



---

# **KLINICKÁ MIKROBIOLOGIE**

# Co je to klinická mikrobiologie

---

- Klinická mikrobiologie „sensu lato“ je lékařská mikrobiologie – tedy ta část mikrobiologie, která se týká mikrobiálního osídlení člověka a lidských patogenů
- Klinická mikrobiologie „sensu stricto“ popisuje vlastní procesy mezi klinickým pracovištěm a laboratoří, jakož i organizaci vlastního laboratorního vyšetření

# Proces mikrobiologického vyšetřování

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)

# 1A Indikace – ZDA provést

---

- Hlavním klíčem k úspěchu je , aby si lékař položil otázku co udělá jinak v závislosti na výsledku vyšetření.
- Pokud zjistí, že ať vyjde vyšetření jakkoli, bude jeho další postup ve vztahu k pacientovi stejný, je vyšetření pravděpodobně zbytečné
- Toto ale neplatí u epidemiologických indikací a také u profylaktických indikací (jako je screening mikrobiálního osídlení pacientů v těžkém stavu)

# 1B Indikace- CO provést

---

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

# Tři typy patogenů (1)

---

- Patogen typu ***Streptococcus pyogenes***. Nemusíme vědět, že myslíme zrovna na tohoto patogena, ale musíme přesně vědět, kde je jeho předpokládaná lokalizace.
- Týká se **kultivovatelných bakterií a kvasinek**

# Tři typy patogenů (2)

---

- Patogen typu ***Mycobacterium tuberculosis***. Musíme vědět, kde patogena hledáme, a zároveň i to, že hledáme právě tuto skupinu patogenů.
- Stále je to přímý průkaz, ale **speciální postupy**, při běžné kultivaci se nezachytí.

# Tři typy patogenů (3)

---

- Patogen typu ***Toxoplasma gondii***. Nemusíme vědět, kde se patogen v těle nachází, ale musíme vědět, že hledáme právě jeho.
- **Nepřímý průkaz**, event. přímý průkaz virového antigenu. Týká se spirochet, virů, ale i některých dalších (třeba zrovna toxoplasmy).



## 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 zasláná 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
- 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.

# Průvodka

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. serologické vyšetření TBC)

# Průvodka – 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 – 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

# Výtěrovky

---



# Některé typy výtěrovek

## Suchý tampon



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



## Amiesova půda s aktivním uhlím

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



Fungi Quick (na kvasinky a plísně)

---



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



Na viry



Na chlamydie



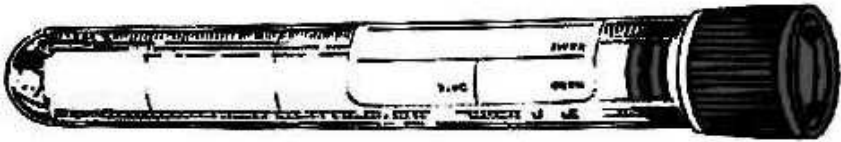


# Odběrové nádoby

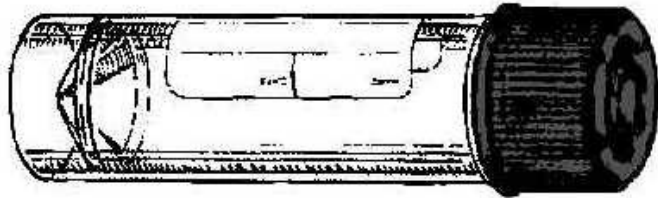
---

- Odběrové nádoby se používají **na kusové a tekuté vzorky**. Na rozměrech fakticky příliš nezáleží, stejně tak barva uzávěru nemá samozřejmě reálný dopad. Má však někdy význam organizační – záleží na dohodě v rámci konkrétní laboratoře
- U anaerobní kultivace je lépe zaslat přímo stříkačku s jehlou zabodnutou do sterilní gumové zátky
- Vzorky se snažíme vždy **dopřít do laboratoře co nejdříve**, zásadní je to však u moče – do dvou hodin

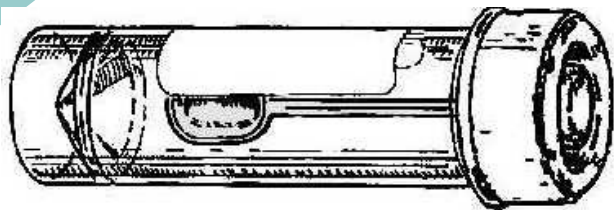
# Nádobky



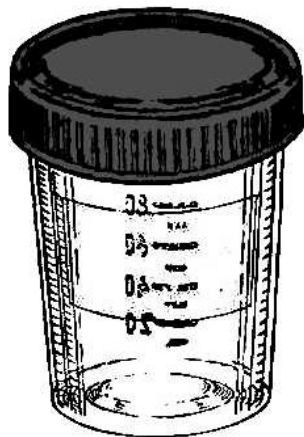
Běžná zkumavka. Universální použití: srážlivá krev (serologie), moč, likvor, hnis, punktát apod.; krevní a močové katetry, menší kousky tkání...



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.

# ZÁSADY ODBĚRU KRVE


---

- Odebírat asepticky!!! Nejen kvůli pacientovi, ale i kvůli vzorku. Nestačí očistit kůži benzinem, nutná desinfekce
- Desinfekci nechat působit dostatečně dlouho, u alkoholových prostředků do zaschnutí (nechat skutečně zaschnout)
- Nejlépe použít tři stejné hemokultivační nádoby. Případně doplnit např. jednou anaerobní
- Hemokultury popsat, nezapomenout na čas odběru a místo odkud bylo odebráno

# DRUHY KULTIVAČNÍCH NÁDOBEK

---

- Existují různé typy podle toho, které mikroby mají být především zachyceny (aerobní, anaerobní)
- Některé nádobky („FAN“) obsahují aktivní uhlí. Jsou určeny ke kultivaci krve pacientů, kteří už berou antibiotika (klasická lahvička by mohla dát falešně negativní výsledek – antibiotikum by potlačilo růst)



Standard  
aerobní

Akt. uhlí  
anaerobní

Akt. uhlí  
aerobní

Bact/ALERT<sup>®</sup> SA

Aerobic, Aérobic, Aeróbica, Aeróbia  
Aerob, Αερόβιος, Aeroba, Aeróbia

See instructions. Voir Notice.  
Ver las Instrucciones.

Use Instructions de Uso.  
Store / Cons. 15°-30°C

For in vitro diagnostic use.

Reg. No. 1077940234

BIOMÉRIEUX, INC.

Bact/ALERT<sup>®</sup> FN

Microaerobic, Anaerobiofila, Anaeróbica  
Microaeróbica, Anaeróbica, Anaeróbica

See instructions. Voir Notice.  
Ver las Instrucciones.

Use Instructions de Uso.  
Store / Cons. 15°-30°C

For in vitro diagnostic use.

Reg. No. 1077940234

BIOMÉRIEUX, INC.

Bact/ALERT<sup>®</sup> S

Aerobic, Aérobic, Aeróbica, Aeróbia  
Aerob, Αερόβιος, Aeroba, Aeróbia

See instructions. Voir Notice.  
Ver las Instrucciones.

Use Instructions de Uso.  
Store / Cons. 15°-30°C

For in vitro diagnostic use.

Reg. No. 1077940234

BIOMÉRIEUX

# FUNGOVÁNÍ KULTIVÁTORŮ

---

- Kultivátor, napojený na počítač, automaticky udržuje optimální podmínky kultivace, a zároveň vyhodnocuje stav nádobky a indikuje případný růst (např. změna tenze  $\text{CO}_2$ )
- Růst je **zvukově a opticky signalizován**. Pokud ani po týdnu nic **neroste**, signalizuje to přístroj také (je třeba expedovat negativní výsledek)

# HEMOKULTIVÁTOR



[www.medmicro.info](http://www.medmicro.info)

# KDYŽ JE HEMOKULTURA POZITIVNÍ...

---

- Lahvička je vyjmuta z přístroje
- Je nutno zaevidovat čas, resp. dobu od příjmu do positivity. Viz další obrázek
- Provádí se vyočkování na pevné půdy, nátěr na sklo barvený Gramem a podle jeho výsledku zpravidla „napřímo“ orientační diskový test citlivosti; místo standardní suspenze se použije přímo tekutina z lahvičky → není spolehlivé



# Proč je tak důležité zapsat čas odběru

---

- **Příklad 1:** Odebraly se tři hemokultury, všechny jsou pozitivní, avšak jedna po 12 hodinách, druhá po 36 hodinách a třetí po 3 dnech. Kmeny jsou fenotypově odlišné → je velmi pravděpodobné, že jde o kožní kontaminanty
- **Příklad 2:** Odebraly se tři hemokultury, všechny jsou pozitivní, všechny po zhruba stejném čase po odběru, kmeny vypadají podobně → je pravděpodobné, že jde o skutečného patogena

# DALŠÍ POSTUP

---

- Je třeba počítat s tím, že testy „napřímo“ jsou jen orientační, už pro nestandardní obsah bakterií v jednotlivých krvích. Zpravidla se proto v dalším kroku provádí řádné vyšetření citlivosti (často pomocí kvantitativních testů)
- Výjimkou jsou případy, kdy jde asi o kontaminaci (zejména u koaguláza negativních stafylokoků)

# SPOLUPRÁCE LABORATOŘ – ODDĚLENÍ

---

- Laboratoř se snaží v průběhu hemokultivace **spolupracovat s oddělením**, nejlépe formou telefonického hlášení, zasílání mezivýsledků (i v případě negativních hemokultur) apod.
- Užitečná je také **dlouhodobá evidence pozitivních nálezů** v rámci soustavného sledování nozokomiálních nákaz.
- **Konkrétní formy spolupráce** je třeba dohodnout vždy individuálně

# 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 VŠ mikrobiologa, jak vzorek zpracovat

# 5 Vlastní zpracování (1)

---

- Vlastní zpracování zpravidla zajišťují laboranti

Postupuje se vždy přísně asepticky, aby se omezilo riziko laboratorní kontaminace. Práce v biohazard boxu je zároveň i dobrou prevencí profesionálních nákaz



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

# Tekuté půdy a pevné půdy

---

- Základem **tekutých půd** je masopeptonový bujon (hovězí vývar + bílkovinný hydrolyzát). Používají se především k pomnožení. Výsledek se špatně hodnotí: v podstatě jen čirý bujon / zakalený bujon (roste / neroste)
- Základem většiny **pevných půd** je tentýž bujon, ale doplněný výtažkem z agarové řasy. Bakterie na pevných půdách rostou pomaleji, ale zato velmi rozmanitě, a lze je rozočkovat.

# Pevné půdy

[www.medmicro.info](http://www.medmicro.info)





# Tekuté půdy

[www.medmicro.info](http://www.medmicro.info)



# Rozdělení tekutých půd

---

- Tekuté půdy mnoho kategorií nemají. Vlastně jen dvě:
  - **Půdy pomnožovací** jsou nejběžnější a univerzální. Příkladem je **bujón** pro aerobní kultivaci a **VL-bujón** pro anaerobní kultivaci (VL = viande-levure, z francouzštiny – obsahuje masokvasničný extrakt)
  - **Půdy selektivně pomnožovací** mají za úkol pomnožit určitou bakterii a potlačit množení jiných. Příkladem je **selenitový bujón** pro salmonely

# Pevné selektivní půdy

---

- Účelem je selektovat (vydělit) ze směsi bakterií pouze určitou skupinu nebo skupiny
- Příkladem je **agar pro stafylokoky s 10 % NaCl**
- Někdy je selektivnosti dosaženo přidáním antibiotika. **Krevní agar s amikacinem** je selektivní pro streptokoky a enterokoky

# Půdy diagnostické

- Nepotlačují růst žádného mikroba
- Zato díky svému složení rozlišují mikroby podle určité vlastnosti
- Příkladem je **krevní agar** ke sledování hemolytických vlastností a **VL krevní agar** (podobný, ale na anaeroby)



# Půdy selektivně diagnostické

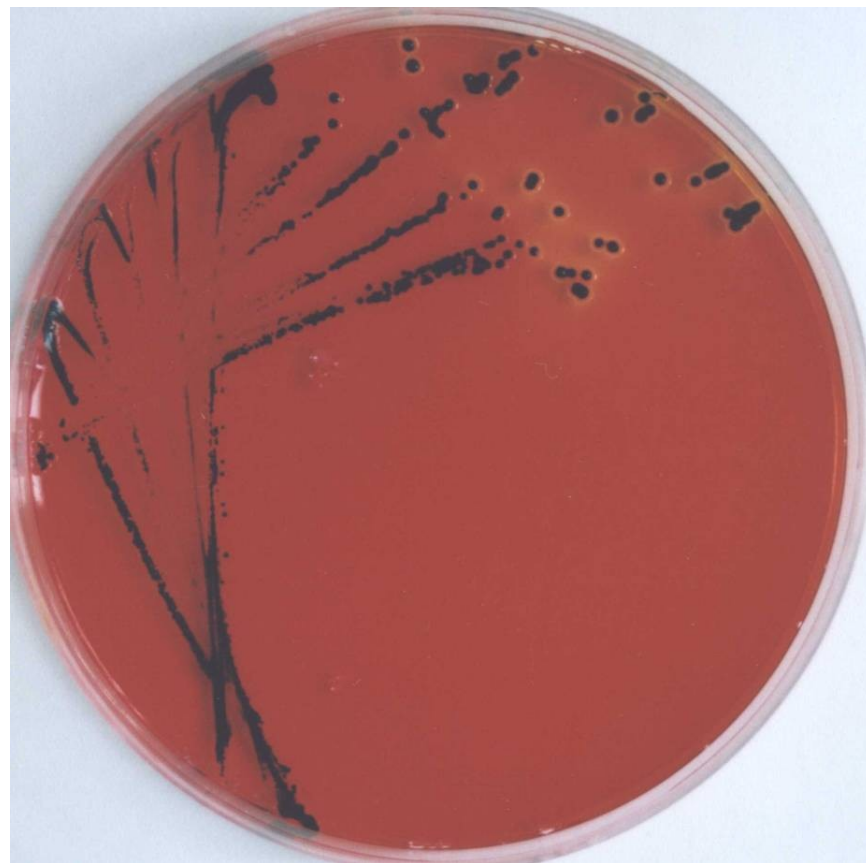
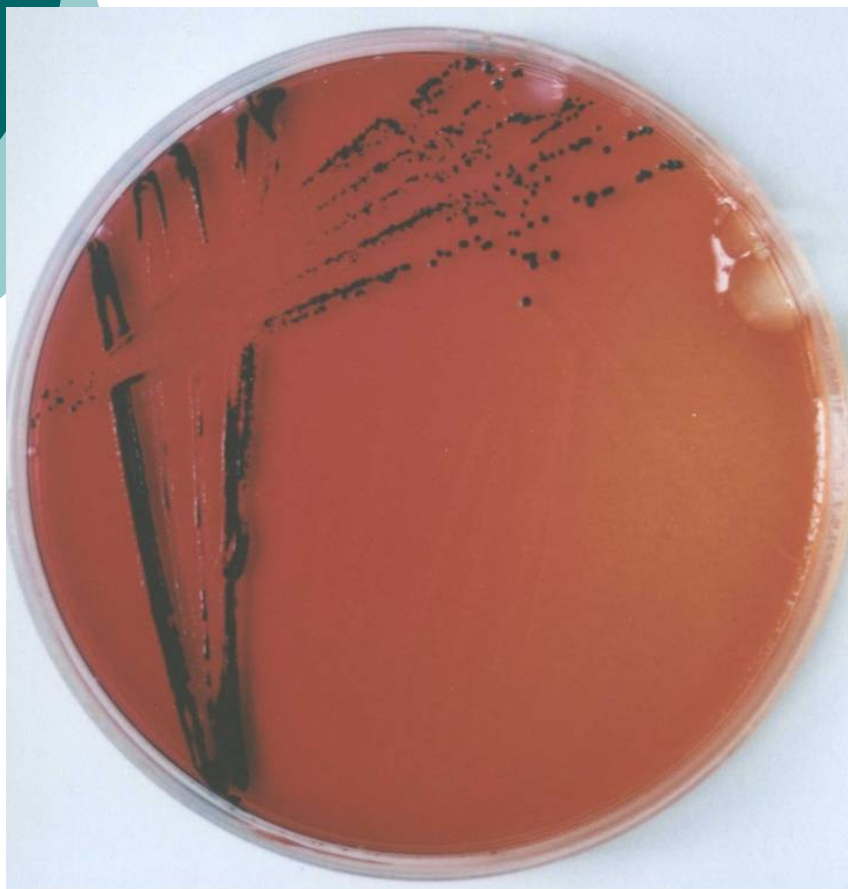
www.medmicro.info

- Kombinují v sobě selektivní a diagnostické vlastnosti
- Příkladem **půda Endova**:
  - Rostou pouze některé G- bakterie (selektivita)
  - Ty, co rostou, lze rozlišit na laktóza pozitivní (červené) a negativní (bledé)
- Podobná je **půda McConkeyho**, ve světě běžnější
- Selektivně diagnostické jsou i půdy **XLD**, **CIN** aj.



# Půdy XLD a MAL na salmonely

---



# Půdy selektivní, diagnostické a selektivně diagnostické – shrnutí

Půda selektivní	Kmen A neroste	Kmen B roste	
Půda diagnostická	Kmen C roste, má kolonie makové	Kmen D roste, má kolonie takové	
Půda selektivně diagnostická	Kmen E neroste	Kmen F roste, má kolonie makové	Kmen G roste, má kolonie takové

# Půdy obohacené a selektivně obohacené

- Jsou určeny pro náročné mikroby
- Obsahují různé nutriční faktory

**Obohacenou půdou je i krevní agar**, který jsme ale uvedli mezi půdami diagnostickými



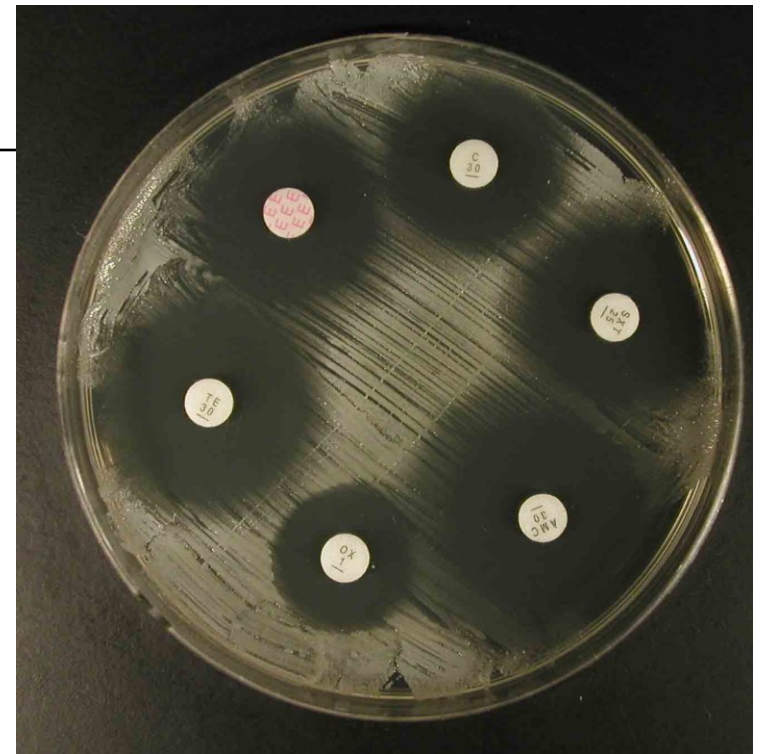
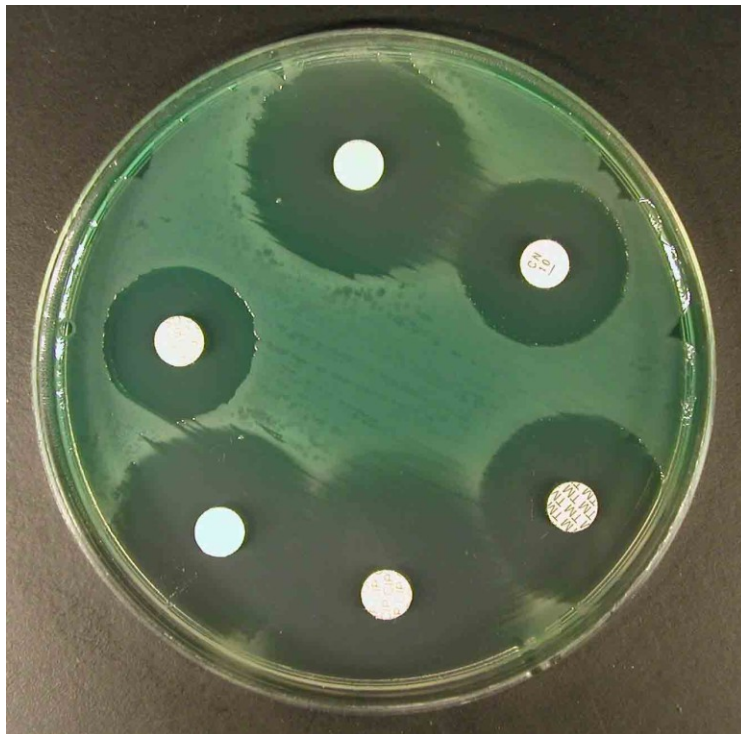
Příkladem „čistých obohacených půd“ jsou **čokoládový agar** pro patogenní neisserie a hemofily a **Levinthalův agar** jen pro hemofily (které ani na krevním agaru nerostou)



# Půdy ke speciálním účelům

In vitro testování citlivosti  
na antimikrobiální látky:

**Müllerův-Hintonové agar;**  
slouží zároveň ke sledování  
pigmentů bakterií



*Vpravo nahoře  
nepigmentovaný  
stafylokok, vlevo dole  
zeleně pigmentovaná  
Pseudomonáda*

# 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.

# Přehled běžné flóry

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

# S čím si lze splést patogena

---

- **S kontaminací:** nejčastěji bakterie rodů *Bacillus*, *Micrococcus*, *Kocuria*, ale i malá množství stafylokoků, plísní a podobně
- **S náhodným nálezem:** u výtěrů z krku mikrob, který se tam dostal s potravou
- **S běžnou flórou:** týká se míst, která svou běžnou flóru mají

# Laboratoř klinické bakteriologie

---

**Laborant 2**  
**„dělá opáčka“:**  
**u pozitivních**  
**vzorků**  
**připravuje testy**  
**citlivosti a testy**  
**bližšího určení**  
**mikroba**

**Mikrobiolog (VŠ)**  
**„odečítá laboratoř“ -**  
**prohlíží výsledky**  
**kultivací**

**Laborant 1**  
**zapisuje**  
**výsledky**

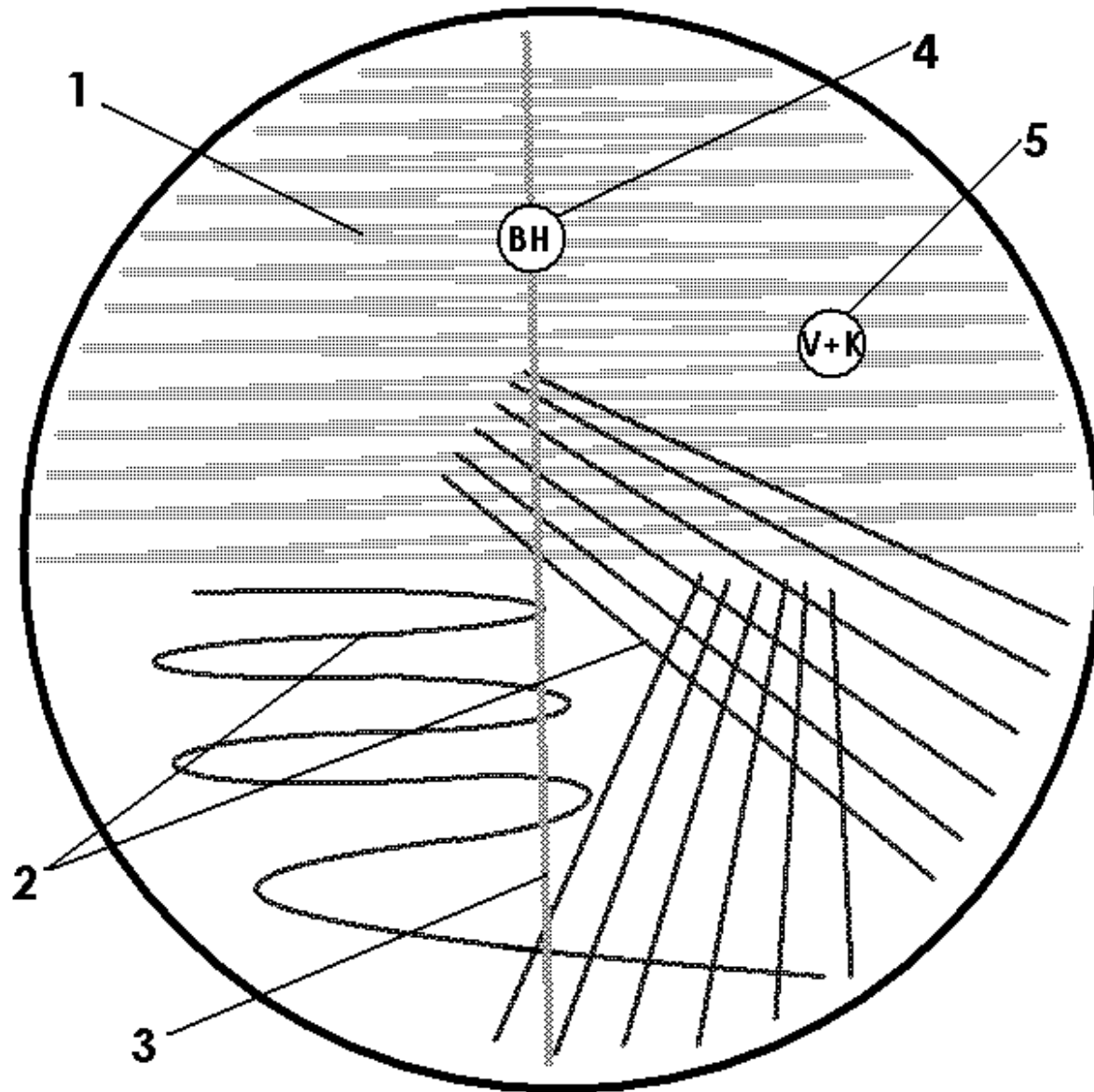


# Jak najít patogena mezi běžnou orofaryngeální flórou

---

- Běžná orofaryngeální flóra zahrnuje **ústní streptokoky** (bezbarvé drobné kolonie s viridací) a **ústní neisserie** (drobné žlutavé kolonie bez hemolýzy). To výrazně ztěžuje hledání možných patogenů. Přesto:
  - **Hemolytické streptokoky** (ale i **zlatý stafylokok**) se projeví výraznou hemolýzou na krevním agaru
  - Pro záchyt **hemofilů** se používá disk s bacitracinem – ve vyšší koncentraci než v bacitracinovém testu (k odclonění běžné flóry)
  - Pro záchyt **meningokoků** se používá disk se směsí vankomycinu s kolistinem

# Záchyt patogena v krku či sputu



1 očkováno tamponem

2 očkováno kličkou

3 stafylokoková čára

4 disk BH (bacitracin pro hemofily)

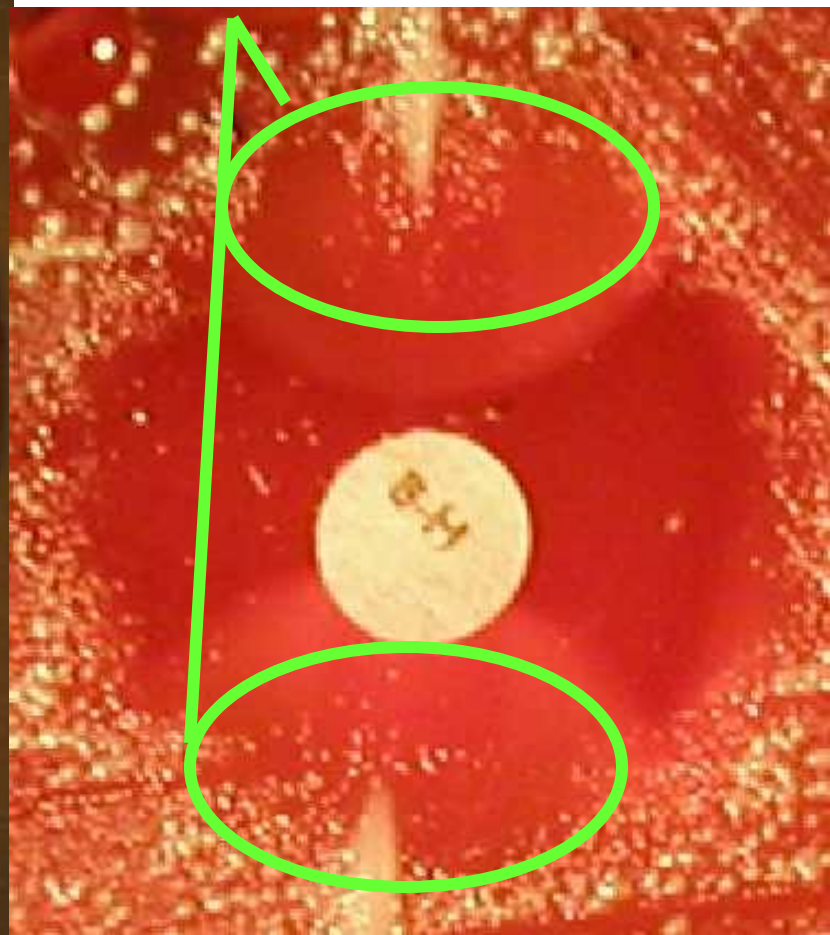
5 disk VK (vankomycin a kolistin pro meningokoky)

Na celé naočkované ploše pátráme po streptokokích (bezbarvé) a po stafylokokích (spíše bílé či zlatavé)



# Kultivační výsledek výtěru z krku s běžnou flórou

V těchto místech pátráme po hemofilech



# Praktická poznámka

---

- Malé, našedlé, skoro bezbarvé, s viridací, to jsou **ústní streptokoky**.
- Malé, nažloutlé, bez viridace, bez hemolýzy (nebo s nepatrně naznačenou hemolýzou), oxidáza pozitivní, to jsou **ústní neisserie**
- Pokud na misce vidíte ještě něco jiného, a zvláště pokud to „něco“ má výraznou hemolýzu, bude to asi **kýžený patogen**.

# Výtěr z krku

## Diagnostické schéma

---

- Den 0: pouze nasazení kultivací
- Den 1: výsledek primokultivace vzorku na KA a EA. NaCl se zde nepoužívá. I v tomto případě se KA s běžnou flórou prodlužují
- Den 2: expedice všech negativních a většiny pozitivních výsledků
- Den 3: expedice téměř všech zbylých pozitivních výsledků

# Farynx – možné nálezy

---

- **Běžná flóra:** Ústní streptokoky a neisserie; hemofily (hlavně *H. parainfluenzae*), za normální se považuje i malé množství aureů, pneumokoků, meningokoků, moraxel apod. Další součásti běžné flóry (anaeroby, spirochety) se při běžné kultivaci neodhalí
- **Patogeny: pyogenní streptokoky,** arkanobakteria; často se nenajde nic a původ je virový (EB viry a jiné)
- Nejvýznamnějším patogenem je ***Streptococcus pyogenes.***

# Moč

## Základní diagnostické schéma

---

- Den 0: pouze nasazení kultivace
- Den 1: výsledek primokultivace vzorku na KA a EA či MCh, expedice všech negativních, testování patogenů
- Den 2: expedice pozitivních, je-li dostatečná citlivost a uspokojivé bližší určení
- Den 3: expedice dalších pozitivních výsledků

# Moč

---

- Běžná flóra sice není, ale u starších osob je často přítomna bezpříznaková bakteriurie, kterou u těchto osob není nutno léčit
- Za pravděpodobnou kontaminaci (či náhodný nálezn) považujeme vše v množství do  $10^4$  / ml, vše v množství do  $10^5$  / ml při dvou různých bakteriích a úplně vše při třech a více bakteriích
- Z patogenů jsou nejběžnější **enterobakterie, enterokoky, *S. agalactiae*, stafylokoky** a další

# Semikvantitativní zpracování moče

---

- Používá se kalibrovaná plastová klička – do očka kličky se zachytí vždy 1  $\mu$ l moče
- Tento mikrolitr se rozočkuje většinou na polovinu misky krevního agaru (vy to máte na celé misce)
- Dále se očkuje i na Endovu půdu nebo UR1chrom, zde se však již hodnotí jen kvalitativně
- Samozřejmě, to, že určujeme kvantitu, nijak neznamena, že bychom se vykašlali na určování rodu a druhu patogena
- **U cystitid volíme zpravidla nitrofurantoin, případně ko-trimoxazol, je-li bakterie na ně citlivá**

# Semikvantitativní hodnocení

Počet kolonií na misce	Počet CFU (bakterií) v 1 $\mu$ l 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