

			Společnost pro lékařskou mikrobiologii ČLS JEP		NSVP_8
Název: Základní mikrobiologické vyšetření likvoru metodou mikroskopickou, metodou koaglutinace bakteriálních antigenů v likvoru a metodou kultivační					
	Verze: 1		K připomínkám od: 1.10.2014		

NÁRODNÍ STANDARDNÍ VYŠETŘOVACÍ POSTUP

NSVP_8

-

ZÁKLADNÍ MIKROBIOLOGICKÉ VYŠETŘENÍ LIKVORU METODOU MIKROSKOPICKOU, METODOU KOAGLUTINACE BAKTERIÁLNÍCH ANTIGENŮ V LIKVORU A METODOU KULTIVAČNÍ

Společnost pro lékařskou mikrobiologii ČLS JEP

Verze: 1 Výtisk č.: 1	Zpracoval: MUDr. Josef Scharfen, CSc.	Kontroloval:	Schválil:	Str. 1/16 Změna str.: -
--------------------------	--	--------------	-----------	----------------------------

			Společnost pro lékařskou mikrobiologii ČLS JEP		NSVP_8
Název: Základní mikrobiologické vyšetření likvoru metodou mikroskopickou, metodou koaglutinace bakteriálních antigenů v likvoru a metodou kulturační					
	Verze: 1		K připomínkám od: 1.10.2014		

Vypracoval	Kontroloval	Schválil
MUDr. Josef Scharfen, CSc.		

Rozdělovník

Výtisk č.	Umístění	Odpovědná osoba	Podpis
1	Elektronická forma – WEB SLM ČLS JEP	Eva Mrázková	
2			

Revize

Číslo revize	Datum revize	Odpovědná osoba	Podpis
1			
2			
3			
4			
5			

Schvalovací proces

Číslo revize	Datum revize	Postup	Odpovědná osoba	Připomínky
1	7.10.2014	Seminář SLM	Bergerová, T, Scharfen, J.	scharfen@seznam.cz
2	10.10.2014	Web SLM ČLS JEP	Scharfen, J.	
3	30.1.2015	Platné od		
4				
5				

Verze: 1 Výtisk č.: 1	Zpracoval: MUDr. Josef Scharfen, CSc.	Kontroloval:	Schválil:	Str. 2/16 Změna str.: -
--------------------------	--	--------------	-----------	----------------------------

		Společnost pro lékařskou mikrobiologii ČLS JEP		NSVP_8
Název: Základní mikrobiologické vyšetření likvoru metodou mikroskopickou, metodou koaglutinace bakteriálních antigenů v likvoru a metodou kultivační				
	Verze: 1		K připomínkám od: 1.10.2014	

Obsah

Úvod

Technické informace/omezení

1 Bezpečnost práce

- 1.1 Odběr vzorku
- 1.2 Transport a skladování vzorku
- 1.3 Zpracování vzorku

2 Odběr vzorku

- 2.1 Optimální čas pro odběr vzorku
- 2.2 Správný typ vzorku a metoda odběru
- 2.3 Požadované množství a vhodný počet vzorků

3 Doprava a skladování vzorku

- 3.1 Čas mezi odběrem a zpracováním vzorku
- 3.2 Opatření k zachování kvality vzorku

4 Zpracování vzorku

- 4.1 Inkubace lahvíček
- 4.2 Vzhled
- 4.3 Mikroskopie
- 4.4 Kultivační vyšetření
- 4.5 Identifikace
- 4.6 Vyšetření citlivosti

5 Oznamování výsledků

- 5.1 Mikroskopie
- 5.2 Kultivace
- 5.3 Vyšetření citlivosti, interpretace nálezu, doporučení léčby

6 Hlášení

7 Materiální, technické a personální zabezpečení

8. Systém kontroly kvality

9. Validace a verifikace

10. Vznikající záznamy a dokumenty

11. Literatura

12. Definice, terminologie a zkratky

13. Přílohy

Cíl dokumentu

Tento dokument popisuje vyšetření mozkomíšního moku pro záchyt a průkaz původce meningitidy.

Úvod

Meningitis

Meningitida je definována jako zánět mozkových plén (meningů). Tento proces může být akutní nebo chronický, infekční nebo neinfekční. Příčinou meningitidy jsou mnohá infekční agens (viry, bakterie, houby, paraziti).

Akutní bakteriální meningitida.

Verze: 1 Výtisk č.: 1	Zpracoval: MUDr. Josef Scharfen, CSc.	Kontroloval:	Schválil:	Str. 3/16 Změna str.: -
--------------------------	--	--------------	-----------	----------------------------

		Společnost pro lékařskou mikrobiologii ČLS JEP		NSVP_8
Název: Základní mikrobiologické vyšetření likvoru metodou mikroskopickou, metodou koaglutinace bakteriálních antigenů v likvoru a metodou kultivační				
	Verze: 1		K připomínkám od: 1.10.2014	

Akutní bakteriální meningitida je život ohrožující naléhavý stav. Příznaky a projevy meningitidy se mohou vyvíjet během několika dnů nebo mají rychlý nástup a fulminantní (superakutní, bleskový) průběh během několika hodin. Klinický obraz může být překryt doprovodnou septikémií jako např. u meningokokové infekce. Mortalita neléčené meningitidy je vysoká. U takového pacienta je kategorickým požadavkem co nejrychlejší zpracování vzorku v zájmu optimalizace klinické léčby. Likvor je obvykle infiltrován neutrofilními leukocyty, má zvýšený obsah proteinů a sníženou koncentraci glukózy.

Predispozicí pro rozvoj meningitidy u příslušných pacientů mohou být **abnormální komunikace mezi subarachnoidálním prostorem a normálně kolonizovanými sliznicemi** (nosu a paranazálních dutin po fraktuře spodiny lebni) vzniklé na základě chirurgického výkonu nebo traumaticky, **přítomnost likvorových shuntů, kochleárních implantátů, meningomyokély a dalších vrozených malformací, infekce přilehlých prostorů** (dutin středního ucha nebo paranazálních dutin) a **nádorů v těsné blízkosti CNS, případně další příčiny** (*per continuitatem*). Stejně tak může dojít k přímému šíření infekce ze vzdáleného místa **krevním řečištěm** do CNS. Pacienti s imunodeficiencí (jako např. syndromy s deficitem komplementu nebo hypogamaglobulinémie) nebo pacienti s imunosupresivní terapií jsou ve zvýšeném riziku vzniku meningitidy.

Virová ("aseptická") meningitis

Virová meningitida je relativně častá. Má obvykle benigní průběh a její komplikace jsou vzácné. Průběh je obvykle subakutní, rozvíjí se během dvou nebo tří dnů. Mikroskopicky převládají lymfocyty, ale v časných fázích infekce mohou být přítomny jak neutrofilie tak i lymfocyty, někdy můžeme vidět i převahu neutrofilů. Koncentrace glukózy v likvoru je obvykle normální a koncentrace proteinů je normální nebo lehce zvýšená. Podobně mohou toto onemocnění vyvolat herpesviry obvykle v kombinaci s primární infekcí (herpes genitalis) nebo rekurentním onemocněním (např. herpes zoster ophthalmicus). U některých pacientů se opakovaně objevují ataky lymfocytární meningitidy (Mollaretova meningitida) v důsledku reaktivace infekce HSV1. Aseptická meningitida komplikuje 10 – 30 % onemocnění příušnicemi a virus příušnic je jednou z nejčastějších příčin meningitidy u neimunizované populace. Je důležité odlišit tyto relativně benigní syndromy a zánět meningů, který může doprovázet virovou meningoencefalitidu. Nejčastější příčinou tohoto onemocnění je HSV. Encefalitidu je nutno rychle a důrazně léčit antivirotiky.

Hlavní příčinou syndromů meningoencefalitidy importovaných do Evropy jsou virové infekce přenášené hmyzími vektory (Japonská B encefalitida, St. Louis encefalitida, West Nile virus). Mnozí původci aseptické meningitidy vyvolávají příznaky lymfocytární pleocytózy v likvoru. Rozhodující roli v diferenciální diagnostice hraje anamnéza. Mnozí původci virové meningitidy, např. enteroviry, mohou být prokazováni pomocí PCR.

Chronická meningitis

Za chronickou meningitidu se považuje, když známky a příznaky meningeálního zánětu (včetně abnormalit v likvoru) přetrvávají déle než jeden měsíc. Hlavní příčinou takového onemocnění je tuberkulózní meningitida. V prokázaných případech může být likvor infiltrován lymfocyty. **Tuberkulózní meningitida** může mít nenápadné a proměnlivé projevy. Je sice v našich podmínkách vzácná, ale musí se o ní uvažovat u pacientů z oblastí s vysokou prevalencí a rizikovými skupinami obyvatel. Vyšetření na přítomnost acidorezistentních bakterií nebo přítomnost mykobakteriálního genomu se provádí pouze v případech specifické indikace. Barvení podle Ziehl-Neelsena doplněné molekulárně mikrobiologickou metodou, jako např. PCR umožňuje rychlý průkaz acidorezistentních bakterií. Zlatým standardem je kultivační vyšetření.

Verze: 1 Výtisk č.: 1	Zpracoval: MUDr. Josef Scharfen, CSc.	Kontroloval:	Schválil:	Str. 4/16 Změna str.: -
--------------------------	--	--------------	-----------	----------------------------

		Společnost pro lékařskou mikrobiologii ČLS JEP		NSVP_8
Název: Základní mikrobiologické vyšetření likvoru metodou mikroskopickou, metodou koaglutinace bakteriálních antigenů v likvoru a metodou kulturační				
	Verze: 1		K připomínce od: 1.10.2014	

Sarkoidóza je multiorgánové onemocnění s neznámou příčinou. Meningitida u sarkoidózy je velmi vzácná, vyvolává zvýšení proteinu v likvoru, leukocytární infiltraci a léze na meningách zjistitelné pomocí NMR.

Meningitida kancerogenního původu vzniká metastaticky z primárního ložiska nádoru na meninge. Diagnóza obvykle vychází z přítomnosti obrny hlavových nervů se symptomy jako je hluchota, z použití NMR a z cytologického průkazu nádorových buněk v likvoru. Je také důležité rozeznávat mezi pravou infekcí a malignitou, protože se tyto procesy mohou vyskytnout současně. **Leukemická meningitida** je také velmi vzácná a vystavuje pacienty riziku infekce během imunosupresivní léčby.

U imunodeficitních pacientů jsou nejčastěji izolovány z likvoru *Listeria monocytogenes*, *Cryptococcus neoformans* a *Toxoplasma gondii*, které mohou být diagnostikovány z biopsátu mozku nebo sérologicky.

Původci meningitidy

Bakteriální izoláty mohou být charakteristické (ale ne výlučně) pro věk nebo predispozici pacienta. U novorozenců a kojenců do dvou měsíců věku jsou vyvolavatelé meningitidy *Streptococcus agalactiae* (GBS), *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, HSV a *Neisseria meningitidis*. U nezralých novorozenců vyžadujících intenzivní péči je riziko vzniku kandidové meningitidy na podkladě předchozí kandidémie. U dětí od 2 měsíců věku až do věku mladistvých jsou nejčastější původci *N. meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, viry (zvláště enteroviry) a *Haemophilus influenzae* typ b. Výskyt posledního agens klesá se zavedením imunizace Hib, i když počet infekcí stoupá. U dospělých jsou nejčastější: *S. pneumoniae*, *N. meningitidis*, viry a příležitostně *H. influenzae* mimo skupinu b. Pacienti starší šedesáti let mohou i bez jiných predisponujících faktorů onemocnět infekcí *Listeria monocytogenes*. Meningitidu mohou rovněž způsobit houby.

Jiné příčiny

Salmonella species, *Brucella* species and *Staphylococcus aureus* mohou infikovat meninge při bakteriémii. Pacienti se strongyloidózovým hyperinfekčním syndromem mohou onemocnět meningitidou vyvolanou *Enterobacteriaceae* v důsledku rekurentní bakteriémie nebo průniku larev do likvoru. Spirochéty jako jsou *Treponema pallidum*, *Borrelia* a *Leptospira* species mohou způsobit meningitidu jako součást generalizované infekce. Houby jako *Histoplasma capsulatum* a *Coccidioides immitis* mohou infikovat meninge při diseminované infekci. Paraziti jako améby (*Acanthamoeba* species a *Naegleria* species) mohou příležitostně vyvolat meningitidu. *Naegleria fowleri* proniká na meninge skrze lamina cribiformis za vzniku meningoencefalitidy s vysokou smrtností u lidí, kteří se koupají v povrchových vodách. Červ *Angiostrongylus cantonensis* v jihovýchodní Asii a v Dominikánské republice může vyvolat eosinofilní meningitidu. Červ parazitující na mývalu americkém *Baylisascaris procyonis* může vzácně vyvolat nervový syndrom „larva migrans“ u kojenců a dětí v USA.

Smišené infekce

Jsou vzácné, ale mohou tvořit až 1 % případů meningitidy. Vznikají obvykle v souvislosti s traumatem, nádory nebo akutní infekcí nosních dutin a mohou se *per continuitatem* šířit na meninge. Mohou rovněž vznikat přímým prostupem bakterií u píštělí nebo provalením abscesu mozku.

Zvláštní rizikové skupiny

U imunosuprimovaní pacientů vzniká riziko rozvoje meningitid vyvolaných organismy jako *Listeria monocytogenes*, *Cryptococcus neoformans* a *Toxoplasma gondii*.

Verze: 1 Výtisk č.: 1	Zpracoval: MUDr. Josef Scharfen, CSc.	Kontroloval:	Schválil:	Str. 5/16 Změna str.: -
--------------------------	--	--------------	-----------	----------------------------

		Společnost pro lékařskou mikrobiologii ČLS JEP		NSVP_8
Název: Základní mikrobiologické vyšetření likvoru metodou mikroskopickou, metodou koagulace bakteriálních antigenů v likvoru a metodou kultivační				
	Verze: 1		K připomímkám od: 1.10.2014	

Po neurochirurgických zákrocích může dojít k infekci vyvolané *Staphylococcus aureus*, *Enterobacteriaceae* a pseudomonádami. Pacienti se zlomeninou lebky postihující oblasti středního ucha a vedlejších nosních dutin jsou náchylní k infekcím *S. pneumoniae*, *H. influenzae* a dalšími mikroorganismy kolonizujícími sliznice těchto míst. Ve vzácných případech vznikla meningitida vyvolaná *S. pneumoniae* a *Streptococcus pyogenes*. Nokardie jsou vzácnou příčinou meningitidy u imunosuprimovaných pacientů, po úrazu hlavy nebo po chirurgickém zákroku. Pacienti s intrakraniálními implantáty (likvorové shunty) jsou predisponováni k infekcím vyvolaným *S. aureus*, koaguláza negativními stafylokoky, *Corynebacterium* sp., *Propionibacterium* sp., *Candida* sp. a *Enterobacteriaceae*.

Diagnostika meningitidy

Na prvním místě je vyšetření likvoru. Ten je obvykle odebrán bederní punkcí, i když může být proveden odběr z ventrikulárních, cisternových nebo fontanelových přístupů. Bederní punkce může způsobit výhřez mozku do míšního kanálu (herniace), takže pacienti s rizikem vysokého intrakraniálního tlaku by měli nejdříve podstoupit CT vyšetření. V některých případech jsou pacienti v nestabilním stavu nebo mají poruchy krvácivosti v důsledku septického syndromu a lumbální punkce (LP) nemůže být provedena. Při kontraindikaci LP musí být proveden každý dostupný pokus k dosažení mikrobiologické diagnózy jinými způsoby. Je to samozřejmě potřebné i z epidemiologických důvodů a pro vhodné zajištění kontaktů. Terapie by měla být nasazena ihned nezávisle na výsledcích mikroskopického nebo kultivačního vyšetření. Kultivace likvoru vyžaduje nejméně 24 hod. inkubaci. Časná rozhodnutí o léčbě jsou učiněna na základě stanovení kvality a počtu buněk v likvoru po obarvení podle Grama. Pro některé původce je dostupná PCR (*Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* a *Streptococcus pneumoniae* mohou být detekovány širokospektrým bakteriálním PCR primerem.) Také jsou dostupné sondy pro aseptické meningitidy. PCR je zvláště užitečná tam, kde je kultivace negativní kvůli již nasazené antibiotické terapii, retrospektivně může pomoci sérologie tam, kde pacient přežije.

Vyšetření likvoru

Při diagnostice meningitidy z likvoru se provádí:

- vyšetření nátěru obarveného dle Grama
- přehledné vyšetření nativního preparátu při menším zvětšení
- kultivace
- stanovení koncentrace glukózy a proteinů (na OKB)
- PCR tam, kde je to vhodné (infekční klinika Hradec Králové)
- vyšetření bakteriálních antigenů pomocí koagulace

Normální hodnoty v likvoru

Leukocyty u novorozenců 0 - 30 buněk x 10⁶/l

Děti 1 - 4 roky 0 - 20 buněk x 10⁶/l

5 let-puberta 0 - 10 buněk x 10⁶/l

dospělí 0 - 5 buněk x 10⁶/l

erytrocyty novorozenci 0 - 675 buněk x 10⁶/l

dospělí 0 - 10 buněk x 10⁶/l

protein novorozenci mladší ≤ 6 dnů 0.7 g/l

protein ostatní 0.2 - 0.4g/l (< 1 % koncentrace proteinu v séru)

glukózy ≥ 60 % vzorku simultánně vyšetřené plazmy

Verze: 1 Výtisk č.: 1	Zpracoval: MUDr. Josef Scharfen, CSc.	Kontroloval:	Schválil:	Str. 6/16 Změna str.: -
--------------------------	--	--------------	-----------	----------------------------

		Společnost pro lékařskou mikrobiologii ČLS JEP		NSVP_8
Název: Základní mikrobiologické vyšetření likvoru metodou mikroskopickou, metodou koaglutinace bakteriálních antigenů v likvoru a metodou kultivační				
	Verze: 1		K připomínce od: 1.10.2014	

Tyto hodnoty představují horní a dolní limit normality. U novorozenců a malých dětí trvá podezření na bakteriální či virové infekce pokud jsou počty leukocytů blízko horní meze.

Abnormality spojené s bakteriální meningitidou

- snížená koncentrace glukózy: < 60% glukózy v krvi (poměr likvor/sérum: < 0.6)
- Zvýšená koncentrace proteinu
- Zvýšený počet bílých krvinek: $10^1 - 10^4$ převládají polymorfonukleáry
- Zvýšený nitrolební tlak.

Přítomnost erytrocytů (ERY)

Přítomnost ERY v likvoru může být důsledkem intracerebrálního nebo subarachoidálního krvácení (SAK) nebo traumatizující lumbální punkce (LP), pak je likvor kontaminován krví, vyšetření je pak obtížnější, ale pouze zřídka tyto abnormality znemožní diagnosu u skutečné bakteriální meningitidy. Při postupném vyšetřování sekvenčních vzorků 1 - 3 z jedné lumbální punkce ukazuje rovnoměrné zakrvácení všech vzorků na předchozí krvácení do subarachnoidálního prostoru, zatímco postupný pokles počtu ERY v sekvenčních vzorcích znamená spíše napíchnutí cévy při odběru likvoru lumbální punkcí.

Poměr LEU : ERY 1:500 až 1 : 1000 je obvykle považován za neprůkazný pro infekci. Likvor odebraný více jak 12 hod po intrakraniálním krvácení může vykazovat vzestup počtu LEU až k $500 \times 10^6/l$ jako výraz zánětlivé odpovědi.

Latexový aglutinační test (LAT)

Je založen na průkazu specifického polysacharidového antigenu na povrchu prokazovaných bakterií. Bylo prokázáno, že sonikace likvoru zvýší asi 600x citlivost vyšetření. Klinik by měl být informován, že ačkoli pozitivní LAT ukazuje na infekční agens, negativní výsledek není definitivní.

Testování antigenu může být užitečné:

- u imunodeficientních pacientů bez produkce LEU v likvoru
- u částečně léčených pacientů s negativním nálezem v likvoru a hemokulturách

U meningokokové meningitidy jsou spolu s vyšetřením likvoru užitečné hemokultury a výtěr z krku, diagnosu je možno retrospektivně potvrdit sérologicky. Při podezření na invazivní meningokokové onemocnění by měl být pacient léčen antibiotiky ještě před přijetím do nemocnice, likvor pak může být kultivačně negativní. Výtěr z krku a nátěr z tekutiny vytlačené z podezřelých petechií může být kultivačně a mikroskopicky pozitivní. Metodou latexaglutinace může být rovněž určen kryptokokový antigen, ale citlivější metodou je vyšetření séra. U podezřelých případů by se měla latexaglutinace provádět spolu s rutinním mikroskopickým vyšetřením.

2.princip a použití

Komplexní vyšetření likvoru s použitím mikroskopických, kultivačních a sérologických metod a s identifikací vykultivovaného etiologického agens včetně vyšetřením jeho citlivosti na antibiotika je třeba řádně interpretovat v kontextu klinického stavu pacienta.

3. typ primárního vzorku, druh odběrových nádobek

Typ vzorku: Likvor (mozkomíšní mok) primární materiál,
odběrové nádoby bez konzervačního agens (zkumavky)
bez přídavných látek
množství vzorku pro analýzu: nejméně 1 ml
stabilita vzorku

PREANALYTICKÁ FÁZE

Verze: 1 Výtisk č.: 1	Zpracoval: MUDr. Josef Scharfen, CSc.	Kontroloval:	Schválil:	Str. 7/16 Změna str.: -
--------------------------	--	--------------	-----------	----------------------------

		Společnost pro lékařskou mikrobiologii ČLS JEP		NSVP_8
Název: Základní mikrobiologické vyšetření likvoru metodou mikroskopickou, metodou koaglutinace bakteriálních antigenů v likvoru a metodou kultivační				
	Verze: 1		K připomínkám od: 1.10.2014	

Informace o odběru materiálu, technická informace/omezení

Informace o vyšetřeních poskytovaných na se nachází v [LP – Laboratorní příručka](#), informace k preanalytické fázi vyšetření jsou uvedeny v souhrnné stručné tabulce pro odběr a transport materiálu s časovými údaji o vydání výsledků ([příloha č. Laboratorní příručky](#)) – [Příručka k odběru biologického materiálu pro vyšetření prováděná na oddělení](#). U odběrů prováděných na oddělení se postupuje podle [OSOP_Odběr biologického materiálu](#), zápis do LIS se provádí podle [MP – LIS](#), případné neshody na příjmu se řeší podle LP s použitím [F_Telefonické konzultace a hlášení neshod při příjmu vzorku](#)

ANALYTICKÁ FÁZE

1 Bezpečnost práce

Bezpečnost práce při zpracování vzorku

BSL 2. pokud není podezření na infekci patogeny na úrovni BSL 3.

Odkaz na všechny postupy bezpečnosti práce dle [PR_Provozní řád](#), [MP_Manipulace s infekčním odpadem](#), [PP_Zpracování likvoru](#)

2 Odběr vzorku

2.1 Optimální čas odběru

Nejlépe před zahájením léčby antibiotiky, ta se však kvůli odběru nesmí opozdit.

2.2 správný typ vzorku a metoda odběru

Dle [LP_Laboratorní příručka](#)

2.3 vhodné množství a počet vzorků

Minimálně objem 1 ml.

Pro záchyt *Mycobacterium* sp. je vhodné odebrat nejméně 10 ml likvoru. Likvor se normálně odebírá postupně do tří nebo více samostatných zkumavek, které mají být číslovány v tom pořadí, jak jsou odebírány. Jde o jednorázové sterilní šroubovací plastické zkumavky. Běžnou praxí je zasílat první a poslední zkumavku na mikrobiologii a prostřední na stanovení proteinu v likvoru.

dle [LP_2 – Laboratorní příručka](#)

3. transport a skladování vzorku

3.1 časový interval mezi odběrem vzorku a jeho zpracováním

Dopravit a zpracovat co možná nejdříve. Viz [LP_Laboratorní příručka](#).

3.2 Speciální úvahy k zachování kvality vzorku

Vzorek je třeba vyočkovat co nejdříve po odběru, ideálně do 10 minut, maximálně do dvou hodin. Buňky se potom rozpadají a zpoždění může způsobit, že stanovený počet buněk neodpovídá klinickému stavu pacienta. Vzorek by se neměl dávat do lednice

Verze: 1 Výtisk č.: 1	Zpracoval: MUDr. Josef Scharfen, CSc.	Kontroloval:	Schválil:	Str. 8/16 Změna str.: -
--------------------------	--	--------------	-----------	----------------------------

		Společnost pro lékařskou mikrobiologii ČLS JEP		NSVP_8
Název: Základní mikrobiologické vyšetření likvoru metodou mikroskopickou, metodou koaglutinace bakteriálních antigenů v likvoru a metodou kulturační				
	Verze: 1		K připomínkám od: 1.10.2014	

před zhotovením mikroskopického preparátu a před naočkování pūd. Pokud je vzorek dále uložen v lednici, umožní to případná další vyšetření.

4. Zpracování vzorku

Podle seznamu priorit a individuální závažnosti vzorku informace na [MP_Urgentní vzorky, stanovení prioritních materiálů, ranní hlášení PP_Zpracování likvoru](#)

4.1 výběr metod

Pokud není odebráno více vzorků, oddělte na základě klinických informací, požadavků na průvodce nebo výsledků mikroskopického vyšetření, po provedení mikroskopie a kultivace vzorky pro další postupy (kultivace v hemokultivačním systému, kultivace na *Mycobacterium* sp., vyšetření na parazity, screening na kryptokokový antigen nebo na virologické vyšetření).

Poznámka: V případě nedostatečného objemu má přednost mikroskopické a kulturační vyšetření včetně kultivace v automatu. **Mezi priority nepatří aglutinace bakteriálních antigenů z likvoru.**

4.2 makroskopický vzhled vzorku

Popište zákal, pokud je v likvoru sraženina, znehodnocuje buněčný rozpočet. V krajních případech tuberkulózní meningitidy je přítomna typická sraženina v podobě pavoučí sítě. Její přítomnost by měla být zaznamenána. Zaznamenejte, zda dodaný objem vzorku je nedostatečný pro všechna požadovaná vyšetření a získejte stanovisko lékaře k prioritním vyšetřením, pokud je třeba. Popište barvu supernatantu po centrifugaci.

(Potvrzení xantochromie by mělo být provedeno spektrofotometricky k interpretaci původu ERY v likvoru provádí se na OKB.)

4.3 mikroskopie

Gramovo barvení

[PP_1_Zhotovení preparátu pro barvení, PP_Barvení preparátu dle Grama, PP_Barvení preparátu dle Ziehl-Neelsena](#)

Obarvěte vzorky podle Grama a Ziehl-Neelsena.

Centrifugujte ve sterilních, zavíčkovaných zkumavkách s konickým dnem při 1200 ot./min 5 min.

Poznámka: Pokud se požaduje rovněž vyšetření na *Mycobacterium* species, prodlužuje se doba centrifugace na 15-20 min při 3000 ot./min a provede se rutinní mikroskopie a kultivace ze stejného objemu vzorku jako pro běžnou kultivaci.

Pokud je likvoru dostatek, přenese se 0.5 ml supernatantu sterilní pipetou do jiné sterilní řádně popsané iniciály pacienta nádoby pro případné další vyšetření (protein, virologie)

Zbylá peleta se resuspenduje ve zbytku tekutiny.

Kapka z centrifugátu se kápne sterilní pipetou na čisté podložní sklíčko, rozetře se sterilní kličkou do tenkého nátěru pro Gramovo barvení. Citlivost Gramova barvení se může zvýšit sériovým vrstvením kapek na sklíčko. Další kapka se přidává vždy po zaschnutí předchozího nánosu. Vrstvením preparátu se zvětšuje objem prohlédnutého vzorku. Je třeba dbát na to, aby se vzorek během barvení nesmyl (provádí se fixace metanolem).

Sražené vzorky likvoru

Verze: 1 Výtisk č.: 1	Zpracoval: MUDr. Josef Scharfen, CSc.	Kontroloval:	Schválil:	Str. 9/16 Změna str.: -
--------------------------	--	--------------	-----------	----------------------------

			Společnost pro lékařskou mikrobiologii ČLS JEP		NSVP_8
Název: Základní mikrobiologické vyšetření likvoru metodou mikroskopickou, metodou koaglutinace bakteriálních antigenů v likvoru a metodou kultivační					
		Verze: 1			K připomínkám od: 1.10.2014

Pokud je to možné, pokuste se sraženinu rozrušit sterilní pipetou a část vzorku použijte pro vytvoření nátěru pro Gramovo barvení.

4.3.2 Doplnková vyšetření

Vyšetření na *M. tuberculosis*

Mikroskopické vyšetření preparátu v barvení podle Ziehl-Neelsena je součástí rutinního vyšetření likvoru. Kultivační vyšetření se provádí pouze na konzultovanou žádost. V takovém případě je vhodné použít vrstvicí techniku pro přípravu nátěru (viz výše) pro mikroskopii k průkazu *Mycobacterium* species. Jestliže je na dně zkumavky pavučinovitá sraženina, měla by být částí vzorku pro mikroskopické a kultivační vyšetření.

[PP_Barvení preparátu dle Ziehl - Neelsena](#)

Vyšetření na *C. neoformans* ([PP_Barvení preparátu dle Burriho](#))

Smíchejte kapku centrifugátu s kapkou 50 % roztoku tuše nebo nigrosinu na čistém mikroskopickém sklíčku a přikryjte krycím sklíčkem. Hledejte okrouhlé nebo oválné kvasinky s průhledným haló kolem buňky (pouzdro). Přítomnost znamená předběžný průkaz *C. neoformans*.

Vyšetření na améby

Prohlédněte nativní preparáty z centrifugovaného a necentrifugovaného likvoru. Kápněte vzorek na čisté podložní sklíčko, přikryjte krycím sklíčkem a hledejte amébové trofozoity. Provádí se pouze při klinické indikaci. ([PP_Nativní preparát](#)).

4.4 kultivace a odečítání

4.4.1 příprava vzorku

Standardní

Pracujte s již zcentrifugovaným materiálem.

4.4.2 zpracování vzorku

[dle PP_Zpracování likvoru.](#)

Standardní

Pro všechny likvory

- Sterilní pipetou inokulujte každý agar centrifugátem
- inokulum před rozočkování nechte zaschnout, aby se minimalizoval antibiotický efekt na čarách
- rozizolujte sterilní kličkou dle [PP_Izolace a rozočkování](#).

Sražené vzorky

Naneste části sraženin na každou plotnu. Jestliže vzorky obsahují pouze malé sraženiny, měly by být rozhodně primárně inokulovány na čokoládovém agaru. Nesražené části likvoru by měly být kultivovány běžným způsobem.

Doplnkově

Pomnožení provedte v půdě RBH.

4.4.3 latexaglutinace antigenů bakteriálních původců meningitid

[PP_Pastorex - meningitis - aglutinace](#)

Verze: 1 Výtisk č.: 1	Zpracoval: MUDr. Josef Scharfen, CSc.	Kontroloval:	Schválil:	Str. 10/16 Změna str.: -
--------------------------	--	--------------	-----------	-----------------------------

			Společnost pro lékařskou mikrobiologii ČLS JEP		NSVP_8
Název: Základní mikrobiologické vyšetření likvoru metodou mikroskopickou, metodou koaglutinace bakteriálních antigenů v likvoru a metodou kultivační					
		Verze: 1			K připomínkám od: 1.10.2014

4. Kultivační media, diagnózy, etiologická agens přehled v tabulce (příloha)

Příloha č. 1

4.5 Identifikace (ID)

4.5.1 minimální úroveň ID v laboratoři

Dle [BSOPID_Identifikace lékařsky důležitých mikroorganismů pomocí orientačních a komerčních fenotypových metod a metodou hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF](#)

Anaeroby se určují do druhu, gramnegativní anaeroby, anaerobní *Actinomyces* do druhu, β -hemolytické streptokoky do skupin podle Lancefieldové, všechny ostatní organismy do druhu.

Poznámka: Kterýkoliv mikroorganismus považovaný za kontaminantu nemusí být identifikován do druhu, rozhodne odečítající pracovník.

Další určování se provádí podle klinické nebo epidemiologické indikace, rozhodne odečítající pracovník.

4.5.2 hlášení referenčním laboratořím

Podle manuálů, které tyto laboratoře vydávají.

Rovněž organismy s neočekávanou rezistencí a nebo s jinými problémy se zasílají do referenčních laboratořím dle [MP_Evidence vzorků odeslaných do smluvních a spolupracujících laboratořím](#), [MP_Zasílání materiálu](#), [K_Kmeny zasláné do NRL](#).

Sérotypizace beta hemolytických streptokoků.

Sérotypizace *S. pneumoniae*

Sérotypizace *H. influenzae*

Sérotypizace *Listeria species*

N. meningitidis se zasílá k typizaci a vyšetření citlivosti do NRL pro meningokoky v SZÚ Praha.

Mycobacterium species

Izoláty v souvislosti s epidemií, izoláty s neobvyklou nebo neočekávanou rezistencí a všude tam, kde je laboratorní nebo klinický problém nebo anomálie, který vyžaduje objasnění, by měly být zaslány do vhodné referenční laboratoře. Likvor, nesrážlivá krev a párové vzorky séra mohou být zaslány do NRL pro meningokoky pro molekulárně mikrobiologické vyšetření a sérologii, pokud je kultivace negativní a je při tom podezření na meningokokovou infekci. Vzorky na molekulárně mikrobiologické vyšetření ostatních mikroorganismů lze zasílat, pokud je klinicky indikováno, zejména všechny likvory z případů neuroparalytických onemocnění.

4.6 vyšetření citlivosti na antibiotika

Verze: 1 Výtisk č.: 1	Zpracoval: MUDr. Josef Scharfen, CSc.	Kontroloval:	Schválil:	Str. 11/16 Změna str.: -
--------------------------	--	--------------	-----------	-----------------------------

		Společnost pro lékařskou mikrobiologii ČLS JEP		NSVP_8
Název: Základní mikrobiologické vyšetření likvoru metodou mikroskopickou, metodou koaglutinace bakteriálních antigenů v likvoru a metodou kultivační				
	Verze: 1		K připomínkám od: 1.10.2014	

Dle [BSOPTP Mikrobiologické vyšetření citlivosti mikroorganismů na antibiotika semikvantitativní diskovou difusní metodou, kvantitativní diluční metodou v mikrodestičkách a kvantitativní metodou E-test](#).

POSTANALYTICKÁ FÁZE VYŠETŘENÍ

5 sdělování výsledků, předpokládaná doba odezvy laboratoře

5.1 makroskopický vzhled

Sděluje se přítomnost krve, zakalení.

5.2 mikroskopické vyšetření

vždy Gramovo barvení

Sděluje zjištěné organismy a přítomnost nebo nepřítomnost buněk v hnisu (hnisavého infiltrátu)

Barvení tuší nebo nigrosinem ([PP Barvení preparátu dle Burriho](#)), jen při klinickém podezření a konzultaci.

Sděluje přítomnost opouzdřených kvasinek.

Mikroskopie při obarvení dle Ziehl Neelsena (vždy) sděluje přítomnost acidorezistentních organismů a parazitů

5.2.1 časové parametry sdělování mikroskopických výsledků

Urgentní mikroskopie telefonicky nebo elektronicky ihned po zjištění.

Psaná zpráva dle [LP Laboratorní příručka](#).

5.3 Kultivace

Sděluje záchyt a identifikaci izolátu

Sděluje nepřítomnost růstu.

Sděluje výsledky doplňkových vyšetření.

Časové parametry sdělování výsledků kultivace

Klinicky urgentní výsledky telefonicky nebo elektronicky ihned po zjištění.

Předběžný nebo definitivní psaný výsledek dle [LP Laboratorní příručka](#), v případě confirmace výsledku v NRL se zasílá mezivýsledek a po obdržení výsledku confirmace se vydává definitivní výsledek identifikace. Výsledky molekulárně mikrobiologického vyšetření (pokud jsou).

5.4 Výsledky citlivosti izolátů na antibiotika

Sděluje výsledky podle klinické indikace.

5.5. Autorizace a validace výsledku oprávněnou osobou, uvolňování výsledků pro tisk a expedice výsledků

[MP Kontrola a uvolňování výsledků](#)

Verze: 1 Výtisk č.: 1	Zpracoval: MUDr. Josef Scharfen, CSc.	Kontroloval:	Schválil:	Str. 12/16 Změna str.: -
--------------------------	--	--------------	-----------	-----------------------------

		Společnost pro lékařskou mikrobiologii ČLS JEP		NSVP_8
Název: Základní mikrobiologické vyšetření likvoru metodou mikroskopickou, metodou koaglutinace bakteriálních antigenů v likvoru a metodou kultivační				
	Verze: 1		K připomínkám od: 1.10.2014	

6 Hlášení výsledků Zdravotním ústavům podle zákona (místní a regionální systém hlášení CDC)

Klinicky signifikantní izoláty z likvoru (–kontakty s *N.meningitidis*) se hlásí místní pobožce Zdravotního ústavu KH kraje, nemocniční izoláty z meningitid se hlásí Komisi pro nozokomiální infekce ON Trutnov a.s..

Povinné hlášení: *Mycobacterium* species.

[K_Kniha hlášek a pravděpodobných nozokomiálních kmenů](#)

7.Materiálně technické a personální zabezpečení

7.1 Personál

Osoby oprávněné podle [F_Pracovníci oprávnění provádět SOP a PP](#)

7.2.Přístroje a pomocná zařízení

viz [Příloha č. 2, PP_Zpracování likvoru, PP_Pastorex - meningitis – aglutinace,BSOPID_Identifikace lékařsky důležitých mikroorganismů pomocí orientačních a komerčních fenotypových metod a metodou hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF, BSOPTP_Mikrobiologické vyšetření citlivosti mikroorganismů na antibiotika semikvantitativní diskovou difusní metodou, kvantitativní diluční metodou v mikrodestičkách a kvantitativní metodou E-test](#)

7.3.Chemikálie, reagentie a spotřební materiál (tabulka)

viz [Příloha č. 3, PP_Zpracování likvoru, PP_Pastorex - meningitidis – aglutinace, BSOPID_ - Identifikace lékařsky důležitých mikroorganismů pomocí orientačních a komerčních fenotypových metod a metodou hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF, BSOPTP_Mikrobiologické vyšetření citlivosti mikroorganismů na antibiotika semikvantitativní diskovou difusní metodou, kvantitativní diluční metodou v mikrodestičkách a kvantitativní metodou E-test](#)

7.4.Prostory

Příjem materiálu, Laboratoř klinická, Laboratoř identifikační

8.Systém kontroly kvality

Podle [QSOP_Interní kontrola kvality v klinické mikrobiologii](#), [MP_EHK](#).

9.Validace a verifikace

Prováděné SOP jsou validovány údaji v recenzované literatuře a Národních SOP (viz. Literatuře) a jsou verifikovány v rámci EHK v nichž se laboratoř účastní a pomocí IHK viz odkazy:

[QSOP_Interní kontrola kvality v klinické mikrobiologii](#)

Dokumenty SLM ČLS JEP platné pro NASKL a ČIA:

http://www.splm.cz/dokumenty/PSSLP_2.pdf,

http://www.splm.cz/dokumenty/PS_VALVER.pdf

10.Související dokumentace

[Vyhl.MZ ČR č.473/2008 Sb., ve znění vyhlášek č.275/2010 Sb. a č.233/2011 Sb](#)

[PK_Příručka kvality](#)

Verze: 1 Výtisk č.: 1	Zpracoval: MUDr. Josef Scharfen, CSc.	Kontroloval:	Schválil:	Str. 13/16 Změna str.: -
--------------------------	--	--------------	-----------	-----------------------------

		Společnost pro lékařskou mikrobiologii ČLS JEP		NSVP_8
Název: Základní mikrobiologické vyšetření likvoru metodou mikroskopickou, metodou koaglutinace bakteriálních antigenů v likvoru a metodou kulturační				
	Verze: 1		K připomínce od: 1.10.2014	

[LP_Laboratorní příručka](#)

[PR_Provozní řád](#)

[MP_Přijem materiálu](#)

[MP_Identifikace vzorků](#)

[MP_LIS](#)

[MP_Oprava chybně vyplněné žádanky](#)

[MP_Uchování vzorku](#)

[MP_Hlášení infekčních nemocí, hlášení nosokomiálních nákaz](#)

[MP_Kontrola a uvolňování výsledků](#)

[MP_Evidence vzorků odeslaných do smluvních a spolupracujících laboratoří](#)

[MP_Manipulace s infekčním odpadem](#)

[MP_Expedice výsledků](#)

[MP_Zasílání materiálu](#)

[MP_Urgentní vzorky, stanovení prioritních materiálů, ranní hlášení](#)

[BSOPID_Obecné zásady identifikace medicínsky významných bakterií](#)

[SOPTP_Vyšetřování citlivosti na antibiotika semikvantitativním difusním testem, kvantitativní diluční mikrometodou a metodou E-test](#)

[PP_Zhotovení preparátu pro barvení](#)

[PP_Barvení preparátu dle Grama](#)

[PP_Barvení preparátu dle Ziehl - Neelsena](#)

[PP_Izolace a rozočkování](#)

[PP_Zpracování likvoru](#)

[PP_Pastorex – meningitidis - aglutinace](#)

11. Literatura

- INVESTIGATION OF CEREBROSPINAL FLUID BSOP 27** 6/ 23/04/2008 Health Protection Agency, UK. Issue no: 5 Issue date: 23.04.08 Issued by: Standards Unit, Evaluations and Standards Unit Page 1 of 25 Reference no: BSOP 27i5
- Quality Assurance in the Diagnostic Virology and Serology Laboratory Quality Guidance | Q 2 |** Issue no: 6.1 | Issue date: 11.11.11 | Page: 1-25 UK Standards for Microbiology Investigations | Issued by the Standards Unit, Health Protection Agency
- Mallátová N, Hamal P, Kocmanová I., Buchta V., Mencl K. Testování citlivosti mikromycet k antimykotikům *in vitro* u imunosuprimovaných pacientů – doporučení odborníků s podporou CELL a SLM ČSL JEP. Postgraduální medicína 2011, 13, příloha č. 5 www.postgradmed.cz**
- SUSCEPTIBILITY TESTING.** Issue no: 2 Issue date: 30.10.06 Issued by: Standards Unit, Evaluations and Standards Laboratory Page no: 2 of 38 Reference no: BSOP 45i2 www.evaluations-standards.org.uk, Email: standards@hpa.org.uk
- SCREENING FOR MENINGOCOCCI** Issue no: 1.1 Issue date: 03.05.05 Issued by: Standards Unit, Evaluations and Standards Laboratory Page 2 of 11 Reference no: BSOP 51i1.1 www.evaluations-standards.org.uk Email: standards@hpa.org.uk
- INTRODUCTION TO THE PRELIMINARY IDENTIFICATION OF MEDICALLY IMPORTANT BACTERIA.** Issue no: 1.4 Issue date: 25.02.08 Issued by: Standards Unit, Evaluations and Standards Laboratory Page no: 2 of 16 BSOP ID 1i1.4 www.evaluations-standards.org.uk Email: standards@hpa.org.uk

Verze: 1 Výtisk č.: 1	Zpracoval: MUDr. Josef Scharfen, CSc.	Kontroloval:	Schválil:	Str. 14/16 Změna str.: -
--------------------------	--	--------------	-----------	-----------------------------

		Společnost pro lékařskou mikrobiologii ČLS JEP		NSVP_8
Název: Základní mikrobiologické vyšetření likvoru metodou mikroskopickou, metodou koaglutinace bakteriálních antigenů v likvoru a metodou kulturační				
	Verze: 1		K připomínce od: 1.10.2014	

7. **IDENTIFICATION OF AEROBIC ACTINOMYCETES.** Issue no: 1 Issue date: 23.11.09 Issued by: Standards Unit, Department for Evaluations, Standards and Training Page: 1 of 15 BSOP ID 10i1 Agency www.evaluations-standards.org.uk Email: standards@hpa.org.uk
8. **Identification of Moraxella Species and Morphologically Similar Organism.** UK Standards for Microbiology Investigations: Issued by the Standards Unit, Microbiology Services Division, HPA Bacteriology -- Identification | ID 11 | Issue no: 2.1 | Issue date: 20.07.11 | Page: 1 of 16
9. **EXAMPLE REFERENCE STRAINS FOR NATIONAL STANDARD METHOD TEST PROCEDURES.** Issue no: 1 Issue date: 01.12.10 Issued by: Standards Unit, Department for Evaluations, Standards and Training Page: 1 of 10 BSOP TP 1i1 www.evaluations-standards.org.uk, Email: standards@hpa.org.uk
10. **Best practice approach on internal quality assurance,** Issued by: Standards Unit, Department for Evaluations, Standards and Training Page 1 – 14 QSOP 1 df www.evaluations-standards.org.uk, Email: standards@hpa.org.uk
11. **Clinical Microbiology Procedures Handbook,** 3rd Edition, Editor in Chief: Lynne S. Garcia, Book ISBN or Item Number: 978-1-55581-527-1,ASM Press2010
12. **Manual of Clinical Microbiology, 9th Edition Edited by Patrick R. Murray, Ellen Jo Baron, James H. Jorgensen, Marie Louise Landry, and Michael A. Pfaller Washington, DC: ASM Press, 2007**
13. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, 6th Edition, Volumes 1 and 2 , Edited by Gerald L Mandell MD MACP, John E Bennett MD MACP, and Raphael Dolin MD. Published by Elsevier Churchill Livingstone, Philadelphia, 2005. ISBN 0-443-06643-4.
14. Kucers' The Use of Antibiotics, 6th Edition. Lead Editor M. Lindsay Grayson, ASM Press 2010
15. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 2 [George M. Garrity](#) (Editor) 2005, ASM Press.
16. [The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria volume 3 Martin Dworkin](#) (Editor), [Stanley Falkow](#) (Editor), [Eugene Rosenberg](#) (Editor), [Karl-Heinz Schleifer](#) (Editor), [Erko Stackebrandt](#) (Editor) Volume 3: Archaea. Bacteria: Firmicutes, Actinomycetes,, 3rd edition, Springer 2006
17. Molecular Microbiology, Diagnostic Principles and Practice. Eds. Persing, Tenover, Versalovic, Tang, Unger, Relman, White, ASM press 2004
18. Molecular Genetics of Bacteria. 3rd ed. Snyder, Champnes. ASM press 2007
19. Manual fo Environmental Microbiology. 3rd ed. Hurst, Crawford, Garland, Lipson, Mills, Stetzenbach, ASM press 2007
20. Infectious Diseases in Critical Care Medicine. Burke A.Cunha, Marcel Dekker, 1998
21. Antibiogram. Courvalin, Lecleq, Rice. ASM press, Eska Publishing. 2010
22. Antibiotics in Laboratory Medicine. 5th ed. Victor Lorian. Lippincott, Williams and Wilkins 2005
23. Prevention and Control of Nosocomial Infections. 3rd ed. R.P.Wenzel. Lippincott, Williams and Wilkins 1997
24. Hospital Epidemiology and Infection Control. 2nd ed. CG Mayhall, Lippincott, Williams and Wilkins 1999

Verze: 1 Výtisk č.: 1	Zpracoval: MUDr. Josef Scharfen, CSc.	Kontroloval:	Schválil:	Str. 15/16 Změna str.: -
--------------------------	--	--------------	-----------	-----------------------------

			Společnost pro lékařskou mikrobiologii ČLS JEP		NSVP_8
Název: Základní mikrobiologické vyšetření likvoru metodou mikroskopickou, metodou koaglutinace bakteriálních antigenů v likvoru a metodou kultivační					
		Verze: 1		K připomínkám od: 1.10.2014	

12. Související záznamy

[K_Kniha hlášek a pravděpodobných nozokomiálních kmenů](#)
[K_Kmeny zaslané do NRL](#)
[F_Telefonická konzultace a hlášení neshod při příjmu vzorku](#)
[F_Evidence šarží – reagentie](#)
[F_ranní hlášení priorit](#)
[F_Evidence šarží - půdy](#)
[F_Evidence šarží – citlivosti](#)
[F_Ranní vyočkování materiálu](#)

13. Přílohy

Příloha č. 1 - Kultivační média, diagnózy, etiologická agens

Příloha č. 2 - Přístroje a pomocná zařízení

Příloha č. 3 - Reagentie

Příloha č. 4 - Algoritmus zpracování likvoru

Verze: 1 Výtisk č.: 1	Zpracoval: MUDr. Josef Scharfen, CSc.	Kontroloval:	Schválil:	Str. 16/16 Změna str.: -
--------------------------	--	--------------	-----------	-----------------------------