MIKROBIOLOGIE

prim. MUDr. Václava Adámková
prof. RNDr. Libuše Kolářová, CSc.

ÚIM a ÚLBLD 1. LF UK a VFN

PATOGENITA A VIRULENCE MIKROORGANISMŮ

- **PATOGENITA** – schopnost mikroorganismu vyvolat onemocnění (vlastnost druhová)
- **VIRULENCE** – míra patogenity (vlastnost individuální)
- **KOLONIZACE** – osídlení nepatogenním mikroorganismem, popř. kdy usazený patogen nevyvolává klinické příznaky onemocnění

KOCHOVY POSTULÁTY

1. Gen/jeho produkt se musí vyskytovat u těch kmenů, které vyvolávají onemocnění, a ne u kmenů avirulentních, které chorobné příznaky nevyvolávají.

2. Poškození genu u virulentního kmene musí snížit jeho virulenci, resp. zavedení genu do avirulentního kmene musí učinit kmen virulentním.

3. Musí se prokázat, že v určitém okamžiku infekce je gen exprimován.

4. Protilátky proti produktu daného genu musí být protekční (musí chránit před onemocněním), resp. u buněčné imunity produkt genu musí vyvolat protekční imunitu.

PŘIROZENÁ PATOGENITA – její součástí je přenosnost, která je nutná k šíření přirozeného onemocnění v populaci

- **primární** (obligátní) patogen: vyvolá onemocnění u zdravého jedince
- **Fakultativní (oportunní)** patogen: vyvolá onemocnění jen za určitých podmínek

EXPERIMENTÁLNÍ PATOGENITA – schopnost vyvolat onemocnění u pokusných zvířat

OBLIGÁTNÍ PATOGENY

- Původci „klasických“ nákaz: *Corynebacterium diphtheriae* (záškrt); *Salmonella* Typhi (břišní tyfus); *Neissseria gonorrhoeae* (kapavka)…

- Míra patogenity různá i u obligátních patogenů (*Yersinia pestis* je více patogenní než *Streptococcus pyogenes*)

- Specializace na jeden hostitelský druh (shigelly, gonokoky – člověk) x infekce různých druhů (stafylokoky, virus vztekliny)

FAKULTATIVNÍ PATOGENY

Podmínky pro vznik infekce

- **změna místa přirozeného výskytu**
  (*Escherichia coli*: střevo x močové ústrojí, krevní řečiště…)

- **snížení odolnosti hostitele**
  (cukrovka, kortikoidy, antibiotika, tumory, přítomnost cizích těles)

VIRULENCE

Kmeny vysoce, středně, málo virulentní

- LD_{50} – 50% letální dávka – takové množství mikroorganismu, které **usmrtí 50 % infikovaných experimentálních zvířat**
- ID_{50} - 50% infekční dávka – **dávka schopná vyvolat nákazu u 50 % naočkovaných osob**
- **Atenuace** – umělé snižování virulence
- **Zesílení virulence** – opakované pasážování na stejném druhu hostitele

SLOŽKY PATOGENITY (VIRULENCE)

- **KONTAGIOZITA** (přenosnost) – schopnost mikroba přenášet se mezi jednotlivými hostiteli

- **INVAZIVITA**

  a) schopnost vstoupit do hostitele (adherence, pomnožení, penetrace)

  b) schopnost množit se ve vnitřním prostředí hostitele

  c) schopnost šířit se ve vnitřním prostředí hostitele

- **TOXICITA**

PATOGENEZE INFEKCE

MIKROORGANISMUS

- patogenita mikroba
- virulence kmene
- infekční dávka

MAKROORGANISMUS

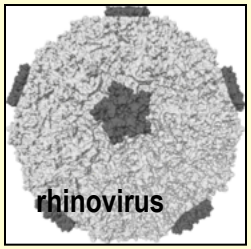
- vnímavost hostitele
- stupeň nespecifické odolnosti
- kvalita specifické odolnosti

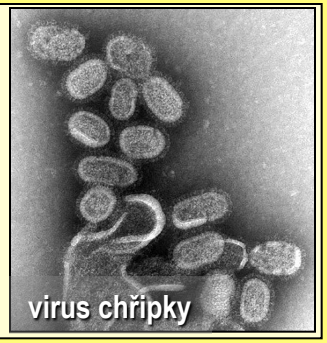
Výsledek infekce: úzdrava, vyhojení s následky, perzistence, smrt

PŮVODCI INFEKČNÍCH NEMOCÍ

A. VIRY

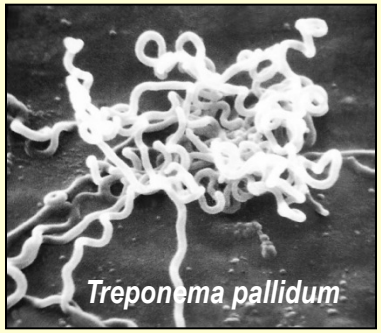
- **satelitní nukleové kyseliny** (tzv.viroidy)
- **priony** (proteinové infekční částice)


rhinovirus

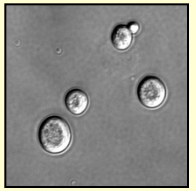

virus chřipky

B. BAKTERIE

Escherichia coli


Treponema pallidum

D. MIKROMYCETY (mikroskopické houby a kvasinky)


kvasinky

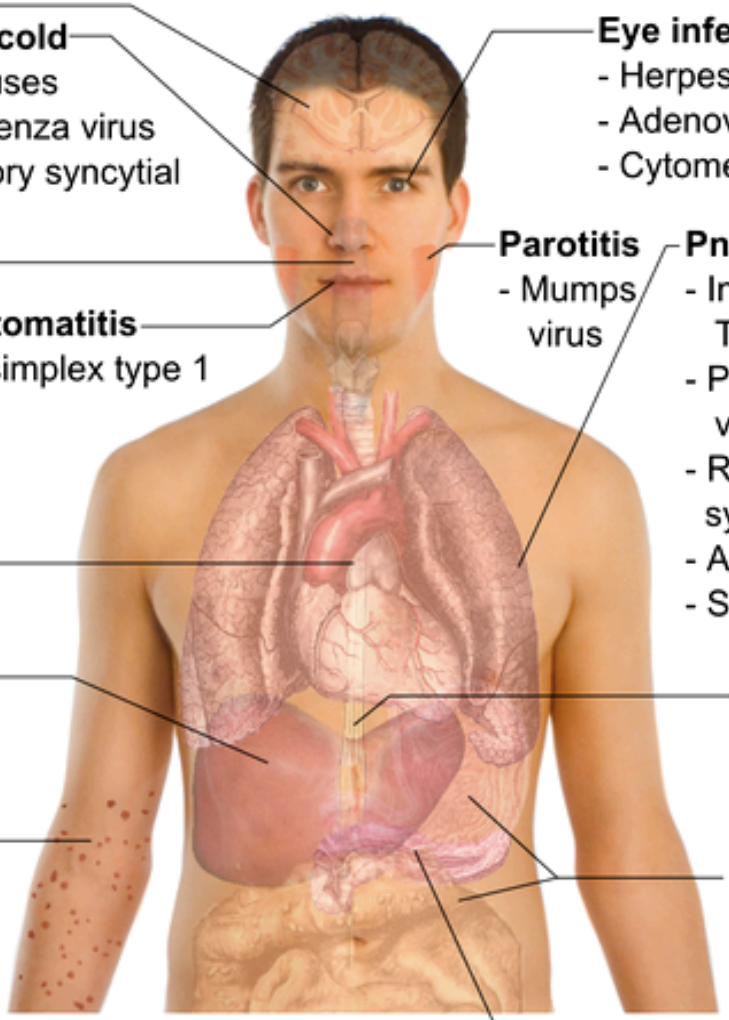
C. PARAZITI

prvoci
helminti
členovci

Giardia

mikrofilárie

PŘEHLED VIROVÝCH INFEKCÍ A JEJICH PŮVODCŮ



Encephalitis/ meningitis
- JC virus
- Measles
- LCM virus
- Arbovirus
- Rabies

Common cold
- Rhinoviruses
- Parainfluenza virus
- Respiratory syncytial virus

Eye infections
- Herpes simplex virus
- Adenovirus
- Cytomegalovirus

Parotitis
- Mumps virus

Pneumonia
- Influenza virus, Types A and B
- Parainfluenza virus
- Respiratory syncytial virus
- Adenovirus
- SARS coronavirus

Pharyngitis
- Adenovirus
- Epstein-Barr virus
- Cytomegalovirus

Gingivostomatitis
- Herpes simplex type 1

Cardiovascular
- Coxsackie B virus

Hepatitis
- Hepatitis virus types A, B, C, D, E

Myelitis
- Poliovirus
- HTLV-I

Skin infections
- Varicella zoster virus
- Human herpesvirus 6
- Smallpox
- Molluscum contagiosum
- Human papillomavirus
- Parvovirus B19
- Rubella
- Measles
- Coxsackie A virus

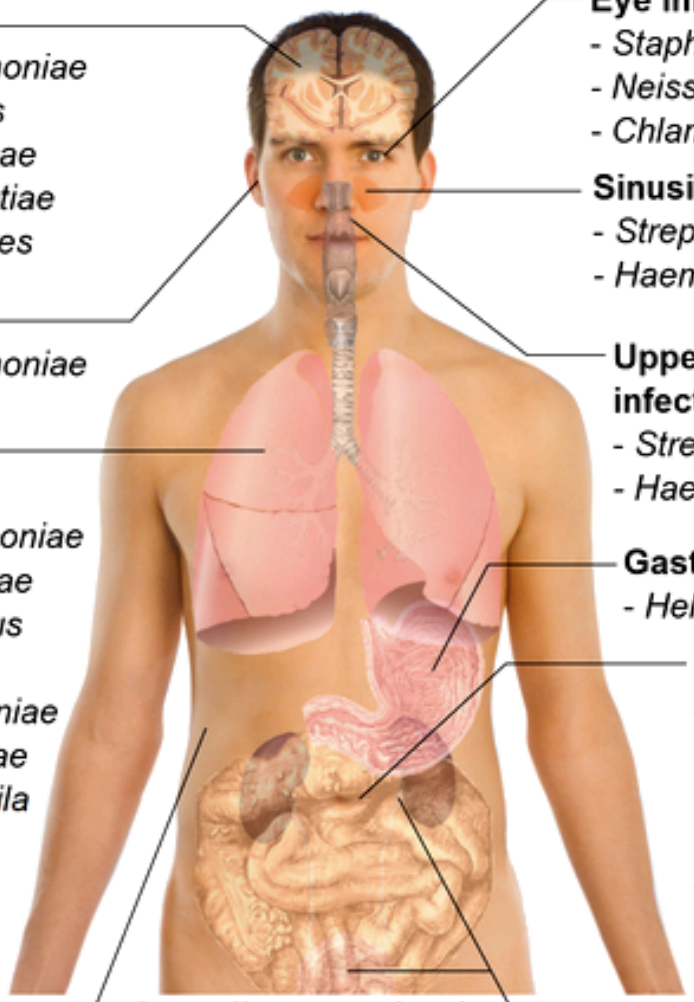
Gastroenteritis
- Adenovirus
- Rotavirus
- Norovirus
- Astrovirus
- Coronavirus

Sexually transmitted diseases
- Herpes simplex type 2
- Human papillomavirus
- HIV

Pancreatitis
- Coxsackie B virus

Autor: Mikael Häggström

PŘEHLED BAKTERIÁLNÍCH INFEKCÍ A JEJICH PŮVODCŮ



Bacterial meningitis
- *Streptococcus pneumoniae*
- *Neisseria meningitidis*
- *Haemophilus influenzae*
- *Streptococcus agalactiae*
- *Listeria monocytogenes*

Otitis media
- *Streptococcus pneumoniae*

Pneumonia
Community-acquired:
- *Streptococcus pneumoniae*
- *Haemophilus influenzae*
- *Staphylococcus aureus*

Atypical:
- *Mycoplasma pneumoniae*
- *Chlamydia pneumoniae*
- *Legionella pneumophila*

Tuberculosis
- *Mycobacterium tuberculosis*

Skin infections
- *Staphylococcus aureus*
- *Streptococcus pyogenes*
- *Pseudomonas aeruginosa*

Sexually transmitted diseases
- *Chlamydia trachomatis*
- *Neisseria gonorrhoeae*
- *Treponema pallidum*
- *Ureaplasma urealyticum*
- *Haemophilus ducreyi*

Eye infections
- *Staphylococcus aureus*
- *Neisseria gonorrhoeae*
- *Chlamydia trachomatis*

Sinusitis
- *Streptococcus pneumoniae*
- *Haemophilus influenzae*

Upper respiratory tract infection
- *Streptococcus pyogenes*
- *Haemophilus influenzae*

Gastritis
- *Helicobacter pylori*

Food poisoning
- *Campylobacter jejuni*
- *Salmonella*
- *Shigella*
- *Clostridium*
- *Staphylococcus aureus*
- *Escherichia coli*

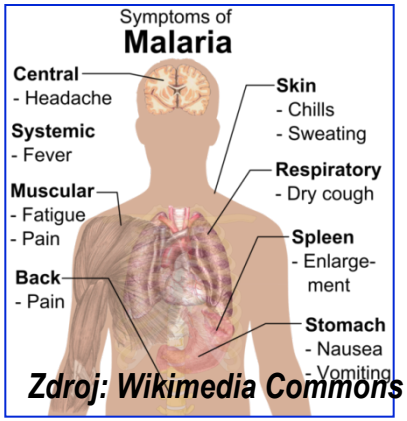
Urinary tract infections
- *Escherichia coli*
- *Other Enterobacteriaceae*
- *Staphylococcus saprophyticus*
- *Pseudomonas aeruginosa*

Autor: Mikael Häggström

PŘEHLED MYKOTICKÝCH INFEKCÍ A JEJICH PŮVODCŮ

MIKROMYCETY	ONEMOCNĚNÍ
KVASINKOVÉ ***Candida***	**moučnivka (soor) - bíle splývající povlak na sliznici úst, jazyka (*Candida albicans*), systémové kandidózy**
Cryptococcus	**u oslabených jedinců smrtelně probíhají infekce plic, meningitidy, sepse**
Pneumocystis	**intersticiální pneumonie u imunokompromitovaných pacientů**
DIMORFNÍ	**plicní nákazy závažně probíhající u imunokompromitovaných osob**
VLÁKNITÉ ***Penicillium***	**dříve považován za nepatogenní, *P. marneffei* (rezervoár bambusové krysy) - diseminované infekce u AIDS pacientů**
Fusarium	**napadají potraviny, kontaminace klinického materiálu**
dermatofyty	**infekce kůže vlasů a nehtů**

PŘEHLED PARAZITICKÝCH INFEKCÍ A JEJICH PŮVODCŮ



Zdroj: Wikimedia Commons

Zdroj: who.int

PŮVODCE	ONEMOCNĚNÍ
plasmodia	**malárie** (*Plasmodium falciparum*, *P. vivax, P. ovale, P.malariae*)
améby	**amébová dyzenterie** (*Entamoeba histolytica*)
leishmanie	**viscerální a kožní leishmaniózy**
toxoplasmy	**toxoplasmóza** (*Toxoplasma gondii*)
škrkavky	**askarióza - střevní obtíže** (*Ascaris lumbricoides*), **larvální toxokaróza - infekce útrobních orgánů, oka** (*Toxocara canis, T. cati*)
tasemnice	**střevní cestodózy, cysticerkóza, hydatidóza**
schistosomy	**schistosomóza** (*Schistosoma mansoni*, *S. haematobium*, *S. japonicum*)
měchovci	**nákaza měchovci - střevní obtíže, anémie**
filárie	**filarióza (elefantiáza, kožní, oční onchocerkóza)**

VÝZNAM MIKROBIOLOGICKÉHO VYŠETŘENÍ

Stanovení původce/zdroje infekce

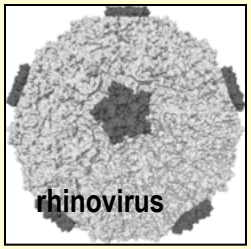
Adekvátní terapie

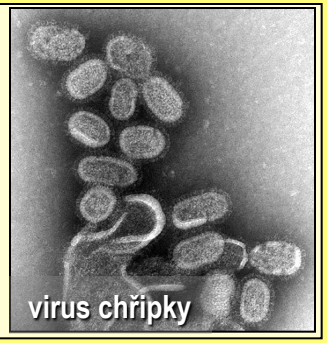
Stanovení účinných opatření vedoucích k omezení šíření infekce

PŮVODCI INFEKČNÍCH NEMOCÍ

A. VIRY

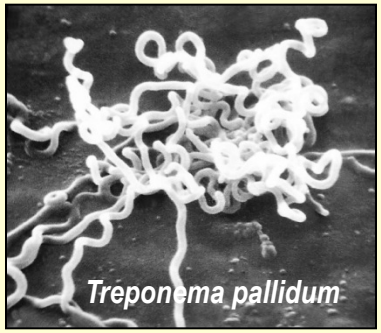
- **satelitní nukleové kyseliny** (tzv.viroidy)
- **priony** (proteinové infekční částice)


rhinovirus

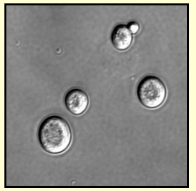

virus chřipky

B. BAKTERIE

Escherichia coli


Treponema pallidum

D. MIKROMYCETY (mikroskopické houby a kvasinky)


kvasinky

C. PARAZITI

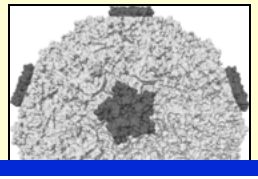
prvoci
helminti
členovci

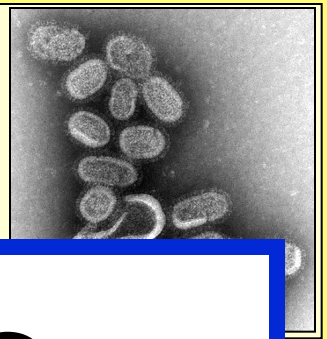
Giardia

mikrofilárie

PŮVODCI INFEKČNÍCH NEMOCÍ

A. VIRY





- **satelitní nukleové kyseliny** (tzv.viroidy)
-

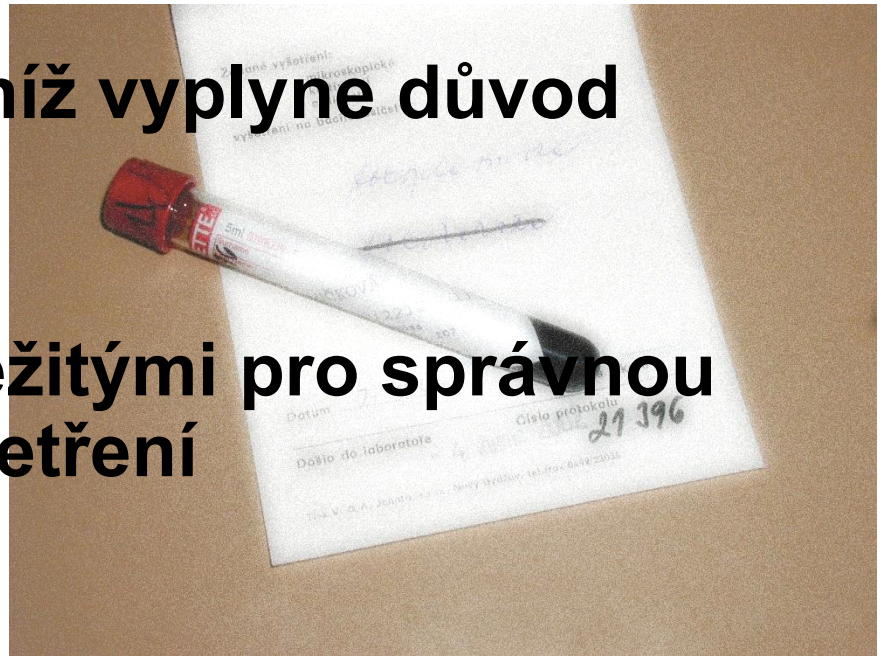
Průkaz každého agens vyžaduje specifický přístup: vhodný materiál + vhodné metody

OBECNÉ PRINCIPY

OZNAČENÍ VZORKU

Transportní nádobky a žádanky musí být označeny:

- **Správně a čitelně**
- **Ještě před odběrem**
- **Relevantní diagnózou, z níž vyplyne důvod požadavku na vyšetření**
- **Dalšími informacemi důležitými pro správnou interpretaci výsledku vyšetření**



STANOVENÍ DIAGNÓZY

KONEČNÁ DIAGNÓZA

KLINIKA + **ANAMNÉZA** + **VÝSLEDKY LABORATORNÍCH VYŠETŘENÍ:**

- **základní**
- **speciální**

ZÁKLADNÍ INFORMACE

- **aktuální klinické údaje**
- **místo lokalizace infekce, zdroj infekce**
- **imunitní stav, implantace cizorodého materiálu, terapie, atd.**
- **věk, bydliště, prodělaná onemocnění, rodinná anamnéza, gravidita,**
- **stravovací návyky**
- **profesní a zájmové aktivity**

  zaměstnání, kontakt se zvířaty, jedovatými látkami, zahradničení, koupání v přírodních sladkovodních nádržích, pobodání členovci, apod.

- **cestovatelská anamnéza** (podrobný popis míst pobytu, čas a délka pobytu)

„exotické“ infekce:
www.who.int; www.cdc.com

KLINICKÉ PROJEVY

SUBJEKTIVNÍ OBTÍŽE PACIENTA
gastrointestinální, kožní, jaterní, neurologické, oční, urogenitální, plicní, renální, svalové, apod.

+

horečnaté stavy
třesavka,
zimnice
úbytek na váze
nechutenství aj.

FYZIKÁLNÍ VYŠETŘENÍ ODBORNÍKEM

kožní
hepatosplenické
oční komplikace
lymfatické
neurologické
plicní
atd.

ZÁKLADNÍ LABORATORNÍ VYŠETŘENÍ

Odběr krve, separace séra

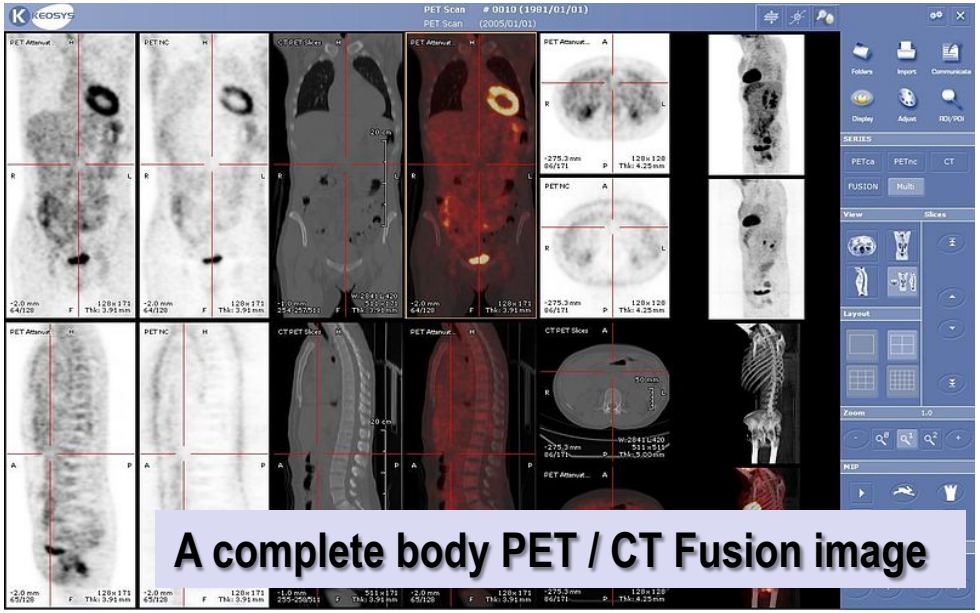
KO
Cholesterol celkový
Glykémie
Jaterní testy (ALT, AST)
Urea, kreatinin

SPECIÁLNÍ BIOCHEMICKÉ VYŠETŘENÍ

Odběr krve, separace séra

Při podezření na infekční proces:
FW,
CRP,…..

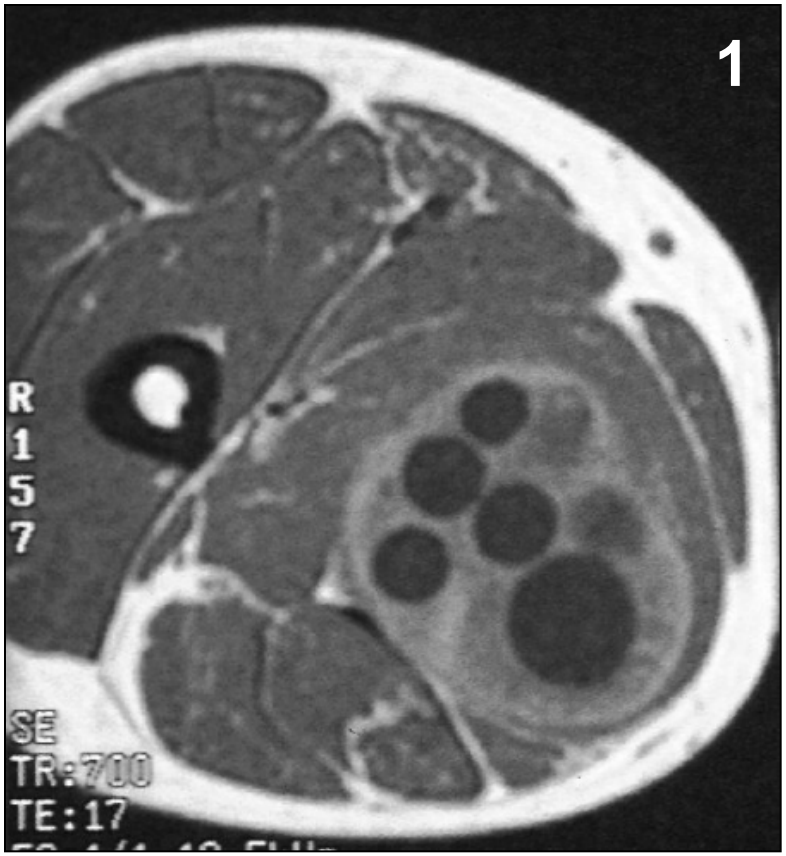
ZOBRAZOVACÍ METODY

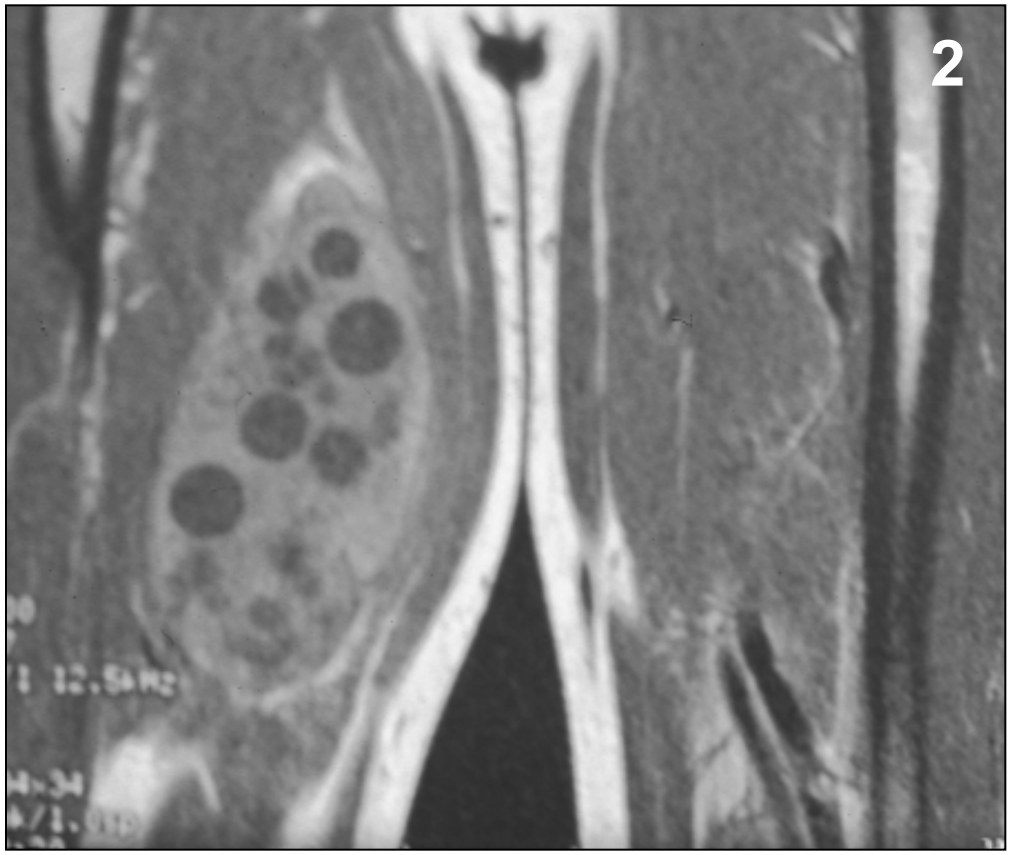


Např. RTG, UZ, MRI, PET, CT, oftalmologické vyš.

Zdroj obrázků : Forstl a kol. Atlas Lékařské arazitologie, Wikimedia Commons

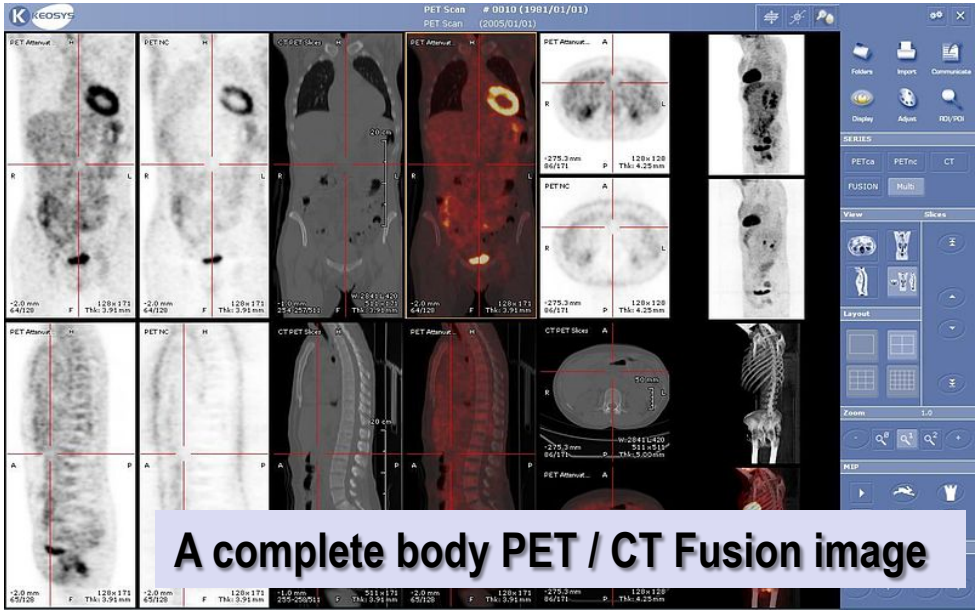
CT:
CE: CYSTS IN THE SPLEEN (1) AND MUSCLES (2)





Source: Atlas of Medical Parasitology, Autor Pietro Caramello, MD

ZOBRAZOVACÍ METODY



Např. RTG, UZ, MRI, PET, CT, oftalmologické vyš.

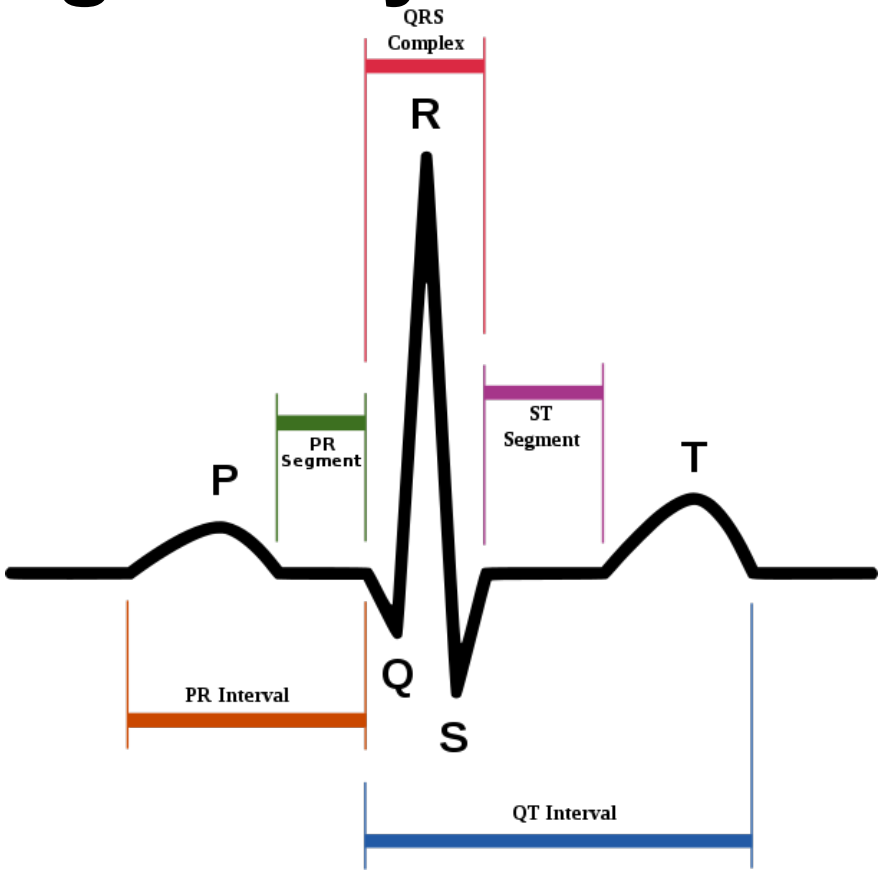
- **Každá metoda má své +/-**
- **Extrémně výhodné zvláště pro charakteri-zaci patologických změn v CNS**

Zdroj obrázků : Forstl a kol. Atlas Lékařské arazitologie, Wikimedia Commons

PŘÍKLADY JINÝCH SPEC. VYŠ.

EKG – elektrokardiologické vyšetření

ECHO – echokardiologické vyšetření



Zdroj obrázku : Wikimedia Commons

SPECIÁLNÍ MIKROBIOLOGICKÉ VYŠETŘENÍ

Vzorky se vždy odebírají před zahájením terapie!!!

FAKTORY MÍRY ÚSPĚŠNOSTI MIKROBIOLOGICKÉHO VYŠETŘENÍ

VALIDNÍ **KLINICKÉ + ANAMNESTICKÉ ÚDAJE**

+

- VALIDNÍ **VZOREK**
  - ze správného místa
  - optimální doba odběru
  - správná technika odběru
  - dodržení podmínek skladování a transportu

  } **PRE-ANALYTICKÁ FÁZE**

- KVALITNÍ **LABORATORNÍ PROCES**

- SPRÁVNÁ **INTERPRETACE** VÝSLEDKU

} **ANALYTICKÁ FÁZE**

↓ ↓ ↓

správná - terapie, epidemiologická opatření

ZÁSADY ODBĚRU

KAŽDÝ vzorek na mikrobiologické vyšetření musí splňovat:

Klinickou validitu

- odběr ze **správného místa** (kde lze předpokládat přítomnost mikroba)

Technickou validitu

odběr

- ve **správný čas** (před podáním antibiotika)
- **správným způsobem** (*lege artis*, asepticky)
- **do správných souprav** (označené sterilní nádoby; popř. transportní média)

VALIDNÍ VZOREK

1. **odběr z místa pravděpodobného výskytu infekčního agens**

2 **záchyt optimálního množství materiálu (tj. agens) z místa infekce**

praxe:

-- **preference odběru tekutých vzorků – hnisy, obsahy primárně sterilních dutin aspirací injekční stříkačkou** (odběr tekutých vzorků tamponem často nevhodné = riziko falešně negativních výsledků, kontaminace)

-- **stěry a výtěry tampónem**: pouze infekce orofaryngeální, nazofaryngeální, ušní, oční, některé urogenitální, při podezření na bakteriální - povrchové kožní léze, rektální urogenitální a (s výjimkou parazitárních) rektální

VALIDNÍ VZOREK

3. **optimální doba odběru**

4. **správná technika odběru**

Vhodná odběrová souprava

- **výtěry**: tampóny např. na tyčince nebo drátku v kombinaci se zkumavkami

- **tekuté vzorky** (např. moč): sterilní nádoby se širším hrdlem

- **hnis, aspirát**: injekční stříkačka na jedno použití uzavřená plastovou zátkou (nikdy jehlou)

Vždy dodržení doporučeného množství minimálního množství materiálu

ZASÍLÁNÍ DO LABORATOŘE

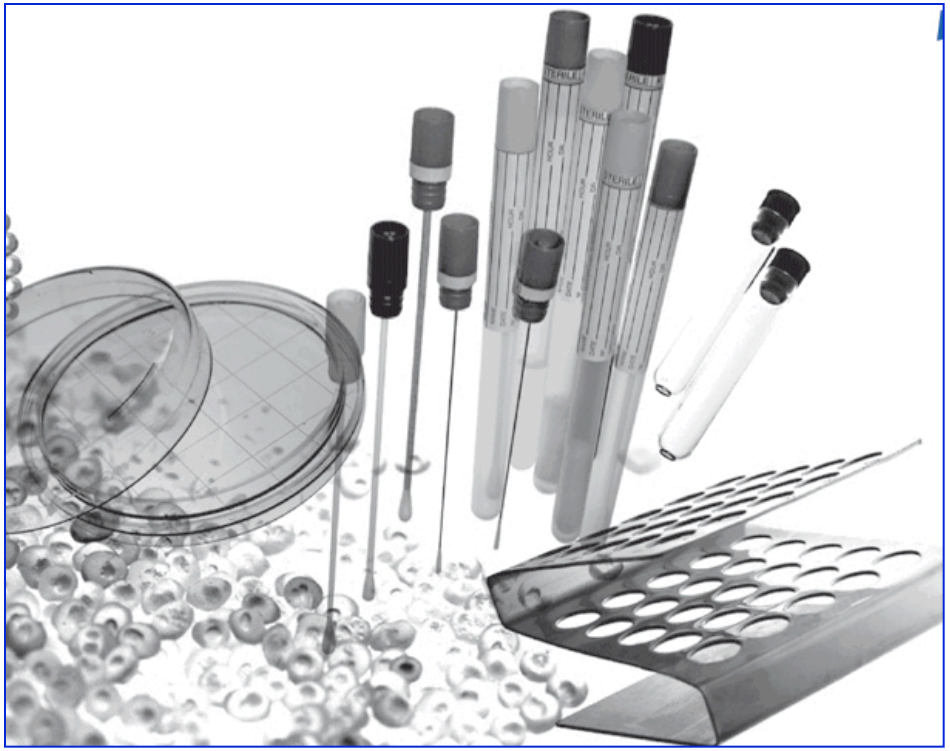
DOPRAVA VZORKU DO LABORATOŘE:

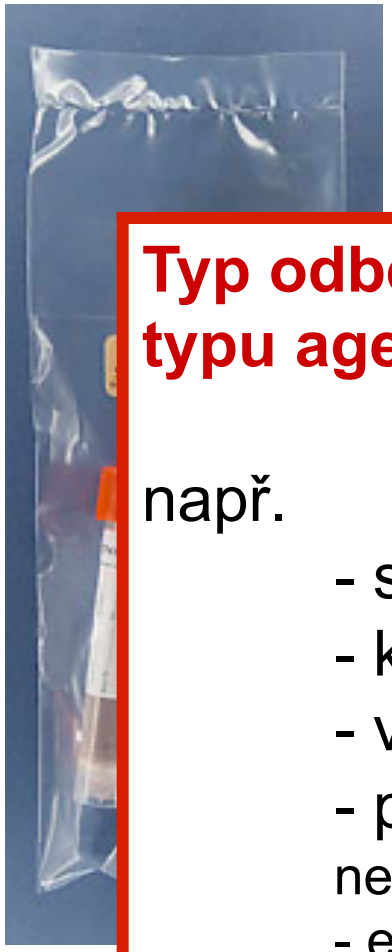
- **co nejrychleji**
- **ve správném transportním systému**
  (anaerobní uzavřený systém+ transportní půdy…)
- **za správné teploty a dalších podmínek**
  (vyšetření na kapavku, likvor x moč)

ANAEROBE SYSTEMS
ANAEROBIC TISSUE TRANSPORT
•STORE AT ROOM TEMPERATURE•

HARDY
DIAGNOSTICS
Copyright 2009. All rights reserved.

Starswab™ Anaerobic System



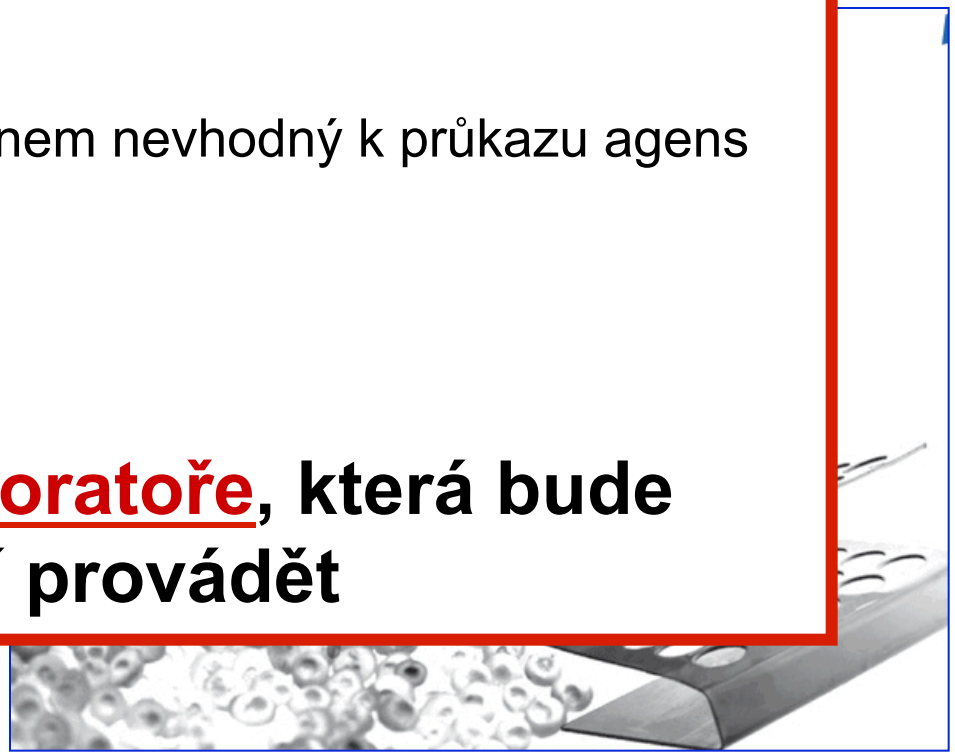


Typ odběrové soustavy a její transport odvislý na typu agens, které chceme prokázat

např.

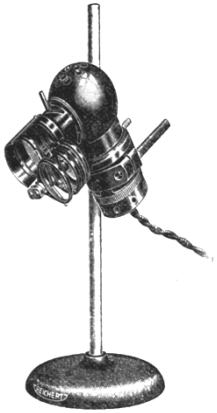
- striktně anerobní bakterie
- kapnofilní bakterie
- viry
- parazity (odběr tampónem nevhodný k průkazu agens nezbytná stolice)
- etc.

Doporučení od laboratoře, která bude vyšetření provádět



PŘÍMÝ
LABORATORNÍ PRŮKAZ MIKROORGANISMŮ

PŘÍMÝ PRŮKAZ

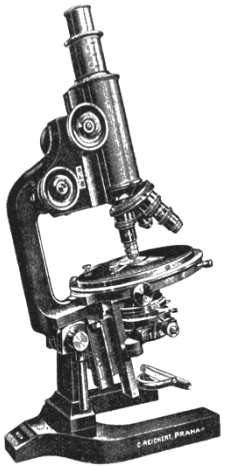


DETEKCE AGENS
VE VYŠETŘOVANÉM VZORKU

a) mikroskopie

b) izolace agens (nebo jeho části)

- kultivace
- detekce specifických složek ve vzorku (Ag, NK)



Identifikace mikroorganismu (+ citlivost na atb)

DIAGNOSTICKÝ PRŮKAZ AGENS

NEPŘÍMÝ PRŮKAZ
detekce protilátek

PŘÍMÝ PRŮKAZ
např. mikroskopie - světelná, elektronová,
průkaz Ag, PCR

Zdroj: Wikimedia Commons

PŘÍMÝ PRŮKAZ - MATERIÁL

A)průkaz agens

- **stěry/výtěry** (např. dutina ústní, nos, nosohltan, zevní zvukovod, rektum, perianální stěry, uretra, pochva - ze zevní či střední klenby, cervix, sekret z Bartholiniho žlázy, spojivkový vak, kožní léze, rána nebo hluboký defekt)

- **sputum**,endotracheální aspirát, BAL,výplachy parasanální dutiny, duodenální obsah, **stolice, moč** (střední či poslední proud, cévkovaná, z permanentního katétru, získaná suprapubickou punkcí), plodová voda, tekutina z adnex, prostatický sekret, ejakulát, **mozkomíšní mok**, tekutina z nitroočního prostoru, seškraby pokožky, apod.

- **bioptický materiál** (tkáň odebraná z infikované lokality -(biopsie, excize, aspirace, peroperačně)

- **krev** (nesrážlivá EDTA, srážlivá), **kostní dřeň**, **krevní nátěry**

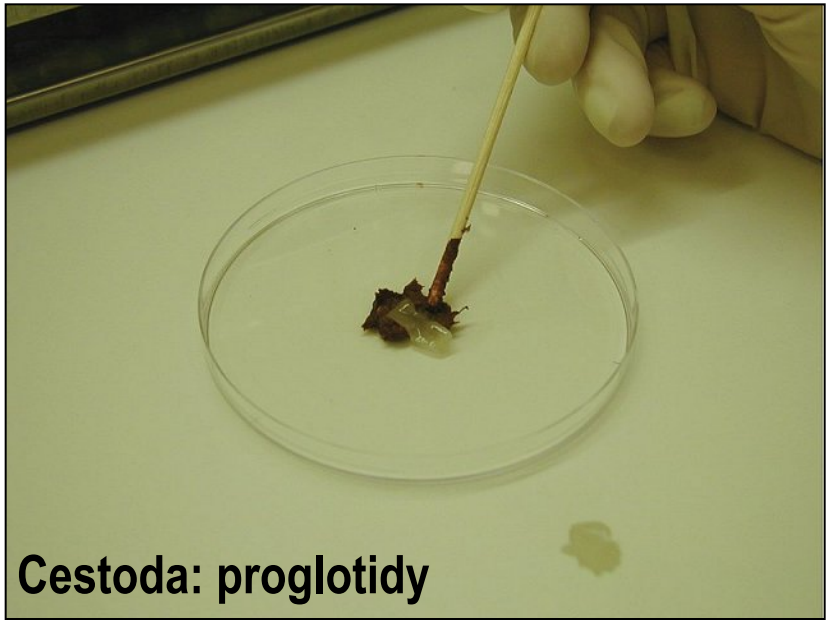
- **obsah patologických dutin, hnis**

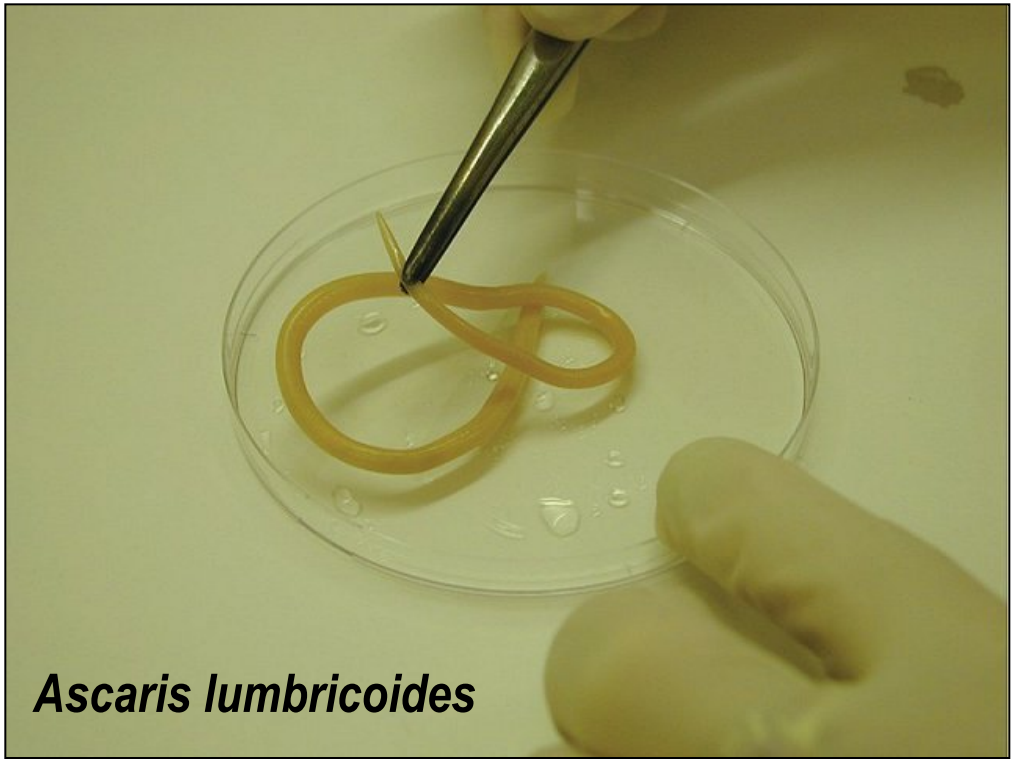
- **cizorodý materiál, dialyzát**

- suspektní útvary

B) průkaz antigenu a DNA

MAKROSKOPICKÉ VYŠETŘENÍ


Cestoda: proglotidy


Ascaris lumbricoides

PARAZITOLOGIE

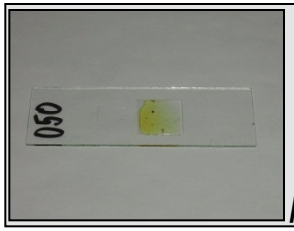
Zdroj foto:
Förstl M. a kol.: Praktický atlas lékařské parazitologie.

PŘÍMÝ mikroskopický pRŮKAZ PATOGENNÍHO AGENS

STOLICE

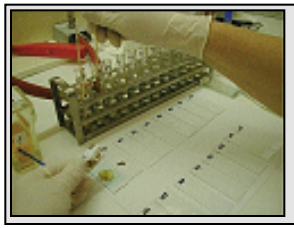
STANDARDNÍ A SPECIÁLNÍ VYŠETŘENÍ STOLICE

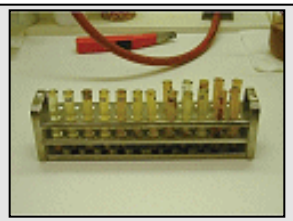
Tampony - výtěr
výjimka:
parazitologie NE!



A. nativní preparát
ředíme fyziologickým roztokem

parazitologie, mykologie, bakteriologie vzácně (syfilis)

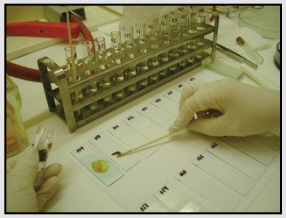




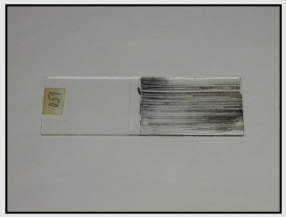
B. Koncentrační metody: flotace a sedimentace

parazitologie

C. Speciální barvící metody



Kato



parazitologie
mykologie
bakteriologie

D. Kultivace

bakteriologie, mykologie, parazitologie - prvoci

Zdroj foto: Förstl M. a kol.: *Praktický atlas lékařské parazitologie*

DIAGNOSTICKÉ METODY V BAKTERIOLOGI

PŘÍMÉ

Přímý průkaz

NÁLEZ MIKROORGANISMU VE VYŠETŘOVANÉM VZORKU

- **Mikroskopický průkaz**
- **Izolace mikroorganismu**

- Kultivace
- Identifikace mikroorganismu (+ citlivost na atb)

- **Průkaz přítomnosti typických mikrobiálních složek ve vzorku (Ag, NK)**

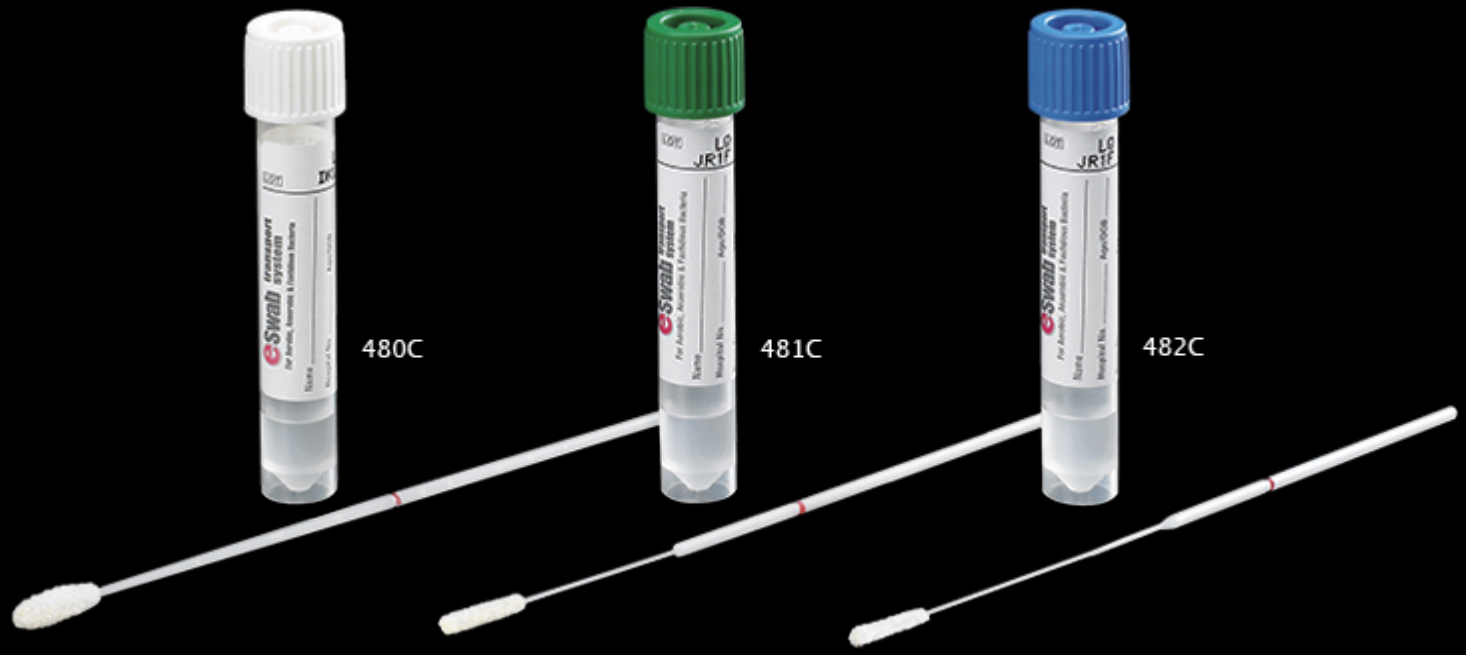
Mikroskopický průkaz

- **Nativní preparát** (bakteriologie vzácně – syfilis)

- **Barvený preparát**
- *Diagnostická barvení* (podle Grama, Ziehl – Neelsena, dle Giemsy)
- *Speciální barvení* (dle Alberta, Burriho, Writze – Conklina)
- IMF

- **EM**

ESwab



- Možnost mikroskopického vyšetření vzorku
- Výborné podmínky pro přežití a transport anaerobních mikroorganismů

ESwab - mikroskopie

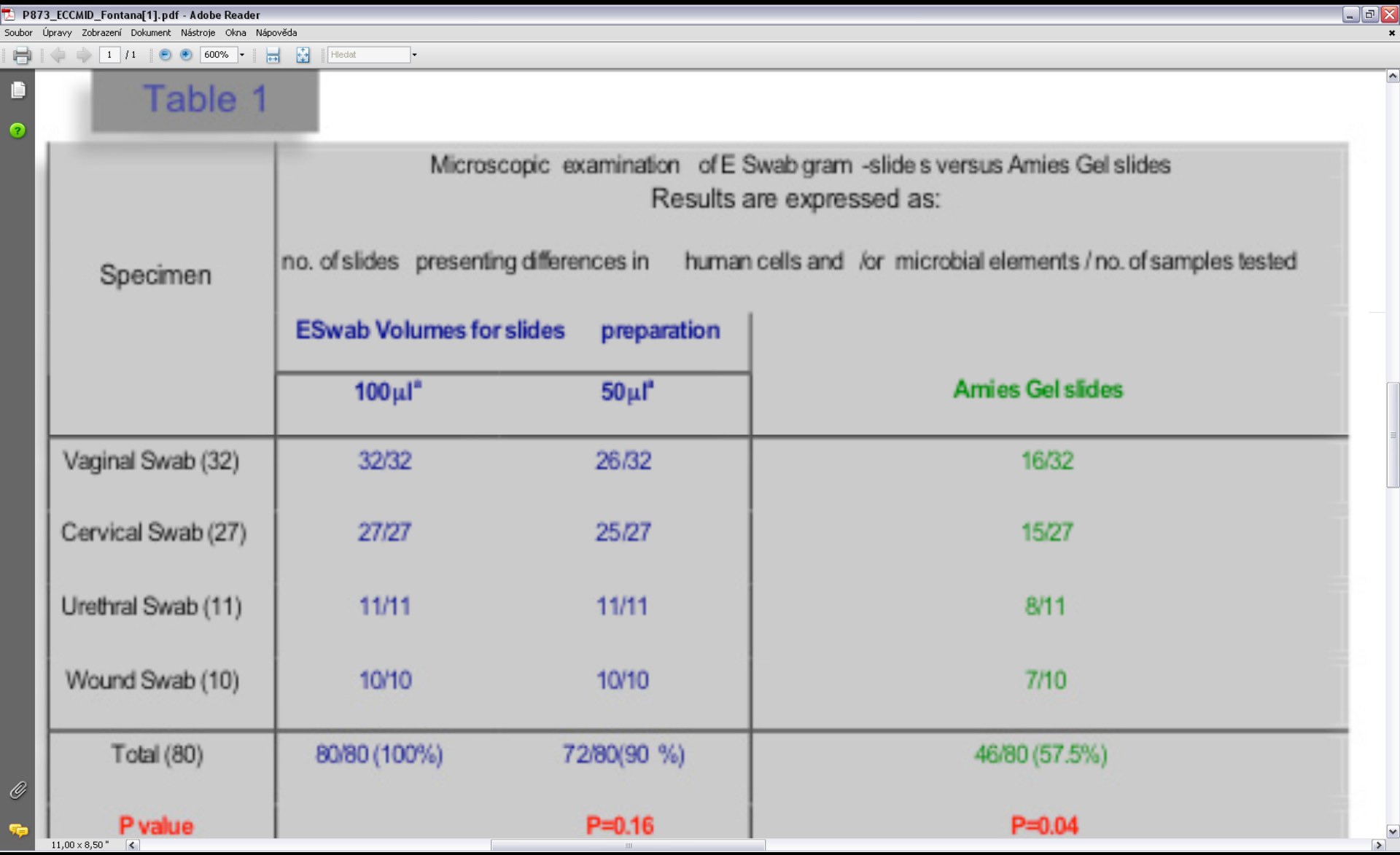
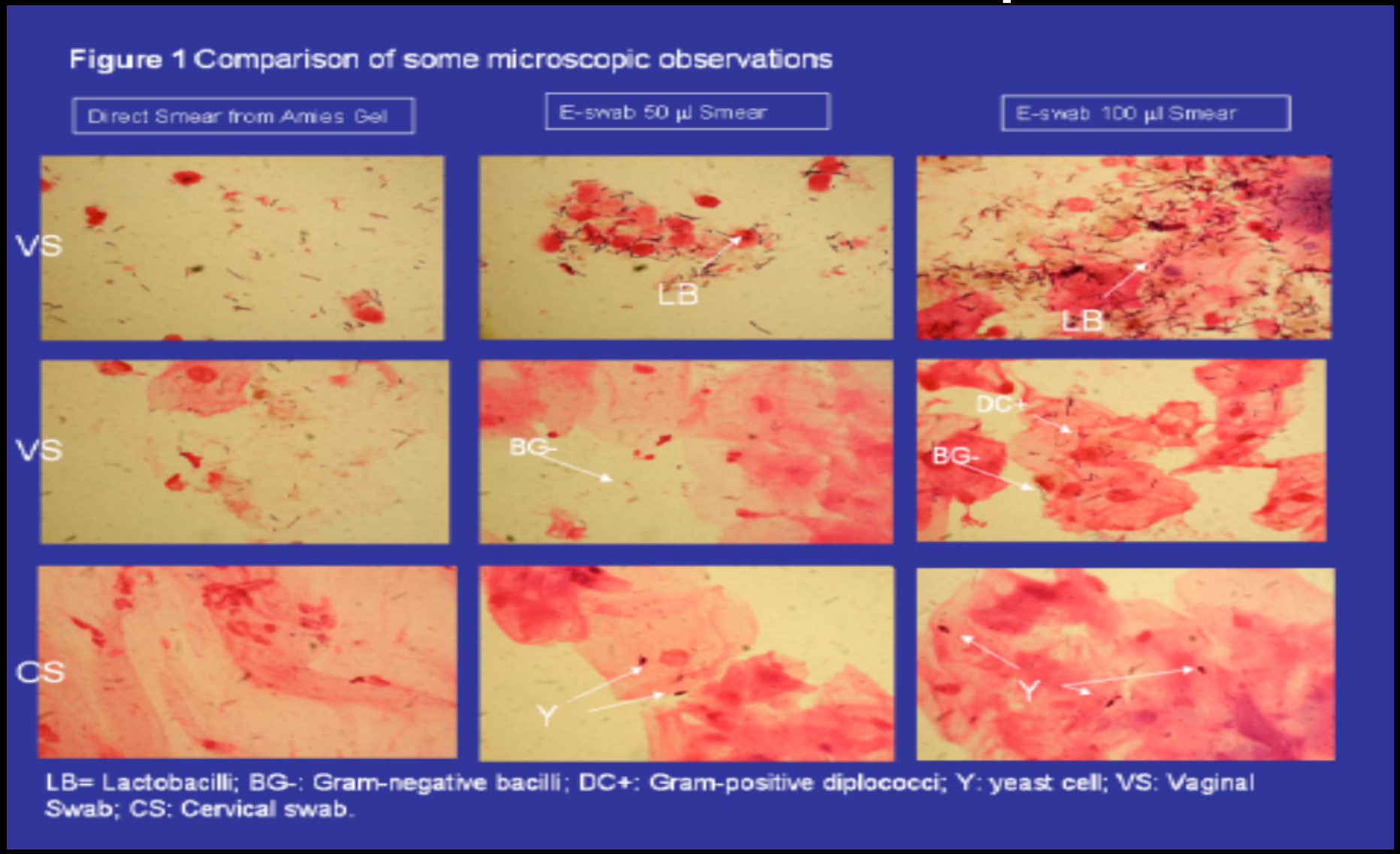


Table 1

Specimen	Microscopic examination of E Swab gram -slide s versus Amies Gel slides Results are expressed as: no. of slides presenting differences in human cells and /or microbial elements / no. of samples tested		
	ESwab Volumes for slides preparation		
	100 µl*	50 µl*	Amies Gel slides
Vaginal Swab (32)	32/32	26/32	16/32
Cervical Swab (27)	27/27	25/27	15/27
Urethral Swab (11)	11/11	11/11	8/11
Wound Swab (10)	10/10	10/10	7/10
Total (80)	80/80 (100%)	72/80(90 %)	46/80 (57.5%)
P value		P=0.16	P=0.04

P873, ECCMID, 2009

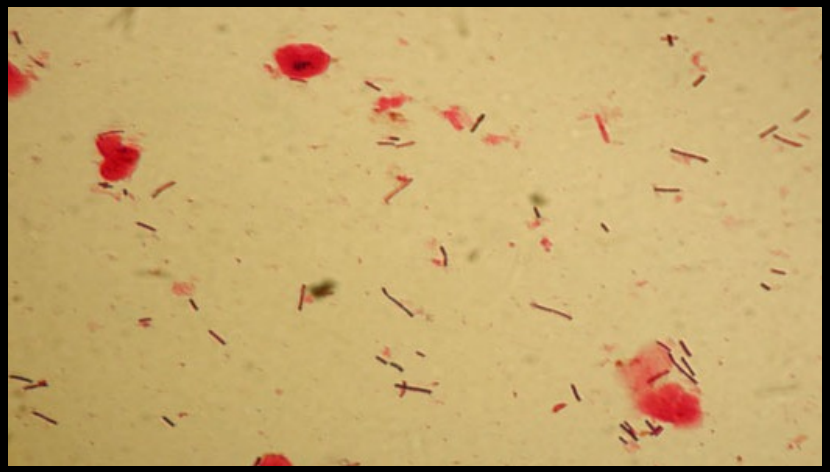
ESwab - mikroskopie

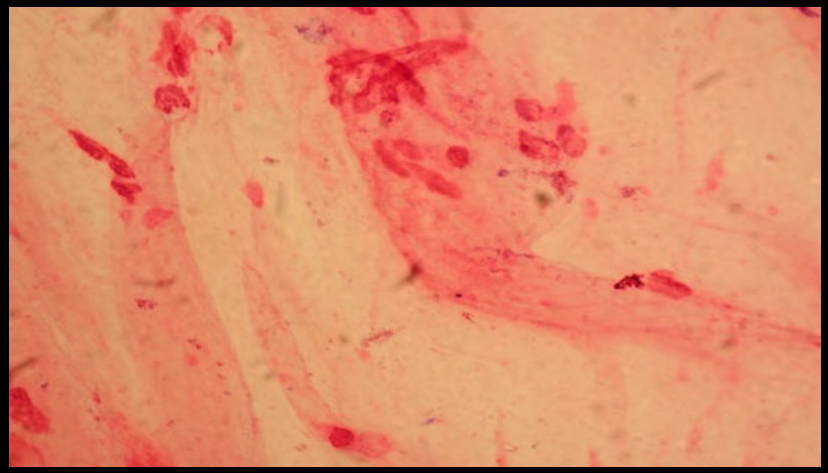


P873, ECCMID, 2009

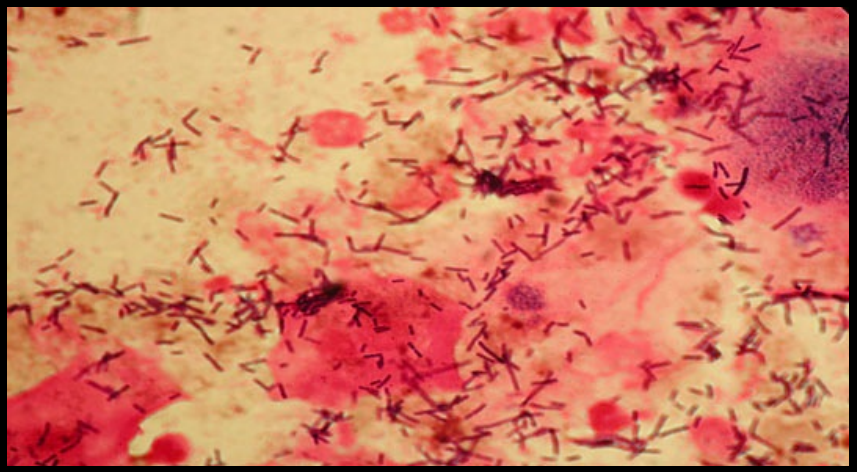
ESwab - mikroskopie

Direct Smear from Amies Gel





E-swab 100 µl Smear



P873, ECCMID, 2009

Přímý průkaz

NÁLEZ MIKROORGANISMU VE VYŠETŘOVANÉM VZORKU

- **Mikroskopický průkaz**
- **Izolace mikroorganismu**

- Kultivace
- Identifikace mikroorganismu (+ citlivost na atb)

- **Průkaz přítomnosti typických mikrobiálních složek ve vzorku (Ag, NK)**

Izolace bakterií

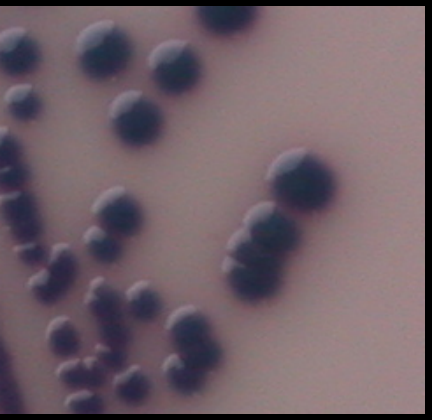
- KULTIVAČNÍ PRŮKAZ

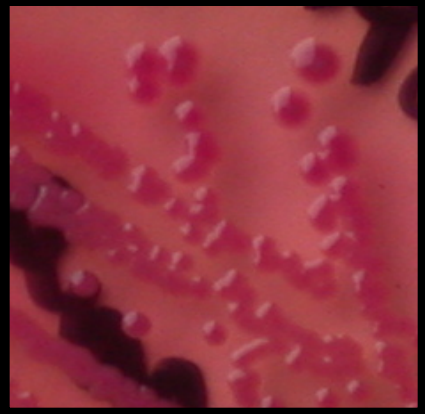
Identifikace kmene

- **Orientační** – morfologie kolonií, růst na selektivně diagnostických půdách; barvený preparát, chromogenní média
- **Konečná identifikace** – biochemické a fyziologické vlastnosti; antigenní struktura; průkaz toxicity

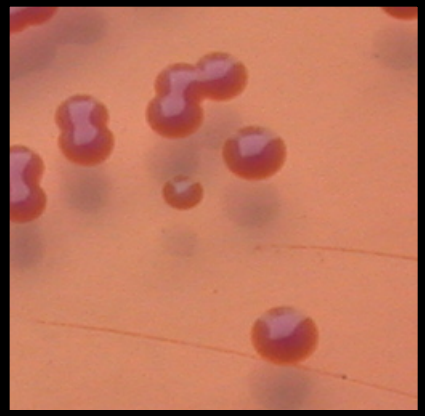
- *Typizace kmene*: biotypizace; antibiogram; fagotypizace; bakteriocinotypizace; RFLP

Enterobacter cloacae; URIselect 4, McConkey agar





Klebsiella pneumoniae; URIselect 4, McConkey agar

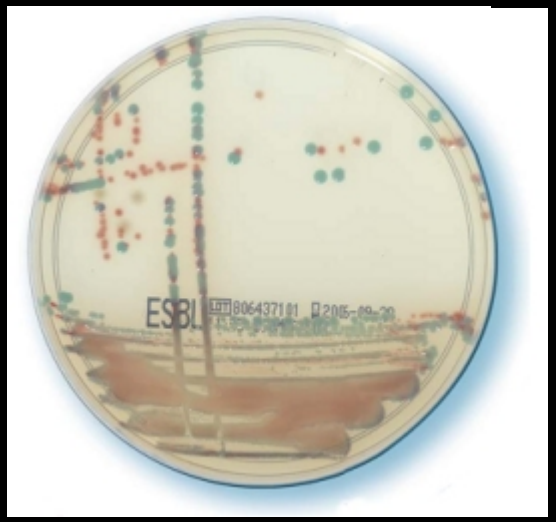


Acinetobacter spp.; URIselect 4, McConkey agar

Chromogenní půdy

Rychlá identifikace rod/druh

ESBL



Rychlý průkaz významného fenotypu

Identifikace kmene

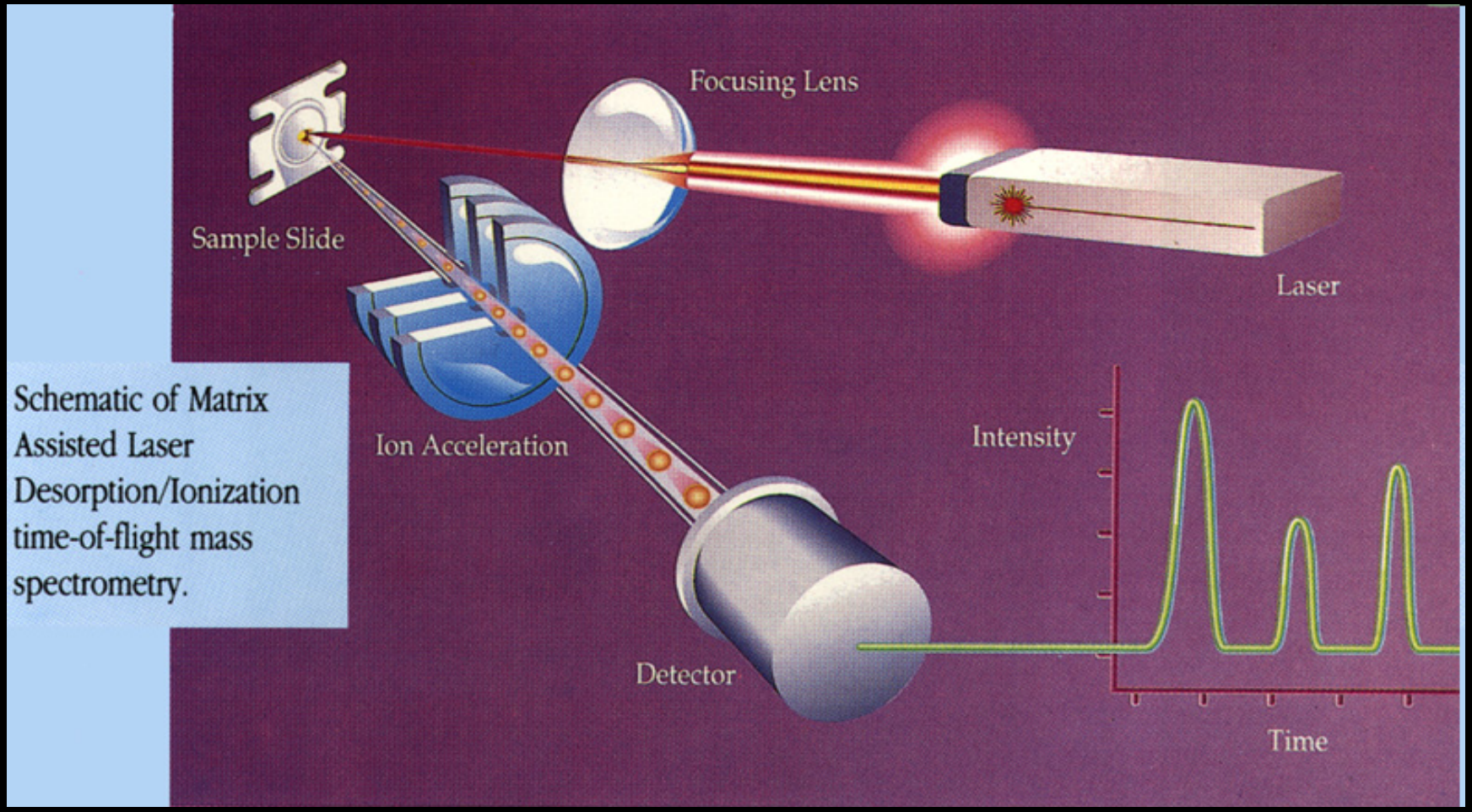
- **Orientační** – morfologie kolonií, růst na selektivně diagnostických půdách; barvený preparát, chromogenní média
- **Konečná identifikace** – biochemické a fyziologické vlastnosti; antigenní struktura; průkaz toxicity

- *Typizace kmene*: biotypizace; antibiogram; fagotypizace; bakteriocinotypizace; RFLP

MALDI-TOF

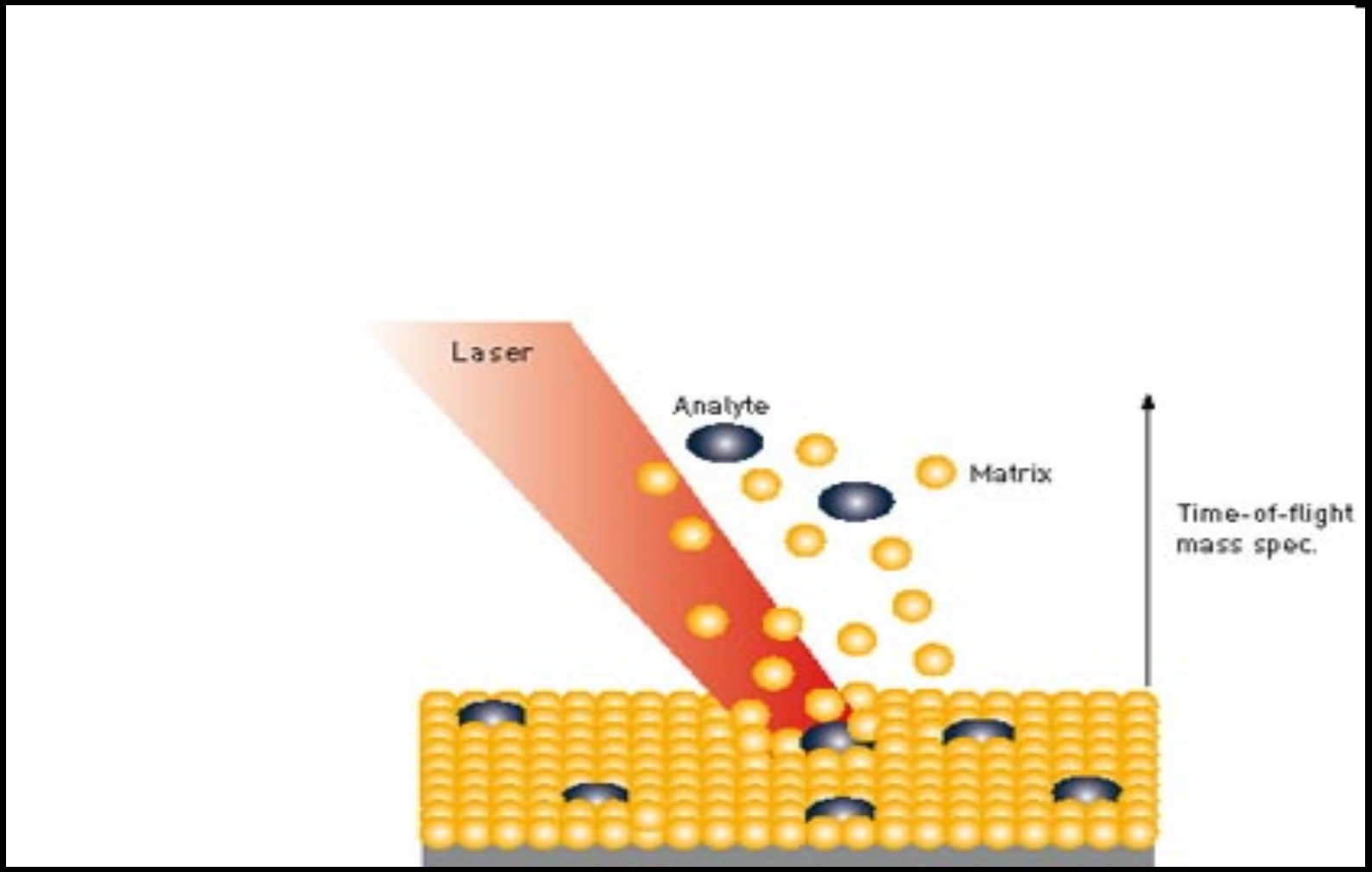
- Identifikace na podkladě hmotnostní spektroskopie
- Molekuly vzorku ionizovány laserem přímo -> štěpí se nežádoucím způsobem -> matrice - látka, jejímž prostřednictvím se ionizační energie laseru přenáší na molekuly vzorku a tím brání jejich štěpení
- Ionizace laserem přes matrici umožňuje měřit molekulové hmotnosti více látek v tomtéž vzorku.
- K stanovení vyšších molekulových hmotností se používá *ionizace laserem za přítomnosti matrice* (MALDI, matrix assisted laser desorption/ionization) v kombinaci s *detektorem doby letu* (TOF, time-of-flight)
- Detektor umožňuje změřit dobu průletu a z ní lze vypočítat rychlost částice
- Hmotnostní spektroskopie MALDI byla původně vyvinuta pro kvalitativní analýzu peptidů a bílkovin

MALDI-TOF



Schematic of Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization time-of-flight mass spectrometry.

MALDI-TOF



MALDI-TOF v mikrobiologii

- Mikroorganizmy jsou přeneseny z kultivačního média na destičku (držák vzorku), která může mít až 384 pozic, přidá se matrice (např. 2,5-dihydroxybenzoová kyselina).
- V hlubokém vakuu je vzorek s matricí „bombardován“ laserem po dobu nanosekund.
- Vzniklé ionty jsou analyzovány po průletu trubicí a dopadu na detektor na základě doby dopadu, která je úměrná molekulové hmotnosti.
- Vzniklé hmotnostní spektrum je charakteristické pro daný mikroorganizmus a slouží k jeho identifikaci.

MALDI-TOF v mikrobiologii

- 1116 bakt. izolátů z rutinní laboratoře + 108 sbírkových kmenů (ATTC, DSMZ)
- Diskrepance ověřeny 16S rDNA sekv.
- Výsledky MALDI-TOF MS porovnány s běžně dostupnými fenotyp. testy

- 101 ref. kmenů (93.5%) správná druhová ID; 1062 (95.2%) z 1116 lab. izolátů - správná druhová ID pomocí MALDI-Biotyper. Enterobacteriaceae 95.5%, G- nefermentující tyčky 79.7%, stafylokoky 99.5%, enterokoky 100% a streptokoky 93.7%
- Výsledky do 20 min

Eigner U. et al: **Performance of a matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry system for the identification of bacterial isolates in the clinical routine laboratory.** Clin Lab. 2009;55(7-8):289-96

MALDI-TOF v mikrobiologii

- 980 klinických izolátů; identifikace konvenčními metodami (Vitek-II, API, biochemické testy)
- Diskrepance ověřeny 16S rDNA sekv.
- Úspěšnost MALDI-TOF MS byla signifikantně vyšší než u konvenčních biochemických systémů při druhové ID (92.2% vs 83.1%) a méně nesprávných rodových ID (0.1% vs 1.6%)
- Správná druhová ID MALDI-TOF MS byla u 97.7 % Enterobacteriaceae, 92 % nefermentujících G- bakterií, 94.3 % stafylokoků, 84.8 % streptokoků, 84 % ostatních (*Haemophilus, Actinobacillus, Cardiobacterium, Eikenella, Kingella* [HACEK]) a 85.2% kvasinek
- Nesprávné ID – nebyla data v registru

van Veen SQ et al.: High-throughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories. J Clin Microbiol. 2010 Mar;48(3):900-7. Epub 2010 Jan 6.

ČAS ??? = PENÍZE

Interpretace kultivačních nálezů

- Růst mikroorganismu ve vyšetřovaném vzorku nemusí vždy znamenat přítomnost infekce!!!
- **Kontaminace**: zanesení cizorodých mikrobů během odběru nebo zpracování vzorku (z kůže, z prostředí…)
- **Kolonizace**: přítomnost mikroorganismů, včetně potenciálních patogenů, ale kteří nevyvolávají danou infekci (normální mikroflora orofaryngu, gastrointestinálního traktu apod.)

- **Signifikantní patogen**: interpretace v kontextu klinického obrazu; místa odběru; metody odběru a zpracování vzorku; kvantity nálezu

DIAGNOSTICKÉ METODY V PARAZITOLOGII

PŘÍMÉ

PŘÍMÝ PRŮKAZ PATOGENNÍHO AGENS - PARAZITOLOGIE

STOLICE = vyšetření při gastrointestinálních obtížích

- Odběry obden
- **3 vzorky (objem lískový-vlašský ořech):**
  - 1 vzorek čerstvý (do 2 hodin! Při RT, NE DO LEDNICE!)
  - 2 vzorky možno skladovat v lednici (max. 2 dny, nesmí zmrznout)

Standardní parazitologické vyšetření: vzorky nesmí zmrznout!

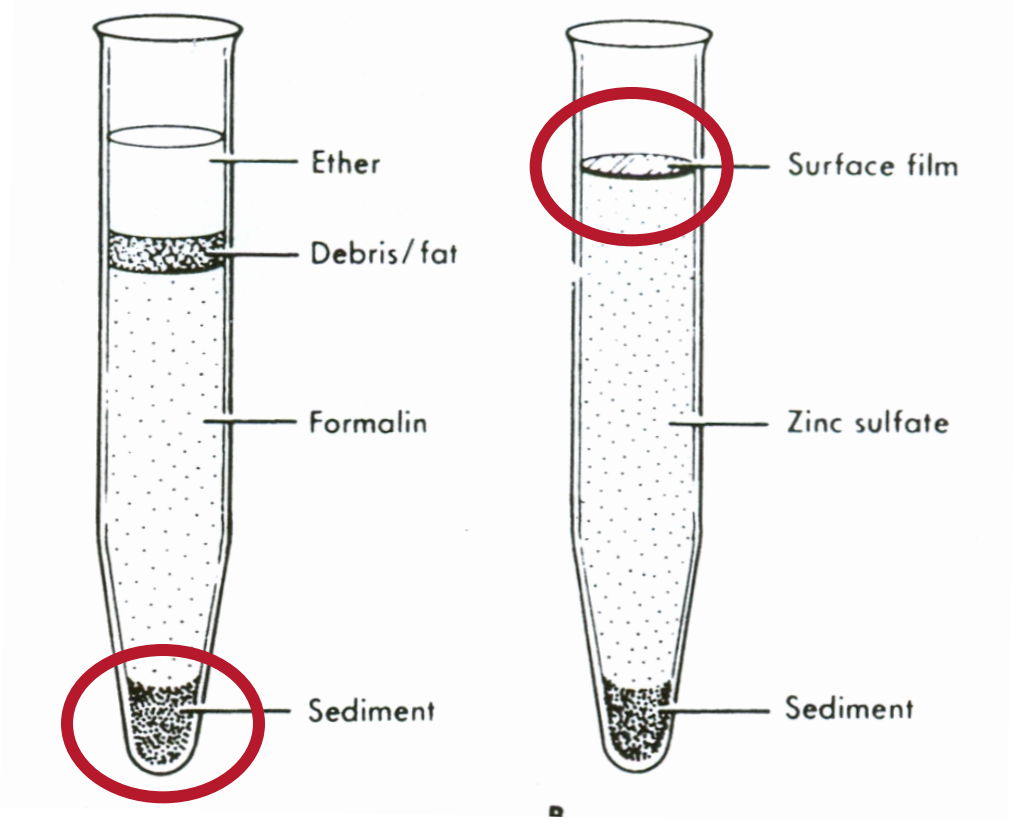
Objem: „vlašský ořech“

Zdroj foto: Förstl M. a kol.: Praktický atlas lékařské parazitologie.

KONCENTRAČNÍ METODY

A) SEDIMENTAČNÍ – **vajíčka** klesají ke dnu (vyšetřujeme sediment)

B) FLOTAČNÍ – **vajíčka nebo larvy** v koncentrovaném roztoku různých solí se vyplavují ke hladině (vyšetřujeme povrchový film, který může odebírat buď kličkou, nebo pomocí krycího sklíčka, které přiložíme na hladinu)



A) Formalin-ether

B) „Zink sulfát“ – nevhodné pro detekci vajíček schistosom

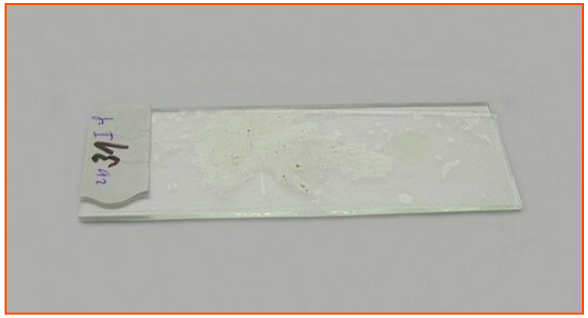
Obr.: WHO

ENTEROBIÓZA

PERIANÁLNÍ STĚRY

↓

!!! vyšetření před koupáním nebo mytím !!!



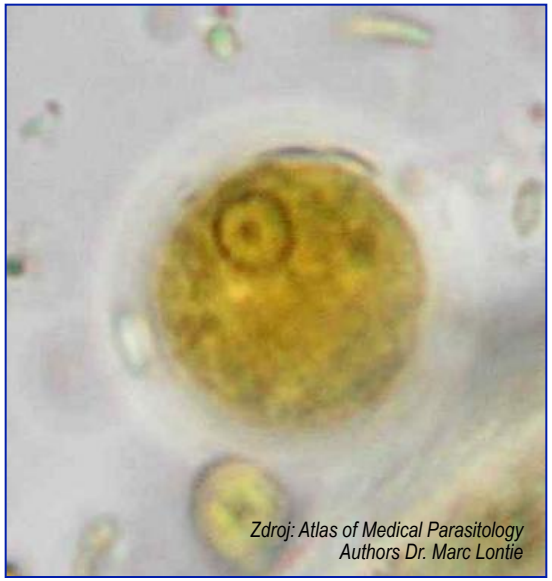
Schüffnerova odběrová tyčinka

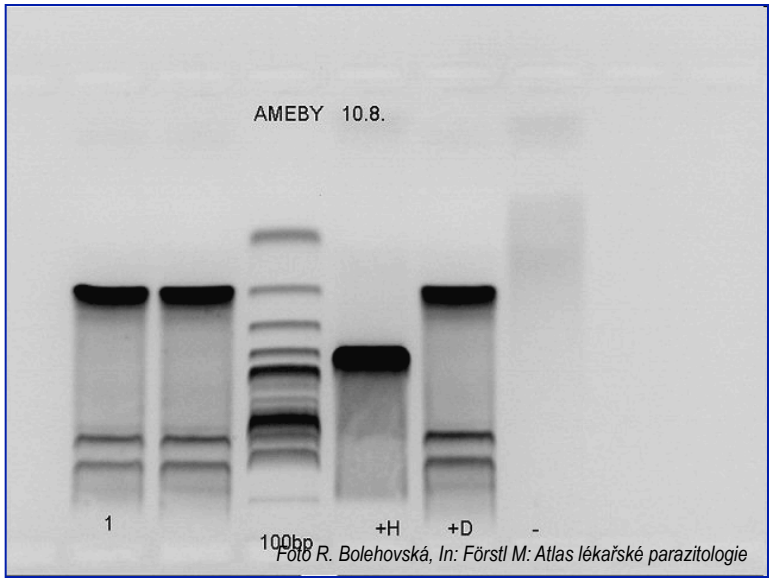
Vajíčka (50-60 x 20-30 μm) na lepicí pásce

Foto Miroslav Förstl In: Förstl M: Atlas lékařské parazitologie

ENTAMOEBA HISTOLYTICA

Není možné mikroskopicky odlišit
patogenní *E. histolytica* od nepatogenní *E. dispar*

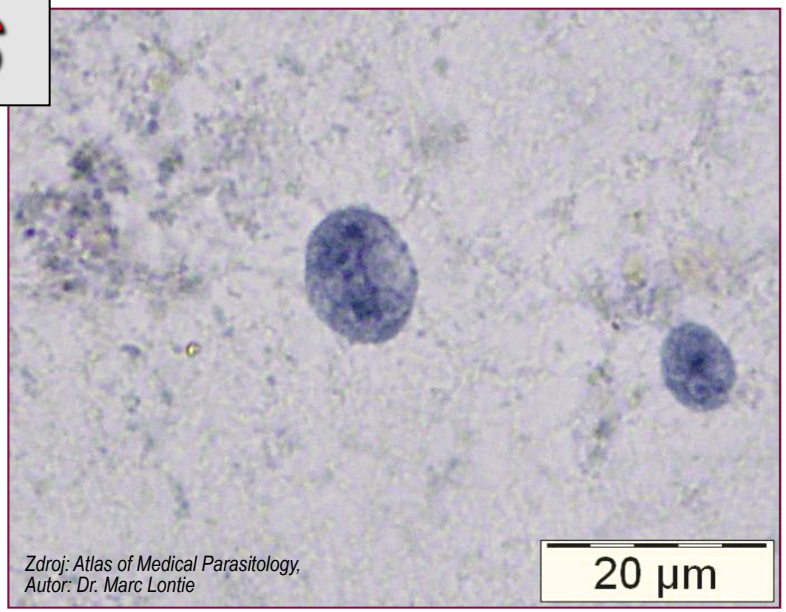




K identifikaci *E. histolytica* nezbytné metody prokazující parazitární DNA

NRL pro dg tropických parazitárních infekcí (vedoucí dr. E. Nohýnková)
NRL pro dg střevních infekcí (vedoucí dr. V. Tolarová)

DIENTAMOEBA FRAGILIS



tvoří pouze trofozoity

DIAGNOSTIKA

MATERIÁL
čerstvá stolice, čerstvé perianální stěry, nechladit, bez přístupu kyslíku

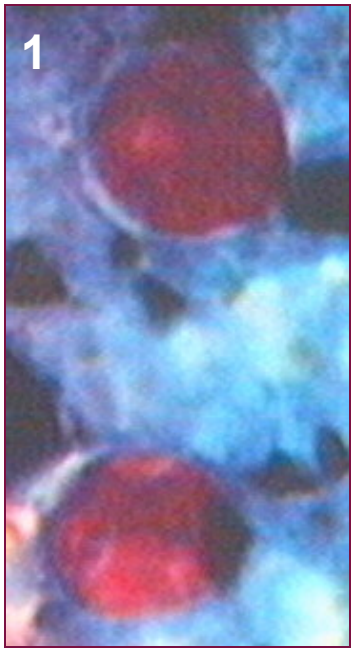
METODY
- nativní preparát (vakuolizované b., tupé panožky)
- ~~Faust~~
- barvený preparát
- kultivace
- PCR

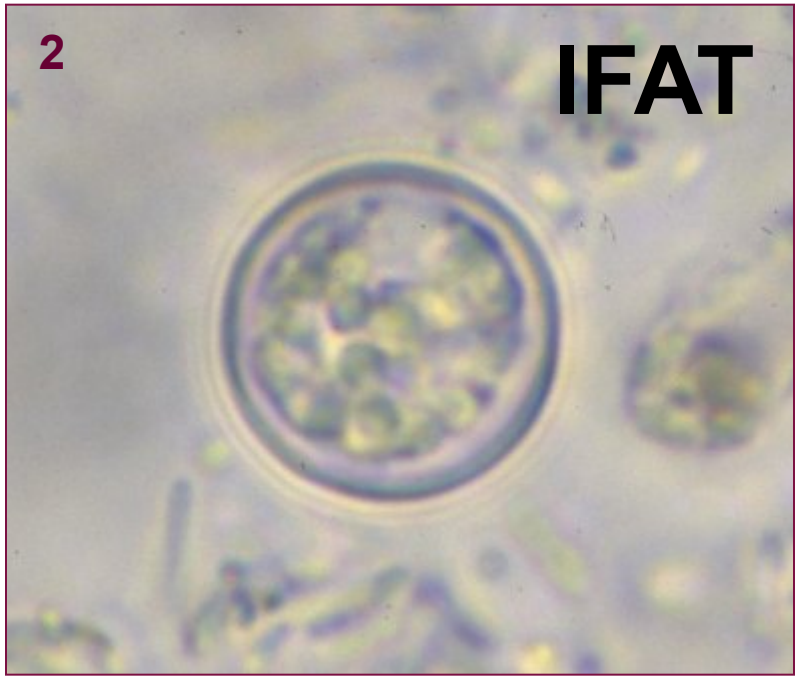
CYCLOSPORA CAYATENSIS

MIKROSKOPICKÝ PRŮKAZ

MATERIÁL

Stolice:
nevysporulované oocysty

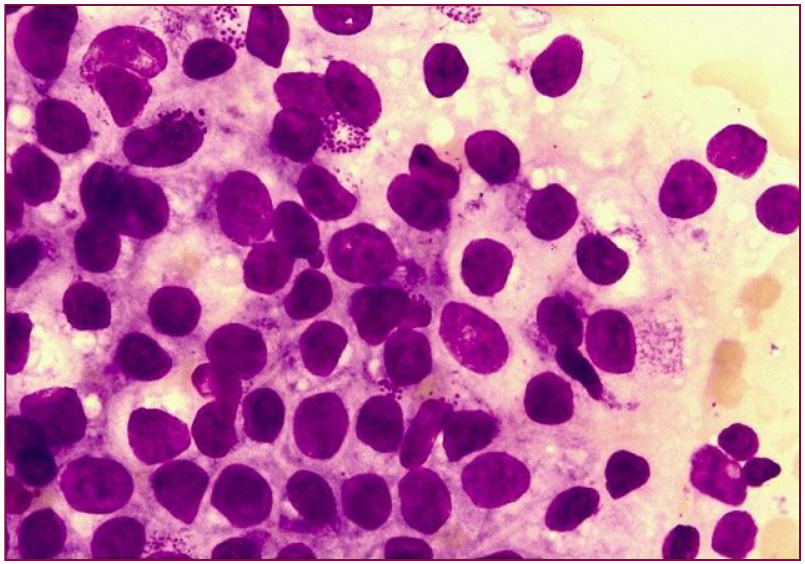




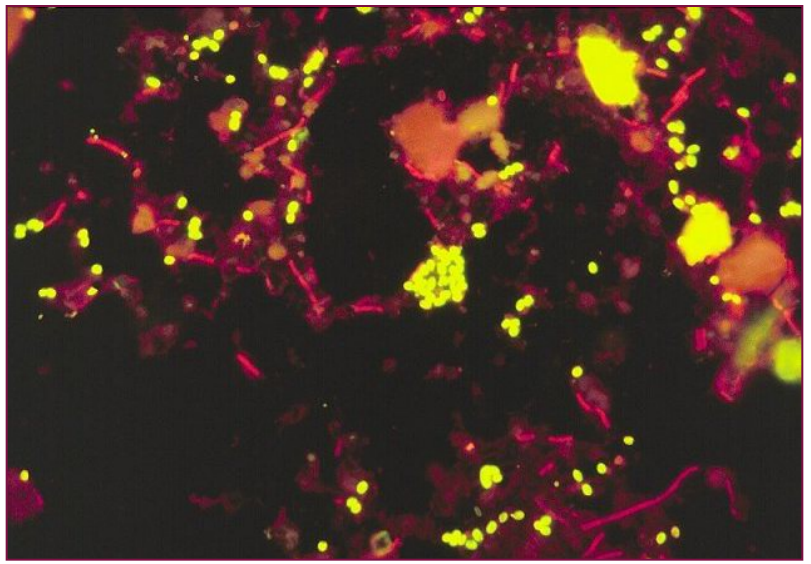
Zdroj obrázků: Atlas of Medical Parasitology, Autor:2. Dr. Marc Lontie

ENTEROCYTOZOON BIENEUSI

nejčastěji diagnostikovaná mikrosporidie při AIDS



Mikroskopický průkaz spor



Materiál:

Stolice, duodenální šťáva, BAL

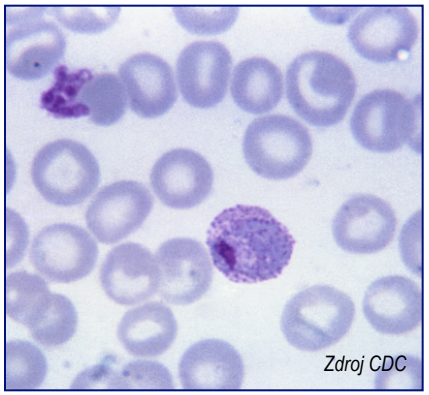
Barvící metody (modifikovaný trichrom)

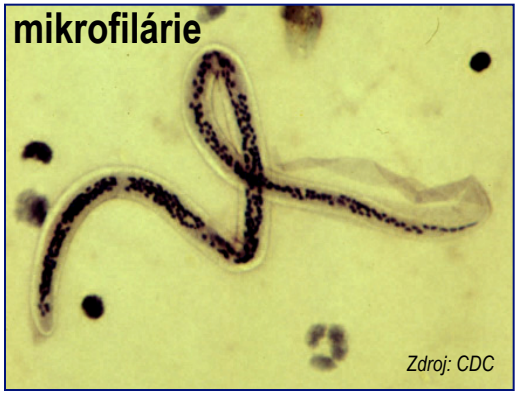
IFAT: calcofluor, uvitex B
značené monoklonální protilátky

Autor obrázků: Eva Nohýnková,, In: Forstl et al. Praktický atlas lékařské parazitologie

PŘÍMÝ PRŮKAZ PATOGENNÍHO AGENS

KREV


Zdroj CDC



Zdroj: CDC

MATERIÁL: **periferní krev**

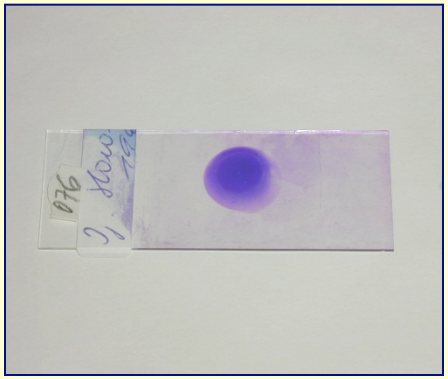
ODBĚR při podezření na:

malárii - kdykoliv (**i mimo malarický záchvat**)

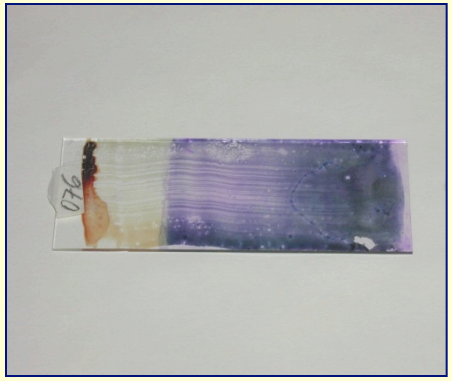
filariózy - **každých 6 hodin během jednoho dne**

METODA: krevní nátěr „tlustá kapka“ a tenký nátěr

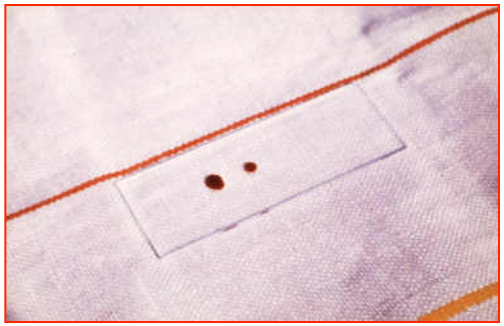
Tlustá kapka:
pouze barvení Giemsa

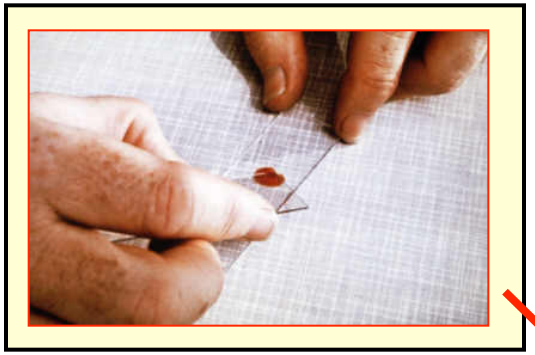


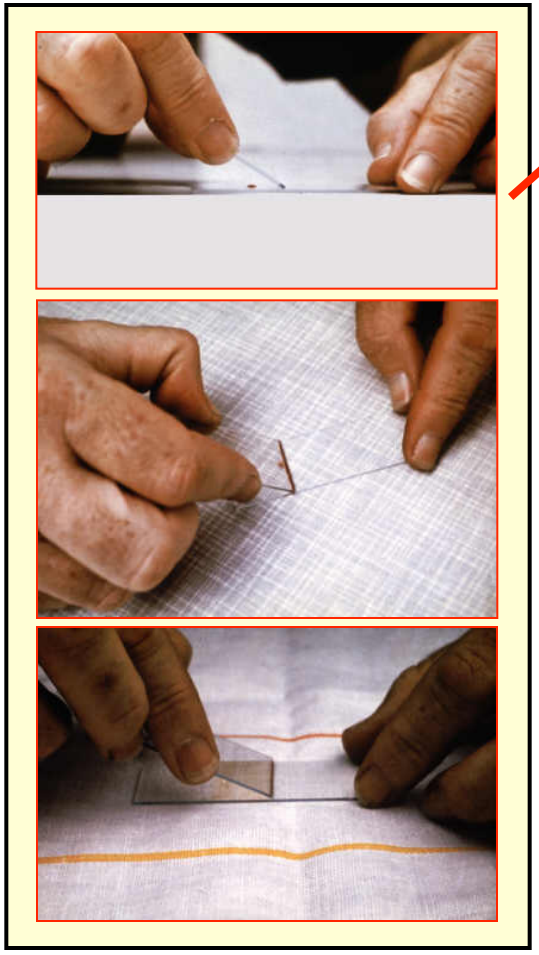
Tenký nátěr:
fixace methanolem
+ barvení Giemsa

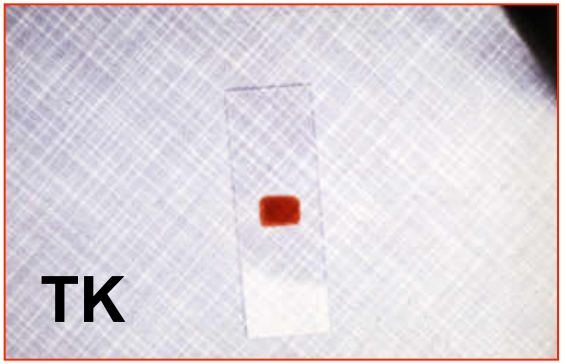


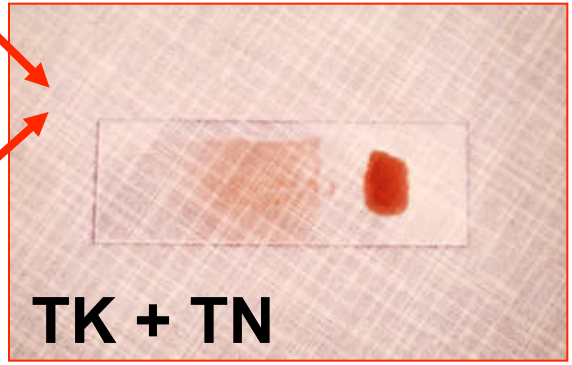
Zdroj foto: Förstl M. a kol.: Praktický atlas lékařské parazitologie.

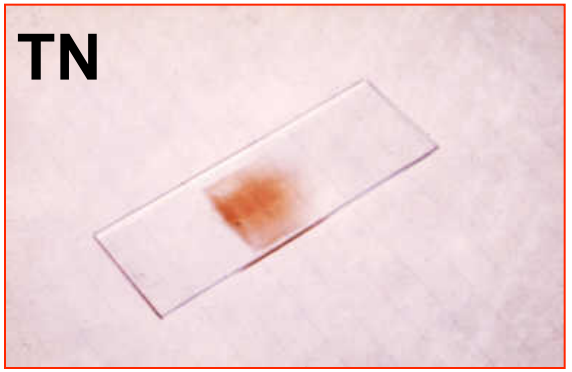







TK

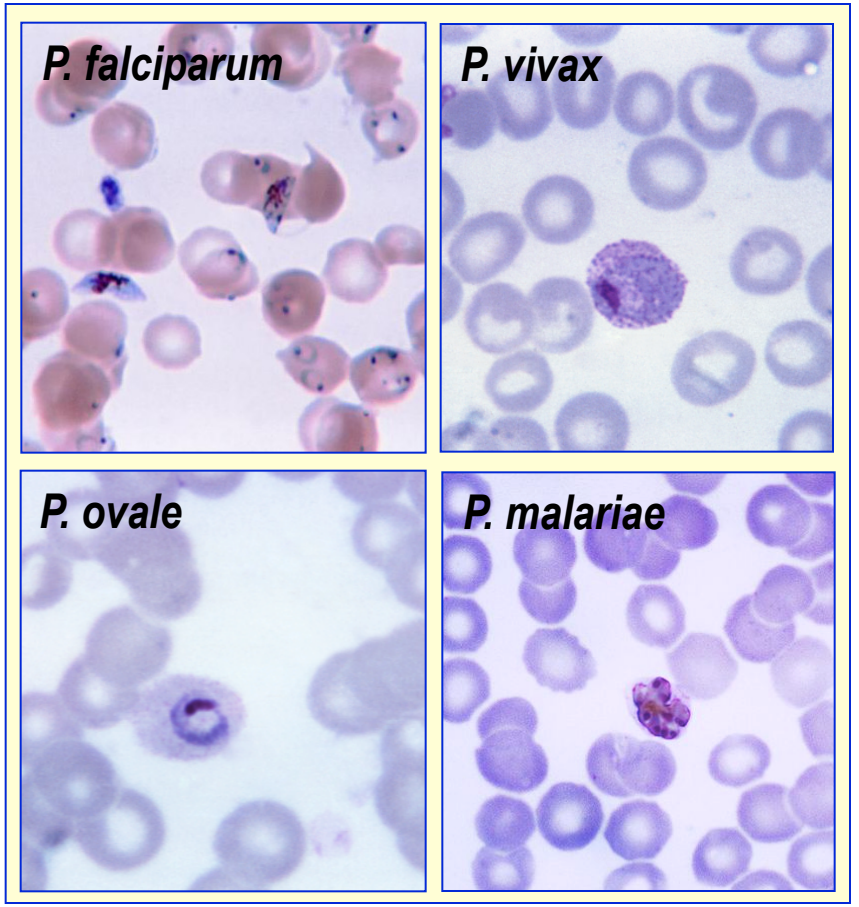

TK + TN


TN

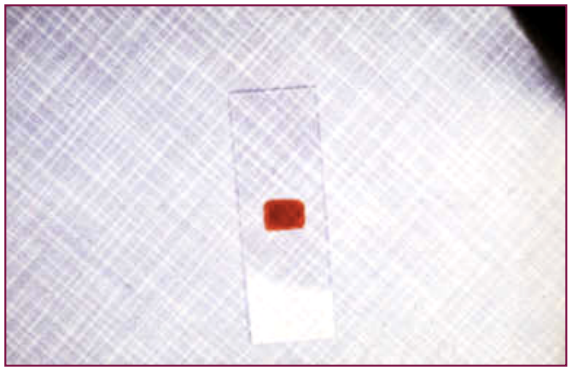
MALÁRIE

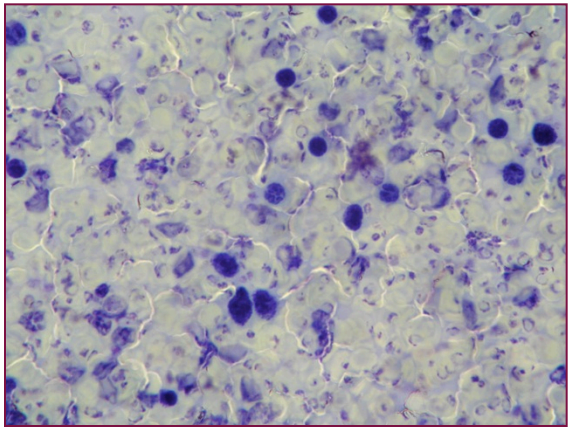
Nezbytné zjistit: ANAMESTICKÉ ÚDAJE

- **Kde** pacient pobýval
- **Jak dlouho** (od kdy do kdy)
- **Profylaxe**: **zda ji pacient bral**
  pokud ano, jakou
  kdy jí vzal naposled



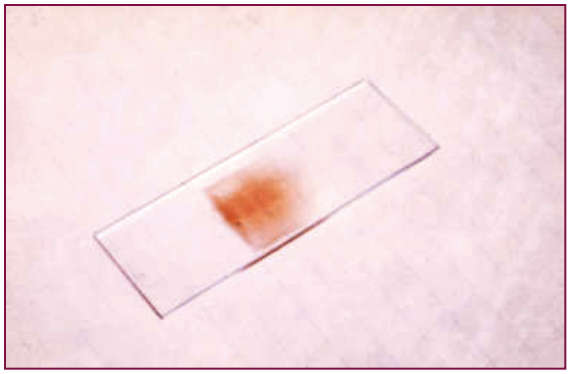
TLUSTÁ KAPKA

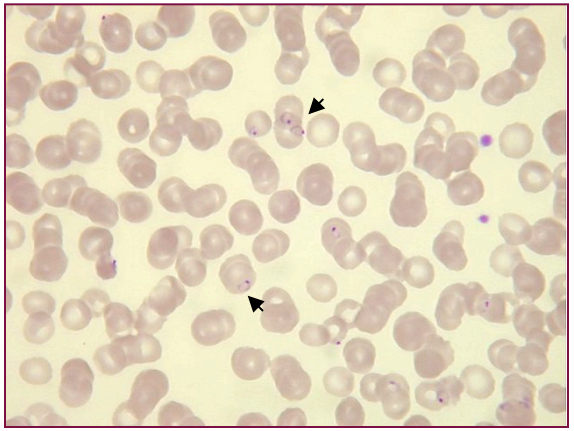




lyse krvinek → rychlé orientační vyšetření

TENKÝ NÁTĚR





druh *Plasmodia* + parazitémie

Parazitémie (počet infikovaných erytrocytů):
význam pro péči o pacienta (sledování účinnosti terapie)

Význam pro:
- výběr léku (rezistence)
- rozhodnutí o antirelapsové léčbě (terciána)

PŘÍMÝ PRŮKAZ PATOGENNÍHO AGENS

MOČ

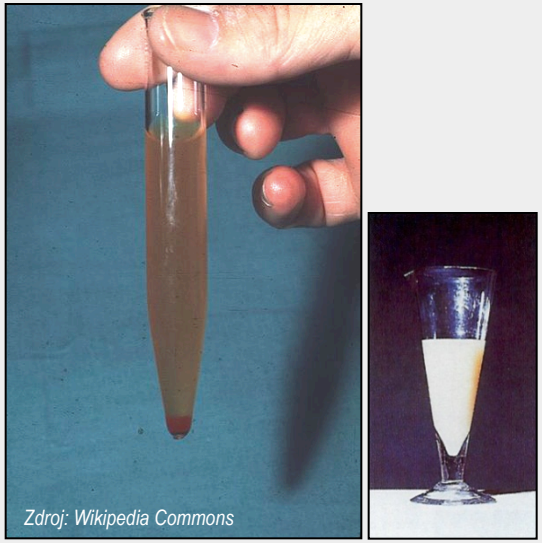
poslední kapky

- odběr:

nejlépe během posledních 24 hod. (před odběrem pohyb)

- zpracování: filtrační techniky

schistosomóza, lymfatická filarióza



BIOPTICKÝ MATERIÁL

HISTOLOGIE

odběr přímo z patologických lézí (**pouze ve vybraných případech**)

tkáňoví parazité

možnost získání falešně negativních výsledků

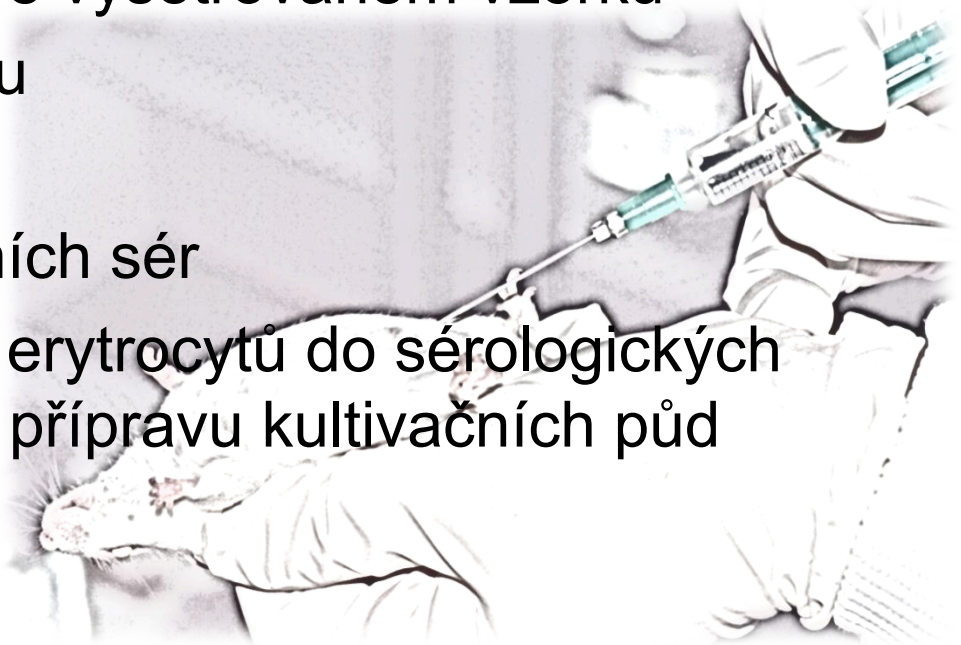
IZOLACE MIKROORGANISMŮ

KULTIVACE

- kultivační půdy

POKUS NA ZVÍŘETI

- průkaz infekčního agens ve vyšetřovaném vzorku
- průkaz bakteriálního toxinu
- neutralizační testy
- příprava antigenů a imunních sér
- získávání komplementu a erytrocytů do sérologických reakcí; tkání a orgánů pro přípravu kultivačních půd
- výzkum



ZÁSADY ZPRACOVÁNÍ VZORKŮ NA KULTIVACI: POSOUZENÍ VALIDITY VZORKŮ

KULTIVAČNÍ PŮDY

- **dle složení**:
  - **tekuté** (masopeptonový bujon, Šulova půda, peptonová voda…)
  - **pevné** (živný agar, krevní agar…)

- **dle účelu**:
  - **základní** (živný agar, bujon…)
  - **obohacené** (krevní agar, Levinthal, Bordet–Gengou…)
  - **selektivní** (selenit, NaCl agar, Löwenstein-Jensen…)
  - **diagnostické** (štěpení substrátu, využívaní substrátu, tvorba typických látek…)
  - **selektivně diagnostické** (MacConkey, Clauberg, CIN, Schaedler…)

POŽADAVKY NA ODBĚR

LIKVOR: přísně asepticky; okamžitý transport do laboratoře při 37 °C, nebo při 4 °C

KREV NA HEMOKULTIVACI: několik vzorků krve během jednoho dne; nelze-li odeslat hned do laboratoře uložit při 37°C nebo při pokojové teplotě; **nejpřínosnější výsledky s velkým klinickým významem**

SPUTUM: přítomnost hnisavých vloček x sliny; mikroskopický skríning na posouzení validity vzorku; kvantitativní kultivace pouze u vzorků purulentních, s minimálním obsahem dlaždicových epitelií

VÝTĚR Z KRKU: setřít patrové oblouky tonzily; **zaslat v transportní půdě**!!!; klinický význam pouze pro průkaz původců akutní tonzilofaringitidy

POŽADAVKY NA ODBĚR

VÝTĚR ZE SPOJIVKOVÉHO VAKU: při hnisavých afekcích zaslat v transportní půdě; při podezření na mykotickou etiologii do transportní půdy nevkládat; doplnit nátěrem na sklíčko

OBSAH PATOLOGICKÝCH DUTIN: dostatečný objem tekutého materiálu ve sterilní stříkačce s jehlou zapíchnutou do sterilní gumové zátky

VÝTĚRY Z RAN A KOŽNÍCH LÉZÍ: pouze nejde-li odebrat materiál tekutý materiál do stříkačky, potom setřít okraj léze, kde probíhá aktivní zánět s pravděpodobnou přítomností původce; u rozsáhlých defektů lze provést otisk na kultivační půdu

POŽADAVKY NA ODBĚR

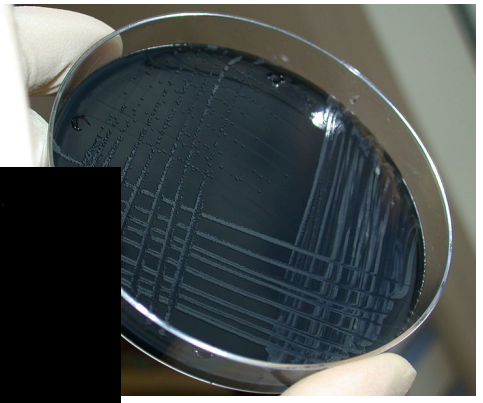
POŠEVNÍ VÝTĚRY: vždy dva – jeden na bakteriologické vyšetření v transportní půdě, druhý ve speciální půdě na trichomonády a kvasinky; plus dvě sklíčka s nátěrem na MOP (Gram, Giemsa), dle agens odběry ze zadní nebo střední klenby

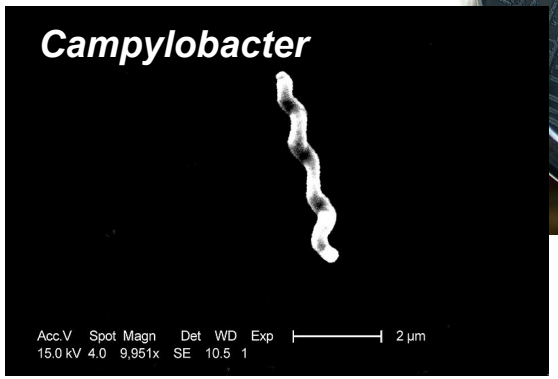
VYŠETŘENÍ NA KAPAVKU: výtěry z uretry, pochvy, cervixu, krku a rekta, se vždy doplní nátěrem na sklíčko, zanoří se do vytemperované transportní půdy a při teplotě 37 °C se co nejrychleji zašlou do laboratoře; požadavek na toto vyšetření musí být uveden na žádance

POŽADAVKY NA ODBĚR

MOČ: **střední proud** moči po řádném omytí genitálu ve sterilním kontejneru se okamžitě zašle do laboratoře; stanovení kvantitativní bakteriurie

STOLICE: výtěr na odběrovém tamponu **v transportní půdě!!!** (průkaz kampylobaktera)





Zdroj: Wikimediacommons

POŽADAVKY NA ODBĚR

PARAZITOLOGICKÉ VYŠETŘENÍ STOLICE: kousek stolice velikosti ořechu; není nutný sterilní kontejner – **kultivovat je možné pouze prvoky**

VIROLOGICKÁ VYŠETŘENÍ: **speciální transportní médium** k izolaci viru; **vždy při 4 °C** (tající led); na průkaz protilátek - párová séra

INTERPRETACE KULTIVAČNÍCH NÁLEZŮ

Růst mikroorganismu ve vyšetřovaném vzorku nemusí vždy znamenat přítomnost infekce !!!

- **KONTAMINACE**: zanesení cizorodých mikrobů během odběru nebo zpracování vzorku (z kůže, z prostředí…)
- **KOLONIZACE**: přítomnost mikroorganismů, včetně potenciálních patogenů, ale kteří nevyvolávají danou infekci (normální mikroflora orofaryngu, gastrointestinálního traktu apod.)
- **SIGNIFIKANTNÍ PATOGEN**: interpretace v kontextu klinického obrazu; místa odběru; metody odběru a zpracování vzorku; kvantity nálezu

CHYBY PŘI DETEKCI PATOGENA

- **Nesprávná diagnóza**
- **Špatná interpretace preparátu obarveného dle Grama** (artefakt x bakterie)
- **Neadekvátní klinický materiál – klinická validita**
- **Špatná technika odběru materiálu**; opožděný transport do laboratoře – **technická validita**
- **Podání antibiotik před odběrem vzorků**
- **Nesprávné zpracování materiálu v laboratoři** (anaeroby,mykobakteria, kampylobakter…)

PRŮKAZ PŘÍTOMNOSTI TYPICKÝCH MIKROBIÁLNÍCH SLOŽEK VE VZORKU

- **PRŮKAZ ANTIGENŮ** (Ag) – specifické protilátky (monoklonální, polyklonální)

  Př.: precipitace (Ascoliho termoprecipitace); aglutinace na nosičích (bakteriální Ag v likvoru při suspektní bakteriální meningitidě); ELISA (Ag *S. pyogenes* ve výtěru z krku, Ag *L. pneumophila* v moči); IMF

- **PRŮKAZ TOXINU** (*C. difficile*)

- **PRŮKAZ DALŠÍCH PRODUKTŮ BAKTERIÁLNÍHO METABOLISMU** (dechový test – *H. pylori*)

- **PRŮKAZ BAKTERIÁLNÍCH NUKLEOVÝCH KYSELIN** (PCR, LCR…)

IDENTIFIKACE KMENE

- **ORIENTAČNÍ** – morfologie kolonií, růst na selektivně diagnostických půdách; barvený preparát

- **KONEČNÁ IDENTIFIKACE** – biochemické a fyziologické vlastnosti; antigenní struktura; průkaz toxicity

- **TYPIZACE KMENE** - biotypizace; antibiogram; fagotypizace; bakteriocinotypizace; RFLP

STANOVENÍ CITLIVOSTI NA ATB

- **KVALITATIVNÍ PRŮKAZ**: **diskový difuzní test**

  měří se průměr inhibiční zóny (IZ) kolem disku napuštěného antibiotikem; je-li průměr IZ větší než průměr IZ referenčního kmene → kmen je k danému antibiotiku citlivý a naopak)

- **KVANTITATIVNÍ PRŮKAZ**

  stanovení minimální inhibiční koncentrace (**MIC**)

  diluční metoda v bujonu, v agaru

MIC – nejnižší koncentrace antibiotika inhibující viditelný růst testované bakterie
MBC (minimální baktericidní koncentrace) – nejnižší koncentrace antibiotika inhibující 99,9% bakteriální populace

MOLEKULÁRNĚ BIOLOGICKÉ METODY

ODBĚR MATERIÁLU

Používáme speciálních odběrových souprav, jsou-li vyžadovány.

DNA

- **Materiál pro stanovení DNA** (bakterie, houby, DNA viry) možno **do 24 hod** od odběru uchovávat v pokojové teplotě, **dále pak v chladničce** při 2 – 8 °C (zhruba do jednoho týdne od odběru).

- **Pro delší časový interval se materiál obvykle archivuje při teplotě –18 až –20 °C.**

RNA

- **Materiál na vyšetření RNA virů je nutné dopravit do laboratoře co nejrychleji** (RNA je mnohem méně stabilní než DNA).
- **Pro archivaci teploty cca –70 °C).**

Transport materiálu probíhá za pokojové teploty; nelze-li v případě respiračních virů zajistit bezprostřední převoz do laboratoře, pak se materiál transportuje v chladu.

MOLEKULÁRNĚ BIOLOGICKÉ METODY

Důvody k využívání molekulárně genetického (MG) vyšetření

(dle P. Dřevínek, 2012)

Indikace k MG vyšetření	Proč nestačí nebo je nevhodná jiná metoda (kultivace)?	Příklad indikace MG vyšetření
Hledá se konkrétní patogen = cílené vyšetření	1. pomalý či žádný nárůst; vyžaduje speciální růstová media; 2. složitá identifikace; 3. biologický hazard; 4. nízká citlivost	1. mykobakterie, *B. petrussis*, *Legionella* spp., Borrelia sp., viry 2. *Burholderia* spp, *Entamoeba* spp., 3. arboviry, B. anthracis 4. původci purulentních meningitid
Hledá se nějaký patogen = univerzální vyšetření	1. klinický významná časová prodleva 2. nízká citlivost	1. septický stav 2. původci purulentních meningitid
Potřeba kvantifikovat bakteriální či virovou nálož	nelze získat exaktní údaj o počtu mikrobů	herpetické viry u imunokompromi-tovaných pacientů, HIV
Pátrá se po genech atb rezistence	omezená kapacita v případě plošného skríningu; klinicy významná časová prodle	MRSA, VRE, *M. tuberculosis*

MOLEKULÁRNĚ BIOLOGICKÉ METODY

Důvody k využívání molekulárně (MG) vyšetření (dle P. Dřevínek, 2012)

Důvody falešné pozitivity MG vyšetření	Důvody falešné negativity MG vyšetření
Kontaminace v laboratoři (z předchozích vyšetření, z jiného pozitivního klinického vzorku, personál)	Přítomnost inhibitorů PCR v klinickém vzorku
Suboptimální protokol PCR (který nezaručuje specificitu PCR jen pro uvažovaný mikroorganismus, ale dovoluje zkříženou reaktivitu i s jinými mikroby)	Ztráta DNA při chybném zpracování či archivaci materiálu
Nerelevantní detekce pouhé DNA (celistvý mikroorganismus není v hostiteli přítomen)	Suboptimální protokol PCR (který způsobuje nízkou senzitivitu PCR)

NEPŘÍMÝ
PRŮKAZ AGENS

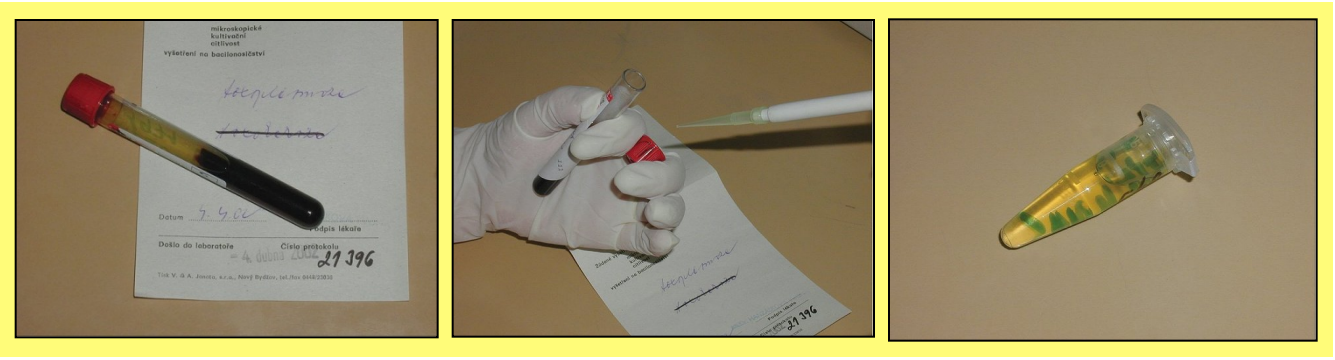
NEPŘÍMÝ PRŮKAZ

PRŮKAZ SPECIFICKÝCH „STOP“, KTERÉ MIKROORGANISMUS ZANECHAL V ORGANISMU → průkaz protilátek

- Precipitace
- Aglutinace
- Komplementfixační reakce
- Neutralizační reakce
- Metody se značenými složkami (IMF, ELISA, RIA, Western blot)

NEPŘÍMÝ PRŮKAZ: DETEKCE PROTILÁTEK

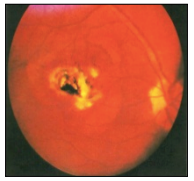
klinické obtíže ↔ nezbytnost stanovování protilátkové odpovědi **ve vybraném materiálu**

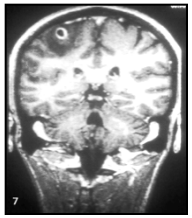


a) **srážlivá krev** (3-5 ml)

b) **sklivec** (maximálně 20 μl neředěného materiálu)

c) **mozkomíšní mok** (maximálně 100 μl)



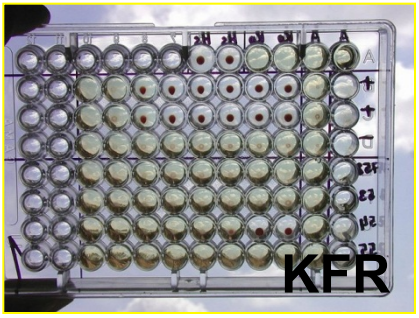


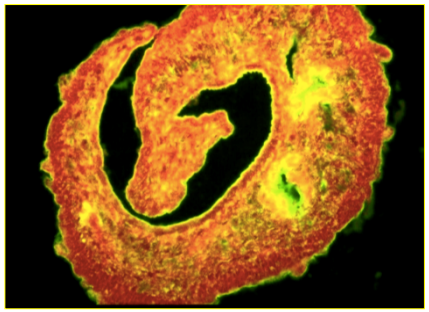
Negativní výsledek získaný vyšetřením séra nevylučuje infekci oka nebo CNS parazitárním agens!

Zdroj foto: Förstl M. a kol.: Praktický atlas lékařské parazitologie.

NEPŘÍMÝ PRŮKAZ: DETEKCE PROTILÁTEK

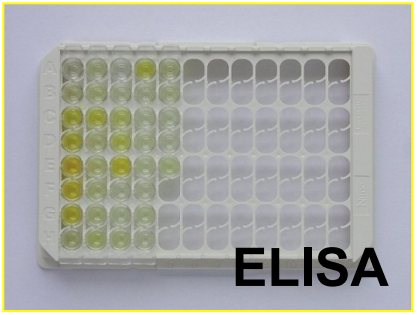
- spektrum diagnostických možností: omezené – dáno možnostmi dostupných specifických antigenů

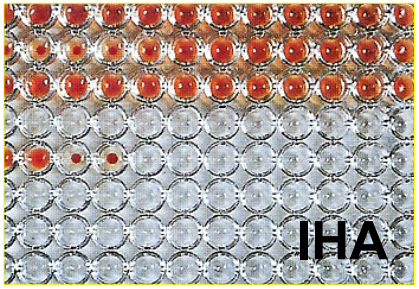




IFAT

Kvalita reakce přímo odvislá na kvalitě používaných antigenů.





- „home made“ metody
- komerční sety

Zdroj foto: Förstl M. a kol.: Praktický atlas lékařské parazitologie a Libuše Kolářová.

NEPŘÍMÝ PRŮKAZ: DETEKCE PROTILÁTEK

- detekce protilátek možná až **po určité době p.i.**

- titry protilátek **neklesají vždy záhy po léčbě**
  např. po léčbě možné dočasné zvýšení hladin protilátek

- **problémy se stanovováním úspěšnosti léčby**

- **zkřížené reakce**

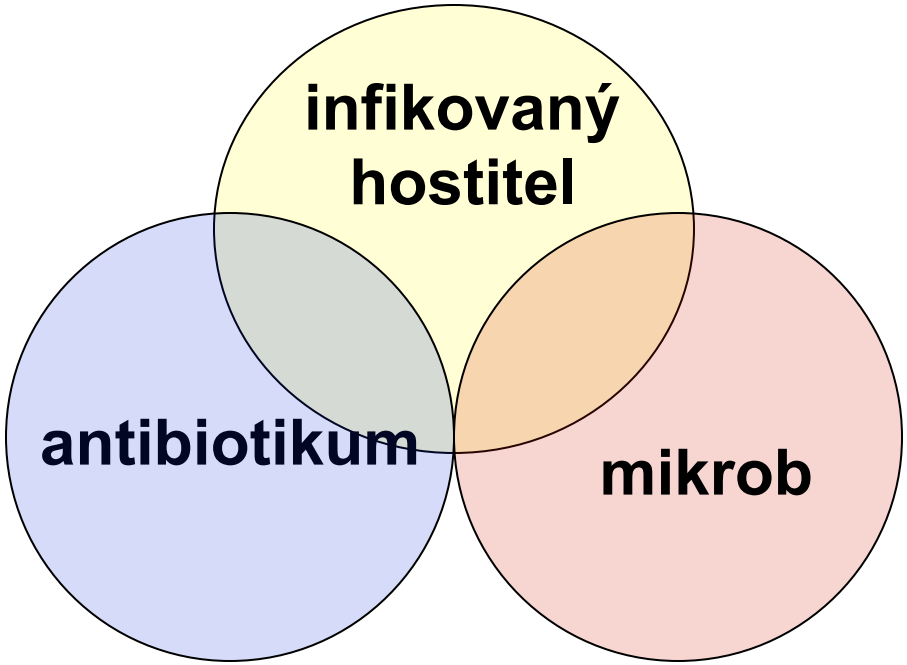
Výsledek sérologického vyšetření = indikátor jehož význam hodnotíme v souvislosti s výsledky ostatních typů vyšetření a klinickém stavu

STRATEGIE SPRÁVNÉHO POUŽÍVÁNÍ ANTIBIOTIK

LÉČBA ANTIBIOTIKY

= podávání léků pro kontrolu infekce na/v těle

= zahrnuje 3 vzájemně se ovlivňující faktory:



ZÁKLADNÍ CHARAKTERISTIKA ANTIBIOTIK

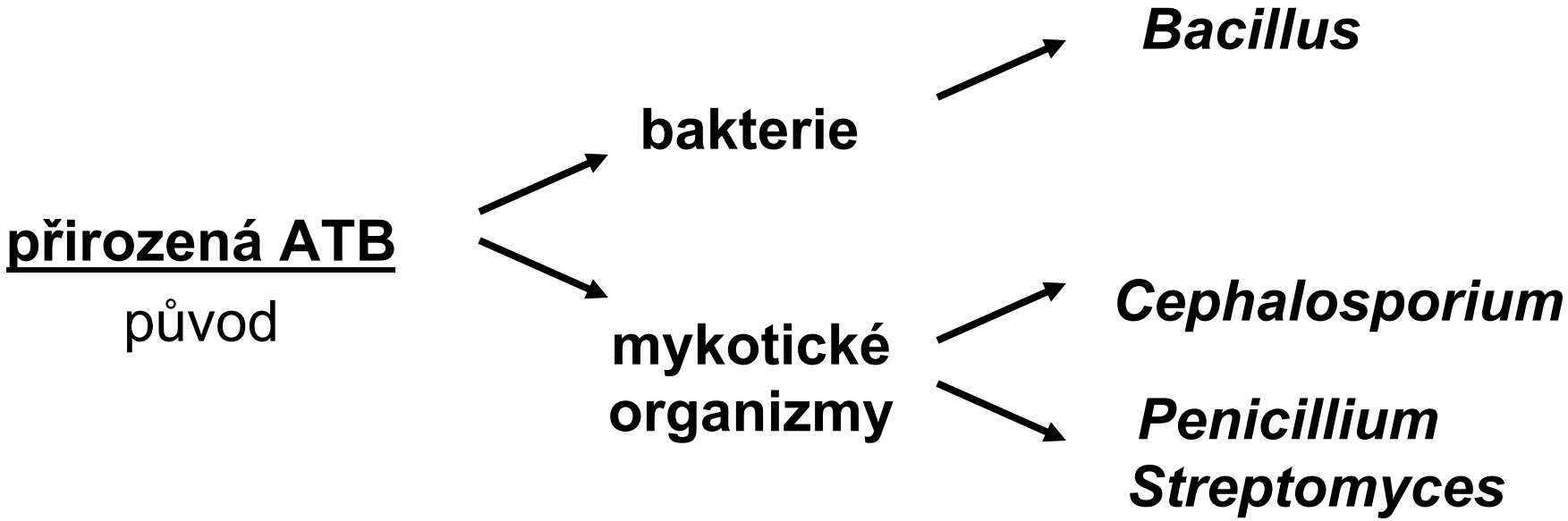
- původ - z přírodních zdrojů nebo se vyráběna synteticky

  polosyntetická ATB = chemicky pozměněné molekulární struktury přirozených ATB

- inhibují nebo destruují mikroby u infikovaného hostitele

- klasifikována podle spektra účinku
  - širokospektrá – působí na mnoho mikrobů
  - úzkospektrá – působí na omezený počet mikrobů

Původ antibiotik



KLASIFIKACE ANTIBIOTIK I

- **klasifikace ATB podle**
  - chemického složení
  - původu
  - cílového místa účinku

- **většina ATB je účinných proti bakteriím**

- **menší počet ATB je účinných proti** virům, houbám, prvokům, červům

KLASIFIKACE ANTIBIOTIK II

- Sulfonamidy, trimethoprim, nitrofurantoin a fluorochinolony jsou syntetická antibiotika. Blokují syntézu nukleových kyselin.
- Beta-laktamy, bacitracin, vankomycin blokují syntézu buněčné stěny bakterií, zejména grampozitivních.
- Aminoglykosidy, tetracykliny a makrolidy blokují proteosyntézu bakterií.
- Většina antimykotik lyzuje buněčné membrány.
- Většina antivirotik jsou analogy nukleotidů; interferují s replikací viru.

IDEÁLNÍ ANTIBIOTIKUM

- selektivně toxické pro mikroby, netoxické pro buňky těla
- preference mikrobicidie (baktericidie) před mikrobiostázou (bakteriostázou)
- relativně rozpustné a aktivní i ve vysokém ředění nepodléhá rychlému rozkladu nebo vylučování, nevytváří rezistenci
- nesnižuje obranyschopnost hostitele
- aktivní i v přítomnosti velkého množství organického materiálu
- nezpůsobuje alergické reakce nebo predispozici k jiné infekci

INDIKACE ATB TERAPIE

- pacient s definovaným infekčním onemocněním
- zvláštní skupina pacient:
  kriticky nemocní vyžadující intenzivní péči, neutropeničtí nemocní, po transplantacích, nedonošenci, těhotné a kojící ženy

HODNOCENÍ ATB LÉČBY- optimální:

– odeznění klinických příznaků

– úplná eliminace původce (eradikace)

NEŽÁDOUCÍ ÚČINKY ANTIBIOTIK

- **Orgánová toxicita** (aminoglykosidy, vankomycin)
- **Alergické reakce** (peniciliny)
- **Suprese nebo alterace normální flóry** (superinfekce)

HLAVNÍ PŘÍČINY REZISTENCE BAKTERIÍ K ANTIBIOTIKŮM

PŘÍČINY VZNIKU REZISTENTNÍCH BAKTERIÍ

- **Přirozené**: 1) chromozomální mutace
  2) zisk rezistence od jiných bakterií

- **Nepřirozené**: selekční antibiotický tlak v prostředí (podpora přežití a množení rezistentních bakterií)

Antibiotika jsou nadprodukována, nadužívána a užívána nesprávně

SELEKČNÍ TLAK ANTIBIOTIKA I

kontakt antibiotika s populací bakterií

- úhyn bakterií vysoce citlivých k tomuto antibiotiku
- přežívání subpopulace méně citlivé nebo zcela rezistentní

počet přežívajících buněk je tím větší, čím nižší je koncentrace antibiotika

SELEKČNÍ TLAK ANTIBIOTIKA II

Postupem času a procesem selekce:

- **rezistentní populace mikroba převládne nad populací citlivou**
- **další genetickou událostí (mutace, zisk genu) se rezistence**
  - **kvantitativně zvyšuje**
  - **rozšiřuje na další antibiotika**

STRATEGIE K OMEZENÍ VZNIKU A ŠÍŘENÍ REZISTENCE

- **Užívání antibiotik**

  správné atb ve správné dávce, správném intervalu, délce podávání

- **Výzkum**
  - stabilních molekul, které nepodléhají inaktivaci (enzymy, jinými mechanizmy)

- **Kontrola spotřeby**
  - vzdělávání odborné i laické veřejnosti
  - restrikce hodnotných ATB

Děkujeme za pozornost