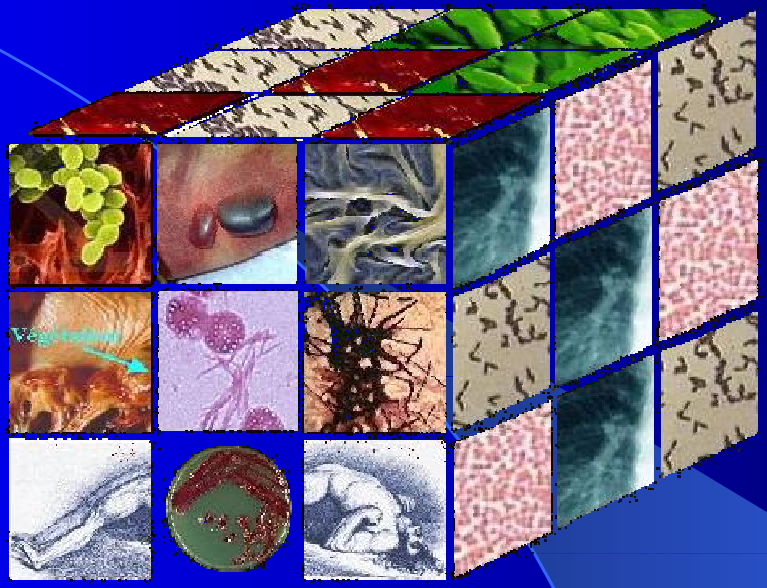
Mikroby a lidské tělo



Mikrobiologie a imunologie – RV2BP_MIKR

Ondřej Zahradníček

zahradnicek@fnusa.cz, 777 031 969

Abych se představil

- MUDr. Ondřej Zahradníček
- povolání: **klinický mikrobiolog**, asistent na LF MU; učíme u nás bakalářské obory, mediky, zubaře i studenty PřF a nyní tedy i PedF
- budou se střídat přednášky a cvičení
- **zájemci se u mne mohou přihlásit a mohou se přijít podívat přímo k nám**

Učební materiály

- **Odpřednášené prezentace** budou vyvěšeny ve Studijních materiálech předmětu
- Tamtéž budou do týdne visí **skripta**; omlouvám se, že tam dosud nevisí
- V případě zájmu mohu dodat různé další materiály

Náš ústav

Foto: Archiv MU

Výuka

Provoz (analýza klinických vzorků)

Výzkum

V naší praktikárně

Foto: Archiv MU

Mikroby a lidské tělo

- Současné děti vědí často velmi mnoho o **zvířatech v ZOO, o rostlinách v zahradě i v lese**, díky naučným seriálům vědí i něco o evoluci, o buňce, i o orgánových systémech lidského těla
- Vědí ale málo o **organismech, které žijí v nich samých**; pokud už se dozvědí něco o mikrobech, jsou to spíše organismy z potoka či z lesní hrabanky než ty, které osidlují je samé

Mikroby v lidském těle

- Každý z nás si s sebou neustále nosí přibližně kilo mikroorganismů. Nejvíc je jich ve střevě. Proto taky je těch mikroorganismů, co s sebou máme, o něco víc, když jdeme „na velkou“, ne když se odtamtud vracíme ☺
- Kromě toho neustále potkáváme různé mikroby, které nás přechodně osidlují a mohou být na povrchu našeho těla nebo uvnitř něj nalezeny
- A konečně jsou tu i mikroby, které nám škodí a způsobují infekční nemoci či různé záněty

Jsou vlastně hodné, nebo zlé?

- Mach a Šebestová se ocitli v krku svého spolužáka, aby zabíjeli zlé bakterie. Obecně představa mnoha laiků je, že bakterie jsou něco zlého, škodlivého, způsobujícího nemoc
- Ve skutečnosti z tzv. „klinicky významných mikrobů" jsou mnohé buď neškodné, anebo školí jen za určitých okolností: například když se přemnoží a dostanou se tam, kam nemají

Kdo zkoumá mikroby

- **Mikroby** se zabývají **mikrobiologové**. Mikrobiologie spadá pod biologické vědy a jako taková se studuje na přírodovědeckých fakultách
- **Mikroby lidského těla** se zabývají **kliničtí mikrobiologové**. Klinická mikrobiologie je přechodný obor mezi biologickými a lékařskými vědami. Kliničtí mikrobiologové jsou proto dílem lékaři a dílem přírodovědci, případně jiní odborníci

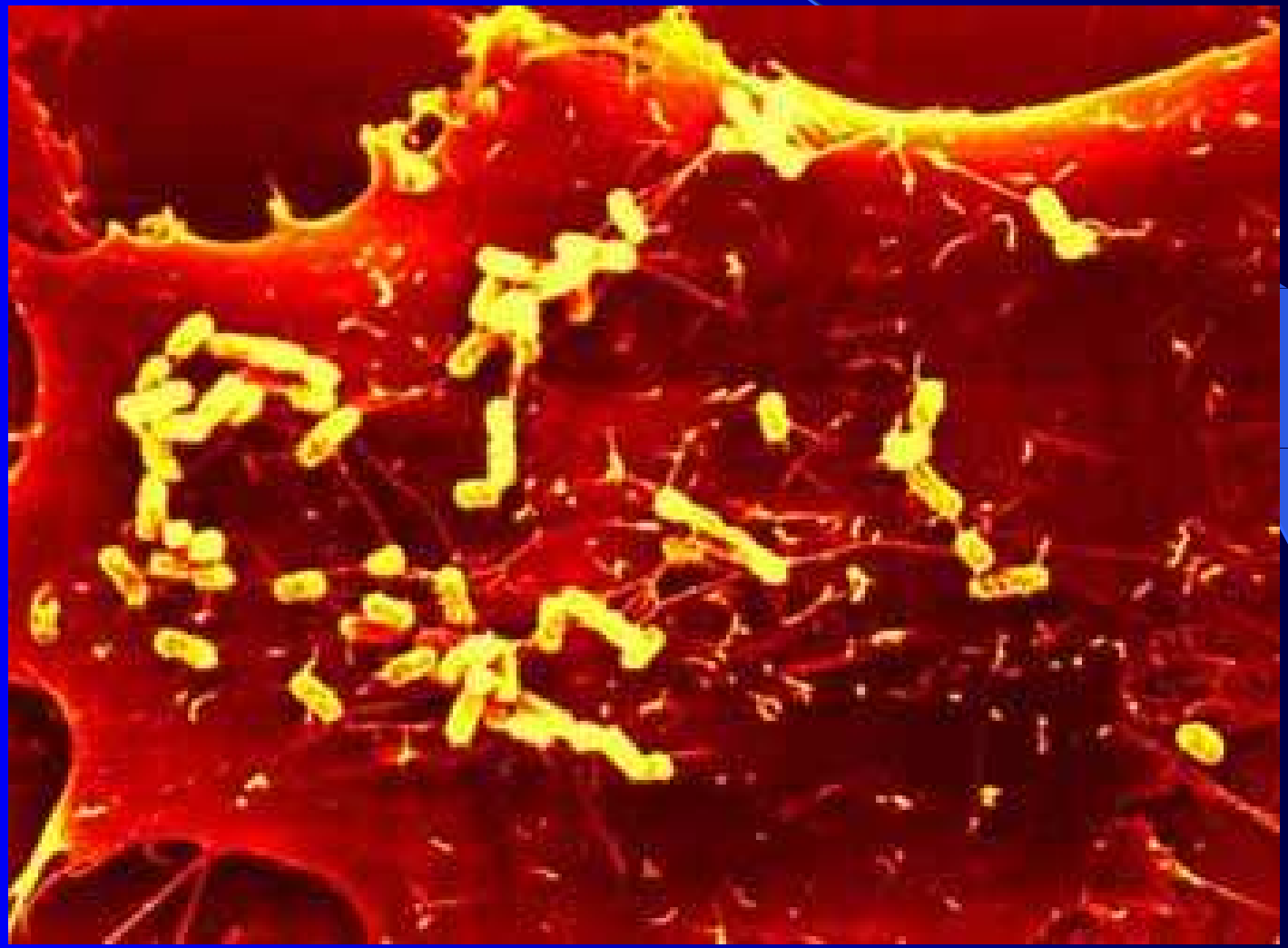
Kdo jsou mikrobiologové

Na našem ústavu jsou lékaři a další odborníci.

Co zkoumají kliničtí mikrobiologové

- Kliničtí mikrobiologové ani tak **nezkoumají mikroby**, od toho jsou mikrobiologové „classic", ti, kteří dělají analýzy DNA a hledají vzájemné příbuzenské vztahy mezi mikroby, jejich vlastnosti a složení
- Kliničtí mikrobiologové spíše zkoumají (někdy velmi křehké ☺) **vztahy mezi mikrobem a jeho hostitelem.** Klinického mikrobiologa většinou nezajímá izolovaná *Escherichia coli*, ale spíše třeba *Escherichia coli* adherovaná na stěnu močového měchýře.

Escherichia coli v močovém měchýři



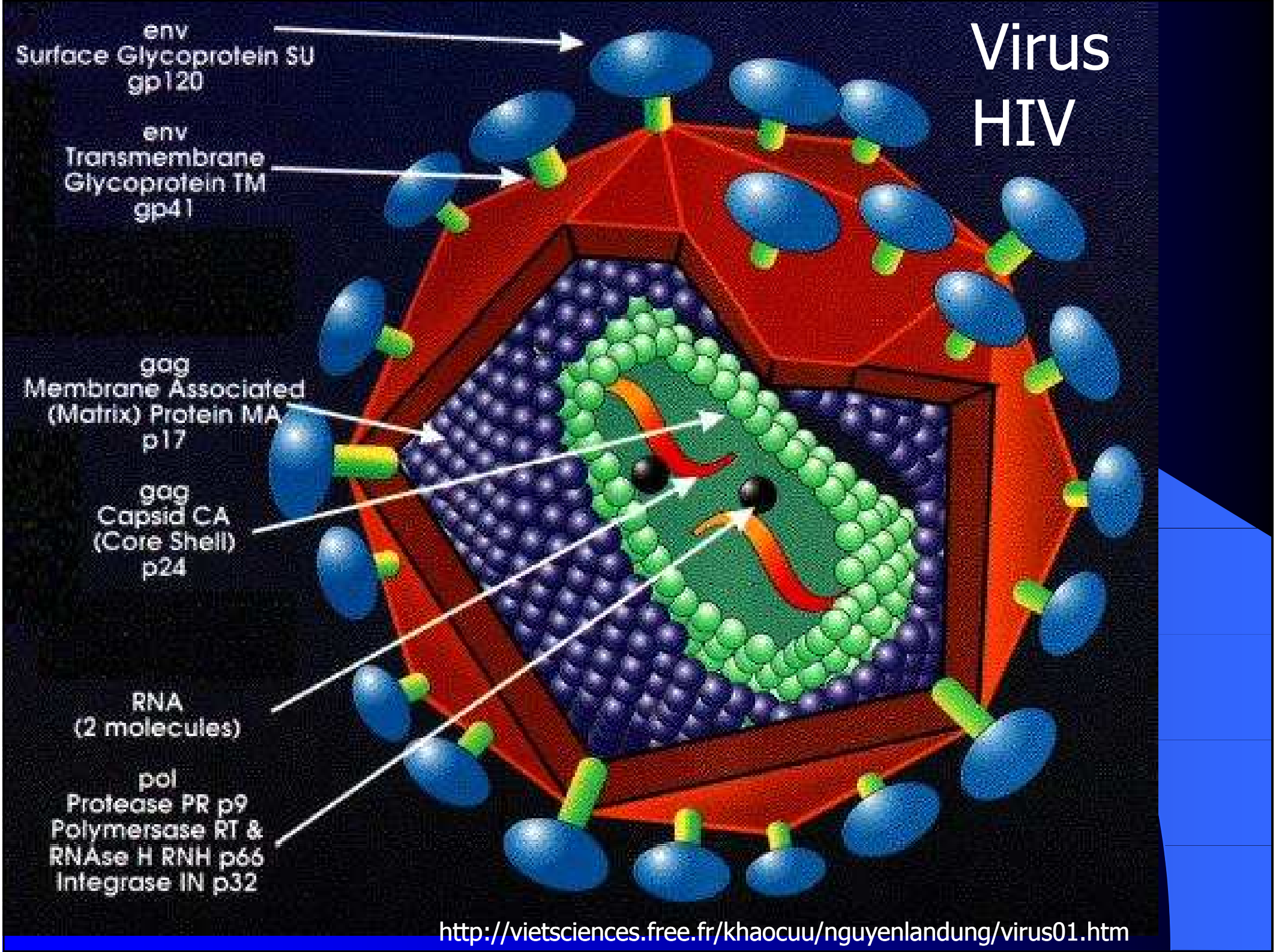
http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Escherichia

Klinická mikrobiologie

Klinická mikrobiologie a imunologie

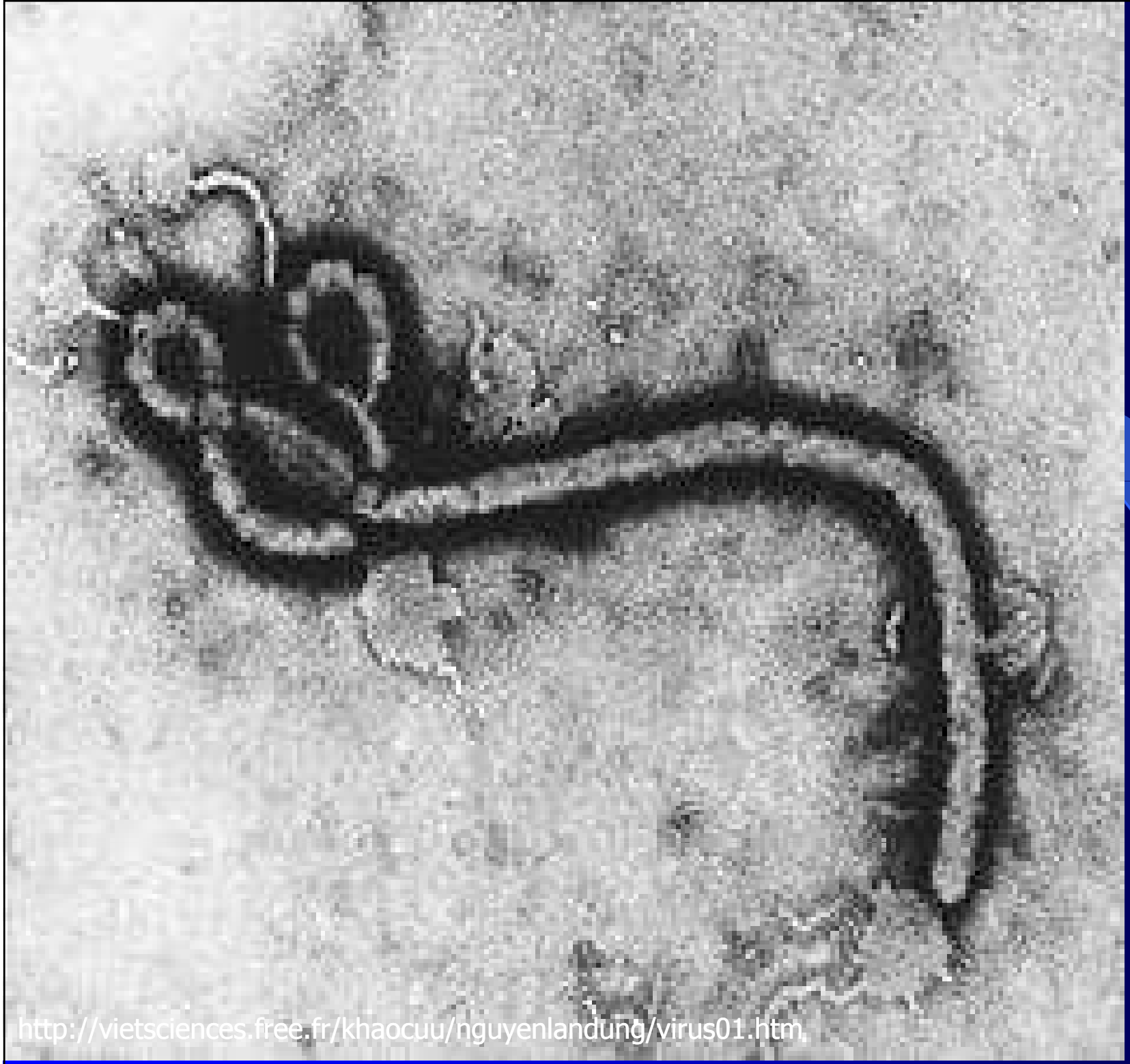
- Klinická mikrobiologie se jako samostatný obor odštěpila začátkem 20. století z patologie. Do té doby se diagnostikou mikrobiálních původců ve vzorcích pacientů zabývali patologové
- O více než půlstoletí později se z mikrobiologie vyčlenila imunologie, tedy věda o obranyschopnosti organismu. Dnes už existují samostatné imunologické ústavy a laboratoře, medici mají samostatnou zkoušku z imunologie. Klinická imunologie je však zároveň i součástí interny, případně pediatrie.

Virus HIV



http://vietsciences.free.fr/khaocuu/nguyenlandung/virus01.htm

Ebola

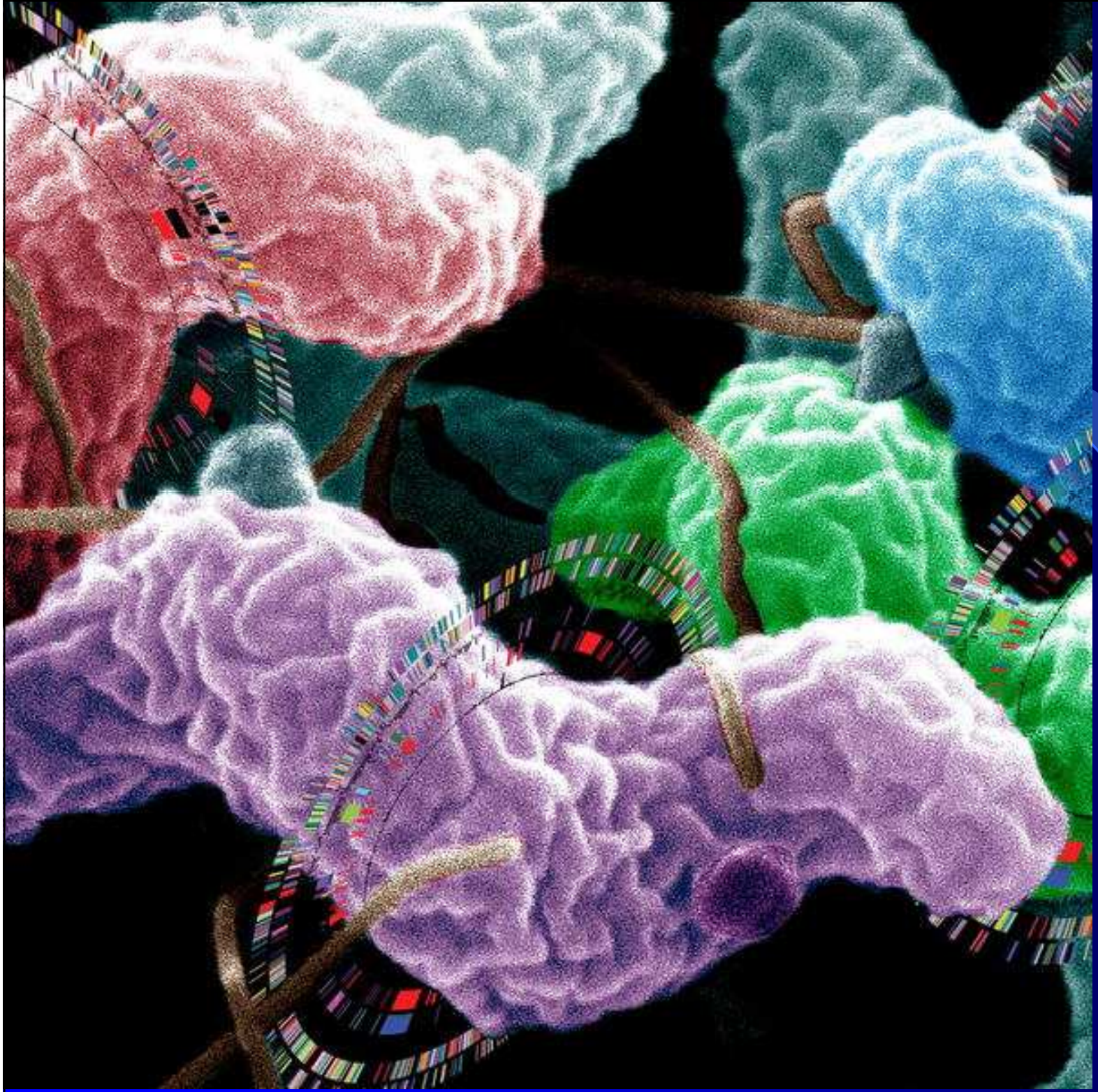


http://vietsciences.free.fr/khaocuu/nguyenlandung/virus01.htm

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

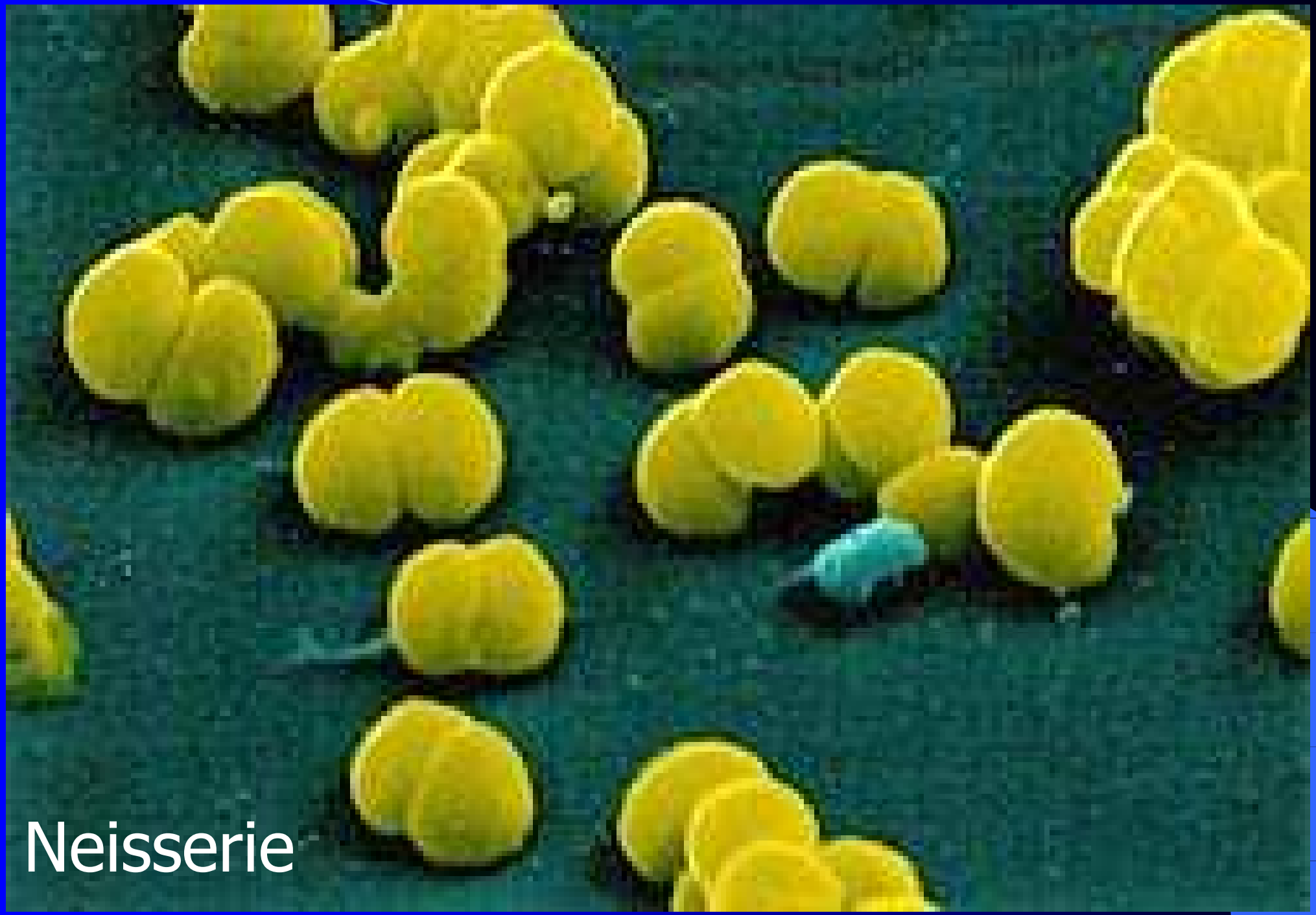
http://biology.plosjournals.org/archive/1545-7885/3/1/figure/10.1371_journal.pbio.0030040.g001-M.jpg

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



www.meningitis.de/erreger/meningokokken.html.

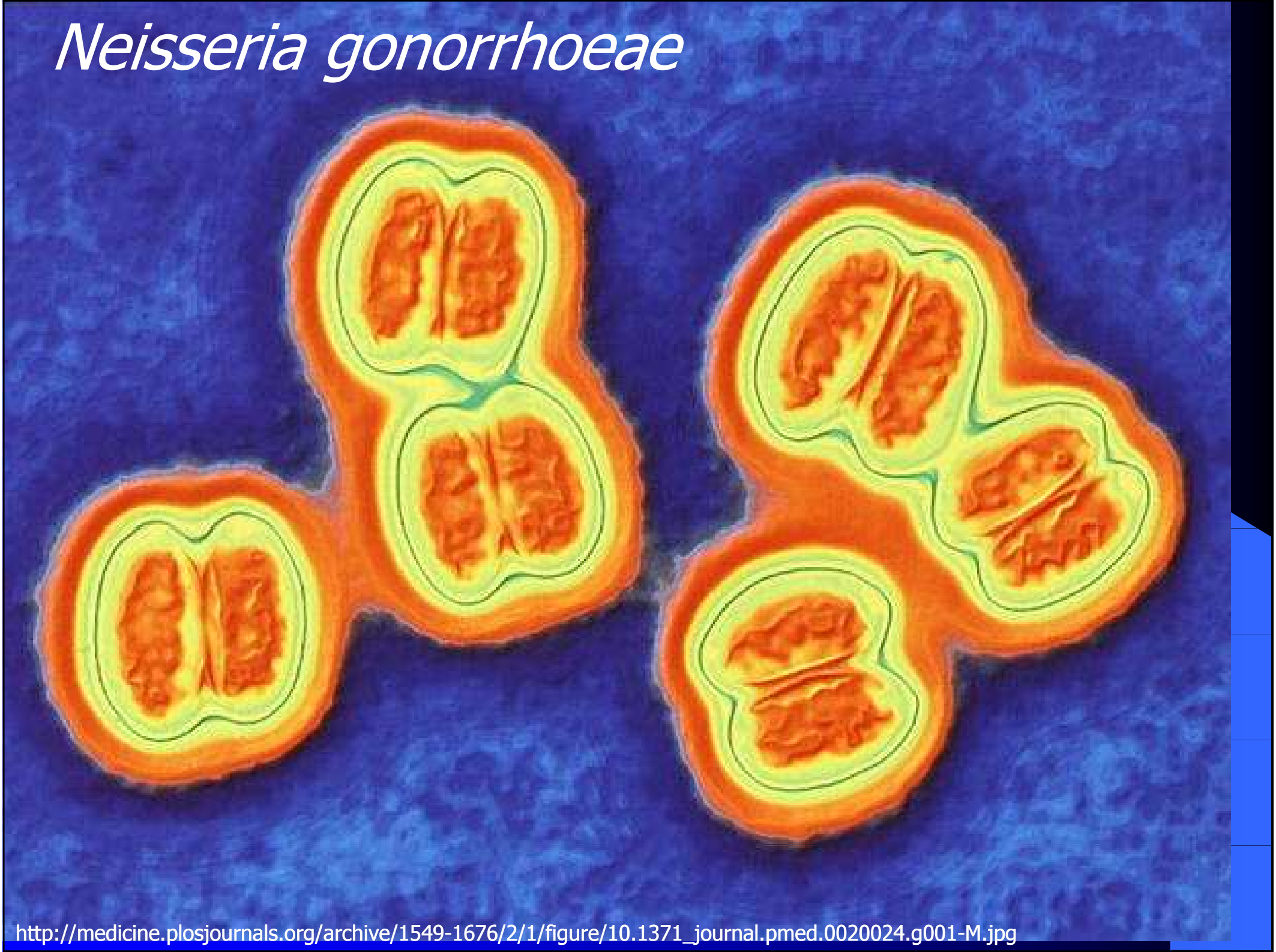
Třídění živých organismů

- ***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** (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



http://medicine.plosjournals.org/archive/1549-1676/2/1/figure/10.1371_journal.pmed.0020024.g001-M.jpg

Hlavní klinicky významné mikroby

- **Viry** (a priony)
- **Bakterie** (třeba streptokok nebo *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** (vši, blechy, štěnice)

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 modře
  - gramnegativní – barví se červeně
  - Gramem se nebarvící – 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

Proč je dobré znát přehled mikrobů

- Pokud umíme mikroba zařadit (alespoň rámcově: je to bakterie, kok, grampozitivní) znamená to, že můžeme odhadnout jeho základní vlastnosti a vhodný způsob léčby
- **Zařazení mikroba do systému se bohužel většinou nedá odvodit.**

Jsou situace, kdy hýžďové svalstvo je důležitější než mozek ☺

Listeria monocytogenes
http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Listeria

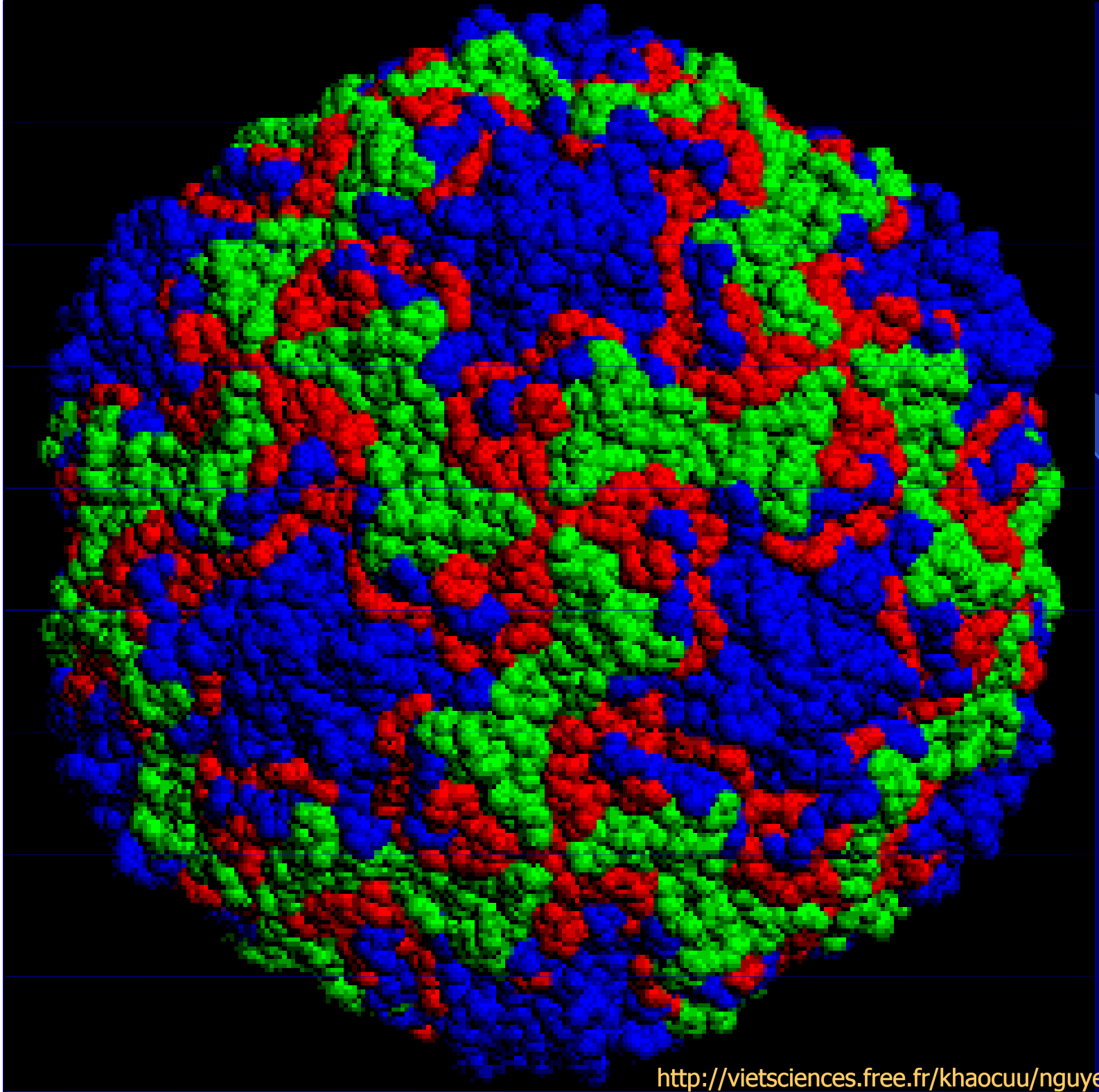
Co nás zajímá o mikrobech

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

Virus běžné rýmy

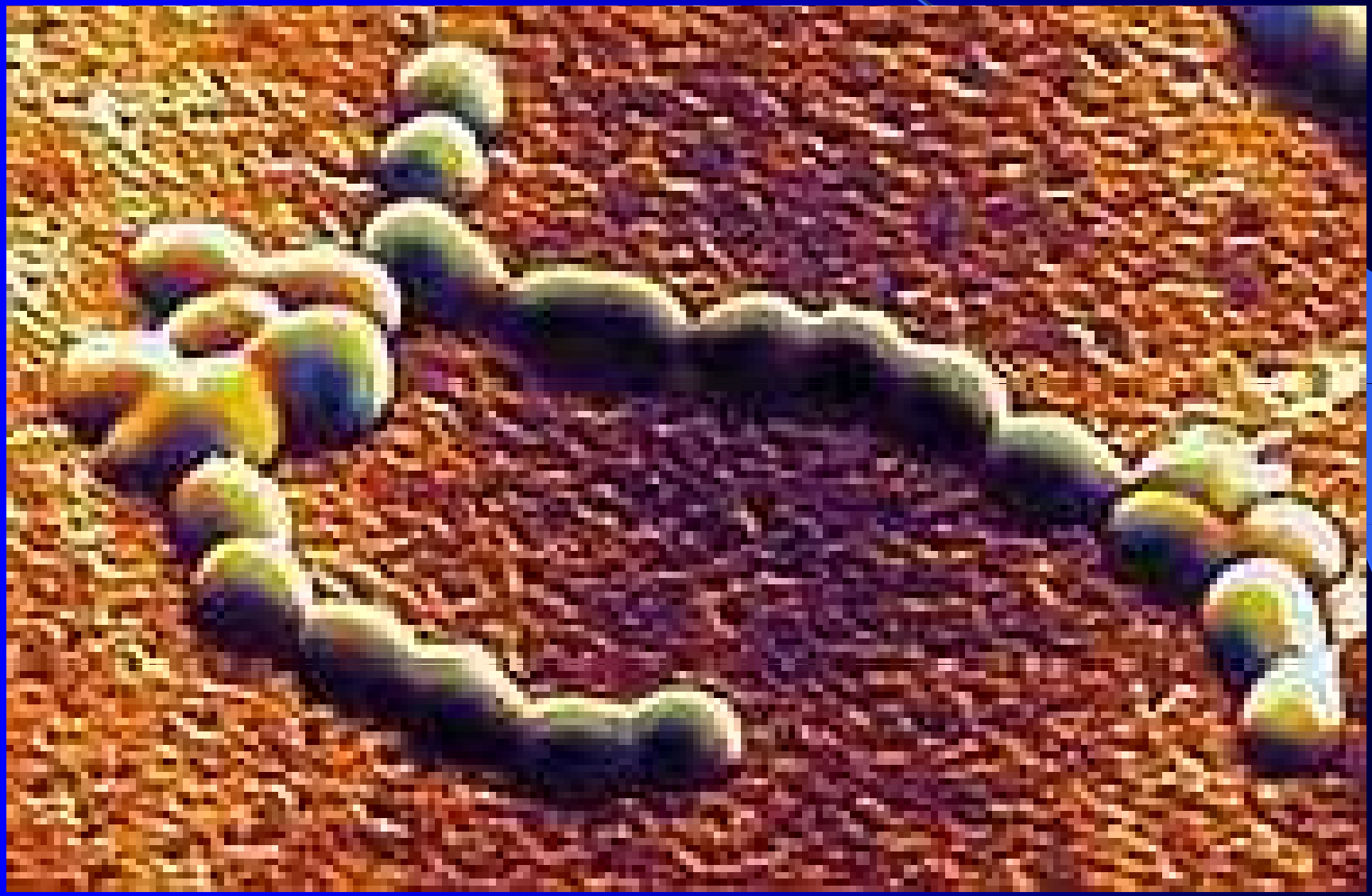


http://vietsciences.free.fr/khaocuu/nguyenlandung/virus01.htm

Morfologie bakterií

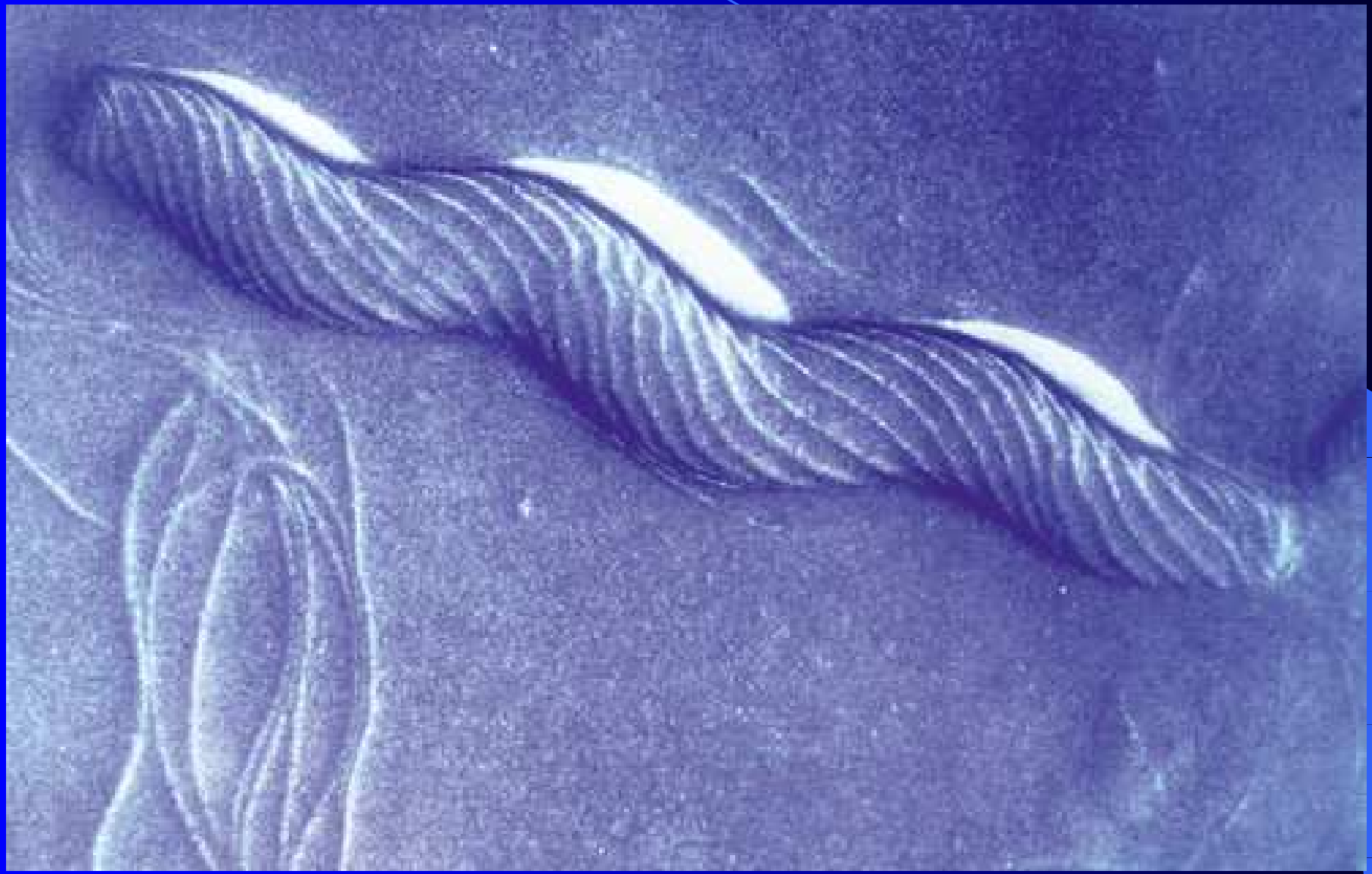
- **Koky** ve dvojicích (diplokoky), v řetízcích a ve shlucích (neříkejme raději „streptokoky“ a „stafylokoky“, bylo by to matoucí)
- **Tyčinky** rovné či zahnuté (vibria), případně několikrát zahnuté (spirily), krátké nebo dlouhé, tvořící až vlákna či rozvětvená vlákna; konce mohou být oblé či špičaté a i tyčinky můžou být různě uspořádané
- **Spirochety** – tenké spirálovité bakterie
- **Beztvaré bakterie**, například mykoplasmata (nemají buněčnou stěnu, takže nemají tvar)

Koky v řetízcích (elektronová mikrofotografie *Enterococcus* sp.)



http://www.morgenwelt.de/typo3temp/5ce14d39b5.jpg

Zprohýbaná tyčinka – helikobakter



http://vietsciences.free.fr/nobel/medecine/images/helicobacter%2520pylori.JPG

Spirochety

www.primer.ru/std/gallery_std/treponema.htm

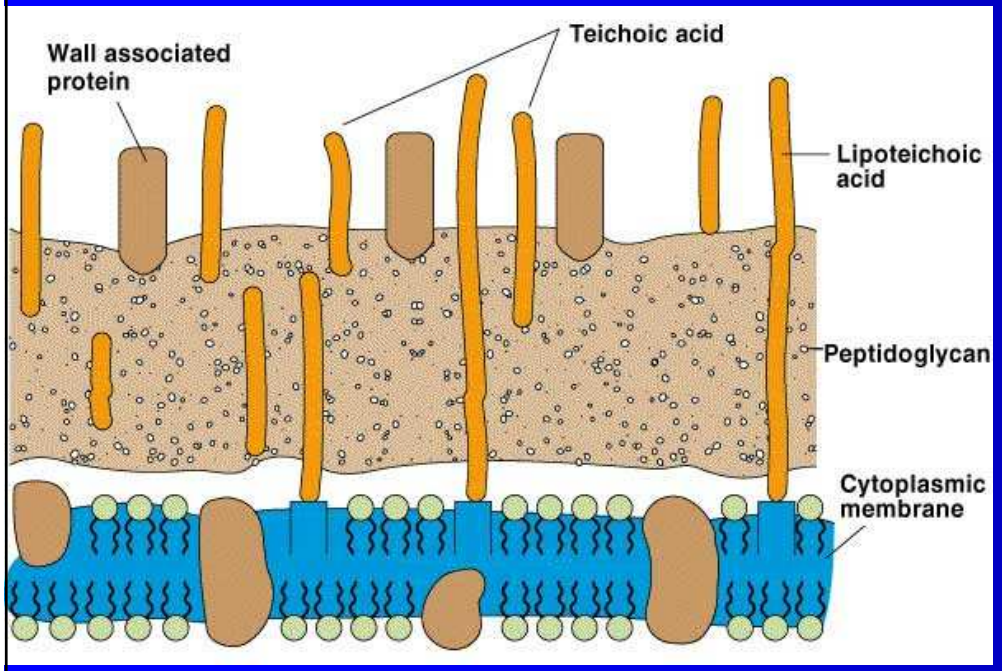
idsc.nih.go.jp/.../k03/k03_012/k03_012.html

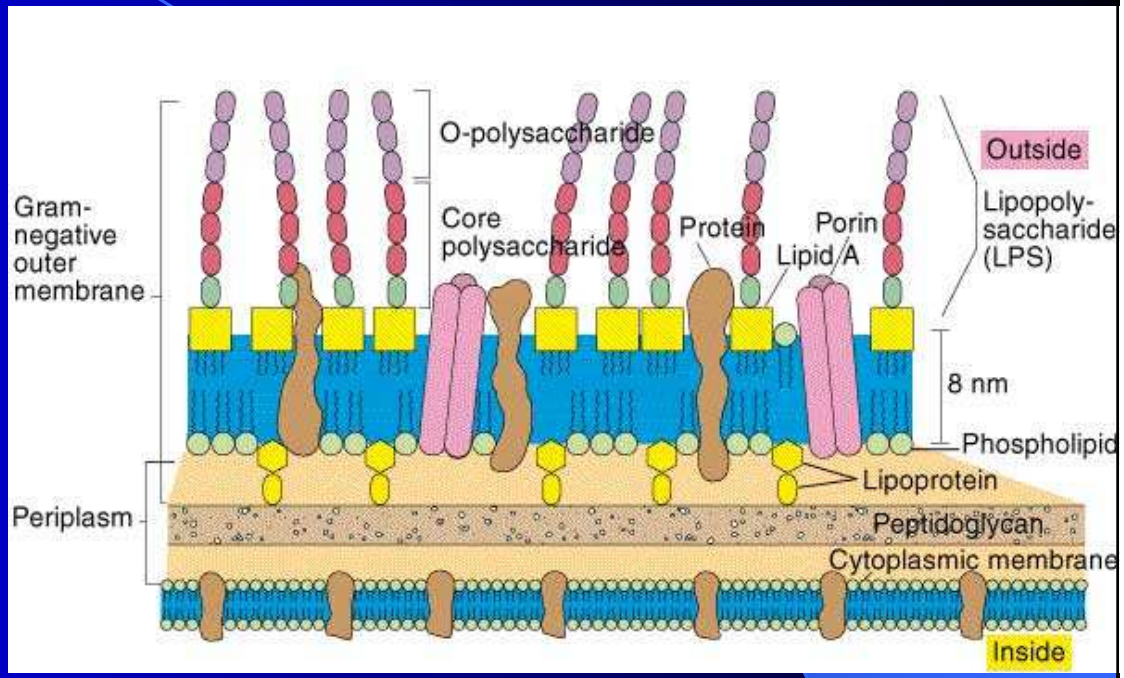
Typ buněčné stěny

- **Grampozitivní bakterie** mají tlustou a jednoduchou buněčnou stěnu. Jsou odolné hlavně mechanicky. Při barvení podle Grama jsou fialové. Například stafylokoky.
- **Gramnegativní bakterie** mají tenkou, ale o to složitější buněčnou stěnu. Jsou odolné hlavně chemicky. Při barvení podle Grama jsou červené. Například escherichie.
- **Gramem se nebarvící bakterie** buněčnou stěnu nemají (mykoplasmata) nebo ji mají hodně jinou (mykobakteria).

Grampozitivní

Gramnegativní



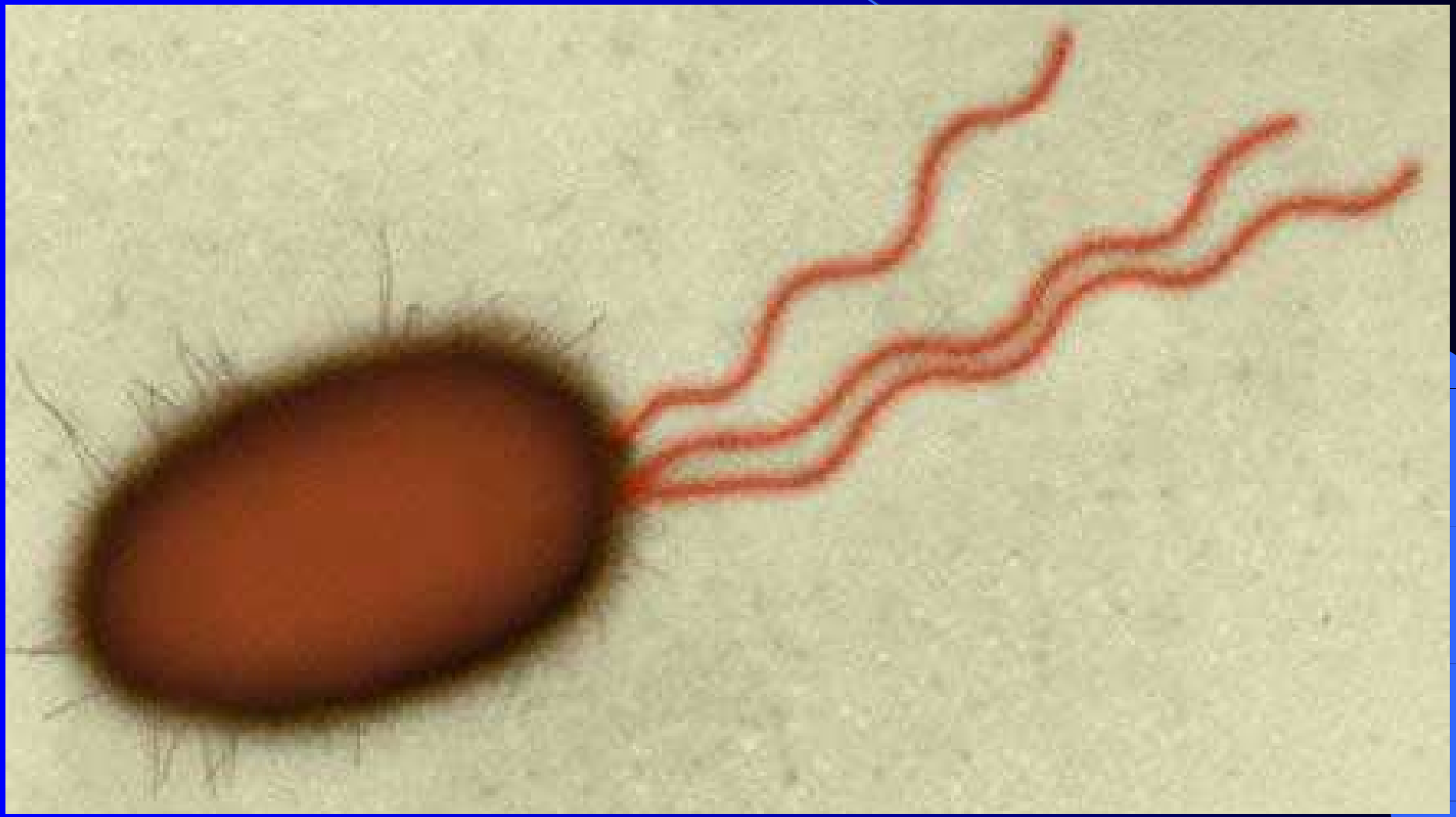


http://www.arches.uga.edu/~emilyd/mibo3510/gm-%2520cell%2520wall.jpg

G+

G–

Bakterie s bičíky *(Escherichia coli)*



http://www.biotox.cz/toxikon/bakterie/bakterie/obr/escherichia_coli_1.htm

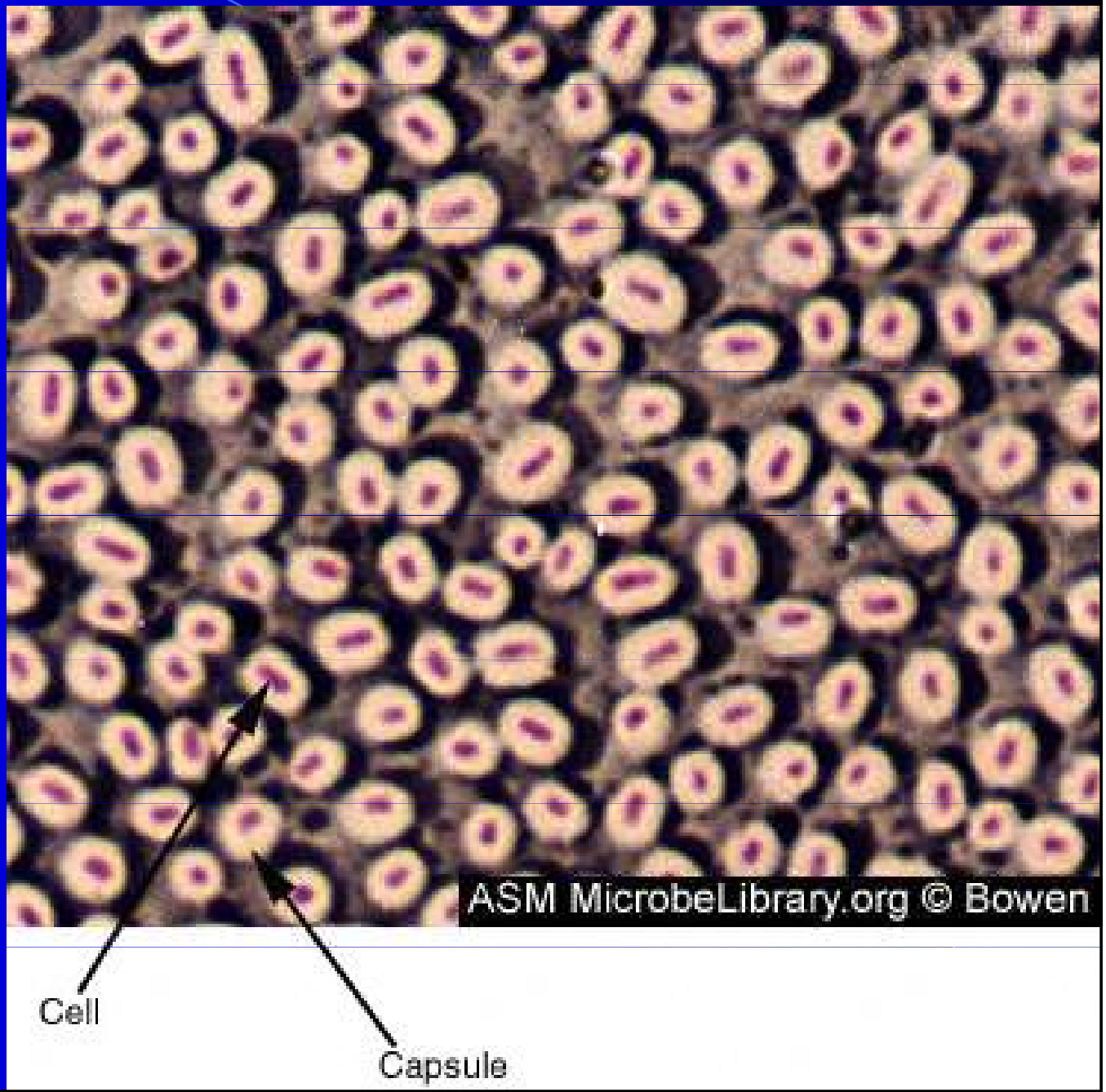
Pouzdro a biofilm

- **Pouzdro** obklopuje jednotlivou bakterii, popř. dvojici. Není to už integrální součást bakteriální buňky, spíš nánosy molekul (většinou polysacharidů), které buňku chrání
- **Biofilm** je souvislá vrstva, vzniklá z bakterií, jejich pouzder a dalšího materiálu. Biofilm je mnohem odolnější než jednotlivá bakterie, žijící v tzv. planktonické formě. O biofilmu bude řeč dále

Neobarvené pouzdro

http://pathmicro.med.sc.edu/fox/capsule.jpg

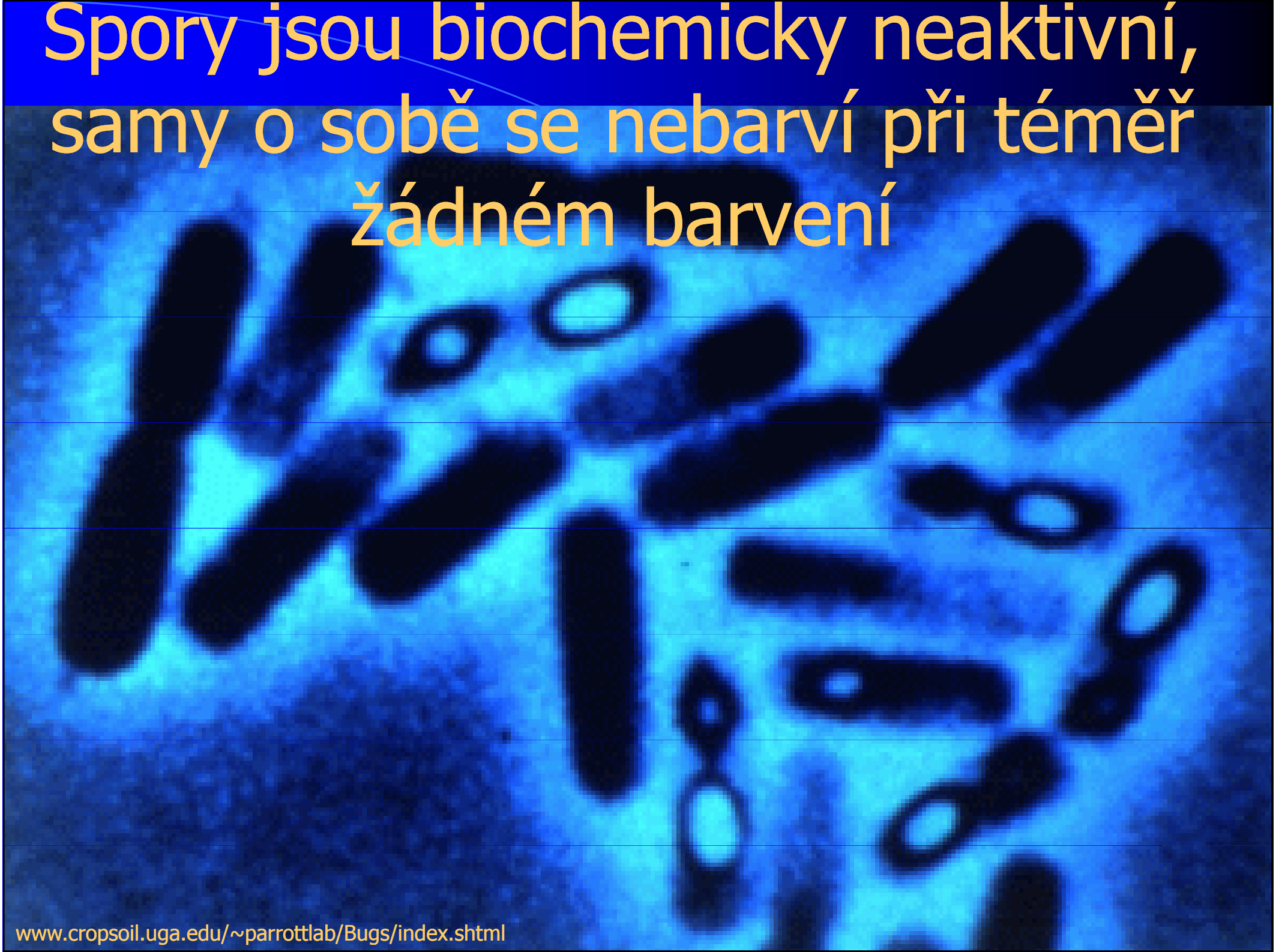
V barvení dle Burriho byly nabarveny bakterie na červeno a pozadí dobarveno tuší; mikroskopista pak tuší pouzdro tam, kde se nic neobarvilo



Sporulace

- Sporulace je **něco jako zimní spánek**, ale mnohem dokonalejší než je zimní spánek zvířat. Opakem spory je **vegetativní forma** života buňky
- Spory přežijí velmi **vysoké teploty, vyschnutí, desinfekci** a podobně
- Spora vzniká tak, že se **buňka rozdělí na dvě části**. Ty se však neoddělí úplně: jedna, ze které se stane spora, je obklopena tou druhou, které zůstává vegetativní forma. Takové spoře říkáme **endospora**
- V extrémních podmínkách **vegetativní buňka hyne a zůstane pouze spora**
- Za příznivých podmínek **spora vyklíčí**
- *Nepleťme si spory bakterií a spory hub!*

Spory jsou biochemicky neaktivní, samy o sobě se nebarví při téměř žádném barvení



www.cropsoil.uga.edu/~parrottlab/Bugs/index.shtml

Fyziologie a metabolismus bakterií

- Tak jako každý organismus, i bakterie mají svůj katabolismus a anabolismus
- Katabolismus může být trojí:
  - Fermentace – štěpení bez potřeby kyslíku. Málo energeticky výhodný, ale nepotřebuje kyslík. Využívají ji například střevní bakterie
  - Aerobní respirace – z mála živin se získá hodně energie, je ale nutný kyslík. Využívají ji bakterie, které nacházíme ve vnějším prostředí, na rostlinách aj.
  - Anaerobní respirace – jiný akceptor elektronů než kyslík, pro člověka málo významné

Množení bakterií

- Každá bakterie má svou **generační dobu**
- Za jednu generační dobu jsou z jedné dvě, za desetinásobek je z jedné bakterie 1024 bakterií (teoreticky) a podobně
- Ideální množení by existovalo pouze kdybychom neustále přidávali živiny a popř. kyslík a odebírali odpadní produkty
- Pozor, nepleťte si generační dobu (za jak dlouho se bakterie rozdělí na dvě) a kultivační dobu (za jak dlouho vidíme výsledek na kultivační půdě)

Foto: archiv MÚ

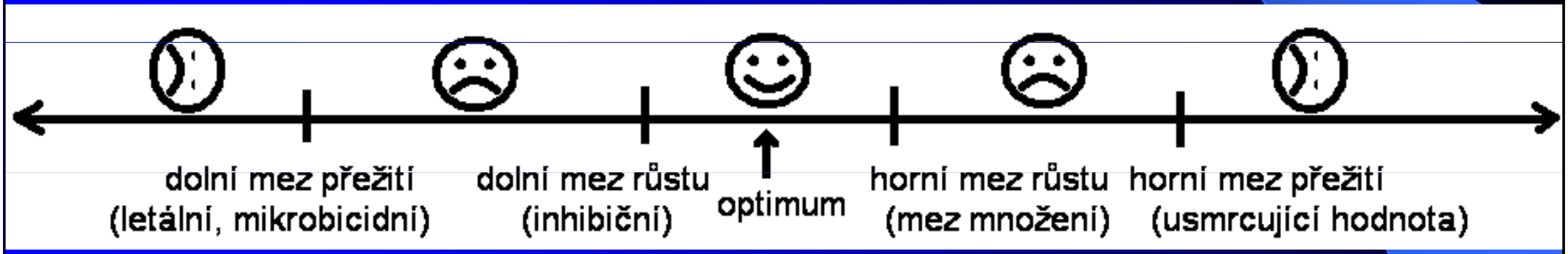
V jedné z našich laboratoří

Životní podmínky bakterií

- Pro život bakterií jsou nutné **určité podmínky**
- Tyto podmínky musíme splnit také v případě, že chceme bakterie **uměle pěstovat** (třeba proto, abychom je přitom mohli určovat)
- Nestačí takové, aby bakterie přežívala. **Musí být i schopna se množit**
- Na druhou stranu, **pokud s bakteriemi bojujeme** (při desinfekci, sterilizaci), nestačí obvykle potlačit jejich množení, ale **musíme je úplně zahubit**.

Životní podmínky – pokračování

- Podmínky musí být splněny, co se týče **teploty**, **pH**, **koncentrace solí** a mnoha dalších věcí
- Nepůsobí přitom jednotlivě, **kombinují se**



Takto působí na bakterie např. různé pH (za předpokladu, že se nemění ostatní podmínky)

Vztahy mezi organismy obecně

Ekologie je věda o vztazích mezi organismy navzájem a mezi organismy a prostředím

Symbióza v širším slova smyslu znamená jakékoli těsné soužití dvou rozdílných organismů

Symbióza v užším smyslu znamená pouze vzájemně prospěšné soužití obou organismů (také mutualismus, oba partneři mají ze soužití užitek a často nemohou mimo ně přežít, např. houba + řasa = lišejník)

Případ, kdy jeden organismus druhému škodí, se pak nazývá antibióza (a případná látka za ni zodpovědná je antibiotikum)

Vztah může být také indiferentní

Potravní vztahy dvou organismů

Komenzalismus – „sdílení jídelního stolu“ (mensa). Například potraviny, které sníme, využívají i mikroby našeho střeva

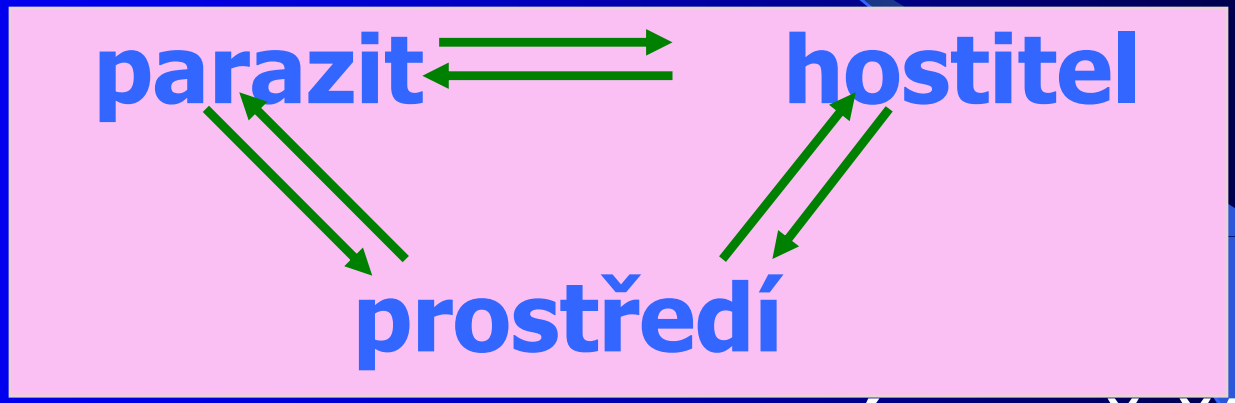
Saprofytismus – využívání odumřelých částí organismů či celých odumřelých organismů (odloupaných epitelií či celých mrtvých těl)

Predace – organismus se živý jiným živým organismem (lev – antilopa)

Parazitismus – případ, kdy jeden organismus žije na úkor druhého a napadá jeho živé buňky, ne však s cílem rychlého usmrcení (jako u predace), ale s cílem dlouhodobého přežití tímto způsobem (jmelí – stromy). **Sem patří i mnohé medicínsky významné mikroby.**

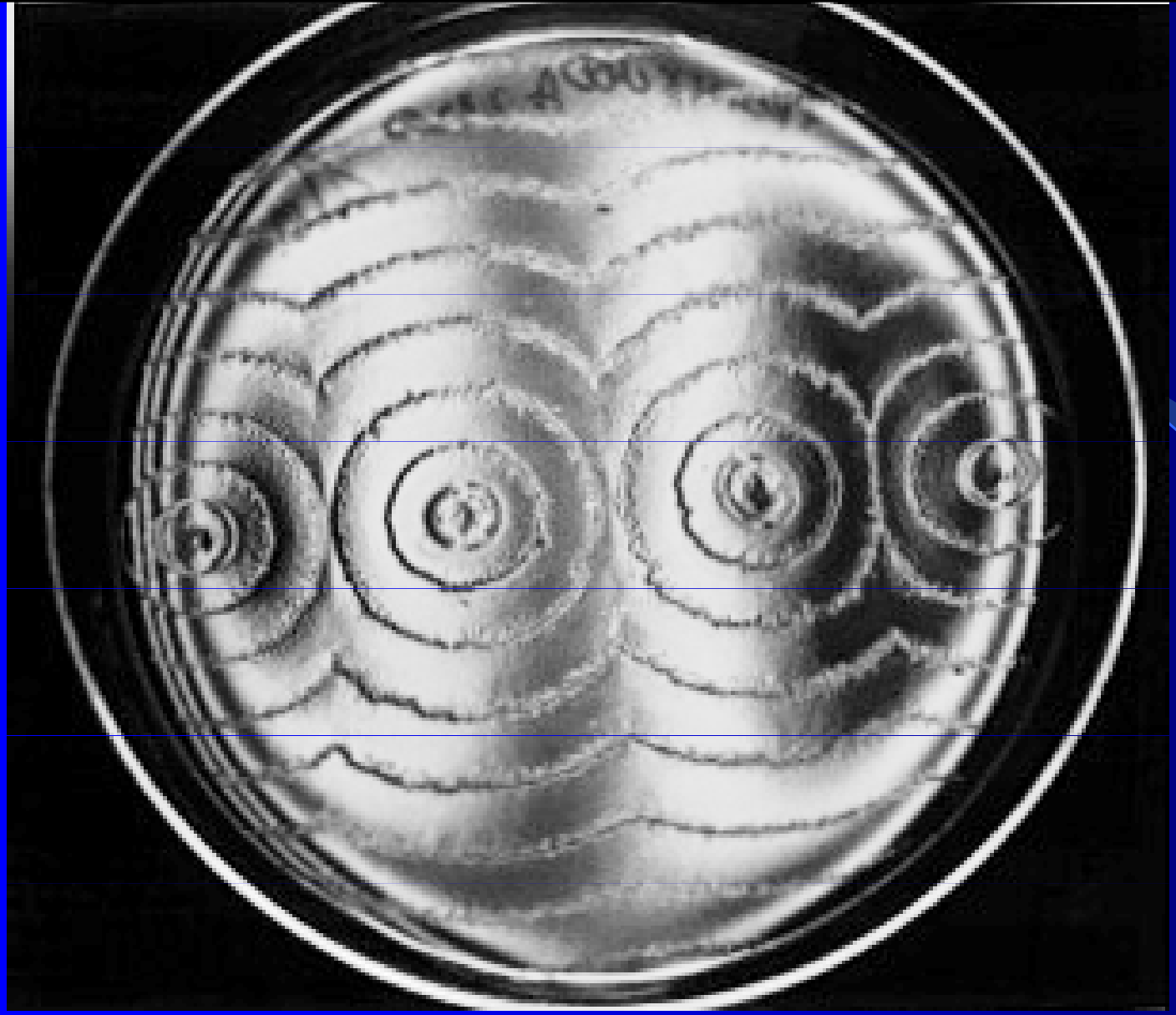
Vztah parazit × hostitel

Je dynamický a je ovlivňován prostředím



Pro parazita je zpravidla nejvýhodnější situace, kdy **hostitel přežije, ale nesnaží se parazita zbavit**

Pro hostitele je ale **živení parazita nevýhodné**, snaží se ho tedy zbavit – zničit, odstranit, nebo aspoň lokalizovat



http://faculty.smu.edu/ayati/proteus/proteus1.gif

Saprofyt: *Proteus* se podílí na likvidaci nestrávených bílkovinných zbytků potravy

Zkusme tedy shrnout

- Z hlediska klinické mikrobiologie je významný **vztah mikroorganismus – makroorganismus** (což může být člověk, ale také zvíře či rostlina)
- Může jít o **symbiózu, neutrální vztah** či **antibiózu**
- Často se používají i **termíny z potravních řetězců** (komenzalismus, saprofytismus, parazitismus). Virulentní mikroby jsou zpravidla – ale ne vždy – parazitické
- **Ne vždycky se dají mikroby jednoduše „zaškatulkovat".** Často záleží na okolnostech, jestli bude mikrob „zlý" nebo „hodný"

Interakce mikrob – makroorganismus: mikroby napadající člověka

- Mikroorganismy, které napadají člověka, jsou vybaveny různými **faktory virulence** – jsou to faktory, které zajišťují schopnost mikroba proniknout do organismu. Nejčastěji to bývají různé enzymy, toxiny, bakteriální pouzdro aj.
- Makroorganismus se mikrobům brání řadou různých způsobů. Jde vždy o to, zda se více prosadí faktor virulence mikroba, nebo **mechanismus obranyschopnosti makroorganismu**

Patogenita mikroorganismů

- Existují mikroby **nepatogenní** – neschopné vyvolat nemoc. Většinou jsou to ty, které vůbec nejsou schopny do organismu proniknout.
- Existují mikroby **podmíněně patogenní**, které vyvolávají nemoci jen za určitých podmínek. Často jsou to prospěšné bakterie, které jsou většinou „hodné" a jen výjimečně začnou „zlobit", když se třeba dostanou kam nemají, nebo když zmutují
- Existují i mikroby **obligátně patogenní**, které vyvolávají nemoc vždy, když se dostanou do těla v dostatečném počtu a vhodným způsobem

Předpoklady patogenity

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

Faktory zodpovědné za virulenci, respektive patogenitu

- Kolonizace hostitele – fimbrie, bičíky, adheziny
- Faktory invazivity – vnikání do tkáně
- Toxiny (jedy), hlavně u bakterií: neurotoxiny, enterotoxiny, lokální toxiny a jiné
- Faktory boje s obrannými mechanismy hostitele
- Biofilm – složitý útvar, složený nejen z mikrobů

Patogenita a virulence

Virulence

- okamžitá vlastnost konkrétního kmene mikroba (kmen = populace z jedné buňky)
- 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.

Patogenita

- vlastnost určitého mikrobiálního druhu
- Nepatogenní: nejsou schopny vyvolat u daného živočišného druhu nemoc.
- Potenciální (oportunní) patogeni: vyvolávají chorobu jen někdy
- Obligátní (primární) patogeni vyvolávají nemoc "vždy"

Příklad působení patogenního mikroba

These large, dark, boil-like blisters are a diagnostic symptom of necrotizing fasciitis (also known as flesh-eating disease).
(Source: EMBBS, 1998 http://mdchoice.com/)

Hodné mikroby: běžná mikroflóra

- **Mnoho mikrobů nám pomáhá.** Tím, že osidlují naše sliznice, zabrání tomu, aby je osídlily zlé patogenní mikroby. Některé pomáhají i jinak
- Nejvíc, asi kilogram, je jich **v tlustém střevě**
- Hodně mikrobů je i **v dutině ústní a v hltanu**
- U žen je mikrobní ekosystém **v pochvě**
- I přes relativní nedostatek vody má svoji mikroflóru také **kůže** (poněkud se liší na různých místech)

Plazivá bakterie *Proteus* se podílí na likvidaci nestrávených bílkovinných zbytků potravy

Mikroflóra jako ekosystém

- Kdysi lidé mysleli, že všechny škůdce úrody jednoduše zahubí například DDT. Ukázalo se ale, že takový **brutální zásah často nadělá víc škody než užitku**, zvlášť když se použije nevhodným způsobem
- Podobně **složitý ekosystém je i třeba střevní mikroflóra**. I proto dnes na střevní infekce většinou nedoporučujeme antibiotika, protože systém „rozhodí" často ještě víc.

Co ovlivňuje infekci

- Vstupní brána infekce (kudy mikrob pronikl)
- Forma infekce
  - podle rozsahu – lokální / celková
  - podle vyjádření průběhu – bezpříznaková / příznaková
  - u infekce s příznaky dále průběh abortivní – typický – komplikovaný
- Vylučování mikrobů z těla

V podstatě je plynulý přechod mezi infekcí, bezpříznakovou kolonizací a běžnou flórou.

Co ovlivňuje formu infekce

- na straně mikroba: vybavenost faktory virulence (může být dána třeba i tím, že mikrob sám je napaden bakteriálním virem – bakteriofágem)
- na straně makroorganismu: stav imunity, stav anatomických bariér, hormonální rovnováha, případné základní onemocnění a spousta dalších věcí
- forma vzájemného setkání mikroba a makroorganismu

Biofilm

Co je to biofilm

- Biofilm je **jeden ze způsobů života bakterií**. Je to způsob, kdy bakterie tvoří souvislou vrstvičku na určitém povrchu
- Opakem biofilmu je **planktonická forma života** bakterie
- Biofilm se v přírodě **vyskytuje velice často**. Biofilm je to, na čem v létě uklouzneme v rybníce, když šlápneme na kámen
- Biofilm může být **jednodruhový**, častěji však bývá **vícedruhový**
- Mohou se na něm podílet **bakterie, kvasinky, řasy a různé jiné mikroorganismy**

Biofilm: dobrý, nebo zlý?

- **Běžná mikroflóra se vyskytuje zpravidla více či méně ve formě biofilmu**. Takový biofilm je pro hostitele pozitivní a poskytuje mu ochranu před patogeny.
- Problém však je, pokud se ve formě biofilmu vyskytnou **patogenní mikroorganismy** a pokud dojde k narušení rovnováhy mezi mikroby a hostitelem.
- Závažný a nebezpečný bývá zejména **biofilm vzniklý na umělých površích** v organismu (katetry, implantáty a podobně)

Píseň běžné flóry

My jsme skvělá flóra běžná
k našemu člověku něžná
osídlíme povrchy
číháme tu na mrchy

Scházíme se každý pátek
za účelem tvorby látek
z kterých vzniká biofilm
pevnější než dub i jilm!

(Píseň běžné flóry, in: O. Zahradníček – Advent v dutině ústní. Zkráceno)

Vznik biofilmu

- Na začátku je pevný povrch a plovoucí bakterie +
- Bakterie adheruje na povrch
- Následuje agregace dalších bakterií
- Bakterie začnou produkovat polysacharidovou matrix
- Až vznikne třídimenzionální struktura zvaná biofilm

Význam tvorby biofilmu u bakterií

Bakterie mohou **lépe regulovat početnost populace** – v rámci biofilmu se totiž informují produkcí určitých látek (tzv. quorum sensing)

Bakterie se stávají **odolnější vůči vnějším vlivům:**

- desinfekčním prostředkům
- antibiotikům
- imunitní reakci hostitele

Biofilm tvoří jak bakterie běžné flóry (z hlediska organismu spíše pozitivní), tak i patogeny.

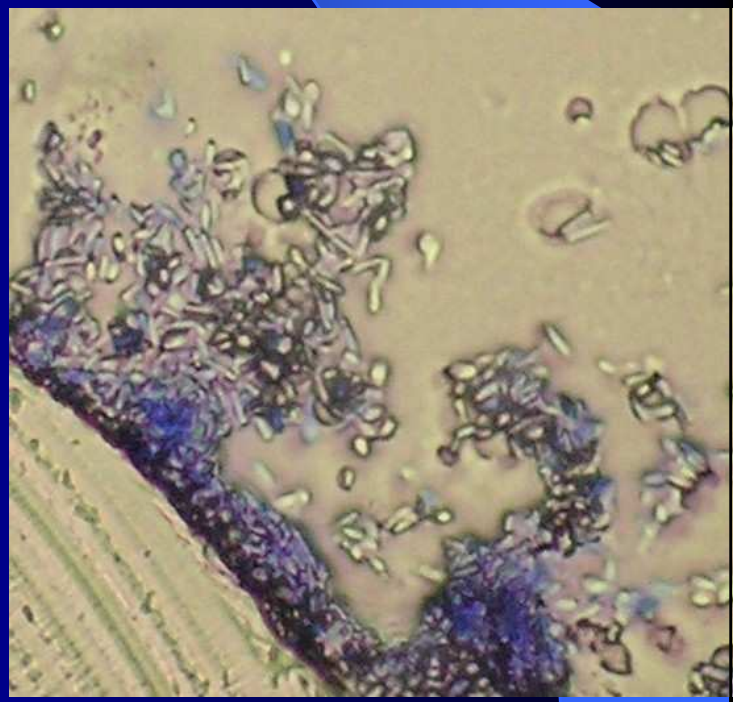


Foto: Archiv Veroniky Holé

Patologický biofilm – příběh

- Muž, 58 let, v roce 2001 zaveden kardiostimulátor, v roce 2002 opakovaně hospitalizován na interním oddělení s teplotami nejasné etiologie, vzestup zánětlivých markerů
- V kultivaci krve (hemokultivaci) prokázán *S. epidermidis* s velmi dobrou citlivostí
- Několikrát dlouhodobě přeléčován vysokými dávkami antibiotik v kombinacích (oxacilin, gentamicin, rifampicin, cefazolin, cefalotin, klindamycin)

Příběh – pokračování

- Zpočátku vždy dobrá odezva, poté se objevují ataky teplot i v průběhu terapie.
- Při vyšetření přes jícen nález vegetace na komorové elektrodě o velikosti 1,5 × 1,5 cm.
- Kardiologové opakovaně odmítají odstranění kardiostimulátoru. Nasazena kombinace antibiotik oxacilin + gentamicin + rifampicin, pacient v dobrém klinickém stavu.
- Znovu však dochází k vzestupu teplot a zvýšení CRP. Nasazena terapie vankomycin + rifampicin, po zlepšení stavu je pacientovi odstraněn trombus a vyměněna elektroda (pod clonou ATB), to vede k celkovému zlepšení stavu pacienta.

Viníkem byl biofilm

- Neúspěch zvolené ATB terapie byl zapříčiněn tím, že **nebyla brána v úvahu vysoká rezistence mikroba rostoucího ve formě biofilmu** vůči těmto antibiotikům.
- Léčba nebyla od samého začátku dostatečně razantní a nebylo odstraněno ložisko biofilmu.
- Teprve **odstranění elektrody** (pod clonou ATB) došlo ke **zlepšení stavu pacienta**.

Biofilm a antibiotika

- Pokud jsou bakterie ve formě biofilmu, **nemusí antibiotika „zabrat“,** i když klasické metody in vitro citlivosti dávají léčbě šanci.
- I přesto, že laboratorní metody (vyšetření citlivosti, nebo dokonce i tzv. „MIC“) vykazují možnost úspěchu, v praxi bývá léčba neúčinná, nebo účinkuje jen dočasně.

Biofilm a mikrobiologická diagnostika

- Protože dnes víme, že biofilm existuje a je důležitý, nemůžeme se tvářit, že tomu tak není. **Biofilm ovlivňuje mikrobiologickou diagnostiku v následujících bodech:**
  - Pokud předpokládáme tvorbu biofilmu, je třeba to zohlednit při **zpracování materiálu** (např. u katetrů)
  - Je možné přímo **detekovat tvorbu biofilmu**, resp. sklon bakterií tvořit biofilm
  - Je možné (a užitečné) **určovat hodnoty MBIC a MBEC.**

Kultivace bakterií tvořících biofilm

- **Pokud bakterie tvoří biofilm, je vhodné zohlednit tuto skutečnost při zpracování materiálu**
- V poslední době se vedou velké diskuse např. o tom, jak zpracovávat **žilní katetry** před jejich kultivací v mikrobiologické laboratoři.
- Jsou vyvíjeny metody, jejichž cílem je dobrý záchyt patogenů, jejich kvantifikace a zároveň odclonění kontaminace

Klasické zpracování katetrů

- **Klasická kultivace v bujonu:** katetr se vloží do tekuté půdy a kultivuje 24 h. Je-li po této době bujon zakalený, je vyočkován na pevnou půdu a případné bakterie identifikovány.
- **Co se stane:** Uvolní se bakterie v planktonické formě. Bakterie ve formě biofilmu se uvolní málo nebo vůbec.
- Vzhledem k použití bujónu jako pomnožovací půdy **nevíme nic o kvantitě** (kontaminace × infekce).

Nové možnosti zpracování katetrů

- **Semikvantitativní metoda:** Bujon se oválí po povrchu pevné půdy. **Co se stane:** zmapujeme povrch katétru a semikvantitativně posoudit nález, nevypovídá však o bakteriích uvnitř a bakterie se nemusí uvolnit z biofilmu.
- **Sonifikace:** biofilm rozbijeme ultrazvukem. **Co se stane:** rozrušíme biofilm na povrchu i uvnitř katétru. Vyočkování určitého objemu vzorku je kvantitativní metoda, takže dává možnost posoudit množství mikrobů.

Možnosti detekce produkce biofilmu u bakterií a kvasinek

- Průkaz biofilmu fenotypovými metodami (kultivace na agaru s kongo červení, Christensenova metoda)

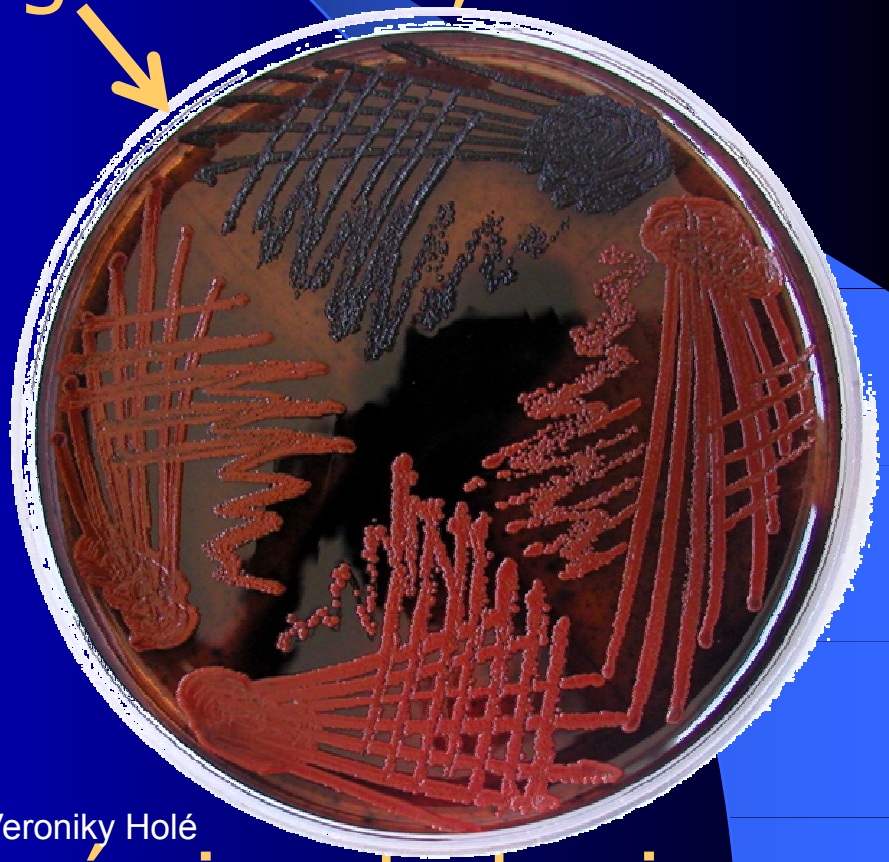


Foto:

Archiv Veroniky Holé

- Průkaz biofilmu genotypovými metodami

Spíše pro výzkumné a výukové účely: Mikroskopie orálního biofilmu

- V preparátech barvených Gramem lze pozorovat shluky bakterií (G+ i G-) a případně buňky makroorganismu (epitelie apod.)
- Jiná barvení, např. barvení alciánovou modří umožňují i znázornění polysacharidového materiálu, tj. nebuněčné části biofilmu, buňky jsou zde znázorněny negativním barvením

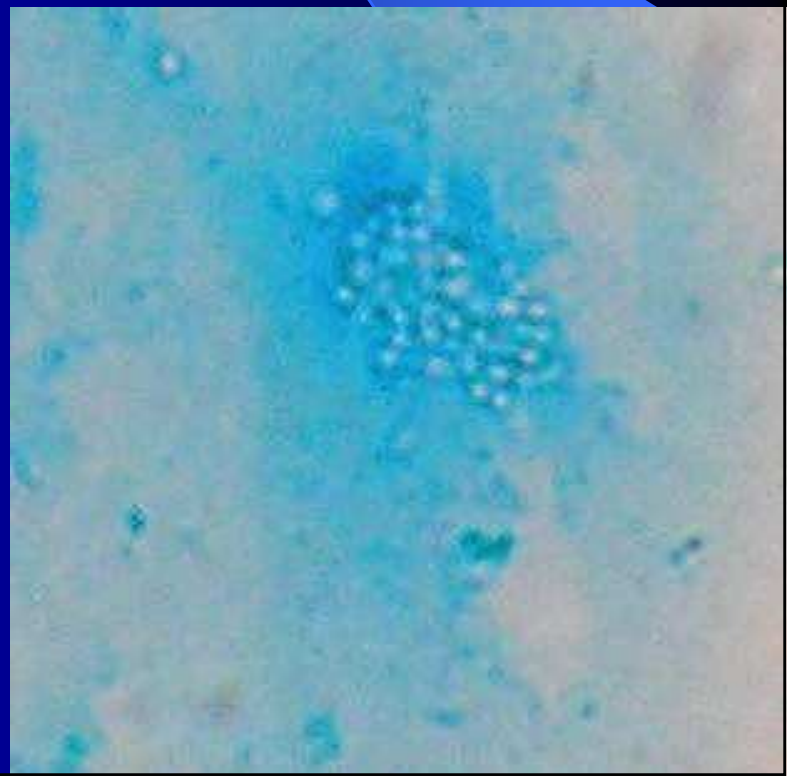


Foto: Archiv Veroniky Holé

Jak zjistit biofilm na zubní sklovině

- Dobrovolník má připravenou tabletku s barvivem barvícím zubní plak.

- Tabletka se nechá působit v dutině ústní cca 2 min. Poté je vidět, kde se nejvíce usazuje plak

Foto: Archiv Veroniky Holé

Prevence

- Prevence nadměrného **biofilmu v ústní dutině**
  - Pravidelné čištění zubů a omezení sladkých jídel a nápojů
- Prevence **katetrových biofilmů**
  - Katétry a kostní cementy z materiálů nepodporujících tvorbu biofilmu, případně s **antimikrobiálními substancemi**, např. minocyklin či rifampicin
  - **Proplachy katétrů**
  - **Dodržování pravidel asepse**, správné dekontaminační postupy apod.

Běžná flóra

Normální mikroflóra a její význam

- Na různých místech lidského těla je přítomna tzv. **normální (běžná) flóra či mikroflóra.**
- Je tvořena **komenzálními či saprofytickými mikroby**, které jsou hostiteli více či méně prospěšné:
  - kolonizací příslušné sliznice **brání tomu, aby byla osídlena patogeny**
  - podílejí se na **stavu mikroprostředí**, např. pH
  - ve střevě **likvidují nestravitelné zbytky**
  - mohou mít i **další pozitivní efekty** pro hostitele (např. tvorba vitamínů střevními bakteriemi)

Kde mikroflóra je a kde není

- **Mikroflóra není** ve tkáních, v parenchymu orgánů, v krvi, v mozku ani mozkomíšním moku. Zde je každý nalezený mikrob velmi pravděpodobně patogenem
- **Mikroflóra není** ani v některých dutých orgánech, např. v jícnu, v plicích, v močovém měchýři (kromě starých osob) či v děloze
- **Mikroflóra je** zejména v dutině ústní a hltanu, v tlustém (a zčásti i tenkém) střevě, v pochvě a v menším množství také na kůži

Mikroflóra v průběhu života člověka

- **Plod nemá žádnou běžnou flóru**, po narození zvolna začíná osidlování
- Během prvních měsíců a let života se **běžná mikroflóra vyvíjí** (zejména střevní v souvislosti se změnami potravy)
- **U žen** se mění vaginální mikroflóra v důsledku hormonů při **menarche**, dále při **začátku pohlavního života** a pak v **menopause**
- **U starších osob** dochází k dalším změnám (např. se často ustanoví „běžná flóra“ v močovém měchýři, dříve sterilním)

Mikroflóra jako ekosystém

- Kdysi lidé mysleli, že všechny škůdce úrody jednoduše zahubí například DDT. Ukázalo se ale, že takový **brutální zásah často nadělá víc škody než užitku**, zvlášť když se použije nevhodným způsobem
- Podobně **složitý ekosystém je i třeba střevní mikroflóra**. I proto dnes na střevní infekce většinou nedoporučujeme antibiotika, protože systém „rozhodí" často ještě víc.

Přehled běžné mikroflóry

Kůže, nos, boltec, zevní zvukovod, kožní adnexa	Stafylokoky (i zlaté), korynebakteria, kvasinky
Hltan a ústní dutina	Ústní streptokoky a neisserie Hemofily, malá množství pneumokoků, meningokoků, anaeroby, nepat. treponem.
Tlusté (i tenké) střevo	Anaeroby, enterobakterie, enterokoky, *Entamoeba coli*
Vagina	Laktobacily, malá množství nejrůznějších mikrobů
Přechody (rty apod.)	Směs zástupců obou míst

Normální osídlení dýchacích cest

- **Nosní dutina** nemá specifickou flóru, přechází tam však mikroflóra z kůže (přední část) a hltanu (zadní část)
- **V hltanu** (stejně jako v ústní dutině) nacházíme ústní streptokoky, neisserie, nevirulentní kmeny hemofilů aj. Mnohé další tam jsou, ale většinou je nevykultivujeme
- **Plíce a dolní dýchací cesty** jsou normálně bez většího množství mikrobů
- **Na ostatních místech** (hrtan) jsou různé přechody (hrtan – jako v hltanu, ale méně)

Normální osídlení trávicích cest

- **Rty** znamenají přechod kožní a ústní flóry
- **V ústní dutině** (stejně jako v hltanu) nacházíme ústní streptokoky, neisserie, nevirulentní kmeny hemofilů aj. Mnohé další tam jsou, ale většinou je nevykultivujeme
- **Jícen a žaludek** jsou za normálních okolností bez většího množství mikrobů
- **V tenkém a zejména tlustém střevě** nacházíme zpravidla asi 1 kg anaerobů, dále enterobakterie, enterokoky, kvasinky, někdy i nepatogenní améby
- **Řiť** je opět místem přechodu střeva a kůže

Normální situace v ústní dutině

- Ústní dutina je i za normální situace velice **složitý ekosystém**, složený z různých druhů bakterií, usazených materiálů, lidských buněk a dalších složek
- Bakterie se v dutině ústní přitom nevyskytují v nějakém chaosu, ale v komplikovaném, **strukturovaném útvaru, zvaném biofilm.** V daném případě jde o vícedruhový strukturovaný biofilm, ve kterém např. anaeroby jsou přítomny ve větší hloubce než aerobní bakterie

Močové cesty zdravého člověka

Ledviny – normálně bez mikrobů

Pánvičky ledvinné – normálně bez mikrobů

Močovody (uretery) – normálně bez mikrobů

Močový měchýř mladých a středně starých osob – normálně bez mikrobů

Močový měchýř seniorů – i za normálních okolností může být osídlen mikroflórou, která nečiní problémy a stává se „běžnou flórou"

Močová trubice – normálně bez mikrobů, část přilehlá k ústí však může být osídlena zvenčí

Normální stav pohlavních orgánů

- Za normálních poměrů nejsou mikroby
  - **U ženy** v děloze, vejcovodech, vaječnících
  - **U muže** v prostatě, chámovodech, varlatech
- Specifickou normální flóru má **vagina** (laktobacily, příměs různých aerobních i anaerobních mikrobů)
- **Vulva** tvoří přechod vaginální a kožní flóry
- U muže je specifický **předkožkový vak**, vedle kožní flóry jsou tu i např. nepatogenní mykobakteria apod.

Normální osídlení kůže

- Přestože kůže je pro mikroby nejdostupnější, je její **osídlení mnohem chudší** než v případě např. úst, pochvy či tlustého střeva
- Mikrob, který chce žít na kůži, musí snášet **vyschnutí a vysoké koncentrace solí**
- **Na kůži se tedy normálně vyskytují**
  - koaguláza negativní druhy stafylokoků
  - zlatý stafylokok – malé množství je normální
  - korynebakteria a příbuzné G+ tyčinky
  - malá množství kvasinek

Péče o střevní mikroflóru

- V **rekonvalescenci průjmů**, ale i např. **po celkové antimikrobiální terapii** (kde mohlo dojít k vybití části mikroflóry) je vhodné snažit se o **obnovu normálního stavu**
- Používají se **jogurty** (nesladké, netučné), **kyselé zelí**, různé preparáty (Hylac)
  - Některé obsahují substráty pro „dobré" bakterie, to jsou **prebiotika**.
  - Některé obsahují přímo ty dobré bakterie, to jsou **probiotika**
  - Některé obsahují oboje, to jsou **symbiotika**

Péče o vaginální mikroflóru

- Také **vaginální ekosystém může být narušen** antimikrobiální léčbou či nějakým onemocněním
- Také zde doporučují „lidové receptury" např. aplikaci jogurtu do pochvy
- Jinak lze doporučit **prebiotické či probiotické vaginální čípky**
- Důležitá je také **výživa a úprava hormonálních hladin** (antikoncepce)

Detekce biofilmu na jazyku ☺

Červený jazyk jedné studentky v praktiku věnovaném průkazu ústního biofilmu

Foto O. Z.

Diagnostika mikrobů

Cíle mikrobiologické diagnostiky

Odhalení původce nemoci (patogena)

Někdy: zjištění citlivosti patogena na antimikrobiální látky *(hlavně u bakterií a kvasinek, nedělá se u parazitů a vláknitých hub, u virů je to ve fázi výzkumu)*

Někdy také: určení faktorů virulence

Co je to vzorek

Vzorek je to, co je odebráno pacientovi a přichází na vyšetření do laboratoře:

- **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.

Přehled metod

- Metody přímé: Hledáme mikroba, jeho část či jeho produkt
  - Přímý průkaz ve vzorku – pracujeme s celým vzorkem
  - Identifikace kmene – určení vypěstovaného izolátu
- Metody nepřímé: Hledáme protilátky. Protilátka není součástí ani produktem mikroba – je produktem makroorganismu

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

1. Mikroskopie

Co vidíme v mikroskopu

- **V případě mikroskopování kmene** vidíme jeden typ mikrobiálních buněk
- **V případě mikroskopování vzorku** můžeme vidět
  - mikroby – nemusí tam být žádné, a může tam být i klidně deset druhů
  - buňky makroorganismu – nejčastěji epitelie a leukocyty, někdy erytrocyty
  - jiné struktury, např. fibrinová vlákna, buněčnou drť (detritus) a podobně

Typy mikroskopie

- **Elektronová mikroskopie** – u virů; spíše výzkum než při běžném průkazu virů
- **Optická mikroskopie**
  - **Nativní preparát** – na velké a/nebo pohyblivé mikroby
  - **Nativní preparát v zástinu** (hlavně spirochety)
  - **Fixované a barvené preparáty**, například:
    - Barvení dle Grama – nejdůležitější bakteriologické
    - Barvení dle Ziehl-Neelsena – např. u bacilů TBC
    - Barvení dle Giemsy – na některé prvoky

Gramovo barvení – princip 1

- Grampozitivní bakterie mají ve své stěně tlustší vrstvu peptidoglykanu mureinu.
  - Díky tomu se na ně pevněji váže krystalová nebo genciánová violeť…
  - …a po upevnění této vazby Lugolovým roztokem…
  - …se neodbarví ani alkoholem.
- Gramnegativní bakterie se naopak odbarví alkoholem a dobarví se pak na červeno safraninem.

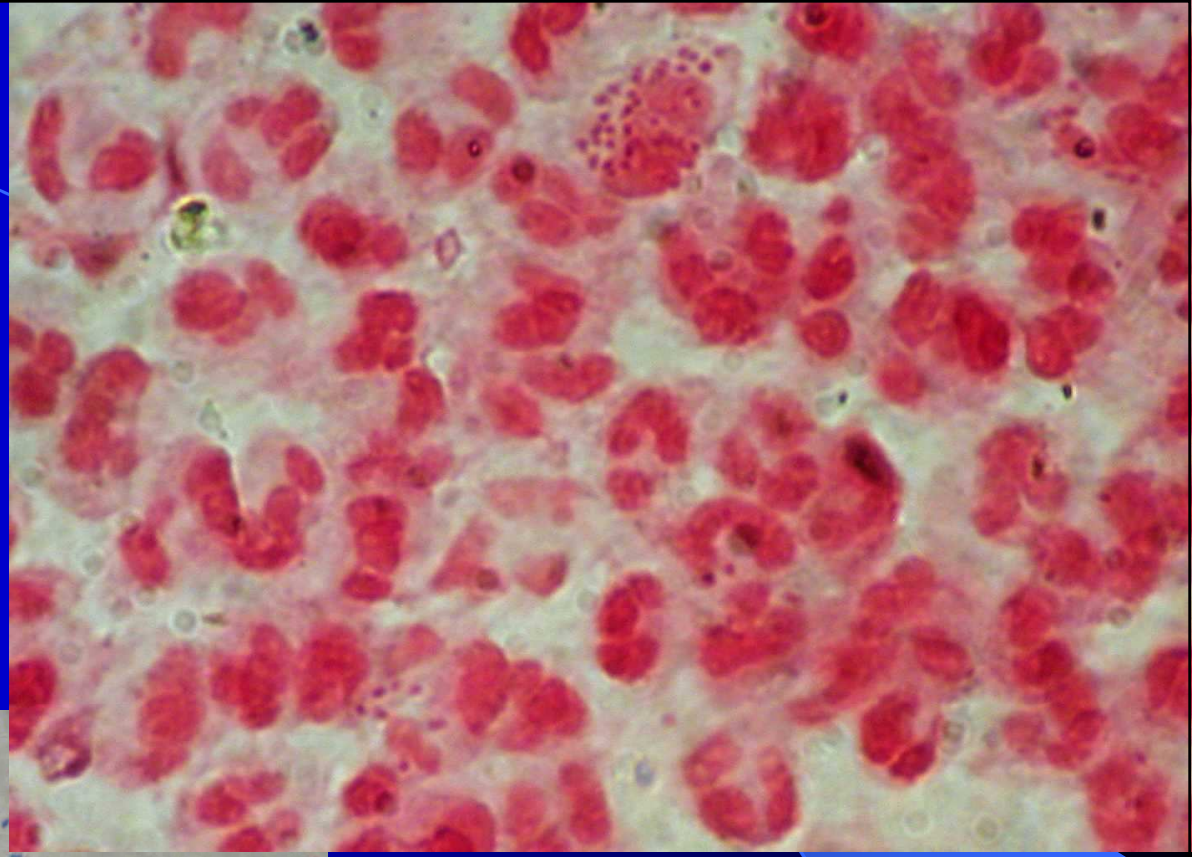
Gramovo barvení – princip 2

Chemikálie	Grampozitivní	Gramnegativní
Krystal. violeť	Obarví se fialově	Obarví se fialově
Lugolův roztok	Vazba se upevní	Upevní se méně
Alkohol	Neodbarví se	Odbarví se
Safranin	Zůstanou fialové	Obarví se červeně

Gramem se nebarvící bakterie se neobarví v prvním kroku kvůli absenci buněčné stěny (*Mycoplasma*) nebo proto, že jejich stěna je vysoce hydrofobní (*Mycobacterium*).

Spirochety by se barvily gramnegativně, ale jsou velmi tenké, takže i je lze také vlastně považovat za „Gramem se nebarvící" a Gram se v jejich diagnostice nepoužívá.

Mikroskopie vzorku



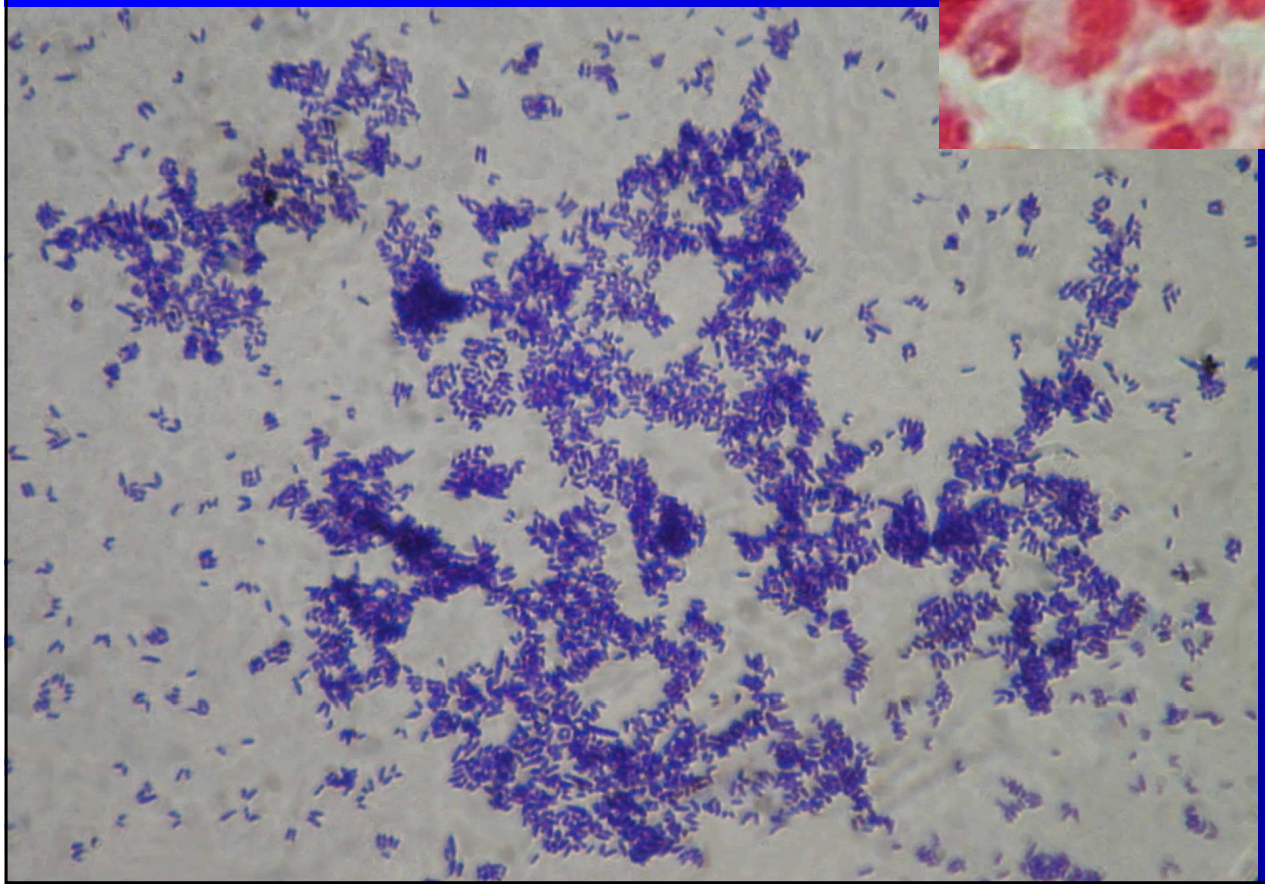


Foto: archiv MÚ

Mikroskopie kmene

2. Kultivace

Kultivace (pěstování) bakterií *(případně také kvasinek)*

- Bakterie často **pěstujeme na umělých půdách**
- Bakterie na půdu **naočkujeme a poté půdu umístíme do termostatu**, většinou nastaveného na 37 °C (pro bakterie významné pro člověka je to většinou optimální teplota – což má logiku)
- Za 24 (někdy až 48) hodin **půdu vytáhneme a pozorujeme, jak nám bakterie vyrostly**
- **Vláknité houby** se pěstují mnohem déle
- **Viry a paraziti** se většinou vůbec nepěstují

Kultivace bakterií – podmínky

- Bakteriím musíme připravit **přijatelné vnější podmínky** – teplotu, vlhkost apod.
- Některé jsou dány **nastavením termostatu**, jiné **složením kultivační půdy**
- Používáme **různá kultivační média**, sloužící k určitým účelům
- **Aerobní a fakultativně anaerobní** bakterie můžeme pěstovat za normální atmosféry
- **Striktně anaerobní bakterie** vyžadují atmosféru bez kyslíku. **Kapnofilní** zase zvýšený podíl CO_2.

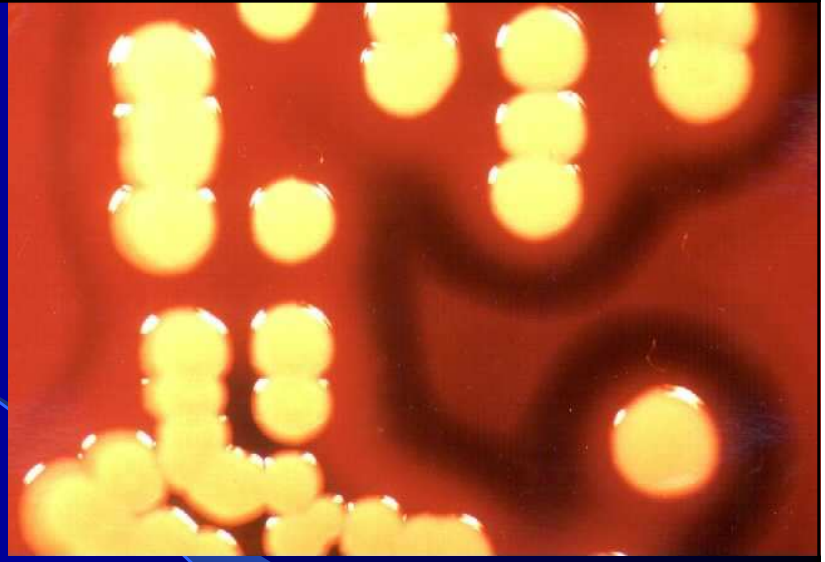
Připravené kultivační půdy se uchovávají v chladničce

Foto: archiv MÚ

Smysl kultivace bakterií

- Proč vlastně v laboratoři bakterie pěstujeme?
  - Abychom je udrželi při životě a pomnožili. K tomu slouží kultivace na tekutých půdách i na „pevných“ půdách (to jsou půdy, které netečou, jejich základem je většinou agarová řasa)
  - Abychom získali kmen – pouze pevné půdy
  - Abychom je vzájemně odlišili a oddělili – používají se diagnostické a selektivní půdy, sloužící k identifikaci

Foto: archiv MÚ



Pojem kolonie

- Kolonie je útvar na povrchu pevné půdy. Pochází z jedné buňky nebo malé skupinky buněk (dvojice, řetízku, shluku)
- Kolonie je tedy vždy tvořena jedním kmenem.
- V některých případech můžeme z počtu kolonií odhadnout počet mikrobů ve vzorku – nebo přesněji počet „kolonii tvořících jednotek“ (CFU)
- Popis kolonií má významné místo v diagnostice

Kultivace v praxi

- Vzorek se vloží do **tekuté půdy** nebo nanese **na pevnou půdu**
- U pevné půdy se ho snažíme tzv. **mikrobiologickou kličkou** rozředit, abychom získali **jednotlivé kolonie** a mohli dále pracovat s kmeny mikrobů
- **Tekuté půdy**
  - jsou půdy pomnožovací
  - základem je zpravidla hovězí vývar a bílkovinný hydrolyzát
  - nejdůležitější je peptonová voda, bujón, VL-bujón, selenitový bujón (selektivně pomnožovací)

Tekuté půdy

Foto: archiv MÚ

Pevné (agarové) půdy

- Základem je opět masopeptonový bujón, ale navíc obsahují výtažek z agarové řasy. Používala se i želatina, ale neosvědčila se tolik jako agar.
- Abychom využili všech výhod, které pevné půdy nabízejí, musíme vzorek (kultivace vzorek → kmen), ale i kmen (kultivace kmen → kmen) dobře rozočkovat. Klasickým způsobem rozočkování je tzv. **křížový roztěr.**

Foto: www.medmicro.info

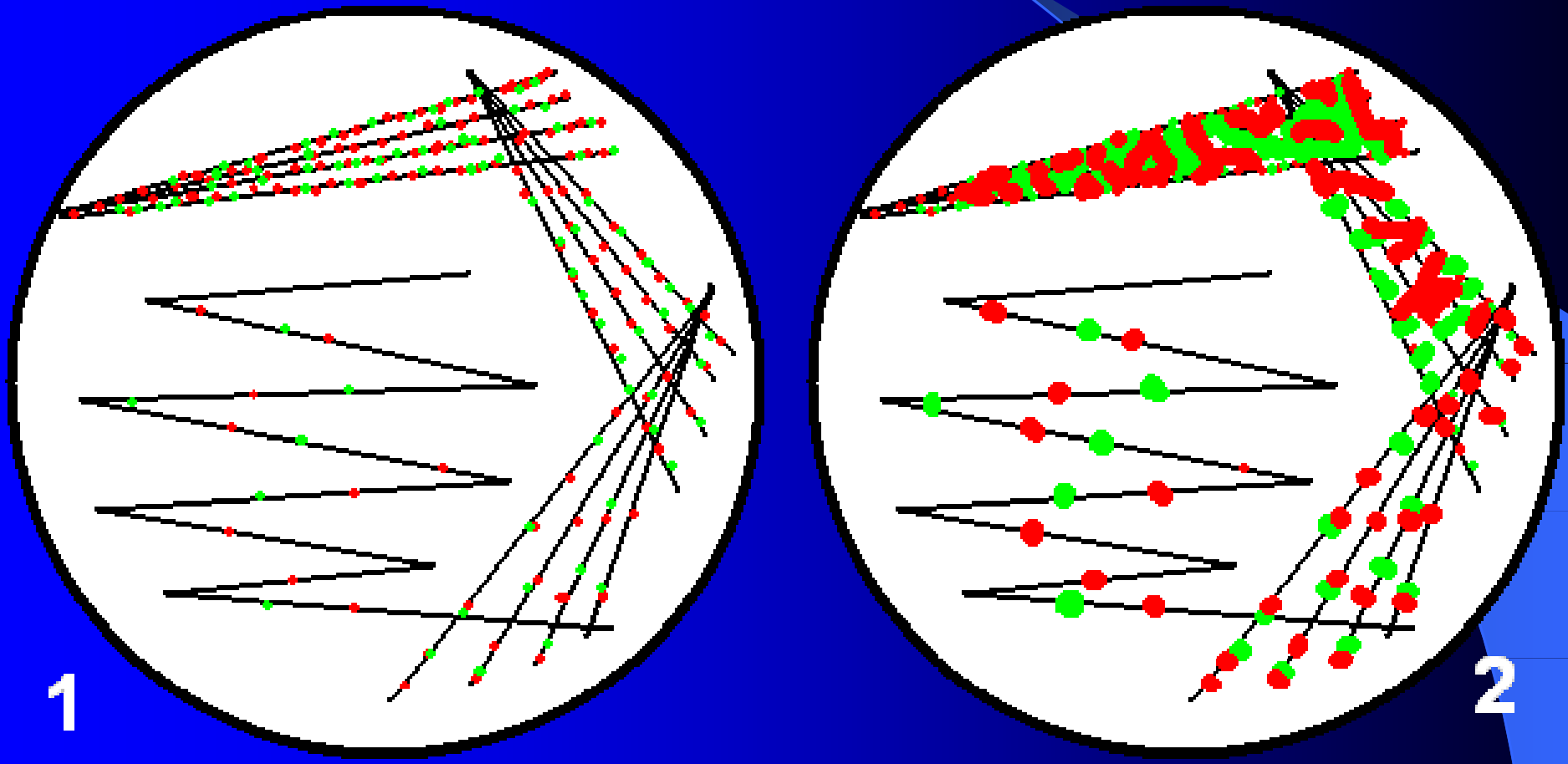
Co se dá popisovat u kolonií

- Velikost
- Barva
- Tvar (okrouhlý…)
- Profil (vypouklý…)
- Okraje (výběžky..)
- Povrch (hladký, drsný)
- Konzistence (suchá…)
- Průhlednost
- Vůně/zápach
- Okolí kolonie

To vše ale pouze v případě, že se podařilo rozočkováním získat jednotlivé kolonie. Tam, kde je hustý nárůst, se tyto vlastnosti hodnotit nedají.

V případě směsi vytvoří každá bakterie svoje kolonie

(při dobrém rozočkování)



1 – očkování směsi bakterií (naznačeny tečkami), 2 – výsledek kultivace: v prvních úsecích směs, až na konci izolované kolonie

Pevné půdy

Foto: archiv MÚ

Existují různé typy pevných půd

- **Diagnostické půdy** – roste "kdeco, ale různě" (krevní agar, VL krevní agar)
  - Chromogenní půdy – zvláštní druh diagnostických půd
- **Selektivní půdy** – roste "jen málo co" (krevní agar s 10 % NaCl pro kultivaci stafylokoků)
- **Selektivně diagnostické půdy** – např. Endova (rostou tam jen některé G– bakterie = selektivita + rozlišení bakterií podle štěpení laktózy = diagnosticita)
- **Obohacené půdy** – k pěstování náročných baktérií (čokoládový agar, což je zahřátý krevní agar)
- **Speciální půdy** – mají své zvláštní určení (MH půda pro testy citlivosti kmene k antibiotikům)

Půdy diagnostické

- Nepotlačují růst žádného mikroba
- Zato díky svému složení **rozlišují mikroby podle určité vlastnosti**
- Příkladem je **krevní agar** ke sledování hemolytických vlastností a **VL krevní agar** (podobný, ale na anaeroby)
- Zvláštním případem půdy chromogenní a fluorogenní

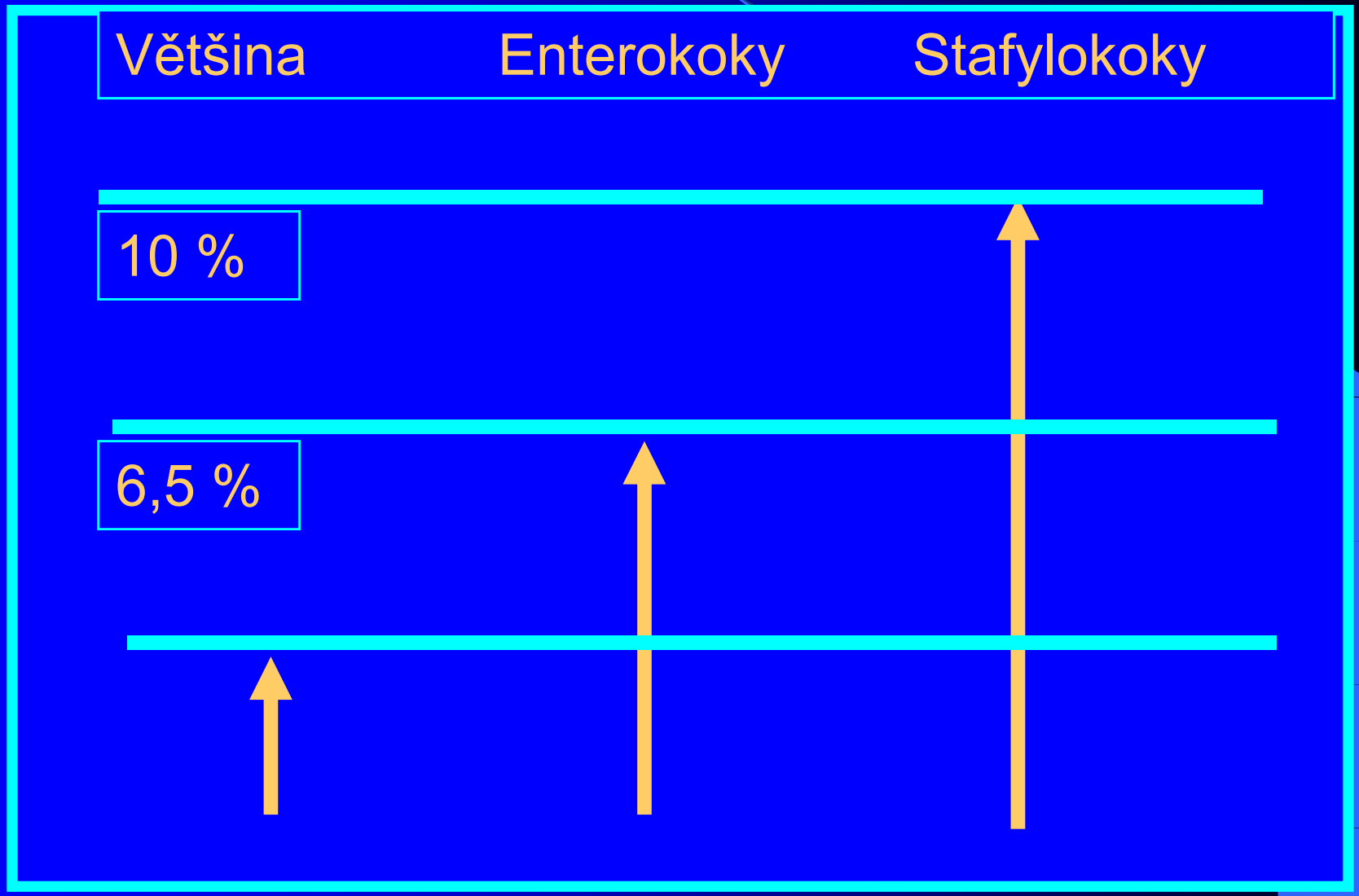
Foto: archiv MÚ

Foto: archiv MÚ

Pevné selektivní půdy

- Účelem je **selektovat (vydělit) ze směsi baktérií** pouze určitou skupinu nebo skupiny
- Příkladem je **agar pro stafylokoky s 10 % NaCl**
- Někdy je selektivnosti dosaženo přidáním antibiotika. **Krevní agar s amikacinem** je selektivní pro streptokoky a enterokoky

Selektivita hypersolného agaru



Příklad selektivně diagnostické půdy – Endova půda

Endova půda je selektivní jen pro některé gramnegativní tyčinky (selektivní vlastnost)

Foto: archiv MÚ

Endova půda umí také rozlišit bakterie podle toho, jestli dovedou štěpit laktózu, nebo ne (diagnostická vlastnost).

Chromogenní půdy

- Chromogenní půdy obsahují barvivo, na které je navázaný specifický substrát → barevnost se ztrácí, není to už barvivo, ale chromogen
- Bakterie schopná štěpit specifický substrát změní chromogen zpět na původní barvivo

Foto:
www.medmicro.info

Půdy se používají i k testování citlivosti na antibiotika

- V tomto případě se bakterie **naočkují po celé ploše** a na půdu se nakladou kulaté **papírky napuštěné jednotlivými antibiotiky** (**antibiotické disky**). Antibiotika difundují agarem. Je-li kmen citlivý, vytvoří se zóna citlivosti.
- Nejčastěji se používá **bezbarvá MH půda**, na které je zároveň dobře vidět i pigmenty bakterií

Foto: archiv MÚ

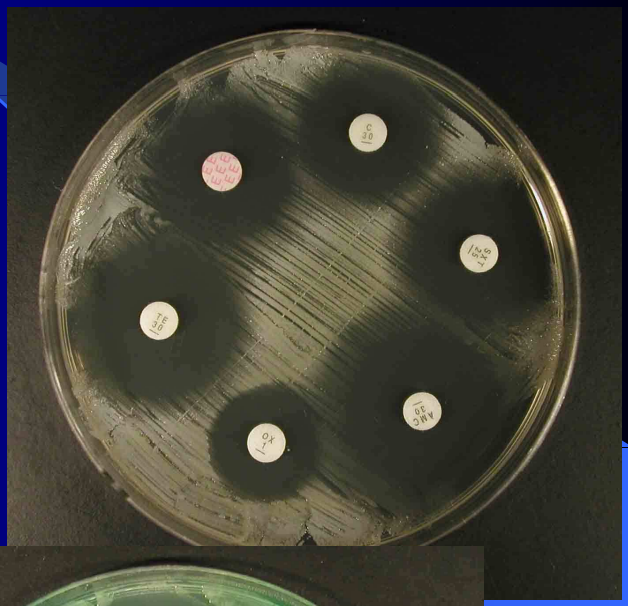
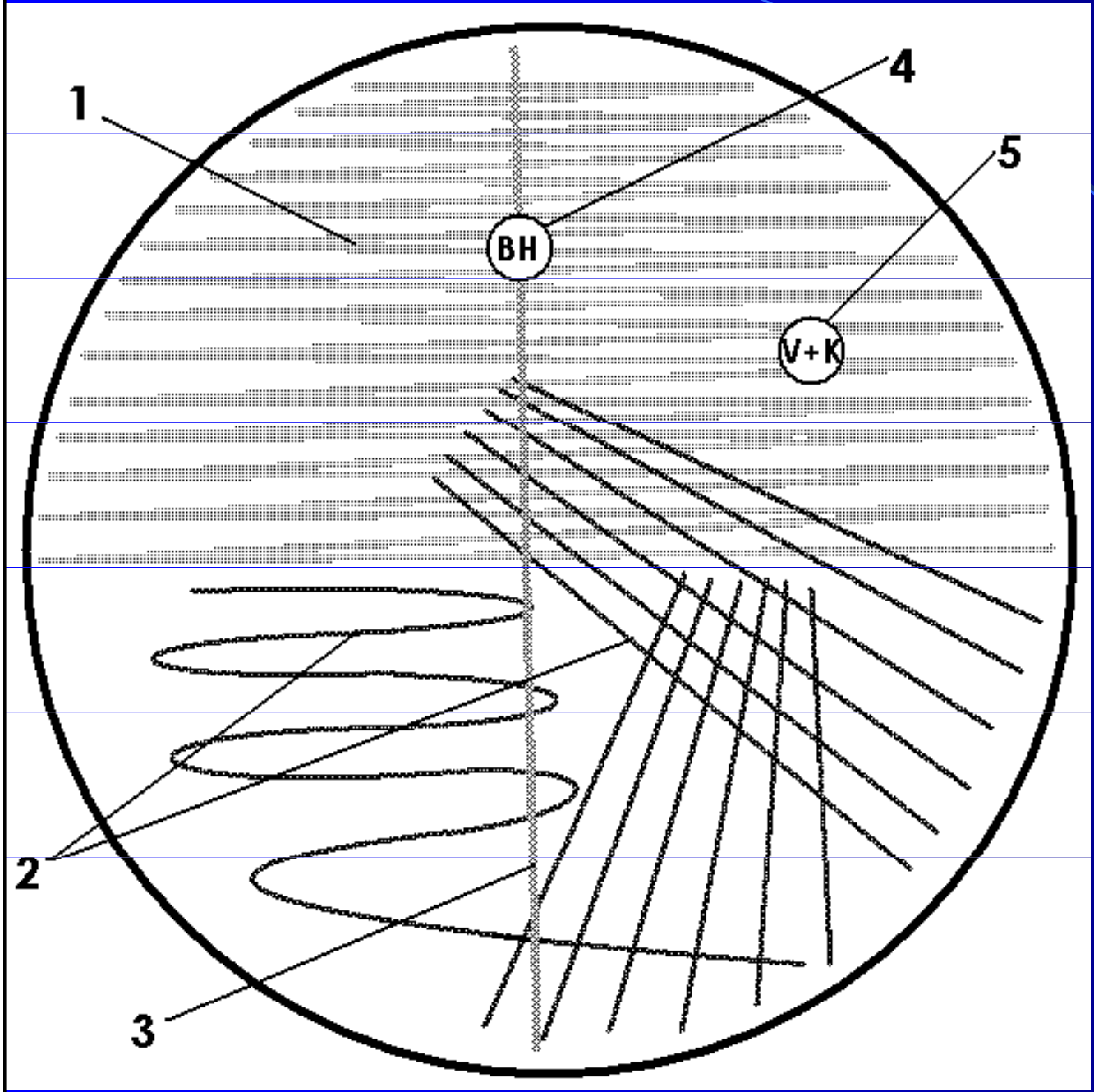


Foto: archiv MÚ

Postup očkování výtěru z krku



1 očkováno tamponem

2 očkováno kličkou

3 stafylokoková čára

4 disk BH (bacitracin pro hemofily)

5 disk VK (vankomycin a kolistin pro meningokoky)

Na celé naočkované ploše pátráme po streptokocích (bezbarvé) a po stafylokocích (spíše bílé či zlatavé)

Výtěr z krku – reálný výsledek

Pěstování anaerobních bakterií

Anaerobní bakterie nesnášejí kyslík. Musíme je tedy pěstovat ve speciální atmosféře bez kyslíku.

3. Biochemická (a jiná) identifikace kmenů

Biochemické identifikační metody

- *I mezi savci jsou rozdíly. Člověk neumí tvořit vitamin C, někteří savci ano*
- Bakterii předložíme určitý **substrát** a zkoumáme, zda ho bakterie pomocí svého enzymu změní v **produkt**. Produkt se musí lišit od substrátu **skupenstvím** či **barvou**. Neliší-li se, užijeme **indikátor**
- **Existuje přitom velké množství způsobů technického provedení tohoto typu testů.**

Možnosti praktického provedení

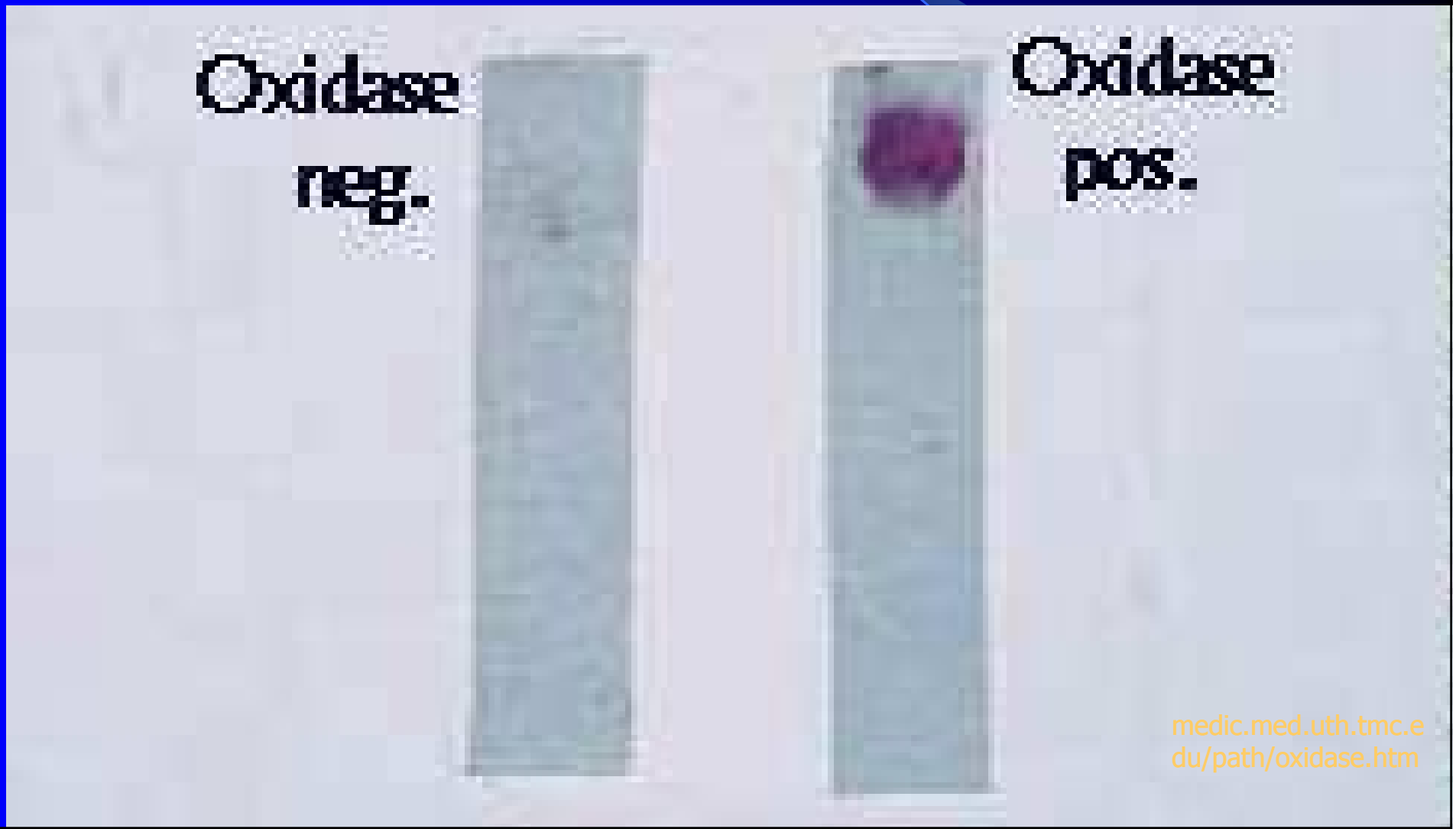
- **Rychlé testy (vteřiny až minuty)**
  - Katalázový test
  - Testy s diagnostickými proužky (oxidáza)
- **Testy s inkubací (hodiny až dny)**
  - Jednoduché zkumavkové testy
  - Složité zkumavkové testy
  - Sady jednoduchých zkumavkových testů
  - Testy v plastové destičce (miniaturizace)
  - Jiné testy (např. Švejcarova plotna)

Katalázový test

- Katalázový test: velmi jednoduchý, do substrátu (roztok H_2O_2) rozmícháme bakterie. Bublinky = pozitivita. Princip: $2\ H_2O_2 \rightarrow 2\ H_2O + O_2$

medic.med.uth.tmc.edu/path/oxidase.htm

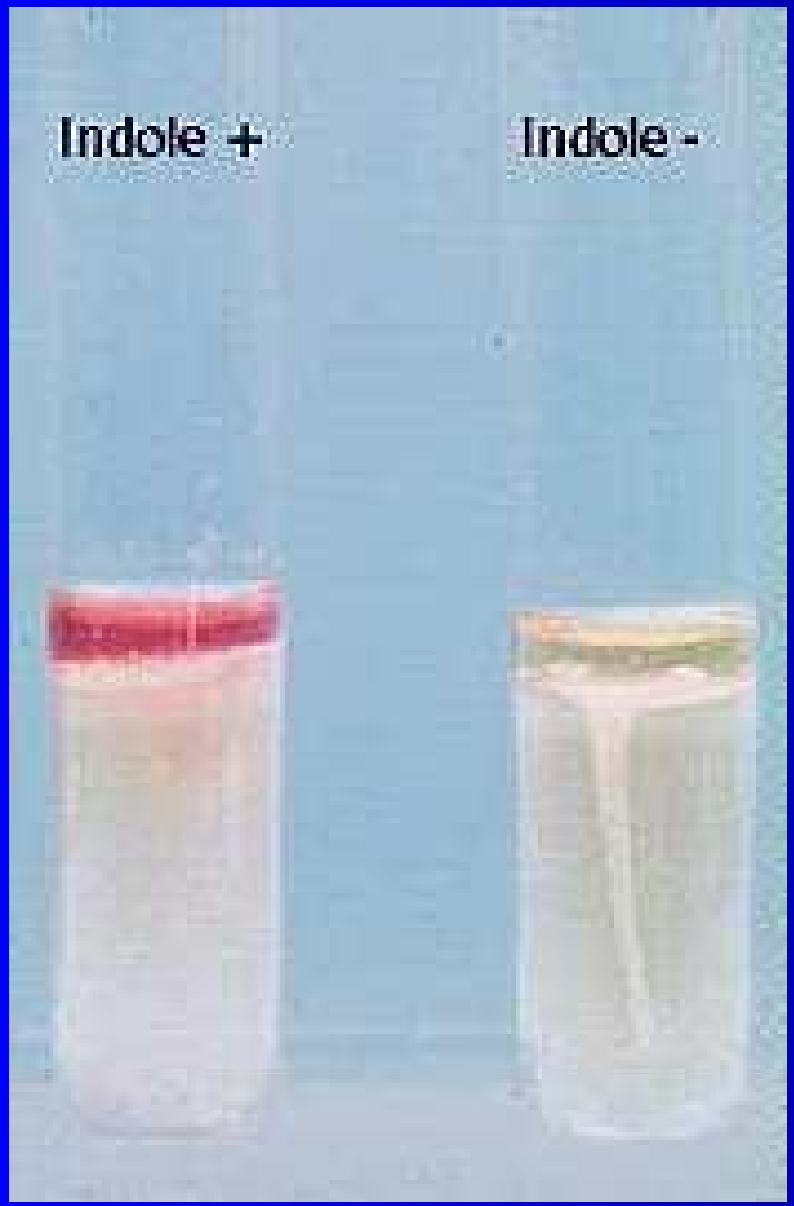
Příklady dalších testů: oxidázový test (diagnostický proužek)



Provedení testu v praxi

Foto: archiv MÚ

...a další testy



medic.med.uth.tmc.edu

Někdy se zkoumají i vzájemné interakce dvou různých bakteriálních kmenů

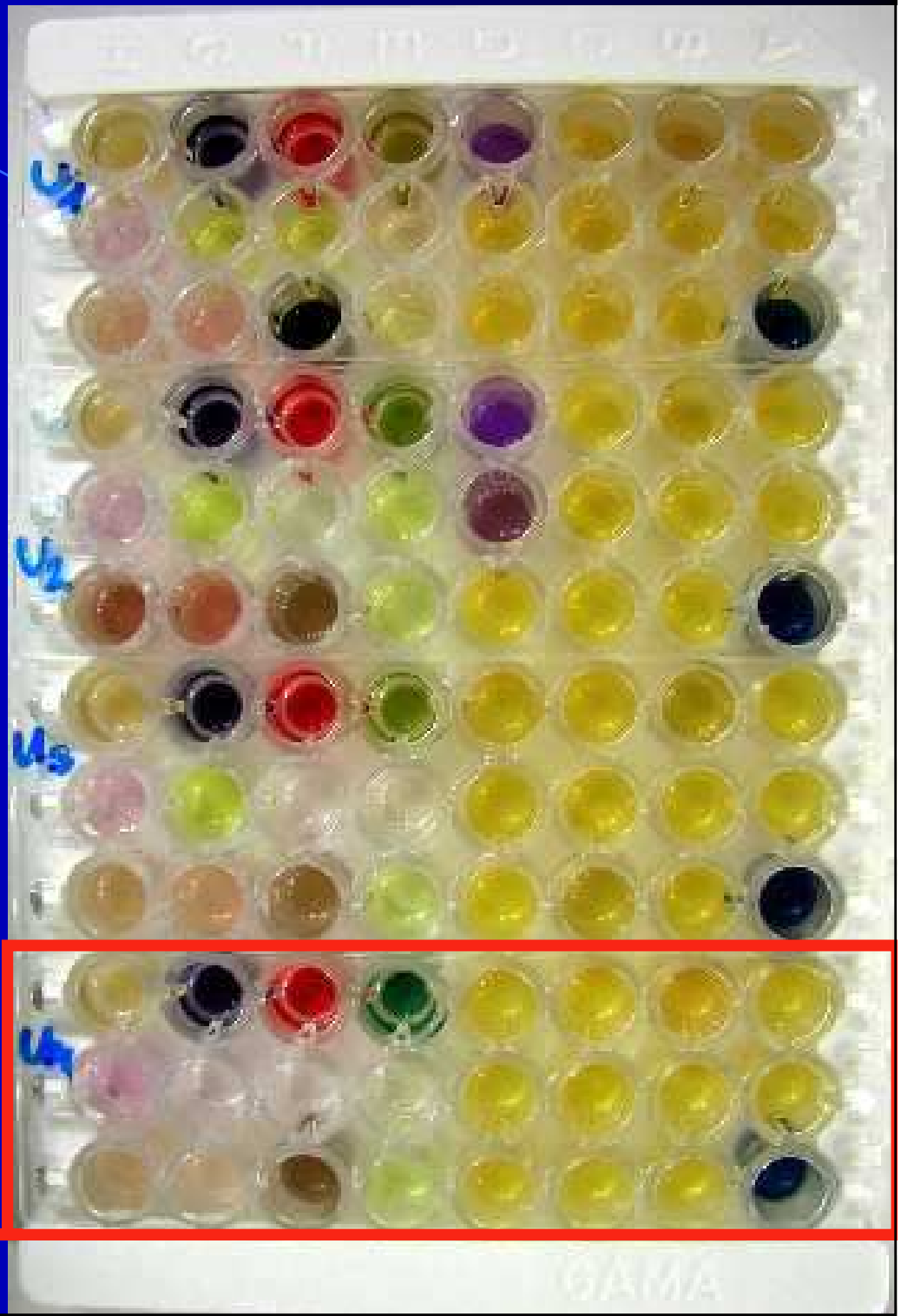
Foto: archiv MÚ

Moderní biochemické testy zahrnují i desítky reakcí

- Testy se dělají v důlcích plastových mikrotitračních destiček.
- Počet testů v sadách kolísá od sedmi až po více než padesát
- Liší se v technických detailech. Vždy je však substrát lyofilizovaný, bakterie se nejprve rozmíchá ve fyziologickém roztoku nebo suspenzním médiu a pak se kape či lije do důlků

Foto: O. Z.

NEFERMtest 24 Pliva Lachema: do jednoho rámečku lze vložit čtyři trojřádky (čtyři testy, určení čtyř různých kmenů)



Zahraniční soupravy

Foto: O. Z.

http://www.oxoid.com/blue Press/uk/en/images/PR020505.jpg

www.ilexmedical.com/products_engl/api.htm.

www.ilexmedical.com/products_engl/api.htm.

www.ucd.ie/kyr/Images/jpgs/Photo16.htm

4. Pokus na zvířeti

Pokus na zvířeti

Pokus na zvířeti býval důležitou součástí diagnostiky v začátcích mikrobiologie. Jsou ale výjimečné případy, kdy se uplatní i dnes.

www.rockinjawrabbits.com/newzealand.htm

5. Průkaz nukleové kyseliny

Průkaz nukleové kyseliny

- **metody bez amplifikace nukleové kyseliny** (klasické genové sondy)
- **metody s amplifikací** (namnožením)
  - PCR (polymerázová řetězová reakce)
  - LCR (ligázová řetězová reakce)
- Principiálně se **použití v mikrobiologii neliší od použití jinde** (např. v genetice)
- Nevýhoda – **někdy jsou až příliš citlivé**, takže se prokáže každá molekula DNA, která mohla třeba „přilétnout odněkud zvenčí". Citlivost se dnes ale dá omezit.

Praktické poznámky

- Vzorky, které budou zkoumány metodou PCR, se odebírají poněkud jinak, než vzorky ke kultivaci. **Mikrob nemusí nutně přežít**, zato je důležité
  - aby DNA nebyla kontaminovaná nějakou DNA zvenčí
  - aby vzorek neobsahoval nějakou látku, která přivodí tzv. inhibici reakce
- Proto se zpravidla používá **suchý tampon**, nikoli tampon s transportní půdou
- Je nutno **pracovat sterilně**, a je nutno používat **netalkované rukavice** (talek může inhibovat reakci)

6. Průkaz antigenu + průkaz protilátky

Metody založené na interakci antigen – protilátka

- O **antigenech a protilátkách** bude řeč příště, dohromady s obranyschopností těla proti mikrobům
- Prozatím budiž jen řečeno, že můžeme detekovat antigen pomocí protilátky, anebo protilátku pomocí antigenu

Shrnutí: Práce laboratoře v praxi

Práce laboratoře v praxi

- Do laboratoře **přijde vzorek**
- **K nepřímému průkazu** jsou přijímány **vzorky séra** (kde hledáme protilátky)
- **K přímému průkazu** jsou přijímány **vzorky z těch míst na těle, kde předpokládáme infekci:** nejčastější jsou výtěry z krku a nosu, vzorky moče a stolice, ale někdy přijde i třeba kousek srdeční chlopně odebraný při operaci

Proces mikrobiologického vyšetřování – na všem záleží!!!

LÉKAŘ (KLINIK)	LABORATOŘ
Indikace vyšetření – zda, jaké	
Vlastní provedení odběru	
Transport materiálu	
	Rozhodnutí, jak zpracovat
	Vlastní zpracování materiálu
Zaslání výsledku	
Interpretace v kontextu ostat. výsledků a stavu pacienta (léčit vždy pacienta, ne nález)	

Stručný přehled významných bakterií

Gramnegativní bakterie

- Ty které rostou na Endově půdě
  - *Enterobacteriaceae* (enterobakterie) – tyčinky
  - *Vibrionaceae* – zahnuté tyčinky
  - Gramnegativní nefermentující bakterie – tyčinky i koky
- Ty které nerostou na Endově půdě
  - Kampylobakter a helikobakter – zahnuté či spirálovité tyčinky
  - *Pasteurellaceae* (hemofily a pasteurelly) – tyčinky
  - Skupina „le-br-bo-fr“ – tyčinky
  - Neisserie a moraxelly – převážně koky
  - *Gardnerella* – tyčinka a ostatní gramnegativní bakterie

1.Enterobakterie

http://www.fehd.gov.hk

Klinická charakteristika

- Vyskytují se ve střevě člověka a jiných obratlovců
- Většina z nich je ve střevě součástí normální mikroflóry a **patogenem mimo střevo,** nejčastěji v močových cestách, ale i v dýchacích a v krevním řečišti
- Někdy mohou být **patogenní i ve střevě**, buď při přemnožení, nebo pokud jsou to primární patogeny jako salmonela. V tom případě způsobují onemocnění charakterizovaná průjmy a zvracením

Přehled enterobaktérií

Červeně pigmentovaný kmen serracie

my.opera.com/MCOB/albums/show.dml?id=46597

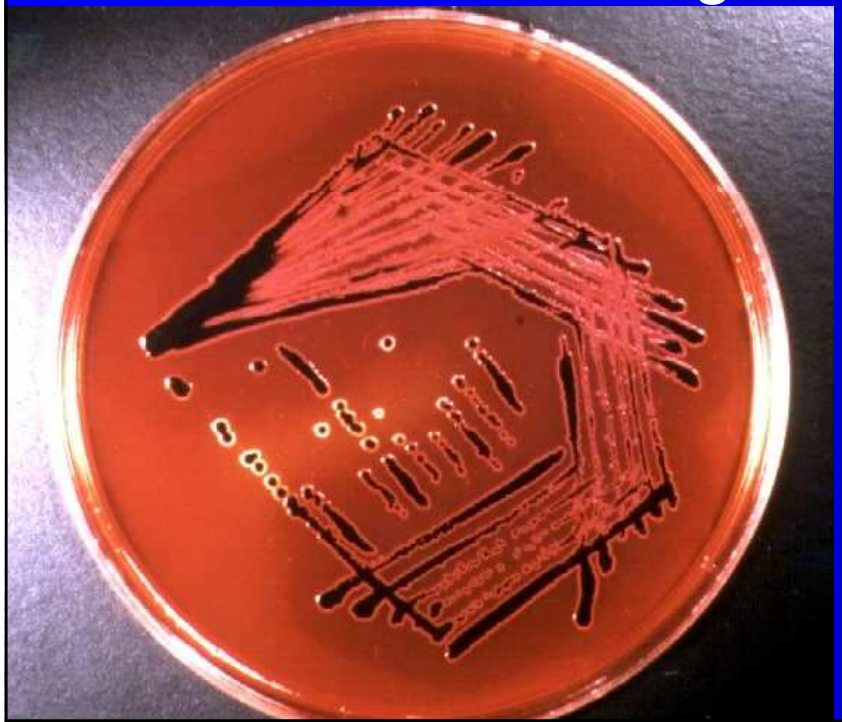
	Patogenita	Příklady
	Systémová	*Y. pestis*, AP** salmonely
	Střevní	ZP* salmonely, shigely, yersinie
	Potenciální	Klebsiely, enterobaktery, protey, providencie, morganely, citrobaktery, serracie a jiné
	Téměř nulová	Mnoho druhů, například *Pragia fontium* a *Budvicia aquatica*

*zoopatogenení **antropopatogenní

Pro odlehčení…

http://www.uwec.edu

Salmonella na MAL agaru



Nemůžem vždy slepici
kontrolovat stolici.
Jednou projdem drůbežárnou
a stolici najdem zdárnou.
Přiletí však holub bělý
zanese tam salmonely.
Odnesou pak vejce
pro cukráře – strejce
Cukrář – strýček nevinný
nadělá z ní zmrzliny
Mládež sní ji s důvěrou
a všichni se…

www.medmicro.info, autor fotografie: prof. MVDr. Boris Skalka, DrSc.

Příběh první

- Slečna Tereza je mlsná. Dnes si po obědě dala krémový zákusek. Odpoledne ji začalo bolet břicho, a pochopila, že vzdálit se na delší dobu z domu nelze. Navštívila lékaře, ten jí odebral výtěr z řitního kanálu. Za několik dní volali Tereze z územního pracoviště krajské hygienické stanice. Tereza si byla jistá, že za všechno může krémový zákusek. Ukázalo se však, že její podezření bylo falešné…

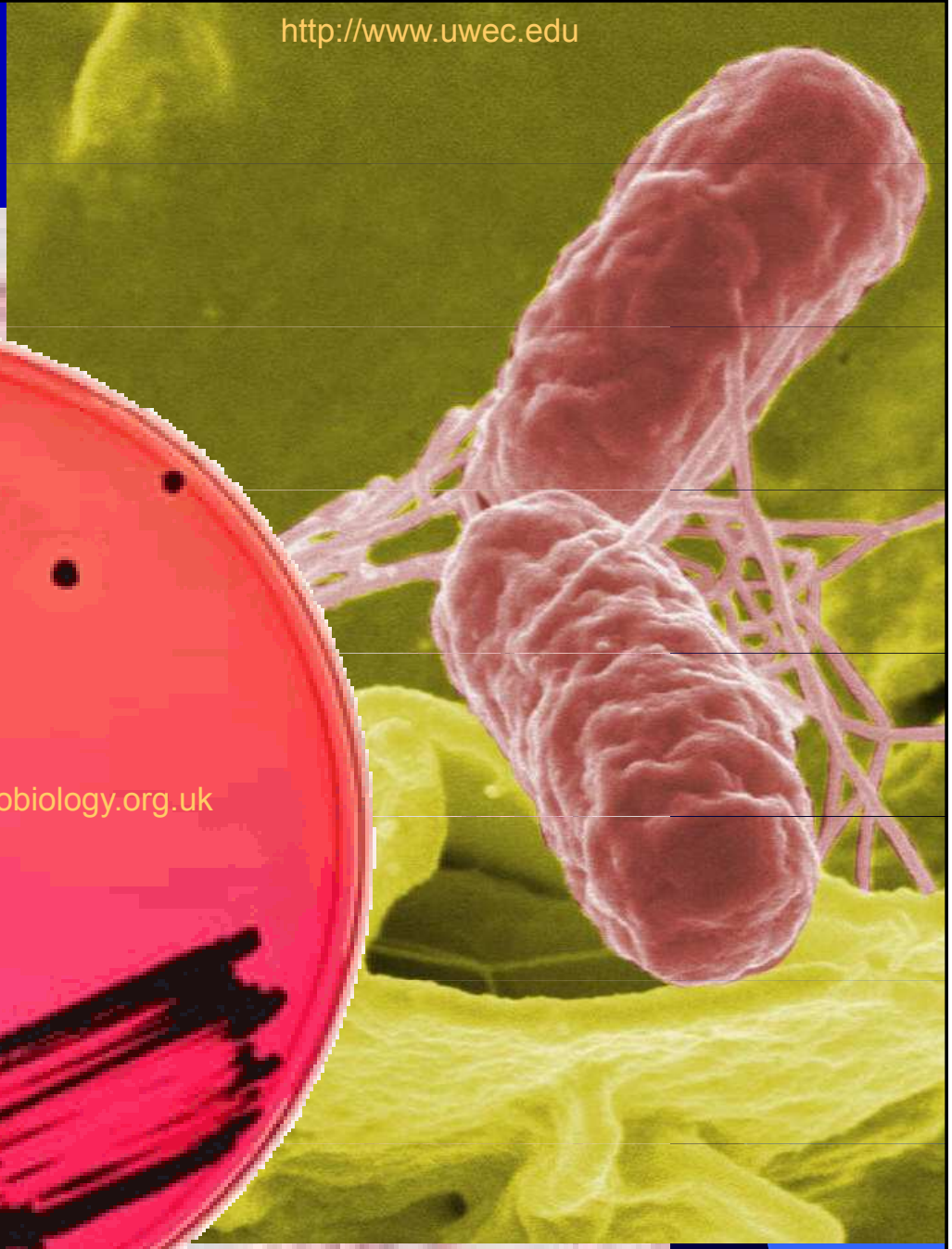
Kdo je tedy skutečný viník?

- Bakteriálním viníkem je *Salmonella enterica* serovar Enteritidis*, zkráceně Salmonella* Enteritidis
- Viník – jídlo nemůže být krémový zákusek! Neodpovídá totiž inkubační doba, které je u salmonelóz zpravidla dva dny, někdy ale i týden
- Viníkem – jídlem se nakonec ukázal být žloutkový věneček, který Tereza zbaštila o dva dny dřív
- Lidským viníkem bude pravděpodobně někdo v cukrárně „U hysterické cukrářky“, kde někdo něco nejspíš zanedbal. Právě teď po tom pátrá oddělení hygieny výživy KHS. Může jít o primární či sekundární kontaminaci jídla.

www.giantmicrobes.com

Salmonela

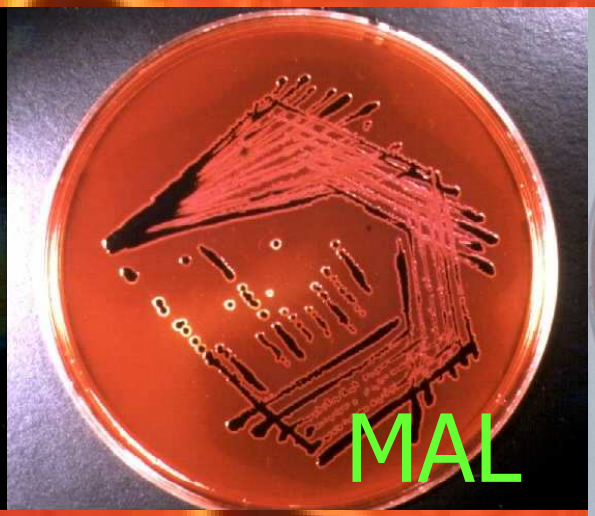
www2.mf.uni-lj.si



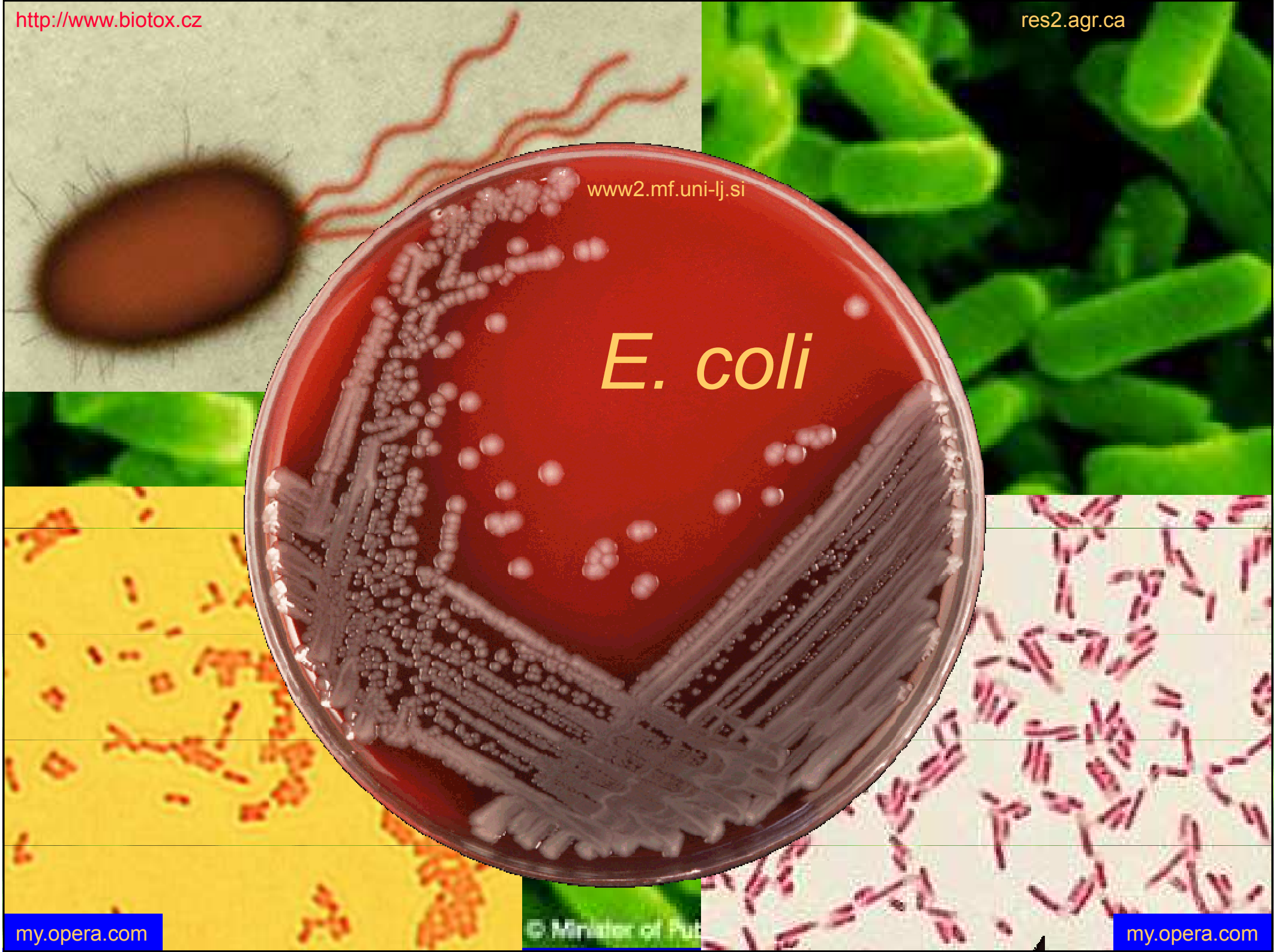
http://www.uwec.edu

http://www.microbiology.org.uk

Salmonela



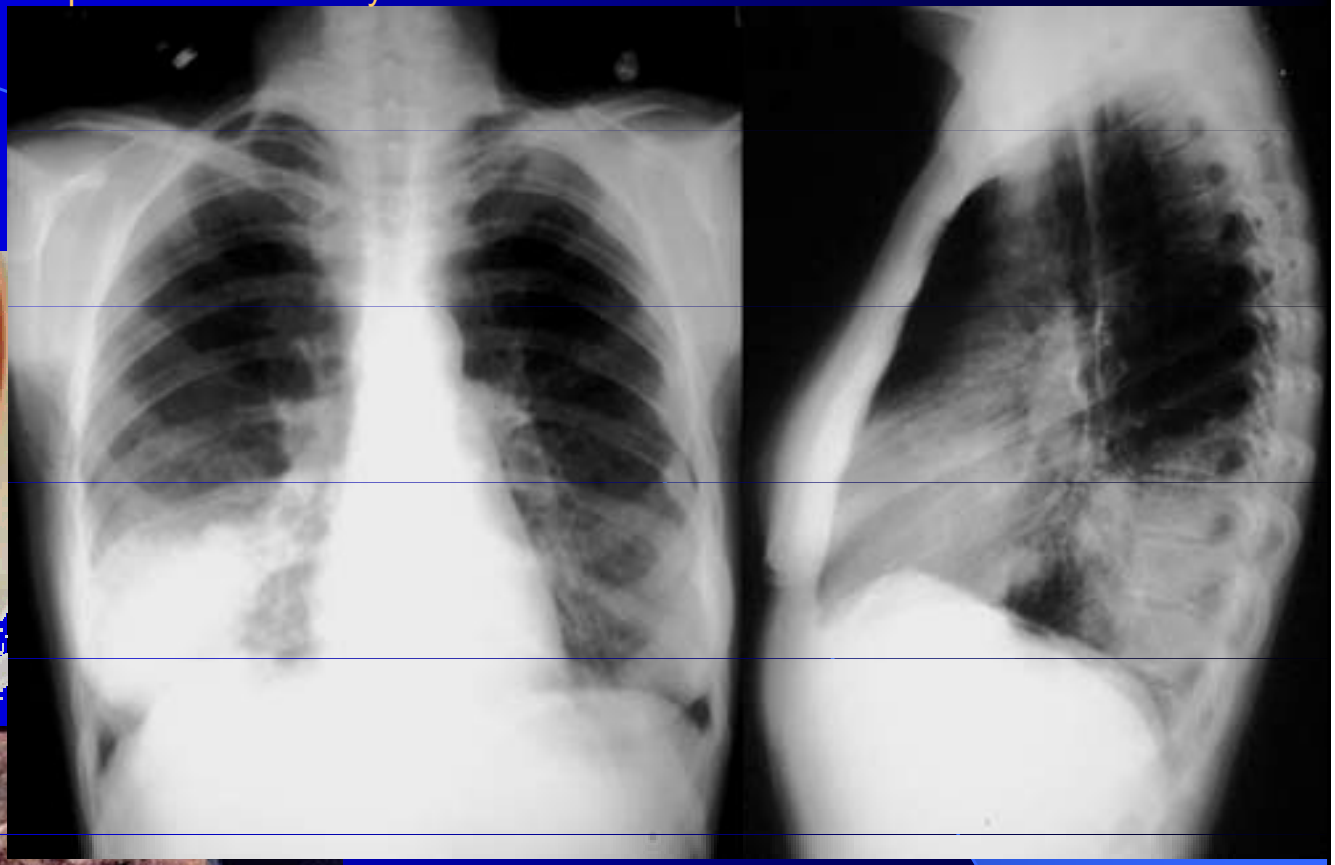
www.medmicro.info


http://www.biotox.cz
res2.agr.ca
www2.mf.uni-lj.si
E. coli
my.opera.com
my.opera.com

Co tropí klebsielly...

http://zdsys.chgb.org.cn

http://microbewiki.kenyon.edu



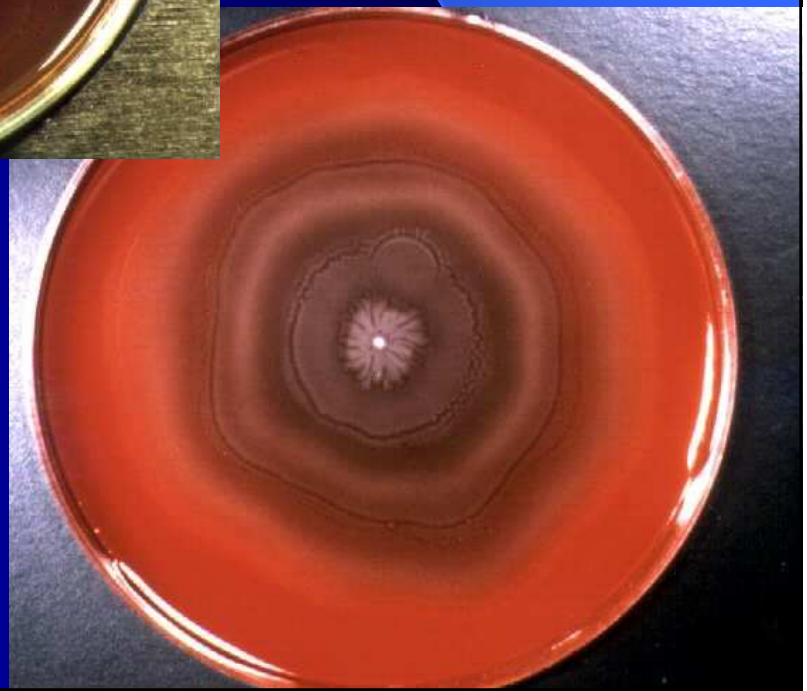
www.brown.edu

BrownMed
Brown Medical School

http://www.bact.wisc.edu

Proteus mirabilis, P. vulgaris (dole)

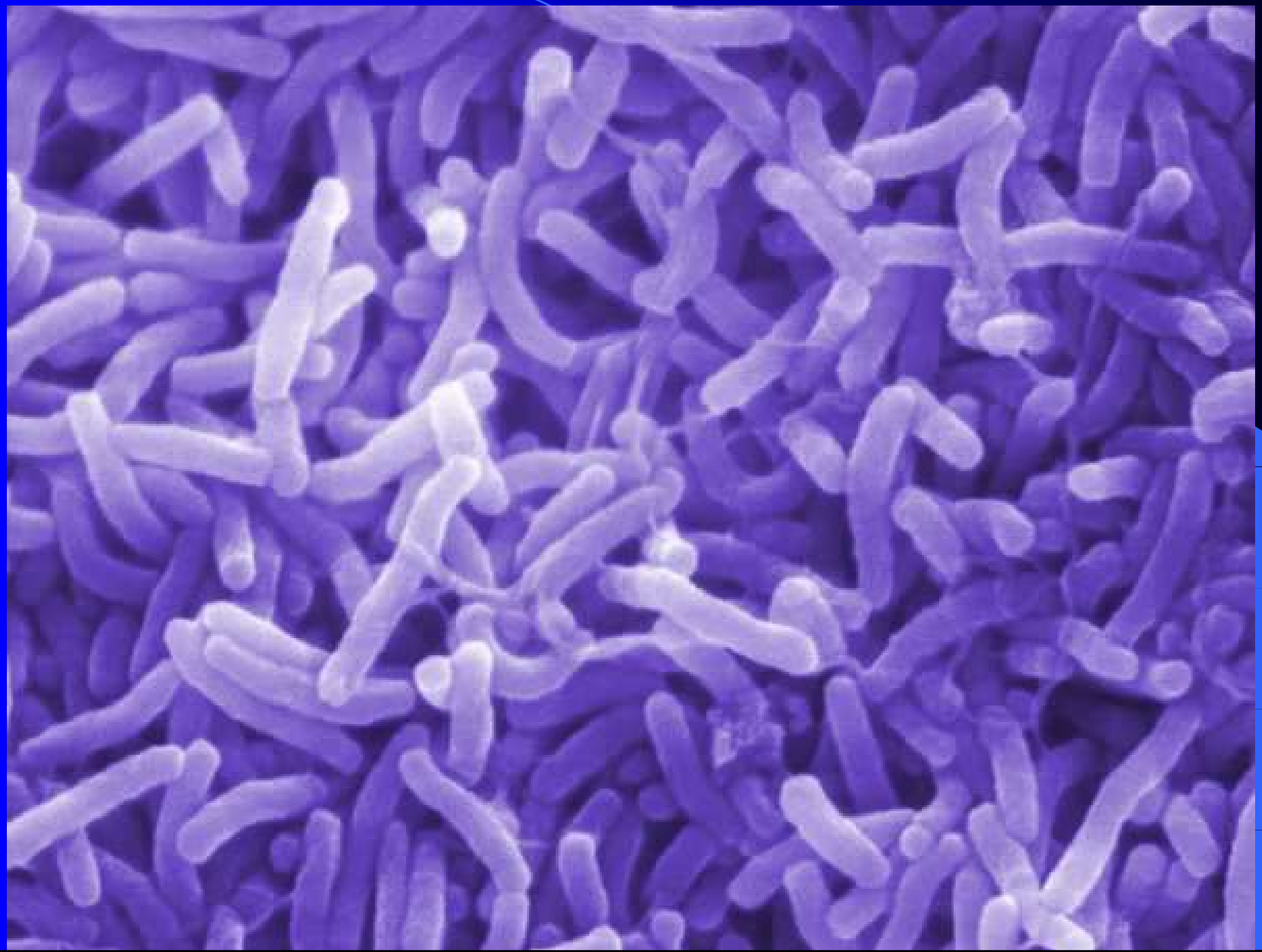
www.medmicro.info



Pro protey je typické, že nerostou jen v.místě inokulace, ale šíří se po povrchu agaru do stran (plazivý růst, Raussův fenomén, také fenomén příbojové vlny

2. Vibrionaceae

http://bepast.org



Klinická charakteristika

- ***Vibrio cholerae*** způsobuje choleru. Nejdůležitější jsou serotypy O139 a zejména O1. Ten se ještě dělí na biotypy; biotyp El Tor je nakažlivější, infekce biotypem Classic mají zase závažnější průběh
- **Halofilní vibria a příslušníci rodu *Aeromonas*** způsobují občasné infekce ran např. při kuchání ryb nebo při koupání v poloslaných lagunách

http://bepast.org

Vibrio sp.

3. Gramnegativní nefermentující bakterie

Bylo nevlídno, že by PSAE ven nevyhnal…

(PSAE – zkratka pro *Pseudomonas aeruginosa*)

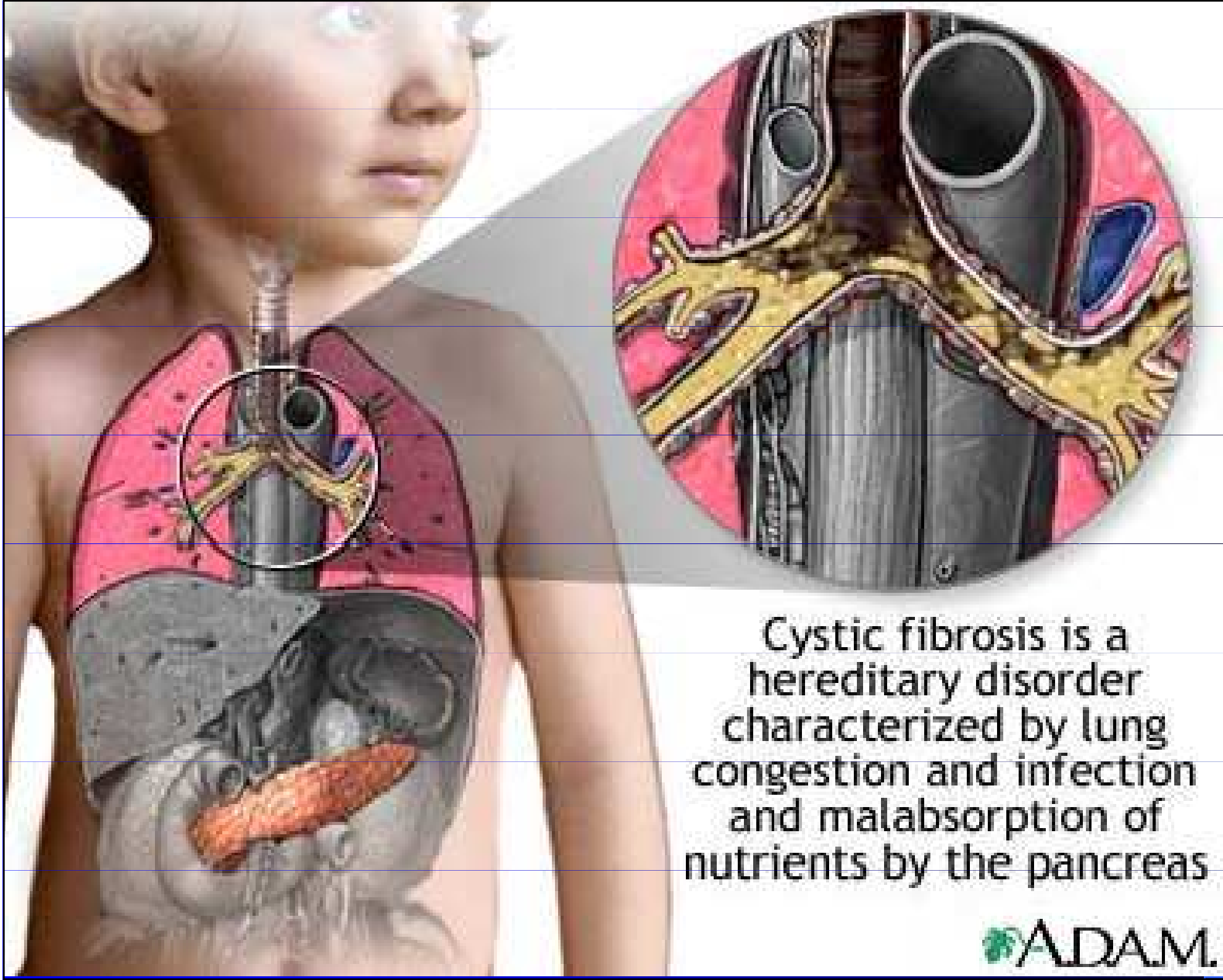
textbookofbacteriology.net

Klinická charakteristika

- Jsou to **oportunní** (sekundární, potenciální) **patogeny**. Jsou to tedy **„bakterie-zbabělci"**, které si netroufnou na zdravého člověka.
- Mezi typicky ohrožené jedince patří
  - lidé s **popáleninami**
  - lidé na **ARO, JIP,** transplantovaní, lidé se sníženou imunitou
  - děti s vrozenou chorobou – **cystickou fibrózou**
- Jsou **typickými původci nemocničních nákaz.** Pak bývají často velmi rezistentní na antibiotika a odolné vůči desinfekci

Nefermentující a cystická fibróza

- Cystická fibróza je těžké, **vrozené onemocnění plic** s poruchou produkce normálního plicního surfaktantu. To vede ke změněným charakteristikám plic, včetně mnohonásobně zvýšeného rizika infekce
- **Nejčastějšími původci** jsou *Pseudomonas aeruginosa, Burkholderia cepacia* a *Staphylococcus aureus*. Kmeny zpravidla získají **polyresistenci** a mnohé děti umírají velmi mladé.



Cystic fibrosis is a hereditary disorder characterized by lung congestion and infection and malabsorption of nutrients by the pancreas

A.D.A.M.

http://www.nlm.nih.gov/medlineplus

U oslabených osob mohou způsobovat např. i zánět nehtového lůžka.

Autokasuistika as. Zahradníčka

Pseudomonády napadají i jinak zdravé lidi při porušení anatomické kožní bariéry. Infekce však bývá jen lokální.

- 13. 1. 2006, pátek, Padang, Západní Sumatra, Indonésie: as. Zahradníček padá do nezakryté dešťové kanalizace s následkem poměrně velké rány sahající na tibiální okostici
- O několik týdnů později: rána je intenzivně cítit pseudomonádou, která je následně z rány i vykultivována. Naštěstí je dobře citlivá
- Terapie: lokální – ušní kapky otosporin (gentamicin + polymyxin B, obě složky účinné)
- Terapie úspěšná

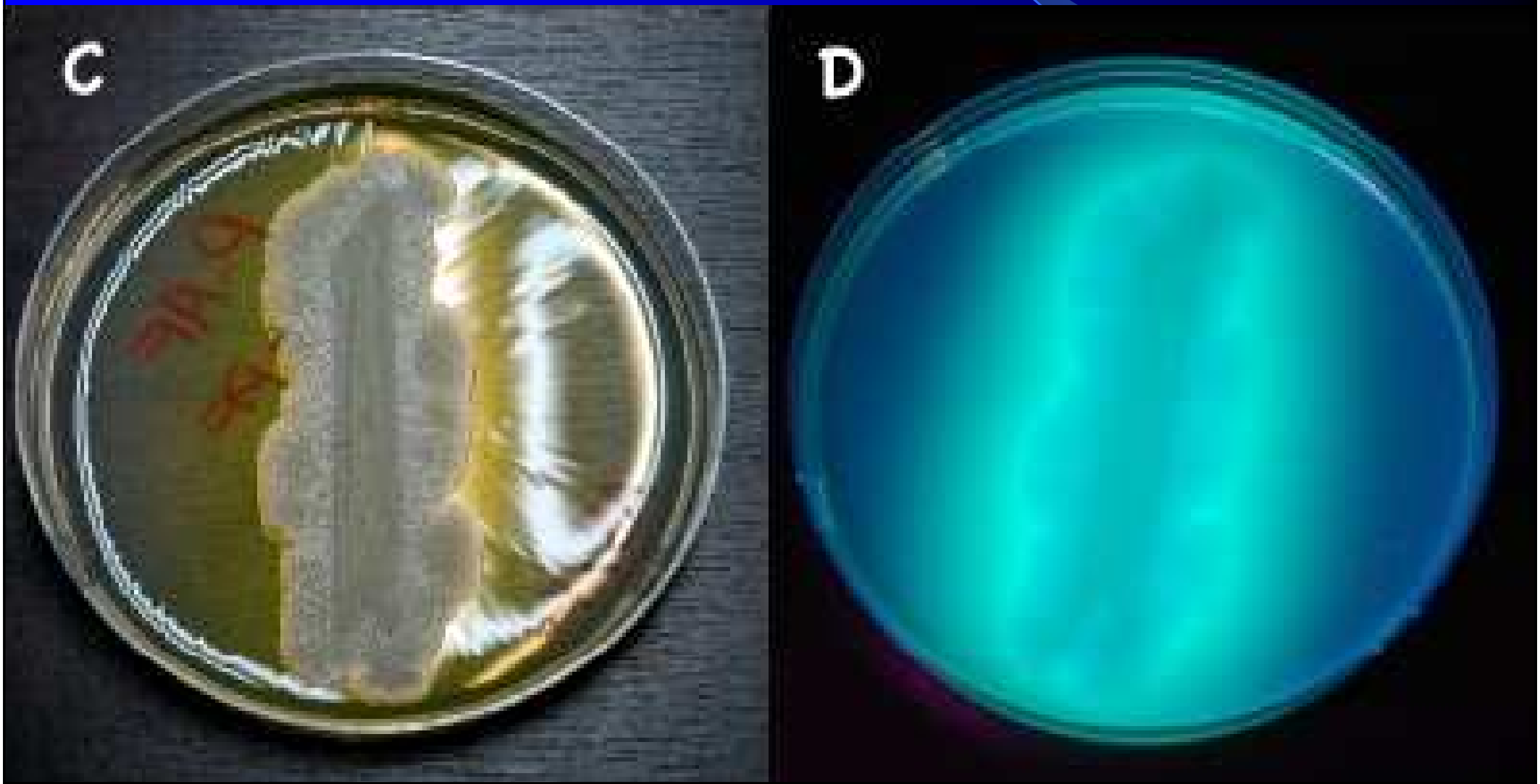
Padang
JL. PROF. M. YAMIN SH.
Photo O. Z.

Pseudomonas aeruginosa na MH

www.medmicro.info
(stránky ústavu),
foto prof. Skalka

Další „nefermentující“: *Pseudomonas fluorescens*

http://www.bact.wisc.edu



http://www.apsnet.org

Burkholderia cepacia

Burkholderia cepacia způsobuje hnilobu cibule (*Allium cepa*), je to tedy typický rostlinný patogen

http://www.microbelibrary.org

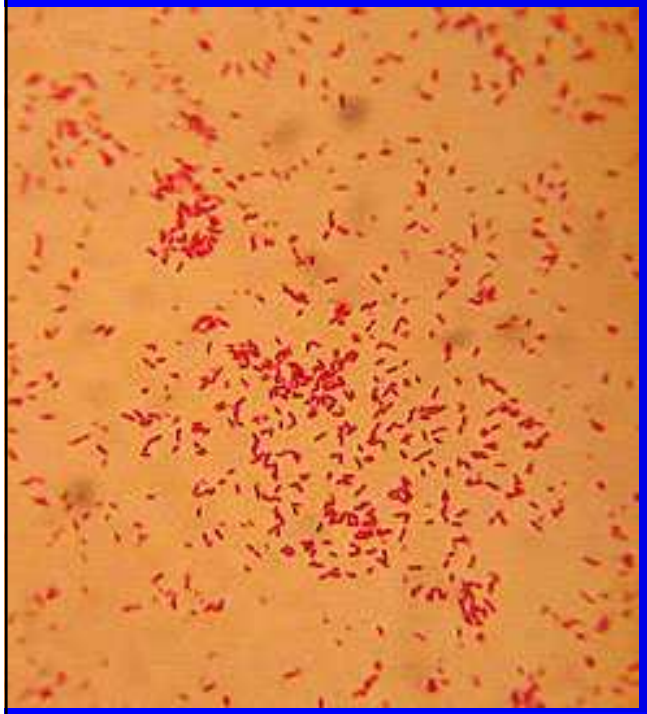
Burkholderia pseudomallei

Burkholderia pseudomallei je původcem mellioidózy. Příbuzná *B. mallei* způsobuje zoonózu zvanou malleus čili vozhřivka

http://www.asm.org

Stenotrophomonas maltophilia

http://www.scielo.cl

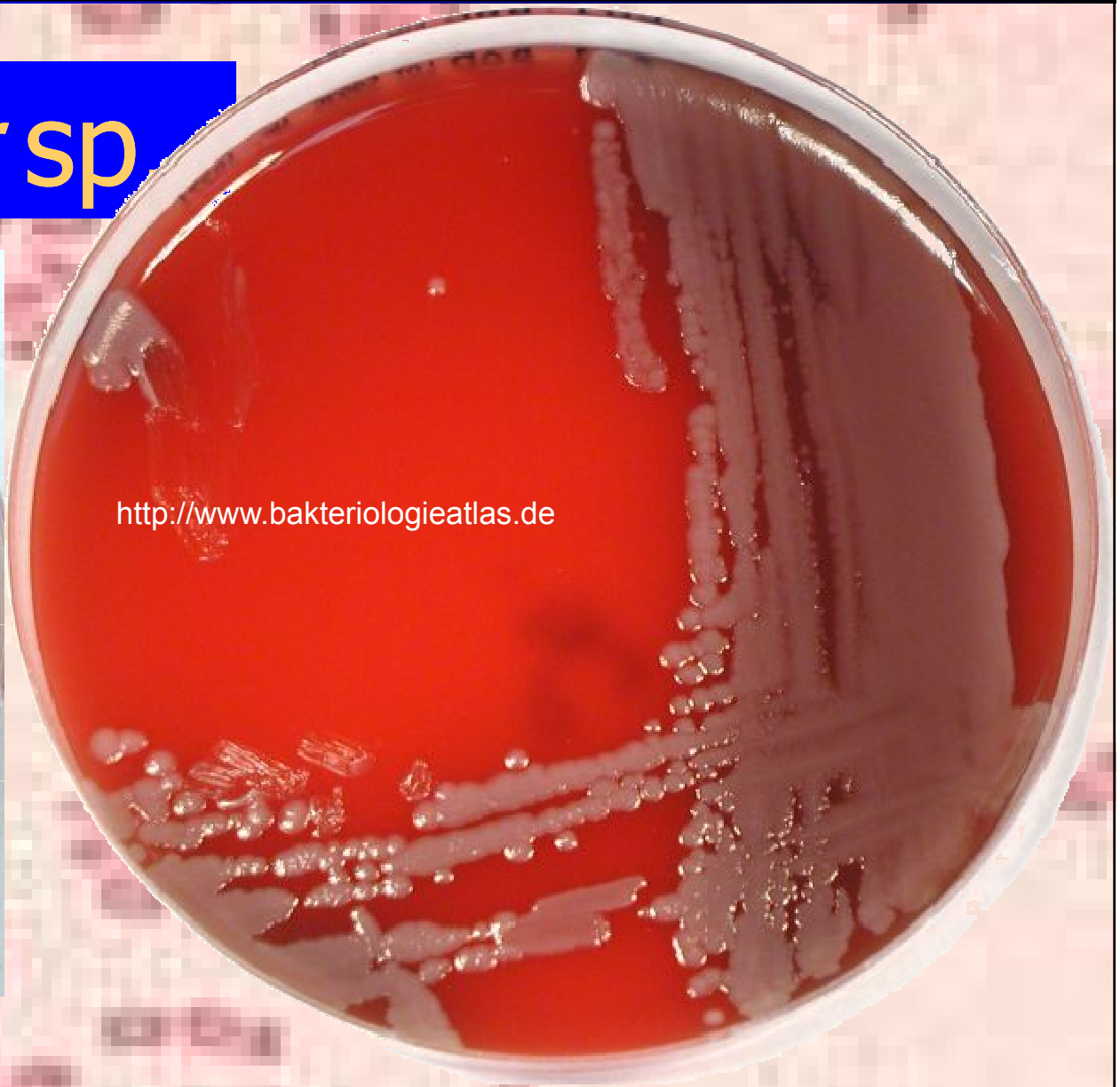


http://clinicalmicrobiology.stanford.edu

http://www.microbelibrary.org

Stenotrophomonas maltophilia je dlouhé jméno, ale snadno si ho zapamatujete: je to „úzké-výživy-jednotka maltózu-milující, čili „bakteriální panda“, místo bambusu žvýkající maltózu ☺

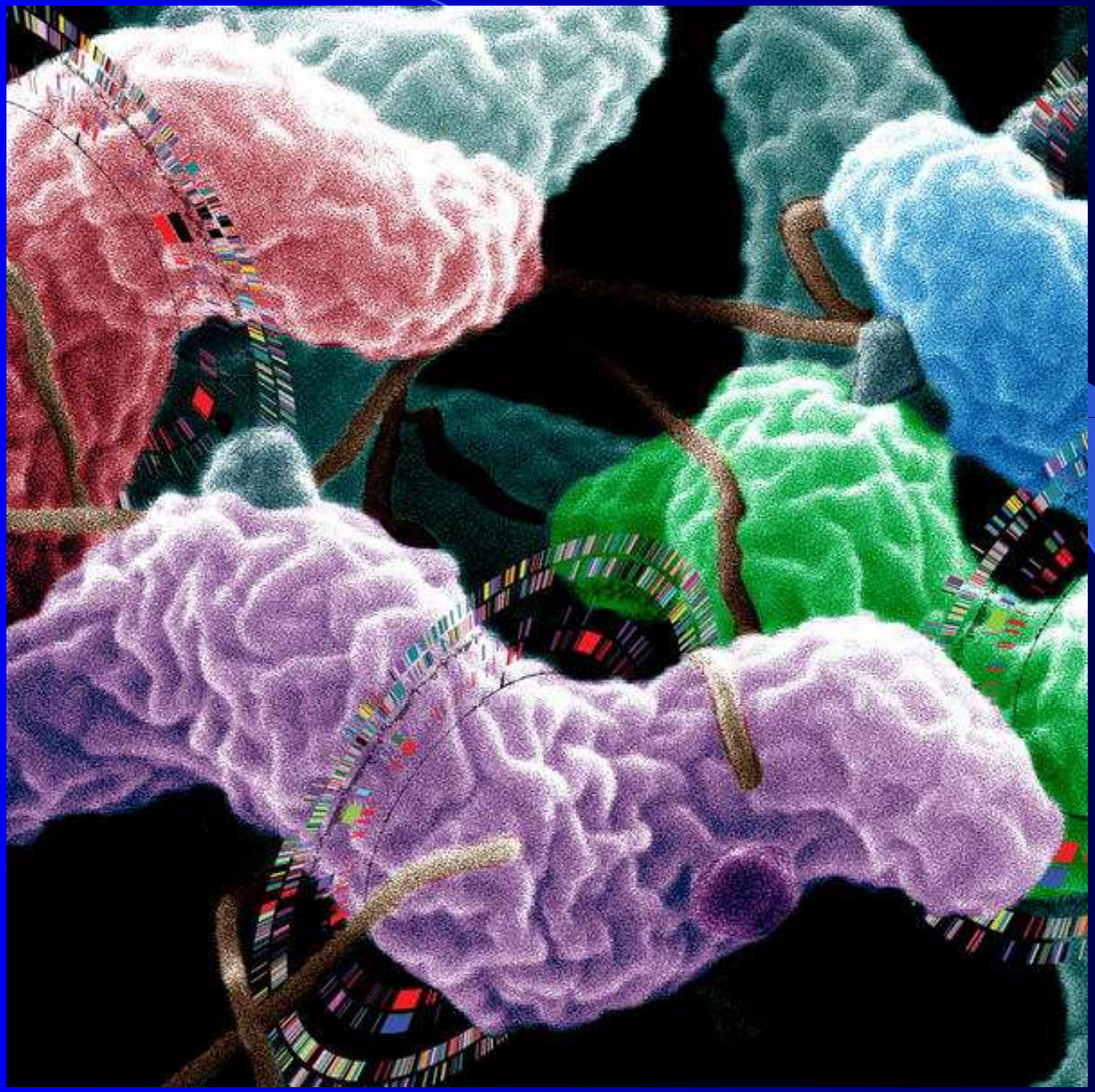
Acinetobacter sp



http://www.buddycom.com

Z řečtiny: a-kineto- = „nepohyblivý“

4. Kampylobakter a helikobakter



http://biology.plosjournals.org

Kampylobakter

- *Campylobacter jejuni*, gramnegativní zahnutá tyčinka. Nepatří mezi enterobakterie, ale kampylobakterióza je svým průběhem a závažností srovnatelná se salmonelózou
- Počet případů u nás je v posledních letech přibližně stejný jako v případě salmonelózy. Těžko říci, do jaké míry kampylobakteriózy skutečně přibylo a do jaké je jen lépe diagnostikována než dříve

Helikobakter

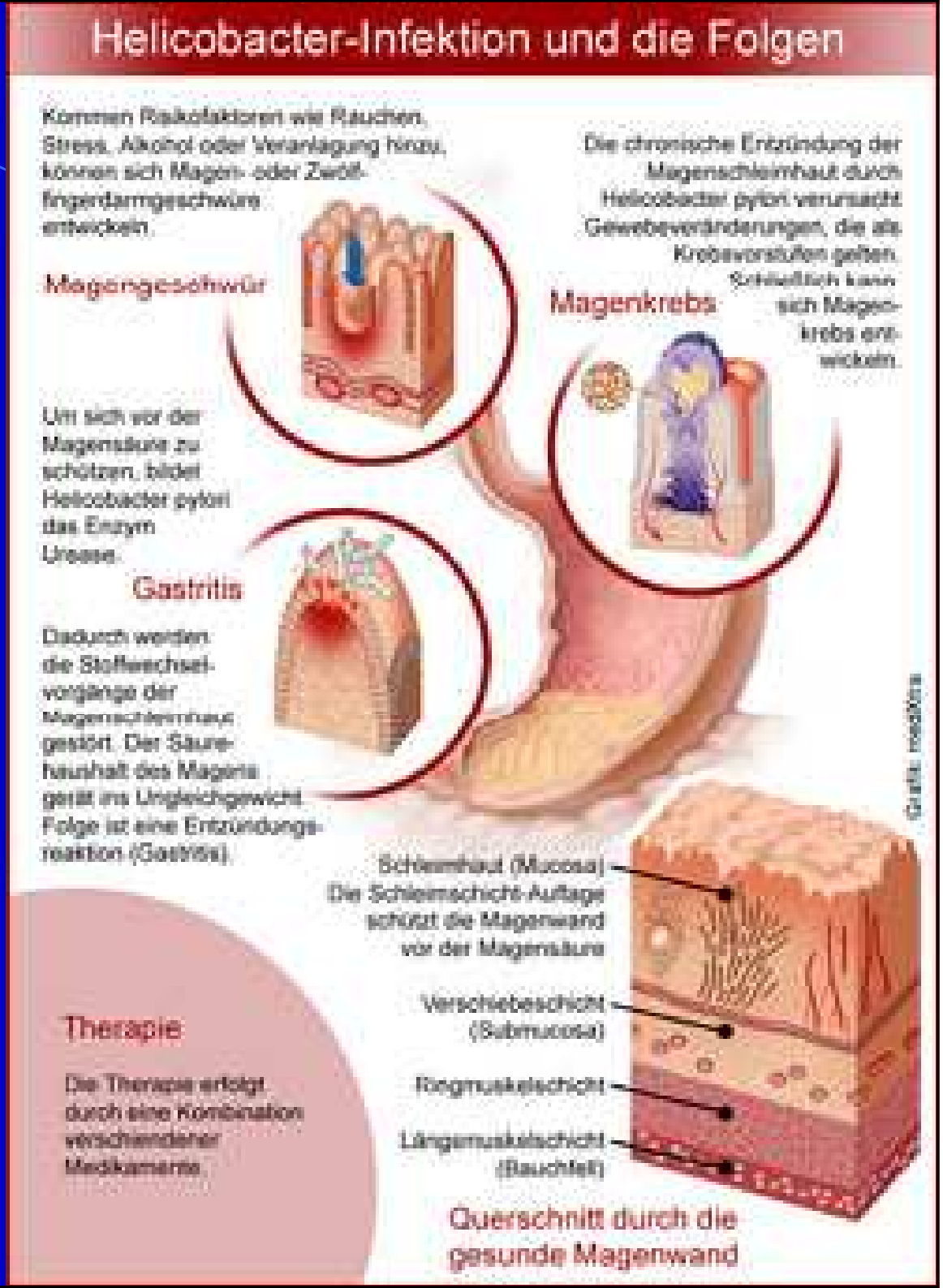
- Peptické (tedy gastrické či duodenální) vředy jsou onemocněním, které vzniká souhrou více příčin. Takovým onemocněním říkáme obvykle multifaktoriální.
- Dodnes se nejen mezi praktickými lékaři, ale i mezi odborníky liší názory na podíl bakterie *Helicobacter pylori* na vředové onemocnění. Jisto je, že jsou i zdraví lidé s helikobakterem, stejně tak je ale jisto, že helikobakter svůj, nikoli nevýznamný, podíl na onemocnění má.

Jak zločinec přežívá v extrémně nepříznivém prostředí žaludku?

- Upravuje si své mikroprostředí – alkalizuje si ho, štěpě močovinu
- Močovina se rozštěpí na kyselý oxid uhličitý, který vyprchá, a zásaditý čpavek, který zůstane a alkalizuje prostředí
- Štěpení močoviny probíhá podle reakce:

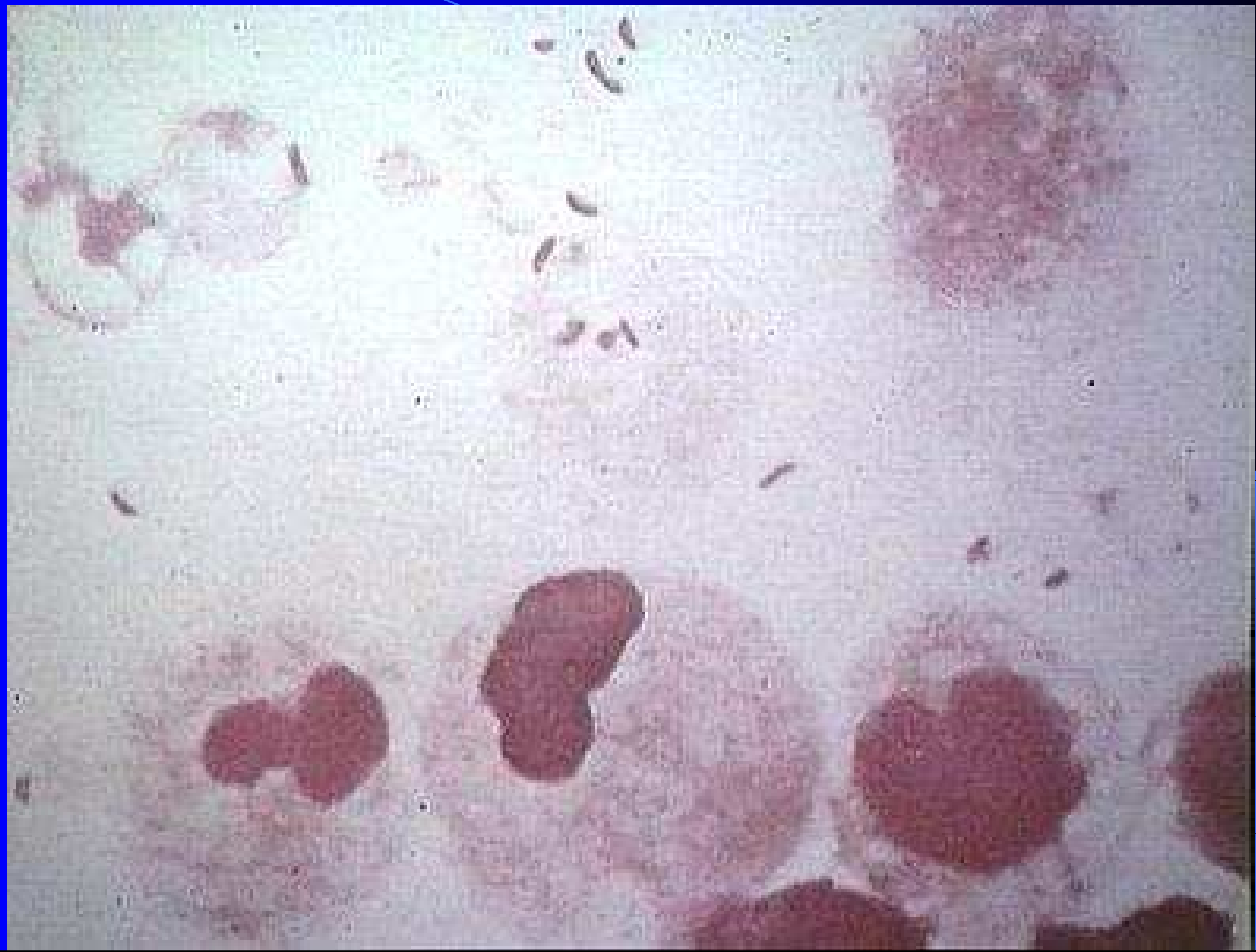
$NH_2\text{-}CO\text{-}NH_2 + 3\ H_2O \rightarrow CO_2 + 2\ NH_4OH$

Komplikace helikobakterového onemocnění



www.medizin.de

5. Čeleď *Pasteurellaceae*



http://medinfo.ufl.edu

Haemophilus influenzae

- **Způsobuje**
  - **meningitidy**, hlavně v batolecím věku (děti, které z rodiny přišly do jeslí nebo školky)
  - **epiglotitidy** (izolované záněty příklopky hrtanové)
  - případně i **jiné dýchací infekce** a vzácně infekce jiných orgánů
- **Přenos** je většinou vzduchem
- **Prevence** infekce Hib se dnes provádí očkováním, očkovací látka je součástí hexavakcíny.
- V **léčbě** těžkých infekcí se uplatňují cefalosporiny třetí generace, u lehčích aminopeniciliny, ko-trimoxazol aj.

www.4to40.com/health/print.asp?id=13

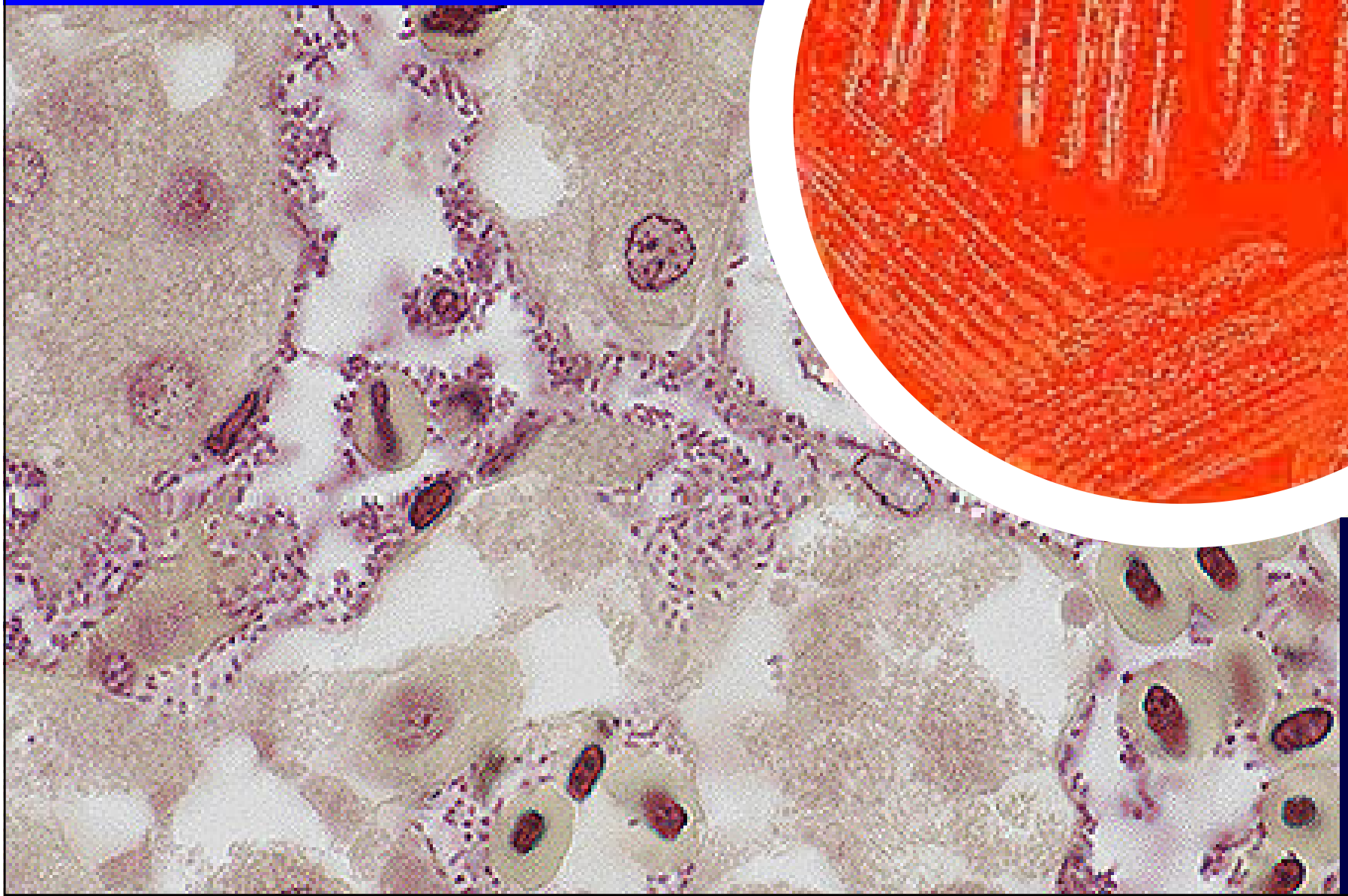
Hemofily

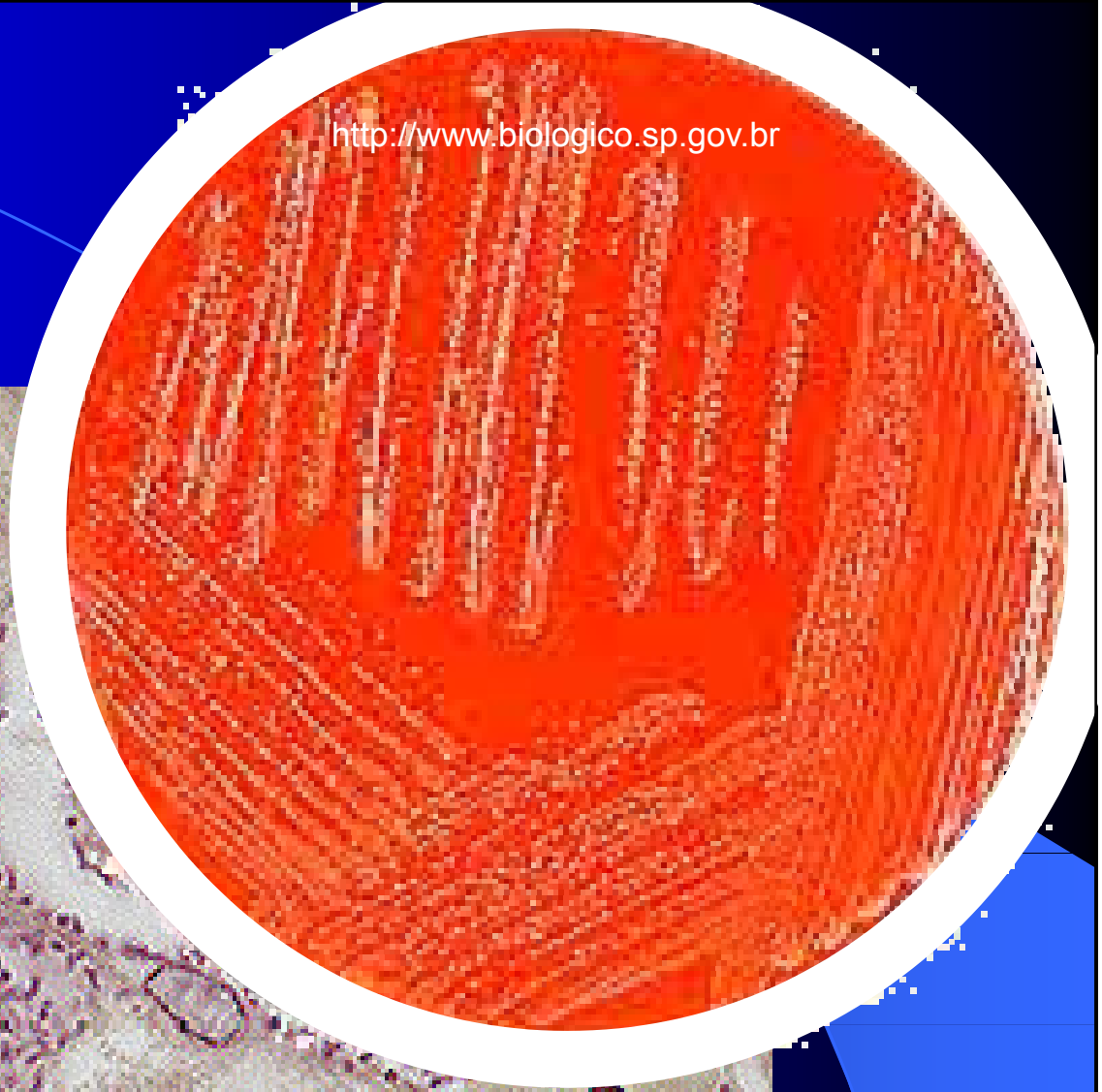
Pasteurella multocida

- *Pasteurella multocida* je běžnou flórou v psích tlamách.
- U člověka způsobuje zejména zhnisání ran po pokousání psem či jiným zvířetem.
- Může jít o rány, které byly například druhotně psem olízané
- Klinicky se onemocnění projevuje zhnisáním rány, tak jako při jiných původcích

Pasteurella multocida

http://library.thinkquest.org





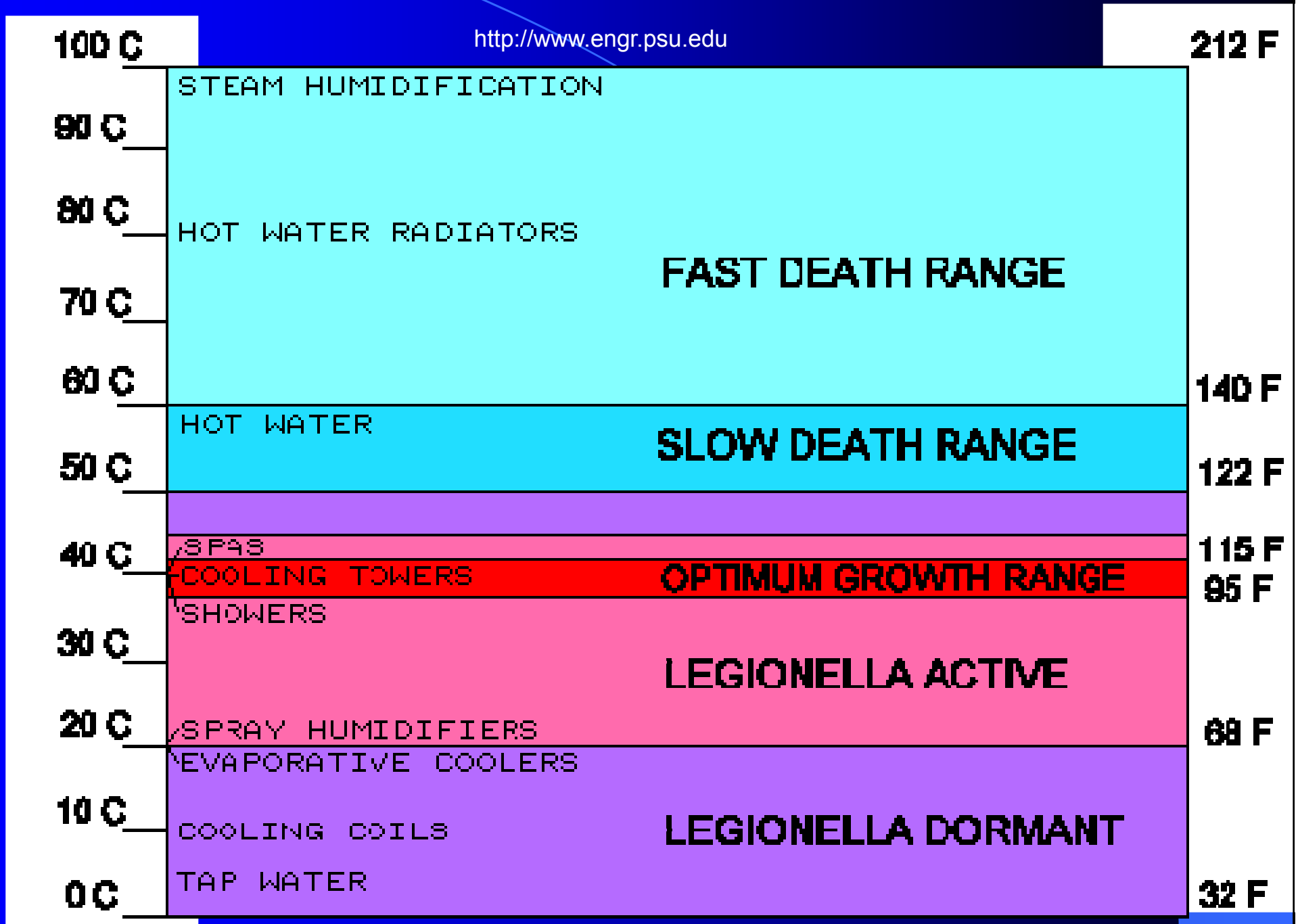
http://www.biologico.sp.gov.br

6. Legionelly, brucelly, bordetelly a franciselly

Legionářská nemoc

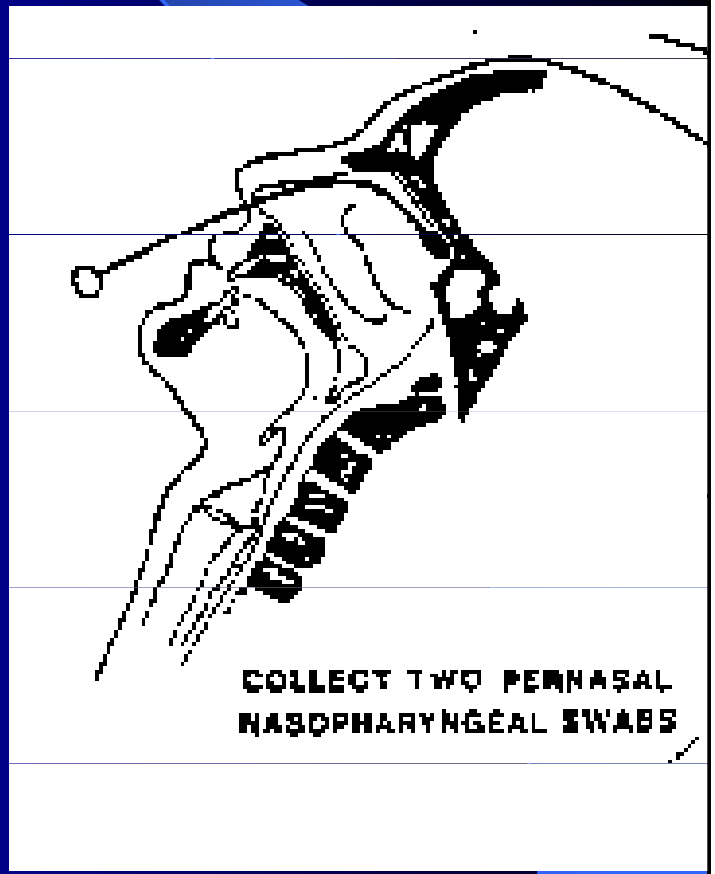
- Tuto nemoc působí ***Legionella pneumophila***
- Legionářská nemoc je těžší variantou nemoci; existuje ještě mírnější varianta, **Pontiacká horečka.**
- Bakterie má často rezervoár ve **vodovodech, klimatizaci**, atd.
- Při stavbě nových částí nemocnic (ale i domovů důchodců, hotelů, lázní…) se musí podniknout opatření na prevenci legionelózy, především při plánování vodovodní sítě (žádné slepé odbočky)

Legionella a teplota



Rod *Bordetella*

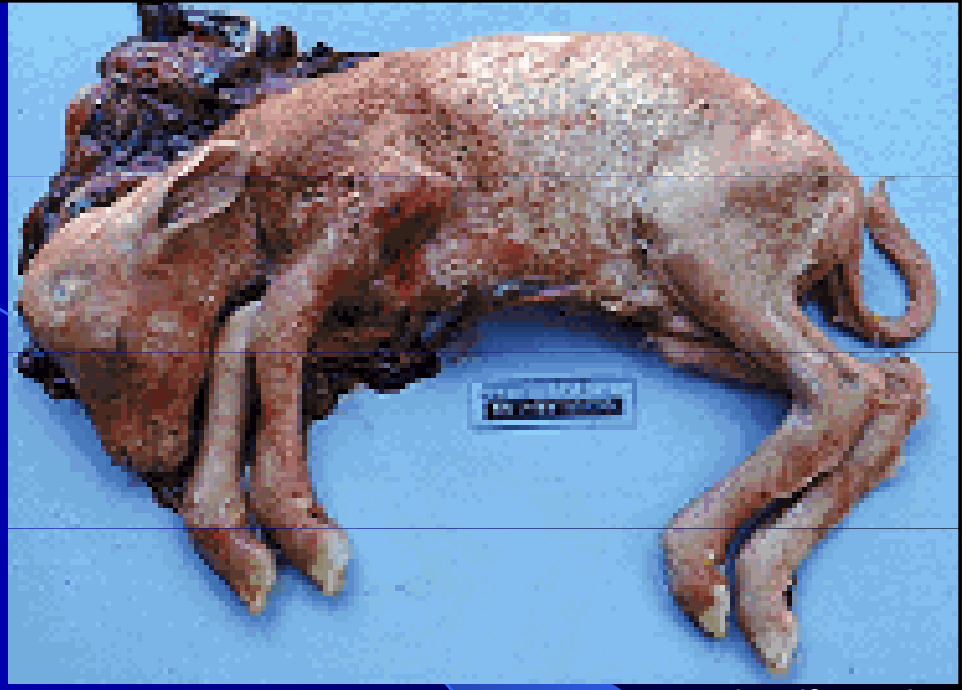
- ***B. pertussis*** **a** ***B. parapertussis*** způsobují černý kašel. Začíná jako běžné nachlazení, ale pak přicházejí mučivé záchvaty kašle s vykašláváním hlenů. U parapertuse jsou příznaky podobné, spíše doba trvání je kratší
- ***B. bronchiseptica*** způsobuje totéž, navíc někdy i sepse
- Černý kašel je velmi vzácný díky očkování
- **Pernasální výtěr** (viz obrázek) se používá v případě potřeby



http://www.dsf.health.state.pa.us

Bordetella byla izolována 1906 a podíleli se na tom Jules Bordet a Octave Gengou

Rod *Brucella*



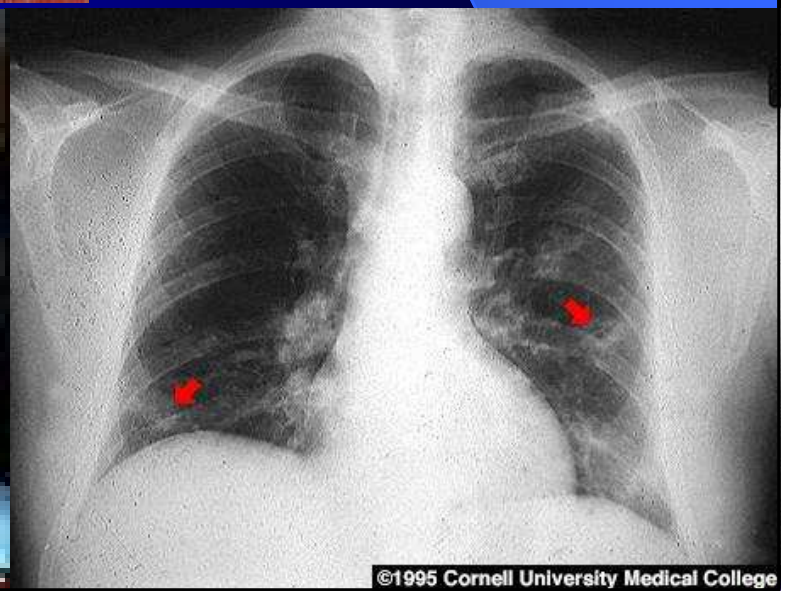
www.poslovniforum.hr

- Je to původce zoonóz
- ***Brucella abortus*** je kraví patogen. Často napadá hovězí placenty, způsobujíc zmetání (potraty) skotu. U lidí způsobuje **Bangovu nemoc** (horečka, orgánová postižení atd.)
- Dalšími brucelami jsou ***Brucella suis*** z prasat, ***Brucella mellitensis*** z ovcí a koz (původce **maltské** čili **vlnivé horečky**) a ***Brucella canis*** ze psů

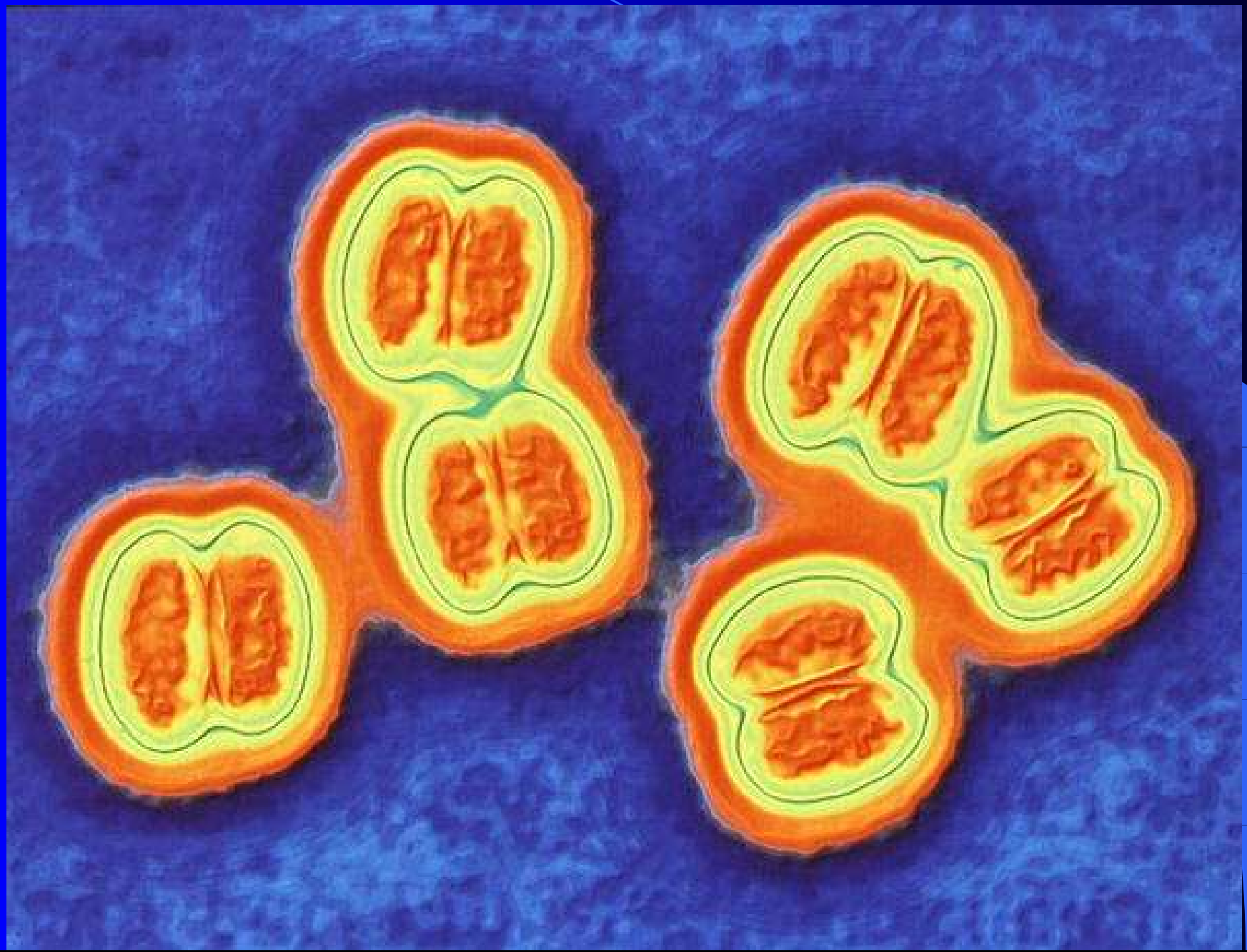
Rod *Francisella*

- Nejdůležitějším druhem je ***F. tularensis***
- Způsobuje **tularémii – „zaječí mor"**
- Tento organismus může napadat **rány**, často s následným uzlinovým syndromem. Ránou, ale také např. dýchacími cestami, se může dostat do krevního řečiště a **napadat různé orgány**. Při masivním vniknutí do plic dojde k **zápalu plic**
- V riziku infekce jsou **myslivci**, ale ještě více **kuchaři připravující zvěřinu**

http://www.antropozoonosi.it (4×)



7. Neisserie a moraxely



Klinická charakteristika

- **Ústní neisserie** jsou jednou z hlavních součástí mikroflóry v ústní dutině a faryngu
- ***Neisseria meningitidis*** **(„meningokok")** je původcem zánětů mozkových blan, často probíhajících bleskově. Mimo to může způsobovat sepse a pneumonie. Nález meningokoka v krku paradoxně nemusí znamenat nic zlého: deset procent lidí má meningokoky bezpříznakově v krku
- ***Neisseria gonorrhoeae*** **(„gonokok")** je původcem kapavky, tedy hnisavého zánětu močové trubice a případně krčku děložního
- ***Moraxella catarrhalis*** je normální nález ve faryngu, ale původce zánětů dutin a středního ucha

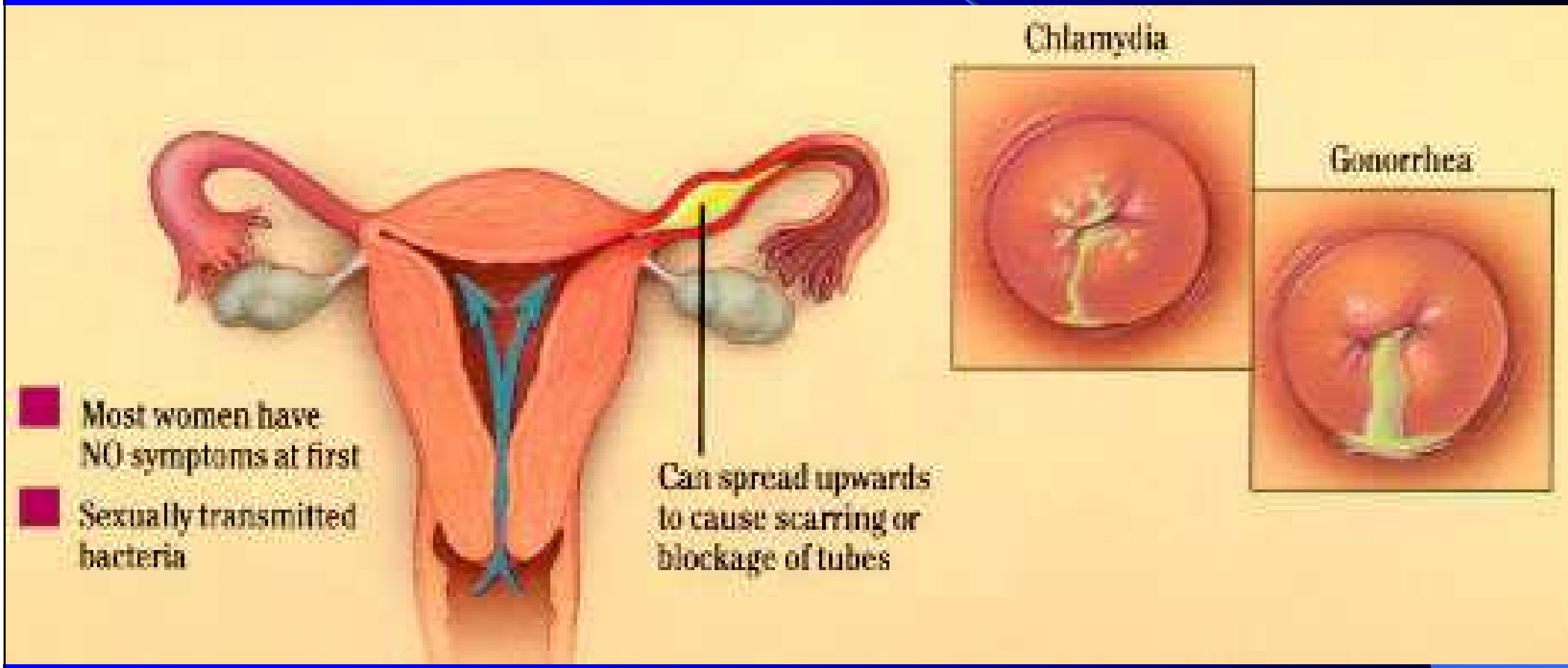
Příběh první

- Honza byl maminčin mazlíček a s holkami to neuměl. Tak se stalo, že ještě ve dvaceti neměl žádnou sexuální zkušenost. Kamarádi z něj měli legraci. Jednou se na něj domluvili, opili ho a zaplatili mu „společnici" na večer. Honza měl pocit, že je konečně mužem... jenže pak přišlo svědění a odkapávání hnisu z močové trubice.

Určitě tušíte, kdo je viníkem

- Samozřejmě, je to *Neiserria gonorrhoeae*, (gonokok) původce kapavky.
- Kapavka se projevuje jako zánět uretry, u žen také cervixu; asymptomaticky či symptomaticky se gonokoky vyskytují i ve faryngu a v rektu.
- U žen naopak nejde o kolpitidu (zánět pochvy) a proto pochva není místem, odkud by bylo doporučeno odebírat u podezření na kapavku výtěry

http://www.waterscan.co.yu


Chlamydia
Gonorrhea
Most women have NO symptoms at first
Sexually transmitted bacteria
Can spread upwards to cause scarring or blockage of tubes

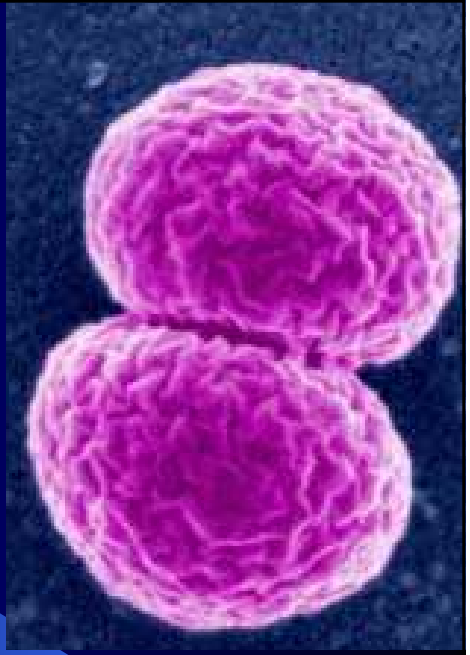
Příběh druhý

- Lucie se už čtyři týdny učila na zkoušku z fyziologie. Vůbec nevycházela z domu a jen seděla na zadnici. U zkoušky měla pocit, že ze sebe nic nevydoluje, ale nakonec si na cosi vzpomněla a prolezla s E-čkem
- Večer to s kamarádkami šla oslavit na taneční party. Bylo tam nakouřeno a tancovalo se do hluboké noci. Druhý den Lucce nebylo dobře, začala mít teploty a pak se objevila i vyrážka.

(pokračování)

- Až tehdy se nechala odvézt do nemocnice na infekční oddělení. V sanitce upadla do bezvědomí a lékaři konstatovali rozvrat metabolismu. Po deseti hodinách marné snahy o zachování základních životních funkcí Lucka zemřela.
- Takový průběh může bohužel někdy mít infekce způsobovaná velmi zákeřným pachatelem. Některé jeho kmeny jsou přítomny v krku zcela zdravých osob…

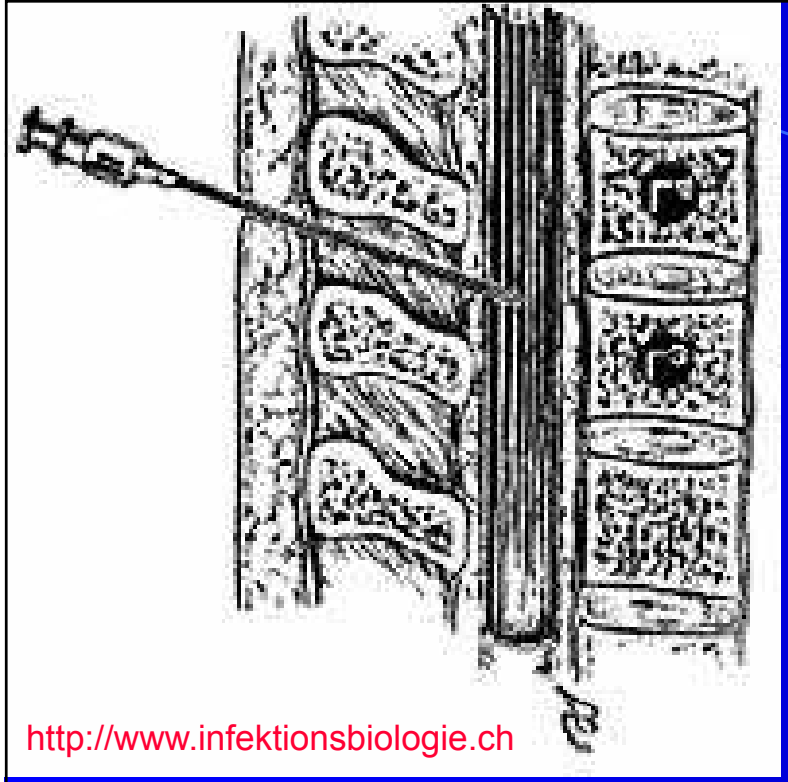
A tímto viníkem je...



- **... *Neisseria meningitidis*** neboli **meningokok**
- Meningokok způsobuje meningitidy, ale i sepse a jiné závažné stavy; to vše se týká tzv. **klonálních kmenů.**
- Jiné kmeny jsou ale docela nevinné a udává se, že **asi deset procent populace má meningokoka v krku**
- Virulence souvisí zřejmě především s výbavou **proteinovými antigeny**. Naopak **polysacharidové antigeny** určují především to, zda kmen je preventabilní očkováním

Proč někdy infekce nastane a jindy se nic nestane

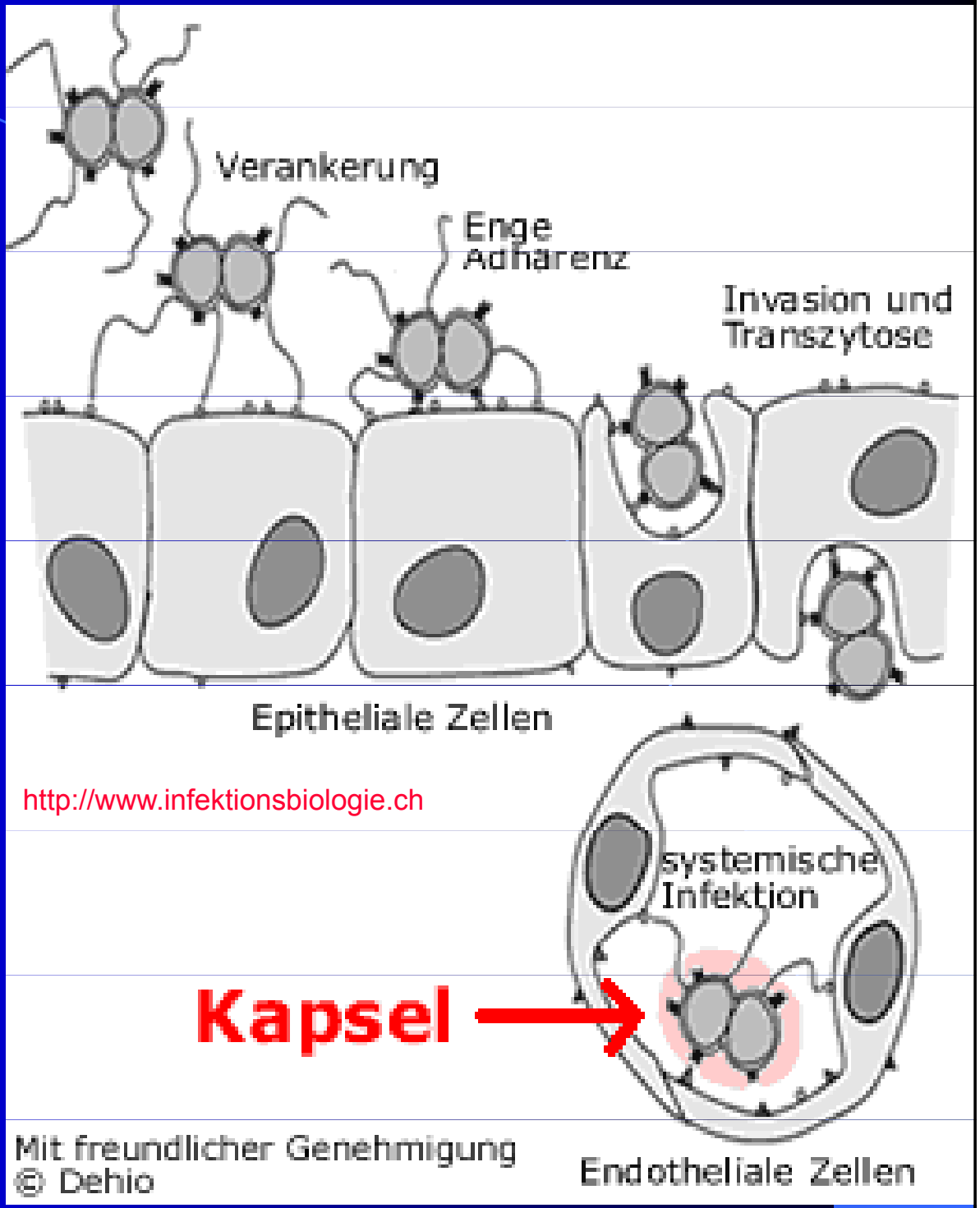
- K invazivní infekci dojde pouze pokud je kmen vysoce virulentní (specifické klony mikroba) a hostitelský organismus je vnímavý
- Meningokok se přenáší těsným kontaktem. Invazivní infekci napomáhá narušení sliznice, např. i kouřením či předchozí virovou infekcí.
- Infekce propukne často tehdy, když je tělo oslabeno neúměrnou fyzickou námahou po předchozí inaktivitě



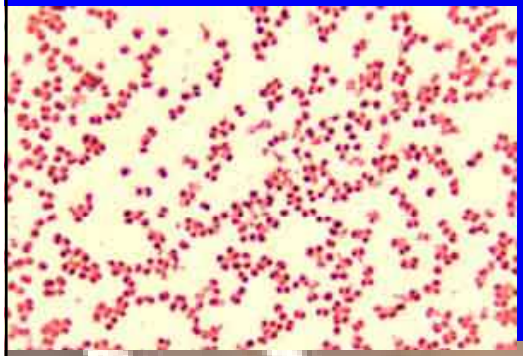
http://www.infektionsbiologie.ch

Odběr likvoru

Takto pronikají do tkání



Meningokoková meningitida je celosvětově velmi závažnou nákazou



„Meningitis belt“, kde se hodně vyskytuje meningokoková meningitis

všechny obrázky: http://www.infektionsbiologie.ch

Obrázky neisserií

Grampozitivní bakterie

- Koky
  - Rod *Staphylococcus* (a další kataláza pozitivní koky)
  - Rod *Streptococcus* (a další kataláza negativní koky)
  - Rod *Enterococcus*
- Tyčinky
  - *Bacillus*
  - Koryneformní tyčinky (*Corynebacterium, Arcanobacterium*…)
  - *Listeria a Erysipelothrix*

1. Stafylokoky
a další kataláza pozitivní koky

- **Stafylokoky ve sputu.** Pátráme po grampozitivních kocích ve shlucích a také po leukocytech (hlavně polymorfonukleárech), které svědčí pro bakteriální zánět

Foto Ondřej Zahradníček

Základní charakteristika

- Stafylokoky patří **mezi klinicky nejvýznamnější G+ koky**. Jsou kataláza pozitivní.
- Morfologicky jde o **koky ve shlucích**, shluky ale často není pořádně vidět
- Kdysi se rozlišovat ***Staphylococcus aureus*** (zlatý) a *Staphylococcus albus* (bílý). Dnes je už známo asi padesát druhů stafylokoků, stále má ale význam rozlišovat „zlatého stafylokoka" a ostatní, z nichž většina patří mezi tzv. **koaguláza negativní stafylokoky**

Klinická charakteristika

- Vyskytují se na **kůži člověka** i jiných živočichů
- Proto také snášejí **vyšší koncentrace soli**
- Všechny patří mezi **podmíněné patogeny**, ovšem zlatý stafylokok je spíše patogenní, ostatní stafylokoky jsou spíše málo patogenní
- **Zlatý stafylokok** způsobuje hnisavé záněty v kůži i ve tkáních, infekce dýchacích cest a vzácně také enterotoxikózu, syndrom toxického šoku či syndrom opařené kůže
- **Všechny stafylokoky** mohou způsobovat sepse

Příklady infekcí způsobených zlatým stafylokokem: Impetigo…

http://pathmicro.med.sc.edu/fox/staph-impetigo.jpg

...bulózní impetigo...

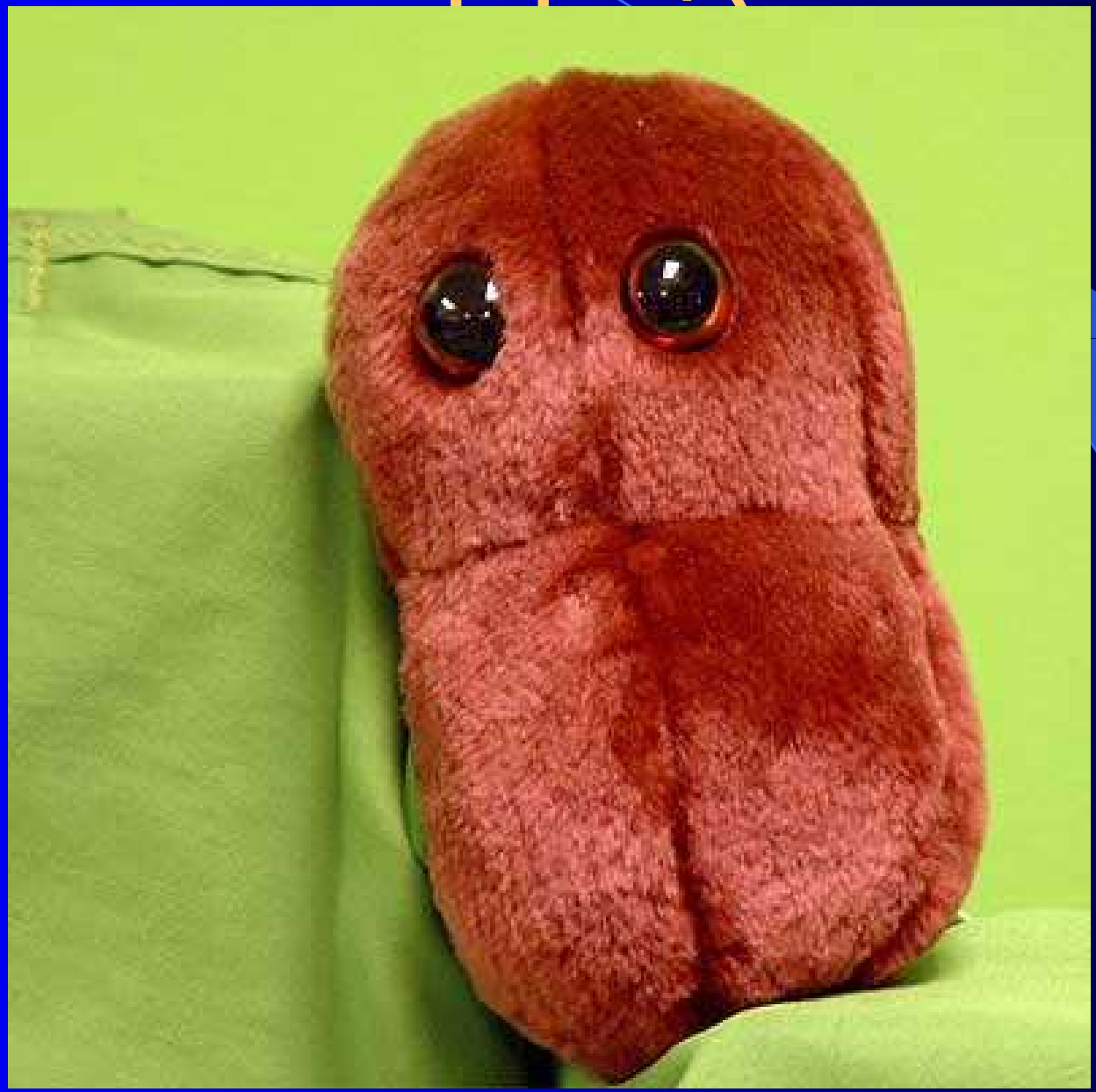
http://www.adhb.govt.nz/newborn/TeachingResources/Dermatology/BullousImpetigo/BullousImpetigo3.jpg

...otitis externa s furunklem...

www.merck.com/mmpe/print/sec08/ch088/ch088c.html.

2. Streptokoky (a jiné

www.giantmicrobes.com,
www.plysovimikrobi.cz

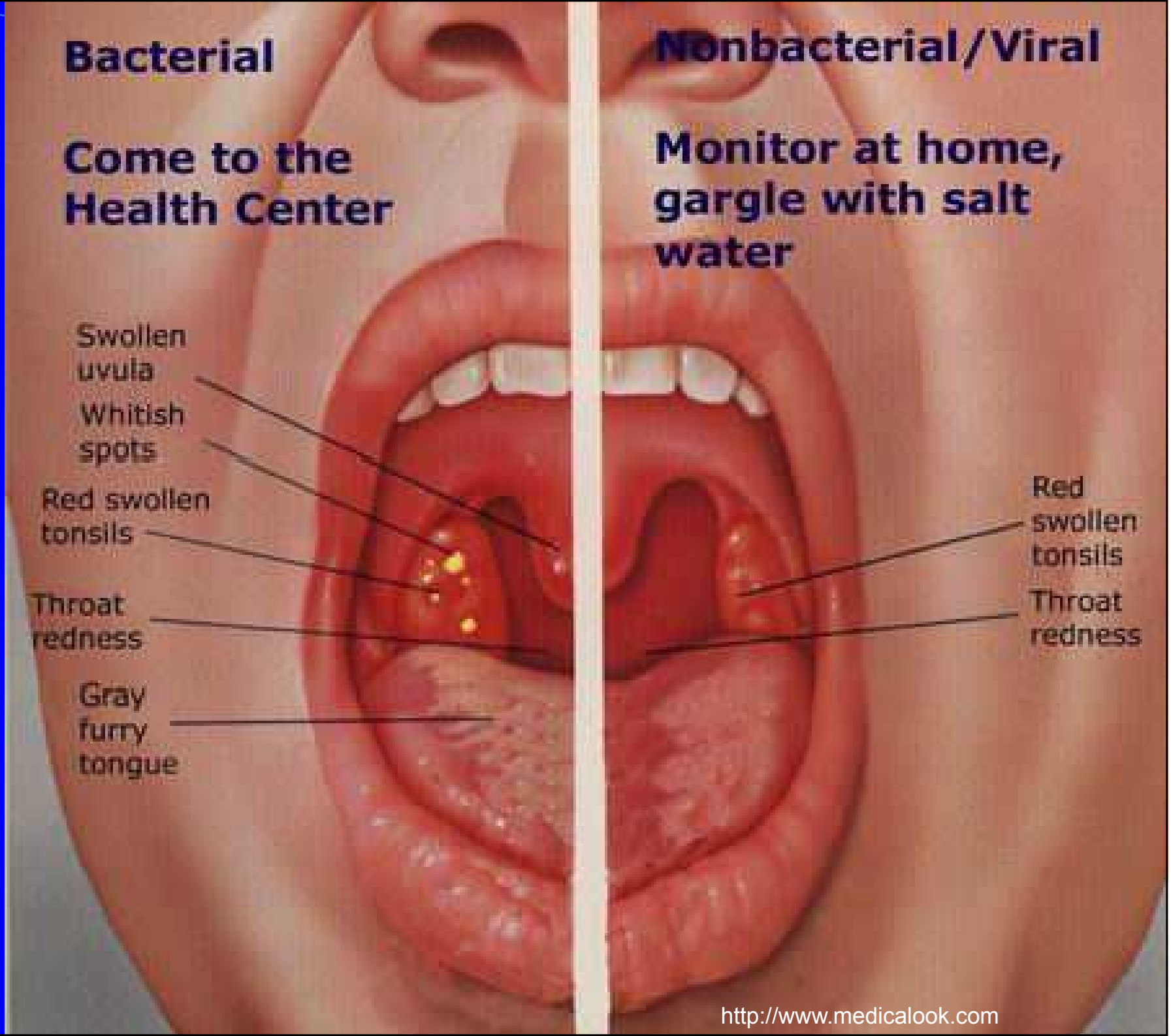


Plyšový streptokok

Klinická charakteristika

- Vyskytují se ve střevě člověka a jiných obratlovců
- Některé jsou ústní flórou v dutině ústní
- Jiné jsou patogenem v dutině ústní a hltanu
- Další jsou patogenem např. v urogenitálním systému
- Některé jsou čisté lidské, jiné napadají i zvířata
- Bližší informace u jednotlivých druhů

Tonsilitis („angína")



Spála (šarlach)

http://www1.lf1.cuni.cz

www.infektionsnetz.at

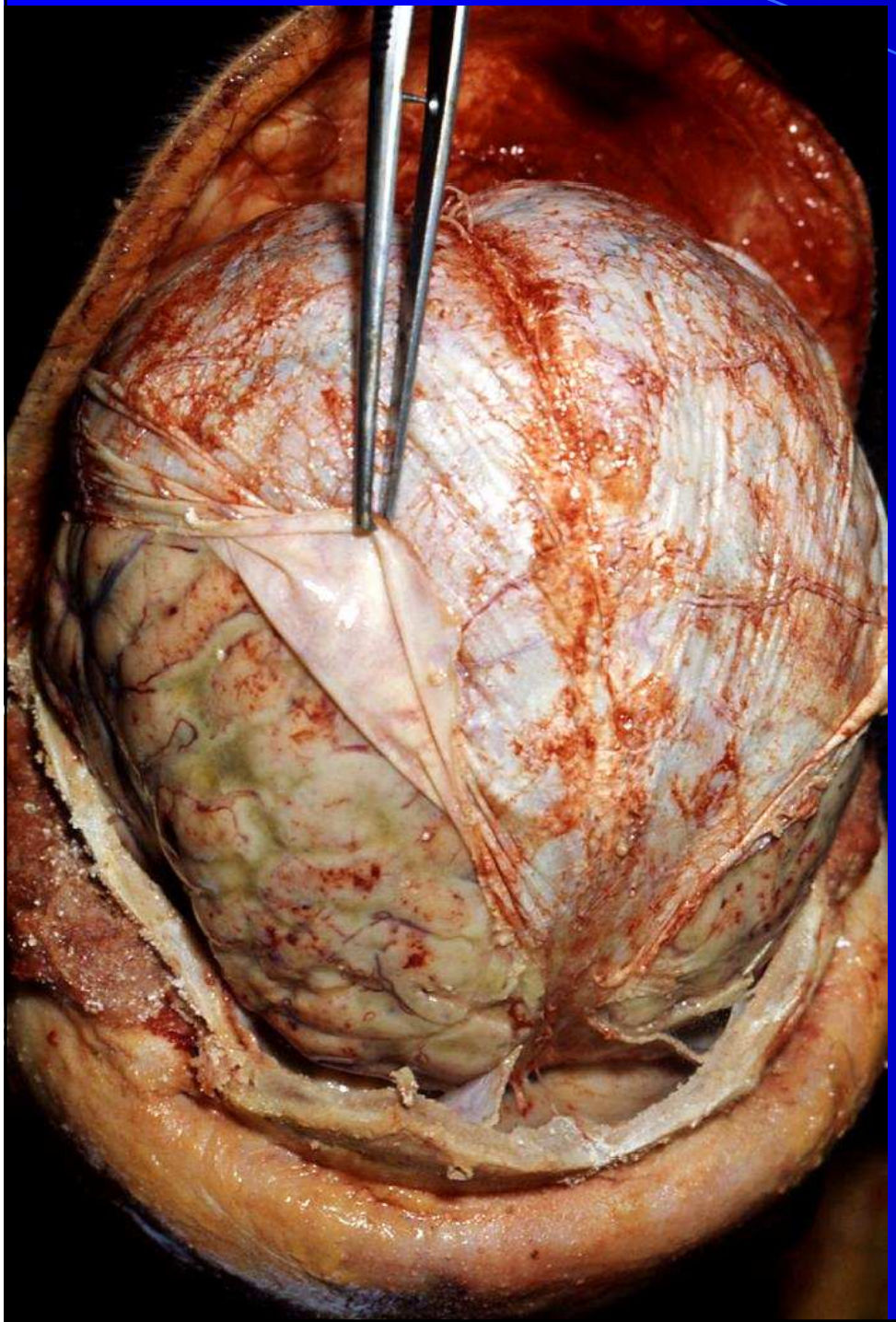
Růže (erysipel)

Růže komplikovaná flegmónou

http://www.megru.unizh.ch

http://homepage.univie.ac.at

Pneumokoková meningitida



http://www.meningitis.com.au

http://commons.wikimedia.org

Takhle tento zločinec vypadá

http://www.cbc.ca/gfx/pix/streptococcus_pneumonia050217.jpg

www.students.stedwards.edu

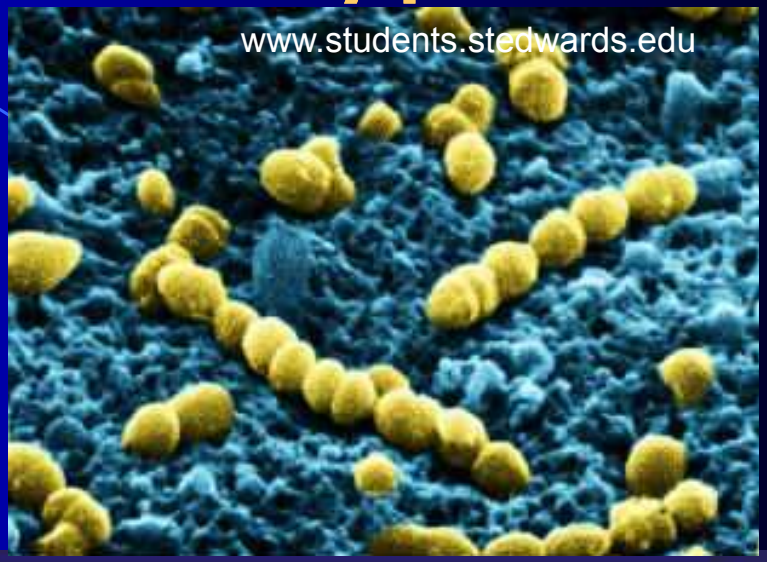
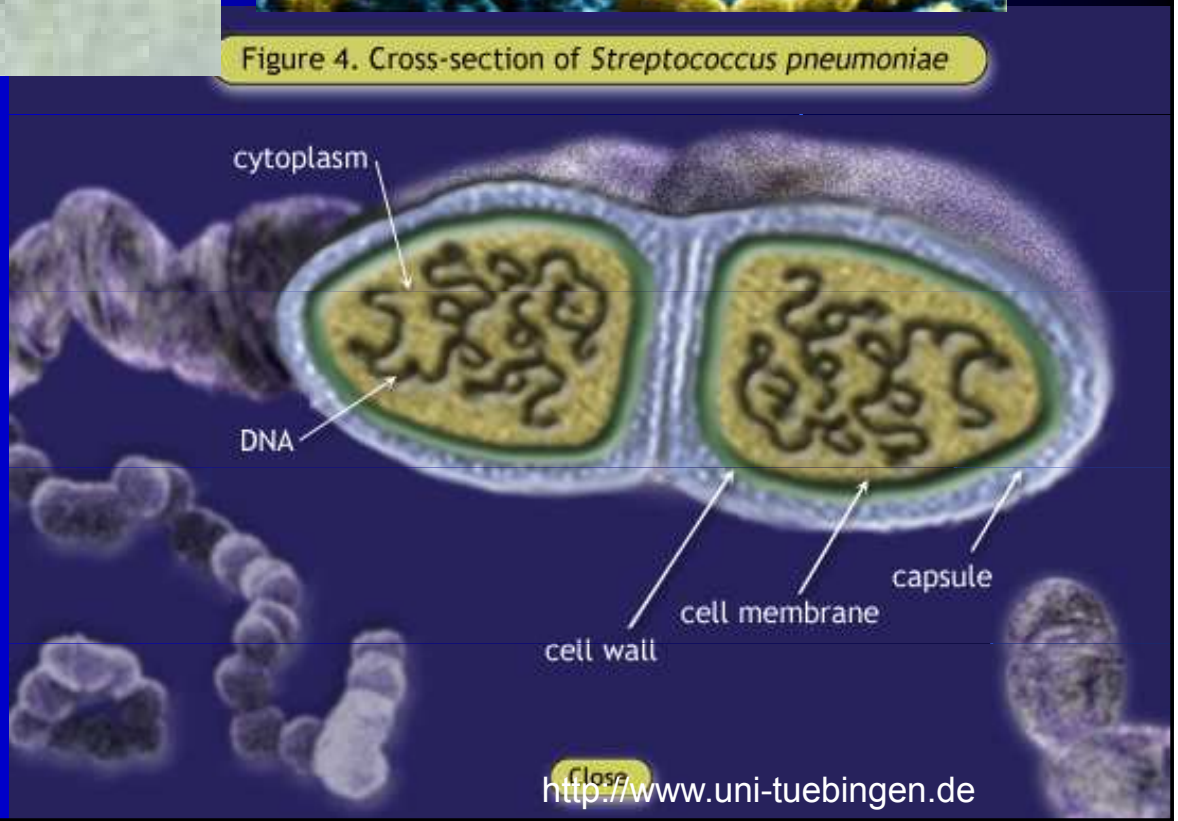


Figure 4. Cross-section of *Streptococcus pneumoniae*

http://www.uni-tuebingen.de



http://www.uni-tuebingen.de

Udělejme si v nich pořádek

Příběh	Na KA	Jméno pachatele
4.	viri-dace (alfa)	*Streptococcus pneumoniae*
5.		skupina „ústních streptokoků“
1.	(beta) hemo-lýza*	*Streptococcus pyogenes*
2.		*Streptococcus agalactiae*
3.		Skupina „non-A-non-B“ streptokoků
-	žádná	Streptokoky bez hemolýzy („gamáči“)

**u S. agalactiae jen částečná hemolýza*

3. Enterokoky

http://www.morgenwelt.de/typo3temp/5ce14d39b5.jpg

Klinická charakteristika

- Vyskytují se ve střevě člověka a jiných obratlovců
- Většina z nich je ve střevě součástí normální mikroflóry a **patogenem mimo střevo,** nejčastěji v močových cestách, ale i v ranách a v krevním řečišti (jako původci sepsí)
- Není známo, že by byly **patogenní i ve střevě**

http://microbiology.mtsinai.on.ca

Enterokoky

Mikroskopie

Žluč-eskulin

Slanetz-Bartley

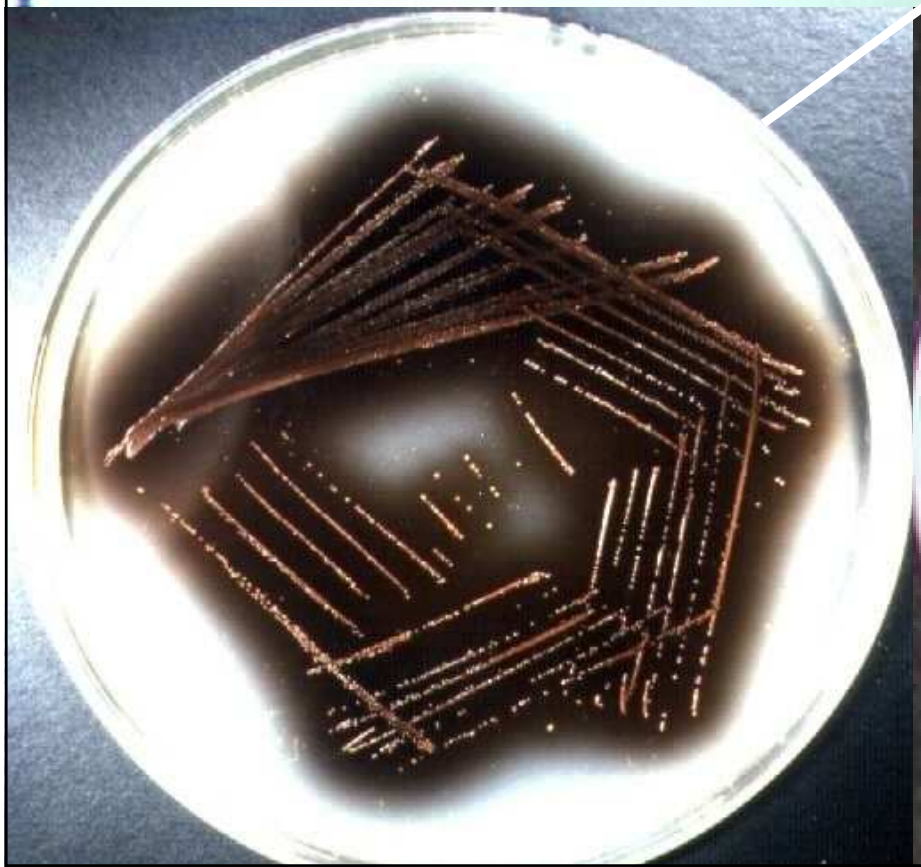


Foto: www.medmicro.info oba levé obrázky fotografoval Prof. MVDr. Boris Skalka, DrSc.

4. Tyčinky

- *Listeria monocytogenes*

Základní charakteristika

- Grampozitivní tyčinky nejsou tak častými původci nemocí jako grampozitivní koky či gramnegativní tyčinky. Přesto jsou mezi nimi **některé výrazné patogeny**
- Jsou záludné tím, že **se na ně často nemyslí**, což komplikuje diagnostiku
- Více je uvedeno u jednotlivých rodů a druhů

http://www.leighday.co.uk

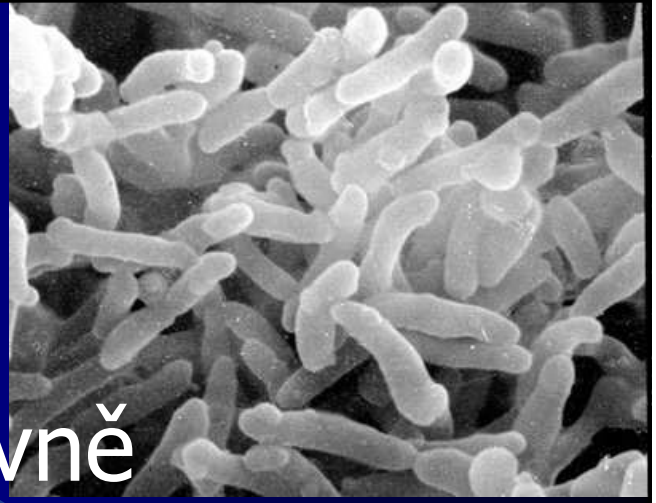
Listeria

- Bakterie *Listeria monocytogenes* je grampozitivní tyčinka, která se vyznačuje schopností růst při nízkých teplotách a vysokých koncentracích NaCl, což je oboje splněno např. ve skladech sýrů
- Málokdy vyvolává viditelné infekce dospělých, snad s výjimkou uzlinového syndromu. Je však nebezpečná pro těhotné
- Někdy se stává záminkou pro omezení dovozu – je samozřejmě vždy otázkou pohledu, zda je omezení skutečně motivováno strachem o zdraví občanů, nebo snahou obejít ustanovení o volném trhu

Classification des aliments selon le risque lié à *Listeria monocytogenes*

http://microbewiki.kenyon.edu

Corynebaterium



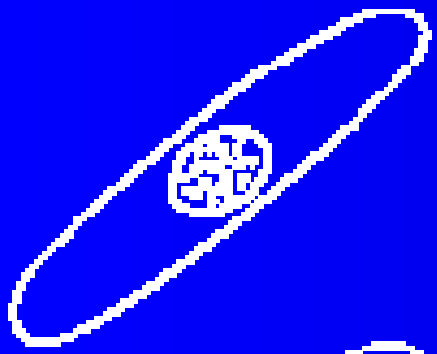
- *Corynebacterium jejkeium*, relativně nejobávanější ze skupiny tzv. nedifterických (= nezáškrtových) korynebakterií. Původně se mu říkalo „korynebakterium skupiny JK".
- Korynebakteria jsou grampozitivní tyčinky kyjovitého tvaru (koryné = kyj), některá jsou pleomorfní (různotvará), popřípadě i nekonstantně probarvená.
- Do stejného rodu patří i původce záškrtu, dnes diky očkování u nás vzácný – *C. diphtheriae*.

Co ještě vědět o korynebakteriích

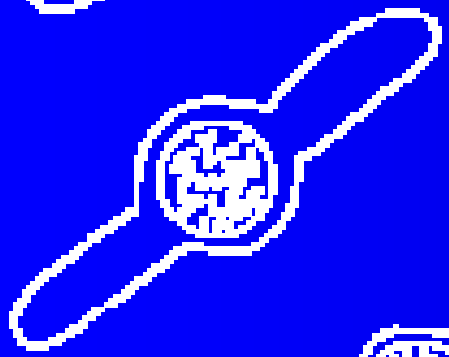
- Jsou normální součástí běžné flóry na kůži, spolu se stafylokoky a kvasinkami
- V mikroskopii se vyznačují palisádovým uspořádáním – název dle raně středověkého kůlového opevnění

Bacily, které stojí za zmínku

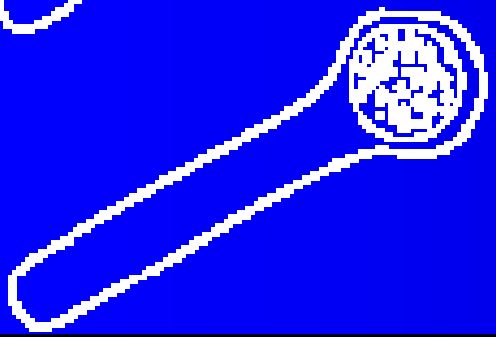
- *Bacillus anthracis* se stal velice populárním při teroristických hrozbách poslední doby. Jinak coby původce veterinárního onemocnění – uhláku – byl jednou z prvních nákaz, proti nimž byla zkoušena (již Pasteurem) vakcinace.
- *Bacillus cereus* je původcem alimentárních intoxikací z obilných produktů.
- *Bacillus stearothemophillus* a *Bacillus subtilis* se vzhledem ke své schopnosti přežívat při velmi vysokých teplotách používají jako indikátory účinnosti sterilizátorů



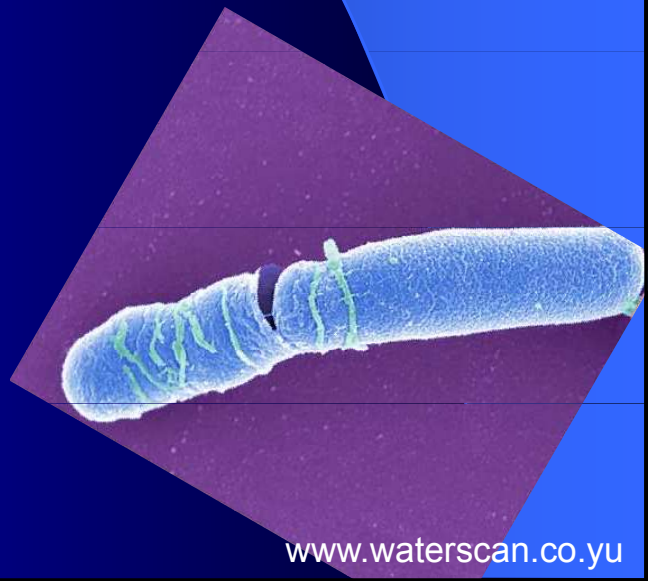
ex : *B. Subtilis*
B. Cereus
B. Thuringiensis
B. Anthracis



ex : *B. Polyxyma* (fixe le N_2)



ex : *B. Pasteurii* (dégrade l'Urée)



Popis pachatelů

		Listerie	Koryneb.	Bacillus
Mikroskopie		G+ tyčinky řetězící se jako špekáčky	G+ tyčinky skládající se vedle sebe (palisády)	G+ robustní tyčinky, sporulující (nemusí být viditelné)
Kultivace		podobné entero-kokům, hemolýza je či není	velmi drobné kolonie podobné mouce	plsťovité kolonie, někdy i výrazná hemolýza

http://pharmacie.univ-lille2.fr

Anaeroby

- Nesporulující anaeroby
- Klostridia

Prevotella melaninogenica, typická tvorba černého pigmentu

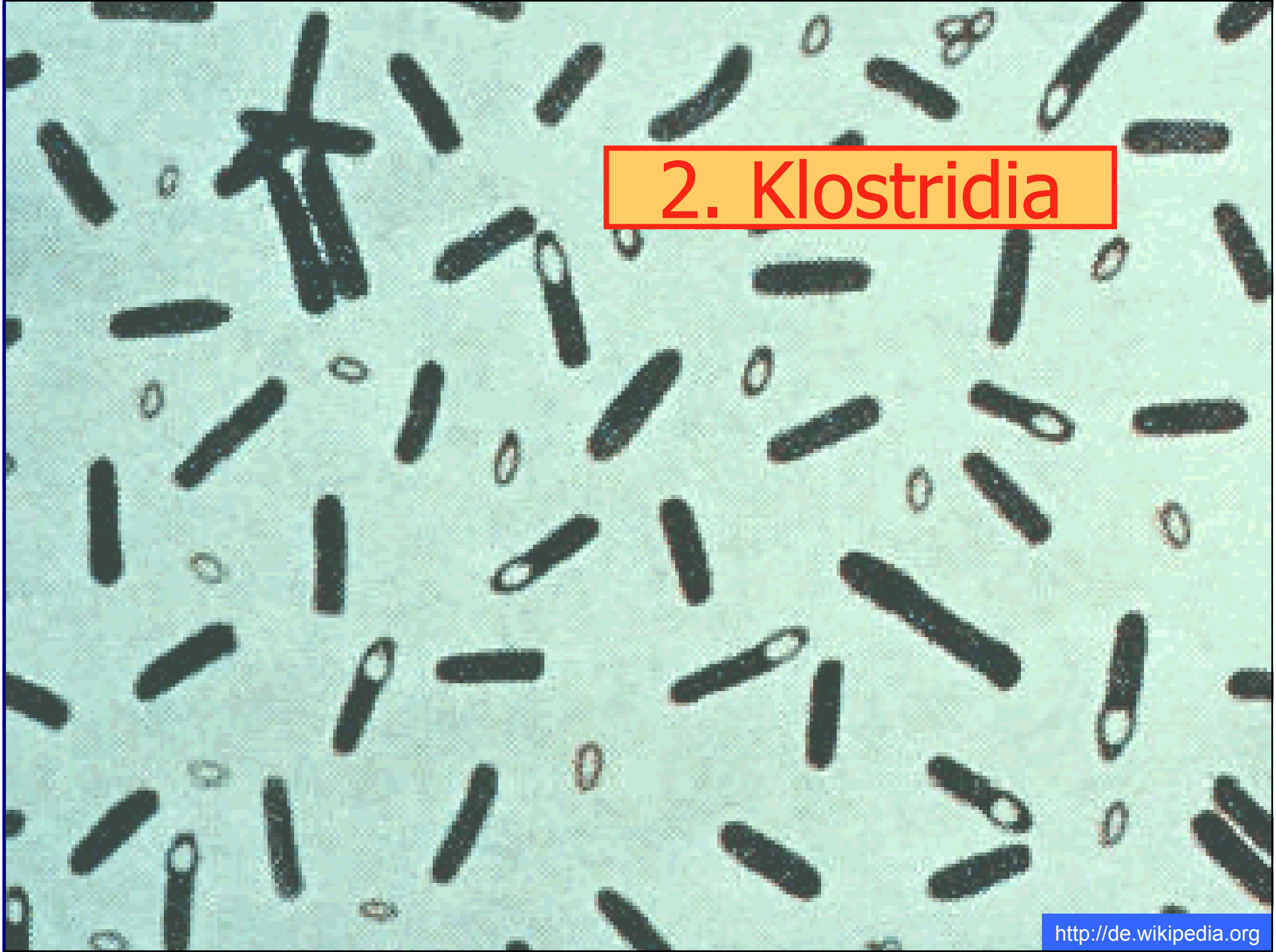
http://pharmacie.univ-lille2.fr

1. Společné charakteristiky nesporulujících anaerobů

- Vyskytují se jako běžná flóra:
  - v tlustém střevě tvoří 99,9 % celkového objemu mikrobů, je jich tam kolem jednoho kilogramu
  - v ústech mohou žít díky biofilmu – jsou do něj zavzaty tak, aby neměly přímý přístup ke vzduchu, které by je ohrožoval
  - v pochvě nejsou přítomny u všech žen, ale uvádí se, že asi 70 % žen nějaké anaeroby v pochvě má; pokud se zde ovšem přemnoží, jde o dysmikrobii, kterou je nutno léčit
- Při zánětu obvykle neexistuje jeden původce, ale uplatňuje se směs. Někdy se používá termín „Veillonova flóra“

Gingivostomatitis: *Prevotella gingivalis*

www.mamagums.com


2. Klostridia
http://de.wikipedia.org

Úvod: Mikulecké pole trochu jinak

Mikulecké pole
hluboko zorané
Nejedno *Clostridium tetani*
v tom poli je schované
V poli je schované
zalezlé ve spoře
Čeká až syneček nějaký
to pole zas pooře…

(Zpívá se jako normální Mikulecké pole od Fanoša Mikuleckého)

S takým klostridiem
Nedobře kočkovat
Nechaj sa, synečku zavčasu
pořádně přeočkovat…

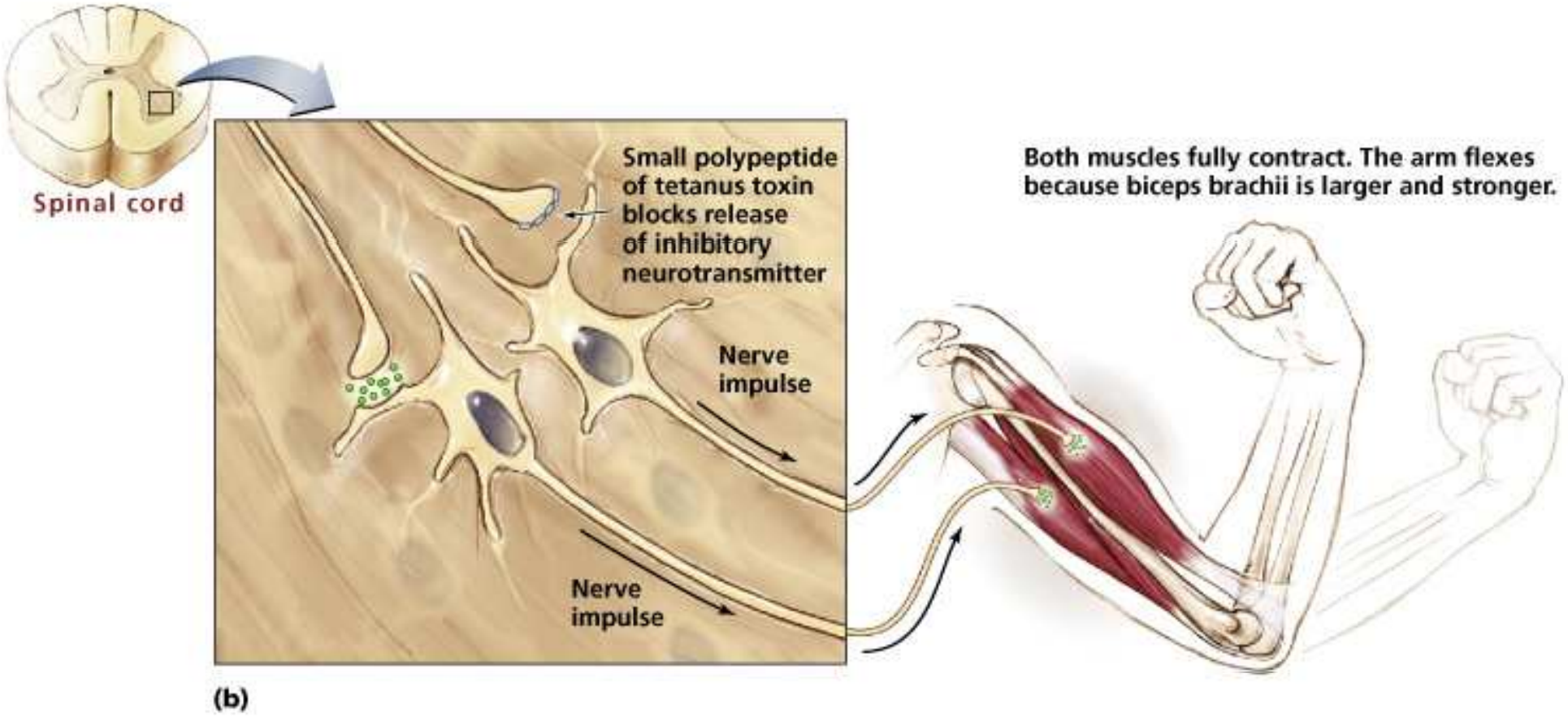
Klostridia – přehled

C. tetani	Původce tetanu
C. botulinum	Producent botulotoxinu
Clostridium perfringens, C. septicum, C. welchii a aj.	Klostridia plynatých snětí (+ enteropatogenita)
C. difficile	Enteropatogenní

Je potřeba si uvědomit, že i klostridia se úplně normálně podílejí na běžné střevní mikroflóře. Problém nastává, pokud se přemnoží, dostanou tam, kam nemají, vyskytne se kmen produkující velké množství toxinu apod.

Tetanus

www2.bc.cc.ca.us



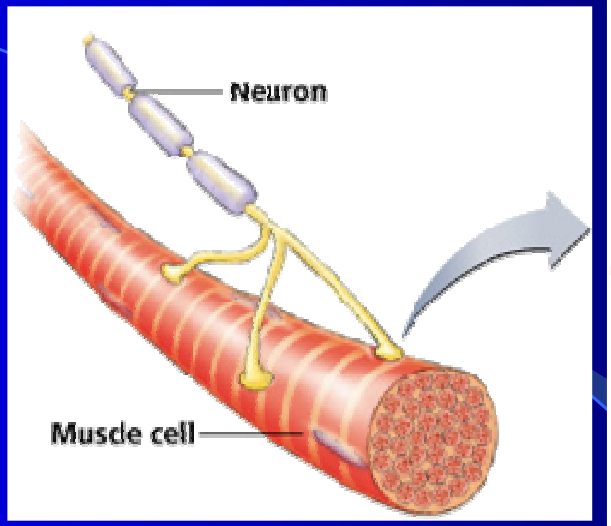
Copyright © 2006 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

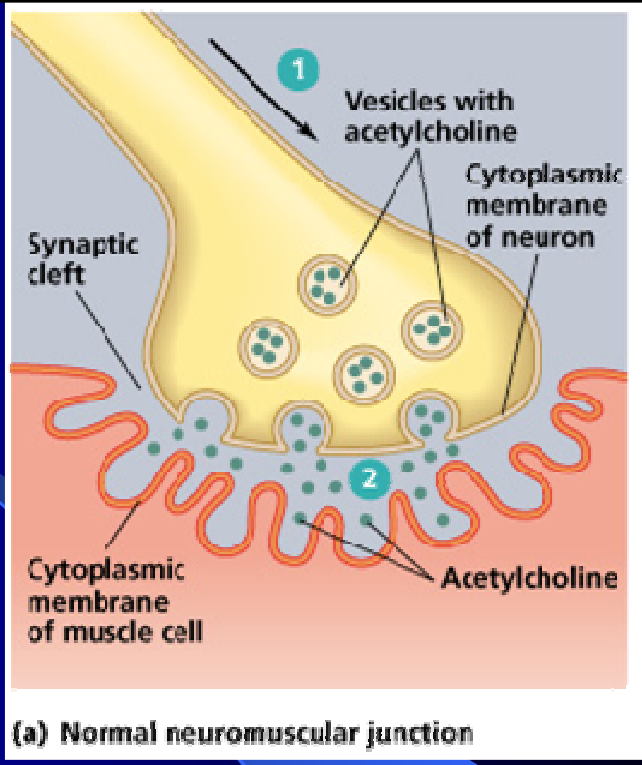
Tetanus

www2.bc.cc.ca.us

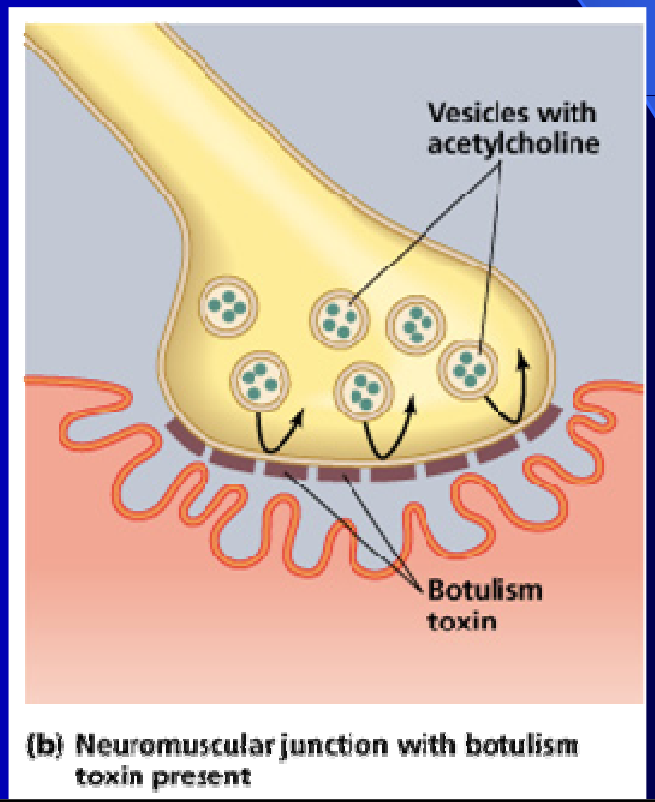
Trismus (křeč čelistních svalů)

Botulismus

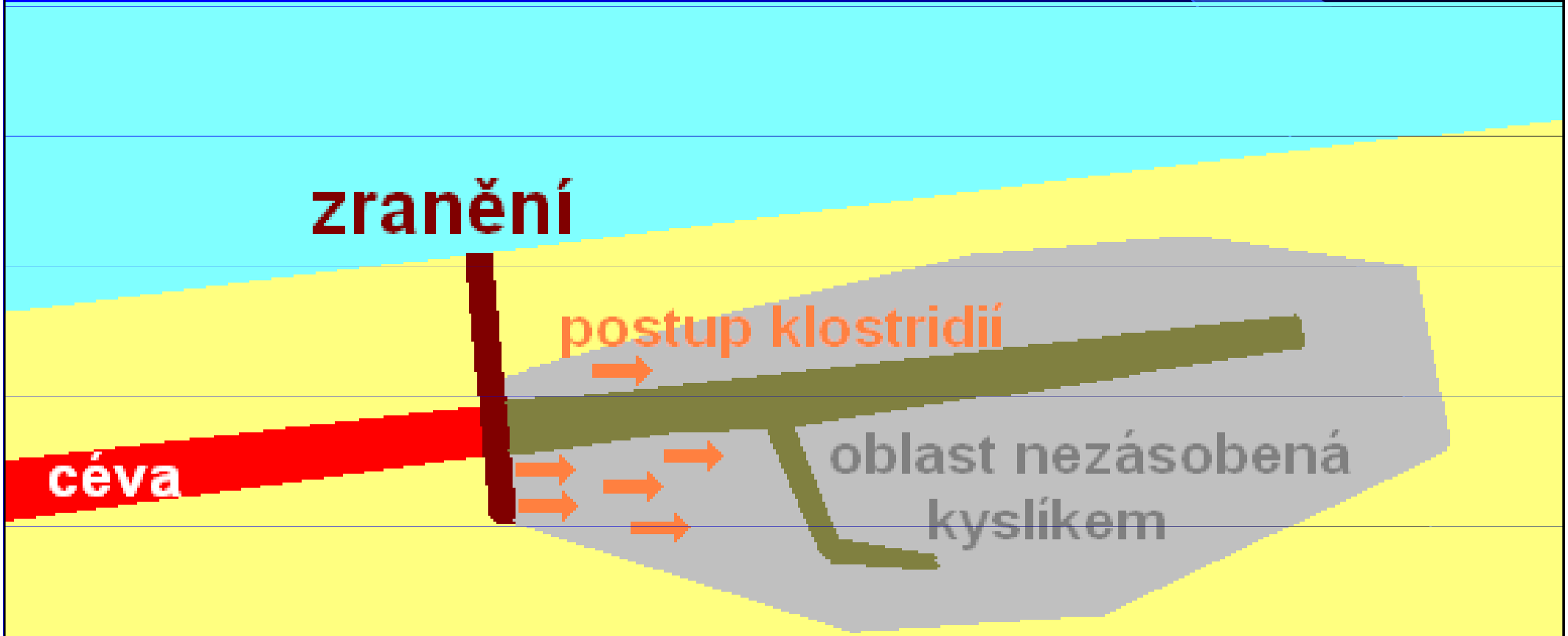




www2.bc.cc.ca.us

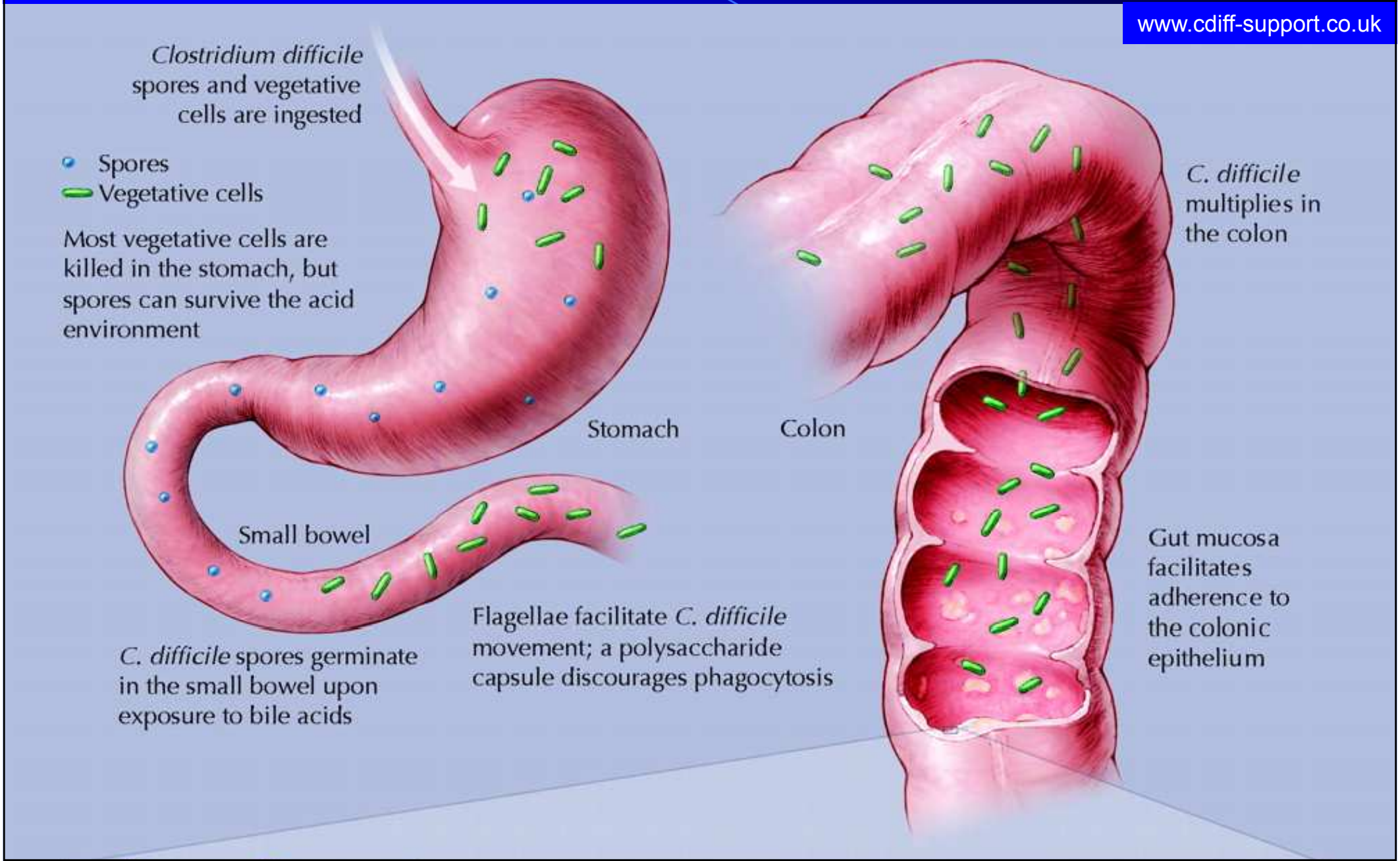


Vznik plynaté sněti



Clostridium difficile a jeho činnost I

www.cdiff-support.co.uk



Anaerostat
podrobnější popis

vzduchotěsné víčko

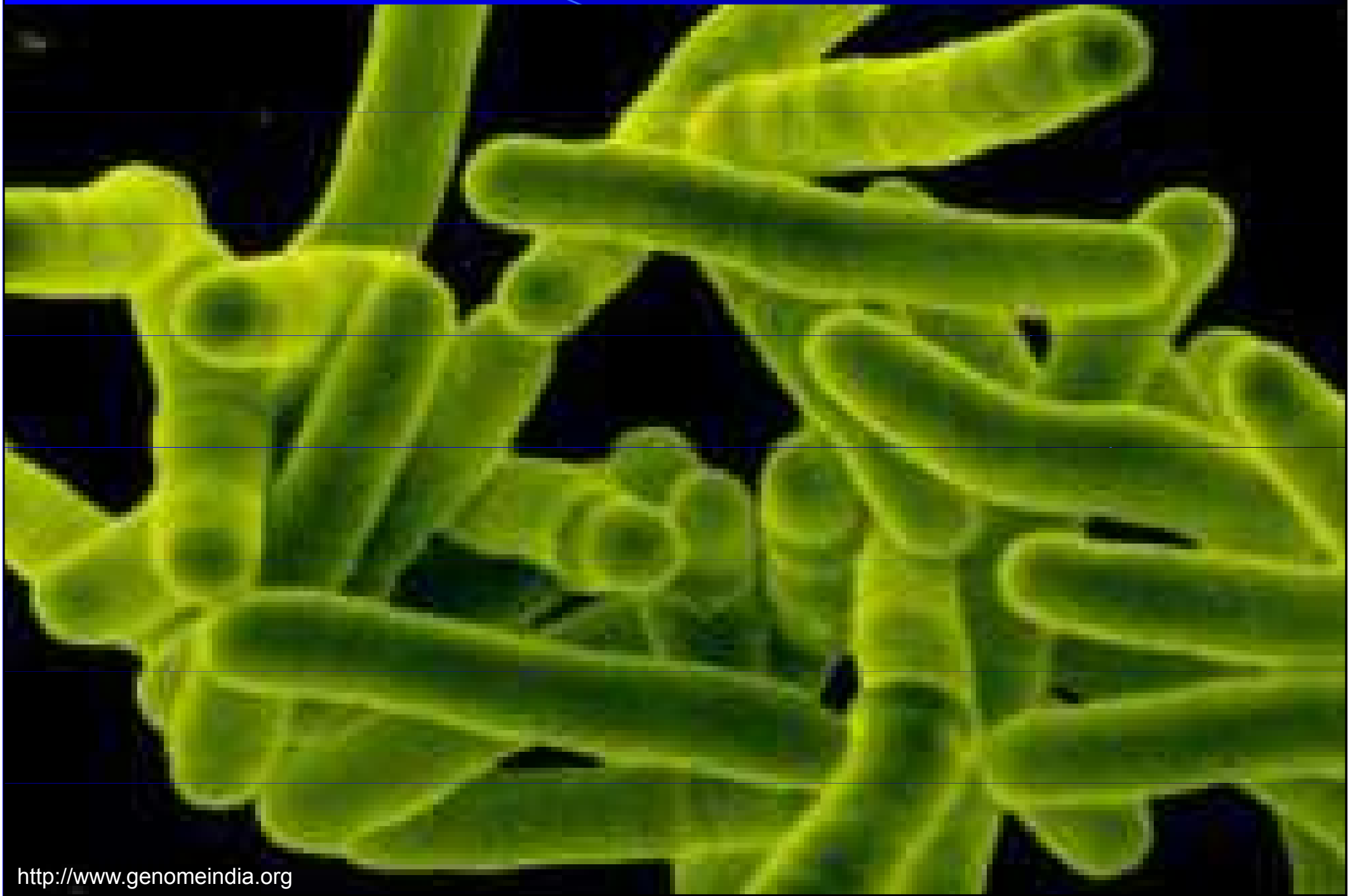
palladiový kalalyzátor
(pod víčkem)

konstrukce pro
ukládání Petriho misek

Generátor anaerobiózy
(sáček s chemikáliemi)

www.medmicro.info, photo O. Z.

3. Mykobakteria, aktinomycety, nokardie

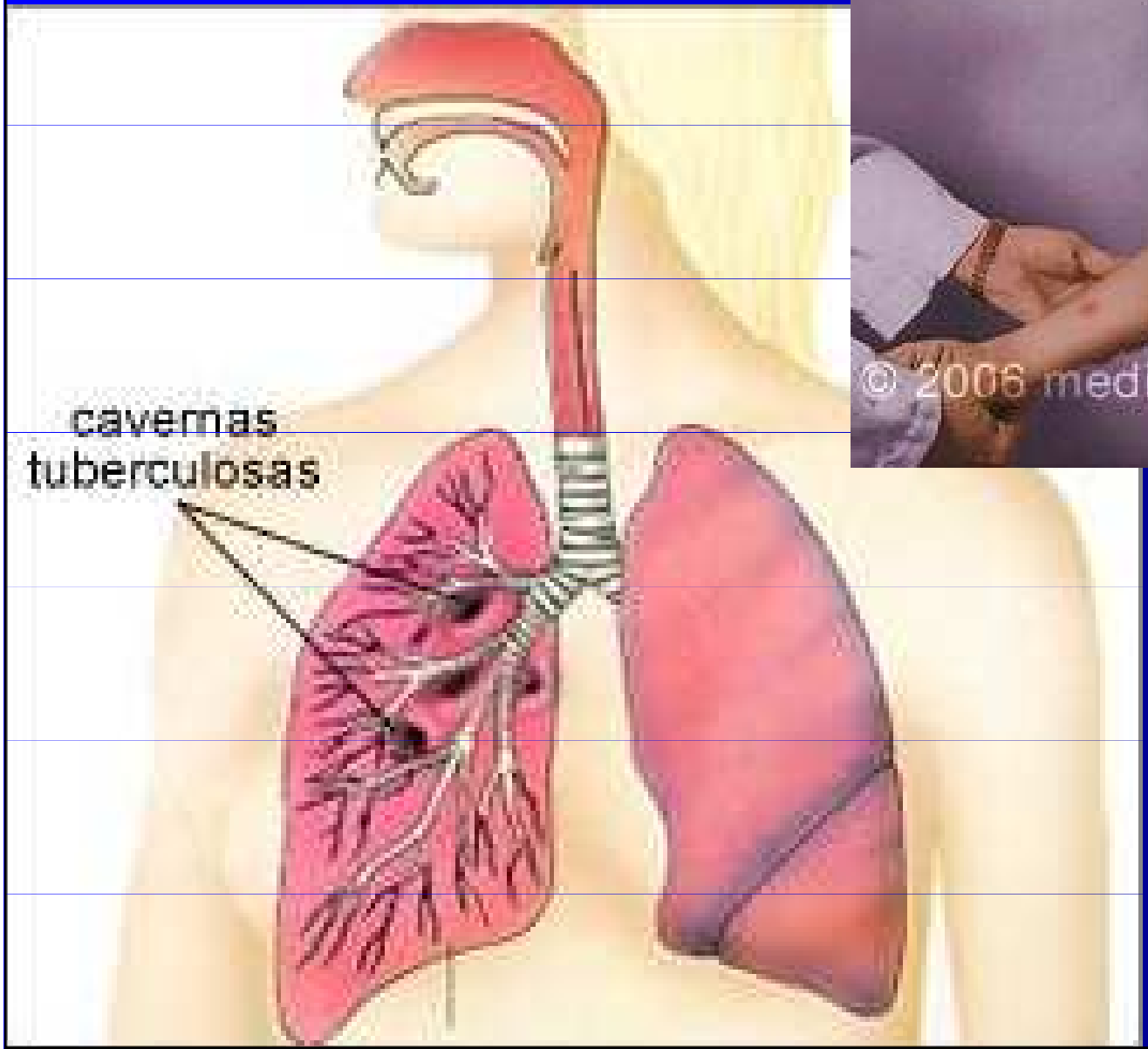


http://www.genomeindia.org

Kochův bacil

- *Mycobacterium tuberculosis*, i když TBC může způsobovat i například *Mycobacterium bovis*.
- Zajímavostí tohoto mikroba je záliba v životě uvnitř buněk. S tím také souvisí skutečnost, že na mykobakteria se špatně tvoří protilátková odpověď (takže se nedá prokazovat antigen ani protilátky) a že hlavní slovo má buněčná imunita – i při vakcinaci.
- Jelikož při HIV infekci je právě buněčná imunita postižena, je TBC jednou z oportunních infekcí.

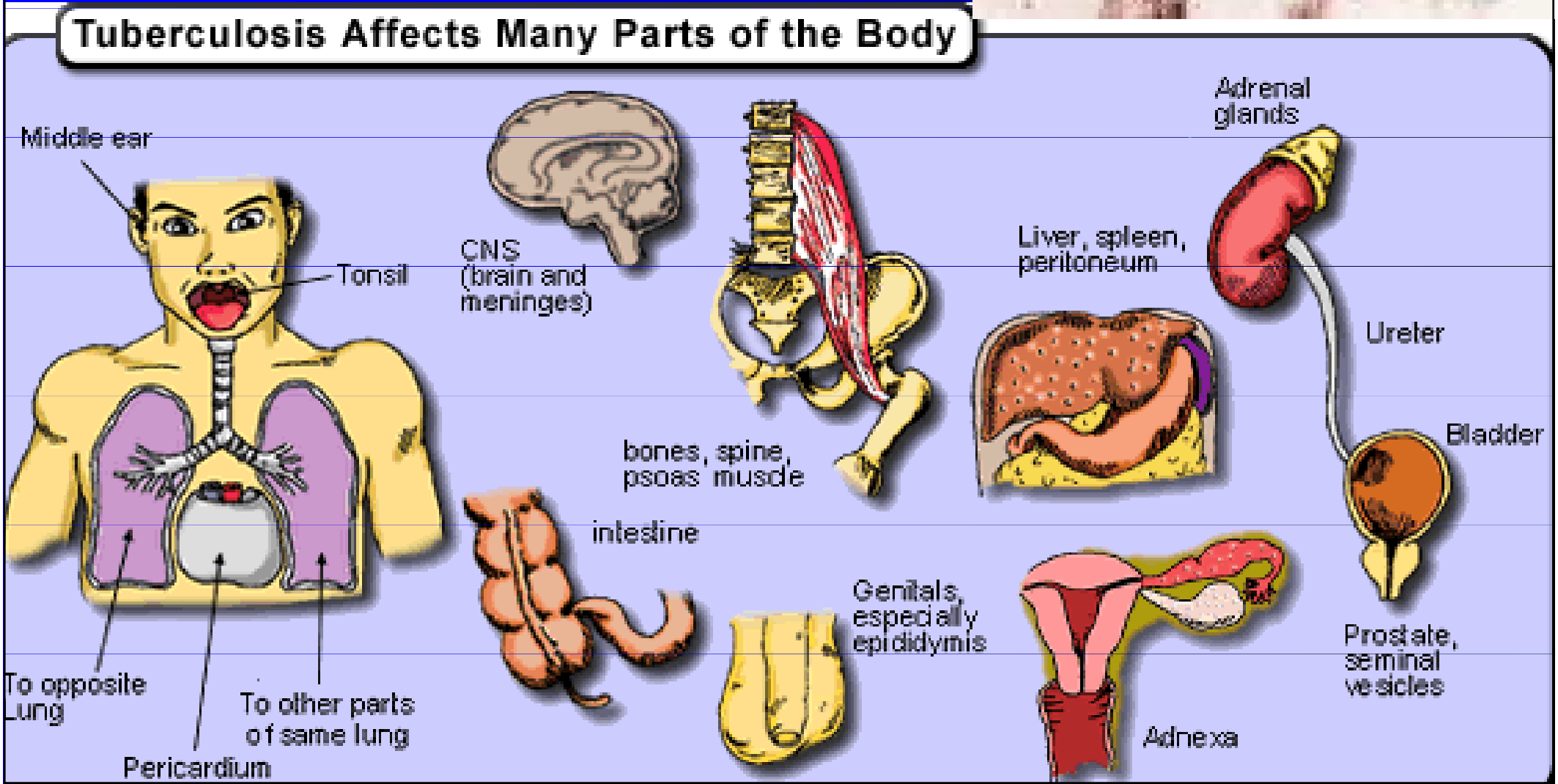
Tuberkulóza



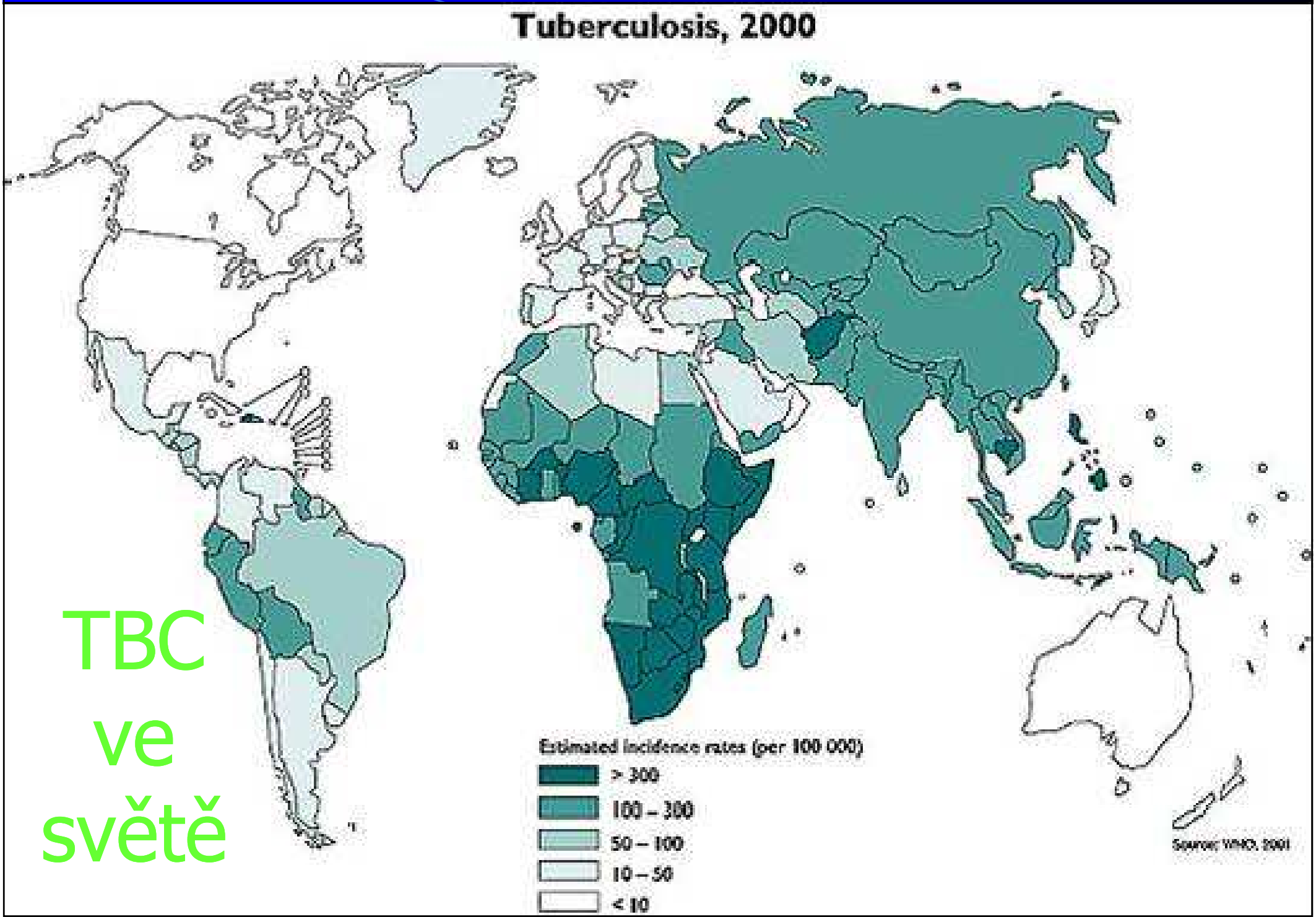
http://www.stockmedicalart.com

Není jen plicní forma TBC

sitemaker.umich.edu (2×)



TBC ve světě


Tuberculosis, 2000
Estimated incidence rates (per 100 000)
> 300
100 – 300
50 – 100
10 – 50
< 10
Source: WHO, 2001

Zmínky o TBC ve známých písních...

...tuberkulóza, no to je paráda...

(Jaromír Nohavica: Pochod marodů)

Známí lidé, kteří zemřeli na TBC

u zkoušky nezapomeňte na Jiřího Wolkera (zejména jste-li z okolí Prostějova)

Lepra

- *Mycobacterium leprae* je mikrob ještě zvláštnější než tuberkulózní mykobakterium
- Jeho generační doba je ještě výrazně delší. In vitro kultivace se podařila teprve nedávno a trvala celý jeden rok
- Základní léčba lepry není drahá, bohužel v zemích, kde se lepra vyskytuje, je i tato poměrně nízká cena příliš vysoká
- Proto se problémem lepry zabývá řada nadací, nevládních a charitativních organizací a podobně.

Lepra

www2.bc.cc.ca.us (2×)

Atypická mykobakteria

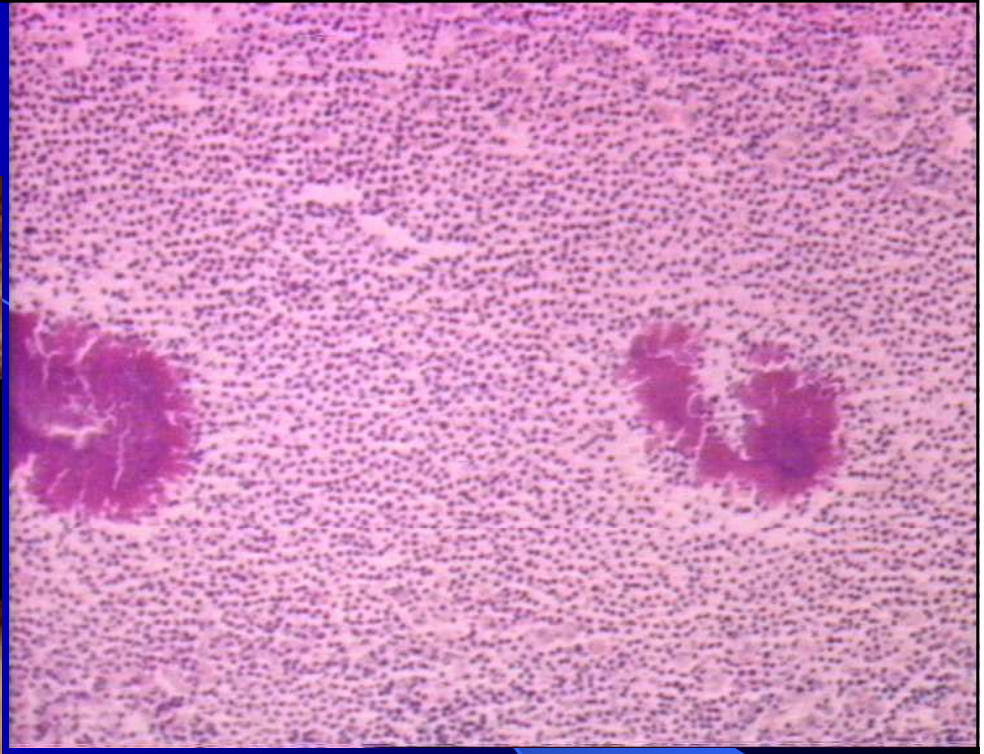
- Kromě *M. tuberculosis* a *M. leprae* existuje i spousta dalších mykobakterií. Některá, např. *Mycobacterium marinum*, patří mezi tzv. atypická mykobakteria, která občas způsobují infekce ran a jiné problémy.
- Některá jiná mykobakteria jsou nepatogenní a jsou normální součástí lidské mikroflóry, např. *M. smegmatis* – viz obrázek

http://www.hhmi.org

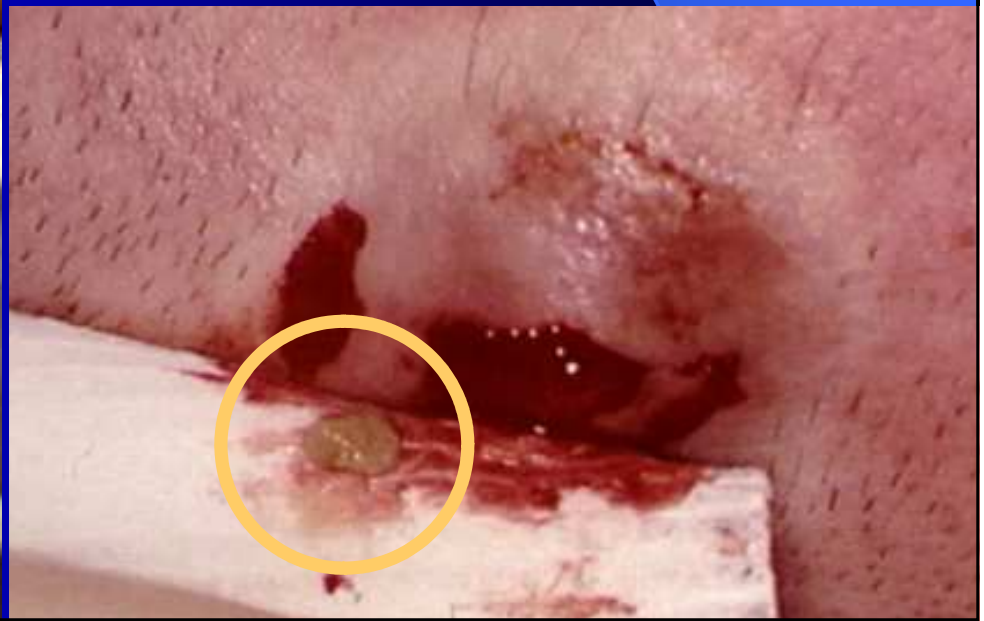
Aktinomycety a nokardie

- Aktinomycety jsou vláknité bakterie, v podstatě grampozitivní, ale barví se Gramem špatně, protože jejich buněčná stěna je hodně hydrofobní a obsahuje hodně mykolových kyselin
- Aktinomycety se běžně vyskytují v ústní dutině zdravých osob. Odtud se za různých okolností mohou dostat do měkkých tkání krku, tváře či hrudníku. Jsou to anaerobní bakterie
- Podobné aktinomycetám jsou nokardie, které jsou naopak striktně aerobní. Jinak však mají hodně podobné vlastnosti.

Aktinomykóza



pathmicro.med.sc.edu (3×)

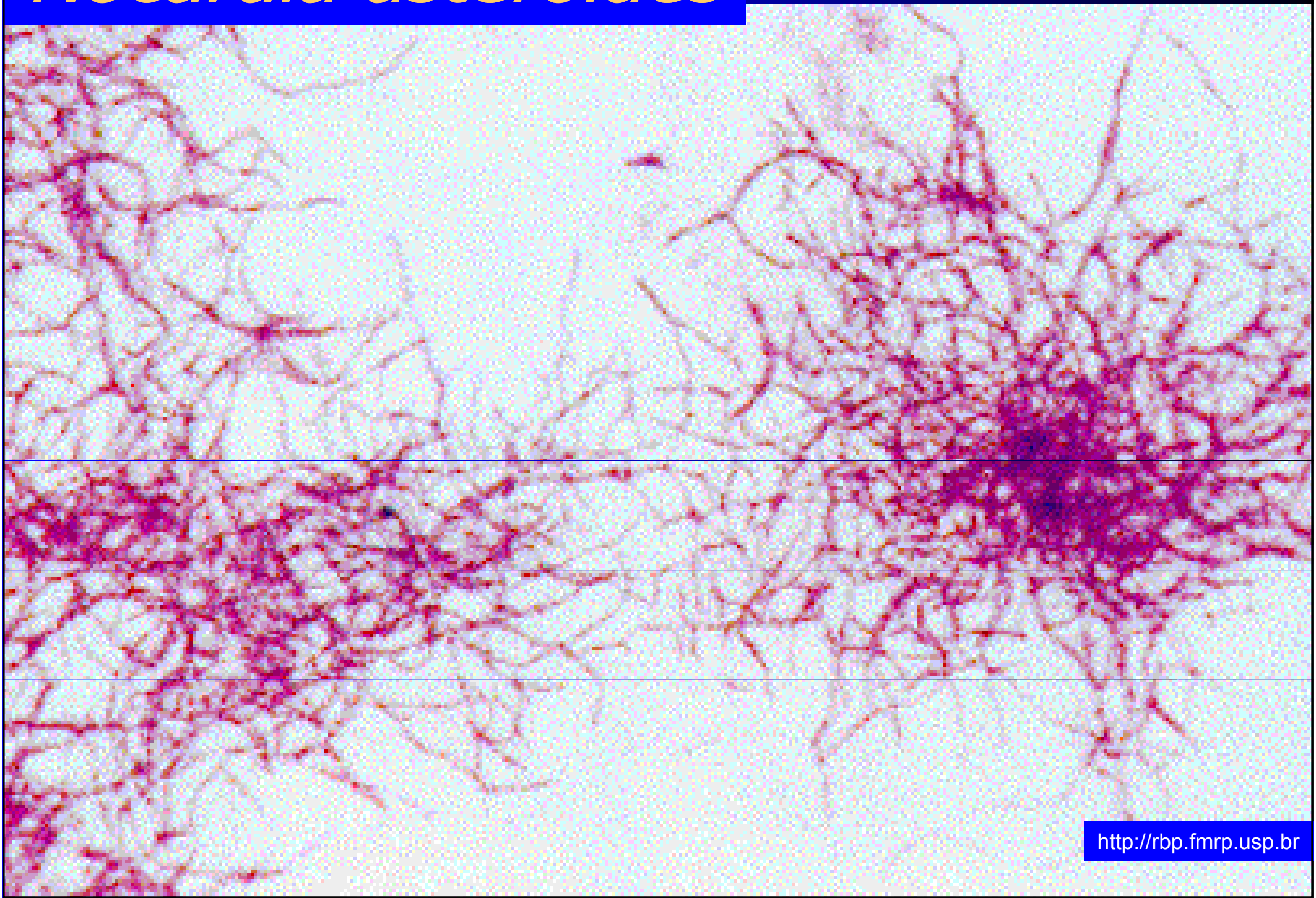


Nokardióza

pathmicro.med.sc.edu

http://www.asm.org

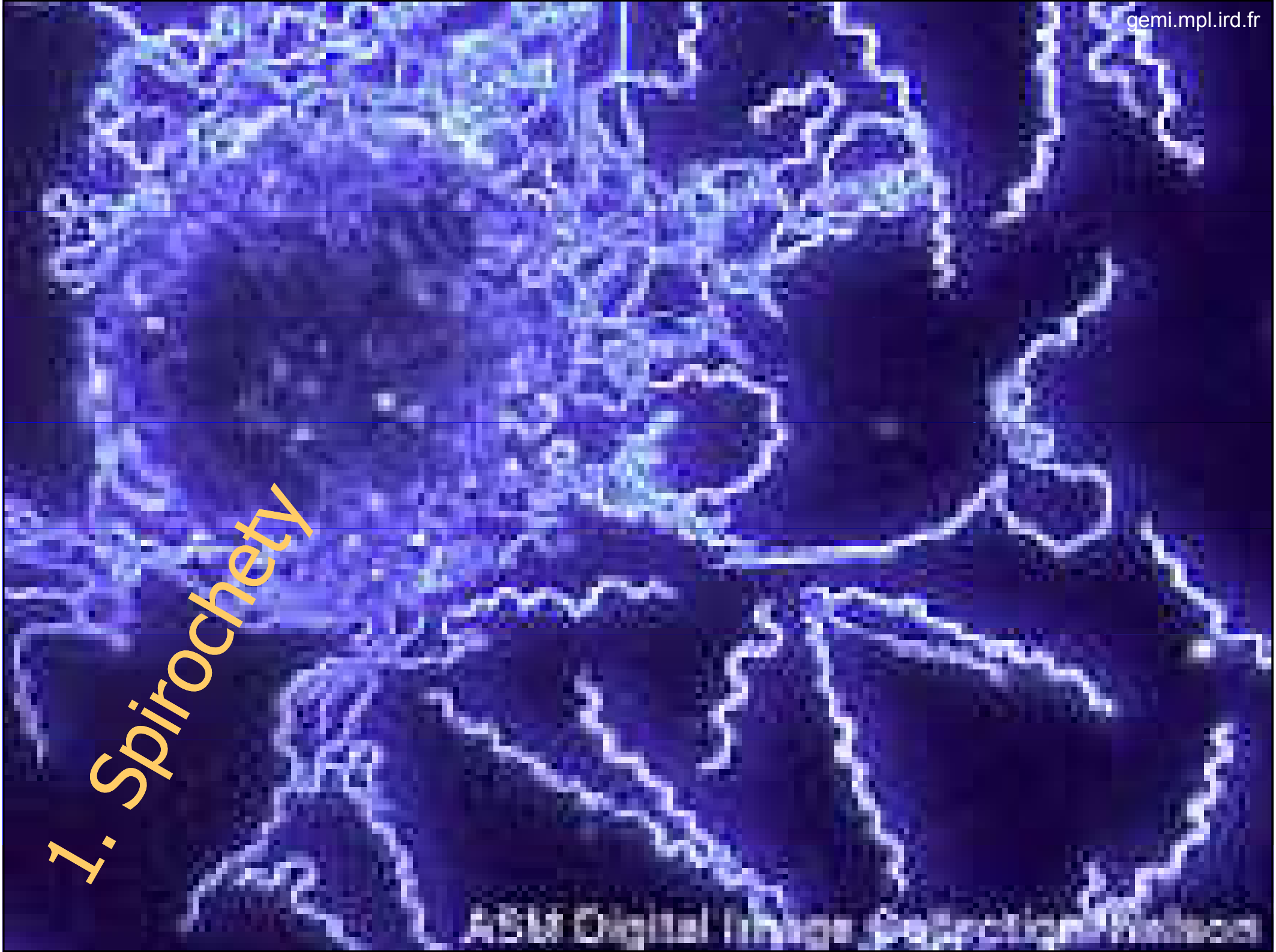
Nocardia asteroides



http://rbp.fmrp.usp.br

Spirochety a ostatní bakterie

- **Spirochety – spirální bakterie**
  - Rod *Treponema*
  - Rod *Borrelia*
  - Rod *Leptospira*
- **Mykoplasmata**
- **Rickettsie** a bakterie zpravidla řazené do jejich příbuzenstva
- **Chlamydie** (Chlamydia, Chlamydophilla)


gemi.mpl.ird.fr
1. Spirochety

Úvod: Z medické hymny „Diabetes mellitus, icterus et vomitus"

(Druhá sloka)

Treponema pallidum

Gonococcus ruber

Ulcus molle, ulcus durum

Molle est reparaturum

Nos curabit …

(doplní se jméno vhodného urologa či dermatovenerologa)

Původce syfilis

Starý název původce kapavky (*N. gonorrhoeae*)

Měkký vřed – choroba způsobovaná *Haemophilus ducreyi*

www.med.sc.edu

Tvrdý vřed – jeden z.typických příznaků syfilis

(Zpívá se jako Gaudeamus igitur, iuvenes dum sumus)

http://www.pasteur.fr

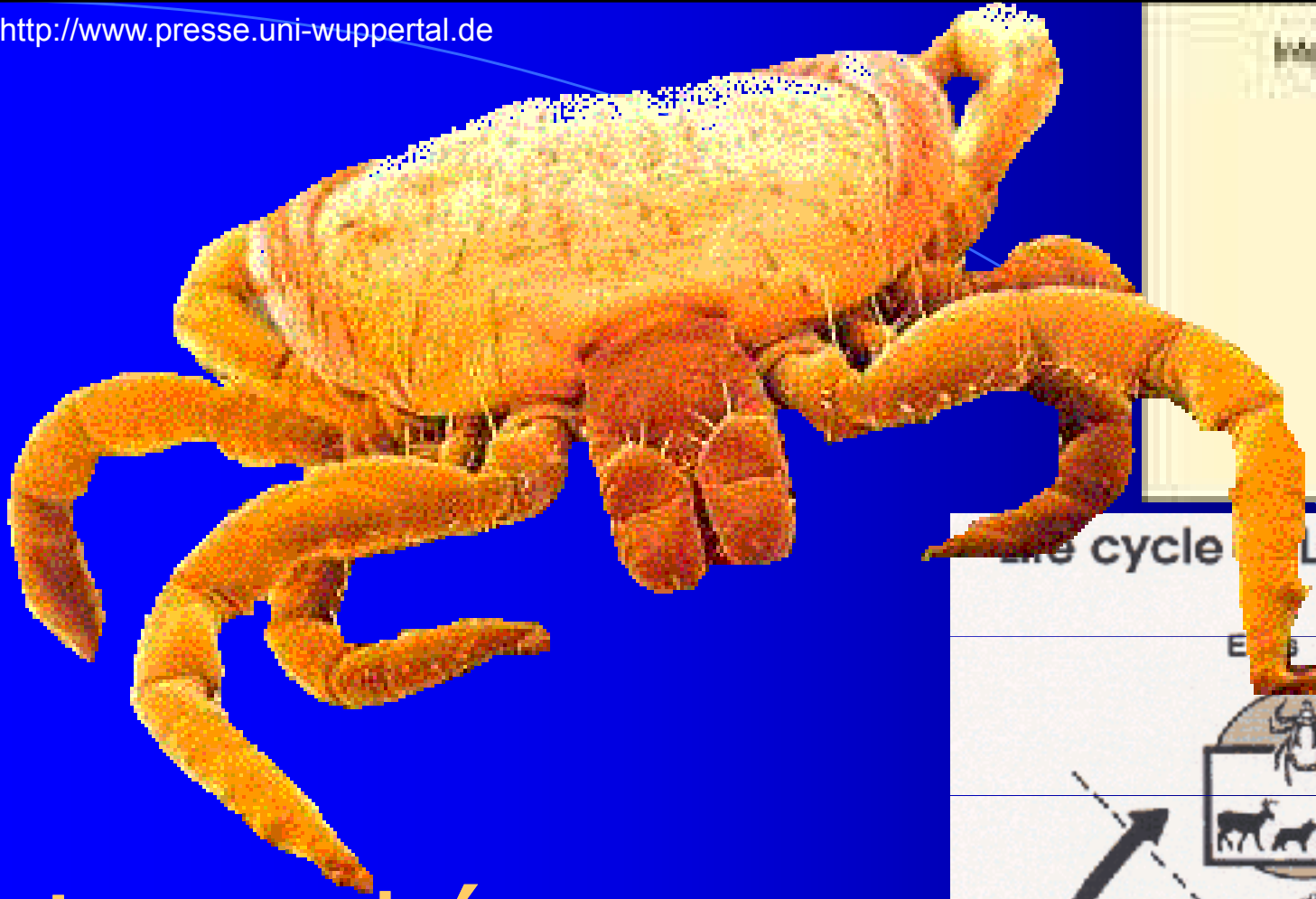
Lymeská borrelióza

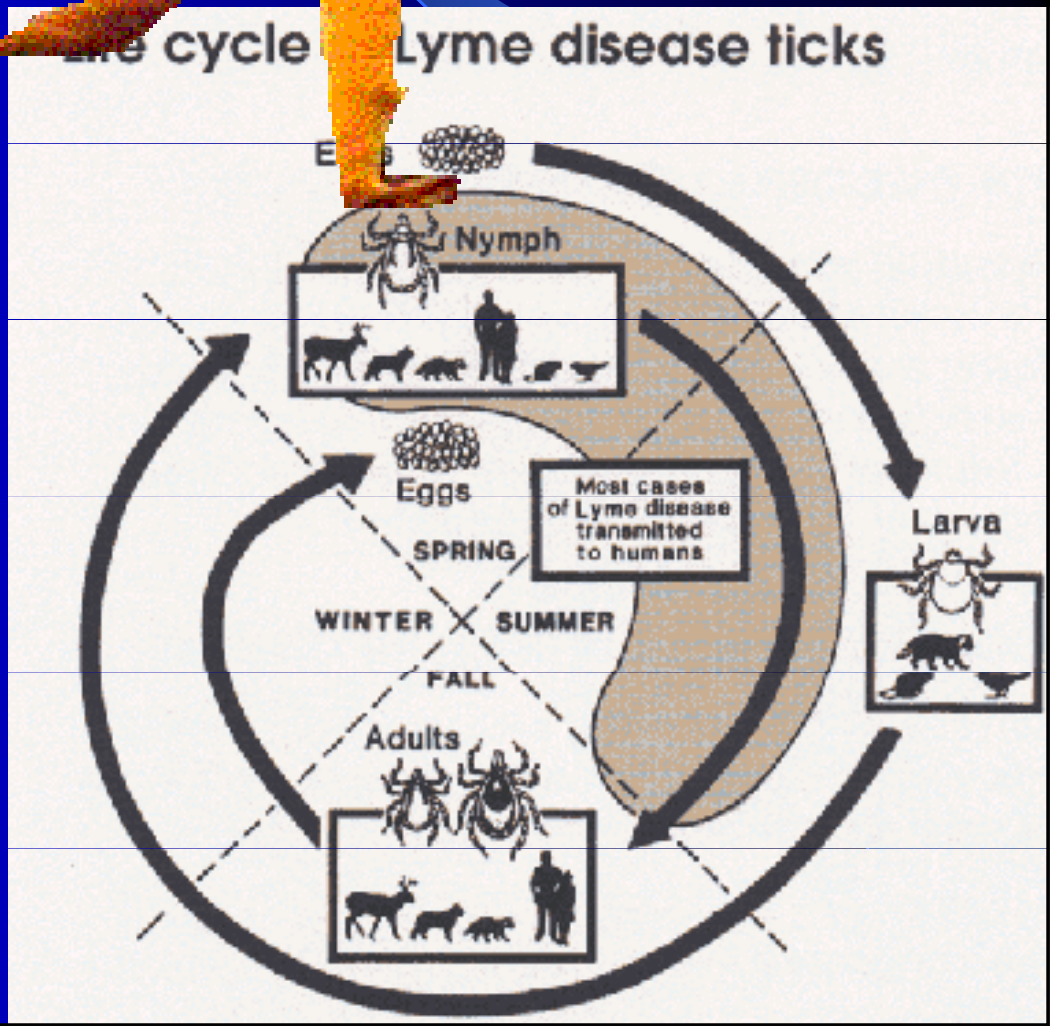
- *Borrelia afzelii*, jedna z borrelií, vyvolávajících Lymeskou nemoc a patřících do skupiny *Borrelia burgdorferi* sensu lato (= „v širším slova smyslu“)
- Tento druh „v širším slova smyslu“ se rozpadá na řadu „v užším slova smyslu“. Nejvýznamnější jsou *B. garinii, B. afzelii* a *B. burgdorferi* sensu stricto
- Zatímco v USA se vyskytuje zejména třetí z oněch borrelií a typické jsou kloubní příznaky, v Evropě jsou častější první dvě borrelie a typická je neuroborrelióza
- Kromě lymeské nemoci vyvolávají borrelie (jiné druhy) návratnou horečku (*B. duttoni, B. recurrentis*)

www.med.sc.edu

www.borrelia.de

http://www.presse.uni-wuppertal.de

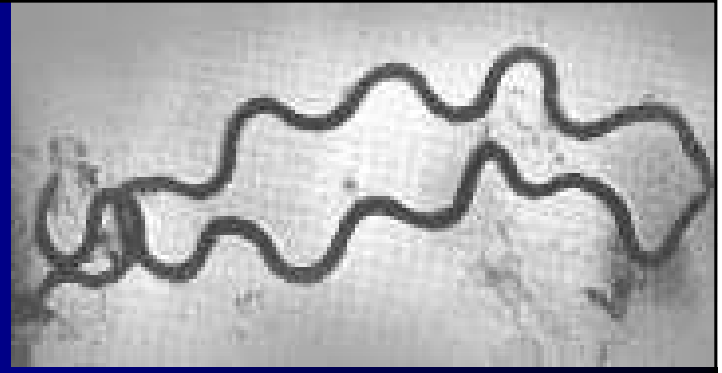




Lymeská nemoc – zoonóza, přenášená klíšťaty

www.med.sc.edu

Původce syfilis

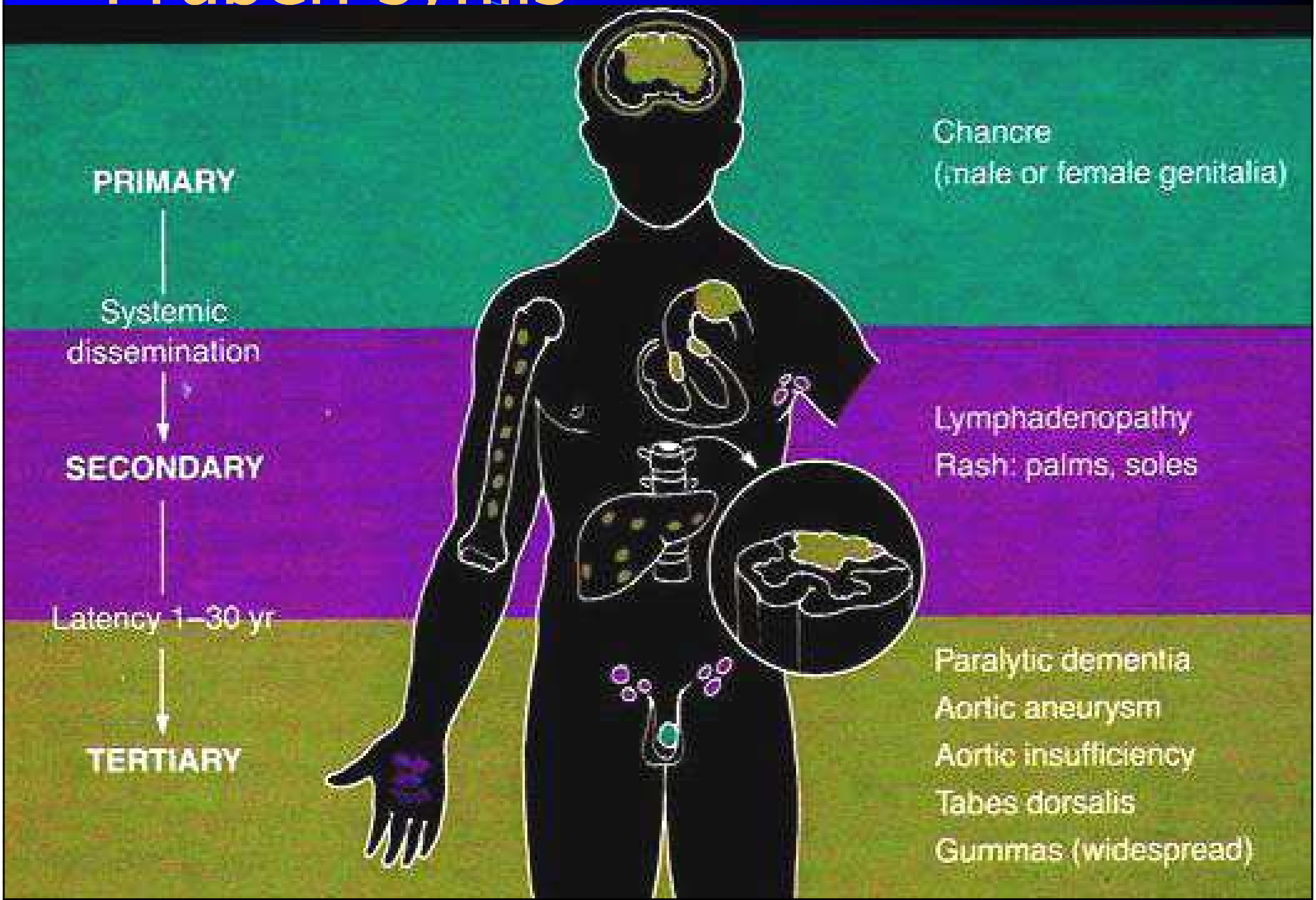


www.primer.ru

- *Treponema pallidum*, původce syfilis
- Syfilis je klasická pohlavní nemoc. Přenáší se výhradně sexuálně. Jde ovšem o systémové onemocnění – v pokročilých stádiích postihuje celé tělo postiženého člověka (postižení různých orgánů, psychické příznaky)
- Některé poddruhy *T. pallidum* a některá jiná treponemata způsobují jiné choroby (framboesie – yaws, *T. pertenue*)
- Některá treponemata jsou i nepatogenní

Průběh syfilis

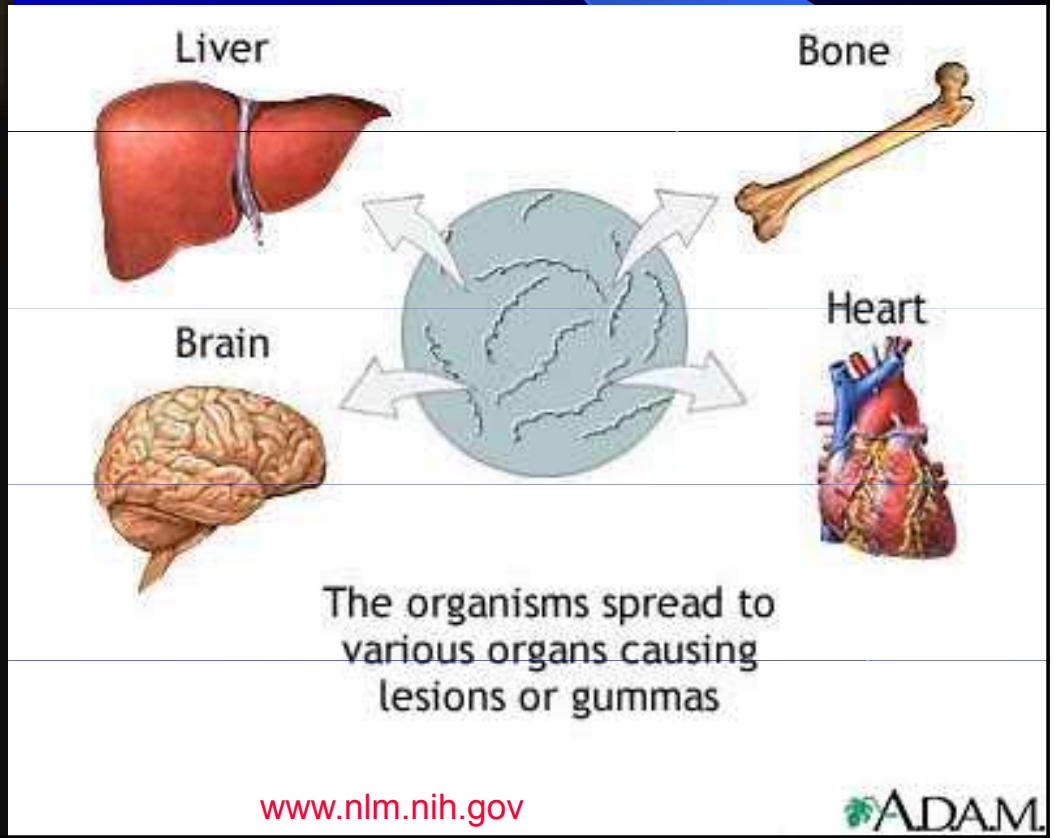
www.geocities.com



Terciární syfilis

www.common-place.org

www.geocities.com

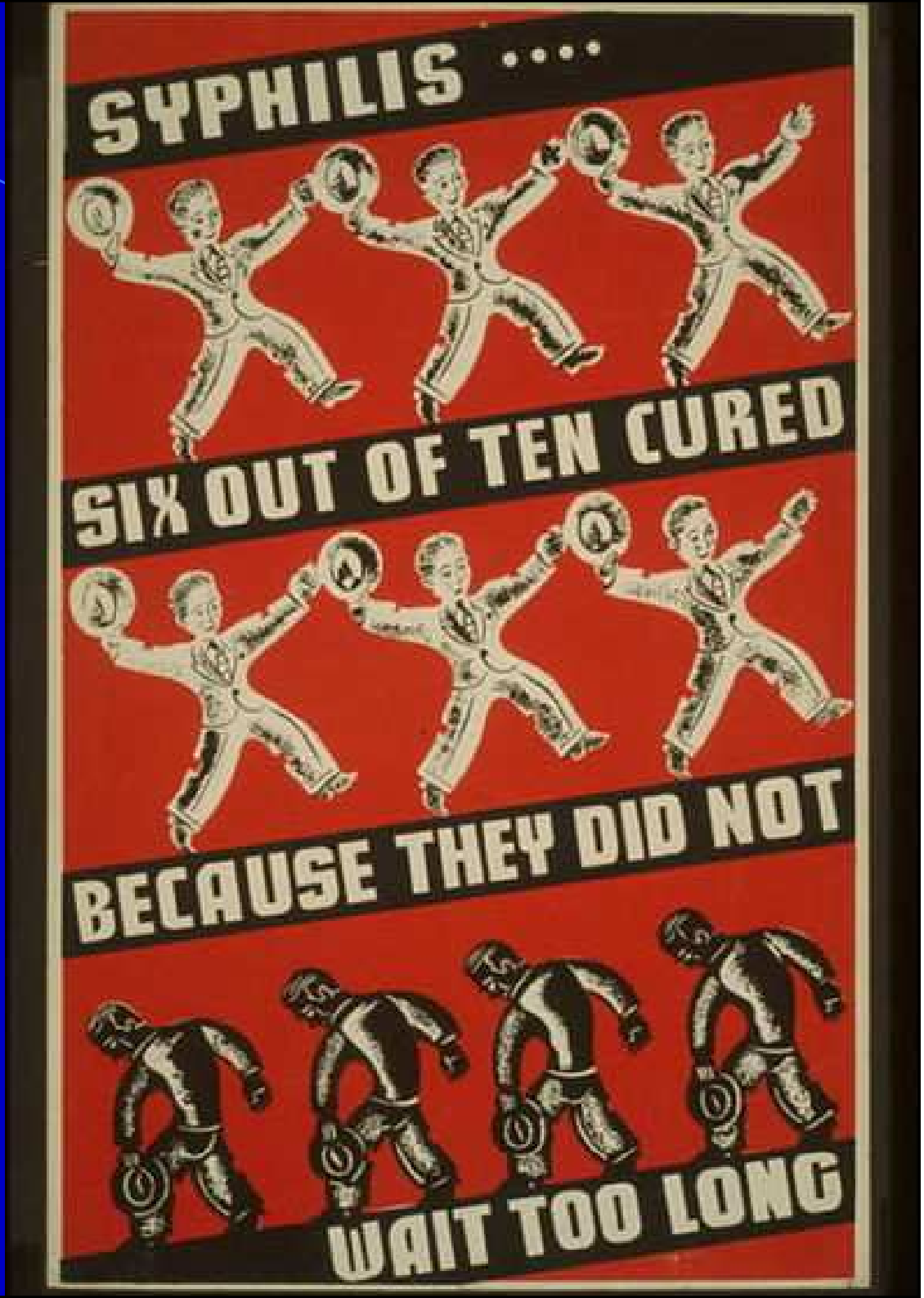


www.nlm.nih.gov

A.D.A.M.

Syfilis

www.med.sc.edu



en.wikipedia.org

Treponema pallidum

http://www.revoptom.com

Leptospiróza

- *Leptospira interrogans* ser. Icterohemorrhagiae
- Dříve se jednotlivé serovary leptospir považovaly za samostatné druhy, nyní se všechny patogenní považují za součást druhu *Leptospira interrogans* (druhý druh *Leptospira biflexa* je nepatogenní)
- Příznaky mohou být různé, od „chřipkotyfových" příznaků serovaru Grippotyphosa (blaťácká horečka) až po žloutenku a krvácivé stavy (Weilova choroba, jako u pana Krysaříka) serovaru Ictero-hemorragiae.

(Tyhle dva serovary se dají celkem logicky zapamatovat, tak když ne jiné, tak si hleďte zapamatovat aspoň je ☺)

Příběh

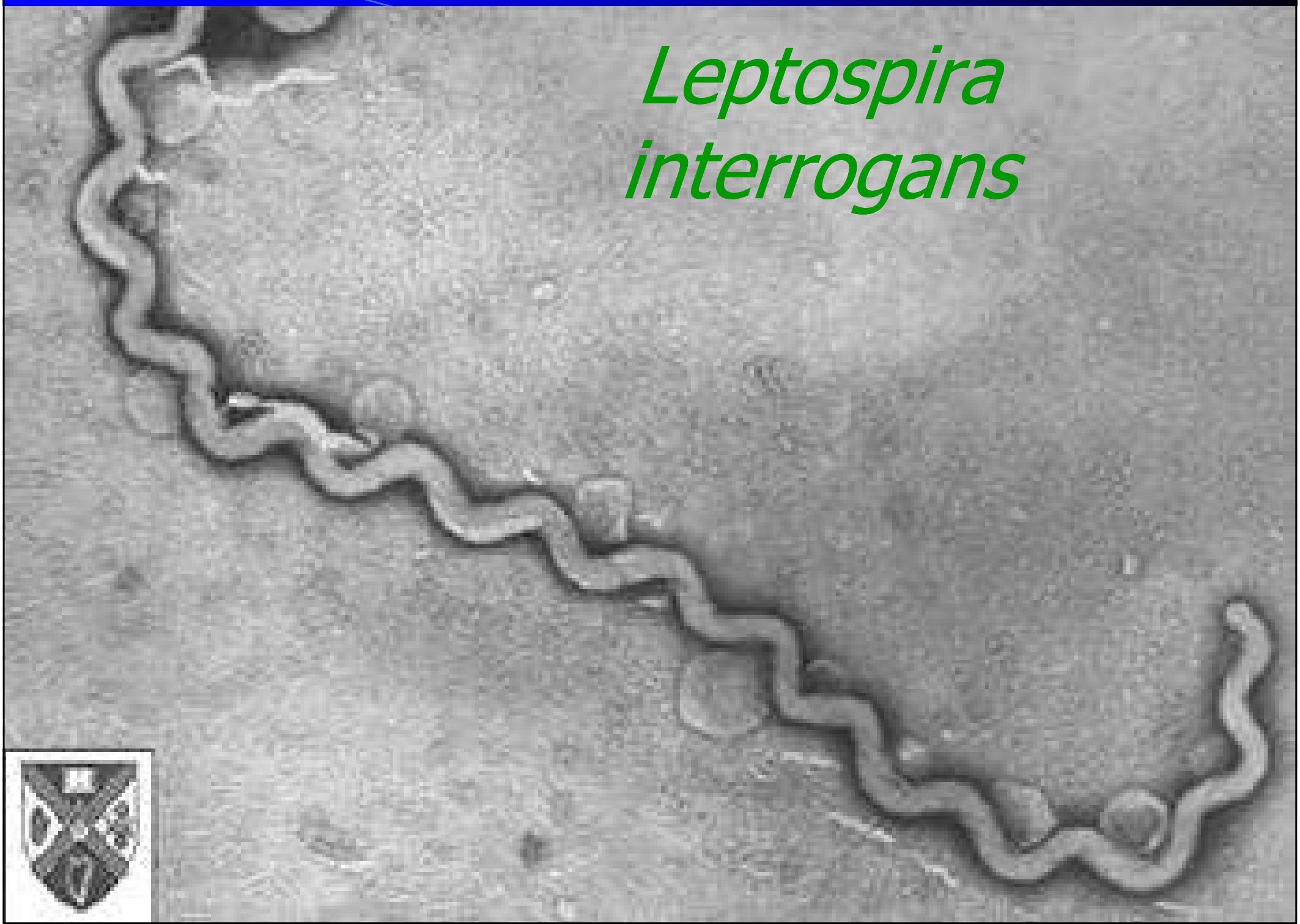
Ledvina postižená příslušnou chorobou

www.med.sc.edu

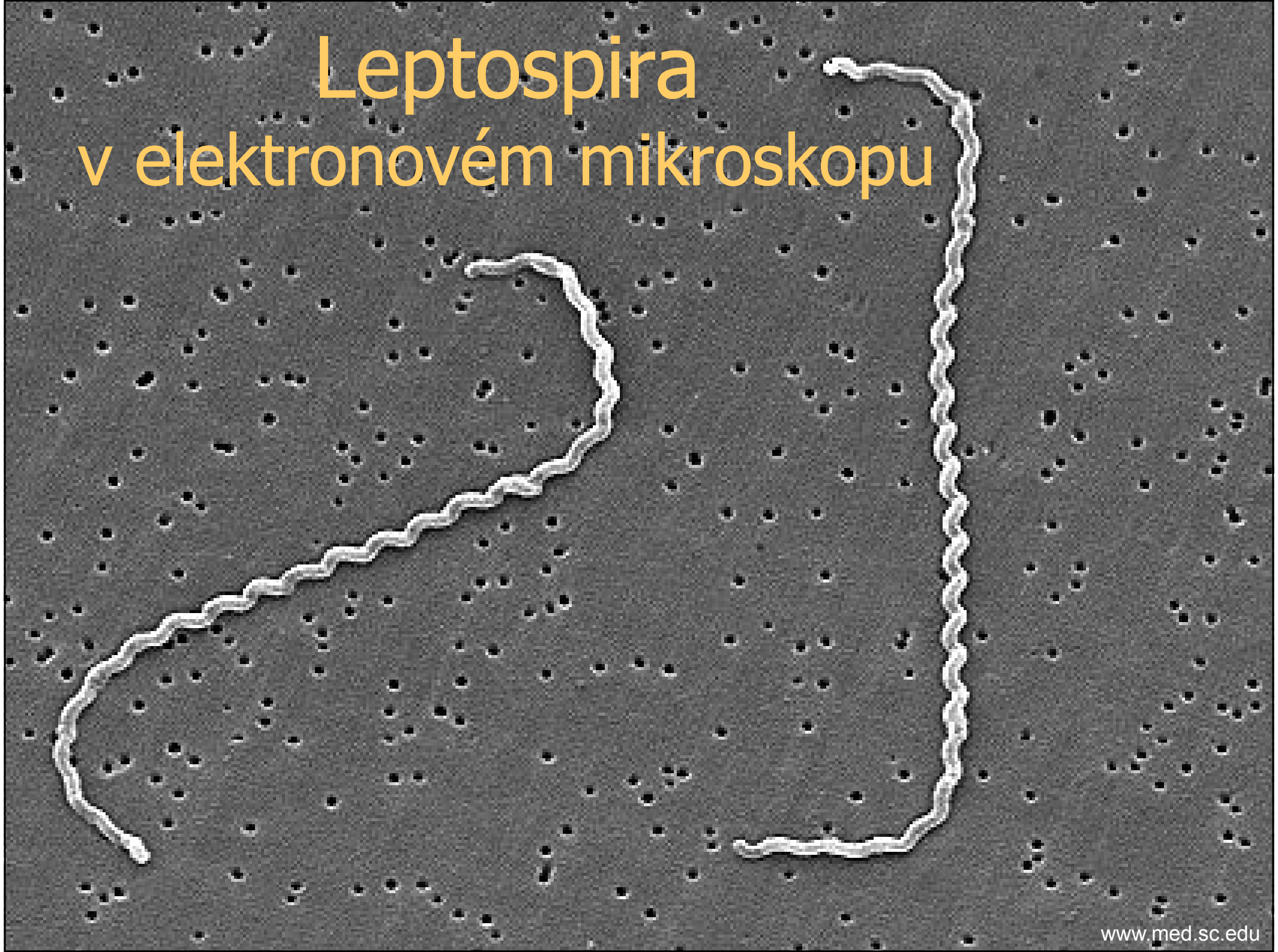
- Pan Krysařík byl pracovníkem firmy KVAK (Kocourkovské vodovody a kanalizace, a. s.)
- Jeho denním chlebem byla údržba kanálů. Nebylo kanálu, který by neznal. Znal i zvyky potkanů, měl je docela rád a rozuměl si s nimi.
- Přesto jednou došlo mezi ním a vůdcem tlupy potkanů k jakémusi nedorozumění a pan Krysařík byl kousnut do lýtka
- Netrvalo dlouho, a pan Krysařík ležel se žloutenkou a krvácivými stavy v nemocnici…

Tohle sice není pan Krysařík, ale jeden jeho venezuelský kolega s podobným osudem

http://www.ceniap.gov.ve



Leptospira interrogans

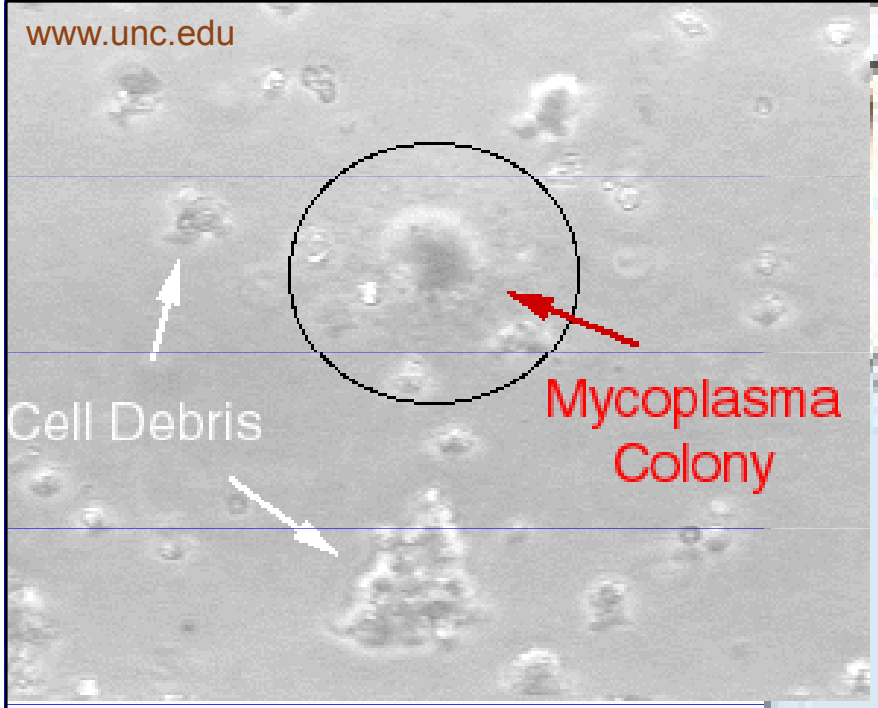

Leptospira
v elektronovém mikroskopu
www.med.sc.edu

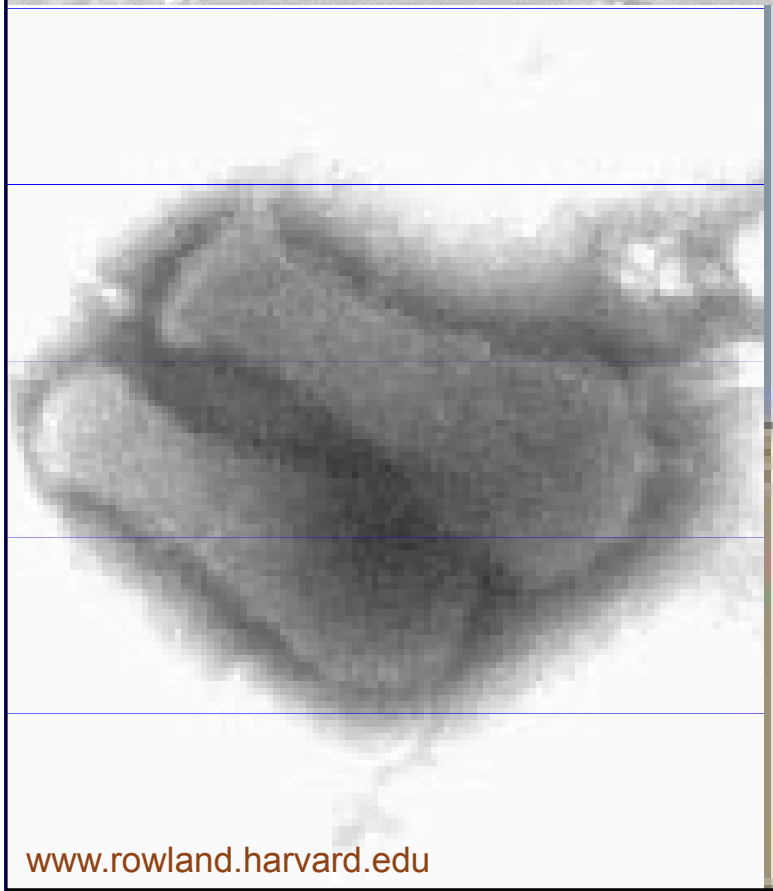
Mykoplasmata

Mykoplasmata

- zvláštní skupina bakterií – *Mollicutes* – "ty s měkkou kůží"
- **nemají buněčnou stěnu.**
- nelze stanovit jejich tvar, který může být kulatý, oválný či vláknitý.
- **u člověka jsou významné rody *Mycoplasma* a *Ureaplasma***
- **nejmenší organismy, které ke svému růstu nepotřebují cizí buňku**
- **několikrát menší než běžné bakterie**

www.unc.edu



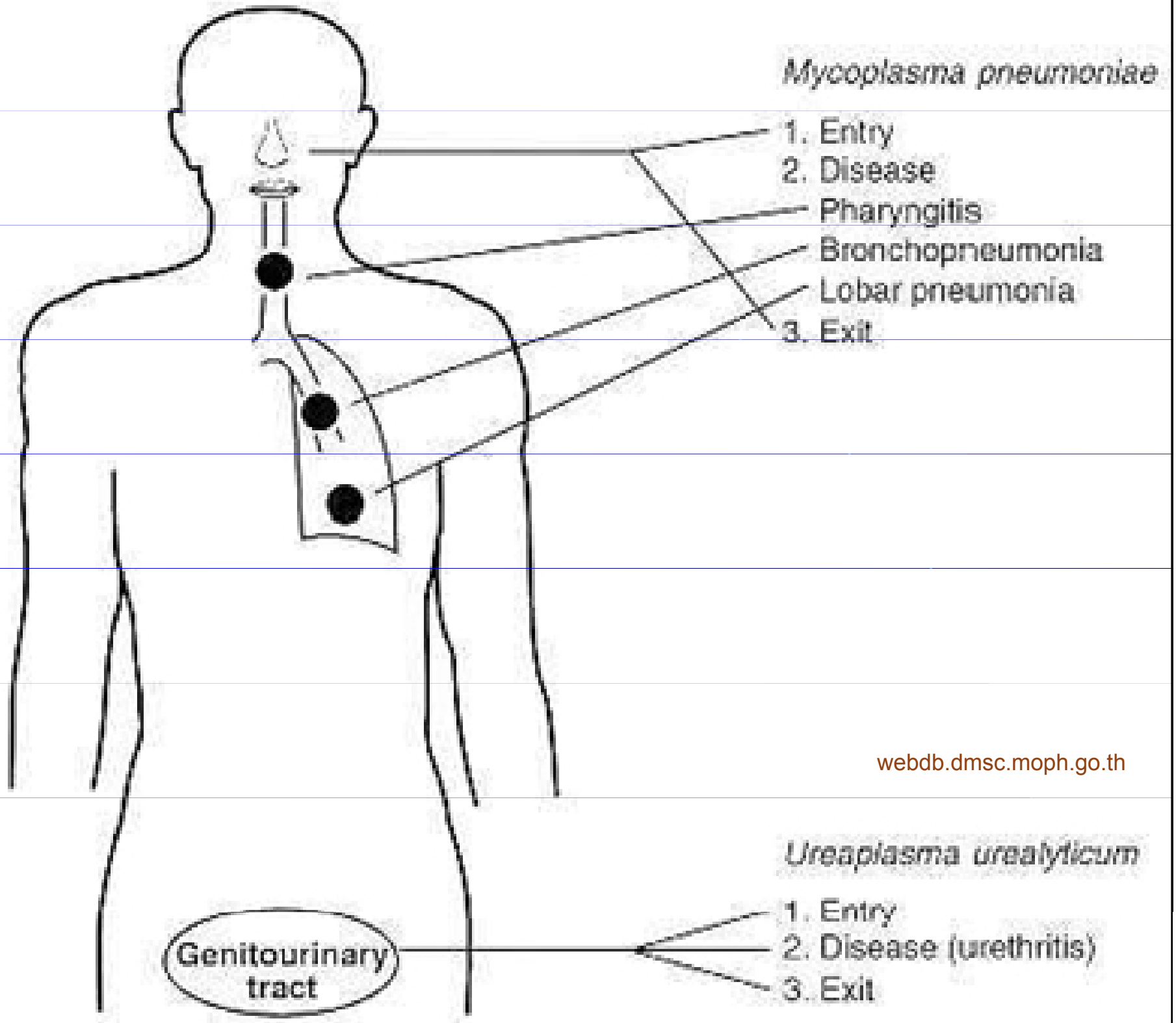


www.rowland.harvard.edu

www.invivogen.comv

Mycoplasma pneumoniae

- původcem tzv. atypických pneumonií.
- **není příliš výrazný nález při běžném vyšetření, ale zato je výrazný nález na rentgenu**
- choroba probíhá **ve tkáni mezi plicními sklípky (tzv. intersticiální pneumonie)**
- mohou nastat i mimoplicní komplikace (srdeční, nervové a jiné).
- často naopak jen jako rýma nebo úplně bez příznaků
- přenos vzduchem


Mycoplasma pneumoniae
1. Entry
2. Disease
Pharyngitis
Bronchopneumonia
Lobar pneumonia
3. Exit
webdb.dmsc.moph.go.th
Ureaplasma urealyticum
Genitourinary tract
1. Entry
2. Disease (urethritis)
3. Exit

Mycoplasma hominis, Ureaplasma urealyticum

- důležití původci pohlavně přenosných nákaz
- záněty pochvy, močové trubice aj.

Mycoplasma genitalium

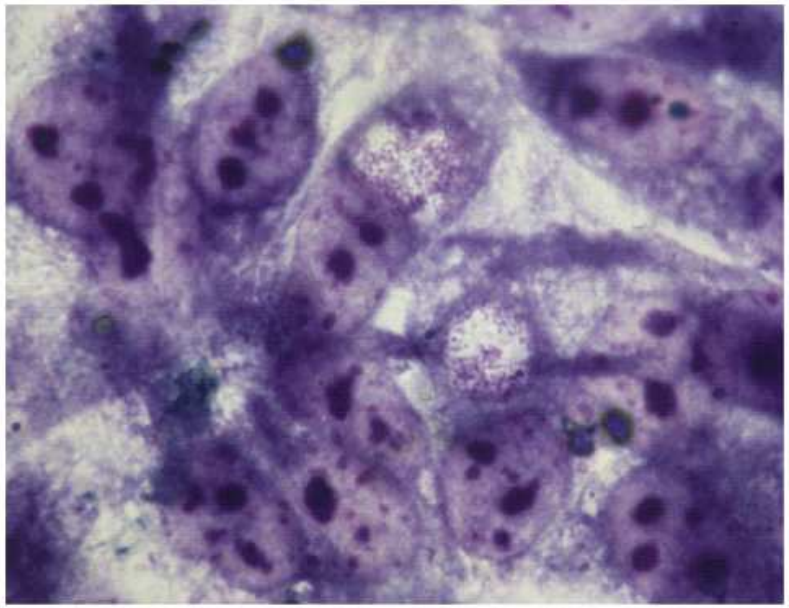
- také na pohlavních orgánech, význam nejasný

Mycoplasma penetrans

- u nemocných AIDS jako oportunní infekce

Chlamydie

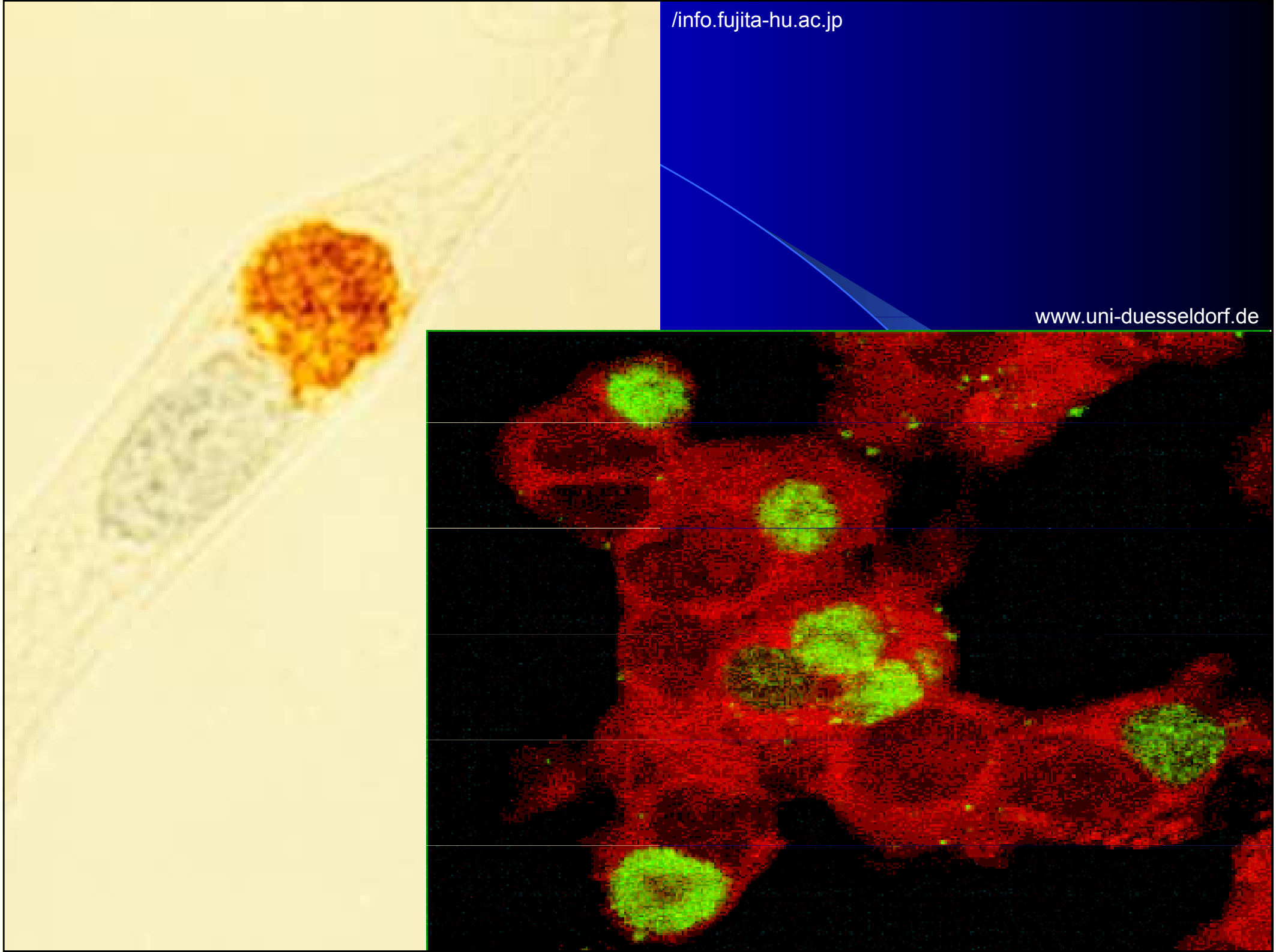
- povinně nitrobuněční parazité.
- jsou to přesto bakterie, v mnohém blízké gramnegativním
- od plnohodnotné bakterie, se liší především neschopností vyrobit ATP
- mají ale buněčnou stěnu.



To be seen each cell are two inclusions with elementary bodies. (Giemsa stain)

(Foto: Prof. Eiko Petersen, Universität Freiburg/Brsg.)

www.roche.com


/info.fujita-hu.ac.jp
www.uni-duesseldorf.de

www.medimix.hu

Chlamydia trachomatis

- onemocnění závisí na serotypu:
- Serotypy L1, L2, La2 a L3
  - vyvolávají tropickou pohlavní nemoc - lymphogranuloma venereum.
- Serotypy D až K
  - způsobují pohlavně přenosná onemocnění ve vyspělých zemích
  - často bez příznaků
  - možné záněty různých částí pohlavního ústrojí
  - možná neplodnosti
  - mohou též způsobit záněty spojivky – paratrachom

Chlamydia trachomatis

- Serotypy A, B, Ba a C
  - způsobují trachom - nejčastější příčinu slepoty v rozvojových zemích
  - postižen téměř každý desátý obyvatel zeměkoule (tj. asi půl miliardy lidí!)
  - začíná jako zánět spojivek
  - slepota přichází během 25 – 30 let
  - přenos dotykem a nespecifickými přenašeči (mouchy).

Trachom

http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Image:Trachoma.jpg

Chlamydophila pneumoniae

- především onemocnění dýchacích cest
- od rým a zánětů dutin až po záněty plic

Chlamydia psittaci

- ptačí nemoc – **ornitóza**
- závažnější papouščí nemoc – **psitakóza**
- důležité je postižení dýchacích cest i jiných orgánů, např. jater
- na chlamydie poměrně odolné, proto přenos i trusem ptáků

Rickettsie a příbuzné organismy

Rickettsie a spol.

- Podobně jako chlamydie odebírají z hostitelských buněk ATP a navíc i jiné živiny
- Jsou rovněž **povinně nitrobuněčnými parazity**
- Při výzkumu rickettsií přispěl badatel **Stanislaus Prowazek z Jindřichova Hradce**

Prowazek

www.quido.cz/osobnosti/images/prowazek.gif

www.amphilsoc.org

Prowazek

- (1875-1915) "Nikdo nemůže vyjádřit mínění o povaze viru jen na základě experimentů, tak, jak se v nynější době stává se dogmatem."

- Mikrobiolog a zoolog a objevitel původce skvrnitého tyfu **Stanislaus Prowazek** se narodil v Jindřichově Hradci v rodině důstojníka rakouské armády dne 12. listopadu 1875. Studoval na přírodovědecké fakultě v Praze a ve Vídni. Jeho doktorská práce zaujala Paula Ehrlicha (pozdějšího držitele Nobelovy ceny). A tak se Prowazek stal jeho asistentem. Postupně se stává nadějí německé medicínské parazitologie. Prowazek se stává vedoucím protozoologické laboratoře Institutu pro tropické choroby v Hamburgu. Další osudy této erudované osobnosti jsou spojeny se skvrnitým tyfem, typickou válečnou chorobou. Za tou se Prowazek v roce 1913 vypravuje do Srbska. Prowazek v chotěbuzském zajateckém lágru studoval nad mikroskopem tyfový materiál nemocných zajatců. Toto studium se mu stalo osudným. Podobně jako Ricketts i on se nakazil skvrnitým tyfem a dne 17. února 1915 zemřel.

- 99 www.quido.cz/osobnosti/images/prowazek.gif

Rickettsia

- **skvrnitý tyfus**, vyvolávaný *R. prowazeki*
  - vyrážka, vysoká horečka aj.
  - smrtí velice často
  - častý během válek, i u nás, např. v koncentračních táborech
  - po letech někdy pozdní vzplanutí – tzv. Brill-Zinserova choroba.
- **jiné rickettsie** způsobují tzv. purpurové horečky (např. horečka Skalistých hor)

/info.fujita-hu.ac.jp

Děkuji za pozornost

G – bakterie v podání as. MUDr. Petra Ondrovčíka, CSc.
(1957 – 2007)