

Mikrobiologie a imunologie



Ondřej Zahradníček

Abych se představil

- MUDr. Ondřej Zahradníček
- povolání: **klinický mikrobiolog**, asistent na LF MU; učíme u nás bakalářské obory, mediky, zubaře i studenty přírodovědecké fakulty
- budu vám přednášet, ale nebudu vás zkoušet, to budou kolegové a kolegyně z našeho ústavu
- **zájemci se u mne mohou přihlásit a mohou se přijít podívat přímo k nám**

Jak se učit na zkoušku

- Ve dvanácti hodinách nelze probrat totéž, na co mají studenti denní formy hodin třicet. Přesto **probereme všechna témata**, jen je více či méně zkrátíme
- Více zkrátíme ta témata, která jsou spíše „na naučení“, méně ta, která jsou spíše „na pochopení“.
- Na IS MU ve Studijních materiálech najdete **nezkrácené verze prezentací**
- Najdete tam také **skripta ke stažení**. To vše bude dostupné v průběhu semestru.

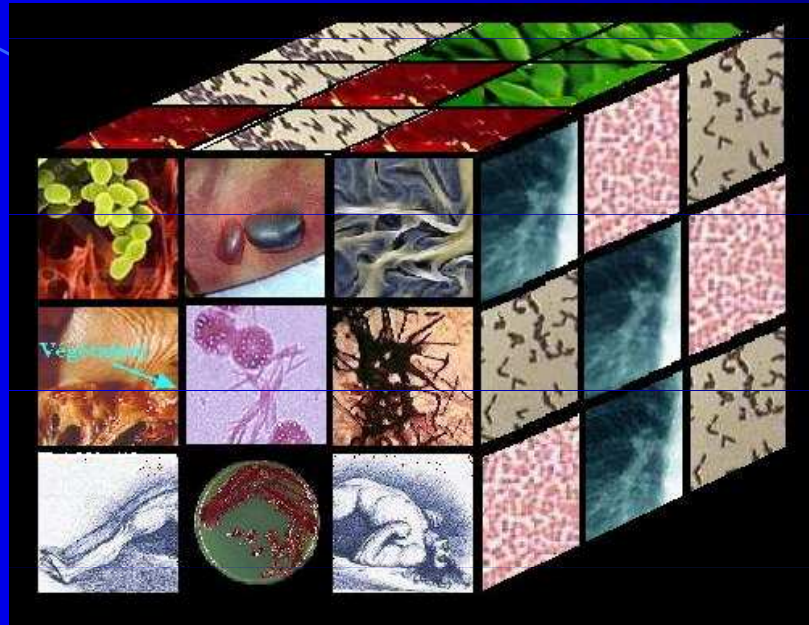
Přehled probíraných témat

- Sezení 1 – 22. února 2008
 - 1 základní pojmy, patogenita a virulence
 - 2 přehled vyšetřovacích metod
- Sezení 2 – 7. března 2008
 - 3 dekontaminační metody
 - 5 základy imunologie
- Sezení 3 – 18. dubna 2008
 - 6 respirační infekce
 - 7 trávicí infekce
 - 8 močové infekce

Přehled probíraných témat

- Sezení 4 – 30. května 2008
 - 9 STD, infekce kůže a oka
 - 10 sepse a systémové infekce
 - 11 hnisavé infekce a infekce měkkých tkání
- Sezení 5 – 2. června 2008
 - 4 antimikrobiální látky
 - 12 nozokomiální nákazy
- Sezení 6 – 3. června 2008
 - 13 odběry vzorků
 - 14 mykologie a parazitologie

Přehled mikrobů. Patogenita a virulence



Mikrobiologie a imunologie – BDKM021

Téma 1

Ondřej Zahradníček

Náš
ústav



Výuka



Výzkum

Provoz
(analýza
klinických
vzorků)

Foto: vše Archiv MU

Klinická mikrobiologie a imunologie

- Klinická mikrobiologie se jako samostatný obor odštěpila začátkem 20. století z **patologie**. Do té doby se diagnostikou mikrobiálních původců ve vzorcích pacientů zabývali patologové
- O více než půlstoletí později se z mikrobiologie vyčlenila **imunologie**, tedy věda o obranyschopnosti organismu. Dnes už existují samostatné imunologické ústavy a laboratoře, medici mají samostatnou zkoušku z imunologie. Klinická imunologie je však zároveň i součástí interny, případně pediatrie.

Co nás čeká v tomto předmětu

- Povídání o **klinicky významných mikrobech** a jejich vlastnostech
- Povídání o **určování mikrobů** a vůbec o práci v laboratoři klinické mikrobiologie
- Krátké představení **lidské imunity a imunologie** jako takové
- A hlavně představení **infekcí jednotlivých orgánových soustav**, způsobů odběru vzorků, interpretace výsledků a podobně

Ebola



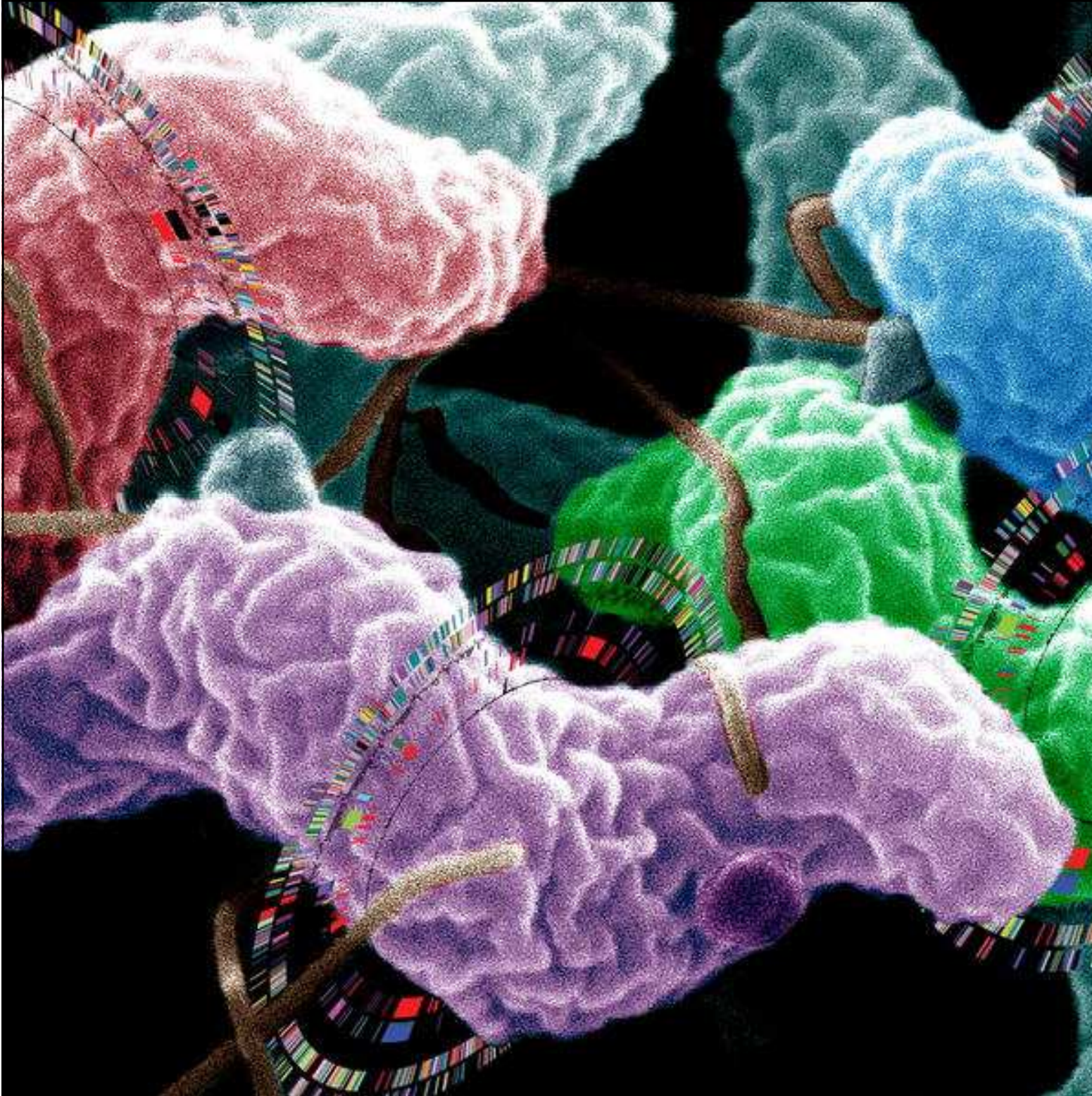
<http://vietsciences.free.fr/khaocuu/nguyenlandung/virus01.htm>

Co je to mikrob

- **Musí to být živé.** Zrníčko prachu není mikrob, i když je mikroskopické
- **Musí to být mikroskopické.** Žirafa není mikrob, i když je živá

Z druhé podmínky se připouštějí výjimky. Třeba tasemnice patří do mikrobiologie přesto, že mohou mít deset metrů. Ale jejich vajíčka jsou mikroskopická.

Bakterie
Helicobacter
a kolem ní
schematicky
její genom



http://biology.plosjournals.org/archive/1545-7885/3/1/figure/10.1371_journal.pbio.0030040.g001-M.jpg

Co jsou všechno mikroby

- Mikroby jsou tedy například **mikroskopické řasy a sinice, archea** (dříve archeobaktérie), různé organismy schopné vydržet hluboko **pod mořem** nebo v extrémních podmínkách **horkých pramenů**
- Jako klinického mikrobiologa mne tyto mikroby neživí, přesto musím uvést, že jsou zajímavé a úžasné

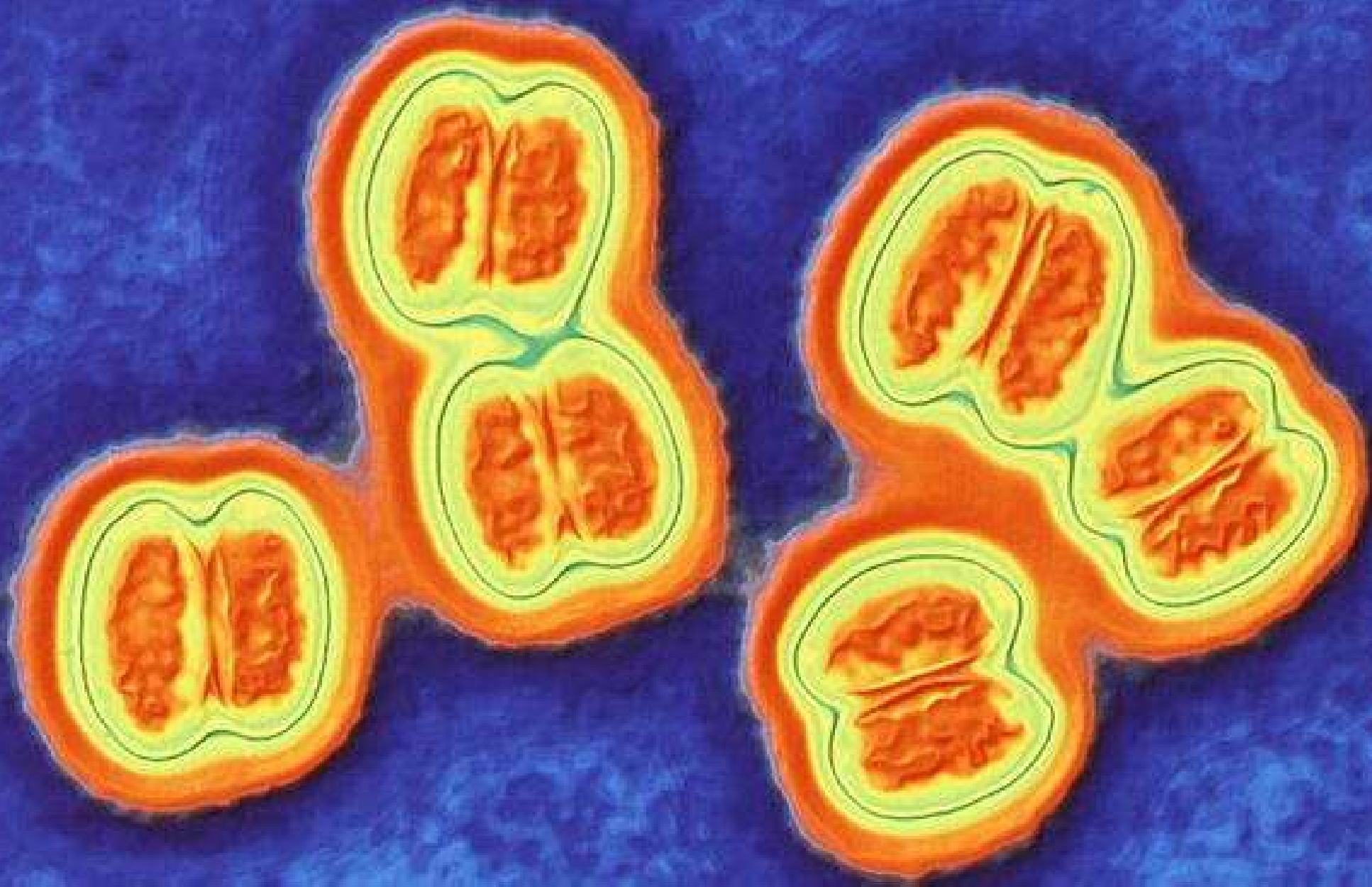
Třídění živých organismů

- **Priony** – *neobsahují DNA, většinou se vůbec nepovažují za živé organismy*
- **Viry a bakteriofágy**
- **Buněčné organismy**
 - **Archea** (archeobakterie)
 - **Eubacteria** (eubakterie)
 - **Eucarya** (eukaryotní organismy)
 - jednobuněčné
 - mnohobuněčné

Klinicky významné mikroby

- Klinicky významné mikroby jsou takové, které jsou **významné pro lidské tělo** (ne tedy pro člověka = tvůrce, ale pro člověka = objekt)
- „Významné pro tělo“ ani zdaleka není totéž jako „tělu škodlivé“. Naopak, **mnohé jsou neškodné, nebo dokonce pomáhají**
- **Každý organismus má své klinicky významné mikroby:** člověk, každý druh zvířete či rostliny. Dokonce i mikroby (třeba bakterie) mají své mikroby (bakteriofágy).

Neisseria gonorrhoeae



Hlavní klinicky významné mikroby

- **Viry** (a priony)
- **Bakterie** (třeba streptokok nebo *Escherichia*)
- **Houby** (kvasinky a plísně)
- **Paraziti** – přesahují pojem mikrob:
 - **Vnitřní paraziti**
 - **Prvoci** (třeba původce malárie)
 - **Motolice** (třeba motolice jaterní)
 - **Hlístice** (třeba roup nebo škrkavka)
 - **Tasemnice** (třeba tasemnice dlouhočlenná)
 - **Vnější paraziti** (vši, blechy, štěnice)

Co nás zajímá o mikrobech

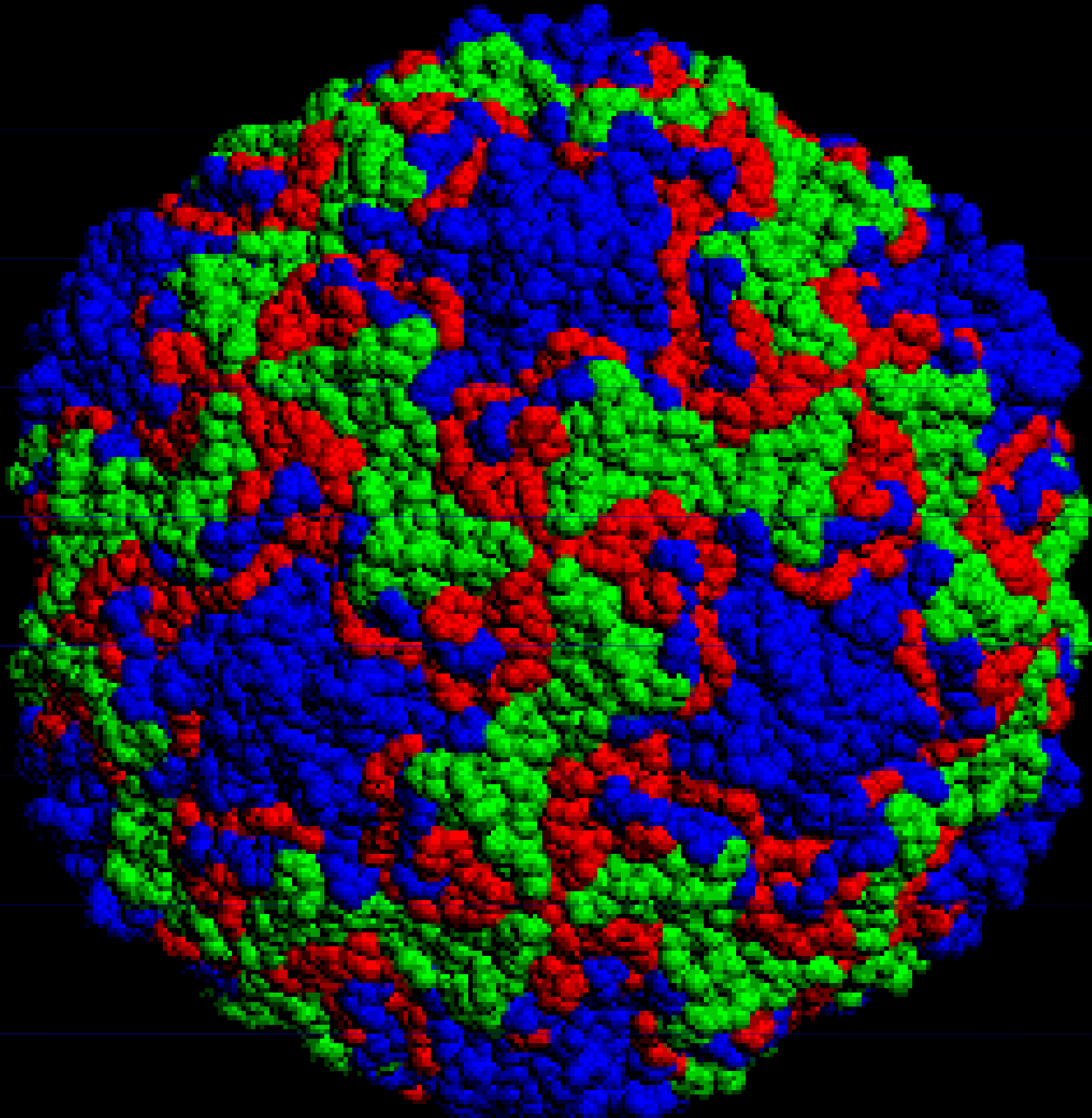
morfologie	jaký mají tvar a uspořádání
struktura	z čeho se skládají
fyziologie	jak se chovají
metabolismus	jak a čím se živí
odolnost	jak vzdorují výkyvům
klasifikace	jak jsou vzájemně příbuzné

Co nás zajímá o klinicky významných mikrobech

patogenita	které orgány osidlují a jak
patogeneze	jakým způsobem případně škodí
přenos	jak se přenášejí
inkubační doba	jak dlouho trvá, než se projeví
diagnostika	jak je můžeme poznat
léčba a prevence	co proti nim můžeme dělat

Morfologie klinicky významných mikroorganismů

- **Viry** se skládají z **DNA** nebo **RNA** a **bílkovin**; některé viry mají navíc membránový obal, který „ukradly“ nějaké hostitelské buňce
- **Viry** mají **kubickou** nebo **šroubovicovou symetrii**. Některé mají třeba tvar dvanáctistěnu. Mohou tvořit „pseudokrystaly“
- **Kvasinky** mají tvar vajíčka, mohou pučet a tvořit tzv. pseudomycelia. Na povrchu mají **b. stěnu**
- **Vláknité houby** a **paraziti** jsou tvarově velice rozmanití, navíc se liší **vývojová stádia**

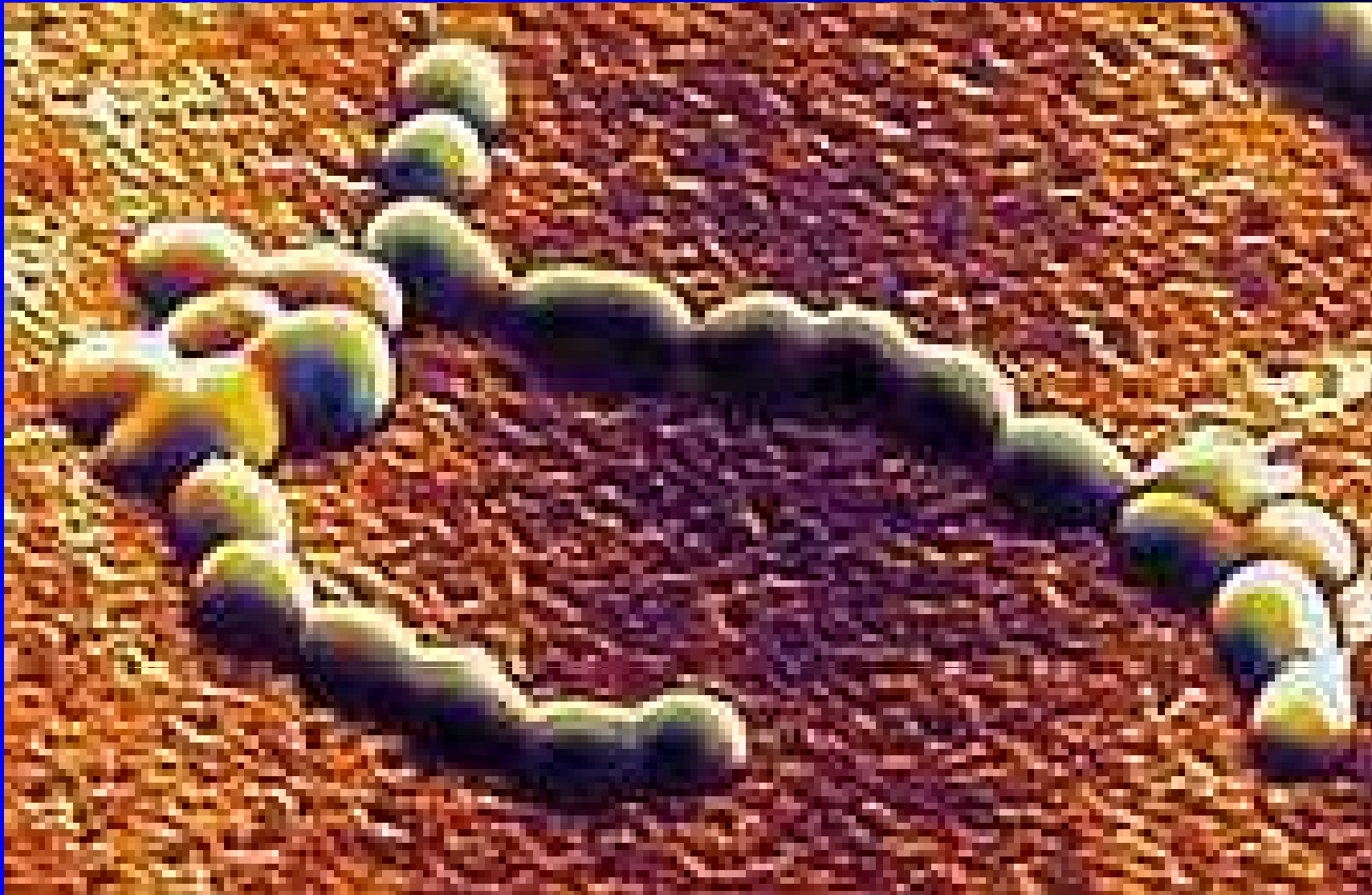


Virus
běžné
řýmy

Morfologie bakterií

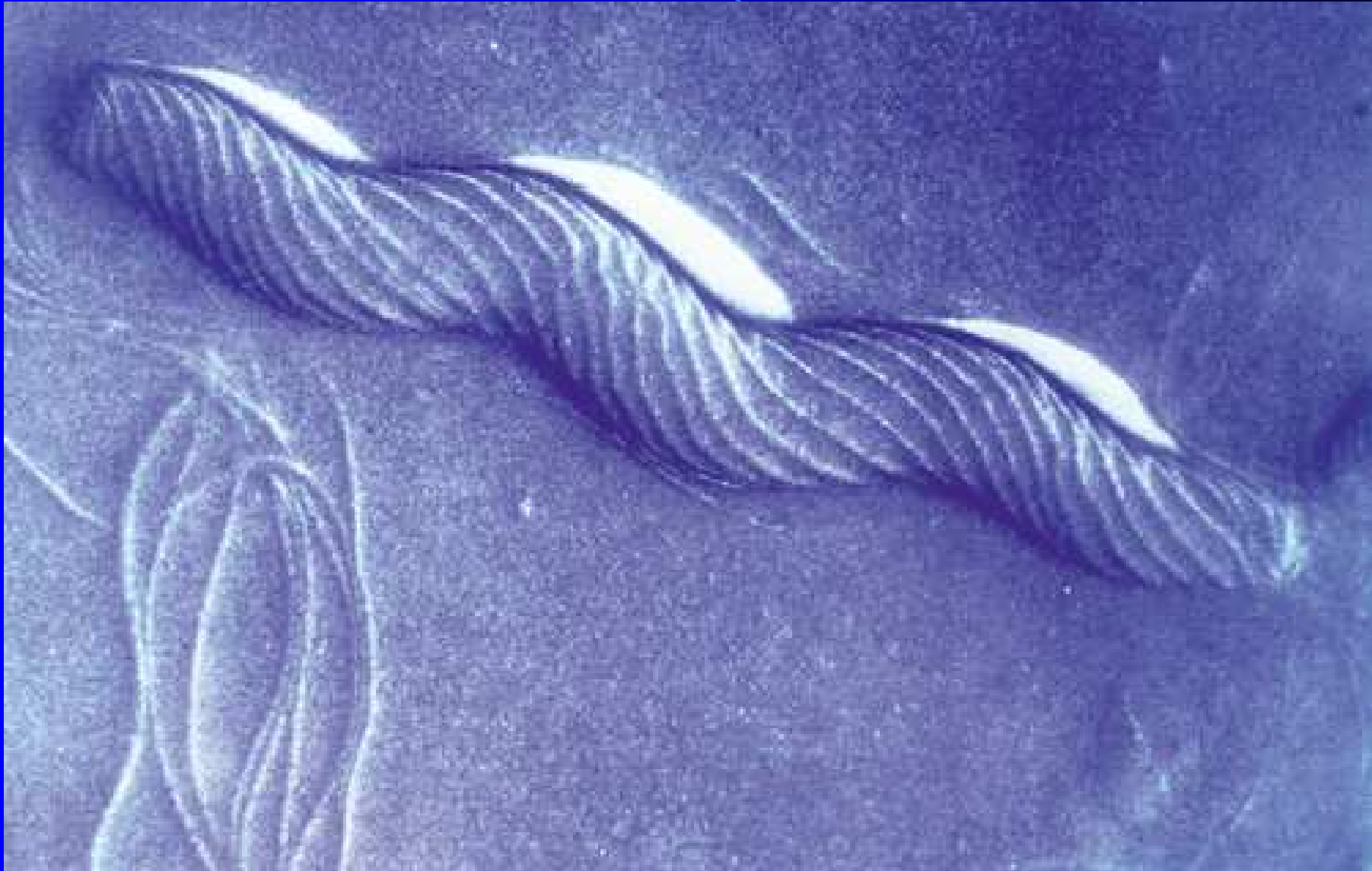
- **Koky** ve dvojicích (diplokoky), v řetězcích a ve shlucích (neříkejme raději „streptokoky“ a „stafylokoky“, bylo by to matoucí)
- **Tyčinky** rovné či zahnuté (vibria), případně několikrát zahnuté (spirily), krátké nebo dlouhé, tvořící až vlákna či rozvětvená vlákna; konce mohou být oblé či špičaté a i tyčinky mohou být různě uspořádané
- **Spirochety** – tenké spirálovité bakterie
- **Beztvaré bakterie**, například mykoplasmata (nemají buněčnou stěnu, takže nemají tvar)

Koky v řetízcích (elektronová mikrofotografie *Enterococcus* sp.)



<http://www.morgenwelt.de/typo3temp/5ce14d39b5.jpg>

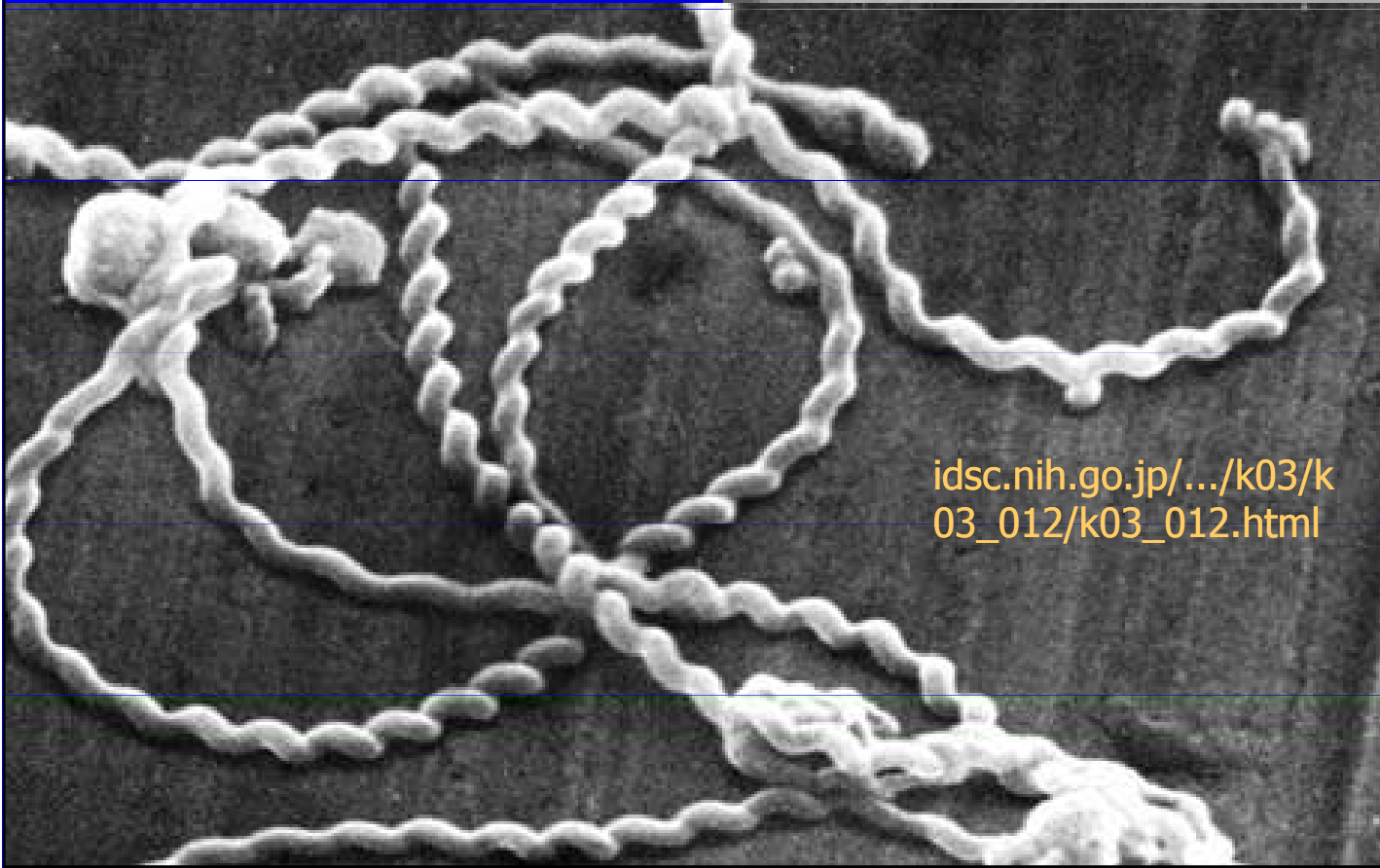
Zprohýbaná tyčinka – helikobakter



<http://vietsciences.free.fr/nobel/medecine/images/helicobacter%2520pylori.JPG>

Spirochety

www.primer.ru/std/gallery_std/treponema.htm



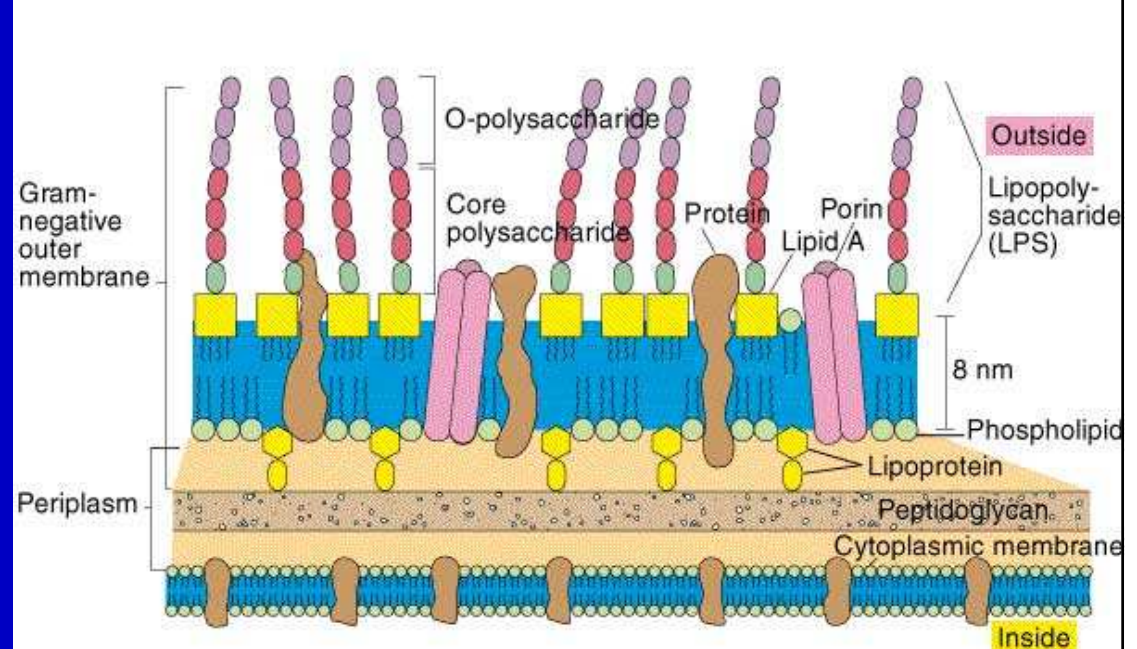
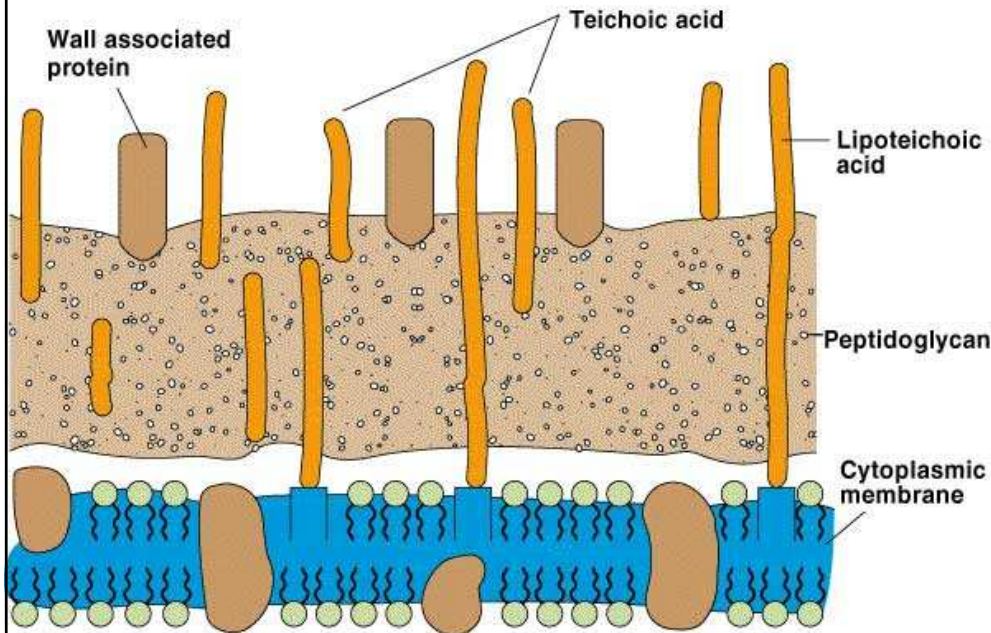
idsc.nih.gov/.../k03/k03_012/k03_012.html

Typ buněčné stěny

- **Grampozitivní bakterie** mají tlustou a jednoduchou buněčnou stěnu. Jsou odolné hlavně mechanicky. Při barvení podle Grama jsou fialové. Například stafylokoky.
- **Gramnegativní bakterie** mají tenkou, ale o to složitější buněčnou stěnu. Jsou odolné hlavně chemicky. Při barvení podle Grama jsou červené. Například escherichie.
- **Gramem se nebarvící bakterie** buněčnou stěnu nemají (mykoplasmata) nebo ji mají hodně jinou (mykobakteria).

Grampozitivní

Gramnegativní

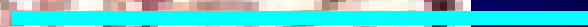


<http://www.arches.uga.edu/~emilyd/mibo3510/gm-%2520cell%2520wall.jpg>

G+



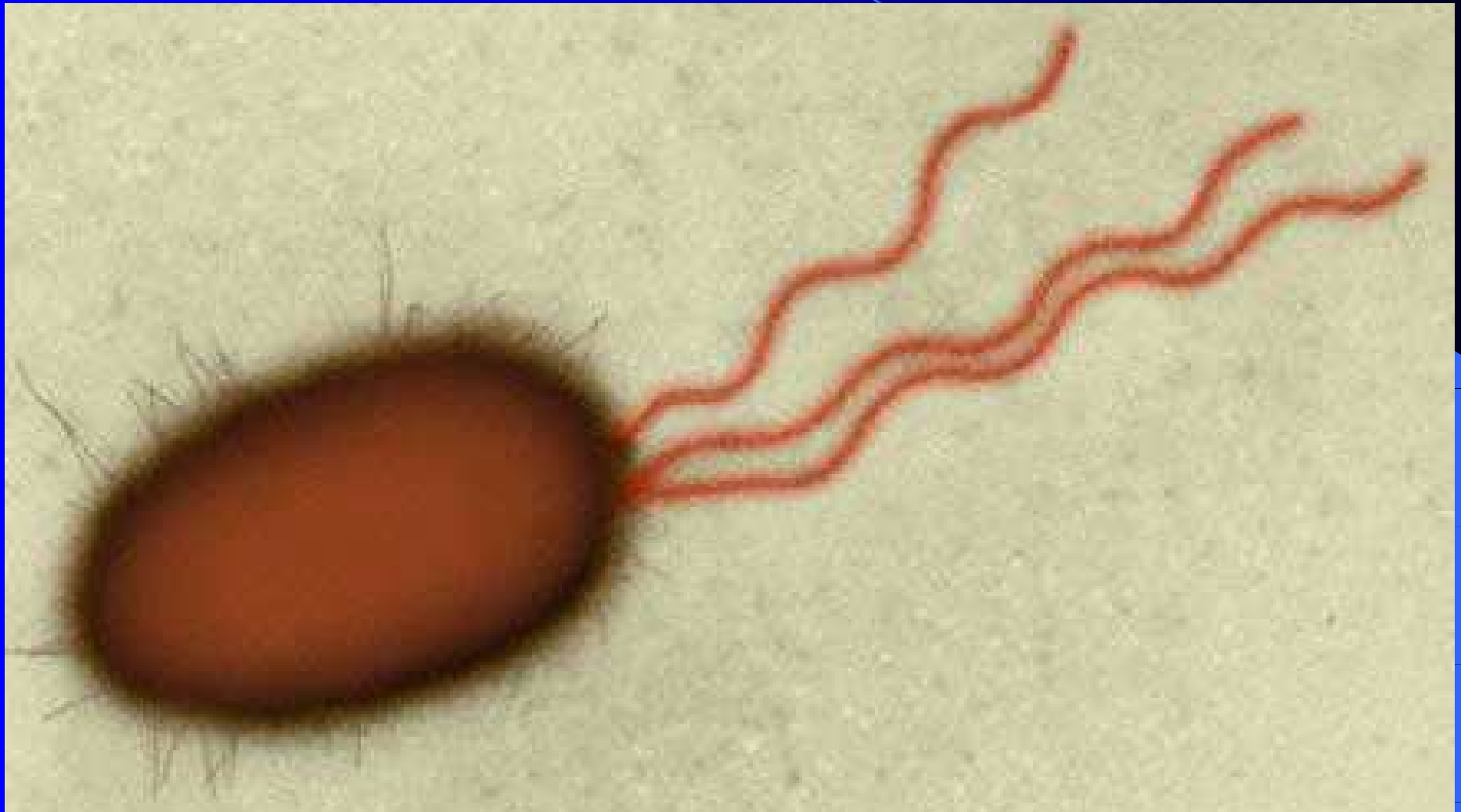
G-



Fimbrie a bičíky

- Mnohé bakterie jsou schopny **pohybu**
- K pohybu slouží hlavně **bičíky**
- **Fimbrie** mohou vedle pohybu sloužit např. i k přilnutí bakterie na povrch nebo při **výměně genetické informace**
- Bičíky bakterií jsou úplně jiné než bičíky eukaryotních organismů

Bakterie s bičíky (*Escherichia coli*)



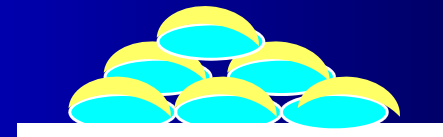
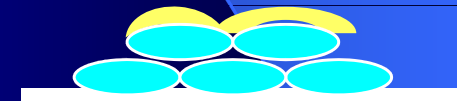
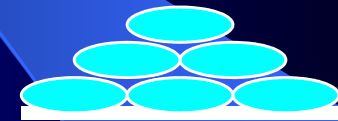
http://www.biotox.cz/toxikon/bakterie/bakterie/obr/escherichia_coli_1.htm

Pouzdro a biofilm

- **Pouzdro** obklopuje jednotlivou bakterii, popř. dvojici. Není to už integrální součást bakteriální buňky, spíš nánosy molekul (většinou polysacharidů), které buňku chrání
- **Biofilm** je souvislá vrstva, vzniklá z bakterií, jejich pouzder a dalšího materiálu. Biofilm je mnohem odolnější než jednotlivá bakterie, žijící v tzv. planktonické formě

Jak se tvoří biofilm bakterií

- **Přímý kontakt** plovoucích bakterií s povrchem
- **Přilnutí** na tento povrch
- **Růst a shlukování** těchto bakterií do mikrokolonií
- Produkce **polymerové matrix**
- Vytvoření **trojrozměrné struktury**, které se říká biofilm
- Bakterie regulují svůj počet pomocí takzvaného **quorum sensingu**

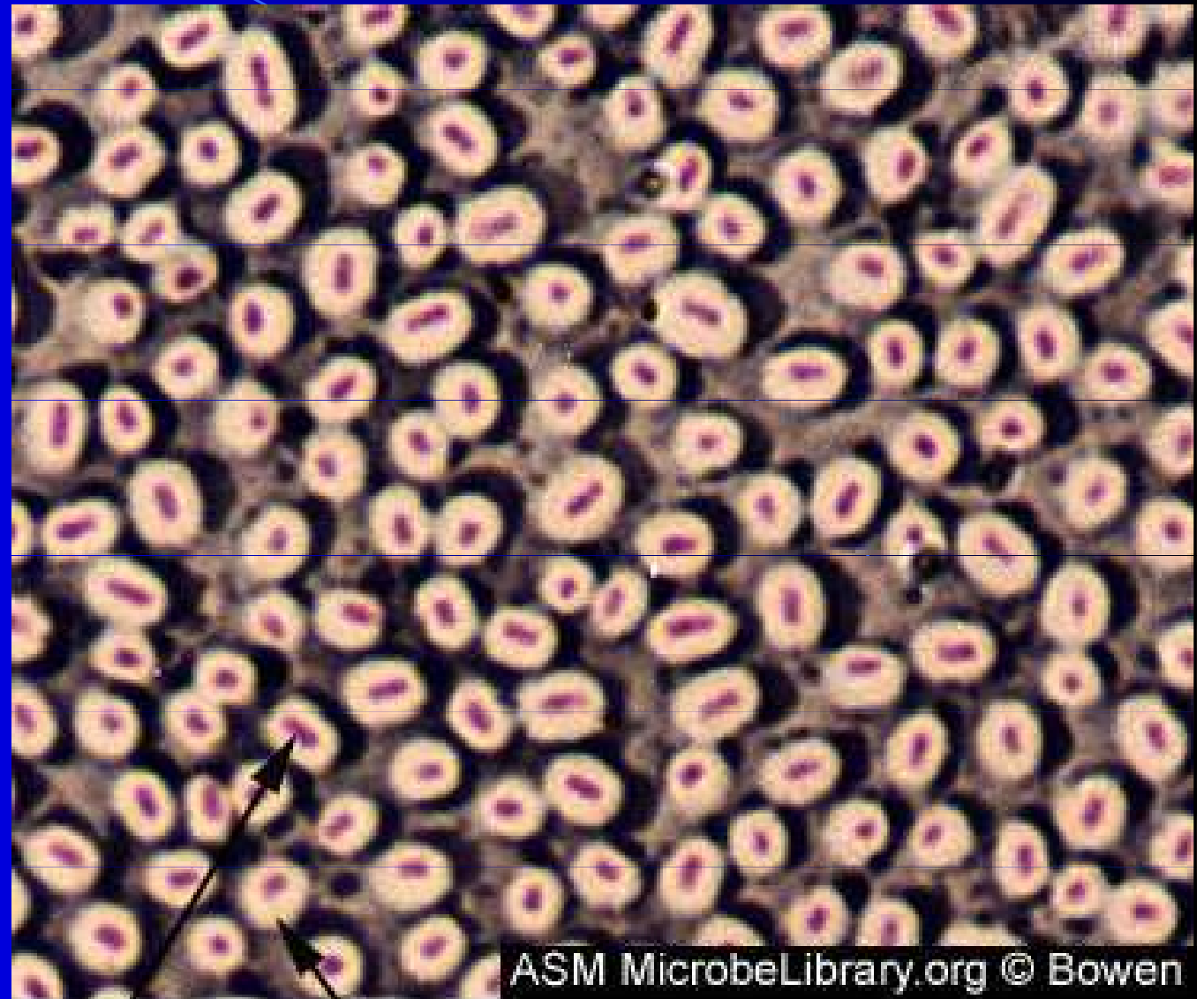


(Podle kolegyně Černožorské z našeho ústavu)

Neobarvené pouzdro

<http://pathmicro.med.sc.edu/fox/capsule.jpg>

V barvení dle Burriho byly nabarveny bakterie na červeně a pozadí dobarveno tuší; mikroskopista pak tuší pouzdro tam, kde se nic neobarvilo



ASM MicrobeLibrary.org © Bowen

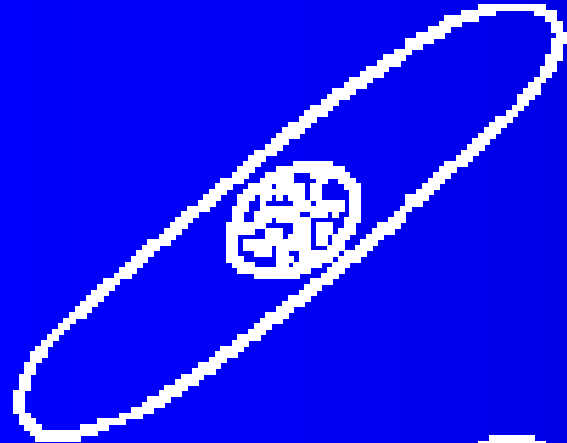
Cell

Capsule

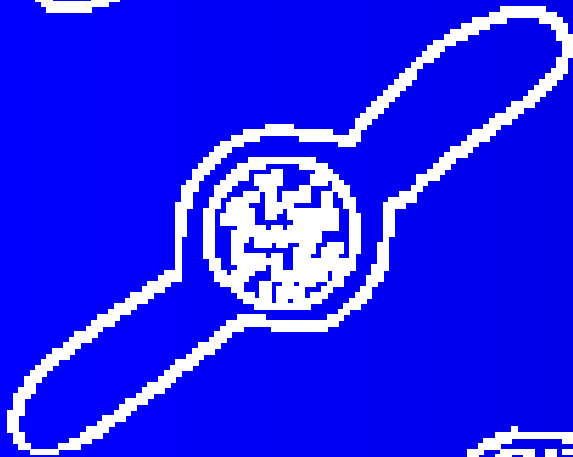
Sporulace

- Sporulace je **něco jako zimní spánek**, ale mnohem dokonalejší než je zimní spánek zvířat. Opakem spory je **vegetativní forma** života buňky
- Spory přežijí velmi **vysoké teploty, vyschnutí, desinfekci** a podobně
- Spora vzniká tak, že se **buňka rozdělí na dvě části**. Ty se však neoddělí úplně: jedna, ze které se stane spora, je obklopena tou druhou, které zůstává vegetativní forma. Takové spoře říkáme **endospora**
- V extrémních podmínkách **vegetativní buňka hyne a zůstane pouze spora**
- Za příznivých podmínek **spora vyklíčí**
- *Neplet' me si spory bakterií a spory hub!*

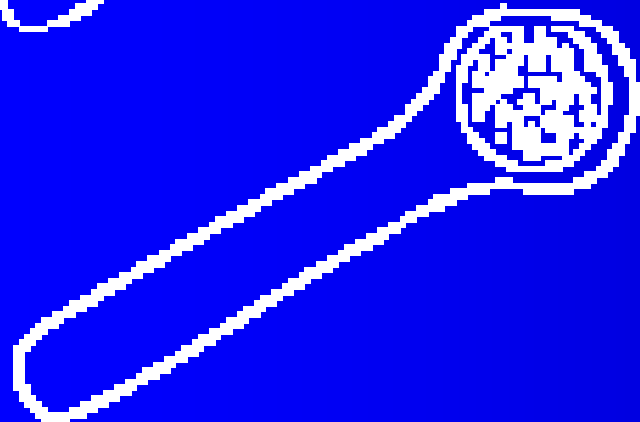
Spory různých druhů rodu *Bacillus*



ex : *B. Subtilis*
B. Cereus
B. Thuringiensis
B. Anthracis



ex : *B. Polysporus* (fixe le N₂)



ex : *B. Pasteurii* (dégrade l'Urée)

<http://membres.lycos.fr/neb5000/BacteriologieI/Groupes%20Bacteriens/Batonnets%20et%20coque%20Gram-positifs%20formant%20des%20endospores.htm>

Spory jsou biochemicky neaktivní,
samy o sobě se nebarví při téměř
žádném barvení



Fyziologie a metabolismus bakterií

- Tak jako každý organismus, i bakterie mají svůj **katabolismus a anabolismus**
- Katabolismus může být trojí:
 - **Fermentace** – štěpení bez potřeby kyslíku. Málo energeticky výhodný, ale nepotřebuje kyslík. Využívají ji například střevní bakterie
 - **Aerobní respirace** – z mála živin se získá hodně energie, je ale nutný kyslík. Využívají ji bakterie, které nacházíme ve vnějším prostředí, na rostlinách aj.
 - **Anaerobní respirace** – jiný akceptor elektronů než kyslík, pro člověka málo významné

Množení bakterií

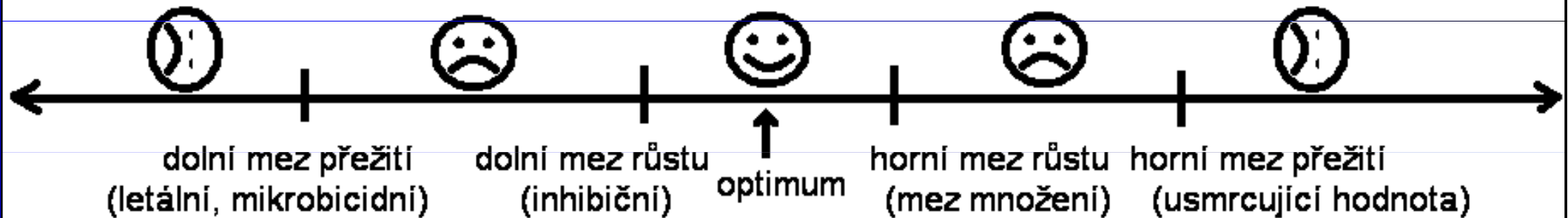
- Každá bakterie má svou **generační dobu**
- Za jednu generační dobu jsou z jedné dvě, za desetinásobek je z jedné bakterie 1024 bakterií (teoreticky) a podobně
- Ideální množení by existovalo pouze kdybychom neustále přidávali živiny a popř. kyslík a odebírali odpadní produkty
- Pozor, neplet'te si generační dobu (za jak dlouho se bakterie rozdělí na dvě) a kultivační dobu (za jak dlouho vidíme výsledek na kultivační půdě)

Životní podmínky bakterií

- Pro život bakterií jsou nutné **určité podmínky**
- Tyto podmínky musíme splnit také v případě, že chceme bakterie **uměle pěstovat** (třeba proto, abychom je přitom mohli určovat)
- Nestačí takové, aby bakterie přežívala. **Musí být i schopna se množit**
- Na druhou stranu, **pokud s bakteriemi bojujeme** (při desinfekci, sterilizaci), nestačí obvykle potlačit jejich množení, ale **musíme je úplně zahubit.**

Životní podmínky – pokračování

- Podmínky musí být splněny, co se týče **teploty**, **pH**, **koncentrace solí** a mnoha dalších věcí
- Nepůsobí přitom jednotlivě, **kombinují se**



Takto působí na bakterie např. různé pH (za předpokladu, že se nemění ostatní podmínky)

Interakce mikrob – makroorganismus: obecně (1)

- Mezi **mikrobem** (mikroorganismem) a **hostitelským organismem** (člověk, ale i zvíře, rostlina, jiný mikrob...) může nastat celá škála vztahů – interakcí. Může to být kooperace (člověk poskytuje útočiště střevním escherichiím a ty se mu za to odvděčí tvorbou vitamínů), indiferentní vztah nebo přímo antagonistický vztah.

Interakce mikrob – makroorganismus: obecně (2)

- Z hlediska klinické mikrobiologie je významný **vztah mikroorganismus – makroorganismus** (což může být člověk, ale také zvíře či rostlina)
- Může jít o **symbiózu, neutrální vztah** či **antibiózu**
- Často se používají i **termíny z potravních řetězců** (komezalismus, saprofytismus, parazitismus).
Virulentní mikrobi jsou zpravidla – ale ne vždy – parazitické
- **Ne vždycky se dají mikrobi jednoduše „zaškatulkovat“**. Často záleží na okolnostech, jestli bude mikrob „zlý“ nebo „hodný“

Interakce mikrob – makroorganismus: mikroby napadající člověka

- Mikroorganismy, které napadají člověka, jsou vybaveny různými **faktory virulence** – jsou to faktory, které zajišťují schopnost mikroba proniknout do organismu. Nejčastěji to bývají různé enzymy, toxiny, bakteriální pouzdro aj.
- Makroorganismus se mikrobům brání řadou různých způsobů. Jde vždy o to, zda se více prosadí faktor virulence mikroba, nebo **mechanismus obranyschopnosti makroorganismu**

Patogenita mikroorganismů

- Existují mikroby **nepatogenní** – neschopné vyvolat nemoc. Většinou jsou to ty, které vůbec nejsou schopny do organismu proniknout.
- Existují mikroby **podmíněně patogenní**, které vyvolávají nemoci jen za určitých podmínek. Často jsou to prospěšné bakterie, které jsou většinou „hodné“ a jen výjimečně začnou „zlobit“, když se třeba dostanou kam nemají, nebo když zmutují
- Existují i mikroby **obligátně patogenní**, které vyvolávají nemoc vždy, když se dostanou do těla v dostatečném počtu a vhodným způsobem

Předpoklady patogenity

- 1) Přenosnost z hostitele (zdroje) na další organismus (osobu)
- 2) **Nakažlivost** – schopnost narušit obranu hostitele
- 3) **Virulence** – schopnost mikroba nějak poškodit hostitele.

Faktory zodpovědné za virulenci, respektive patogenitu

Kolonizace hostitele – fimbrie, bičíky, adheziny

Faktory invazivity – vnikání do tkáně

Toxiny (jedy), hlavně u bakterií: neurotoxiny, enterotoxiny, lokální toxiny a jiné

Faktory boje s obrannými mechanismy hostitele

Biofilm – složitý útvar, složený nejen z mikrobů

Patogenita a virulence

Virulence

okamžitá vlastnost konkrétního kmene mikroba (kmen = populace z jedné buňky)

Kmeny tedy mohou být

avirulentní – tedy v daném okamžiku úplně neškodné, neschopné napadat makroorganismus

méně či více virulentní – tedy disponující různou mírou schopnosti napadnout makroorganismus.

Patogenita

vlastnost určitého mikrobiálního druhu

Nepatogenní: nejsou schopny vyvolat u daného živočišného druhu nemoc.

Potenciální (oportunní) patogeni: vyvolávají chorobu jen někdy

Obligátní (primární) patogeni vyvolávají nemoc "vždy"

Příklad působení patogenního mikroba



These large, dark, boil-like blisters are a diagnostic symptom of necrotizing fasciitis (also known as flesh-eating disease).

(Source: EMBSS, 1996 <http://mdchoice.com/>)

Hodné mikroby: běžná mikroflóra

- **Mnoho mikrobů nám pomáhá.** Tím, že osidlují naše sliznice, zabrání tomu, aby je osídlily zlé patogenní mikroby. Některé pomáhají i jinak
- Nejvíc, asi kilogram, je jich **v tlustém střevě**
- Hodně mikrobů je i **v dutině ústní a v hltanu**
- U žen je mikrobiální ekosystém **v pochvě**
- I přes relativní nedostatek vody má svoji mikroflóru také **kůže** (poněkud se liší na různých místech)

<http://faculty.smu.edu/ayati/proteus/proteus1.gif>



Plazivá bakterie *Proteus* se podílí na likvidaci nestrávených bílkovinných zbytků potravy

Mikroflóra jako ekosystém

- Kdysi lidé mysleli, že všechny škůdce úrody jednoduše zahubí například DDT. Ukázalo se ale, že takový **brutální zásah často nadělá víc škody než užitku**, zvláště když se použije nevhodným způsobem
- Podobně **složitý ekosystém je i třeba střevní mikroflóra**. I proto dnes na střevní infekce většinou nedoporučujeme antibiotika, protože systém „rozhodí“ často ještě víc.

Co ovlivňuje infekci

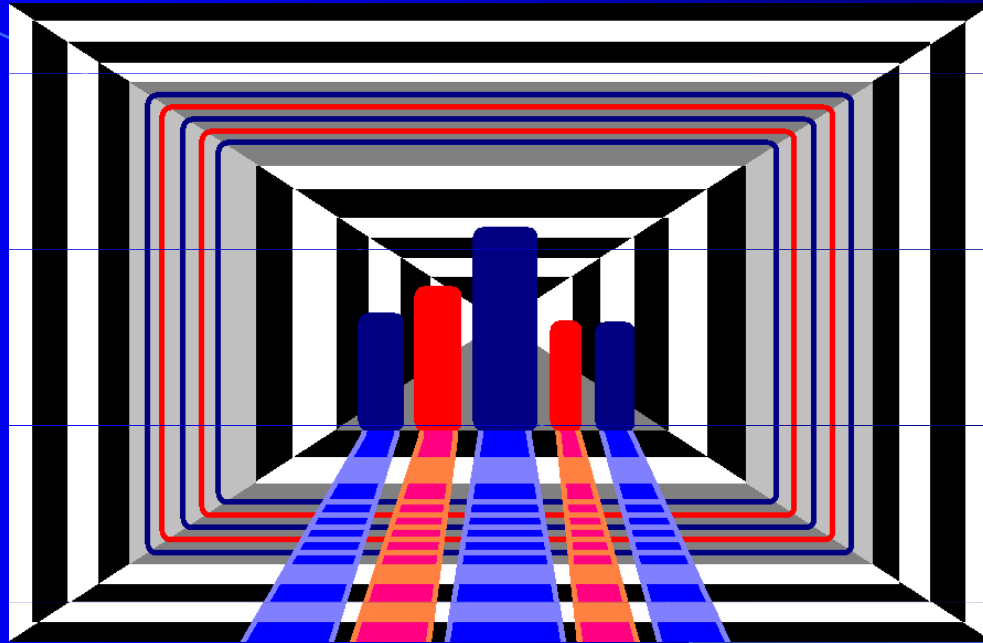
- **Vstupní brána infekce** (kudy mikrob pronikl)
- **Forma infekce**
 - podle rozsahu – lokální / celková
 - podle vyjádření průběhu – bezpříznaková / příznaková
 - u infekce s příznaky dále průběh abortivní – typický – komplikovaný
- **Vylučování mikrobů z těla**

V podstatě je plynulý přechod mezi infekcí, bezpříznakovou kolonizací a běžnou flórou.

Co ovlivňuje formu infekce

- **na straně mikroba:** vybavenost faktory virulence (může být dána třeba i tím, že mikrob sám je napaden bakteriálním virem – bakteriofágem)
- **na straně makroorganismu:** stav imunity, stav anatomických bariér, hormonální rovnováha, případné základní onemocnění a spousta dalších věcí
- **forma vzájemného setkání** mikroba a makroorganismu

Přehled mikrobiologických vyšetřovacích metod



Mikrobiologie a imunologie – BDKM021

Téma 2

Ondřej Zahradníček

Cíle mikrobiologické diagnostiky

Odhalení původce nemoci (patogena)

Někdy: zjištění citlivosti patogena na antimikrobiální látky

Někdy také: určení faktorů virulence

Co je to vzorek

Vzorek je to, co je odebráno pacientovi a přichází na vyšetření do laboratoře:

- **kusový či tekutý materiál ve zkumavce** či jiné nádobce (krev, sérum, moč...)
- **stěr či výtěr na vatovém tamponu**, obvykle zanořeném do transportního média.

Při diagnostice někdy pracujeme s celým vzorkem. Jindy je nutno získat ze vzorku kmen nebo kmeny patogenních mikrobů.

Co je to kmen

Kmen je čistá kultura („výpěstek“) jednoho druhu mikroba

Kmen získáme jedině kultivací (pěstováním) mikroba na pevné půdě.

Kochův objev, že bakterie lze takto pěstovat, měl zásadní význam v dějinách mikrobiologie.

Přehled metod

- **Metody přímé:** Hledáme mikroba, jeho část či jeho produkt
 - Přímý průkaz ve vzorku – pracujeme s celým vzorkem
 - Identifikace kmene – určení vypěstovaného izolátu
- **Metody nepřímé:** Hledáme protilátky. Protilátka není součástí ani produktem mikroba – je produktem makroorganismu

Přehled metod přímého průkazu

Metoda	Průkaz ve vzorku	Identifikace
Mikroskopie	ano	ano
Kultivace	ano	ano
Biochemická identifikace	ne	ano
Průkaz antigenu	ano	ano
Pokus na zvířeti	ano	v praxi ne
Molekulární metody	ano	v praxi ne*

*netýká se molekulární epidemiologie – sledování příbuznosti kmenů

Co vidíme v mikroskopu

- **V případě mikroskopování kmene** vidíme jeden typ mikrobiálních buněk
- **V případě mikroskopování vzorku** můžeme vidět
 - **mikroby** – nemusí tam být žádné, a může tam být i klidně deset druhů
 - **buňky makroorganismu** – nejčastěji epitelie a leukocyty, někdy erytrocyty
 - **jiné struktury**, např. fibrinová vlákna, buněčnou drť (detritus) a podobně

Typy mikroskopie

- **Elektronová mikroskopie** – u virů; spíše výzkum než při běžném průkazu virů
- **Optická mikroskopie**
 - **Nativní preparát** – na velké a/nebo pohyblivé mikroby
 - **Nativní preparát v zástinu** (hlavně spirochety)
 - **Fixované a barvené preparáty**, například:
 - Barvení dle Grama – nejdůležitější bakteriologické
 - Barvení dle Ziehl-Neelsena – např. u bacilů TBC
 - Barvení dle Giemsy – na některé prvoky

Gramovo barvení - princip

- Grampozitivní bakterie mají ve své stěně tlustší vrstvu peptidoglykanu mureinu. Díky tomu se na ně pevněji váže krystalová nebo genciánová violet' a po upevnění této vazby Lugolovým roztokem se neodbarví ani alkoholem. Gramnegativní bakterie se naopak odbarví alkoholem a dobarví se pak na červeno safraninem.

Chemikálie	Grampozitivní	Gramnegativní
Krystal. violet'	Obarví se	Obarví se
Lugolův roztok	Vazba se upevní	Upevní se méně
Alkohol	Neodbarví se	Odbarví se
Safranin	Zůstanou fialové	Obarví se na červeno

Mikroskopie vzorku

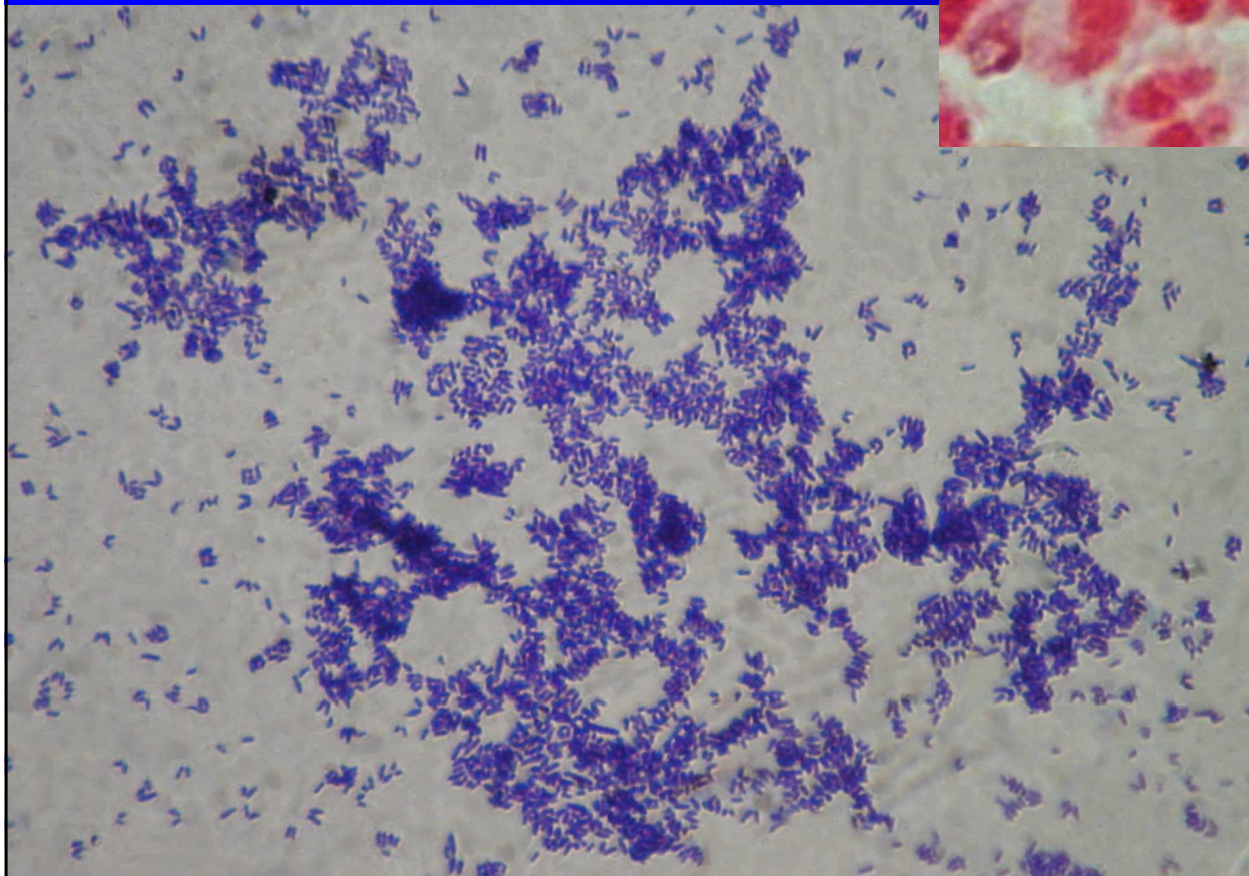
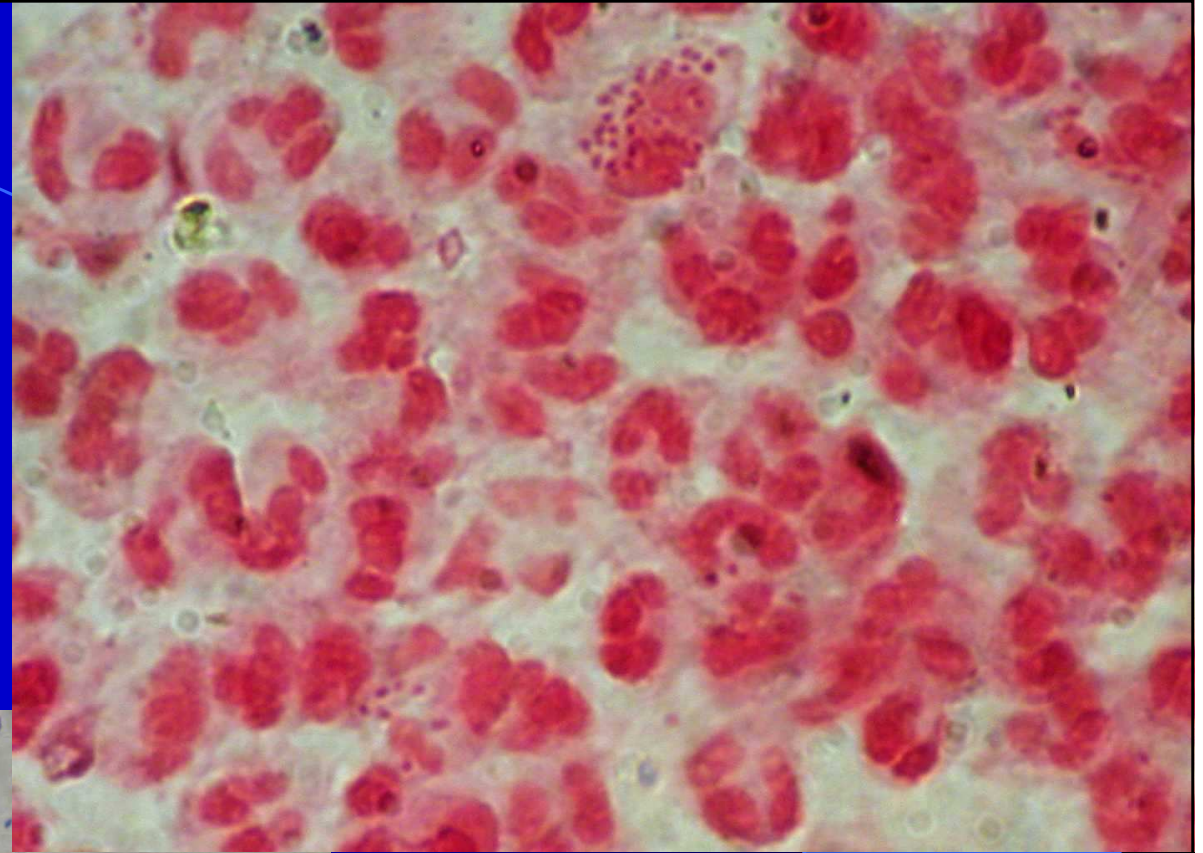


Foto: archiv MÚ

Mikroskopie kmene

Kultivace (pěstování) bakterií *(případně také kvasinek)*

- Bakterie často **pěstujeme na umělých půdách**
- Bakterie na půdu **naočkujeme a poté půdu umístíme do termostatu**, většinou nastaveného na 37 °C (pro bakterie významné pro člověka je to většinou optimální teplota – což má logiku)
- Za 24 (někdy až 48) hodin **půdu vytáhneme a pozorujeme, jak nám bakterie vyrostly**
- **Vláknité houby** se pěstují mnohem déle
- **Viry a paraziti** se většinou vůbec nepěstují

Kultivace bakterií – podmínky

- Bakteriím musíme připravit **přijatelné vnější podmínky** – teplotu, vlhkost apod.
- Některé jsou dány **nastavením termostatu**, jiné **složením kultivační půdy**
- Používáme **různá kultivační média**, sloužící k určitým účelům
- **Aerobní a fakultativně anaerobní** bakterie můžeme pěstovat za normální atmosféry
- **Striktně anaerobní bakterie** vyžadují atmosféru bez kyslíku. **Kapnofilní** zase zvýšený podíl CO₂.

Připravené kultivační
půdy se uchovávají
v chladničce

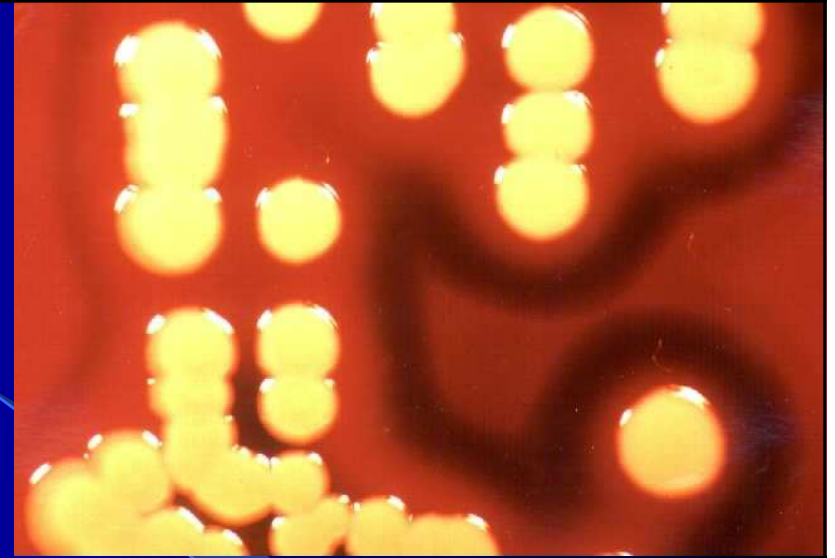
Foto: archiv MÚ



Smysl kultivace bakterií

- Proč vlastně v laboratoři bakterie pěstujeme?
 - Abychom je **udrželi při životě a pomnožili**. K tomu slouží kultivace na tekutých půdách i na „pevných“ půdách (to jsou půdy, které netečou, jejich základem je většinou agarová řasa)
 - Abychom získali **kmen** – pouze pevné půdy
 - Abychom je vzájemně **odlišili a oddělili** – používají se diagnostické a selektivní půdy, sloužící k identifikaci

Pojem kolonie



- Kolonie je **útvarem na povrchu pevné půdy**. Pochází z jedné buňky nebo malé skupinky buněk (dvojice, řetízku, shluku)
- Kolonie je tedy vždy tvořena **jedním kmenem**.
- V některých případech můžeme z počtu kolonií **odhadnout počet mikrobů** ve vzorku – nebo přesněji počet „kolonií tvořících jednotek“ (CFU)
- Popis kolonií má významné místo v diagnostice

Kultivace v praxi

- Vzorek se vloží do **tekuté půdy** nebo nanese **na pevnou půdu**
- U pevné půdy se ho snažíme tzv. **mikrobiologickou kličkou** rozředit, abychom získali **jednotlivé kolonie** a mohli dále pracovat s kmeny mikrobů
- **Tekuté půdy**
 - jsou půdy pomnožovací
 - základem je zpravidla hovězí vývar a bílkovinný hydrolyzát
 - nejdůležitější je peptonová voda, bujón, VL-bujón, selenitový bujón (selektivně pomnožovací)

Tekuté půdy

Foto: archiv MÚ



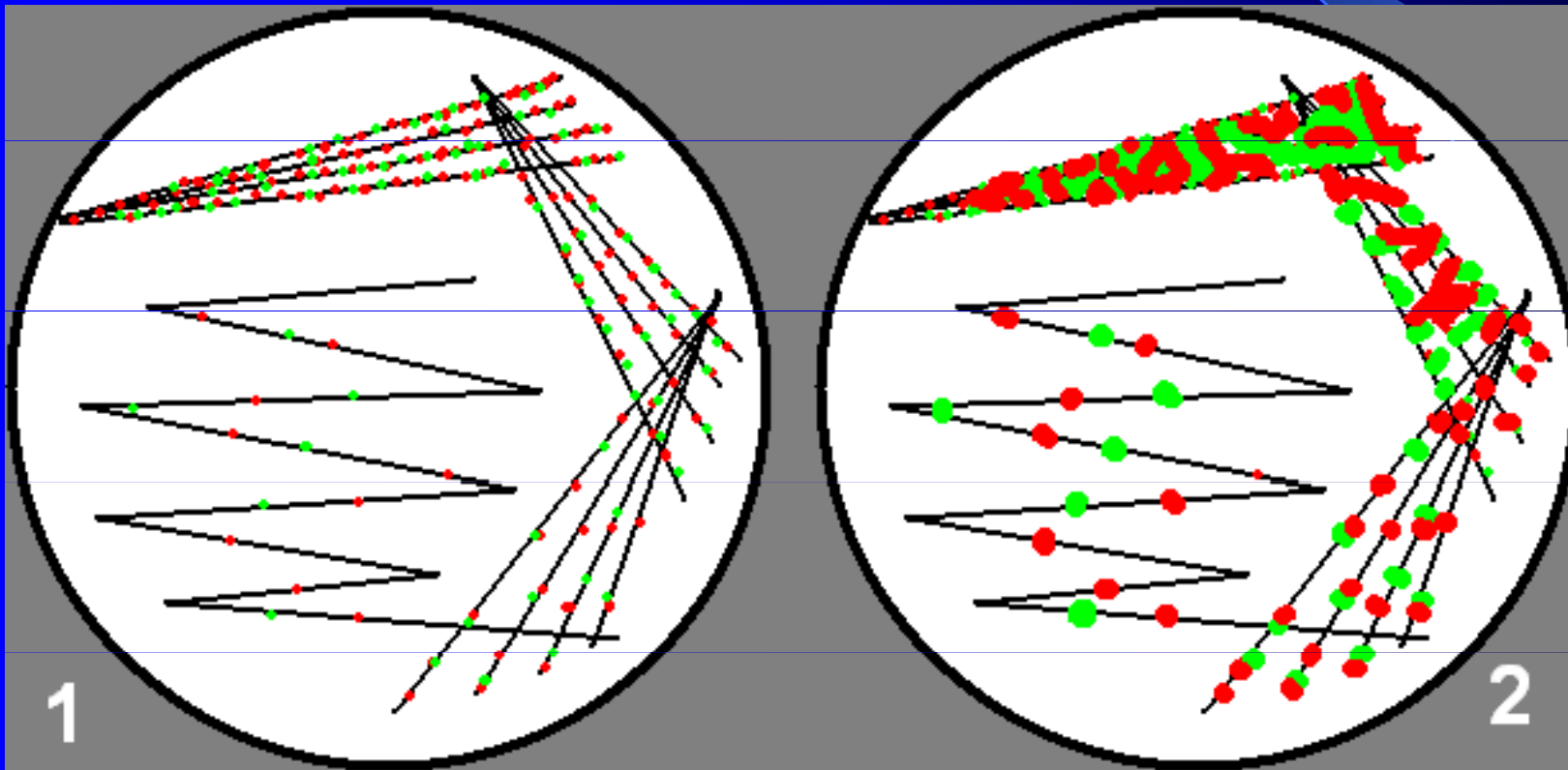
Pevné (agarové) půdy

- Základem je opět masopeptonový bujón, ale navíc obsahují výtažek z agarové řasy. Používala se i želatina, ale neosvědčila se tolik jako agar.
- Abychom využili všech výhod, které pevné půdy nabízejí, musíme vzorek (kultivace vzorek → kmen), ale i kmen (kultivace kmen → kmen) dobře rozočkovat. Klasickým způsobem rozočkování je tzv. **křížový roztěr.**

Foto: www.medmicro.info



V případě směsi vytvoří každá bakterie svoje kolonie (při dobrém rozočkování)



1 – očkování směsi bakterií (naznačeny tečkami), 2 – výsledek kultivace: v prvních úsecích směs, až na konci izolované kolonie

Pevné půdy



Existují různé typy pevných půd

- **Diagnostické půdy** – roste "kdeco, ale různě" (krevní agar, VL krevní agar)
 - Chromogenní půdy – zvláštní druh diagn. půd
- **Selektivní půdy** – roste "jen málo co" (krevní agar s 10 % NaCl pro kultivaci stafylokoků)
- **Selektivně diagnostické půdy** – např. Endova (jen G⁻, a rozlišení bakterií podle štěpení laktózy)
- **Obohacené půdy** – k pěstování náročných bakterií (čokoládový agar, což je zahřátý krevní agar)
- **Speciální půdy** – mají své zvláštní určení (MH půda pro testy citlivosti kmene k antibiotikům)

Pěstování anaerobních bakterií

Anaerobní bakterie nesnášejí kyslík. Musíme je tedy pěstovat ve speciální atmosféře bez kyslíku.

Foto: archiv MÚ



Foto: archiv MÚ



Biochemické identifikační metody

- *I mezi savci jsou rozdíly. Člověk neumí tvořit vitamin C, někteří savci ano*
- Bakterii předložíme určitý **substrát** a zkoumáme, zda ho bakterie pomocí svého enzymu změní v **produkt**. Produkt se musí lišit od substrátu **skupenstvím** či **barvou**. Neliší-li se, užijeme **indikátor**
- **Existuje přitom velké množství způsobů technického provedení tohoto typu testů.**

Možnosti praktického provedení

- **Rychlé testy (vteřiny až minuty)**
 - Katalázový test
 - Testy s diagnostickými proužky (oxidáza)
- **Testy s inkubací (hodiny až dny)**
 - Jednoduché zkumavkové testy
 - Složité zkumavkové testy
 - Sady jednoduchých zkumavkových testů
 - Testy v plastové destičce (miniaturizace)
 - Jiné testy (např. Švejcarova plotna)

Katalázový test

- **Katalázový test:** velmi jednoduchý, do substrátu (roztok H_2O_2) rozmícháme bakterie. Bublinky = pozitivita. **Princip:** $2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$

medic.med.uth.tmc.edu/path/oxidase.htm

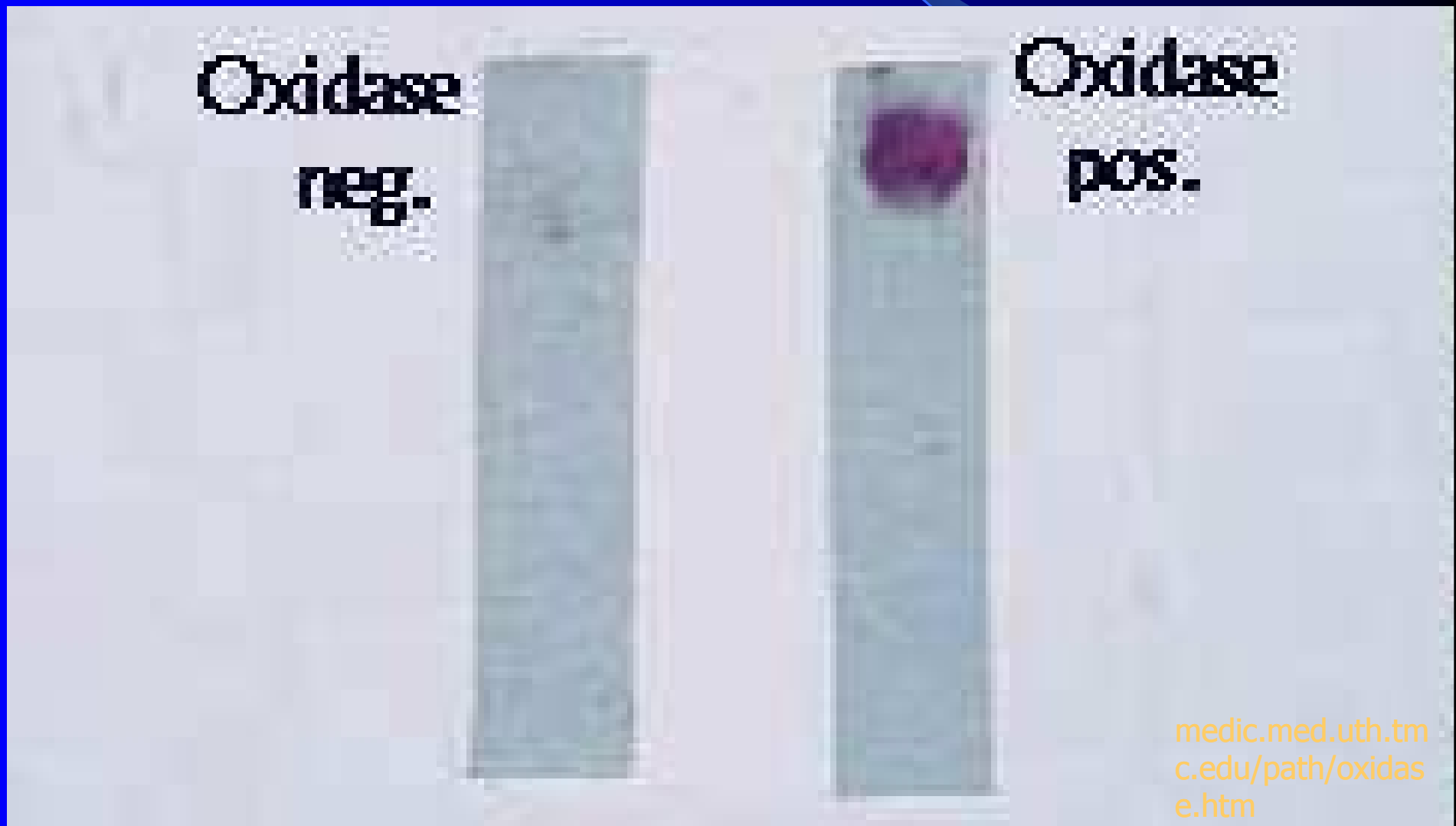
Catalase +



Catalase -



Příklady dalších testů: oxidázový test (diagnostický proužek)

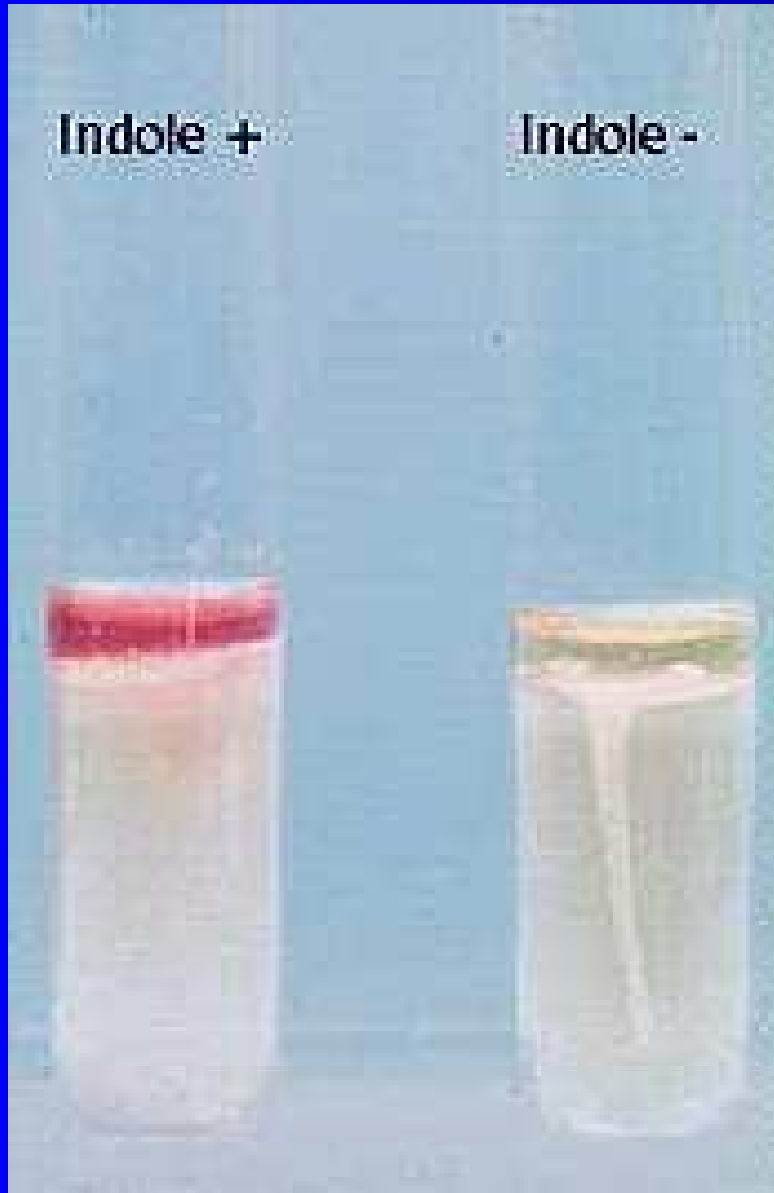


Provedení testu v praxi



Foto: archiv MÚ

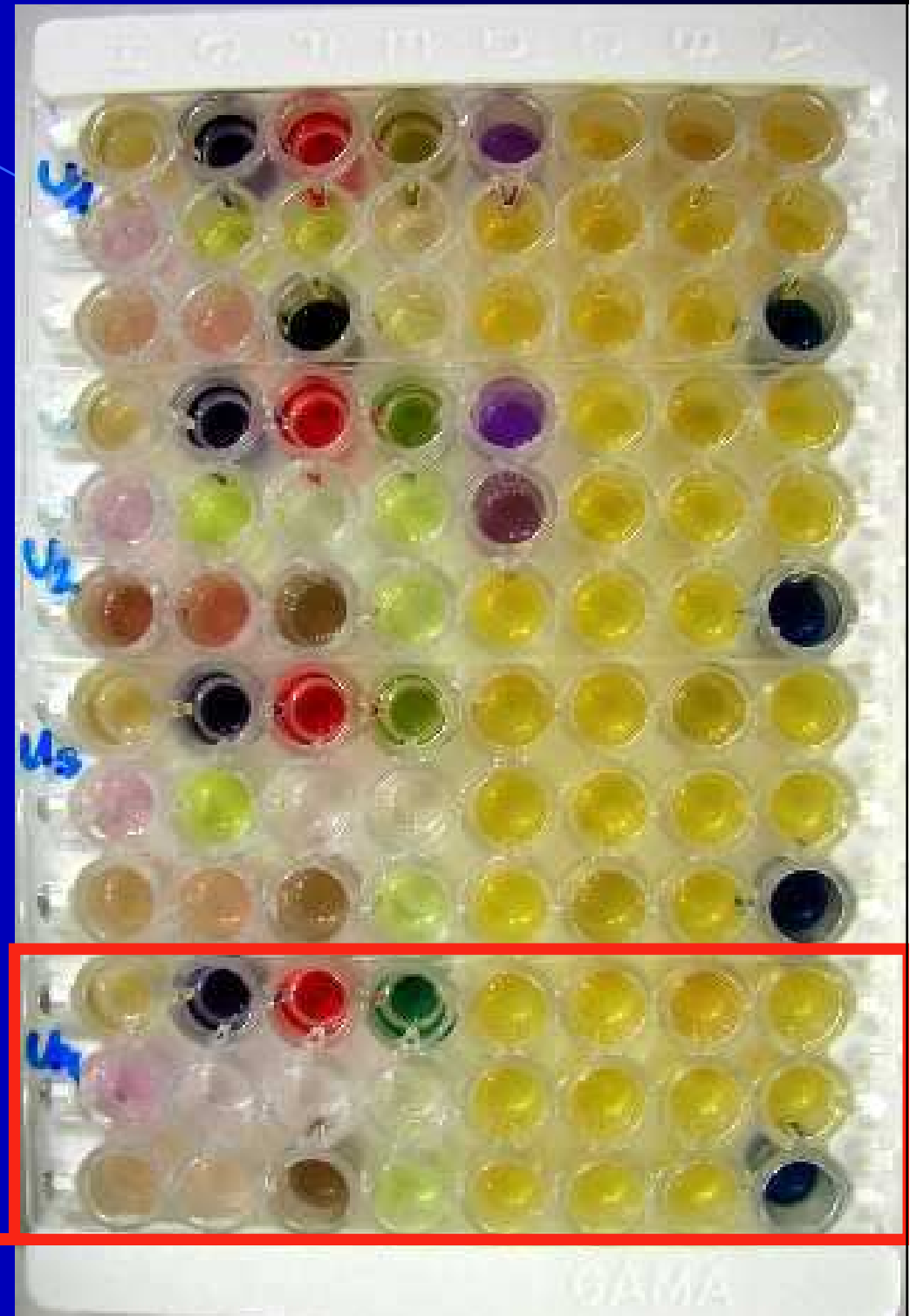
...a další testy



Moderní biochemické testy zahrnují i desítky reakcí

- Testy se dělají v důlcích plastových mikrotitračních destiček.
- Počet testů v sadách kolísá od sedmi až po více než padesát
- Liší se v technických detailech. Vždy je však substrát lyofilizovaný, bakterie se nejprve rozmíchá ve fyziologickém roztoku nebo suspenzním médiu a pak se kape či lije do důlků

NEFERMtest 24
Pliva Lachema: do
jednoho rámečku lze
vložit čtyři trojřádky
(čtyři testy, určení
čtyř různých kmenů)



Zahraniční soupravy

www.ilexmedical.com/products_eng/api.htm

Foto: archiv ústavu



<http://www.oxid.com/bluePress/uk/en/images/PR020505.jpg>

Pokus na zvířeti

Pokus na zvířeti býval důležitou součástí diagnostiky v začátcích mikrobiologie. Jsou ale výjimečné případy, kdy se uplatní i dnes.



Průkaz nukleové kyseliny

- **metody bez amplifikace nukleové kyseliny** (klasické genové sondy)
- **metody s amplifikací** (namnožením)
 - PCR (polymerázová řetězová reakce)
 - LCR (ligázová řetězová reakce)
- Principiálně se **použití v mikrobiologii neliší od použití jinde** (např. v genetice)
- Nevýhoda – **někdy jsou až příliš citlivé**, takže se prokáže každá molekula DNA, která mohla třeba „přilétnout odněkud zvenčí“. Citlivost se dnes ale dá omezit.

Metody založené na interakci antigen – protilátka

- O **antigenech a protilátkách** bude ještě řeč, až se budou probírat základy imunologie.
- Prozatím si pouze představíme v hrubých rysech **mikrobiální antigen a protilátku proti němu**, abychom si pak ukázali, jak se jejich vzájemná interakce využívá v diagnostice

Co je to antigen

Antigen je **struktura na povrchu mikroba** (ale i třeba pylového zrnka či zvířecího chlupu), které tělo provokuje k tvorbě protilátek

Antigen **se dá prokázat pomocí protilátky**, která se proti němu vytvořila například u zvířete

Co je to protilátka

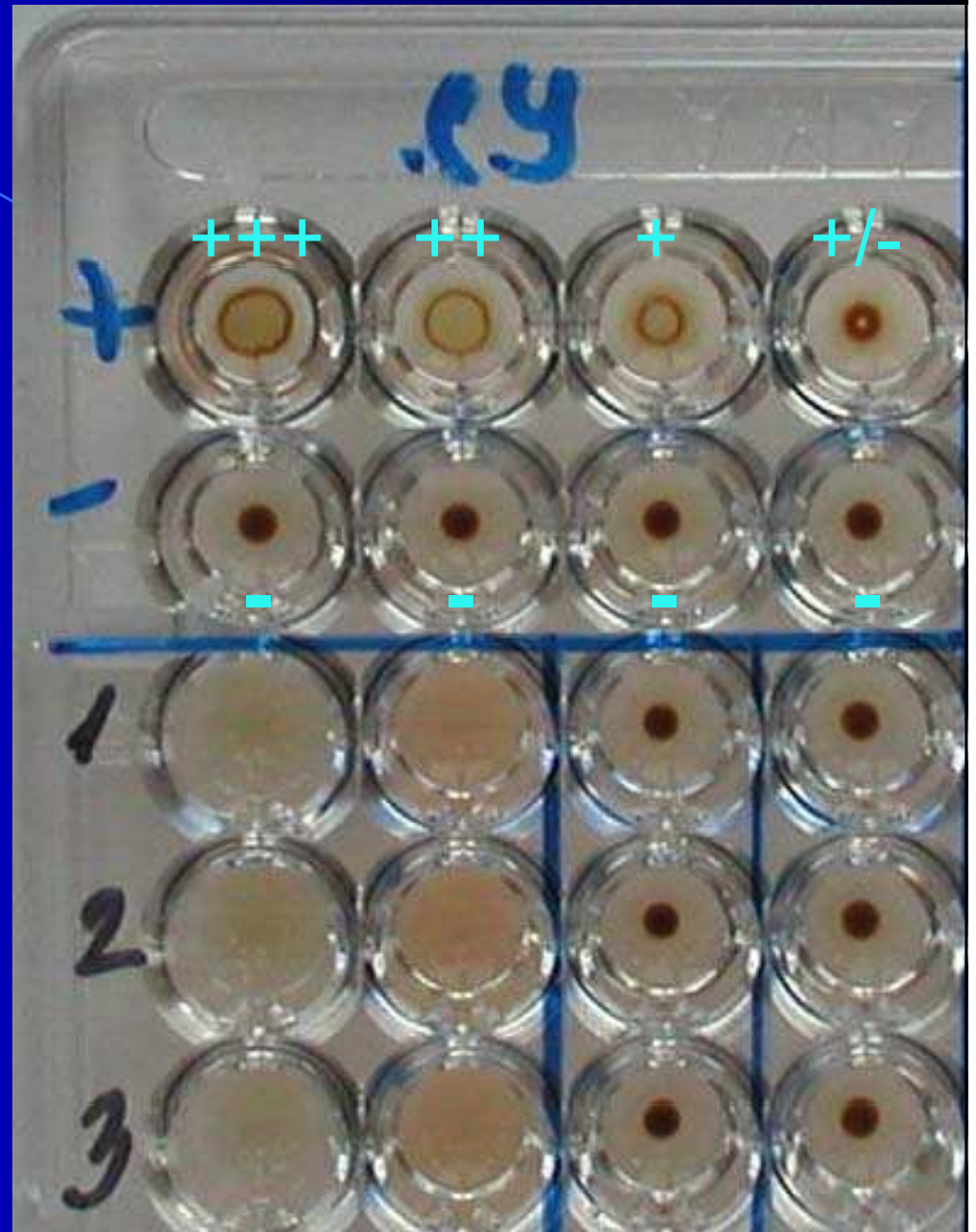
Protilátka je **bílkovina, imunoglobulin, produkt imunitního systému člověka** (nebo zvířete).

Protilátka **se dá prokázat pomocí specifického antigenu**, proti kterému se vytvořila

Serologické metody (založené na interakci antigen – protilátka)

- **pracují s reakcí antigen – protilátka** (za vzniku komplexu); vzájemně se liší způsobem detekce komplexu antigen – protilátka
- **při stejném principu metod se dají využít pro průkaz antigenu** (pomocí zvířecí protilátky) **i pro průkaz protilátky v těle pacienta** (pomocí antigenu mikroba, nebo i celého mikroorganismu)

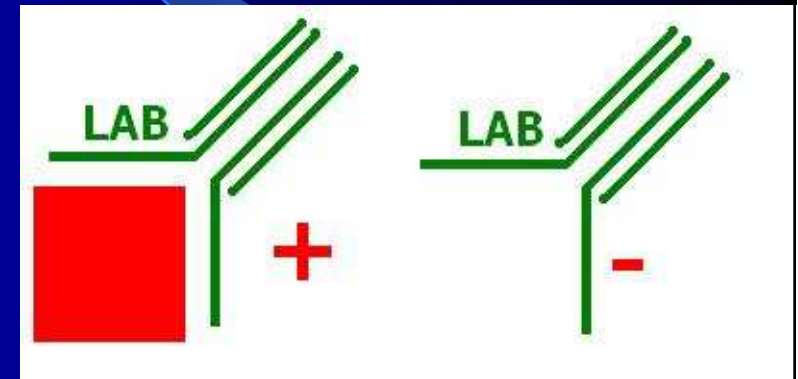
Serologická reakce v praxi



Protilátku antigenem, nebo antigen protilátkou?

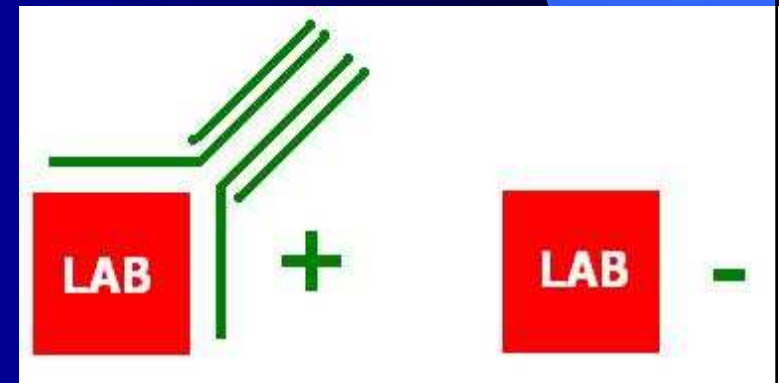
Průkaz antigenu: laboratorní protilátky (zvířecího původu) + vzorek pacienta nebo kmen mikroba.

Přímá metoda



Průkaz protilátky: laboratorní antigen (mikrobiální) + sérum (výjimečně sliny, likvor) pacienta

Nepřímá metoda



Průkaz antigenu a antigenní analýza

- **V rámci průkazu antigenu** (tedy přímého průkazu) lze ještě dále rozlišit dva podtypy:
 - **Přímý průkaz antigenu ve vzorku**, například ve vzorku mozkomíšního moku
 - **Antigenní analýza (identifikace) kmene**, izolovaného ze vzorku (například kmene meningokoka)
- U **nepřímého průkazu** naopak vždy pracujeme se vzorkem, a to **se vzorkem séra**, kde hledáme protilátky

Serologická laboratoř



Foto: archiv MÚ

Čerstvá, nebo dávno prodělaná nákaza?

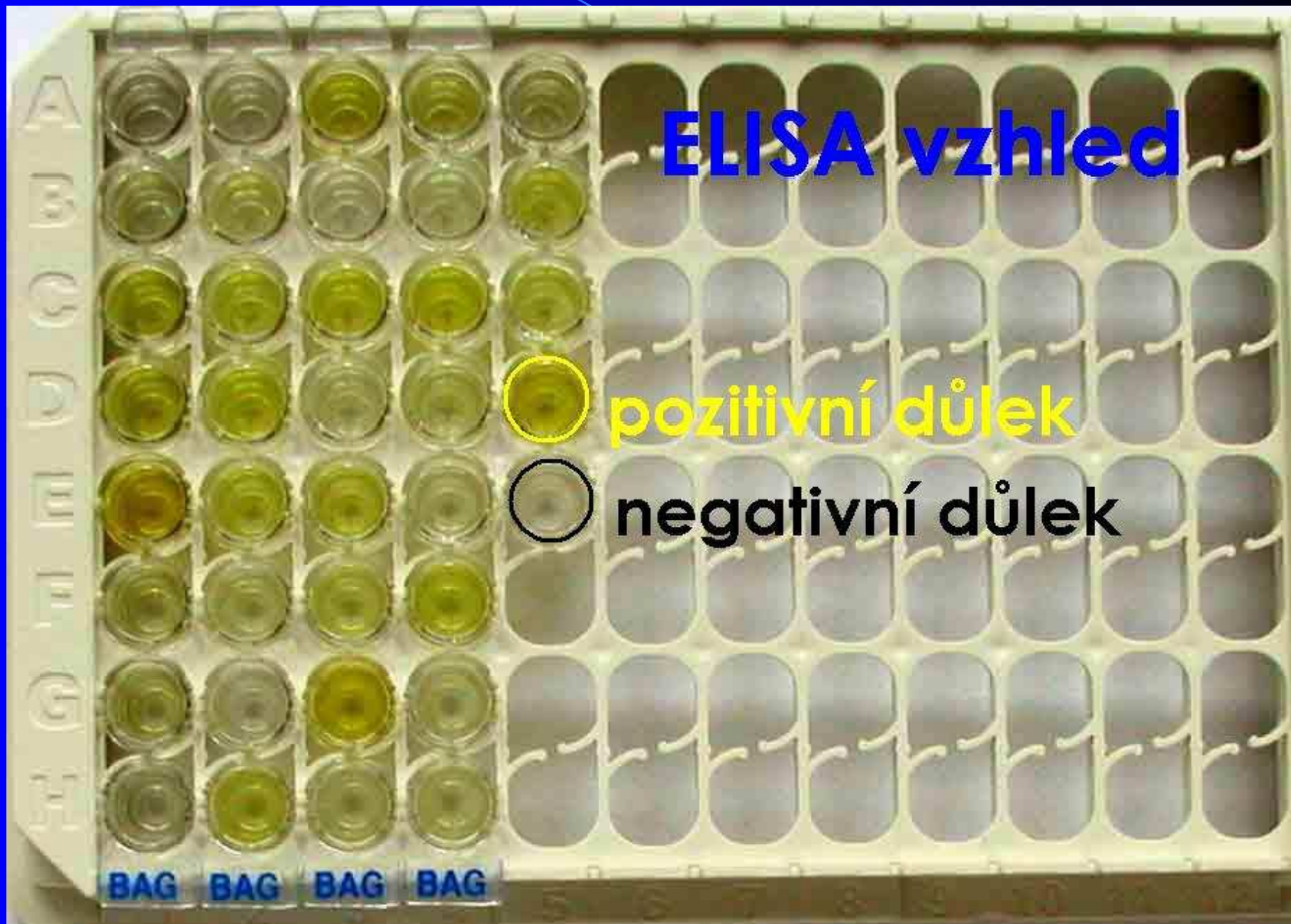
- Po nákaze přetrvávají protilátky dlouhodobě, někdy celoživotně. Samotný nálezn protilátek tedy tolik neznamena. Pro rozlišení čerstvé x dávno prodělané nákazy se používá:
 - **zjištění množství protilátek** (jako tzv. titru) a **změna tohoto množství v čase** (dynamika titru)
 - **rozlišení protilátek třídy IgM a IgG** (jen u některých novějších reakcí je to ovšem možné)
 - **stanovení tzv. avidity** (síly vazby protilátek)

Průběh protilátkové odpovědi

- **Akutní infekce:** velké množství ¹ protilátek, převážně třídy IgM
- **Pacient po prodělané infekci:** malá množství protilátek, hlavně IgG ² (imunologická paměť)
- **Chronická infekce:** různé možnosti



Ukázka serologické reakce ELISA



Nespecifické antigeny a heterofilní protilátky

- **Nespecifický antigen** (Paul-Bunnellova reakce): protilátky reagují s nějakým jiným antigenem než s antigenem mikroba
- **Heterofilní protilátky**: protilátky nejsou namířeny přímo proti mikrobu, ale proti nějaké molekule, která se při infekci tvoří (kardiolopin u syfilis)

Přehled sérologických metod

- Precipitace
- Aglutinace (a aglutinace na nosičích)
- Komplementfixační reakce (KFR)
- Neutralizace (ASLO, HIT, VNT)
- Reakce se značenými složkami:
 - Imunofluorescence (IMF)
 - Radioimunoanalýza (RIA)
 - Enzymová imunoanalýza (EIA, ELISA)
 - Immunoblotty (= zvláštní případ ELISy)

Rozdíl mezi staršími a novějšími metodami

- **Starší metody** (aglutinace, komplementfixace, neutralizace) neumějí rozlišit protilátky třídy IgG a IgM. Proto je tu nutno odebírat dva vzorky séra a sledovat dynamiku titru.
- **Novější metody** toto nepotřebují. Titry se nezjišťují, u metody ELISA se zato zjišťují hodnoty absorbance, odpovídající intenzitě reakce (množství molekul, které reagovaly)

Práce laboratoře v praxi

- Do laboratoře **přijde vzorek**
- **K nepřímému průkazu** jsou přijímány **vzorky séra** (kde hledáme protilátky)
- **K přímému průkazu** jsou přijímány **vzorky z těch míst na těle, kde předpokládáme infekci**: nejčastější jsou výtěry z krku a nosu, vzorky moče a stolice, ale někdy přijde i třeba kousek srdeční chlopně odebraný při operaci

Proces mikrobiologického vyšetřování – na všem záleží!!!

LÉKAŘ (KLINIK)

LABORATOŘ

Indikace vyšetření – zda, jaké

Vlastní provedení odběru

Transport materiálu

Rozhodnutí, jak zpracovat

Vlastní zpracování materiálu

Zaslání výsledku

Interpretace v kontextu ostat. výsledků a stavu pacienta (léčit vždy **pacienta**, ne nález)

Nashledanou příště...



Foto: O. Z.