

# KLINICKÁ MIKROBIOLOGIE- SHRNUTÍ

---

Markéta Hanslianová  
Masarykova univerzita  
Katedra laboratorních metod

- Dotazy k prezentaci:
- 109293@mail.muni.cz

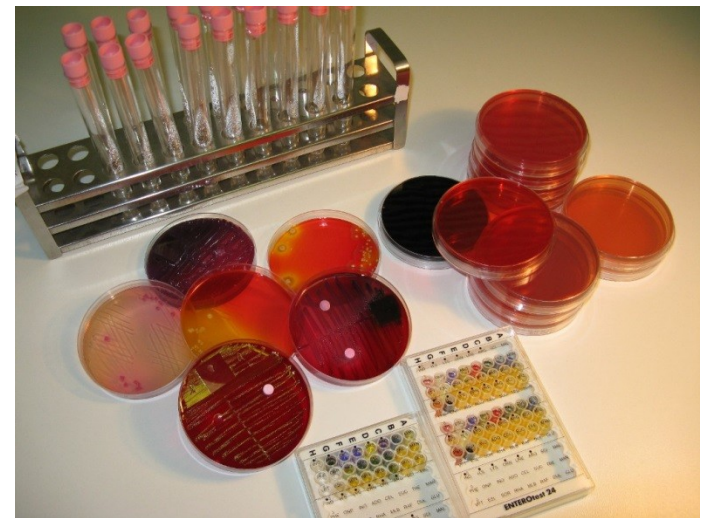
# Klinická mikrobiologie

- Zajišťuje diagnostiku infekčních onemocnění vyvolaných bakteriemi, viry, parazity a mykotickými agens
- Stanovuje citlivost/rezistenci mikrobiálních agens k antimikrobiálním látkám
- Ve spolupráci s klinickými lékaři poskytuje konzultace mikrobiologického nálezu a antimikrobiální terapie

- Správný výsledek mikrobiologického vyšetření začíná správným odběrem biologického materiálu a jeho rychlým transportem do mikrobiologické laboratoře

- Výtěr z krku
  - ❖ AMIES
- Vyšetření na toxin *Clostridium difficile*
  - ❖ Kusová (tekutá) stolice
- PCR vyšetření
  - ❖ Suchý tampon

- Vyšetření biologického materiálu
- Stanovení pravděpodobného původce infekce
- Stanovení citlivosti k antibiotikům



# Vyšetření biologického materiálu

- Mikroskopie
- Kultivace
- Průkaz antigenů
- Průkaz metabolitů (*Helicobacter pylorii* -ureáza)
- Průkaz nukleových kyselin (PCR)
- Průkaz protilátek (nepřímý průkaz)

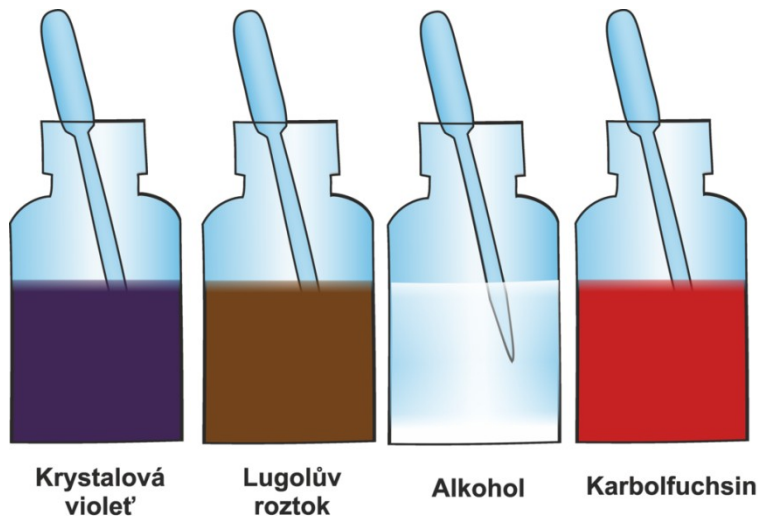
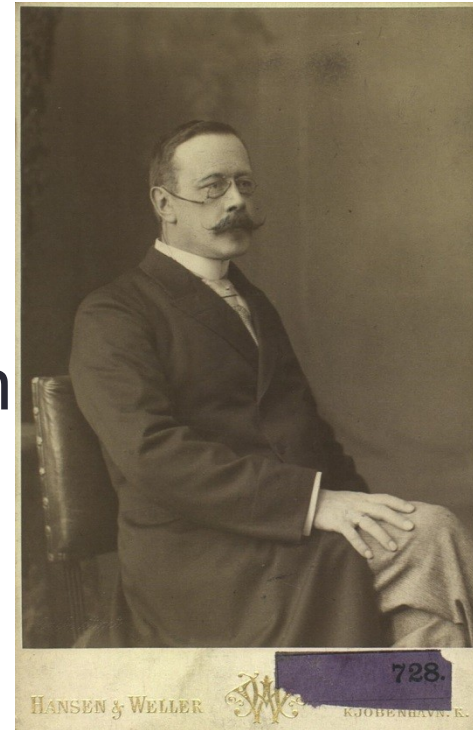
# Mikroskopie

- ❖ Nativní preparát
  - Trichomonas vaginalis
- ❖ Barvený preparát
  - Barvení dle Grama
  - Barvení dle Giemsy
  - Barvení dle Ziehl- Nielsena
  - Barvení spor
  - Barvení pouzder
  - Fluorescenční barvení

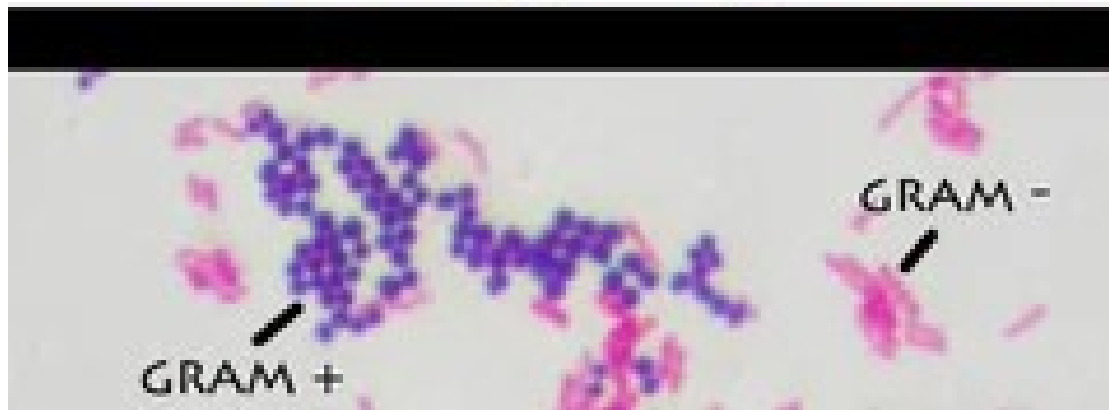
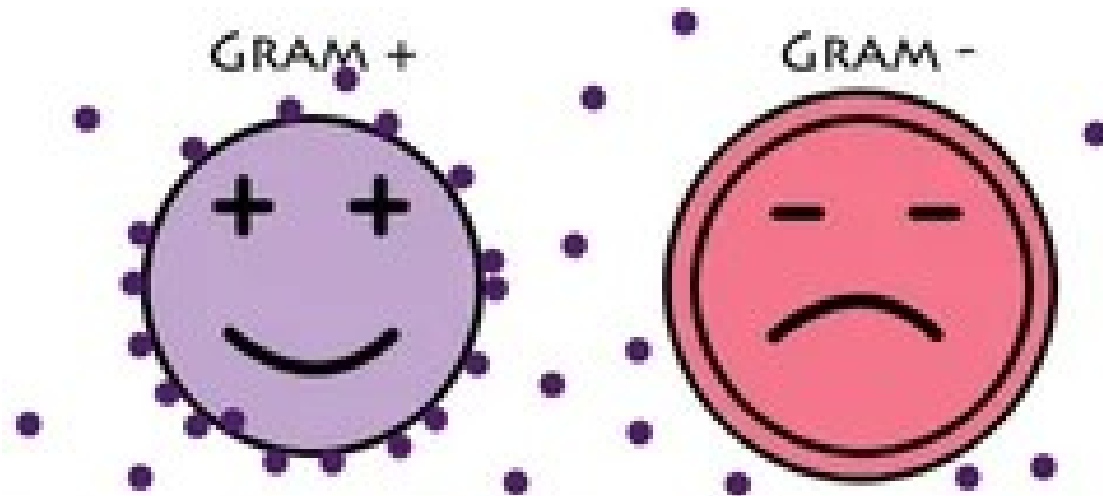


# Barvení podle Grama

- Hans Christian Joachim Gram, 1884
- Dělí bakterie do dvou základních skupin
  - Grampozitivní G +, modrofialové
  - Gramnegativní G -, růžovočervené

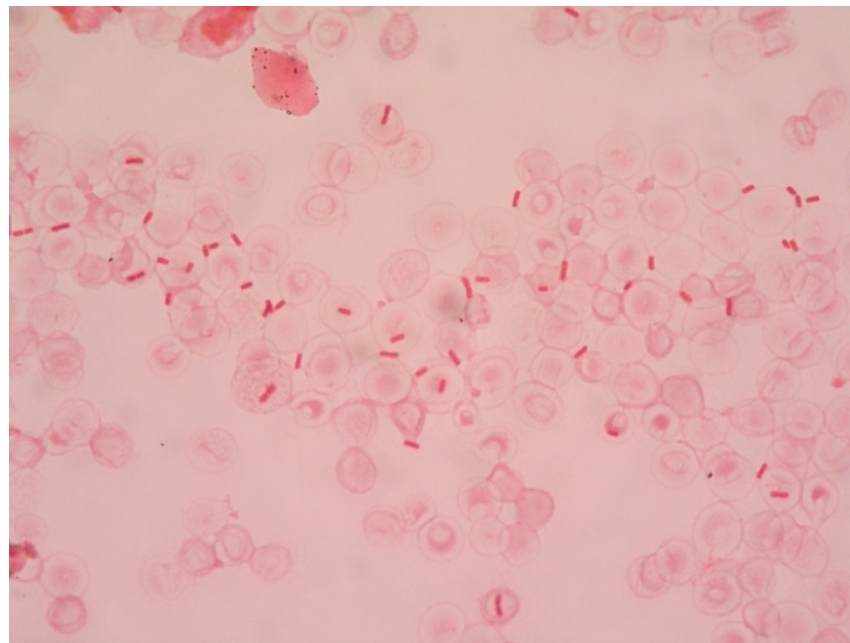


# Barvení podle Grama



# Barvení podle Grama- význam

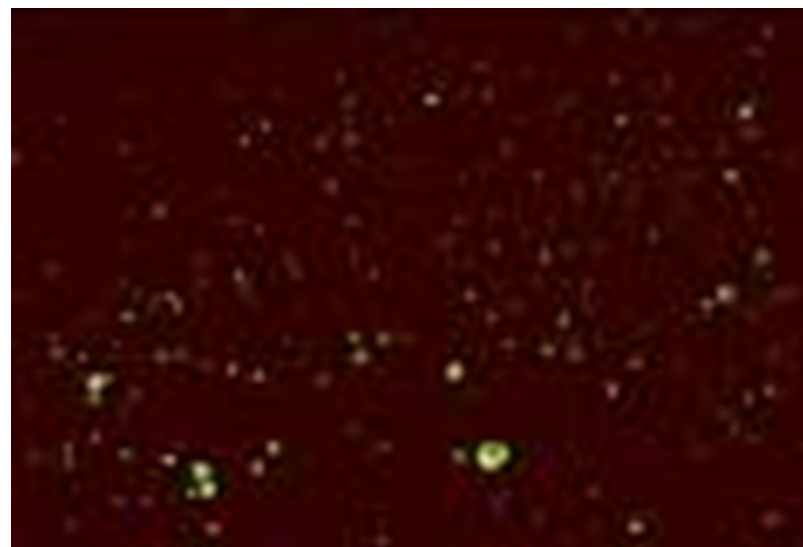
- Diagnostické barvení – základ klasifikace a taxonomie bakterií
- Možnost okamžité a racionální antibiotické terapie (mikroskopie pozitivních hemokultur, sputa)



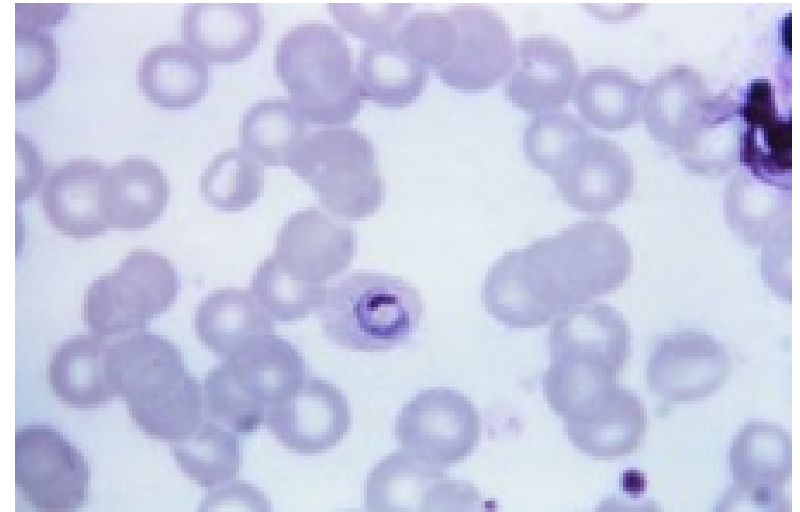
# Fluorescenční barvení

Pomocí fluoreskujícího barviva

- Imunofluorescence
  - Na hledaný antigen se naváže protilátka označená fluoreskujícím barvivem
- Pozorování pomocí fluorescenčního mikroskopu



- Mikroskopie- parazitologické vyšetření



# Kultivační průkaz

- Základní mikrobiologický postup
- Cílem je:
  - ✓ Získat mikroba z klinického materiálu v čisté kultuře
  - ✓ Identifikovat ho
  - ✓ Určit citlivost k antibiotikům

- Kultivační půdy (tuhé, tekuté, diagnostické, selektivní, selektivně diagnostické...)
- Očkování biologického materiálu
- Diagnostická antibiotika
- Kalibrované kličky

# Kultivační půdy

- ❖ Tekuté: masopeptonový bujon
- ❖ Tuhé:
  - Krevní agar
  - Čokoládový agar
  - Levinthalův agar
  - Mac Conkey agar (Endova půda)
  - Sabouraudův agar



# Podmínky kultivace

- Dostatečná vlhkost prostředí
- Optimální teplota - 37 °C (4 °C, 40 °C)
- Optimální pH půdy – 7,2 – 7,4
- Dostatek vhodných živin
- Vhodné plynné prostředí (aerobní, anaerobní, mikoraerofilní kultivace)

# Anaerostat



# Identifikace bakterií

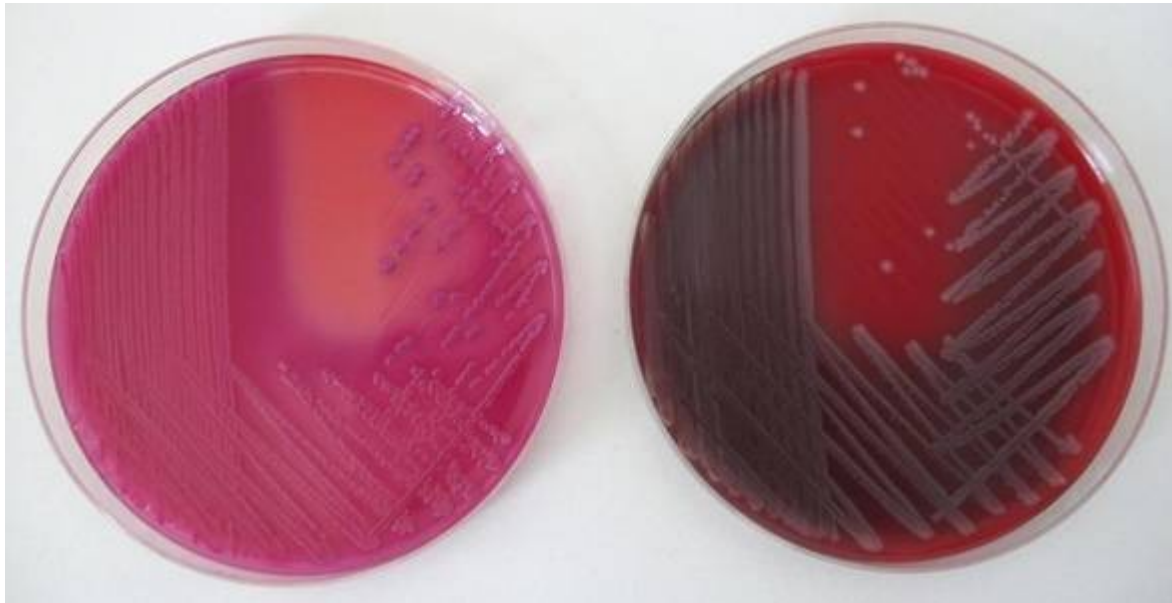
- Podle morfologie
- Podle růstových vlastností
- Podle biochemických vlastností
  - Selektivní půdy
  - Komerční diagnostické soupravy
- Podle antigenní struktury
  - Latexová aglutinace
- Hmotnostní spektrometrie (MALDI)

# Identifikace bakterií- morfologie a růst

- Typický růst některých bakterií
- Morfologie kolonií
- Hemolýza



# MacConkey agar a krevní agar nárůst *E.coli*



# Identifikace bakterií- MALDI

- Výhody hmotnostní spektrometrie (rychlost)
- Úskalí dokonalé identifikace

Anaerobní kultivace:

Nález: *Finegoldia magna*

Stanovení kvalitativní citlivosti na antibiotika:

Augmentin, Unasyn.....C

metronidazol.....C

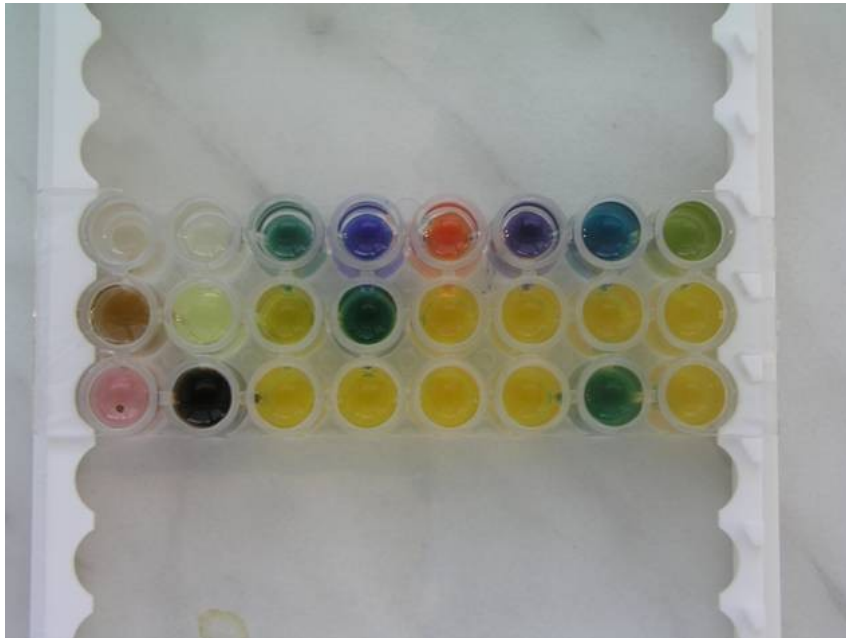
clindamycin.....C

---

*F.magna* je grampozitivní anaerobní kok.

Kódy citlivosti: C=citlivý, R=rezistentní, X=výsledek sdělíme na požádání

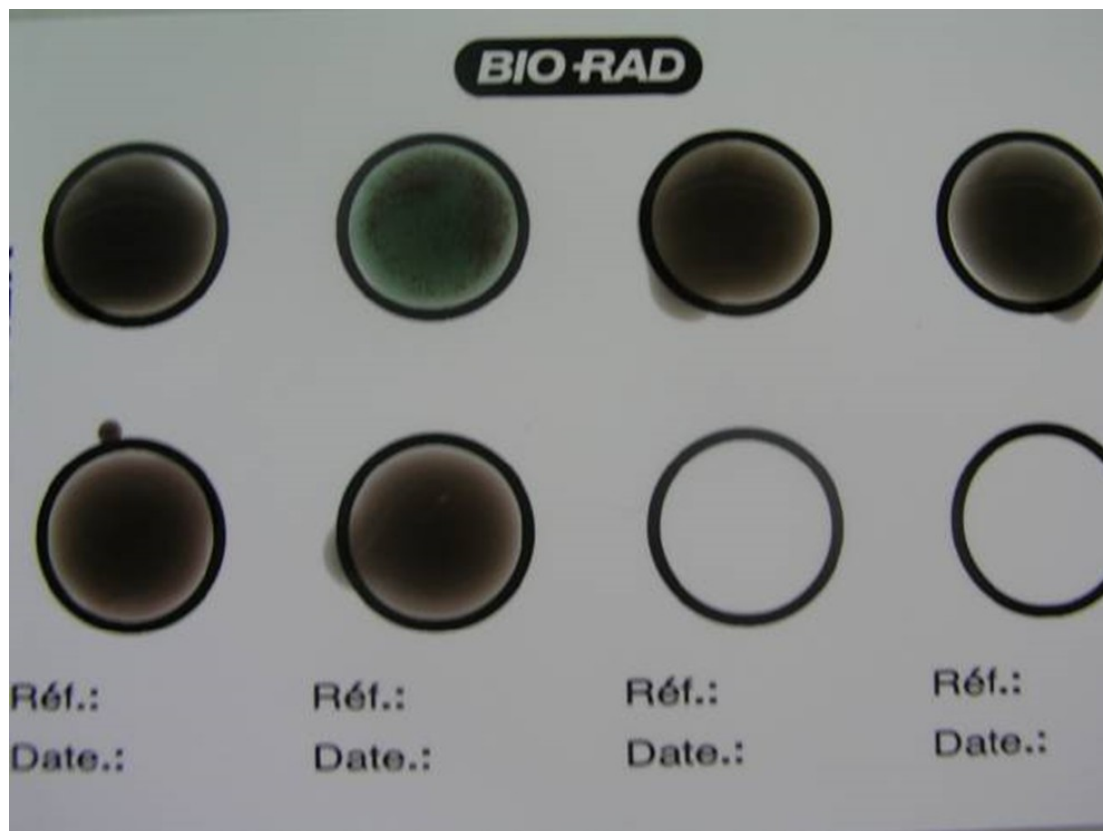
# Identifikace bakterií- biochemie



- Většinou nahrazeno MALDI
- V některých případech ale nutné (E.coli x Shigella)

# Identifikace bakterií- průkaz antigenů

- Latexová aglutinace
- Rychlá vyšetřovací metoda





# Identifikace - průkaz antigenů

- Mykologie- stanovení antigenů hub pomocí ELISA
- Galaktomanan (aspergilový antigen)
- Glukan (panfungální antigen- vysoká negativní prediktivní hodnota)

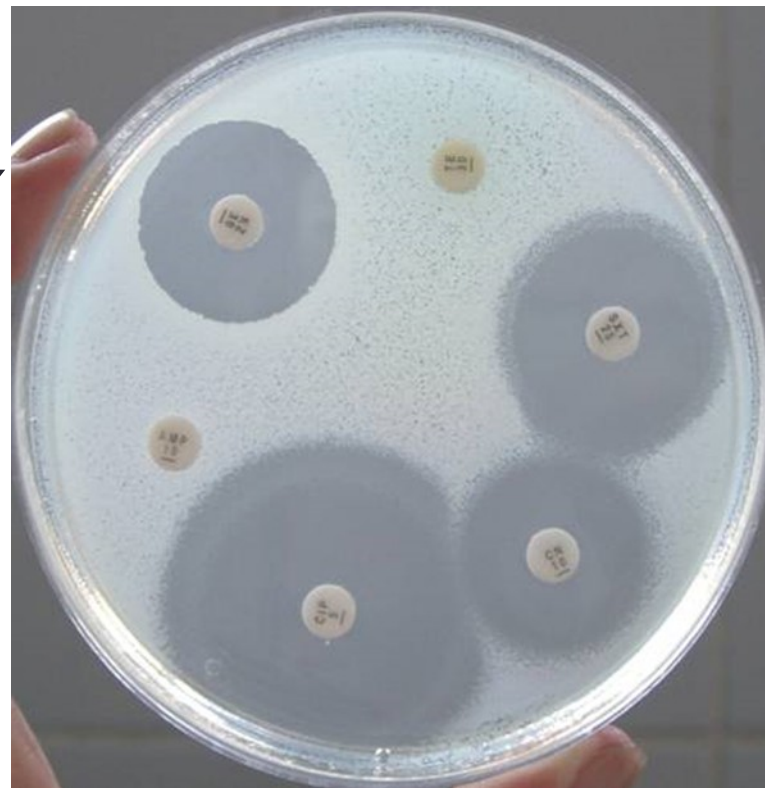
# Kultivace- hodnocení

- Nález primárního patogena- většinou jednoznačná situace (*Neisseria gonorrhoeae*)
- Nález oportunního patogena- nutné informace o pacientovi a komunikace s klinikem!!  
častější situace

- Stanovení citlivosti agens k antibiotikům
- Disková difúzní metoda
- Stanovení hodnot MIC antibiotika vůči danému mikroorganismu
- Semikvantitativní metody (mykoplazmata, ureoplazmata)

# Stanovení citlivosti k antibiotikům

- Disková difúzní metoda
  - Difuze antibiotik z disků do půdy a potlačení růstu bakterií
  - Srovnání se standardy
  - Vyhodnocení a zařazení do kategorií C/I/R

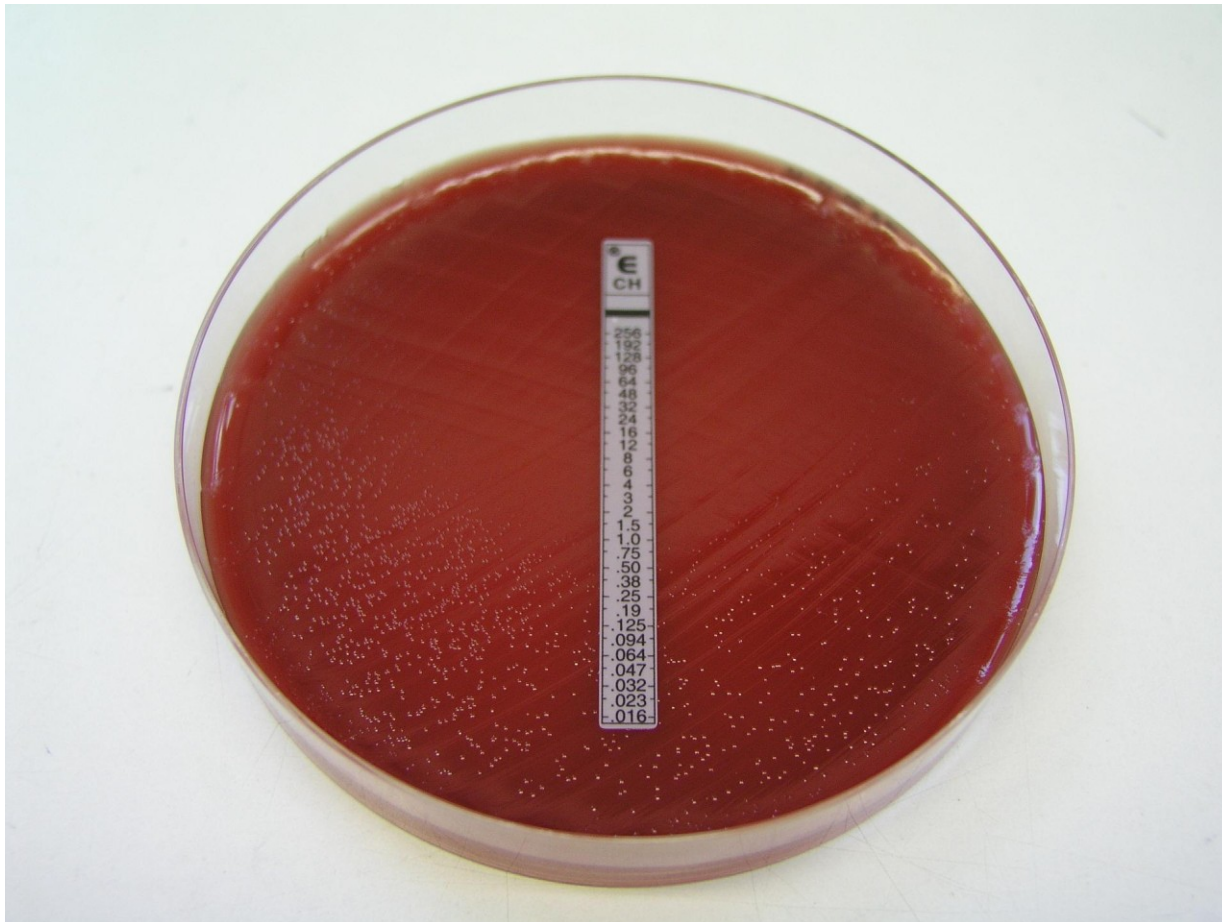


# Stanovení citlivosti k antibiotikům

- Diluční testy
  - Stanovení koncentrace antibiotika, která potlačuje růst mikroba (MIC)
  - Srovnání se standardy
  - Vyhodnocení a zařazení do kategorií C/I/R



# Stanovení MIC– E-test



# Diagnostika virových infekcí

1. Přímá- , mikroskopie, tkáňové kultury, průkaz antigenu, nebo nukleové kyseliny viru
2. Nepřímá- průkaz protilátek

# Přímý průkaz viru

- Mikroskopický průkaz- elektronový mikroskop
- Izolace viru na tkáňových kulturách- pěstování viru na kulturách buněk (opičí ledviny)- cytopatický efekt



# Průkaz nukleových kyselin viru

- polymerázová řetězová reakce
- přímý průkaz NK virů (bakterií, kvasinek, parazitů)
- různé modifikace
- výhody: vysoká specifita, rychlost, ATB nejsou kontraindikací vyšetření
- nevýhody: vysoká cena, přístrojové vybavení, riziko kontaminace

# Průkaz protilátek

- Průkaz odezvy makroorganismu na infekční agens
- Používané také u obtížně kultivovatelných bakterií (chlamydie, borélie)

# Přehled serologických metod

1. Precipitace
2. Aglutinace
3. Komplement fixační reakce (KFR)
4. Neutralizace
5. Reakce se značenými složkami:
  - imunofluorescence
  - enzymová immunoanalýza
  - Western blot (imunoblot)

- **Klinická mikrobiologie**- poskytuje servis vyšetření klinickým lékařům v úzké spolupráci s nimi!!
- Stanovuje různými metodami původce daného onemocnění
- Konzultace mikrobiologického nálezu
- Konzultace antibiotické terapie
- Rychlost, kvalita
  
- **Vzájemná komunikace!!**

# Kasuistika

- Pacient VCH, 1960
- Přijatý v březnu 2015 pro bolesti zad, crp 275, leukocytóza, febrílie
- Paraplegik po autonehodě, kovový materiál na rozhraní Th a L páteře

- Bolesti zad:
  - Ranná infekce
  - Spondylodiscitida
  - Infekce ledvin
  - Infekce v dutině břišní (pankreas)
  - Infekce v malé pánvi (gynekologické infekce)

- Paraplegik po autonehodě, kovový materiál na rozhraní Th a L páteře
- Odběr biologického materiálu:
  - Hemokultivace
  - Moč



- Diagnostikována spondylodiscitida v oblasti Th páteře
- Hemokultura
- Empirická antibiotická terapie



- Původce?

*Staphylococcus aureus* představuje nejčastější mikrobiální agens vyvolávající spondylodiscitidu. Lze jej předpokládat zejména u spondylodiscitid anamnesticky spojených se stafylokokovou infekční endokarditidou, u pacientů s předchozí katéetrovou infekcí krevního řečiště, nebo infekcí kůže a měkkých tkání v anamnéze. Rizikovou skupinu pro spondylodiscitidu vyvolanou *Staphylococcus aureus* představují také nitrožilní narkomani.

U pacientů s touto předpokládanou etiologií je pro empirickou terapii doporučený **oxacilin v kombinaci s gentamicinem**.

- Anamnéza:

- Infekční fokus (kariézní chrup, abscesy, IE...)
- Předchozí infekce (infekce spojené se zavedením CVK, uroinfekce, jiné infekce spojené a bakterémií...)

- Anamnéza:
  - 11-12/2014 hospitalizován pro absces v ledvině
  - Nefrektomie
  - Revize pro krvácení do lůžka po ledvině
  - 11/2014 pozitivní hemokultura s nálezem *Klebsiella pneumoniae* s ESBL produkcí

- Vstupně nasazený potencovaný aminopenicilin (Augmentin)
- Pro vysokou suspekci na klebsielovou etiologii spondylodiscitidy doporučena terapie meropenemem
- Monoterapie- solitární ledvina s horší funkcí, kreatinin 370  $\mu\text{mol/l}$ , alergie na ciprofloxacin

- Kultivace: půdy, inokulum, antibiotické disky
- Atmosféra, doba kultivace
- Hodnocení: identifikace mikroorganismu a stanovení citlivosti

- Pozitivní hemokultura s nálezem *Klebsiella pneumoniae* s ESBL produkcí
- Ponechána terapie meropenemem + přidáný amikacin v redukováných dávkách
- Pokles hodnot crp i leu, stabilizace stavu



- Délka terapie?
- Perorální pokračování terapie?
- P.o. tetracyklin?
- OPAT?- zatím ne v ČR

Tetracyclines	MIC breakpoint (mg/L)		Disk content (µg)	Zone diameter breakpoint (mm)		Notes Numbers for comments on MIC breakpoints Letters for comments on disk diffusion
	S ≤	R >		S ≥	R <	
Doxycycline	-	-		-	-	1. Tigecycline has poor activity against <i>Morganella</i> spp., <i>Proteus</i> spp. and <i>Providencia</i> spp. 2. For tigecycline broth microdilution MIC determination, the medium must be prepared in a special way. A. Zone diameter breakpoints validated for <i>E. coli</i> only. For other Enterobacteriaceae
Minocycline	-	-		-	-	
Tetracycline	-	-		-	-	
Tigecycline <sup>1</sup>	1 <sup>2</sup>	2 <sup>2</sup>	15	18 <sup>A</sup>	15 <sup>A</sup>	

- Hospitalizace pokračuje.....

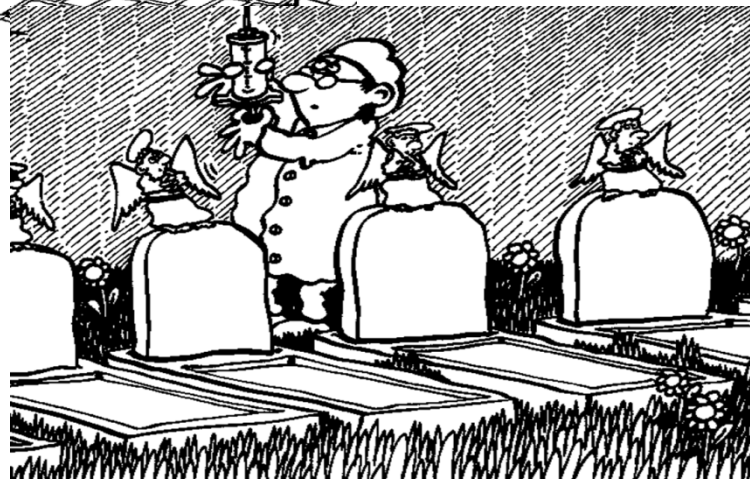
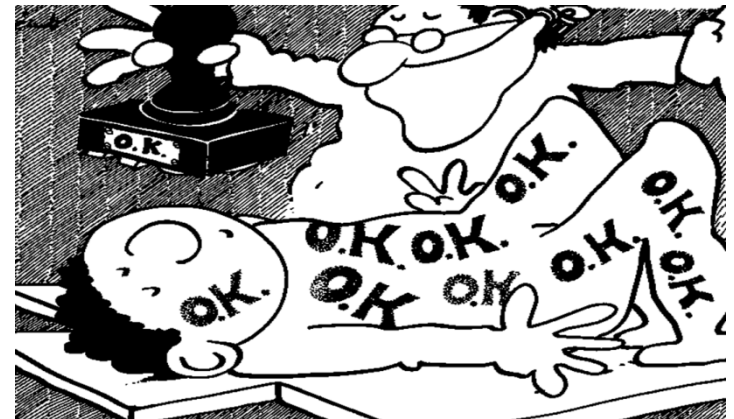
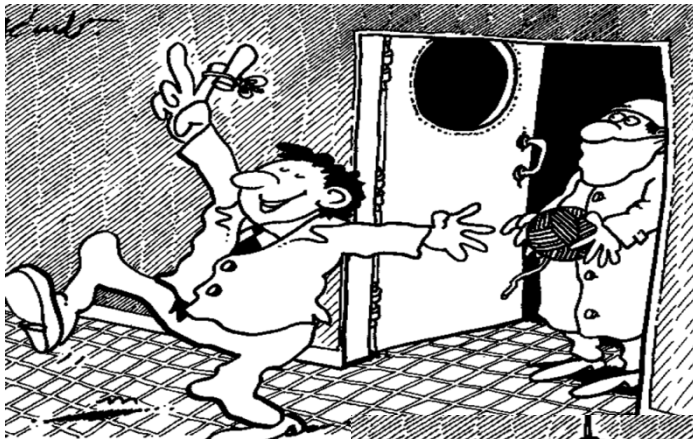


Sestrol! Skočte na internet, otevřete [CHIRURGIE.COM](http://CHIRURGIE.COM),  
sjed'te dolů a klikněte na ikonu "Jste totálně v prdeli?"



- Opakovaná antibiotická konzultace po hospitalizaci v jiném ZZ
  - Pacient s crp opět 270, zhoršení stavu
  - Klindamicin v terapii osteomyelitidy v kombinaci s amikacinem
  - Po CDI (*Clostridium difficile*)
  - *Kl.pneumoniae* ESBL ze sputa
  - MRSA z hrudních drénů
  - Polyrezistentní *Pseudomonas aeruginosa* z moči
- Původce spondylodicitidy není *S.aureus*, tedy zbytečný klindamycin
- Riziko clostridiové kolitidy
- Amikacin není vhodný v monoterapii plicních infekcí
- Amikacin není vhodný v monoterapii stafylokokových infekcí

- Opět doporučený do terapie meropenem
- Výhled pacienta?



- Klinická mikrobiologie – spolupráce mikrobiologa s klinickým lékařem
- Na konci/ na začátku každého mikrobiologického vyšetření je nemocný člověk

**Děkuji za pozornost**

