

Metodyka do badań KyberKompakt oraz KyberKompakt Pro

Badanie KyberKompakt/ KyberKompakt Pro

Badanie KyberStatus pozwala na ilościową i jakościową ocenę wybranych rodzajów bakterii znajdujące się w przewodzie pokarmowym człowieka, na podstawie badania próby kału.

Pierwszym etapem badania jest prawidłowe pobranie materiału. Kał do analizy pobierany jest z 8 różnych miejsc, po uprzednim przemieszaniu kału, w celu ujednoczenia ocenianej próby. Materiał jest stabilny 3 dni od pobrania. Należy przechowywać go w chłodnym miejscu (4 – 8 °C). Z pobranego w ten sposób kału wykonuje się szereg 10 – krotnych rozcieńczeń, a następnie posiewa się zawiesinę bakterii z kolejnych rozcieńczeń na szereg wybiórczo-różnicujących i namnażających podłoży. Dodatkowo z materiału wyodrębnia się próbkę na badanie ilościowe bakterii wskaźnikowych metodą PCR real-time

Ocenia się następujące drobnoustroje wskaźnikowe:

- Beztlenowce z rodzaju *Bacteroides* i *Bifidobacterium*
- Bakterie z rodzaju *Enterococcus* i pałeczek z gatunku *E. coli*.
- Potencjalnie patologiczną formę *E. coli* tzw. postać *biovare*
- beztlenowe laseczki z rodzaju *Clostridium*
- pałeczki kwasu mlekowego z rodzaju *Lactobacillus*, w tym produkujące nadtlenuk wodoru
- wstępne różnicowanie innych pałeczek z rodziny *Enterobacteriaceae* (*Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.*, *Citrobacter spp.*, *Proteus spp.*) oraz z rodzaju *Pseudomonas*.
- Całkowitą liczbą bakterii
- **W wersji KyberKompakt Pro** – dodatkowo bakterie odżywiające enterocyty - *Akkermansia muciniphila* oraz *Faecalibacterium prausnitzii*

Badanie przeprowadza się dla części bakterii metodą PCR real-time – całkowitej liczby bakterii, bakterii z rodzaju *Bacteroides*, *Bifidobacterium* oraz *Akkermansia muciniphila* i *Faecalibacterium prausnitzii*.

Dla pozostałych bakterii tlenowych i beztlenowych oraz wymagających zwiększonego stężenia CO₂ prowadzi się hodowlę na podłożach mikrobiologicznych.

Hodowle prowadzi się w odpowiednich warunkach – dla bakterii z rodzaju *Clostridium* – inkubacja trwa 48 godzin w 37⁰C w warunkach beztlenowych. Dla pałeczek kwasu mlekowego z rodzaju *Lactobacillus* hodowle prowadzi się w warunkach o podwyższonym stężeniu CO₂, przez 48 godzin w temperaturze 37⁰C. Bakterie z rodzaju *Enterococcus*, pałeczki z rodziny *Enterobacteriaceae*, pałeczki z rodzaju *Proteus* oraz *Pseudomonas* hoduje się w warunkach tlenowych przez 24 godziny w 37⁰C. Po określonym czasie inkubacji hodowle poddaje się diagnostyce mikrobiologicznej.

W celu ilościowej i jakościowej diagnostyki grzybów drożdżopodobnych oraz grzybów pleśniowych występujących w przewodzie pokarmowym człowieka, określoną ilość materiału (kał) umieszcza się w roztworze trypsyny, z dodatkiem antybiotyków, w celu zahamowania wzrostu bakterii. Odpowiednio przygotowaną próbkę, po rozmieszaniu na wytrząsarce, umieszcza się w komorze inkubacyjno-wytrząsającej w temperaturze 37⁰C na 15 min w celu nadtrawienia resztek pokarmowych, mogących utrudnić wzrost grzybom. Po tym czasie badaną próbkę przenosi się do zbuforowanego roztworu soli fizjologicznej w celu

przeplukania. Z roztworu próbkę nanosi się na 2 podłoża agarowe Sabouraud z chloramfenikolem i gentamycyną. Jedną płytkę z badaną próbą inkubuje się w 37⁰C przez 48 godzin, a drugą w temperaturze pokojowej przez ten sam okres czasu. Takie działanie pozwala odróżnić grzyby które są tylko pasażerami ze środowiska, a grzybami potencjalnie chorobotwórczymi. W przypadku wzrostu grzybów przeprowadza się diagnostykę mikologiczną - grzyby drożdżopodobne identyfikuje się wstępnie do gatunku przy użyciu podłoża chromogennego, a pleśniowe w oparciu o preparat bezpośredni i klucz mikologiczny.

Znaczenie kliniczne, wskazania do wykonania:

Mikroflora jelitowa jest względnie stabilna i w niewielkim stopniu ulega wpływom egzo- i endogennym. Gdy jednak czynniki szkodliwe działają na jelito przez dłuższy czas lub działanie wielu czynników sumuje się, to środowisko jelita może ulec zmianie. Pojawiają się zmiany w liczbie bakterii, w składzie bakteryjnym i zaburzenia przemiany materii drobnoustrojów.

Nieprawidłowy skład mikroflory jelitowej może być przyczyną pojawienia się przewlekłych stanów zapalnych. Dzięki badaniu **KyberKompakt oraz KyberKompakt Pro** możliwe jest ilościowe i jakościowe oznaczenie bakterii i grzybów w przewodzie pokarmowym odpowiedzialnych za sprawne funkcjonowanie układu immunologicznego.

Zaburzenia flory bakteryjnej mają negatywny wpływ na barierę mikrobiologiczną, a pośrednio na cały układ immunologiczny. W konsekwencji mogą one pośrednio lub bezpośrednio wywoływać różne choroby wynikające z defektów immunologicznych, np.:

Choroby alergiczne: ryzyko chorób alergicznych dotyczy dzieci, które w wieku niemowlęcym często otrzymywały antybiotyki, wcześniaków i noworodków urodzonych przez cesarskie cięcie, a także dzieci wychowywanych w warunkach przesadnej higieny. Przyczyną tego jest niedostateczne zasiedlenie błon śluzowych fizjologicznymi szczepami bakteryjnymi i wynikający z tego zbyt słaby efekt treningu immunologicznego układu immunologicznego śluzówek jelita. Ponadto występuje u nich zwiększona przepuszczalność błony śluzowej prowadząca do nadmiernego przenikania antygenów do wnętrza organizmu i tym samym do przeciążenia układu immunologicznego.

Nawracające infekcje: Gdy ochrona śluzówek przed bakteriami (sIgA) jest niewystarczająca lub gdy bariera mikrobiologiczna jest nieefektywna, wówczas łatwo dochodzi do kolonizacji błon śluzowych przez mikroorganizmy patogenne. Skutkiem są grzybice i przewlekle nawracające infekcje dróg oddechowych, dróg moczowych i przewodu pokarmowego.

Czynnościowe choroby jelit: U pacjentów z zespołem jelita drażliwego występują zaburzenia ukrwienia i motoryki jelita, pozostające w związku z niedoborem krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych będących produktem przemiany materii pałeczek kwasu mlekowego. Tak więc występowanie zaburzeń mikroflory jelitowej w tym schorzeniu jest wielce prawdopodobne.

Przewlekłe choroby zapalne jelit: Obok innych czynników patogennych, w przewlekłych chorobach zapalnych jelit rozważa się również rolę zakażeń bakteryjnych i wirusowych. Nie można wykluczyć, że jedną z przyczyn mogą być składniki fizjologicznej flory jelitowej. Ponadto istnieją dane, z których wynika, iż pacjenci z chorobami zapalnymi jelit częściej w dzieciństwie przechodzili zakażenia dróg oddechowych oraz zapalenia żołądka i jelit i z tych powodów przyjmowali często antybiotyki.

Dolegliwości spowodowane przez nadmierne rozmnażanie się drożdżaków z rodzaju Candida w jelicie, nabierają w medycynie coraz większego znaczenia.

Ich rozwojowi sprzyja nieprawidłowe żywienie, nadmierny stres, antybiotyki, krótko mówiąc: wpływy środowiska osłabiające odporność organizmu. Objawy infekcji przewodu pokarmowego wywoływane przez drożdże Candida mogą przybierać różne formy.

- zmieniająca się struktura kału,
- wodniste biegunki na przemian z zaparciami,
- wzdęcia, nadmierne tworzenie się gazów,
- uczucie pełności
- swędzenie okołoodbytnicze
- wyprysk okołoodbytniczy.

Metodyka pobrania materiału na badanie KyberKompakt/ KyberKompakt Pro:

1. Zakupić jałowy pojemnik o objętości ok. 150 ml (np. pojemnik na mocz)
2. Kał oddać na czysty podkład (papier toaletowy, ręcznik kuchenny) lub jeśli toaleta posiada „półkę” kał można pobrać bezpośrednio z toalety.
3. Wypełnić $\frac{3}{4}$ pojemnika kałem, najlepiej z ośmiu różnych miejsc i szczelnie zamknąć pokrywką. Pojemnik opisać w następujący sposób:
 - imię i nazwisko
 - data urodzenia
 - data i godzina pobrania materiału
4. Materiał jak najszybciej przekazać do laboratorium. Materiał jest stabilny przez 3 dni od pobrania (maksymalny czas umożliwiający analizę). Po pobraniu przechowywać w lodówce (2-8°C), nie dopuszczać do zamrożenia oraz do przegrzania materiału >25°C. Transportować w warunkach chłodniczych, nie zamrażać.
5. Do materiału należy dołączyć wypełnione skierowanie na badanie.

Przeciwwskazania do wykonania badania:

Przeciwwskazaniem do wykonania badania **KyberKompakt/ KyberKompakt Pro** jest antybiotykoterapia oraz przyjmowanie leków przeciwgrzybiczych przyjmowanych doustnie (nie dotyczy np. grzybicy paznokci i stosowanych miejscowo lakierów). Po zakończonej antybiotykoterapii należy zachować odstęp czasowy w wymiarze około 2 tygodni. Kontrolę po zakończonej terapii przeciwgrzybiczej zaleca się wykonać po 4 tygodniach.

**Najczęściej zgłaszane problemy z materiałem do badanie KyberKompakt/
KyberKompakt Pro (kał):**

NIEPRAWIDŁOWE DZIAŁANIE		PRAWIDŁOWE POSTĘPOWANIE
1.	Za mało materiału.	Prawidłowo pobrany materiał to ¼ objętości pojemnika na mocz wypełnionego kałem.
2.	Materiał za stary na badanie (> 3 dni).	Dopuszczalna jest 3-dniowa (72h) próbka (od momentu pobrania materiału przez pacjenta).
3.	Niezgodny opis daty pobrania materiału na pojemniku, z datą na skierowaniu.	Na skierowaniu powinna znajdować się data pobrania materiału a nie przyjęcia zlecenia.
4.	Materiał zamrożono.	Na badanie należy dostarczyć świeżą, nigdy nie mrożoną próbkę kału (2-8st.C). Badanie polega m. in. na tradycyjnym posiewie mikrobiologicznym.
5.	Materiał ponownie dostarczany (wcześniej był źle pobrany) wysyłany jest ze starym zleceniem, bez aktualnej daty pobrania.	Każdorazowe wysłanie materiału musi być opatrzone aktualną datą pobrania na skierowaniu/zleceniu.