

1 Indikace, riziko a účelnost mikrobiologického vyšetření

- mikrobiologické vyšetření je indikováno při podezření na *infekční proces*
- nutná správná indikace vyšetřovaného vzorku
- na základě údajů od pacienta, ale i na základě objektivního vyšetření a dalších údajů

Slouží k:

- Zjištění etiologického agens – zcela zásadní pro cílenou ATB terapii
- Pro epidemiologické účely
- Někdy k vyloučení infekční etiologie – dif dg u nejasných stavů, kterých je čím dál více (infekci lze ale definitivně vyloučit, až když se potvrdí jiná diagnóza)

Pro zjištění etiologie infekce provést:

- Odpovídající vyšetření ze správného (a správně odebraného) materiálu vhodného k dg
- Podmínky preanalytické fáze (viz dále)
- nejpřínosnější materiál:
 - Vzorky ze sterilních lokalit a tekutin (mok, moč, krev, punktáty, operační materiál)
 - Invazivní výkony – materiál na kultivaci neopakovatelný a výjimečný! (pozor na podání ATB)

Preanalytická fáze zahrnuje:

- indikaci k mikrobiologickému vyšetření
- odběr vzorku – nutný správný postup (informace v laboratoři, v příručkách)
- uchování a transport – velice zásadní pro výtěžnost, urgentnost dodání na Ústav mikrobiologie určí lékař
- manipulaci v laboratoři před vlastním zpracováním

Účel mikrobiologického vyšetření

- Zjišťujeme, který mikrob je příčinou sledovaného onemocnění, případně také přítomnost jeho faktorů patogenity (např. toxinů) a jeho citlivost na antimikrobiální látky.

Co může následovat

- 1) Chybná diagnóza (nepoznaná endokarditida)
 - 2) Špatně vedená léčba – problém u dlouhodobě léčených infekcí (osteomyelitis, TBC)
 - 3) Širokospektrá či nákladná léčba – širokospektrá ATB po celou dobu léčby, ač mohl být pacient léčen cíleněji a levněji
- přecenění kolonizační mikroflóry při následných kultivacích → rezistence
- 4) Únik epidemiologicky významných infekcí (TBC, meningokok) – ohrožení okolí

2 Diagnostika bakteriálních infekcí

- Přímá = přímý průkaz přítomnosti mikroba (kultivace) nebo jeho části (antigen, DNA)
 - Materiál – odběr z postiženého místa – stěr, sputum, krev, moč, mok
 - Klasické metody
 - Mikroskopie – nativní nebo barvené preparáty (Gram, Ziehl-Neelsen); snadné, levné, technicky nenáročné, ale nutná interpretace zkušeným mikrobiologem
 - Kultivace – viz 38
 - Pokročilé metody – založeny na specifických chemických vl. nebo kultivačních podmínkách
 - Specifické testy
 - Biochemie – založeno na schopnosti bakterií metabolizovat substráty, dnes frčí komerčně vyráběné testové sady s diagnostickými půdami pro určité skupiny bakterií
 - Detekce antigenu – aglutinace, IMF, ELISA
 - Citlivost k Atb – disková difuzní metoda, E-test, MIC
 - Moderní metody
 - Detekce DNA – hybridizace, PCR

- Nepřímá = průkaz specifické imunitní reakce proti mikrobovi (specifické protilátky)
 - Materiál – sérum, vzácněji mok
 - Klasické metody
 - KFR
 - Přímá aglutinace
 - Hemaglutinace
 - Moderní metody
 - ELISA
 - Western blot

3 Diagnostika virových infekcí

- Vyšetřovaný materiál: výtěry, výplach nosohltanu, kožní léze, obsah puchýřků, moč, stolice, likvor, krev, pitevní materiál
- **Izolace** viru – klasicky vaječný zárodek (amniová dutina, alantois, žloutkový vak) + buněčné kultury (buňky jsou nesmrtelné – proto používáme buď *embryonální*, nebo *nádorové*)
- **Optická** mikroskopie – sledujeme virové inkluze v buňce
- **Elektronový** mikroskop – vyšší rozlišení, můžeme sledovat samotný virus
- **Kultivace** – pouze na živých buňkách
 - Kuřecí embrya – pro citlivá a náročná viry (př. virus chřipky)
 - Tkáňové kultury = živé buňky z určité tkáně narostlé v monolayeru (= 1 vrstva buněk na dně speciální kultivační nádoby pro viry) – do nádoby se přidá vyšetřovaný materiál a pokud obsahuje virus, vytváří se mikroskopem viditelný cytopatogenní efekt (= morfologické změny napadených buněk)
 - Shell-vials techniky – jde o urychlenou kultivaci, inkulum se centrifugací vmasíruje do buněčné kultury narostlé na kulatém krycím sklíčku – virus se pomnoží a poté se prokazuje IMF monoklonálními protilátkami; celý postup je hotov do 24 h
- Dnes se často využívá nepřímá dg.
 - Používá se hlavně KFR
 - Neutralizace – HIT, VNT
 - V poslední době především ELISA
- Diagnostika vybraných virových onemocnění
 - Přímý důkaz virových antigenů a NK – hlavně hepatitida B a C
 - Infekce viru herpes simplex - přímý průkaz antigenů viru herpes simplex (HSV) v buňkách, získaných stěrem; u dospělých jedinců to má hlavně podpůrný význam
 - Cytomegalovirové nákazy – izolace viru z moči nebo leukocytů nebo přímý průkaz virových antigenů pomocí monoklonálních protilátek má největší význam pro průkaz intrauterinní infekce novorozenců nebo průkaz aktivity u chronických cytomegalových onemocnění
 - EBV – při podezření na infekční mononukleózu (IM) je nejlepší vyžádat nejprve jednoduchý a levný průkaz heterofilních protilátek; nejsou-li heterofilní protilátky zjištěny, je proto vždy třeba doplnit vyšetření specifických protilátek jak k EBV, tak i k CMV (často bývá za těchto okolností požadováno chybně pouze vyšetření na CMV); asi u 1/3 tonzilitid u IM bývá komplikována infekcí streptokokem, proto ani u prokázané IM by nemělo být zanedbáno bakteriologické vyšetření

4 Diagnostika mykotických infekcí

- Mikroskopie
 - Nativní preparáty – lze nespecificky (Lugol) nebo specificky dobarvit (Mycolnk, Rylux – vážou se na chitin)
 - Fixované preparáty – obecná barvení (Gram), speciální barvení (IMF, Gram-Weigert)
 - Výhody: rychlost, nízká cena, specifita
 - Nevýhody: malá senzitivita, patogena zařadíme jen orientačně
- Kultivace
 - Nejběžnější **Sabouraudův agar** s Glc a atb
 - Chromogenní agar – kvasinky
 - Rýžový agar – kvasinky
 - Czapek Dox – aspergilové
 - Výhody: umožní zařadit patogena do rodu a druhu, otestovat citlivost na antimykotika, specifická

- Nevýhody: málo senzitivní, časově náročná, riziko kontaminace
- Kvasinky:
 - Makro a mikromorfologie – vzhled kolonií, tvorba mycelií
 - Biochemické vlastnosti – utilizace a kvašení cukrů
 - Sekvence (PCR), proteomika
- Vlákňité houby (včetně dermatofyt)
 - Makro a mikromorfologie – vzhled kolonií, tvorba pigmentu, tvar a větvení mycelií, velikost a tvar konidií
 - Biochemka takřka nepoužitelná
 - Sekvence, proteomika
- Testování citlivost k antimykotikům
 - E-test – stanovení MIC pomocí plastického proužku s gradientem antimykotika
- Sérologie (dg invazivních mykóz) – stanovení protilátek není obvykle přínosné (výjimkou jsou endemické mykózy – histoplazmóza atd.), u invazivních mykóz je klíčové včasné zahájení léčby = časná dg. – využití serologických a molekulárně-biologických metod
 - Latexová aglutinace – kryptokokóza, histoplazmóza
 - ELISA – kandidóza, aspergilóza
 - G-test
 - KFR, hemaglutinace, imunodifuze v gelu
 - Výhody: rychlé, senzitivní, specifické, možnost monitorovat léčebnou odpověď, vysoká negativní prediktivní hodnota (= negativní výsledek s vysokou pravděpodobností znamená nepřítomnost choroby)
 - Nevýhody: falešné pozitivity, cena (G-test)

Laboratorní dg. – C. albicans

- Materiál se odesílá rychle po odebrání nebo zamrazený
- Odebíráme: kožní šupiny, sputum, bronchiální laváž, moč ... prostě záleží na formě onemocnění
- Mikroskopie – barvení na Grama – vidíme hlavně směs pučících blastokonidií a vláken
- Kultivace – Sabouraudův agar s Glc při 20 a 37°C
- Průkaz invazivního procesu – histologické vyšetření vzorku tkáně a nálezem kvasinek a hyf
- Diseminované formy a sepse je spolehlivým testem antigenemie, později průkaz protilátek precipitačními a aglutinačními reakcemi

Laboratorní dg. – Cryptococcus neoformans

- Vyšetřuje se likvor, sputum, moč a krev hemokultivací
- Mikroskopie – vidíme typické kulovité pučící buňky s nápadným pouzdrém
- V likvoru lze prokázat kapsulární antigen

Laboratorní dg. – rod Aspergillus

- Sputum, bronchiální výplachy, biopsie tkáně
- Mikroskopie – nález septovaných hyf
- Rozhodující je sérologické vyšetření – protilátky jsou druhově specifické a zjišťují se metodou precipitace v agaru
- U alergického typu onemocnění je vhodný kožní test

Laboratorní dg. – Histoplasma capsulatum

- Sputum, biopsie uzlin (u diseminované formy), krev, sternální punktát
- Izolace a kultivace náročná – nutné nutričně bohaté půdy (mozko-srdcová infuze), kultivace vyžaduje delší inkubaci
- Využívají se pokusy na zvířatech
- Cenná je nepřímá sérologická dg. – KFR, imunodifuze a latexová aglutinace se solubilním antigenem histoplasminem (nemocní reagují na tento antigen v kožním testu reakcí pozdní přecitlivělosti)

5 Diagnostika parazitárních onemocnění

- **Mikroskopické vyšetření**
 - Nativní preparát
 - Barvení dle Giemsy, hematoxylin, trichrom atd.
 - Na sklíčko se nanáší tlustý nátěr, tlustá kapka, krevní nátěr

- Materiál – stolice (velikost lískového ořechu), anální výtěr, perianální stěr, krev (kapka z břicha prstu), sputum (larvy škrkavky), bronchoalveolární laváž (plicní Pneumocystis carinii), vaginální/uretrální výtěry (trichomonády), stěr ze zadní klenby poševní (pro stanovení MOP = mikrobiální obraz poševní)
- Vzorek se posílá v nesterilních zkumavkách, nesmí se zamrazit
- Améby – vyšetření do 30 min po odebrání
- Co hledáme? – červi, jejich články, vajíčka, cysty
- Krev – dg. trypanosom či mikrofilárií; barvení dle Giemsy
- **Sérologická vyšetření**
 - Detekce antigenů v séru
 - Pomocná metoda
 - Málo významné u střevních parazitů, pokud nepronikají do jiných orgánů – v tomto případě by byla významná dg. cysticerkózy vyvolané Taenia solium
 - Rychlý screening a dg. malárie – imunochromatografický test založený na detekci plasmodiové laktátdehydrogenázy
 - Významné hlavně v případech, kdy je přímý důkaz parazita obtížný – toxokarózy a toxoplasmózy
 - ELISA – protilátky proti škrkavkám
 - KFR – průkaz protilátek IgM, IgA a IgG (umožňuje rozlišení akutní a latentní toxoplasmózy)
 - PCR
 - Western blot
- **Kultivační metody** – jen u trichomoníazy – před mikroskopickým průkazem necháme T. vaginalis pomnožit v Diamondově médiu

6 - Metody přímého průkazu, interpretace výsledků vyšetření

- Přímá = průkaz živého či mrtvého mikrobiálního původce, jeho částí, povrchových struktur, charakteristických látek - NK, enzymy, toxiny, produkty mtb
 - Materiál – odběr z postiženého místa – stěr, sputum, krev, moč, mok
 - Klasické metody
 - Mikroskopie – nativní nebo barvené preparáty (Gram, Ziehl-Neelsen); snadné, levné, technicky nenáročné, ale nutná interpretace zkušeným mikrobiologem
interpretace: barva, velikost, tvar a uspořádání (koky, tyčinky, kvasinky)
 - Kultivace – viz 38
interpretace: kolonie- vzhled, tvar, velikost, barva, způsob růstu, pachy/ vůně, hemolýza
 - Pokročilé metody – založeny na specifických chemických vl. nebo kultivačních podmínkách
 - Specifické testy
 - Biochemie – založeno na schopnosti bakterií metabolizovat substráty, dnes frčí komerčně vyráběné testové sady s diagnostickými půdami pro určité skupiny bakterií - ENTEROtest, CAMPtest, St.aureus latex test
 - Detekce antigenu – aglutinace, IMF, ELISA
 - Citlivost k Atb – disková difuzní metoda, E-test, MIC
 - Moderní metody
 - Detekce DNA – hybridizace, PCR

7 Metody nepřímého průkazu, interpretace výsledků, titer protilátek

- Nepřímá = průkaz specifické imunitní reakce proti mikrobovi (specifické protilátky)
 - Materiál – sérum, vzácněji mok
 - Klasické metody
 - KFR
 - Přímá aglutinace
 - Hemaglutinace
 - Moderní metody
 - ELISA
 - Western blot

Pozitivita = mikrob potkal hostitele v minulosti (nevíme, zda před týdny / měsíci / roky)

Průkaz protilátky: laboratorní antigen (mikrobiální) + sérum (výjimečně sliny, likvor) pacienta
způsoby, jak alespoň odhadnout, kdy přibližně se mikrob s tělem pacienta setkal:

- Množství protilátek (relativní – titr) a jeho změny v čase (dynamika titru)
- Třída protilátek: IgM/IgG

Průběh protilátkové odpovědi

- Protilátky IgM se tvoří jako první, ale také jako první mizí. Neprocházejí placentou, jejich průkaz u novorozence je svědectvím jeho infekce

- Protilátky IgG se tvoří později a zůstávají jako paměťové přítomny dlouhodobě.

Procházejí placentou (novorozenec je tedy může mít od matky)

Protilátky ostatních tříd

- Protilátky třídy IgA se u některých infekcí vyšetřují místo protilátek IgM. Tato třída se uplatňuje hlavně u slizniční imunity, a tedy u infekcí, kde branou vstupu je sliznice (například gastrointestinální)

- Protilátky třídy IgE se vyskytují u alergií a infestací červy. Zpravidla se však nestanovují specifické IgE proti nějakému patogenovi

- S protilátkami IgD se v mikrobiologii nepracuje

Titř

- vyjádření stupně zředění vyšetřovaného krevního séra, při němž jsou sérové protilátky ještě schopny viditelně reagovat s příslušným antigenem bakteriálním, virovým, plísňovým apod..

- Čím vyšší je t., tím více lze zředit sérum a ještě docílit příslušné reakce

- Z toho lze usuzovat na obsah a množství protilátek v krvi a tím i na infekci a její intenzitu: čím vyšší je titr, tím více bylo protilátek proti hledanému původci ve vyšetřovaném vzorku

- *Dynamika titru* - Každý má jinou úroveň protilátkové odpovědi. Proto samotná hodnota titru mnoho neříká

- Změna titru vypovídá více - Jde-li o čerstvou záležitost, titr se vždy vyvíjí, nejprve stoupá, později zvolna klesá.

- Sérum pacienta se naředí do řady zkumavek či jamek Příslušná reakce se provede ve všech jamkách (zkumavkách). Hledá se poslední jamka, kde je ještě viditelná pozitivní reakce. Převrácená hodnota ředění v této jamce je titr séra = Nejvyšší ředění, kde ještě vidíme pozitivní reakci

8 Kultivační vyšetření klinických materiálů

- Přímé metody = kultivační a mikroskopický průkaz
 - Negativní kultivační nález neznamená nepřítomnost patogenu
 - Časová náročnost
 - Kultivace některých druhů velmi obtížná – M. leprae roste jen v lidských bb. nebo v bb. pásovce
 - Molekulárně-biologické techniky – průkaz IC parazitů, virů, kvasinek a plísní; využití značených hybridizačních sond komplementárních k charakteristické sekvenci NK mikroorganismu
 - PCR
- Nepřímé metody = sérologické (antigeny) a chemické (buněčné složky, metabolity)

Kultivace

- Kultivační půdy – obsahují živiny a růstové faktory, optimální pH a teplota (termostat), úprava redox potenciálu je-li to nutné (čínidla, povaření, uzavření parafinovým olejem)
- Úprava atmosféry – pro striktně anaerobní, mikroaerofilní a kapnofilní (vyžadují vyšší obsah CO₂)
- Kultivační média:
 - Bujóny – tekuté ... růst se projevuje difúzním zákalem, některé druhy rostou v povrchové blance nebo sedimentu
 - Pevné půdy – připravují se z bujónů přidáním agaru (agar = polysacharid mořských řas, obvykle konc. 1 – 2%), při teplotě kolem 80°C půdy tají a mohou se rozlévat na Petriho misky, kultivační destičky či do zkumavek – rovnoměrně nebo s proměnnou tloušťkou (šikmý agar)
- Druhy kultivačních půd:
 - Základní – bohaté na živiny, sušené masové extrakty nebo peptony (= produkty připravené z bílkovin – jater, sóji, kaseinu, kvasničného extraktu, mléka – proteiny jsou natráveny enzymy – papain, pankreatin, trypsin, pepsin atd.), obvykle 0,5% NaCl
 - Obohacené – vit., AMK, cukry, koenzymy, Fe³⁺ soli; př. krevní agar – obsahuje hemin (růst. faktor hemofilů)

- Diagnostické – sledování biochemických vl. – schopnost využít cukry, deaminovat AMK, štěpit močovinu a produkovat charakteristické produkty (sulfan, indol, pigmenty atd.) či enzymy; testuje se též schopnost tolerovat inhibitory růstu (NaCl, KCN atd.)
- Selektivní – obsahují inhibitory (NaCl, azidy, teluričnany, seleničnany, žlučové kys., Atb); Šulova půda pro průkaz mykobakterií
- Selektivně diagnostické – obsahují jak inhibitory, tak indikátory = umožňují selektivní záchyt i předběžnou identifikaci patogenu; Endova půda, MacConkey, deoxycholát-citrátový agar, média s bezbarvým substrátem a navázaným chromoforem (utilizací substrátu se kolonie projeví zbarvením, popřípadě fluorescencí; žluč-eskulinový agar pro identifikaci enterokoků nebo Rambachův agar pro diferenciaci enterobakterií)
- Transportní – většinou tekuté (u gonokoků – citlivé na vyschnutí), obsahují obvykle thioglykolát, fosfátový pufr a soli, minimum živin; Amiesovo, Stuartovo nebo Cary-Blairovo médium
- Vybrané půdy a jejich vlastnosti:
 - **Živné půdy** – masový extrakt, pepton, NaCl
 - **Krevní agar** – základem je živná půda s přidávkou 7% krve, přítomnost a povaha hemolýzy
 - **Endova půda** – pepton, NaCl, laktóza, siřičitan Na, bazický fuchsin; na světle růžová, **laktóza-pozitivní bakterie** zkvašují laktózu na aldehydy – reagují s fuchsinem = Schiffovi báze – **červené** kolonie
 - **MacConkey** – pepton, NaCl, laktóza, acidobazický indikátor, **laktóza-pozitivní bakterie** zkvašují laktózu za vzniku kyseliny – **růžová červená** barva kolonií nebo **žlutá**; může být tuhá (zahuštěna agarem) nebo tekutá (v tekutém médiu produkce plynu)
 - zpomaluje růst G+ bakterií, podporuje růst G- bakterií
 - **Deoxycholát-citrátový agar** – citronan Na, citronan Fe³⁺, thiosíran Na, deoxycholát Na, laktóza, acidobazický indikátor (neutrální červeň); růst G+ je inhibován, **G-neg. zkvašující laktózu** okyselují okolí – **růžová až červená**, laktóza-negativní rostou v bílých koloniích, bakterie produkující sulfan (**salmonely, Citrobacter**) kolonie s **černou** sraženinou sulfidů Fe
 - **Žluč-eskulinový agar** – eskulin (β-glukosidohydroxykumarin), Fe³⁺, citronan, žluč; bakterie produkující β-glukosidázu hydrolyzují eskulin na eskuletin – s Fe tvoří **šedé/hnědočerné** komplexy, specifická pro **enterokoky**
 - **Wilson-Blairova půda** – pepton, siřičitan Na, citronan bismutitý, brilliantová zeleň, hydrogenfosforečnan Na, síran Fe²⁺; citronan a b. zeleň potlačují růst koliformních bakterií kromě **salmonel** – ty produkují sultan a redukují tak soli bismutu = **černé až hnědočerné** kolonie s kovovým leskem okolí
 - **Claubergova půda** – pepton, krev, glycerol, teluričnan Na; **korynebakterie** – redukují teluričnan na elementární Te – u C. diphtheriae šedé kolonie (dle charakteru zbarvení možno odlišit typ – gravis, intermedius, mitis), kolonie jiných bakterií – černá či bílá barva
 - **Tinsdalova půda** – pepton, kvasničný extrakt, sérum, cystin a teluričnan Na, diferenciálním znakem je šedočerný zákal (halo) kolem některých kolonií – produkt reakce Te se sulfanem
 - **Čokoládový agar** – připraven přidáním krve do agarového základu při 85°C, je hnědý (barva vzniká tepelnou denaturací krve), růst **náročných bak. – N. gonorrhoeae, bordetely, hemofily**
 - **Löwensteinova-Jensenova půda** – asparagin nebo hydrolyzát kaseinu, glycerol, vaječný žlutek a bílek, škrob, soli, malachitovou zeleň; vzhled – žlutá až nazelenalá, zakalená; kultivace **mykobakterií**
 - **Sabouraudova půda** – pepton, Glc či maltóza, vzhled – bezbarvá až nažloutlá, růst **kvasinek a plísní**
 - **Mueller - Hinton agar** - ATB testy
- Popsat očkování na pevné a tekuté půdy
- Kultivace v definované atmosféře – popsat anaeroby (viz. 39)

9 Vlastnosti a kultivace anaerobních bakterií

- Sporulující (př. klostridia, působí specifickými toxiny) x nesporulující (specifické nástroje virulence, způsobují nespecifické hnisavé nemoci často endogenního původu); striktně anaerobní, mikroaerofilní, aerotolerantní
- Velmi heterogenní skupina, obsahují i extrémofilní druhy – termofilní, psychofilní, halofilní, acidofilní, alkalofilní, barofilní + někteří jsou původci velmi závažných onemocnění

Kultivace

- Nutný vhodný výběr materiálu, správný odběr a transport – i přes správný postup je kultivační záchyt nejistý
- Hnisavé abscesy, treacheální a plicní aspiráty, pleurální a ascitické tekutiny, hnis, biopsie, krev, žluč
- Nejvhodnější jsou části tkání a aspiráty
- Nutné anaerobní prostředí
- Transportní média – určena pro transport tamponů, Amiesovo nebo Stuartovo médium
- Kapalně vzorky – do stříkačky s vytlačeným vzduchem, jehlu zabodnout do gumové zátky
- Před kultivací makroskopický vzhled se zápachem a mikroskopické vyšetření
- Kultivační půdy s nízkým redox potenciálem (cca 150 mV) – obvykle VL-médium (masokvasničný extrakt) – obsahuje hydrolyzát kaseinu, kvasničný autolyzát, masový vývar, cystein, glukosu, soli
- Při kultivaci je důležitá atmosféra – musí být bez kyslíku
 - Izolované rukavicové boxy s anaerobní atm
 - Biologické odstranění kyslíku v uzavřených Petriho miskách = **Fortnerova metoda** – část povrchu agaru se naočkuje aerobní bakterií (*Serratia marcescens*), část se naočkuje anaerobem, miska se uzavře zalepením plastelínou a inkubuje se
 - Anaerostaty – kyslík se odstraní fyzikálně (profoukávání inertním plynem – př. dusíkem) či chemicky (zapálená svíčka, přídavek alkalického roztoku pyrogallolu)
 - Dnes se používá řada komerčních systémů – sáčky se směsí tetrahydroboritanu, hydrogenuhličitanu a kys. vinné, ze které se po přidání vody vyvíjí vodík a CO₂ – kyslík se spotřebovává reakcí s vodíkem
- Diferenciace anaerobů – mikroskopie (vzhled a zápach kolonií) + mikroskopie (tvar buněk a spór, barvení na Grama)
- Biochemické testy
- Průkaz toxinů
- Chromatografické stanovení produktů fermentačního metabolismu

NEJVÝZNAMNĚJŠÍ ANAEROBNÍ PATOGENY	
G+ sporující tyčinky:	<i>Clostridium</i>
G+ a G- nesporující koky:	<i>Peptococcus</i> <i>Peptostreptococcus</i> <i>Veillonella</i>
G- nesporující tyčinky:	<i>Bacteroides</i> <i>Fusobacterium</i> <i>Prevotella</i>
G+ nesporující tyčinky:	<i>Actinomyces</i> <i>Propionibacterium</i>

10 Způsoby barvení bakterií, mikromycet a parazitů

Barvení bakterií

Gramovo barvení - základem je absorpce komplexu krystalové violeti s Lugolovým roztokem do bakteriálních buněk

- diferenciace bakterií tímto barvením je založena na rozdílném vymývání tohoto komplexu organickým rozpouštědlem (aceton/ethanol) a na vlastnostech bakteriální stěny
- G- bakterie mají tenkou stěnu, více lipidů - snadný průnik rozpouštědla, snadné vymytí absorbovaného komplexu -> růžová (červená)
- G+ bakterie mají silnou stěnu - neumožňuje pronikání rozpouštědla - komplex odolává vymývání - modrofialová Positive-Purple

POSTUP

- 1) krystalová Violet - 1 min
- 2) opláchnout a Lugolův roztok - 1 min
- 3) opláchnout vodou
- 4) Aceton - dokud odtéká fialový roztok
- 5) opláchnout vodou
- 6) Karbofuchsun - 1 min
- 7) opláchnout vodou

VLAK

Barvení dle Burriho - tuší, znázornění pouzder

Albert - metachromatická granula

Wirz & Concklin - barvení spór (zelené), těla (červená)

Barvení mikromycet

Ziehl - Neelsen - používá se u acidorezistentních bakterií, které ve své stěně obsahují více než 30% lipidů - špatně absorbují barviva, musejí se barvit za horka -> takto absorbovaná barviva se z nich nedají vymýt - barvení karbofuchsinem, dobarvení malachitovou zelení -> jeví se jako růžové až ohnivě červené na zeleném pozadí

Barvení parazitů

Giemsa - založeno na absorpci Giemsova barviva - na bázi eosinu a methylenové modři

- různé postupy dle povahy preparátu a hledaného organismu
 - bakterie modré, pouzdra světle modré, sliz růžový, prvoci - různě zbarvené organely
- 1) fixovaný preparát do konc/zřed' Giemsova roztoku na 2min/30min/přes noc
 - 2) opláchnout vodou

11 - Metody průkazu produkce toxinu + 12 - Stanovení interakcí bakteriálních hemolysinů

Endotoxiny - test na králících - průkaz botulotoxinu

- **Limulus test:** Tělesná tekutina (hemolymfa) ostrorepa *Limulus polyphemus* obsahuje cirkulující buňky, amoebocyty.
- vystavíme-li lyzát z nich účinku nepatrného množství endotoxinu, během hodiny se srazí
- sraženinu lze odečítat pouhým okem, turbidimetry, příp. v některých modifikacích i podle změny barvy
- Limulus test je pro průkaz endotoxinu vysoce citlivý i specifický

Enterotoxiny - průkaz na kotěti nebo žábě

Exotoxiny

- stanovení hemolysinů

- **CAMP test** - na KA se naočuje čára testovacího kmene (*Staph. aureus*) a křížem čára neznámého testovaného kmene

- v místě překřížení dochází k interakci hemolysinů

pozitivní CAMP test - úplné projasnění ve tvaru motýlích křídel/ mašliček - hovoříme o synergismu

- *Str. agalactiae*, *Listeria monocytogenes*, *L. seeligeri*

negativní CAMP test - hemolýza *S. aureus* není ovlivněna

- *Str. pyogenes*

inverzní CAMP test - hemolysiny jsou antagonické, navzájem se inhibují, KA zůstane v místě překřížení beze změny a v neúplných hemolýzách obou kmenů jsou zakrojeny červené zóny nedotčených ery -

- *Arcanobacterium haemolyticum*, *Corynebacterium ulcerans*

- **hemolýza** - schopnost mikrona rostoucím na KA narušovat ery pod kolonií nebo v jejím okolí

úplná : odbarvení a dokonalé projasnění KA kolem kolonie

- úplný rozpad ery včetně rozložení Hb

- u streptokoků se naývá *beta-hemolýza*: *Str. pyogenes*

- *Staph. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*

neúplná: ztrácí se červená barva KA, půda zůstává zakalená

- *Staph. aureus*, *Staph. epidermidis*

- *Str. agalacticae* - neúplná beta hemolýza

viridace - alfa: Hb se mění na zelený verdoglobín

- viridující ústní streptokoky, *Str. pneumoniae*

- stanovení toxigenity *Corynebacterium diphtheriae*

- na Tinsdalově půdě

13 Metody vyšetření citlivosti na atb (diskové a diluční metody, podmínky pro spolehlivost, limitace, interpretace)

- Přímé vyjádření – MIC
- Nepřímé – inhibiční zóna kolem disku
- Diskový difuzní test
 - Provádí se na Muller-Hintonově agaru – pH 7,2 – 7,4
 - Komerční disky s atb
 - Pro naočkování se do bujony připraví suspenze z kolonií bakterií
 - K naočkování se používá sterilní vatový tampon zvlhčený suspenzí bakterií – očkuje se rovnoměrným rozetřením po celém povrchu plotny
 - Na naočkovanou plotnu se nakladou disky s předepsaným množstvím atb
 - Inkubace 18 – 24 h v termostatu
 - Změří se průměry inhibičních zón – průměry se zapíší a porovnávají

- Princip: atb postupně difunduje a působí na kolonie bakterií – ty se množí, ale podle citlivosti se množit přestávají nebo naopak pokračují dále, atb difunduje jen do určité vzdálenosti – okraj inhibiční zóny
- Diluční test v bujonu
 - Zjišťuje se MIC
 - Provádí se v polystyrenových mikrotitračních destičkách s 12 sloupci a 8 řadami jamek (8 koncentrací atb)
 - Jamky se plní 100 ml bujonu s atb
 - Koncentrace se vybírají tak, že kolem čtvrté jamky je hraniční koncentrace
 - Očkuje se silnými zbroušenými jehlami 1 – 2 ml suspenze o konc. 10^8 bakterií/ml
 - MIC je v první nezakalené jamce = jamka, kde nic neroste
 - Interpretuje se podle tabulek
- Diluční test v agaru
 - Petriho miska obsahuje agar s různou koncentrací atb
 - Na plotnu se bodově naočkuje 30 – 40 kmenů najednou
 - Po inkubaci se odečítá růst ve formě uzavřené kolonie
 - Plotna, kde již nevidíme růst, obsahuje MIC antibiotika
 - Interpretace dle tabulek, je to **referenční metoda**
- E-test
 - Gradientová difúzní metoda stanovení MIC na agarové půdě
 - Na agar se položí kalibrovaný proužek obsahující diskontinuální gradient koncentrací – přilnutím se díky difúzi vytvoří kontinuální gradient
 - Na proužku je vyznačena stupnice s hodnotami MIC
 - Vysoká cena
- Automatická vyšetření
 - MIC – mikrotitrační destičky, v pravidelných intervalech se fotometricky odečítá zákal a hodnoty se porovnávají se zákalem kontrolním (kde nejsou atb), po inkubaci se stanoví jamka, kde není růst
 - Měření inhibičních zón – digitální posuvná měřidla
- Účelem vyšetření je návrh terapie a dávkování
- Vyšetřujeme atb běžně užívaná nebo zástupce podskupin atb, které mají stejný mechanismus účinku nebo chemickou povahu, citlivost některých druhů k některým atb nevyšetřovat – výsledek in vitro neplatí in vivo
- Stanovení produkce beta-laktamázy u stafylokoků, hemofilů, gonokoků a *Branhamella catarrhalis* má větší význam, než zjišťovat jejich citlivost k penicilinu či ampicilinu
- Pokud je nutné neprodleně zahájit atb terapii dříve, než je ukončeno vyšetření, bere se v úvahu nejpravděpodobnější původce nemoci = empirická terapie (léčba bez průkazu původce a jeho citlivosti)
- Laboratorní interpretace
 - Citlivý kmen = jeho MIC je nižší, než break-point (hraniční koncentrace)
 - Rezistentní = MIC je vyšší, než break-point
 - Intermediární kmen
- Multirezistence = kmeny rezistentní k více než 2 atb
- Kombinace znaků rezistence u jednoho kmene se označuje jako **profil rezistence**
- Pro jednotlivé skupiny bakterií jsou k dispozici mezinárodně uznané standardní kmeny



14. Speciální metody pro vyšetření citlivosti na atb

Pro většinu bakterií se k testování citlivosti na antibiotika diskovým difúzním testem DDT používá Mueller-Hintonův agar.

Pro růstově náročnější bakterie (streptokoky, pneumokoky, korynebakterie, moraxelly) je nutno použít Mueller-Hintonův agar obohacený beraní krví, pro hemofily speciální půdu pro kultivaci hemofilů vzhledem k jejich růstovým nárokům -hemin, NAD.

U *Neisseria gonorrhoeae* se neprovádí DDT (nejsou stanoveny breakpointy EUCAST), stanovuje se MIC většinou E-testem a používá se speciální kultivační půda pro gonokoky.

Helicobacter pylori – pomalu rostoucí bakterie – proto se nedoporučuje DDT, nejsou stanoveny breakpointy EUCAST - stanovuje se MIC většinou E-testem.

U významných anaerobních patogenů se také DDT nedoporučuje, stanovují se minimální inhibiční koncentrace – MIC: diluční metodou nebo metodou E-test. Testování probíhá za anaerobních podmínek na půdě vhodné pro kultivaci anaerobů.

U některých bakterií, které v tekutém prostředí špatně rostou nebo autolyzují (např. meningokoky, některé anaeroby) se využívá vyšetření MIC agarovou diluční metodou. Metoda spočívá v použití agarových půd, které obsahují zvolené koncentrace antibiotika (přímo v tom agaru). Obvykle se připravuje 12 – 15 koncentrací jednoho antibiotika v ředění dvojnásobně geometrickou řadou. Na půdy se očkuje standardní inokulum vyšetřovaných bakterií. Po příslušné době inkubace se odečítá MIC jako nejnižší množství ATB, které inhibuje viditelný růst. Tato metodika je však velmi pracná a časově náročná, není vhodná pro rutinní používání, je určena spíše pro referenční laboratoře.

Speciální vyšetření pro průkaz rezistence:

V některých případech nelze rezistenci spolehlivě prokázat žádnou z metod (DDT, MIC, E-test, agarová diluční metoda). Příčin může být několik, někdy antibiotikum není vhodným substrátem pro vyšetření rezistence in vitro nebo vyšetřovaná bakterie vytváří in vitro nízká množství enzymů destruujiících antibiotikum apod. Přítomnost mechanismu rezistence lze spolehlivě detekovat příslušnými molekulárními metodami (zjištění genu rezistence).

Také se odvozuje výsledek vyšetření podle výsledku získaného s jiným antibiotikem, inaktivovaným shodným mechanismem rezistence. Například vyšetření citlivosti k ampicilinu platí v plném rozsahu pro amoxicilin.

Dále se využívá speciálních screeningových vyšetření, která spočívají např. ve stimulaci růstu rezistentních subpopulací nebo indukci produkce enzymů destruujiících antibiotika. (příklady – indukce produkce metylázy stafylokoků a streptokoků /D-test/, vyšetření produkce širokospektrých beta-laktamáz ESBL a karbapenemáz)

15 - Identifikace pomocí fenotypických znaků - otázka 35 ve vyprac.

16 - Detekce agens metodami molekulární biologie - materiál, indikace, interpretace

- přímá dg. - detekce části bb struktury - NK
- využívání komplementární vláken NK, založeno na procesu hybridizace NK
- kultivačně nezávislé - detekce nekultivovatelných/obtížně kultivovatelných/usmrcených/poškozených mikroorganismů
- vysoká citlivost (HCV, HBV, gonokoky)
- rychlá detekce
- možnost vyšetřit jakékoliv vzorky bez ohledu na transportní podmínky

vhodný materiál: periferní krev, likvor, BAL, sputum, sérum, plazma, sperma, moč, tkáň, biopsie kůže, výtěry a stěry, vzorky z katetrů, implantátů

- nesrážlivá krev v roztoku EDTA
- zvýšené riziko kontaminace
- není třeba zanechat organismy životaschopné

17 - Mikrobní obraz poševní. Interpretace výsledků vyšetření

- osídlení se mění věkem
- vaginální laktobycily = Döderleinův bacil
 - rovnováha může být snadno posunuta
 - sexuálně přenosné nemoci
 - přemnožení minoritních složek (ATB, hormony)
 - přemnožení kvasinek
 - přemnožení E.coli

MOP	Zhodnocení	Výtok	Mikroskopický obraz	Poznámka
MOP I	MOP zdravé ženy	Bez výtoku	Převaha epitelů a laktobacilů	Lze prokázat jen u části klinicky zcela zdravých žen
MOP II	Mikrobiální výtok nehnisavý	Mléčně zkalený, někdy nažloutlý; různé hustota i viskozita konzistence	<ul style="list-style-type: none"> Žádné nebo minimální množství leukocytů Množství bakterií (nejčastěji Gardnerella vaginalis) Laktobacily úpině chybějí nebo jen sporadicky 	Přítomnost tzv. „clue cells“ (klíčové buňky) – epitelální buňky poševní sliznice, na něž je adherováno množství různých bakterií
MOP III	Bakteriální výtok hnisavý; bakteriální vaginóza	Hustý bělavý až žlutavý výtok	<ul style="list-style-type: none"> Velké množství polymorfonukleárů Velké množství různých bakterií Laktobacily obvykle chybí Epitelů relativně málo 	Odpovědný většinou pyogenní bakterie – koliformní tyčinky, streptokoky, stafylokoky, enterokoky...
MOP IV	Akutní nebo chronická gonorrhoea	Hustý žlutobílý až žlutozelenavý výtok	<ul style="list-style-type: none"> Akutní stadium – téměř výhradně leukocyty s intra- i extraleukocytárně lokalizovanými G-diplokoky, které vypadají jako kávové zrna Chronické stadium – i příměs jiných bakterií a malého množství epitelů, není tak výrazná převaha leukocytů jako u akutní fáze 	Hodnocení nálezu je obtížné, konečná diagnóza se opírá o opakované kultivační nebo PCR vyšetření.
MOP V	Trichomonóza (Trichomonas vaginalis)	Řidký, bílý, často zpěněný	<ul style="list-style-type: none"> Trichomonas vaginalis Epitelie, leukocyty I laktobacily a směs různých bakterií 	Barveno podle Giemsky – často dochází k rozpadu buněk Trichomonád, lze pozorovat jen fialově červená jádra (obvykle v jednom místě zahrocená) obklopená zbytky namodralé cytoplazmy
MOP VI	Vaginální kandidózy	Různě hustý bělavý výtok	<ul style="list-style-type: none"> Kvasinky (saprofytická i parazitická fáze) Leukocyty mohou a nemusí být Laktobacily a další bakterie 	Není sexuálně přenosná – spíše na základě hormonálních výkyvů, při oslabení, léčbě antibiotiky atd.

18 - Pravidla izolace vhodného materiálu / 31 ústní

- Sterilní odběrové pomůcky, dezinfekce odběrového místa
- Nesterilně mohou být odebírány vzorky na parazitární vyšetření

Odběr dostatečného množství vzorku – pokud máme příliš málo vzorku, stoupá statistická pravděpodobnost nepřítomnosti patogenů, kteří se vyskytují jen v malé koncentraci

Čas a místo odběru – patogen je v různých fázích v různých lokalitách (syfilis, břišní tyfus)

Odběry před zahájením atb terapie

U vyšetření na anaeroby zamezit přítomnosti kyslíku

Poučení pacienta a jeho souhlas

- Transport do laboroky – co nejrychlejší, nedoporučuje se konzervace mrazením ani chlazením, hemokultury a vzorky likvoru se mohou transportovat při 37°C, pro výtěry na tamponech jsou též vhodná transportní média (Stuartovo, Amiesovo, Cary-Blairovo; zabraňují vyschnutí a díky málu živin i množení bakterií), stříkačky s odebraným hnisem na anaeroby lze zabodnou to gumové zátky
- Dokumentace !
- Kůže
 - Samovolně uvolněný či seškrábnutý povrch kůže, seškrab nehtů, chlupy, vousy, vlasy
 - Vředy, abscesy, granulomy – odběr hnisu či exsudátu stříkačkou
 - Otisk na podložní sklíčko (možno i na povrch agarové půdy)
 - Odběr excizí
- Ústní dutina – stěr, v případě větších abscesů odběr tekutiny do stříkačky
- Horní cesty
 - Výtěr z nosní dutiny – do cca 3 cm
 - Výtěr z krku – ráno, nalačno, před ústní hygienou, pacient vyplázne jazyk, vysloví „á“ (elevuje tak uvulu a minimalizuje dávivý reflex), tamponem rychle oťřeme povrch tonzil (neměli bychom se dotknout jiných sliznic)
 - Laryngeální stěr – poměrně zřídka využívaný, tampon zavádíme nad epiglottis, pacient by měl zakašlat (tím zachytíme kapénky sekretu dých. cest)
- Dolní cesty
 - Sputum – ráno před jídlem a hygienou, do sputovky (nádobka se širokým hrdlem a uzávěrem), vzorek je i při správném odběru kontaminován ústní mikroflórou

- Endotracheální aspirát nebo bronchoalveolární laváž – při podezření na pneumonie, zavede se sonda a provede se výplach 30ml fyziologického roztoku
- Technika chráněného odběru – zavede se dvojitý bronchoskopický katetr – umožňuje fibroskopickou kontrolu a odebrání malého množství sekretu (0,001 – 0,01 ml)
- GIT
 - Žaludek – sonda, zvratky (je to hlavně u otravy z jídla, takže je důležité mít i podezřelou potravinu); cílené kultivační nebo mikroskopické vyhledávání H. pylori – biopsie (materiál je transportován v chlazeném médiu)
 - Stolice – průjmy (vyšetřují se i osoby, co byli pouze v blízkém kontaktu s postiženými), NPB nebo průkaz toxinu Cl. difficile; odběry – zavedení tamponu do konečníku, kousek stolice, při podezření na nosičství salmonely se požívá vzorek průjmové stolice vyvolané projímadly, tampony impregnované deoxycholatcitrátovým médiem při hromadných vyšetřeních při epidemii salmonely nebo shigelózy
- Vagina
 - Odběr tamponem ze zadní klenby nebo čípku za kontroly poševním zrcadlem
 - 3 tampony – bakterie, kvasinky, chlamydie + odeberou se i 2 nátěry na mikroskopická podložní sklička pro vyšetření MOP – jeden se barví na Grama a druhý na Giemsu
- Močový trakt
 - Vymočení do sterilní nádoby se širokým hrdlem, před močením omýt, zamezit styku se zevním genitálem
 - První porce moči – zánět přední části uretry
 - Střední proud – cystitida, nefritida
 - Konečný proud – prostatitida
 - Stačí několik ml, u tbc a Weilovi nemoci 100 – 200 ml
 - Odběr cévkované moči – riziko kontaminace v případě dlouho zavedených katetrů
 - Suprapubická punkce – invazivní, ojediněle
 - Vyšetření kvantitativní – proto se vzorky zchlazují na cca 4 °C (omezí se množení)
 - Výtěry z uretry při podezření na kapavku – tampon do transportního média (N. gon je citlivá k vyschnutí)
 - Odběr pro chlamydiové uretritidy – sedře se i epitel s IC uloženými chlamydiemi
- Krevní oběh
 - Diagnostika septických stavů (i při těžkých sepsích bývá koncentrace nízká, proto se využívá hemokultivace = pomnožení v kultivačním médiu), bakteriémie, malignit
 - Pro odběr jsou důležitá aseptická opatření, odběr v určitých časových intervalech opakovaně (zapsat čas)
 - Místo odběru dezinfikovat, po dezinfekci nepalpat, vhodné je odebrat z místa vpichu i kožní stěr
 - Krev se neodebírá nalačno, ale většinou v době vzestupu teploty, třesavky atd. – v krvi je nejvíce bakterií
 - Před zahájením atb terapie
- CNS
 - Lumbální pce – přísně aseptický odběr do uzavřené zkumavky, 5 ml
 - K sterilnímu roztoku je možné přidat trochu glukosy – pro zlepšení zachytu snadno autolyzující N. meningitidis
- Hnis a exsudáty
 - Odsátí do stříkačky nebo excize, při malém množství tekutiny stěr tamponem
 - Často anaeroby – ze stříkačky předtím vytlačíme vzduch a jehlu potom zabodneme do gumové zátky
 - Nátěr (př. obsahu abscesu) na skličko
- Oko – výtěr tamponem navlhčeným fyziologickým roztokem, při podezření na chlamydie seškrab z rohovky nebo spojivky
- Pitevní materiály – nesmějí být konzervovány roztokem formalinu

19 - Pravidla správného transportu vzorků do laboratoře

- Odběrové nádoby je nutno bezpodmínečně dobře uzavřít a dopravovat v kolmé poloze.
- BM je nutné doručit rychle a vhodným způsobem do mikrobiologické laboratoře, nejlépe v termoboxech.
- **Hemokultury a mozkomíšni mok** je nutné dopravit do laboratoře poslem neprodleně po odebrání. Není-li možný okamžitý transport BM v den odběru, využívají se transportní půdy (na stěry, výtěry), ve kterých se obecně uchovává materiál při pokojové teplotě.

- Na **moče** je vhodné použít Uricult, který je zároveň transportní a kultivační půda.
- **Sputa, moče, výpotky, hnis, výtěry a stěry bez užití transportní půdy** je nejlépe uchovávat při teplotě +4°C.
- výtěr tamponem s transp. médiem - 24 hod/ +4°C
- transportní souprava - umožnit odběr vzorku
 - zajistit přežívání mikroorganismů
 - ochránit vzorek před vnější kontaminací
 - ochránit vnější prostředí před kontaminací
 - jednoznačná identifikace vzorku

20 - Metody zpracování vzorků

- viz. předešlé otázky

21 - Validní materiál k vyšetření infekcí krevního řečiště a systémových infekcí

- stěr z kůže z místa vpichu
- krev ze žíly

HEMOKULTURA - při podezření na sepsi, při zvyšující se teplotě, třesavce

- za přísně aseptických podmínek
- set 2-3 lahviček, pro kultivaci aerobních a anaerobních bakterií, každá cca 10 ml, dítě 4 ml
- před nasazením ATB, aby nedošlo k znehodnocení
- odebrat během 24 hod s odstupem 2-3 HK

22 - Validní materiál - dých. cesty, dutina ústní, ucho

- výtěr z krku, tonzil, nosohltanu
- výtěr z nosu
- výtěr z hrtanu
- punktát z paranazálních dutin - punkcí, odsátím
- sputum - kultivace nespecifické flóry
- BAL - bronchoskopie
- výtěr z ucha, sekret ze středouší

23 - Validní materiál - GIT

- výtěr z rektu a stolice na běžné/ostatní patogeny/průkaz antigenů adenovirů a rotavirů/ průkaz toxinu Clostridium difficile/ průkaz antigenu Helicobacter pylori
- obsah žlučových cest - punkce, aspirace, peroperačně, drenáž
- duodenální šťáva na giardie (lamblie) - sondou při vyšetření GIT
- žaludeční laváž - sondou

24 - Validní materiál - močové cesty

- ranní moč po omytí genitálu - střední proud
- cévkovaná moč
- punkcí močového měchýře

25 - Validní materiál - pohlavní systém

muži

- výtěr z uretry, sekret z uretry sekret z prostaty
- ejakulát

ženy

- výtěr z pochvy (vždy 2 - jeden bakterie, druhý kvasinky), cervixu, uretry
- sekret z Bartoliniho žláz - sekret, punkce
- punkce Douglasova prostoru
- MOP - sekret pochvy

26 - Validní materiál - CNS

- likvor - lumbální punkce - první dvě kapky nechat odtéct, poté min 2 l do 2 zkumavek - první biochem, druhá kultivace
- mozkový absces - punkce

27 - Validní materiál - oční infekce

- výtěr z oka, z esojivkového vaku

28 - Validní materiál - kožní infekce

- stěr a výtěr z kůže, povrchových ložisek, ran, píštělí, dekubitů - tamponem, spíše z hlubších partií
 - kde lze, tak nabrat sekret či hnis do stříkačky
- hnis, obsah patologických ložisek - punkce
- tkáň - biopsie, excize, nekrotická tkáň dekubitů

29 - Mikrobiologické vyšetření bioptického materiálu, punktátu, sekrečního materiálu

biopsie: hlavní náplň práce patologa, vyšetření tkáně ze živého pacienta

punktát: Zpracovává se mikroskopicky (Gram, jen u materiálu odebraných do stříkačky nebo zkumavky, stěry – málo materiálu, neumožňují mikroskopii), kultivačně (END, GPA, aerobně se zvýšenou tenzí CO₂, pomnožení na bujónu, KA pro anaeroby)

- hodnotí se vzhled (zákal), bílkovina, cholesterol, TAG, glu

sekční materiál:

30 - Mikrobiologická kontrola prostředí a sterility - + 31, 32

dekontaminace - ničení a odstraňování mikrobů

sanitace - snížení koncentrace mikrobů

asanace - odstranění rezervoárů a přenašečů původců nálezů

dezinfekce - úplné odstranění původců nálezů

sanace - účinnější než dezinfekce, působí i na viry a spóry

antiseptice - odstranění patogenních organismů z určitého místa lidského těla

aseptice - podmínky a postupy bránící mikrobiální kontaminaci

sterilizace - úplné odstranění životaschopných forem

FYZIKÁLNÍ METODY STERILIZACE A DESINFEKCE

- **SNÍŽENÁ/ZVÝŠENÁ TEPLOTA** - různý účinek, suché/vodní páry, ↑ teplota zvyšuje účinnost chem. prostředků, závisí na vých. počtu mikrobu a době působení - letaltní křivka; chlad - N. gonorrhoeae, C. perfringens - hynou chladovým šokem (t blízko 0°C), většina mikrobů přežívá 4°C; zmrazením pod 0°C většina mikrobů suspendovaných ve vodě nepřežije (mech. poškození růstem krystalů ledu)
- **PASTEURIZACE** - zahřátí kapaliny, při dlouhodobé pasteurizaci na 62°C po dobu 30 min, většinou ale několik vteřin na 70-80°C; krátkodobá konzervace termolabilních tekutin (potravinářských), 99% spolehlivost, přežívají spory a termofilní organismy (Streptococcus faecalis, S. lactis); ultrapasteurizace = mžikové zahřátí kapaliny vstříknutím vodní páry přehřáté na 150°C (ničí prakticky vše včetně spór)
- **TYNDALIZACE** - zahřátí na 60°C po dobu 30-60 min, 6x opakovat á 16-24 hodin, u termolabilních látek
- **VAR ZA NORM. TLAKU** - ve vodě, 100°C, po 2-30 min hubí většinu veget. forem bakterií, virů a kvasinek; přežívají spóry a některé viry; není vhodný ke sterilizaci nástrojů
- **FRAKCIONOVANÁ STERILIZACE** - varem při 100°C po dobu 30 min, 3x opakovat á 16-24 hodin; za snížené teploty resistantní spóry vyklíčí, následný var vegetativní formy zničí; v tzv. Kochových hrncích, Arnoldových sterilizátorech proudem nasycené vodní páry (pára 80-100°C v průmyslu k desinfekci papíru a textilu)
- **VAR POD TLAKEM** - působení přehřáté vodní páry, bod varu vody závisí na přetlaku (200 kPa - 121°C, 300 kPa - 134°C); těchto tlaků dosahujeme v autoklávech = silnostěnná kovová nádoba, přívod přehřáté páry z vyvíječe; doporučení: 20 min 121°C a 10 min 134°C → bezpečné zničení všech forem mikroorganismů; denaturace prionů není spolehlivá ani při 1 hodině 134°C

- *HORKÝM VZDUCHEM* - horkovzdušné sterilizátory, ohřev do 200°C, nucený oběh vzduchu; suché teplo méně účinné než vlhké → vyšší teplota, delší doba: 160-180°C po dobu 1-2 hodin; spóry zničeny při 180°C za 15 min
- *HORKÝ OLEJ* - olejová lázeň, teplota kolem 200°C, sterilizace zubařských (kovových) nástrojů
- *PLAMEN* - protažení plamenem není zcela spolehlivé (jen zahřátí do červeného žáru, ale to je omezeno jen na bakteriologické klíčky)
- *FILTRACE* - mech. oddělení částic z termolabilních kapalin nebo plynů; podle požadovaného stupně - různé filtry (materiál, velikost pórů), filtry: keramické, azbestové, skleněné, kolodiové → filtrační zařízení → protlačování nebo odsávání kapaliny; velikost pórů → většina virů projde (jen velké zachyceny)
- *UV ZÁŘENÍ* - 210-330 nm, baktericidně, účinnost klesá s čtvercem vzdálenosti, jen v nezastíněném prostoru, poškozuje zrak, letální dávka se liší, hl. tzv. germicidní zářivky - jen do vzdálenosti 0,5 m, dodatková dekontaminace místností (pítevný, laboratoře)
- *IONISUJÍCÍ ZÁŘENÍ* - gama záření, ^{60}Co , proniká většinou materiálů, nezahřívá, nezanechává residua, sterilizace nástrojů, doporučená dávka je 25 kGy, neničí spolehlivě některé viry (hepatitidy, HIV)
- *NÍZKOTEPLTNÍ PLASMA* - v komorách - evakuovány a naplněny parami peroxidu vodíku nebo peroctové kys., vysokofrekvenční elektromag. pole převede páry na reaktivní radikály - při teplotě 50°C během 20 min spolehlivá sterilizace většiny suchých materiálů
- *MIKROVLNY* - frekvence MHz až GHz, vytvářejí uvnitř mikrobiální b. teplo, podobný účinek jako var ve vodě, půs. dobře na mikroorganismy ve vodní suspenzi, minimální účinek na bakteriální spóry, které neobsahují vodu; nedají se použít na el. vodivé materiály
- *OSMOTICKÝ TLAK* - zvýš. koncentrací anorg. solí, potlačení růstu některých mikroorganismů, konzervace potravin, dif. dg. bakterií; při ↑ konc. solí a sacharosy → většina bakterií inhibována; řada mikrobů (plísně, kvasinky, některé bakterie) tyto podmínky toleruje

CHEMICKÉ METODY STERILIZACE A DESINFEKCE

- *ANORGANICKÉ KYS. A ZÁSADY* - HCl, HNO₃, H₂SO₄; při pH < 4 usmrcují bakterie i spóry koagulací bílkovin; omezené použití (poškozují); NaOH, KOH, Ca(OH)₂, CaO: účinné na bakterie, spóry i viry - při pH > 9 denaturují bílkoviny a zmýdelňují lipidy, žíravé
- *ORGANICKÉ KYSELINY* - kys. octová, mléčná, propionová, benzoová, sorbová, salicylová, citronová; slabé protibakteriální účinky, lepší protiplísňové; potravinářství (konzervační prostředky)
- *MANGANISTAN DRASELNÝ* - KMnO₄, dobře na bakterie, antiseptikum (výplach kůže, ran, sliznic), v konc. 1-2% účinný i na některé viry
- *PEROXID VODÍKU* - 30% roztok, leptavý → používá se jen 3% roztok; uvolňuje kyslík, který působí na bakterie, spóry a viry; velmi labilní
- *PEROXYKyseliny* - peroxomravenčí kys. - antibakteriální, fungicidní, ale nestálá, příprava těsně před použitím (mravenčí kys. + peroxid vodíku); peroxyoctová kys. - nejúčinnější a nejčastěji používaná, desinfekční i sterilizační účinky, Persteril (36-40% roztok), již konc. 0,5% ničí bakterie, mykobakterie, spóry, viry; nepůsobí na cysty protozoí a vajíčka parazitů
- *OZON* - účinný ale labilní, někdy dezinfekce vody
- *HALOGENY A JEJICH SLOUČENINY* - Cl, I, jejich sloučeniny; půs. uvolňováním volných halogenů, dobře účinné na bakterie, kvasinky, plísně, méně na mykobakteria, spóry a některé viry; plynný chlor k desinfekci pitné vody a dekontaminaci odpadních vod, velmi toxický

- *CHLORNANY* - laciné preparáty, hrubá desinfekce, roztok chlornanu sodného je podstatou komerčních preparátů řady SAVO
- *CHLORAMINY* - deriváty chloraminu (H_2NCl), uvolňují jako chlornany aktivní chlor, obecně účinnější, nejběžnější Chloramin B (konc. 2%, 30 min), pokud konc. 5% a několik hodin - i na spóry, mykobakterie, a viry, přidáním amonných solí (aktivace) se účinek zrychluje
- *DICHLORISOKYANURÁT SODNÝ* - působí rychleji a účinněji než chlornany a chloraminy i na mykobakterie, viry a spóry
- *JOD* - roztoky nebo kovalentně vázaný na org. nosiče (jodofory), nerozpustný ve vodě, rozpouští se dobře v roztoku jodidu draselného za vzniku polyjodidů (Lugolův roztok), slabé desinfekční účinky, pro výplachy sliznic; jodová tinktura = jod + jodid draselný + ethanol → velmi dobře na všechny mikroorganismy včetně spór, mykobakterií, plísní a prvoků; nejspolehlivější antiseptika kůže a okolí ran
- *ALKOHOLY* - denaturace bílkovin nebo dehydratace, nepůsobí na spóry a většinu virů, účinnost stoupá s délkou řetězce; hlavně ethanol a isomery propanolu; součástí řady preparátů pro desinfekci rukou - zesilují účinky aldehydů, oxidačních činidel a kyselin; další: triethylenglykol - páry k dezinfekci ovzduší v uzavřených místnostech, glycerol - dekontaminace a konzervace virových kultur
- *ETHYLENOXID* - plynný, toxický, velmi reaktivní; výborné sterilizační účinky na všechny mikroby včetně spór; sterilizace nástrojů a pomůcek zatavených vobalech z plastové folie (proniká do plastů) - sterilizátory: 10% ethylenoxidu a 90% CO_2 , zvýš. vlhkost, teplota do $50^\circ C$, 2-24 hodin
- *ALDEHYDY* - formaldehyd (ve vodě 40% = formalin, formol), ničí vegetativní formy bakterií i spóry, mykobakteria, plísně a viry; hrubá desinfekce 2-20% koncentrace ve směsi s vodní párou při $60-80^\circ C$ - sterilizace nástrojů a choulostivých předmětů; korozivní účinky, dráždivý zápach, toxický, kancerogenní; glutaraldehyd - méně dráždivý, olejovitý, desinfekce nástrojů (před použitím opláchnout)
- *DERIVÁTY FENOLU* - fenol je klasické antiseptikum - inaktivace enzymů a koagulace proteinů, toxický, desinfekční účinnost poměrně malá; dnes konservans farmaceutických preparátů; k desinfekci ve směsi s kafrem a ethanolem (Chlumského roztok); kresol - 10% vodný roztok, hrubá desinfekce; chlorhexidin - účinná složka Spitadermu, residuální půs., baktericidní, fungicidní, nepůsobí na mykobakteria, spóry a viry
- *BARVIVA* - akridinová a trifenylnmethanová, desinfekce kůže a sliznic, dobře na bakterie, kvasinky a spóry
- *POVRCHOVĚ AKTIVNÍ LÁTKY* - detergenty, mech. snižování povrch. napětí, změn povrch. struktur, inaktivace specif. enzymů a koagulace bílkovin; spíše bakteriostatický účinek, většinou jen na G+ bakterie a plísně, nepůsobí na mykobakteria, spóry a viry
- *ANION-AKTIVNÍ SLOUČENINY* - různé druhy mýdel (drasel. a sodných solí vyšších MK), nemají desinf. úč.
- *AMFOTENSIDY* - amfoterní sloučeniny, účinnější než kvartérní slouč., baktericidní a fungicidní účinek
- *NEIONOGENNÍ TENSIDY* - komerční přípravky řady Tween nebo Triton; pro desinfekci nemají praktický význam
- *KATION-AKTIVNÍ SLOUČENINY* - kvartérní amonné báze; komerční preparáty - Ajatin, Septonex, Mukoseptonex, Centrimid; dobře na G+ bakterie a plísně, špatně na G- bakterie, neúčinné na mykobakteria, spóry a viry
- *AZID SODNÝ* - NaN_3 , i v malých konc. (0,001 - 0,003%) účinný na G+ i G- bakterie, kvasinky a plísně; desinfekce a konzervace biologických materiálů - dg. preparáty, léčiva
- *RTUŤ A JEJÍ SLOUČENINY* - klasickým desinfekčním prostředkem - sublimát a oxycyanát; toxické, málo účinné, již se nepoužívají; org. slouč. méně toxické ale také málo účinné
- *STŘÍBRO* - $AgNO_3$ v 1% roztoku - vykapávání spojivkových vaků novorozenců (prevence gonorrhoeické ophtalmia neonatorum. credéiase); komplexní chlorostříbrnan sodný (komerční Sagen) k desinfekci menších zdrojů vody (konc. 10 g/m^3)

- **CÍN** - organocínité sloučeniny, dobře na bakterie, mykobakterie, spóry, fungicidní, residuální účinek; toxické, hlavně ochrana stavebních konstrukcí a v zemědělství
- **MĚĎ** - baktericidní a fungicidní účinek sloučenin, toxické; postřiky s modrou skalicí při ochraně rostlin

KONTROLA STERILIZAČNÍCH PROCESŮ

fyzikální metody: záznam správné činnosti sterilizačního zařízení zapisovacím zařízením (termografem)

chemické metody: změna barvy indikátoru, který se vkládá do sterilizačního zařízení
např. skleněné indikátorové trubičky Sterilan - obsah mění při teplotě nad 120 °C barvu z růžové na zelenou

biologické metody: kontrolní sterilizace indikátorových kmenů sporulujících bacilů
- po sterilizaci se kontrolní kmeny 7 dní inkubují - jejich růst dokazuje neúčinnost příslušného ster. procesu

MIKROBIOLOGICKÁ KONTROLA PROSTŘEDÍ

- obvykle se používají *aeroskopy*, které pracují na principu vysavače: pomocí ventilátoru se nasává kontrolovaný vzduch a je vyfukován proti polotuhému kultivačnímu médiu
- po inkubaci je možné spočítat CFU (colony forming unit)
- sedimentační metoda : položit Petriho misku s KA nebo živným agarem dnem dolů na daný povrch, hodinu nechat exponovat, přes noc inkubovat a pak spočítat vyrostlé kolonie (CFU)

33 - Pravidla bezpečnosti práce v prostředí rizika profesionálních infekcí

Info od kamarádky

lahvičku s hemokulturou - vědět jak ji získáte (sterilní odběr krve - popište co víte z ošetřovatelství), co se s ní dělá - inkubace při 37°C, pak se dává hned pod mikro, abyste mohli říct aspoň předběžnou diagnózu, pak teprve na agary

na agaru (někdo měl *S. aureus* - ptali se ho co je CAMP test a co u něj roste jako satelitní kolonie

neřešte antigenní struktury a kdo štěpí jaké cukr - vědět kok/tyč, G-/G+, na čem to vyrostě, jak to získáte, co vám to udělá v těle a jak se toho zbavíte, na klinice bazírujou úplně nejvíc ale nechtějí zálužnosti

McConkey pro Enterobakterie
Ž-E pro enterokoky

Kultivace moči močová destička

McConkey	McConkey	McConkey
10 µl neředěné moči	10 µl 10 x ředěné moči	1 µl 10 x ředěné moči
Krevní agar	Krevní agar	Žluč/Eskulin
10 µl 10 x ředěné moči	1 µl 10 x ředěné moči	1 µl neředěné moči

Hodnotí se počet kolonií x ředění x množství moči
→ Přibližné množství bakterií v moči (bakteriurie)