

# **Lékařská mikrobiologie pro ZDRL**

**Týden 1: Úvod**

# 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 –
  - na konci druhého semestru. Má praktickou a teoretickou část. U teoretické části si vytáhnete trojici otázek. Otázek je celkem 120
- Doporučenou knihou je Miroslav Votava a kol. „Lékařská mikrobiologie – vyšetřovací metody“. Prezentace z přednášek budou postupně viset na ISu ve „Studijních materiálech“ spolu s dalšími materiály, které vám poskytneme.

Náš  
ústav



Výuka

Provoz  
(analýza  
klinických  
vzorků)<sup>4</sup>

Výzkum

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.

# 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

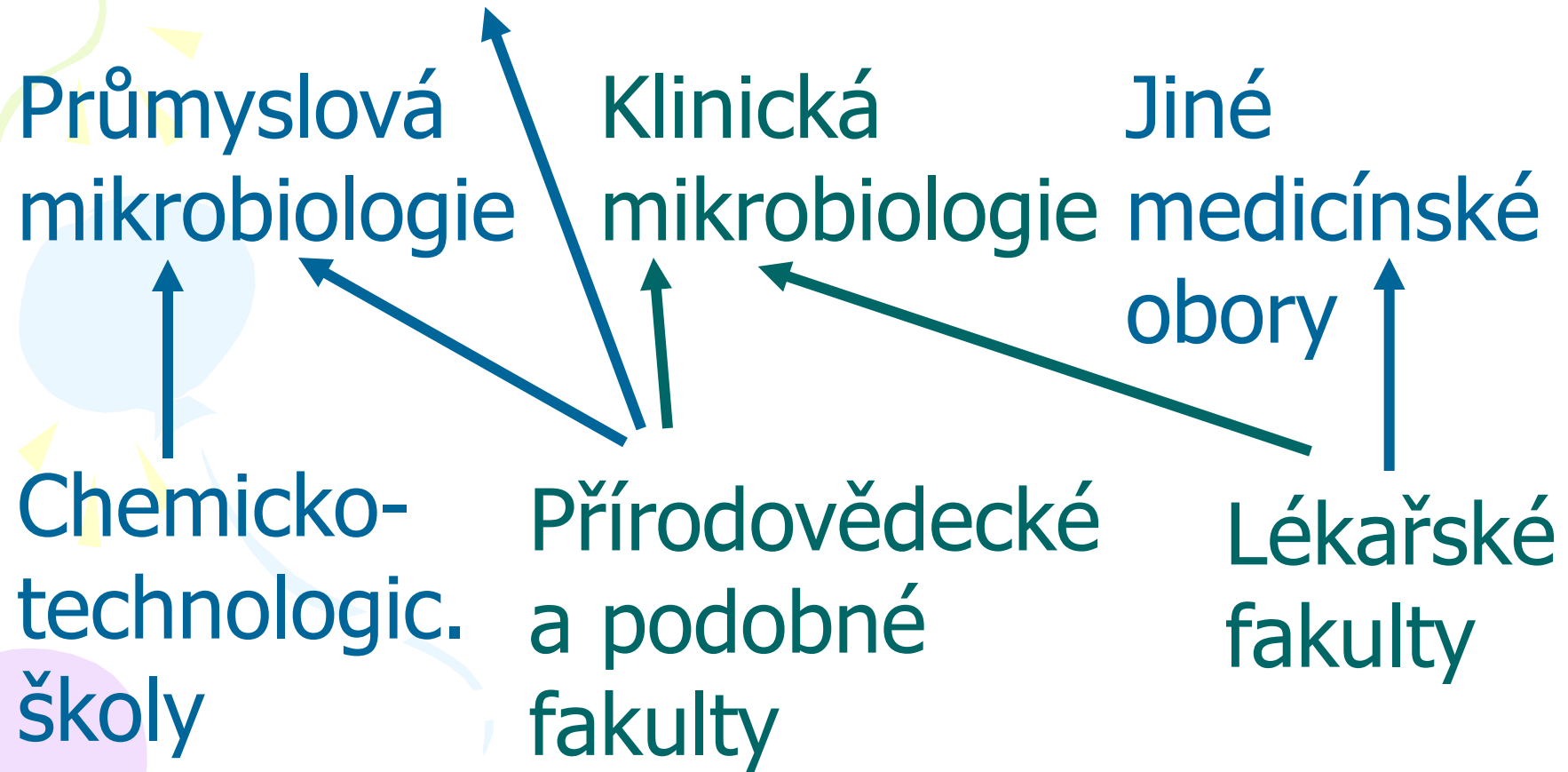
Buněčná  
biologie

Veterinární  
klinická  
mikrobiologie

Dermato-  
venerologie

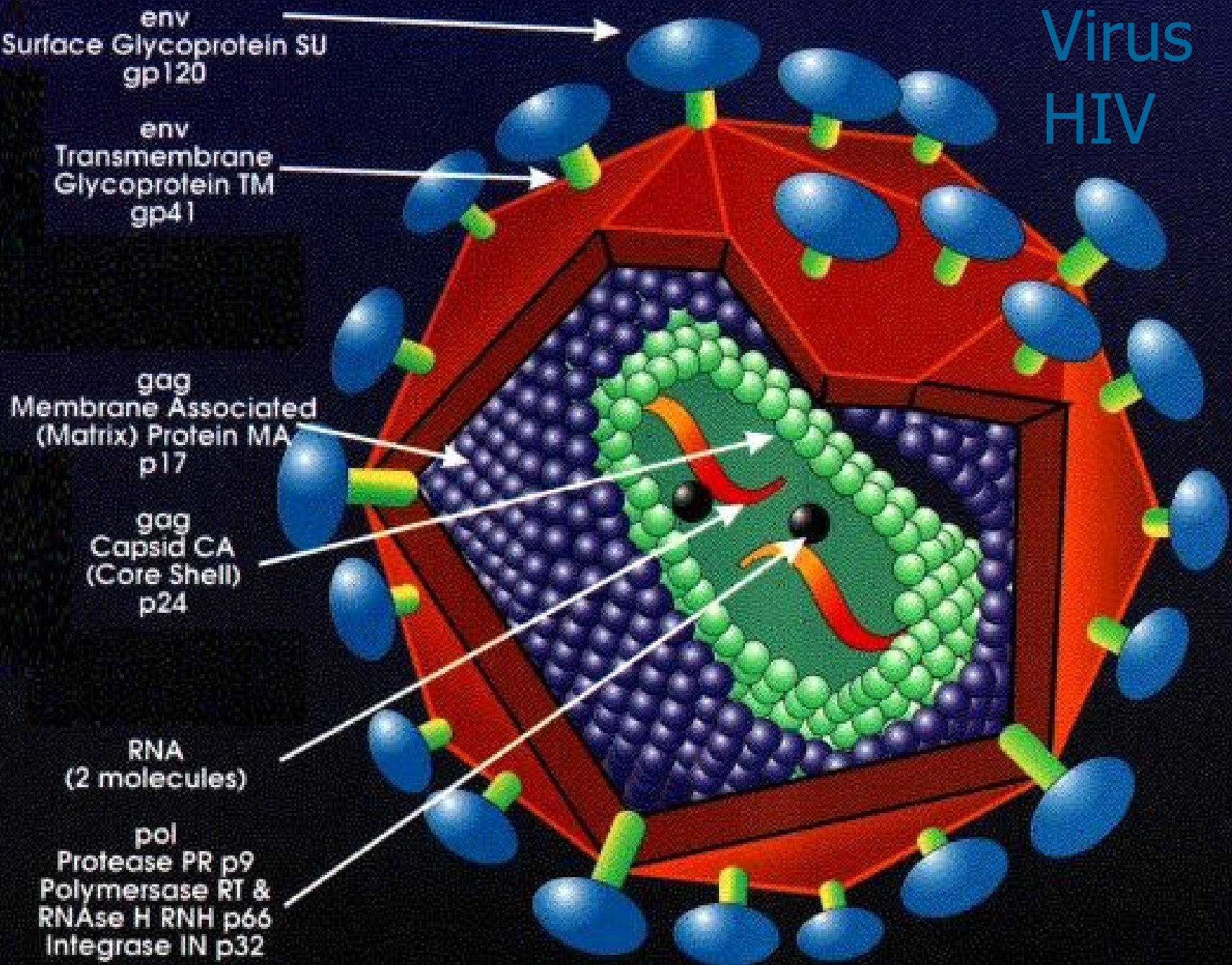
# Kdo jsou mikrobiologové

## Základní mikrobiologický výzkum



Na našem ústavu jsou lékaři a další odborníci. 10

# 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 antibioticích**
- Drobné **exkurze do styčných oblastí** mezi mikrobiologií, imunologií, epidemiologií apod.

# Ebola

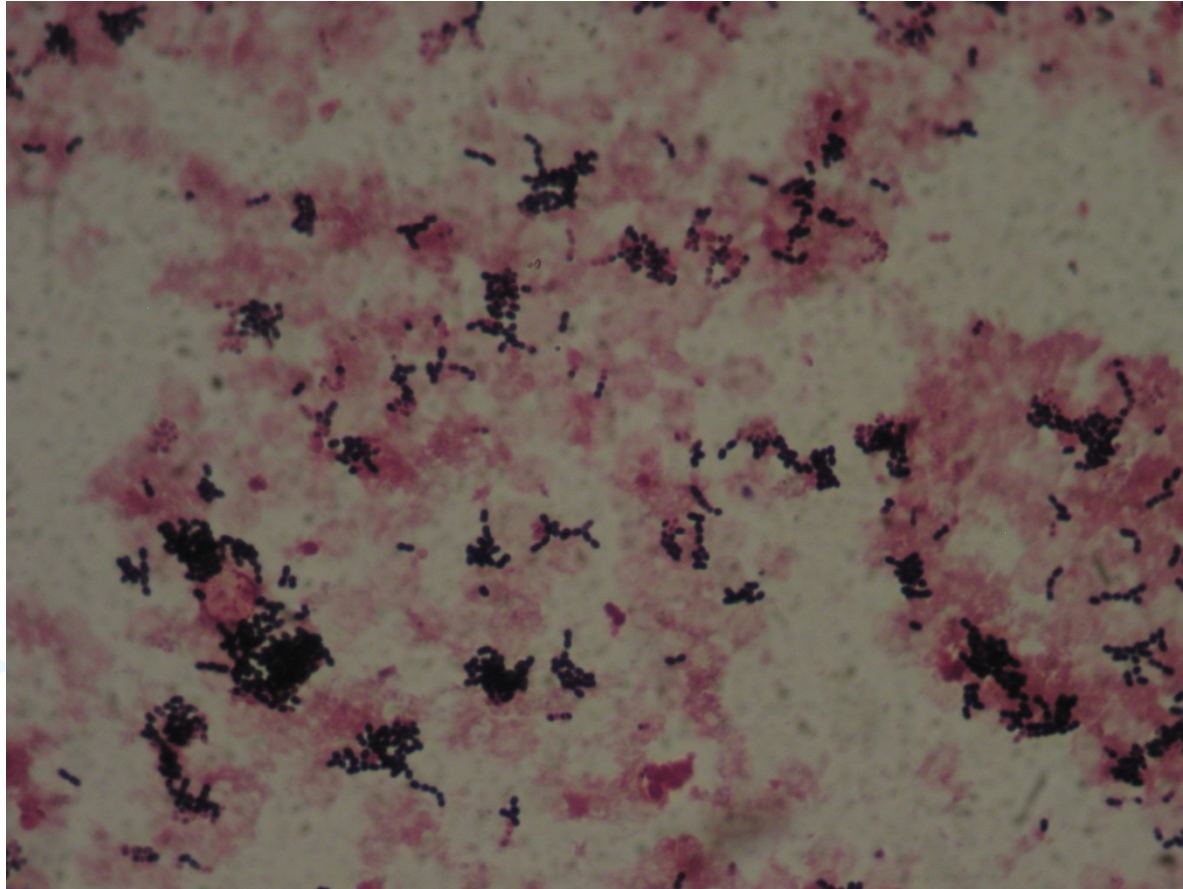


# Co je to mikrob?!

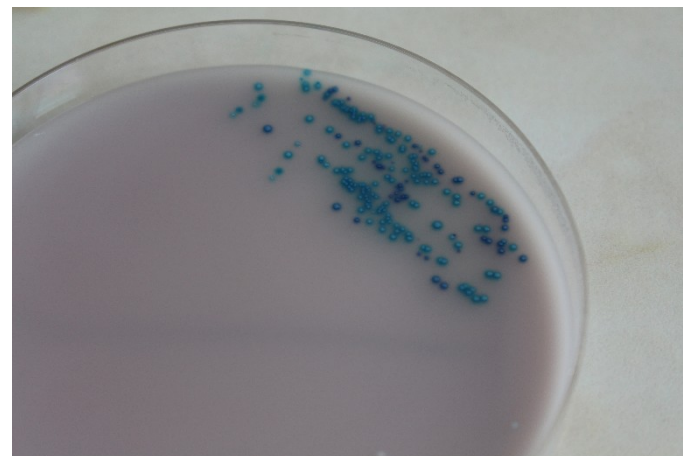
- **Musí to být živé.** Zrníčko prachu není mikrob, i když je mikroskopické
- **Musí to být mikroskopické.** Žirafa není mikrob, i když je živá

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

# G+ koky



# Bakterie na kultivačních půdách





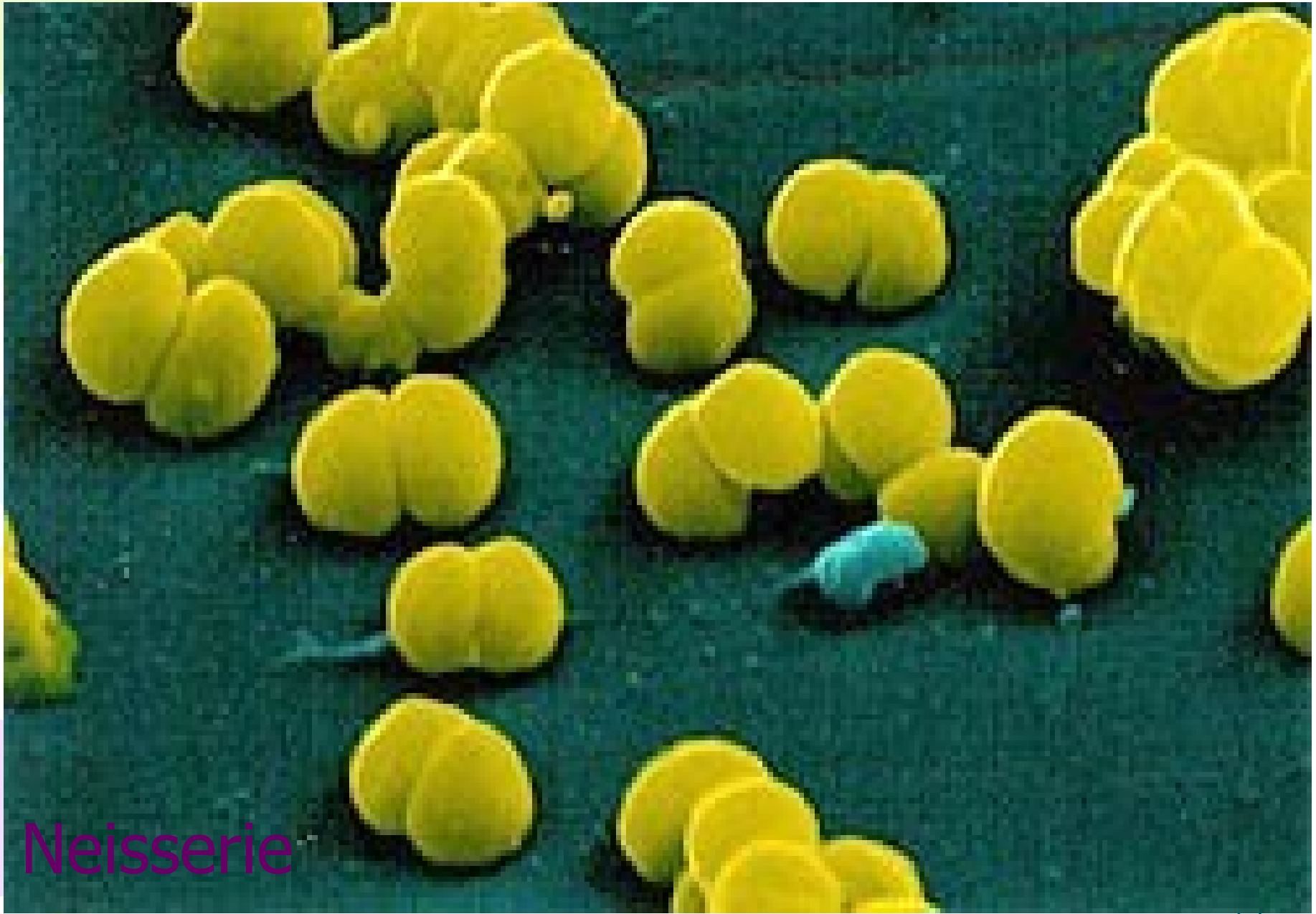
# Co jsou všechno mikroby

- Mikroby jsou tedy například **mikroskopické řasy a sinice, archea** (dříve archeobaktérie), různé organismy schopné vydržet v extrémních podmínkách - extremofilové
- Teplota, pH, koncentrace soli
- hluboko **pod mořem** nebo **horkých pramenů**
- jsou zajímavé a úžasné



# Co tyhle mikroby umí

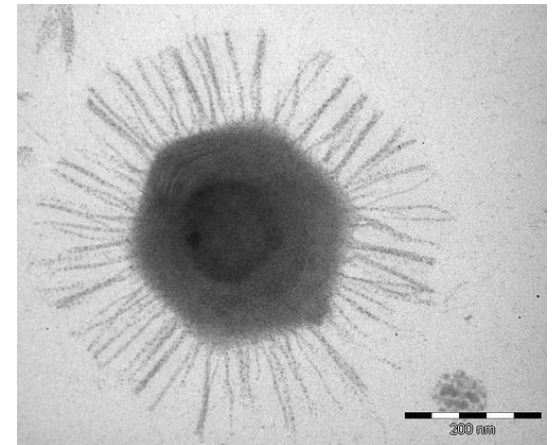
- Přežívají v moři **v hloubce** 10 km
- Přežijí i **teploty** kolem 110 °C
- Vydrží značnou **radioaktivitu**
- Jsou schopny místo kyslíku „dýchat“ síru či dusík (zkrátka, mají jiný akceptor elektronů než atom kyslíku)
- Hrají významnou roli v koloběhu prvků, zejména **uhlíku, dusíku a síry**
- Mnoho věcí ovšem umějí i mikroby lékařsky významné, jak si povíme dále



# Neisserie

# Třídění živých organismů

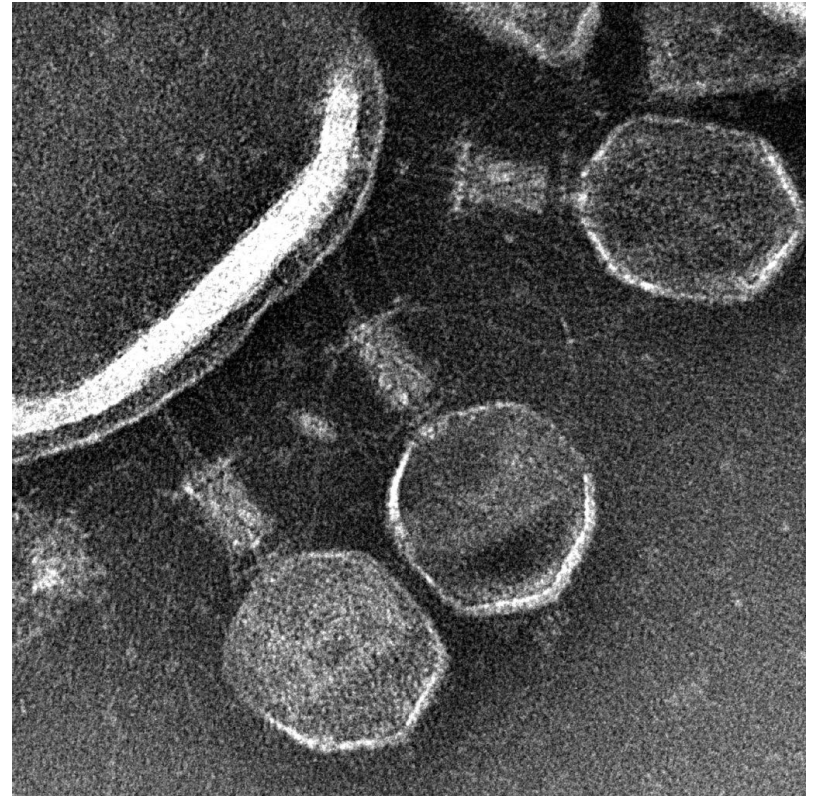
- **Priony** – *neobsahují DNA, většinou se vůbec nepovažují za živé organismy*
- **Viry a bakteriofágy**
- **Buněčné organismy**
  - **Archea** (archeobakterie)
  - **Eubacteria** (eubakterie)
  - **Eucarya** (eukaryotní organismy)
    - jednobuněčné
    - mnohobuněčné





# Klinicky významné mikroby

- Klinicky významné mikroby jsou takové, které jsou **významné pro lidské tělo**
- „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).



<http://www2.warwick.ac.uk/fac/sci/lifesci/research/facilities/imaging/imagegallery/phages--80000x-0025c.jpg>

# 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** (např. původce malárie)
    - **Motolice** (např. motolice jaterní)
    - **Hlístice** (např. roup nebo škrkavka)
    - **Tasemnice** (např. 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 sérologie, tj. obor, který se zabývá průkazem protilátek proti mikrobům, případně i průkazem antigenů v séru (nejen)





# 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 podmínek vnějšího prostředí
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

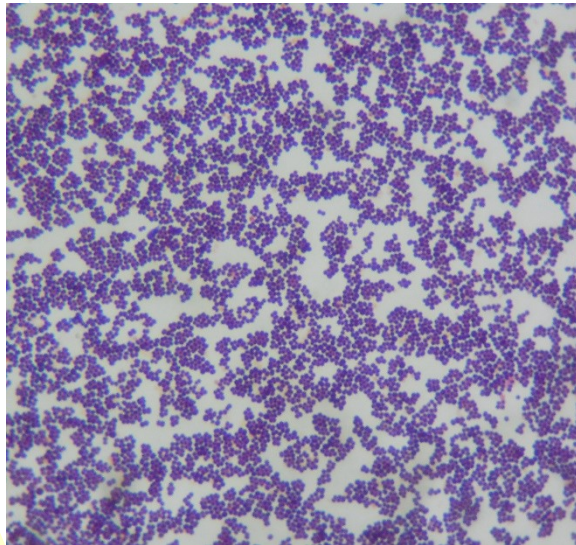
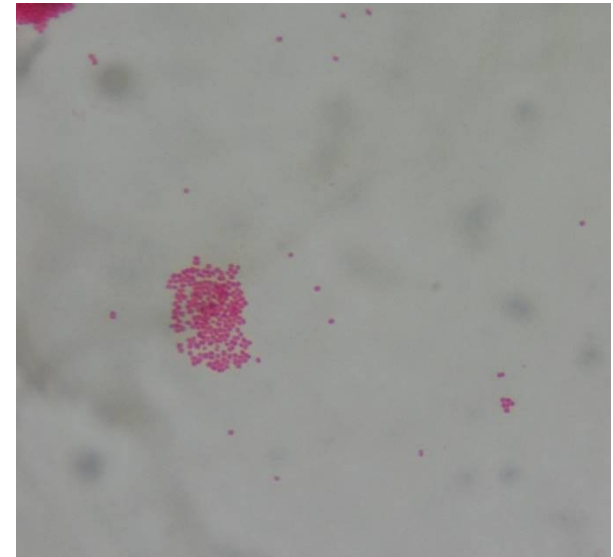
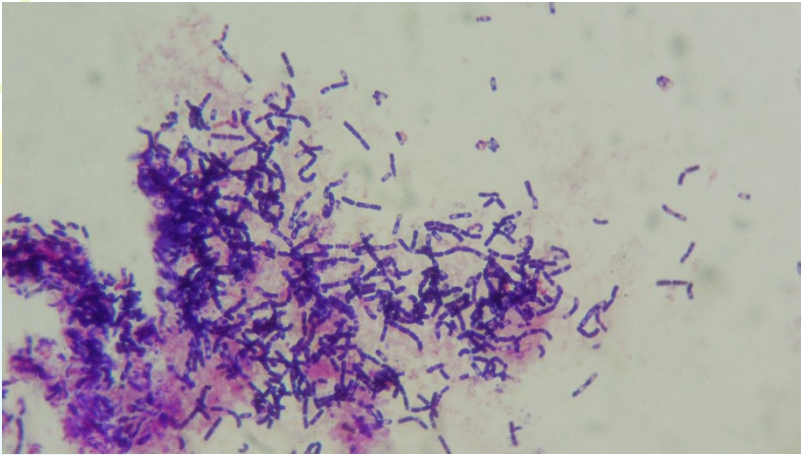
# Rozdělení virů

- 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
  - spirochéty – 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

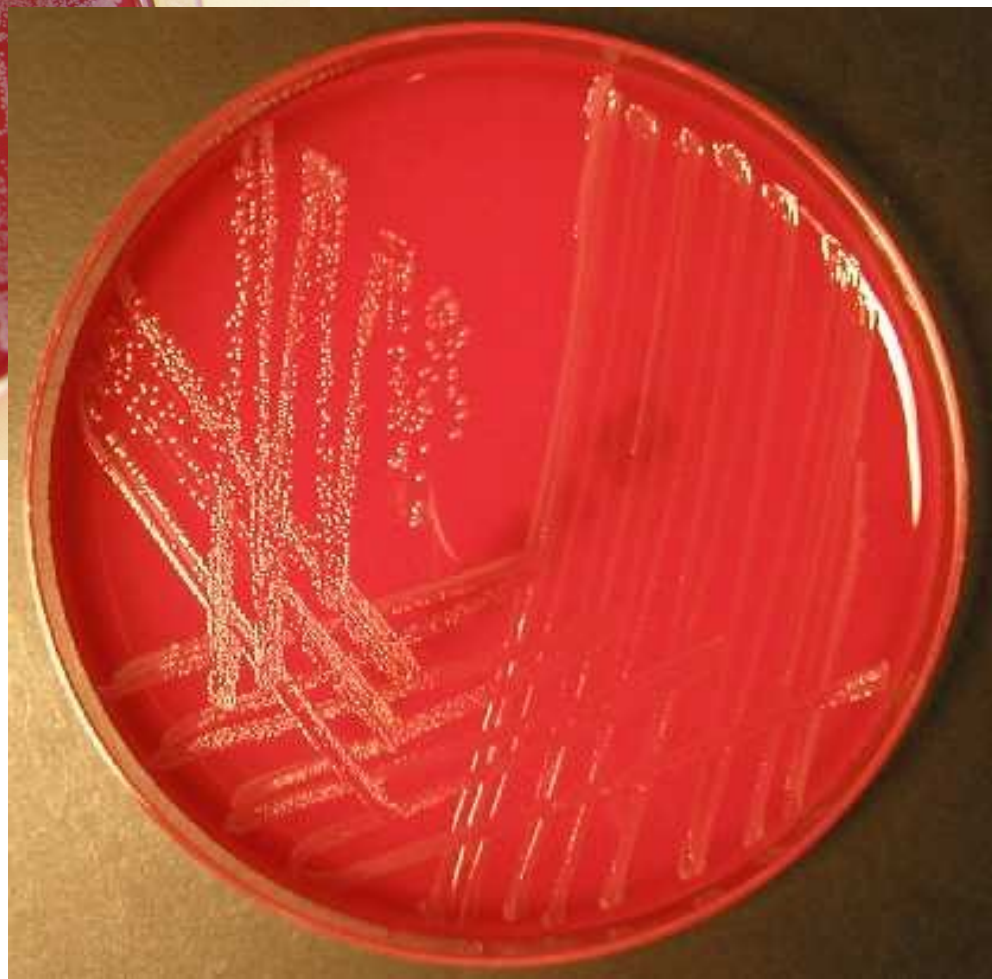
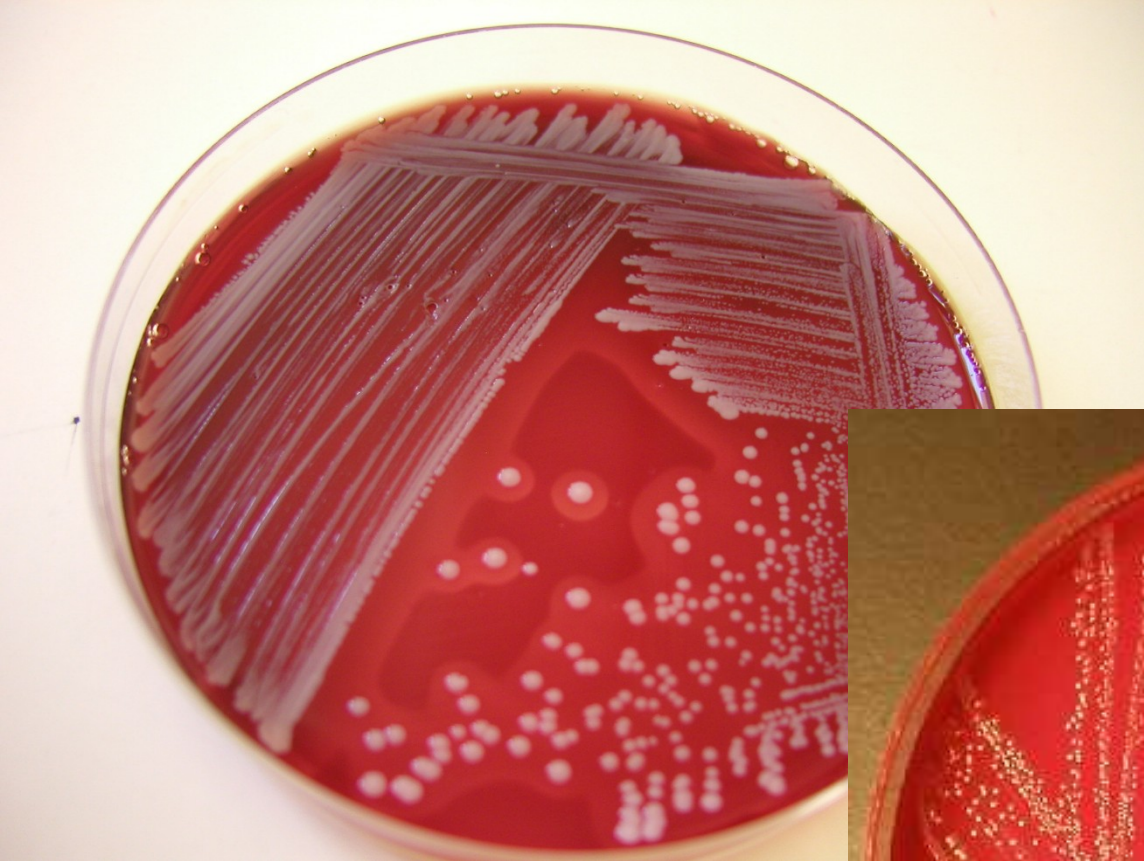


# Rozdělení bakterií 2

- 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 CO<sub>2</sub> 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 sporulující 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**.

# 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
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

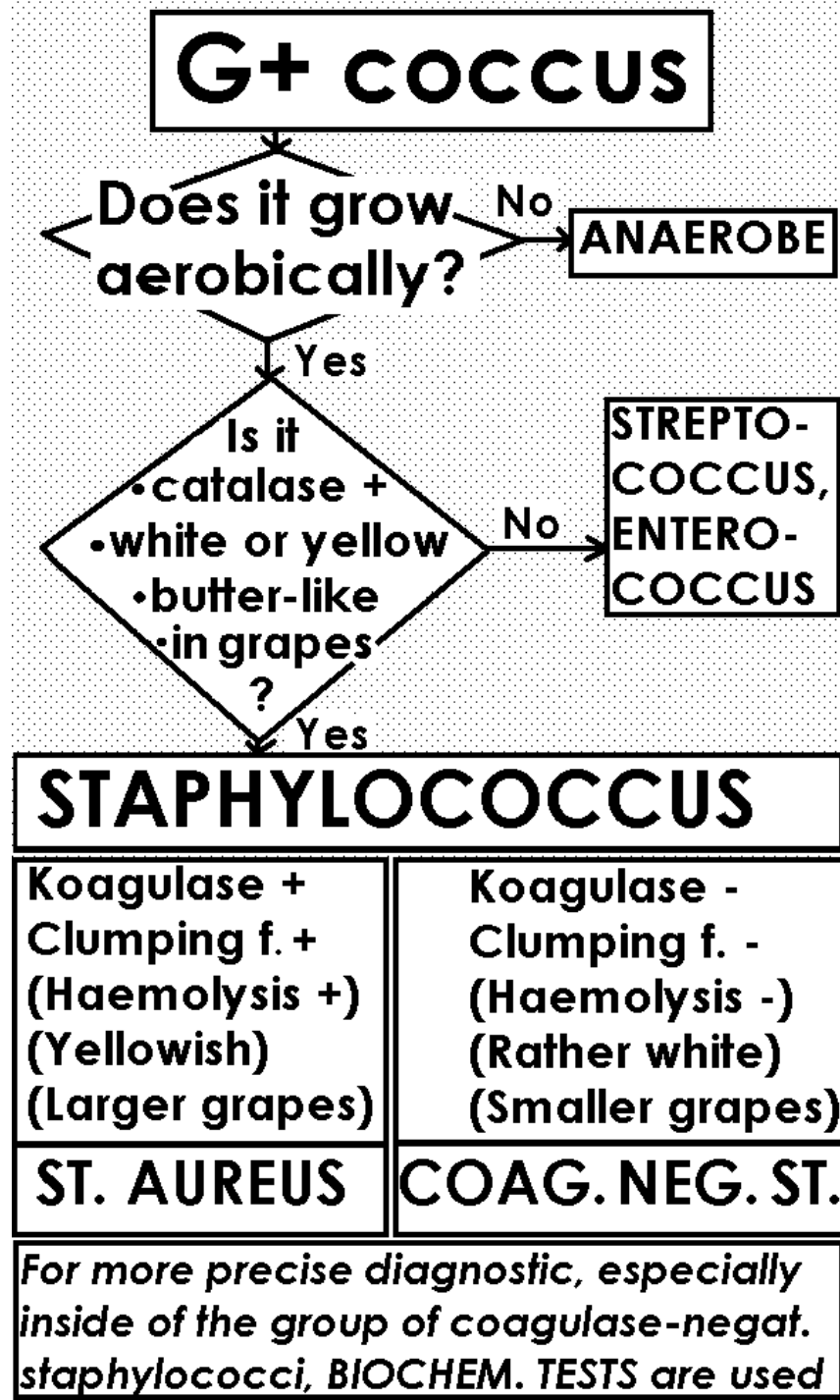
- Tekuté a kusové materiály se zasílají zpravidla ve sterilních nádobkách různého tvaru a velikosti. Může to být krev, moč, mozkomíšní mok a různé jiné tělní tekutiny
- Výtěry a stěry se zasílají zpravidla zanořené do transportní půdy, nejčastěji **Amiesovy**
- Zvláštní případy: zaslání sklíčka s nátěrem, 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, určujeme ho dalšími testy. Přitom vědomě pomíjíme klinicky nevýznamné a vzácné rody a druhy. Riziko omylu ovšem musí být přijatelné.

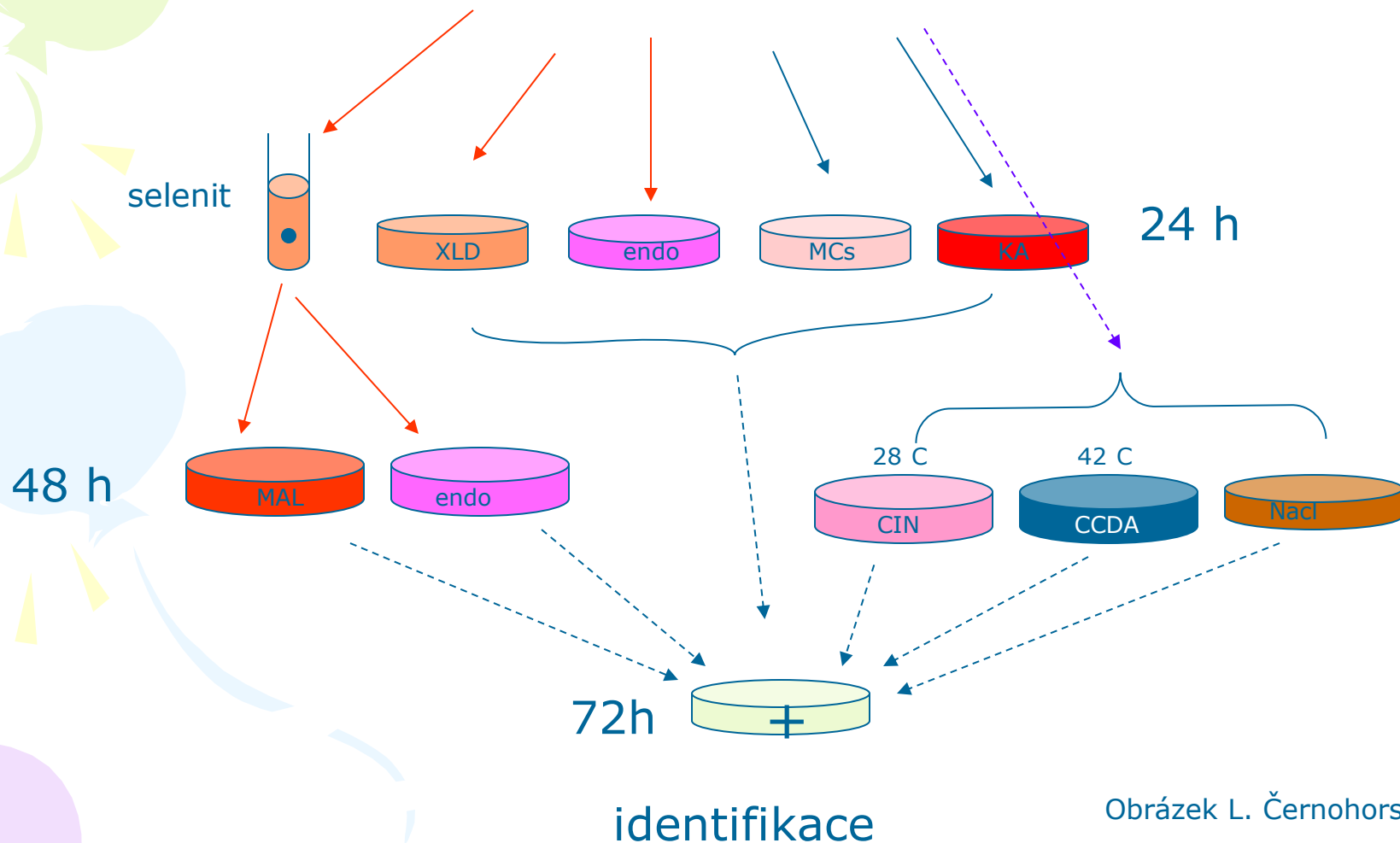


# Časový faktor

- 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

# Příklad

Den 0. (přijatá stolice)



Obrázek L. Černohorské

Negativní výsledek je za 48h

Pozitivní za 72h a později

\*Není-li uvedeno jinak, kultivace probíhá při 37 C



Na shledanou  
příště