány zároveň s anaeroby. Sice nejsou přímo anaerobní, ale zpravidla coby mikroaerofilní mikroby rostou lépe v anaerobióze

## Diagnostika

### Mikroskopie

Grampozitivní tyčinky

#### **CORYNEBACTERIUM**

Často pleomorfní (různotvaré) tyčinky, uspořádané do „ohrádek“ – palisád, případně útvarů ve tvaru ptačích křídel

#### **LISTERIE**

Tyčinky bez výrazného palisádového uspořádání, spíše tvoří řetízky

#### **BACILLUS**

Velmi robustní tyčinky, občas přerušené neprobarveným místem – endosporou

### Kultivace

#### **CORYNEBACTERIUM**

Na KA drobné bělavé kolonie, připomínající poprašek, často se může splést s kvasinkami

## LISTERIE

Na KA kolonie podobné enterokokům, anebo (pokud jsou hemolytické) streptokokům

## BACILLUS

Plst'ovitý nárůst, odlišný od snad všech ostatních druhů bakterií

## JINÉ PŮDY NEŽ KREVŇÍ AGAR

- Za zmínku stojí, že korynebakterie často nalézáme na KA s amikacinem
- U listerií se (spíše ale v potravinářství) používají chromogenní půdy, např. ALOA.

## MH

- Na MH spíše nerostou, proto je lépe použít pro testování půdy s krví

## Biochemické a podobné identifikační metody

- *Corynebacterium*, *Listeria* i *Bacillus* jsou kataláza pozitivní, avšak například *Arcanobacterium* je negativní
- V zahraničí dostupné biochemické testy v panelech (např. API-coryne fy BioMérieux)
- U nás lze využít kombinace dvou testů (STREPTOtest a STAPHYtest) při použití speciální matice
- U listerií a korynebakterií lze využít hemolytických interakcí

## Testování citlivosti

- Běžným difusním diskovým testem na vhodných půdách

## Diferenciálně diagnostický algoritmus

### KROK 1: NEZNÁMÝ KMEN

- obarvíme Gramem, abychom vyloučili jiné bakterie než G+ tyčinky

### KROK 2: G+ TYČINKY

- V praxi potřebujeme rozlišit nejběžnější rody
- Použijeme rozdíly v mikroskopii, viz výše
- Použijeme také rozdíly v morfologii kolonií na KA, viz výše
- V případě potřeby použijeme biochemické testy, růstové schopnosti (listerie přežívají při nízkých teplotách), selektivní a selektivně diagnostické půdy apod.

## Popis speciálních testů

### Současně použitý STAPHYtest a STREPTOtest

Pracuje se s nimi tak, že se oba testy provedou a odečtou, jako by se jednalo o stafylokoka, resp. streptokoka. Do počítače se pak zadají pouze některé reakce – ty, které u koryneformních tyčinek či listerií mohou hrát roli. V počítači se musí zvolit příslušný oddíl – ne tedy „stafylokoky“ či „streptokoky“, ale „koryneformní bakterie“.

## P04A – Enterobaktérie

Také tady pro přehlednost uvádíme zvlášť enterobaktérie, a zvlášť *Vibrionaceae*, kampylobakteria a helikobakteria

## Úvod

Enterobaktérie si někteří studenti s oblibou pletou s enterokoky, avšak jde o nejvýznamnější čeleď G- tyčinek. Ovšem i ony si zpravidla libují ve střevě. Z hlediska patogenity lze rozčlenit na:

## Obligátní patogeny, původci systémových infekcí

Sem patří původci moru, tyfu a paratyfů. V Evropě nás zase tak moc netíží.

## Obligátní patogeny, původci střevních infekcí

Sem patří shigely, salmonely a yersinie. Na stejné úrovni je také kampylobakter z další podkapitoly. Jde o průjemová onemocnění podléhající hlášení. V některých případech může dojít i k sepsi, hlavně u mimin a starých a oslabených lidí.

## Potenciální patogeny

Tady je strašná spousta rodů. Na prvním místě nelze nejmenovat *Escherichii coli*, dále pak *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Serratia*, a nezapomeňme na hvězdné trio Proteus – Providencia – Morganella (dohromady tvoří tribus *Proteae* a jsou to bakterie s výraznou proteolytickou a menší sacharolytickou aktivitou, které hlavně rozebírají organické zbytky, ať už v přírodě – mršiny nebo ve střevě – střevní obsah). Ty, které zde nejsou jmenovány, jsou přece jen o kus méně významné a jejich případná neznalost není důvodem k utržení uší.

K onemocnění dochází u těchto bakterií:

- Když se naruší rovnováha střevního ekosystému
- Když se dostanou ze střeva jinam (nejblíž to mají do urogenitálního systému, a protože jsou líné, málokdy dojdou dál)
- Když se vyskytne kmen, který je virulentnější než jiné. U *E. coli* například kmeny označované čtyřpísmennými zkratkami, jako je EPEC, ETEC, EIEC či VTEC.



- **Miláčku, proč jsi nervózní? Dělá ti starostí OTEC?**

- **Ne, ETEC...**

## Nepatogenní

Velká spousta pro člověka zpravidla nevýznamných druhů, jako je *Pragia fontium* či *Budvicia aquatica* (uvádím pouze z vlasteneckých důvodů).

## Diagnostika

### Mikroskopie

- Gramnegativní tyčinky
- Vzájemné rozdíly mezi nimi nestojí za řeč a v diagnostice nemají význam. Je ale dobré vědět, že některé se barví polárně. To neznamená, že bychom je museli jezdit barvit na Špicberky, ale že se barví víc u pólů (konců) tyčinky než uprostřed. Taková polárně vybarvená tyčinka může, potvora, dokonce budit dojem, že se nejedná o tyčinku, ale o dva koky.

### Kultivace

#### KREVNÍ AGAR

- Kolonie šedo-bezbarvé (třeba u *escherichie*) nebo bílé (třeba u *klebsiely*), ale mnohem větší a vodovější než stafylokoky či enterokoky, o streptokokoch ani nemluvě

- Hemolýza může být přítomna u rodů *Escherichia* a *Proteus*, ale nemá diagnostický význam. Spíše z tradice se věří, že hemolytické kmeny escherichií jsou horší než nehemolytické, ale nemusí to být vždycky pravda.
- Některé kmeny *Proteus mirabilis* a v menší míře i *Proteus vulgaris* vykazují na krevním agaru tzv. Raussův fenomén – mají plazivý růst. Z centrální kolonie se bakterie šíří po povrchu agaru. Protey se také vyznačují pronikavým zápachem.

#### **ENDOVA PŮDA**

- Rostou na ní enterobakterie, Vibrionaceae a gramnegativní nefermentující tyčinky. Nerostou na ní nejen žádné grampozitivní bakterie, ale ani žádné z ostatních gramnegativních (selektivita)
- Bakterie, které si pochutnají na laktóze, zbarvují svoje kolonie i okolní půdu na tmavočerveno. Bakterie, kterým laktóza nechutná (nemají pro ni enzym) zbarvení půdy nemění. To se dá dobře využít – obligátní patogeny jsou vesměs laktóza negativní, z potenciálních jsou laktóza negativní jen málokteré (ale proteové třeba ano).
- Proteové se i na Endově agaru plazí, ale méně než na KA

#### **SELEKTIVNĚ DIAGNOSTICKÉ PŮDY**

Používají se půdy XLD, MAL, DC a jiné kvůli salmonelám, CIN kvůli yersiniím apod. Většina půd na salmonely je založena na průkazu paralelní laktóza-negativity a zároveň tvorby sulfidů. Tato kombinace se projeví bledými koloniemi s černým středem.

#### **MH**

- Enterobakterie jsou schopny růst na MH.

### **Biochemické a podobné identifikační metody**

- Všechny kataláza pozitivní a oxidáza negativní (s výjimkou rodu *Plesiomonas*)
- Většinou mají výraznou biochemickou aktivitu. Jejich metabolismus je fermentativní. Ke vzájemnému rozlišení se používá testů v panelech, jako je ENTEROtest 16 a ENTEROtest 24.

### **Testování citlivosti**

- Běžným difusním diskovým testem, mikrodilučním testem či E-testem.
- Nutno hlídat přirozené rezistence (např. klebsiela na ampicilin, enterobaktery na cefalosporiny 1. a 2. generace, protey na kolistin apod.); jejich znalost může také usnadnit diagnostiku

## **Diferenciálně diagnostický algoritmus**

#### **KROK 1: NEZNÁMÝ KMEN**

- obarvíme Gramem, abychom vyloučili jiné bakterie než G- tyčinky

#### **KROK 2: G- TYČINKY**

- Prověříme, že rostou na Endově agaru. Tím vyloučíme mnohé bakteriální rody, které na Endově agaru nerostou (například hemofily, pasteurely či legionelly)

#### **KROK 3: UŽ VÍME, ŽE ROSTOU NA ENDOVĚ AGARU**

- V praxi potřebujeme odlišit enterobakterie od *Vibrionaceae* a gramnegativních nefermentujících tyčinek
- Gramnegativní NEFERMENTUJÍCÍ tyčinky poznáme podle toho, že NEFERMENTUJÍ glukózu. Ne zcela spolehlivý, ale přesto používaný je šikmý agar dle Hajny. Do malé

zkumavečky je nalit tento červený agar. Když se jeho barva jakkoli změní, nejde pravděpodobně o gramnegativní nefermentující tyčinky.

- *Vibrionaceae* zase poznáme podle toho, že jsou oxidáza pozitivní

#### **KROK 4: RODOVÉ A DRUHOVÉ ROZLIŠENÍ ENTEROBAKTÉRIÍ**

- V orientačním určení, oč by mohlo jít, slouží selektivně diagnostické půdy
- Pro druhové rozlišení použijeme biochemické testy v panelu
- Z ekonomických důvodů se někdy používají také zkumavkové testy a jejich kombinace, přičemž výhodný je test MIU, kdy z jedné zkumavky zjistíme tři věci.

#### **KROK 5: VNITRODRUHOVÁ DIAGNOSTIKA – ANTIGENNÍ ANALÝZA**

Používá se jen v některých případech:

- Z epidemiologických důvodů u salmonel, shigel a yersinií
- Z důvodu rozdílné patogenity u escherichií, pokud potřebujeme vyloučit EPEC, eventuálně ETEC, VTEC a podobně.

Bez ohledu na důvod se provádí klasickou skličkovou aglutinací (viz jarní semestr)

## **Popis speciálních testů**

### **MIU**

Zkumavka obsahuje kombinaci několika substrátů v polotuhém agaru. Očkuje se vpichem a inkubuje se přes noc. Pokud zůstane zákal pouze v čáře vpichu, jde o nepohyblivou bakterii, pokud se bakterie „rozleze“ po celé zkumavce, je pohyblivá. Zrůžovění substrátu svědčí o štěpení urey. Červený prstenec po přikápnutí Kovácsova činidla vykazuje indolpozitivní bakterie.

### **Báseň**

Nemůžem vždy slepici  
Kontrolovat stolici  
Jednou projdem drůbežárnou  
A stolici najdem zdárnou  
Přiletí však holub bělý  
Zanese tam salmonely  
Odnosou pak vejce  
Pro cukráře-strejce  
Cukrář, strýček nevinný  
Nadělá z nich zmrzliny  
Mládež sní ji s důvěrou  
A všichni se...

## **P04B – Ostatní střevní bakterie**

### **Úvod**

Nesmíme zapomínat, že kromě enterobakterií jsou i další bakteriální původci infekcí GIT.

#### ***Vibrionaceae***

- Rod *Vibrio* – *V. cholerae*, původce cholery, dále tzv. halofilní vibria
- Rod *Aeromonas* – infekce ran při kuchání ryb (spíše v učebnicích)



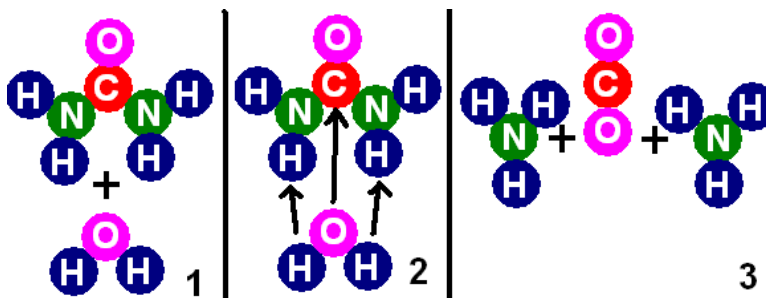
- Rod *Plesiomonas* nyní přearžzen mezi enterobakterie  
Cholera je stále významnou infekcí v mnoha zemích subtropického a tropického pásu.

### ***Campylobacter a Helicobacter***

- Kamylobakteri6za je v poslední době stejne 6ast6 střevní infekce jako salmonel6za.  
*Campylobacter* je zahnut6 oxid6za pozitivn6 ty6inka

- *Helicobacter* je n6kolikr6t zahnut6 (spir6lovit6) ty6inka, jedin6 bakterie, schopn6 preežit v žaludku. Helikobakter zde preežív6 díky masivn6 produkci ure6zy. Doch6z6 ke št6pen6 mo6oviny na oxid uhli6it6 (kter6 vyprch6) a amoniak (kter6 „zez6sadiťuje“ mikroprostred6 kolem helikobaktera). Mezi klinicky v6znamn6mi mikroby nenajdeme druh6ho takov6ho, kter6 by ur6it6 enzym produkoval tak masivn6 m6rou.

Helikobaktery se pod6lej6 na gastroduoden6ln6ch v6redech, ale jde vžd6 jen o jeden z faktor6. Jsou i zdrav6 lid6 s helikobaktery v žaludku.



Nobelova cena za medic6nu za rok 2005 je spojena pr6v6 s helikobaktery.

## **Diagnostika**

### **Mikroskopie**

Gramnegativn6 ty6inky, zahnut6 (helikobakter spir6lovit6), pohybliv6. Lze sledovat i v nativn6m prepar6tu.

### **Kultivace**

#### **VIBRIA**

Podobaj6 se enterobakteri6m. Pro c6lenou kultivaci se pouz6vaj6 speci6ln6 p6d6, zejména tekut6 m6dium – alkalick6 peptonov6 voda, a pevn6 p6d6 – TCBS (TCZS) agar (zkratka znamen6 thioglykol6t, citr6t a zlu6ov6 soli = bile salts).

#### **KAMPYLOBAKTERY**

6ty6i kultiva6n6 zvl66stnosti:

- Speci6ln6 kultiva6n6 p6d6 6ern6 barvy s aktivn6m uhl6m
- Zv6šen6 tenze CO<sub>2</sub>
- Prodloužen6 kultivace – 48 h
- Zv6šen6 teplota – 42 °C (kamylobakter je prim6rn6 pta66 patogen a pta6ci maj6 v666 t6lesnou teplotu)

#### **HELICOBACTER**

Speci6ln6 p6d6, kultivace trv6 p6t dn6

### **Biochemick6 a podobn6 identifika6n6 metody**

- *Vibrionaceae* se poznaj6 od enterobakteri6 pozitivn6 oxid6zou. Vz6jemn6 se rozli66 ENTEROtestem s t6m, že pro n6 mus6me pouz6t speci6ln6 matici
- *Campylobacter* zaujme pozitivn6 (i kd6ž n6kd6 opožd6nou) oxid6zovou reakc6

- *Helicobacter* imponuje, jak již bylo řečeno, mohutnou ureázovou aktivitou. Je tak mohutná, že ji lze prokázat i přímo v bločku bioprátku. Helikobaktery jsou tedy výjimkou potvrzující jinak platné pravidlo, že biochemické identifikační testy lze provádět pouze s kmenem a nikoli s celým vzorkem. To však helikobakterům nestačí. Chtějíce být originální za každou cenu, daly vzniknout jedinému mikrobiologickému testu, na který potřebujeme celého pacienta: urea breath test (viz dále).

Slyšíte-li dva mikrobiology bavit se o *heligónech*, nemusí to být mikrobiologové-hudebníci. Spíše mají na mysli své oblíbené helikobaktery ☺.

## Testování citlivosti

- Neprovádí se.

## Diferenciálně diagnostický algoritmus

### KROK 1: NEZNÁMÝ KMEN

- obarvíme Gramem, abychom vyloučili jiné bakterie než G- tyčinky

### KROK 2: G- TYČINKY

- Prověříme, zda rostou na Endově agaru. Tím vyloučíme mnohé bakteriální rody, které na Endově agaru nerostou (například hemofily, pasteurely či legionelly)

### KROK 3A: UŽ VÍME, ŽE ROSTOU NA ENDOVĚ AGARU

- V praxi potřebujeme odlišit *Vibrionaceae* od enterobakterií a gramnegativních nefermentujících tyčinek
- Gramnegativní NEFERMENTUJÍCÍ tyčinky poznáme podle toho, že NEFERMENTUJÍ glukózu (viz předchozí podkapitola).
- *Enterobacteriaceae* zase poznáme podle toho, že jsou oxidáza negativní

### KROK 4: VIBRIONACEAE

K rozlišení použijeme ENTEROtest, s maticí pro vibria a aeromonády.

### KROK 3B: UŽ VÍME, ŽE NEROSTOU NA ENDOVĚ AGARU

Kampylobaktera a helikobaktera od jiných takových (hemofilů, legionel aj.) odlišíme mikroskopii – jedná se o ZAHNUTÉ tyčinky.

Upřímně řečeno, v praxi bychom u kampylobakterů a helikobakterů asi tento algoritmus vůbec nevyužili.

Diagnostikujeme je jen tehdy, pokud předem pojmeme podezření, že by se o tyto bakterie mohlo jednat, a v takovém případě jim připravíme speciální testy a kulturační půdy.

## Popis speciálních testů

### Urea breath test

Pacientovi podáme radioaktivně značenou močovinu. Je-li v žaludku helikobakter, močovinu štěpí. Radioaktivní oxid uhličitý pak má významný podíl ve vydechaném vzduchu. Není-li helikobakter přítomen, močovina není štěpena a projde i s radioizotopem až do střeva.

## P05A – Hemofily (a *Pasteurellaceae*)

Rovněž hemofily a pseudomonády se sešly v jednom praktiku jen proto, že by ty ani ony celé praktikum nezaplňily.

## Úvod

Čeď *Pasteurellaceae* zahrnuje gramnegativní tyčinky nerostoucí na EA.

## ***Pasteurella***

Je doma v psích tlamách. Pasteurelové infekce jsou časté v ranách po pokousání psem.

## ***Haemophilus***

Je u člověka mnohem běžnější než *Pasteurella*. Hemofily se vyskytují ve faryngu zdravých osob, patogenem se stávají při porušení rovnováhy. To se týká jak druhů *Haemophilus parainfluenzae* (HEPA) a *Haemophilus aphrophilus* (HEAP) tak i většiny kmenů *Haemophilus influenzae* (HEIN). Avšak opouzdřené kmeny HEIN s pouzdrným typem „b“ jsou horší než ostatní: bývají příčinou invazivních infekcí – epiglottitid, meningitid, případně pneumonií. Proto se také proti nim očkuje.

Obšourníci cestující do tropů by měli znát také *Haemophilus ducreyi*, původce měkkého vředu.

## **Diagnostika**

### **Mikroskopie**

- Gramnegativní krátké tyčinky

### **Kultivace**

#### **KREVNÍ AGAR**

- Pasteurely na KA rostou a typicky smrdí. Vypadají podobně jako enterokoky.
- Hemofily na KA rostou pouze v přítomnosti bakterie, která jim umožní přístup k faktorům uzavřeným uvnitř erytrocytů. Takovou bakterií bývá *S. aureus*. Jev se označuje jako satelitový fenomén – hemofil totiž „krouží“ kolem stafylokokové čáry jako družice (satelit).

Když je řeč o družicích, víte, jak zní otrocký překlad jména slavného českého cestovatele a literáta Kryštofa Haranta z Polžic a Bezdružic? Přece Christopher the Bastard from Afterspoons and Withoutsatelites! ☺

#### **ČA A LEVINHALŮV AGAR**

- Bez pomoci jiné bakterie rostou hemofily jen na ČA, případně přefiltrovaném ČA, který má název Levinthalův agar

#### **AGAR K DIAGNOSTICE RŮSTOVÝCH FAKTORŮ**

Je to poměrně chudý agar, blízký živnému agaru. Je paradoxní, že hemofily v podstatě nejsou zase tak zhýčkané, jak by si někdo myslel. Nebýt potřeby růstových faktorů, rostly by v podstatě na kdečem. Proto právě se používá tento chudý agar k jejich rozlišení.

#### **MH**

- Hemofily nejsou schopny růst na MH, citlivost se zjišťuje na Levinthalově agaru.

### **Biochemické a podobné identifikační metody**

- Některé firmy nabízejí biochemické soupravy k testování hemofilů a podobných bakterií, v praxi se však příliš nevyužívají.

### **Testování citlivosti**

- Diskovým testem na Levinthalově agaru s tím, že je nutné zároveň prokázat případnou produkci betalaktamázy pomocí diagnostického proužku

## **Diferenciálně diagnostický algoritmus**

### **KROK 1: NEZNÁMÝ KMEN**

- obarvíme Gramem, abychom vyloučili jiné bakterie než G- tyčinky

### **KROK 2: G- TYČINKY**

- Prověříme, zda rostou na Endově agaru. Zjistíme, že nerostou.

### **KROK 3: UŽ VÍME, ŽE NEROSTOU NA ENDOVĚ AGARU**

Upřímně řečeno, potvůrek, které nerostou na EA je hrozně moc. Pokud ale ucítíme typický zápach a zároveň vidíme satelitový fenomén (hemofily) nebo máme k dispozici anamnézu pokousání psem (pasteurely), tušíme, která bije.

### **KROK 4A: POTVRZENÍ DIAGNOSTIKY PASTEUREL**

- Pasteurelu ověříme tak, že zkusíme citlivost na penicilin a vankomycin. Je citlivá na penicilin a rezistentní na vankomycin, což je kombinace mezi bakteriemi neběžná.

### **KROK 4B: URČENÍ DRUHU HEMOFILA**

Nejběžnější tři druhy hemofilů (HEPA, HEAP a HEIN) určíme faktorovým testem.

### **KROK 5B: VNITRODRUHOVÁ DIAGNOSTIKA – ANTIGENNÍ ANALÝZA**

V případě invazivní infekce a prokázaného HEIN provádíme latexovou aglutinaci, abychom prokázali případnou přítomnost typu „b“.

## **Poznámka k diagnostice výtěrů z krku**

V praxi samozřejmě nemíváme k dispozici izolovaný kmen, ale celý vzorek. Hemofil by se nám ve výtěru z krku ztratil mezi ústními streptokoky a neisseriemi. Na KA naočkujeme stafylokokovou čáru a na ni umístíme bacitracin – v jiné koncentraci než pro bacitracinový test (na disku bývá napsáno „BH“ – „Bacitracin hemofilový“). Bacitracin odcloní běžnou flóru a hemofily rostou kolem stafylokoka.

## **Popis speciálních testů**

### **Faktorový test**

Na chudý agar plošně naočkujeme hemofily jako při testování citlivosti. Na agar však místo antibiotických disků naklademe disky napuštěné růstovými faktory:

- Disk s faktorem X (hemin)
- Disk s faktorem V (NAD\*)
- Disk se směsí faktorů X + V

\*pro štoury: nikotinamidadeninukleotid, nikoli náhradní autobusová doprava ☺

Vyhodnocení výsledků:

- HEIN roste pouze kolem „směsného“ disku (potřebuje oba faktory)
- HEPA roste kolem směsi a kolem V faktoru (stačí mu V faktor)
- HEAP roste kolem směsi a kolem X faktoru (stačí mu X faktor)

## **P05B – Pseudomonády (a další gramnegativní nefermentující bakterie, zkráceně GNFB)**

### **Úvod**

Jsou to oportunní patogeny, které napadají oslabené jedince: popálené, transplantované, děti s cystickou fibrózou a podobně. Jsou to významní původci nozokomiálních infekcí. Zdravého člověka zpravidla nenapadají. Jejich metabolismus je aerobně respirační, jsou to mikroby z vnějšího prostředí, často patogeny rostlin.

## ***Pseudomonas aeruginosa***

Zdaleka nejběžnější GNFB. Její charakteristika se neliší od ostatních

### **Ostatní GNFB**

Za zmínku stojí zejména:

- *Burkholderia cepacia*; *Alium cepa* = cibule, burkholderie působí hnilobu cibule
- *Stenotrophomonas maltophilia*: krásný příklad, jak i příšerný název může mít svou logiku. Je to jakási jednotka (monas) která má zúžené (steno-) možnosti výživy (-tropho-) a to konkrétně tak, že miluje (-philia) pouze maltózu (malto-). Jako panda žere jen bambus a koala okusuje blahovičnickové listí, tak stenotrofomonády „okusují“ maltózu.
- *Acinetobacter* je upřímně řečeno spíš kok než tyčinka (nanejvýš kokotyčinka), ale z praktických důvodů se obvykle probírá zároveň s ostatními GNFB. Je to druhá nejběžnější GNFB po pseudomonádě.

## **Diagnostika**

### **Mikroskopie**

Gramnegativní tyčinky, které nepoznáte od jakýchkoli jiných rovných gramnegativních tyčinek.

### **Kultivace**

#### **KA**

Podobají se enterobaktériím. Pseudomonády na KA příliš neprojeví své pigmenty, mohou však projevit svou vůni a zejména perleťový lesk. Mohou být také hemolytické, což u nich ale nic neznamená.

#### **EA**

Na EA rostou. Laktózu zpravidla nefermentují, avšak kolonie mohou být tmavé v důsledku produkce pigmentu či jiných biochemických změn.

#### **MH**

Na MH rostou jako zběsilé. Protože je MH skoro bezbarvá půda, je zároveň ideální pro pozorování tvorby pseudomonádových pigmentů. Ty jsou nejčastěji zelené, méně často hnědé, rezavé či modré.

### **Biochemické a podobné identifikační metody**

- Některé mají pozitivní oxidázu (*Pseudomonas*), jiné (*Acinetobacter*) ji však mají negativní.
- Nefermentují glukózu, Hajnova půda zůstává červená.
- Existují však biochemické testy, založené na aerobně respiračních reakcích. Používá se (u nás) NEFERMtest 24. Jeho zvláštností je, že se inkubuje 48 h (tedy dvojnásobek času proti většině ostatních testů od stejného výrobce) a kultivuje se při 30 °C namísto běžných 37 °C. Bystré studenty, kteří se dočetli v úvodu, že jde o mikroby z prostředí, toto zjištění zajisté nepřekvapí.

### **Testování citlivosti**

- Lze provádět všechny metody bez omezení. Zelený pigment je viditelný i v mikrodilučním testu určování MIC.

## Diferenciálně diagnostický algoritmus

### KROK 1: NEZNÁMÝ KMEN

- obarvíme Gramem, abychom vyloučili jiné bakterie než G- tyčinky

### KROK 2: G- TYČINKY

- Prověříme, zda rostou na Endově agaru. Tím vyloučíme mnohé bakteriální rody, které na Endově agaru nerostou (například hemofily, pasteurely či legionelly)

### KROK 3: UŽ VÍME, ŽE ROSTOU NA ENDOVĚ AGARU

- V praxi potřebujeme odlišit *Vibrionaceae* a enterobakterie
- Gramnegativní NEFERMENTUJÍCÍ tyčinky poznáme podle toho, že NEFERMENTUJÍ glukózu a Hajnovu půdu tedy z červené barvy nemění na jinou

### KROK 4: GNFB

- Pseudomonádu poznáme, protože voní po jasmínu (starší kultury ale smrdí čpavkem), je barevná (většinou zelená), kolonie mají perleťový lesk a jsou oxidáza pozitivní.
- K rozlišení ostatních použijeme NEFERMtest

## P06A – Různé další gramnegativní tyčinky

Již počtvrté se jeví jako užitečné kapitolu rozdělit. Dokonce se autorovi jeví jako logičtější nejdříve dokončit gramnegativní tyčinky a pak se teprve pustit do koků, navzdory tomu, že v protokolu je to naopak.

### Úvod

Čtyři rody zde popisované toho nemají mnoho společného. Jedno však přece: nezachytí se zpravidla při běžné kultivaci, klinik musí pojmout podezření, že by se o ně mohlo jednat, a v některých případech je dokonce užitečnější nepřímý průkaz než přímý.

### **Legionella**

Původce pontiacké horečky a legionářské nemoci. Vyskytuje se v potrubí, ve vodě, která je dost teplá na to, aby se v ní množily, a ne dost teplá na to, aby je zabila. Riziková jsou slepá ramena vodovodních systémů, která mohou sloužit jako rezervoáry legionel. Největším odborníkem na legionely v Česku je dr. Drašar z vyškovské nemocnice.

### **Brucella**

U nás málo běžné zoonózy přenášené z hovězího dobytka (*B. abortus*), prasat (*B. suis*) či koz a ovcí (*B. melitensis* – název podle ostrova Malta).

### **Bordetella**

Původce dávivého kašle (pertuse způsobená *B. pertussis*, parapertuse způsobená *B. parapertussis*), díky očkování vzácný

### **Francisella**

Původce tularemie, v riziku jsou především osoby stahující zajíce.

## Diagnostika

### **Legionella**

Můžeme se pokusit o přímý kultivační průkaz na speciálních půdách, např. BCYE. Nebo hledat protilátky v séru.

## ***Brucella***

Téměř výhradně serologická diagnostika.

## ***Bordetella***

Roste sice často i na KA (zejména *B. parapertussis*), ale nemusí tu být poznána.

## ***Francisella***

Téměř výhradně serologická diagnostika

## **Diferenciálně diagnostický algoritmus**

Je to v tomto případě spíš teoretická možnost, většinou totiž na tyto infekce nepříjeme náhodou při testování neznámého kmene, ale pouze cíleně, máme-li na příslušnou infekci podezření.

### **KROK 1: NEZNÁMÝ KMEN**

- obarvíme Gramem, abychom vyloučili jiné bakterie než G- tyčinky

### **KROK 2: G- TYČINKY**

- Prověříme, zda rostou na Endově agaru. Zjistíme, že nerostou.

### **KROK 3: UŽ VÍME, ŽE NEROSTOU NA ENDOVĚ AGARU**

Kombinací anamnézy a typických vlastností je určíme.

## **Popis speciálních testů**

### **Kultivace na Bordet-Gengou**

- Používá se zvláštní postup. Vzorek se nanese doprostřed a kličkou se rozprostírá „šnekem“ a radiálními čarami. Po kultivaci se hledají načernalé kolonie zejména v periferní části misky

## **P06B – Gramnegativní koky**

### **Úvod**

Poměrně malá, ale důležitá skupina.

### ***Neisseria gonorrhoeae***

Nejchoulostivější (*in vivo* i *in vitro*) neisserie, původce kapavky. *In vivo* choulostivost se projevuje praktickou nemožností jiného přenosu než sexuálního. Kapavka je především uretritida, u žen též cervicitida, nikoli tedy kolpitida (zánět vaginy). Na to je třeba myslet i v diagnostice. Nelze také zapomínat na možnou kapavčitou faryngitidu. I ti, kteří ještě neodhalili půvaby orálního sexu, by měli s touto možností počítat.

### ***Neisseria meningitidis***

Zrádná bakterie, která se vyskytuje u významného procenta zdravých osob ve faryngu, na druhou stranu působí i závažné invazivní infekce. Dvacetiletá dívka, ve čtvrtku ještě zcela zdravá, se tak v neděli může ocitnout na pitevně. Invazivní infekce (meningitidy, sepse, pneumonie) způsobují určité klony. Pro patogenitu jsou významné spíše proteinové antigeny, kdežto polysacharidové zase určují, zda je či není možná prevence očkováním. Existují vakcíny proti séro skupinám A a C, případně A, C, Y a W135. Prozatím však není vakcína, která by chránila proti kmenům séro skupiny B.



## Ústní neisserie

Vyskytují se jako součást mikroflóry dutiny ústní a faryngu. Výjimečně mohou být patogenem.

### ***Moraxella (Branhamella) catarrhalis***

Na rozdíl od jiných moraxel, které mají vztah hlavně k infekcím oka, je tato spíše spjatá s horními cestami dýchacími. Může zde být běžnou flórou, anebo patogenem – záleží na množství a okolnostech.

## Odběr vzorku

U podezření na kapavku se odebírá výtěr z urethry, cervixu, rekta a případně i faryngu (bystří studenti jistě odhalili, že u muže jedno z těchto míst vynecháme 😊). Vzhledem k tomu, že rozmazlené gonokoky neobyčejně ochotně chcípají, je doporučeníhodné při odběru kromě výtěru (provedeného klasickou výtěrovkou s Amiesovou půdou) provést i přímo nátěr na sklíčko a poslat sklíčko. Netýká se to výtěrů z řiti, kde je mikrobů i normálně „habakuk“ a sklíčko by bylo k ničemu.

Ostatní popisované bakterie se odhalí při diagnostice výtěrů z krku, popřípadě (meningokok) hemokultur, mozkomíšního moku a podobně.

## Diagnostika

### Mikroskopie

Gramnegativní koky. Patogenní neisserie mají charakteristické uspořádání po dvojicích, přičemž celý útvar připomíná kávové zrno. Ve vzorku (likvor u meningokokové meningitidy, urethrální nátěr u kapavky) se typicky vyskytují nejen vně, ale i uvnitř leukocytů. Nesmíme ale očekávat, že by každý leukocyt byl plný diplokoků.

### Kultivace

#### KA

Na běžném KA rostou jen moraxely a ústní neisserie. Meningokok roste na KA, je-li tento obohacený živinami.

#### EA

Na EA moraxely ani neisserie nerostou. (Je fatálním omylem mnoha mediků, kteří se domnívají, že ano, protože „jsou přece gramnegativní“.)

#### ČA

ČA se používá ke kultivaci zejména kapavky, ale vyočkovávají se naň i vzorky mozkomíšního moku. Lze také použít jeho variantu, GC agar, který obsahuje antibiotika, je to tedy selektivně obohacená půda.

#### MH

Na MH nerostou, testování citlivosti se musí provádět na KA (moraxely), obohaceném KA (meningokoky) či ČA (gonokoky).

### Biochemické a podobné identifikační metody

- Mají pozitivní oxidázový test.
- *M. catarrhalis* má pozitivní indoxylacetátový (INAC) test. Je to test, který se prakticky provádí stejně jako oxidázový až na to, že se reakční ploška musí před testem zvlhčit

(např. kondenzní vodou zesponu víčka misky), test trvá déle než oxidázový (několik minut) a barva není modrá, ale modrozelená.

- K podrobnému rozlišení neisserií i moraxel slouží biochemické testy, v našich podmínkách hlavně NEISSERIAtest

## Testování citlivosti

Viz Kultivace – MH.

## Diferenciálně diagnostický algoritmus

### KROK 1: NEZNÁMÝ KMEN

- obarvíme Gramem, abychom vyloučili jiné bakterie než G- koky

### KROK 2: G- KOKY

- Ověříme oxidázou, že se jedná o neisserie/moraxely (mohlo by jít např. o acinetobaktera a ten je oxidáza negativní)
- *M. catarrhalis* odlišíme INAC testem
- Další rozlišení provedeme biochemickým testem v panelu (NEISSERIAtest)

### KROK 3: MENINGOKOK, PŮVODCE INVAZIVNÍ INFEKCE

- Prakticky jen v tomto případě pokračuje diagnostika dál: provádí se latexová aglutinace. Lze ovšem provést také aglutinaci přímo likvor

## Poznámka k diagnostice výtěrů z krku

Jak již bylo řečeno u hemofilů, v praxi samozřejmě nemíváme k dispozici izolovaný kmen, ale celý vzorek. Pro snazší odhalení meningokoků používáme disk s vankomycinem a kolistinem (V + K), kolem kterého meningokoky rostou, kdežto většina zástupců běžné flóry i možných dalších patogenů je na jedno či obě z antibiotik rezistentní.

## Intermezzo

Na tomto místě považuje autor repetitoria za vhodné upozornit na podstatný metodologický rozdíl mezi bakteriemi, které byly probrány v tématech P01 až P06, a bakteriemi, houbami a parazity, probíranými v tématech P07 až P11. Zatímco ty první (s výjimkou legionel, bordetel, brucel, francisel a helikobakterů) nalezneme při rutinní bakteriologické kultivaci (aniž bychom museli vyslovit podezření na konkrétního mikroba), ty druhé vyžadují buďto speciální kultivační postupy (anaeroby, mykobakteria, houby) nebo se kultivovat prakticky vůbec nedají a musí se diagnostikovat jinak (spirochéty, parazité). V každém případě je u nich nezbytné, aby klinik pojal podezření, že se o takovou infekci může jednat, zaznamenal to na žádance a zaslal k vyšetření odpovídající vzorek.

Z tohoto důvodu také v dalších kapitolách nenaleznete „Diferenciálně diagnostický algoritmus“. Také koncepce úkolů u praktické části zkoušky se u těchto mikrobu liší.

## P07 Anaeroby

### Úvod

Striktně anaerobní bakterie nejsou schopny žít v prostředí, které obsahuje větší množství kyslíku. Tím je ovlivněn jejich přenos. Většina infekcí způsobených anaeroby je endogenního původu: z místa, kde jsou anaeroby coby běžná flóra (ústní dutina, střevo, pochva) se dostávají do okolí. Z dutiny ústní se mohou anaeroby např. při zubním kazu, úrazu apod. dostat do měkkých tkání v okolí čelisti či krku. Střevní anaeroby při perforaci způsobují peritonitidu, poševní pak záněty malé pánve. Výjimkou jsou klostridia, které sporulují, a díky tomu se mohou mnohem snáze šířit.

#### G- KOKY

Význam má jedině rod *Veillonella*.

#### G+ KOKY

*Peptococcus* (ve shlucích) ani *Peptostreptococcus* (v řetízcích) se neliší od obecné charakteristiky nesporelujících anaerobů.

#### G- TYČINKY

*Bacteroides*, *Prevotella* a *Porphyromonas* patřily původně do jednoho rodu a mají zaoblené konce. Naopak špicaté konce má *Leptotrichia* a *Fusobacterium* (podílí se na tzv. Plaut-Vincentově angíně). *Mobiluncus* - účastní se nespecifických zánětů pochvy, označovaných jako "vaginózy". Dříve byl označován jako "poševní vibrio".

#### G+ NESPORULUJÍCÍ TYČINKY

*Actinomyces* – způsobuje aktinomykózu, je probráno v P08. *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+ SPORULUJÍCÍ TYČINKY – CLOSTRIDIUM

*C. 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 projevuje hlavně obrnami (parézami). *C. tetani* způsobuje tetanus. V tomto případě sice dochází k infekci, ale důležité je zase působení toxinu. Člověk se zraní např. o špinavý trn, zemědělský nástroj (nejrizikovější jsou vidle, protože těmi se přehazuje hnůj) a do rány si vnese klostridia. Vznikne nevelké ložisko infekce, samo o sobě nevýznamné. Významné ale je, že z ložiska se šíří tetanický toxin. Stejně jako botulotoxin je to neurotoxin, ale působí opačně: ne obrny, ale naopak křeče svalstva. Klostridia plynatých snětí, například *Clostridium perfringens* (ale i několik dalších druhů) mají na svědomí dva typy lidských onemocnění: a) Plynatá sněť je především válečné onemocnění. V míru se může přihodit např. při zemětřesení a podobných katastrofách. Úraz jednak přesekne zásobení 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. *C. 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).

## Odběr materiálu

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

## Diagnostika

### Mikroskopie

Je velice důležitá, hodnotí se tvar včetně tvarových detailů (zaoblené či zašpičatělé konce tyčinek), barvitelnost dle Grama a uspořádání.

Spóry klostridií mohou a nemusí být viditelné – některá klostridia tvoří spory jen tehdy, když se dostanou do nepříznivých podmínek.

Umístění sférické spory na konci tyčinky ("palička na buben") je typické pro *Clostridium tetani*.



### Kultivace

je anaerobní – používá se některý ze způsobů získání anaerobního prostředí, viz dále. Používáme půdy s masokvasničním extraktem (francouzsky viande-levure), kterým pak říkáme VL bujón (tekutá pomnožovací půda) a VL agar (vlastně by se mělo říkat „VL krevní agar“, je to pevná diagnostická půda).

Žloutkový agar se používá ke speciálnímu testu na průkaz toxinu *C. perfringens*.

Délka kultivace je vyšší než u anaerobů, výsledky se odečítají zpravidla za 48 – 96 h.

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, v našich podmínkách zpravidla ANAEROTest 23. Matice není jednotná, musíme mít k dispozici výsledek mikroskopie.

### Pokus na zvířeti

připadá stále ještě v úvahu u tetanu a botulismu. Používá se myš. V pozitivním případě zvíře uhynie a je charakterizováno typickou pozicí končetin a ocasu.

### Průkaz antigenu

se používá hlavně jako průkaz toxinů *C. perfringens* a *C. difficile* ve stolici. Je totiž u nich důležitější než samotný nálezklostridia: klostridia se totiž vyskytují běžně, ale ne vždy produkují toxin.

## Testování citlivosti na antibiotika

Používá se difusní diskový test, je však nutno použít i v tomto případě anaerobní kultivaci na VL agaru.

## Popis speciálních testů

### 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 (generátorem anaerobiózy) a do anaerostatu vložíme (pokud už tam není) platinový katalyzátor. Když se do anaerostatu umístí naočkované misky, sáček se směsí se otevře, u některých typů se ještě zalije vodou (typy, které se nezalévají, berou vodu ze vzduchu). Tím začne běžet první fáze reakce, která během několika desítek minut vytvoří směs vodíku a oxidu uhličitého. Ve druhé fázi pak vodík na katalyzátoru reaguje s kyslíkem za vzniku vody. Tím je spotřebován kyslík. Kdybychom do anaerostatu nedali katalyzátor, proběhla by pouze první fáze reakce. Tento postup se používá, pokud namísto anaerobního chceme získat mikroaerofilní prostředí (např. na kampylobaktery),

#### ANAEROBNÍ BOX

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

### Průkaz lecitinázy *Clostridium perfringens*

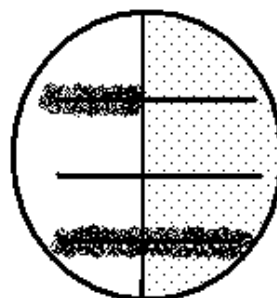
- (1) Na žlutkovém agaru se lecitinázy projevují precipitací
- (2) *Clostridium perfringens* tvoří toxin, který je svou povahou lecitináza.
- (3) Ne každá lecitináza je toxin *Clostridium perfringens*

Na polovinu žlutkového agaru nanese se specifický antigen proti toxinu *C. perfringens*. Poté očkujeme testované kmeny jako čáry tak, aby vždy polovina čáry byla v oblasti bez antitoxinu a polovina v oblasti s antitoxinem.

Pozitivní kmen vypadá tak, že v oblasti bez antitoxinu je precipitace přítomna, ale v oblasti s antitoxinem přítomna není (je inhibována antitoxinem).

Negativní kmen „I. typu“ je takový, kde vůbec není žádná precipitace, kmen tedy netvoří žádnou lecitinázu.

Negativní kmen „II. typu“ je naopak takový, kde precipitace je všude, kmen sice tvoří jakousi lecitinázu, ale



pozitivní  
negativní I  
negativní II

→ půlka s antitoxinem

ta není totožná s hledanou lecitinázou, protože zjevně není inhibována antitoxinem.

## P08 Mykobakteria\* a jiné acidorezistentní bakterie

*\*Recenzentka této kapitoly, jakož i někteří jiní, se kloní spíše k tvaru „mykobakterie“. Nicméně jsem se rozhodl pro tvar respektující původní latinské neutrum (bacterium). Pozn. aut.*

Jsou to tyčinky, které se nebarví Gramovým barvením. Jejich buněčná stěna je vysoce hydrofobní, obsahujíc mykolové kyseliny. Mykobakteria jsou odolná vůči odbarvení kyselinami a zároveň také odolná vůči kyselinám jako takovým - proto se jim říká acidorezistentní. V menší míře mají tutéž vlastnost také aktinomycety, nokardie a korynebakteria.

Mykobakteria dobře snášejí vnější změny, v přítomnosti bílkovin (ve sputu) jim nevadí ani vyschnutí (jindy však již tak odolné nejsou, například na starých, vysychajících půdách hynou). Jsou také odolná na většinu antibiotik a na mnohé desinfekční prostředky. Přenáší se vzduchem; postprimární tuberkulóza vzniká jako endogenní (tj. pacient nakazí "sám sebe" - "probudí" spící mikroby. Mykobakteria velmi pomalu rostou, (dlouhá generační doba - u TBC asi 20 hodin, u lepry několik týdnů).

Většina nálezů způsobených mykobakterií se výrazně liší od běžných bakteriálních infekcí svou patogenezí – bližší vysvětlení leží mimo rámec možností tohoto repetitoria.

U zdravých jsou možnosti přenosu TBC malé, riziko se zvyšuje při špatném celkovém stavu. Dříve to byla často špatná výživa, třeba za války, dnes mimo jiné i AIDS.

V Česku představuje typická triáda osob často nakažených „ABC“ – **a**lkoholici, **b**eždomovci, **c**izinci.

### Tuberkulóza

je způsobena *Mycobacterium tuberculosis* (zpravidla lidská, ale ojediněle přenosná i na zvířata), ale může být (dnes vzácně) způsobena i např. *M. bovis* (z dobytka) Obvykle se jedná o plicní onemocnění, ale může se vyskytnout i postižení jiných orgánů (kosti, urogenitální, trávicí ústrojí) Vzácné, ale mimořádně závažné jsou TBC meningitidy zvané bazilární. Tuberkulóza se projeví při prvním kontaktu obvykle jako tzv. primární komplex - zánětlivé ložisko + zvětšené uzliny. Po letech se může (ale nemusí) tuberkulóza obnovit jako tzv. postprimární tuberkulóza. Tuberkulóza je na světě velice rozšířena, nakaženo je asi 1,7 miliard osob.

Na TBC zemřel například básník Jiří Wolker.

### Mykobakteriízy

Takto se označují onemocnění způsobená jinými mykobakterií než *M. tuberculosis* a *M. bovis* - např. *M. avium-intracellulare*, *M. kansasii*. Probíhají do jisté míry podobně jako tuberkulóza, ale jsou rezistentnější na léky. Tato mykobakteria se vyskytují u zvířat nebo i v prostředí.

### Nepatogenní (lépe: „spíše nepatogenní“) mykobakteria

Jsou i mykobakteria, která člověku neškodí a mohou se vyskytovat třeba jako součást běžné flóry (*M. smegmatis*). Ovšem i ta mohou působit nemoci u imunosupremovaných osob.



## Lepra

způsobená *M. leprae* probíhá velmi pomalu. Má formu tuberkulózní, kdy na kůži vznikají ohraničená ložiska, a formu lepromatózní, kdy dochází kromě znečistlivění periferních nervů také k deformaci tkání. Vzniká typická "lví tvář" - facies leontina.

## Aktinomykóza a nokardióza

Jsou to zvláštní onemocnění s hnisavým ložiskem v podkoží či jinde ve tkáni. Ložiska zpravidla obsahují mazlavý hnis.

Odběr vzorků

U tbc je nejběžnějším vzorkem sputum, ale podle lokalizace mohou být použity různé vzorky. Je třeba vyznačit na průvodce, že je požadováno vyšetření na tbc (buď mikroskopicky + kultivačně, nebo PCR, případně oboje)

## Diagnostika

### Mikroskopie

Provádí se barvení za horka podle Ziehla-Neelsena (čti cíl nýlsna), viz dále. Důležitá je také fluorescenční mikroskopie.

U aktinomykózy a nokardiózy lze provádět Gramovo barvení, v obou případech jde o větvená G+ vlákénka, mnohem menší než vláknité houby. Zpravidla jsou nepravidelně probarvená, což souvisí s jejich částečnou acidoresistencí.

### Kultivace

Používá se speciálních půd - např. pevná půda Löwensteinova-Jensenova a tekutá půda Ogawova. Aby mykobakterie nepřerostly jiné bakterie, provádí se před začátkem kultivace tzv. moření (dekontaminace) vzorku - tj. odstranění běžných bakterií, zpravidla louhem (mykobakterie jsou nejen acido-, ale i alkalirezistentní). Výsledek kultivace se pak zpravidla hodnotí po 3, 6 a 9 týdnech kultivace. Některá tzv. "rychle rostoucí mykobakterie" se mohou množit i rychleji a tvoří kolonie po 2 – 7 dnech. Naopak *M. leprae* roste ještě pomaleji a nedá se kultivovat prakticky vůbec.

Před nedávkem se podařilo *M. leprae* vykultivovat (po asi 50 týdnech). Pro rutinní diagnostiku je vám ovšem tohle zjištění poměrně málo platné.

V poslední době se pro kultivaci tuberkulózních mykobakterií využívají automatické kultivátory podobné jako na hemokultivaci. Dokážou zpravidla hlásit pozitivitu podstatně dříve než klasická kultivace a jsou i citlivější.

U aktinomykózy se používá klasická anaerobní kultivace, ale musí se kultivovat déle (až týden).

U nokardiózy se používá normální aerobní kultivace, ale opět se musí déle počkat.

### Biochemická identifikace

Provádí se ve specializovaných laboratořích

### Průkaz antigenu a průkaz protilátek

V poslední době se prosazují nové imunologické testy na průkaz specifického interferonu gamma v krvi (QuantiFERON TB-Gold)

Neprovádí se však průkaz protilátek (metodika existuje, ale nemá praktický význam).

Látková imunita je u mykobakterií nepodstatná, protilátky se sice tvoří, ale málo a

Řásovec devílipásý je důležitým laboratorním zvířetem v diagnostice lepry, zejména při výrobě leprominu





nemají význam ani pro pacienta, ani pro diagnostiku. Ověření stavu buněčné (!) imunity se provádí kožním testem dle Mantouxové přímo na kůži testované osoby . V případě positivity se vytvoří zánětlivá reakce v místě, kam byl vstříknut tuberkulin, resp. lepromin (antigeny mykobakterií).

Lepromin se získává pomocí pásovců (obrázek pásovice převzat z encyklopedie Microsoft Encarta Encyclopedia)

## **Testování citlivosti na antituberkulotika**

Nelze provádět diskovým testem - provádí se příměsí jednoho (či více) antituberkulotik v kultivačním médiu (v určité kombinaci) a koncentraci.

Aktinomycety a nokardie lze testovat na VL-agaru (aktinomycety) či krevním agaru (nokardie) na jejich citlivost na antibiotika

## **Průkaz DNA**

Metodou PCR lze prokázat DNA mykobakterií dokonce i ze vzorků několik staletí starých.

## **Popis speciálních testů**

### **Barvení dle Ziehla-Neelsena**

1. Za horka se barví karbolfuchsinem - Gabbetem (jen takto se mykobakteria obarví)
2. Odbarvujeme kyselým alkoholem (= alkohol s přídavkem minerální kyseliny). Odbarví se vše kromě acidorezistentních tyčinek
3. Dobarvujeme pozadí na modro (methylenovou modří) nebo na zeleno (malachitovou zelení).

Positivní vzorek se projeví jako červené čárky na modrém či zeleném pozadí.

### **Kultivace na Löwensteinově-Jensenově půdě**

Jde o vaječnou půdu zelené barvy, mykobakteria na ní tvoří bíložluté květákovité kolonie. Půda se nalévá do zkumavky a zazátkuje, čímž je jednak zamezeno vyschnutí, jednak nákaze manipulujícího personálu.

## **P09 Spirochéty**

### **Úvod**

Spirochety jsou spirální bakterie - nepatří tedy mezi ani mezi koky, ani mezi tyčinky.

Také se nebarví podle Grama, i když mají blíž ke G- bakteriím než ke gram pozitivním.

### ***Treponema pallidum***

*Treponema pallidum* způsobuje syfilis (lues), smrtelnou nemoc, která se hojně vyskytuje i v dnešním Česku. Nemoc má tři stádia: 1) místní projevy (tvrdý vřed, zvětšené uzliny), 2) celková infekce - projevuje se např. vyrážkou, 3) orgánové změny - nevratné poškození cév, mozku, míchy a podobně. První dvě stádia jsou vysoce nakažlivá, třetí již méně. *Treponemata* pronikají placentou, dojde k potratu anebo k postižení plodu. Příbuzná *treponemata* *Treponema pertenue* a *T. carateum* způsobují tropická kožní onemocnění. U nás se nevyskytují. Nepatogenní *treponemata* jsou součástí běžné flóry v ústech a v přirození. Mohou být příčinou falešně pozitivních serologických reakcí na syfilis.

*Treponema pallidum* je velmi citlivé na vnější prostředí. U ostatních treponemat je odolnost větší. Přenos je u *T. pallidum* pouze pohlavní a z matky na plod, u ostatních treponemat i nepohlavním kontaktem, hmyzem a podobně.

### ***Borrelia burgdorferi sensu lato***

(= v širším slova smyslu) vlastně zahrnuje několik klíšťaty přenášených druhů, způsobujících Lymeskou boreliózu. Nejvýznamnější jsou *Borrelia burgdorferi sensu stricto* (= v užším slova smyslu), *B. garinii* a *B. afzelii*. U nás se vyskytuje hlavně druhá a třetí z nich; jejich příznaky bývají nervové a kožní. V USA se vyskytuje spíš první z nich a příznaky bývají kloubní. Nemoc má tři stádia, od nespecifických ke specifickým. Klasickým příznakem jsou stěhovavé červené skvrny (erythema migrans).

### ***Borrelia vincenti***

se s fuzobaktérií podílí na vzniku Plaut-Vincentovy angíny.

***Borrelia recurrentis* a *Borrelia duttoni*** způsobují návratnou horečku. Přenašečem je veš šatní.

*Borrelia recurrentis* se vyskytuje i na jihu Evropy. *B. duttoni* pouze v tropech. Při nemoci je zvětšená slezina a játra. Horečky trvají několik dnů, pak odejdou a vrátí se. Zdrojem jsou nejrůznější zvířata (hlavně hlodavci). Důležitý je přenos členovci. Mezi druhem borrelie a druhem přenašeče bývá vztah.

### **Leptospiry**

Dnes se uznává jediný patogenní druh - *Leptospira interrogans* (druh *Leptospira biflexa* je nepatogenní). To, co se dříve označovalo za druhy, jsou dnes jen serotypy. Závažný serotyp icterohaemorrhagiae vyvolává Weilovu chorobu (žloutenka, krvácení, poškození ledvin, těžký stav někdy končící smrtí), typ grippotyphosa blaťáckou horečku (něco mezi chřipkou a tyfem). Leptospiry jsou odolnější než treponemata. Zdrojem jsou infikovaná zvířata (krysy, potkani, hraboši, myši), člověk se nakazí kontaminovanou vodou, potravinami, kousnutím. Leptospiry mohou pronikat i kůží.

## **Diagnostika**

### **Leptospiróza**

U leptospirózy se používá zástinová mikroskopie (viz jarní semestr) a kultivace ve speciálním médiu.

### **Lymeská borrelióza**

Diagnostika Lymeské borreliózy je především sérologická, v indikovaných případech je využita metoda PCR. Sérologii se stanovují IgM (svědčí pro časnou infekci) a IgG protilátky metodou ELISA, pozitivní nález se ověřuje Western blotem. Western blot je specifitější metodou.

## **Syfilis**

### **METODY PŘÍMÉHO PRŮKAZU**

Lze je použít pouze ve fázích, kdy je co odebrat (například spodina z tvrdého vředu).

- Zástinová mikroskopie
- Fluorescenční mikroskopie
- PCR – je v současnosti nejvýkonnější metodou přímého průkazu
- RIT (rabbit infectivity test – kulturační pokus na králíčích varlatech)

### **METODY NEPŘÍMÉHO PRŮKAZU**

Screening se provádí pomocí jedné metody netreponemové (reakce RRR, je to precipitace, antigenem je kardiolipin z hovězích srdcí) a jedné metody treponemové (reakce TPHA, je to pasivní hemaglutinace). Popis obou metod najdete v repetitoriu jarního semestru v příslušných kapitolách. RRR je nespecifický test, občas pozitivní i při jiných infekcích, nebo v těhotenství. Slouží také k monitorování úspěšnosti léčby.

Konfirmace (potvrzení) se provádí buďto tam, kde screening je aspoň částečně pozitivní, nebo tam, kde je závažné podezření na infekci. Provádí se zejména nepřímou imunofluorescencí (FTA-ABS), reakcí ELISA a Western blotem. ELISA a Western blot umožňují stanovit protilátky IgM, které svědčí pro časnou infekci.

Spíše historický význam má dnes TPIT (Nelsonův test) = *Treponema pallidum* imobilizační test.

Laboratorní kmen je smíchán s pacientovým sérem. Obsahuje-li sérum protilátky, je kmen zbaven pohyblivosti, což se ozřejmí v zástinu.

## P10 Klinická mykologie

### P10 Klinická mykologie

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. Pojem spora se obvykle používá ve spojení s pohlavním rozmnožováním, pojem konidie se obvykle používá ve spojení s nepohlavním rozmnožováním.

Vědecká klasifikace hub se pořád vyvíjí. Situaci komplikuje fakt, že spousta hub se může vyskytovat ve více formách – jednu má 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.

Mikroskopické houby jsou velmi různorodá skupina. Z hlediska patogenity a míry adaptace se mohou dělit do šesti tříd. 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).

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*, *Microsporium*), a podkožní (*Sporothrix*)
- Mykózy orgánové či systémové (*Cryptococcus*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Histoplasma*, *Coccidioides*, *Blastomyces*, *Paracoccidioides*),
- Kandidózy mají zvláštní postavení. Nejvýznamnější z kandid je druh *Candida albicans*, důležité jsou ale i některé další - *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*. U

závažných onemocnění je druhové určení užitečné - některé druhy mají přirozenou rezistenci vůči některým antimykotikům.

## Odběr vzorku

Při podezření na povrchové mykózy se posílají šupiny, seškrab z nehtů, vlasů apod. Je potřeba dát pozor, aby se poslal materiál z okrajové části ložiska, kde jsou houby vitální, a zároveň nikoli z povrchu, kde jsou vlákna hynoucí či již uhynulá, případně se tam mohou vyskytovat spóry vzdušných plísní, které by vzorem mohly kontaminovat. U kvasinek se používají výtěry, výhodou je zaslání v transportním médiu např. FUNGIquick, u gynekologických a andrologických materiálů C. A. T.

## 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 fialově, přestože jejich buněčná stěna nemá nic společného s buněčnou stěnou grampozitivních bakterií.

V některých případech se používají speciální barvení.

U vláknitých hub je mikroskopie základním prostředkem jejich identifikace.

V preparátech posuzujeme charakter a stavbu vláky, rozmnožovacích orgánů, příp. dalších typických struktur.

U kvasinek má mikroskopie relativně menší význam, zde je větší význam biochemického průkazu. Naproti tomu u vláknitých hub umožňuje mikroskopie rozlišení pomocí tvaru mycelií, spor a konidií.

V některých případech je nutno před mikroskopií rozvolnit struktury např. kožní šupiny, což se provádí louhem.

### Kultivace

Základem je Sabouraudův agar. Většinou se nalévá jako šikmý agar do zkumavek, takže i při dlouhodobé kultivaci (vláknitých hub) půda nevyschne. Sám o sobě není selektivní, ale přidávají se doň zpravidla antibiotika, čímž je znemožněn růst bakterií.

Kvasinky zachytíme i při bakteriologické kultivaci na krevním agaru. Od kolonií

*Staphylococcus epidermidis* nebo *Corynebacterium* sp. se odliší někdy kvasnicovou vůní, ale někdy teprve nátěrem či kultivací na selektivní půdě.

Pro rozlišení kandid se používají různé chromogenní půdy (viz jarní semestr, kultivace)

### Biochemická identifikace

Provádí se např. pomocí zjištění jejich kvasných vlastností (auxonogram) či schopnosti využít určitý substrát (zymogram) a dalších testů. Biochemické reakce mohou být sdruženy do komerčně dodávaných sad testů. např. souprava Auxacolor, jde o test v panelu, co do způsobu odečítání v podstatě analogický biochemickým identifikačním testům na bakterie.

### Nepřímý průkaz

průkaz antigenů (mannan, galaktomannan) protilátek (antimann) má význam u systémových mykóz, např. u kandidóz a aspergilózy.

## Testování citlivosti na antimykotika

připadá v úvahu u kvasinek, nikoli u vláknitých hub. Difusní diskový test se dělá, ale není spolehlivý. Spolehlivější jsou E-testy a mikrodiluční testy, např. tzv. FUNGITest.

Používají se antimykotika několika skupin:

**Polyenová antimykotika:** AMFOTERICIN B je vysoce účinné, širokospektré rezervní antimykotikum k léčbě velmi závažných infekcí. Bohužel je značně toxické. Menší toxicitu má ve směsi intralipidem nebo ve formě liposomů.

**IMIDAZOLOVÁ ANTIMYKOTIKA**, jako je ketokonazol, mikonazol aj., se používají k běžné léčbě lokální, příp. i celkové.

**TRIAZOLOVÁ ANTIMYKOTIKA:** itrakonazol (SPORANOX), flukonazol (DIFLUKAN) a vysoce účinný vorikonazol (V-FEND) U flukonazolu je problémem primární rezistence některých druhů kandid (*C. krusei*, *C. glabrata*).

**5-FLUOROCYTOSIN** (flucytozin) je relativně širokospektrý a dobrou účinností. Bohužel na něj vzniká snadno rezistence, proto se hodí se pro léčbu v kombinacích

**ECHINOKANDINY:** Caspofungin nové vysoce účinné antimykotikum se širokým spektrem

## P11 Lékařská parazitologie

### Úvod

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)
  - *T a s e m n i c e* (Cestoda) - např. tasemnice dlouhočlenná
  - *M o t o l i c e* (Trematoda) - např. motolice jaterní
- *Červi oblí* (oblovci) - Nematoda čili hlístice - např. škrkavka

Paraziti vnější (hmyz a roztoči) - např. zákožky, vši, blechy, štěnice apod.

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

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

urogenitální paraziti – například trichomonády

krevní paraziti – například malarická plasmodia, trypanosomy, filárie

tkáňoví paraziti – například toxoplasma, leishmanie, částečně i tentohlavci bičíkoví

Paraziti vydrží zpravidla méně než bakterie, zato se mohou často aktivně cíleně pohybovat (skrz kůži, napříč naším tělem). Přenos je nejčastěji fekálně-orální, kontakt, častý je také přenos specifickým přenašečem, zejména u tropických parazitóz.

### Odběr vzorku

Posílají se různé kusové vzorky, a to i v případě stolice. Výjimečně se posílá něco jiného, např. nátěr na sklíčko (MOP), tenký roztěr a tlustá kapka (malárie), sklíčko s lepící páskou (Grahamova metoda na roupy) či výtěr na médium C. A. T. (diagnostika trichomonád).

V případě stolice se doporučuje vzorek velikosti lískového (nikoli kokosového) ořechu.

## Diagnostika

### MIKROSKOPIE

Mikroskopie je základem diagnostiky většiny parazitů. Používají se barvicí metody (Giemsa, trichrom), ale dost často i nativní preparát. Často se však využívají složité koncentrační metody před vlastní mikroskopií (Kato, Faust – viz dále)

### KULTIVACE

Používá se prakticky jen u trichomonád a akantaméb. U trichomonád je kultivačním médiem je samotné transportní médium. Výsledek se odečítá jako nativní preparát.

### NEPŘÍMÝ PRŮKAZ

Používá se hlavně u tkáňových parazitóz, kde ani jiná diagnostika není možná, především u toxoplasmózy a larvální toxokarózy (nemoc způsobená tkáňovými škrkavkami *Toxocara canis* a *T. cati*). Připadá tu v úvahu např. KFR a ELISA.

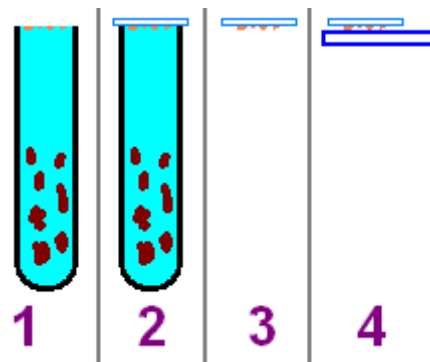
## Popis speciálních testů

### Metoda dle Kato

Vrstva rozsuspendované stolice, ve které předpokládáme parazity, se překryje celofánem napuštěným malachitovou zelení.

### Faustova koncentrační metoda

Vzorek se smíchá s nasyceným roztokem síranu zinečnatého. Pak se centrifuguje. Pro další proces se použije jen část těsně u hladiny. Ta se opět smíchá se síranem a opět centrifuguje, a pak totéž ještě jednou. Nakonec se zkumavka dolije síranem až do okraj. Na hladinu se přiloží krycí sklíčko, které se pak zase přenesse na podložní sklíčko. Jsou-li přítomni parazité, nalepí se na krycí sklíčko zepředu.



### Grahamova metoda na roupy.

Máme-li podezření na opravdové roupy (nikoli roupy v přeneseném slova smyslu, které má téměř neustále autor těchto řádků), hodí se nám Grahamova metoda.

Pacient (většinou dítě) na nás vystrčí zadek. Na řiť se mu nalepí speciální a zásadně průhledná lepicí páska. Hýždě se přitisknou k sobě. Poté se páska opět odlepí a nalepí se na podložní sklíčko. To se pak prohlídí v mikroskopu.

Metoda se nehodí pro pacienty, mající chlupatou řiť. V takovém případě se doporučuje standardní vyšetření stolice.

## Báseň

Šel jsem oběd naraziti  
V menze byli paraziti  
Škrkavky a lamblie  
Spolužačka tam...

## Hádanka

Víte, jaký je rozdíl mezi českým vědcem a tasemnicí? (Odpověď je bílou barvou)



## P12 Klinická mikrobiologie I

Zatímco „sensu lato“ je klinická mikrobiologie synonymem lékařské mikrobiologie jako celku, existuje ještě klinická mikrobiologie „sensu stricto“, tedy v užším slova smyslu.

### Obecné zásady odběru a transportu infekčního materiálu

#### 1. Indikace mikrobiologického vyšetření.

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

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

V některých případech si musí klinik ujasnit nejen zda se rozhodne pro vyšetření, ale také pro jaké konkrétní vyšetření. První otázka je, zda provést přímý průkaz (má vždy přednost) nebo nepřímý (pokud přímý neexistuje, je obtížný, anebo pokud není na přímý průkaz co odebrat – např. u toxoplasmózy)

Rozhodnout se ale musíme i v rámci jednotlivých metod nepřímého či přímého průkazu.

To se týká serologických a virologických vyšetření (protilátky proti kterému mikrobovi?), ale často také bakteriologických vyšetření (například požadavek anaerobní kultivace, popřípadě současného vyšetření bakteriologického a mykologického).

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

#### 2. Odběr vzorku – problém má několik částí:

##### **VOLBA VHODNÉHO VZORKU – PŘÍKLADY:**

- u infekcí DCD není vhodný výtěr z krku, daleko lepší je vzorek sputa (ne sliny)
- nevhodný je roztok borové vody u výplachu dutin, neumožňuje přežití patogenů

##### **SPRÁVNÉ NAČASOVÁNÍ:**

- odebrat vzorek před zahájením antibiotické léčby
- u serologických vyšetření je nutno provést nejméně dva odběry, druhý za dva až tři týdny
- u některých parazitóz je vhodné načasování prodiskutovat s mikrobiologem

##### **SPRÁVNÉ PRAVIDLO ODBĚRU – TADY BÝVÁ ČASTO ZAKOPANÝ PES NEÚSPĚCHU VYŠETŘENÍ - NAPŘÍKLAD**

- jestliže se odebere moč nesterilně, zachytí se místo patogenů kontaminanta
- jestliže je odebrán výtěr z kořene jazyka namísto z tonzil, je výsledek značně zkreslený.

##### **POUŽITÍ VHODNÉ ODBĚROVÉ SOUPRAVY (V PŘÍPADĚ VÝTĚRŮ A STĚRŮ)**

- suchý tampon je zpravidla nevhodný, s výjimkou PCR a některých průkazů virových antigenů
- používá se transportních půd, univerzální (pro bakteriologii) je půda Amiesova.
- pro mykologii souprava Fungiquick, zvláštní soupravy také u izolace virů a chlamydií



- u poševních a uretrálních výtěrů nejlépe kombinace Amies + C. A. T., kde Amies je na bakterie a C. A. T. na kvasinky a trichomonády

#### **POUŽITÍ VHODNÉ NÁDOBKY (V PŘÍPADĚ TEKUTÝCH A KUSOVÝCH MATERIÁLŮ)**

- ve většině případů nezáleží na typu nádoby, ale jen na tom, aby nádoba byla sterilní
- nesterilní nádoby jsou přípustné jen u parazitologického vyšetření stolice
- u materiálů, kde je nutné též anaerobní vyšetření, je ideální zaslání přímo v injekční stříkačce bez vzduchu s jehlou zabodnutou do sterilní zátky
- u hemokultur se dnes používají speciální transportně-kultivační lahvičky pro automatickou kultivaci; lze je použít i pro některá další vyšetření
- u dermatomykóz se zasílají nehty, vlasy, šupiny a podobně
- u izolace virů nutno nádobku vložit do systému udržujícího teplotu kolem 0 °C

#### **POUŽITÍ DALŠÍCH ZPŮSOBŮ VYŠETŘENÍ:**

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

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

### **3. Vyplnění průvodky.**

- nutné precizní vyplnění osobních údajů (pacienta, pojišťovna aj. – kvůli platbě)
- ještě větší pozornost nutno věnovat pozornost také údajům odborného rázu: Základem přesný popis materiálu a požadovaného vyšetření.

#### **PŘÍKLADY ČASTÝCH CHYB:**

- označeno pouze „výtěr“, aniž by bylo zřejmé, zda se jedná o výtěr z krku, pochvy či odjinud; přitom v laboratoři se každý typ materiálu zpracovává poněkud odlišně
- ani označení „stěr z rány“ nestačí (je rozdíl, jde-li o ránu operační, traumatickou, zhnisanou, zda je lokalizována na bříše, na končetině či třeba perianálně).
- u „katetrizované moče“ rozlišit katetrizaci kvůli odběru (citlivější než moč běžně odebraná) od moče z permanentního katetru (naopak vyšší pravděpodobnost kontaminace)
- není uvedeno, zda je požadováno např. anaerobní vyšetření apod.

Kuriózní nedorozumění se občas stává, je-li vzorek označen „výtěr z hrdla“, přičemž není jasné, jedná-li se o cervix či o farynx ☺.

#### **Z DALŠÍCH DŮLEŽITÝCH ÚDAJŮ:**

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

V případě mimořádných vzorků je dobré upozornit laboratoř i telefonicky.

#### **4. Zaslání materiálu do laboratoře**

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

#### **5. Vlastní zpracování materiálu v laboratoři**

I tuto fázi může klinické pracoviště ovlivnit, např.:

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

#### **6. Zaslání výsledku a jeho interpretace**

##### **ZASLÁNÍ VÝSLEDKU**

- zorganizovat tak, aby nedocházelo ke zbytečným prodlevám
- dnes zpravidla možnost využít zasílání vzorků elektronicky (v rámci zdravotnického zařízení i mezi zařízeními navzájem)
- dohodnout s mikrobiologem, zda má být zaslán až konečný výsledek nebo i mezivýsledek
- dohodnout, kam má být výsledek poslán, je-li při odběru známo, že bude pacient přeložen

##### **INTERPRETACE**

- laboratoř zpravidla odfiltruje zcela evidentní kontaminanty z prostředí a náhodné nálezy
- v méně jednoznačných případech ovšem konečné rozhodnutí leží na klinickém pracovišti
- vodítkem může být poznámka ke kvantitě („ojediněle“, „masivně“), nesmí se ale přecenit
- u vzorků z dutin normálně osídlených běžnou flórou je nezbytné chápat ekosystém mikrobů jako celek, nemoc je často porušením rovnováhy mezi mikroby a léčba antibiotiky nemusí být nutná
- interpretace serologických vyšetření: samotná přítomnost protilátek není zpravidla významná, důležitější je titr a zejména jeho dynamika.

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

## 7. Kontinuální spolupráce mezi klinikem a laboratoří

Může mít nejrůznější formy, od občasných konzultací až po součinnost při výzkumné práci. Je oboustranně užitečná. Klinikovi pomáhá při rozhodování, mikrobiologovi zase dává konkrétnější představu o pacientech, jejichž vzorky mu procházejí rukama.

## Přehled základních odběrových souprav a nádobek

Pro NEPŘÍMÝ PRŮKAZ používáme prakticky vždy zkumavku na sérum, neboť vzorkem je v tomto případě vždy srážlivá krev.

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

### Výtěrky

#### SOUPRAVA S BAKTERIOLOGICKOU TRANSPORTNÍ PŮDOU (NEJČASTĚJI AMIESOVOU)

je základem všeho. Hodí se prakticky k jakémukoli bakteriologickému kultivačnímu vyšetření.

#### SUCHÝ TAMPON

Lze použít jen výjimečně: PCR nebo některé průkazy antigenu, kde nepotřebujeme živého patogena, ale jen jeho antigen či DNA, a transportní půda by byla spíše na škodu. Výjimečně se lze se suchým tamponem spokojit u některých kontrolních výtěrů.

#### FUNGIQUICK

je souprava na mykologické vyšetření

#### SOUPRAVY PRO VIRY A PRO CHLAMYDIE

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

#### C. A. T.

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

### Zkumavky

mohou mít různé rozměry, ale musí být sterilní. (Výjimkou je souprava na odběr stolice na parazitologii, ta sterilitu nevyžaduje.) Širší samostojací zkumavce říkáme sputovka, ale zdaleka nemusí sloužit jen k zaslání sputa.

#### HEMOKULTIVAČNÍ NÁDOBK

dnes obsahuje nejen protisrážlivou látku, ale i transportně-kultivační médium. Slouží pro automatickou kultivaci krví. Existují různé typy – aerobní, anaerobní, pediatrické, u všech ještě ve variantě s aktivním uhlím (k adsorpci antibiotik a jiných látek, které by mohly negativně ovlivnit přežití mikroba).

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).

U hemokultur je nutno

- provést dva až tři odběry, při vzestupu teploty

- vždy z nové venepunkce (odběr ze zavedeného vstupu případně učinit také, ale počítat ho „navíc“, nad rámec „normální hemokultivace“)
- odběr provést striktně asepticky (místo vpichu desinfikovat, ne jen čistit benzinem či lihobenzinem)
- použít pro celou sérii stejný typ nádoby
- pečlivě označit, včetně data a HODINY odběru
- při interpretaci zohlednit, zda ve všech hemokulturách jedné série je zachycen stejný kmen a zda kultivační pozitivita byla po zhruba stejné době

## **Další způsoby odběru**

### **SKLÍČKO**

přímým nátěrem na sklíčko 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) sklíčka si už provede laboratoř.

### **MOP**

Je zvláštním případem zasílání na sklíčku.

Do laboratoře přicházejí dvě sklíčka. Jedno se obarví podle Grama, druhé podle Giemsy.

Je to tak proto, že podle Grama bys se nedaly barvit trichomonády, které se barví právě podle Giemsy. MOP se hodnotí dvojím způsobem: Za prvé se zhodnotí kvantita jednotlivých elementů (jeden až čtyři křížky), jednak se MOP zhodnotí celkově - číslem MOPu, někdy s uvedením podskupin. Základních typů MOPů (čísel) je šest:

- MOP I: obraz zdravé ženy. Obsahuje hlavně epitelie a laktobacily, málo leukocytů
- MOP II: i tento obraz mohou mít zdravé ženy, nebo může znamenat nespecifický nehnisavý zánět. Oproti prvnímu typu obsahuje více různých bakterií. Leukocyty však chybí. U takzvaných "bakteriálních vaginóz" vidíme zvláštní epitelie, na které jsou nalepená velká kvanta bakterií. Říká se jim "clue cells".
- MOP III: typický bakteriální hnísavý zánět. Obsahuje leukocyty, spoustu různých bakterií, relativně méně epitelii, zato laktobacily chybějí nebo je jich málo.
- MOP IV: Kapavka. Vlastně vypadá jako MOP III, ale místo různých bakterií obsahuje skoro samé gramnegativní diplokoky. Některé jsou i uvnitř leukocytů.
- MOP V: Je ho vidět především v Giemsově barvení. Obsahuje spoustu leukocytů, může, ale nemusí obsahovat všelijaké bakterie, a především obsahuje útvary, které jsou větší než leukocyty, menší než epitelie, jsou šmolkově modré a mají špičatá, karmínově červená jádra: jsou to trichomonády.
- MOP VI: Poševní mykóza. Nejzávažnější obsahují hodně leukocytů, méně závažné obsahují leukocytů méně. Vždycky jsou ale přítomny kvasinky. Významné je i to, jestli tvoří jen jednotlivé buňky (klidová fáze) nebo pučí a větví se (nebezpečnější, aktivní fáze).

Je důležité nezaměnit kvasinky za jádra spermií, která se jeví podobně a která mohou být v nátěru přítomna jako následek chvil vášně, které vyšetřovaná žena prožívala před odběrem.

MOPy dnes prakticky k vyšetření nepřicházejí, z nejméně 99 % je nahradily výtěry na soupravě C. A. T.

### **URIKULT**

byl jednu dobu zvláštním způsobem zasílání moče. Moč se přímo na klinickém pracovišti nalila do nádoby 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.

## **Píseň – „Hemoškovadlo“**

1. Byla jedna z kalných zimních neděl  
v houfu mračen den se ve tmu smrákal  
Primář právě do bujónu hleděl  
je to čiré, nebo je tam zákal?  
Tuhle službu, tu mi byl čert dlužen -  
- do bujónu hledět na šestý den  
Lepší hledat útočiště u žen  
nežli zkoumat krev co je tu týden

R. A přitom jej náhle napadlo:  
Zakoupíme hemoškovadlo  
Nejsme blbci, máme filipa  
Koupíme si stroj, co zapípá

2. Do přístroje hemoška se strčí  
Ostatní už automat si hlídá  
Kultivuje, spokojeně vrčí  
Technika tu lidskou práci střídá  
Když se zvuky začnou linout divné  
Je to znakem, že tam něco roste  
Automat nám vzorek hned vyplivne  
Milý Watsone, je to tolik prosté!

R. Dobře, že primáře napadlo  
Zakoupiti hemoškovadlo  
Důležité je mít filipa  
Koupit si ten stroj, co zapípá.

## **P13 Klinická mikrobiologie II**

### **Běžná flóra**

Běžná flóra je soubor mikrobů (hlavně bakterií), které normálně osidlují tělní povrchy a některé tělní dutiny. I v rámci běžné flóry se ale nechovají všechny mikroby stejně.

- "Klasická" běžná flóra. Tyto mikroby mají velmi nízkou patogenitu, přesto nikdy nejsou zcela nepatogenní. Jejich patogenita se projeví především tehdy, když se dostanou tam, kam nemají. Na určených místech se vyskytují téměř vždy. Příklad: ústní neisserie, viridující streptokoky, *Escherichia coli* ve střevě. koaguláza negativní stafylokoky na kůži

- Nekultivovatelná část "klasické" běžné flóry se od předchozí liší jen tím, že ji při běžném vyšetření nezachytíme. Příklad: anaeroby v ústech, střevě i pochvě, nepatogenní spirochety v ústech a mnoho dalších mikrobů
- Přechod mezi běžnou flórou a patogenem představují mikroby, které jsou více patogenní než předchozí. Záleží velice na konkrétní situaci, počtu a virulenci mikrobů i stavu makroorganismu. Příklad: meningokoky či pneumokoky v krku, *Streptococcus agalactiae* v pochvě, zlatý stafylokok na kůži
- Přechodná (transientní) běžná flóra jsou bakterie, které sice na určité místo normálně nepatří, přesto se tam mohou v určitých případech vyskytnout, aniž by to znamenalo skutečnou infekci. Příkladem je výskyt enterobaktérií v ústech, pseudomonád či stafylokoků ve střevě apod.
- Kolonizace je stav, kdy určitý mikrob nebo mikroby sekundárně osídlí místo, kde dříve žádné mikroby nebyly nebo tam byly jiné, a vytvoří se stav rovnováhy. Kolonizující mikroby se pak chovají v podstatě jako běžná flóra. Příkladem je kolonizace močového měchýře starých osob enterobaktériemi

<b>Přehled běžné flóry</b>	Klasická běžná flóra, dobře kultivovatelná	Také normální běžná flóra, ale nezachytí se (obtížná kultivovatelnost)	Přechod mezi běžnou flórou a patogenem
Kůže (včetně boltce, zevního zvukovodu, zevní třetiny nosu, spojivk. vaku apod.)	Koag. neg. stafylok., Corynebacterium sp.	-	Staphylococcus aureus (malá množství), Candida
Ústní dutina + farynx	Ústní neisserie a streptokoky, případně hemofily (hlavně H. parainfluenzae)	Anaeroby (Prevotella, Porphyromonas, Actinomyces, Fusobacterium), nepatogenní spirochety	Malá množství meningokoků, pneumokoků, zlatých stafylokoků, Moraxella catarrhalis, event. i S. pyogenes
Močové cesty	Normálně bez mikrobů, u starších lidí kolonizace střevní flórou		
Tlusté střevo	E. coli, další enterobakterie, enterokoky	Anaeroby včetně klostridií,	Entamoeba coli, kvasinky, vlastně i některé enterobakterie
Tenké střevo	Podobné jako v tlustém střevě, ale menší množství		
Žaludek, jícn	Normálně bez mikrobů		
Předkožkový vak	Kožní mikroflóra	Nepatogenní mykobakteria	
Pochva	Laktobacily, stafylokoky	Anaeroby (malá množství)	Streptococcus agalactiae, Gardnerella, Mobiluncus aj.
Děloha, vejcovody	normálně bez mikrobů		
Vulva, ret, řiť apod.	směs mikroflóry kůže a mikroflóry přiléhající dutiny		

## Vztahy mikrobů běžné flóry a patogenů

Je nutno počítat s tím, že za běžných podmínek neexistuje jednoduchý vztah mikrob - makroorganismus. Mikroby se ovlivňují i navzájem - ty z běžné flóry i ty více či méně patogenní. Dohromady vzniká ekosystém stejně složitý jako třeba ekosystém louky

nebo rybníka. Baktérie jsou do jisté míry schopny reagovat na exoprodukty jiných bakterií jiného i stejného druhu a podle toho upravit i svoje chování, např. množení. Projev, kdy bakterie sledují celkový počet svého a příbuzných druhů v populaci, se používá pojem quorum sensing (jakoby "sledování kvóra potřebného k hlasování v parlamentu").

Baktérie (ani jiné mikroby) nenacházíme moc často v "planktonické formě", ve které je najdeme např. v bujónu. Tvořívaly často biofilm - vrstvičku, kterou známe třeba z povrchu kamenů v rybníce. Do biofilmu špatně pronikají antibiotika a vůbec se dá říci, že bakterie jsou tu lépe chráněny.

## **Nejčastější patogeny jednotlivých orgánových soustav**

### **Horní cesty dýchací**

*Streptococcus pyogenes* (hlavně záněty mandlí neboli tonsilitidy čili angíny), *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*. Dále různé viry (RS viry, adenoviry, rhinoviry), popř. kvasinky. Zvláštním případem je zánět příklopky hrtanové, typicky způsobený hemofilem.

### **Dolní cesty dýchací**

*Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Mycobacterium tuberculosis*, viry chřipek, parachřipek, aspergily a další

### **Trávicí cesty**

V dutině ústní kandidy a různé bakterie. V žaludku helicobakter. Ve střevě kampylobaktery, salmonely, shigely, yersinie, klostridia a jejich toxiny, kvasinky, paraziti (entamoeba, lamblie...), viry (hlavně rotaviry).

### **Močové cesty**

*Escherichia coli* a další enterobaktérie, enterokoky, *Streptococcus agalactiae*, kvasinky, stafylokoky, některé viry, vzácně paraziti

### **Pohlavní orgány**

Kapavka, syfilis, *Haemophilus ducreyi*, *Chlamydia trachomatis* (některé sérotypy), mykoplasmata a ureaplasmata, *Streptococcus agalactiae*, enterobaktérie, *Gardnerella vaginalis*, *Mobiluncus mullieris*, trichomonády, kvasinky, papilomaviry

### **Kůže, oko, zevní zvukovod**

*Staphylococcus aureus*, kvasinky, plísně, *Propionibacterium acnei*, zákožka svrabová. Některé virózy se projevují n kůži, ale nejde o lokální infekci

### **Infekce krevního řečiště**

Stafylokoky (zlaté i koaguláza negativní), enterokoky, enterobaktérie, gramnegativní nefermentující tyčinky. Záleží na okolnostech - stafylokoky jsou typické u katérových sepsí (kdy stafylokoky putují do těla po cévkách).

### **Kosti, chrupavky, svaly, vazivové tkáně**

Stafylokoky, anaeroby (hlavně v okolí ústní dutiny, střeva a pochvy), streptokoky, případně cokoli, co se do tkáně dostane zvenčí (např. při úrazu nebo operaci)



## Mozek, mícha a nervy

Mozkomíšní mok může být hnisavý - pak se mluví o hnisavé meningitidě. Nejčastějšími původci jsou

*Streptococcus agalactiae* – novorozenci (nákaza při porodu)

*Haemophilus influenzae* – děti 2 – 5 let (rapidně ubývá po zavedení očkování)

*Neisseria meningitidis* – dospívající a mladí dospělí; ale také malé děti

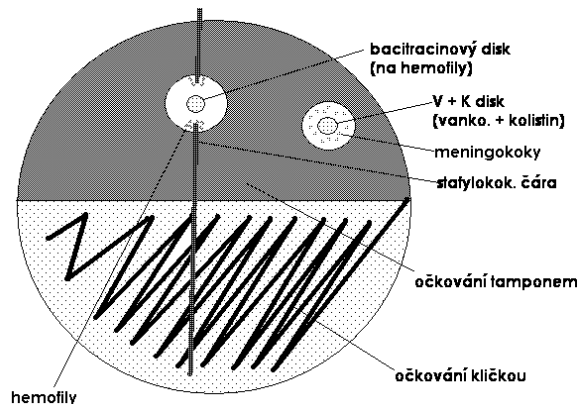
*Streptococcus pneumoniae* – starší lidé

Z dalších infekcí: původce tuberkulózy, virus klíšťové encefalitidy, některé herpesviry, virus vztekliny, někteří paraziti (toxoplasma), výjimečně kvasinky a plísně.

## Vyšetření jednotlivých typů vzorků

### Výtěr z nosu, krku, ústní dutiny a ucha

- Zpracovává se zpravidla jen aerobně, na krevní agar + čtvrtinu nebo polovinu Endova nebo McConkeyho agaru. Na krevní agar se nanese na polovinu štětičkou, rozočkuje se kličkou. Na štětičkovou část se umístí
- disk s vankomycinem a kolistinem (odcloní běžnou flóru, odhalí rezistentní meningokoky)
- stafylokokovou čáru
- na stafylokokovou čáru disk s bacitracinem (odcloní běžnou flóru, odhalí hemofily podle současného satelitového fenoménu)
- Výtěry z ucha se navíc očkují na KA s 10 % NaCl.
- Odečítá se po 24 hodinách a negativní obvykle ještě po 48 hodinách ("prodlužky").



### Výtěry z oka (spojivkového vaku)

se pouze zalévají bujónem. Teprve je-li bujón zakalený, vyočkovává se na KA a Endovu či jinou půdu.

### Sputum

- Pokud možno se homogenizuje, někdo spíše doporučuje vyhledat hnisavé vločky. Proveďte se nátěr na sklíčku, kde se semikvantitativně (na křížky) odečítají epitelie, leukocyty a různé tvary bakterií. Dále se zpracovává podobně jako výtěry (výše).
- Podobně se zpracovávají tracheální aspiráty (výcucy z průdušnice) a bronchoalveolární laváže (výplachy plic).

### Moč

- Moč se zpracovává semikvantitativně. Je více možností, jak to dělat. Jedna z nich je použití kalibrované kličky, například o objemu jednoho mikrolitru. Touto kličkou se rozprostře moč po celém povrchu krevního agaru (celé misky nebo její poloviny). Počet kolonií vynásobený tisícem pak zhruba odpovídá počtu mikroorganismů v jednom mililitru původní moče. Kromě KA se použije také Endo nebo McConkey. Některé

laboratoře používají místo KA jinou půdu, např. CLED, anebo vůbec používají speciální chromogenní agary.

- Semikvantitativní vyšetření nám aspoň částečně odliší patogeny (velké množství, čistá kultura) od kontaminace či kolonizace (menší množství, často několik různých druhů).
- Existují také speciální soupravy (např. Uricult), kde klinický lékař uvede odebranou moč přímo do kontaktu s kultivační půdou.

## **Stolice**

- Na rozdíl od předchozích materiálů se zpravidla nepoužívá KA. Použije se Endo a další půdy, např. XLD, MAL, CIN, kampylobakterová půda a jiné, někdo opět používá chromogenní půdy. U sv. Anny např. používáme následující postup:
- Při příjmu se stolice nasadí na Endovu půdu, CIN, kampylobakterovou půdu a XLD. U podezření na STEC (viz E. coli) se použije i McConkey se sorbitem. Odběrová tyčinka se pak vkládá do selenitového bujónu.
- Druhý den se odečte Endo a XLD. Selenit se vyočkuje znovu na Endo a dále na MAL. Případně se odečte McConkey se sorbitem.
- Třetí den se odečte Endo z pomnožení, MAL, CIN a kampylobakterová půda.
- V případě potřeby se použijí i další půdy (KA, půda na klostridia, TCŽS na cholera apod.)

## **Různé stěry, výtěry, punktáty, cévky močové i cévní, kusy tkáně a jiné**

U těchto materiálů se zvažuje zpracování podle konkrétní situace. Většinou se použije KA + Endo (nebo McConkey), často také půda s 10 % NaCl, někdy selektivní půda na streptokoky (s amikacinem) a další. Tekuté materiály se mikroskopují; výsledek se neodečítá na křížky, ale popisuje se slovně (například "amorfní hmoty, leukocyty, bakterie nenalezeny"). Prakticky vždy se po vyočkování na pevné půdy použije též bujón. V některých případech nelze jinak než např. cévku pouze zalít bujónem a teprve druhý den ji vyočkovat

## **Hemokultury**

by se měly odebírat pokud možno tři, při vzestupu tělesné teploty pacienta. Mělo by se hlídat, zda je odběr přísně sterilní, zda nemůže být kontaminován z kůže.

Dnes se hemokultury odebírají prakticky vždy do lahviček pro automatickou kultivaci. Laboratoř je pouze zaeviduje a umístí do automatu. Pokud automat hlásí pozitivitu, vyočkují se hemokultury na KA a Endo, udělá se nátěr a podle výsledku nátěru se přímo provede atb test - buď "grampozitivní" nebo "gramnegativní" sada antibiotik.

## **Mozkomíšní mok**

Mozkomíšní mok se mikroskopuje, u podezření na hnisavou meningitidu se provede latexová aglutinace se specifickými séry (především meningokokovým, pneumokokovým, hemofilovým). Poté se provádí buď klasická kultivace (doplněná o čokoládový agar kvůli meningokokům), nebo se použije lahvička pro automatickou kultivaci jako u hemokultur.

## **Gynekologické materiály**

- Používají se zpravidla výtěry z poševní klenby a z děložního krčku (cervixu), někdy (u kapavky) i z ústí močové trubice. Občas se vyšetření doplňuje o výtěr z řiti.
- Kromě běžné bakteriologie (KA, Endo) se zpravidla provádí anaerobní vyšetření, vyšetření na mykoplasmata, popř. i další.
- Zvláštností je možné použití soupravy s transportní a kultivační půdou C. A. T., a dále možnost provést přímo nátěr materiálu na jedno či dvě podložní sklíčka. Jsou-li sklíčka dvě, hovoří se o vyšetření mikrobiálního obrazu poševního (MOP).

### **C. A. T.**

- Je to speciální odběrová souprava s průhlednou transportní a kultivační půdou (vedle hemokulturních lahvíček je to druhá výjimka z pravidla, že transportní půdy nemají nic společného s půdami kultivačními). Souprava přijde do laboratoře, zde se kultivuje 48 h při 37 °C a pak se výsledek hodnotí mikroskopicky. Lze najít kvasinky a pohyblivé trichomonády. Naopak pro diagnostiku bakterií je C. A. T. nevhodný - proto se téměř vždy provádí paralelně běžné bakteriologické vyšetření

### **MOP**

Byl probrán v předchozí kapitole.

**Hodně úspěchů u zkoušky z lékařské mikrobiologie všem krásným studentkám (to jsou všechny studentky) a všem sympatickým studentům přeje Ondřej Zahradníček**