ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI

FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2017 **Zuzana Šimnová**

FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

Studijní program: Specializace ve zdravotnictví B5345

Zuzana Šimnová

Studijní obor: Zdravotní laborant 5345R020

LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA BAKTERIÁLNÍCH ONEMOCNĚNÍ

Bakalářská práce

Vedoucí práce: MUDr. Jana Amlerová

PLZEŇ 2017

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a všechny použité prameny jsem uvedla v seznamu literatury.

V Plzni dne

……

vlastnoruční podpis

Poděkování

Děkuji MUDr. Janě Amlerové za odborné vedení, trvalý zájem a cenné rady při psaní mé bakalářské práce.

Anotace

Příjmení a jméno: Šimnová Zuzana

Katedra: Katedra teoretických oborů

Název práce: Laboratorní diagnostika bakteriálních onemocnění

Vedoucí práce: MUDr. Jana Amlerová

Počet stran – číslované: 47

Počet stran – nečíslované: 24

Počet příloh: 14

Počet titulů použité literatury: 37

Klíčová slova: mikrobiologie, bakteriologie, laboratorní diagnostika, bakterie

Souhrn:

Tato bakalářská práce se zaměřuje na metody vyšetření bakteriálních onemocnění. Skládá se ze dvou hlavních částí – teoretické a praktické. Teoretická část vysvětluje, jaké metody se používají v komplexní laboratorní diagnostice infekčních bakteriálních onemocnění. Praktická část je zaměřena na šetření a vlastní výsledky, které jsou zobrazeny v tabulkách. Při zpracování této bakalářské práce byla použita odborná literatura podle uvedeného seznamu.

Annotation

Surname and name: Šimnová Zuzana

Department: Department of Theoretical Fields

Title of thesis: Laboratory diagnosis of bacterial diseases

Consultant: MUDr. Jana Amlerová

Number of pages – numbered: 47

Number of pages – unnumbered: 24

Number of appendices: 14

Number of literature items used: 37

Keywords: mikrobiology, bacteriology, laboratory diagnosis, bacteria

Summary:

This Bachelor´s thesis is concentrated on the laboratory diagnostic methods of bacterial diseases. It consists of two main parts - theoretical and practical one. The theoretical part explains what methods are used in complex laboratory diagnostics of infectious bacterial diseases. The practical part is focused on investigation and own results which are displayed in tables. The specialized and reference literature by presented list was used during processing of this thesis.

Obsah

ÚVOD **11**

TEORETICKÁ ČÁST **13**

1 KOMPLEXNÍ LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA INFEKČNÍCH ONEMOCNĚNÍ **13**

1.1 HEMATOLOGICKÁ VYŠETŘENÍ 13
1.2 BIOCHEMICKÁ VYŠETŘENÍ 13
1.3 IMUNOLOGICKÁ VYŠETŘENÍ 14
1.4 HISTOLOGICKÁ VYŠETŘENÍ 14

2 PRINCIPY MIKROBIOLOGICKÉ LABORATORNÍ DIAGNOSTIKY **15**

2.1 OBECNĚ O BAKTERIÍCH 15
2.1.1 Vztah mikroorganismu a makroorganismu *16*
2.2 RŮST A MNOŽENÍ BAKTERIÍ 16
2.3 TAXONOMIE BAKTERIÍ 17
2.4 METODY LABORATORNÍ DIAGNOSTIKY V MIKROBIOLOGII 17

3 LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA V BAKTERIOLOGII **18**

3.1 MIKROSKOPIE 18
3.2 KULTIVACE 19
3.2.1 Typy kultivačních médií *19*
3.3 MOLEKULÁRNĚ GENETICKÉ METODY 20
3.4 SÉROLOGICKÉ METODY PŘÍMÉHO PRŮKAZU – AGLUTINACE A PRECIPITACE 21
3.5 SÉROLOGICKÉ METODY NEPŘÍMÉHO PRŮKAZU 21
3.6 POCT METODY 21

4 ODBĚR MATERIÁLU NA BAKTERIOLOGICKÉ VYŠETŘENÍ **22**

4.1 OBECNÉ ZÁSADY SPRÁVNÉHO ODBĚRU MATERIÁLU 22
4.1.1 Odběr moče *23*
4.1.2 Odběr krve *23*
4.1.3 Odběr mozkomíšního moku *23*
4.1.4 Odběr výtěrů z ložisek *23*
4.1.5 Odběr materiálu z primárně sterilních lokalizací *24*
4.1.6 Odběr vzorků z horních cest dýchacích *24*
4.1.7 Odběr vzorků z dolních cest dýchacích *24*
4.1.8 Odběr vzorků z pohlavních orgánů *24*
4.1.9 Odběr stolice a výtěrů z rekta *24*
4.1.10 Odběr tkání *24*
4.1.11 Odběr cizorodých materiálů *24*

5 ZPRACOVÁNÍ KLINICKÉHO MATERIÁLU NA BAKTERIOLOGII **25**

5.1 ZPRACOVÁNÍ MOČE 25
5.2 ZPRACOVÁNÍ KRVE 25
5.3 ZPRACOVÁNÍ MOZKOMÍŠNÍHO MOKU 25
5.4 ZPRACOVÁNÍ VÝTĚRU 26
5.5 ZPRACOVÁNÍ VÝTĚRU Z REKTA 26
5.6 ZPRACOVÁNÍ SPUTA 26
5.7 ZPRACOVÁNÍ STĚRŮ Z POHLAVNÍCH ORGÁNŮ 26

6 IDENTIFIKACE BAKTERIÍ **27**

6.1 METODY FENOTYPOVÉ KONVENČNÍ 27
6.1.1 Morfologie bakterií *27*
6.1.2 Vztah bakterií ke kyslíku *28*

6.1.3 Růst bakterií na kultivačních půdách ... *28*
6.1.4 Biochemická identifikace bakterií ... *29*
6.1.5 Sérotypizace ... *29*
6.2 METODY FENOTYPOVÉ MOLEKULÁRNÍ ... 30
6.2.1 Chromatografie ... *30*
6.2.2 Hmotnostní spektrometrie ... *30*
6.3 METODY MOLEKULÁRNĚ-GENETICKÉ ... 31
7 STANOVENÍ CITLIVOSTI BAKTERIÍ ... 32
7.1 METODY STANOVENÍ CITLIVOSTI BAKTERIÍ ... 33
7.1.1 Detekce rezistence ... *34*
8 DETEKCE ZVLÁŠTNÍCH DRUHŮ BAKTERIÍ ... 36
9 AUTOMATIZACE V BAKTERIOLOGICKÉ DIAGNOSTICE ... 37
PRAKTICKÁ ČÁST ... 38
10 CÍLE PRÁCE, VÝZKUMNÉ OTÁZKY, HYPOTÉZY ... 38
11 POSTUP ZÍSKÁVÁNÍ BIOLOGICKÉHO MATERIÁLU A POPIS SLEDOVANÉHO SOUBORU ... 39
11.1 ODBĚR BIOLOGICKÉHO MATERIÁLU ... 39
11.2 POPIS SLEDOVANÉHO SOUBORU ... 39
12 METODIKA ... 40
12.1 ZPRACOVÁNÍ VZORKŮ KLINICKÉHO MATERIÁLU ... 40
12.1.1 Výtěry z krku, nosu a rekta ... *40*
12.1.2 Moč ... *41*
12.1.3 Sputum a další materiál z dolních cest dýchacích ... *41*
12.1.4 Stěr z rány a dekubitu ... *41*
12.1.5 Žaludeční obsah ... *42*
12.1.6 Žluč ... *42*
12.1.7 Tekuté vzorky z primárně sterilních lokalit ... *42*
12.1.8 CŽK a arteriální katétr ... *42*
12.1.9 Hemokultura ... *42*
12.2 IDENTIFIKACE BAKTERIÍ ... 43
12.2.1 Identifikace jednoduchá ... *43*
12.2.2 Identifikace složitá ... *45*
12.2.3 Identifikace hmotnostní spektrometrií ... *46*
12.2.4 Identifikace na selektivně diagnostických půdách ... *46*
12.3 STANOVENÍ CITLIVOSTI ... 46
12.3.1 Diskový difúzní test – základní citlivost ... *46*
12.3.2 Diskový difúzní test – rozšířená citlivost ... *47*
12.3.3 Stanovení MIC ... *47*
12.4 MOLEKULÁRNĚ GENETICKÉ METODY ... 47
12.5 PRŮKAZ ANTIGENŮ ... 47
12.6 PRŮKAZ MYKOBAKTERIÍ ... 47
12.7 PRŮKAZ TOXINU *CLOSTRIDIUM DIFFICILE* ... 48
13 ZPRACOVÁNÍ ZÍSKANÝCH DAT - VÝSLEDKY ... 49
14 DISKUZE ... 54
ZÁVĚR ... 57
SEZNAM LITERATURY A INTERNETOVÝCH ZDROJŮ ... 58
SEZNAM ZKRATEK ... 62

SEZNAM TABULEK **63**

SEZNAM PŘÍLOH **64**

PŘÍLOHY **65**

ÚVOD

Bakterie se vyskytují všude kolem nás a jsou původci mnoha různých infekčních onemocnění. V krajních případech mohou způsobit i smrt svého hostitele. Přesto ne všechny bakterie jsou ale škodlivé. Některé (např. střevní bakterie) mají důležitou úlohu pro správné fungování našeho organismu, žijeme s nimi tedy v symbióze a nazýváme je normální (fyziologickou) mikroflórou lidského organismu. Tzv. probiotické bakterie se přidávají do některých potravin, jako příklad je možné uvést bakterie rodu *Lactobacillus.* Onemocnění mohou způsobit jak bakterie pocházející z vnějšího prostředí, tak i bakterie z našeho vlastního organismu. Toto nastává, pokud se bakterie, žijící primárně třeba ve střevech, dostanou do jiného orgánu. Typickým příkladem může být *E. coli*, která je za normálních okolností součástí střevní mikroflóry a je také nejčastějším původcem infekcí močových cest.

Předkládaná práce se věnuje laboratorní diagnostice bakteriálních onemocnění, především se zaměřením na mikrobiologické laboratorní vyšetření. V teoretické části se věnuji nejdříve stručně komplexně diagnostice bakteriálních onemocnění. V dalších kapitolách se zaměřuji pouze na mikrobiologii a na bakteriologii jako takovou. Jsou zde popsány základní principy mikrobiologické laboratorní diagnostiky, zejména bakteriologické, a základní bakteriologické vyšetřovací postupy. Dále se ve své práci zabývám správným odběrem a zpracováním biologického materiálu pro bakteriologické vyšetření. Tato část diagnostiky je velmi důležitá, neboť správný odběr a transport materiálu do laboratoře je základem pro správný výsledek laboratorního vyšetření a správnou interpretaci výsledku klinickému lékaři, který v závislosti na výsledcích podává pacientovi léčbu. Tuto část laboratorního vyšetření (též nazývanou jako preanalytická část laboratorního vyšetření) nemůže pracovník laboratoře nijak ovlivnit. Dále popisuji různé metody stanovení citlivosti bakterií k antimikrobiálním látkám, které jsou neméně důležitou součástí laboratorního vyšetření. Závěrem teoretické části popisuji možnosti automatizace v bakteriologické laboratorní diagnostice. Zde je třeba upozornit na to, že automatizace se v mikrobiologické diagnostice uplatňuje mnohem méně, než je tomu v jiných oborech.

Práce pokračuje praktickou částí. K provedení praktické části jsem si vybrala po konzultaci s vedoucí práce, MUDr. Janou Amlerovou, oddělení metabolické JIP I. interní kliniky Fakultní nemocnice v Plzni. Toto oddělení bylo zvoleno proto, že se

zde nacházejí pacienti s velmi vážným klinickým stavem, a lze tedy předpokládat velké množství odebíraných biologických vzorků s pravděpodobnou patologií. Sledovala jsem, jaké vzorky zde byly pacientům odebrány a jakým způsobem byly následně zpracovány – zda se jednalo o metody „klasické diagnostiky“, nebo zda se více využívá moderních automatických metod stanovení. Přehled odebraných vzorků i jejich zpracování jsou uvedeny a popsány ve výsledcích. S tímto souvisí i výzkumná otázka, kterou jsem si vzhledem k tématu práce položila - „Jaká jsou kritéria pro volbu metody v laboratorní diagnostice bakterií?“.

TEORETICKÁ ČÁST

1 KOMPLEXNÍ LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA INFEKČNÍCH ONEMOCNĚNÍ

Diferenciální diagnostika infekčních onemocnění je komplexní proces, který vede ke správnému stanovení diagnózy, správné léčbě, a tím k úzdravě pacienta a zabránění šíření infekčních agens v komunitě. Zásadní součástí tohoto procesu je diagnostika laboratorní, na níž se podílejí v různé míře různé odbornosti – mikrobiologie, biochemie, hematologie, histologie a imunologie. Výsledky laboratorních vyšetření musí být správně interpretovány v souvislosti se stavem pacienta a také v souvislosti s ostatními nálezy. Laboratorní metody v jednotlivých oborech se mohou prolínat (15). Mikrobiologická laboratorní diagnostika je popsána v samostatné kapitole.

1.1 Hematologická vyšetření

Mezi hematologická vyšetření při podezření na infekční původ onemocnění patří hemokoagulační vyšetření, stanovení krevního obrazu s diferenciálním rozpočtem leukocytů nebo sedimentace erytrocytů (15).

Sedimentace erytrocytů je rychlost klesání erytrocytů v nesrážlivé plazmě. Toto stanovení má sice svá omezení v diagnostice akutní fáze zánětu, ale pro své snadné provedení je dnes stále využíváno. Podle výsledků lze rozlišit, zda je onemocnění bakteriálního nebo virového původu – při bakteriálním onemocnění jsou hodnoty velmi vysoké, na rozdíl od virového původu onemocnění, kde jsou hodnoty nižší (15).

Na akutní fázi zánětu při vyšetření **krevního obrazu** upozorňuje především leukocytóza (zvýšený počet neutrofilních leukocytů). Stejně jako u sedimentace erytrocytů jsou hodnoty bílých krvinek vyšší u bakteriální infekce, než u virové, kde mohou být počty bílých krvinek normální nebo snížené (16). U těžkých bakteriálních infekcí je patrné vyplavování mladých forem neutrofilních leukocytů bez segmentace jádra – tyčí, tzv. posun doleva (23).

1.2 Biochemická vyšetření

V klinické biochemii se při stanovení akutní fáze infekčního onemocnění nejčastěji využívá tzv. reaktantů akutní fáze. Jedná se o bílkoviny, jejichž hodnota stoupá při akutní fázi zánětu. Nejčastěji takto stanovovanou bílkovinou je C reaktivní protein

(CRP), který v současné době nahrazuje stanovení sedimentace erytrocytů, protože ke zvýšení hladiny CRP dochází rychleji, než ke změně sedimentace erytrocytů. Hodnoty CRP jsou vyšší u bakteriálního původu infekce. Kromě CRP se stanovuje také prokalcitonin (PCT), který je za normálních okolností produkován C buňkami štítné žlázy jako prekurzor hormonu kalcitoninu (17). Při systémové a zejména při bakteriální infekci ho ale produkují i ostatní buňky v těle a nedochází k jeho konverzi na kalcitonin (15, 17, 18).

1.3 Imunologická vyšetření

Během imunologického vyšetření se zjišťuje především koncentrace imunoglobulinů v séru. Jelikož se jedná o bílkoviny, tedy molekuly s elektrickým nábojem, provádí se toto vyšetření elektroforézou (19). Dále je možné vyšetřit specifické protilátky proti infekčním mikroorganismům, kdy se hodnotí titr protilátek. Neméně důležité je také vyšetření komplementu, ať už stanovení jen jeho složek (základním vyšetřením je stanovení C3 a C4 složek komplementu) nebo provedení funkčního testu, který poukazuje na aktivitu celého komplementového systému (19).

1.4 Histologická vyšetření

Součástí diagnostických postupů při detekci infekčního procesu v organismu je využití cytologických a histologických technik. Cytologické vyšetření zkoumá buňky přítomné v ložisku infekčního procesu (24). Vyšetření buněk je možné buď odběrem stěrů, tekutých materiálů nebo tzv. otiskem. Histologické vyšetření je založeno na posouzení charakteristik odebrané tkáně (biopsie) a určení povahy onemocnění (24).

2 PRINCIPY MIKROBIOLOGICKÉ LABORATORNÍ DIAGNOSTIKY

Laboratorní diagnostika v mikrobiologii obecně je důležitá pro stanovení příčiny infekčního onemocnění, a tím tedy stanovení diagnózy pacienta. Je jedním ze základních pilířů diferenciální diagnostiky v klinických oborech. Cílem je zachycení infekčního agens jako příčiny onemocnění, jeho identifikace a určení možností správné léčby, anebo alespoň průkaz reakce organismu na toto agens jako důkaz jeho pravděpodobné přítomnosti v organismu (viz nepřímá diagnostika). Po rozpoznání bakteriálního původce onemocnění je stanovena citlivost na antibiotika, což je důležité pro správnou léčbu tohoto onemocnění. Rozeznáváme tedy **mikrobiologii lékařskou**, která je více orientována na vlastnosti mikroorganismů a zabývá se především patogenními mikroby a **mikrobiologii klinickou**, která využívá znalosti lékařské mikrobiologie při diagnostice a léčbě infekčního onemocnění (1). Ve své práci se budu zabývat jedním z podoborů lékařské mikrobiologie – bakteriologií.

Bakteriologie je obor mikrobiologie, který se zabývá strukturou a vlastnostmi bakterií. První, kdo vůbec mikroorganismy objevil a popsal, byl Antoni van Leeuwenhoek – bývá označován jako „otec mikrobiologie“. Dalším průkopníkem v mikrobiologii byl Louis Pasteur, který dokázal, že mikroby mohou vznikat pouze z mikrobů stejného druhu. Robert Koch byl rovněž důležitou osobností pro mikrobiologii a především pro bakteriologii – „otec bakteriologie“ – prokázal původce tuberkulózy (TBC) (Kochův bacil) (4, 5).

2.1 Obecně o bakteriích

Bakterie jsou řazeny mezi prokaryotické organismy. Od eukaryotických buněk se liší třemi základními vlastnostmi. V prvé řadě se jedná o organizaci buněčného jádra. Jádro prokaryotických buněk je (na rozdíl od buněk eukaryotických) haploidní. To znamená, že je tvořeno pouze jednou molekulou DNA, ve které je uložena veškerá genetická informace bakterie. Jádro neobsahuje ani vlastní jadernou membránu ani jadérko (5, 9).

Dále se prokaryota liší absencí některých buněčných organel, jako jsou mitochondrie nebo endoplasmatické retikulum. V neposlední řadě je u bakterií i odlišná funkce ribozomů. Ty se od eukaryot liší v celé řadě dílčích funkčních a stavebních vlastností, ve velikosti a hmotnosti (5).

2.1.1 Vztah mikroorganismu a makroorganismu

Možnost vzájemného působení mikroorganismu a makroorganismu odpovídá obecně vztahu mezi dvěma biologickými druhy. Rozlišujeme tři základní vztahy. Buď se může mikroorganismus chovat jako **saprofyt (komenzál),** kdy nepoškozuje makroorganismus a využívá jeho metabolity jako zdroj živin, nebo spolu mohou žít v **symbióze** – tehdy si jsou organismy vzájemně prospěšné, nebo se může mikroorganismus chovat jako **parazit**, kdy svými metabolity poškozuje makroorganismus a ochuzuje ho o potřebné živiny. Takto se chová většina patogenních mikroorganismů (patogenita představuje schopnost mikroba proniknout do těla hostitele, pomnožit se v něm a vyvolat onemocnění) (5, 9).

2.2 Růst a množení bakterií

Bakterie se množí prostým dělením svých buněk a rychlost množení je ovlivněna celou řadou působících faktorů – vhodné složení atmosféry, dostatek biogenních prvků, živin, apod. Za ideálních podmínek narůstá počet bakterií geometrickou řadou (ve skutečnosti se ale rychlost množení bakterií postupně zpomaluje, protože vyčerpají živiny a hromadí se zplodiny jejich metabolismu). Celý proces množení se nazývá růstový cyklus, který začíná oddělením dceřiné buňky od mateřské a končí rozdělením na dvě identické buňky (5, 10). Tento proces má několik fází.

První fáze zahrnuje **růst buňky**, kdy vznikají cytoplazmatické membrány, cytoplasmy a rozdvojuje se DNA. Druhou fází je **tvorba septa**, které roste ze stěny směrem ke středu buňky, a v poslední fázi dochází ke konečnému **rozdělení buňky**, kdy každá dceřiná buňka získá kopii DNA a septum ji oddělí od druhé dceřiné buňky (5, 10). Rozdělené buňky na sebe ale často naléhají svými stěnami, z čehož vyplývá uspořádání bakteriálních buněk, které pozorujeme v mikroskopu (7).

Důležitým pojmem při množení bakterií je také **generační doba**. To je doba, za kterou se zdvojnásobí počet bakterií v kultuře. Je různá u různých druhů bakterií, ale platí, že pro většinu patogenních bakterií je to přibližně půl hodiny až hodina. Existují samozřejmě i výjimky, jako třeba *Mycobacterium tuberculosis*, které má generační dobu až 12 hodin (5, 10).

2.3 Taxonomie bakterií

Taxonomie je vědní obor, zabývající se klasifikací, nomenklaturou a identifikací bakterií. Klasifikací se rozumí uspořádání do skupin podle vzájemných vztahů bakterií, tyto skupiny jsou obecně označovány jako taxony. Základní taxonomická jednotka je druh a příbuzné druhy tvoří jeden taxon. Druhem tedy rozumíme bakteriální kmeny, které mají společné znaky (7, 8).

Další částí taxonomie je nomenklatura, která pojmenovává jednotlivé druhy taxonů. Nomenklatura bakteriálního druhu má vždy pouze jedno platné jméno, přičemž toto jméno je složeno vždy ze dvou částí – první částí se označuje rod příslušné bakterie a druhou částí se označuje druh, např. *Streptococcus pyogenes* (7, 8).

Identifikace, tedy určování, je vlastně zkoumání, při kterém zjistíme, do kterého již označeného druhu patří příslušná bakterie. Identifikace se provádí na základě morfologie, barvitelnosti, vztahu bakterie ke kyslíku, růstu bakteriálních kolonií na kultivačních půdách, apod. (7, 8). Samotná identifikace bude v této práci ještě popsána.

2.4 Metody laboratorní diagnostiky v mikrobiologii

Metody mikrobiologické laboratorní diagnostiky se dají rozdělit do dvou hlavních skupin – přímý a nepřímý průkaz (7). Během **přímého průkazu** se prokazuje přímo přítomnost mikroorganismu nebo jeho části v klinickém vzorku. Toto vyšetření lze provádět mikroskopicky, kultivačně, molekulárně genetickými metodami a některými sérologickými metodami přímého průkazu (viz dále). Při **nepřímé diagnostice** se sleduje interakce mezi mikrobiálním antigenem a imunitním systémem makroorganismu (protilátkovou nebo buněčnou imunitou). Hledáme tedy známky imunitní odpovědi jako reakce makroorganismu na přítomnost mikroorganismu, který v organismu pacienta předpokládáme (2).

3 LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA V BAKTERIOLOGII

V bakteriologické laboratorní diagnostice se uplatňuje především diagnostika přímá. Mezi její základní postupy patří průkaz mikroskopický, kultivační, dále se využívá průkaz molekulárně genetický a průkaz antigenů sérologickými metodami. U patogenů obtížně prokazatelných přímou diagnostikou se využívá nepřímý průkaz, a to jak průkaz protilátek, tak v určitých případech i reakce buněčné imunitní složky (např. průkaz latentní tuberkulózy) (1).

3.1 Mikroskopie

Mezi základní metody laboratorního průkazu infekčního agens v mikrobiologii patří mikroskopie. Jedná se o rychlý průkaz z kultivačně zachyceného mikroba nebo přímo ze vzorku klinického materiálu. Nejčastěji používaným mikroskopem je mikroskop optický. Dále je možno použít elektronový mikroskop, který však své uplatnění nachází především ve virologii, nebo mikroskop fluorescenční, který slouží k diagnostice pomocí fluoreskujících látek (2).

Před samotným mikroskopováním je nutné zhotovit preparát z odebraného materiálu. **Preparát** může být buď **nativní** – na podložní sklo se nakape tekutý materiál, tuhý se rozetře v kapce fyziologického roztoku, překryje se krycím sklíčkem a pozoruje se, nebo se zhotoví fixovaný (**barvený**) **preparát** – materiál na podložním skle se nechá zaschnout, fixuje se protažením v plameni nebo metanolem, obarví se podle zvolené metody a prohlíží se (2).

Základním barvením v bakteriologii je barvení dle Grama. Postup tohoto barvení je velmi jednoduchý – bývá označován zkratkou VLAK. Na zkoumaný vzorek na podložním skle se postupně nanáší roztoky – nejdříve krystalová **v**ioleť, **L**ugolův roztok, **a**lkohol, následně se preparát promyje vodou a nakonec se nanese **k**arbolfuchsin. Takto připravené mikroskopické preparáty se prohlíží pod zvětšením 1000x s pomocí imerzního oleje (2).

Gramovo barvení rozděluje bakterie na grampozitivní (v mikroskopu vidíme jako modré bakterie) a gramnegativní (červené bakterie). Zabarvení je způsobeno odlišnou stavbou buněčné stěny bakterií. Grampozitivní bakterie obsahují ve své buněčné stěně především polysacharidy a velmi málo lipidů. Krystalová violeť tvoří s Lugolovým roztokem modrou komplexní barvu a při navrstvení alkoholu nedochází k jejímu

vymytí. Naopak gramnegativní bakterie mají ve své stěně mnohem větší poměr lipopolysacharidů a při navrstvení alkoholu dochází k proděravění buněčné stěny a k vyplavení modrého komplexu, tvořeného violetí a Lugolovým roztokem v předchozích krocích (2).

Některé bakterie se mohou barvit jak modře, tak červeně, ty nazýváme gramlabilní. Jiné bakterie se Gramem barví velmi obtížně. Na tyto bakterie se využívá barvení dle Ziehl-Neelsena, v mikroskopu je pozorujeme jako červené tyčky na zeleném nebo modrém pozadí. Kvůli své odolnosti vůči odbarvení kyselým alkoholem nesou označení acidorezistentní (rod *Mycobacterium*) (2,7).

V případě speciálních požadavků je možné využít i jiné metody barvení, např. barvení dle Burriho na bakteriální pouzdra, dle Giemsy-Romanowského pro barvení vaginálních sekretů (7).

3.2 Kultivace

Další standardní metodou průkazu bakterie je kultivace. Ta se provádí naočkováním odebraného klinického materiálu na vhodnou kultivační půdu. Následně se inkubuje při optimální teplotě (standardně 35–37 °C) a vyhodnocují se narostlé kolonie (7). V bakteriologii a mykologii představuje kultivační průkaz základní a nejdůležitější diagnostický postup zvaný zlatý standard. Délka kultivace závisí na rychlosti množení dané bakterie (2, 4).

Při kultivaci je nutné dodržovat kultivační podmínky nezbytné pro jednotlivé druhy bakterií. Mezi kultivační podmínky patří teplota (rozděluje organismy na mezofilní, psychrofilní a termofilní), vlhkost, pH, složení plynného prostředí (rozděluje kultivaci na aerobní a anaerobní) a dostatečné množství živin a biogenních prvků (2, 4).

3.2.1 Typy kultivačních médií

Kultivační půdy můžeme rozdělit na **tekuté a pevné**. Tekuté půdy (bujony, masopeptonové vody apod.) většinou slouží k pomnožení bakterií – růst se projevuje zákalem, tvorbou sedimentu nebo povrchové blanky. Základem pevných (agarových) půd je agar z mořské řasy obohacený živnými látkami. Na pevných půdách bakterie rostou ve formě kolonií. Základní pevná kultivační půda, která je vhodná pro kultivaci většiny bakterií, se nazývá krevní agar, kromě živného agaru obsahuje erytrocyty (beraní nebo koňské) (2,7,10). Podle barvy, vzhledu a zápachu kolonie můžeme

orientačně usuzovat na druh bakterie. Pro kultivaci bakterií se využívají také půdy **selektivní**. Ty obsahují kromě základních látek různé chemikálie, které potlačují růst určitých bakteriálních druhů a naopak růst některých druhů umožňují. Tyto půdy se využívají, pokud je nutné některý bakteriální kmen izolovat ze smíšené kultury (2, 4).

Pro základní identifikaci můžeme využít **diagnostické půdy**, které obsahují biochemické látky (substrát), které odhalí biochemické vlastnosti mikrobů (např. produkce určitého enzymu bakterií změní substrát a to se projeví v přítomnosti indikátoru barevnou reakcí). (2, 4, 7).

V současné době jsou v rutinní diagnostice hojně využívány **půdy selektivně diagnostické** (např. Endova půda nebo McConkey), které mají obě tyto vlastnosti společné (7). Pro správnou diagnostiku je důležitý správný výběr kultivační půdy a izolace bakteriálního kmene v čisté kultuře. Pro transport vzorků do laboratoře jsou využívána tzv. transportní média (např. Amiesovo, Stuartovo), která zajistí podmínky pro přežití bakterií během transportu (2, 4).

3.3 Molekulárně genetické metody

Molekulárně genetické metody jsou charakteristické vysokou specificitou a senzitivitou (7). Většina těchto metod využívá pro svá stanovení vyšetřovanou nukleovou kyselinu (DNA) zbavenou určitého podílu bílkovin. Tyto metody se využívají k detekci patogenů ve vzorku klinického materiálu i k identifikaci agens (viz dále). Nejprve musí dojít k izolaci DNA z bakteriálních buněk. Při tomto procesu jsou rozrušeny chemickou cestou jednotlivé komplexy DNA. Izolovaná nukleová kyselina (NK) je poté zkoumána metodami hybridizačními nebo amplifikačními (21).

Hybridizační metody (tzv. sondy) se využívají především k identifikaci mikrobů předem namnožených například kultivací (25).

Mezi amplifikační reakce patří v rutinní diagnostice nejčastěji používaná metoda polymerázová řetězová reakce (PCR) (7). Tato metoda je založena na opakování tří cyklů vlivem změny teplot reakční směsi. Nejprve dochází k rozložení dvouvláknové DNA na jednotlivá vlákna. Poté se připojí dva krátké nukleotidy (tzv. primery) komplementární ke specifickým úsekům na vláknech DNA, dojde tak k vymezení krátkého úseku DNA, který se následně ve třetím kroku množí (amplifikuje). Detekce amplifikace se provádí pomocí DNA sondy nebo elektroforézou. Metoda Real-Time

PCR umožňuje detekci amplifikované DNA v reálném čase v průběhu reakce, a tím kvantifikaci výsledku. Amplifikační reakce mohou být využity k detekci i k identifikaci infekčního agens (3, 25).

3.4 Sérologické metody přímého průkazu – aglutinace a precipitace

Sérologická reakce je reakce mezi antigenem a protilátkou. Pokud prokazujeme protilátky, jedná se o nepřímý průkaz (viz dále), při prokazování antigenu se jedná o průkaz přímý. Při **aglutinaci** dochází k reakci mezi korpuskulárním antigenem a protilátkou za tvorby viditelného aglutinátu. U **precipitace** reaguje antigen v roztoku s protilátkou za vzniku jemného precipitátu (2, 7).

3.5 Sérologické metody nepřímého průkazu

Protilátky se prokazují v séru, popř. i v jiném biologickém materiálu, jakým může být např. likvor. Principem těchto metod je detekce protilátek v pacientově séru pomocí známého antigenu. Samotnou reakci můžeme rozdělit na dvě fáze, kdy při první fázi dochází k vazbě antigenu na protilátky a při druhé fázi se tento komplex zviditelní (15).

Tyto metody jsou používány také v imunologii, diagnostika infekčních onemocnění se nazývá infekční sérologie. Podle typu metody je možné výsledky interpretovat kvalitativně nebo kvantitativně. Nezbytná je správná interpretace výsledku sérologického vyšetření v souvislosti s dalšími nálezy a stavem pacienta (1, 2, 25).

3.6 POCT metody

V současné době dochází také k rozvoji a využívání tzv. POCT metod (point-of-care tests), což jsou metody prováděné in vitro v místě péče o pacienta s cílem urychlení diferenciální diagnostiky. V mikrobiologii mají omezený význam, ale jejich přínos je nezanedbatelný. Stanovení je jednoduché, výsledek je dostupný do několika minut. Z těchto testů je nejvíce využívaný test pro stanovení CRP, což přispívá k odlišení bakteriální a virové infekce a tedy k rozhodnutí o zahájení antibiotické léčby. Dále je možné využít např. rychlý imunochromatografický test pro detekci pyogenních streptokoků ve výtěru z krku (2, 26).

4 ODBĚR MATERIÁLU NA BAKTERIOLOGICKÉ VYŠETŘENÍ

Správný odběr klinického materiálu je základem jakéhokoliv laboratorního vyšetření. Většina laboratorních chyb během vyšetření je způsobena právě špatným odběrem (7). Odběr vzorku klinického materiálu musí proběhnout podle přesně daných kritérií, aby se zabránilo kontaminaci materiálu, aby bylo získáno dostatečné množství materiálu a aby byl vzorek odebrán ze správného místa. Pouze správně provedený odběr spolu se správným transportem do laboratoře vede k validnímu výsledku celého laboratorního procesu. Materiál musí být do laboratoře dopraven a zpracován v co nejkratším čase (1, 7, 20).

Odběr biologického materiálu se provádí při podezření na infekční původ onemocnění – je tedy nutné v každém vzorku předpokládat přítomnost infekčního agens a nakládat s ním jako s potenciálně infekčním, tzn. používat ochranné prostředky. Samotný odběr se provádí podle lokalizace a druhu infekčního onemocnění, sterilními nástroji do sterilních nádob a správnou technikou odběru (6, 7).

Samotný proces vyšetření má několik fází – nejdříve musí dojít k **indikaci** vyšetření. O tom rozhoduje klinický lékař a posuzuje, zda se vyšetření vůbec provede a jaké vyšetření má být provedeno. Poté dochází k vlastnímu **odběru materiálu** (jeho obecné zásady budou popsány dále) **a k jeho transportu.** Současně je nutno spolu se správně označeným vzorkem dodat řádně vyplněnou žádanku (průvodku). Ta je nezbytným dokumentem s významem lékařským (informace o pacientovi a o vzorku klinického materiálu, ekonomickým (objednávka služby) a také právním (součást zdravotnické dokumentace). Je vodítkem pro to, které vyšetření se bude provádět. V laboratoři vzorek přijme pracovník příjmu, který zkontroluje kvalitu materiálu, vyplněnou žádanku a identifikační údaje pacienta. Na žádanku se zapíše čas příjmu a podpis pracovníka, který příjem provedl. Každému vzorku se přidělí specifické protokolové číslo, pod kterým je vzorek veden po celý proces vyšetření. Následně dochází k **vlastnímu zpracování vzorku** podle druhu materiálu. Po dokončení vyšetření je výsledek **interpretován** a **odeslán** zpět k indikujícímu lékaři (7, 20).

4.1 Obecné zásady správného odběru materiálu

Každý vzorek na jakékoliv mikrobiologické vyšetření musí být odebrán **ze správného místa** – tj. místa, kde lze předpokládat přítomnost mikroba, **ve správný**

čas – pokud možno před zahájením léčby pomocí antibiotik, **správným způsobem** – lege artis, asepticky a **do správných odběrových nádob**, které musí být správně označené a sterilní (8, 20).

Žádanky a odběrové nádobky musí být čitelně označeny ještě před provedením vlastního odběru. Nesmí chybět ani kód diagnózy, kvůli které se požaduje bakteriologické vyšetření, identifikace pacienta, oddělení, které žádá vyšetření, a podpis odebírajícího pracovníka. Obecně platí, že vzorek by měl být dopraven do laboratoře a zpracován nejpozději do dvou hodin po odběru. Důležitá je také správná transportní půda a správná teplota při transportu, která je většině případů přibližně 20 °C (8).

4.1.1 Odběr moče

Vyšetření moče se provádí při podezření na infekci močového ústrojí. Nejčastější způsob je odběr středního proudu moče do sterilní zkumavky. Zevní ústí močové trubice je osídleno mikrobiální flórou, proto odběr musí probíhat po důkladném omytí vodou a mýdlem. Další možností je odběr jednorázovým vycévkováním močového měchýře, event. i suprapubickou punkcí (4, 7).

4.1.2 Odběr krve

Odebírá se žilní krev do speciálních lahviček na hemokultivaci (tzv. hemokultura) pro detekci aerobních i anaerobních bakterií. Podle standardních postupů je doporučeno odebírat hemokultury v sadě 2–3 odběrů. Je důležité, aby odběr proběhl za aseptických podmínek (4, 13).

4.1.3 Odběr mozkomíšního moku

Mozkomíšní mok (likvor) se v bakteriologii vyšetřuje především pro diagnostiku bakteriální meningitidy. Velký význam má toto vyšetření pro včasnou diagnostiku např. meningokokové meningitidy. Likvor se odebírá do sterilních zkumavek v množství alespoň 2 ml (4).

4.1.4 Odběr výtěrů z ložisek

Odběr se provádí z rozhraní zdravé a zánětlivě změněné tkáně nebo ze spodiny hluboké rány na výtěrovku do transportního média (20).

4.1.5 Odběr materiálu z primárně sterilních lokalizací

Odběr tekutého materiálu (výpotek, sekret…) se provádí do sterilní zkumavky. Při podezření na anaerobní infekci se může vzorek poslat v injekční stříkačce uzavřené zátkou. Není-li z různých důvodů možné odebrat tekutý materiál, lze odběr provést na výtěrovku. Nezbytné je pak použití transportního média např. Amiesova nebo Stuartova (7).

4.1.6 Odběr vzorků z horních cest dýchacích

Odebírá se většinou výtěr z krku, nosohltanu event. nosu na výtěrovku do transportního média (20).

4.1.7 Odběr vzorků z dolních cest dýchacích

Odběr sputa je vlastně vykašlání hlenu do speciální nádobky, tzv. „sputničky“. Provádí se ráno po hygieně dutiny ústní. Mezi invazivní odběry z dolních cest dýchacích patří např. bronchoalveolární laváž nebo další speciální techniky (7).

4.1.8 Odběr vzorků z pohlavních orgánů

Zpravidla se jedná o odběry z ústí močové trubice, jak u muže, tak u ženy. U ženy je ještě možný stěr z pochvy nebo cervixu. U poševních výtěrů by měl být udán údaj o fázi menstruačního cyklu. Pro transport je užívána Amiesova půda (7).

4.1.9 Odběr stolice a výtěrů z rekta

Pro kultivaci střevních patogenů se provádí odběr výtěrovkou, zavedenou opatrně cca 2–3 cm za anální svěrač, vzorek se odebírá rotačním pohybem, aby na výtěrovce byla patrná stolice. V některých případech (např. průkaz toxigenního kmene *Clostridium difficile*) se odebírá vzorek stolice do sterilní nádobky (7).

4.1.10 Odběr tkání

Tkáň se většinou odebírá peroperačně nebo při jiném invazivním zákroku do sterilní nádobky. Vyšetřuje se i pitevní materiál, zde se doporučuje větší množství tkáně opět do sterilní nádobky (7).

4.1.11 Odběr cizorodých materiálů

Vyšetřují se například chlopenní, cévní nebo kloubní náhrady, intrauterinní tělíska, katétry apod. Po vynětí se cizí těleso nebo jeho část vloží do sterilní nádobky (7).

5 ZPRACOVÁNÍ KLINICKÉHO MATERIÁLU NA BAKTERIOLOGII

Základní zpracování klinických vzorků probíhá kultivačně, u vzácných vzorků a v dalších indikovaných případech se kultivace doplňuje mikroskopickým vyšetřením. Základní kultivace probíhá na krevním agaru, dle druhu klinického materiálu se přidávají další diagnostická a selektivní kultivační média (1, 7). U vzorků s předpokládaným menším množstvím patogenních bakterií (např. tekuté vzorky nebo výtěry z rekta) se zakládá tzv. pomnožení do pomnožovacích tekutých médií. Inkubace probíhá většinou 24 hodin při 35–37 °C. Mikroskopické vyšetření se provádí po obarvení dle Grama (1).

5.1 Zpracování moče

Nejčastěji zachycenými mikroorganismy v moči jsou bakterie a kvasinky. Moč se kultivuje na krevním agaru a na další půdě vhodné pro kultivaci gramnegativních tyčinek, která se zvolí podle provozu laboratoře (nejčastěji Endův agar, McConkey agar). Pro záchyt kvasinek se využívají speciální selektivně diagnostické půdy (Candiselect, Sabouraudův agar) (7). Moč se zpracovává kvantitativně (1). Za klinicky významný se považuje nález více než 10^5 mikrobů v 1 ml. Nejčastějším původcem močových infekcí je *Escherichia coli* (až 80 % případů) (6, 7).

5.2 Zpracování krve

Krev v hemokultivačních lahvičkách je inkubována v uzavřených automatických systémech, detekce růstu bakterií probíhá na základě měření metabolických produktů v lahvičce. Vyšetření trvá minimálně týden, záleží na druhu přítomné bakterie (4).

5.3 Zpracování mozkomíšního moku

Likvor se hodnotí mikroskopicky a kultivačně. Je možná také detekce antigenů nebo detekce bakteriální nukleové kyseliny molekulárně genetickou metodou. Vzorek je nutné dopravit do laboratoře co nejdříve po odběru, protože dochází k postupnému úbytku glukózy ve vzorku, k rozpadu buněk a k nárůstu koncentrace laktátu ve vzorku (4, 8, 12).

5.4 Zpracování výtěru

Výtěr se naočkuje na krevní a Endův agar. Na krevní agar se naočkuje ještě čára *Staphylococcus aureus* pro zachycení satelitních bakterií např. *Haemophilus* sp. U výtěrů z horních cest dýchacích lze pro lepší záchyt některých patogenů použít určité disky s antibiotiky pro odclonění normální flóry (např. disk s vankomycinem a kolistinem pro zachycení patogenních neisserií) (2, 7).

5.5 Zpracování výtěru z rekta

Při bakteriologickém zpracování výtěru z rekta se rovněž používá více kultivačních půd, nejčastěji Endův agar a půda pro detekci střevních patogenů, např. XLD, očkuje se i pomnožovací tekutá půda (7).

5.6 Zpracování sputa

Před vlastním založením kultivace se sputum naředí mukolytickým roztokem, čímž dojde k rozvolnění hlenových vláken a uvolnění mikrobů. Mikroskopickým vyšetřením se zhodnotí validita sputa. Hodnotí se poměr leukocytů a epitelií. Převaha epitelií ukazuje na původ materiálu z horních cest dýchacích, což je pro další zpracování nevhodné. Sputum lze v určitých indikacích zpracovat i kvantitativně, v tomto případě je dále ředěno. Nález v ředění 10^7 a vyšším značí infekci dolních cest dýchacích (6).

5.7 Zpracování stěrů z pohlavních orgánů

U výtěrů z pochvy a cervixu se provádí kultivace a mikroskopické vyšetření. Sklíčka se zpracovávají dvě – tzv. MOP (mikrobiální obraz poševní). Jedno sklíčko se obarví podle Giemsy-Romanowského (hodnocení výskytu *Trichomonas vaginalis)* a druhé podle Grama (hodnocení buněk a bakterií) (4, 7). Kvasinky bývají viditelné v obou barveních (7).

6 IDENTIFIKACE BAKTERIÍ

Identifikace bakterií je důležitá především pro správné určení etiologického agens, tedy bakterie, která způsobuje infekci, a pro vhodné zvolení následující léčby. Provádí se celou řadou na sebe navazujících identifikačních postupů a testů (10). Identifikační metody lze rozdělit na fenotypové, a to konvenční, které jsou určeny metabolismem živých a rostoucích buněk vč. sérotypizace, a molekulární, kam patří například analýzy proteinů a mastných kyselin, dále pak na metody molekulárně genetické (5). V této kapitole bude problematika identifikace více přiblížena.

6.1 Metody fenotypové konvenční

Mezi takové metody patří následující uvedené v této podkapitole.

6.1.1 Morfologie bakterií

První fází identifikačního procesu je zpravidla hodnocení bakteriální morfologie jednak mikroskopické a jednak makroskopické (vzhled kolonií na kultivační půdě – viz dále). Tvar, velikost, uspořádání a barvitelnost bakterií lze detekovat mikroskopickou metodou, běžně používané zvětšení je 1000x (7).

Tvar bakterií je buď kulovitý (koky), nebo tyčinkovitý (bacily). Krátké tyčinky, které nejsou zařaditelné mezi koky nebo mezi bacily, označujeme jako kokobacily. Tyčinky mohou mít rovněž různé tvary a zakřivení – dlouhé tyčinky se označují jako vlákna, prohnuté tyčinky jako vibria, spirálovité tyčinky jako spirochéty apod., některé tyčinky se mohou dokonce větvit (např. *Actinomyces*) (10). Koky ani tyčinky nemusejí mít pravidelné tvary – koky mohou být oploštělé nebo zašpičatělé, tyčinky mohou mít zase různý vřetenovitý nebo kyjovitý vzhled (5).

Bakteriální buňky mají rozpětí velikosti v řádu několika mikrometrů. Bakterie, které jsou patogenní pro člověka, dosahují nejčastěji velikosti mezi 1–3 μm. K drobnějším patogenním bakteriím patří chlamydie, rickettsie nebo hemofily (5, 7).

Uspořádání bakterií je ovlivněno jejich dělením. U koků je tomu tak, že jedna buňka zůstává přichycena na druhou buňku, a podle počtu buněk, které jsou k sobě přichycené, se jejich uspořádání označuje jako diplokoky, tetrakoky apod. Koky mohou být také uspořádány do řetízků, což pozorujeme u streptokoků, nebo do nepravidelných shluků, které vídáme u stafylokoků. Tyčinky jsou nejčastěji uspořádány jednotlivě, jen velmi vzácně tvoří diplobacily nebo streptobacily (8, 10).

Barvení bakterií může být monochromatické nebo polychromatické. K monochromatickým barvením patří jednoduché barvení jednou barvou, a to methylenovou modří nebo krystalovou violetí. Toto barvení informuje pouze o velikosti, tvaru a uspořádání bakterií, ale ne o tom, zda se jedná o bakterii grampozitivní, gramnegativní nebo gramlabilní (7).

Gramovo barvení patří mezi polychromatická barvení, která se provádí dvěma a více barvami. Princip byl uveden v kapitole 3.1. Jeho význam spočívá v souvislosti typu barvitelnosti s dalšími vlastnostmi dané bakterie, např. s její citlivostí na určité skupiny antibiotik (7).

6.1.2 Vztah bakterií ke kyslíku

Podle vztahu ke kyslíku můžeme bakterie rozdělit do několika skupin (podle 7, 10). Do první skupiny patří bakterie, které ke svému růstu a množení vyžadují přítomnost kyslíku, a takové bakterie nazýváme **aerobní.** Další skupinu tvoří **fakultativně anaerobní bakterie**, které ke svému růstu a množení kyslík přímo nevyžadují, ale za jeho přítomnosti rostou daleko rychleji. Déle existují **mikroaerofilní bakterie**, které sice kyslík ke správné funkci svého metabolismu vyžadují, ovšem potřebují ho desetkrát méně, než je jeho koncentrace v atmosféře, která činí 21 %. Mezi **kapnofilní bakterie** řadíme bakterie, které vyžadují pro svůj růst a množení atmosféru s vyšší koncentrací oxidu uhličitého. Do poslední skupiny patří **obligátní** (striktní) **anaeroby,** pro které je kyslík toxický a které rostou pouze v jeho nepřítomnosti. Pokud jsou vystaveny prostředí s obsahem kyslíku, hynou během několika minut. Některé anaeroby dokážou v prostředí s kyslíkem přežívat díky fakultativně anaerobním bakteriím, které z prostředí kyslík odnímají svojí aerobní respirací. Zvláštní skupinou anaerobů jsou **aerotolerantní anaeroby**, které sice přítomnost kyslíku snášejí, ale nemohou se v jeho přítomnosti množit.

6.1.3 Růst bakterií na kultivačních půdách

Podle typu růstu bakteriálních kolonií na různých kultivačních médiích lze posuzovat některé vlastnosti bakterií a lze je dělit do různých skupin. Lze hodnotit barvu a vzhled kolonií nebo jejich zápach. Jedním z kritérií, které je pozorovatelné na KA, je míra hemolýzy erytrocytů a degradace hemoglobinu. Jako alfa hemolýza (viridace) je označována změna červeného krevního barviva na barvivo zelené, jako

beta hemolýza je označováno úplné projasnění půdy, způsobené kompletní lýzou erytrocytů. Při negativní hemolýze zůstává barva půdy beze změny (7, 22).

6.1.4 Biochemická identifikace bakterií

Biochemické vlastnosti bakterií jsou rodově a event. i druhově charakteristické. Bakterie produkují řadu enzymů, které jsou potřebné pro štěpení živin i k syntéze stavebních struktur bakterie. K testům lze využít diagnostické kultivační půdy, testovací proužky nebo sety biochemických reakcí ve zkumavce. Testy je možné rozdělit podle trvání na rychlé (několik minut) a testy s inkubací (hodiny až dny) (11, 27).

Principem těchto testů je přeměna dodaného substrátu bakteriálním enzymem na produkt, který se od substrátu liší změnou barvy nebo skupenstvím. Ke znázornění této reakce se v některých testech využívá indikátor. V negativním případě k žádné změně nedojde (7, 11).

Biochemická identifikace bakterií sleduje výsledky spektra biochemických testů u zkoumaného kmene a porovnává je s databází výsledků známých rodů a druhů. Identifikace je tedy tzv. pravděpodobnostní (7). K realizaci biochemických testů je nutná čistá kultura bakterií, kterou chceme identifikovat. Kulturu kmene přeneseme do zkumavky, mikrotitrační destičky nebo na filtrační papírek s příslušnými sloučeninami a sledujeme reakci produktů bakterie (11).

Pro praxi je důležité vědět, že různé testy jsou různě náročné na čas a mají také různou citlivost. Výhodnější jsou samozřejmě citlivé a rychlé testy, kdy je výsledek známý již během několika vteřin nebo minut (např. katalázový test), u většiny testů je ale nutné čekat na výsledek několik hodin, často až do druhého den. Toto se týká všech testů ve zkumavkách nebo v plastových jamkách (7).

6.1.5 Sérotypizace

Sérotypizace neboli antigenní analýza je diagnostický postup, který vede k rozlišení bakterií v rámci jednoho druhu do tzv. sérotypů, tedy podle jejich antigenní struktury. Využívá se princip aglutinace bakteriální kultury se specifickým antisérem. V mikrobiologii je sérotyp považován za taxonomickou jednotku. Tyto metody se využívají např. v typizaci Enterobacteriaceae, kdy např. různé sérotypy mohou vykazovat různý stupeň virulence. Důležitý je i význam epidemiologický (7).

6.2 Metody fenotypové molekulární

Tyto metody používají k dosažení výsledku analýzu různých molekulárních struktur dané bakterie. Vyšetření fenotypu je zde doplněno chemotaxonomickými údaji (31). Mezi tyto metody patří chromatografická analýza, hmotnostní spektrometrie, dále pak např. elektroforetická typizace proteinů, multilokusová enzymová elektroforéza (33, 36).

6.2.1 Chromatografie

Principem chromatografie obecně je rozdílná rychlost pohybu látek v soustavě dvou fází – mobilní a stacionární. Jednotlivé složky vzorku jsou unášeny mobilní fází. Podle upoutání k stacionární a mobilní fázi se některé složky se pohybují rychleji a jiné pomaleji. Pro identifikaci mikrobů se používá plynová chromatografie, což je detekce mastných kyselin jako konečných produktů buněčného metabolismu. Vzorek je v toku plynu unášen kolonou, složky se separují v koloně na základě odlišné schopnosti poutat se na stacionární fázi. Komponenty opouštějící kolonu jsou zaznamenány detektorem. Z časového průběhu signálu vyhodnoceného detektorem se určí druh a kvantitativní zastoupení složek (34).

6.2.2 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie je fyzikálně-chemická metoda, jejímž principem je stanovení molekulové nebo atomové hmotnosti látek ve velkém rozsahu po jejich převedení na ionty (35).

V mikrobiologické diagnostice se využívá systém MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie (MALDI-TOF MS - Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry) (35). K ionizaci molekul zde dochází impulsem pulzního laseru, ionty jsou rozděleny ve vakuu v letové trubici podle poměru hmotnosti a náboje a po průletu jsou zachyceny detektorem (28). Výsledkem je křivka znázorňující tzv. hmotnostní spektrum. To je porovnáno s databází známých profilů mikroorganismů. V klinické mikrobiologii je tento systém využíván k identifikaci izolátů bakterií, mykobakterií, kvasinek a vláknitých hub. Je schopný rozlišit bakterie na rodové, druhové a kmenové úrovni. Jsou vyvíjeny i aplikace k detekci antibiotické rezistence (35).

Další metodou je např. Ramanova spektrometrie. Zde se využívá rozptylu molekul plynu, které absorbují UV světlo. Část absorbované energie je emitována energií o delší vlnové délce. Výhodou tohoto způsobu identifikace je mimo přesnost a rychlost i potřeba minimálního množství izolátu (34).

6.3 Metody molekulárně-genetické

K identifikaci lze použít hybridizační metody, tzv. genové sondy, nebo metody amplifikační (viz dříve). Genová sonda je molekula NK komplementární k NK identifikované bakterie. Je označená látkou, která po úspěšné hybridizaci (komplementárním navázání obou NK) dává fluorescenční nebo barevnou reakci, a tím umožní vizualizaci proběhlé reakce. Z amplifikačních metod je nejčastější reakce PCR, dále pak např. metody založené na tzv. DNA-strip technologii, kdy je postup rozložen do tří kroků – izolace DNA, amplifikace NK a následná reverzní hybridizace (např. Genotype, Hain Lifescience, GE) (25).

PCR (polymerázová řetězová reakce) je založena na opakování třech po sobě jdoucích reakcích, které se odehrávají v přístroji, termocycleru, který je schopný rychle střídat teploty. Nejprve dochází při 95 °C k rozložení dvouvláknové šroubovice DNA (tzv. denaturace) na jednotlivá vlákna. Ve druhém kroku na jednořetězcovou DNA nasednou krátké oligonukleotidy (tzv. primery) komplementární ke specifickým úsekům na vláknech DNA. Teplota klesne na 50–60 °C. Nakonec dochází k syntéze nových řetězců DNA za přítomnosti termostabilní Taq polymerázy. Teplota reakce je v této fázi nastavena přibližně na 72 °C. Detekce amplifikované DNA se uskutečňuje pomocí elektroforézy nebo DNA sondy, která bývá fluorescenčně označena (33).

7 STANOVENÍ CITLIVOSTI BAKTERIÍ

Léčba bakteriálních infekcí je spojena s antimikrobiálními látkami. Tyto látky jsou buď připravené chemicky a nazývají se **chemoterapeutika**, nebo jsou mikrobiálního původu a nazývají se **antibiotika**. Častými producenty antibiotik jsou převážně plísně (např. penicillium), z bakterií se jedná hlavně o streptomycety. V současné době existuje široká škála antibiotik, proto se využívají mnohé testy pro zjištění toho nejúčinnějšího a tím i nejvhodnějšího antibiotika (2, 8).

V roce 1928 byl objeven penicilin skotským lékařem Alexandrem Flemingem. K tomuto objevu došlo spíše náhodou, když si Fleming všiml, že na staré půdě se stafylokoky roste plíseň, později identifikována jako *Penicillium notatum*, která hubila mikroby kolem sebe. Izolovat penicilin se ale podařilo až o dvanáct let později oxfordskému chemikovi Ernstu Chainovi a biochemikovi Howardu Floreyovi. V únoru 1941 byl tento lék poprvé úspěšně podán člověku (14).

Účinné antimikrobiální látky musí být selektivně toxické, tzn., že musí inhibovat nebo dokonce zabíjet mikroby v dávkách, které ještě nepoškozují organismus hostitele (7). Selektivní toxicitu vyjadřuje **chemoterapeutický index**, který udává poměr mezi dávkou toxickou pro hostitele a dávkou účinnou pro mikroba. Z toho vyplývá, že čím je tato dávka vyšší, je zvolená antimikrobiální látka pro léčbu vhodnější, protože je pro hostitele méně toxická (7, 8).

Dále je pro léčbu infekčního onemocnění důležité vybrat správný typ antimikrobiálních látek podle účinku. Z tohoto hlediska se tyto látky rozdělují na baktericidní a bakteriostatické (podle 7, 8). **Baktericidní látky** usmrcují mikrobiální buňku, působí rychle a nevratně. Klinický účinek se obvykle dostavuje do 48 hodin. Preferují se při snížené obranyschopnosti a u vážných stavů. Do baktericidních antibiotik zahrnujeme β-laktamy (např. peniciliny, cefalosporiny), glykopeptidy (např. vankomycin), polypeptidy a aminoglykosidy (např. streptomycin a gentamycin). Mezi baktericidní chemoterapeutika patří např. některá antituberkulotika. Mechanizmem účinku těchto látek může být inhibice syntézy buněčné stěny, inhibice syntézy nukleových kyselin, poškození buněčné membrány a u aminoglykosidů i inhibice proteosyntézy. **Bakteriostatické látky** pouze zastavují růst a množení bakterií a působí tedy pomaleji, než baktericidní látky. Jejich účinek není nevratný. Klinický účinek se dostavuje až po 3–4 dnech, a pokud dojde k vysazení, mohou se mikroby opět

začít množit. Likvidace potlačených mikrobů závisí na obranyschopnosti hostitele. Mezi bakteriostatická antibiotika patří např. tetracykliny a linkosamidy, do bakteriostatických chemoterapeutik zahrnujeme např. sulfonamidy a některá antituberkulotika. Mechanizmus účinku spočívá u některých bakteriostatických látek v inhibici proteosyntézy jako u baktericidních aminoglykosidů.

Důležitými pojmy při stanovování citlivosti bakterií jsou minimální inhibiční koncentrace (MIC) a minimální baktericidní koncentrace (MBC). Jako **MIC** označujeme nejnižší koncentraci dané antimikrobní látky, která zabraňuje růstu daného mikroba. **MBC** vyjadřuje nejnižší koncentraci antimikrobiální látky, která během 24 hodin zabije 99,9 % původní populace mikrobů. Pro nejlepší klinický účinek je třeba podávat antibiotika v takových dávkách, aby dosažená hladina byla vyšší než MIC (8).

Antimikrobiální látky lze rozdělit podle spektra účinku na látky s úzkým spektrem účinku, se středně širokým spektrem účinku a se širokým spektrem účinku. Při léčbě je možné jednotlivé antimikrobiální látky kombinovat. Důvodem ke kombinaci může být rozšíření antibakteriálního spektra, oddálení vzniku rezistence, rozšíření synergického účinku užitých léčiv nebo snížení dávky jednotlivých antibiotik a tím i snížení jejich vedlejších účinků (7, 8).

Vedlejší účinky mohou být **toxické**, které nastanou např. při předávkování příslušným antibiotikem, **alergické**, kdy se jedná o přecitlivělost organismu k příslušnému antibiotiku, nejčastěji nastává po použití penicilinu, a **biologické**, kdy účinek antibiotik ovlivní běžnou mikroflóru (8).

7.1 Metody stanovení citlivosti bakterií

Stanovení citlivosti bakterií je jednou z nejvýznamnějších činností bakteriologické laboratoře. Pro stanovení se využívají sestavy antibiotik, které jsou zvoleny podle druhu vyšetřovaného materiálu a podle druhu vyšetřované bakterie. Výsledek stanovení se označuje jako **antibiogram**. Metody dělíme na **difúzní** a **diluční** (2, 7).

Mezi difúzní metody patří disková difúzní metoda. Jedná se o kvalitativní test, kdy se určí citlivost nebo rezistence bakterií na příslušné antibiotikum. Principem testu je difúze antibiotika do agaru, na kterém je naočkovaný bakteriální kmen. Pokud je bakteriální kmen citlivý na dané antibiotikum, neroste v jeho okolí a vytvoří se tzv. **inhibiční zóna.** Po kultivaci se změří průměr inhibičních zón a mikrob, který má

tuto zónu větší, než je zóna stanovená experimentálně (tzv. break point), je k danému antibiotiku citlivý. V opačném případě je rezistentní (7). Z principu difúzní metody vychází také metoda E-test, jejíž výsledek je kvantitativní, je to gradientová metoda. Jedná se o proužek papíru napuštěného stoupající koncentrací příslušného antibiotika a hodnoty koncentrace jsou na papírku vyznačeny stupnicí. Proužek se klade na pevnou půdu, kde je naočkovaný sledovaný bakteriální kmen, stejně jako u diskového difúzního testu. Inhibiční zóna má tvar slzy a tam, kde její okraj protíná proužek, lze odečíst hodnotu MIC na stupnici papírku (2, 7).

Diluční metody jsou kvantitativní a patří sem stanovení MIC a MBC. Principem obou metod je inhibice růstu bakterií danou koncentrací antibiotika rozpuštěného v tekuté nebo pevné půdě (2, 7). Stanovení MIC se provádí u kmene izolovaného z hemokultur, likvoru a klinicky závažných vzorků. Ke stanovení se většinou používají mikrotitrační destičky. Jedna destička obsahuje 96 jamek a používá se vždy pro jeden bakteriální kmen. Jamky se naplňují růstovým médiem a různou koncentrací antibiotik – ve 12 sloupcích je 12 různých antibiotik. Hodnotí se jamka s nejnižší koncentrací antibiotika, která potlačuje růst mikroba (MIC). Interpretace citlivý/rezistentní vychází opět z experimentálně stanovených hodnot break pointů pro daný druh (2, 7). Stanovení MBC vychází z MIC. Z důlků, kde došlo k inhibici růstu bakteriálního kmene, se tekutina přeočkuje na pevnou půdu a nechá se znovu 18 hodin kultivovat. Pokud mikrob na půdě vyroste, koncentrace antibiotika ho neusmrtila, v opačném případě je mikrob usmrcen. Hledá se tedy nejnižší koncentrace antibiotika, která je ještě schopna mikroba usmrtit (7).

7.1.1 Detekce rezistence

Některé bakterie mohou mít tzv. „skrytou rezistenci“ a při klasických citlivostních testech se in vitro jeví jako citlivé. Proto je nutné v určitých situacích doplnit klasické testy citlivosti speciálními metodami detekce rezistence, které slouží k odhalení schopnosti bakterií odolávat některým skupinám antibiotik. Takto se testují epidemiologicky závažné rezistence např. u kmenů *Staphylococcus aureus (*MRSA – methicillin rezistentní *Staphylococcus aureus*) nebo u Enterobacteriaceae (kmeny produkující širokospektré beta laktamázy ESBL). Důsledkem infekcí těmito rezistentními mikroby je zvýšení morbidity nebo významné prodloužení doby hospitalizace, také významně stoupají náklady na zdravotní péči o nemocného (5).

Průkaz MRSA se provádí běžnými kultivačními metodami na KA a selektivní půdě, která obsahuje antibiotika (oxacilin) inhibující citlivé kmeny *Staphylococcus aureus* (5). Dále se využívá test stanovení citlivosti k cefoxitinu (disková difuzní metoda s diskem cefoxitinu o obsahu 30 μg) nebo molekulárně genetický průkaz mutace rezistence k oxacilinu (28).

Průkaz širokospektrých beta-laktamáz (nejčastější producenti jsou rody *Klebsiella*, *Enterobacter* a *Escherichia*) se provádí testováním systému daných antibiotických disků (např. Double Disk Synergy Test – DDST). Principem je detekce deformace inhibičních zón, způsobené testovaným kmenem mezi antibiotickými disky v přesném rozmístění (cefalosporiny a aztreonamem a disk s amoxicilinem/klavulanovou kyselinou). Je možné využít i selektivní kultivační půdy nebo komerční sety a také molekulárně-genetický průkaz. Jiné typy beta laktamáz se prokazují podobně (29).

8 DETEKCE ZVLÁŠTNÍCH DRUHŮ BAKTERIÍ

Existují bakterie, které jsou náročné na kultivaci. Některé z nich jsou prokazatelné speciálními kultivačními postupy, u jiných se musíme spolehnout pouze na molekulárně genetický průkaz event. i na průkaz infekce nepřímou diagnostikou. Mezi takové bakterie patří např. Kochův bacil, tedy *Mycobacterium tuberculosis.* Z mykobakterií je tento druh nejvýznamnějším patogenem pro člověka. Jedná se o acidorezistentní tyčinky. Generační doba této bakterie je dlouhá, uvádí se 18–24 hodin, a proto se řadí mezi obtížně kultivované bakterie. Na kultivaci se používá speciální půda Löwenstein-Jensenova nebo Ogawova, kde vyrůstá tato bakterie během 3–6 týdnů v lehce nažloutlých koloniích s nepravidelnými okraji. S výhodou rychlejší a citlivější detekce se využívá kultivace v tekuté půdě v tzv. uzavřeném systému s automatickou detekcí metabolických produktů. K laboratornímu průkazu se využívá především **mikroskopie** a **kultivace,** doplněné o průkaz DNA (12).

Mezi další bakterie náročné na kultivaci a identifikaci patří legionely. Ty mohou být původci velmi závažných a komplikovaných pneumonií, proto je jejich včasná diagnostika velice důležitá. Infekce způsobená druhy *Legionella* sp. byla poprvé zaznamenána až v roce 1976 na konferenci amerických legionářů (odtud název *Legionella*). Proč byly infekce legionelou objeveny až tak pozdě? Pravděpodobně dřív unikali diagnostice v důsledku jejich špatné barvitelnosti a náročné kultivaci. Na jejich kultivaci jsou potřeba speciální kultivační půdy s obsahem železa a cysteinu. Rostou v rozmezí teplot 25–43 °C ve formě šedavých a ostře ohraničených kolonií. Tvoří katalázu a hydrolyzují močovinu. Detekce probíhá ze vzorků z dolních cest dýchacích, v moči je možné legionelu zachytit metodou ELISA (12).

Speciální kultivační půdy se používají také ke kultivaci *Bordetella pertussis* a *parapertussis*, *Helicobacter pylori* apod. Pro kultivaci urogenitálních patogenů typu mykoplasmat a ureaplasmat se využívají speciální postupy v komerčních kitech (12).

9 AUTOMATIZACE V BAKTERIOLOGICKÉ DIAGNOSTICE

Tak jako v jiných oborech medicíny i v mikrobiologii se objevují snahy o automatizaci diagnostických procesů. Možnosti jsou v porovnání např. s lékařskou biochemií omezené vzhledem k práci s živým mikroorganismem. Přesto se i v rutinním provozu objevují automatizované a poloautomatizované systémy. Průlom v detekci bakterií v krvi, tzv. hemokultivaci a např. detekci mykobakterií znamenaly systémy metabolické kultivace. K těmto účelům jsou používána komerční kultivační média, do nichž je aplikován klinický vzorek. Po založení do přístroje je v pravidelných intervalech automaticky sledována metabolická aktivita bakterií v lahvičce (např. detekce spotřeby kyslíku) a je zaznamenána přístrojem. Tento způsob kultivace je vysoce senzitivní, znamená zkvalitnění a urychlení diagnostiky a také úsporu lidské práce (1).

Další automatizovaný přístroj se uplatňuje např. při stanovení kvantitativní bakteriurie. Automatický kultivační systém je schopný po 4 hodinách identifikovat pozitivní vzorek a umožňuje i stanovit citlivost na antibiotika. Výsledek citlivosti nemusí být zcela přesný, protože není určen druh bakterie. Výsledky musí hodnotit odborník až po kompletaci vyšetření (7).

Pro laboratoře zpracovávající velké množství vzorků jsou dostupné přístroje pro automatizovanou inokulaci a odečítání, často kombinované s možností identifikace a stanovení citlivosti (1). K identifikaci a stanovení citlivosti jsou využívány automatické přístroje. Jedním z nich je i systém VITEK® (bioMerieux), který slouží nejen k identifikaci mikroorganismů, ale současně dochází i ke stanovení citlivosti k antimikrobiálním látkám. Moderní verze systému VITEK® - VITEK® MS – je vlastně MALDI–TOF (30). Jiným přístrojem pro identifikaci a stanovení citlivosti je BD Phoenix® (Becton Dickenson) (33).

Velké využití mají automatické přístroje pro provádění sérologických metod a také metod molekulární biologie. Automatizace v provozu laboratoře lékařské mikrobiologie je jistě přínosem, ale je nutné zdůraznit, že definitivní zhodnocení a interpretace nálezu vždy zůstává na odborníkovi a musí být posouzena v klinickém kontextu konkrétního pacienta (1).

PRAKTICKÁ ČÁST

10 CÍLE PRÁCE, VÝZKUMNÉ OTÁZKY, HYPOTÉZY

V teoretické i praktické části práce jsem se zabývala mikrobiologickou laboratorní diagnostikou, zejména diagnostikou bakteriální.

Cíle práce:

Cíl 1: Zmapování metod laboratorní diagnostiky bakterií v konkrétní mikrobiologické laboratoři.

Cíl 2: Porovnání konvenčních metod s moderními metodami (molekulární metody, molekulárně genetické metody, automatizace v provozu).

Výzkumná otázka: Jaká jsou kritéria pro volbu metody v laboratorní diagnostice bakterií?

Hypotézy:

Hypotéza 1: V rutinním mikrobiologickém laboratorním provozu jsou přednostně využívány moderní metody.

Hypotéza 2: Automatizace laboratorního provozu vede ke zlepšení diagnostiky a k přesnější detekci patogenů.

11 POSTUP ZÍSKÁVÁNÍ BIOLOGICKÉHO MATERIÁLU A POPIS SLEDOVANÉHO SOUBORU

Veškerý klinický materiál byl získán od hospitalizovaných pacientů z oddělení Metabolické jednotky intenzivní péče (JIP) I. interní kliniky Fakultní nemocnice (FN) v Plzni. Vzorky klinického materiálu byly odebrány v rámci standardního mikrobiologického vyšetření indikovaného lékaři z tohoto oddělení.

11.1 Odběr biologického materiálu

Odběr vzorků probíhal na uvedeném klinickém pracovišti standardním doporučeným způsobem – viz kapitola č. 4 (Odběr materiálu na bakteriologické vyšetření). Vzorky byly doručeny do bakteriologické laboratoře Ústavu mikrobiologie FN v Plzni v den odběru.

11.2 Popis sledovaného souboru

Sledovaný soubor obsahoval veškeré vzorky klinického materiálu z oddělení Metabolické JIP I. interní kliniky FN odebrané na bakteriologické a mykologické vyšetření v období 12. 9. – 21. 9. 2016. Celkem bylo odebráno 146 vzorků (přehled je uveden v tabulce č. 1).

Metabolická JIP je oddělení, kde jsou hospitalizováni pacienti, u kterých došlo k selhání nebo ohrožení základních životních funkcí. Toto oddělení bylo vybráno kvůli širokému spektru odebraných vzorků klinických materiálů a kvůli charakteru patologických stavů u těchto nemocných (polymorbidita, komplikovaný zdravotní stav a vysoké riziko infekce). U pacientů na tomto oddělení se kromě diagnostických odběrů také provádí pravidelný screening, kterým lze monitorovat osídlení jednotlivých pacientů mikrobiální flórou, ať už běžnou nebo nozokomiální. Informace o recentní mikrobiální flóře umožňuje v případě infekčních komplikací zahájit odpovídající antibiotickou terapii, případně určit mikrobiální kolonizaci pacienta. V rámci tohoto screeningu se pravidelně (2x týdně) odebírají výtěry z rekta, nosu a krku.

12 METODIKA

V této kapitole budou popsány jednotlivé metody, které byly použity ke zpracování všech vzorků sledovaného souboru po jejich odebrání. Typy a metody bakteriologického vyšetření byly rozděleny do několika kategorií. Jednoduchá identifikace zahrnovala jednoduché testy prováděné většinou rovnou během odečtu kultivací. Složitá identifikace představuje testy komerčními sety, tedy sestavy jednoduchých identifikačních postupů. Byly prováděné většinou během 24 hodin po odečtu kultivace. Stanovení citlivosti bylo rozlišeno na testování základní řady a dále testování rozšířené řady antibiotik v případech, kdy základní řada nebyla dostatečná. Testování MIC pak probíhalo jen ve výjimečných případech u zvlášť významných izolátů.

12.1 Zpracování vzorků klinického materiálu

Výtěry byly do laboratoře dodány v Amiesově transportním médiu, tekutý materiál ve sterilních odběrových nádobkách. Ke zpracování byla použita komerční kultivační média (výrobce pro jednotlivé typy půd bude uveden dále). Při kultivaci na krevním agaru byla vždy nanesena čára *Staphylococcus aureus* pro záchyt satelitních bakterií. Inkubace probíhala standardně 24 hodin v termostatu při teplotě 35 $^{+}/_{-}$ 2 °C (výjimky budou uvedeny v jednotlivých podkapitolách). Výtěry z rekta a ran, vzorky z primárně sterilních lokalit a katétry byly zpracovány také po pomnožení v tekuté pomnožovací půdě – BHI bujón Brain Heart Infusion (OXOID CZ). V případě indikace ošetřujícím lékařem bylo doplněno vyšetření na průkaz kvasinek – půda Candiselect (BIO-RAD) a screening na MRSA – selektivně diagnostická půda MRSA Select II (BIO-RAD), event. byla doplněna další specifická kultivační média.

Po uplynutí inkubační doby byly všechny kultivační půdy hodnoceny klinickým mikrobiologem (vysokoškolákem) a bylo rozhodnuto o dalším postupu (identifikace, stanovení citlivosti atd.).

Mikroskopické preparáty byly obarveny dle Grama a prohlíženy pod imerzí zvětšením 1000x. Mikroskopii hodnotil také klinický mikrobiolog.

12.1.1 Výtěry z krku, nosu a rekta

Výtěry z krku a nosu byly naočkovány na krevní agar (DULAB) a Endův agar (bioMérieux CZ), výtěry z rekta na krevní a Endův agar a současně na půdu XLD

(OXOID CZ). V případě požadavku na vyšetření *Campylobacter* sp. pak na selektivní půdu Campylosel (bioMérieux CZ) agar (inkubace probíhala v GENboxu s generátorem mikroaerofilního prostředí po dobu 48 hod.).

12.1.2 Moč

Moč byla zpracována kvantitativně. Pomocí kalibrované kličky o objemu 1 µl byla nanesena moč na krevní agar a poté stejnou kličkou rozočkována vlnovkou. Na Endově agaru byl proveden běžný křížový roztěr opět 1µl kličkou. Obě půdy byly inkubovány v termostatu 24 hodin. Po proběhlé kultivaci se spočítal počet narostlých kolonií, přičemž počet kolonií odpovídá počtu CFU (colony forming unit) v 1 µl moče. Poté se stanovila citlivost bakterie na antibiotika.

12.1.3 Sputum a další materiál z dolních cest dýchacích

Před vlastním zpracováním byl hustý materiál smíchán s mukolytikem v poměru 1:1 a 10 min. homogenizován. Řídké vzorky (BAL apod.) byly centrifugovány (10 min/4000 otáček) a následně byl zpracováván sediment. Následovalo zhotovení mikroskopického preparátu obarveného Gramem a jeho zhodnocení vysokoškolákem, který hodnotil validitu sputa a v ostatním materiálu přítomnost dlaždicových epitelií, leukocytů, hlenu a mikrobů. Za validní sputum je považováno takové, kde je převaha leukocytů nad epiteliemi, přítomnost hlenu a nepřítomnost orofaryngeální flory. Nevalidní sputa nebyla zpracována, validní byla vyočkována na krevní, Endův a čokoládový agar – Chocolat-Agar Poly Vitex (bioMérieux CZ), event. podle indikace na Sabouraudův agar – Sabouraud Gentamicin chloramphenicol (bioMérieux CZ). Tracheální aspiráty a bronchoalveolární laváže byly kultivovány na stejném spektru kultivačních půd jako sputa. Kultivace probíhala 24–48 hod v termostatu s 5–10 % CO_2. Při podezření na infekci způsobenou *Legionella pneumophila* byla založena kultivace na speciální půdě pro legionely – Legionella BCYE medium (OXOID CZ), kultivace 7–10 dní, termostat 37 °C s 5–10 % CO_2 za zvýšené vlhkosti prostředí. Kvantitativně materiál z dolních cest dýchacích v daném souboru vyšetřován nebyl.

12.1.4 Stěr z rány a dekubitu

Stěry byly kultivovány na krevním a Endově agaru, dle indikace event. na půdě pro kultivaci kvasinek Candiselect. V případě indikace ošetřujícího lékaře nebo podle rozhodnutí mikrobiologa byla založena i kultivace anaerobní v anaerobním boxu (24–48 hod) na pevné půdě Schaedler agar a do anaerobní půdy pomnožovací

Wilkins-Chalgren anaerobní bujón. Anaerobní bujón se před použitím regeneroval povařením 20 minut. Byl-li dodán výtěr na dvojvýtěrce, bylo provedeno i mikroskopické vyšetření.

12.1.5 Žaludeční obsah

Tento materiál byl získán endoskopickým vyšetřením nebo žaludeční sondou. Kultivace probíhala na krevním, Endově a Sabouraudově agaru.

12.1.6 Žluč

Žluč byla kultivována aerobně na krevním a Endově agaru i anaerobně na Schaedlerově agaru a pomnožena v anaerobním bujónu. Bylo provedeno také mikroskopické vyšetření.

12.1.7 Tekuté vzorky z primárně sterilních lokalit

Punktáty, ascites byly kultivovány na krevním a Endově agaru, pomnoženy v BHI bujonu. Bylo provedeno i mikroskopické vyšetření, v případě indikace také selektivní mykologická kultivace.

12.1.8 CŽK a arteriální katétr

Do laboratoře byly dodány konce vyjmutých katétrů. Katétry byly zpracovány tzv. semikvantitativní metodou dle Makiho. Kultivace probíhala na krevním agaru. Konec katétru byl sterilně přenesen na kultivační půdu, poválen po povrchu půdy a vložen do pomnožovacího bujonu. Po inkubaci byl hodnocen počet kolonií, kdy za klinicky významný byl považován počet více než 15 CFU (colony forming unit).

12.1.9 Hemokultura

Krev na hemokultivaci byla odebrána do hemokultivačních lahviček pro aerobní kultivaci BD BACTEC™ Plus Aerobic/F* Culture Vials, pro anaerobní kultivaci BACTEC™ Lytic/10 Anaerobic/F Culture Vials a/nebo pro kultivaci mykologickou BD BACTEC™ Mycosis-IC/F Culture Vials (Becton Dickinson). Kultivace probíhala 5 dní, resp. 10 dní u mykologické kultivace v přístroji BACTEC® 9240 Fluorescenční systém (Becton Dickinson). Pozitivní lahvičky byly vyočkovány na krevní a Endův agar, v případě mykologické kultivace ještě i na Sabouraudův agar.

12.2 Identifikace bakterií

12.2.1 Identifikace jednoduchá

Jednoduchými metodami identifikace (viz druhý sloupec v tabulce č. 3, kapitola 13) se v praktické části mojí práce rozumí mikroskopické zkoumání, kdy jsem pozorovala tvar bakterií a barvitelnost dle Grama. Dále pak makroskopické hodnocení kolonií na kultivační půdě. Dále jednotlivé biochemické testy, prováděné zpravidla během odečtu kultivace.

Průkaz katalázy

Enzym kataláza se prokazoval ve zkumavce s 3% peroxidem vodíku. V případě pozitivity se uvolňovaly kyslíkové bublinky.

Průkaz oxidázy

Průkaz oxidázy se prováděl pomocí filtračního papírku napuštěného parafenyldiaminem a alfa-naftolem. V případě pozitivity filtrační papírek zmodral.

Průkaz plazmakoagulázy

Rozlišuje se průkaz koagulázy volné a vázané (tzv. clumping faktor) (11, 7). Vázaná koaguláza se prokazovala aglutinací suspektní kolonie s králičí plazmou na sklíčku. V případě nejasného výsledku vázané koagulázy se prokazovala koaguláza volná, přenesením zkoumané bakteriální kolonie do králičí plazmy ve zkumavce. Inkubovala se až 12 hodin v termostatu při 37 +/- 2 °C. V případě pozitivního nálezu se plazma srazila. Doba inkubace se nesmí přesáhnout, protože vzniklá sraženina by mohla být rozložena fibrinolyzinem produkovaným některými bakteriemi (7).

Testy s diagnostickými proužky

Jedná se o rychlé testy, kdy se používá plastový úzký proužek, na jehož konci je reakční ploška se směsí indikátoru a substrátu (7). Na reakční plošku se nanesla sledovaná bakteriální kolonie bakteriologickou kličkou a po několika minutách se odečítal výsledek.

Do této skupiny testů patří např. **PYR test** – přítomnost enzymu PYRázy (pyrrolidonyl arylamidáza). V případě pozitivity se zbarvila reakční ploška červeně. U tohoto testu je nutné na výsledek čekat přibližně 5–10 minut, po uplynutí této doby se přikáplo činidlo a znovu se vyčkalo přibližně minutu. V případě negativity zůstala

reakční ploška zabarvena žlutě. Pozitivní výsledek se vyskytuje např. u enterokoků nebo u bakterie *Streptococcus pyogenes.* Průkaz beta-laktamázové aktivity se prováděl nitrocefinovým testem. Beta-laktamáza je enzym produkovaný některými bakteriemi jako faktor rezistence, který rozkládá penicilinová antibiotika (7).

CAMP test

Tento test slouží k rozlišení β-hemolytických streptokoků – konkrétně k identifikaci *Streptococcus agalactiae.* Prováděl se na krevním agaru s beraními krvinkami. Po zkřížení naočkovaných čar sledovaného β-hemolytického streptokoka a *Streptococcus aureus* vzniklo v případě pozitivity typické projasnění ve tvaru mašle. Prokázal se tak tzv. CAMP (název dle objevitelů Christie Atkinson Munch-Petersen) faktor (hemolyzin) produkovaný testovaným kmenem, který byl potencován β-lyzinem *Streptococcus aureus.* Částečná hemolýza se tak změnila na úplnou. Výsledek byl odečten po inkubaci 24 hod.

Optochinový test

Slouží k identifikaci **α-hemolytických streptokoků** – konkrétně umožňuje odlišit *Streptococcus pneumoniae* od ostatních α-hemolytických streptokoků, které tvoří běžnou orální flóru (7). Sledovaný kmen byl naočkován na krevní agar a byl přidán disk napuštěný optochinem. *S. pneumoniae* je citlivý na přítomnost optochinu a nerostl v jeho okolí. V případě pozitivity se vytvořila kruhová zóna.

Dekapsulační test na průkaz hyaluronidázy

Test se používá k průkazu enzymu hyaluronidázy, který je významný faktor virulence u *Staphylococcus aureus.* K tomuto průkazu se používá detekční kmen *Streptococcus equi*, jehož pouzdra obsahují kyselinu hyaluronovou. K naočkovanému kmeni *S. equi* na krevním agaru byla naočkována čára vyšetřovaného stafylokoka. Inkubace probíhala 18 hodin při 37 +/- 2 °C. V pozitivním případě (*S. aureus*) se v blízkosti stafylokoka produkujícího hyaluronidázu vytvořil patrný půlkruh bez hlenovitého nárůstu, což svědčilo o ztrátě pouzdra kmene *S. equi* tzv. dekapsulaci.

Satelitismus

Satelitismus je jev, kdy určitá bakterie roste pouze v blízkosti jiné, která jí poskytuje různé růstové faktory. Nejčastější satelitní bakterií je *Haemophilus influenzae* rostoucí v přítomnosti *S. aureus*, jehož hemolýza na krevním agaru uvolňuje

z erytrocytů faktor X a V nezbytné pro růst hemofilů (7). Tento jen byl využíván k odlišení hemofilů od jiných bakterií

12.2.2 Identifikace složitá

Do této skupiny byla zařazena identifikace komerčními sety s biochemickými testy pro jednotlivé skupiny mikroorganismů – konkrétně diagnostické soupravy od firmy Erba Lachema STAPHYtest 16, STAPHYtest 24, STREPTOtest 24 nebo EN-COCCUStest. Tyto soupravy jsou spjaty se softwarem TNW, který slouží pro vyhodnocení identifikace a interpretaci výsledků. Dále sem byla zařazena identifikace home-made biochemickou řadou cukrů pro gram negativní tyčinky (zkvašování glukózy, tvorba plynu, průkaz H_2S, ureázy, Simmons citrát a tvorba indolu).

Průkaz zkvašování cukrů

Půda ve zkumavce je obohacena o cukr – glukózu, sacharózu, manitol, laktózu nebo xylózu. V případě pozitivity se půda okyselí a zežloutne. Jako indikátor sloužila bromthymolová modř.

Průkaz ureázy

Průkaz ureázy se prováděl v pevné půdě s 2% močovinou. Bakterie produkující ureázu rozkládají močovinu obsaženou v půdě za tvorby amoniaku, ten alkalizuje prostředí a změní barvu indikátoru na modrou (11). Jako indikátor zde sloužila bromthymolová modř.

Průkaz tvorby indolu

Průkaz se prováděl v tekuté půdě nazývané Hottingerův bujón. Bakteriální kolonie byla přenesena do bujónu a nechala se inkubovat. Po proběhlé inkubaci se půda zakapala Kovacsovým činidlem. V pozitivním případě se na rozhraní tekutin objevil červeno-růžový prstenec.

Průkaz tvorby sirovodíku

Tento průkaz se prováděl v agaru podle Hajna obsahující sulfát železa. Pozitivita se projevila zčernáním půdy.

Další biochemické testy

Další použité testy jsou založené např. na produkci plynu (hromadění plynu v malé zkumavce tzv. plynovce, která je dnem vzhůru), redukci nitrátů na nitrity (průkaz Grissovým činidlem), průkazu dekarboxyláz (lyzinu, ornitinu a argininu), Simmons citrátovém testu (utilizace uhlíku z citrátu sodného) a ONPG testu (průkaz beta-galaktosidázy).

12.2.3 Identifikace hmotnostní spektrometrií

Identifikace touto metodou probíhala na hmotnostním spektrometru MicroFlex LT (Bruker Daltonik GmbH), princip MALDI-TOF MS. Bakteriální kmen byl párátkem nanesen na terčík kovové destičky a převrstven matricí (kyselinou skořicovou). Destička byla vložena do přístroje. Po analýze byla naměřená spektra vyhodnocena pomocí MALDI Biotyper. Výsledky byly interpretovány podle hodnotových skóre srovnáním pravděpodobnosti pořadí jednotlivých identifikovaných druhů.

12.2.4 Identifikace na selektivně diagnostických půdách

K identifikaci na selektivně-diagnostických půdách byly použity: k diagnostice kvasinek Candiselekt 4 (BIO-RAD), pro identifikaci MRSA půda MRSA Select II (BIO-RAD) a pro identifikaci *E. coli* Brilliance UTI agar (OXOID CZ s.r.o.).

12.3 Stanovení citlivosti

Citlivost k základním antibiotikům byla stanovena diskovou difúzní metodou ve spektru typickém pro daný druh. Rozšířená citlivost byla stanovena jednak diskovou difúzní metodou v rozšířeném spektru antibiotik a dále pak metodou stanovení MIC v mikrotitrační destičce.

12.3.1 Diskový difúzní test – základní citlivost

Z bakteriálního kmene byla připravena suspenze ve fyziologickém roztoku (zákal 0,5 dle McFarlanda měřeno pomocí denzitometru). Inokulum bylo naneseno vatovým tamponem na kultivační půdu Mueller Hinton agar (OXOID CZ), špatně rostoucí izoláty pak na Mueller Hinton agar + Horse blood (OXOID CZ). Antibiotické disky byly naneseny dispenzorem do 15 minut od inokulace a kultivační misky byly uloženy dnem vzhůru do příslušného inkubátoru. Na jednu kultivační půdu se kladlo maximálně šest disků antibiotik. Inkubace probíhala 16–20 hodin. Odečet velikosti zón byl proveden pomocí posuvného měřítka. Interpretace byla provedena podle kritérií standardních

postupů – interpretační kritéria EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing).

12.3.2 Diskový difúzní test – rozšířená citlivost

V určených indikacích byl proveden tento test s rozšířenou sestavou antibiotik. Viz tabulka s přehledem antibiotik (Příloha č. 7).

12.3.3 Stanovení MIC

Tato metoda byla zvolena podle indikací především u klinicky vysoce významných vzorků (hemokultury, centrální katetry) nebo u vysoce rezistentních izolátů. Z kmene byla připravena suspenze ve fyziologickém roztoku o hustotě 0,5 McFarlandovy stupnice. Pro testování byly použity komerční mikrotitrační destičky (ERBA Lachema) s lyofilizovanými antibiotiky, které byly před inokulací doplněny doporučeným suspenzním médiem. Po naočkování byly destičky inkubovány 16–20 hodin při 35 +/- 1 °C. Odečet a interpretace byly provedeny podle kritérií standardních postupů – interpretační kritéria EUCAST.

12.4 Molekulárně genetické metody

U vzorků ze sledovaného souboru byl proveden průkaz DNA *Pneumocystis jirovecii* metodou Real-Time PCR. Izolace nukleové kyseliny ze vzorku byla provedena soupravou DNA/RNA Prep (Sacace, Biotechnologies), amplifikace a vyhodnocení probíhaly na přístroji SmartCycler II (Cepheid).

12.5 Průkaz antigenů

V případě požadavku na průkaz antigenů *Streptococcus pneumoniae* a/nebo *Legionella pneumophila* byl proveden chromatografický test (BinaxNOW® *S. pneumoniae* resp. *Legionella*, Alere) ze vzorku moči.

12.6 Průkaz mykobakterií

Mykobakteriologické vyšetření bylo provedeno na základě indikace klinika. Vzorky byly dekontaminovány metodou s N-acetyl-l-cysteinem, kultivace probíhala ve 37 +/- 2 °C devět týdnů na vaječných půdách – Löwenstein-Jensen a Ogawa (Trios) a šest týdnů v tekuté půdě Middlebrook (Becton Dickinson) v uzavřeném systému Bactec MGIT 960 (Becton Dickinson). Bylo provedeno také mikroskopické vyšetření (fluorescenční barvení).

12.7 Průkaz toxinu *Clostridium difficile*

Toto vyšetření bylo prováděno z nativní stolice. V první fázi byl proveden chromatografický test na průkaz toxinu a antigenu *C. difficile* (*C. difficile* Quick Chek Complete, TechLab). Antigen je představován enzymem glutamát dehydrogenázou (GDH). V případě pozitivity antigenu i toxinu bylo provedeno kultivační vyšetření pro izolaci kmene – selektivní půda *Clostridium difficile* agar (bioMérieux CZ) a inkubace 24–72 hod v anaerobním boxu). Před založením kultivace byl proveden tzv. alkoholový šok (30min. inkubace 0,5 ml stolice s 0,5 ml 95% alkoholu). V případě pozitivity pouze antigenu bylo provedeno další vyšetření – PCR průkaz toxinů A/B (RIDA®GENE Clostridium difficile & Toxin A/B, R-Biopharm AG).

13 ZPRACOVÁNÍ ZÍSKANÝCH DAT - VÝSLEDKY

Celkem bylo zpracováno 146 vzorků klinického materiálu. Tabulky jsou vytvořeny z vlastních zdrojů.

Přehled lokalizací původu vzorků je uveden v tabulce č. 1. Tato tabulka také uvádí přehled pozitivních (n 83) a negativních (n 41) výsledků a také výsledků s nálezem pouze normální mikrobiální flóry (n 22).

Přehled jednotlivých kategorií použitých metod uvádí tabulka č. 2 – Přehled metod základního mikrobiologického vyšetření a tabulka č. 3 – Přehled identifikačních postupů a stanovení citlivosti.

Tabulka č. 4 uvádí přehled identifikovaných patogenů ve sledovaném souboru vzorků.

Tabulka 1 *Přehled odebraných vzorků*

	Počet vzorků			
Druh materiálu	**Celkem**	**Nález min. 1 patogena**	**Normální flóra**	**Negativní**
Výtěr z krku	25	18	7	0
Výtěr z nosu	11	3	6	2
Výtěr z rekta	15	6	9	0
Stolice průkaz *C. difficile*	2	0	-	2
Moč	23	5	-	18
Moč průkaz Ag	2	0	-	2
Sputum	7	6	0	1
Stěr z rány	2	1	-	1
Tracheální aspirát	6	5	0	1
BAL	4	1	1	2
Žaludeční obsah	5	2	-	3
Ascites	3	0	-	3
CŽK	8	3	-	5
Katétr arteriální	2	0	-	2
Hemokultura	25	4	-	21
Žluč	1	1	-	0
Sekret z drenu	1	0	-	1
Dekubitus stěr	2	2	-	0
Stěr z rány	2	0	-	2
Celkem	146	83	22	41

Legenda k tabulce č. 1:

- **BAL –** bronchoalveolární laváž
- **CŽK –** centrální žilní katétr
- **Ag –** antigen

Tabulka 2 *Přehled metod základního mikrobiologického vyšetření*

	Metoda základního vyšetření							
Druh vzorku	**MI**	**KU**	**Anaer KU**	**Průk.Ag**	**Průk. toxinu**	**Mykolog KU**	**Mykobakt KU**	**PCR**
Výtěr krk	0	25	0	-	-	11	0	0
Výtěr nos	0	11	0	-	-	3	0	0
Výtěr rektum	0	15	0	-	-	9	0	0
Stolice – průkaz *C. difficile*	-	-	-	-	2	-	-	-
Moč	0	23	0	2	-	12	0	0
Sputum	7	7	0	-	-	5	0	0
Tracheální aspirát	5	4	0	-	-	1	1	2
BAL	2	1	0	1	-	1	1	2
Žaludeční obsah	0	5	0	-	-	3	0	0
Ascites	3	3	0	-	-	3	0	0
Hemokultura	0	22	22	0	-	3	0	0
CŽK + katétr	0	10	0	-	-	4	0	0
Žluč	1	1	1	-	-	1	0	0
Dekubitus stěr, defekt	0	4	0	-	-	2	0	0
Stěr z rány	0	2	0	-	-	0	0	0
Celkem	18	133	23	3	2	58	2	4

Legenda k tabulce č. 2:

- **MI –** mikroskopie
- **KU –** kultivace
- **Anaer KU –** anaerobní kultivace
- **Průk. Ag** – průkaz antigenu
- **Průk. toxinu** – průkaz toxinu
- **Mykolog KU** – mykologická kultivace
- **Mykobakt KU** – kultivace na mykobakterie
- **PCR** – polymerázová řetězová reakce
- **BAL** – bronchoalveolární laváž
- **CŽK** – centrální žilní katétr

Tabulka 3 *Přehled identifikačních postupů a stanovení citlivosti*

	Typ metody identifikace				Typ metody stanovení citlivosti			MI z kultury
Druh vzorku	**Jedno-duchá**	**Složitá**	**MALDI TOF MS**	**Selekt-dg. půda**	**Základní**	**Rozšířená**	**MIC**	
Výtěr krk	1	0	19	10	9	9	1	0
Výtěr nos	1	0	4	0	3	1	0	0
Výtěr rektum	0	0	6	5	1	0	0	0
Moč	0	0	5	0	3	2	0	0
Sputum	0	0	5	2	1	4	0	0
Tracheální aspirát	0	0	1	0	0	1	0	0
BAL	0	0	0	0	0	0	0	0
Žaludeční obsah	0	0	6	2	5	1	1	0
Ascites	0	0	0	0	0	0	0	0
Hemokultura	0	0	6	0	0	3	3	6
CŽK + katétr	0	0	1	1	0	0	0	0
Žluč	0	0	1	0	0	1	0	0
Dekubitus stěr, defekt	1	0	5	0	1	2	0	1
Stěr z rány	1	1	2	0	0	0	0	0
Celkem	4	1	61	20	23	24	2	7

Legenda k tabulce č. 3:

- **Selekt-dg. půda** – selektivně diagnostická půda
- **MIC** – minimální inhibiční koncentrace
- **MI z kultury** – mikroskopie/preparát z kultury
- **BAL** – bronchoalveolární laváž
- **CŽK –** centrální žilní katétr

Tabulka 4 *Identifikovaný patogen dle skupiny typu klinického vzorku (materiálu)*

	Skupina typu vzorku						
Identifikovaná bakterie	**Screening**	**Moč**	**DDC + ŽO**	**Hemokultivace + katétry**	**Dutina břišní, punktát, žluč**	**Ostatní**	**Celkem**
STAU	1	0	0	0	0	0	1
SKN	7	0	7	2	0	2	18
EKSP	4	0	2	0	1	2	9
ESCO	3	1	0	0	0	0	4
KLSP	7	2	4	0	0	1	14
ENSP	2	0	1	0	0	0	3
NFT	3	0	3	0	0	0	6
Jiné G- tyčinky	5	2	1	4	0	2	14
Kvasinky	18	0	4	1	0	0	23
Normální flóra / negativní	24	20	7	28	4	4	87

Legenda k tabulce č. 4:

- **DDC** dolní dýchací cesty (sputum, BAL, aspirát)
- **ŽO** žaludeční obsah
- **STAU** *Staphylococcus aureus*
- **SKN** stafylokoky koaguláza negativní
- **EKSP** *Enterococcus species*
- **ESCO** *Escherichia coli*
- **KLSP** *Klebsiella species*
- **ENSP** *Enterobacter species*
- **NFT** gram negativní nefermentující tyčinky

14 DISKUZE

Jako první cíl mé práce jsem zvolila „**Zmapování metod laboratorní diagnostiky bakterií v konkrétní mikrobiologické laboratoři**“. V teoretické části jsem se zabývala obecně všemi rutinně používanými metodami v mikrobiologické diagnostice, které vedou ke správnému výsledku a jeho interpretaci klinickému lékaři. V praktické části už jsem tento cíl konkretizovala na určité oddělení v konkrétní nemocnici, tudíž tento cíl považuji za **splněný**. Na sledovaném bakteriologickém pracovišti se využívá široká škála metod detekce, identifikace i stanovení citlivosti. Postupy odpovídají moderním trendům v lékařské mikrobiologii, vycházejí z doporučovaných standardních postupů, tak, jak je prezentují např. Scharfen, 2013 nebo Společnost pro lékařskou mikrobiologii České lékařské společnosti J. E. Purkyně.

Druhým cílem bylo „**Porovnání konvenčních metod s moderními metodami**. Konvenčními metodami se rozumí obvyklý, běžný postup vyšetření – mikroskopie, kultivace, identifikace na základě biochemické aktivity bakterií (jednoduchá, složitá) a stanovení citlivosti bez využití automatizace. Tyto metody jsou starší, časově náročnější a je zde vyžadována zkušenost se zpracováním a hodnocením výsledků. Mnohé biochemické testy ale vyžadují hodnocení softwarem, a to se tedy dá popsat jako prolínání konvenční a moderní diagnostiky.

Z moderních metod byly ve sledovaném souboru využity molekulárně genetické metody a identifikace izolátů hmotnostní spektrometrií MALDI TOF MS. U těchto metod je výhodou vyšší senzitivita, než je tomu u konvenčních metod, úspora času a práce, vyšší přesnost, ale negativní stránkou je zde ekonomická náročnost, zejména při pořizování přístroje, eventuálně i při jeho provozu. K moderním postupům lze zařadit i automatizaci procesů. U moderních automatických přístrojů je nutná interpretace výsledků zkušeným odborníkem v souvislosti s ostatními okolnostmi a nálezy.

Mezi nejčastěji odebírané vzorky patřily výtěry z krku, nosu a rekta (vzhledem k pravidelnému screeningu pacientů na oddělení – uvedeno výše) a hemokultivace. Na těchto vzorcích je (dle uvedených tabulek) vidět, jak je důležitá provázanost konvenčních a moderních metod s cílem co nejkvalitnější diagnostiky, volily se např. metody jednoduché i složité identifikace k dosažení přesného výsledku.

V tabulce č. 4 je uvedeno široké spektrum patogenů – jsou zde obligátní lidské patogeny (dokážou vyvolat nemocnění i u zdravých jedinců, např. *Staphylococcus aureus)* i potencionální patogeny, kteří vyvolávají onemocnění u oslabených jedinců (na sledovaném oddělení běžné). Ve sledovaném souboru nebyl zachycen ani jeden kmen se sledovaným typem rezistence (MRSA, VRE, ESBL). V populaci se tyto bakterie vyskytují, dle údajů výroční zprávy ECDC 2014 (European Centre for Disease Prevention and Control) u invazivních onemocnění v České republice MRSA v 10–25 %, kmeny *E. coli* ESBL pozitivní také v intervalu 10–25 %. Nulový záchyt těchto kmenů ve sledovaném souboru lze vysvětlit relativně krátkým intervalem pozorování, a tedy nízkým počtem vzorků. Přesná detekce rezistentních izolátů je umožněna právě kombinací různých metod, např. screening na selektivně-diagnostických půdách, využití diskového difúzního testu spolu se stanovením MIC atd. To vše má význam klinický, ale také epidemiologický.

Porovnání použití konvenčních a moderních metod bylo obtížné. Některé podobory mikrobiologie, např., sérologie, využívají automatizaci mnohem více (např. metody ELISA). Obecně bychom mohli říci, že volba typu metod závisí na typu pracoviště, jak v rámci podoborů mikrobiologie, tak např. velikosti a postavení laboratoře (zpracování ambulantních vzorků, lůžková zařízení, referenční pracoviště apod. Nelze pominout ani ekonomické možnosti pracoviště.

Velmi důležitá je otázka interpretace výsledků. Automatizace a využití nejmodernějších postupů nemůže nahradit základní metody diagnostiky – v bakteriologii stále zůstává zlatým standardem mikroskopie a kultivace vzorků. Moderní metody mohou ale diagnostiku velmi urychlit a upřesnit. Pro vysvětlení – např. metody PCR jsou velmi citlivé na kontaminaci při odběru a zpracování vzorků. Vzhledem k vysoké citlivosti těchto metod je úskalím to, že dokážou prokázat i již mrtvé bakterie nebo klinicky bezvýznamnou příměs bakteriální DNA, která se do vzorku dostala při kontaminaci odběru nebo během jeho zpracování. Proto by měl být každý pozitivní nález získaný touto metodou porovnán s ostatními výsledky mikrobiálních vyšetření, stavem pacienta atd. a definitivní závěr musí provádět zkušený mikrobiolog ve spolupráci s indikujícím klinikem (37). Tento postup interpretace byl dodržován i na pracovišti, kde jsem prováděla praktickou část.

Konvenční metody se v porovnání s molekulárně genetickými metodami, v souladu se zjištěnými výsledky ve sledovaném souboru, **využívají častěji.** Když se ale zaměřím na **metody identifikace**, jednoznačně zde jsou **konvenční metody nahrazovány moderními automatickými metodami**. V mikrobiologické laboratoři ve FN Plzeň je to konkrétně analyzátor MALDI-TOF MS. Vzhledem k tomu, že identifikace izolátů pomocí tohoto přístroje vede k rychlejším a přesnějším výsledkům stanovení, vede i k rychlejší interpretaci výsledků klinickému lékaři, který je schopný v závislosti na tomto podat léčbu pacientovi mnohem dříve, než tomu bylo před využíváním tohoto přístroje.

Vzhledem k výše uvedenému tento cíl považuji za **splněný –** splněný s ohledem na porovnání metod. Nelze ale jednoznačně říci, zda je nějaká metoda nahrazována jinou. Podle mého pozorování je důležité spojení jak konvenčních, tak moderních postupů.

Dále jsem si v souladu s tématem práce položila výzkumnou otázku: „**Jaká jsou kritéria pro volbu metody v laboratorní diagnostice bakterií?**“. K této otázce se vztahovaly dvě hypotézy.

Hypotéza 1: V rutinním mikrobiologickém laboratorním provozu jsou přednostně využívány moderní metody – Ne, podle mých pozorování nejsou využívány přednostně, ale jsou důležitou součástí mikrobiologického vyšetření pro dosažení správného výsledku. Moderní metody diagnostiku výrazně zkvalitňují a urychlují, ale konvenční postupy nemohou zcela nahradit.

Hypotéza 2: Automatizace laboratorního provozu vede ke zlepšení diagnostiky a k přesnější detekci patogenů – Ano, slouží k rychlejší, přesnější a dokonalejší detekci patogenů, použitím automatických metod se dá v určitých situacích předejít selhání lidského faktoru.

ZÁVĚR

Tato bakalářská práce byla napsána za účelem zmapování procesu bakteriologické diagnostiky a jednotlivých diagnostických metod. Rovněž jsem chtěla poukázat na široké spektrum rutinně používaných metod a složitost diagnostického postupu.

V bakteriologii se využívá tzv. IVD (in vitro diagnostika), která je základem i mnoha jiných laboratorních oborů. Tato diagnostika doslova znamená „diagnostika ve skle“ a její podstatou je, že určení nemoci je prováděno mimo živý organismus. Zkoumají se pouze odebrané vzorky tělních tekutin nebo vzorky tkání ve zkumavce, reakční jamce, na živných půdách, podložním skle apod.

Bakteriologická laboratoř tedy přijímá vzorky biologického materiálu „na kultivaci“ na základě indikací a odběrů klinických lékařů. Vyšetření se provádí komplexně, tzn. řadou různých postupů podle různých kritérií: mikroskopické a kultivační, v indikovaných případech kvantitativními metodami (moče, sekrety dýchacích cest atd.), v některých případech vyšetření anaerobní. Zachycené bakterie jsou následně identifikovány a stanovuje se u nich citlivost na antibiotika. Významnou součástí tohoto podoboru mikrobiologie je diagnostika sepsí u imunokompromitovaných pacientů, sledování rezistence k antibiotikům, které jsem také prováděla a popsala v praktické části.

Stanovila jsem si cíle práce, které byly splněny. S hypotézami už to tak jednoduché nebylo – Hypotéza 1 (V rutinním mikrobiologickém laboratorním provozu jsou přednostně využívány moderní metody) nedopadla podlé mého očekávání, na rozdíl od Hypotézy 2 (Automatizace laboratorního provozu vede ke zlepšení diagnostiky a k přesnější detekci patogenů), kde už odpověď na tuto hypotézu byla kladná, přesně jak jsem předpokládala. Odpovědi a vysvětlení cílů a hypotéz jsou uvedeny v diskuzi.

Bakalářská práce dokládá, že laboratorní diagnostika infekčních nemocí je složitý proces, kdy volba diagnostických metod závisí jednak na standardních postupech oboru, ale také na druhu klinického materiálu, diagnóze a stavu pacienta. Indikace a použití metod vyplývá také z průběžných nálezů a výsledků během samotného diagnostického procesu. Diagnostika není tedy procesem automatickým a neměnným, pro její kvalitu je rozhodující odborná kvalifikace a zkušenost laboratorních pracovníků. Tato kvalifikace je také rozhodující pro kvalitní interpretaci výsledků laboratorního vyšetření.

SEZNAM LITERATURY A INTERNETOVÝCH ZDROJŮ

1. SCHARFEN, Josef. 2013. *Diferenciální diagnostika v klinické mikrobiologii*. Praha: Nucleus HK. 219 s. ISBN 978-80-87009-32-1.
2. SCHINDLER, Jiří. 2009. *Mikrobiologie - Pro studenty zdravotnických oborů*. Praha: Grada. 222 s. ISBN 978-80-247-3170-4.
3. JULÁK, Jaroslav. 2007. *Úvod do lékařské bakteriologie*. 1. Praha: Karolinum. 406 s. ISBN 80-246-1270-4.
4. GOPFERTOVÁ, Dana, JANOVSKÁ, Daniela a DOHNAL, Karel. 1999. *Mikrobiologie, imunologie, epidemiologie, hygiena pro střední a vyšší odborné zdravotnické školy*. Praha: Triton. 154 s. ISBN 80-7254-049-1.
5. SOUČEK, Andrej, SCHINDER, Jiří, VÁVRA, Jiří, BEDNÁŘ, Marek a FRAŇKOVÁ, Věra. 1996. *Lékařská mikrobiologie: Bakteriologie, virologie, parazitologie*. 1. Praha: Triton. 560 s. ISBN 859-4-315-0528-0.
6. JURÁNKOVÁ, Jana. 2011. *Klinická mikrobiologie v laboratorní praxi*. 1. Brno: Masarykova univerzita. 73 s. ISBN 978-80-210-5657-2.
7. VOTAVA, Miroslav, kol. 2010. *Lékařská mikrobiologie vyšetřovací metody*. 1. Brno: Neptun. 495 s. ISBN 978-80-86850-04-8.
8. VOTAVA, Miroslav. 2005. *Lékařská mikrobiologie obecná.* 2. Brno: Neptun. 351 s. ISBN 80-86850-00-5.
9. HAMPLOVÁ, Lidmila a kol. 2015. *Mikrobiologie, imunologie, epidemiologie, hygiena*. 1. Praha: Triton. 264 s. ISBN 978-80-7387-934-1.
10. KAPRÁLEK, František. 2000. *Základy bakteriologie*. Praha: Karolinum. 241s. ISBN 80-7184-811-5.
11. BERLINSKÁ, Jana. *Biochemická identifikace*. Mikrobiologie [online]. [cit. 2016-08-25]. Dostupné z: http://mikrobiologie.webgarden.cz/rubriky/biochemicka-identifikace
12. VOTAVA, Miroslav, kol. 2003. *Lékařská mikrobiologie speciální*. 1. Brno: Neptun. 495 s. ISBN 80-802896-6-5.
13. *Společnost pro lékařskou mikrobiologii ČLS JEP 2014, Mikrobiologické vyšetření hemokultur metodou mikroskopickou a kultivační v automatickém a manuálním hemokultivačním systému, NÁRODNÍ STANDARDNÍ VYŠETŘOVACÍ POSTUP NSVP6,* [online]. [cit. 2016-08-30]. Dostupné z http://www.splm.cz/dokumenty/NSVP_6_navrh1.pdf

14. HESSENBRUCH, Arne. 2000. *Reader's guide to the history of science*. Chicago: Fitzroy Dearborn. ISBN 188496429X
15. ROZSYPAL, Hanuš. 2015. *Základy infekčního lékařství*. Praha: Karolinum. 572 s. ISBN 978-80-246-2932-2.
16. MAČÁK, Jiří, MAČÁKOVÁ, Jana. 2004. *Patologie*. Praha: Grada. 347 s. ISBN 80-247-0785-3.
17. BOHDÁLKOVÁ, Jana, KVĚCHOVÁ, Martina. 2007. *Vyšetření prokalcitoninu a jeho srovnání s CRP. Zdraví euro* [online]. FN Brno - Bohunice: OKBH [cit. 2016-09-06]. Dostupné z: http://zdravi.euro.cz/clanek/sestra/vysetreni-prokalcitoninu-a-jeho-srovnani-s-crp-329825
18. KAZDA, A., kol. *Prokalcitonin u kriticky nemocných* [online]. Praha: ČLS JEP, 2005 [cit. 2016-09-06]. Dostupné z: http://nts.prolekare.cz/cls/odkazy/kbm0501_4.pdf
19. JÍLEK, Dalibor, KRÁL, Vlastimil. 2009. *Laboratorní imunologická diagnostika. Zdraví euro* [online]. Ústí nad Labem: Centrum imunologie a mikrobiologie [cit. 2016-09-06]. Dostupné z: http://zdravi.euro.cz/clanek/postgradualni-medicina/laboratorni-imunologicka-diagnostika-413551
20. ROZSYPAL, Hanuš, HOLUB, Michal a KOSÁKOVÁ, Monika. 2013. *Infekční nemoci ve standardní a intenzivní péči*. Praha: Karolinum. 386 s. ISBN 978-80-246-2197-5.
21. BERÁNEK, Martin. 2016. *Molekulární genetika pro bioanalytiky*. Praha: Karolinum. 196 s. ISBN 978-80-246-3224-7
22. MELTER, Oto a MALMGREN, Annika. 2014. *Principy a praktika lékařské mikrobiologie*. 1. Praha: Karolinum. 139 s. ISBN 978-80-246-2414-3.
23. KRČ, Ivo. *Hodnocení bílého krevního obrazu v ambulantní praxi*, Solen 2004 [online], Interní medicína pro praxi, www.internimedicina.cz, [cit. 2016-10-11]. Dostupné z: http://www.internimedicina.cz/pdfs/int/2004/03/09.pdf
24. TONDROVÁ, Irena. *Cytologické a histologické vyšetření.* [online] 2011, [cit. 2016-10-11]. Dostupné z: *http://www.szsmb.cz/admin/upload/sekce_materialy/cytologie.pdf*
25. GOERING, Richard V. et al. 2016. *Mimsova lékařská mikrobiologie*. Praha Triton, 5. vyd. ISBN-978-80-7387-928-0.
26. RŮŽKOVÁ, Renáta. *Rychlé diagnostické testy v ordinaci PLDD – význam a*

použití, [online], www.pediatriepropraxi 2014; 15(1): 28–30, [cit. 2016-10-11]. Dostupné z: http://www.pediatriepropraxi.cz/pdfs/ped/2014/01/07.pdf

27. ZAHRADNÍČEK, Ondřej. *Pátráme po mikrobech*. [online] [cit. 2016-10-11]. Dostupné z: http://slideplayer.cz/slide/2356159/
28. *EUCAST: Návody EUCAST pro detekci mechanizmů rezistence a specifické rezistence s klinickým a/nebo epidemiologickým významem*. verze 1.0, prosinec 2013. [online], www.szu.cz, [cit. 2017-01-16]. Dostupné z: http://www.szu.cz/uploads/documents/CeM/NRLs/atb/EUCAST/EUCAST_Detekce_mechanizmu_rezistence.pdf
29. HRABÁK, J., VANIŠ, V., BERGEROVÁ, T. a URBÁŠKOVÁ, P.. 2007. Průkaz beta-laktamáz širokého spektra (ESBL) a typu AmpC u enterobakterií. *Zprávy Centra epidemiologie a mikrobiologie*. Praha: Státní zdravotní ústav, roč. 16, č. 1, s. 31-36.
30. LAY, J.O. 2001. *MALDI-TOF mass spectrometry of bacteria*. *Mass Spectrometry Reviews*, vol. 20, no. 4, s. 172– 194.
31. HRABÁK, Jaroslav, kol. *Aplikace metod molekulární genetiky v klinické mikrobiologii – zpráva z jednání Pracovní skupiny molekulární mikrobiologie – TIDE*. Dostupné z: http://www.splm.cz/dokumenty/PSMM_1.pdf
32. JABOR, Antonín. 2008. *Vnitřní prostředí*. Praha: Grada. 560 s. ISBN 978-80-247-1221-5.
33. O'HARA CM. *Manual and Automated Instrumentation for Identification of Enterobacteriaceae and Other Aerobic Gram-Negative Bacilli*. Clinical Microbiology Reviews. 2005;18(1):147-162. doi:10.1128/CMR.18.1.147-162.2005. [cit. 2017-02-06]. Dostupné z: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC544179/
34. KLOUDA, Pavel. 2003. *Moderní analytické metody*. 2. upr. vyd. Ostrava: Pavel Klouda. 132 s. ISBN 80-86369-07-2.
35. HRABÁK, J., CHUDÁČKOVÁ, E., WALKOVÁ R. 2013. *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight (MALDI-TOF) Mass Spectrometry for Detection of Antibiotic Resistance Mechanisms: from Research to Routine Diagnosis*. *Clin. Microb Rev*., roč. 26. s. 103–114.
36. ZAIDI, N., KONSTANTINOU, K., ZERVOS, M.. T*he Role of Molecular Biology and Nucleic Acid Technology in the Study of Human Infection and Epidemiology*, Arch Pathol Lab Med. 2003 Sep;127(9):1098-105. [cit. 2017-02-

06]. Dostupné z: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12946209

37. ŽAMPACHOVÁ, E., Interpretace mikrobiologického výsledku, Postgraduální medicína 6/2009, [cit. 2017-02-06]. Dostupné z: *http://zdravi.euro.cz/clanek/postgradualni-medicina-priloha/interpretace-mikrobiologickeho-vysledku-431514*

SEZNAM ZKRATEK

- **BAL** bronchoalveolární laváž
- **CRP** C reaktivní protein
- **CFU** colony forming unit (jednotka tvořící kolonie)
- **DNA** deoxyribonukleová kyselina
- **ESBL** Enterobacteriaceae - kmeny produkující širokospektré beta laktamázy
- **GDH** glutamát dehydrogenáza
- **HCD** horní cesty dýchací
- **IVD** in vitro diagnostika
- **JIP** jednotka intenzivní péče
- **KA** krevní agar
- **MBC** minimální baktericidní
- **MIC** minimální inhibiční koncentrace
- **MRSA** methicilin rezistentní *Staphylococus aureus*
- **NK** nukleová kyselina
- **PCR** polymerázová řetězová reakce
- **PCT** prokalcitonin
- **POCT** point-of-care tests
- **TBC** tuberkulóza

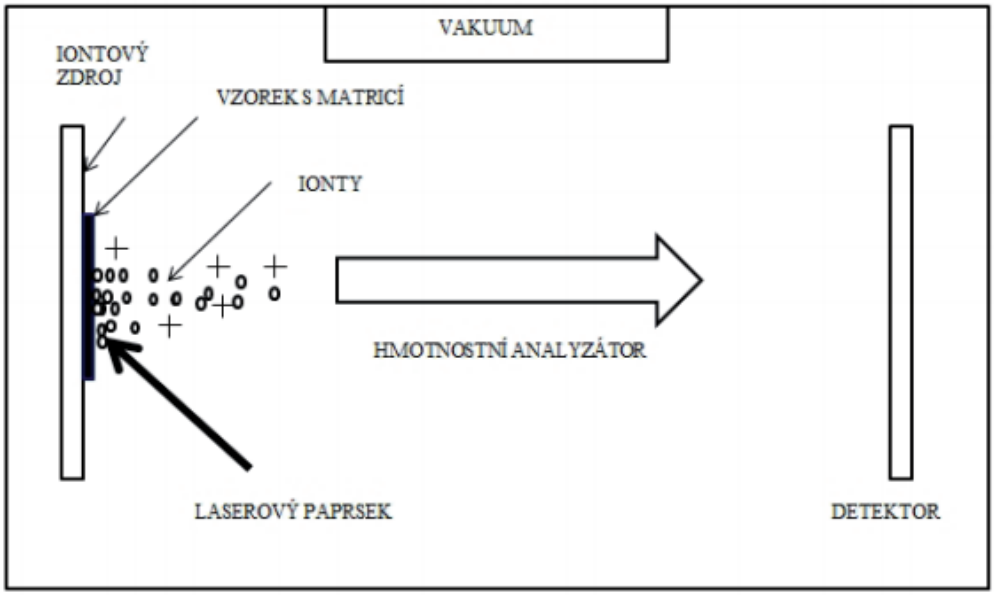
SEZNAM TABULEK

- **Tabulka č. 1** Přehled odebraných vzorků
- **Tabulka č. 2** Přehled metod základního mikrobiologického vyšetření
- **Tabulka č. 3** Přehled identifikačních postupů a stanovení citlivosti
- **Tabulka č. 4** Identifikovaný patogen dle skupiny typu klinického vzorku (materiálu)

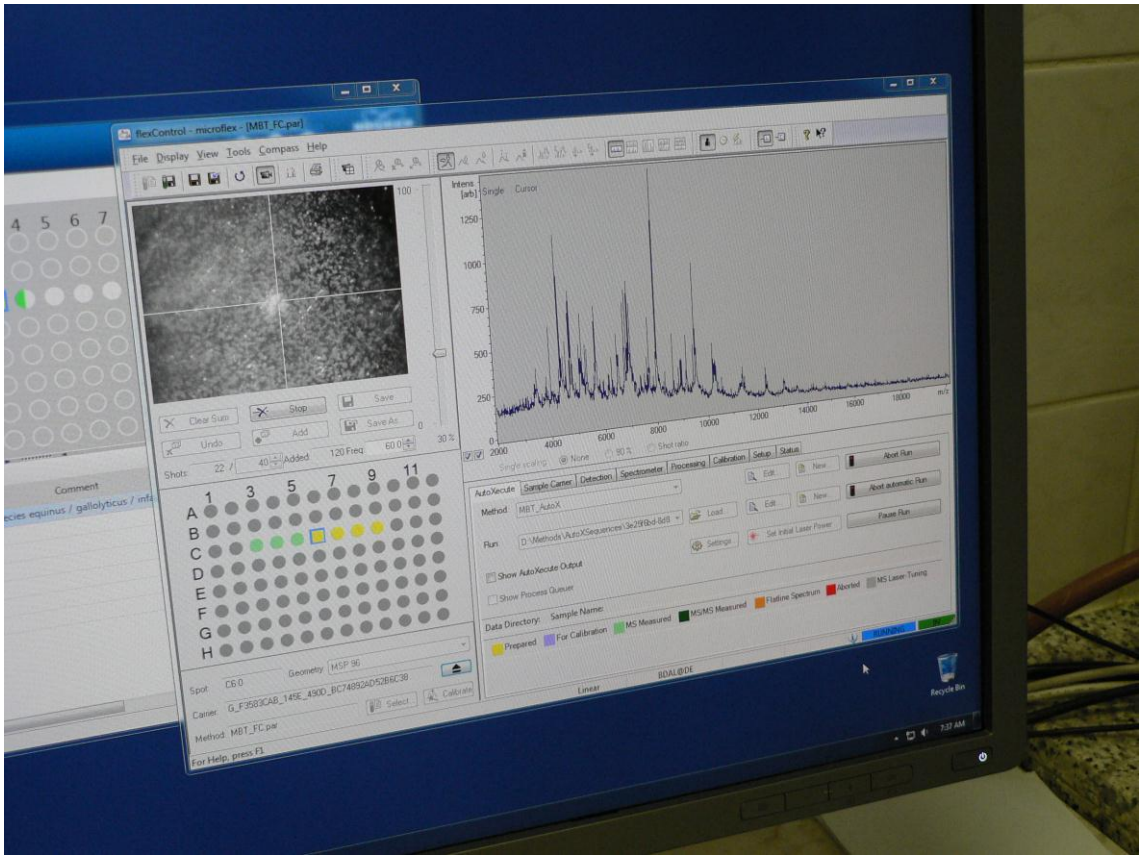
SEZNAM PŘÍLOH

- **Příloha č. 1** Schéma přístroje MALDI TOF
- **Příloha č. 2** Hmotnostní spektrometr MicroFlex LT (Bruker Daltonik GmbH), princip MALDI-TOF MS – vyhodnocení měření softwarem
- **Příloha č. 3** Standardní sestavy antibiotik (atb) pro jednotlivé skupiny bakterií
- **Příloha č. 4** Mikroskopický preparát grampozitivní koky, barvení dle Grama, zvětšení 1000x
- **Příloha č. 5** Mikroskopický preparát gramnegativní tyčinky, barvení dle Grama, zvětšení 1000x
- **Příloha č. 6** Kultivace hemokultur v BACTEC® Fluorescenční systém 9240 (Becton Dickinson)
- **Příloha č. 7** Stanovení citlivosti – diskový difúzní test
- **Příloha č. 8** Stanovení citlivosti – diluční metoda – minimální inhibiční koncentrace
- **Příloha č. 9** Home-made biochemická řada pro identifikaci gramnegativních tyčinek: glukóza s plynovkou, agar podle Hajna, urea, Simmonsův citrát, Hottingerův bujon pro průkaz indolu
- **Příloha č. 10** Příprava kultivačních půd a testů k odečtu výsledků
- **Příloha č. 11** Endův agar – růst gramnegativních tyčinek
- **Příloha č. 12** Krevní agar – růst bakterií v primokultivaci
- **Příloha č. 13** Selektivně diagnostická půda Brilliance UTI agar (OXOID CZ s.r.o.) pro identifikaci *E. coli* (růžové kolonie)
- **Příloha č. 14** Anaerobní box Anaerobní box MACS MG 500 (Don Whitley Scientific) pro kultivaci anaerobních bakterií

PŘÍLOHY



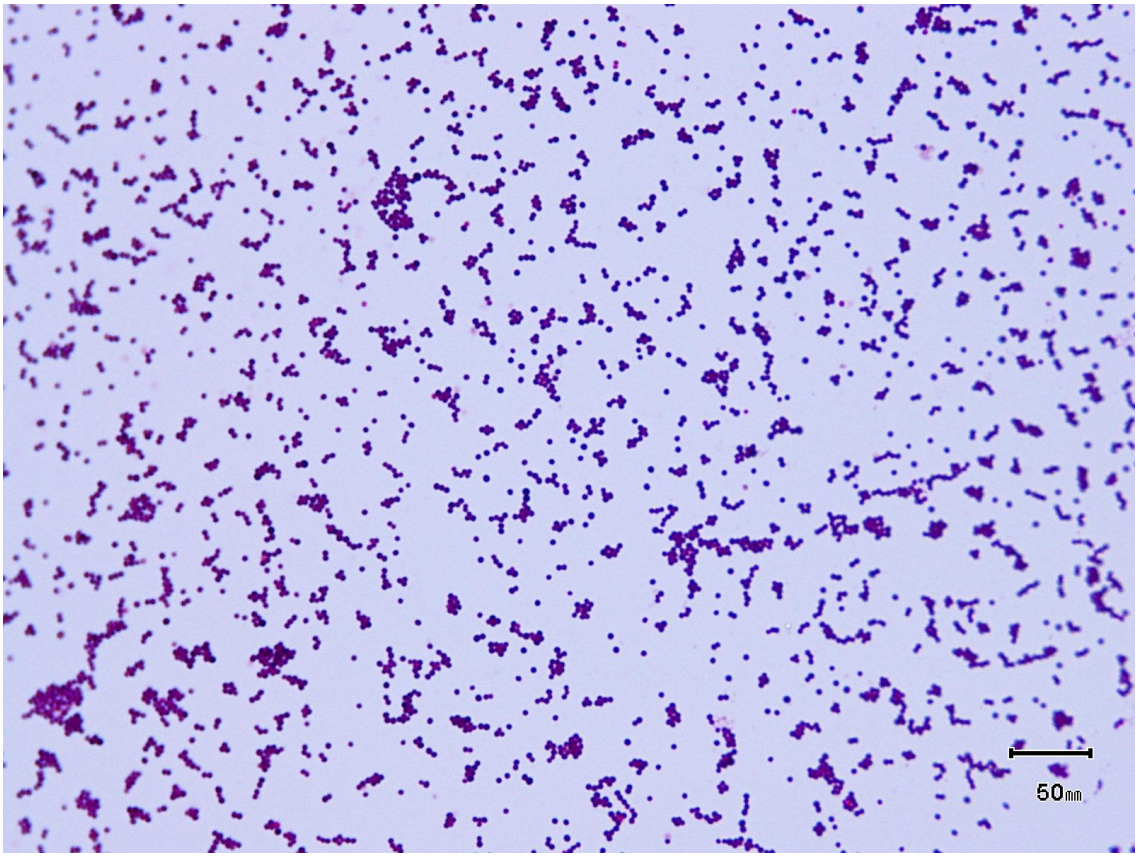
Příloha č. 1 *Schéma přístroje MALDI TOF [převzato z (30)]*



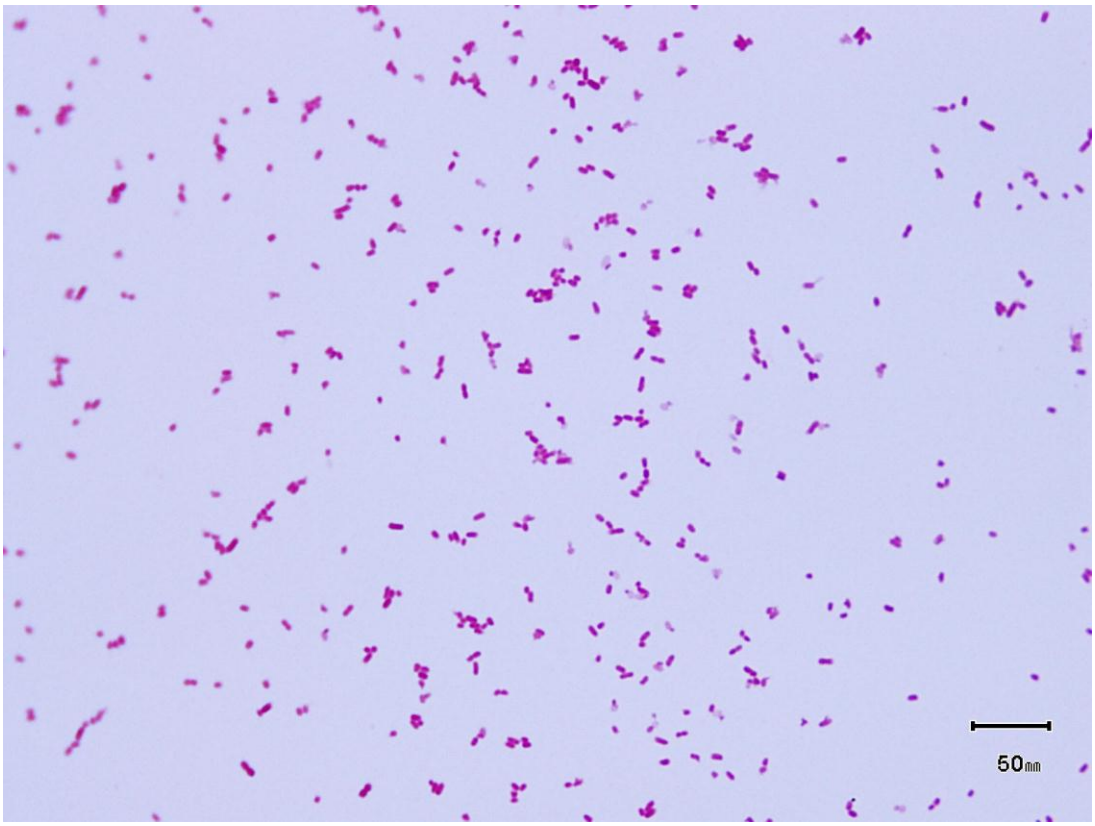
Příloha č. 2 *Hmotnostní spektrometr MicroFlex LT (Bruker Daltonik GmbH), princip MALDI-TOF MS – vyhodnocení měření softwarem*

skupina bakterií	standardní atb	další přidaná atb u močových infekcí	další přidaná atb u rozšířené citlivosti
enterobakterie	ampicilin amoxicilin klavulanát gentamicin ciprofloxacin piperacilin tazobaktam cefotaxim	cefuroxim kotrimoxazol furantoin norfloxacin fosfomycin	ceftazidim cefepim imipenem meropenem amikacin tigecyklin
stafylokoky	oxacilin gentamicin erytromycin klindamycin tetracyklin kotrimoxazol	furantoin	ciprofloxacin vankomycin linezolid tigecyklin chloramfenikol rifampicin
streptokoky	penicilin erytromycin klindamycin	furantoin	vankomycin linezolid
enterokoky	ampicilin tetracyklin vankomycin	furantoin	tigecyklin teikoplanin linezolid gentamicin
pseudomonády	piperacilin ceftazidim imipenem gentamicin ciprofloxacin		piperacilin tazobaktam cefepim meropenem amikacin kolistin

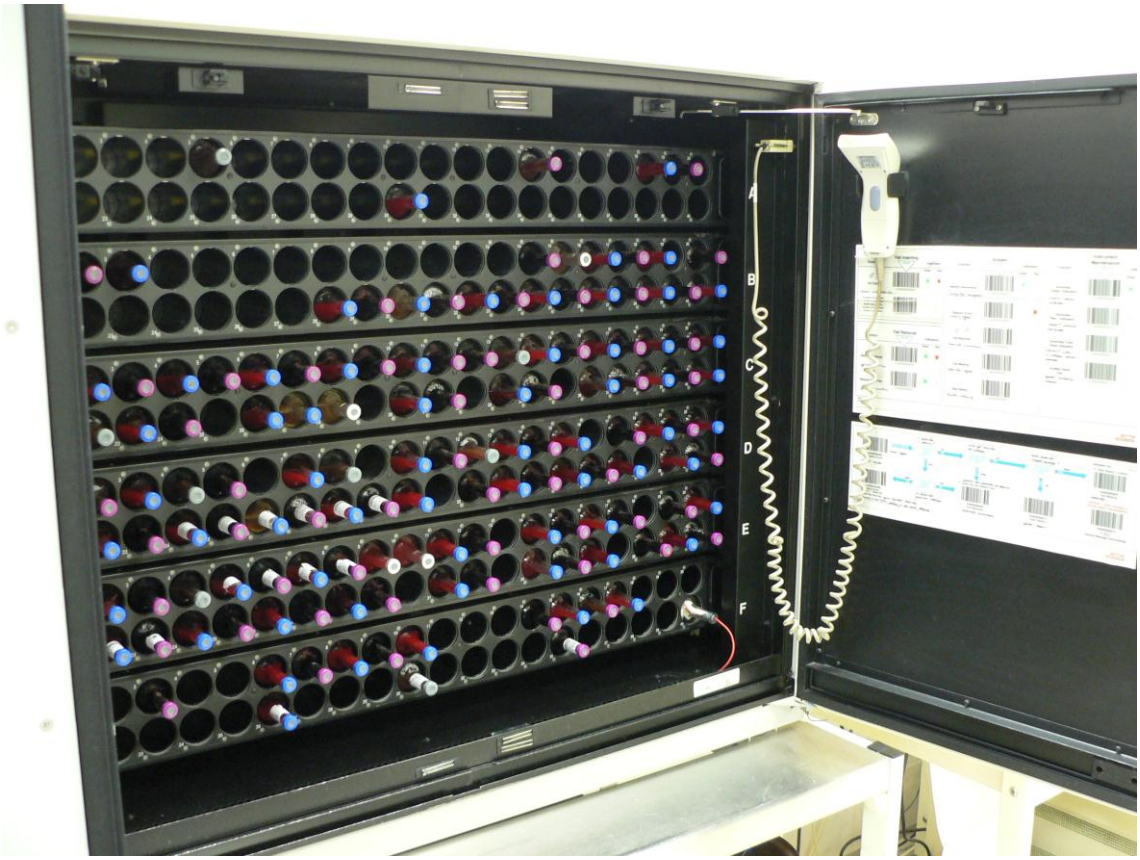
Příloha č. 3 *Standardní sestavy antibiotik (atb) pro jednotlivé skupiny bakterií*



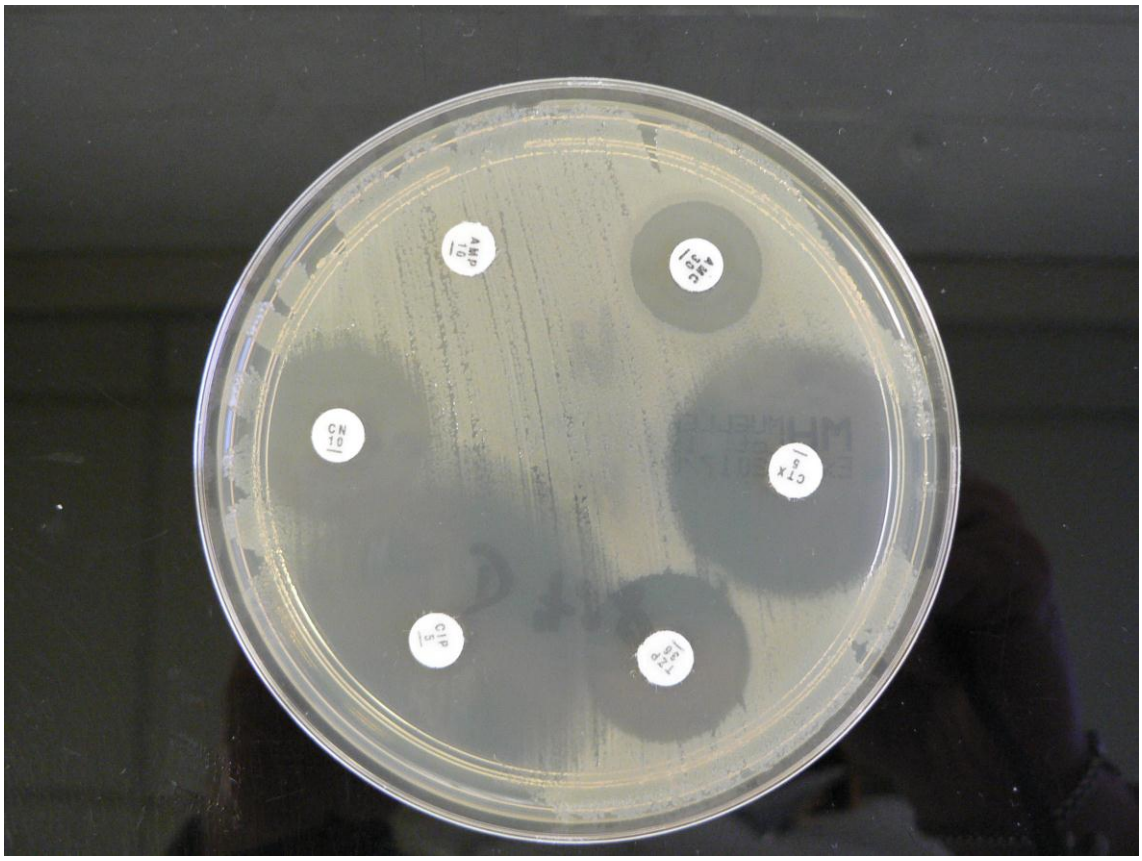
Příloha č. 4 *Mikroskopický preparát grampozitivní koky, barvení dle Grama, zvětšení 1000x*



Příloha č. 5 *Mikroskopický preparát gramnegativní tyčinky, barvení dle Grama, zvětšení 1000x*



Příloha č. 6 *Kultivace hemokultur v BACTEC® Fluorescenční systém 9240 (Becton Dickinson)*



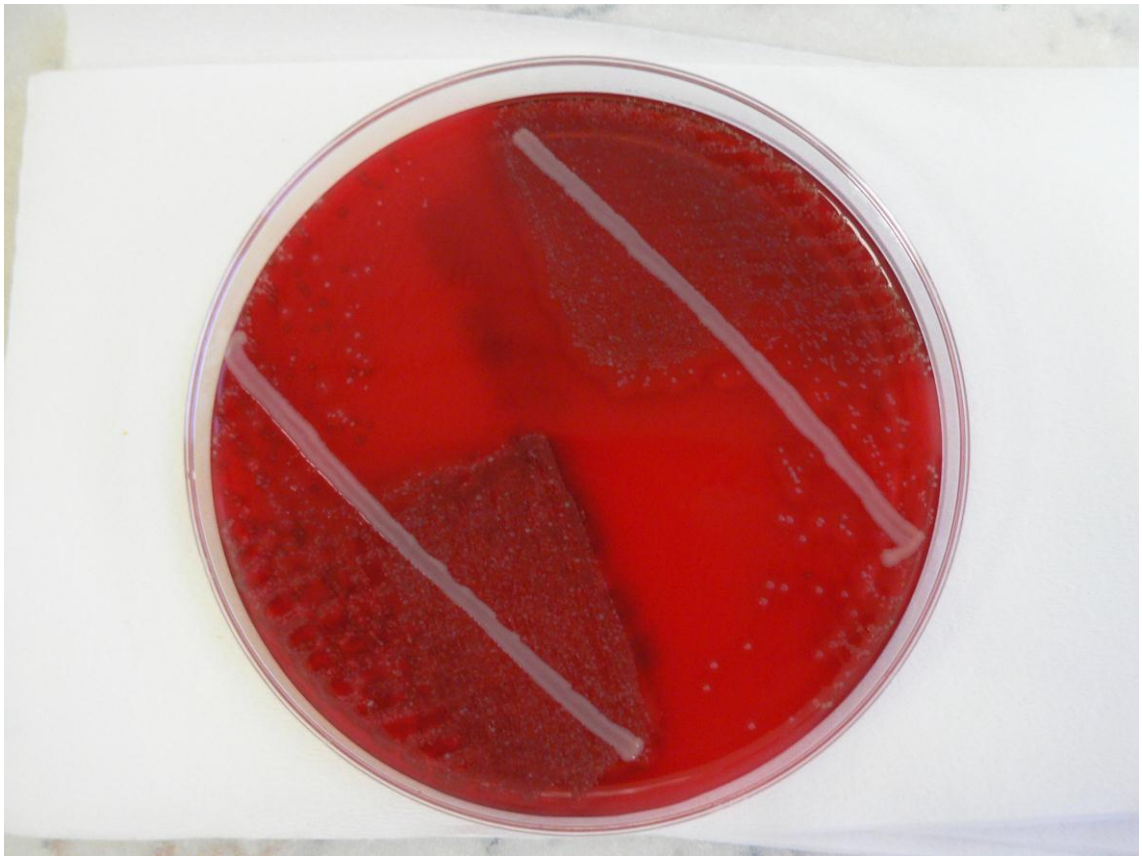
Příloha č. 7 *Stanovení citlivosti - diskový difúzní test*

Příloha č. 8 *Stanovení citlivosti – diluční metoda – minimální inhibiční koncentrace*

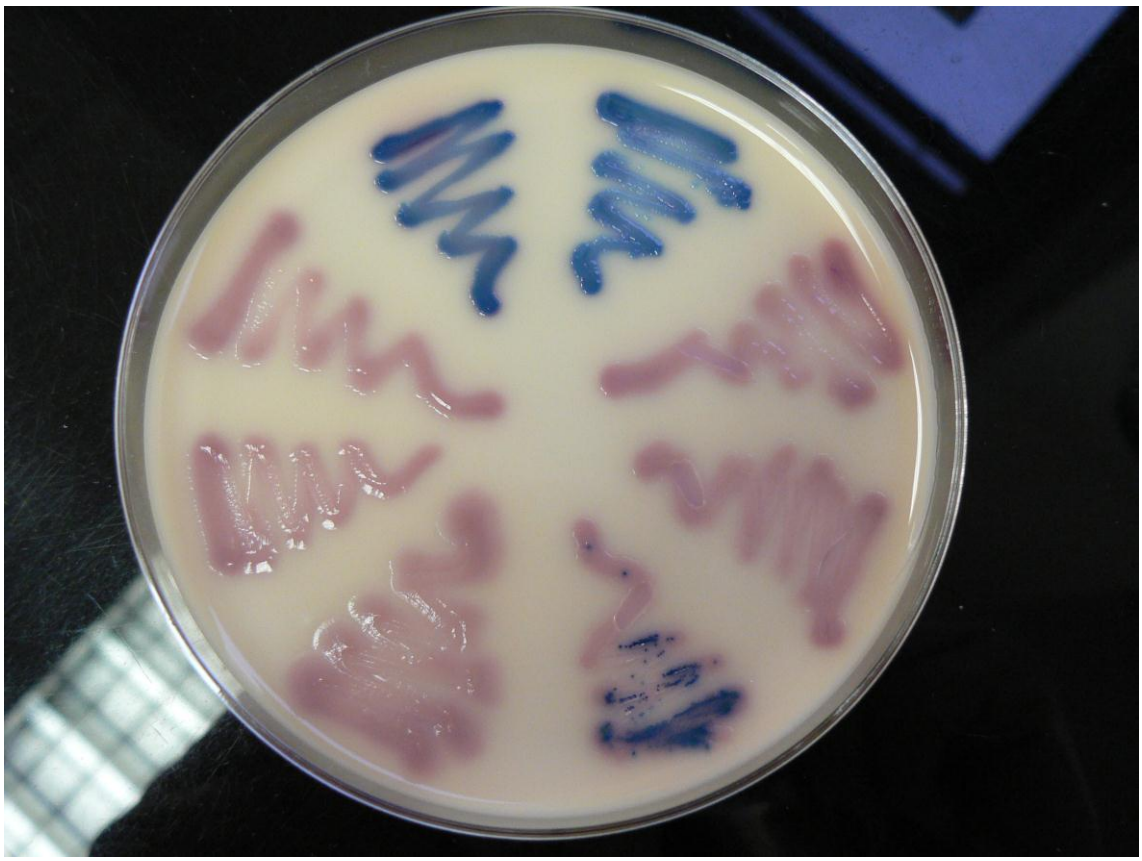
Příloha č. 9 *Home-made biochemická řada pro identifikaci gramnegativních tyčinek: glukóza s plynovkou, agar podle Hajna, urea, Simmonsův citrát, Hottingerův bujon pro průkaz indolu*

Příloha č. 10 *Příprava kultivačních půd a testů k odečtu výsledků*

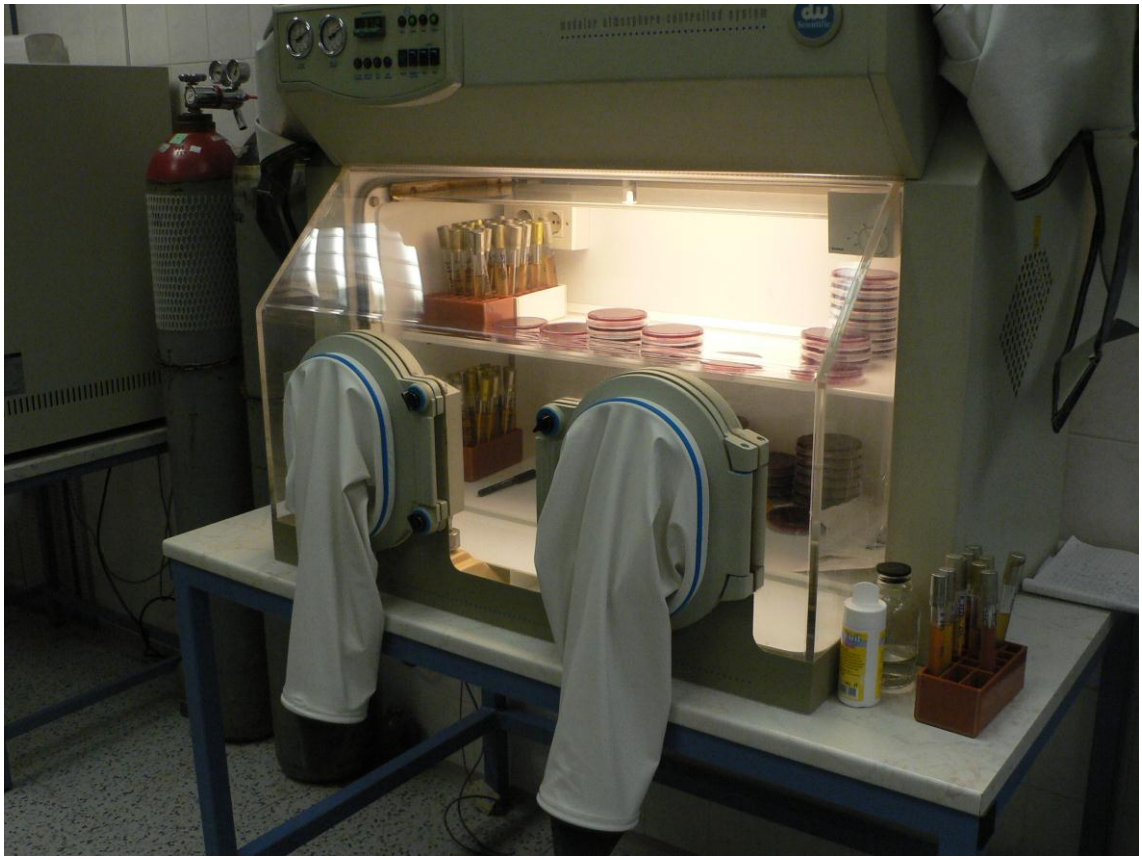
Příloha č. 11 *Endův agar – růst gramnegativních tyčinek*



Příloha č. 12 *Krevní agar - růst bakterií v primokultivaci*



Příloha č. 13 *Selektivně diagnostická půda Brilliance UTI agar (OXOID CZ s.r.o.) pro identifikaci E. coli (růžové kolonie)*



Příloha č. 14 *Anaerobní box Anaerobní box MACS MG 500 (Don Whitley Scientific) pro kultivaci anaerobních bakterií*