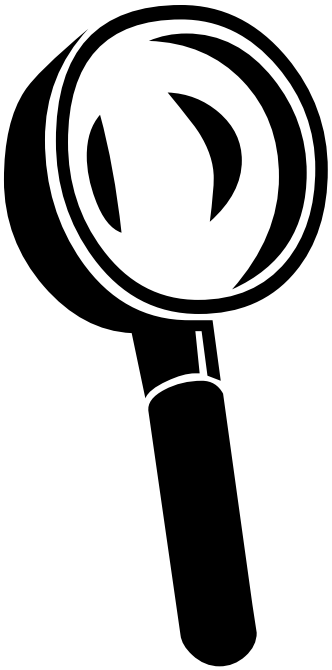


Mikrobiologický ústav uvádí

NA STOPĚ PACHATELE

Díl čtrnáctý:

Opakování

Autor prezentace: Ondřej Zahradníček (kontakt: zahradnicek@fnusa.cz). K praktickému cvičení pro Bi7170c

Základní informace

- Student si vytáhne **jeden z 60 úkolů; není řečeno, že jsou vždy všechny k dispozici**
- Ke každému z praktik jarního a podzimního semestru přináleží **cca dva až čtyři úkoly**. Některé úkoly náležejí k více praktikům (např. ASLO k neutralizaci i ke streptokokům)
- Některé části praktik jsou sice mimo úkoly, nicméně studenti na ně **mohou být tázáni**
- **Studenti mohou být žádáni o písemné vypracování úkolu formou protokolu (ne nutně vždy)**

Přehled témat

Metody

Speciální mikrobiologie

Klinická mikrobiologie

Metody

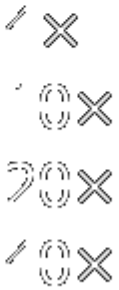
J01 Mikroskopie

- **Nativní preparát** – pro velké a/nebo pohyblivé mikroby (parazity, houby, pohyblivé mikroby)
  - **Znát také: Zástin** (hlavně spirochety)
- **Gramovo barvení** – jak se dělá + přehled dalších barvicích metod (Giemsa, Ziehl Neelsen, Burri…)
- **Prohlížení již nabarvených preparátů** – hlavně interpretace
- Mikroskopické jsou i některé úkoly z jiných témat!

Příprava nativního preparátu

- V případě nativního preparátu kapku, ve které je vzorek či rozmíchaný kmen, nesušíme. **Pouze přikryjeme krycím sklíčkem a pozorujeme objektivy, které zvětšují např. 4 ×, 10 × či 40 ×.**
- **Nepoužíváme imerzní olej**
- **Pozor! Kdo namočí neimerzní objektiv do imerzního oleje, okamžitě končí a u zkoušky neuspěl!!!**

Nativní preparát – postup (u kmene)



Příprava barvených preparátů

7a: voda

Gramovo barvení – postup

- **Genciánová violeť = Sol. Gram-Nowy (20 –) 30 vteřin**
- **Lugol (20 –) 30 vteřin**
- **Alkohol 15 (– 20) vteřin**
- opláchnout vodou – nezbytné!!!
- **Safranin 60 – 120 vteřin**
- opláchnout vodou
- osušit sušítkem* z filtračního papíru
- mikroskopovat jako v prvním úkolu

Mikroskopie vzorku

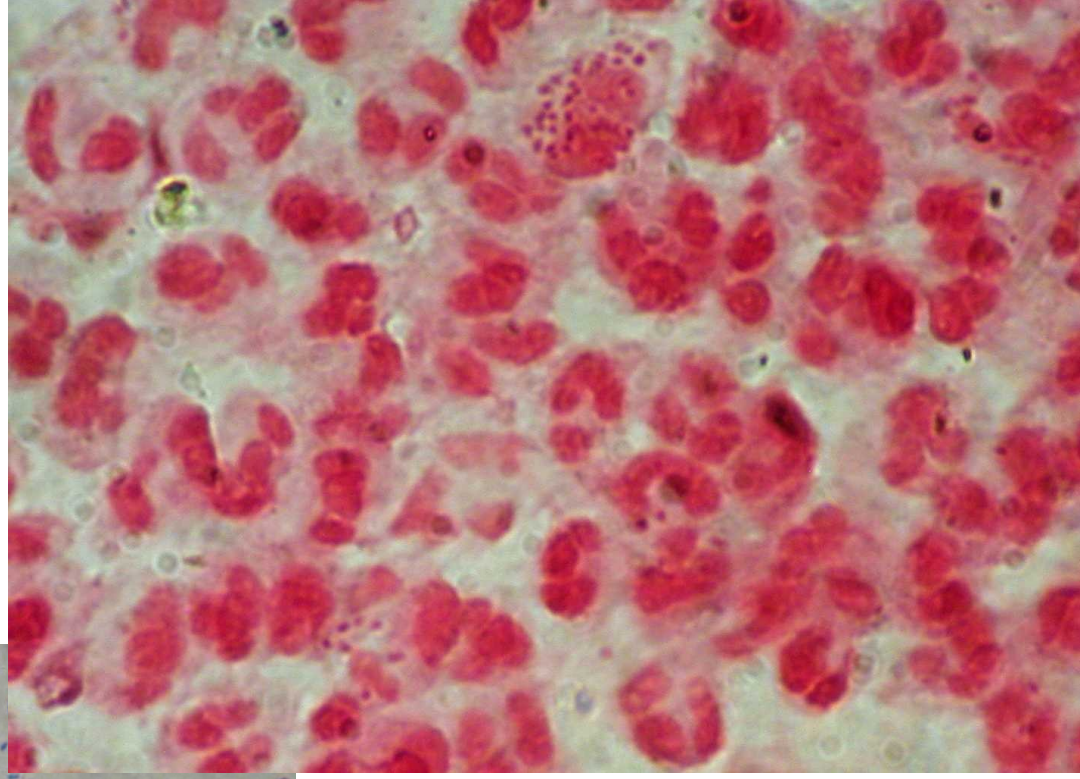
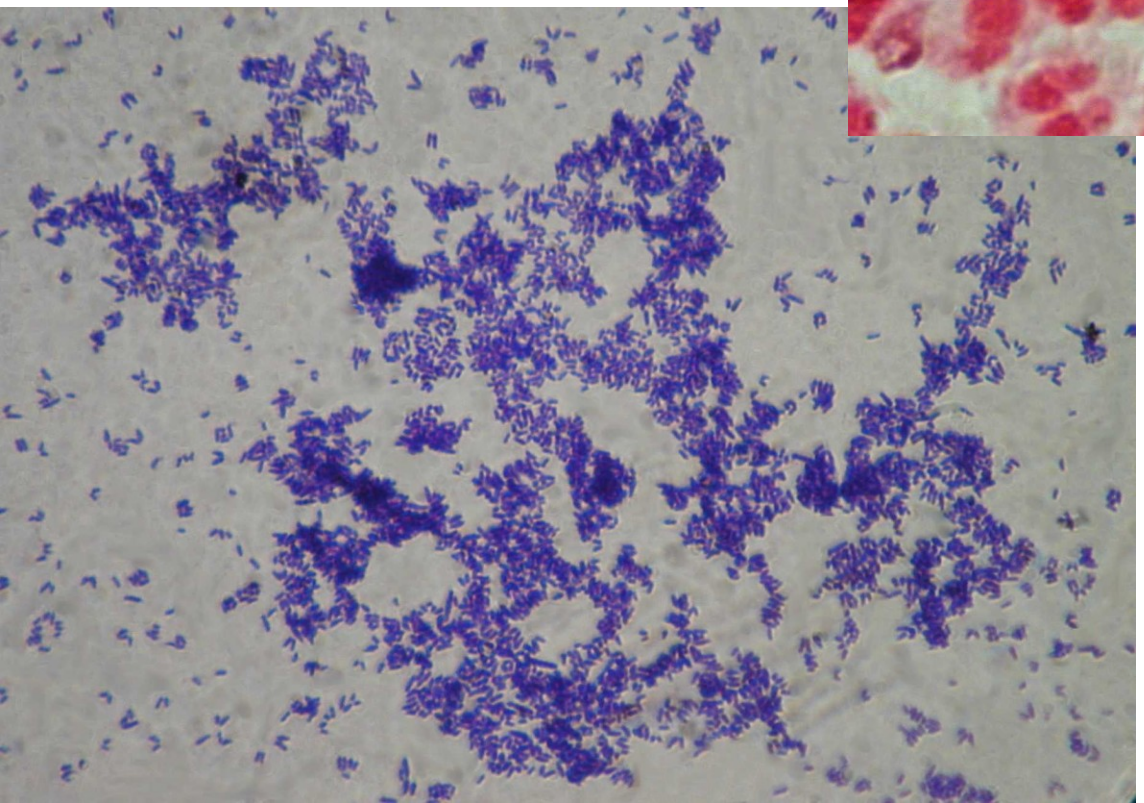


Foto O. Z.



Mikroskopie kmene

Co ještě vědět

- Kromě zhotovení nativního preparátu a Gramem barveného preparátu se po vás také může chtít **odečíst již několik hotových sklíček** (nátěry ze vzorků).
- Zde se očekávají také vaše **znalosti z pozdějších praktik** (např. interpretace nálezu leukocytů ve sputu a obecně v klinickém materiálu, nález intraleukocytárních diplokoků v uretrálních výtěrech apod.)

J02: Kultivace

Přeočkování agarové kultury

Vyžíhejte kličku

Naberte kmen

Naočkujte první úsek

Vyžíhejte kličku

Už znovu nenabírejte kmen

Naočkujte druhý úsek

Vyžíhejte kličku

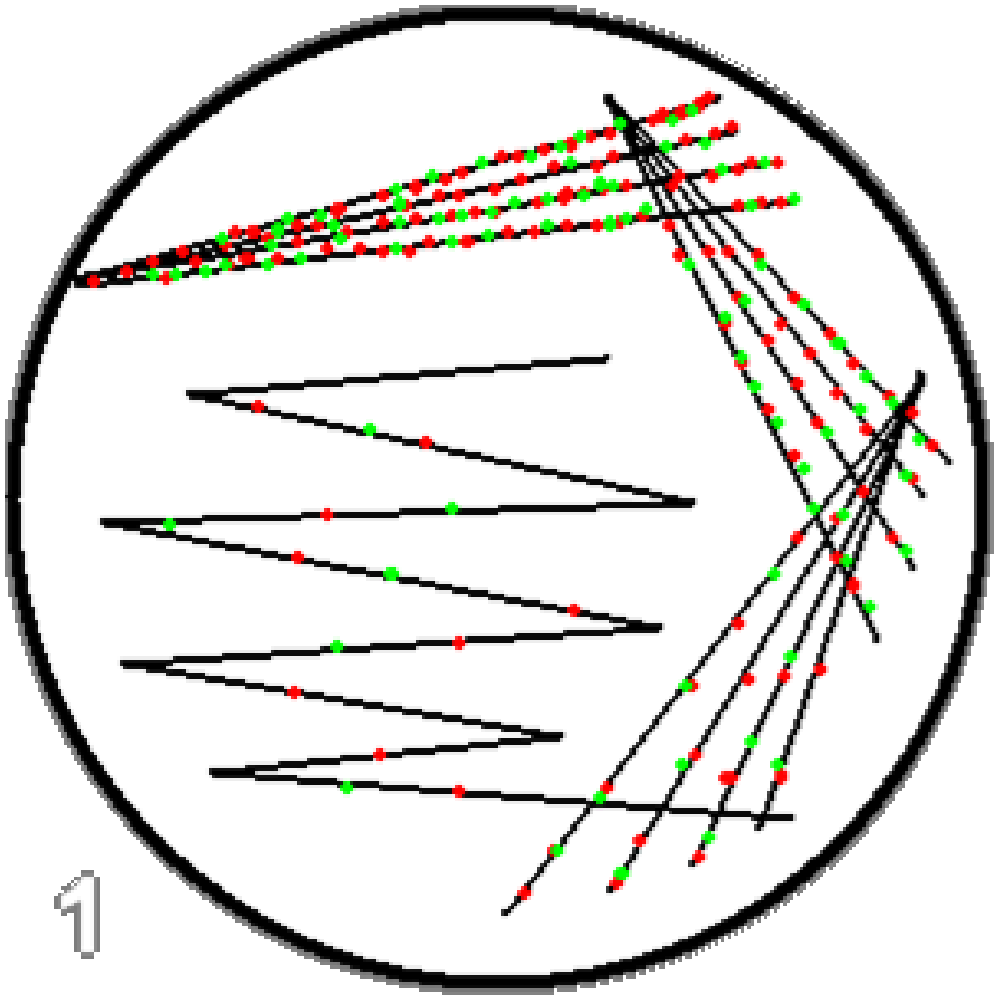
Už znovu nenabírejte kmen

Naočkujte třetí úsek

Vyžíhejte kličku

Už znovu nenabírejte kmen

Naočkujte „hádka“



Pozor!

- Úkol je těžší, než se zdá (zapomíná se na **vyžíhání** mezi jednotlivými kroky, nebo se zapomene na to, že čáry se musí **křížit**)
- Naopak se **nehodnotí technická dokonalost čar** (je nám jasné, že nejste zkušení mikrobiologové ani laboranti)
- Jde tedy o pochopení (a případně i vysvětlení) **principu křížového roztěru**

Další pod-téma: vysvětlete funkci daných kultivačních půd

1. bujon
2. VL-bujon
3. selenitový bujon
4. Sabouraud
5. Löwenstein-Jenssen
6. KA
7. Endo
8. MH
9. NaCl
10. VLA
11. XLD (a MAL)
12. ČA
13. Levinthal
14. Slanetz-Bartley

S některými dalšími půdami se případně můžete u praktické zkoušky setkat také, ale spíše výjimečně a u jiných úkolů (speciální bakteriologie)

J03: biochemická identifikace

- **V rámci jiných úkolů (speciální bakteriologie a mykologie) určitě musíte být schopni provést:**
  - Katalázový test a testy s diagnostickými proužky (oxidáza, INAC, PYR) + znát kdy který použít
  - Hajnovu půdu použít k odlišení nefermentujících od fermentujících tyčinek; další přesné vlastnosti Hajnovy půdy a MIU se nepožadují, i když jejich znalost není na škodu
- **Jediný úkol čistě patřící k J03 je**
  - odečtení biochemického testu typu ENTEROtest (dostanete vše potřebné a test odečtete; nic více, ale také nic méně; důležité je určit i procento pravděpodobnosti a index typičnosti)

Nezapomeňte na ONPG

musí se odečíst před ostatními testy

	1 ONPG	2 H	3 G	4 F	5 E	6 D	7 C	8 B	9 A	10 H	11 G	12 F	13 E	14 D	15 C	16 B	17 A
		První řádek panelu								Druhý řádek panelu							
+	🟡	⚪	🔵	🔴	🔵	🔴	🟢	⚪	🔵	🔵	🟡	🟡	🟡	🟡	🟡	🟡	🟡
—	⚫	⚫	🟢	🟡	🟢	🟡	🟡	⚫	🟡	🟡	🟢	🟢	🟢	🟢	🟢	🟢	🟢
?	🟡	⚫	🔵	🔴	🔵	🟡	🟡	⚫	🟡	🟡	🟢	🟢	🟢	🟡	🟡	🟡	🟡
?	+	—	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+
	1	~~2~~	4	1	2	~~4~~	~~1~~	~~2~~	~~4~~	~~1~~	~~2~~	~~4~~	~~1~~	2	4	1	2
	5			3			0			0			6			3	

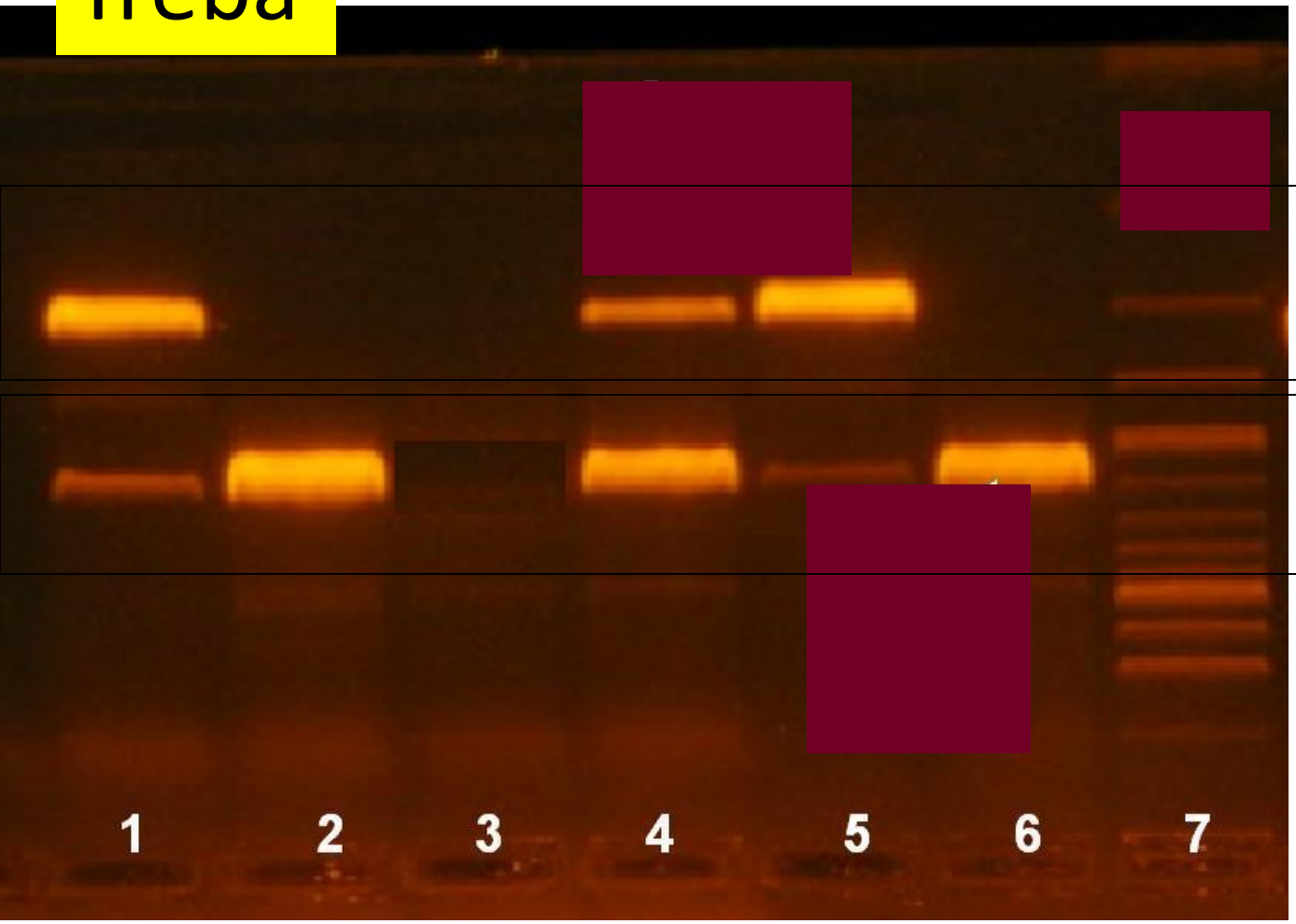
J04: PCR a jiné průkazy DNA/RNA

- **Není nutno znát detaily principu, ale je potřeba vědět, kdy a jak se používají v mikrobiologii**
- Tyto metody používáme zpravidla tam, kde mikroskopický a kultivační průkaz je obtížný nebo není vůbec možný
- Nehodí se příliš pro běžné patogeny přítomné ubikvitárně. Pro svou velkou citlivost by ruče vyčenichaly kdejakou molekulu přilétlou z vnějšího prostředí
- Metody nejsou ani neužitečné, jak si někdo myslí, ani samospasitelné, jak si myslí pro změnu jiní

Nutno znát interpretaci PCR

Vlastní reakce	Interní kontrola	Interpretace
negativní	pozitivní	negativní
negativní	negativní	inhibice reakce
pozitivní	pozitivní	pozitivní
pozitivní	negativní	(vysoce) pozitivní

Třeba



Pacienti 1 a 4 – pozitivní, pacient 2 – negativní, pacient 3 – inhibice reakce. 5 – pozitivní kontrola, 6 – negativní kontrola, 7 – ladder

J05 Dekontaminační metody

Nutná znalost metodologického rozdílu

- Pokud chceme ověřit **mez přežití** bakterií, musíme je po odstranění testovaných extrémních parametrů přemístit do podmínek růstového optima a nechat je tam dostatečně dlouho.
- V opačném případě bychom ověřili pouze **mez růstu**, nikoli mez přežití.

Úkol: Vyhodnocení účinnosti desinfekce

- Nestačí jen říci, kolikaprocentní desinfekce je výsledkem testu, je také potřeba říci (a zdůvodnit!) že **jde o baktericidní, nikoli bakteriostatickou koncentraci desinfekce**.
- (V agaru, na kterém se bakterie pěstuje, už žádná desinfekce není.)

Parametry sterilizace

Vyhodnocení účinnosti horkovzdušné sterilizace

Rezistentní, sporulující bakterie	160 °C	170 °C	180 °C
20 min	přežívá	přežívá	hyne
30 min	přežívá	hyne	hyne
60 min	hyne	hyne	hyne

K oběma úkolům navíc

- patří **vytvoření dvojic z předložených lístečků** (například spárovat „sterilizace kovu, který nesnese vlhké teplo“ a „horkovzdušná sterilizace“)
- lístečky jsou v praktikárně k dispozici

J06: Antimikrobiální látky
Nutná znalost kvalitativních i kvantitativních testů

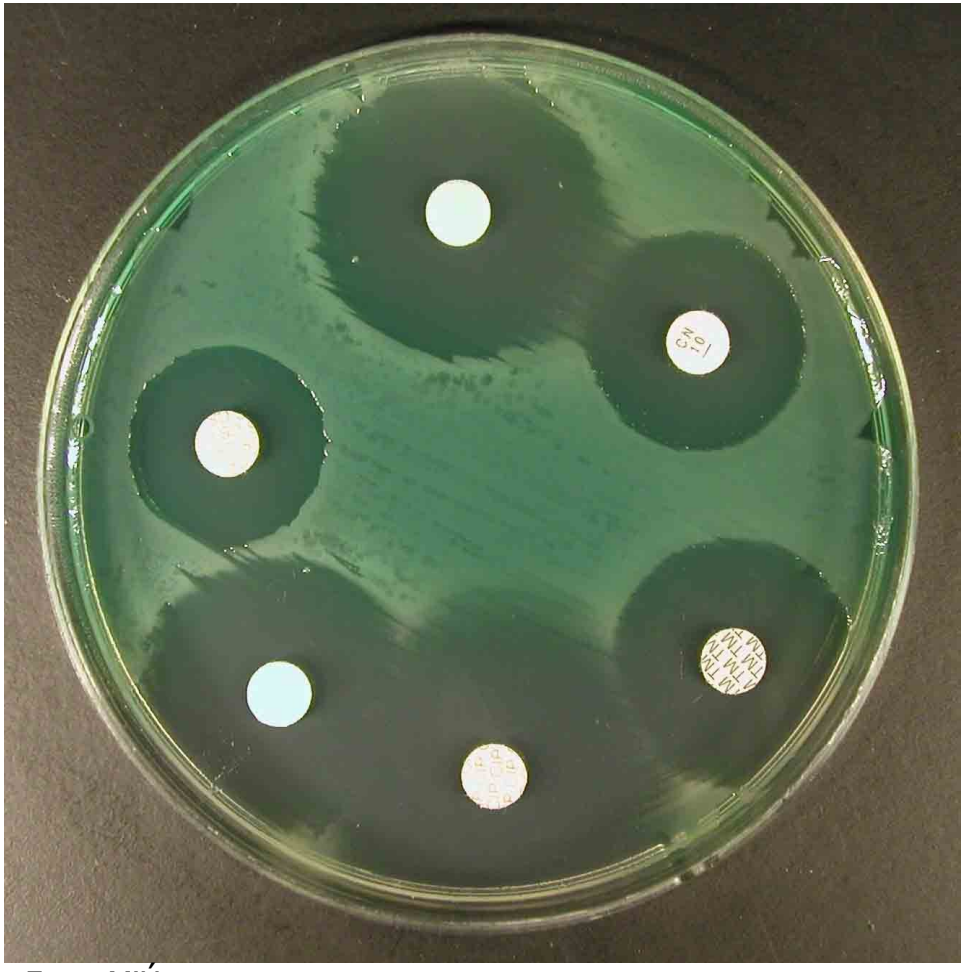
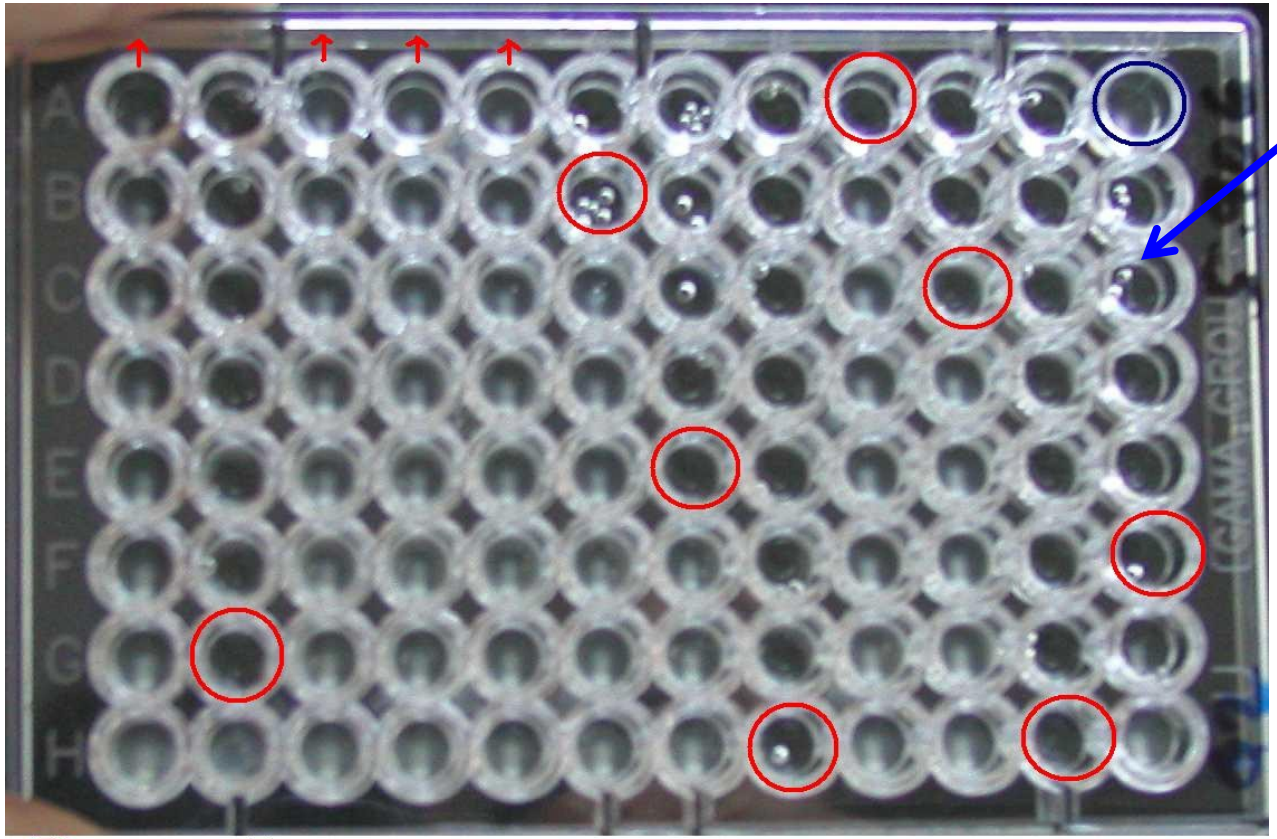


Foto: MiÚ

Není samostatným úkolem, ale je součástí úkolů ze speciální mikrobiologie

Mikrodiluční test – odečtení



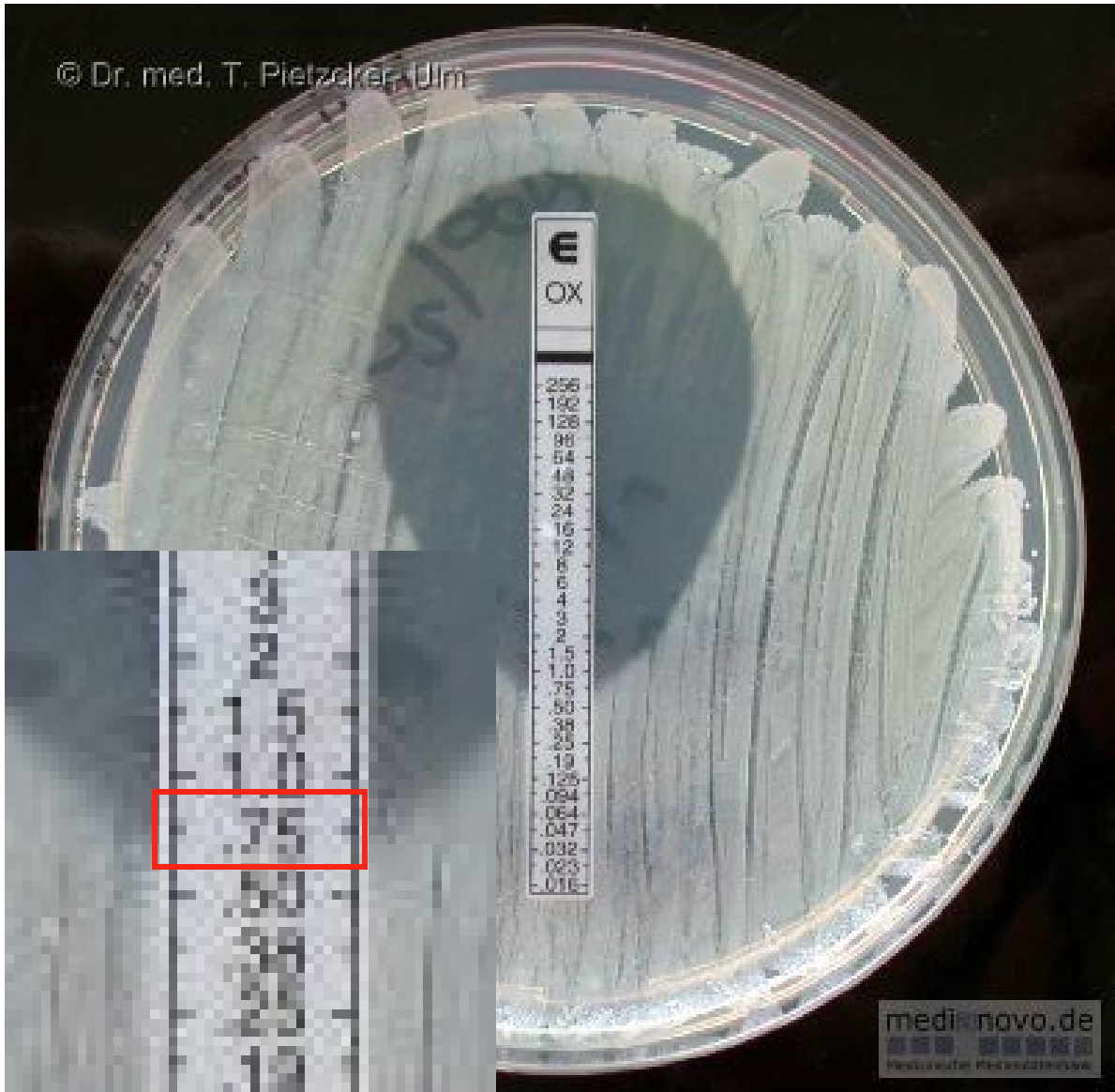
Někdy se v důlcích mohou objevit bublinky – při odečítání si jich nevšímejte

- Včetně porovnání s breakpointy a vysvětlení interpretace

E-test – není samostatným úkolem, ale znát byste ho měli

www.uniklinik-ulm.de

Hodnota MIC se odečítá přímo na proužku – v místě, kde okraj zóny protíná daný proužek



Betalaktamázy běžné i širokospektré

Mohou být také součástí některého úkolu

Foto O. Z.

J07 Biofilm
Porovnání metod kultivace cévních katetrů

- Klasická kultivace v bujónu
- Makiho semikvantitativní metoda
- Sonifikace (rovněž semikvantitativní!

Odečtení + diskuse: výhody a nevýhody všech metod, možná interpretace

J07 Biofilm: Úkol posouzení vlivu sacharidů a času na biofilm

- **Jako v praktiku, ale včetně vytvoření grafu**
- Posuďte vliv příjmu různého množství sacharidů ve stravě na rychlost tvorby biofilmu u kariogenního *Streptococcus mutans.*

Jaké závěry vyplývají z tohoto pokusu ohledně množství sacharidů ve stravě, délce jejich setrvání v dutině ústní apod.?

Schema důlků

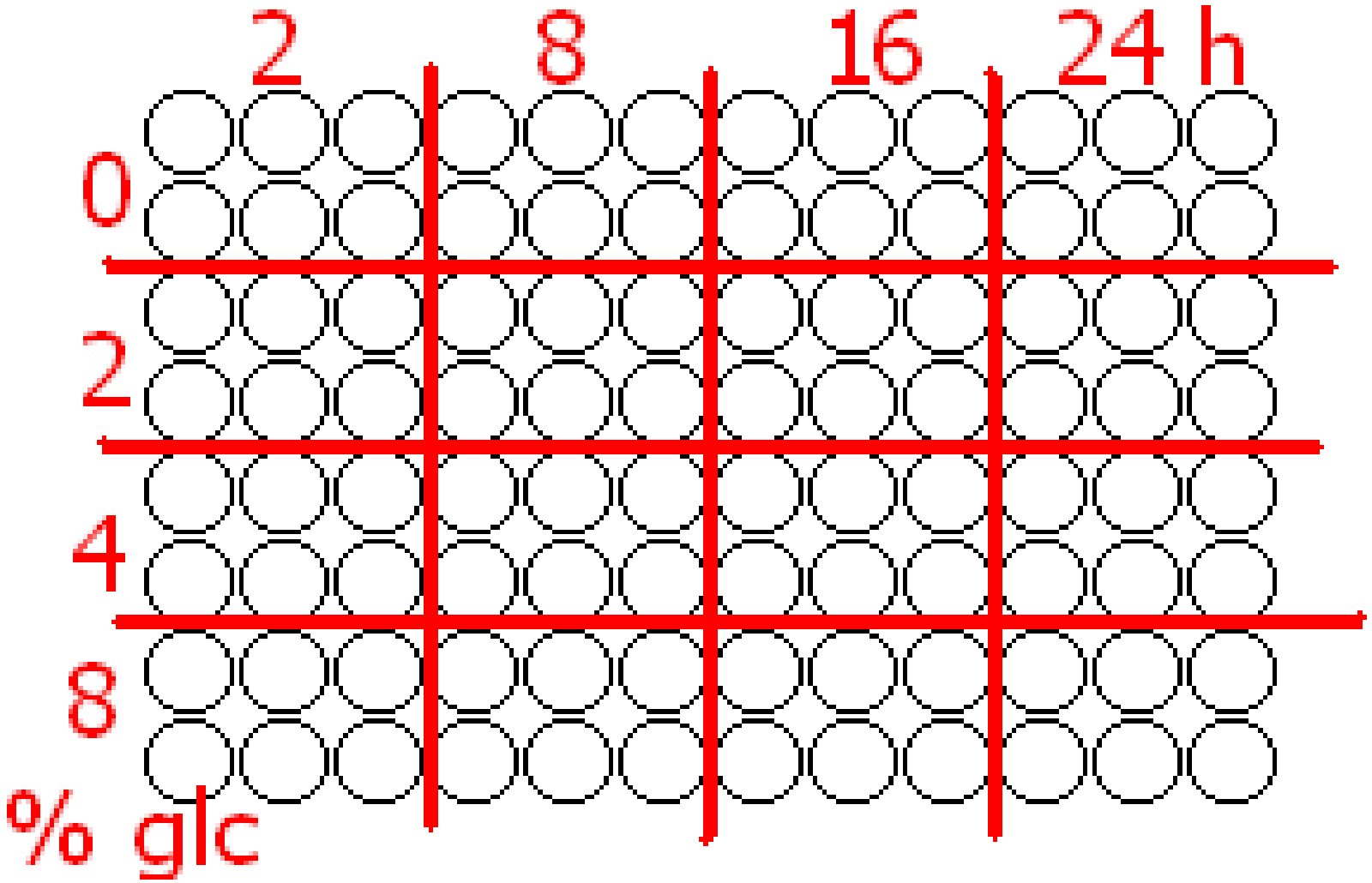
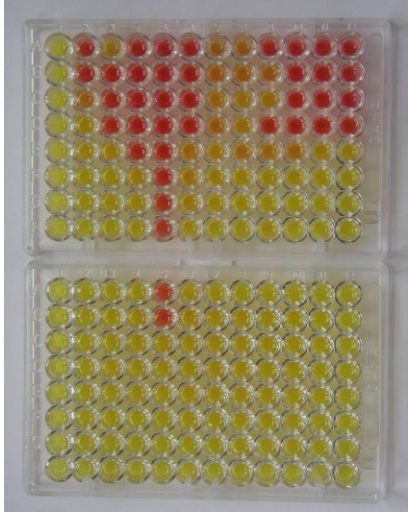


Foto: Archiv Veroniky Holé



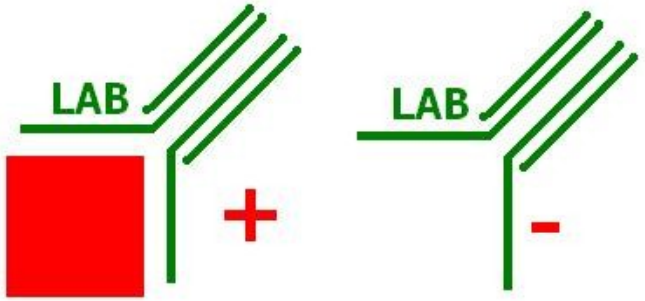
Další úkol – stanovení MBEC

- Zatímco MIC je metoda určující minimální inhibiční koncentraci ATB u planktonické formy, MBEC zjistí eradikaci bakteriálního biofilmu. Vypovídá tedy lépe o skutečném účinku antibiotika na bakterie žijící ve formě biofilmu.
- MBEC odpovídá nejnižší koncentraci antibiotika, kde ještě prokážeme eradikaci biofilmu (nepřítomnost živých buněk, nedochází ke změně pH média, důlek tedy zůstává červený)

Serologie – praktika J08 až J10

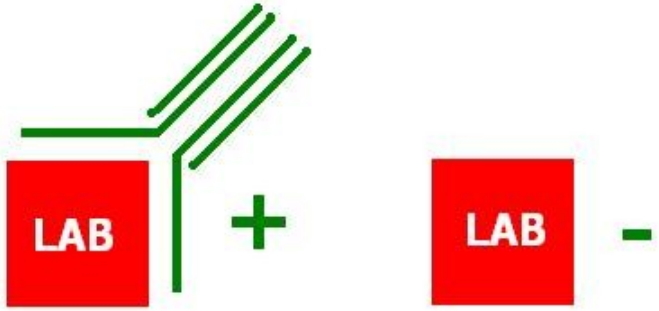
Průkaz antigenu: laboratorní protilátky (zvířecího původu)+ vzorek pacienta nebo kmen mikroba.

Přímá metoda



Průkaz protilátky: laboratorní antigen (mikrobiální) + sérum (výjimečně sliny, likvor) pacienta

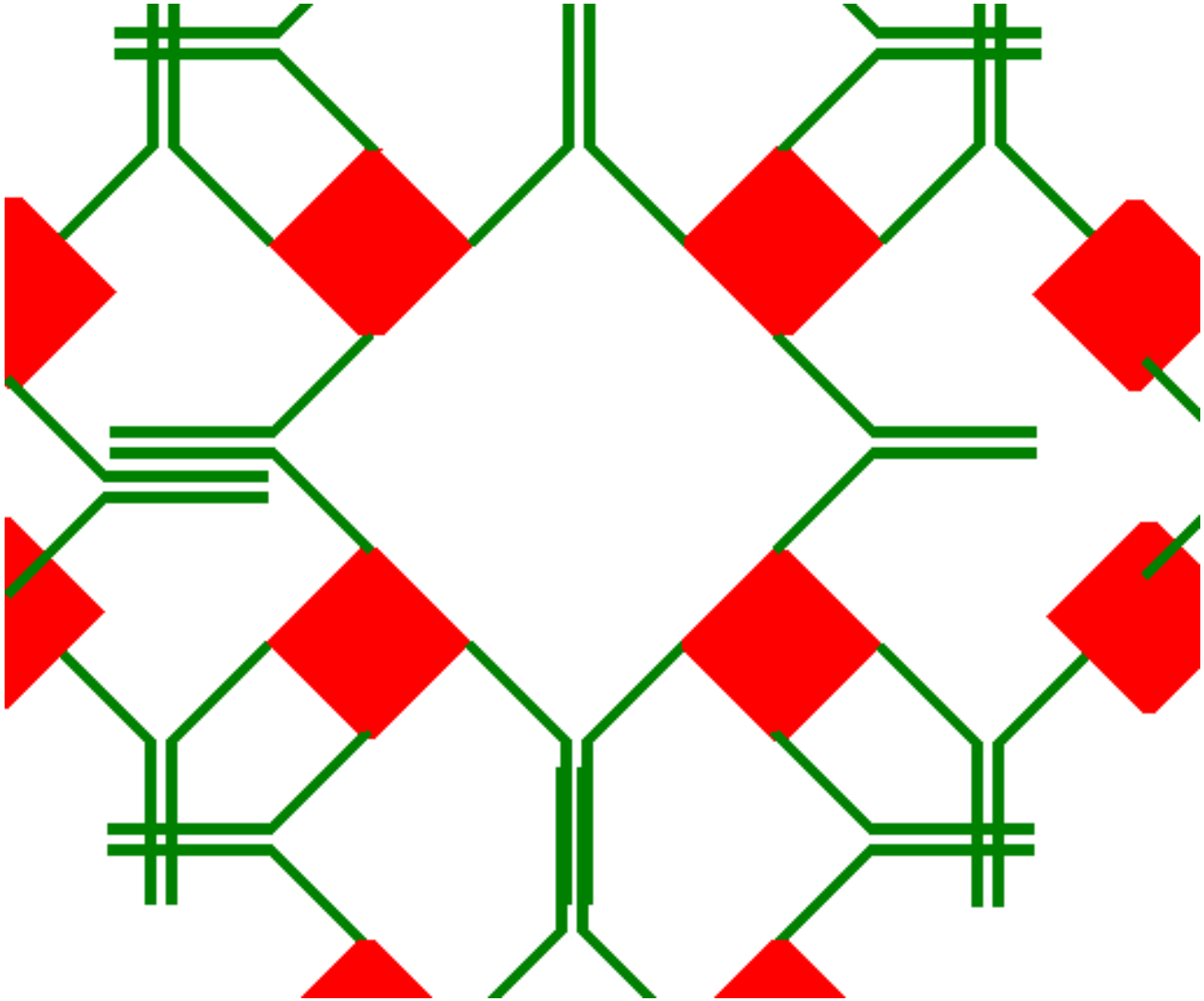
Nepřímá metoda



Interpretace – důležité znát!

- **Průkaz antigenu** je přímá metoda. Pozitivní výsledek znamená přítomnost mikroba v těle pacienta
- **Průkaz protilátek:** je to nepřímá metoda. Nicméně jsou způsoby, jak alespoň odhadnout, kdy přibližně se mikrob s.tělem pacienta setkal:
  - Množství protilátek (relativní – titr) a jeho změny v čase (dynamika titru)
  - Třída protilátek: IgM/IgG (pouze u reakcí se značenými složkami!)
  - *(Avidita protilátek)*

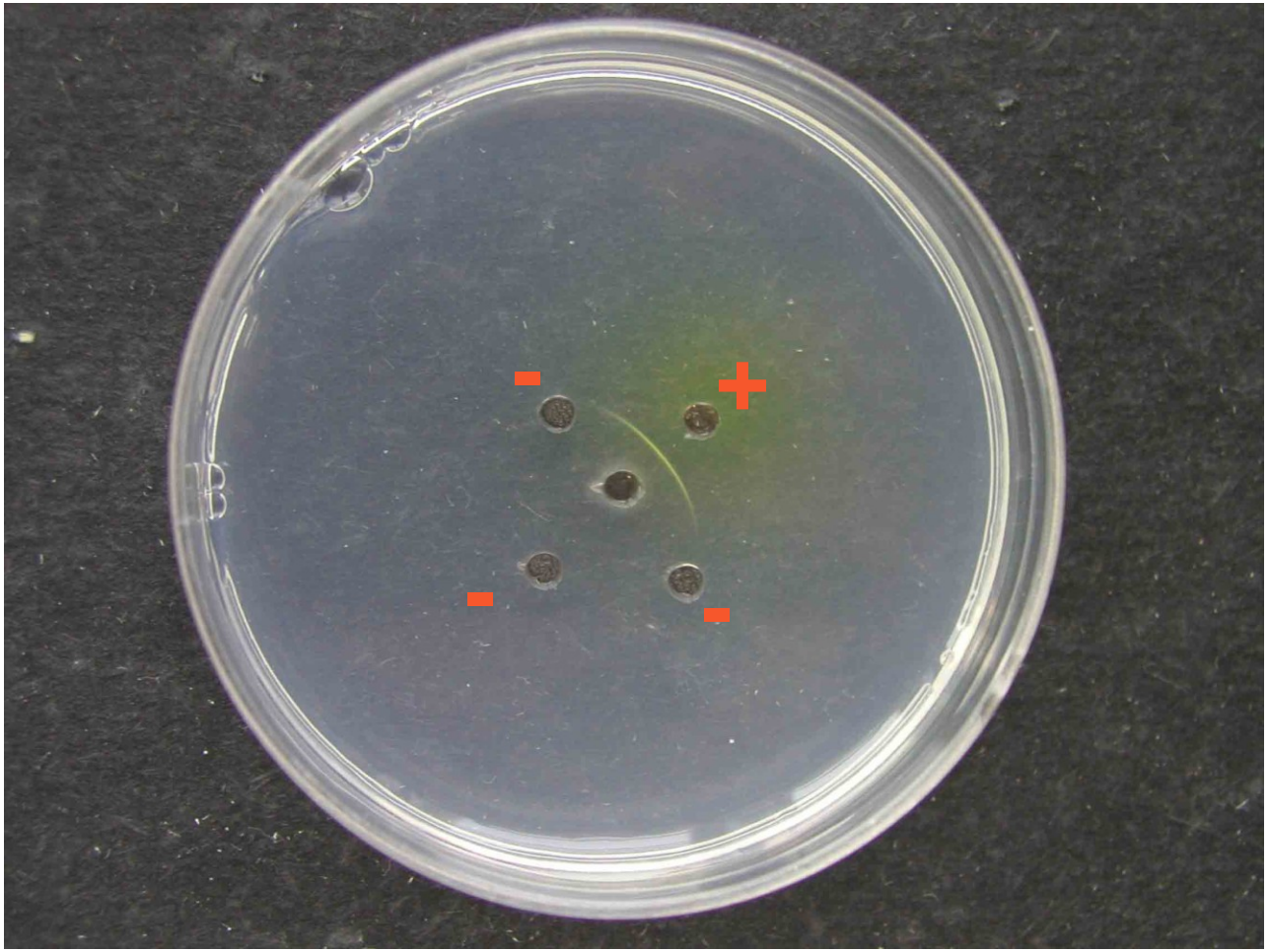
Precipitace



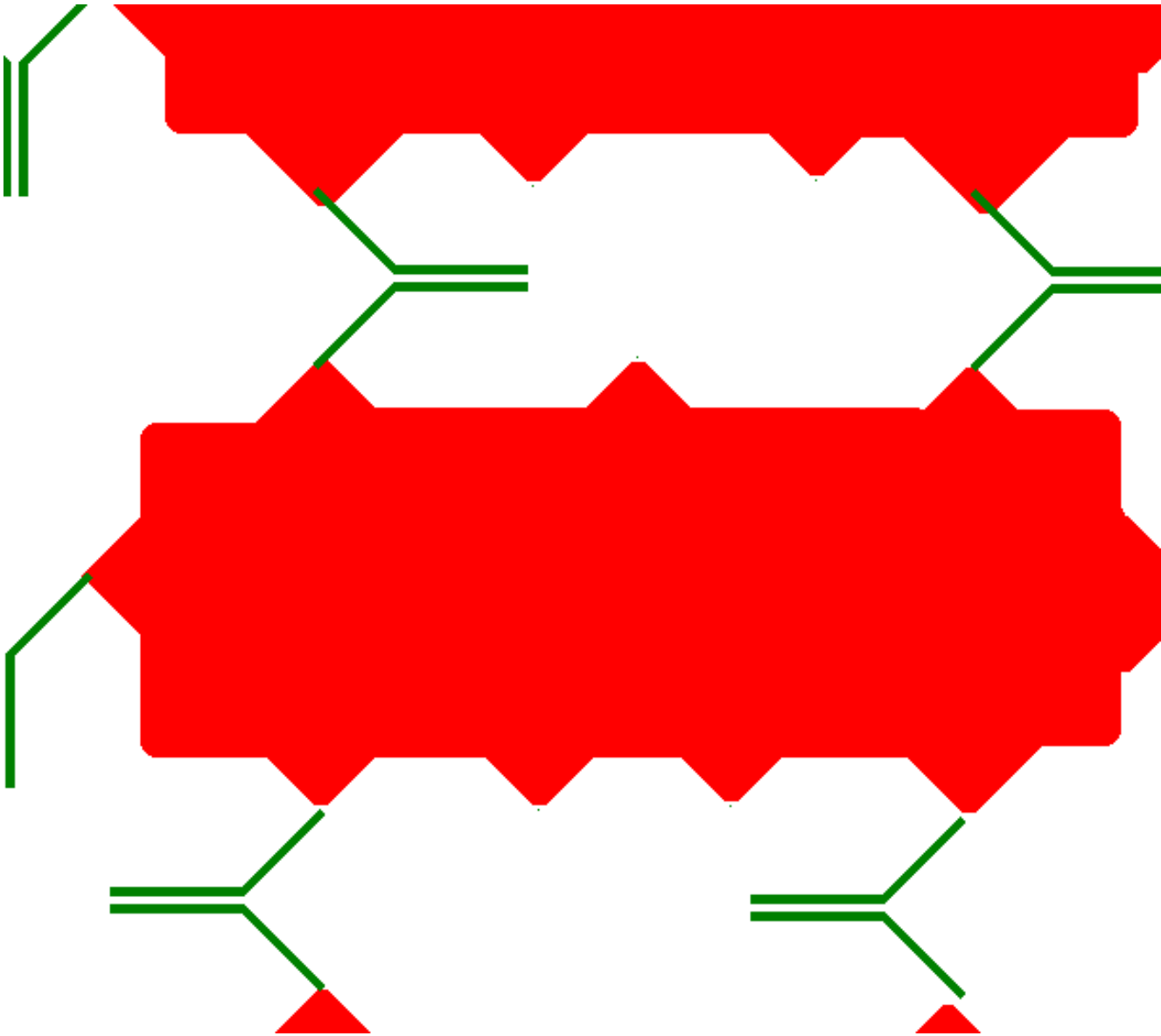
Dva příklady precipitace

1) Tzv. mikroprecipitace v agaru dle Ouchterlonyho – není přímo úkolem, ale může na ni přijít řeč

2) RRR – vyvločkovací (flokulační) reakce s kardiolipinem na syfilis



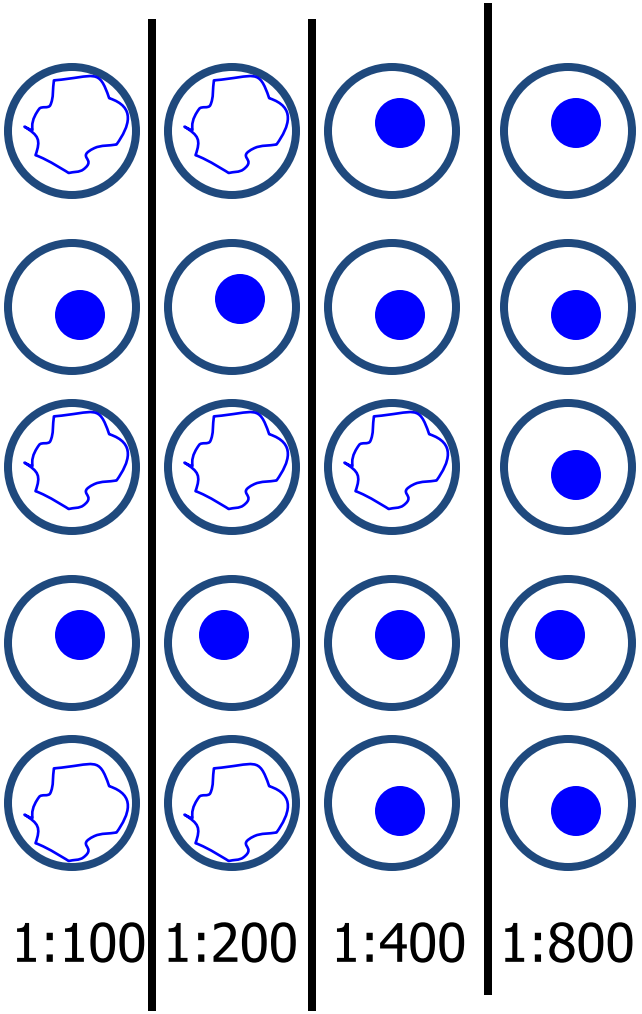
Aglutinace



Agglutinace k detekci antigenu nebo antigenní analýze

- **Průkaz EPEC:** v jaké situaci se dělá, jak se dělá (prakticky – dostanete kmen a měli byste vědět, co s ním)
- **Aglutinace likvoru** (úkol „Okomentujte video“). Důležité: tato metoda je vedle mikroskopie druhou rychlou metodou průkazu purulentní meningitidy

Aglutinační reakce k průkazu protilátek



K+ pozitivní, titr = 1 : 200

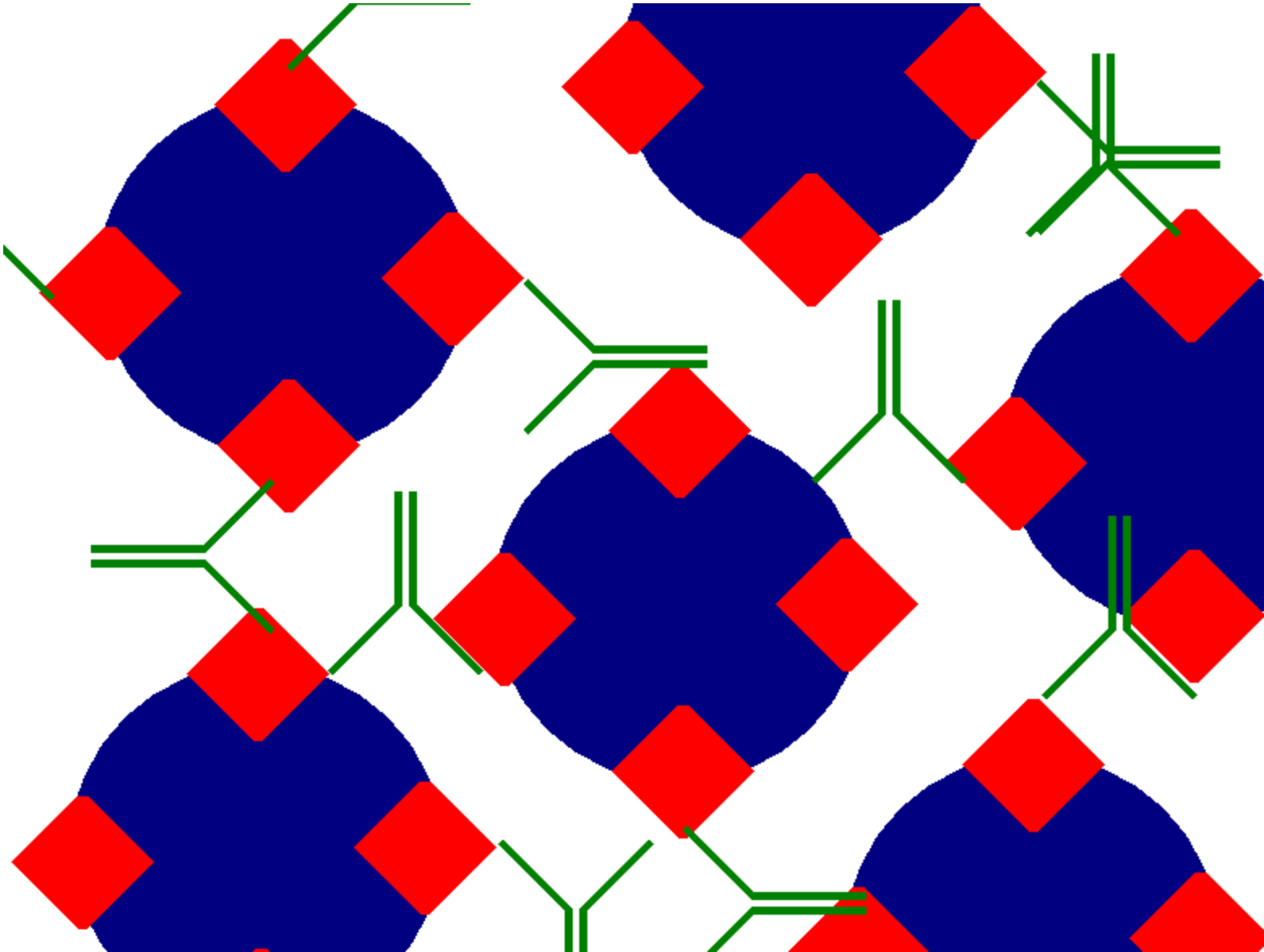
Č. 1 negativní

Č. 2 pozitivní, tit. = 1 : 400

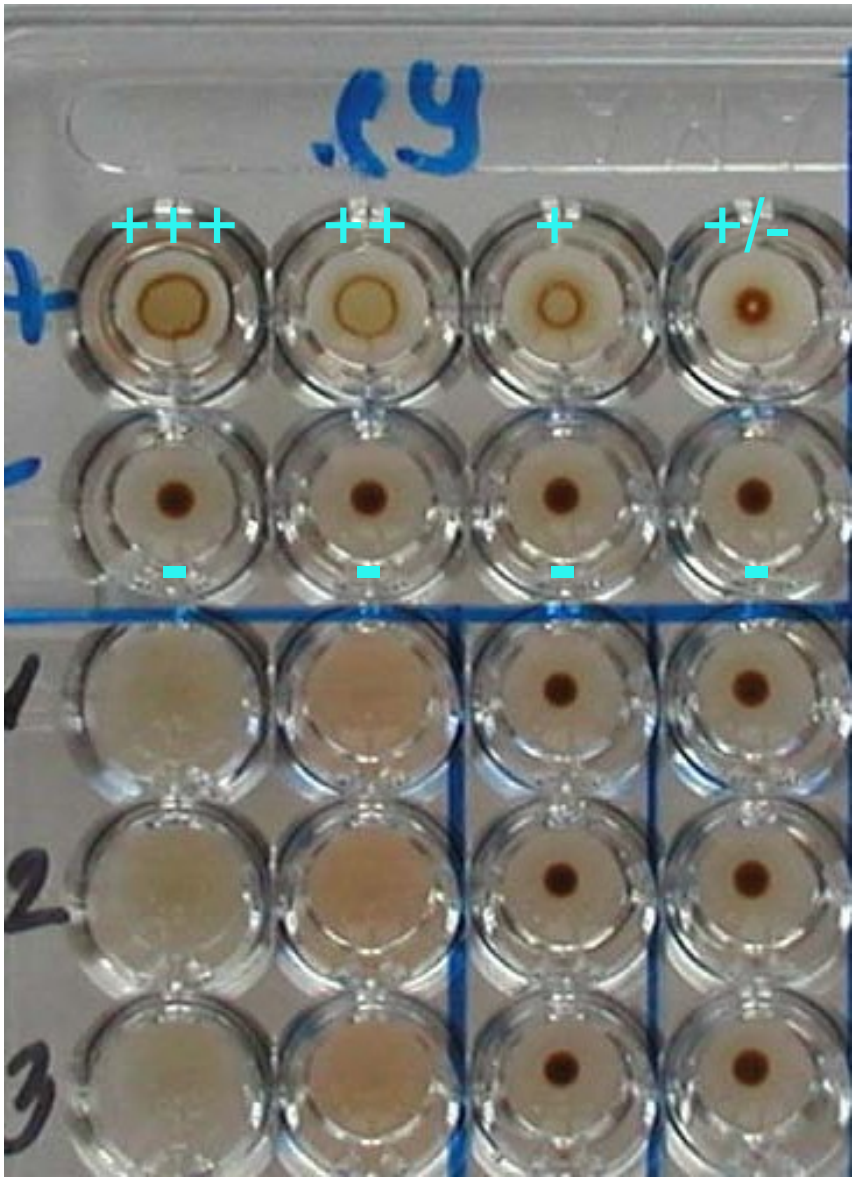
Č. 3 negativní

Č. 4 pozitivní, titr = 1 : 200

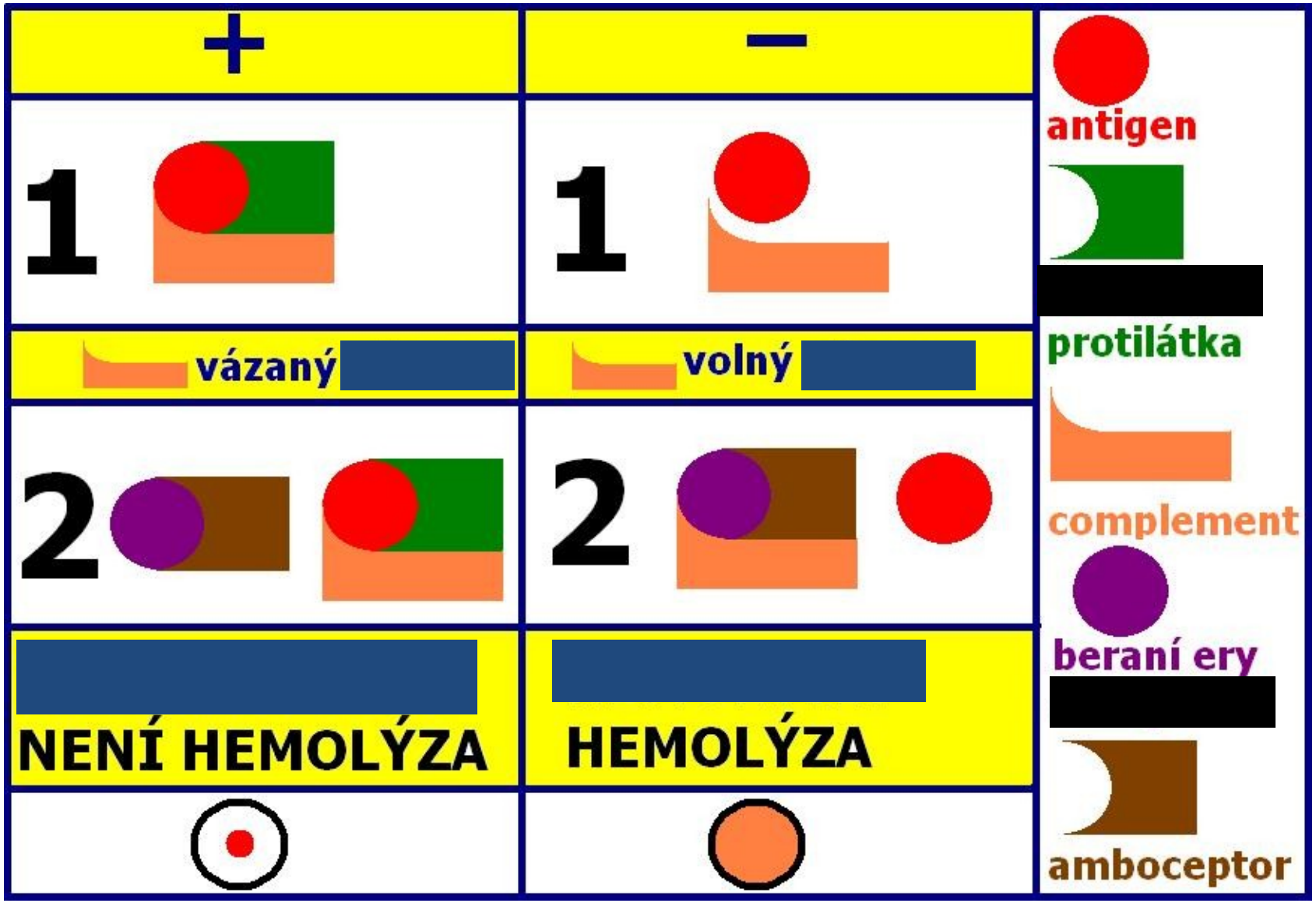
Aglutinace na nosičích



Příklad: TPHA



Komplementfixace



Test antikomplementarity

Toto je méně důležité

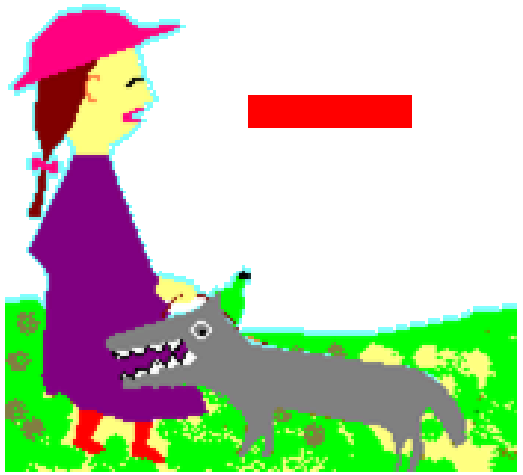
Neutralizace

- Protilátka (Ig) brání efektu toxinu/viru na buňku / krvinku

Buňka ve tkáňové kultuře či červená krvinka

Protilátka

Toxin či virus



Buňka ve tkáňové kultuře či červená krvinka

Toxin či virus

Příklady neutralizačních reakcí

	Neutralizován	Objekt	Reakce
	Toxin bakterie (hemolyzin)	Erytrocyt hemolýza	ASLO
	Virus	Erytrocyt shlukování	HIT
	Virus	Buňka efekt metabolický	VNT

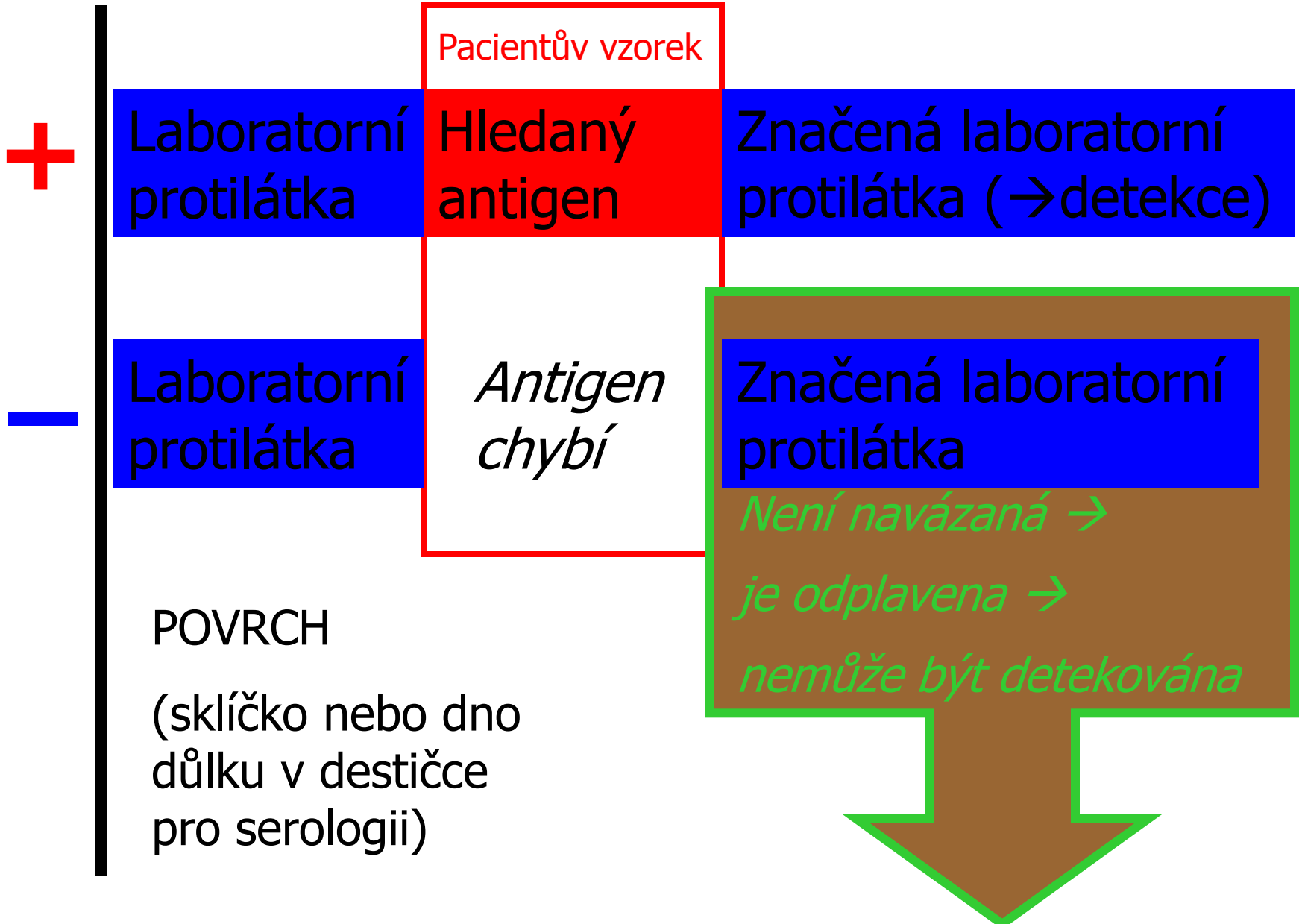
Pozor – ASLO a co o něm znát

- Po každé streptokokové infekci se objevují protilátky, často včetně protilátek proti streptokokovému toxinu – streptolyzinu O.
- Někdy se však stane, že množství těchto protilátek po infekci neklesá, naopak stoupá. Protilátky se totiž vážou na některé struktury hostitelského organismu (autoimunita), roztáčejíce „bludný kruh“.
- V takovém případě jsou tedy paradoxně nebezpečnější protilátky než patogen, proti kterému nás měly chránit.

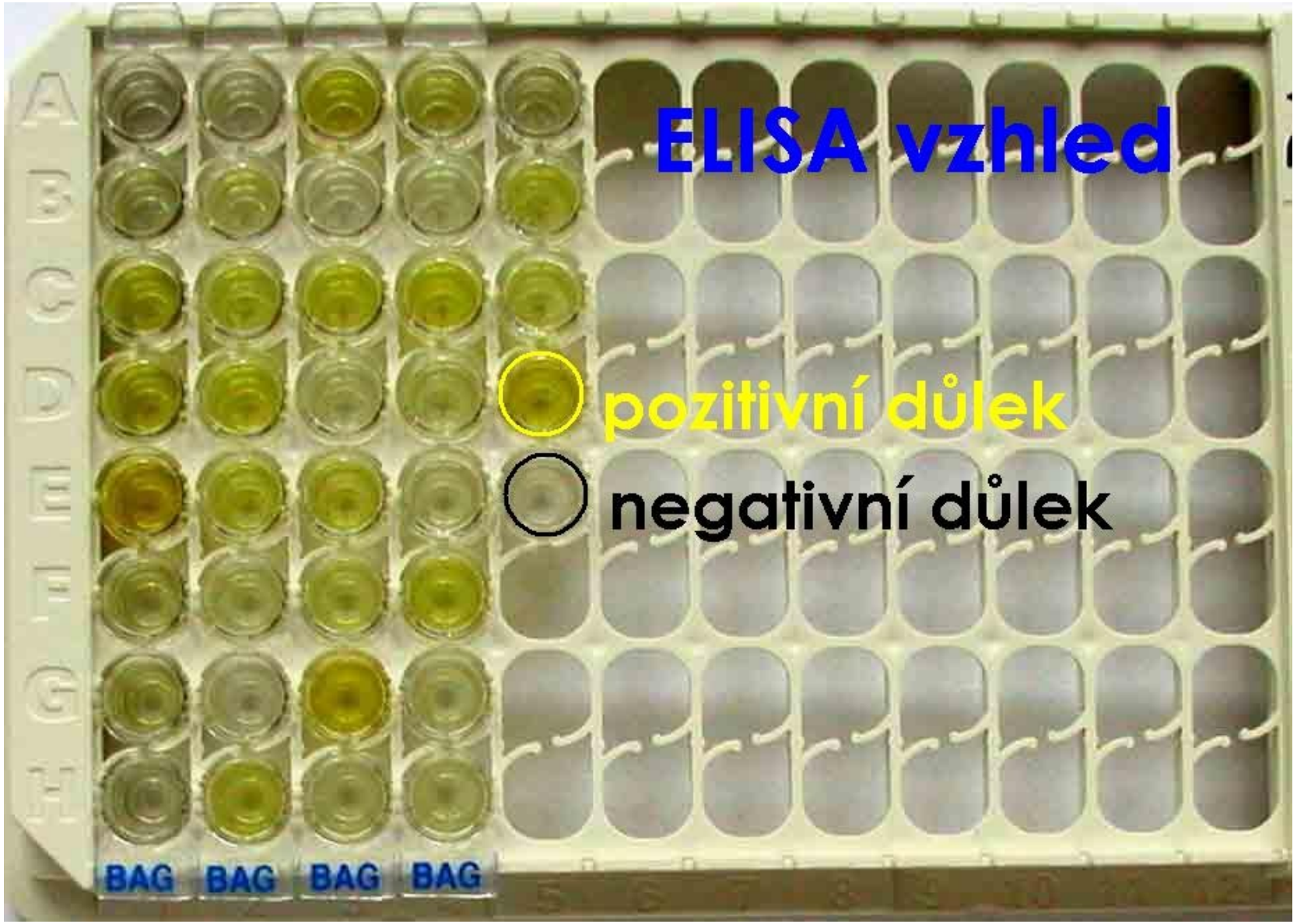
HIT

- Hemaglutinačně Inhibiční Test: Dávejte pozor, toto NENÍ aglutinační, ale neutralizační reakce! Protilátky neutralizují virové shlukování erytrocytů.
- **A tak: Bramboroid = negativní výsledek. Intenzivní kulatá tečka = pozitivní výsledek**
- HIT se liší od ASLO hlavně tím, že krvinky nejsou hemolyzované, ale shlukované. Ovšem to, že specifické protilátky blokují akci platí v obou případech

Reakce se značenými složkami



ELISA – příklad (MiÚ)



Jeden úkol: skládačka HBsAg / anti-HBS

- Testování HBsAg – pozitivní
- Testování HBsAg – negativní
- Testování anti-HBs – pozitivní
- Testování anti-HBs – negativní

Například umět vyhodnotit

BL	4
K-	5
K-	6
K+	7
K+	8
1	9
2	10
3	11
IgA	

BL	4
K-	5
K-	6
K+	7
K+	8
1	9
2	10
3	11
IgG	

c. o. (IgA) = (0,107 + 0,137)/2 + 0,320
c. o. (IgA) = 0,122 + 0,320 = 0,442
90 % c. o. = 0,398 110 % c. o. = 0,486
hodnoty pod 0,398 jsou negativní
hodnoty nad 0,486 jsou pozitivní

c. o. (IgG) = (0,034 + 0,029)/2 + 0,320
c. o. (IgG) = 0,032 + 0,320 = 0,352
90 % c. o. = 0,317 110 % c. o. = 0,387
hodnoty pod 0,317 jsou negativní
hodnoty nad 0,387 jsou pozitivní

HLEDEJTE POZITIVNÍ A HRANIČNÍ PACIENTY JAK V IgA, TAK I V IgG!

Western blotting – princip

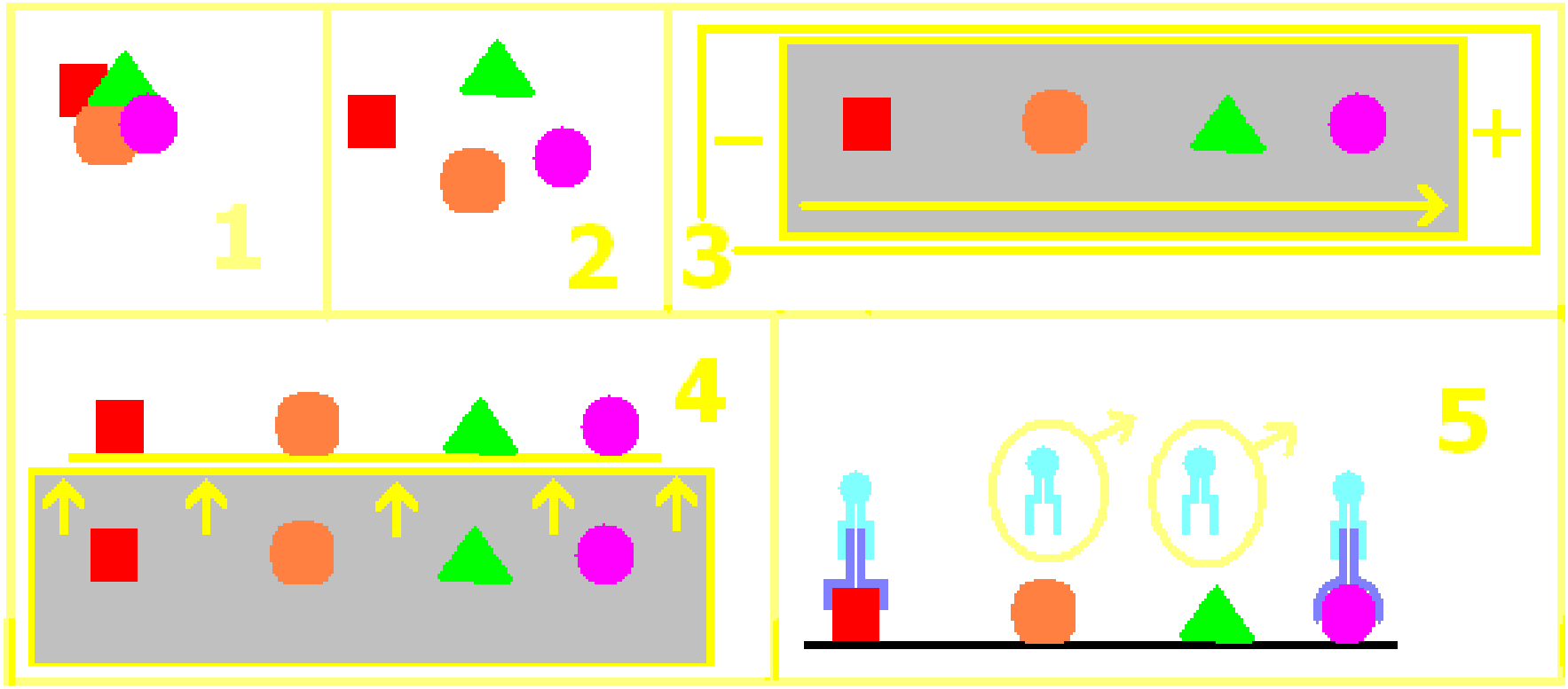
1: původní antigen (směs)

2: uvolnění jednotlivých antigenů detergentem

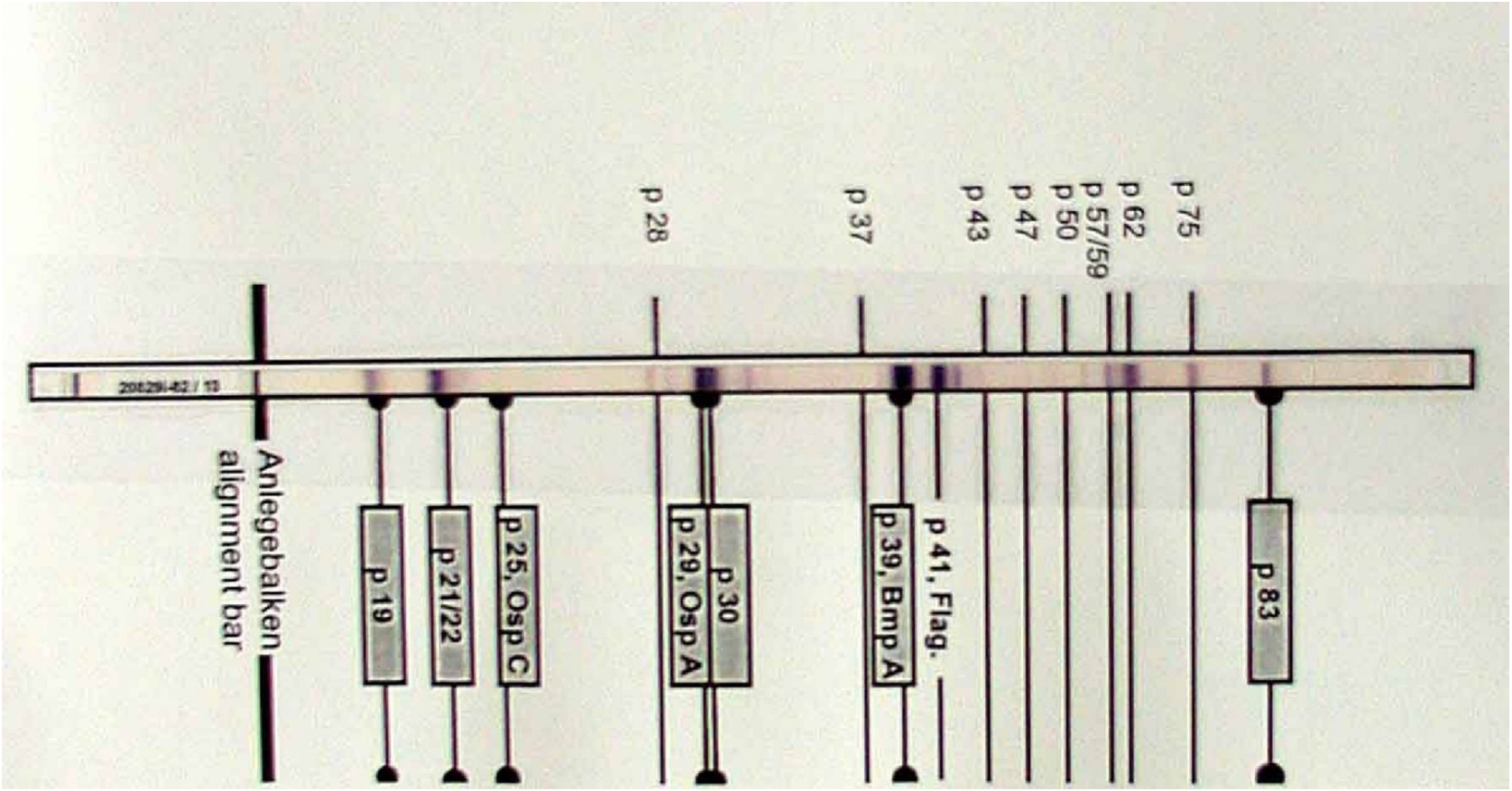
3: elektroforetické rozdělení antigenů

4: „přesátí“ rozdělených antigenů na nitrocelulózu

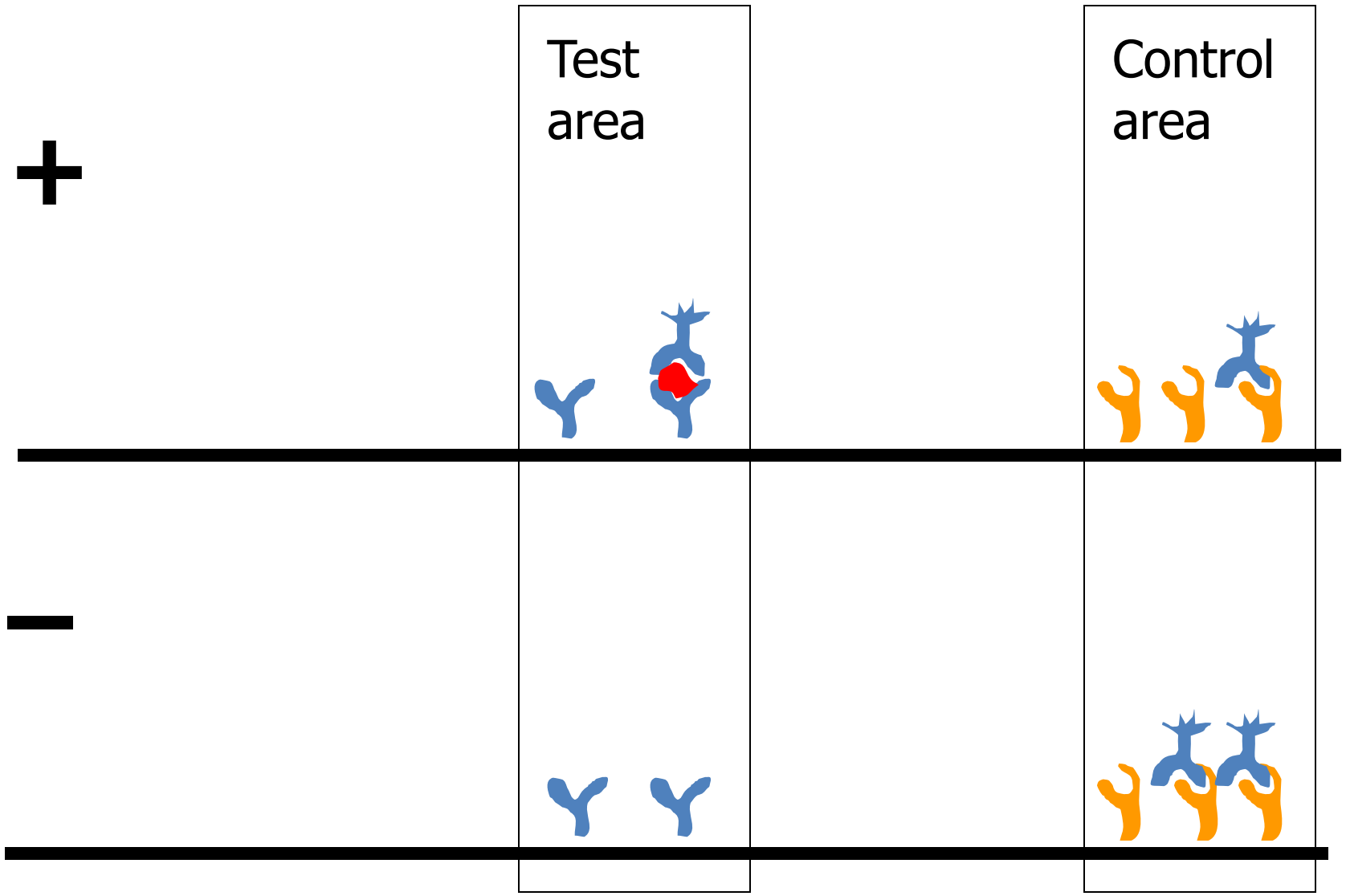
5: reakce ELISA (přítomny jsou jen některé protilátky)



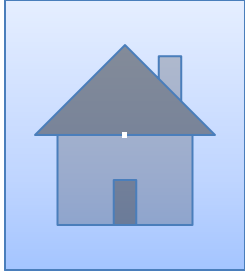
Western blot – vzhled
(obrázek z Foto: MiÚ)



Immunochromatografie



Důležité!



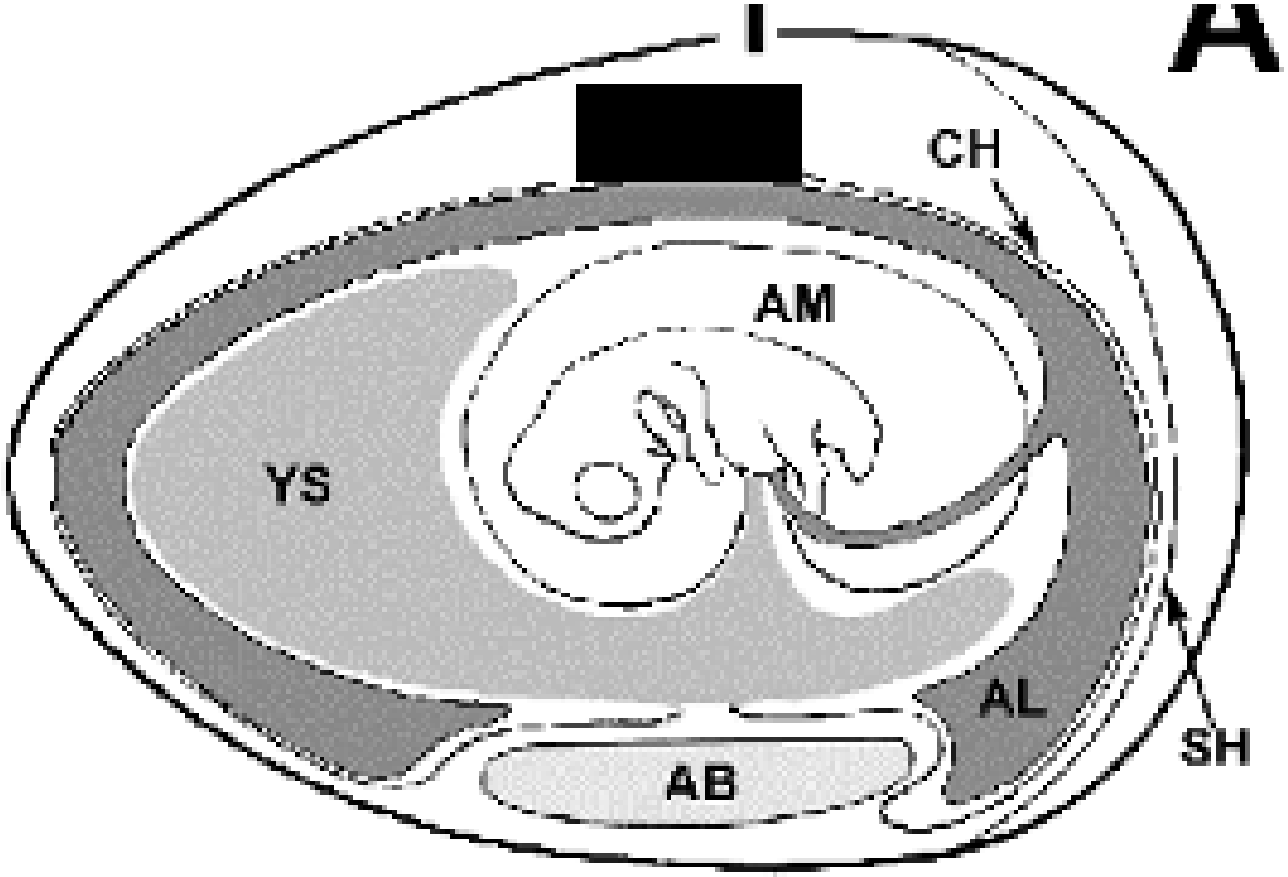
- Je potřeba nejen vědět, jak vyhodnotit test, ale také jak ho interpretovat.
- Existují tři speciální úkoly (na toxoplasmózu, boreliózu a hepatitidy A/B/C) založené na komplexní interpretaci včetně anamnézy!
  - Např. těhotná žena s IgG proti toxoplasmóze NENÍ nemocná, ale chráněná!

Speciální lékařská mikrobiologie

J11+J12
Virologie

- Větší část virologie je **totožná se serologií** (průkaz HBsAg a podobně)
- Navíc: přímý **průkaz viru na vaječných zárodcích a buněčných kulturách** (a na sajících myšatech, teoreticky)
- Nutno znát: **kdy je a kdy není vidět výsledek izolace viru**, a co se dá dělat, když výsledek vidět není (hemaglutinace, hemadsorpce)

Nutno znát části oplodněného vejce…



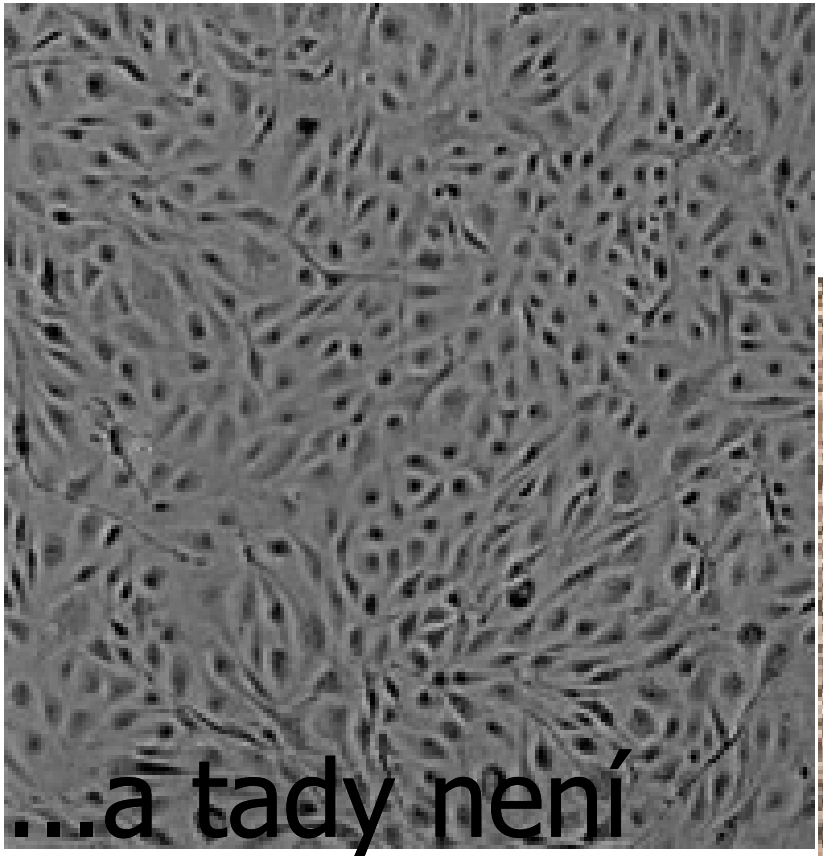
SH – skořápková (papírová) membrána

AB – bílek

http://www.scielo.cl/fbpe/img/bres/v38n4/fig02.gif

AM – amniový vak, YS – žloutkový vak, AL – allantois

CH – chorioallantoidní membrána (CAM)

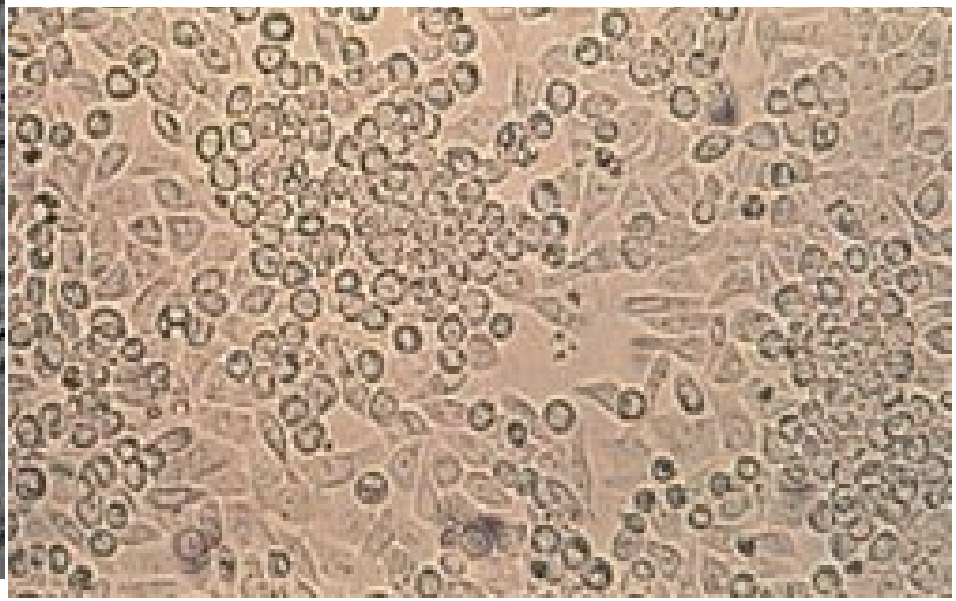


…a tady není

http://cmir.mgh.harvard.edu/cellbio/cellculture.php?menuID_=122

HSV Growing in Tissue Culture

Takže tady CPE je…



www.herpesdiagnosis.com/diagnose.html

…a zhruba tušit něco o CPE

(HSV je virus prostého oparu – HSV 1 způsobuje zpravidla herpes labialis, HSV 2 herpes genitalis)

J13: Parazitologie. Znát tato vejce:

Alespoň tyto tvary byste měli znát ke zkoušce

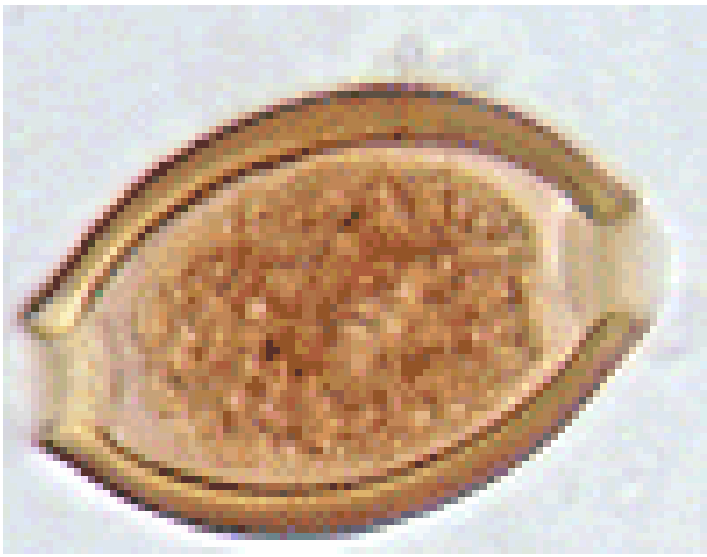
Roup

Mrľa

Enterobius

Tenkohlavec

Trichuris



Škrkavka

Hlísta

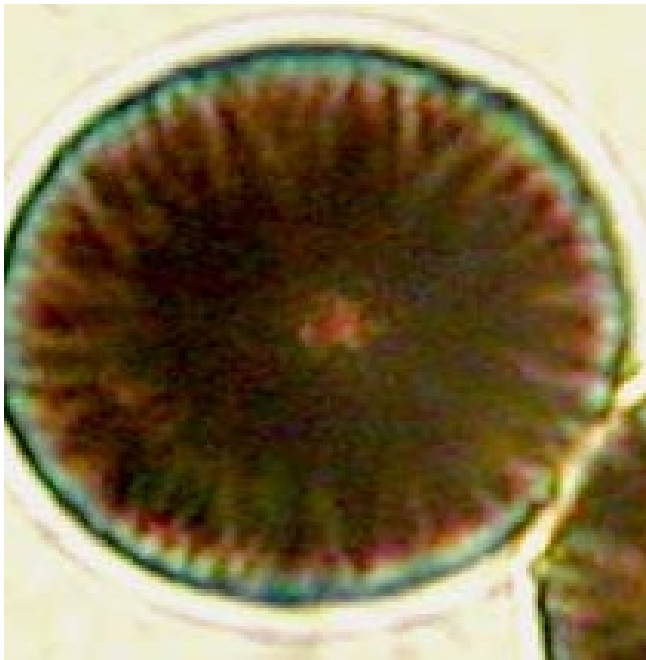
Ascaris

Tasemnice

Pásomnica

Taenia

+ články!



Obrázky převzaty z CD-ROM „Parasite-Tutor“ – Department of Laboratory Medicine, University of Washington, Seatle, WA

Znát metody diagnostiky střevních parazitů

- Jako základ se používají metody, které představují v podstatě **nativní preparát v různých modifikacích**
  - **U metody dle Kato** se používá dobarvení pozadí malachitovou zelení, aby se paraziti zvýraznili
  - **Faustova metoda** je koncentrační (viz dále)
- **Grahamova metoda** se používá jen u roupů (umět odečíst i prakticky)
- *Nativní preparát „sensu stricto“ a barvené preparáty (např. trichromem) se použijí u zvýšeného podezření na střevní prvoky (buďto primárně, nebo po prohlédnutí Fausta a Kato)*

Pozor – také dg. *Toxoplasma gondii* serologickými testy

- Jak již bylo řečeno, u tkáňových parazitů se často používá nepřímý průkaz
- **KFR.** První důlek je test antikomplementarity séra , ve druhém ředění 1 : 5, dále geometrickou řadou (1 : 10, 1 : 20, 1 : 40, 1 : 80 atd.). Pozitivní je nepřítomnost hemolýzy, negativní je hemolýza
- **ELISA** – způsob výpočtu: co je vyšší než (C1+ D1) : 2, je pozitivní. A1 je blank, B1 negativní, E1 pozitivní kontrola.

J14 mykologie

- Kvasinky se zkoušejí se jako bakterie z P01 až P06 – vizte dále
- U vláknitých hub se předpokládá, že určíte houbu podle mikroskopického preparátu porovnáním s obrázky hub, které se prohlížely v praktiku

P01 až P06 a J13 (většina speciální bakteriologie a kvasinky)

- **Jednotný typ úkolů: „Z předložených kmenů vyberte kmen …** (např. stafylokoka), **blíže určete, popř. také určete test citlivosti na antibiotika“**
- Úkol z větší části teoretický (Gramovo barvení se nedělá, jen se o něm hovoří), ale některé části (kataláza, oxidáza) se mohou provést i prakticky, je-li na to čas
- Důležité je znát a dodržet algoritmus – postupovat od obecného k detailnímu

Výjimky:

- **ASLO se zkouší jako serologický úkol**, plus znalost specifického významu tohoto testu (viz u serologie)
- **Grampozitivní tyčinky se zkoušejí jinak** – student si prohlíží obrázky G+ tyčinek a má určit, který obrázek morfologicky odpovídá korynebakteriím, plus odpoví na doplňující otázky (např. „co by to mohlo být, kdyby to nedělalo palisády a rostlo by to při 4 °C?“)
- **Zvláštní úkoly se také týkají anaerobů, mykobakterií a spirochet**

Korynebakteria, tvary

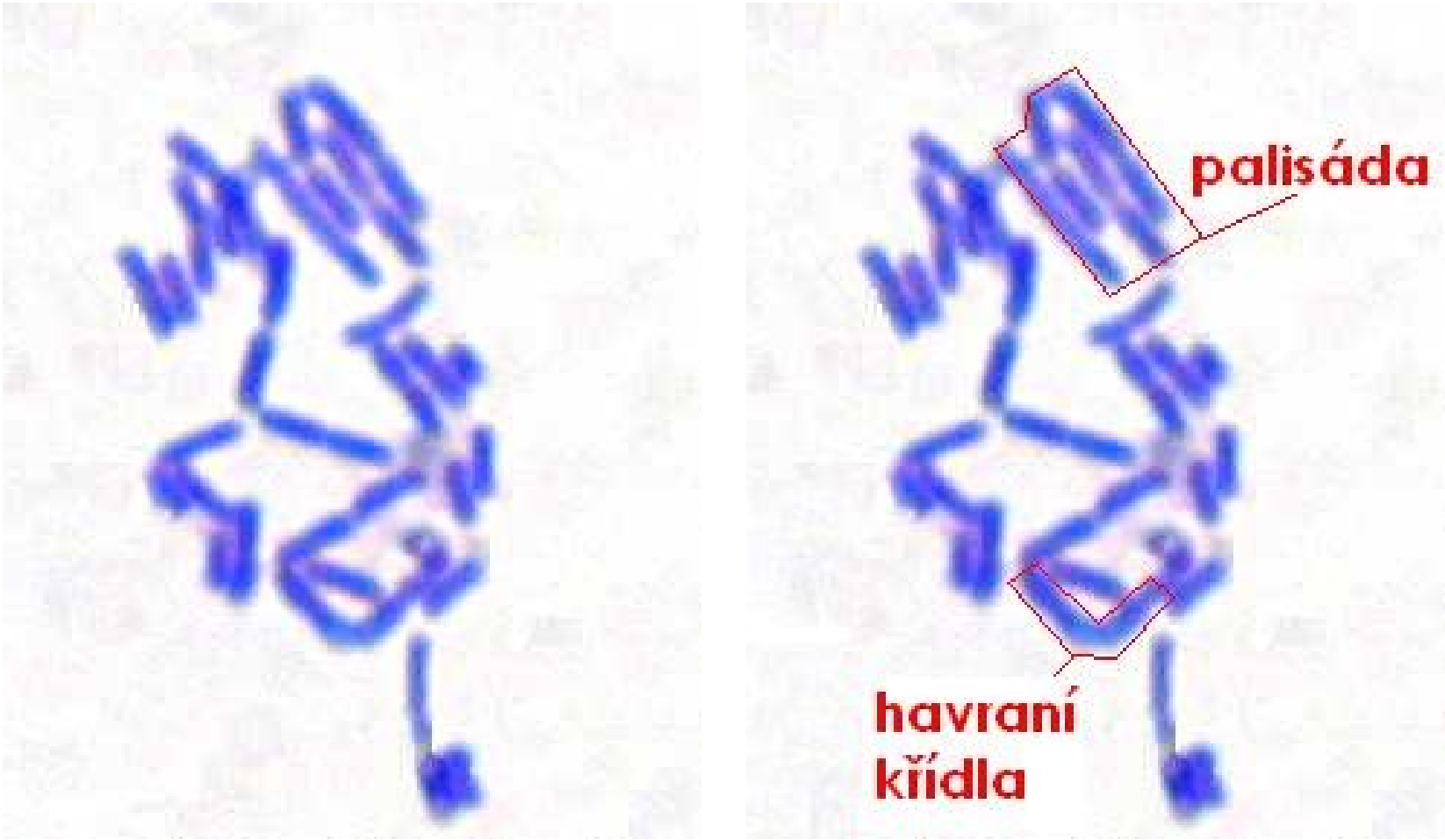


foto O. Z.

P07: Anaeroby

popis anaerostatu

vzduchotěsné víčko

palladiový kalalyzátor
(pod víčkem)

konstrukce pro
ukládání Petriho misek

Generátor anaerobiózy
(sáček s chemikáliemi)

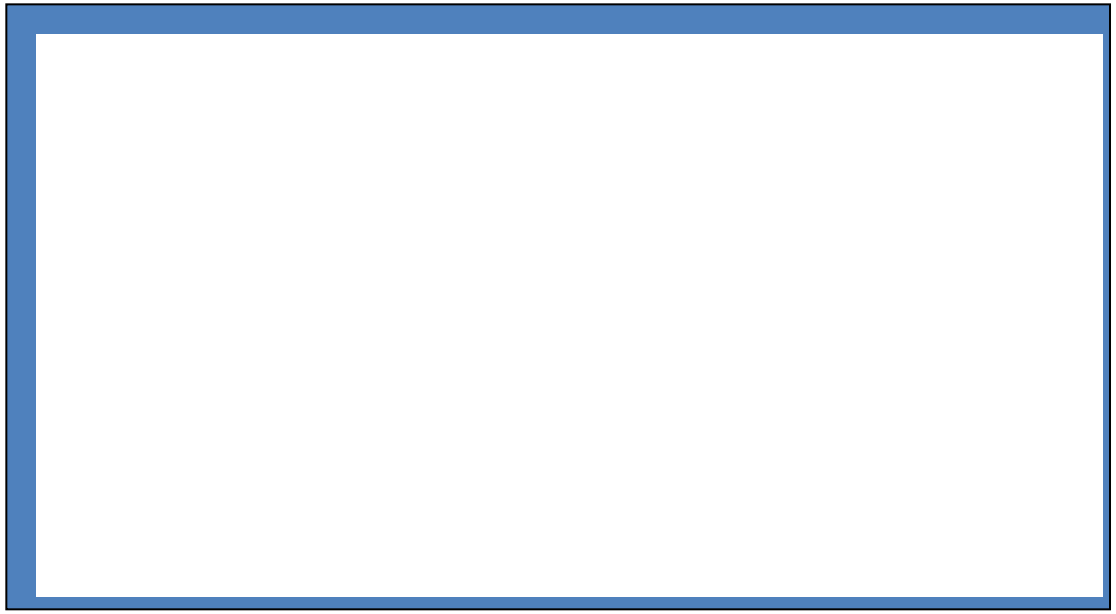
Anaerobní box (znát ho zhruba také)

Foto: MiÚ, photo O. Z.

Detekce lecitinázy

- Produkce lecitinázy je detekována jako precipitace kmene na žloutkovém agaru. Existuje ovšem mnoho lecitináz, a zajímá nás pouze lecitináza *Clostridium perfringens*, musíme tedy ověřit, bude-li lecitináze inhibována příslušným antitoxinem

„Negativní I“ vůbec neprodukuje lecitinázu.
„Negativní II“ produkuje, ale nějakou jinou, než nás zajímá



Plus: znát i další metody, znát půdy pro anaerobní kultivaci aj.

- Pokus na zvířeti se používá u tetanu a botulismu. U tetanu se myš svíjí v křeči, u botulismu jsou naopak patrné parézy. U toxinu *Clostridium perfringens* se pokus na zvířeti nepoužívá, zde využíváme kultivační průkaz lecitinázy na žloutkovém agaru.

U toxinu *Clostridium difficile* využíváme imunochromatografický test.

P08: Acidorezistentní bakterie
Znát Ziehl-Neelsena

- V prvním kroku barvíme karbolfuchsinem (Gabbetem) za horka až do výstupu par. Bez zahřívání by mykobakteria nešlo obarvit, leda při použití koncentrovanějšího karbolfuchsinu.
- V druhém kroku odbarvujeme cca 15 s „kyselým alkoholem“, což je směs alkoholu s minerální kyselinou, nejčastěji kyselinou chlorovodíkovou, poté opláchneme vodou
- Ve třetím kroku dobarvujeme pozadí, tj. vše, co jsme ve druhém kroku odbarvili. Dobarvujeme cca 30 s malachitovou zelení nebo metylenovou modří. Opět opláchneme, osušíme a pozorujeme imerzí.
- Výsledkem jsou červené acidorezistentní tyčinky na modrém nebo zeleném pozadí

Jak se zkouší

- Měli byste **znát postup, plus vědět, jak vypadá pozitivní Ziehl-Neelsen** a na základě toho umět odlišit jeho obrázek od jiných (například Gramem barvených preparátů)
- Plus (stejně jako u dalšího úkolu) **znalost ostatních metod u TBC, testování citlivosti**, diagnostika aktinomycet a nokardií (rámcově) pro dodatečné dotazy

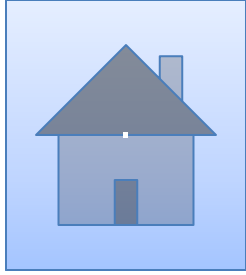
Další úkol: Kultivace mykobakterií

- Vědět,že před kultivací musí být provedeno moření
- Znát **půdy (Šula, Banič a vaječné půdy Ogawovu či Löwenstein-Jenssenovu)**.
- **I pevné půdy se nalévají do zkumavek a uzavírají zátkou**. Není to jen kvůli ohrožení personálu, ale především kvůli vyschnutí půdy.
- Výsledky **se odečítají po 1 (kontrola kontaminace) 3, 6 a pro jistotu i 9 týdnech kultivace**. (Pozitivní výsledky se obvykle nacházejí po šesti týdnech)

Nepřímá diagnostika TBC

- **Buněčná imunita**
- Testování kvantiferonu včetně pochopení významu zkumavek „NIL“ a „MIT“
- Vysvětlení významu nepřímé diagnostiky TBC

P09 Serologie syfilis + serologie borreliózy (viz serologická část)



Historický	BWR – Bordet Wassermann	Netr.
Screeningové	RRR – Rapid Reagin Test	
	TPHA/TPPA	Treponemové
Konfirmační	ELISA	
	FTA-ABS (např. imunofluor.)	
	Western Blotting	
Historický, popř. superkonfirmace	*TPIT (Treponema Pallidum Imobilizační Test) = Nelson*	

Rámcově musíte znát také testy přímého průkazu!

Klinická mikrobiologie „sensu stricto“

P10–13 Klinická mikrobiologie I–IV

- **Odběry a rozhodování obecně (P10):**
- Několik úkolů, všechny jsou stejné:
- „Pro tři minikazuistiky najděte vhodné metody odběru a nádobky/výtěrovky pro odběr
- Je nutná znalost odběrových souprav (požaduje se, abyste prakticky ukázali vhodnou soupravu)

Některé typy výtěrovek

Suchý tampon
www.calgarylabservices.com

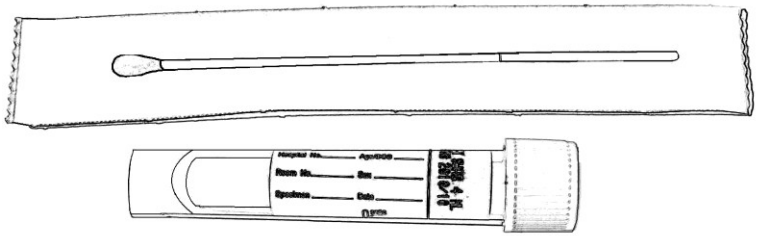
Dnes se používá jen pro PCR a průkaz antigenu, ne pro kultivaci!

Amiesova půda s aktivním uhlím www.herenz.de

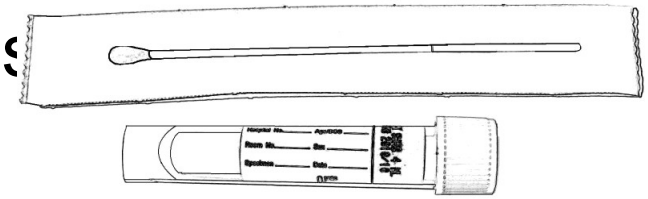
Univerzální transportní půda pro bakteriologii (všechny typy výtěrovek). Drátěná varianta je důležitá, pokud se potřebujeme „dostat za roh“.

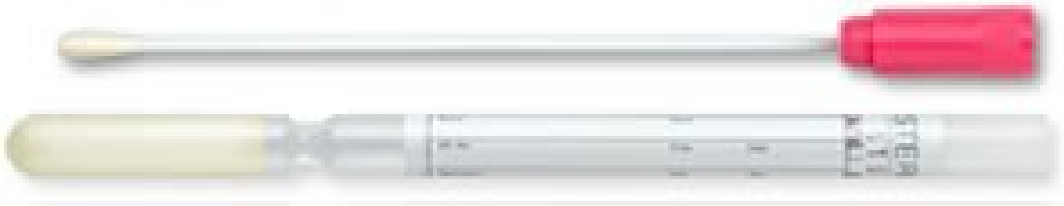
Další výtěry

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

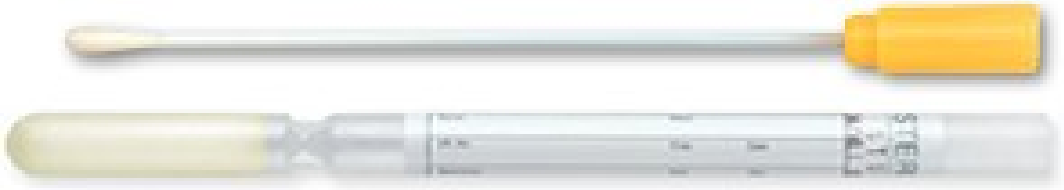


Souprava C. A. T. (Candida And Trichomonas, pouze z genitálií www.copans



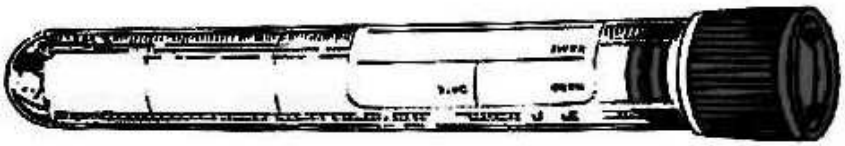


Na viry
www.copanswabs.com

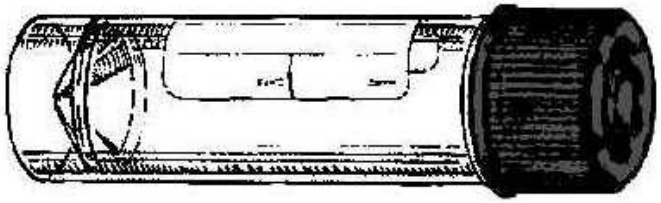


Na chlamydie
www.copanswabs.com

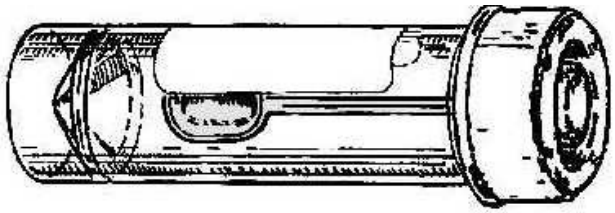
Nádobky



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



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



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

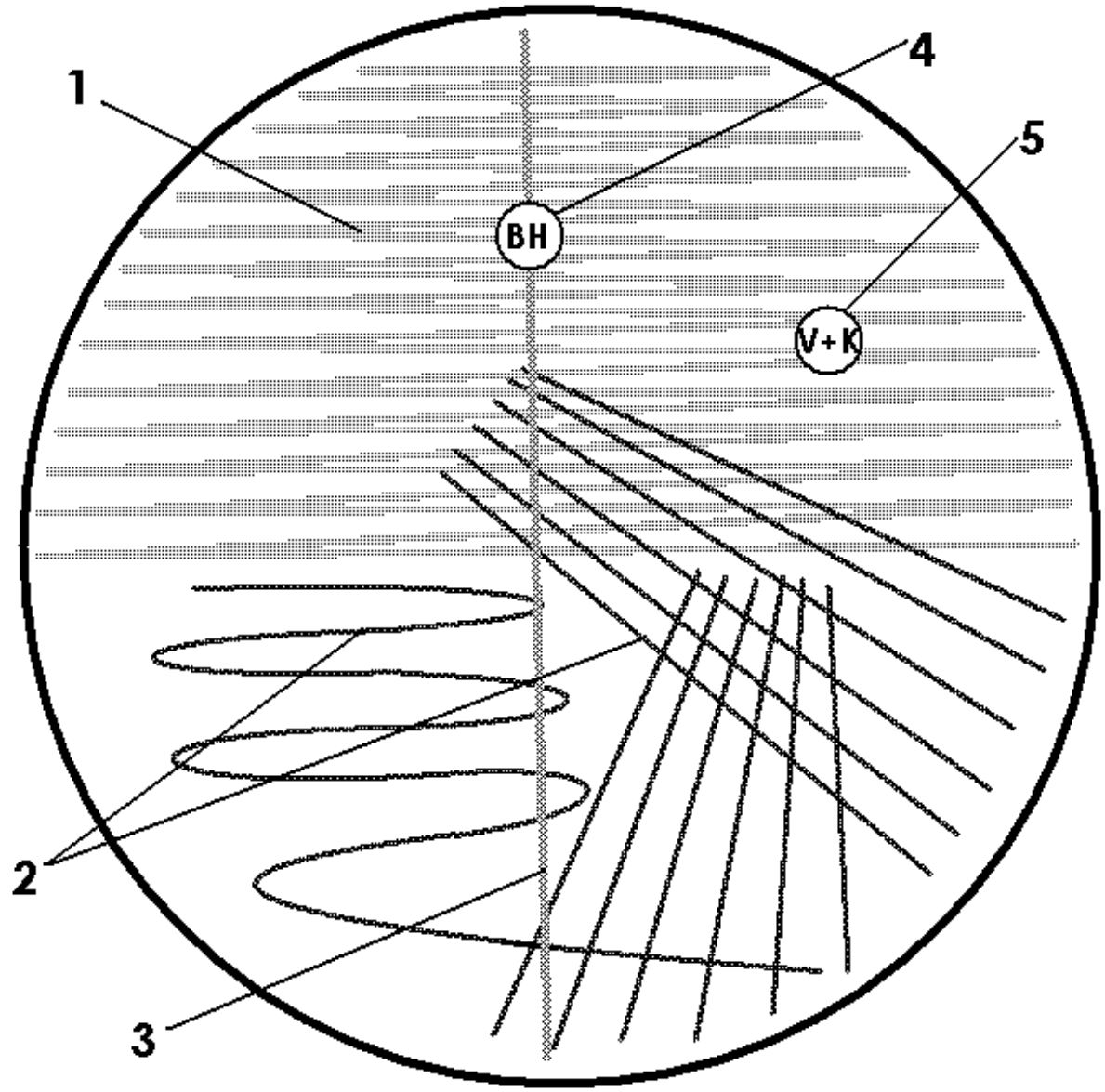
Nádobka na odběr moče. Je lepší, když pacient čurá rovnou do zkumavky, avšak zvláště pro ženy je to obtížné (nejsou-li ve sprše). Mohou tedy močit do této nádobky, a pak sestra moč přelije do zkumavky.

P11–13 Klinická mikrobiologie II–IV

Zahrnuje řadu zrádných úkolů:

- **Najít patogeny mezi běžnou orofaryngeální mikroflórou** (nutno vědět, která to je, a jak se tam patogeny hledají)
- **Odečíst semikvantitativní a kvalitativní vyšetření moče** – nezapomenout, že určení kvantity je podmínka nutná, ale nikoli dostačující (je totiž ještě nutno zjistit, co to je za mikroba)
- **Odečíst hemokulturu (mikroskopicky i kultivačně), poševní nátěr a výtěr, výtěr z rány, výtěr z řiti**

Záchyt patogena v krku či sputu



1 očkováno tamponem

2 očkováno kličkou

3 stafylokoková čára

4 disk BH (bacitracin pro hemofily)

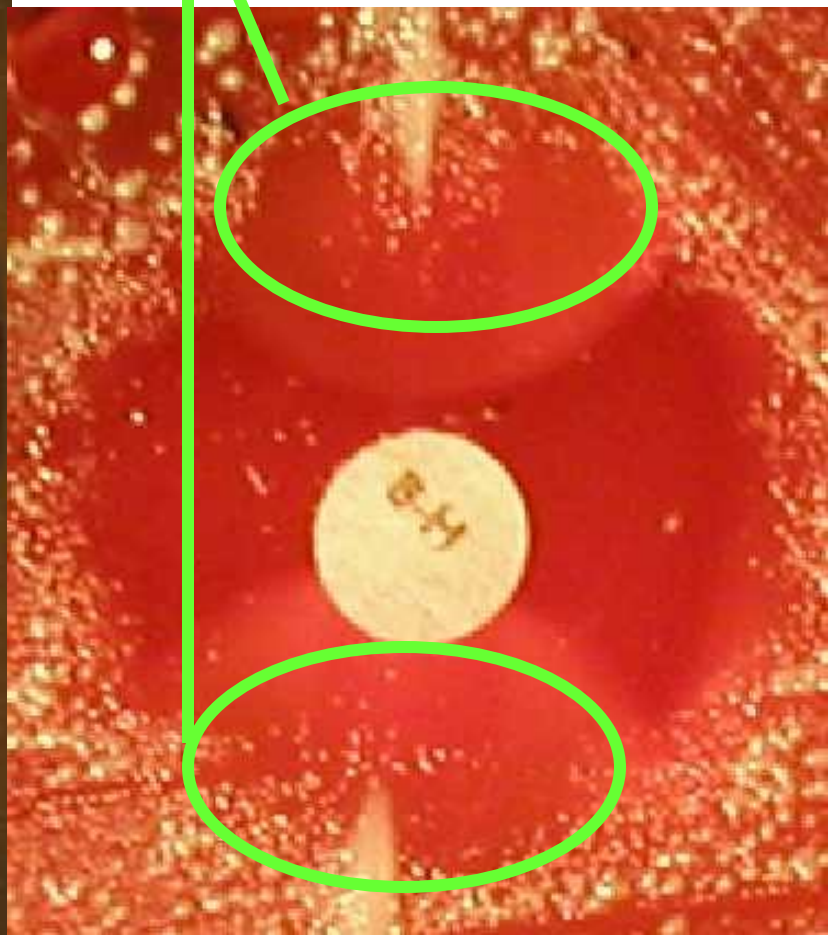
5 disk VK (vankomycin a kolistin pro meningokoky)

Na celé naočkované ploše pátráme po streptokocích (bezbarvé) a po stafylokocích (spíše bílé či zlatavé)

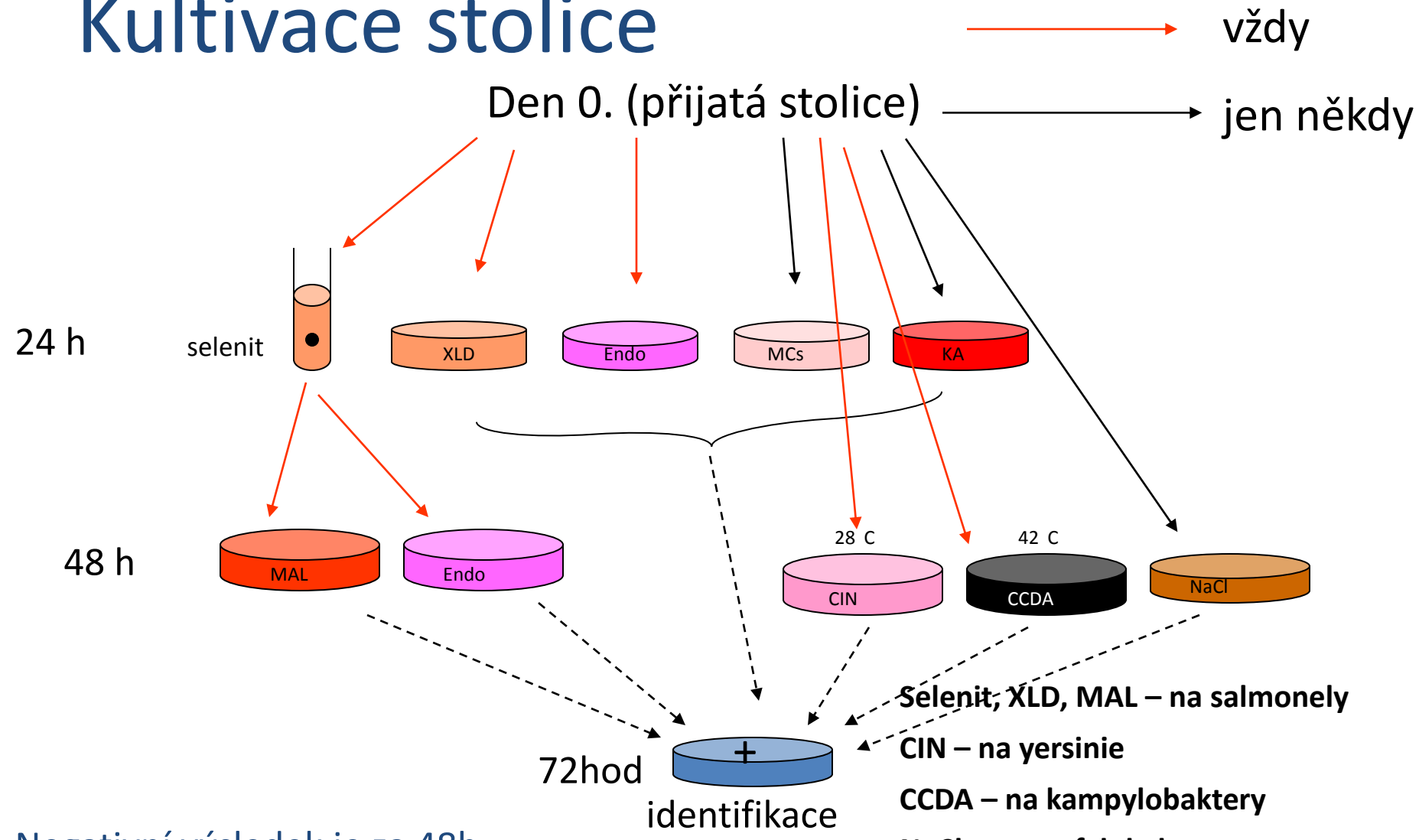
Kultivační výsledek výtěru z krku s běžnou flórou

Foto: MiÚ

V těchto místech pátráme po hemofilech



Kultivace stolice



Selenit, XLD, MAL – na salmonely

CIN – na yersinie

CCDA – na kampylobaktery

NaCl – na stafylokoky

MCS – na některé STEC

Endo – na různé enterobakterie

KA – na některé další bakterie

Negativní výsledek je za 48h

Pozitivní za 72h a déle

*Není-li uvedeno jinak, kultivace probíhá při 37 C

Semikvantitativní zpracování moče

- Používá se kalibrovaná plastová klička – do očka kličky se zachytí vždy 1 µl moče
- Tento mikrolitr se rozočkuje většinou na polovinu misky krevního agaru (vy to máte na celé misce)
- Kolonie není třeba přesně spočítat, stačí odhadnout je-li jich více než 100, méně než 10 nebo „něco mezi“
- Zároveň je třeba určit patogena, který se v moči nachází

Semikvantitativní hodnocení moče

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

Výpočet Nugentova skóre

Vzhledem k tomu, že jde o mikroskopický a ne kultivační průkaz, pracuje systém s tzv. morfotypy. Například bakterie patřící k „morfotypu laktobacil“ nemusí být laktobacil, ale je to velmi pravděpodobné.

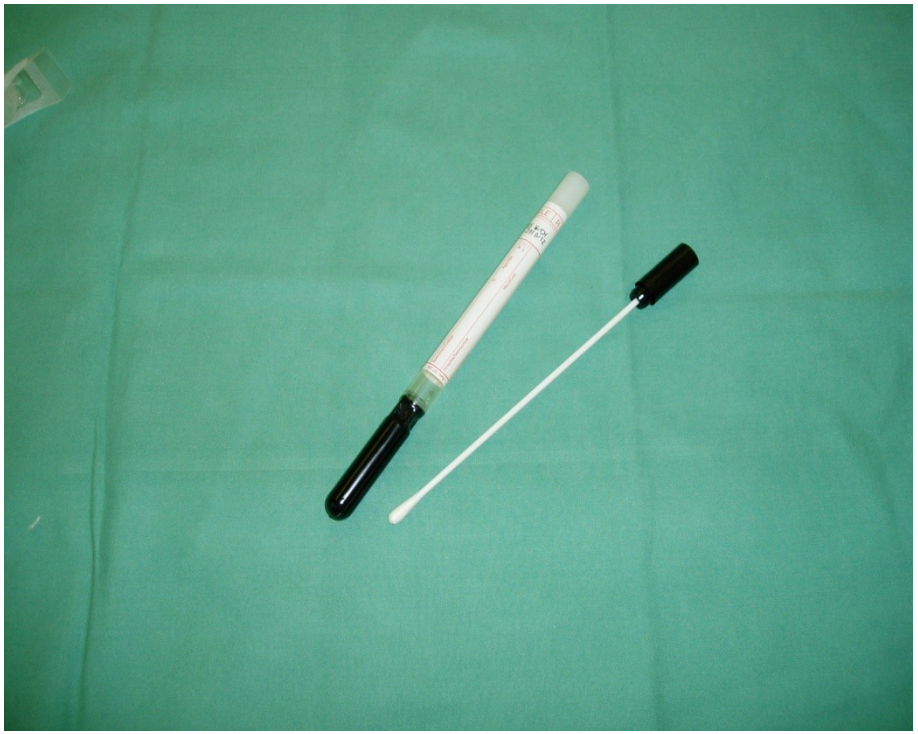
- **Morfotyp Gardnerella/Bacteroides:** nepřítomny = žádný bod, + = jeden bod, ++ = dva body, +++ = tři body, ++++ = čtyři body
- **Morfotyp Lactobacillus:** naopak – nepřítomny = čtyři body až pozitivita na ++++ = nula bodů
- **Zahnuté gramlabilní tyčinky:** nejsou = 0 bodů, + či ++ = jeden bod, +++ či ++++ = dva body

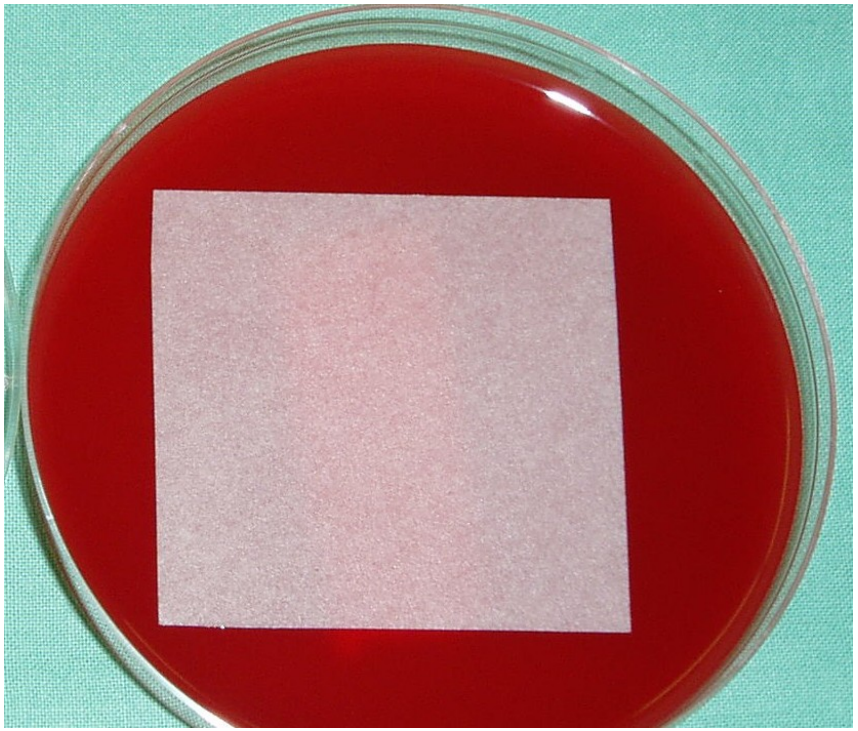
Poševní výtěry

Poševní výtěry zpravidla kultivujeme na následujících půdách:

- krevní agar (na běžné bakteriální patogeny)
- Endova půda (nebo McConkeyho půda)
- agar s 10 % NaCl (pro staphylokoky)
- speciální varianta krevního agaru pro *Gardnerella vaginalis* (GVA agar)
- WCHA agar (anaerobní kultivace) – jen někdy

Stěr a otisk





Obrázky otiskové metody převzaty z prezentace MUDr. Zdeňka Chovance z I. CHK LF MU a FN USA v Brně

Výtěr z rány (bez anaerobní kultivace): Možné diagnostické schéma

(Podle okolností se může v praxi lišit)

- **Den 0:** pouze nasazení kultivací
- **Den 1:** výsledek primokultivace vzorku na krevním agaru (KA), Endově půdě, KA s 10 % NaCl a KA s amikacinem. V případě negativity všech pevných půd se prohlíží bujón, je-li zakalený, vyočkuje se (subkultivace)
- **Den 2:** expedice všech negativních a mnohých pozitivních výsledků – pro komplikace, rezistence apod. ovšem zdaleka ne všech
- **Den 3:** expedice dalších pozitivních výsledků

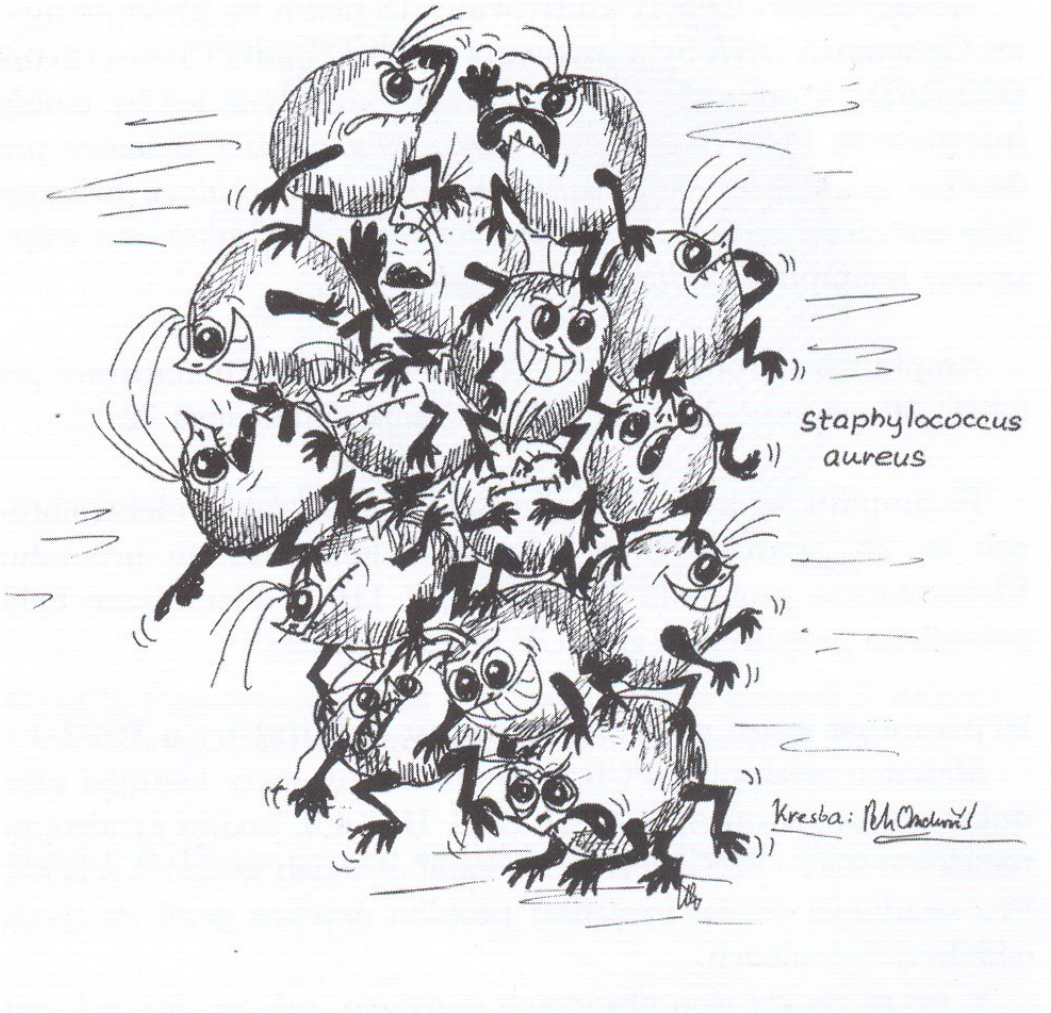
Hemokultury – odběr krve

- Jedná se o **nesrážlivou krev**, principiálně zcela odlišné vyšetření než vyšetření serologická ***(nejde o průkaz protilátky ani antigenu, mikrob musí zůstat živý a prokazuje se kultivačně)***
- Dnes zpravidla odběr do **speciálních lahviček s transportně-kultivačním médiem** pro automatickou kultivaci *(kdysi se posílala jen samotná nesrážlivá krev)*
- Nutno zabezpečit tak, aby se **minimalizovalo riziko pseudobakteriémie** (viz dále)
- **U dospělých se odebírá 10 až 20 ml krve, u dětí zpravidla 1–5 ml podle věku** (odběr je u nich náročnější než u dospělých, a také platí, že u dětí má význam i méně bakterií)

Fungování kultivátorů

- **Kultivátor, napojený na počítač**, automatický udržuje optimální podmínky kultivace, a zároveň vyhodnocuje stav nádobky a indikuje případný růst (např. změna reflektance, tj. optických vlastností lahvičky)
- Růst je **zvukově a opticky signalizován. Pokud ani po týdnu nic neroste**, signalizuje to přístroj také (je třeba expedovat negativní výsledek)

Nashledanou u zkoušky!



kresba: Petr Ondrovčík