

P10

**Klinická mikrobiologie I –
obecná**

Osnova

- klinická mikrobiologie
- procesy a organizace vyšetření
- normální mikroflóra a interpretace přímých a nepřímých průkazů

Klinická mikrobiologie

- **klinická mikrobiologie „v širším slova smyslu“**
 - lékařská mikrobiologie: **mikrobiálního osídlení člověka a lidské patogeny** (tj. obsah zkoušky Lékařská mikrobiologie)
- **klinická mikrobiologie „v užším slova smyslu“**
 - **procesy** na klinickém pracovišti a v laboratoři
 - **organizace** vlastního laboratorního **vyšetření** konkrétních typů vzorků

Procesy na klinickém pracovišti a v laboratoři



Indikace vyšetření

- **co se změní v závislosti na výsledku vyšetření?**
 - **cílená vs. empirická léčba** (pokud se postup péče o pacienta nezmění je vyšetření pravděpodobně zbytečné)
 - **neplatí u epidemiologických indikací a profylaktických indikací** (screening mikrobiálního osídlení pacientů v těžkém stavu)
- **jaké vyšetření chci provést?**
 - **orientace ve spektru možných patogenů a možností jejich vyšetření → rozhodnutí o technicky správném odběru**
 - **správný odběr je klíčový pro všechny další diagnostické kroky!**

Typy patogenů

- **kultivovatelné bakterie a kvasinky, někteří paraziti**
 - mikroby ze cvičení P01 až P06 (tj. patogeny typu *S. aureus*, *S. pyogenes* apod.)
 - **není nutné myslet na konkrétní druh patogenu**
 - **zachytitelné běžnými diagnostickými postupy**
 - **nutné znát lokalizaci patogenu v těle**
- **bakterie a mikromycety kultivovatelné speciálními postupy**
 - mikroby ze cvičení P06, (legionelly, bordetelly apod.) P07 (anaeroby), P08 (mykobakterie), J13 (mikromycety)
 - speciální postup **nutno vyznačit na žádance!**
 - **nutné znát lokalizaci patogenu v těle**

Typy patogenů (2)

- **nekultivovatelné nebo běžně nekultivované patogeny**
 - patogeny ze cvičení P09 (spirochety), J10 a J11 (viry), J12 (někteří paraziti, např. toxoplasma)
 - **nepřímý průkaz, přímý průkaz (virové antigeny)**
 - **není nutné znát lokalizaci patogenu v těle, ale nutné cílit na konkrétní patogen**

Úkol 1: Indikace mikrobiologického vyšetření

- **vymyslete vhodné řešení** pro následující kazuistiky
- zamyslete se, jestli je vhodné **indikovat vyšetření**
- zvolíte **empirickou** nebo **cílenou léčbu**, nebo budete léčit jen **symptomaticky**?

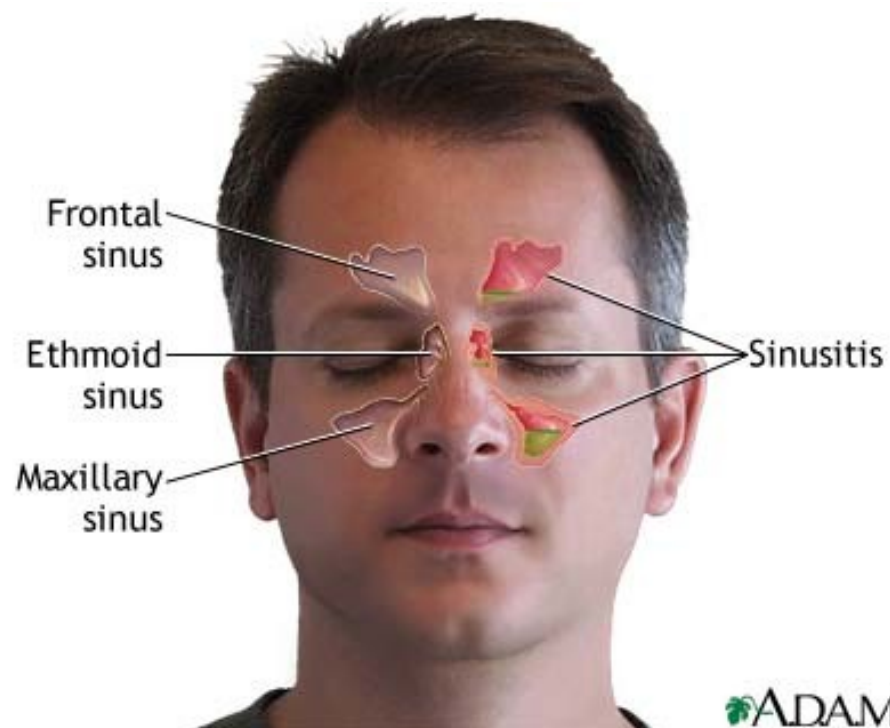
Úkol 1: kazuistika A

- **pacient se zarudlou, červenou mandlí a bělavým povlakem, podezření na angínu**



Úkol 1: kazuistika B

- **pacient s bolestivostí v oblasti obličeje, dle rtg zřejmě sinusitis, CRP vysoké (zřejmě tedy bakteriální původ), klinicky však není indikována punkce dutiny**



Úkol 1: kazuistika C

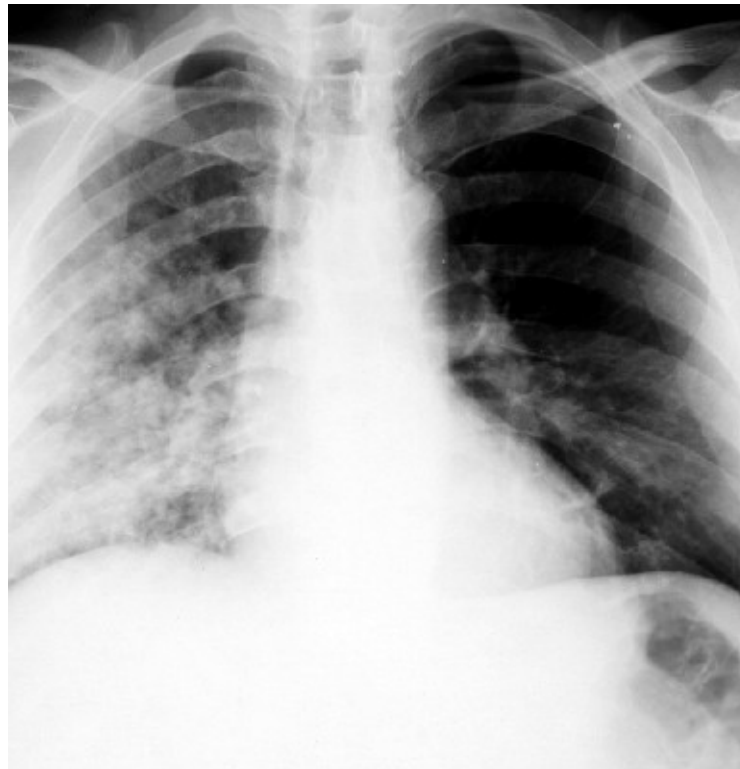
- **pacient s bolestivostí v oblasti zad, dle biochemických markerů vysloveno podezření na pyelonefritidu**



bbc.co.uk

Úkol 1: kazuistika D

- **pacient s prokázanou pneumonií, u kterého již bylo provedeno vyšetření sputa a nebyla potvrzena přítomnost běžných patogenů**
- **v anamnéze práce v živočišné výrobě**



Úkol 1: kazuistika A (závěr)

- **léčba bez mikrobiologického vyšetření vždy špatná**
- dle studií je nejméně **polovina tonsilitid virová** (včetně infekční mononukleózy), **klinické vyšetření nestačí ke správné diagnóze**
- nutné je **mikrobiologické vyšetření**, popř. **použití soupravy pro detekci *S. pyogenes*** přímo v ordinaci
- **v časové tísní alespoň CRP pro ověření bakteriální etiologie**
- v léčbě **při prokázané etiologii *S. pyogenes*** (nebo aspoň prokázané bakteriální etiologii pomocí CRP) **použijeme penicilin**
- **makrolidová antibiotika pouze u alergiků!**

Úkol 1: kazuistika B (závěr)

- **punkce není indikována ani mikrobiologicky** (punktovat pacienta jen kvůli vyšetřování je nutno považovat za jeho zbytečné týrání)
- **není indikován ani výtěr z nosu**, protože nalezené bakterie (často zlaté stafylokoky) se neshodují s patogenem přítomným v dutině (pneumokok, hemofil, moraxela)
- **doporučena empirická léčba**
- **amoxicilin** lék první volby (širokospektré β -laktamové antibiotikum)

Úkol 1: kazuistika C (závěr)

- **nutné vyšetření moče**
- **vhodné i hemokultivační vyšetření → odlišení systémového patogena** od bakterií přítomných pouze v močovém měchýři, případně kontaminace
- **léčba by měla být cílená**
- na rozdíl od cystitidy je při **pyelonefritidě** nutno volit **preparáty, které se dostatečně koncentrují i ve tkáních** a ne jen v moči (ne tedy např. nitrofurantoin)

Úkol 1: kazuistika D (závěr)

- **odběr srážlivé krve → vyšetření séra**
- navzdory anamnéze se zřejmě bude **uvažovat i o běžných respiračních patogenech ze spektra původců atypických pneumonií** (viry, mykoplasmata, chlamydie)
- vhodné **doplnit o serologický průkaz** tularémie, případně dalších **zoonóz** (například leptospirózy; pokud by šlo např. o zootehnika pomáhajícího v Africe, pak i např. brucelóza apod.)

Odběr vzorku a transport do laboratoře

- **při odběru nutné brát na zřetel i transport materiálu**
- **tři typy vzorků:**
 - **výtěry a stěry** na tamponech
 - **tekuté a kusové vzorky**, zasílané v nádobkách (zpravidla sterilních)
 - **jiné a speciální případy**
- **správné vyplnění průvodky**

Odběr vzorku

- **přednost má zpravidla zaslání tekutého/kusového materiálu** před pouhým zasláním stěru/výtěru
- **příklady výjimek:**
 - v bakteriologii se zpravidla používá **výtěr z řitního kanálu namísto kusové stolice** (i když zaslání kusové stolice v zásadě není chyba)
 - **stěr z uretry** je u kapavky, ale i negonokokových urethritid (NGU) doporučován spíše než zaslání vzorku moče

Odběrové soupravy

- **suchý tampon** (dnes jen pro PCR a průkaz antigenu, nikoliv kultivace), suchý tampon na drátku

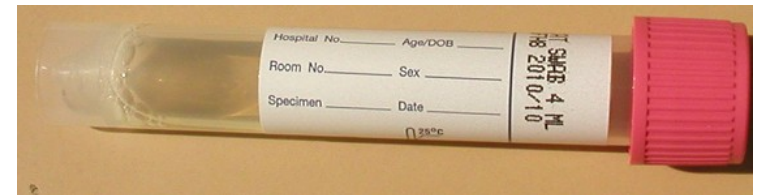
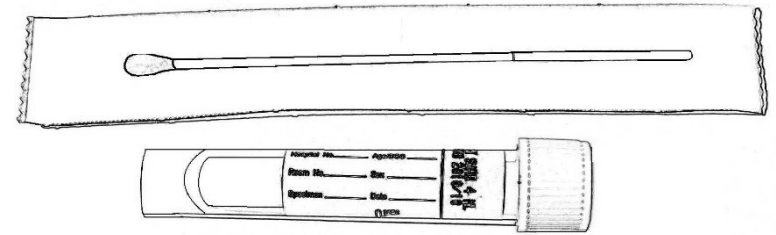


- **Amiesova půda s aktivním uhlím** (univerzální transportní půda pro bakteriologii pro všechny typy výtěrů)
- drátěná varianta je vhodná, pokud se potřebujeme „dostat za roh“ (stěr z rány s výběžky apod.)



Odběrové soupravy (2)

- **Fungi Quick** (na kvasinky a plísně)
- souprava **C. A. T.** (Candida And Trichomonas, pouze z genitálií)
- na viry
- na chlamidie

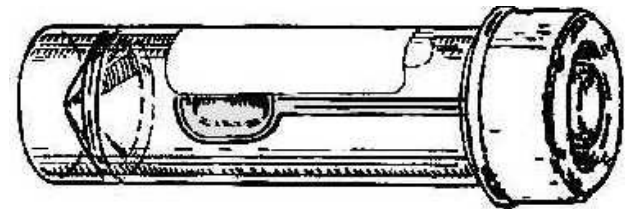
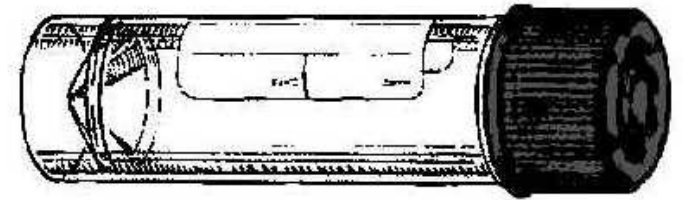
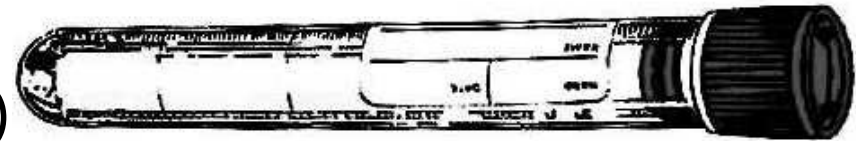


Odběrové nádoby

- **na kusové a tekuté vzorky**
- **na rozměrech nezáleží**
- barva uzávěru má význam jen v kontextu dodavatele
- **u anaerobní kultivace zaslat přímo stříkačku se speciálním uzávěrem** (ne s jehlou!)
- **vzorky dopravit do laboratoře co nejdříve** (u moče do dvou hodin)

Odběrové nádoby (2)

- **běžná zkumavka** (universální použití: srážlivá krev (serologie) moč, likvor, hnis, punktát apod., krevní a močové katetry, menší kousky tkání...)
- **sputovka** (sputum, větší kousky tkání, ...)
- **nádobka na stolici** – na parazitologii (pouze tato nemusí být sterilní!)
- **nádobka na odběr moče** (lepší, když pacient močí rovnou do zkumavky, avšak zvláště pro ženy obtížné; moč z této nádoby sestra přelije do zkumavky)



Úkol 3: Jiné odběrové metody než odběrovky a nádobky

- **nátěr na podložní sklíčko:** kapavka, aktinomykóza, přímo zasláná tlustá a tenká kapka apod.
- **otisk na agar:** v kožním lékařství a v epidemiologii otisky přímo na kultivační půdu, která je pro tento účel nalita až po okraj Petriho misky; v chirurgii otisk na filtrační papír, který je pak přiložen na misku s kultivační půdou
- **urikult** – zvláštní způsob zasílání moče v soupravě obsahující kultivační půdy; příliš se neujalo
- **rychlé diagnostické soupravy**, většinou založené na přímém průkazu antigenu; jednoduchá manipulace, dostupná i pro nemikrobiologický personál (při pochybách o výsledku následuje klasické zaslání vzorku do laboratoře)

Otisková metoda u některých ran

- čtvereček filtračního papíru je nanesen na ránu a přenesen na kultivační půdy



Uricult



Žádanka

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

Žádanka (2)

- **skutečnou diagnózu** (je-li více, napsat tu, která souvisí s vyšetřením, popř. všechny; např. (1) diabetes mellitus, (2) poševní výtok)
- **akutní / chronický stav / kontrola po léčbě**
- uvést stávající nebo uvažovanou **antibiotickou terapii**, případně i alergii na antibiotika
- cestovatelská **anamnéza** (návrat z tropů, ...), pracovní **anamnéza** (práce v zemědělství, ...)
- u serologických vyšetření **datum prvních příznaků**, první / druhý vzorek
- u gynekologických materiálů **fázi menstruačního cyklu** (při menses raději neodebírat)
- **mimořádné vzorky dohodnout telefonicky**

Úkol 4a: Vyplnění žádanky

- **vyplňte do žádanky jméno a údaje pacienta a požadované vyšetření dle kartičky**
- nezapomeňte vyplnit všechna důležitá pole (pole popisující pacienta, vzorek, amanmézu apod.)

Úkol 4b: Nejčastější chyby v žádance

- **pokuste se zjistit, které chyby jsou přítomny**
- častou **chybou** je **nedostatečné označení typu vzorku** nebo **požadovat vyšetření, které je nevhodné** (například pátrání po protilátkách tam, kde převažuje buněčná imunita a protilátky nemají diagnostický význam)

Úkol 4b: Nejčastější chyby v žádance

- **výsledky:**
 - **výtěr z rány: nedostatečné**, nutné přesnější uvedení typu rány a místa na těle
 - **tkáň na mikrobiologii**: naprosto nedostatečné, nutno více údajů
 - **výtěr z rekta na parazitologii**: nelze použít výtěr, nutno poslat kusovou stolicí
 - **kultivace syfilis**: treponemata nelze kultivovat

Rozhodnutí, jak zpracovat materiál

- **dáno standardními operačními postupy (SOP)**
- **pro každý typ vzorku je dáno v SOP**, jak má být vzorek zpracován a jaké metody na něj mají být aplikovány
- **ne vždy je ovšem vše dáno SOP** (zvláště ve vzácných a mimořádných případech je na rozhodnutí zkušeného laboranta či mikrobiologa, jak vzorek zpracovat)
- **v důležitých případech vhodné zatelefonovat do laboratoře a domluvit se!**

Vlastní zpracování

- **zajišťují laboranti**, dříve se SŠ vzděláním, nyní s VOŠ nebo Bc. stupněm
- postupuje se **vždy přísně asepticky**, aby se omezilo riziko laboratorní kontaminace
- práce v "biohazard boxu" dobrou prevencí profesionálních nákaz

Vlastní zpracování (2)

- **obvyklý postup zpracování bakteriologických kultivačních vzorků:**
 - homogenizace, centrifugace či jiná úprava
 - u některých typů vzorků **rychlé postupy** – mikroskopie, popř. přímý průkaz antigenu
 - téměř vždy je základem **kultivace na několika pevných půdách** (KA + Endo + popř. další)
 - **někdy též pomnožení v tekuté půdě** (v případě výtěrů ze spojivky POUZE tento bod)
- **zpracování jiných vzorků** (serologie, PCR, mykologie, parazitologie) je speciální a je dána typem vyšetření a povahou vzorku

Zaslání výsledku

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

Interpretace

- **definitivní interpretace nálezu v rukou klinika**
- mikrobiolog nemá k dispozici také biochemický, rentgenový či ultrazvukový nálezu (a především nezná pacienta)
- **konzultace klinika a mikrobiologa je u závažných případů vhodná** (nelze konzultovat každý nálezu)

Normální mikroflóra a její význam

- **na různých místech lidského těla**
- **komenzální či saprofytické mikroby**, které jsou hostiteli více či méně prospěšné:
 - **kolonizací příslušné sliznice** brání tomu, aby byla osídlena patogeny
 - **podílejí se na stavu mikroprostředí**, např. pH
 - ve střevě **likvidují nestravitelné zbytky**
 - mohou mít i **další pozitivní efekty** pro hostitele (např. tvorba vitamínů střevními bakteriemi)

Lokalizace normální mikroflóry

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

Mikroflóra v průběhu života člověka

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

Normální osídlení trávicích cest

- **rtý** přechod kožní a ústní flóry
- v **ústní dutině** (stejně jako v hltanu) ústní streptokoky, neisserie, nevirulentní kmeny hemofilů aj. (další obvykle nekultivovatelné); **dentální biofilm** (složitý strukturovaný ekosystém)
- **jícen a žaludek** jsou za normálních okolností bez většího množství mikrobů
- v **tenkém a zejména tlustém střevě** zpravidla 1 kg anaerobů, dále enterobakterie, enterokoky, kvasinky, někdy i nepatogenní améby
- **řiť** je opět místem přechodu střeva a kůže

Normální osídlení dýchacích cest

- **nosní dutina** nemá specifickou flóru, přechází tam mikroflóra z kůže (přední část) a hltanu (zadní část)
- v **hltanu** (stejně jako v ústní dutině) ústní streptokoky, neisserie, nevirulentní kmeny hemofilů aj. (další obvykle nekultivovatelné)
- **plíce a DCD** normálně bez většího množství mikrobů
- na ostatních místech (hrtan) jsou různé přechody (hrtan – jako v hltanu, ale méně)

Močové cesty zdravého člověka

- **ledviny** – normálně bez mikrobů
- **pánvičky ledvinné** – normálně bez mikrobů
- **močovody (uretery)** – normálně bez mikrobů
- **močový měchýř** mladých a středně starých osob – normálně bez mikrobů
- **močový měchýř seniorů** – i za normálních okolností může být osídlen mikroflórou, která nečiní problémy a stává se „běžnou flórou“
- **močová trubice** – vnější část může (nemusí) být osídlena jednak kožní mikroflórou, jednak i specificky (viridující streptokoky, aerokoky)

Genitálie zdravého člověka

- za normálních poměrů **nejsou mikroby**:
 - **u ženy** v děloze, vejcovodech, vaječnicích
 - **u muže** v prostatě, chámovodech, varlatech
- **specifickou normální flóru má vagina** (laktobacily, příměs různých aerobních i anaerobních mikrobů)
- vulva tvoří přechod vaginální a kožní flóry
- **u muže** specifický **předkožkový vak**, vedle kožní a urethrální flóry i např. nepatogenní mykobakteria apod.

Normální osídlení kůže

- **chudší osídlení** než v případě např. úst, pochvy či tlustého střeva
- mikroby musí snášet **vyschnutí a vysoké koncentrace solí**
- **normálně se vyskytují:**
 - **koaguláza negativní druhy stafylokoků**
 - ***S. aureus*** – malé množství normální
 - **korynebakteria** a příbuzné G+ tyčinky
 - malá množství **kvasinek**

Interpretace přímého průkazu

- **patogen:** mikrob nalezený přímým průkazem může být patogenem (není jím ale vždy)
- **součást běžné flóry:** důvod, proč je třeba znát normální osídlení v různých lokalizacích.
- **náhodný nález** (= součást transientní běžné flóry);
příklad: malá množství enterobakterií ve výtěru z krku, zvláště u ambulantních pacientů – normální
- **kolonizující mikrob:** zejména u výtěrů z ran (mnohé mikroby ránu jen kolonizují)
- **kontaminace** během odběru, transportu apod.

Úkol 5a: Interpretace přímého průkazu

- pomocí tabulky v prezentaci napište interpretaci pro třináct nálezů, které jsou napsány na kartičkách v praktikárně
- používejte termíny "patogen", "běžná flora", "náhodný nález", "kolonizace", "kontaminace"

Úkol 5a: Interpretace přímého průkazu (přehled běžné flóry)

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

Úkol 5a: Interpretace přímého průkazu – výsledky

Nález	Interpretace
<i>Streptococcus pyogenes</i> ve výtěru z krku	patogen
<i>Neisseria lactamica</i> ve výtěru z krku	běžná flóra
<i>Escherichia coli</i> (významné množství) v moči	patogen
<i>Escherichia coli</i> ve stolici	běžná flóra
<i>Bacillus</i> sp. ve stěru z kůže	kontaminace
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ve stěru z kůže	běžná flóra
<i>Staphylococcus epidermidis</i> opakovaně ve vzorku z krevního řečiště	patogen

Úkol 5a: Interpretace přímého průkazu – výsledky

Nález	Interpretace
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> v ráně, kde byl zároveň nalezen <i>Streptococcus pyogenes</i>	kolonizace (streptokoka léčit celkově, pseudomonádu jen lokálně)
<i>Entamoeba histolytica</i> ve stolici	patogen
<i>Entamoeba coli</i> ve stolici	náhodný nález
<i>Aspergillus</i> sp. v malém množství v kožní šupině	kontaminace z prostředí
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> v kožní šupině	patogen
Rotavirus ve stolici	patogen

Interpretace nepřímého průkazu

- **akutní infekce:** pozitivitou IgM protilátek, čtyřnásobným vzestupem titru, nízkoavidními protilátkami (pozor na zkříženou reaktivitu)
- **nemoc v minulosti:** zpravidla pouze IgG pozitivita a nízký, neměící se titr
- **chronická nemoc:** někdy obtížná interpretace (u hepatitidy B je velký rozdíl mezi jednotlivými formami chronické hepatitidy)

Úkol 5b: Interpretace nepřímého průkazu

- **interpretujte několik klinických situací na kartičkách**
- **pro interpretaci je nutno využít jak klinická data, tak také laboratorní nálezy**

Úkol 5b: Interpretace nepřímého průkazu (klinické situace)

Klinická situace	Výsledky serologie
Těhotná žena bez problémů	Toxoplasma IgG +, IgM -, KFR pozitivní, titr 1:10 opakovaně
Senior s příznaky toxoplasmové retinitidy	Toxoplasma IgG -, IgM -, KFR negativní
Pacient se žloutenkou	VHA a VHC kompletně negativní, HBsAg, HBeAg a anti-HBc igM pozitivní
Jiný pacient se žloutenkou	VHA kompletně negativní, anti-HBs, anti-HBe a anti-HCV IgM pozitivní
Pacient s erythema migrans	Protilátky proti borreliím kompletně negativní

Úkol 5b: Interpretace nepřímého průkazu (interpretace)

Klinická situace	Výsledky serologie	Interpretace
Těhotná žena bez problémů	Toxoplasma IgG +, IgM -, KFR pozitivní, titr 1:10 opakovaně	Není nyní nakažena, zřejmě infekce dříve, má výhodu, protože je chráněna
Senior s příznaky toxoplasmové retinitidy	Toxoplasma IgG -, IgM -, KFR negativní	Vzhledem k příznakům nelze infekci vyloučit. Je nutné další vyšetřování
Pacient se žloutenkou	VHA a VHC kompletně negativní, HBsAg, HBeAg a anti-HBc igM pozitivní	Akutní hepatitida B
Jiný pacient se žloutenkou	VHA kompletně negativní, anti-HBs, anti-HBe a anti-HCV IgM pozitivní	Akutní hepatitida C; hepatitida B v minulosti
Pacient s erythema migrans	Protilátky proti borreliím kompletně negativní	Nutná léčba, možná příliš čerstvá infekce

Po tomto cvičení byste měli umět:

- popsat rozhodovací procesy, možnosti odběru vzorku, transport do laboratoře
- správně vyplnit žádanku a být si vědomi nejčastějších chyb při jejím vyplňování
- hovořit o normální mikroflóře lidského těla a na základě těchto informací být schopni posoudit, zda výsledek testování je patogen, normální součást mikroflóry, kolonizace, kontaminace apod.
- interpretovat výsledky přímého i nepřímého průkazu v klinickém kontextu