

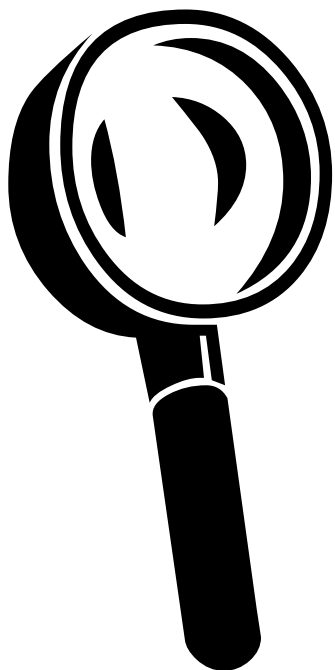
Mikrobiologický ústav uvádí

NA STOPĚ PACHATELE

Díl jedenáctý:

Spolupráce při pátrání aneb Klinická
mikrobiologie II + Pachatelé v biofilmu

Autor prezentace: Ondřej Zahradníček (kontakt:
zahradnicek@fnusa.cz). K praktickému cvičení pro Bi7170c



Hlavní obsah

Dýchací a trávicí infekce

Biofilmové infekce

- Poznámka: Z praktických důvodů tato prezentace zahrnuje celé téma mikrobiálního biofilmu v klinické mikrobiologii. V praxi je ale toto téma rozděleno – část úkolů (ty, které se týkají trávicího traktu, konkrétně ústní dutiny) jsou součástí jedenáctého tématu, zbytek (biofilm na cévních katetrech) součástí třináctého tématu.

DÝCHACÍ A TRÁVICÍ INFEKCE

Přehled témat

[Zpět na
hlavní obsah](#)

Dýchací infekce – úvod

Indikace k vyšetření při chorobách dýchacích cest

Odběry a vyšetřování u dýchacích infekcí

Zpracování a vyhodnocení respiračních vzorků

Význam a rozdělení infekcí trávicích cest

Odběry a vyšetření u infekcí střeva

Dýchací infekce – úvod



Význam infekcí dýchacích cest (respiračních nákaz)

- Jsou to **nejběžnější infekce** v ordinaci praktického lékaře (mikroby se v dýchacích cestách snadno pomnožují)
- Mají obrovský **ekonomický dopad** (neschopenky, OČR)
- Mají sklon vyskytovat se **v kolektivech** a občas probíhat v podobě epidemií
- Tři čtvrtiny respiračních infekcí (a u dětí ještě více) vyvolávají **viry**

Umístění nákazy v rámci dýchacích cest

- **Není jedno, kterou část dýchacích cest infekce postihuje (liší se vyšetřování, léčba i závažnost).**

- Příznaky infekcí různých částí dýchacího traktu jsou různé (smrkání u rhinitid, kašel u infekcí DCD)
- Různí jsou také původci

- **Proto je třeba rozlišovat infekce:**

- horních cest dýchacích (plus anatomicky i středního ucha, které s nimi souvisí)
- dolních cest dýchacích, včetně plic (*někdy se plíce kladou zvlášť, nejde už o „cestu“*)

Je ale potřeba počítat také s tím, že infekce může postihovat více částí dýchacích cest současně.

Rozdělení dýchacích infekcí

HCD a přilehlé orgány

- infekce nosu a nosohltanu
- infekce ústní části hltanu (faryngu) včetně mandlí
- infekce vedlejších dutin nosních
- většinou se sem přiřazují z anatomických důvodů také infekce středního ucha

DCD a plíce:

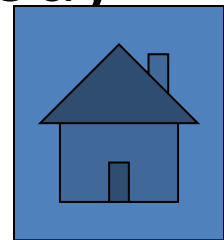
- infekce příklopky hrtanové
- Infekce hrtanu (laryngu) a průdušnice (trachey)
- infekce bronchů (průdušek)
- infekce bronchiolů (průdušinek)
- infekce plic

Není chřipka jako „chřipka“

- Většina běžných akutních onemocnění dýchacích cest probíhá jako rhinitidy, faryngitidy nebo smíšené rhinofaryngitidy (záněty nosu a hltanu). Epidemiologové používají zkratku „**ARI**“ – **acute respiratory illness (akutní respirační onemocnění)**. Lidé často mluví o „chřipce“, ale o tu tady nejde
- Pravá chřipka sice postihuje dýchací cesty, ale spíše dolní, projevuje se suchým kašlem a také celkovými příznaky (schvácenost, horečka). Podobně se ovšem mohou projevovat i například tzv. parachřipky. Epidemiologové tady používají zkratku „**ILI**“ (**influenza-like illness, chřipce podobná onemocnění**).

Normální osídlení dýchacích cest

- **Nosní dutina** nemá specifickou flóru, přechází tam však mikroflóra z kůže (přední část) a hltanu (zadní část)
- **V hltanu** (stejně jako v ústní dutině) nacházíme ústní streptokoky, neisserie, nevirulentní kmeny hemofilů aj. Mnohé další tam jsou, ale většinou je nevykultivujeme
- **Plíce a dolní dýchací cesty** jsou za normálních okolností bez většího množství mikrobů
- **Na ostatních místech** (hrtan) jsou různé přechody (hrtan – jako v hltanu, ale méně)





Indikace

k vyšetření při

chorobách

dýchacích cest

Vyšetřování a léčba infekcí nosu a nosohltanu

- **Vyšetřování je zbytečné.** Ani hlenohnisavý sekret není důvodem provádět bakteriologické vyšetření, pokud netrvá delší dobu.
- **Léčba je symptomatická** (při ucpaném nosu kapky, jinak tekutiny, např. čaj; ani antipyretikum není příliš vhodné, protože zvýšená teplota pomáhá proti virům). Antibiotická léčba není indikována. Nanejvýš je možno zkusit lokální léčbu framykoinem.
- **Pouze pokud infekce trvá déle než 10–14 dnů**, je vhodné vyšetřit výtěr z nosu (vyhnout se kontaminaci z kůže!) a léčit cíleně antibiotiky dle citlivosti

Co praví odborníci

„Více než 80 % rhinitid je provázeno změnami na sliznicích dutin, proto toto onemocnění bývá nazýváno také rhinosinusitida. Kašel provází asi 60–80 % rhinosinusitid. Hlenovitá sekrece z nosu se do tří dnů od počátku onemocnění mění v hlenohnisavou, obsahující deskvamované epiteliální buňky a kolonizující bakterie běžně se vyskytující v nose. Tato kvalitativní změna sekrece, která bývá často v ambulantní praxi nesprávně považována za bakteriální komplikaci, zejména provede-li se kultivační vyšetření hlenu nebo výtěru z nosu, však patří k přirozenému průběhu virové rhinosinusitidy.“

(Respirační infekce – doporučený postup ČLS JEP)

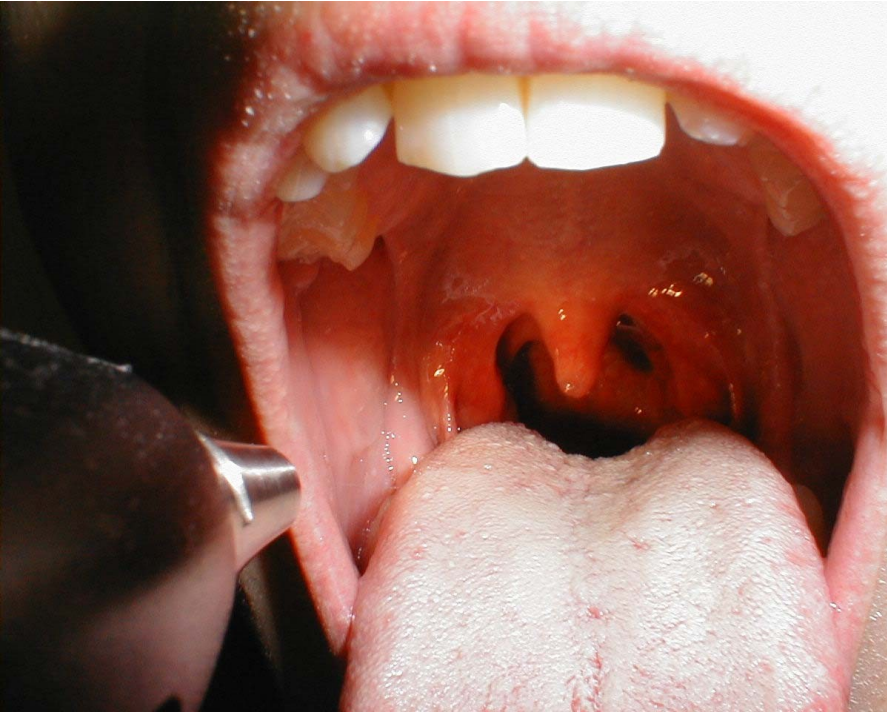
Vyšetřování a léčba infekcí přínosných dutin

- **Léčba** sinusitidy pravděpodobného bakteriálního původu by měla být zahájena neprodleně, i bez vyšetření.
- **Lékem volby** je amoxicilin (např. AMOCLEN), alternativou může být doxycyklin (DOXYBENE), u dětí kotrimoxazol (např. BIASEPTOL)
- Vyšetřovat **výtěr z nosu či krku je k ničemu.**
- Pokud máme pochybnosti o úspěšnosti léčby a chceme léčit cíleně, jediná možnost je **správně provedená punkce či výplach dutin na ORL**, samozřejmě pokud výplach, ne borovou vodou!! **Na žádanku nutno uvést**, zda jde o čistý punktát, nebo proplach fyziologickým roztokem

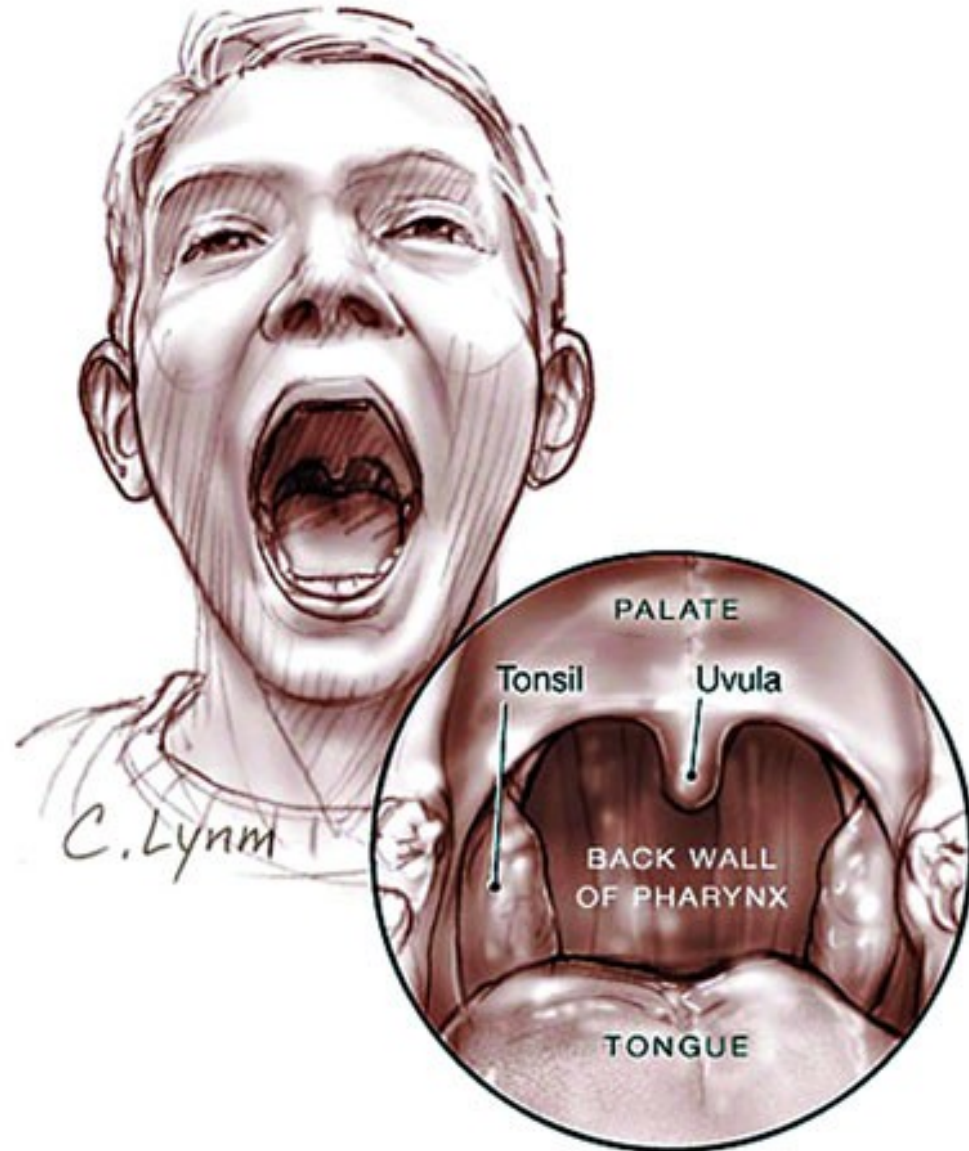
Vyšetřování a léčba infekcí středního ucha

- **Léčba** má smysl, pokud jde o skutečně prokázaný zánět (bolest, zarudnutí, horečka) a nereaguje na protizánětlivou léčbu
- **Lékem volby** je amoxicilin (např. AMOCLEN), alternativou může být kotrimoxazol
- Vyšetřovat **výtěr ze zvukovodu** má smysl pouze po provedené paracentéze (propíchnutí bubínku)
- Jinak má samozřejmě smysl vyšetřit **hnisavou tekutinu**, která je při paracentéze odebrána

Tonsilopharyngitis



<http://medicine.ucsd.edu/Clinicalimg/Head-Pharyngitis.htm>



<http://www.newagebd.com/2005/sep/12/img2.html>

Vyšetřování a léčba infekcí z krku

- Vždy by měl být proveden **výtěr z krku** (tonsil) k ověření bakteriálního původu a případně určení původce. *(To, že mnozí lékaři výtěry nedělají, ještě neznamená, že je to tak dobře.)*
- Protože ale zpravidla není možné čekat na výsledek kultivace, provede se také **vyšetření CRP** (zvýšený u bakteriálních infekcí, typicky nad 60 mg/l – u virové naopak pod 40 mg/l), jehož výsledek je k dispozici mnohem dříve
- **Léčba by měla být cílená.** U angín způsobených *Streptococcus pyogenes* (a těch je naprostá většina) je lékem první volby **V-penicilin**. Makrolidy (RULID, KLACID, SUMAMED, AZITROX) by se měly používat pouze u alergických pacientů.
- Případně serologie EB viru a cytomegaloviru (vyloučení infekční mononukleózy a cytomegalovirózy)

Vyšetřování a léčba zánětů hrtanu (a průdušnice)

- Není co vyšetřit. Dělat např. výtěr z krku je nesmyslné, protože v krku jsou úplně jiné bakterie. Mikrobiologické vyšetření se tedy až na výjimky (chronické stavy) neprovádí
- **Léčba je jen symptomatická.** Antibiotika nejsou indikována prakticky za žádných okolností

Vyšetřování a léčba zánětů průdušek a průdušinek

- Základem je **klinické vyšetření**, které prokáže rozvoj kašle s vykašláváním, bez nálezu na plicní tkáni (podle rentgenu a klinického vyšetření)
- **Laboratorní vyšetřování** je většinou zbytečné. U vykašlávání hnisu se zasílá sputum (chrchel), neboť je pravděpodobná sekundární bakteriální infekce. V tom případě má také smysl vyšetřit CRP. Dále je možno poslat krev na serologické vyšetření protilátek proti mykoplasmatům a chlamydiím.
- **Léčba antibiotiky je většinou zbytečná**, u mykoplasmat a chlamydií se použijí tetracykliny nebo makrolidy

Zvláštní případ: akutní zhoršení chronické bronchitidy

- Charakterizována
 - zhoršením kašle
 - zvýšenou expektorací a změnou charakteru sputa i jeho barvy
 - často zhoršením dušnosti.
- **Původci jsou do 40 % viry**
- Z bakterií jsou nejčastějšími vyvolavateli *H. influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* či *Moraxella catarrhalis*.
- Rutinní antibiotická léčba pacientů se nedoporučuje
- **Podání atb má prokazatelný účinek pouze pokud jsou u pacientů přítomny současně všechny tři příznaky onemocnění**

Mikrobiologické vyšetřování infekcí plic



● U klasických komunitních pneumonií


- krev na hemokultivaci (hemokultura)
- sputum – mikroskopické a základní kultivační vyšetření
- sputum – kultivační průkaz *Legionella pneumophila*
- moč – průkaz antigenu *Legionella pneumophila*

● U atypických pneumonií

- krev – sérologické vyšetření (průkaz protilátek)
- hemokultura a sputum na bakteriologii (pro jistotu)
- virologické vyšetření (sérologie, přímý průkaz)
- sputum – přímý průkaz původce (EIA, PCR)

- Speciální případy: TBC (sputum na TBC), plicní aspergilóza (kultivace BAL, antigeny v krvi, serologie)

Odběry a vyšetřování u dýchacích infekcí



Odběr vzorků na vyšetření z dýchacích cest obecně (1)

- Na **bakteriologii** posíláme
 - **výtěry** – (z krku, tonzil, nosu apod.), vždy na tamponu v **transportní půdě** (např. Amiesově), popsat odkud je výtěr
 - **sputum, tracheální aspirát či bronchoalveolární laváž**, případně také různé endotracheální kanyly a podobné vzorky, u bronchitid a pneumonií (*požadavek vyšetření TBC musí být na žádance!*)
 - **hemokulturu** u pneumonií
 - **moč** na legionelový antigen
- Na **mykologické vyšetření** volíme výtěr na tamponu v soupravě FungiQuick (ale také běžný Amies)

Odběr vzorků na vyšetření z dýchacích cest obecně (2)

- **Viroví** původci se většinou nevyšetřují.
- Je-li výjimečně potřeba je vyšetřit, volíme např. **výplachy z nosohltanu** a bronchoalveolární laváže speciálním médiem, či **krev na serologii respiračních virů** (tj. na protilátky – je ale třeba počítat s tím, že protilátky se vytvoří až za týden či dva po propuknutí nemoci)
- **U viru chřipky** se používá výtěr ze zadní stěny faryngu do speciálního transportního média

Výtěr z krku – technika

- **Odběrový materiál:** Tampon na tyčince v transportním mediu podle Amiese.
- **Způsob odběru:**
 - Tampon se zavede za pomoci špátle **za patrové oblouky**, aniž by došlo k dotyku se sliznicí dutiny ústní.
 - Válivým pohybem **se razantně setře povrch obou tonsil** a patrových oblouků tak, aby se do tamponu nasálo dostatečné množství slizničního sekretu.
 - Současně se provede **výtěr ze zadní stěny faryngu**.
 - Tampon se **opatrně vyjme**, aby se zabránilo jeho kontaminaci, a vloží se do sterilního obalu, nejlépe s transportním médiem.
- **Uchovávání:** Do 24 hodin při pokojové teplotě (*na kapavku neuchovávat a zaslat okamžitě*)
- **Transport:** Do 2 hodin při pokojové teplotě.

Výtěr z nosohltanu („pertusoidní“ syndrom, podezření na dávivý kašel)

- **Odběrový materiál:** Tampon **na drátu**; na bordetely nutno ihned naočkovat na speciální kultivační půdu, na hemofily stačí zaslat v transportní půdě
- **Způsob odběru:** Koncová část (asi 3 až 4 cm) tamponu na drátě se ohne o hranu odběrové zkumavky do úhlu 90°, zavede se ústní dutinou za patrové oblouky k zadní stěně nasopharyngu, aniž by došlo k dotyku se sliznicí dutiny ústní nebo tonsil. Krouživým, vějířovitým pohybem se provede stěr z faryngeální sliznice (tamponem vzhůru).
- **Uchovávání:** Okamžitý transport do laboratoře.
- **Transport:** Do 2 hodin od odběru při pokojové teplotě.

Odběr sputa

- **Odběrový materiál:** Sterilní průhledný kontejner z umělé hmoty se šroubovacím víčkem.
- **Způsob odběru:**
 - Odběr se provádí vždy za dohledu sestry nebo lékaře.
 - Pacient si vypláchne ústa a vykloktá vodou (omezení kontaminace ústními bakteriemi)
 - **Poté pacient zhluboka zakašle tak, aby vykašlal sekret z dolních dýchacích cest, nikoliv sliny či sekret z nosohltanu.**
 - Takto získané sputum se zachytí do sterilního kontejneru v objemu nejméně 1ml.
- **Uchovávání:** Do 24 hodin při chladničkové teplotě
- **Transport:** Do 2 hodin při pokojové teplotě.

Možná vyšetření u plicních infekcí

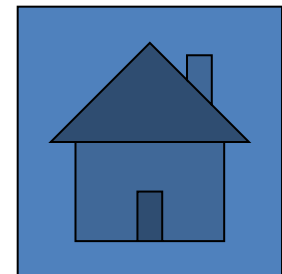
- Základem je **klinické vyšetření a rentgen**, důležité je rozlišení klasické × atypické pneumonie (zcela jiné spektrum původců)
- **U klasických pneumonií** má smysl správně odebrané sputum, případně (zejména u septického průběhu) krev na hemokultivaci
- **U atypických pneumonií** serologie mykoplasmat a chlamydií (případně v rámci „serologie respiračních virů“).
- **U nemocničních pneumonií** může připadat v úvahu navíc cílené **vyšetření na legionely**. Kromě kultivačního vyšetření je možné i vyšetření moče na legionelový antigen, případně serologie

Co napsat na žádanku o vyšetření


- Kromě vyplnění obvyklých polí (jméno, číslo pojištěnce...) je důležité pole požadavku, co má být vyšetřeno.
- **Příklady formulací na žádance:**
 - Výtěr z krku na bakteriologii
 - Punktát čelní dutiny na bakteriologii + kvasinky
 - Krev na serologii původců atypických pneumonií
 - Sputum na bakteriologii
 - Sputum na TBC (kultivace + PCR)
 - Hemokultura č. II z periferie
 - BAL na *Pneumocystis jirovecii*

Co je potřeba vědět

- **Na průvodku** je nutno uvést, o jaký vzorek jde, jaké vyšetření je požadováno, a případně další podstatné údaje
- Mikrobiolog má právo **odmítnout špatně odebraný vzorek sputa** (nehnisavý, neobsahuje leukocyty, jen epitelie → jsou to sliny!!!)
- **Kultivace tuberkulózy** trvá několik týdnů, stejně tak kultivace některých hub
- U **virologie a průkazů různých antigenů** závisí rychlost vyšetření hlavně na organizaci práce



Zpracování a vyhodnocení respiračních vzorků



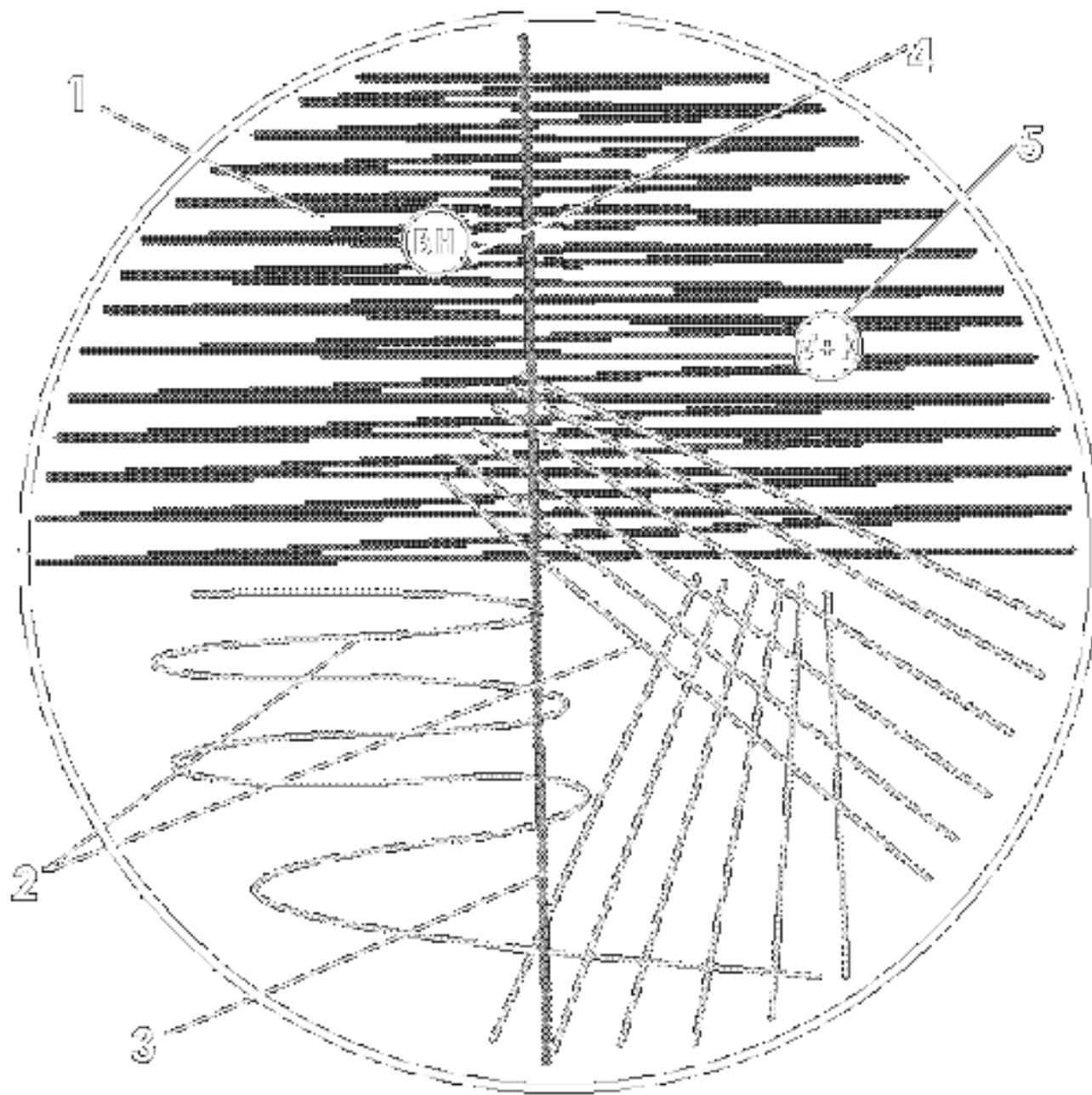
Co se se vzorky děje v laboratoři

- Většina výtěrů se kultivuje na **krevním agaru**. Na ten se umísťují disky, jejichž cílem je odclonit běžnou flóru a umožnit záchyt patogenů. Kvůli hemofilovi, který na KA roste jen v přítomnosti např. zlatého stafylokoka, se na agar očkuje stafylokoková čára
- U sput apod. se také provádí **mikroskopie**
- Kromě KA se užívají **další půdy**, např. Endova
- **Virologické vzorky** se izolují na vajíčkách či tkáňových kulturách, nebo se hledá antigen
- V **serologických vzorcích** se hledají protilátky

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 stafylokocích (spíše bílé či zlatavé), případně pneumokokích (podobné ústním streptokokům, ale penízkovité nebo naopak výrazně mukózní)

Kultivační výsledek výtěru z krku s běžnou flórou a patogenem



Foto: Filip Daněk

Vysvětlivky k dalšímu textu

- KA – krevní agar
- EA – Endův agar; většinou lze místo něj použít alternativně také McConkeyho agar
- KA+AMIK – krevní agar s amikacinem, selektivní pro streptokoky a enterokoky
- NaCl – KA s 10 % NaCl, selektivní pro stafylokoky
- B – bujón

A white plastic cup containing a thick, yellowish, foamy substance, likely sputum. The foam is dense and occupies most of the cup's volume. The text "Vyšetření sputa" is overlaid in blue on the cup.

Vyšetření sputa

Vyšetření sputa

Diagnostické schéma (1)

- **Den 0:** mikroskopie (Gramovo barvení)
- **Den 1:** výsledek primokultivace vzorku na KA a EA. Je-li přítomna jen běžná flóra, EA se vyhodí a KA se prodlužuje do dalšího dne. Případný patogen se určuje a testuje se jeho citlivost; je-li ho málo, dělá se jeho izolace (kolonie se opatrně nabere kličkou a naočkuje se na celou misku křížovým roztěrem tak, aby se určitě získal čistý kmen.
- **NaCl** se u sputa nevyužívá, ale u některých jiných respiračních vzorků (tracheální aspiráty, bronchoalveolární laváže) ano.

Vyšetření sputa

Diagnostické schéma (2)

- **Den 2:** expedice negativních výsledků (prohlížení „prodlužek“, jak říkáme u nás, či „dohřívek“, jak říkají v nemocnici na Homolce). Expedice většiny pozitivních výsledků, je-li bližší určení hotovo a test citlivosti uspokojivý. Není-li, nebo je-li hotova teprve izolace, „jede se dál“.
- **Den 3:** expedice většiny zbylých pozitivních výsledků (rezistentní, špatně určitelné, z izolací)
- **Den 4:** výjimečně expedice posledních výsledků

Sputum – možné nálezy

- **Běžná flóra:** V DCD sice není, ale při průchodu HCD vždy dochází ke kontaminaci ústními streptokoky a neisseriemi
- **Patogeny:** pneumokoky, pyogenní streptokoky, hemofily (klasické pneumonie). Původci atypických pneumonií většinou nejsou kultivovatelní.
- Jedním z nejčastějších nálezů je ***Staphylococcus aureus***. Lékem volby by měl být oxacilin, ovšem ten není t. č. dostupný v perorální formě. Mohl by se tedy použít např. některý cefalosporin I. generace.

Praktická poznámka

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

„Odečítání“ bakteriologie



Výtěr z krku



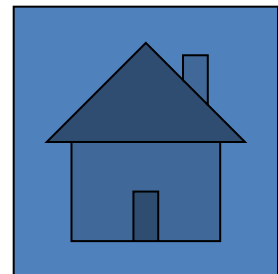
Výtěr z krku

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 respirační viry)
- Nejvýznamnějším patogenem je *Streptococcus pyogenes*. Lékem volby u nealergických pacientů je jednoznačně – ale to přece víte 😊



Význam a rozdělení infekcí trávicích cest



Význam infekcí trávicích cest

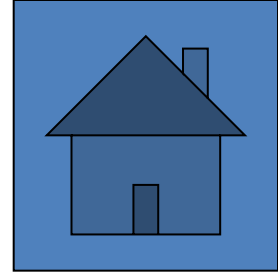
- Mnohé z nich jsou přenášeny **kontaminovanými potravinami a vodou**
- Nepříjemné, **ekonomické ztráty** nejen při infekci, ale i při kontaktu s infekcí
- Pro jejich předcházení je zásadní **hygiena** v **potravinářských výrobnách** a provozovnách a ochrana **vodních zdrojů**
- Důležitá je také **osobní hygiena** včetně hygieny dutiny ústní
- V léčbě **jen výjimečné použití antibiotik**

Rozdělení trávicích infekcí


- **Rozlišujeme**

- infekce v **dutině ústní**
- infekce **hltnu** – viz respirační infekce
- infekce **jícnu** – velice vzácné, většinou sekundární při původně neinfekční nemoci
- infekce **žaludku** (či spíše spolupůsobení žaludečních mikrobů u některých chorob)
- infekce **tenkého střeva** (enteritidy)
- infekce **tlustého střeva** (kolitidy)
- často infekce obou částí (enterokolitidy)

Normální osídlení trávicích cest



- **Rty** znamenají přechod kožní a ústní flóry
- **V ústní dutině** (stejně jako v hltanu) nacházíme ústní streptokoky, neisserie, nevirulentní kmeny hemofilů aj. Mnohé další tam jsou, ale většinou je nevykultivujeme
- **Jícen a žaludek** jsou za normálních okolností bez většího množství mikrobů
- **V tenkém a zejména tlustém střevě** nacházíme zpravidla asi 1 kg anaerobů, dále enterobakterie, enterokoky, kvasinky, někdy i nepatogenní améby
- **Řiť** je opět místem přechodu střeva a kůže



Odběry a vyšetřování u infekcí střeva

Odběr a transport stolice na jednotlivá vyšetření

- **Bakterie** – v Amiesově transportní půdě
- **Kvasinky** – lépe sice v půdě FungiQuick, ale v zásadě také stačí Amiesova transportní půda
- **Viry** – vzorek velikosti lískového oříšku; má-li být provedena izolace viru, je nutno chladit
- **Paraziti** – opět velikosti lískového oříšku, nemusí být sterilní. Označit cestovatelskou anamnézu! Zpravidla tři vzorky (jeden negativní nevylučuje pozitivitu)
- **Toxin *Clostridium difficile*** – tekutá stolice ve zkumavce
- **Roupi** – Grahamova metoda – perianální otisk na speciální lepicí pásku, mikroskopuje se
- **Otravy bakteriálním toxinem** – zvratky, zbytky jídel

Odběr stolice na bakteriologii

- Pacient stojí (klečí) a opírá se o ruce (lokty) nebo leží.
- Odběrový tampon se **opatrně zavede za anální svěrač**, opatrnou rotací se setře povrch anální sliznice a krypt
- Při správném odběru je **stolice makroskopicky zřetelná** na povrchu tamponu.
- Tampon se vloží do nádobky (zkumavky) určené k transportu, v nádobce s transportním médiem tampon musí být **zanořen hluboko do media**. Nádobka musí být dobře uzavřena.
- Uchovávání a transport probíhají **při pokojové teplotě**, lepší je ovšem doručit vzorek ihned
- Na žádanku je **vhodné uvést adresu pacienta**

Proč adresu?

- V případě nálezu obligátního patogena (salmonela, shigela, kampylobakter, yersinie) je laboratoř **povinna hlásit nález na územně příslušné pracoviště hygieny**, takže jednak musí vědět, na které okresní pracoviště volat, jednak při samotném hlášení je adresa vyžadována, aby mohl být pacient osloven
- Pokud na žádance adresa není, zjistí laboratoř adresu **telefonickým dotazem** (což je ovšem zbytečně zdlouhavé)

Odběr kusové stolice (na parazity, toxin *C. difficile*, případně viry)

- Pro odběr se používá **kontejner s lopatkou, sterilita není striktně vyžadována** (hlavně u parazitů)
- Pacient odebere po defekaci **kousek stolice velikosti lískového ořechu** (ne menší), ne z povrchu stolice, ne tak, aby mohlo dojít ke kontaminaci
- U parazitů nutno vyšetřit **několikrát za sebou, zpravidla se provádí tři dny po sobě**
- Materiál **lze uchovat v lednici**, ale nesmí zmrznout
- Při vyšetření na lamblie je lépe doručit materiál do laboratoře **čerstvý**; je vhodné domluvit s laboratoří čas odběru. U izolace virů nutno uchovávat při 0 °C

Ještě ke stolici na parazity

- Důležité je uvedení tzv. cestovatelské anamnézy, tedy nejen „návrat ze zahraničí“, ale také přesně které oblasti, které pacient navštívil
- Pokud je ve stolici **přítomen makroskopicky přítomen celý parazit** (např. škrkavka), lze poslat přímo tohoto parazita ve zkumavce
- Ovšem pozor, často pacienti tvrdí, že si ve WC míse našli parazita a ve skutečnosti jim do mísy živočich (třeba žížala) spadl např. z okenního parapetu
- Někdy je přesvědčení o přítomnosti parazita ve střevě součástí psychiatrické diagnózy pacienta

Odběr na roupy (Grahamova metoda)

- Odběr se provádí **ráno bez omytí** (samičky roupů přes noc nakladou vajíčka do perianálních řas)
- Před odběrem **průhlednou (!)** lepicí pásku opatrně odlepit z podložního skla, přiložit na anální otvor a řasy v jeho okolí, stisknout hýždě proti sobě, pak zase rozevřít a pásku opatrně přemístit zpátky na sklo
- U dospělých (bolestivost kvůli ochlupení) se použije **odběr stolice** (je ale menší výtěžnost), případně se použije tzv. **Schüffnerova tyčinka**

Diagnostika bakteriálních původců

- **Mikroskopie** nemá praktický význam
- **Kultivace** se provádí na různých půdách (výběr závisí na stáří pacienta a diagnóze, u cestovatelů případně přidáváme i méně obvyklé půdy), nalezené patogeny jsou identifikovány – viz dále
- **Přímý průkaz toxinů A a B (*Clostridium difficile*)** jako antigenu. Průkaz toxinu je důležitější než samotný nálezklostridia nebo nálezkstrukturálního antigenu, na druhou stranu i nálezkantigenu bereme v případě odpovídajících příznaků vážně (více viz P07)

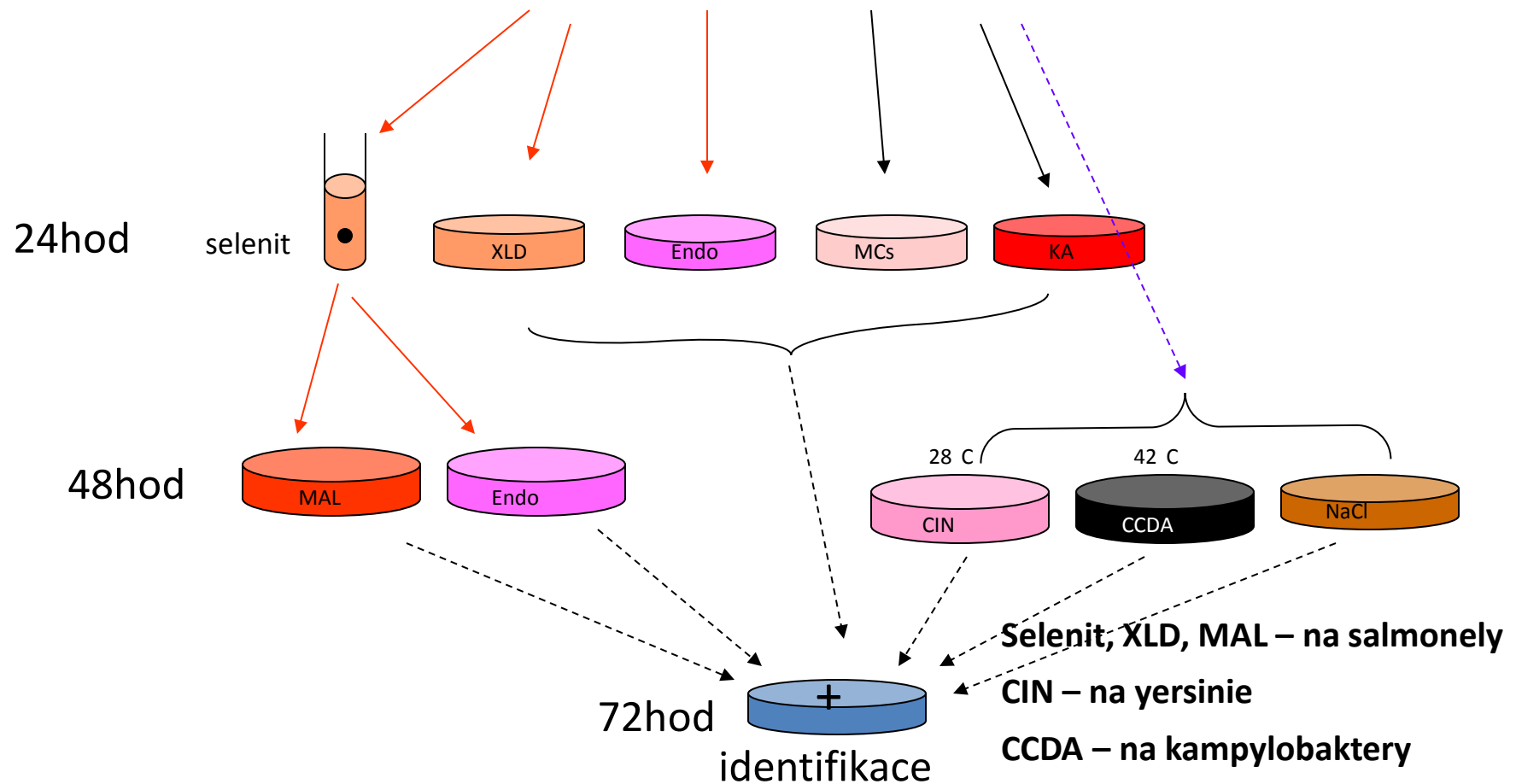
Diagnostika virových původců: většinou průkaz antigenu, případně virové nukleové kyseliny.

Diagnostika parazitárních a houbových původců: vizte speciální téma věnované této problematice



Kultivace stolice

Den 0. (přijatá stolice)



Negativní výsledek je za 48h

Pozitivní za 72h a déle

*Není-li uvedeno jinak, kultivace probíhá při 37 C

MCS – na některé STEC
Endo – na různé enterobakterie
KA – na některé další bakterie

Identifikace bakterie

Bakterie **kultivujeme na různých půdách**, po kultivaci je odečítáme s tím, že

- U Endovy půdy se snažíme indentifikovat součásti běžné flóry (zpravidla E. coli) a možné patogeny
- U ostatních půd zapisujeme pouze jako
 - „suspektní“ – podobné pozitivní kontrole, nutná další diagnostika
 - „negativní“ – nejen v případě, že na půdě nic neroste, ale také pokud se bakterie nepodobají kontrole

Bakterie dále identifikujeme, zpravidla **biochemickými testy nebo jinak (např. MALDI-TOF)**

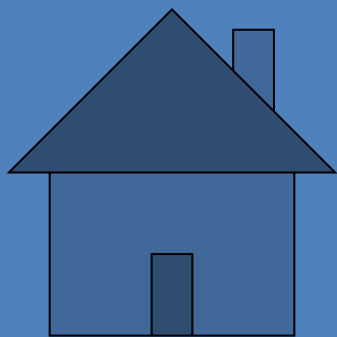
V některých případech (salmonely, escherichie u malých dětí) je žádoucí **antigenní analýza vypěstovaného kmene**

Interpretace vyšetření stolice

- U výsledků vyšetření stolice je nutno rozlišovat, zda jde o **primární patogeny** (salmonely, shigely, yersinie, kampylobaktery) nebo jen **podmíněné patogeny**; u některých podmíněných patogenů (především u *Escherichia coli*) je velmi žádoucí bližší určení (EPEC, STEC, EAaggEC a další)
- Interpretace se musí dít **v kontextu klinických příznaků** (při masivním nálezů tzv. nepatogenních améb a zároveň výrazných potížích může být vhodné přeléčení)
- V případě infekce *Clostridium difficile* je důležité, zda je pozitivní **klostridiový toxin**. Samotný nález klostridiového antigenu nebo kultivační nález klostridia mnoho neznamena.

Zpět na
hlavní obsah

Konec



BIOFILM

Na úvod

My jsme skvělá flóra běžná
k našemu člověku něžná
osídlíme povrchy
čiháme tu na mrchy

Scházíme se každý pátek
za účelem tvorby látek
z kterých vzniká biofilm
pevnější než dub i jilm!

(Píseň běžné flóry, in: O. Zahradníček – Advent v dutině ústní. Zkráceno)

Přehled témat

Klinické případy spojené s biofilmem

Základní charakteristika biofilmu

Diagnostické a experimentální metody u biofilmu

Bonus: Více o biofilmu

Klinické případy spojené s biofilmem

Příběh první (tentokrát skutečný)

- Muž, 58 let, v roce 2001 zaveden kardiostimulátor, v roce 2002 opakovaně hospitalizován na interním oddělení s **teplotami nejasné etiologie**, vzestup zánětlivých markerů
- V **hemokulturách** prokázán *S. epidermidis* s velmi dobrou citlivostí
- Několikrát dlouhodobě přeléčován **vysokými dávkami antibiotik v kombinacích** (oxacilin, gentamicin, rifampicin, cefazolin, cefalotin, klindamycin)

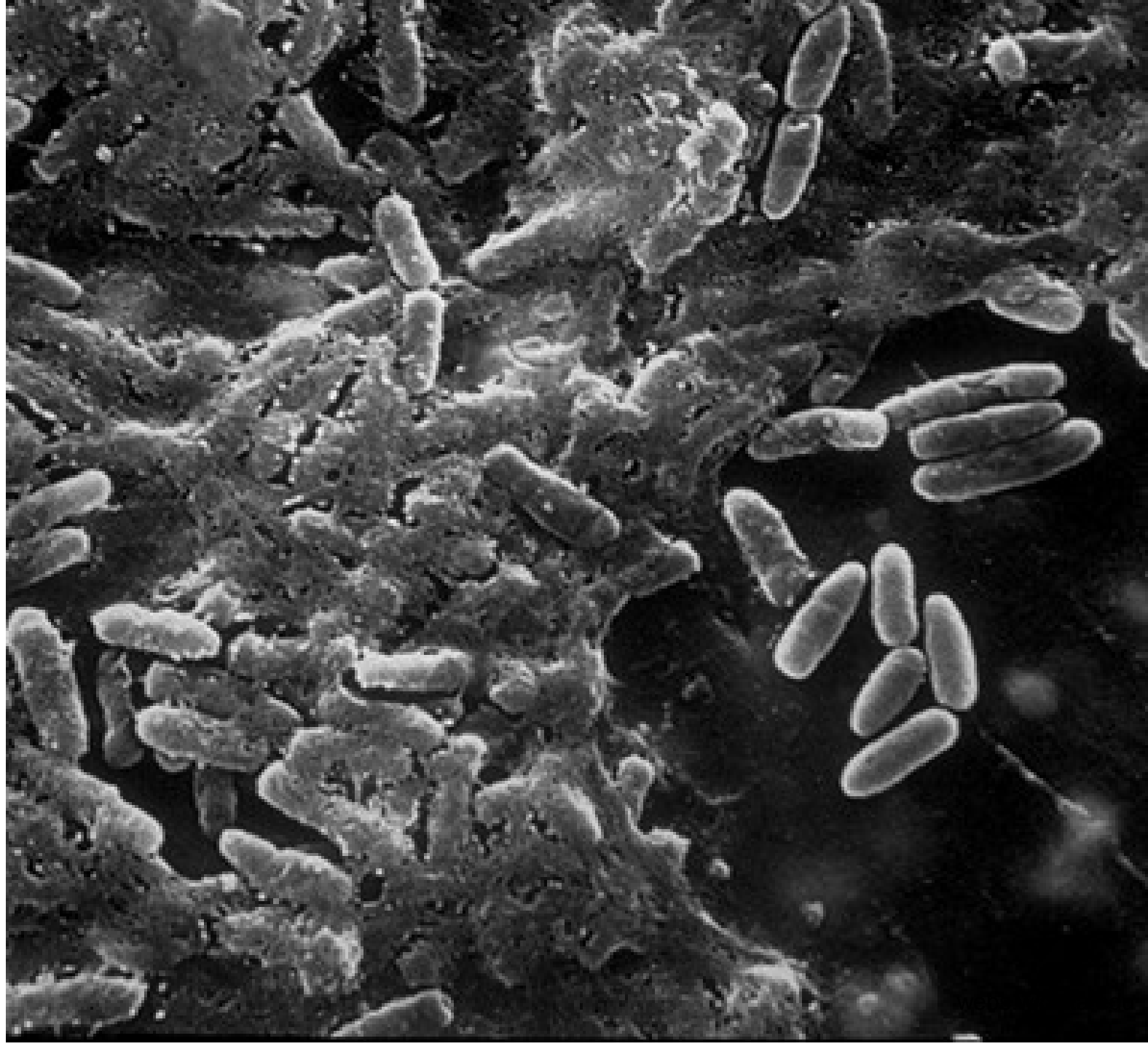
Příběh – pokračování

- Zpočátku vždy dobrá odezva, poté se objevují **ataky teplot i v průběhu terapie**.
- Při transesofageálním vyšetření **nález vegetace na komorové elektrodě** o velikosti $1,5 \times 1,5$ cm.
- Kardiologové opakovaně **odmítají odstranění kardiostimulátoru**. Nasazena kombinace antibiotik **oxacilin + gentamicin + rifampicin**, pacient v dobrém klinickém stavu.
- Znovu však dochází k **vzestupu teplot a zvýšení CRP**. Nasazena terapie **vankomycin + rifampicin**, po zlepšení stavu je pacientovi **odstraněn trombus a vyměněna elektroda** (pod clonou ATB), to vede k celkovému zlepšení stavu pacienta.

Viníkem byl biofilm

- Neúspěch zvolené ATB terapie byl zapříčiněn tím, že **nebyla brána v úvahu vysoká rezistence mikroba rostoucího ve formě biofilmu** vůči těmto antibiotikům.
- Léčba nebyla od samého začátku dostatečně razantní a **nedošlo k eradikaci ložiska biofilmu**.
- Teprve **odstranění elektrody** (pod clonou ATB) došlo ke **zlepšení stavu pacienta**.

Katetrový biofilm



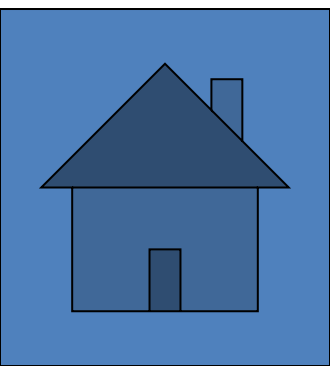
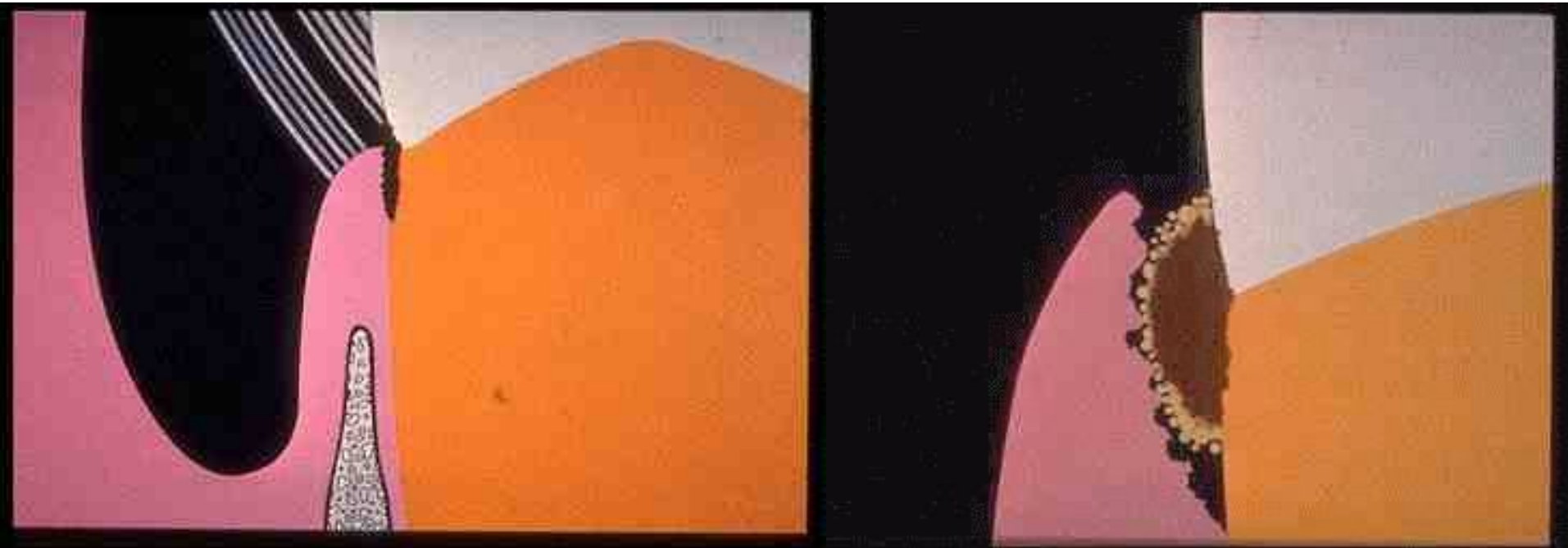
Příběh druhý

- Michal byl **13letý kluk**. Nenáviděl rodiče a rozhodl se udělat cokoli, co bude proti nim..
- Rozhodl se, že jedna z metod boje s rodiči by mohla být blokáda všeho, co po něm rodiče chtějí.
- A tak si **přestal čistit zuby**, udržovat pořádek ve svém pokoji a dělat některé další podobné věci.
- Brzy ho ale začaly **bolet zuby**. Musel k zubaři, který konstatoval **těžký zubní kaz**. Zubařka mu zuby spravila, ale také nemilosrdně trvala na tom, že si musí začít zuby zase čistit, jinak že bude mít problémy znova – ne jen s ní (a ostatními z generace „vraťte-se-do-hrobu“), ale hlavně s vlastními zuby.

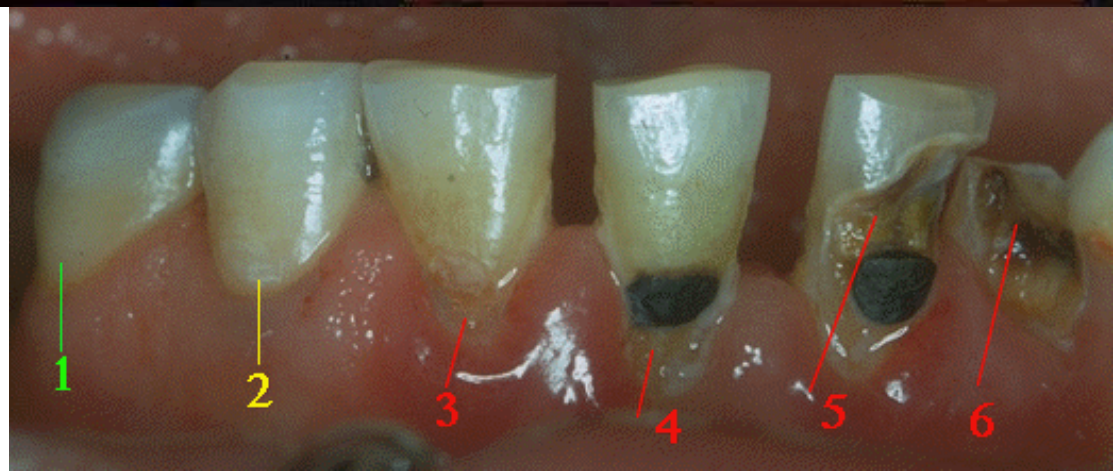
Zločincem byl

- ...opět přerostlý biofilm.
- **V ústní dutině je biofilm normální.** Je dokonce užitečný: normální ústní flóra se organizována ve formě biofilmu, a tak se může bránit vnějším vlivům včetně patogenních agens
- Nicméně **příliš přerostlý biofilm** (jako výsledek příliš velkého množství zkonsumovaných cukrů a příliš malého čištění zubů) způsobuje, že biofilm se stává **nepřítelem, místo aby byl přítelem** pacienta.

Biofilm utekl zubnímu kartáčku a stává se zdrojem kazu



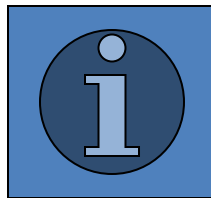
3× webs.wichita.edu



**Základní
charakteristika
biofilmu**

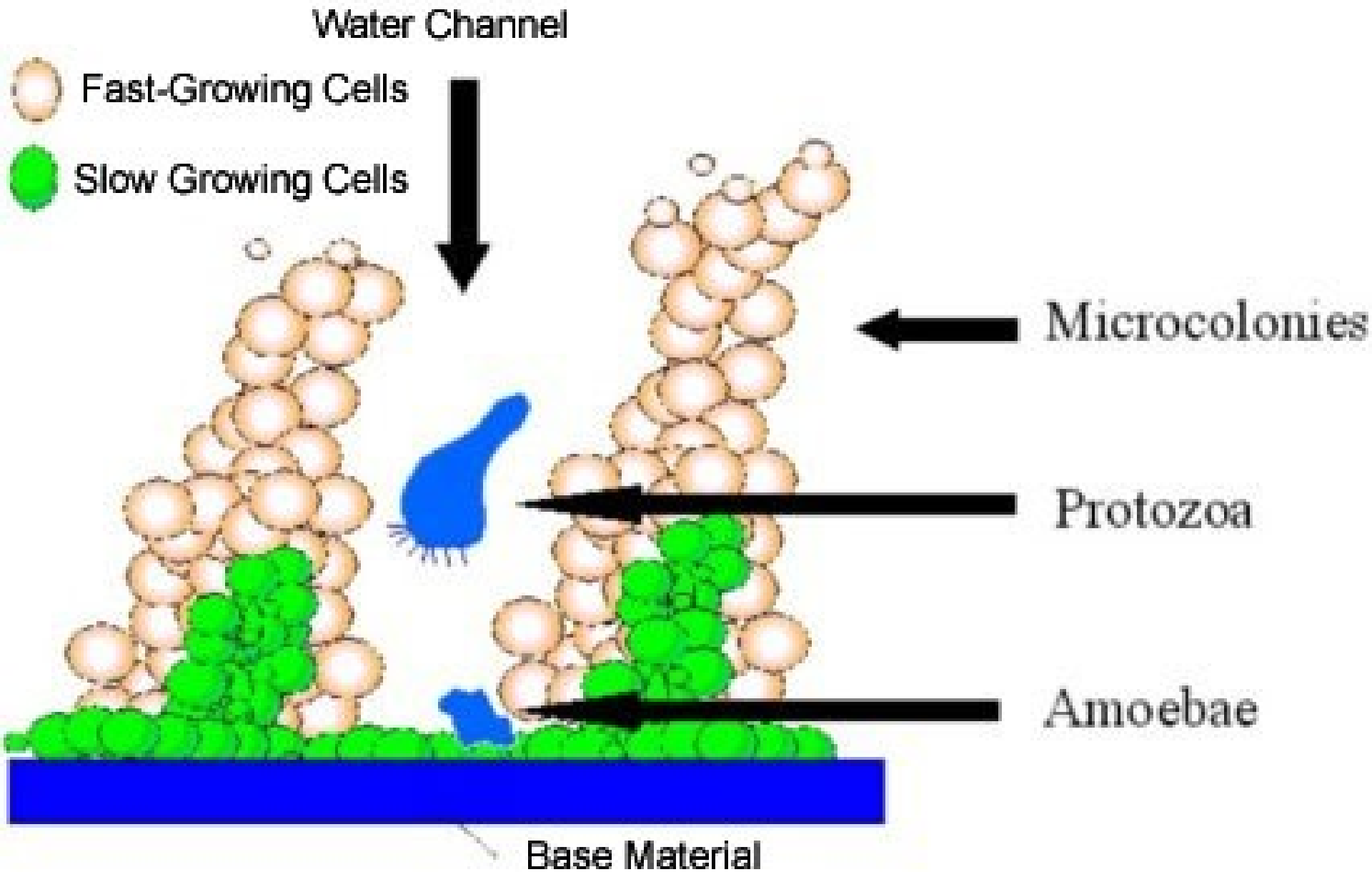
Biofilm: co je to?

- Biofilm je **komplexní, organizovaná struktura**
- Skládá se z **živých buněk** (většinou bakterií), **hmot** jimi produkovaných (většinou polysacharidů) a **kanálků**
- Není přítomen jen v živých organismech, ale i **v prostředí**. Například kámen, na které jsme uklouzli v létě v řece či rybníku, byl asi pokryt biofilmem. Biofilm je významný i například v potravinářství

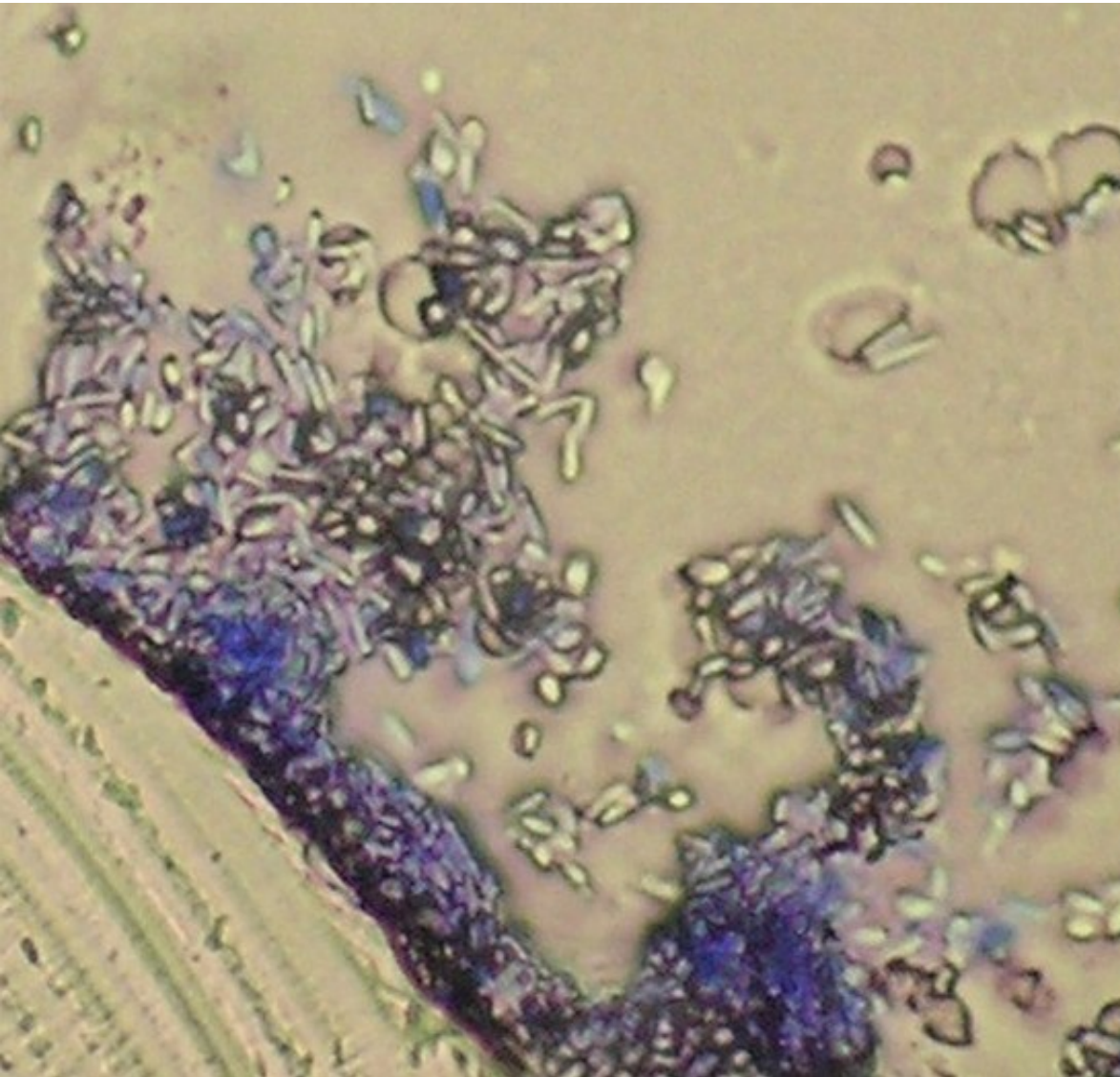


Biofilm v řece

www.sbs.soton.ac.uk

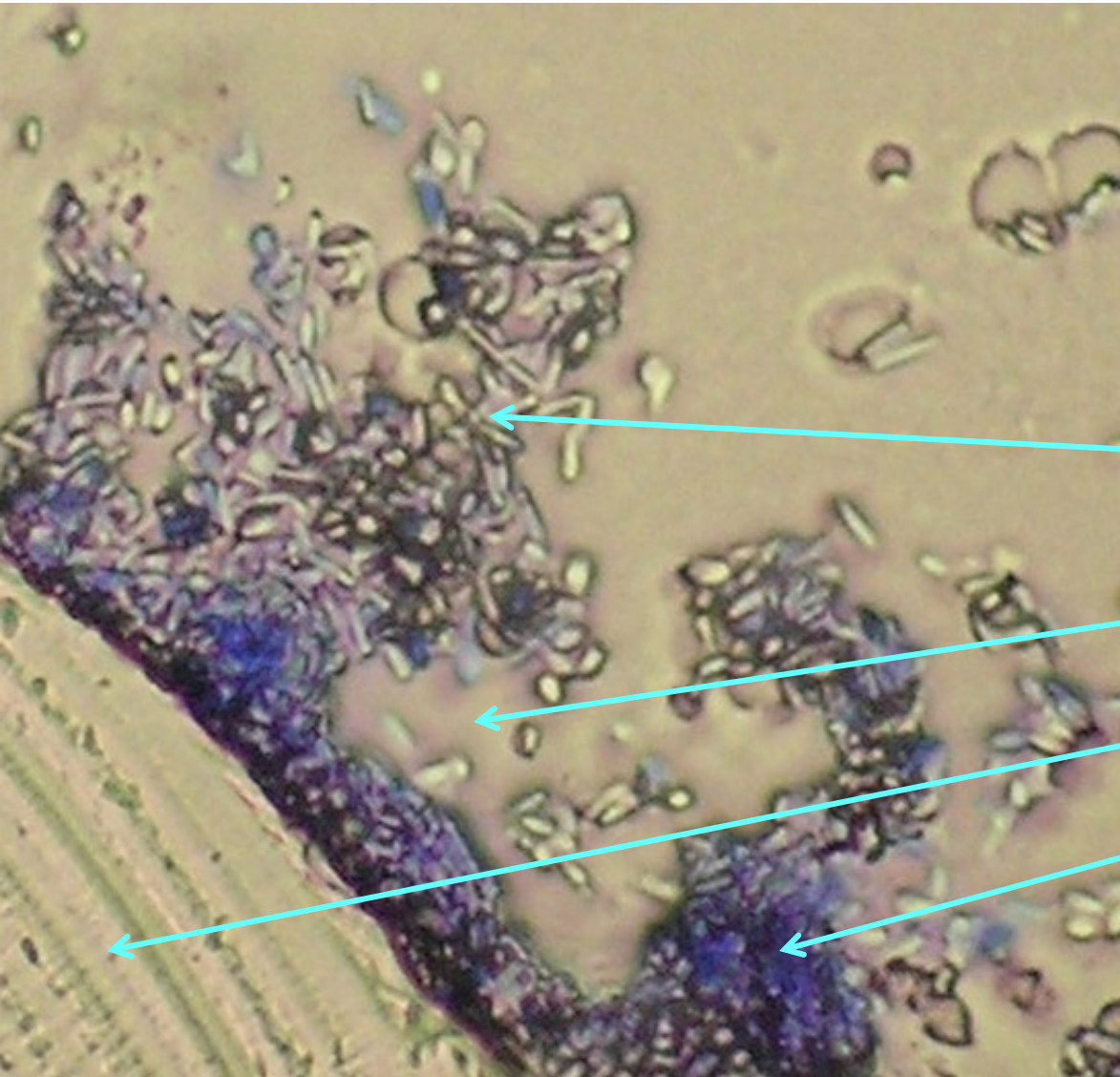


Různé obrázky biofilmu



Biofilm na katetru

Různé obrázky biofilmu



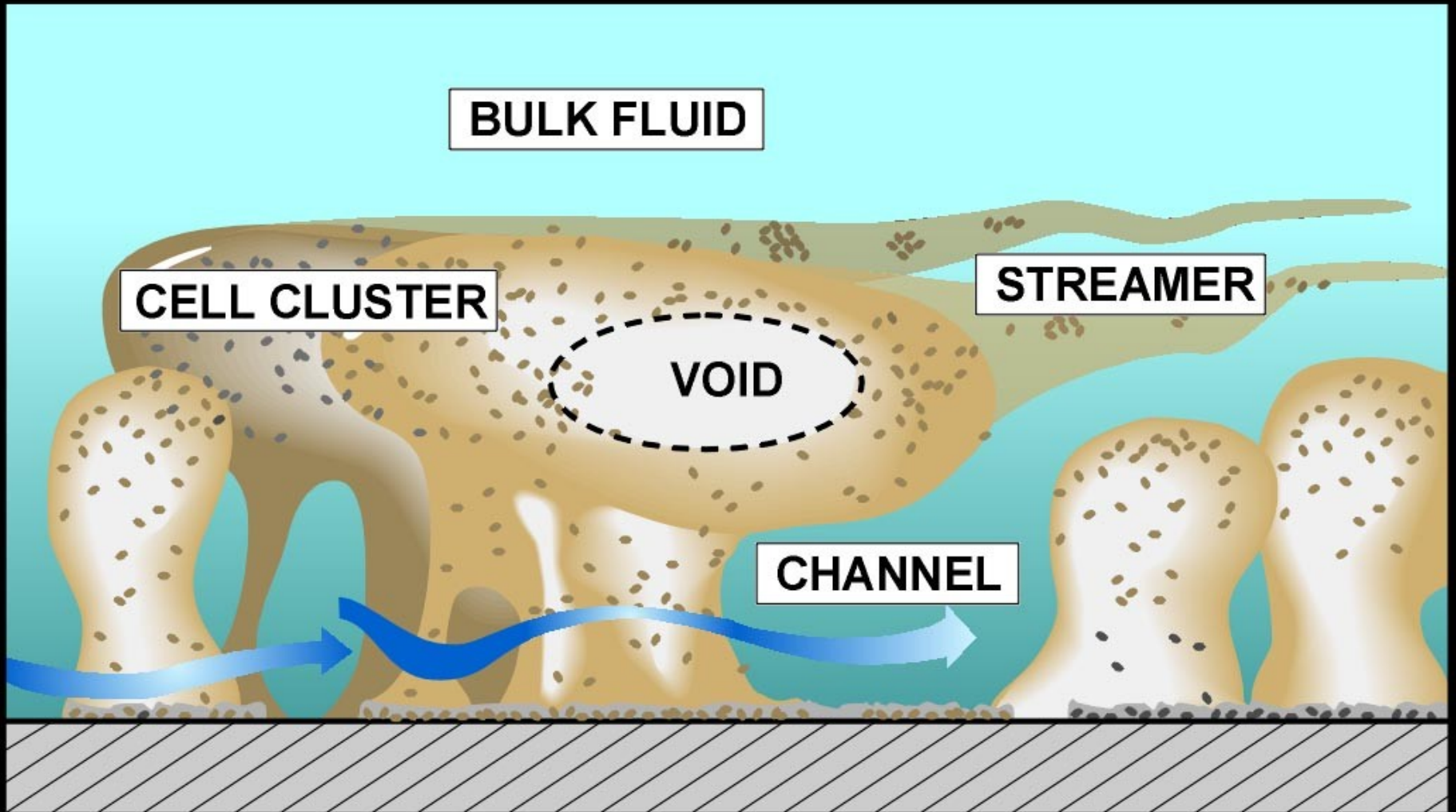
Biofilm na katetru

Bakterie




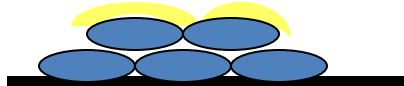

Kanálek

Katetr

Polysacharidy

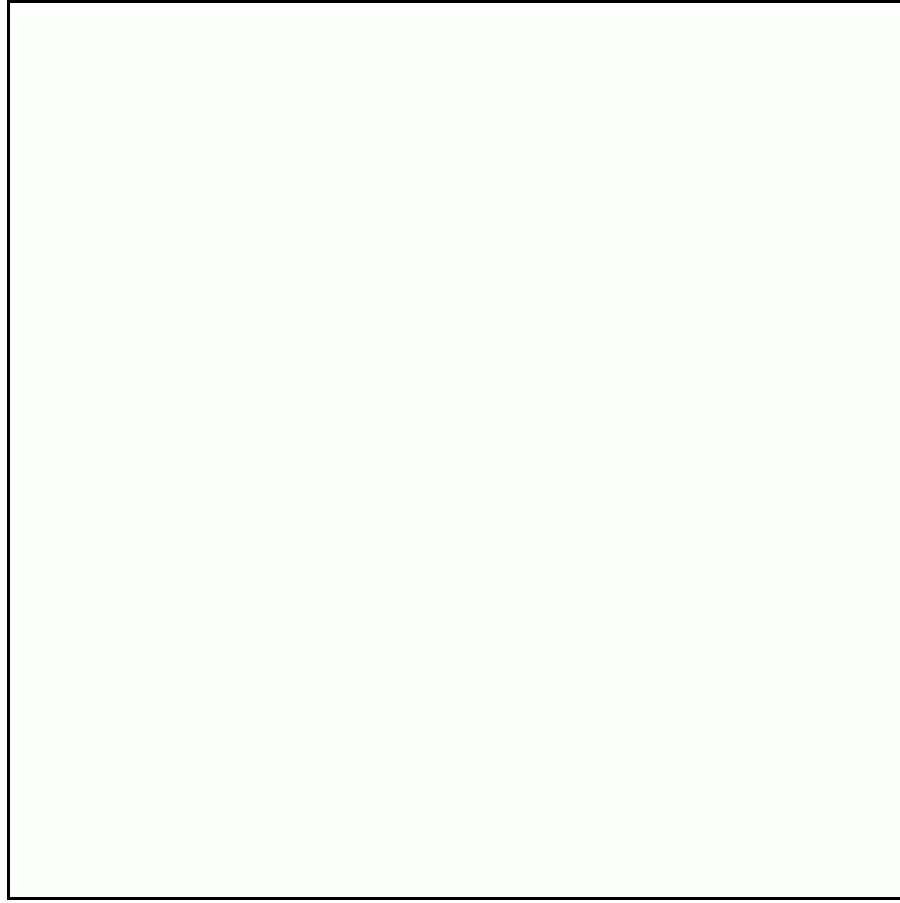
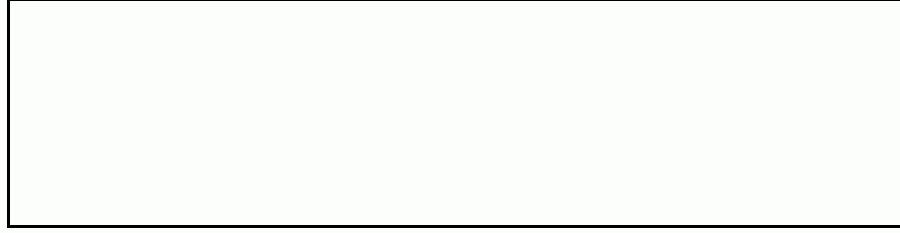


Vznik biofilmu

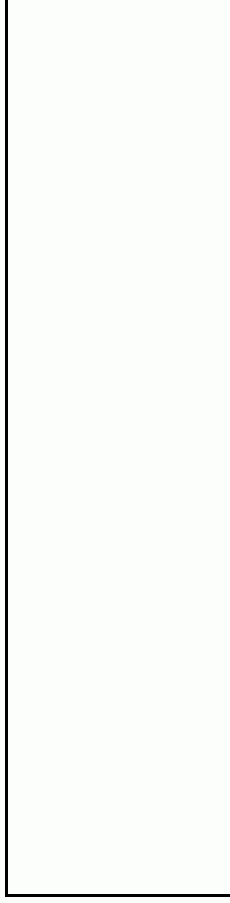
- Na začátku je **pevný povrch a plovoucí bakterie** 
- Bakterie **adheruje** na povrch 
- Následuje **agregace** dalších bakterií 
- Bakterie začnou produkovat **polysacharidovou matrix** 
- Až vznikne **třídímenzionální struktura zvaná biofilm** 

Biofilm může být **jedno- či vícedruhový**

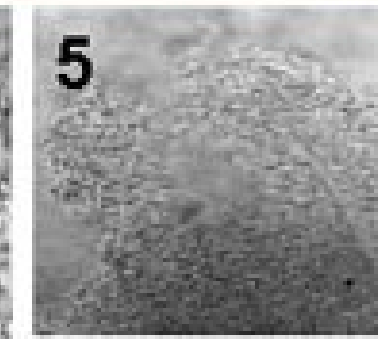
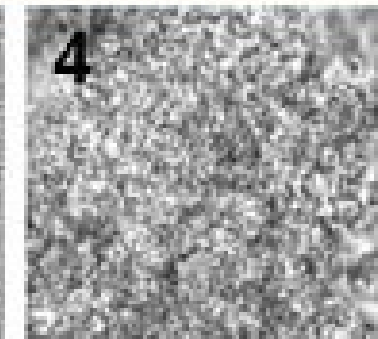
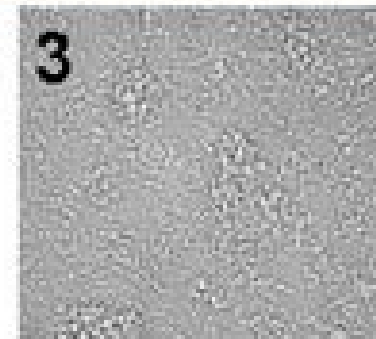
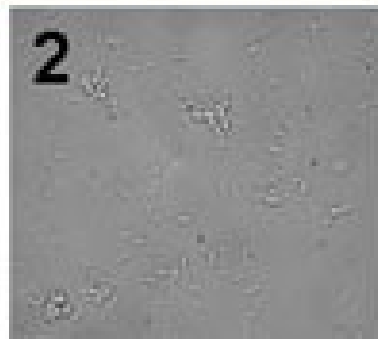
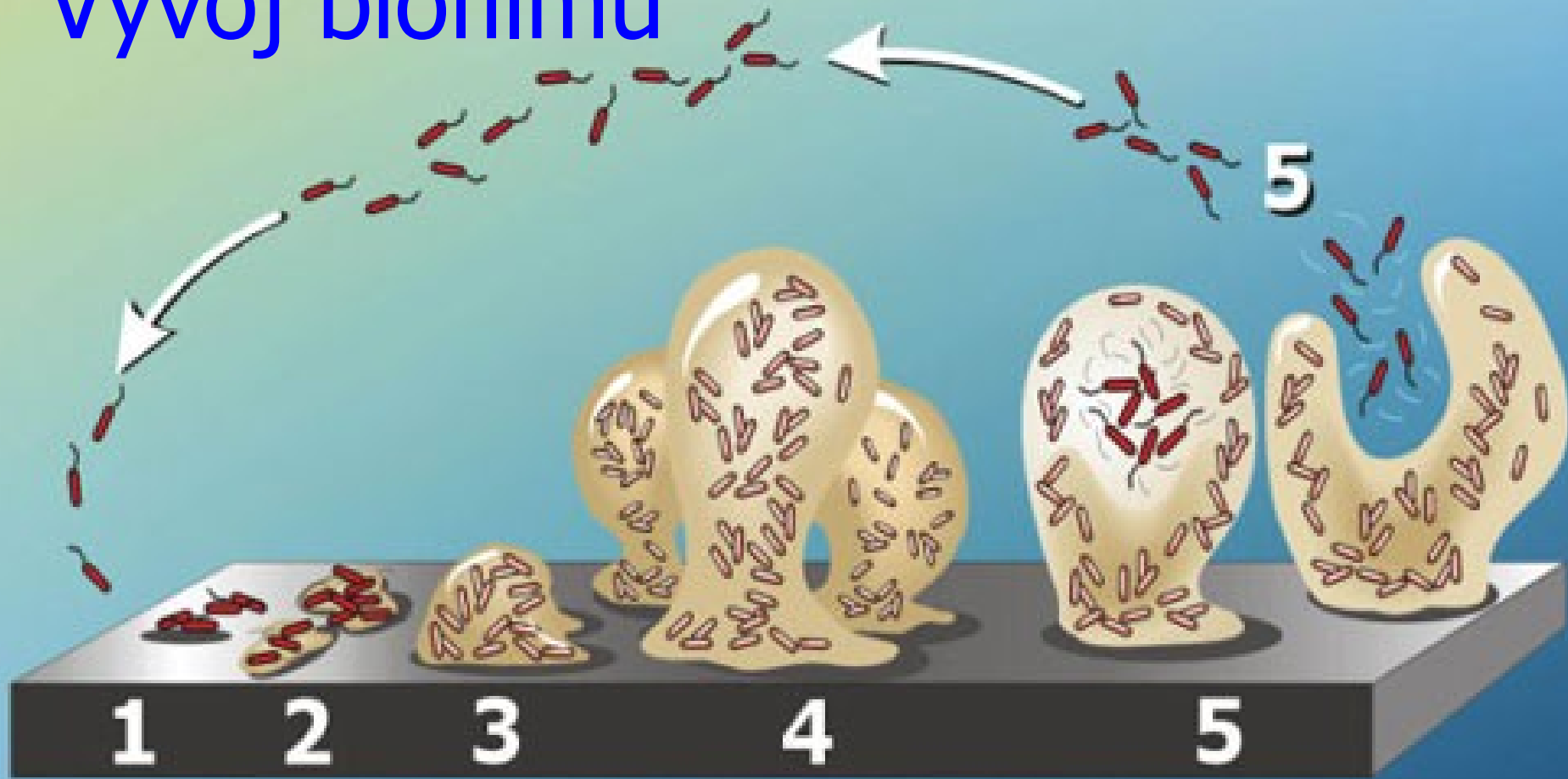
Vznik biofilmu v časovém sledu



0 h



Vývoj biofilmu



Vývoj biofilmu, jiné schema

webs.wichita.edu

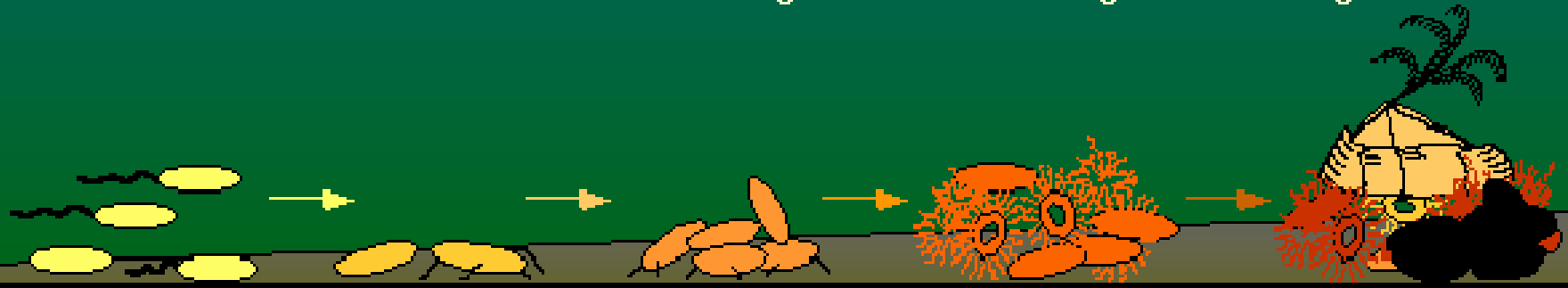
REVERSIBLE
ADSORPTION
OF BACTERIA
(sec.)

IRREVERSIBLE
ATTACHMENT
OF BACTERIA
(sec.-min.)

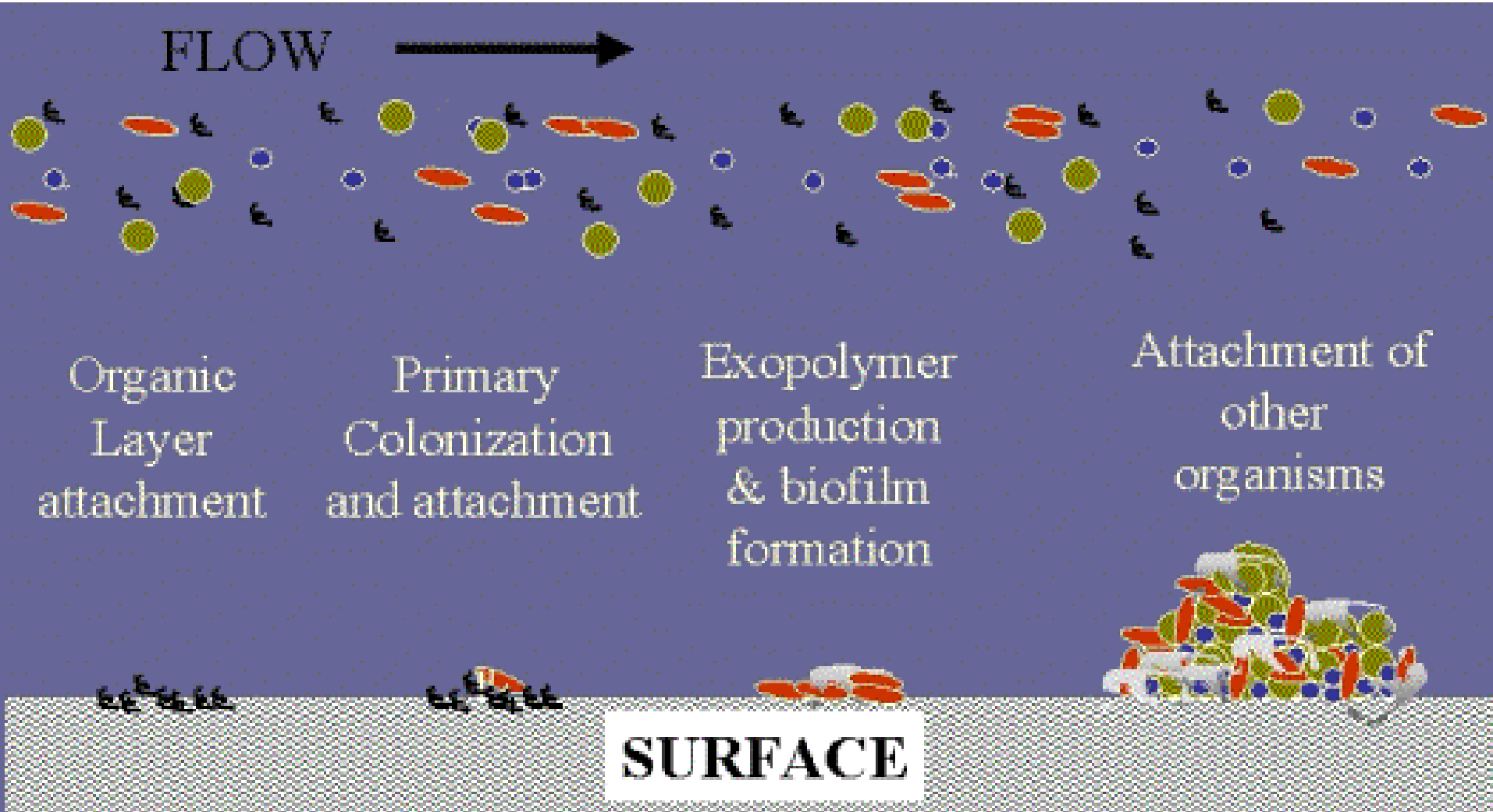
GROWTH &
DIVISION
OF
BACTERIA
(hrs.-days)

EXOPOLYMER
PRODUCTION
& BIOFILM
FORMATION
(hrs.-days)

ATTACHMENT
OF OTHER
ORGANISMS TO
BIOFILM
(days-months)



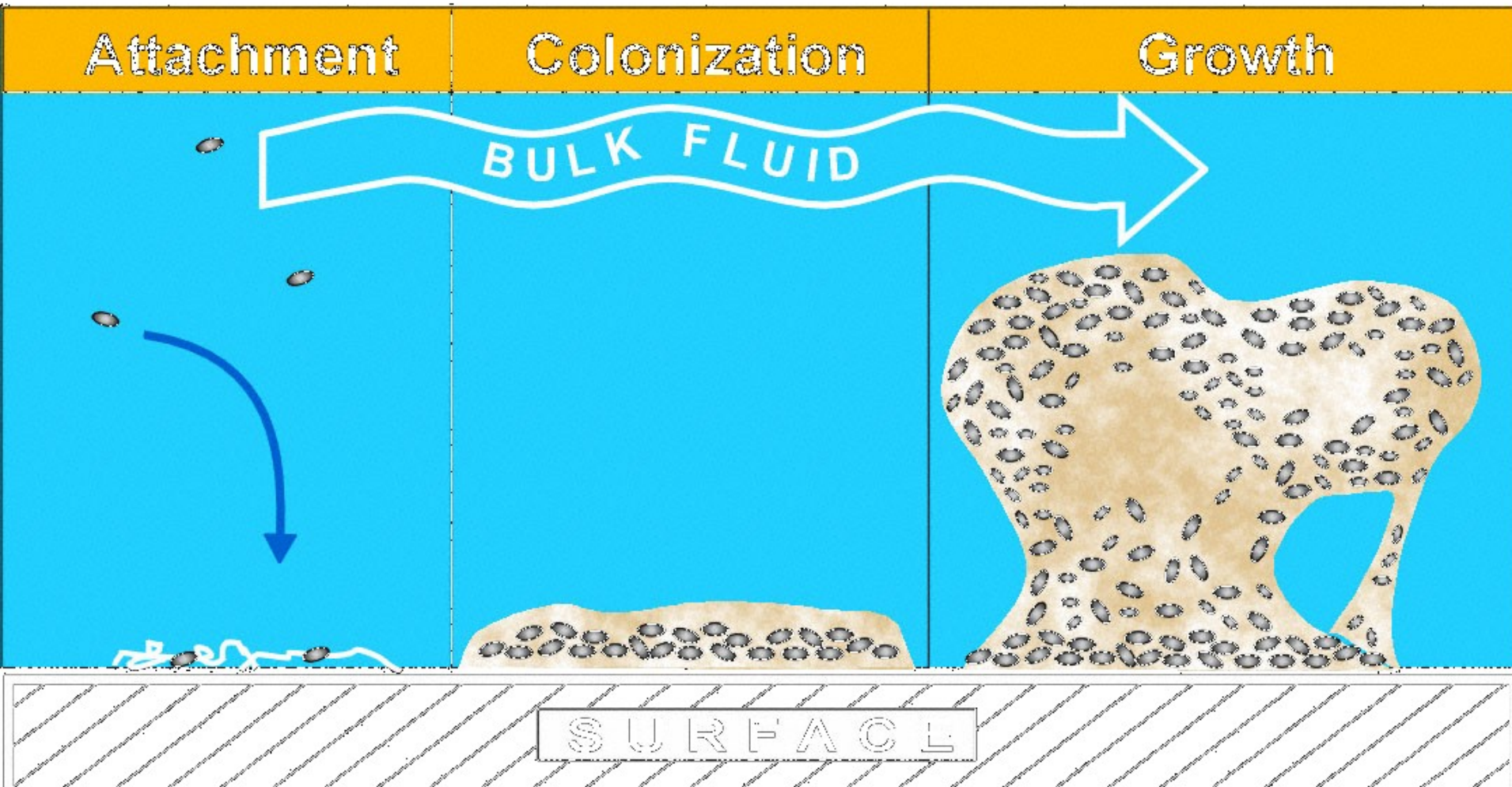
Vývoj biofilmu



Vývoj biofilmu, jiné schema

www.uweb.engr.washington.edu

Biofilm formation:



Význam tvorby biofilmu u bakterií

Bakterie mohou **lépe regulovat početnost populace** – v rámci biofilmu se totiž informují produkcí určitých látek (tzv. quorum sensing)

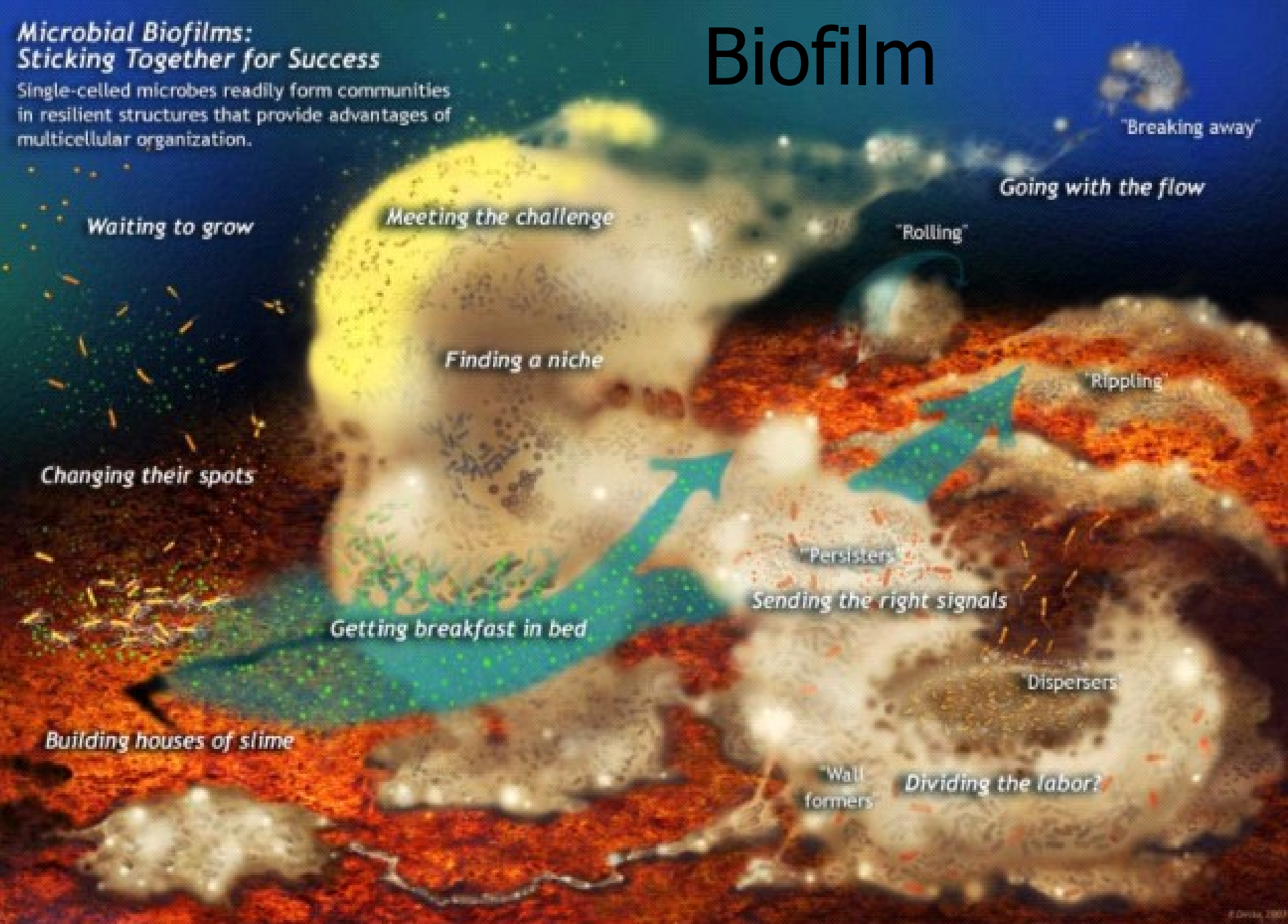
Bakterie se stávají **odolnější vůči vnějším vlivům, např.:**

- desinfekčním prostředkům
 - antibiotikům
 - imunitní reakci hostitele
-
- *Biofilm tvoří jak bakterie běžné flóry (z hlediska organismu spíše pozitivní), tak i patogeny.*

Biofilm

Microbial Biofilms: Sticking Together for Success

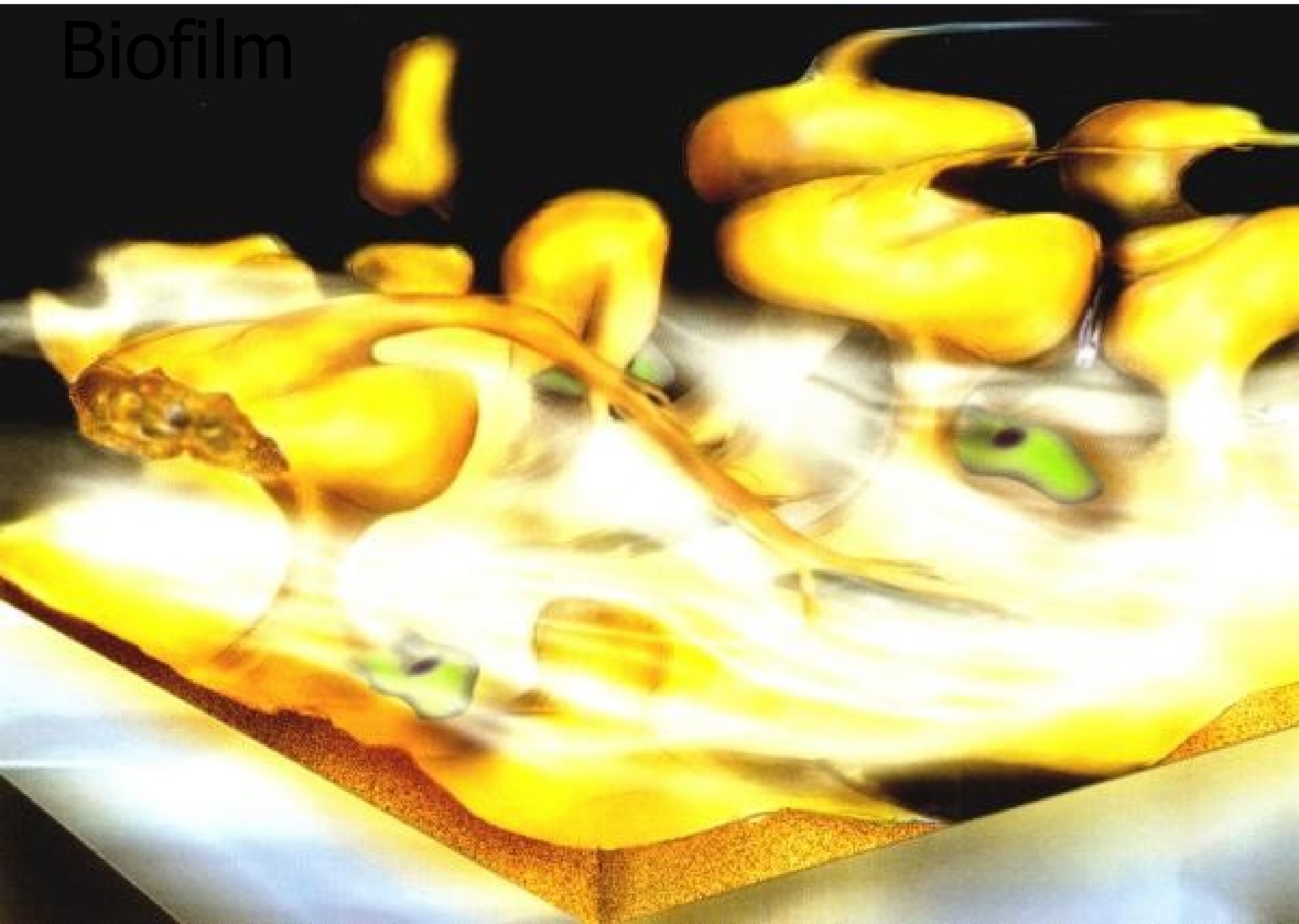
Single-celled microbes readily form communities in resilient structures that provide advantages of multicellular organization.



Mechanismy ovlivňující rezistenci k antibiotikům

- Vliv **povrchového náboje**
- Snížení **růstové rychlosti**
- **Penetrační bariéra**
- Nehomogenní matrix
- **Fenotypové odlišnosti**
- **Intercelulární signalizace**
- **Imunitní mechanismy...**

Biofilm

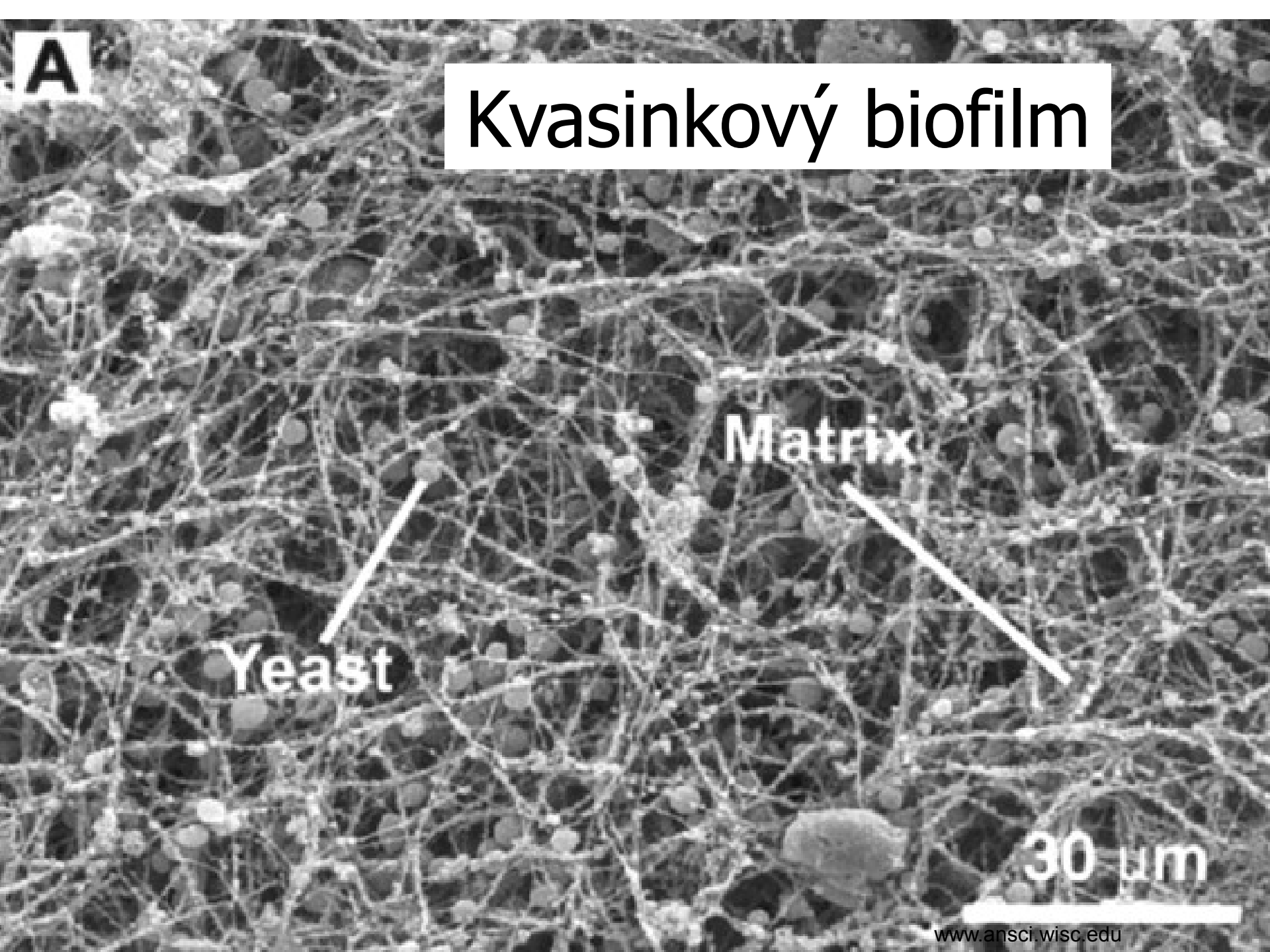


Eradikace biofilmu

- **Antibiotická léčba často potlačí pouze symptomy** infekce způsobené buňkami uvolněnými z matrix biofilmu a jejich interakcí s imunitním systémem, buňky uložené v matrix biofilmu není schopna zasáhnout.
- K **eradikaci biofilmu** je možno využít vysokých koncentrací ATB či jejich kombinací (např. ATB zátka katétru), **pokud léčba selhává, je nutno vyjmout ložisko biofilmu**
- V budoucnu se určitě budeme pokoušet přímo rozbít biofilm, například pomocí enzymoterapie

A

Kvasinkový biofilm



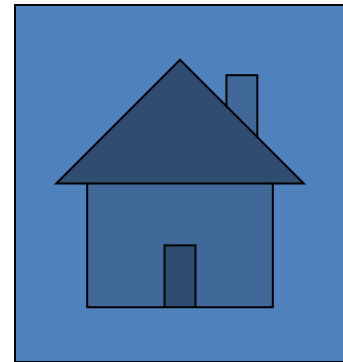
Yeast

Matrix

30 μ m

Prevence

- Katétry a kostní cementy
 - vyrobené z **nové generace plastů** (snížení rizika adheze a tvorby biofilmu)
 - s **koloidním stříbrem** a dalšími povrchově aktivními látkami
 - s **antimikrobiálními substancemi**, např.
 - minocyklin
 - rifampicin
- Proplachy katétrů
- Dodržování pravidel asepse, správné dekontaminační postupy apod.



Diagnostické a experimentální metody u biofilmu

Biofilm a mikrobiologická diagnostika

a) Průkaz biofilmu

aa) fenotypovými metodami (Christensenova metoda, Kultivace na agaru s kongo červení)



Foto: Archiv Veroniky Holé



ab) genotypovými metodami

b) Stanovení **citlivosti bakterií** v biofilmu k jednotlivým antibiotikům (MBEC)

c) **Zohlednění tvorby biofilmu** při běžné bakteriologické diagnostice: např. při kultivaci žilních katetrů se volí specifické metody (viz dále) namísto klasického pomnožení v bujónu

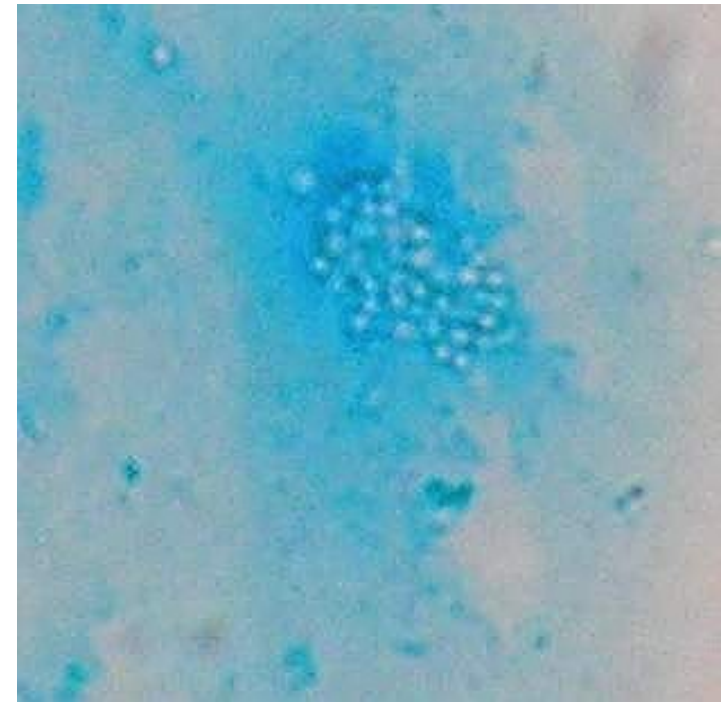
Mikroskopie orálního biofilmu

Vedle oficiálních metod pro průkaz biofilmu existují i další možnosti, jak zviditelnit biofilm.

V případě orálního biofilmu:

- **Gramovo barvení** umožňuje pozorovat shluky bakterií (G+ i G-) a případně buňky makroorganismu (epitelie apod.). Polysacharidové hmoty zůstávají nezbarvené.

- **Barvení alciánovou modří** naopak umožňuje i znázornění polysacharidového materiálu, tj. nebuněčné části biofilmu, buňky jsou zde znázorněny negativním barvením



Průkaz vlivu čištění zubů na orální biofilm

Foto: Archiv Veroniky Holé



- Dobrovolník má připravený jodový roztok či tablety s barvivem barvícím zubní plak.



- Roztok se nechá působit v dutině ústní cca 2 min.

Foto: Archiv Veroniky Holé

Kultivace bakterií tvořících biofilm

- **Pokud bakterie tvoří biofilm, je doporučeno použít před vlastní kultivací materiálu speciální postupy**
- V případě kultivace centrálního venózního katétru s předpokládanou kolonizací existují dvě metody. Obě jsou výhodnější než klasická kultivace v bujónu, sonifikace je však ještě o něco lepší než Makiho metoda

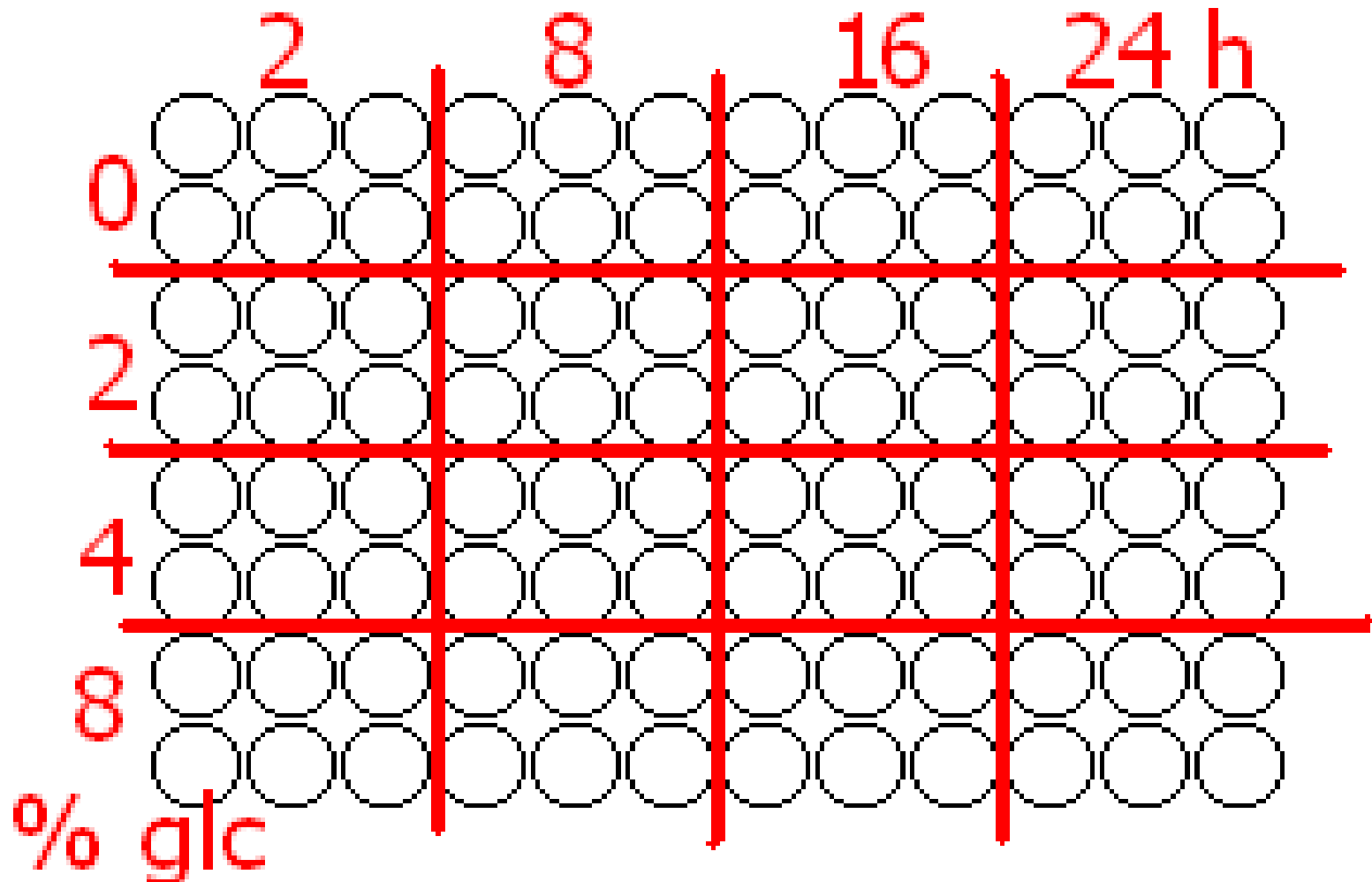
Možnosti

- **Klasická kultivace v bujonu:** *Uvolní se bakterie v planktonické formě. Bakterie ve formě biofilmu se uvolní málo nebo vůbec. Vzhledem k použití bujónu jako pomnožovací půdy nevíme nic o kvantitě (kontaminace × infekce).*
- **Semikvantitativní metoda:** Umožňuje nám zmapovat povrch katétru a semikvantitativně posoudit nález, nevypovídá však o bakteriích v lumen a bakterie se nemusí uvolnit z biofilmu.
- **Sonifikace:** rozrušuje biofilm na povrchu i v lumen katétru. Vyočkování určitého objemu vzorku je kvantitativní metoda, takže dává možnost posoudit množství mikrobů.

Průkaz vlivu přítomnosti sacharidů na tvorbu zubního plaku

- Princip pokusu je jednoduchý. Na plastovém důlku (který imituje povrch zubu) je kultivována jedna z ústních bakterií při **různých koncentracích glukózy a po různě dlouhé časové úseky**
- Vzniklý biofilm je poté vizualizován **genciánovou violetí** a jeho intenzita je **kvantifikována ve formě absorbance** pomocí spektrofotometru

Abby se zabývá manuálně namíchané emulze,
má vždy šest sousedních důlků
stejně hodnoty koncentrace glc i



Staré a nové zkratky pro určování účinnosti antibiotik

MIC – minimální inhibiční koncentrace je pojem, který se u antibiotik používá pro označení meze růstu (množení) mikroba

MBC – minimální baktericidní koncentrace se používá pro mez přežití bakterie. U virů by se použil pojem „minimální virucidní“ a podobně.

MBIC – minimální biofilm inhibující koncentrace

MBEC – minimální biofilm eradikující koncentrace

Diagnostické možnosti

– stanovení

MBEC

MBEC ... minimální biofilm eradikující koncentrace

*(Existuje také hodnota: **MBIC** ... minimální biofilm inhibující koncentrace – hodnota nepodporovaná všemi vědci)*

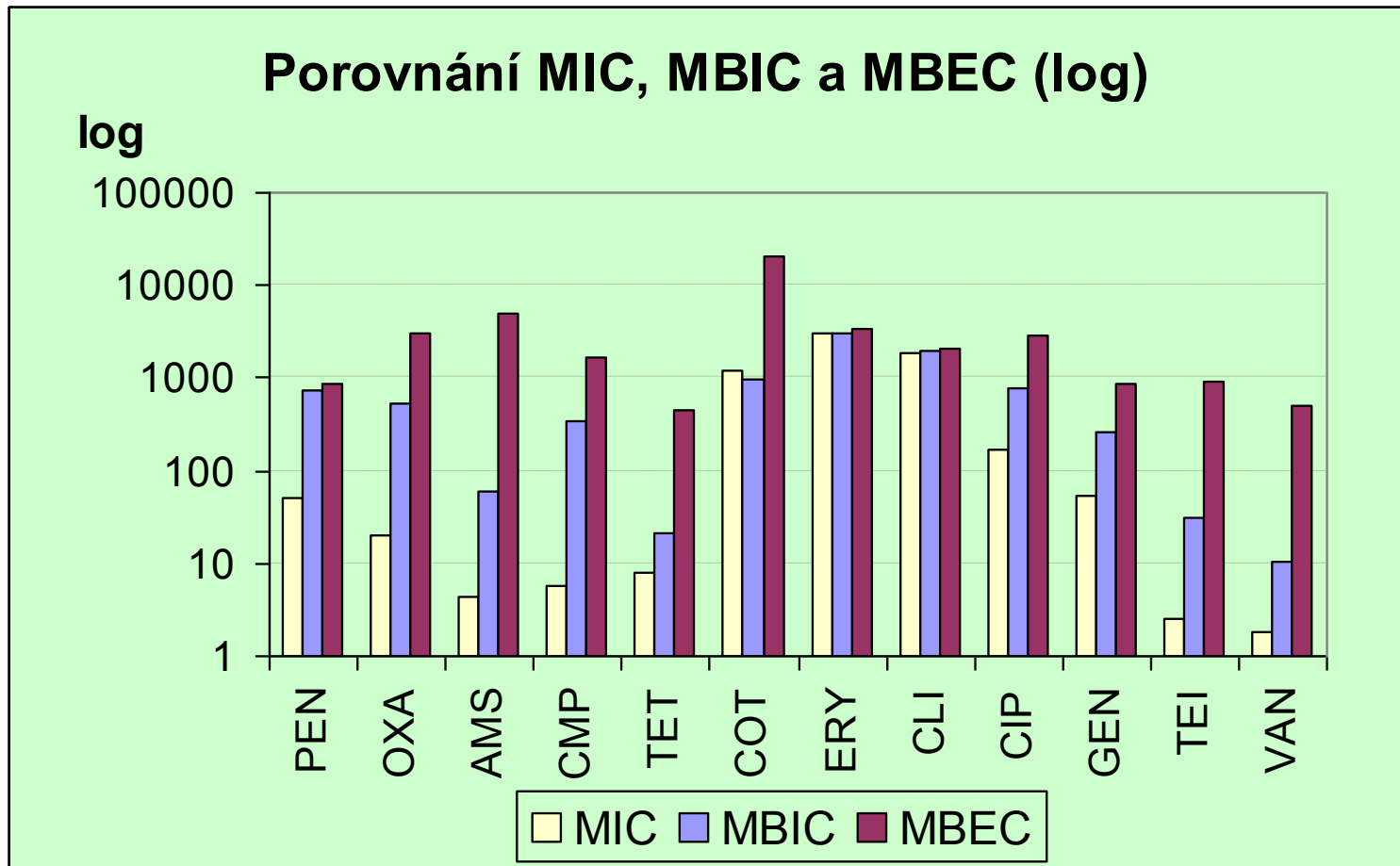


MIC versus MBEC



- Zatímco MIC je metoda určující minimální inhibiční koncentraci ATB u planktonické formy, MBEC zjistí eradikaci bakteriálního biofilmu. Vypovídá tedy lépe o skutečném účinku antibiotika na bakterie žijící ve formě biofilmu.
- MBEC odpovídá **nejnižší koncentraci antibiotika, kde ještě prokážeme eradikaci biofilmu** (nepřítomnost živých buněk, nedochází ke změně pH média, důlek tedy zůstává červený)

Rozdíly v MIC, MBIC a MBEC



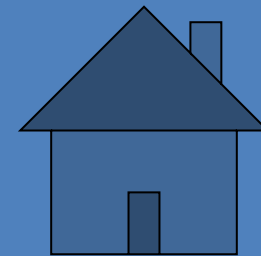
Zkratky antibiotik: pen – penicilin, oxa – oxacilin, ams – ampicilin/sulbactam, cmp – chloramfenikol, tet – tetracyklin, cot – kotrimoxazol, ery – erytromycin, cli – clindamycin, cip – ciprofloxacin, gen – gentamicin, tei – teikoplanin, van – vankomycin

Diagnostické možnosti II.

- Hodnoty **MBEC** leží často **nad break pointem** pro daná antibiotika (bakterie jsou k nim rezistentní)
- Hodnoty **MBEC** jsou také zpravidla **několikanásobně vyšší** než MIC
- Mikroby v biofilmu jsou zpravidla rezistentní i ke **kombinacím antibiotik**, jedinou možností potom zůstává vyjmutí biofilmového ložiska (katétru, ale i kloubních náhrad, zubních implantátů apod.)

Konec

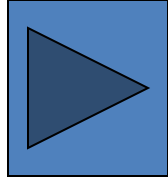
Zpět na
hlavní obsah



Prezentace byla vytvořena
ve spolupráci ing.
Veroniky Holé, PhD.,
MUDr. Lenky
Černohorské, PhD., a
MUDr. Ondřeje
Zahradníčka

(Studentka K. C.
před několika
lety zapomněla
index, takže
zápočet pak
dostala v
hospodě 😊)

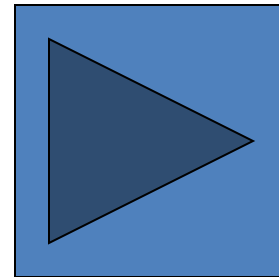
Bonus: více o biofilmu



Kde všude působí biofilm problémy

- **biofilm vzniklý na umělých površích v organismu** člověka i zvířete (katetry, implantáty a podobně)
- méně často **biofilm na přirozených površích** (zde si s tím organismus spíše poradí), ale i zde mohou být komplikace (zubní plak člověka, biofilm v žlázovém epitelu vemene u krávy)
- a samozřejmě také **biofilm na různých površích či v potrubních systémech mimo organismy**, zejména ve vodárenství a potravinářství

Materiály a místa



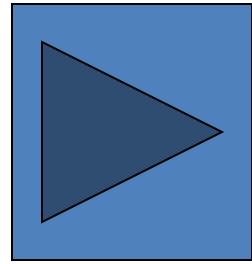
Na čem se tvoří:

- **nerez**
- **hliník**
- **sklo**
- **teflonu**
- **guma**
- **plasty**

Nejčastější výskyt:

- mrtvá místa
výrobního zařízení
- **ventily**
- **klouby**
- **těsnění**
- **apod.**

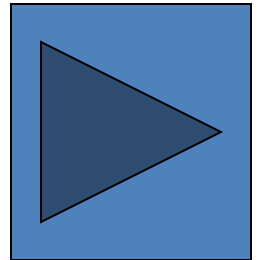
Jaké jsou možné problémy u průmyslových biofilmů



- **zdroj křížových, postpasteračních a poststerilačních kontaminací** → znehodnocení potravinářských produktů, kažení potravin, popř. přenos nálezů potravinami
- **korozí kovových částí zařízení**
- **turbulence protékajících tekutých materiálů** v průtokových trubkách
- **snížení účinnosti a energetické ztráty** v důsledku tvorby tepelné izolační vrstvy ve výměnících tepla

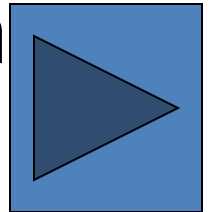
Biofilm jako zdroj dalšího šíření

- Poté, co se biofilm vytvoří, **uvolňují se** z něj **mikroorganismy**, které pak **mohou kolonizovat zase další povrchy**, takže biofilm vzniká na dalších místech
- Neodstraněný biofilm tedy představuje **potenciální riziko** pro vznik biofilmu na jiných místech

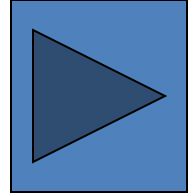


Účinnost na biofilm \neq účinnost na bakterie

- Účinnost chemických látek na biofilm jako celek je dána **zcela jinými mechanismy** a vlivy než účinek na bakterie samotné. Často se právě uplatňuje **povrchový náboj**
- Proto **postupy méně účinné na jednotlivé bakterie mohou být účinnější na biofilm**
- U biofilmů **v chirurgických ranách je například důležitější lokální ošetření rány** (např. koloidní stříbro – povrchový náboj) než celkově podaná antibiotika

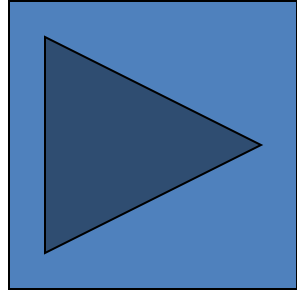


Odstranění biofilmu (obecně)



- **Odstranění povrchu** (výměna zařízení, části potrubí apod.) je samozřejmě radikální krok. Otázkou je, zda se biofilm nevytvoří znovu, bude-li nová část stejné konstrukce
- K **mechanickému odstranění biofilmu** lze přistoupit, pokud to umožňuje situace
- Z **fyzikálních** metod lze použít např. ultrazvuk
- **Chemická cesta** je možná, je však nutné mít ověřeno, že příslušný postup (látka a koncentrace) na biofilm působí. Často se používají chlorové preparáty
- **Kombinace** různých postupů je též možná

Detergenty a desinfekce: možnost kombinace (v průmyslu)

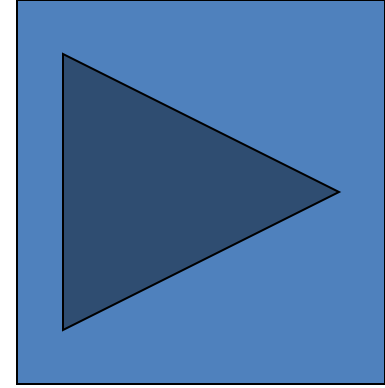


Účinná může být kombinace

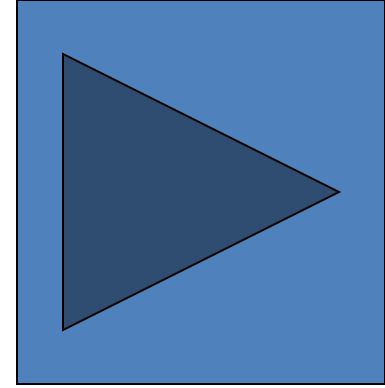
- **působení detergentu**, který rozpustí a rozruší organickou hmotu na povrchu biofilmu, následně
- **opláchnutí** rozrušený biofilm odplaví, a tím obnaží mikroorganismy, a poté
- **desinfekční látka** pronikne dovnitř biofilmu a inaktivuje přítomné mikroorganismy

Nebo lze využít prostředků, které mají účinek detergentu i desinfekčního prostředku; problém je v tom, že vlastní desinfekční účinek detergentů je spíše slabý.

Je možná prevence?

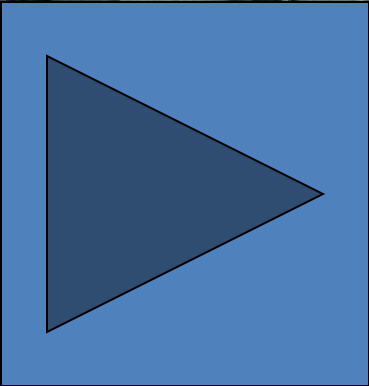
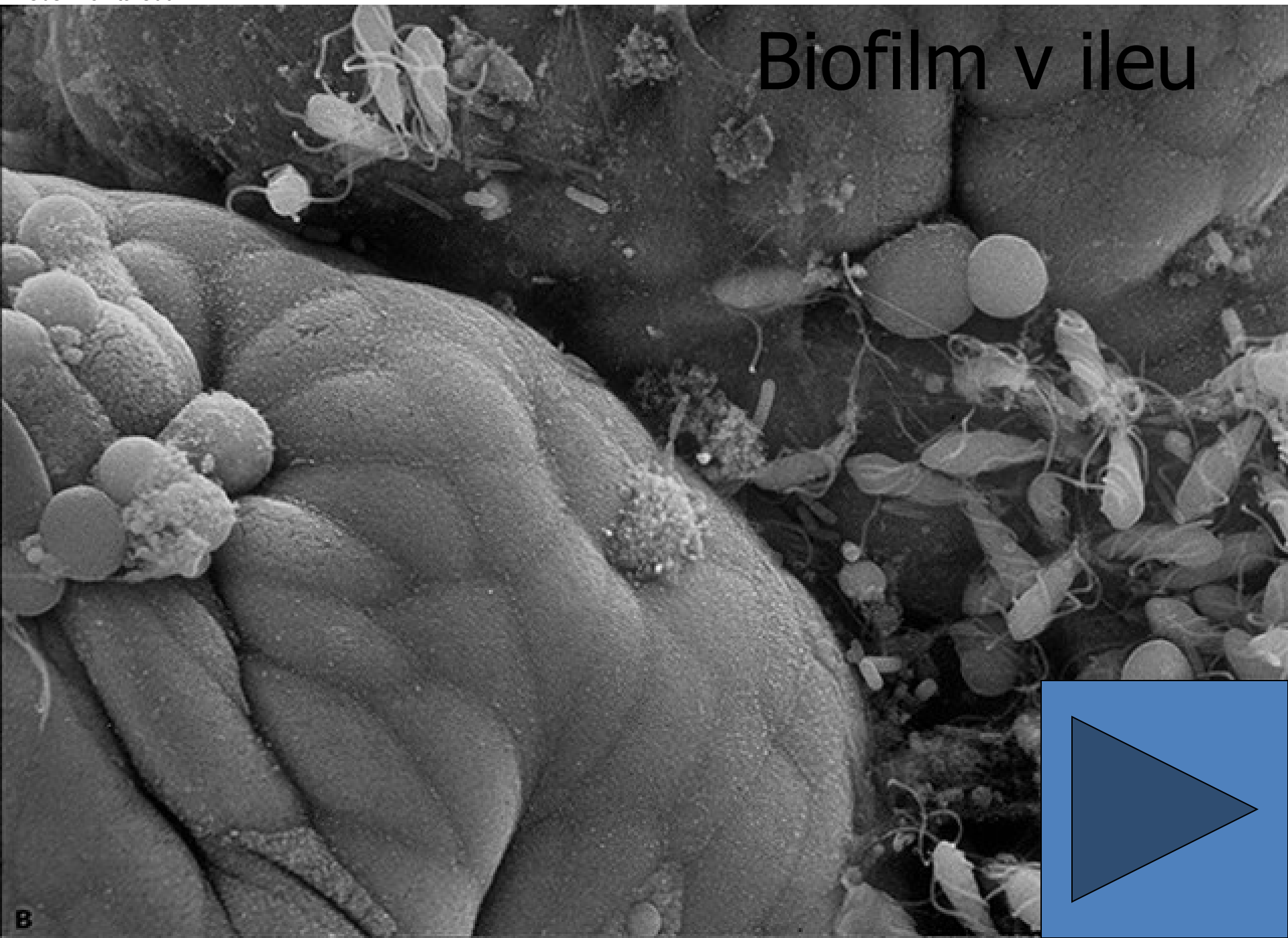


- Šanci pro prevenci dávají **materiálové vědy**, zejména makromolekulární chemie
- Povrchy nejsou stejně náchylné ke kolonizaci; méně náchylné jsou zpravidla hydrofobní povrchy. I jednotlivé plasty se liší
- V medicíně se již používají **materiály se speciální povrchovou úpravou**, případně dokonce napuštěné antibiotiky (to ovšem nelze v potravinářství připustit)



Další obrázky biofilmu

Biofilm v ileu



A

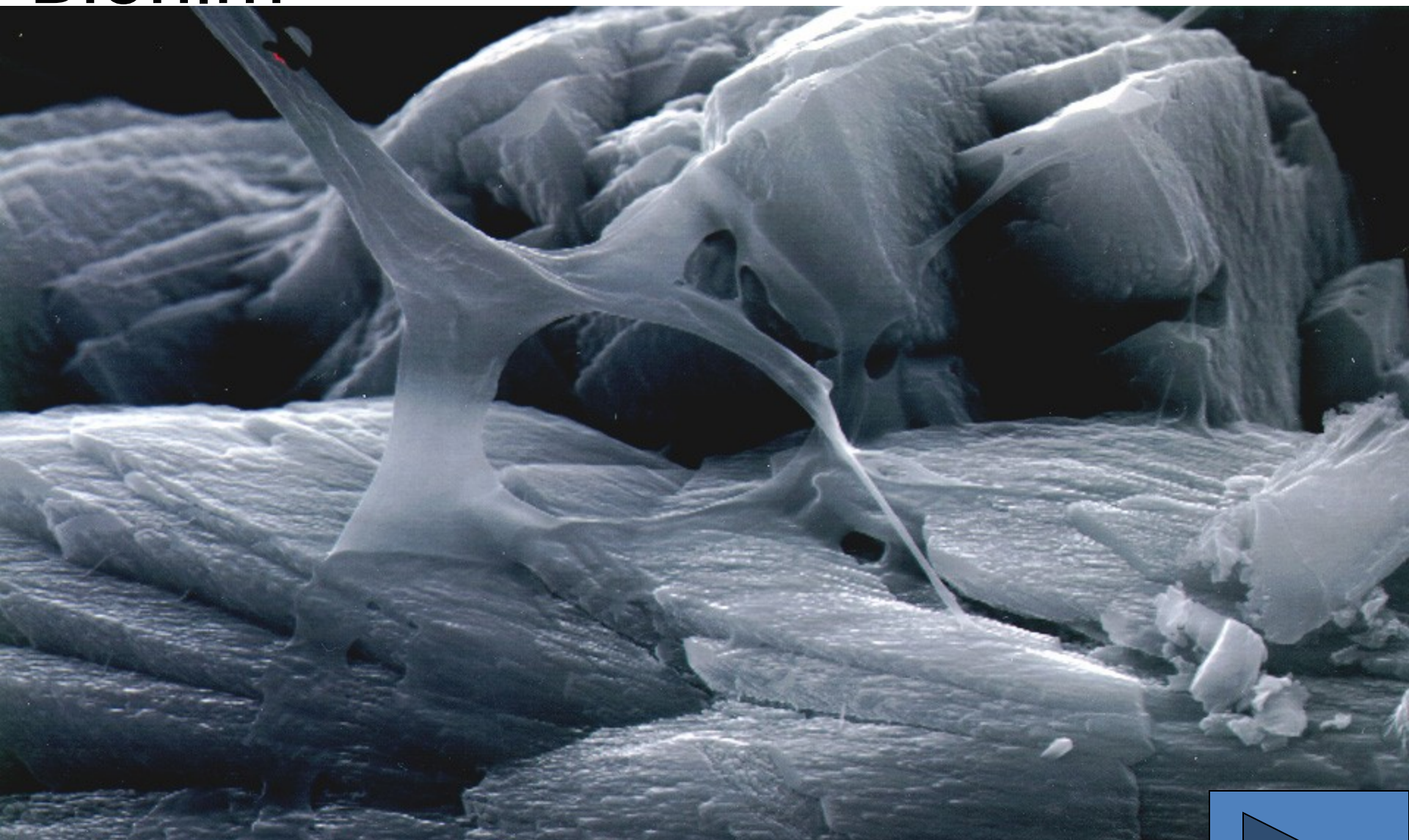
Biofilm na protéze

webs.wichita.edu

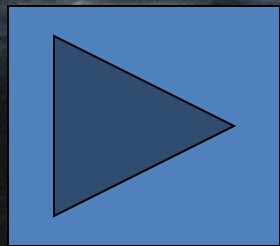


4 μm

Biofilm



Acc.V - Exp |-----| 5 μ m
25.0 kV 5076 Travertine ZF#5 Unetched Area 2



B

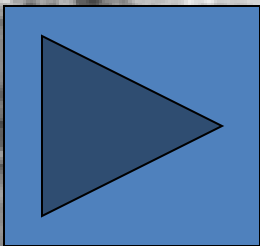
Yeast
|

Kvasinkový
biofilm

Matrix —

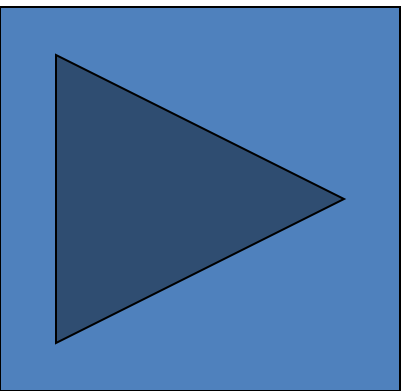
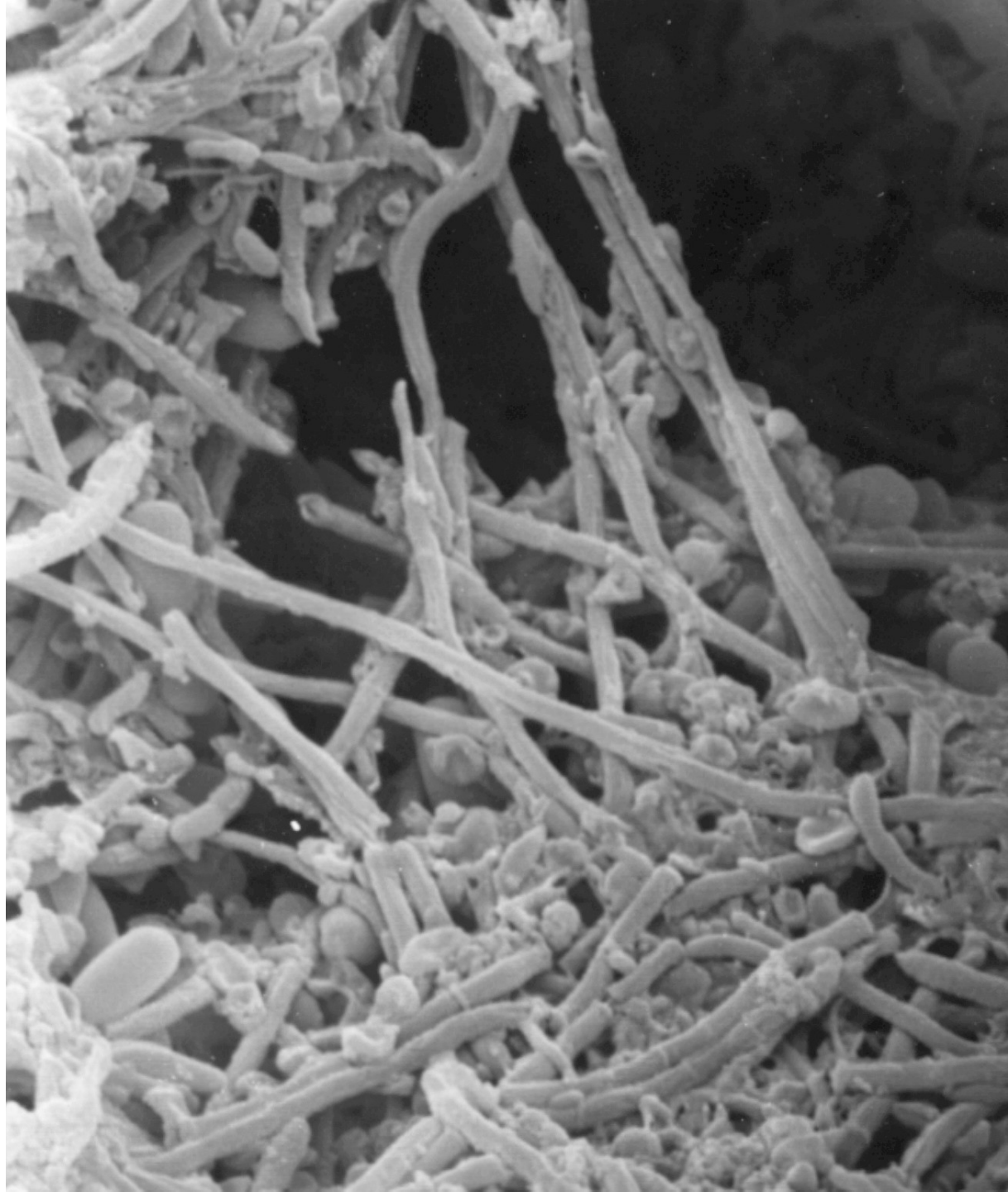
Hyphal
structure

30 μm



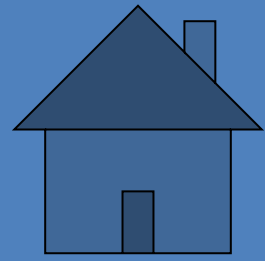
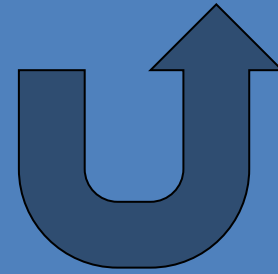
Biofilm

commtechlab.msu.edu



Shrnutí bonusového materiálu

Zpět na
hlavní obsah



- Biofilm působí komplikace **nejen ve zdravotnictví, ale i v jiných oborech**
- Nejčastějším dalším oborem, kde se biofilm uplatňuje, je **potravinářství**
- I zde ovšem existuje významná souvislost s lidským zdravím. Biofilm v technologických zařízeních se může stát **zdrojem kontaminace potravin, případně vody**