

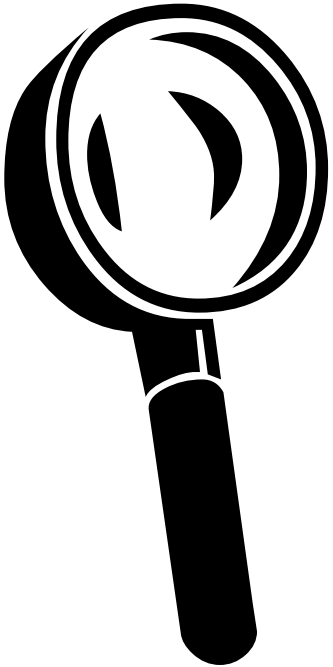
Mikrobiologický ústav uvádí

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

*někdy se sem přiřazují
z anatomických důvodů
také infekce středního ucha*

DCD a plíce:

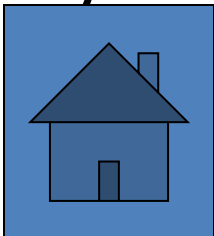
- infekce příklopky hrtanové
- infekce hrtanu (laryngu) a průdušnice (trachey)
- infekce bronchů (průdušek)
- infekce bronchiolů (průdušinek)
- infekce plic

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 specifický mikrobiom, přechází tam však mikrobiom 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), případně amoxicilin-klavulanát (AUGMENTIN, AMOKSIKLAV) alternativou může být doxycyklin (DOXYBENE), u dětí kotrimoxazol (např. BISEPTOL)
- 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

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

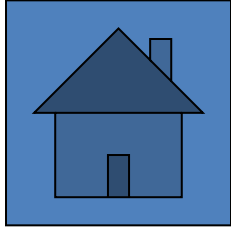
Zvláštní případ: akutní zhoršení chronické bronchitidy

- 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)

Pneumonie způsobené Legionella pneumophila jsou na pomezí mezi klasickými a atypickými.

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

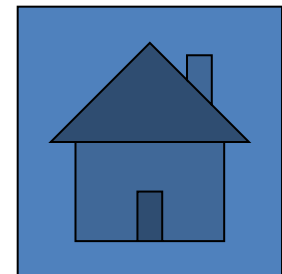
- Základem je **klinické vyšetření a rentgen**, důležité je rozlišení klasické × atypické pneumonie (zcela jiné spektrum původců)
- **U klasických pneumonií** má smysl správně odebrané sputum, případně (zejména u septického průběhu) krev na hemokultivaci
- **U atypických pneumonií** serologie mykoplasmat 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

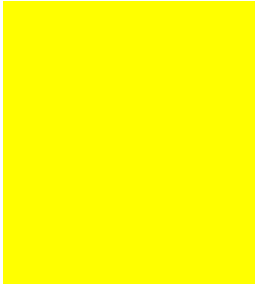
- Kromě vyplnění obvyklých polí (jméno, číslo pojištěnce...) je důležité pole požadavku, co má být vyšetřeno.
- **Příklady formulací na žádance:**
 - výtěr z krku na bakteriologii
 - punktát čelní dutiny na bakteriologii + kvasinky
 - krev na serologii původců atypických pneumonií
 - sputum na bakteriologii
 - sputum na TBC (kultivace + PCR)
 - hemokultura č. II z periferie
 - bronchoalveolární laváž (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



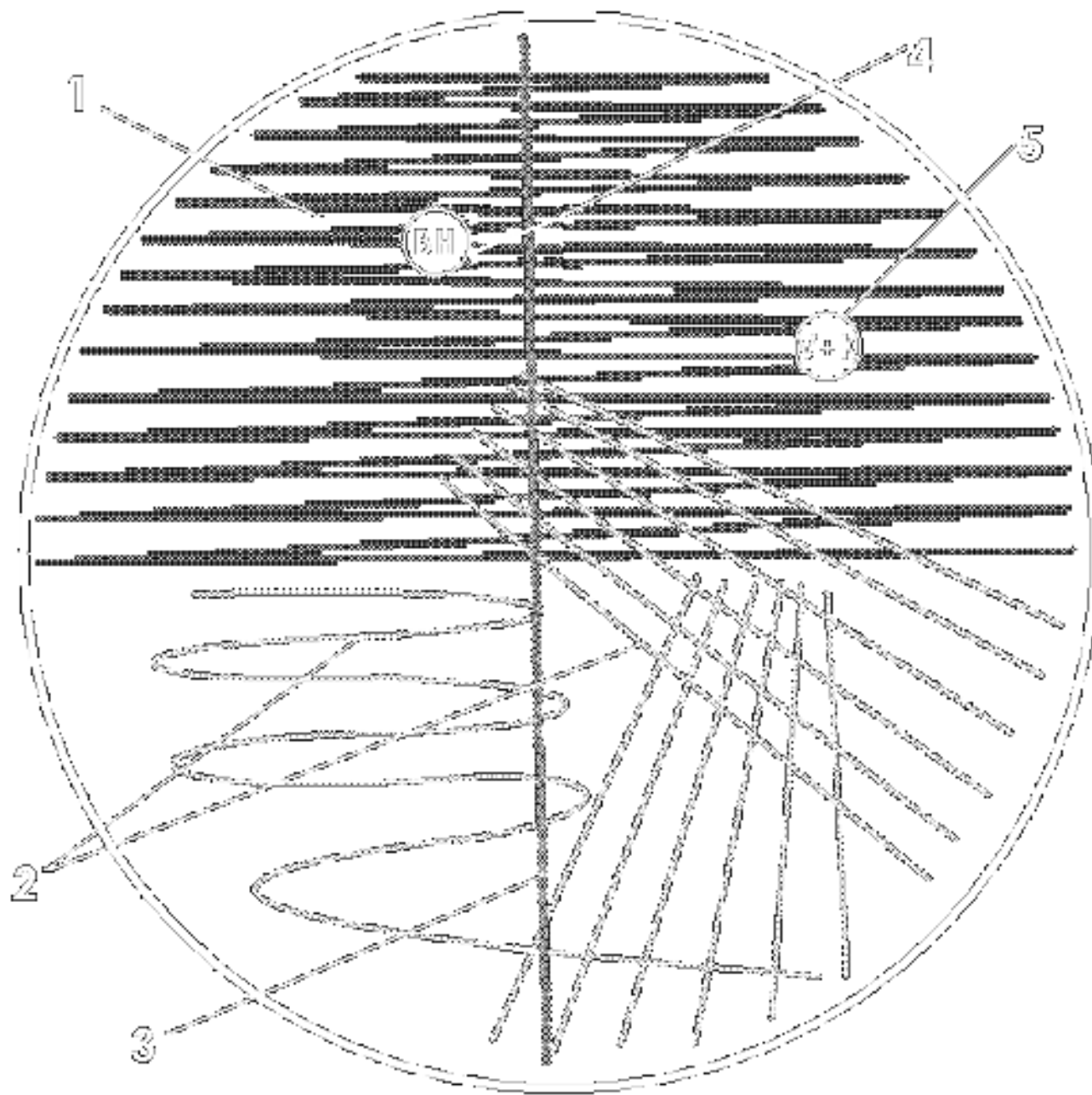
Co se se vzorky děje v laboratoři

- 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. *(Poznámka: Některé laboratoře považují hemofily za normální nález, a tudíž po nich ve faryngu vůbec nepátrají.)*
- 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 možného 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

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 miskou 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



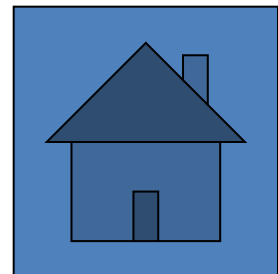
Výtěr z krku

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

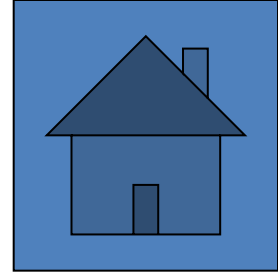
- Mnohé z nich jsou přenášeny **kontaminovanými potravinami a vodou**
- Nepříjemné, **ekonomické ztráty** nejen při infekci, ale i při kontaktu s infekcí
- Pro jejich předcházení je zásadní **hygienu** v **potravinářských výrobnách** a provozovnách a ochrana **vodních zdrojů**
- Důležitá je také **osobní 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 nevyklučuje pozitivitu)
- **Toxin *Clostridioides (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, 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
- Je-li stolice tekutá, je možno odebrat vzorek do jakékoli nádobky. To platí také při testování na toxin *Clostridioides difficile*

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

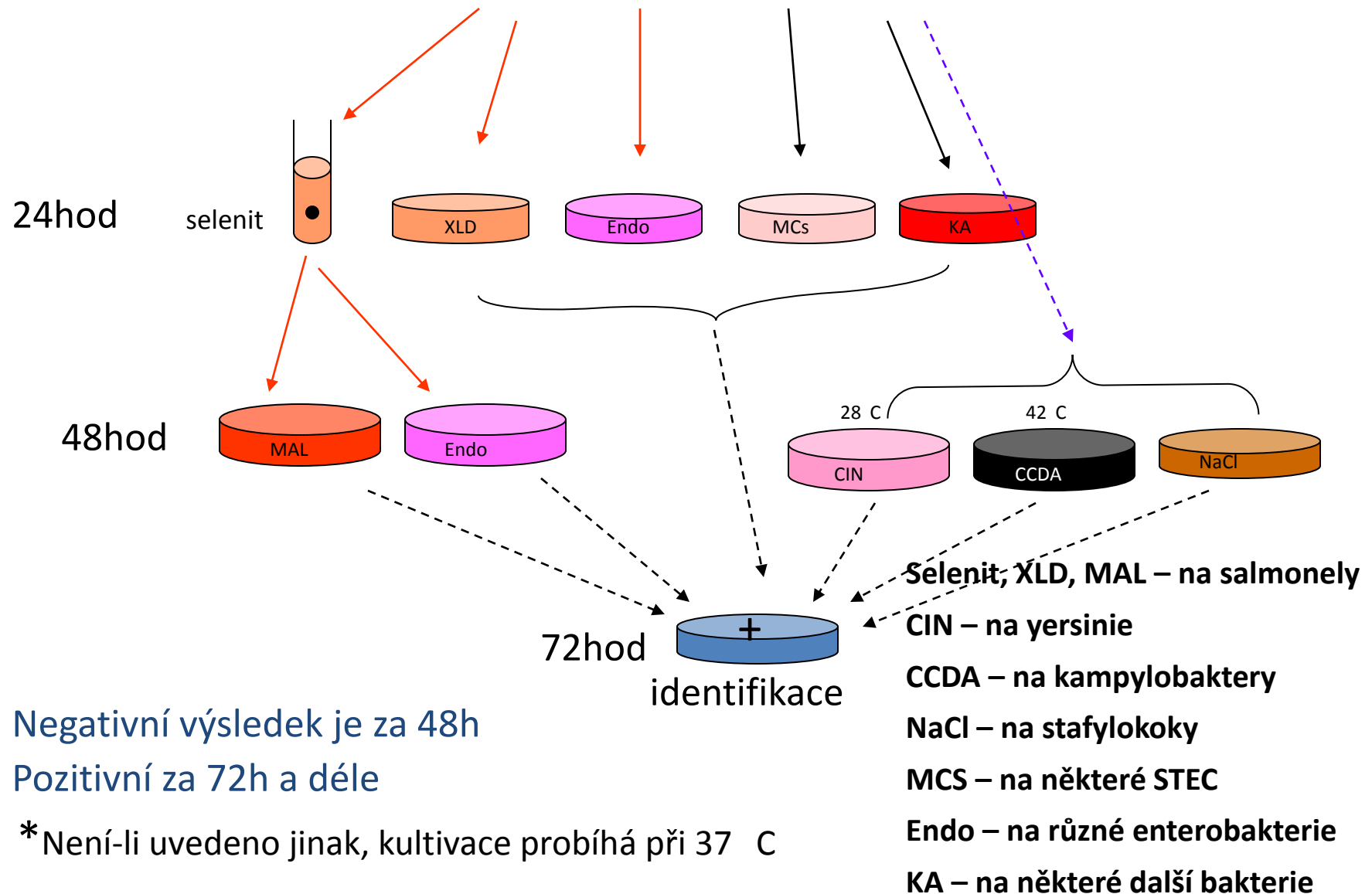
- **Mikroskopie** nemá praktický význam
- **Kultivace** se provádí na různých půdách (výběr závisí na stáří pacienta a diagnóze, u cestovatelů případně přidáváme i méně obvyklé půdy), nalezené patogeny jsou identifikovány – viz dále
- **Přímý průkaz toxinů A a B (*Clostridioides difficile*)** jako antigenu. Průkaz toxinu je důležitější než samotný nález klostridia nebo nález strukturálního antigenu, na druhou stranu i nález antigenu 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)



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)**

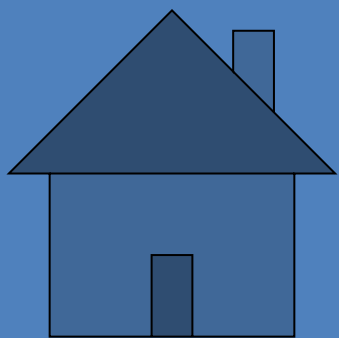
V některých případech (salmonely, escherichie u malých dětí) je žádoucí **antigenní analýza vypěstovaného kmene**

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 *Clostridioides difficile* je důležité, zda je pozitivní **klostridiový toxin**. Nicméně i samotný nález antigenu při negativitě toxinu se považuje za významný, pokud odpovídají klinické příznaky.

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 × 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

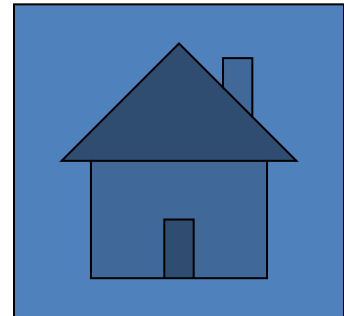
- Neúspěch zvolené ATB terapie byl zapříčiněn tím, že **nebyla brána v úvahu vysoká rezistence mikroba rostoucího ve formě biofilmu** vůči těmto antibiotikům.
- Léčba nebyla od samého začátku dostatečně razantní a **nedošlo k eradikaci ložiska biofilmu**.
- Teprve **odstranění elektrody** (pod clonou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

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

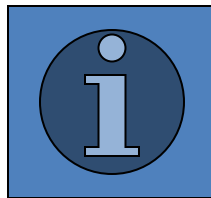
- ...opět přerostlý biofilm.
- **V ústní dutině je biofilm normální.** Je dokonce užitečný: normální ústní flóra se organizována ve formě biofilmu, a tak se může bránit vnějším vlivům včetně patogenních agens
- Nicméně **příliš přerostlý biofilm** (jako výsledek příliš velkého množství zkonsumovaných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



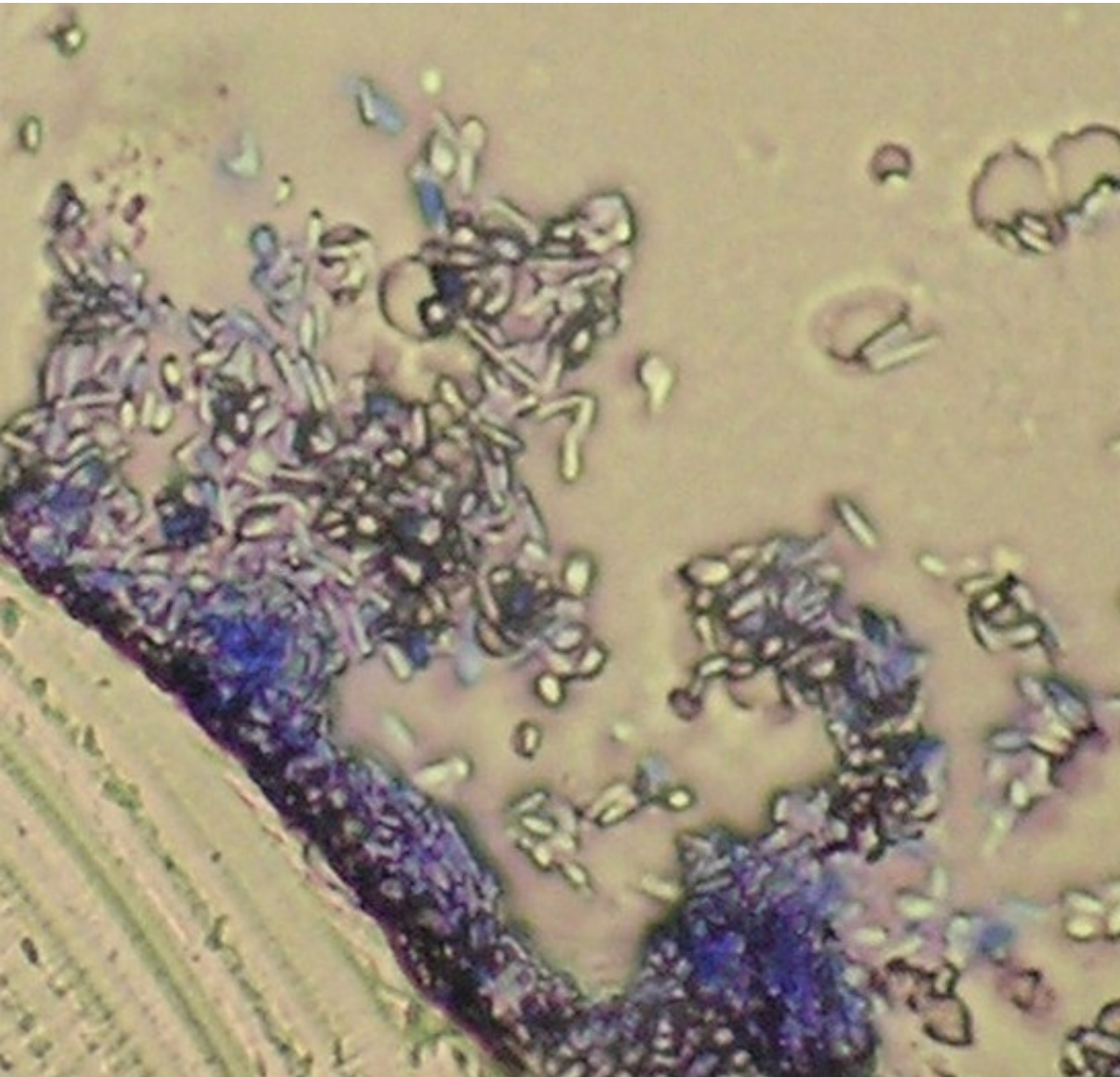
Základní
charakteristika
biofilmu

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

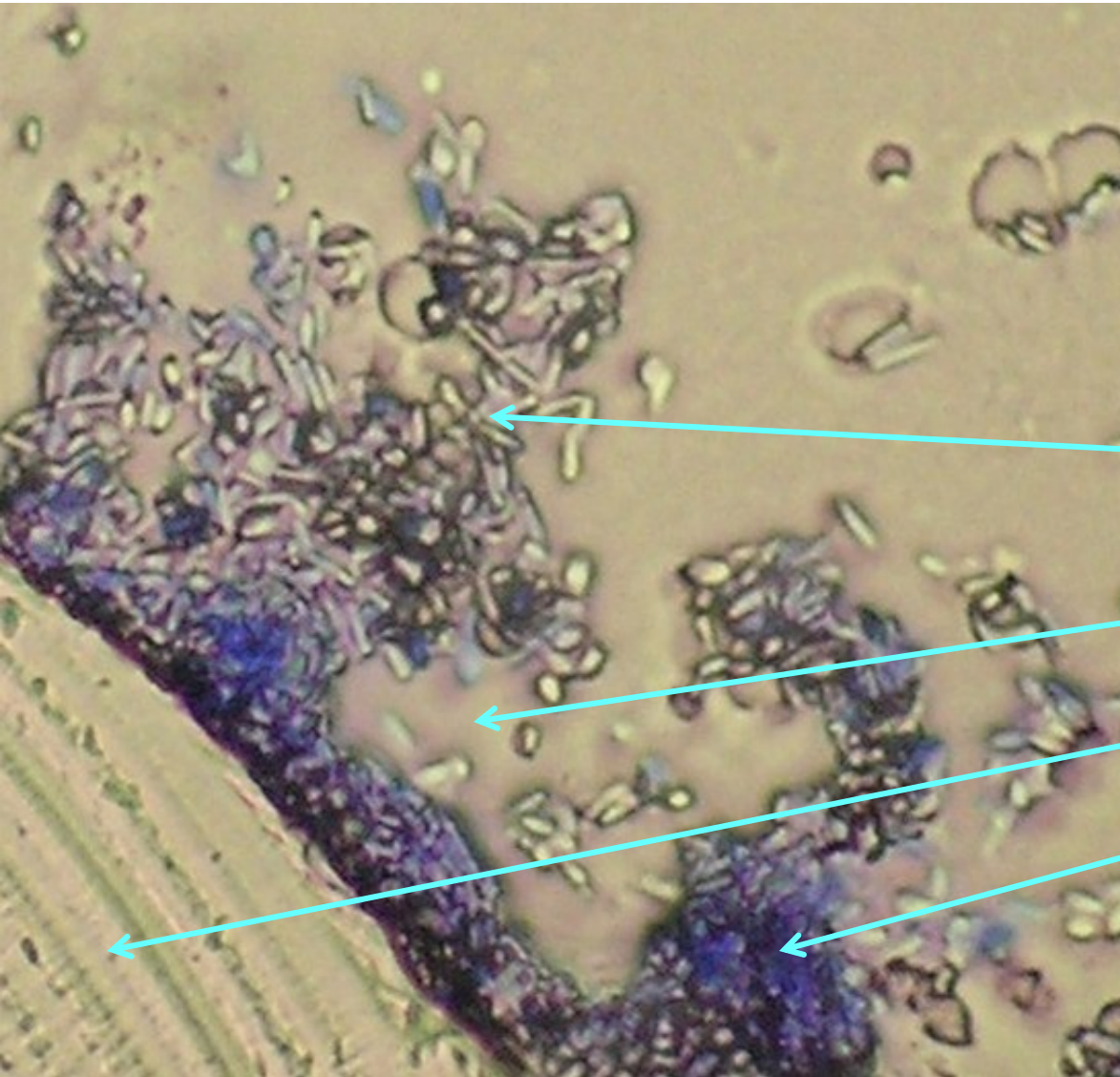


Různé obrázky biofilmu



Biofilm na katetru

Různé obrázky biofilmu



Biofilm na katetru

Bakterie

Kanálek

Katetr

Polysacharidy

Vznik biofilmu

- Na začátku je **pevný povrch a plovoucí bakterie**

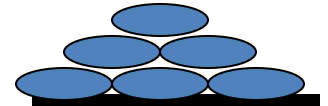
+



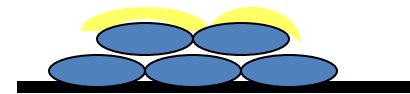
- Bakterie **adheruje** na povrch



- Následuje **agregace** dalších bakterií



- Bakterie začnou produkovat **polysacharidovou matrix**

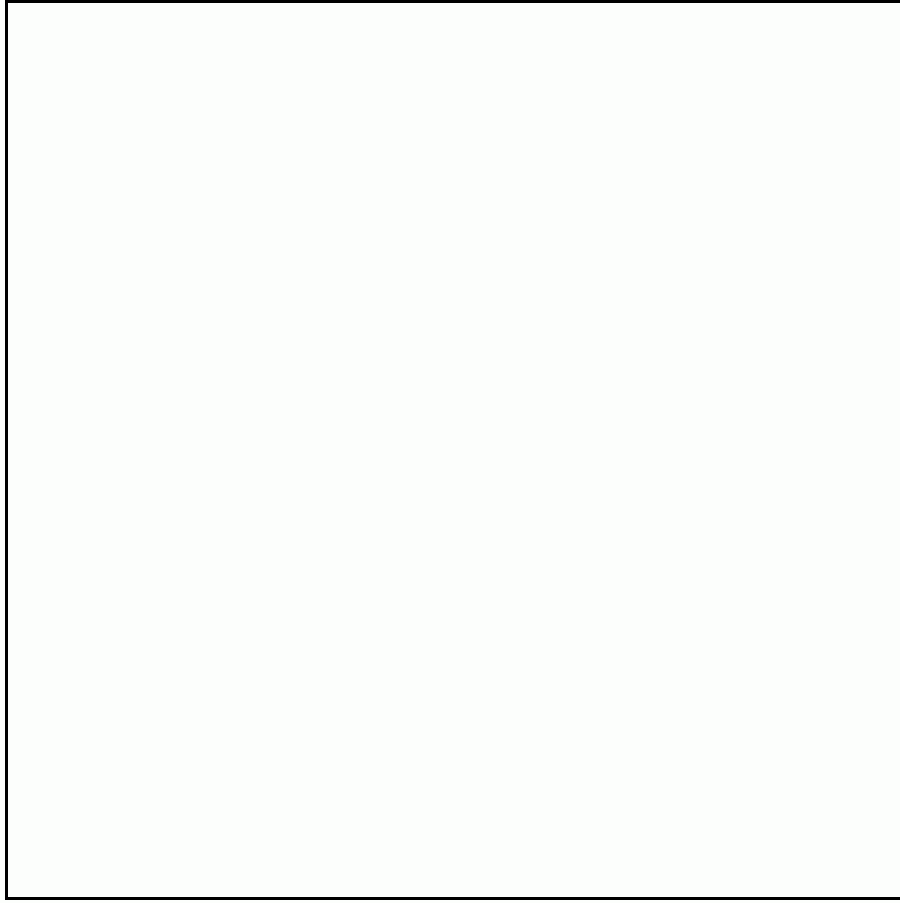
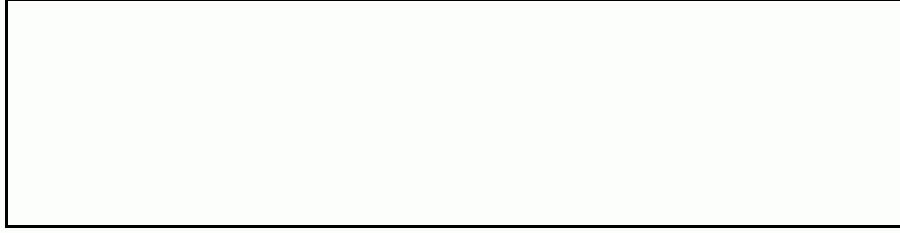


- Až vznikne **třídímenzionální struktura zvaná biofilm**

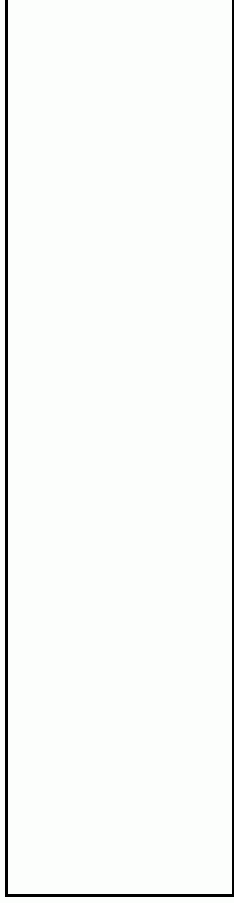


Biofilm může být **jedno- či vícedruhový**

Vznik biofilmu v časovém sledu



0 h



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.*

Mechanismy ovlivňující rezistenci k antibiotikům

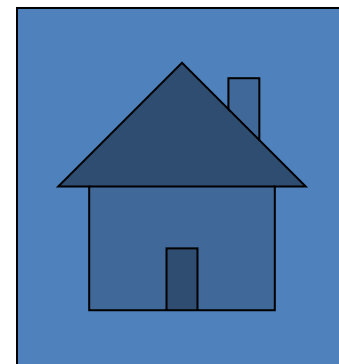
- Vliv **povrchového náboje**
- Snížení **růstové rychlosti**
- **Penetrační bariéra**
- Nehomogenní matrix
- **Fenotypové odlišnosti**
- **Intercelulární signalizace**
- **Imunitní mechanismy...**

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

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

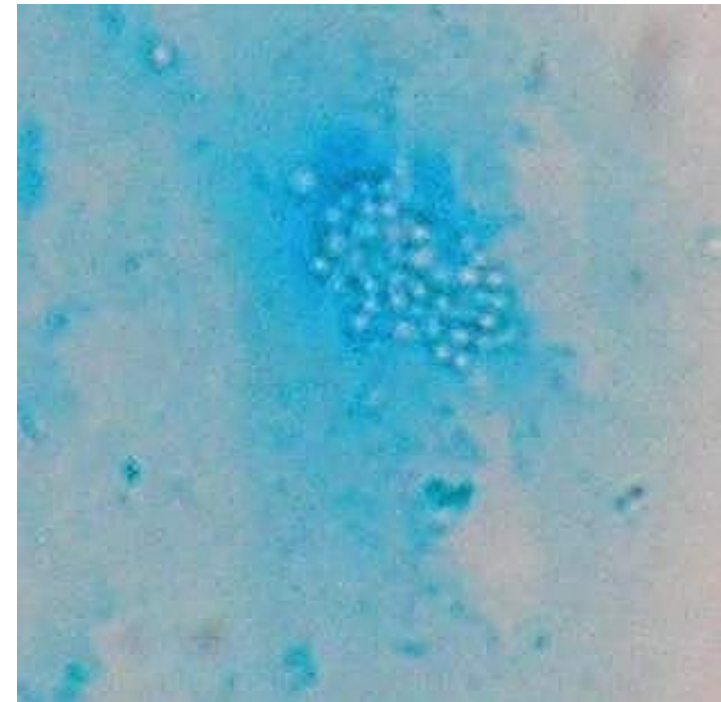
Mikroskopie orálního biofilmu

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

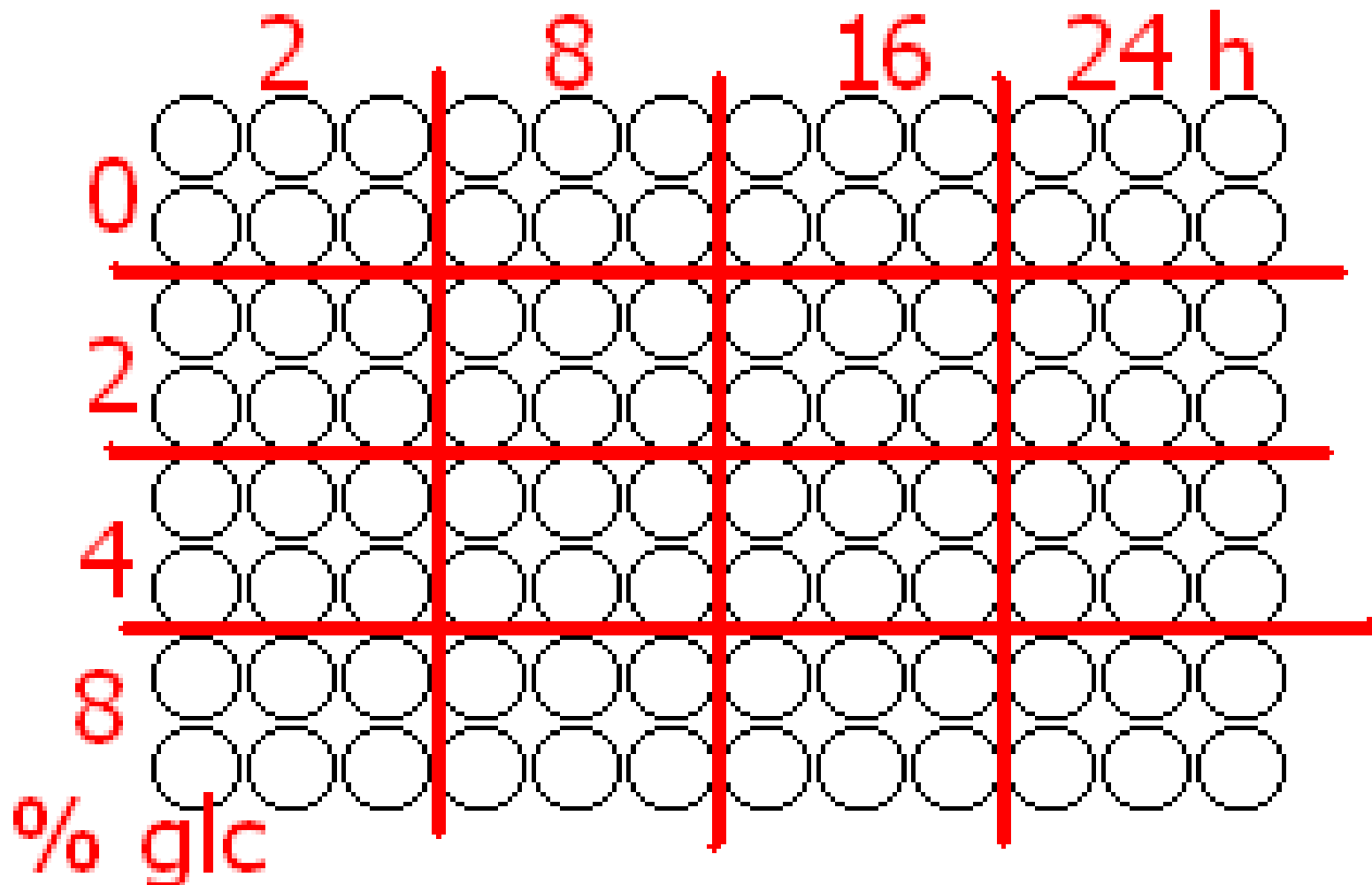
Možnosti

- **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 dýlku (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

Aby se zabránilo náhodné chybě, má
vždy šest sousedních důlků stejné
hodnoty koncentrace glc i času



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



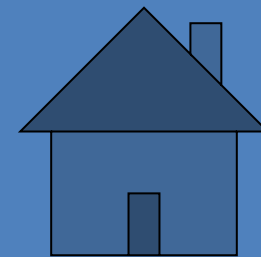
- Zatímco MIC je metoda určující minimální inhibiční koncentraci ATB u planktonické formy, MBEC zjistí eradikaci bakteriálního biofilmu. Vypovídá tedy lépe o skutečném účinku antibiotika na bakterie žijící ve formě biofilmu.
- MBEC odpovídá **nejnižší koncentraci antibiotika, kde ještě prokážeme eradikaci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

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

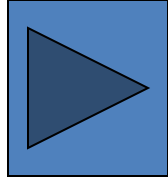
Zpět na hlavní obsah



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 😊)

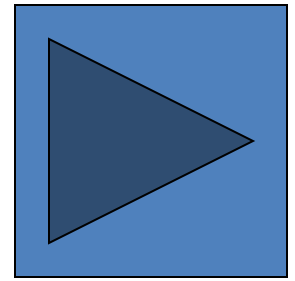
Bonus: více o biofilmu



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



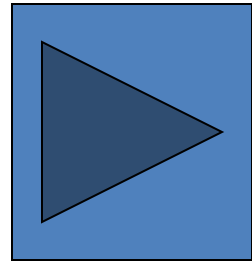
Na čem se tvoří:

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

Nejčastější výskyt: mrtvá
místa výrobního zařízení

- **ventily**
- **klouby**
- **těsnění**
- **apod.**

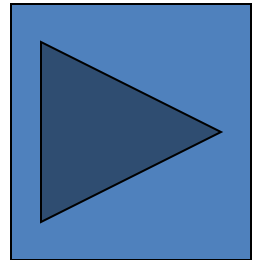
Jaké jsou možné problémy u průmyslových biofilmů



- **zdroj křížových, postpasteračních a poststerilačních kontaminací** → znehodnocení potravinářských produktů, kažení potravin, popř. přenos nález 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

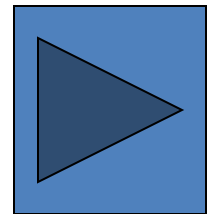
Biofilm jako zdroj dalšího šíření

- 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

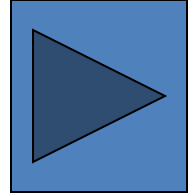


Účinnost na biofilm \neq účinnost na bakterie

- 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

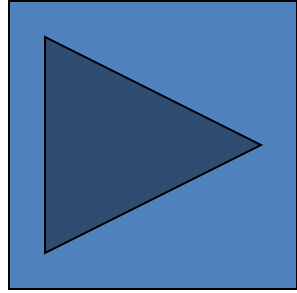


Odstranění biofilmu (obecně)



- **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)

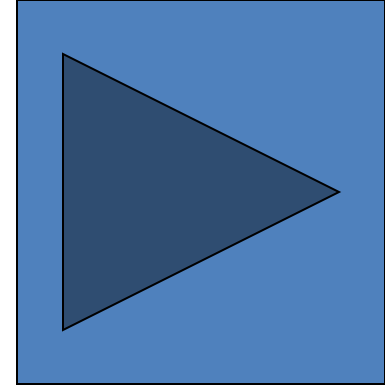


Účinná může být kombinace

- **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.

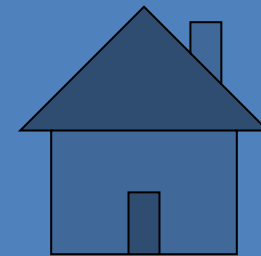
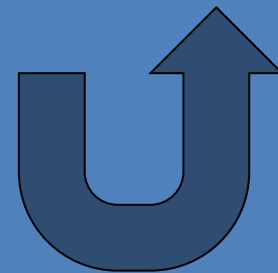
Je možná prevence?



- 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)

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**