

Téma 2 Patogenita a virulence. Přehled mikrobiologických vyšetřovacích metod I

2.3 Patogenita a virulence.

Klinicky významné mikroby mohou žít s člověkem v míru jako naši neškodní nebo dokonce užiteční průvodci – v poslední době se předpokládá, že mikrobiom lidského těla (tj. soubor mikrobu, které v těle žijí) má velký význam pro normální fungování organismu a že při jeho narušení mohou nastávat choroby dříve považované za neinfekční. Mikroby se ale také mohou podílet na vzniku různých infekčních onemocnění nebo infekčních komplikací nějakého neinfekčního stavu (například zhnisání rány).

Důležité je vždy rozlišovat mezi **mikrobem, který onemocnění způsobil** (původce nemoci, např. virus klíšťové encefalitidy nebo salmonela), **nemocí samotnou** (například klíšťová encefalitida nebo salmonelóza) a v některých případech i **přenašečem** (u klíšťové encefalitidy je to klíště). Absolvent lékařské fakulty – byť bakalářského optometrického či ortoptického směru – by neměl používat nepřesných termínů jako „onemocněl salmonelou“ (místo salmonelózou) nebo „očkování proti klíšťatům“ (místo proti klíšťové encefalitidě). To ponechme nepoučeným (a nepoučitelným) bulvárním novinářům.

Při definici významu mikroorganismů pro onemocnění člověka, zvířete či rostliny, se používají pojmy patogenita a virulence. Oba tyto pojmy vlastně znamenají schopnost poškodit. Přesto neznamenají totéž, jak uvidíme vzápětí.

2.3.1 Virulence

Na rozdíl od patogenity představuje okamžitou vlastnost konkrétního **kmene** mikroba (kmen je populace mikroba vzešlá z jedné buňky, více k pojmu „kmen“ je uvedeno dále).

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.

Avirulentní kmen se může stát virulentním například v důsledku mutace nebo třeba i tím, že bakterie sama je napadena svým virem (bakteriofágem). Stejně tak se ale může virulentní kmen stát méně virulentním či avirulentním. Je například běžně pozorováno, že bakterie snižují svou virulenci, pokud je opakovaně pěstujeme na umělých kultivačních médiích.

2.3.2 Patogenita

je **vlastnost určitého mikrobiálního druhu** ve vztahu k danému makroorganismu (v našem případě člověku, jindy zvířeti, rostlině). Z hlediska patogenity existují **tři skupiny mikrobu**:

1) **Nepatogenní: nejsou schopny** vyvolat u daného živočišného druhu nemoc.

Dalo by se říci, že u nepatogenních bakterií nepřipadá v úvahu, že by některý jejich kmen byl virulentní. Všechny jsou zcela avirulentní.

2) **Potenciálně (oportunně) patogenní** jsou takové mikroby, které vyvolávají chorobu jen někdy, jindy jsou "hodné". Typicky jsou to bakterie, které jsou zvyklé s člověkem žít v pokoji (a velmi často jako součást jeho běžné flóry). Typickým příkladem je *Escherichia coli* – známá součást běžné mikrobiální flóry střeva. K infekci potenciálním patogenem dojde zpravidla

- V případě **průniku bakterie na jiné místo** než kde se vyskytuje normálně: u *Escherichia coli* například ze střeva (kde většinou neškodí) do močových cest (*E. coli* je nejběžnějším původcem močových infekcí!), do rány, do břišní dutiny apod.
- V případě **výskytu kmene se zvýšenou virulencí** i na původním místě (existují např. enteropatogenní kmeny *Escherichia coli*, které způsobují průjmy novorozenců a kojenců)
- V důsledku **přítomnosti nějakých faktorů, které ovlivňují vztah mikrob – makroorganismus**: narušení rovnováhy mikrobiální flóry, základní onemocnění, porucha imunity a podobně

3) **Obligátně (primární) patogenní** jsou mikroby, které vyvolávají nemoc vždy, když se setkají s makroorganismem. Toto "vždy" je ale tak trochu relativní (záleží na počtu mikrobů, způsobu, jakým se člověk s mikrobem setká, apod.).

Skutečných obligátně patogenních mikrobů je ze všech mikrobů vlastně velice málo.

Patogenita (ať už se týká obligátních nebo potenciálních patogenů) je podmíněna třemi vlastnostmi mikroba, které musí být splněny současně:

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

2.4.2 Faktory zodpovědné za virulenci, respektive patogenitu

1. Ty, které se podílejí na **kolonizaci hostitele**: řasinky (latinsky pili či fimbrie), bičík, různé další tzv. adheziny. Bičík umožňuje pohyblivost bakterií.

2. Ty, které u některých mikrobů zabezpečí **invazi** (vniknutí mikroba do tkání). Jsou to různé enzymy, štěpící vazivo, faktory, zabezpečující virům a některým bakteriím vstup přímo buněk aj.

3. **Toxiny** (jedy), které bakterie (případně houba či prvok – viry jsou „na to moc malé“) produkuje navenek. Důležité z nich jsou zejména:

- **Neurotoxiny**, které ovlivňují nervovou soustavu. Například tetanický toxin působí křeče, botulotoxin naopak obrny.
- **Enterotoxiny**, které působí ve střevě (výsledkem je průjem, popř. i zvracení).
- **Místní (lokální) toxiny**, které nepůsobí v celém organismu, ale jen místně ve tkáni.
- Zvláštním případem je tzv. **endotoxin**, což není volná molekula, ale povrchová struktura gramnegativních bakterií. Uplatní se zpravidla až po rozpadu bakterie (Klasické toxiny, uvolňované bakteriemi do prostředí, se někdy označují jako exotoxiny).

4. Faktory, které se podílejí na **boji s obrannými mechanismy hostitele**: např. pouzdra (kapsuly), které zabraňují pohlcení mikroba buňkou hostitele, různorodost variant mikroba (u chřipky) aj.

2.3.4 Planktonická forma života a biofilm

Hovoříme-li o virulenci mikroba, nesmíme zapomenout na schopnost mikrobů tvořit tzv. **biofilm**.

Biofilm není výsadou klinicky významných mikrobů – biofilm byla ta slizká vrstva na kameni, po které jste uklouzli v rybníce, nebo to, co musí akvaristé pravidelně drhnout ze stěn akvária. I to, co se ultrazvukem čistí z brýlí, může mít do určité míry charakter biofilmu.

Biofilm je vysoce organizovaný strukturovaný útvar, složený nejen z mikrobů (většinou většího počtu druhů), ale i z hmot těmito mikroby produkovaných. Biofilm jako celek je daleko odolnější vůči vnějším vlivům, ať už fyzikálním, chemickým (včetně antibiotik) nebo biologických. Je-li biofilm tvořen běžnou bakteriální mikroflórou, chrání organismus před vpádem patogenů.

Naopak tvoří-li biofilm patogen, stává se léčba takové infekce mnohem obtížnější než kdyby mikroby nebyly v biofilmu (opakem biofilmu je takzvaná **planktonická forma** života).

2.4 Průběh infekčního procesu a faktory, které se na něm podílejí

2.4.3 Vstupní brána infekce

je pojem, který označuje místo, kudy mikrob do těla pronikl. Málokdy je to kůže, mnohem častěji různé sliznice, včetně např. sliznice spojivkového vaku. Těsně souvisí s cestou přenosu nákazy.

2.4.2 Forma infekce

2.4.2.3 Podle rozsahu postižení organismu:

lokální (omezená na jednu sliznici, tkáň orgán)

celková (systémová, celotělová)

2.4.2.4 Podle vyjádření příznaků:

2.4.2.4.3. bezpříznaková (asymptomatická, inaparentní)

2.4.2.4.2. příznaková (symptomatická):

- **abortivní průběh:** nemoc proběhne, ale namísto typických příznaků dojde jen k nespecifickým celkovým („chřipkovým“) příznakům – teplota, svalové bolesti apod.
- **typický průběh** („učebnicový“)
- **komplikovaný průběh** (těžší, než obvykle, resp. kromě obvyklých příznaků i např. přechod na další orgány a podobně)
- v průběhu infekce může dojít k **superinfekci** jiným mikroben. Může také dojít ke **koinfekci** dvěma různými mikroby.

2.4.3 Vylučování mikrobů z těla

se může dít jedním nebo více způsoby, podle druhu mikroba a infekce

2.4.4 Výsledek infekce

- **Úplné uzdravení:** nejčastější výsledek, hlavně u běžných (banálních) infekcí)
- **Uzdravení s následky:** někdy samotná infekce pomine, zanechá však trvalé následky. Například po některých nervových infekcích dochází k nevratnému poškození mozku, ačkoli mikrob sám už není v těle přítomen.
- **Přechod do chronicity:** z akutní infekce se stává dlouhodobá až trvalá
- **Úmrtí**

2.4.5 Co ovlivňuje formu infekce

- **faktory na straně mikroba:** zejména vybavenost jednotlivými faktory virulence – je u každého mikrobiálního kmene jiná. Například u meningokoků platí, že musí jít o tzv. klonální kmen, aby mohl napadnout člověka. Naproti tomu kmeny, nalézané u zdravých osob v krku (uvádí se, že jde až o 10 % populace) mezi klonální zpravidla nepatří.
- **faktory na straně makroorganismu:** stav imunity, stav anatomických bariér – kůže, sliznice (např. zda není oslabena kouřením), stav funkčních mechanismů – kýčání, střevní peristaltika, vypuzování mikrobů z močové trubice proudem moče). Může jít i o to, zda se tělo nenachází ve stavu celkového vyčerpání – toho zneužívají např. meningokoky
- **faktory týkající se setkání mikroba a makroorganismu:** za jakých okolností k němu došlo, jakou infekční dávkou a podobně. Salmonela například není nebezpečná, pokud se nepomnoží a nedosáhne tak dostatečné infekční dávky. Také není nebezpečná při kontaktu s neporušenou kůží.

2.3 Cíle a základní rozdělení mikrobiologických metod.

Pojmy kmen a vzorek

2.3.1 Cíle mikrobiologické diagnostiky

V předchozím textu byly komentovány pojmy patogenity a virulence. **Mikrobiologická diagnostika** je praktický postup, který směřuje ke zjištění, zda se v těle aktuálně nachází mikrob, který je patogenní (a pokud možno také ke zjištění, zda je **aktuálně virulentní**). Ideální by bylo zároveň zjistit, jestli přítomnost patogenního mikroba má skutečnou příčinnou souvislost s potížemi, na které si pacient stěžuje (infekční choroba, záněť). To se ale nikdy nedá zjistit s úplnou jistotou – ten, kdo služby mikrobiologické laboratoře využívá (většinou lékař) by tedy neměl vnímat výsledky samostatně, ale spojit si je se vším ostatním, co o pacientovi a jeho onemocnění ví – tedy anamnéza („vzpovídání“ pacienta – kdy mu potíže začaly, jestli je měl už dříve, jestli na podobné potíže trpěl i někdo jiný...), klinické vyšetření pacienta „od hlavy k patě“, další diagnostické postupy (zobrazovací metody, biochemické, hematologické a histologické testy, a tak dále). Teprve pak může odhadnout – většinou stále ne s jistotou tvrdit – jestli mikrobiologický nálezu opravdu souvisí s infekčním onemocněním, které pacienta postihlo. Mikrobiologická diagnostika probíhá v **klinikomikrobiologické diagnostické laboratoři**. To je laboratoř, která primárně není zaměřena na výzkum (i když to neznamená, že se v ní nemůže výzkum odehrávat), ale na vyšetřování klinických vzorků od pacientů buďto hospitalizovaných

(ležících v nemocnici) nebo ambulantních (těch, kteří navštívili ordinaci praktického lékaře nebo ambulantního specialisty).

Mikrobiologická diagnostika (tedy práce laboratoře klinické mikrobiologie) směřuje v zásadě především k následujícím cílům:

- **odhalení původce nemoci.** Skutečného původce je přitom často potřeba odlišit od **běžné flóry** – tedy mikrobů (hlavně bakterií), které se v některých tělních dutinách vyskytují normálně, od **náhodného nálezu**, který se např. do úst zatoulal s potravou, od **kolonizace**, tedy mikrobů, které osídlí určitý povrch (například zavedené močové cévky), ale nejsou původcem nemoci, a také od **kontaminace**, tedy od mikrobů, které pocházejí z vnějšího prostředí a které se do vzorku přilepily omylem cestou
- *někdy také:* **určení "in vitro" citlivosti na antimikrobiální látky** (aby bylo možno určit, jakým lékem má být pacient léčen)
- *někdy také* **určení faktorů virulence** – například tehdy, kde není podstatné, jestli se v těle nachází určitá bakterie, ale jestli jde o kmen, který produkuje významné množství nějakého faktoru virulence (toxinu, enzymu zodpovědného za invazivitu a podobně)

2.4.3 Pojmy vzorek a kmen

2.4.3.1 Vzorek (klinický vzorek)

Vzorek je (v klinické mikrobiologii) to, co je odebráno pacientovi a přichází k vyšetření do laboratoře. Většinou jde o nějakou jeho tělní tekutinu, tkáň, výtěr/stěr z povrchu nebo dutiny, může ale také jít o něco, co je umělé, ale nacházelo se to v pacientově těle (použitý cévní nebo močový katetr, použitá kontaktní čočka a podobně). Nejčastěji se do laboratoře posílá

- **kusový či tekutý materiál** ve zkumavce či jiné nádobce (krev, sérum, moč, mozkomíšní mok, sputum, šupiny, odštěpek kosti, stolice, kousek nehtu...)
- **stěr či výtěr** (z nejrůznějších tělních povrchů a otvorů) na vatovém tamponu, obvykle zanořeném do transportního média
- **někdy může jít o jiné vzorky**, například otisky, nátěry na sklíčka (určené čistě jen k mikroskopickému průkazu) a další.

Odběrům vzorků se věnuje speciální kapitola.

2.4.3.2 Kmen

Kmen je čistá kultura („výpěstek“) jednoho druhu mikroba (obvykle bakterie nebo mikroskopické houby). Je to soubor jedinců, kteří mají stejné vlastnosti a zřejmě pocházejí z jediné buňky.

Mikrobiolog nemá možnost pracovat s **jedincem** jak jako zoolog či botanik: jedinec (jednotlivá bakterie či kvasinka) je příliš malý. Práce s kmenem mikrobiologům práci s jedincem nahrazuje. Zjišťovat například biochemické vlastnosti či tvorbu pigmentu u jedné buňky by bylo extrémně náročné. Použije-li se místo toho kmen, je to mnohem jednodušší

Kmen získáme ze vzorku kultivací na pevné půdě (s podmínkou správného rozočkování) – proto má tato metoda výsadní postavení zejména v diagnostice bakterií.

2.4.2 Přehled metod

Metody, kterými určujeme mikroby, si můžeme rozdělit na:

2.4.2.3 Metody přímé

Pomocí těchto metod **hledáme mikroba jako takového, jeho součást nebo jeho produkt** ve vzorku pacienta. Můžeme si je dále rozdělit:

2.4.2.3.1 Přímý průkaz ve vzorku. V tomto případě pracujeme s celým vzorkem. Je potřeba vzít v úvahu, že vzorek zpravidla obsahuje buňky makroorganismu a že předem nevíme, kolik různých druhů mikrobů je ve vzorku obsaženo – nemusí tam být žádné, ale může jich být v extrémních případech i několik desítek. Taková situace samozřejmě znemožňuje použití některých diagnostických metod. Můžeme to přirovnat k tomu, že dveře od posluchárny také těžko může využít kriminalista k hledání otisku prstů jednoho studenta.

2.4.2.4.3 Práce s kmenem. V řadě případů nelze pracovat s celým vzorkem – potřebujeme získat **kmen**. Pokud máme k dispozici kmen a určujeme jeho vlastnosti, hovoříme o **identifikaci kmene** mikroba. Některé metody identifikace jsou tytéž, které se používají i k přímému průkazu ve vzorku (např. mikroskopovat se dá jak celý vzorek, tak i kmen). Jiné metody se naopak používají pouze k identifikaci, avšak nikoli k přímé práci se vzorkem (příkladem je biochemická identifikace, která se dá uplatnit pouze máme-li k dispozici čistou kulturu mikroba, tedy kmen).

2.4.2.4 Metody nepřímé

Těmito metodami **hledáme odezvu imunitního systému pacienta na mikroba**. V naprosté většině případů hledáme **protilátky**. Jen výjimečně jde o průkaz **buněčné imunity** (například u tuberkulózy). Rozdíl oproti přímému průkazu spočívá v tom, že protilátka není ani mikrobem, ani jeho součástí, a není ani produktem mikroba – je to produkt makroorganismu. Na druhou stranu by ale bez podráždění daným mikrobem (resp. jeho antigenem) nevznikla. Nevýhodou nepřímých metod je, že nejsou důkazem toho, že je mikrob v těle právě přítomen – svědčí jen o tom, že se s ním tělo někdy setkalo (anebo se setkalo s očkovací látkou, která obsahovala části těla toho mikroba). Tuto nevýhodu je ale možné aspoň částečně eliminovat – bližší vysvětlení se nachází ve třetí kapitole.