

„Jak může laboratoř zvýšit
relevanci výsledku?“

V. Adámková

Ústav lékařské mikrobiologie FNKV, Praha

Mikrobiologická diagnostika v éře narůstající rezistence k antibiotikům

- obtížný odhad citlivosti původce → riziko terapeutického selhání
- empirické používání širokospektrých antibiotik → nárůst rezistence
- průběžné hodnocení výsledků mikrobiologických vyšetření → aktuální přehled o stavu rezistence → účinná úvodní terapie
- Správně indikované mikrobiologické vyšetření umožňuje účinnou a cílenou léčbu infekce, omezující riziko dalšího nárůstu rezistence

Chyby při indikaci mikrobiologického vyšetření a interpretaci jeho výsledku

- Indikace vyšetření vzorku, který neodpovídá klinické diagnóze
- Indikace mikrobiologického vyšetření s očekáváním, že jeho výsledek stanoví klinickou diagnózu
- Nedostatečná dokumentace
- Polypragmatický přístup k indikaci mikrobiologického vyšetření
- Přecenění a chybná interpretace nálezu některých mikroorganismů
- Chybná interpretace výsledku vyšetření mikrobiologickou laboratoří, testování citlivosti u klinicky nevýznamných izolátů

Zásady odběru

Každý vzorek na mikrobiologické vyšetření musí splňovat:

Klinickou validitu

Ze správného místa (kde lze předpokládat přítomnost mikroba)

Technickou validitu

- Ve správný čas (před podáním antibiotika)
- Správným způsobem (lege artis, asepticky)
- Do správných souprav (označené sterilní nádoby; popř. transportní média)

Chyby při detekci patogena

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

Nepřímý průkaz

- PRŮKAZ SPECIFICKÝCH STOP, KTERÉ MIKROORGANISMUS ZANECHAL V ORGANISMU → průkaz protilátek
- Precipitace
- Aglutinace
- Komplementfixační reakce
- Neutralizační reakce
- Metody se značenými složkami (IMF, ELISA, RIA, Western blot)

Přímý průkaz

- NÁLEZ MIKROORGANISMU VE VYŠETŘOVANÉM VZORKU
- **Mikroskopický průkaz**
- **Izolace mikroorganismu**
 - Kultivace
 - Průkaz přítomnosti typických mikrobiálních složek ve vzorku (Ag, NK)
- Identifikace mikroorganismu (+ citlivost na atb)

Klasifikace typizačních metod

- Neexistuje „zlatý standard“, který by jednoznačně definoval 100% pozitivní a 100% negativní výsledek
- Kontext epidemiologických dat
- Senzitivita, specifita

Klasifikace typizačních metod

- Fenotypové techniky – detekce exprimovaných vlastností
- Genotypové techniky – přímý průkaz chromozomální / extrachromozomální NK

Genotypové metody

- Plasmidová analýza – epidemiologie; extrachromozomální element...
- REA - restriční endonukleázová analýza; různé kmeny jednoho druhu mají různé REA profily...
- Southern blot
- PFGE
- PCR

Fenotypová klasifikace bakterií

Fenotyp = soubor všech pozorovatelných vlastností a znaků organismu; výsledek interakce jeho genotypu s prostředím

Biotypizace /morfologie, metabolické aktivity

Antibiogram

Sérotypizace

Fagotypizace

MLEE – multilocus enzyme electrophoresis; pro matematickou analýzu; popis diverzity a struktury bakteriální populace

Identifikace kmene

- **Orientační** – morfologie kolonií, růst na selektivně diagnostických půdách; barvený preparát
- **Konečná identifikace** – biochemické a fyziologické vlastnosti; antigenní struktura; průkaz toxicity
- *Typizace kmene*: biotypizace; antibiogram; fagotypizace; bakteriocinotypizace; RFLP

Průkaz přítomnosti typických mikrobiálních složek ve vzorku

- Průkaz antigenů – specifické protilátky (monoklonální, polyklonální)
 - Příklad: precipitace (Ascoliho termoprecipitace); aglutinace na nosičích (bakteriální Ag v likvoru při suspektní bakteriální meningitidě); ELISA (Ag *S. pyogenes* ve výtěru z krku, Ag *L. pneumophila* v moči); IMF
- Průkaz toxinu (*C. difficile*)
- Průkaz dalších produktů bakteriálního metabolismu (dechový test – *H. pylori*)
- Průkaz bakteriálních nukleových kyselin (PCR, LCR...)

Interpretace kultivačních nálezů

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

Obligátní patogeny

- Původci „klasických“ nákaz: *Corynebacterium diphtheriae* (záškrt); *Salmonella Typhi* (břišní tyfus); *Neisseria gonorrhoeae* (kapavka)...
- Míra patogenity různá i u obligátních patogenů (*Yersinia pestis* je více patogenní než *Streptococcus pyogenes*)
- Specializace na jeden hostitelský druh (shigelly, gonokoky – člověk) x infekce různých druhů (stafylokoky, virus vztekliny)

Fakultativní patogeny

- Podmínky pro vznik infekce
- - změna místa přirozeného výskytu (*Escherichia coli* : střevo x močové ústrojí, krevní řečiště...)
- - snížení odolnosti hostitele (cukrovka, kortikoidy, antibiotika, tumory, přítomnost cizích těles)

Mikroorganismy kolonizující respirační trakt

Bakterie

Acinetobacter spp.

Actinobacillus spp.

Actinomyces spp.

Cardiobacterium spp.

Corynebacterium spp.

Eikenella spp.

Enterobacteriaceae

Eubacterium spp.

Fusobacterium spp.

Haemophilus spp.

Kingella spp.

Moraxella spp.

Mycoplasma spp.

Neisseria spp.

Peptostreptococcus spp.

Porphyromonas spp.

Prevotella spp.

Propionibacterium spp.

Staphylococcus spp.

Streptococcus spp.

Stomatococcus spp.

Treponema spp.

Veillonella spp.

Mykotické mikroorganismy

Candida spp.

Paraziti

Entamoeba spp.

Fenotypová vs. genotypová identifikace; možný dopad na pacienta

Dg + klinický materiál	Fenotypová identifikace	Fenotypové metody	Genotypová identifikace	Možné příčiny chybné ID
Hnis z mozkového abscesu; 2letá dívka		Manuální metody		
HK; 68letá žena s metastazujícím Ca				
HK; chlopeň; 59letý muž s IE				
HK; 24letá žena s perzist. bakteriemií				

Fenotypová vs. genotypová identifikace; možný dopad na pacienta

Dg + klinický materiál	Fenotypová identifikace	Fenotypové metody	Genotypová identifikace	Možné příčiny chybné ID
Hnis z mozkového abscesu; 2letá dívka	<i>Gemella spp.</i>	Manuální metody		
HK; 68letá žena s metastazujícím Ca				
HK; chlopeň; 59letý muž s IE				
HK; 24letá žena s perzist. bakteriemií				

Fenotypová vs. genotypová identifikace; možný dopad na pacienta

Dg + klinický materiál	Fenotypová identifikace	Fenotypové metody	Genotypová identifikace	Možné příčiny chybné ID
Hnis z mozkového abscesu; 2letá dívka	<i>Gemella spp.</i>	Manuální metody	<i>Streptococcus intermedius</i>	
HK; 68letá žena s metastazujícím Ca				
HK; chlopeč; 59letý muž s IE				
HK; 24letá žena s perzist. bakteriemií				

Fenotypová vs. genotypová identifikace; možný dopad na pacienta

Dg + klinický materiál	Fenotypová identifikace	Fenotypové metody	Genotypová identifikace	Možné příčiny chybné ID
Hnis z mozkového abscesu; 2letá dívka	<i>Gemella spp.</i>	Manuální metody	<i>Streptococcus intermedius</i>	Lidská chyba
HK; 68letá žena s metastazujícím Ca				
HK; chlopeč; 59letý muž s IE				
HK; 24letá žena s perzist. bakteriemií				

Fenotypová vs. genotypová identifikace; možný dopad na pacienta

Dg + klinický materiál	Fenotypová identifikace	Fenotypové metody	Genotypová identifikace	Možné příčiny chybné ID
Hnis z mozkového abscesu; 2letá dívka	<i>Gemella spp.</i>	Manuální metody	<i>Streptococcus intermedius</i>	Lidská chyba
HK; 68letá žena s metastazujícím Ca		Manuální metody + API Coryne		
HK; chlopeň; 59letý muž s IE				
HK; 24letá žena s perzist. bakteriemií				

Fenotypová vs. genotypová identifikace; možný dopad na pacienta

Dg + klinický materiál	Fenotypová identifikace	Fenotypové metody	Genotypová identifikace	Možné příčiny chybné ID
Hnis z mozkového abscesu; 2letá dívka	<i>Gemella spp.</i>	Manuální metody	<i>Streptococcus intermedius</i>	Lidská chyba
HK; 68letá žena s metastazujícím Ca	<i>Listeria grayii</i>	Manuální metody + API Coryne		
HK; chlopeň; 59letý muž s IE				
HK; 24letá žena s perzist. bakteriemií				

Fenotypová vs. genotypová identifikace; možný dopad na pacienta

Dg + klinický materiál	Fenotypová identifikace	Fenotypové metody	Genotypová identifikace	Možné příčiny chybné ID
Hnis z mozkového abscesu; 2letá dívka	<i>Gemella spp.</i>	Manuální metody	<i>Streptococcus intermedius</i>	Lidská chyba
HK; 68letá žena s metastazujícím Ca	<i>Listeria grayii</i>	Manuální metody + API Coryne	<i>Lactobacillus plantarum</i>	
HK; chlopeň; 59letý muž s IE				
HK; 24letá žena s perzist. bakteriemií				

Fenotypová vs. genotypová identifikace; možný dopad na pacienta

Dg + klinický materiál	Fenotypová identifikace	Fenotypové metody	Genotypová identifikace	Možné příčiny chybné ID
Hnis z mozkového abscesu; 2letá dívka	<i>Gemella spp.</i>	Manuální metody	<i>Streptococcus intermedius</i>	Lidská chyba
HK; 68letá žena s metastazujícím Ca	<i>Listeria grayii</i>	Manuální metody + API Coryne	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Pseudokatalázová reakce ->špatný komerční kit
HK; chlopeň; 59letý muž s IE				
HK; 24letá žena s perzist. bakteriemií				

Fenotypová vs. genotypová identifikace; možný dopad na pacienta

- První 2 případy chybné ID nemají dopad na management léčby pacienta

Fenotypová vs. genotypová identifikace; možný dopad na pacienta

Dg + klinický materiál	Fenotypová identifikace	Fenotypové metody	Genotypová identifikace	Možné příčiny chybné ID
Hnis z mozkového abscesu; 2letá dívka	<i>Gemella spp.</i>	Manuální metody	<i>Streptococcus intermedius</i>	Lidská chyba
HK; 68letá žena s metastazujícím Ca	<i>Listeria grayii</i>	Manuální metody + API Coryne	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Pseudokatalázová reakce ->špatný komerční kit
HK; chlopeň; 59letý muž s IE		Manuální metody + API 20NE		
HK; 24letá žena s perzist. bakteriemií				

Fenotypová vs. genotypová identifikace; možný dopad na pacienta

- Konvenční fenotypizační metody
- 16S rRNA sekvenace

Fenotypová vs. genotypová identifikace; možný dopad na pacienta

Dg + klinický materiál	Fenotypová identifikace	Fenotypové metody	Genotypová identifikace	Možné příčiny chybné ID
Hnis z mozkového abscesu; 2letá dívka	<i>Gemella spp.</i>	Manuální metody	<i>Streptococcus intermedius</i>	Lidská chyba
HK; 68letá žena s metastazujícím Ca	<i>Listeria grayii</i>	Manuální metody + API Coryne	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Pseudokatalázová reakce ->špatný komerční kit
HK; chlopeň; 59letý muž s IE	<i>Pasteurella haemolytica</i> (z HK; tkáň neg.)	Manuální metody + API 20NE		
HK; 24letá žena s perzist. bakteriemií				

Fenotypová vs. genotypová identifikace; možný dopad na pacienta

Dg + klinický materiál	Fenotypová identifikace	Fenotypové metody	Genotypová identifikace	Možné příčiny chybné ID
Hnis z mozkového abscesu; 2letá dívka	<i>Gemella spp.</i>	Manuální metody	<i>Streptococcus intermedius</i>	Lidská chyba
HK; 68letá žena s metastazujícím Ca	<i>Listeria grayii</i>	Manuální metody + API Coryne	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Pseudokatalázová reakce -> špatný komerční kit
HK; chlopeň; 59letý muž s IE	<i>Pasteurella haemolytica</i> (z HK; tkáň neg.)	Manuální metody + API 20NE	<i>Agregatibacter (Haemophilus) aphrophilus</i> z obou mater.	
HK; 24letá žena s perzist. bakteriemií				

Fenotypová vs. genotypová identifikace; možný dopad na pacienta

Dg + klinický materiál	Fenotypová identifikace	Fenotypové metody	Genotypová identifikace	Možné příčiny chybné ID
Hnis z mozkového abscesu; 2letá dívka	<i>Gemella spp.</i>	Manuální metody	<i>Streptococcus intermedius</i>	Lidská chyba
HK; 68letá žena s metastazujícím Ca	<i>Listeria grayii</i>	Manuální metody + API Coryne	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Pseudokatalázová reakce ->špatný komerční kit
HK; chlopeň; 59letý muž s IE	<i>Pasteurella haemolytica</i> (z HK; tkáň neg.)	Manuální metody + API 20NE	<i>Agregatibacter (Haemophilus) aphrophilus</i> z obou mater.	Nesprávná char. kmene jako Glc neferm. ->špatný výběr ID soupravy
HK; 24letá žena s perzist. bakteriemií				

Fenotypová vs. genotypová identifikace; možný dopad na pacienta

- 3. případ může vést k chybné dg. IE -
>nedostatečná délka léčby...

Fenotypová vs. genotypová identifikace; možný dopad na pacienta

Dg + klinický materiál	Fenotypová identifikace	Fenotypové metody	Genotypová identifikace	Možné příčiny chybné ID
Hnis z mozkového abscesu; 2letá dívka	<i>Gemella spp.</i>	Manuální metody	<i>Streptococcus intermedius</i>	Lidská chyba
HK; 68letá žena s metastazujícím Ca	<i>Listeria grayii</i>	Manuální metody + API Coryne	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Pseudokatalázová reakce ->špatný komerční kit
HK; chlopeň; 59letý muž s IE	<i>Pasteurella haemolytica</i> (z HK; tkáň neg.)	Manuální metody + API 20NE	<i>Agregatibacter (Haemophilus) aphrophilus</i> z obou mater.	Nesprávná char. kmene jako Glc neferm. ->špatný výběr ID soupravy
HK; 24letá žena s perzist. bakteriemií		VITEK 1		

Fenotypová vs. genotypová identifikace; možný dopad na pacienta

Dg + klinický materiál	Fenotypová identifikace	Fenotypové metody	Genotypová identifikace	Možné příčiny chybné ID
Hnis z mozkového abscesu; 2letá dívka	<i>Gemella spp.</i>	Manuální metody	<i>Streptococcus intermedius</i>	Lidská chyba
HK; 68letá žena s metastazujícím Ca	<i>Listeria grayii</i>	Manuální metody + API Coryne	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Pseudokatalázová reakce ->špatný komerční kit
HK; chlopeň; 59letý muž s IE	<i>Pasteurella haemolytica</i> (z HK; tkáň neg.)	Manuální metody + API 20NE	<i>Agregatibacter (Haemophilus) aphrophilus</i> z obou mater.	Nesprávná char. kmene jako Glc neferm. ->špatný výběr ID soupravy
HK; 24letá žena s perzist. bakteriemií	<i>Actinobacillus ureae</i>	VITEK 1		

Fenotypová vs. genotypová identifikace; možný dopad na pacienta

Dg + klinický materiál	Fenotypová identifikace	Fenotypové metody	Genotypová identifikace	Možné příčiny chybné ID
Hnis z mozkového abscesu; 2letá dívka	<i>Gemella spp.</i>	Manuální metody	<i>Streptococcus intermedius</i>	Lidská chyba
HK; 68letá žena s metastazujícím Ca	<i>Listeria grayii</i>	Manuální metody + API Coryne	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Pseudokatalázová reakce ->špatný komerční kit
HK; chlopeň; 59letý muž s IE	<i>Pasteurella haemolytica</i> (z HK; tkáň neg.)	Manuální metody + API 20NE	<i>Agregatibacter (Haemophilus) aphrophilus</i> z obou mater.	Nesprávná char. kmene jako Glc neferm. ->špatný výběr ID soupravy
HK; 24letá žena s perzist. bakteriemií	<i>Actinobacillus ureae</i>	VITEK 1	<i>Brucella melitensis</i>	

Fenotypová vs. genotypová identifikace; možný dopad na pacienta

Dg + klinický materiál	Fenotypová identifikace	Fenotypové metody	Genotypová identifikace	Možné příčiny chybné ID
Hnis z mozkového abscesu; 2letá dívka	<i>Gemella spp.</i>	Manuální metody	<i>Streptococcus intermedius</i>	Lidská chyba
HK; 68letá žena s metastazujícím Ca	<i>Listeria grayii</i>	Manuální metody + API Coryne	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Pseudokatalázová reakce ->špatný komerční kit
HK; chlopeň; 59letý muž s IE	<i>Pasteurella haemolytica</i> (z HK; tkáň neg.)	Manuální metody + API 20NE	<i>Agregatibacter (Haemophilus) aphrophilus</i> z obou mater.	Nesprávná char. kmene jako Glc neferm. ->špatný výběr ID soupravy
HK; 24letá žena s perzist. bakteriemií	<i>Actinobacillus ureae</i>	VITEK 1	<i>Brucella melitensis</i>	Nevhodné spoléhání se autom. ID systém

Fenotypová vs. genotypová identifikace; možný dopad na pacienta

- 4. případ – chybná ID *B. melitensis* ->chybná volba ATB -> perzistence infekce; riziko infekce laboratorních pracovníků

Fenotypová vs. genotypová identifikace; možný dopad na pacienta

- Chyby ve fenotypové ID jsou multifaktoriální; genotypová ID by měla být zvažována v případech jasně probíhající infekce, kdy výsledky fenotypové ID jsou nejednoznačné, nebo velmi raritní

Interpretace kultivačních nálezů

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

Kazuistika

- 4letý chlapec, atopik; bez známek respirační infekce
- 13. 2. 2008
- Návštěva dermatologické ambulance pro kontrolu atopického ekzému
- Proveden výtěr z nosu????

Kazuistika

- Nálež: *Streptococcus pyogenes*
- Citlivost na ATB: (penicilin+, oxacilin+, tetracyklin+, klaritromycin+, Augmentin+, cefuroxim+)

Kazuistika

- Nález: *Streptococcus pyogenes*
- Citlivost na ATB: (penicilin+, oxacilin+, tetracyklin+, klaritromycin+, Augmentin+, cefuroxim+)
- Závěr: pacient odeslán k ORL specialistovi - nasazen Augmentin, 3 x denně 375 mg

Kazuistika

- 4. 3. 2008
- Návštěva ORL specialisty – kontrolní vyšetření
- Vyšetření: výtěr z krku, výtěr z nosu

Kazuistika

- Nález:
 - Výtěr z krku – fyziologická flora
 - Výtěr z nosu – *Haemophilus* spp. (ampicilin+, Augmentin+, klaritromycin+, doxycyklin+, neomycin+); *Streptococcus pneumoniae* (ampicilin+, Augmentin+, klaritromycin+, doxycyklin+, neomycin-); *Moraxella catarrhalis* (ampicilin-, Augmentin+, klaritromycin+, doxycyklin+, neomycin+)

Kazuistika

- Nález:
 - Výtěr z krku – fyziologická flora
 - Výtěr z nosu – *Haemophilus* spp. (ampicilin+, Augmentin+, klaritromycin+, doxycyklin+, neomycin+); *Streptococcus pneumoniae* (ampicilin+, Augmentin+, klaritromycin+, doxycyklin+, neomycin-); *Moraxella catarrhalis* (ampicilin-, Augmentin+, klaritromycin+, doxycyklin+, neomycin+)
- Závěr: nasazen Sumetrolim

Děkuji za pozornost.