

# Odběr a transport biologického materiálu, vyšetřovací metody v bakteriologii

Martin Vrba  
OKMI FN Brno

## Specifika odběrů pro bakteriologická vyšetření

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

# Odběr biologického materiálu

- Ze správného místa – např. z okraje rány, z místa akutně probíhajícího zánětu apod.
- Ve správnou dobu – např. hemokultury při třesavce, před podáním antibiotik
- Opakovaně – zvýší se pravděpodobnost zachytu infekčního agens
- Zabránění kontaminace

# Odběr biologického materiálu

- Odběry do komerčních odběrových souprav
- Pro různé materiály různé odběrové soupravy
- Správná identifikace materiálu

# Obecné zásady transportu

- Co nejrychleji po odběru do laboratoře
  - Stěry na suchém tampónu a moče do 2 hodin po odběru

# Uchování materiálu

- **Pokožková teplota:**
  - Stěry a výtěry v transportní půdě
  - Hemokultury
  - Likvory
  - Hnisy a punktáty
- **Chladničková teplota (4-8 C):**
  - Moč
  - Stolice na průkaz toxinu *C.difficile*
  - Krev na sérologická vyšetření

# Stěry a výtěry

- Výtěr z krku, nosu, ucha, oka, z rány, z kůže, z konečnicku, z uretry, z pochvy atd.
- **Sterilní vatový tampon**
  - **Suchý** – zpracování do 2 hodin po odběru
  - **S transportní půdou**
    - bez aktivního uhlí
    - s aktivním uhlím
    - Možnost uchování až 24 hodin při pokojové teplotě

# Stěry a výtěry

- Co nejdříve zpracovat v laboratoři
- Bez mikroskopie
- Anaerobní kultivace





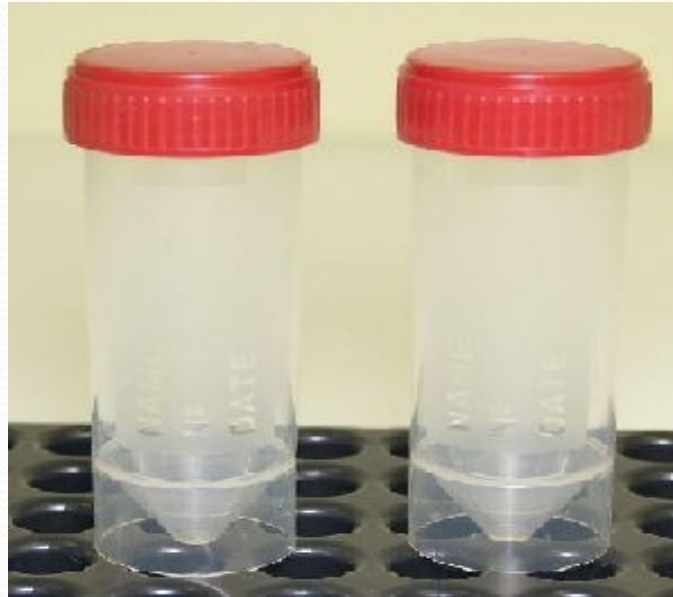
# Odběrová souprava



# Sputum

- Odběr ráno, na lačno, někdy po provokaci expektorace
- Sterilní široká zkumavka „sputovka“
- Ne sliny, ale sputum z dolních cest dýchacích
- Nutno zpracovat do 2 hodin po odběru
- Uchování při pokojové teplotě

# Odběrová souprava



# Sputum - zpracování

- Mikroskopie
- Kultivace semikvantitativní
- Postupné ředění sputa
- Signifikantní nález v ředění  $10^{-7}$
- pro semikvantitativní vyšetření se nehodí sliny – zavádějící výsledek

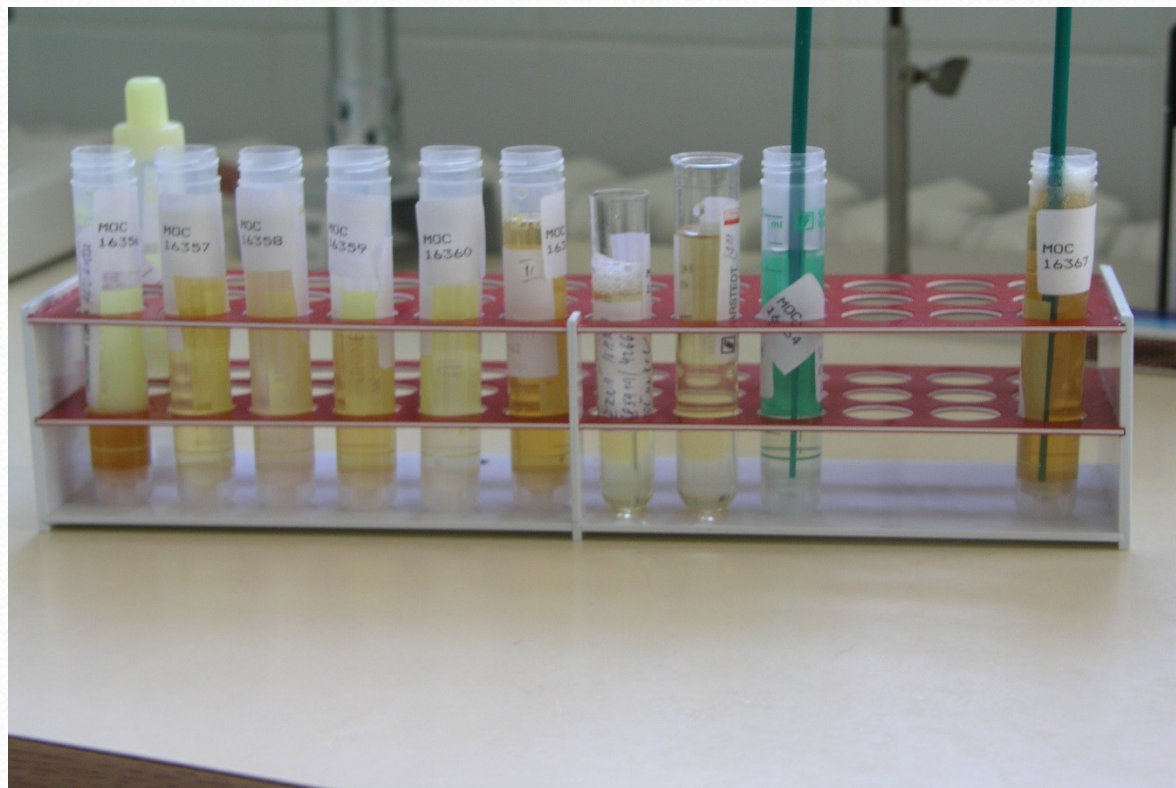
# Moč

- Odběr většinou ráno
- Odběr za aseptických podmínek po předchozím umytí, případně dezinfekci do sterilní užší zkumavky
  - První porce při zánětech močové trubice
  - Střední proud při infekci močového měchýře
  - Poslední porce při infekcích prostaty a vyšších etážích močové soustavy

# Odběr moče

- 5 – 7 ml moči
- Uchování při chladničkové teplotě
- Zpracovat do 2 hod po odběru
- Vysoké riziko kontaminace

# Zkumavky na odběr moče



# Vyšetření moče

- Semikvantitativní
- Vyočkování kalibrovanou kličkou 1  $\mu\text{l}$
- Postupné ředění a vyočkování moče
- Přístrojové vyhodnocení množství leukocytů a bakterií
- Signifikantní množství  $10^5/\text{ml}$



# Hnis, punktát

- Tekutý materiál vždy, pokud je to možné
  - Mikroskopie
  - Širší škála kultivačních půd
- Odběr pomocí stříkačky
- Transport
  - Ve stříkačce bez přístupu vzduchu
  - Ve sterilní zkumavce
- Uchování při pokojové teplotě

# Odběr tkáně

- Odběr za aseptických podmínek
- Odběr do sterilní širší zkumavky
- Uchování při pokojové teplotě



# Likvor (mozkomíšní mok)

- Odběr asepticky lumbální punkcí nebo z drénů
- Transport ve sterilní zkumavce s pevným uzávěrem
- Odběr 2 – 3 ml likvoru
- Uchování při pokojové teplotě
- Možnost odběru a transportu v lahvičce na hemokultury

# Krev

- Hemokultivace
- Odběr pro sérologická vyšetření průkazu protilátek

# Odběr krve na hemokultivaci

- Diagnostika sepse
- Odběr
  - při nárůstu teploty, při třesavce
  - Při kontinuální teplotě kdykoli
- Vždy venepunkcí
  - Při přítomnosti katetru zároveň venepunkcí i z katetru, možnost diagnostiky katetrových sepsí
- Odběr za aseptických podmínek

# Odběr krve pro hemokultivaci

- Počet odběrů: 2x – 3x denně
- Kultivace aerobní a anaerobní
- 5 – 10 ml krve u dospělých
- 0,5 – 3 ml krve u dětí
- Uchování při pokojové teplotě

# Lahvičky pro odběr, transport a kultivaci hemokultur



# Stolice

- Výtěr z konečníku do transportní půdy na obligátní střevní patogeny
- Kousek stolice pro parazitologické vyšetření do širší zkumavky, nemusí být sterilní
- Odběr kousku stolice pro průkaz toxinu *Clostridium difficile*
- Lepex – otisk perianálních řas na lepící pásku, průkaz vajíček roupů



# Urogenitální trakt

- Výtěr z uretry
- Výtěr z pochvy
- Výtěr z cervixu
- Při podezření na GO i výtěr z rektu a krku (transportní půda)

# Urogenitální trakt

- Výtěr do transportní pŕdy
  - Běžná aerobní kultivace
  - Anaerobní kultivace
  - Kultivace na GO
  - Diagnostika *Ureaplasma urealyticum* a *Mycoplasma hominis*
  - Kultivace kvasinek

# Urogenitální trakt

- Výtěr z pochvy doplnit nátěrem na 2 skla
  - Nátěr nechat zaschnout, nefixovat, nelepit
  - Mikroskopický průkaz infekce nebo změny ve složení vaginální flóry
    - Přítomnost leukocytů
    - Přítomnost laktobacilů
    - Možnost barvení na *Trichomonas vaginalis*

# Odběry pro mykologická vyšetření

- Šupiny kůže z okraje ložiska sterilním skalpelem do sterilní zkumavky
- Mokvající plochy – stěr do transportní půdy
- Nehty – seškrab sterilním skalpelem z okraje ložiska

# Odběr k vyšetření molekulárně – genetickou metodou (PCR)

- Tekutý materiál
- Stěr suchým vatovým tampónem
- Odběr bez příměsí chemických látek (heparin, agar)

# Vyšetřovací metody v mikrobiologii

- Přímý průkaz – průkaz přítomnosti bakterií nebo virů– bakteriologie, virologie
- Nepřímý průkaz – průkaz reakce makroorganismu na přítomnost bakterií nebo virů - sérologie

# Vyšetřovací metody v bakteriologii

- Mikroskopie
- Kultivace
- Průkaz antigenů
- Průkaz metabolitů
- Průkaz nukleových kyselin

# Mikroskopie

- Preparát nativní
- Preparát barvený
  - Barvení dle Grama
  - Barvení dle Giemsy
  - Barvení dle Ziehl – Nielsena





# Nativní preparát

- Suspenze materiálu nebo kultury ve fyziologickém roztoku
- Pro pozorování živých mikroorganismů, posouzení jejich pohyblivosti
- 100 – 400násobné zvětšení
- **Využití:**
- bakteriologie – sledování typického pohybu bakterií (listerie, cholera)
- parazitologie – průkaz střevních parazitů ve stolici
- mykologie – sledování růstu a množení kvasinek

# Nativní preparát – pučení kvasinek



# Barvení podle Grama

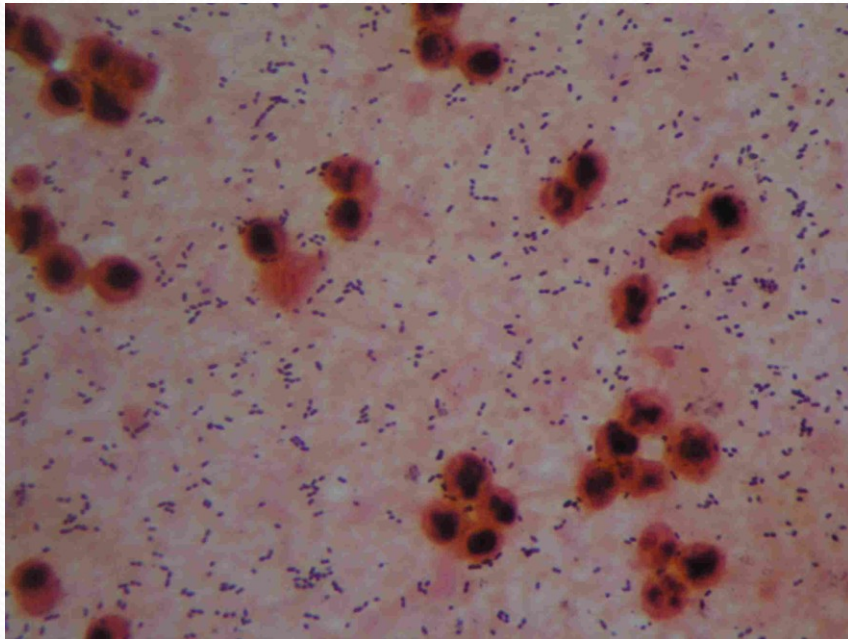
- Hans Christian Joachim Gram, 1884
- Dělí bakterie do dvou základních skupin dle složení buněčné stěny (Gram pozitivní a Gram negativní)
- Mikroskopie při 1000násobném zvětšení s použitím imerzního oleje mezi preparátem a objektivem

# Barvení podle Grama - postup

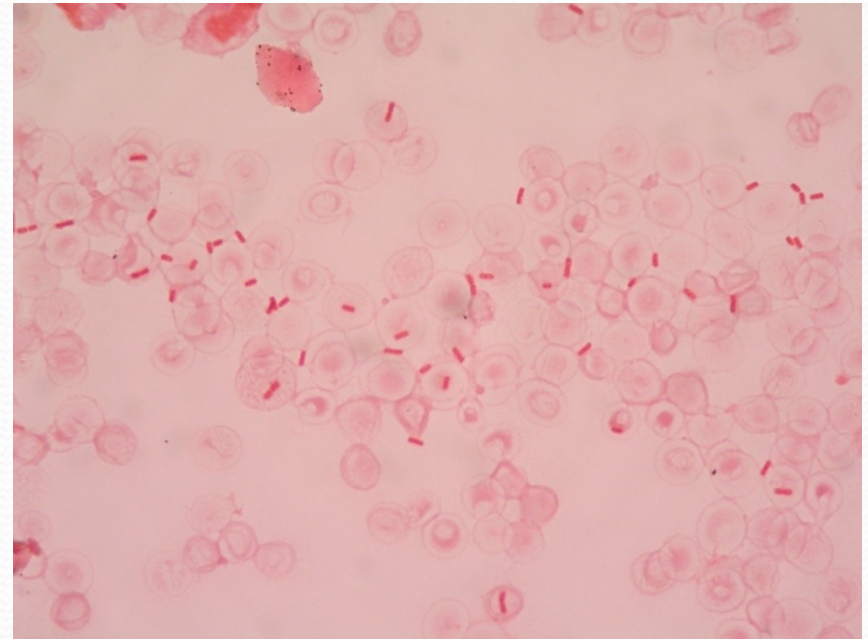
- Zhotovení nátěru na sklíčko
- Fixace plamenem nebo metanolem
- Barvení:
  - Krystalová violet' (20 - 30 s)
  - Lugolův roztok (20 - 30 s)
  - Oplach vodou
  - Odbarvení acetonalkoholem (10 s)
  - Safranin (1 min)

# Barvení podle Grama

G+ koky ve dvojicích



G- tyčinky



# Barvení podle Grama - význam

- Diagnostické barvení – základ klasifikace a taxonomie bakterií
- Možnost okamžité a racionální antibiotické terapie

# Barvení podle Giemsy

- Slouží k diferenciaci buněčných struktur
- Použití hlavně v parazitologii:
  - Mikrobiální obraz poševní – průkaz *Trichomonas vaginalis*
  - Diagnostika malárie
- Barvení obtížně barvitelných mikroorganismů
- Fixace metanolem

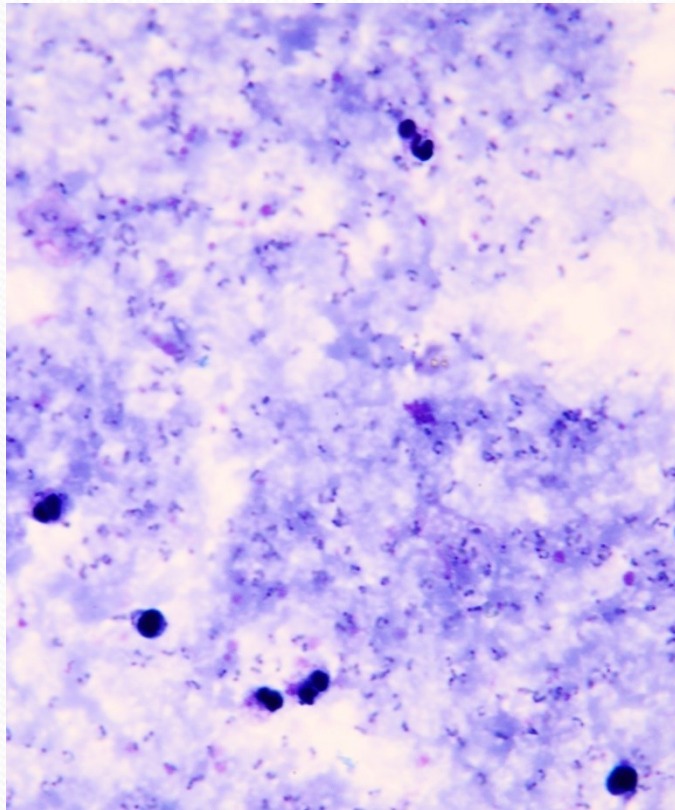
# Barvení podle Giemsy

- Azur a eosin rozpuštěný ve směsi glycerinu a metanolu
- Ředěn neutrální destilovanou vodou
- Roztok není stabilní, používá se vždy čerstvý

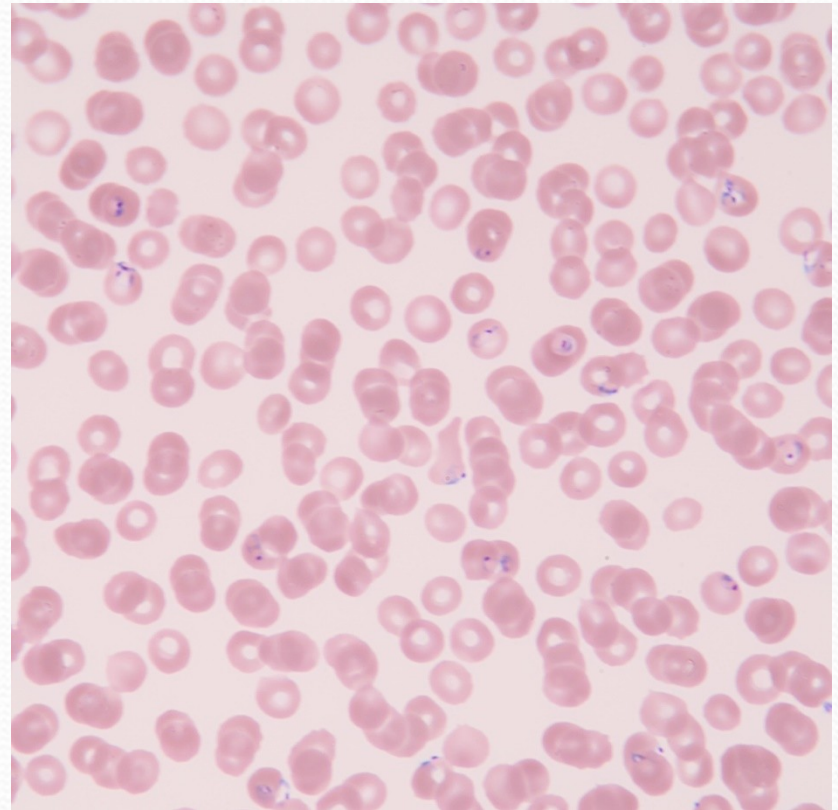


# Barvení podle Giemsy

*Plasmodium falciparum* – tlustá kapka



*Plasmodium falciparum* – tenký roztěr



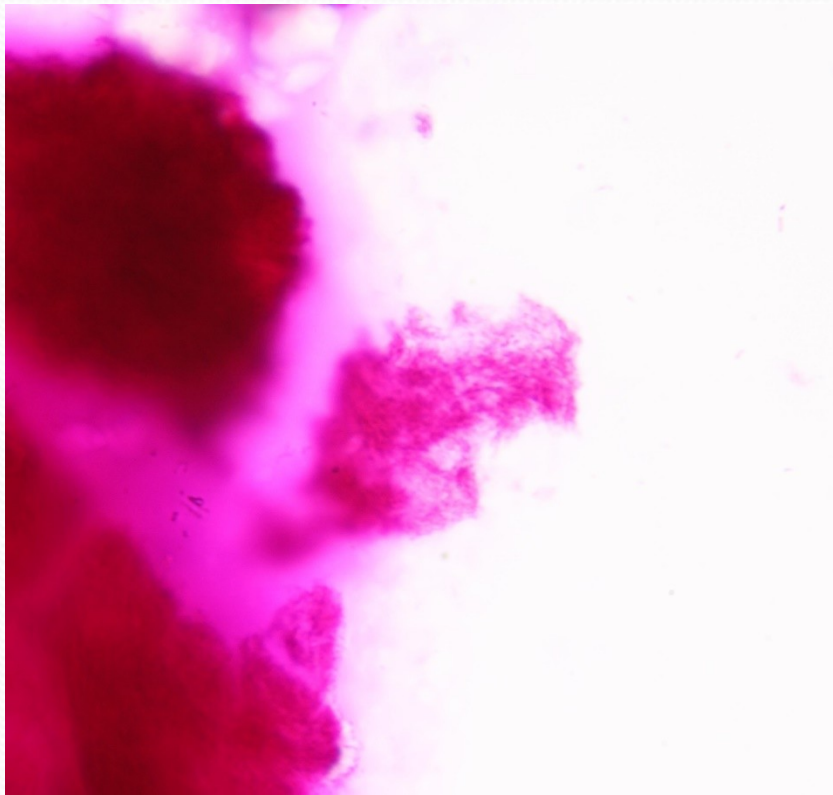
# Barvení podle Ziehl - Nielsena

- Barvení acidorezistentních tyčinek
  - Špatně barvitelné
  - Vysoký obsah lipidů v buněčné stěně
- Nejčastěji *Mycobacterium sp.*

# Barvení podle Ziehl - Nielsena

- Fixace teplem
- Barvení karbolfuchsinem
- Zahřátí
- Odbarvení kyselým alkoholem
- Oplach vodou
- Dobarvení malachitovou zelení

# Barvení podle Ziehl - Nielsena



- *Mycobacterium tuberculosis*

# Kultivační průkaz

- Základní mikrobiologický postup
- Cílem je získat mikroba z klinického materiálu v čisté kultuře
- Identifikace mikroba
- Určit citlivost k antibiotikům

# Kultivační půdy

- Dělení podle konzistence:
  - Tekuté – k pomnožení bakterií
  - Polotuhé – ke sledování pohybu bakterií
  - Tuhé, pevné

# Kultivační půdy

- Dělení podle funkce:
  - Základní – masopeptonový bujon, krevní agar
  - Diagnostické – obsahují látky, které se mění vlivem metabolismu bakterií (např. štěpení laktózy)
  - Selektivní – k výběrovému růstu bakterií, obsahují látky, které potlačují některé bakterie
  - Selektivně diagnostické

# Kultivační půdy

- Dělení podle funkce (pokračování)
  - Transportní - k transportu (bez množení) – umožňují přežití bakterií při transportu
  - Pomnožovací – tekuté, k pomnožení bakterií ve vzorku, mohou být i selektivní



# Podmínky kultivace

- Dostatečná vlhkost prostředí
- Optimální teplota: 37 C (4 C, 42 C)
- Optimální pH půdy: 7,2 – 7,4
- Vhodná izotonie média: 0,5 – 1% NaCl
- Dostatek vhodných živin
- Vhodné plynné prostředí

# Dělení bakterií podle vztahu ke kyslíku

- Striktně aerobní
- Fakultativně anaerobní
- Striktně anaerobní
- Anaerobní aerotolerantní
- Mikroaerofilní
- Kapnofilní

# Nádoba pro anaerobní kultivaci



# Anaerostat



# Termostat se zvýšenou tenzí CO<sub>2</sub>



# Hlavní druhy kultivačních pŕd

- Masopeptonový bujon
- Krevní agar
- Čokoládový krevní agar
- MacConkey agar
- Sabouraudův agar
- XLD agar (xylóza – lyzin - deoxycholát)
- Mueller – Hintonův agar
- Chromagary

# Masopeptonový bujón

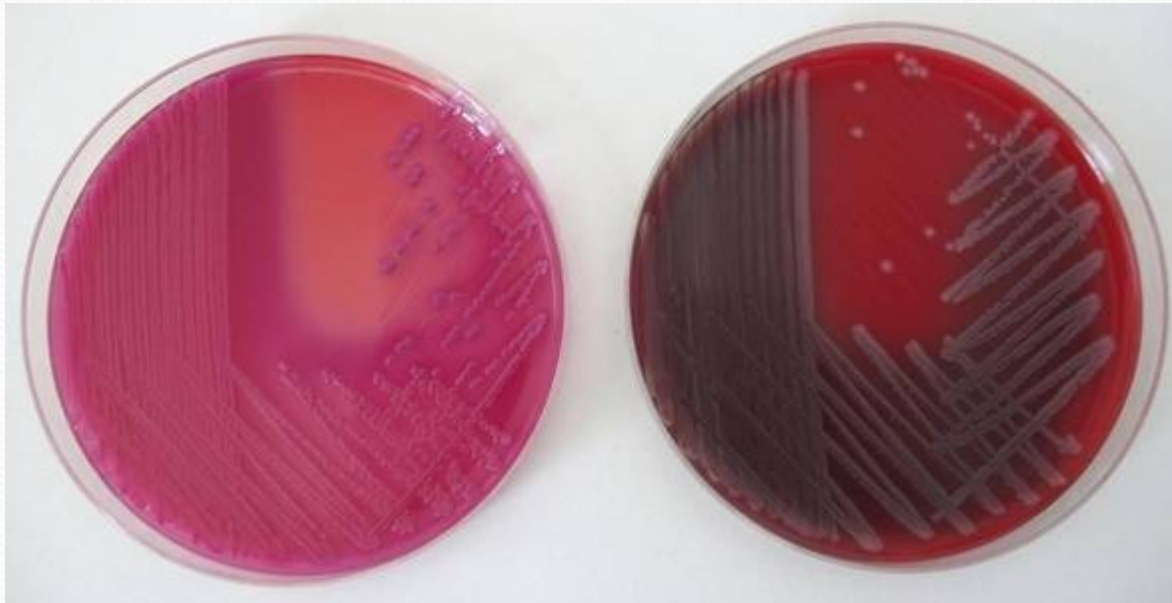


# Krevní agar – nárůst *S.aureus*

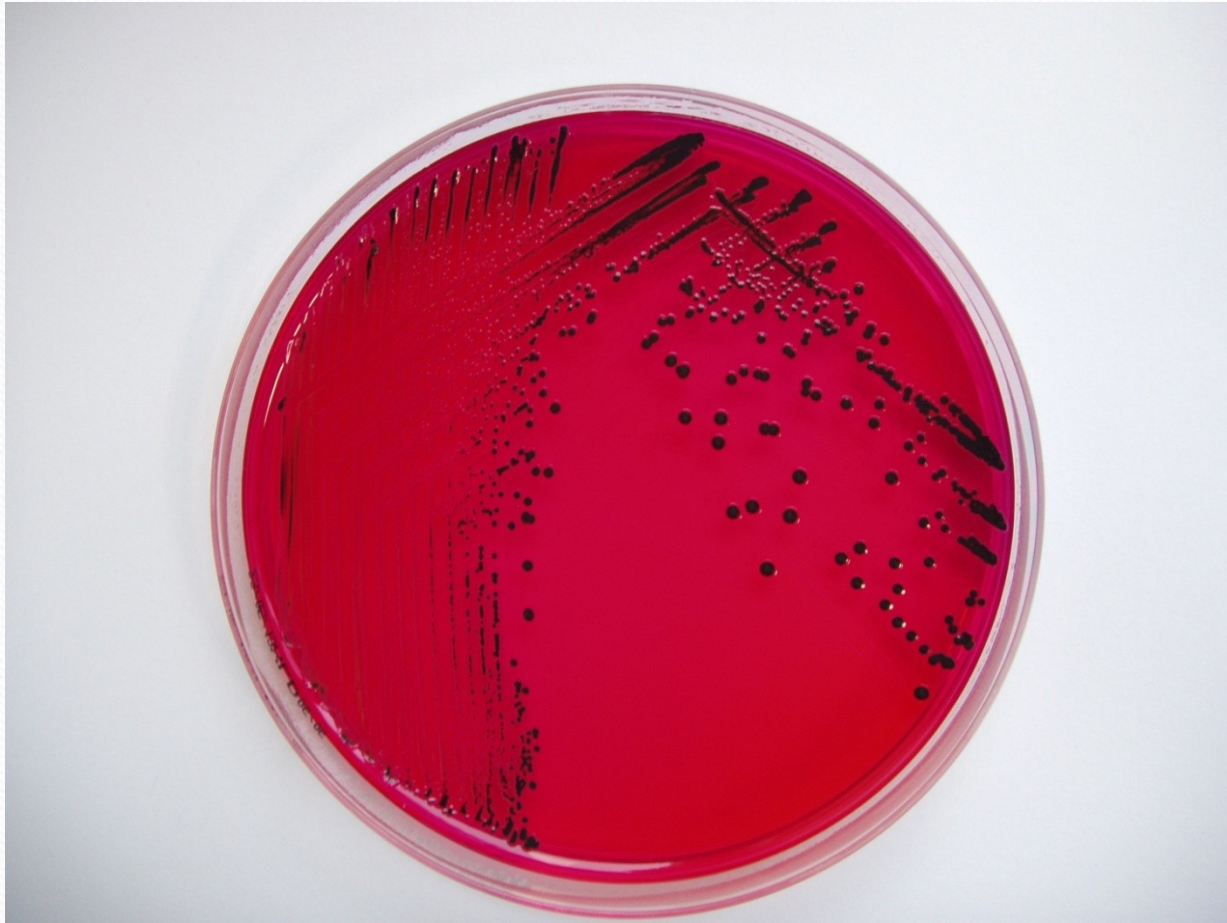




# MacConkey agar a krevní agar nárůst *E.coli*



# XLD agar – nárůst *Salmonella* sp.



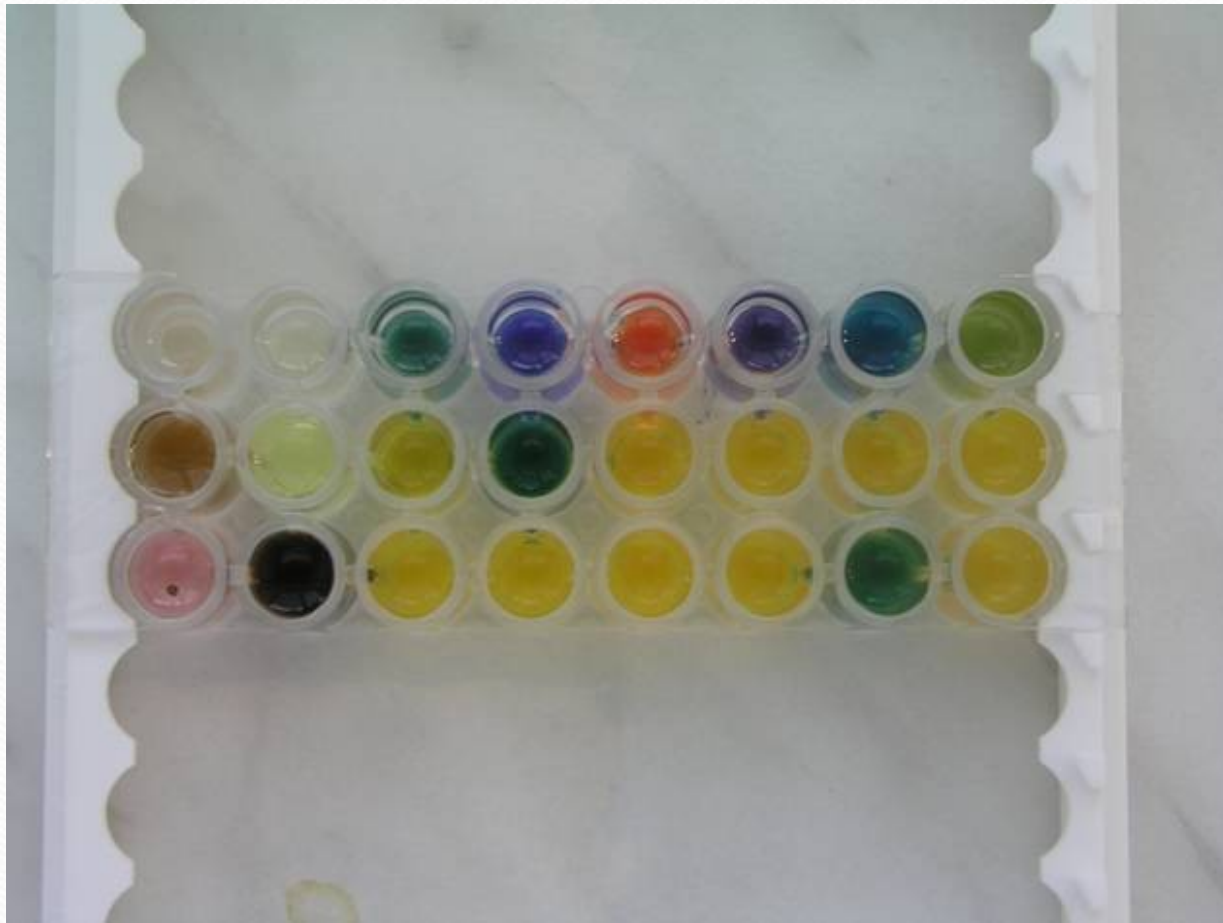
# Karmali agar - nárůst *Campylobacter* sp.



# Identifikace bakterií

- Podle morfologie
- Podle růstových vlastností
- Hmotnostní spektrometrie – metoda MALDI TOF
- Podle biochemických vlastností
  - Selektivní půdy
  - Komerční diagnostické soupravy
- Podle antigenní struktury
  - Latexová aglutinace

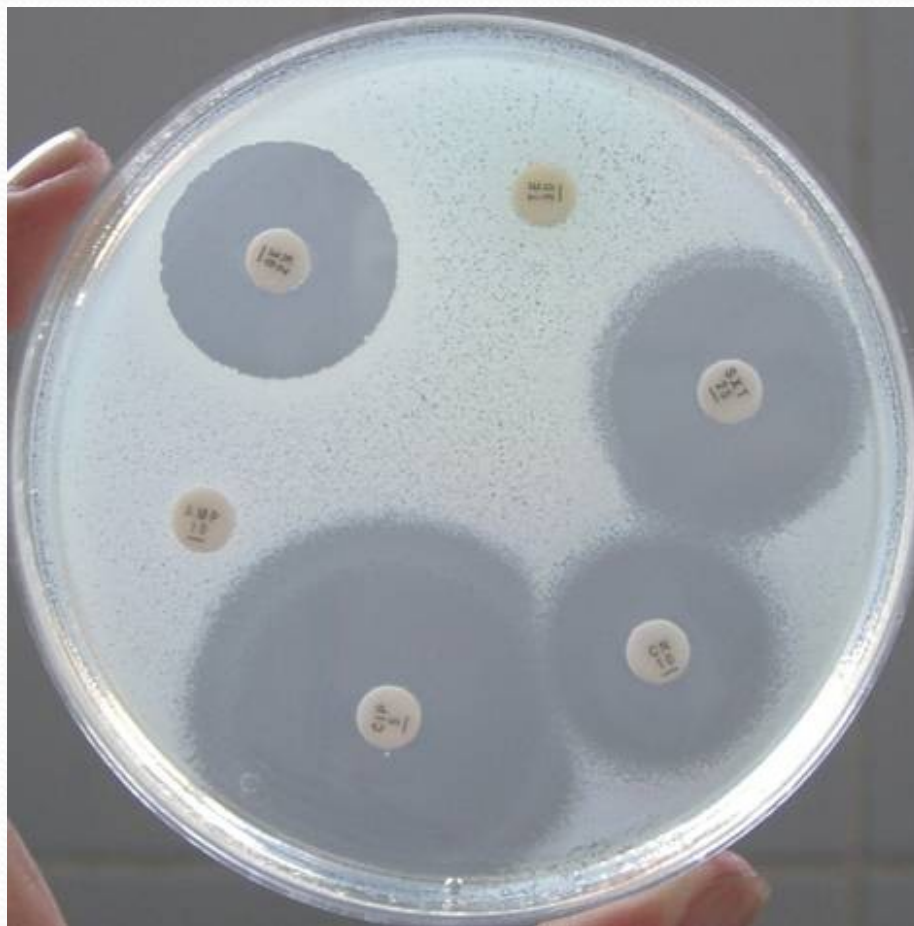
# Biochemické určení bakterií



# Stanovení citlivosti na antibiotika

- Disková difúzní metoda
  - Difuze antibiotik z disků do půdy a zábrana růstu bakterií
- Diluční testy
  - Stanovení koncentrace antibiotika, která je ještě na mikroba účinná

# Disková difúzní metoda

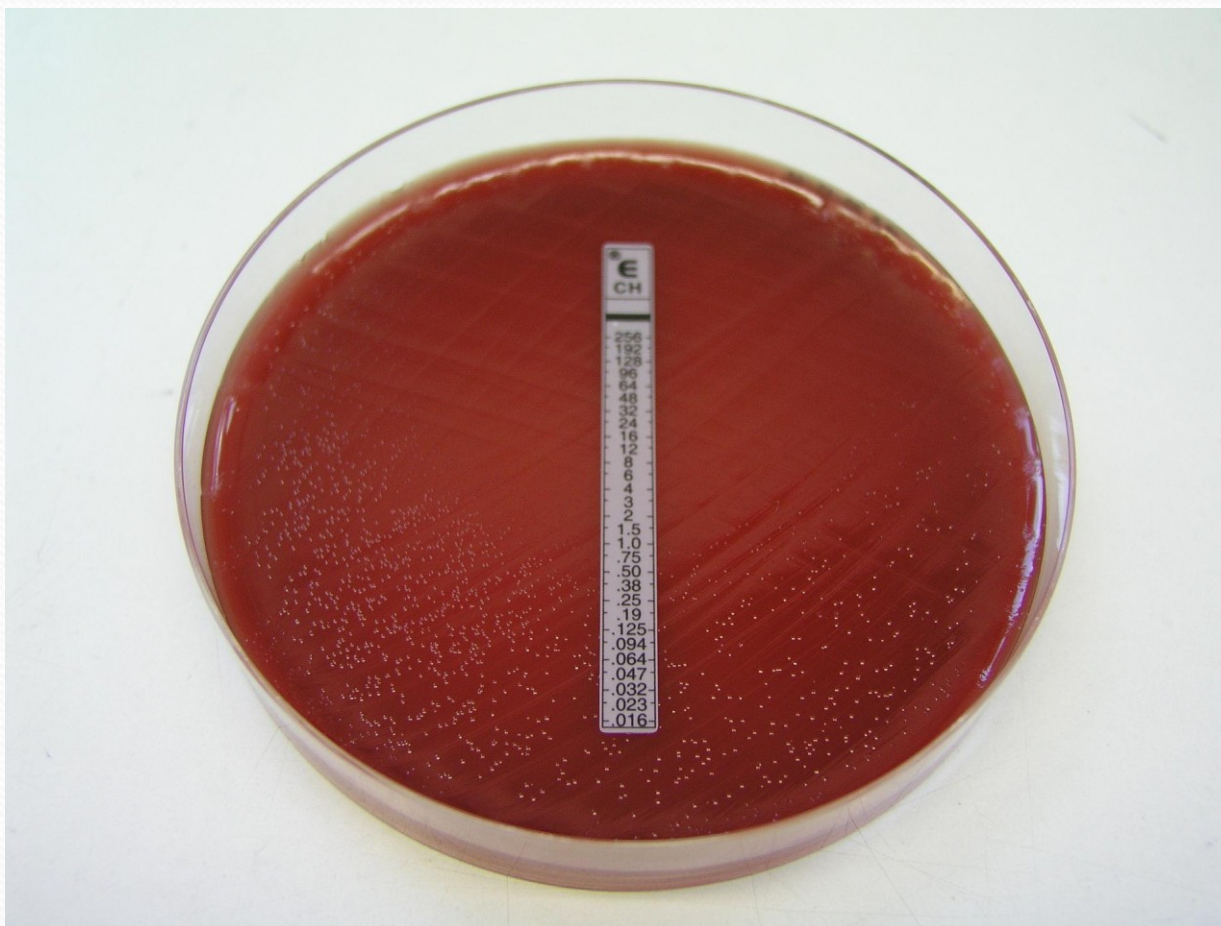


# Diluční metoda – mikrotitrační destičky





# Diluční metoda – E-test



# Průkaz antigenů z materiálu

- Latexová aglutinace

vyšetření likvoru, moče

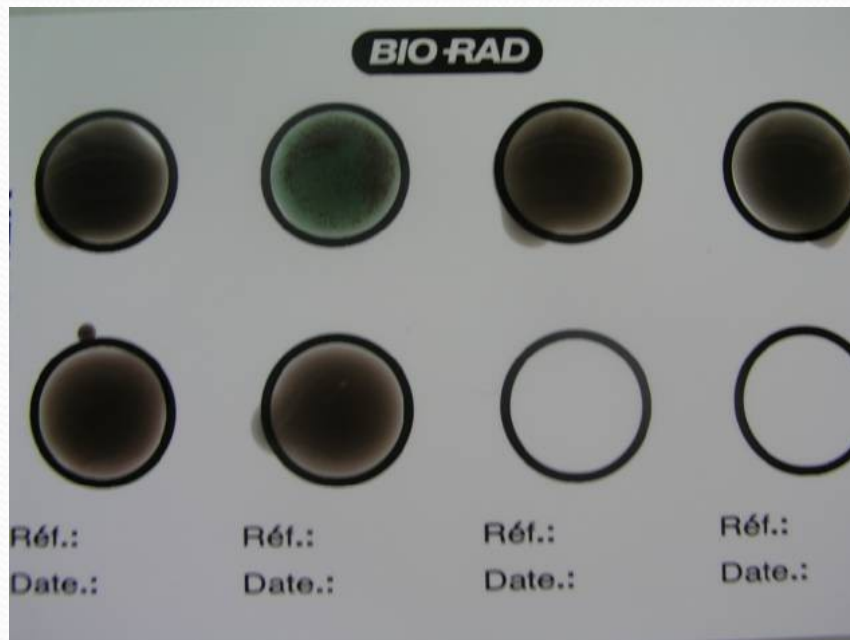
- Imunochromatografie

vyšetření moče – *Legionella pneumophila*,

*Streptococcus pneumoniae*

vyšetření stolice - *Clostridium difficile*, střevní viry, *Helicobacter pylori*

## Latexová aglutinace



## Imunochromatografie



# Průkaz metabolitů

- Těžko kultivovatelné bakterie
- Rychlý průkaz
  - Např. infekce *Helicobacter pylori*  
průkaz produkce ureázy

# Průkaz nukleových kyselin

- Průkaz přítomnosti nukleové kyseliny mikroorganismu v klinickém vzorku
- Druhovú identifikace izolovaného mikrobiálního kmene