

P11 Klinická mikrobiologie II – vyšetřování u dýchacích a trávicích infekcí; metody detekce orálního biofilmu

Ke studiu: Infekce různých orgánů a orgánových systémů (z učebnic, WWW atd.); mikroskopie, kultivace, biochemická identifikace

Vyšetřování u infekcí respiračního traktu

Úkol 1: Vyhledávání respiračních patogenů v klinické mikrobiologii

S pomocí učitele a prezentace popište následující obrázek. Poznatky z něj pak využijte v úkolech 2 a 3.

disk obsahuje _____

možný patogen _____

možné patogeny _____

disk obsahuje _____ a _____

možný patogen (drobné, bezbarvé kolonie, hemolýza) _____

možný patogen (trochu větší, bílé kolonie, hemolýza) _____

Běžnou flóru ve faryngu tvoří hlavně

a) _____ vzhled: _____

b) _____ vzhled: _____

čára naočkovaná bakterií _____ kvůli kultivaci _____

Úkol 2: Vyšetření u akutní bronchopneumonie

Pro tuto kasuistiku, dokumentovanou průvodkou, se pokuste vyšetřit odpovídající vzorek (sputum), nalézt patogena, učinit závěr a interpretovat jej. Postupně vyplňte jednotlivá políčka v „obrazovce laboratorního informačního systému“.

Kód pojistovny 1 1 1	požaduje díl A	IČP 7 2 1 2 3 4 5 6 Odbornost 7 8 9	Datum 1 5 1 2 0 8	Čís. dokladu	Poř. č.
POUKAZ NA VYŠETŘENÍ / OŠETŘENÍ				provedl díl B	
Pacient	Linda Zelená				
Č. pojistěnce	*1932	akutní bronchopneumonie, 38,5 °C, diabetička			
Variabilní symbol					
Odeslán ad:		Kód náhrady			
Požadováno:					
sputum na bakteriologické vyšetření					
Poznámka:					
72 123 456	Dr. Mikrob Strašlivý praktický lékař G. pozitivní 8. Brno				
razítko a podpis lékaře					Dne:
VZP-06x/1999					razítko a podpis

Pacientka: Linda Zelená*1932 Dg.: Pneumonie, diabetes					
Vzorek: Sputum Objednavatel: Dr. Mikrob Strašlivý					
Mikroskopie: epitelie: leukocyty: G+ koky ve dvojicích: G+ koky v řetězcích: G+ koky ve shlucích: G+ tyčinky:			G- diplokoky: G- tyčinky: kvasinky: Jiné:		
Bakterie A: popis	Závěr:	Interpretace			
Bakterie B: popis	Závěr:	Interpretace			
Bakterie C: popis	Kataláza	10 % NaCl	Hyaluronidáza	Závěr:	Interpretace

Test citlivosti na antibiotika (bakterie C)

Cefoxitin (FOX)*	R < 22 C ≥ 22		Ko-trimoxazol (SXT)	R < 14 C ≥ 17	
Erythromycin (E)	R < 18 C ≥ 21		Tetracyklin** (TE)	R < 19 C ≥ 22	
Clindamycin	R < 19		Chloramfenikol	R < 18	

(DA)	$C \geq 22$		(C)	$C \geq 18$	
------	-------------	--	-----	-------------	--

zapisujte C = citlivý, R = rezistentní, případně I = intermediární

*interpretuje se jako oxacilin a další betalaktamy

**výsledek testu citlivosti platí i pro doxycyklin

Konečný závěr a doporučení léčby: _____

a) Mikroskopie sputa

Prohlédněte si nátěr připravený z vašeho vzorku. Pokuste se identifikovat jednotlivé objekty (bakterie, hostitelské buňky). Vyplňte políčko „Mikroskopie“ takto:

+++ = více než 10 objektů v zorném poli

++ = méně než 10 objektů v zorném poli

+ = jen řídce (jeden či méně objektů na zorném pole)

0 = nepřítomno

b) Popis bakterií

Na krevním agaru popište velikost, barvu a hemolytické vlastnosti daných bakterií. Jiné vlastnosti nepopisujte. Vezměte v úvahu, že na Endově půdě žádné bakterie nerostly. Bakterie A a B by měly být takové, které lze považovat za součást běžné flóry. Bakterie C bude patogen, který bude blíže testován v části c) a d).

c) Další testy

Vyplňte výsledek katalázového testu, růst na krevním agaru s 10 % NaCl a hyaluronidázový test

d) Citlivost na antibiotika

Vyplňte test antibiotické citlivosti u bakterie C. Napište vždy název antibiotika a „C“ nebo „R“ (citlivé či rezistentní). Hraniční zóny máte na stole.

e) Končený závěr.

Pokuse se formulovat závěr pro obvodního lékaře. Zvláště se s pomocí svého učitele pokuste vybrat to nejvhodnější antibiotikum léčby.

Úkol 3: Vyšetření u akutní tonsilitidy

Také u této kasuistiky, dokumentované průvodkou, se pokuste vyšetřit příslušný vzorek (výtěr z krku), najít patogena a učinit závěr a interpretovat jej. Postupně vyplňte jednotlivá políčka v „obrazovce laboratorního informačního systému“. Způsob vyplnění viz u předchozího úkolu.

Kód pojistovny 1 1 1	požaduje díl A	IČP 7 2 1 2 3 4 5 6 Odbornost 7 8 9	Datum 1 5 : 1 2 : 0 8	Čís. dokladu	Poř. č.						
POUKAZ NA VYŠETŘENÍ / OŠETŘENÍ				provedl díl B							
Pacient	Martin Modrý										
Č. pojistěnce	*1991	akutní tonsilitis, 38,8 °C									
Variabilní symbol											
Odeslán ad:	Kód náhrady										
Požadováno:	výtěr z krku na bakteriologické vyšetření										
Poznámka:	<table border="1"> <tr> <td>72</td> <td>Dr. Mikrob Strašlivý</td> </tr> <tr> <td>123</td> <td>praktický lékař</td> </tr> <tr> <td>456</td> <td>Gen. o. pozitivní 8, Brno</td> </tr> </table>					72	Dr. Mikrob Strašlivý	123	praktický lékař	456	Gen. o. pozitivní 8, Brno
72	Dr. Mikrob Strašlivý										
123	praktický lékař										
456	Gen. o. pozitivní 8, Brno										
VZP-06x/1999	razítko a podpis										

Pacient Martin Modrý *1991 Dg.: Akutní tonsilitis						
Vzorek: Výtěr z krku Objednavatel: Dr. Mikrob Strašlivý						
Bakterie A: popis			Závěr:		Interpretace	
Bakterie B: popis			Závěr:		Interpretace	
Bakterie C: popis			Kata-láza	Slanetz Bartley	PYR	CAMP
			Závěr:		Interpretace	

Test citlivosti na antibiotika (bakterie C)

Penicilin (P)	R < 18 C ≥ 18		Chloramfenikol (C)	R < 19 C ≥ 19	
Erythromycin (E)	R < 18 C ≥ 21		Tetracyklin* (TE)	R < 20 C ≥ 23	
Klindamycin (DA)	R < 17 C ≥ 27		Vankomycin (VA)	R < 13 C ≥ 13	

zapisujte C = citlivý, R = rezistentní, případně I = intermediární

*interpretuje se jako oxacilin a další betalaktamy

**výsledek testu citlivosti platí i pro doxycyklin

Konečný závěr a doporučení léčby: _____

Úkol 4: Vhodné vzorky u různých respiračních chorob

S pomocí prezentace najděte vhodné vyšetřovací postupy pro různé klinické situace

Podezření na	Typ vzorku	Podezření na	Typ vzorku
rhinitis		bronchitis	
sinusitis		akutní pneumonie (hnisavá expektorace)	
pharyngitis		subakut. pneumonie (suchý kašel)	
chřipku		plicní aspergilózu	

Vyšetřování gastrointestinálního systému

Úkol 5: Vyšetření u akutního průjmu

V tomto případě byla do laboratoře zaslána stolice. Je třeba vědět, že stolice normálně obsahuje striktně anaerobní flóru, která však nemůže být nalezena při normální kultivaci, neboť ta je pouze aerobní. Ani enterokoky běžně nenalézáme, protože součástí běžného vyšetření stolice není použití krevního agaru. Na druhou stranu ve stolici často nacházíme zástupce čeledi *Enterobacteriaceae*, a to jak součástí normální flóry (přičemž některé kmeny mohou vykazovat zvýšenou virulenci, např. EPEC u *E. coli*) tak i obligátní patogeny (*Salmonella*). – Výsledky kultivace posuzujeme po 24 h (přímá kultivace na Endově agaru a XLD) a 48 h (přímý výsledek kultivace kampylobaktera na půdě CCDA a yersinie na půdě CIN agar, a subkultivace ze selenitového bujónu na Endovu půdu a MAL agar). Ve vašem případě byl již odečet za 24 h proveden. Proveďte vyhodnocení za 48 hodin, proveďte další testy a učiňte závěr.

Pozor: Na půdách jako je XLD, MAL, CIN či CCDA zapíše nález jako „suspektní“ pouze pokud se podobá pozitivní kontrole (na bočním stole). Všechny ostatní nálezy (něco roste, ale „ne jako kontrola“) se považují za negativní!

Kód pojišťovny 1 1 1	požaduje díl A	IČP 7 2 1 2 3 4 5 6 Odbornost 7 8 9 1 5 1 2 0 8	Datum	Čís. dokladu	Poř. č.																																																																																										
POUKAZ NA VYŠETŘENÍ / OŠETŘENÍ				provedl díl B																																																																																											
Pacient	Cecílie Hnědá	Dg.	Akutní průjem	<table border="1"> <thead> <tr> <th>IČP</th> <th>Odbornost</th> <th>Var. symbol</th> <th>Datum</th> <th>Kód</th> <th>Poč.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>1</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>2</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>3</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>4</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>5</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>6</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>7</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>8</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>9</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>10</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>11</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>12</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>13</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>14</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> </tbody> </table>		IČP	Odbornost	Var. symbol	Datum	Kód	Poč.	1						2						3						4						5						6						7						8						9						10						11						12						13						14					
IČP	Odbornost	Var. symbol	Datum			Kód	Poč.																																																																																								
1																																																																																															
2																																																																																															
3																																																																																															
4																																																																																															
5																																																																																															
6																																																																																															
7																																																																																															
8																																																																																															
9																																																																																															
10																																																																																															
11																																																																																															
12																																																																																															
13																																																																																															
14																																																																																															
Č. pojištění	*1983	Variabilní symbol	Kód náhrady																																																																																												
Odeslán ad:																																																																																															
Požadováno:	Bakteriologické vyšetření stolice																																																																																														
Poznámka:	<table border="1"> <tr> <td>72</td> <td>Dr. Mikolaj Čiřáňský</td> </tr> <tr> <td>123</td> <td>praktický lékař</td> </tr> <tr> <td>456</td> <td>G. M. Positivní 8, Brno</td> </tr> </table>					72	Dr. Mikolaj Čiřáňský	123	praktický lékař	456	G. M. Positivní 8, Brno																																																																																				
72	Dr. Mikolaj Čiřáňský																																																																																														
123	praktický lékař																																																																																														
456	G. M. Positivní 8, Brno																																																																																														
	razítko a podpis lékaře	Dne:																																																																																													
		razítko a podpis																																																																																													

Pacientka Cecílie Hnědá, *1984				Dg.: Akutní průjem	
Endova půda (24 h)	Půda XLD (24 h)	Endova půda (subkultivace)	Půda MAL (subkultivace)	Půda CIN (48 h)	Půda CCDA (48 h)
<i>E. coli</i>	negativní			Konečný závěr a interpretace:	
Další testy					
Hajnova půda					
Serotypizace					

Úkol 6: Odběr stolice na vyšetření různých patogenů a toxinů

Pro některé účely lze zasílat výtěry z konečníku. V jiných případech je nutno zaslat skutečný vzorek stolice, někdy dokonce při chladničkové teplotě.

Vyplňte následující tabulku.

Stolice zaslána na	Typ vzorku	Stolice zaslána na	Typ vzorku
bakteriologii		virologii – izolace viru	
mykologii		parazitologii	
virologii – průkaz antigenu		detekce toxinu <i>Clostridium difficile</i>	

Úkol 7: Mikroskopie orálního biofilmu

Prohlédněte si dvě skla s preparáty zubního plaku. První sklo je obarveno podle Grama, druhé je obarveno alcianovou modří (barvivo selektivně se váže na polysacharidy): fixovaný preparát se polije alcianovou modří a barví asi 5 minut, poté se sklo lehce opláchne, opatrně osuší a kápne se kapka parafinového oleje.

Popište a zakreslete sledované útvary. Všimněte si shluků bakterií a v preparátu barveném alcianovou modří obarvené extracelulární polysacharidové substance (v preparátu barveném Gramem je nevidíte)

Gramovo barvení	Alcianová modř
-----------------	----------------

Úkol 8: Vliv čištění zubů na orální biofilm

Vypláchněte si ústa roztokem předloženého barviva dle pokynů vyučujícího a prohlédněte. Zbarvená místa jsou pokryta biofilmem. Popište místa, kde se biofilm usazuje nejvíce, případně kde nebyl biofilm odstraněn při čištění zubů. Poté si zuby vyčistěte, máte-li čím.

Výsledek: Biofilm se nejvíce usadil na těchto místech: _____

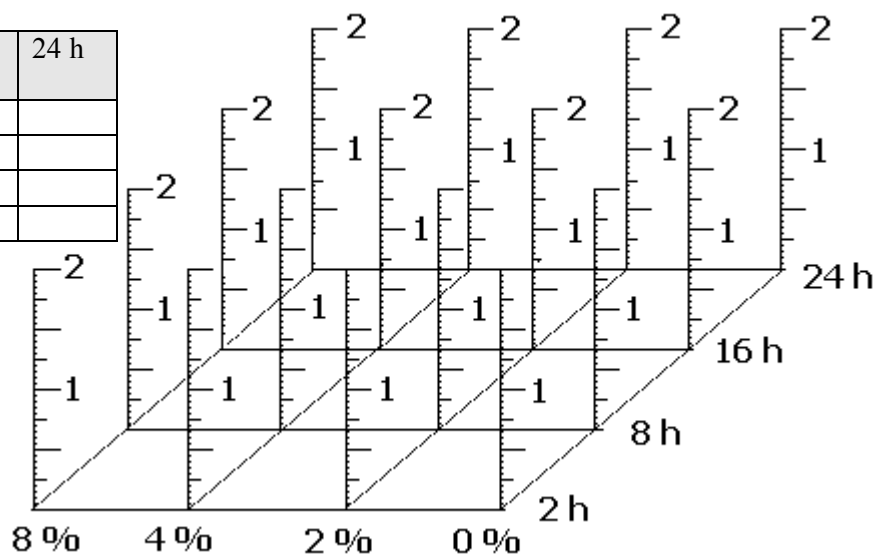
Úkol 9: Vliv přítomnosti sacharidů na dynamiku růstu biofilmu

Do jednotlivých důlků mikrotitrační destičky obsahující BHI médium doplněné 0 %, 2 %, 4 %, 8 % glukózy byl inokulován kmen *Streptococcus mutans*. Po 2, 8, 16, 24 hodinách kultivace při 37 °C byly příslušné důlky třikrát promyty. Vrstva vytvořeného biofilmu, která zůstala pevně adherovaná na stěnách jamek mikrotitrační destičky, byla obarvena 20minutovým působením genciánové violeti. Přebytečné barvivo bylo odstraněno z jamek opatrným promytím. Intenzita zbarvení jamek se měří spektrofotometrem a odpovídá tloušťce vytvořené biofilmové vrstvy.

Na přiloženém papíře jsou výsledky spektrofotometrického měření intenzity zbarvení důlků. Z předložených výsledků sestrojte prostorový graf dynamiky tvorby biofilmu v závislosti na čase a koncentraci glukózy. (Pro každou koncentraci a čas je změřeno šest důlků, vyberte vždy hodnotu přibližně průměrnou, není nutno počítat průměr přesně.)

Průměrné hodnoty*	2 h	8 h	16 h	24 h
0 %				
2 %				
4 %				
8 %				

* hodnoty absorbance, přibližný průměr ze všech šesti důlků, které byly podrobeny stejné koncentraci glukózy po stejný čas



Jak ovlivňuje doplnění média glukózou tvorbu biofilmu?