

Lékařská mikrobiologie pro ZDRL

Týden 1: Úvod

Ondřej Zahradníček
zahradnicek@fnusa.cz

Dnes máme na programu

- Co je to **mikrobiologie**
- Co je to **humánní klinická mikrobiologie**
- Co je to **laboratoř klinické mikrobiologie** (hlavně bakteriologie), jak funguje a proč funguje **právě** tak, jak funguje
- Které jsou **lékařsky významné mikroby** a kterými metodami je zkoumáme

Zkouška, literatura

- Zkouška z lékařské mikrobiologie se dělá na konci druhého semestru. Má praktickou a teoretickou část. U teoretické části si vytáhnete trojici otázek. Otázek je celkem 120
- Doporučenou knihou je „Lékařská mikrobiologie – vyšetřovací metody“, je ale hodně objemná a také poměrně drahá. Můžete také studovat s těchto prezentací (všechny budou postupně viset na ISu ve Studijních materiálech) a dalších materiálů, které vám poskytneme.

Abych se představil

- MUDr. Ondřej Zahradníček
- povolání: **klinický mikrobiolog**, asistent na LF MU; učíme u nás bakalářské obory, mediky, zubaře i studenty přírodovědecké fakulty
- možná některé z vás povedu i v rámci bakalářské práce
- kdybyste cokoli potřebovali, obraťte se na mne
- Jelikož nemám „PhD“, nemohu vás zkoušet, zkoušet vás proto budou kolegyně, možná i kolega

Náš
ústav



Výuka

Výzkum

Provoz
(analýza
klinických
vzorků)

Foto: Archiv MU

Medici ve velké praktickárně



Historie mikrobiologie

- První mikroby („animalcula“) pozoroval Antony van Leeuwenhoek, díky tomu, že jako první sestrojil dostatečně zvětšující mikroskop
- Zásahu na dnešní podobě mikrobiologie mají Louis Pasteur a Robert Koch, kteří propracovali mikrobiologické metody a popsali mnoho jednotlivých druhů bakterií

Historie klinické 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. Ta se často dala dohromady s alergologií, a více než mikrobiologie pracuje i s pacienty, nikoli tedy jen s jejich vzorky.

Humánní klinická mikrobiologie – co to je

- Je to průnik množiny všelijakých mikrobiologických oborů a množiny lékařských oborů.
- Pro lékaře jsme příliš mikrobiologičtí. Pro mikrobiology z přírodovědecké fakulty jsme příliš lékařsky zaměřeni
- Veterináři nám nadávají (a mají někdy pravdu), že si myslíme, že klinická mikrobiologie je jen ta humánní. Ve skutečnosti existuje i veterinární obdoba – veterinární klinická mikrobiologie

Klinická mikrobiologie

Molekulární
biologie a
genetika

Mikrobiologie
rostlin

Infekční
lékařství

Obecná
mikrobiologie

**Humánní
klinická
mikrobiologie**

Epidemiologie
infekčních
nemocí

Buněčná
biologie

Veterinární
klinická
mikrobiologie

Dermato-
venerologie

Kdo jsou mikrobiologové

Základní mikrobiologický výzkum

Průmyslová
mikrobiologie

Klinická
mikrobiologie

Jiné
medicínské
obory

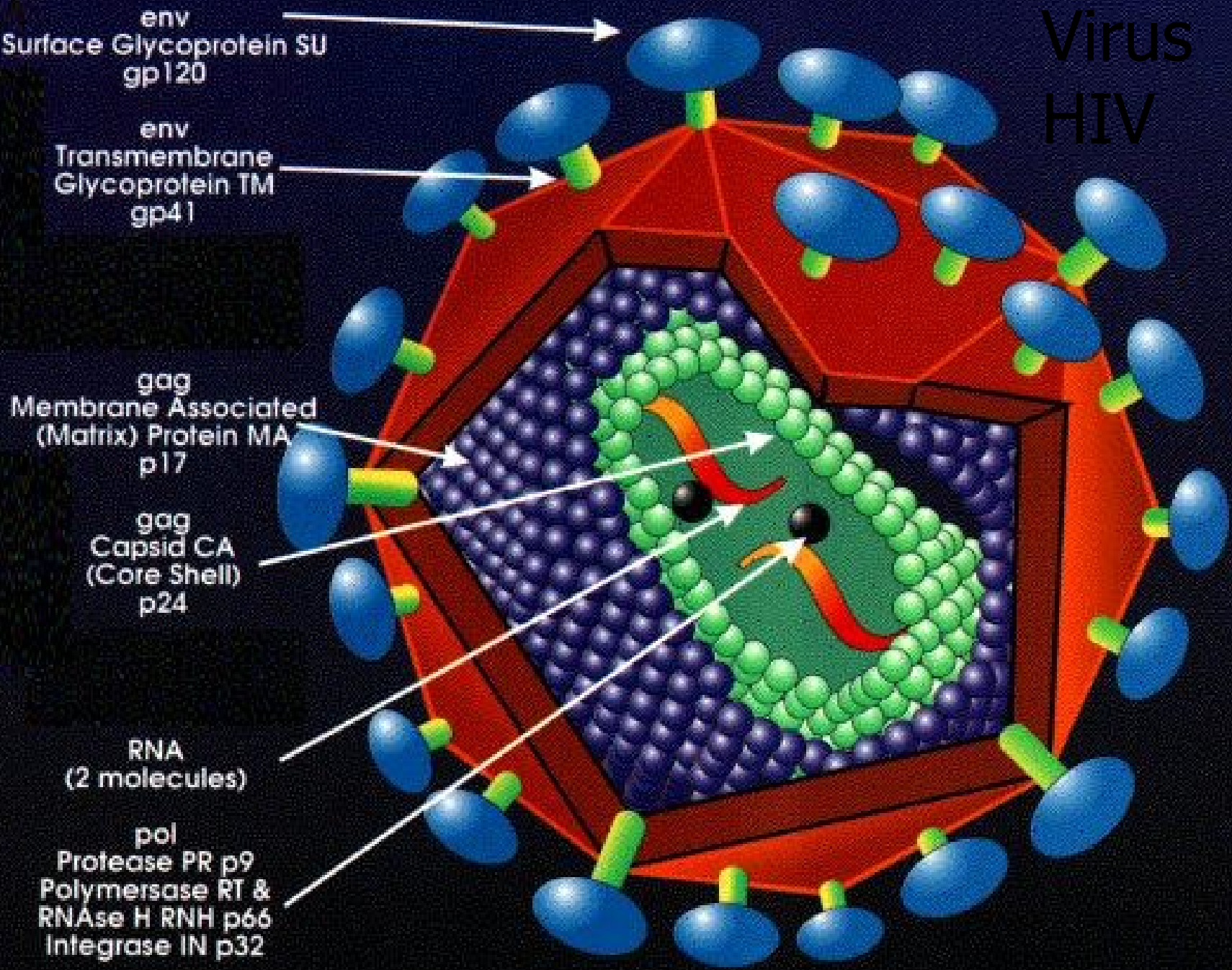
Chemicko-
technologic.
školy

Přírodovědecké
a podobné
fakulty

Lékařské
fakulty

Na našem ústavu jsou lékaři a další odborníci.

Virus HIV



Co nás čeká v tomto předmětu

- Povídání o **určování mikrobů** a vůbec o práci v laboratoři klinické mikrobiologie
- Povídání o **klinicky významných mikrobech** a jejich vlastnostech
- Něco o **dekontaminaci** a **antibiotících**
- Drobné **exkurze do styčných oblastí** mezi mikrobiologií, imunologií, epidemiologií apod.

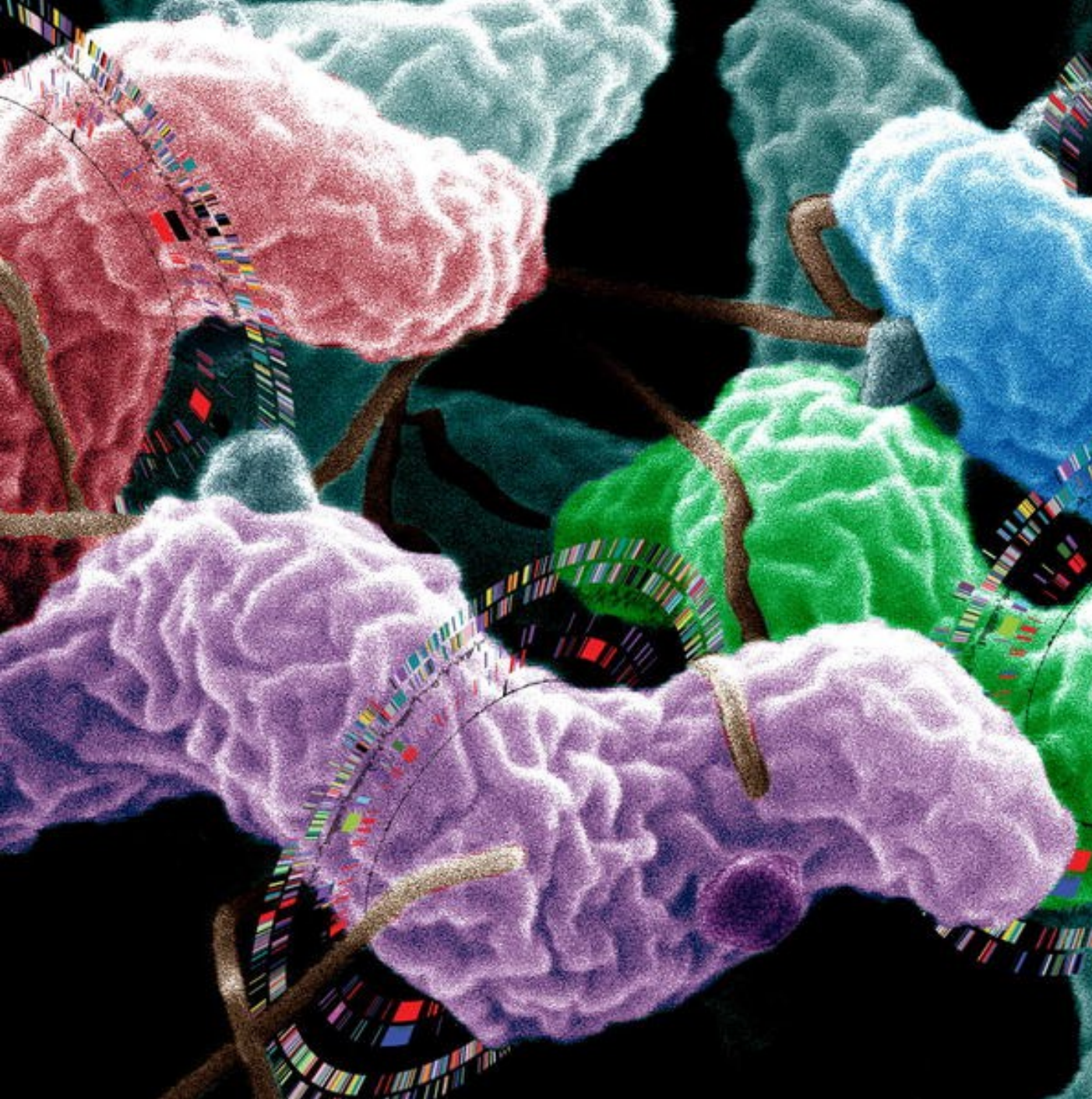
Ebola



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

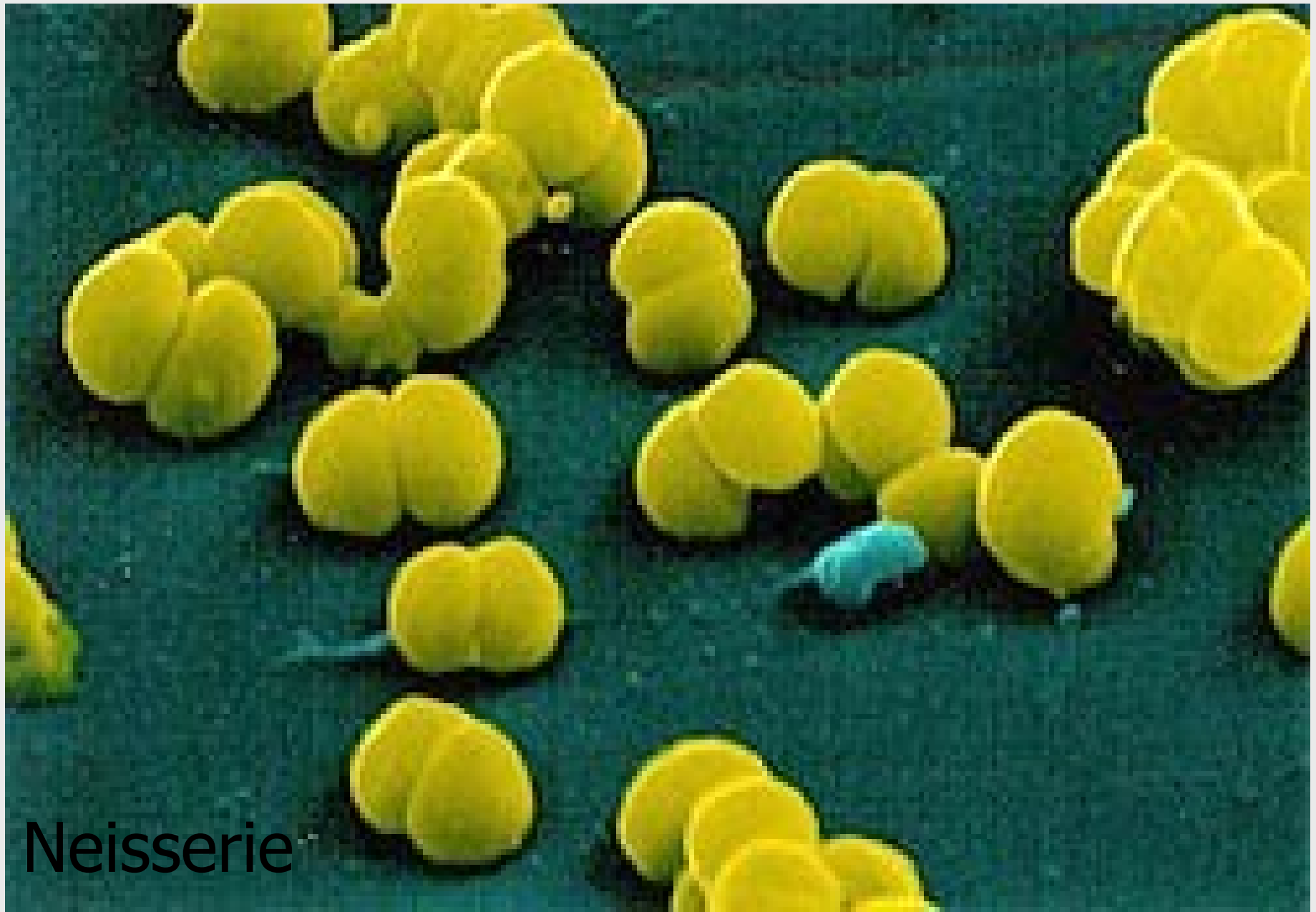
http://biology.plosjournals.org/archive/1545-7885/3/1/figure/10.1371_journal.pbio.0030040.g001-M.jpg

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

Co tyhle mikroby umí

- Přežívají v moři **v hloubce** 10 km
- Přežijí i **teploty** kolem 110 stupňů Celsia
- Vydrží značnou **radioaktivitu**
- Jsou schopny místo kyslíku „dýchat“ síru či dusík (zkrátka, mají jiný akceptor elektronů než atom kyslíku)
- Mnoho věcí ovšem umějí i mikroby lékařsky významné, jak si povíme dále



Neisserie

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 (a jiné organismy)

- **Viry** (a priony)
- **Bakterie** (třeba streptokok, *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** (většinou členovci, tedy například vši, blechy, štěnice)

Humánní klinická mikrobiologie se proto dělí na podobory:

- lékařská bakteriologie
- lékařská virologie
- lékařská mykologie
- lékařská parazitologie
- někdy se ještě zvlášť vyčleňuje serologie, tj. obor, který se zabývá průkazem protilátek proti mikrobům, případně i průkazem antigenů v séru

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

Rozdělení virů

■ DNA viry, například

- herpesviry – HSV, VZV, EBV, CMV, HHV6
- adenoviry – některé respirační virózy
- papovaviry – například urogenitální papilomaviry
- parvoviry – například původce páté dětské nemoci
- virus žloutenky B

■ RNA viry, například

- enteroviry – polio, coxsackie, ECHO
- rhinoviry – viry rýmy
- viry chřipky, parachřipky, spalniček, zarděnek, příušnic
- viry žloutenek A, C, D, E
- různé viry klíšťových encefalitid, tropických viróz, vztekliny, horeček Lassa a Ebola
- virus HIV

Rozdělení bakterií 1

- podle tvaru a uspořádání
 - koky – kulovité, tvoří dvojice, řetízky, shluky...
 - tyčinky – protáhlé, mohou být rovné, zahnuté...
 - kokotyčinky (kokobacily) – mezi koky a tyčinkami
 - spirochety – ve tvaru spirály
 - bez tvaru – např. mykoplasmata
- podle tzv. Gramova barvení (dáno typem buněčné stěny)
 - grampozitivní – barví se fialově
 - gramnegativní – barví se červeně
 - Gramem se nebarví – jiný typ stěny či bez stěny

Rozdělení bakterií 2

- podle vztahu ke kyslíku
 - striktně aerobní (rostou pouze v přítomnosti kyslíku)
 - striktně anaerobní (vyžadují atmosféru bez kyslíku)
 - fakultativně anaerobní („přepínají“ metabolismus)
 - aerotolerantní (v praxi neodlišitelné od předchozích)
 - mikroaerofilní (potřebují kyslík, ale musí ho být málo)
 - kapnofilní (potřebují kyslík, ale také zvýšený podíl CO₂ v atmosféře)
- v praxi často jen aerobní / anaerobní

Přehled klinicky významných bakterií, o kterých bude hodně řeč: část první

- Nejdůležitější grampozitivní koky:
 - *Staphylococcus*: *S. aureus*, koaguláza-negativní stafylokoky
 - *Streptococcus*: hemolytické, viridující, streptokoky bez hemolýzy (gamahemolytické)
 - *Enterococcus*: *E. faecalis*, *E. faecium*



Část druhá

- Nejdůležitější grampozitivní tyčinky:
 - *Listeria*, *Corynebacterium*, *Bacillus* (ten je sporulující, tj. tvoří spory)
- Nejdůležitější gramnegativní koky:
 - *Neisseria* (*N. gonorrhoeae* – „gonokok“, *N. meningitidis* – „meningokok“, „ústní neisserie“)
 - *Moraxella catarrhalis* – také *Branhamella catarrhalis*

Část třetí

- **Nejdůležitější gramnegativní tyčinky:**
 - **Enterobakterie:** obligátní patogeny: *Salmonella, Shigella, Yersinia*; oportunní patogeny: *Escherichia coli, Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter, Proteus, Providencia, Morganella, Serratia*,
 - **Gramnegativní nefermentující tyčinky** (popř. i kokotyčinky, event. koky): *Pseudomonas aeruginosa, Acinetobacter, Burkholderia, Stenotrophomonas*
 - **Ostatní:** *Haemophilus Pasteurella* (rány po pokousání psem); *Campylobacter, Helicobacter; Vibrio* (např. *V. cholerae*); *Legionella, Bordetella Francisella*

Část čtvrtá

- **Nejdůležitější anaeroby:**
 - *Clostridium* (*C. tetani*, *C. botulinum*, *C. difficile*, *C. perfringens* a jiná tzv. „klostridia plynatých snětí) – grampozitivní sporující tyčinky
 - *Actinomyces* – původce aktinomykózy
 - **Ostatní anaeroby** většinou působí ve směsi. Např. *Propionibacterium*, *Peptococcus*, *Bacteroides*, *Prevotella*, *Fusobacterium* či koky *Veillonella* gramnegativní.

Část pátá

- Nejdůležitější spirochety:
 - *Treponema, Borrelia, Leptospira*
- Nejdůležitější z ostatních bakterií:
 - *Mycobacterium (M. tuberculosis, M. leprae), Mycoplasma (M. pneumoniae, M. hominis), Ureaplasma (U. urealyticum), rickettsie, chlamydie*

Diagnostika: průkaz a určování mikroorganismů

- **Klinická mikrobiologie v praxi** spočívá v tom, že **lékař** (ať už je to obvodní lékař, ambulantní specialista či lékař z kteréhokoli oddělení nemocnice) **pošle do laboratoře vzorek**
- **Úkolem klinickomikrobiologické laboratoře** je **prokázat** v takovém vzorku případnou **přítomnost mikrobů** a pokud tam jsou, tak je také **určit**.
- Určení nemusí být přesné, ale musí poskytnout **dostatek informací pro léčbu**

Co je to vzorek

- Vzorek** je to, co je odebráno pacientovi a přichází na vyšetření do laboratoře, většinou:
- **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.

Cíle mikrobiologického vyšetření

- Zjištění mikrobiálního agens
 - **přímo** (prokážeme mikroba, jeho součást či produkt ve vzorku; v případě izolačních metod sem patří i identifikace kmene)
 - **nepřímo** (prokážeme protilátky, které si makroorganismus vytvořil jako odezvu na antigenní výzvu)
- Jen někdy též: **zjištění in vitro citlivosti mikrobiálního agens na antimikrobiální látky** (kultivovatelné bakterie a houby)

Přehled metod

- **Metody přímé: Hledáme mikroba, jeho část či jeho produkt** (produktem může být například nějaký bakteriální jed – toxin)
 - **Přímý průkaz ve vzorku** – pracujeme s celým vzorkem (močí, krví, výtěrem z krku a podobně)
 - **Identifikace kmene** – určení vypěstovaného izolátu
- **Metody nepřímé: Hledáme protilátky.** Protilátka není součástí ani produktem mikroba – je produktem makroorganismu, odezvou na činnost mikroba

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

Proč se mikrobiologická diagnostika zabývá nejvíc bakteriemi

- Houby a paraziti, při vší úctě, způsobují relativně méně onemocnění člověka než viry a bakterie. Problematika mykologie a parazitologie je hodně speciální a moc se nehodí do všeobecné mikrobiologie
- Zabývat se **viry** je obtížné a zatím to nemá zpravidla příliš velký praktický dopad (to „zatím“ znamená, že situace se možná změní po praktickém zavedení zjišťování citlivosti na antivirotika)

Proč je méně klinických virologů než bakteriologů

- Mnohá virová onemocnění (hlavně dětská) se projevují **typickými klinickými příznaky** a nevyžadují laboratorní diagnostiku
- Mnohá virová onemocnění se **neléčí kauzálně, tj. léčí se pouze příznaky**. Je-li tomu tak, není nutno bezpodmínečně znát původce.
- Virologická diagnostika je **obtížnější a dražší** a proto se pro ni rozhodujeme jen když je opravdu pádný důvod

Jak je organizována laboratoř klinické mikrobiologie

- **Příjem vzorku.** Dobrý primář se pozná podle toho, že ví, že právě příjem je nejdůležitější součástí laboratoře.
- **Vlastní vyšetření.** Pokud je kultivační, trvá několik dnů až mnoho týdnů (některé viry, plísně, mykobakteria). Některá jiná (mikroskopie, průkaz antigenu) mohou být hotová během několika desítek minut.
- **Expedice výsledku** v takové formě, aby umožnila správnou interpretaci

Rozdíl mezi klinickou bakteriologií a bakteriologickým výzkumem

- Badatel má relativně **dost času**. Když mu to dlouho trvá, nikdo na něj vztekle neřve do telefonu.
- Badatel na druhou stranu musí **diagnostikovat přesně**. Klinickému mikrobiologovi jeho klienti rádi odpustí, pokud bakterii určí jen rodově či skupinově, jen když to rychle.
- *Klinika ostatně více zajímají léčebné možnosti, než přesný název mikroba.*

Rozdíl mezi klinickou mikrobiologií a klinickou biochemií – 1

- Doba biochemického stanovení závisí převážně na organizaci práce v biochemické laboratoři
- Doba mikrobiologického vyšetření závisí převážně na tom, jak rychle se těm potvůrkám uráčí vyrůst; sebeúpornější a sebezavilejší ortoped či doktor z ARK jim nedokáže poručit. Neplatí to ovšem u metod, kde se mikroby nekultivují

Rozdíl mezi klinickou mikrobiologií a klinickou biochemií – 2

- Biochemik (ale i serolog) pracuje takto:
 - Stanovení 1 → výsledek 1
 - Stanovení 2 → výsledek 2
 - Stanovení 3 → výsledek 3
- Bakteriolog pracuje jinak:
 - Vzorek → metoda → podle výsledku případně kupa dalších metod → možná časem i nějaký výsledek
 - Bakteriologie se mnohem hůř automatizuje

Rozdíl mezi klinickou mikrobiologií a klinickou biochemií – 3

- Dalším rozdílem jsou i **typy vzorků**. Biochemici pracují téměř výhradně se sérem, plazmou a močí. Mikrobiolog u nepřímého průkazu rovněž pracuje se sérem. U přímého průkazu je však nutno použít vzorek odpovídající lokalizaci mikroorganismu. A to může být skoro cokoli.

Typy vzorků

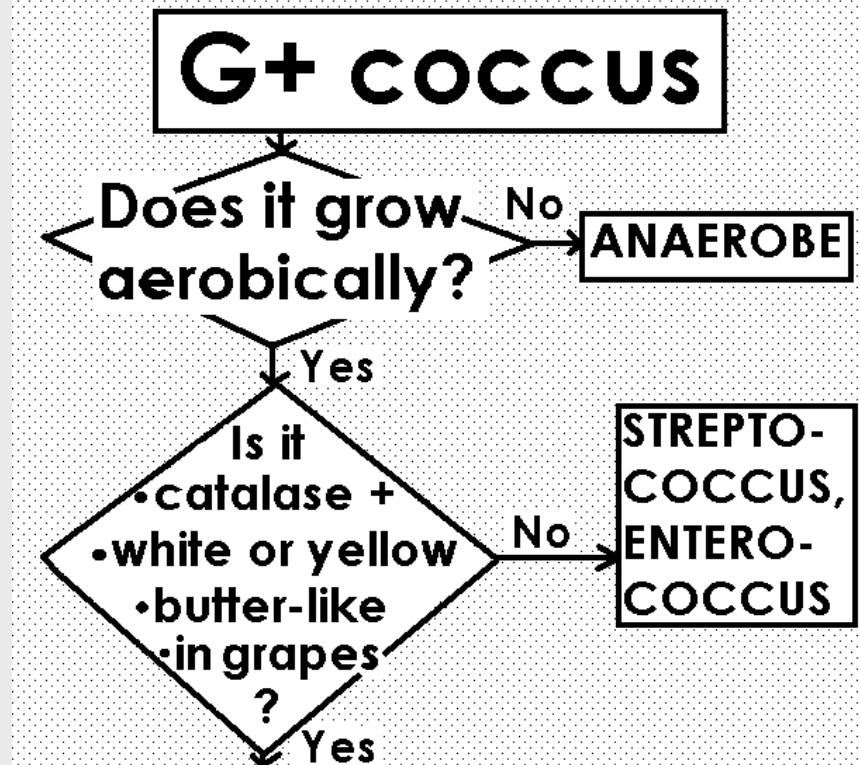
- **Tekuté a kusové materiály** se zasílají zpravidla ve sterilních nádobkách různého tvaru a velikosti. Může to být krev, moč, mozkomíšní mok a různé jiné tělní tekutiny
- **Výtěry a stěry** se zasílají zpravidla zanořené do transportní pudy, nejčastěji Amiesovy
- **Zvláštní případy:** zaslání sklíčka s nátěrem, speciální odběrové soupravy (hemokultury) aj.

Algoritmy

- Bakteriologické vyšetření je ve své podstatě algoritmus. Je podobné kriminalistice – postupně se zužuje okruh podezřelých, až je pachatel usvědčen. (A jako v kriminalistice, i zde mohou nastat „justiční omyly“)

Příklad

Diagnostika stafylokoků. Poté, co zjistíme, že náš kmen je grampozitivní kok, určíme ho dalšími testy. Přitom vědomě pomíjíme klinicky nevýznamné a vzácné rody a druhy. Riziko omylu ovšem musí být přijatelné.



STAPHYLOCOCCUS	
Koagulase + Clumping f. + (Haemolysis +) (Yellowish) (Larger grapes)	Koagulase - Clumping f. - (Haemolysis -) (Rather white) (Smaller grapes)
ST. AUREUS	COAG. NEG. ST.

For more precise diagnostic, especially inside of the group of coagulase-negat. staphylococci, BIOCHEM. TESTS are used

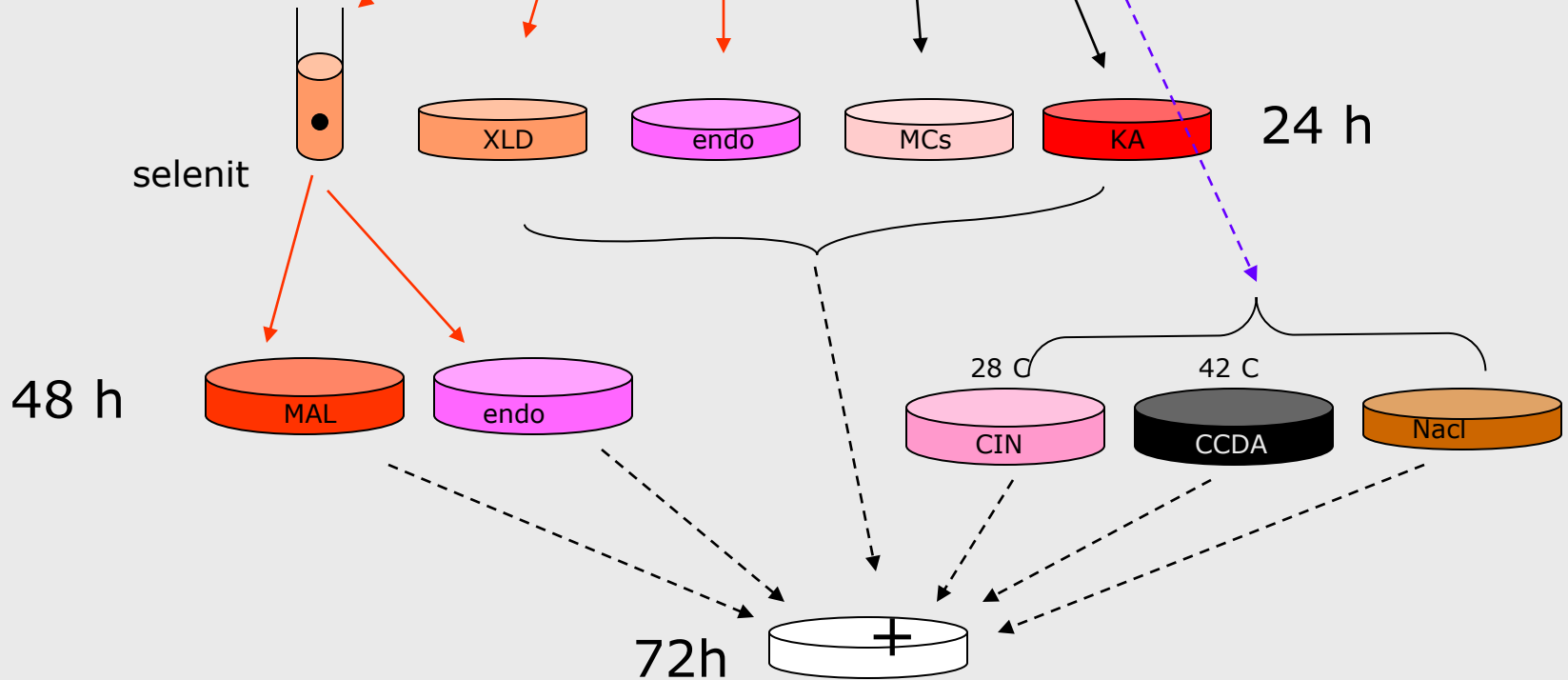
Časový faktor

- V „den 0“ obvykle pouze přijde vzorek. Provést lze leda mikroskopii, přímý průkaz antigenu ve vzorku či průkaz DNA
- V „den 1“ či „den 2“ je k dispozici výsledek kultivace. Když je podezřelý nebo pozitivní, pokračuje diagnostika do dalšího dne
- Negativní výsledky se expedují v „den 1“ nebo „den 2“, pozitivní v „den dva až „den 5“ podle situace

Den 0. (přijatá stolice)

Obrázek L. Černohorské

Příklad



identifikace

Negativní výsledek je za 48h

Pozitivní za 72h a později

*Není-li uvedeno jinak kultivace probíhá při 37 C

Nashledanou

Příště budeme pokračovat povídáním
o morfologii mikrobů