

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)⁴

Výzkum

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

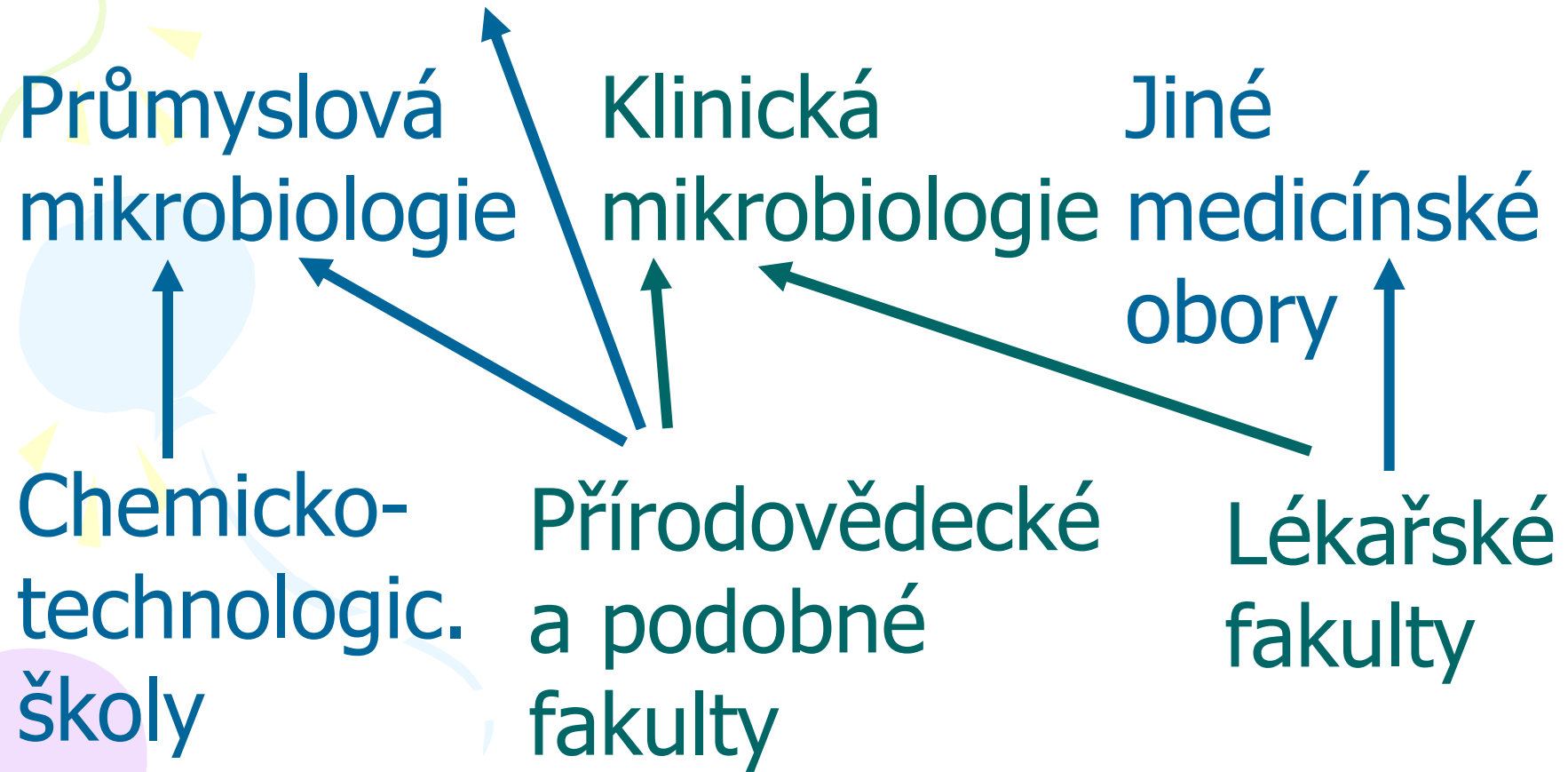
Buněčná
biologie

Veterinární
klinická
mikrobiologie

Dermato-
venerologie

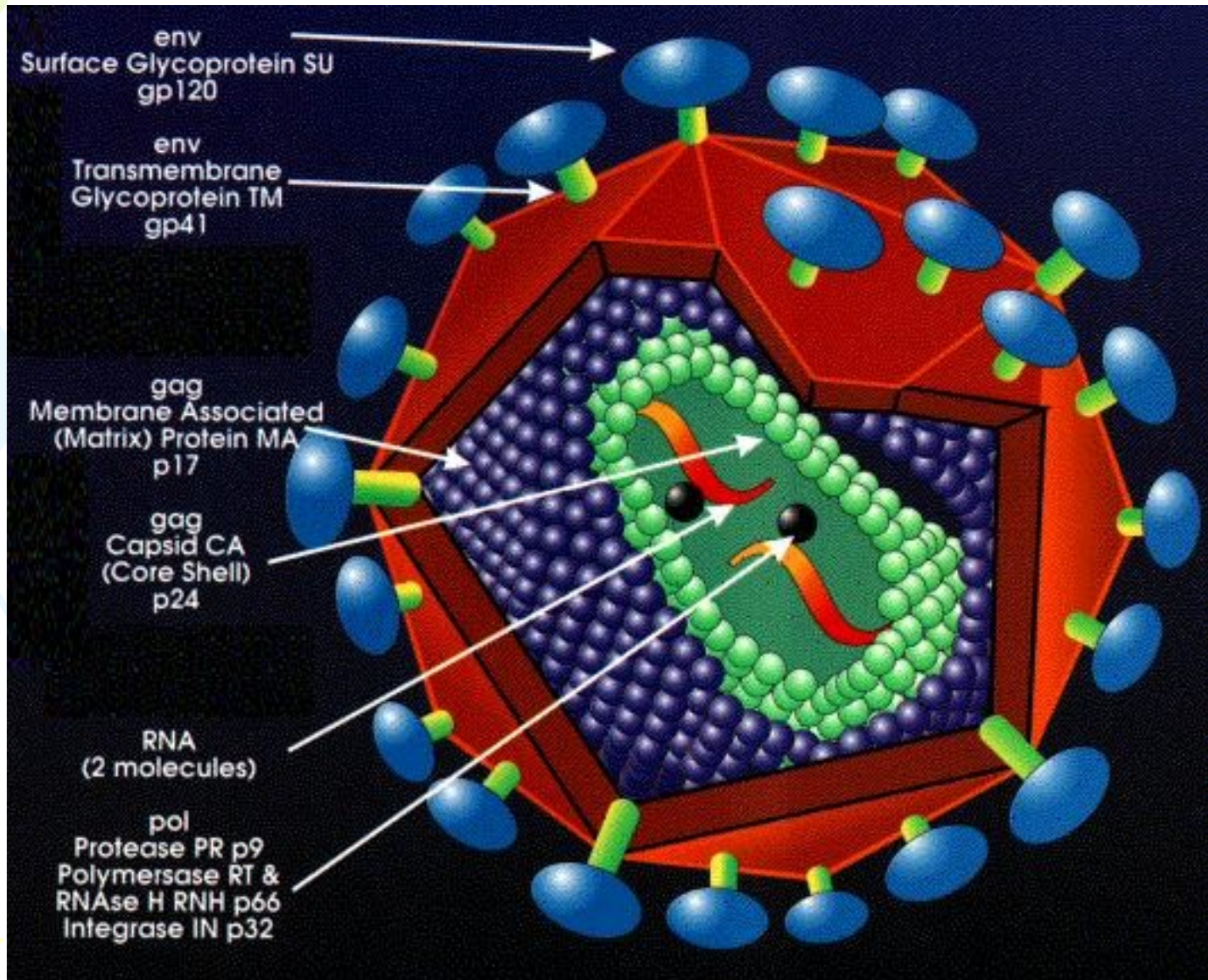
Kdo jsou mikrobiologové

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

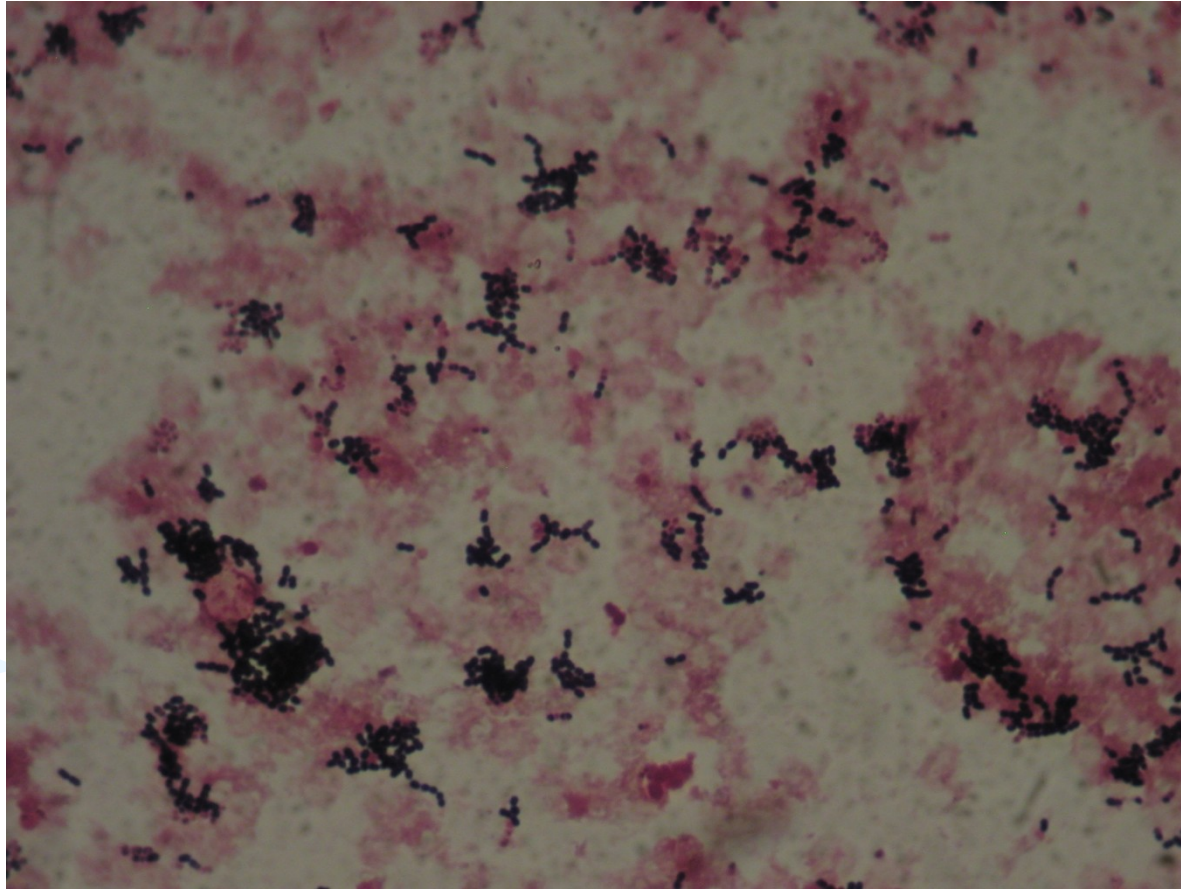
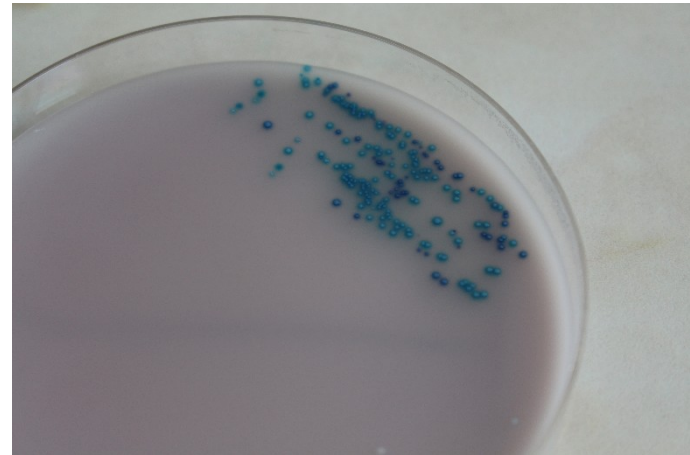


Foto DVH

Bakterie na kultivačních půdách



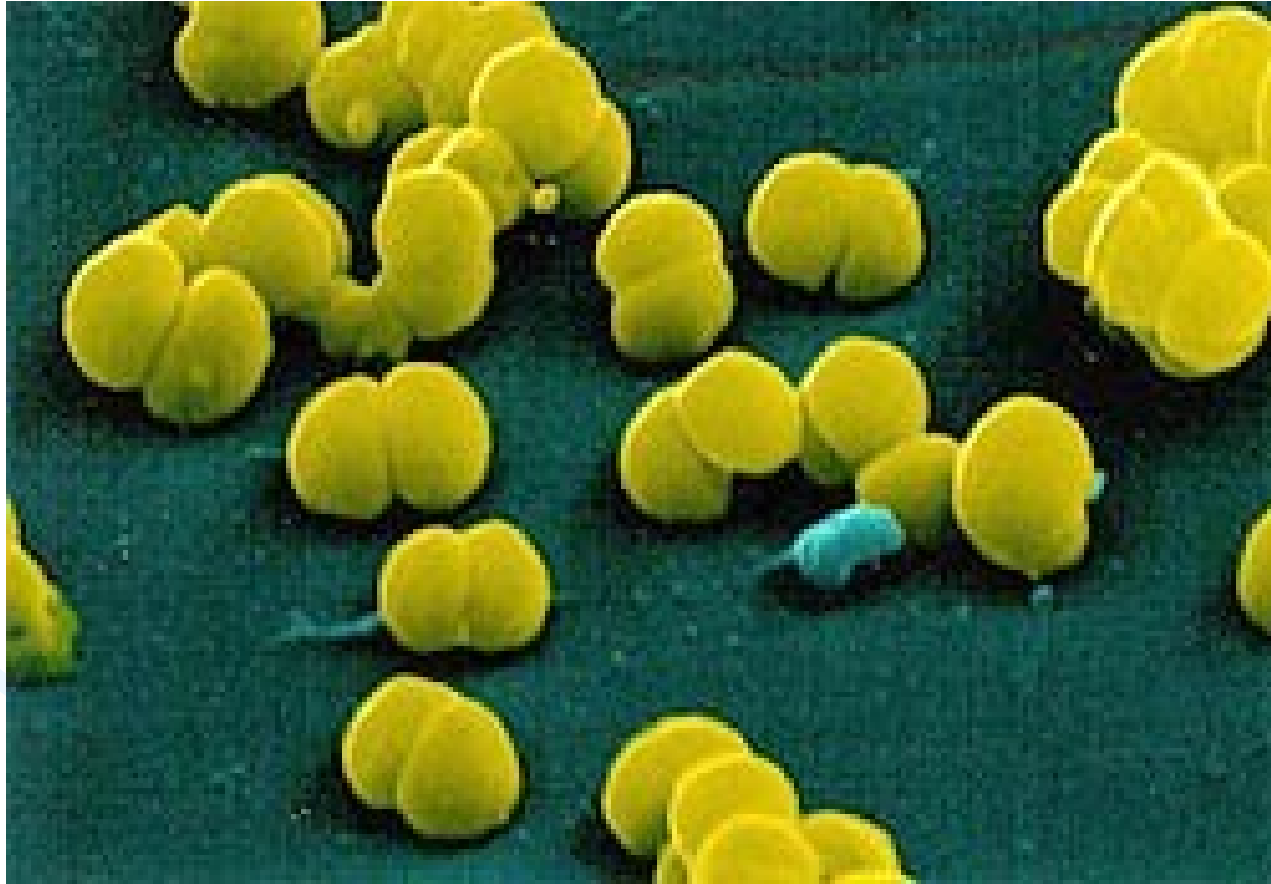
Co jsou všechno mikroby

- Mikroby jsou tedy například **mikroskopické řasy a sinice, archaea** – stáří 3,5 biliónu let
 - schopné vydržet v extrémních podmínkách (extremofilové)
 - teplota, pH, koncentrace soli
 - hluboko **pod mořem** nebo **horkých pramenů**
 - v půdě, v mořské vodě (součást planktonu)
 - 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

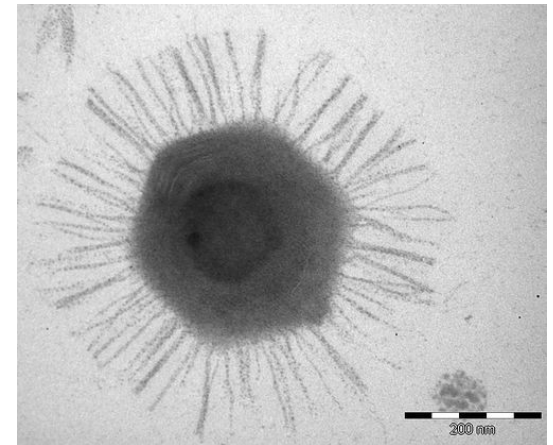


Neisserie

www.meningitis.de/erreger/meningokokken.html

Třídění živých organismů

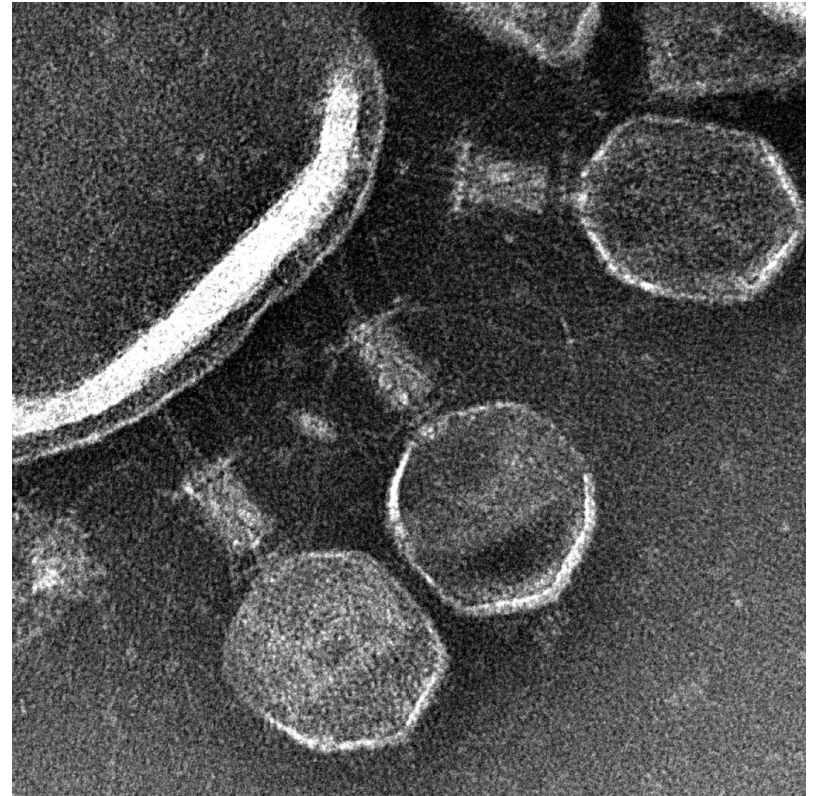
- **Priony** – *neobsahují DNA, většinou se vůbec nepovažují za živé organismy*
- **Viry a bakteriofágy**
- **Buněčné organismy**
 - **Archea** (archeobakterie)
 - **Eubacteria** (eubakterie)
 - **Eucarya** (eukaryotní organismy)
 - jednobuněčné
 - mnohobuněčné





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

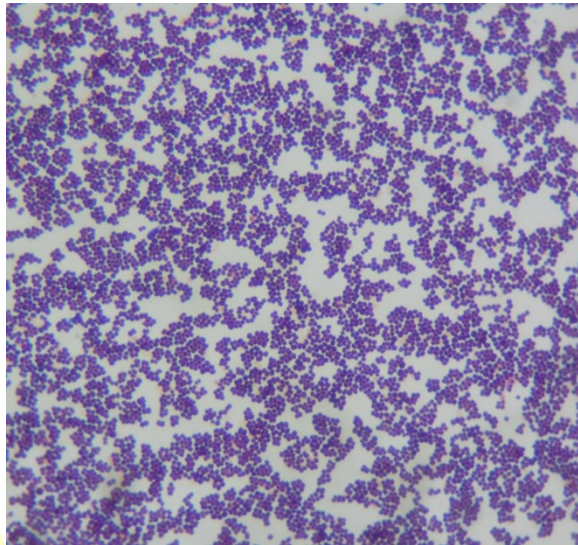
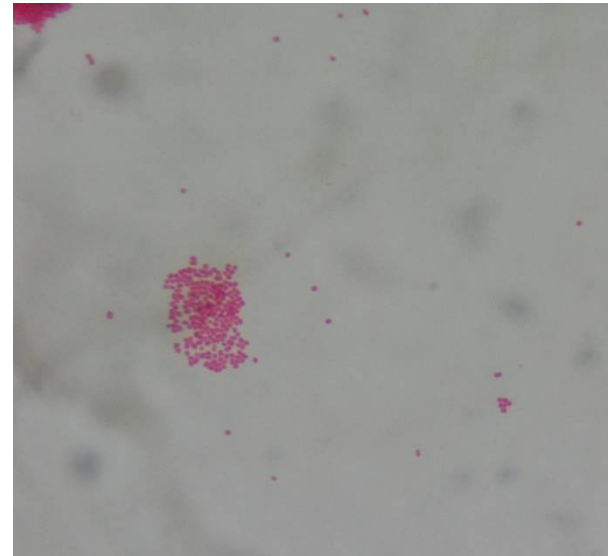
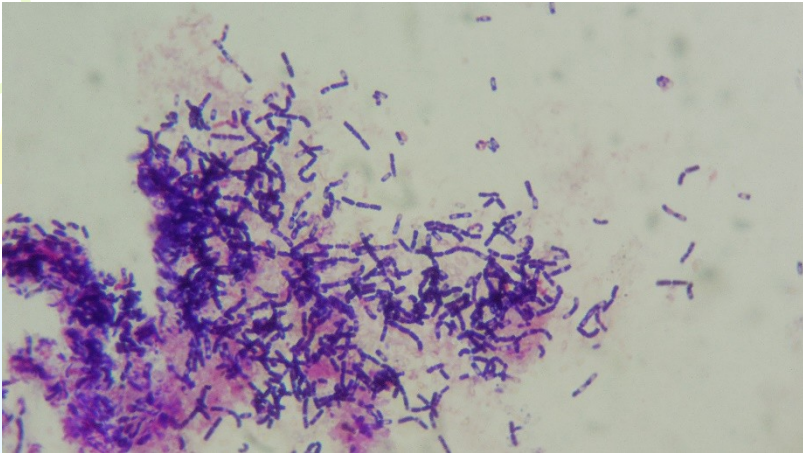
Rozdělení virů

- 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

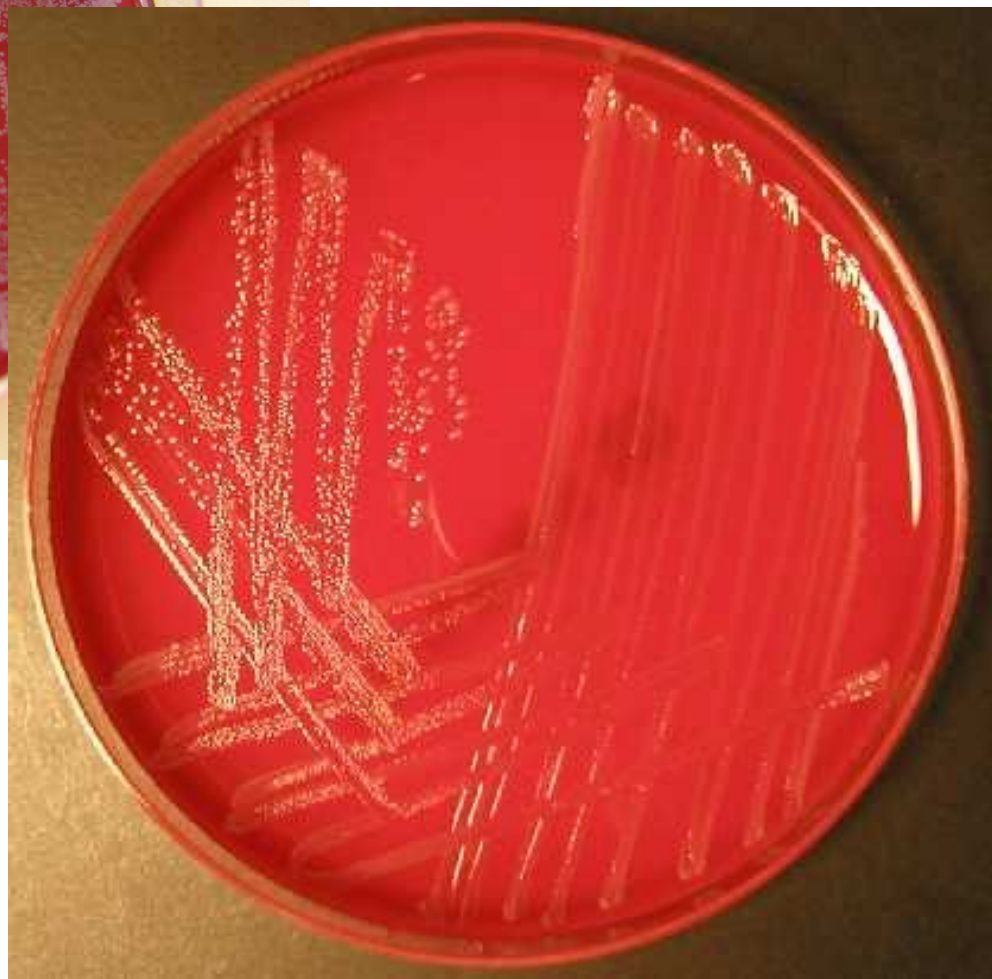
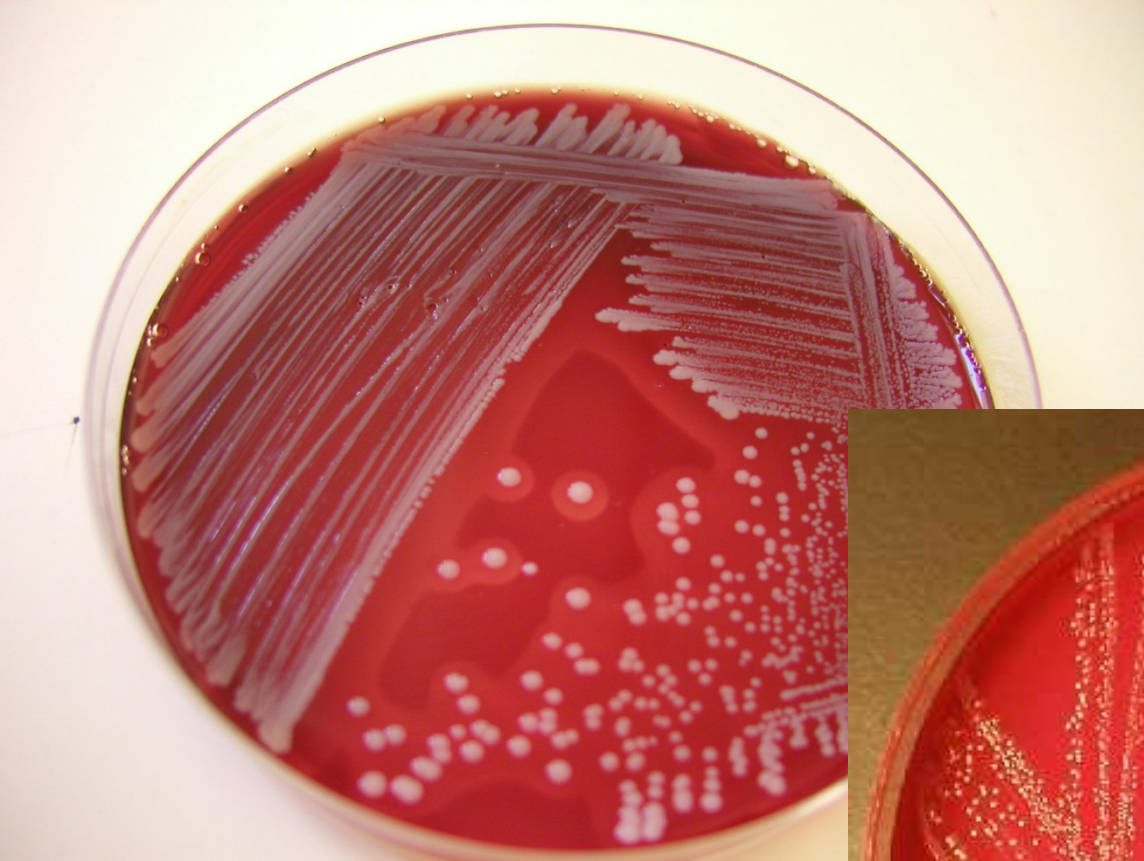


Rozdělení bakterií 2

- 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 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**.

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

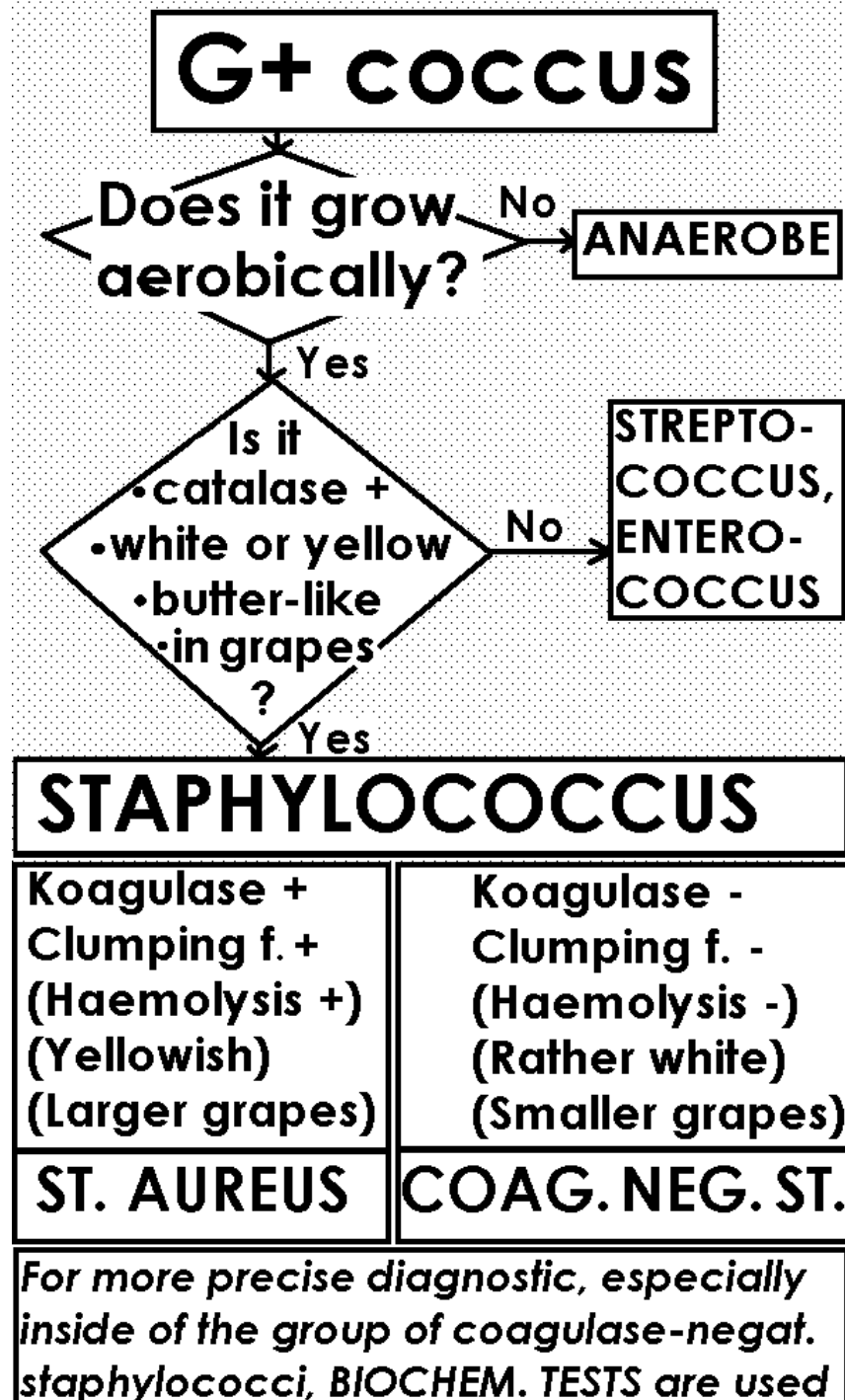
- Tekuté a kusové materiály se zasílají zpravidla ve sterilních nádobkách různého tvaru a velikosti. Může to být krev, moč, mozkomíšní mok a různé jiné tělní tekutiny
- Výtěry a stěry se zasílají zpravidla zanořené do transportní půdy, nejčastěji **Amiesovy**
- Zvláštní případy: zaslání sklíčka s nátěrem,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

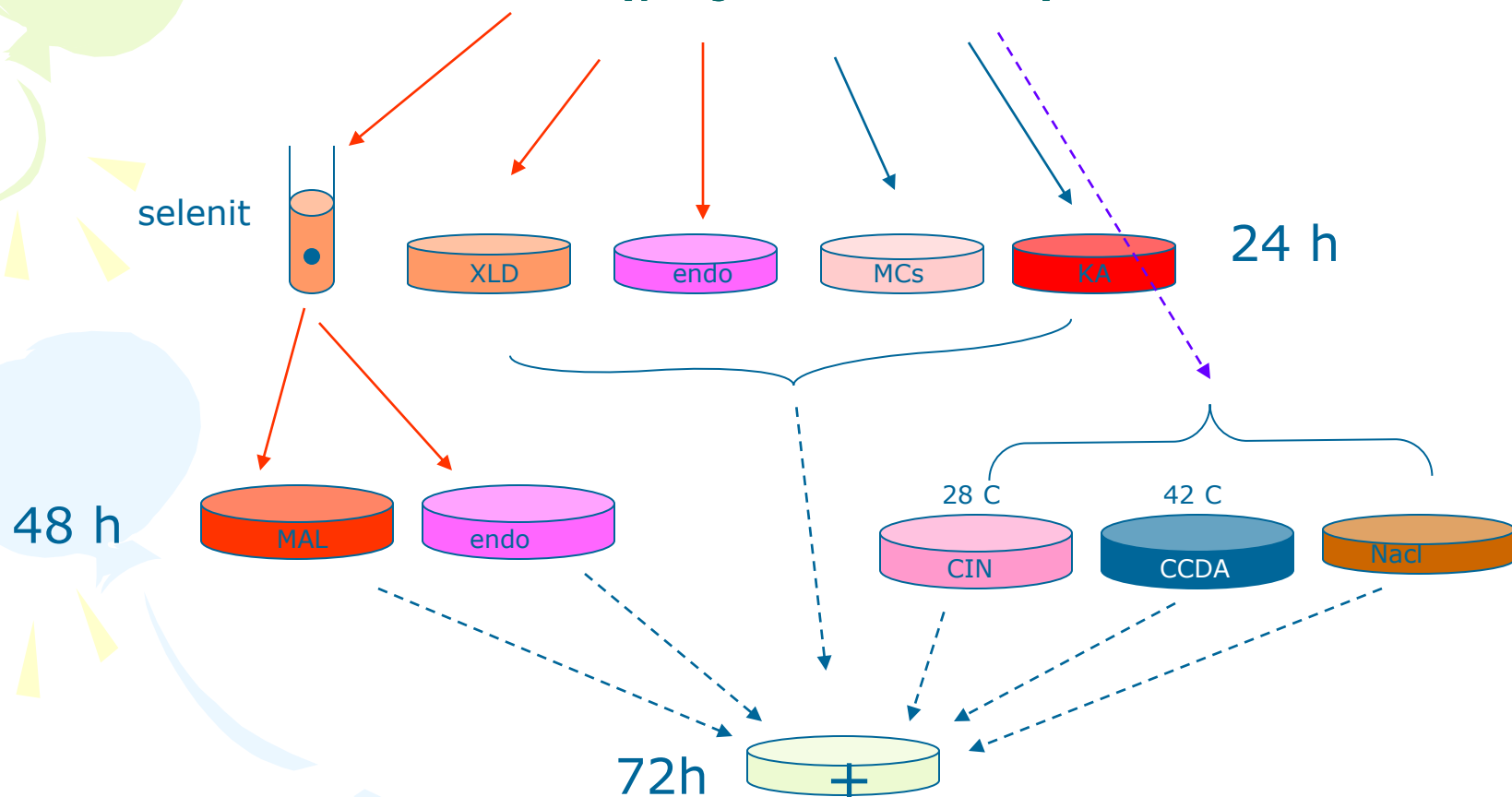


Časový faktor

- 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)



identifikace

Obrázek L. Černoorské

Negativní výsledek je za 48h

Pozitivní za 72h a později

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



Na shledanou
příště