

# KLINICKÁ MIKROBIOLOGIE- SHRNUTÍ

---

Ivana Vítková

Masarykova univerzita

Katedra laboratorních metod



# 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

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



# Klinická mikrobiologie

Správný výsledek mikrobiologického vyšetření

začíná **správným odběrem** biologického materiálu

a jeho rychlým **transportem** do mikrobiologické laboratoře

# Vyšetření biologického materiálu

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

# Mikroskopie

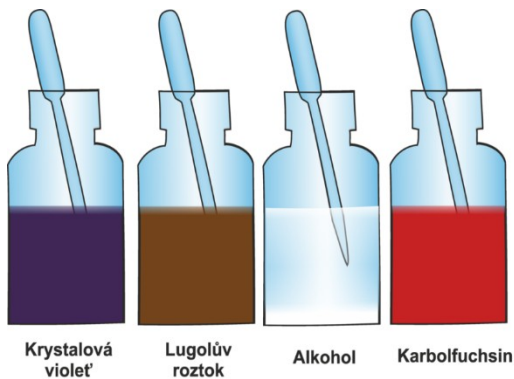
❖ **Nativní preparát** (např. *Trichomonas vaginalis*)

❖ **Barvený preparát**

- Barvení dle Grama
- Barvení dle Giemsy
- Barvení dle Ziehl- Nielsena
- Barvení spor
- Barvení pouzder
- Fluorescenční barvení (např. *Pneumocystis jirovecii*)

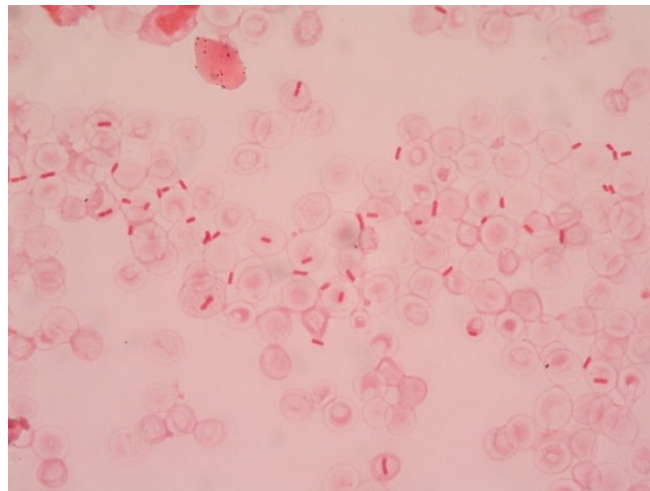
# Barvení podle Grama

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



# Barvení podle Grama- význam

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

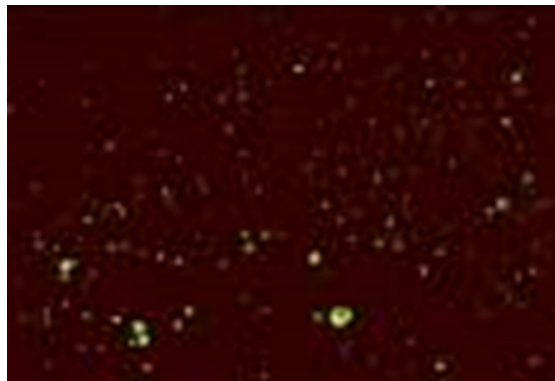




# Fluorescenční barvení

Pomocí fluoreskujícího barviva

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



# Kultivační průkaz

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

# Kultivační průkaz

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

# 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

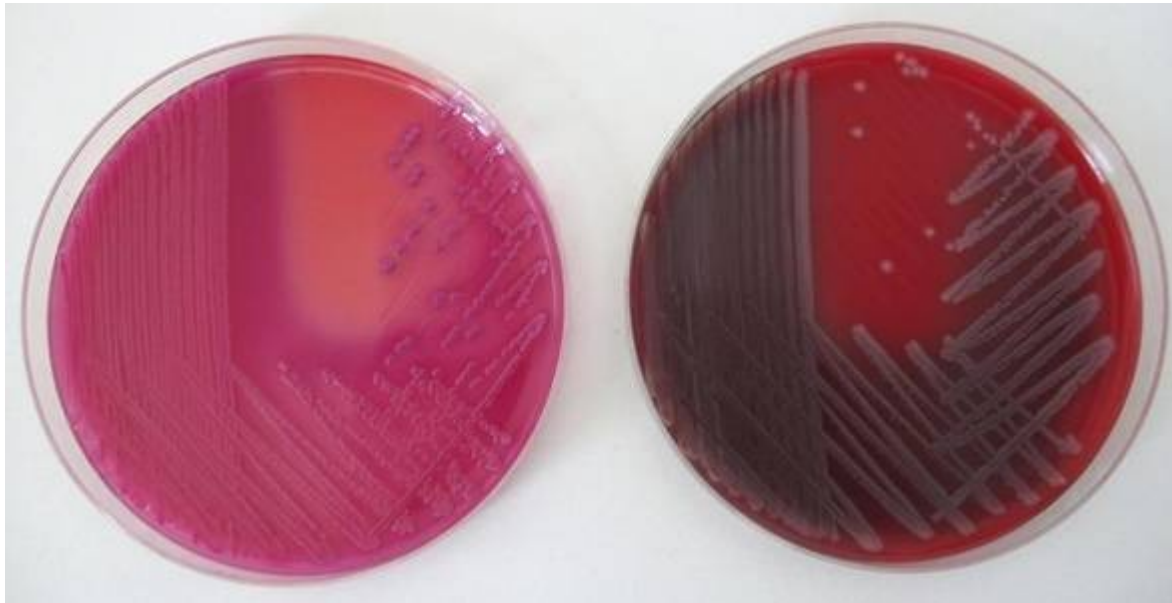
- Podle morfologie
- Podle růstových vlastností
- Podle biochemických vlastností
  - Selektivní půdy
  - Komerční diagnostické soupravy
- Podle antigenní struktury
  - Latexová aglutinace
- Hmotnostní spektrometrie (MALDI TOF)

# 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

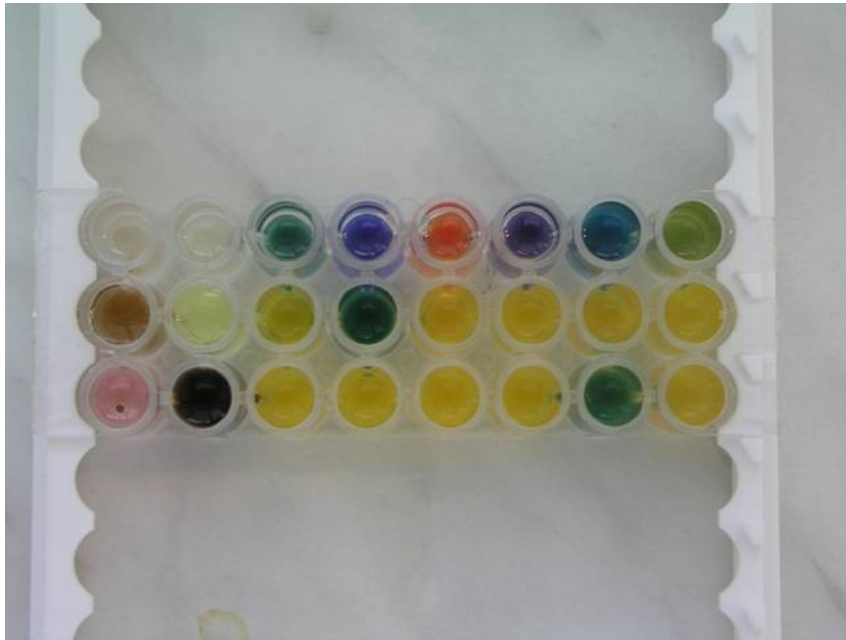
clindamycin.....C

---

*F.magna* je grampozitivní anaerobní kok.

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

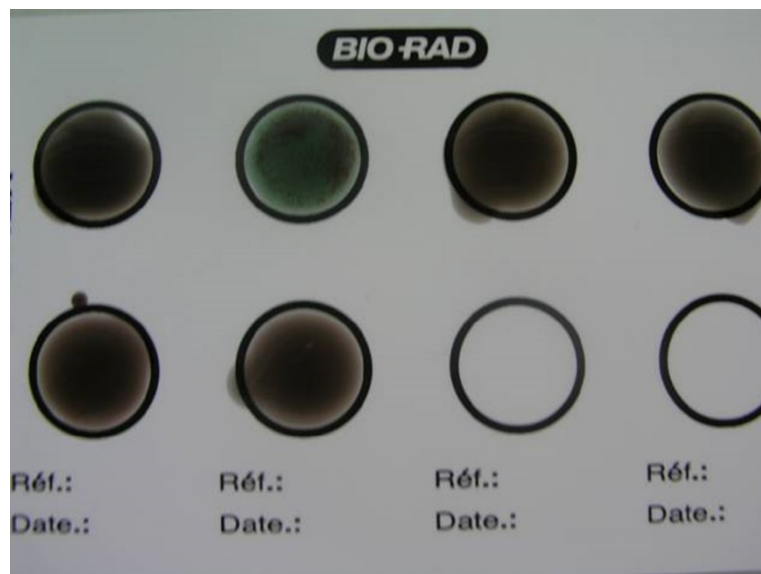
# Identifikace bakterií- biochemie



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

# 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

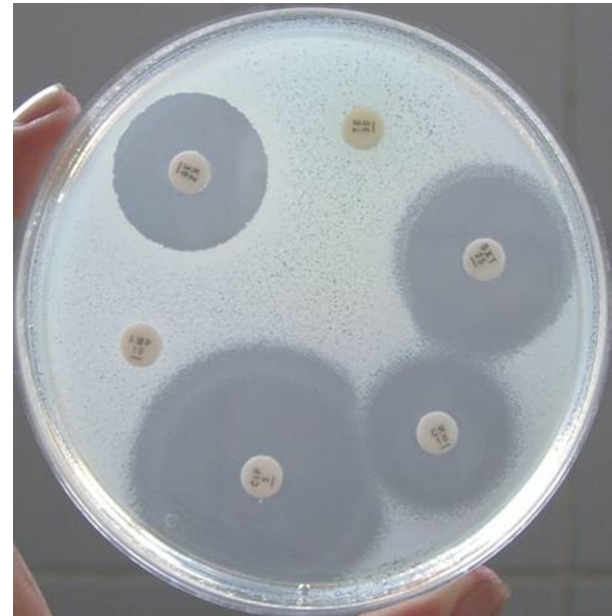
- Nález **primárního patogena**- většinou jednoznačná situace (*Neisseria gonorrhoeae*)
- Nález **oportunního patogena**- nutné informace o pacientovi a komunikace s klinikem!  
častější situace

# Stanovení citlivosti k antibiotikům

- Disková difúzní metoda
- Stanovení hodnot MIC antibiotika vůči danému mikroorganismu
- Semikvantitativní metody (mykoplazmata, ureaplazmata)

# 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



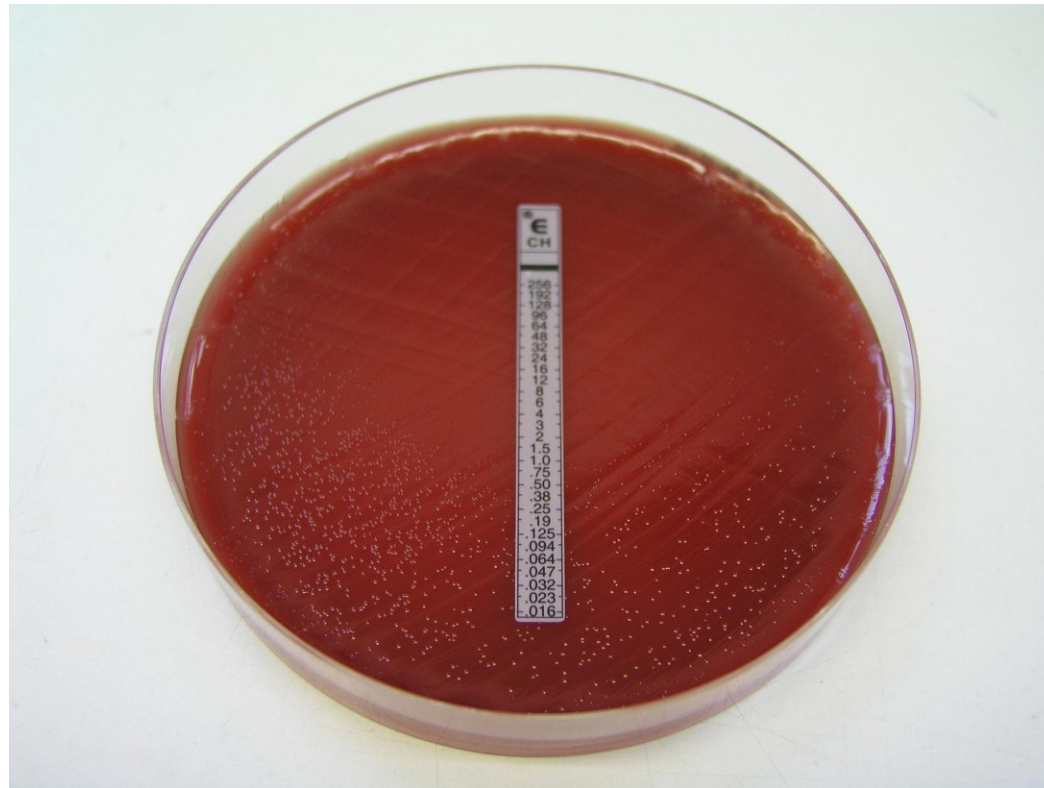
# Stanovení citlivosti k antibiotikům

- Stanovení MIC: 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 specificita, 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 baktérie (chlamydie, borélie)

# Přehled serologických metod

1. Precipitace
2. Aglutinace
3. Komplement fixační reakce (KFR)
4. Neutralizace
5. Reakce se značenými složkami:
  - imunofluorescence
  - enzymová imunoanalýza
  - 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!

## Kazuistika 2: pacient s hlubokým abscesem

- Muž, řidič kamionu, věk 53 let, po prodělaném erysipelu na bérce dříve
- Bydlí doma s otcem, otec bez abscesů
- Cestovatelská anamnéza: nyní na cestě z Německa, cesty po Evropě
- 12.9.2023 – ošetřen na chirurgické ambulanci FN Brno, před 3 dny se objevilo **zarudnutí na bérce**, které se zvětšuje. Pod kolenem je **kožní defekt**, distálně **pustulka**, okolí indurované **s flegmónou**, **CRP 76**, **leu 14,3 x 10<sup>9</sup> g/l**. Pacient byl odeslán na ambulanci Kliniky infekčních chorob FN Brno (KICH). Zde aplikován **P-PNC**.
- 13.9.2023 – příjem na KICH – **subfebrílie**, na bérce **prasklý absces**, **flegmóna v okolí asi 20 cm** a táhne se po vnitřní straně stehna **ke tříslu**. Vstupně nasazen **G-PNC** 5 MIU/6h.
- 14.9.2023 – při převazu **evakuace většího množství hnisu**, provedena **incize fascie**, **dutina do hloubky 4 cm**, zaveden drén. Antibiotická terapie byla upravena na **oxacilin** 3g/6h. + **klindamycin** 900mg/8h.



## Kazuistika 2: pacient s hlubokým abscesem

- 15.9.2023 – **zarudnutí** v okolí defektu v rozsahu asi **15 cm**, defekt zející, **vytéká hustý hnis**, výměna drénu, lokální terapie. Kultivačně z rány prokázán **S. aureus MRSA**, následně **PVL+**, změna terapie na **linezolid** 600mg/12h.
- 16.9.2023 – **ustupující otok a zarudnutí**, bez sekrece
- 18.9.2023 – **subjektivně zlepšení**, objektivně ještě **inflamace 10x4cm**, defekt s nekrotickými tkáněmi, drén in situ, nekrektomie
- 21.9.2023 – výrazné **zlepšení lokálního nálezu**, pacient propuštěn
- Linezolid podáván celkem 7 dní i.v. za hospitalizace, doporučeno ještě 7 dní p.o. terapie
- Pacient hospitalizován 9 dní na KICH a poté propuštěn do péče ambulantního chirurga
- Pacient poučen o dekolonizaci a režimových opatřeních

**Děkuji za pozornost**