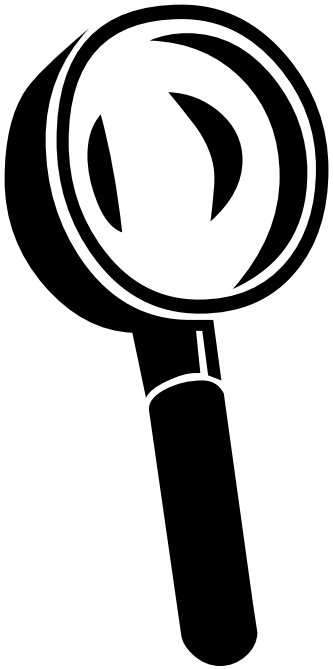


Mikrobiologický ústav uvádí

NA STOPĚ PACHATELE

Díl desátý:

Spolupráce při pátrání aneb Klinická mikrobiologie I

Na úvod (materiál se přijímá i o Vánocích)

Přehled témat

Bonus: Běžná flóra +

Úvod do klinické mikrobiologie

1 Indikace

2 Odběr vzorku (včetně žádanky)
3 Transport vzorku

4 Rozhodnutí, jak zpracovat
5 Vlastní zpracování

6 Zaslání výsledku
7 Interpretace

Úvod do klinické mikrobiologie

Příběh první – 1

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

Příběh první – 2

- Petrův stav se však nezlepšoval. Petr se naštval a navštívil známého lékaře na plicním. Byla odebrána srážlivá krev na serologii respiračních virů a nalezeny vysoké titry protilátek proti *Mycoplasma pneumoniae*. Petr začal užívat SUMAMED (azithromycin) a brzo se jeho stav výrazně zlepšil.

Viníkem bylo nejen *Mycoplasma pneumoniae*, ale i

- obvodní lékař X. Y., protože:
  - správně si vzpomněl, že je většinou dobré před nasazením antibiotik zjistit původce a antibiotickou citlivost
  - udělal však chybu v rozhodování, jaké vyšetření je v daném případě indikováno
  - mělo být zasláno sputum, a při negativitě kultivace (nebo při indiciích ukazujících spíše na atypickou než klasickou pneumonii) případně srážlivá „krev na serologii respiračních virů“ (včetně chlamydií a mykoplasmat, ač to viry nejsou)

Všimněte si, že jsou i případy, kdy makrolidy jsou správné řešení dané situace (ač jinak autor těchto řádků spíše brojí proti jejich nadužívání)

Příběh druhý

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

Viníkem byla pouze *Neisseria gonorrhoeae*

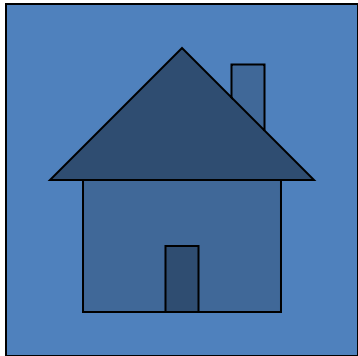
- Obvodní lékař tentokrát nic nezanedbal, gonokoková faryngitida zase není tak běžná, aby se po ní rutinně pátralo při rutinní anamnéze. Pozitivní je, že se nenechal zviklat negativním výsledkem vyšetření.
- Lékař si totiž správně uvědomil, že každý typ vzorku má v laboratoři své rutinní vyšetřovací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

Co je to klinická mikrobiologie

- Klinická mikrobiologie „v širším slova smyslu“ je lékařská mikrobiologie – tedy ta část mikrobiologie, která se týká mikrobiálního osídlení člověka a lidských patogenů. V podstatě tedy všechno to, z čeho budete skládat zkoušku
- Klinická mikrobiologie „v užším slova smyslu“ popisuje procesy mezi klinickým pracovištěm a laboratoří, jakož i organizaci vlastního laboratorního vyšetření. Je tedy orientovaná na jednotlivé orgány a systémy a tedy také jednotlivé typy vzorků.

Proces mikrobiologického vyšetřování – na všem záleží!!!

KLINIK	LABORATOŘ
Indikace vyšetření – zda, jaké	
Vlastní provedení odběru	
Transport materiálu	
	Rozhodnutí, jak zpracovat
	Vlastní zpracování materiálu
Zaslání výsledku	
Interpretace v kontextu ostat. výsledků a stavu pacienta (léčit vždy pacienta, ne nález)	



1 Indikace

1A Indikace – ZDA provést

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

1B Indikace – CO provést

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

Tři typy patogenů (1)

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

Tři typy patogenů (2)

- Patogen typu *Streptococcus pyogenes*. Týká se kultivovatelných bakterií a kvasinek, tedy většiny mikrobů z P01 až P06 a zčásti J12
- Patogen typu *Mycobacterium tuberculosis*. Stále je to přímý průkaz, ale speciální postupy, při běžné kultivaci se nezachytí. Týká se zejména mikrobů z P07, P08, J13, část P06.
- Patogen typu *Toxoplasma gondii*. Nepřímý průkaz, event. přímý průkaz virového antigenu. Týká se spirochet z P09, virů z J10 a J11, ale i některých dalších (třeba zrovna toxoplasmy).

Foto: MIkrobiologický ústav

2 Odběr vzorku

(včetně žádanky)

3 Transport

2 Vlastní odběr vzorku
3 Transport vzorku do laboratoře

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

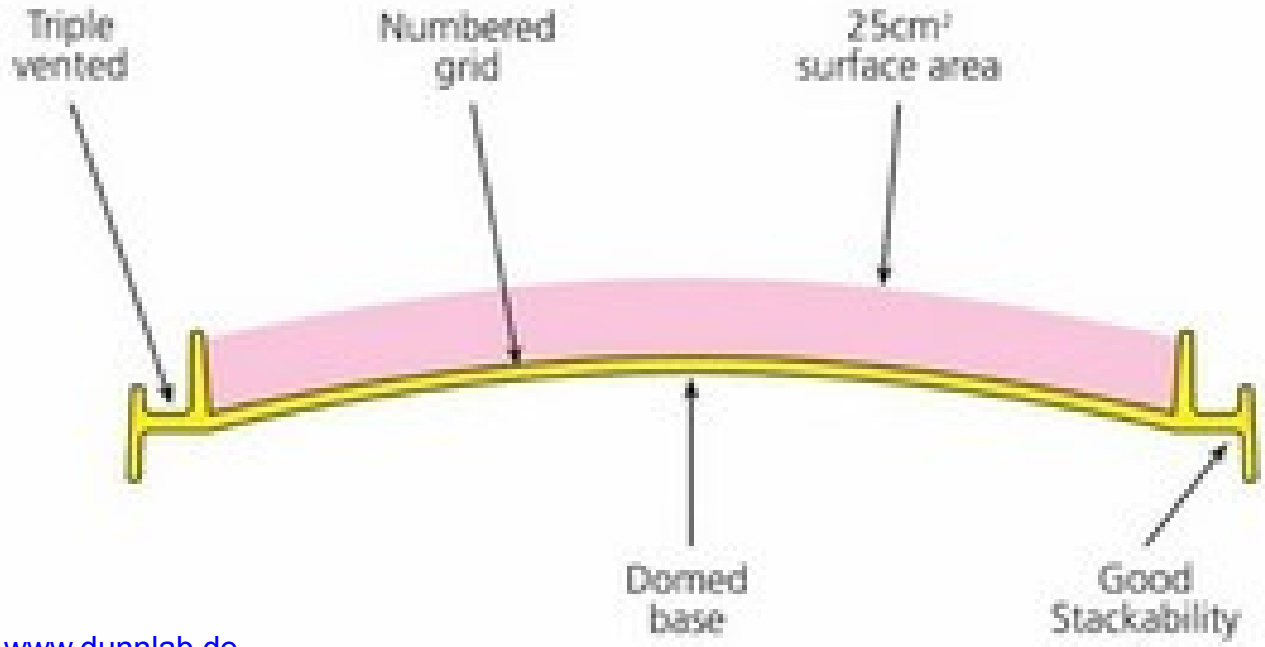
Jiné typy odběrů než „výtěrovky“ a odběrové nádobky

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

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

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

Kontaktní destička



www.dunnlab.de

Uricult

www.mediost.com

Některé typy výtěrovek

Suchý tampon www.calgarylabservices.com

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

Amiesova půda s aktivním uhlím www.herenz.de

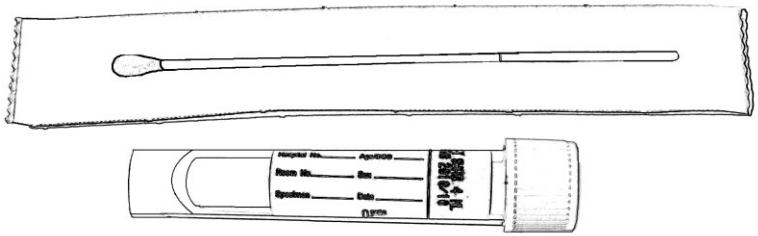
Univerzální transportní půda pro bakteriologii (všechny typy výtěrů). Drátěná varianta je vhodná, pokud se potřebujeme „dostat za roh“ (výtěr z nosohltanu u chřipky, stěr z rány s výběžky)

Další výtěry

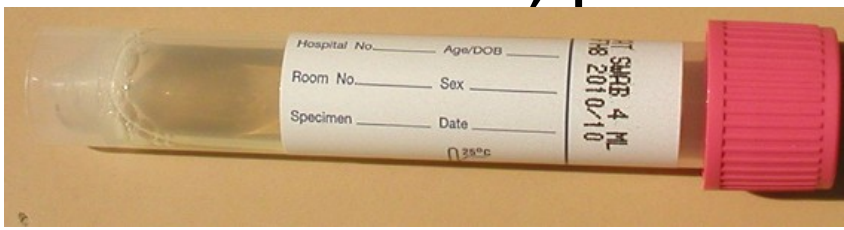
Fungi Quick (na kvasinky a plísně) www.copanswabs.com

Poznámky:

1) *má bleděmodrý vršek, jinak je podobný soupravě CAT*
2) *aktuálně se používá jen minimálně (i na kvasinky se často používá Amies)*



Souprava C. A. T. (Candida And Trichomonas, pouze z genitálií Foto: Mikrobiologický ústav



Na viry www.copanswabs.com

Na chlamydie

www.copanswabs.com

Přehled souprav na výtěry

Suchý tampon na špejli: průkaz antigenu a DNA	Suchý tampon na drátku: totéž, potřebuji-li se dostat na jinak nedostupné místo
Tampon v Amiesu na špejli: univerzální pro bakteriologickou kultivaci (vč. anaerobů, kapavky, kampylobakt.)	Tampon v Amiesu na drátku: totéž, potřebuji-li se dostat na jinak nedostupné místo

Fungiquick – houby

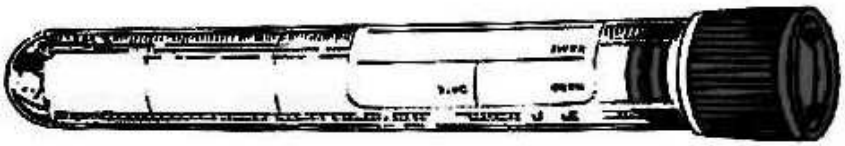
C. A. T. – houby a trichomonády (stěry z pohlaví)

Soupravy s médiem na viry, popř. chlamydie

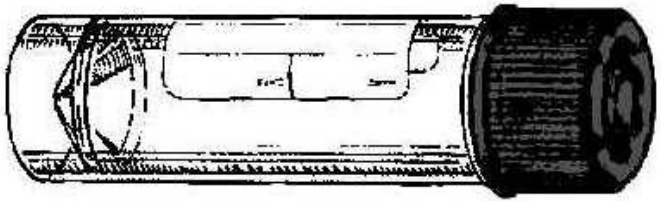
Odběrové nádobky

- Odběrové nádobky se používají na kusové a tekuté vzorky. Na rozměrech fakticky příliš nezáleží, stejně tak barva uzávěru má význam jen v kontextu dodavatele. Pokud jsou dodávány např. sterilní zkumavky s červeným uzávěrem a nesterilní s bílým, je třeba se tím řídit. Pozor ale při změně dodavatele!
- U anaerobní kultivace je lépe zaslat přímo stříkačku se speciálním uzávěrem (již tedy ne s jehlou)
- Vzorky se snažíme vždy dopravit do laboratoře co nejdříve, zásadní je to však u moče – do dvou hodin

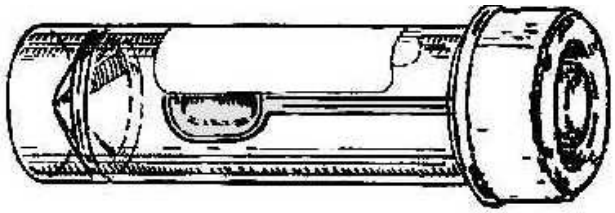
Nádobky



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



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



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

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

Průvodka 1

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

Průvodka 2 – co uvést

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

Průvodka 3 – co ještě uvést

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

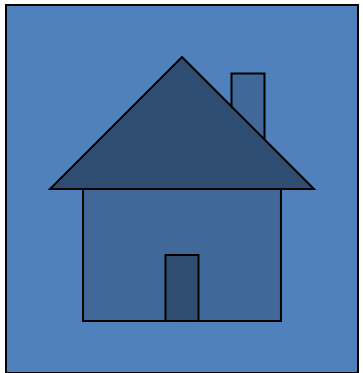
Vyplnění průvodky – shrnutí

Nesmíme zapomenout vyplnit na průvodce všechna důležitá pole:

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

Chyby při vyplňování žádanek

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



4 Rozhodnutí jak zpracovat

5 Vlastní zpracování

4 Rozhodnutí, jak zpracovat

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

5 Vlastní zpracování (1)

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

Foto: MIkrobiologický ústav

5 Vlastní zpracování (2)

Zpracování **bakteriologických kultivačních vzorků** obvykle zahrnuje následující

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

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

Laboratoř klinické bakteriologie
(konkrétní příklad uspořádání u sv. Anny)

Foto:

6 Zaslání výsledku

7 Interpretace

6 Zaslání výsledku

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

7 Interpretace

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

Interpretace přímého průkazu

- Patogen. Samozřejmě – 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, to se týká zejména gramnegativních (a z nich hlavně pseudomonád)
- Kontaminace během odběru, transportu apod.

Přehled běžné flóry

Více zde:

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

Interpretace nepřímého průkazu

- Akutní infekce. Charakterizována pozitivitou IgM protilátek, čtyřnásobným vzestupem titru, nízkoavidními protilátkami. Avšak někdy ani to vše nestačí – může např. jít o zkříženou reaktivitu
  Nemoc v minulosti. Zpravidla pouze IgG pozitivita a nízký, neměnící se titr. Bohužel ani zde ne vždy jednoznačně platí tato pravidla.
- Chronická nemoc. Někdy velmi obtížná interpretace. U hepatitidy B je velký rozdíl mezi jednotlivými formami chronické hepatitidy

Výjev z laboratoře

Foto: MIkrobiologický ústav

Konec

Foto: Mikrobiologický ústav

Mikrobiom +

BONUSOVÝ MATERIÁL

Normální mikrobiom a jeho význam

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

Kde mikrobiom je a kde není

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

mikrobiom v průběhu života člověka

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

mikrobiom jako ekosystém

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

Přehled mikrobiomu

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, *Entamoeba coli*
Vagina	Laktobacily, malá množství nejrůznějších mikrobů
Přechody (rty apod.)	Směs zástupců obou míst

Normální osídlení dýchacích cest

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

Normální osídlení trávicích cest

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

Normální situace v ústní dutině

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

Močové cesty zdravého člověka

Ledviny – normálně bez mikrobů

Pánvičky ledvinné – normálně bez mikrobů

Močovody (uretery) – normálně bez mikrobů

Močový měchýř mladých a středně starých osob – normálně bez mikrobů

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

Močová trubice – vnější část může (nemusí) být osídlena jednak kožní mikroflórou, jednak i specificky (viridující streptokoky, aerokoky)

Normální stav pohlavních orgánů

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

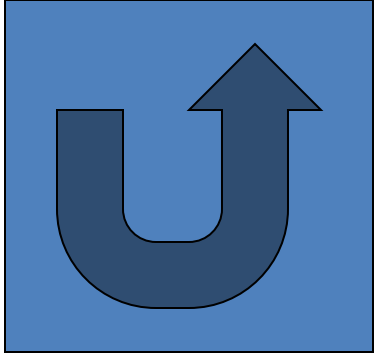
Normální osídlení kůže

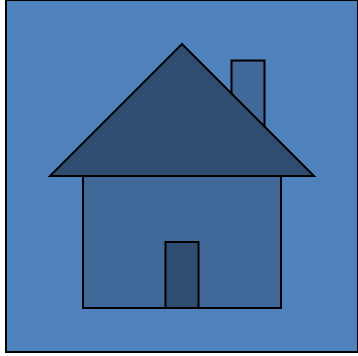
- Přestože kůže je pro mikroby nejdostupnější, je její **osídlení mnohem chudší** než v případě např. úst, pochvy či tlustého střeva
- Mikrob, který chce žít na kůži, musí snášet **vyschnutí a vysoké koncentrace solí**
- **Na kůži se tedy normálně vyskytují**
  - **koaguláza negativní druhy stafylokoků**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

Péče o střevní mikroflóru

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

Péče o vaginální mikrobiom





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