

Lékařská mikrobiologie

MUDr. Alena Ševčíková

Mikrobiologie

- lékařská – zabývá se mikroorganismy, které jsou patogenní pro člověka, vyvolávají u něj onemocnění nebo se u člověka přirozeně vyskytují
- veterinární
- potravinářská – mikrobiologie potravin, jejich konzervace, využití v potravinářských technologiích

Mikrobiologie

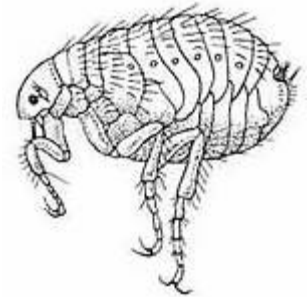
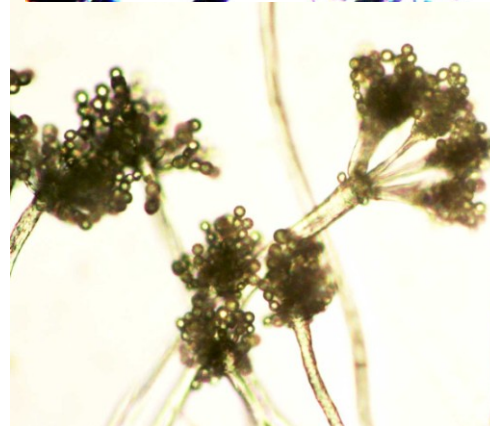
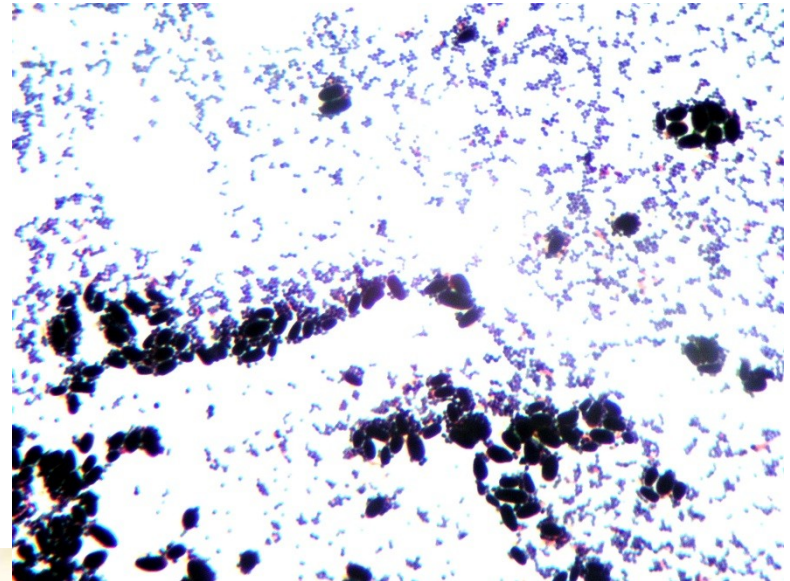
- **Mikrobiologie**
- (z řeckého *micron* = *malý*, *biologia* = *studium života*) je věda studující mikroorganismy

Virologie – 20 - 200nm

Bakteriologie - 1 μm

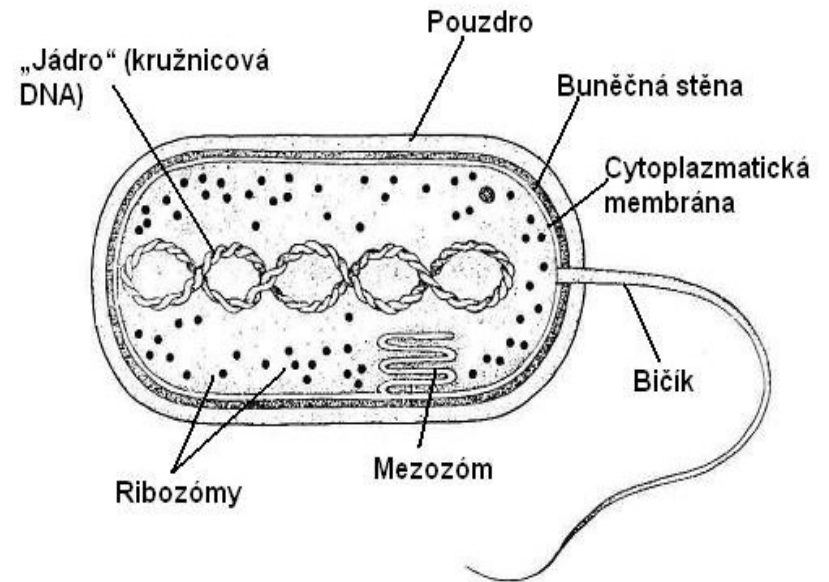
Mykologie - cca 10 μm

Parazitologie – 10 -150 μm



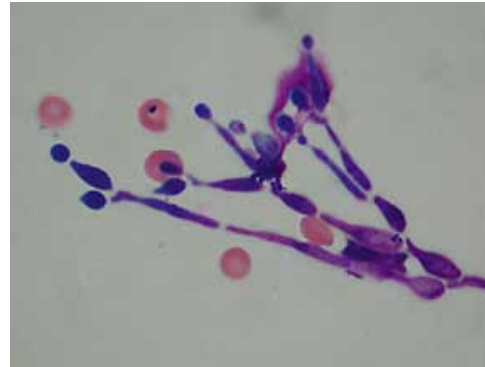
Bakteriologie

- buňky **prokaryotické**
- vždy jednobuněčné, tvoří tkáně
- **nukleoid** (bakteriální obdoba jádra)
– není obalen membránou
- neobsahuje mitochondrie, ani endoplasmatické retikulum
- součástí buněčné stěny je peptidoglykan



Buňky eukaryotické

- Kvasinky a plísně



- Jednobuněční prvoci, vícebuněční příživníci, členovci a červi (blecha, veš)

- Rostliny
- Živočichové



Stručná historie

- Stáří planety cca 4,5 miliardy let
- Prokaryotické buňky – archea, bakterie cca 3,5 miliardy let
- Eukaryotické buňky jednobuněčné – cca 2 miliardy let
- Eukaryotické vícebuněčné organismy – cca 700 miliónů let
- Obratlovci - cca 250 milionů let
- Savci - cca 70 miliónů let
- Člověk – 200 000 let – 500 000let

Obor mikrobiologie

- **1857 Louis Pasteur** zformuloval teorii, že zkvašení vína je způsobeno mikroby a předpokládal, že stejným způsobem by mikroby mohly vyvolávat choroby a současně s **Robertem Kochem** prokázali
- **1876**, že sněť slezinná může být vyvolána experimentálně vstříknutím bakterie *Bacillus anthracis* do těla zvířat



Érou **Louise Pasteura** a **Roberta Kocha** nastalo období označované jako **zlatý věk mikrobiologie**

- **Louis Pasteur** (1822 – 1895)
 - očkování proti vzteklině, sněti slezinné, choleře drůbeže
 - příčina kvašení piva a vína, pasterizace
 - kultivace bakterií v tekutých půdách
 - objevil mikroby vytvářející spóry, anaeroby
- **Robert Koch** (1843 – 1910)
 - zavedl izolaci čistých kultur na pevných půdách, barvení bakterií a mikrofotografii
 - podílel se na objevu původce cholery a izoloval původce tuberkulózy

- Podle metod a postupů zavedených Pasteurem a Kochem byla postupně objevena většina původců bakteriálních infekcí
- 1898 – objeven první živočišný virus
- 1911 – první lidský virus, žlutá zimnice
- 1915 – viry bakterií - bakteriofágy

Nomenklatura – názvosloví

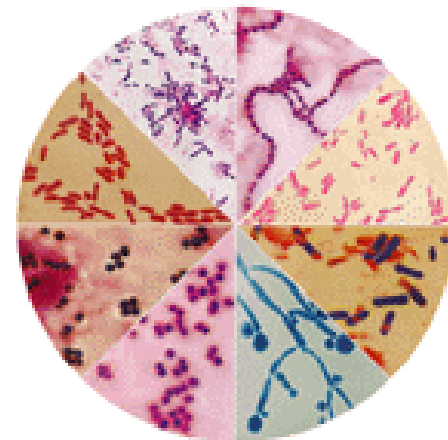
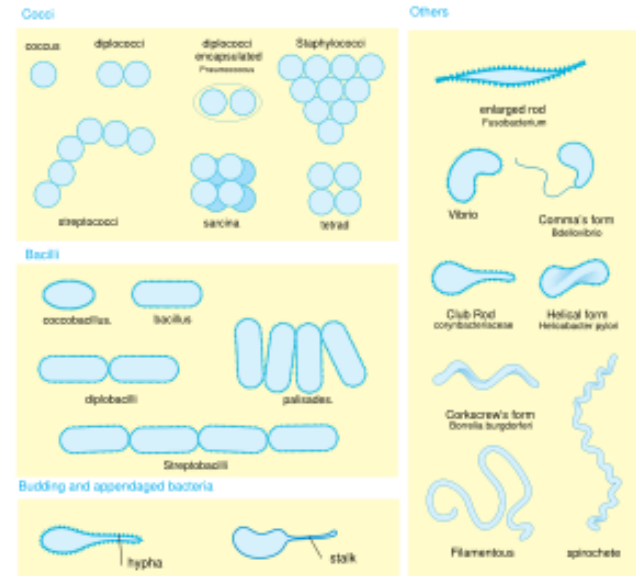
- Pojmenování taxonu, bakteriálního druhu, podle mezinárodně dohodnutých pravidel
- Název bakterií se skládá ze jména rodového (***rod, genus***) a jména druhového (***druh, species***)
 - *Streptococcus pyogenes, Staphylococcus aureus, Escherichia coli*
- **bakteriální druh (species)** –soubor kmenů sdílejících stálé vlastnosti a lišící se od kmenů jiné skupiny
- **Kmen** je populace mikrobů pocházející z jediné mikrobiální buňky

Identifikace – určování

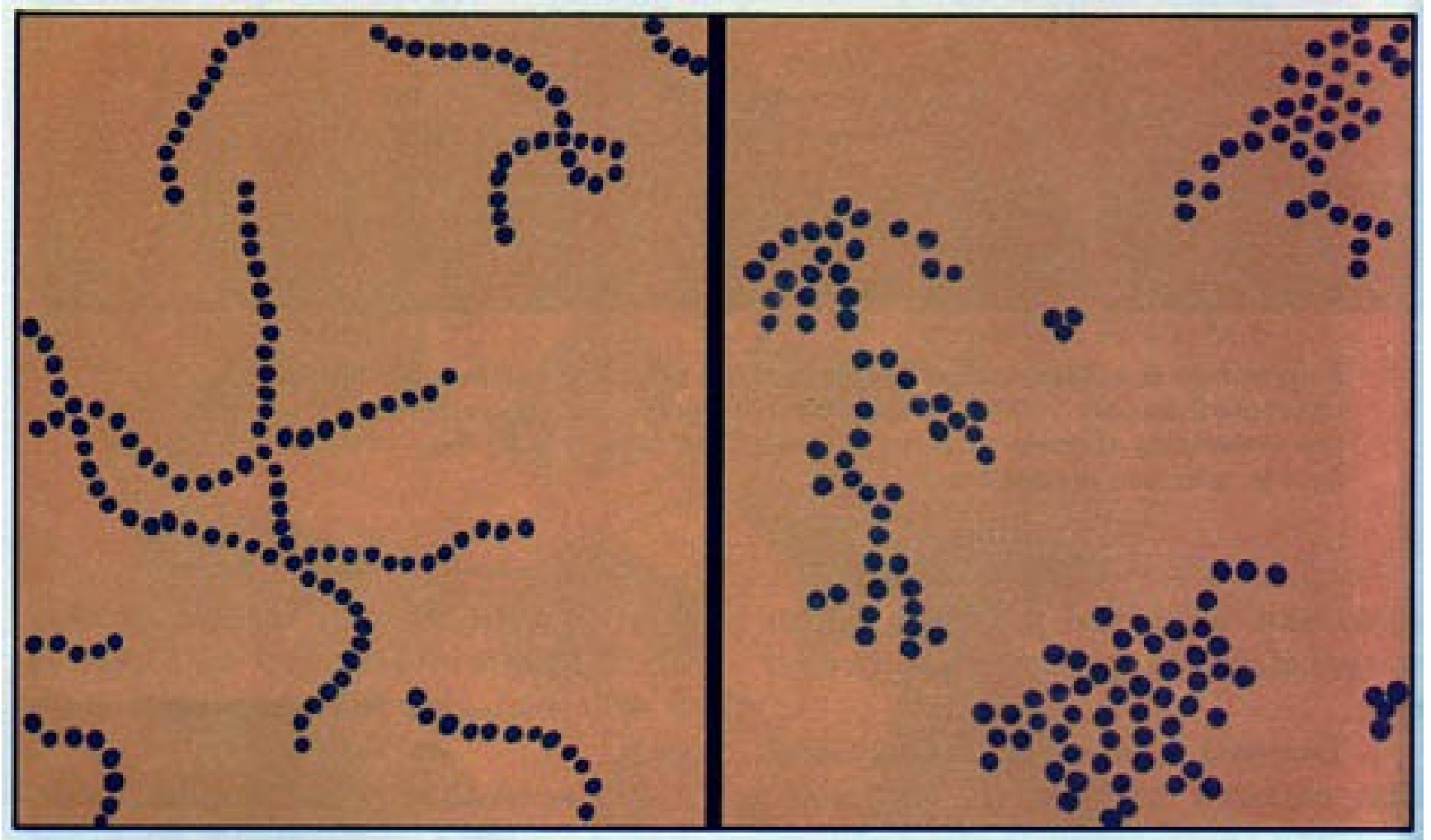
- Postup, kterým zjistíme, že nově izolovaný kmen náleží do známého, pojmenovaného taxonu
 - morfologické znaky (tvar, velikost, uspořádání, barvitelnost buněk, vzhled kolonií)
 - fyziologické znaky (tvorba nebo štěpení různých sloučenin)
 - chemotaxonomické znaky (složení buněčné stěny, analýzy mastných kyselin)
 - genetické znaky a molekulární vlastnosti

Základní morfologie bakterií

- **Velikost** – většina patogenů 0,5 – 3 μm
- **Tvar a uspořádání**
 - koky ve dvojicích, řetězcích, shlucích, tetrádách
 - tyčinky
 - spirály
- **Barvitelnost** dle Grama
 - grampozitivní - modré
 - gramnegativní – červené
- dle acidorezistence

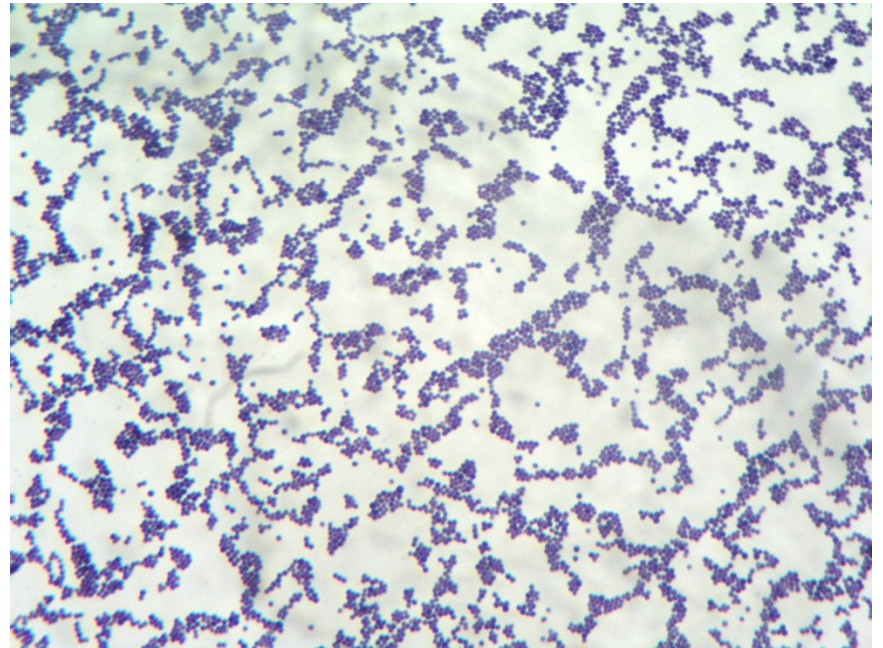


Streptococcus sp. - *Staphylococcus* sp.



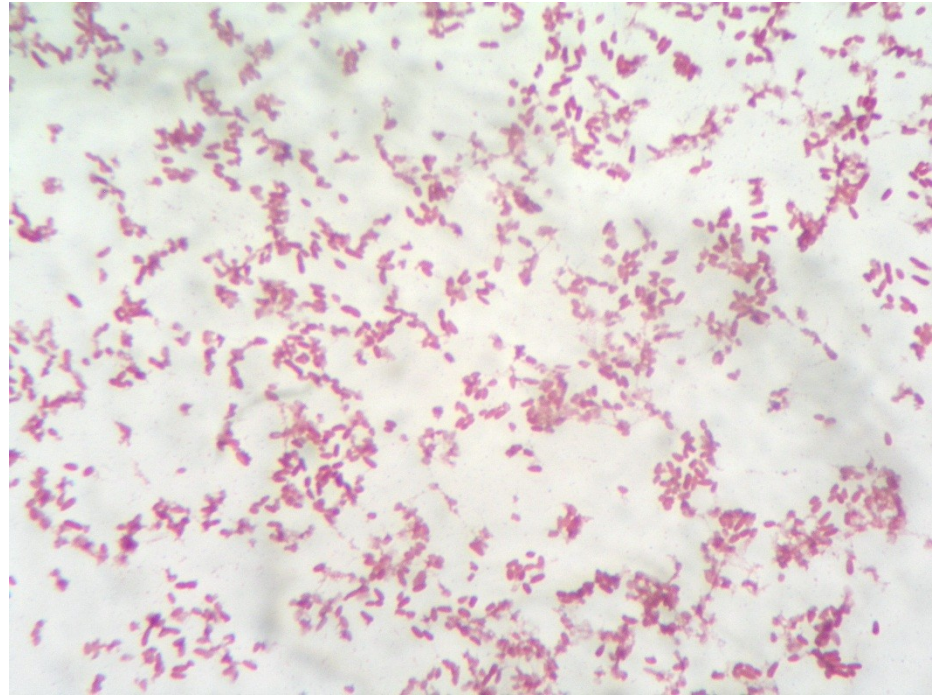
Buněčná stěna

- Silná tuhá vrstva odolávající osmotickému tlaku a umožňující bakterii uchovat svůj tvar
- Stěna **grampozitivních** bakterií je jednodušší a tvoří ji mohutná 20 nm silná peptidoglykanová struktura, protkaná řetězci kys.teichoové



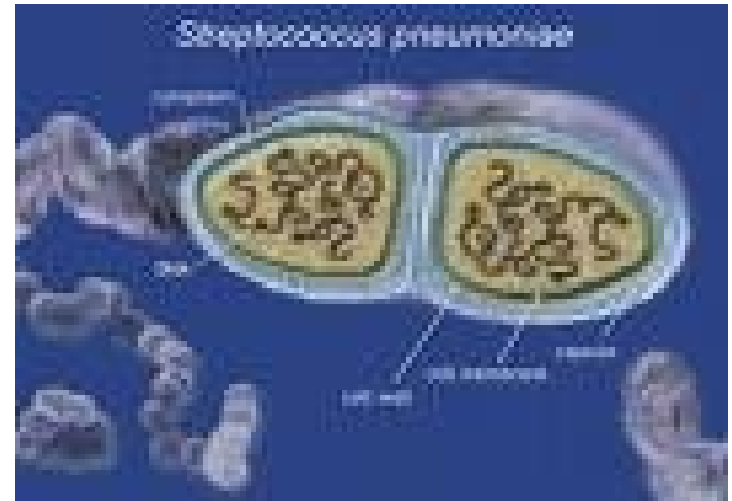
Buněčná stěna

- Stěna **gramnegativních** je tenčí, ale složitější 15 nm – tenký peptidoglykan, proteiny tvořící poriny ve fosfolipidové dvojvrstvě, lipoproteiny, lipopolysacharidy, periplasmatický prostor (endotoxin, O antigen)



Vnější vrstvy

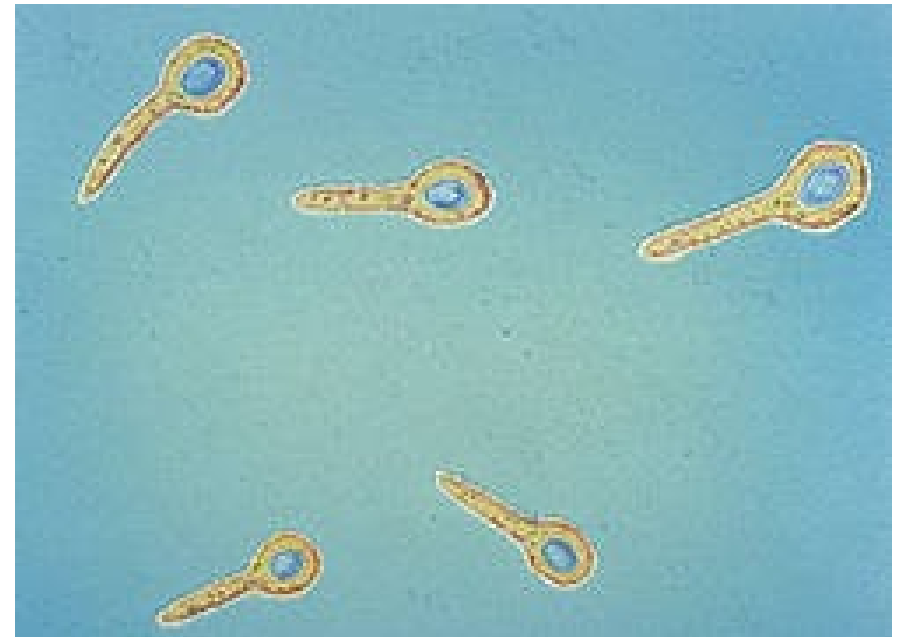
- **Polysacharidové pouzdro**
(pneumokoky, klebsiely, hemofily)
- **Polypeptidové pouzdro**
(anthrax)
- **Slizová vrstva** (*Streptococcus mutans*, koaguláza negativní stafylokoky) – biofilm
- **Bakteriální bičíky**
- **Pili, fimbrie**



Bakteriální spory

- Rody ***Bacillus*** a ***Clostridium*** reagují na vysychání či úbytek živin tvorbou spor – vysoce odolné útvary, mohou přežívat stovky let při nepříznivých podmínkách
- Bakteriální endospory nepřijímají Gramovo barvivo – světlolomné útvary
- Tvar, velikost a uložení spor jsou někdy typické pro různé druhy

Clostridium tetani



Rozdělení mikrobů podle vztahu ke kyslíku

- **Aeroby:** *Pseudomonas, Vibrio, Mycobacterium*
- **Anaeroby:**
 - **Obligátní**, (striktní): *Clostridium haemolyticum, Clostridium difficile*
 - **aerotolerantní:** *Clostridium perfringens*
- **Fakultativní anaeroby:** většina, např. enterobakterie, stafylokoky, enterokoky
- **Mikroaerofilní mikroby:** lactobacily, kampylobaktery
- **Kapnofilní:** zvýšená tenze CO²: meningokoky, gonokoky

Generační doba

- Délka růstového cyklu, je doba, za kterou se počet bakterií zdvojnásobí
- Její délka je individuální vlastností buňky a závisí také na množství živin
- Generační doba u *Escherichia coli* za optimálních podmínek je při 37° C 20min, při 30° C jedna hodina
- Generační doba u *Mycobacterium tuberculosis* je 12 hodin

Podmínky pro kultivaci mikroorganismů

- **Voda** – 80 % živé bakterie, 15% u spor
 - Nejvíce citlivé na vyschnutí jsou neisserie (gonokok)
 - Odolnější jsou zástupci kožní flóry
 - Původce tuberkulózy – vydrží několik týdnů
 - Vysoce odolné – nokardie, aktinomycety – půdní, plísně, spory, cysty prvoků, vajíčka červů

Podmínky pro kultivaci mikroorganismů

- **Teplota**

- Minimální, optimální, maximální růstová teplota
- Teplotní rozmezí růstu
 - 20-40° C – většina lékařsky významných bakterií
 - Nejužší teplotní rozmezí má gonokok 30-38,5° C
 - Schopnost množit se při 0° C mají listerie, yersinie
 - Schopnost množit se při 8° C mají salmonely, zlaté stafylokoky
 - Kolem 45° C ještě rostou salmonely, kampylobaktery, *Bacillus cereus*

Podmínky pro kultivaci mikroorganismů

- **Teplota optimální**

- **0 - 20° C psychrofilny** – nepatogenní mikroby, žijící ve vodě a půdě
- **20 - 40° C mesofily** – většina mikrobů významných pro lékařskou mikrobiologii
- **Nad 40° C termofily**, horké prameny, kompost, chlévská mrva, nepatogenní, Archaea
- **Nad 80° C hypertermofily**, podmořské sopečné oblasti, Archaea

Podmínky pěstování bakterií

- Dostatek vody, živin, růstových faktorů, optimální teplotu, vhodné složení atmosféry, odpovídající redox potenciál, optimální pH, vhodný osmotický tlak, ochrana před zářením, sterilita prostředí a jeho ochrana před kontaminací
- **Termostaty** – většinou při 37°C, vlhkost, případně se zvýšenou tenzí CO²
- **Anaerostaty**

Druhy kultivačních pŮd

- **Tekuté pŮd**

- Různé druhy **bujónů** (masopeptonový bujón, thioglykolátový bujón)

- Použití k pomnožení malého množství mikrobů
- Zákal, sediment, blanka

- **Cukrové pŮdy**

- Štěpením substrátu dochází ke změně pH roztoku a ke změně barvy přidaného indikátoru

Druhy kultivačních pŮd

- **Pevné pŮdy** - ztužení původně tekutého základu přidáním 1-2% agaru, (5%)
- Výhoda - pěstování mikrobů v izolovaných koloniích
- Bakteriální kolonie je společenství buněk vzniklé z původně třeba z jedné životaschopné mikrobiální buňky
- Viditelnou kolonii tvoří několik set miliard buněk
- Rozočkováním jedné kolonie získáme čistou mikrobiální kulturu



Staphylococcus aureus
na krevním agaru



Typy půd

- **Základní** – bujón, peptonová voda
- **Obohacené** – krevní agar, čokoládový agar, Bordet-Gengouova půda (*Bordetella pertussis*, *parapertusis*), Šulova půda (*mykobakteria*)
- **Selektivní** – obsahují inhibitor zabraňující růstu nežádoucí flóry, KA s 10% NaCl (*stafylokoky*), selenitová půda (*salmonely*), alkalická peptonová voda (*vibria*), antibiotické disky: bacitracin (*hemofily*), vankomycin-colistin (*meningokoky*)

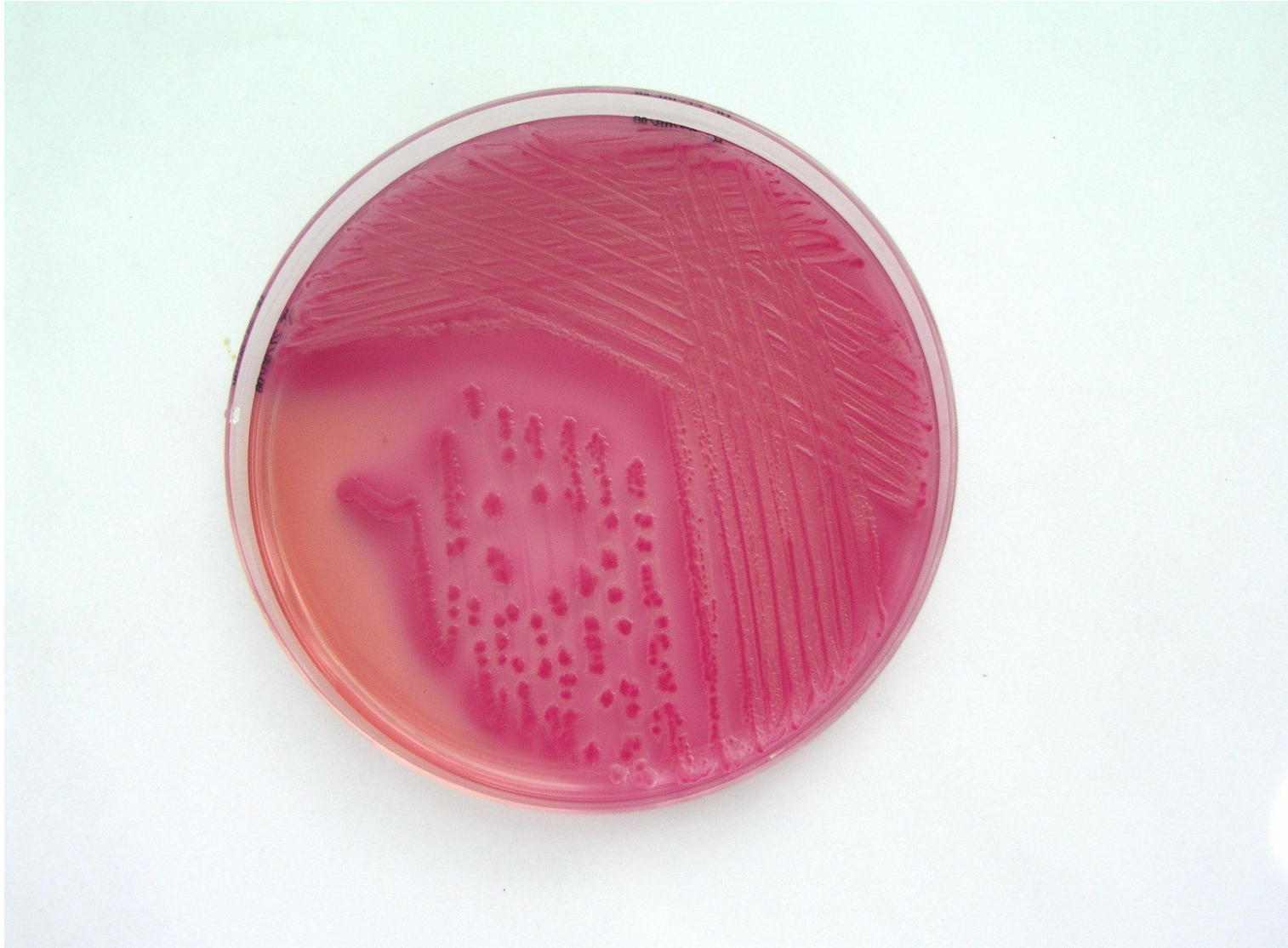
Typy půd

- **Diagnostické půdy** – sledujeme, zda mikrob dokáže využít přidaný substrát,
 - štěpení cukrů, např. glukózy,
 - Desaminace fenylalaninu (proteus)
 - Dekarboxylace aminokyselin (lysin, arginin, ornithin)
 - Štěpení močoviny, redukce nitrátu,
 - Tvorba H₂S, indolu, acetoinu, využití citrátu
 - Průkaz enzymu - kataláza, oxidáza, Pyr-test, ONPG
 - Chromogenní půdy, kombinované půdy Hajn,
 - Pestrá řada, komerční soupravy,

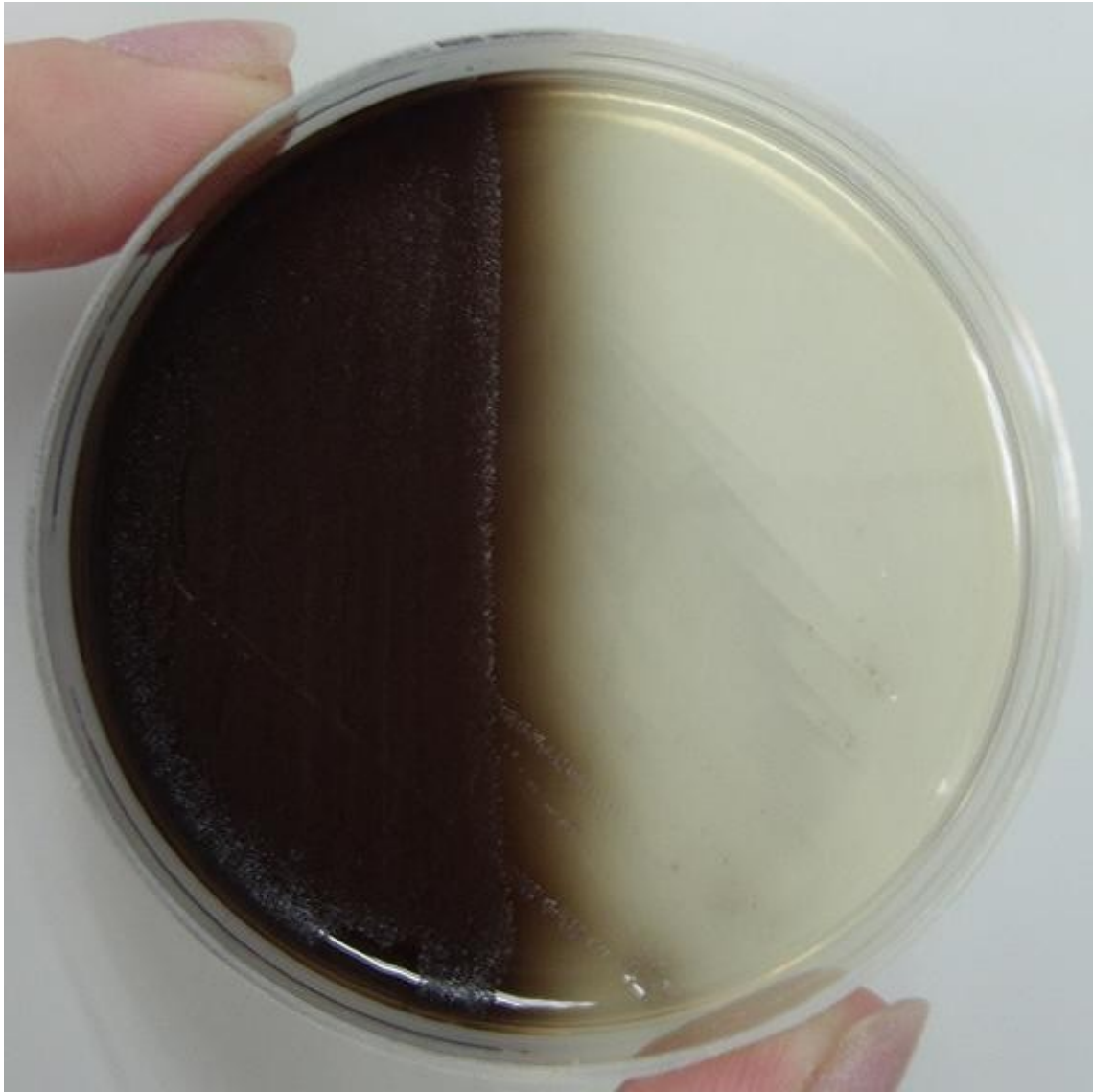
Typy půd

- **Selektivně diagnostické** – kombinují vlastnosti půd selektivních a diagnostických
 - Pro gramnegativní mikroby
 - Endova, MacConkeyho, XLD, SS, CIN, TCŽS
 - Pro grampozitivní mikroby Claubergova půda (původce záškrtu)
 - Slanetzův-Bartleyho agar (enterokoky)
 - Pro anaerobní kultivaci
 - VL bujón, thioglykolátový, Schaedlerův

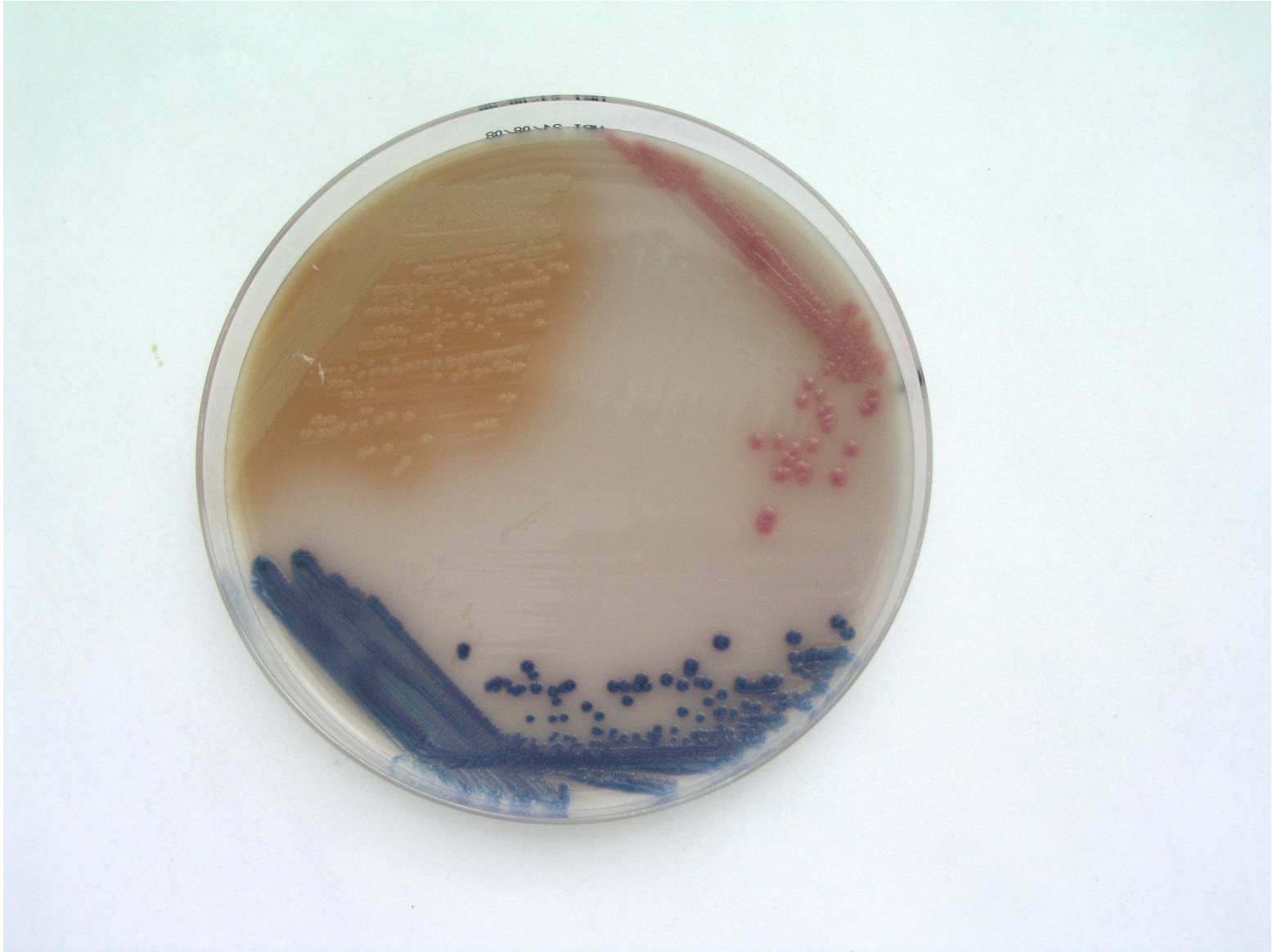
Escherichia coli
na MacConkey agaru



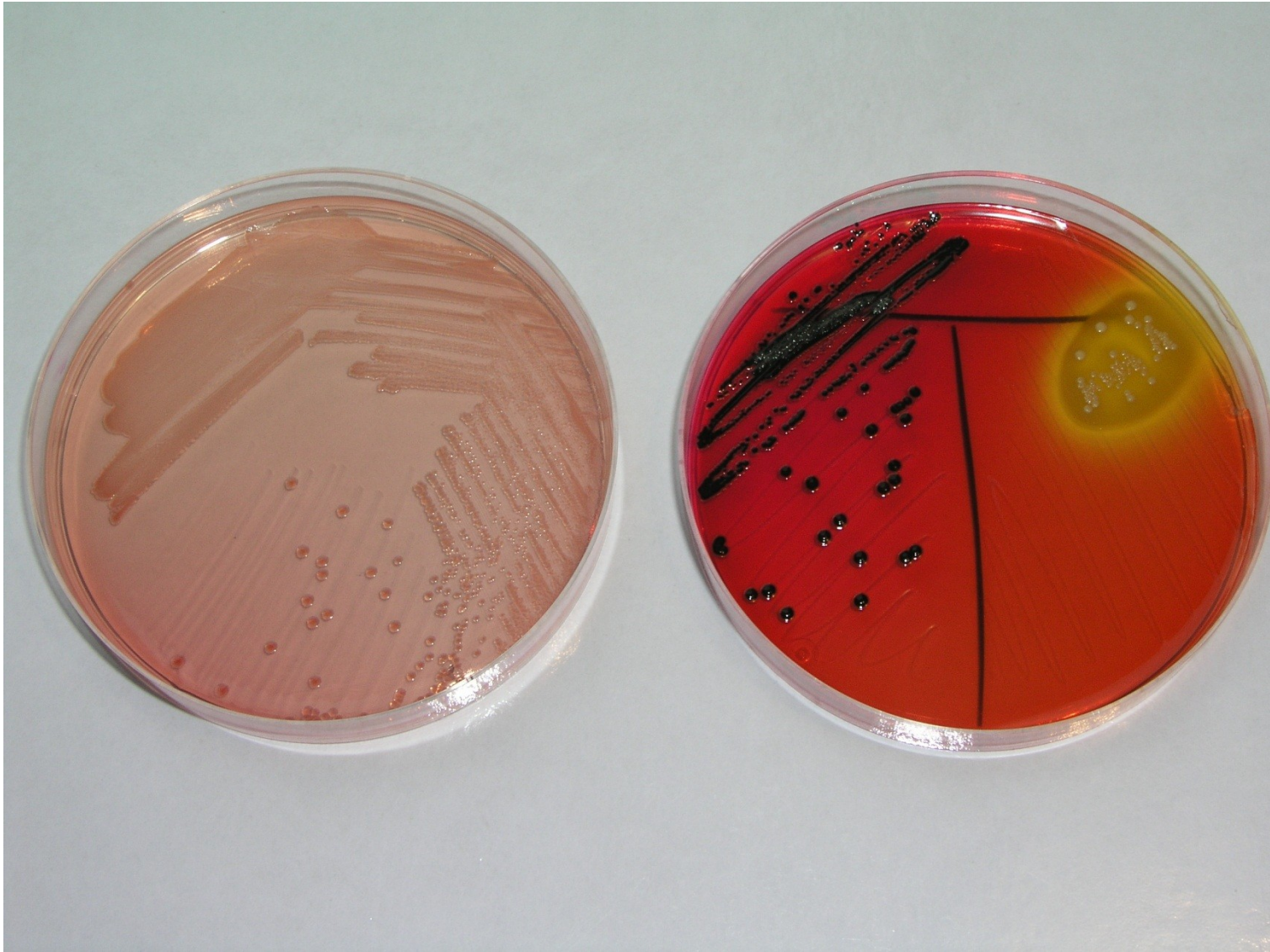
Černé kolonie vankomycin rezistentního enterokoka na selektivní půdě



Chromogenní půda (žlutě roste *Proteus* sp.,
červeně *Escherichia coli*, modře *Klebsiella* sp.)



Salmonella sp. rostoucí na Endově půdě
(průhledné kolonie) a na XLD (černě)



Obecné podmínky přežívání a usmrcování mikrobů

- Nepříznivé faktory zevního prostředí
 - teplota
 - UV a ionizační záření
 - nedostatek vody
 - nedostatek živin
 - nevhodné pH



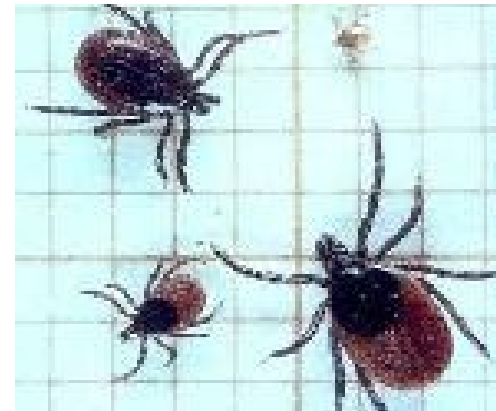
- Při pozvolném růstu intenzity nepříznivého faktoru
 - ustává množení buněk (bakteriostáza) - vratný proces
 - postupné odumírání buněk, probíhá podle logaritmické křivky - nevratný proces

Konkrétní případy

- *Neisseria gonorrhoeae* – podléhá chladovému šoku byla-li odebrána do chladné transportní půdy
- V chladničce při 5° C se mohou množit yersinie, listerie, *Escherichia coli*, přežívají salmonely a kampylobaktery
- většina mikrobů hyne při 60° C - 65° C za 10 – 15 min
- spory vydrží 4 – 20 hodin varu

Základy epidemiologie přenosných nemocí

- Přenos specifického původce nebo jeho toxického produktu z infikovaného jedince na vnímavý objekt
- Proces šíření nákazy
 - Zdroj původce nákazy
 - Cesta přenosu
 - Vnímavý jedinec, populace



Výskyt nákazy

- **Sporadický** – ojedinělá onemocnění bez vzájemné souvislosti
- **Epidemický** – nahromadění v prostoru a čase
 - explozivní – prudký začátek, několikahodinová inkubační doba, alimentární, respirační onemocnění
 - kontaktní – vleklý průběh, dlouhá inkubační doba, virová hepatitida A, AIDS
- **Endemický** – bez časového omezení, vychází z přírodních ohnisek nákazy, rezervoárová zvířata
- **Pandemický výskyt** - chřipka

Výskyt nákazy

- **Sporadický** – ojedinělá onemocnění bez vzájemné souvislosti
- **Epidemický** – nahromadění v prostoru a čase
 - explozivní – prudký začátek, několikahodinová inkubační doba, alimentární, respirační onemocnění
 - kontaktní – vleklý průběh, dlouhá inkubační doba, virová hepatitida A, AIDS
- **Endemický** – bez časového omezení, vychází z přírodních ohnisek nákazy, rezervoárová zvířata
- **Pandemický výskyt** - chřipka

Zdroj nákazy

- **Člověk**

- nemocný

- ke konci inkubační doby, nemocný s typickým nebo atypickým průběhem onemocnění, případně s průběhem abortivním nebo asymptomatickým

- zdravý nosič

- **Zvíře**

- antropozoonózy (brucelóza, antrax, vzteklna, leptospiróza, toxoplazmóza, tularémie)

- **Zevní prostředí – kontaminace, spíše cesta přenosu**

- spóry bakterií, prvoků, vajíčka červů, plísně, nokardie

Přenos původce nákazy

- **přenos přímý**
 - sexuálně přenosné nákazy, pokousání zvířetem, transplacentární
- **přenos nepřímý**
 - předpokládá schopnost původce přežít ve vnějším prostředí, na kontaminovaném povrchu, materiálu, nebo v jiném vehikulu

Přenos nepřímý

- **ingescí – alimentární přenos**
 - vodou (salmonely, shigely, cholera, enteroviry, virové hepatitidy, leptospiry, brucely, původci tularémie, amébová dyzentérie, botulotoxin, shigatoxin)
 - potravin (VHA, TBC, klíšťová encephalitida, alimentární nákazy)
- **inhalací – vzdušnou cestou**
 - respirační nákazy
 - aerosol (Q-horečka, ornithóza, antrax, tularémie)
- **inokulací – transmisivní nákazy**
 - hmyz (malárie, mor), injekce (VHB)

Exogenní infekce

- jsou důsledkem styku makroorganismu s virulentním patogenním mikroorganismem
- klasické infekce
 - variola, skvrnitý tyfus, malárie, diftérie, poliomyelitida, pertuse
 - respirační, průjmová onemocnění, klíšťová encephalitida

Endogenní infekce

- vznikají zavlečením infekčního agens z kolonizovaného místa (kůže, pochva, ale zejména orofarynx a GIT) do jiného systému téhož organismu.
 - **Primárně endogenní infekce** jsou způsobeny potenciálně patogenními mikroorganismy, které jsou normálně přítomny v pacientově mikroflóře.
 - **Sekundárně endogenní infekce** jsou způsobeny mikroorganismy, které před vznikem infekce nejprve kolonizovaly sliznice či kůži pacienta

Indikace k mikrobiologickému vyšetření

- Zjištění etiologického agens
- Stanovení citlivosti na antibiotika
- Sledování výskytu rezistentních kmenů

- Interpretace mikrobiologického nálezu
- Konzultace antibiotické terapie
- Spolupráce s pracovníky ústavní hygieny

Přehled lékařsky významných mikrobiálních agens

- G + koky:
 - *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*
 - *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*,
Streptococcus pneumoniae
 - *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*
- G – koky:
 - *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*

Přehled lékařsky významných mikrobiálních agens

- G+ tyčinky:
 - *Corynebacterium diphtheriae*, *Listeria monocytogenes*
- G + anaerobní tyčky:
 - *Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile*, *Clostridium botulinum*
- G – tyčky:
- *Salmonella enteritidis*, *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter* sp., *Proteus* sp.
- G – tyčinky:
 - *Haemophilus influenzae*
- Acidorezistentní tyčinky:
 - *Mycobacterium tuberculosis*