

Lékařská mikrobiologie

Alena Ševčíková

OKM, FN Brno

Plán přednášek – zimní semestr

- 12.9.16 - stručná historie mikrobiologie, základní vlastnosti bakterií, morfologie, fyziologie, druhy kultivace, typy kultivačních pŕd - *Mgr. Petra Myšková, Ph.D.*
- 12.9.16 - mikroby a prostředí, dezinfekce, sterilizace, základy epidemiologie – *Mgr. Petra Myšková, Ph.D.*

- 14.9.16 – mikroby a makroorganismus, patogenita a virulence, průběh a formy infekce, základy klinické mikrobiologie – *prim. MUDr. Markéta Hanslianová*
- 15.9.16 – odběr, zasílání a zpracování infekčního materiálu, vyšetřovací metody v bakteriologii – *MUDr. Ivana Vítková*

Plán přednášek – zimní semestr

- 16.9.16 - základy imunologie, obecná virologie, virologické a sérologické vyšetřovací metody – *MUDr. Jana Bednářová, PhD.*
- -----
- 7.10.16 – antibiotika, vyšetřování citlivosti, rezistence kmenů na antibiotika - *prim. MUDr. Markéta Hanslianová*
- 4.11.16 – grampozitivní aerobní a fakultativně anaerobní koky, bezpečnost práce v laboratoři - *MUDr. Ivana Vítková*

Mikrobiologie

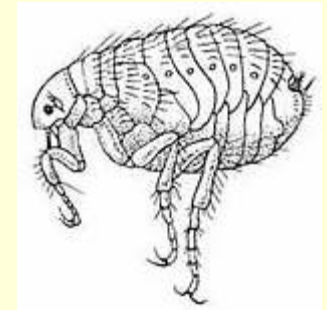
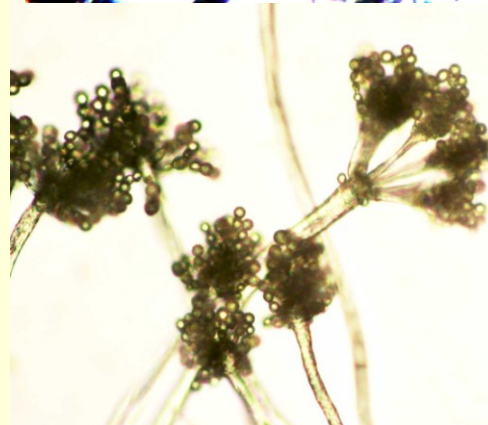
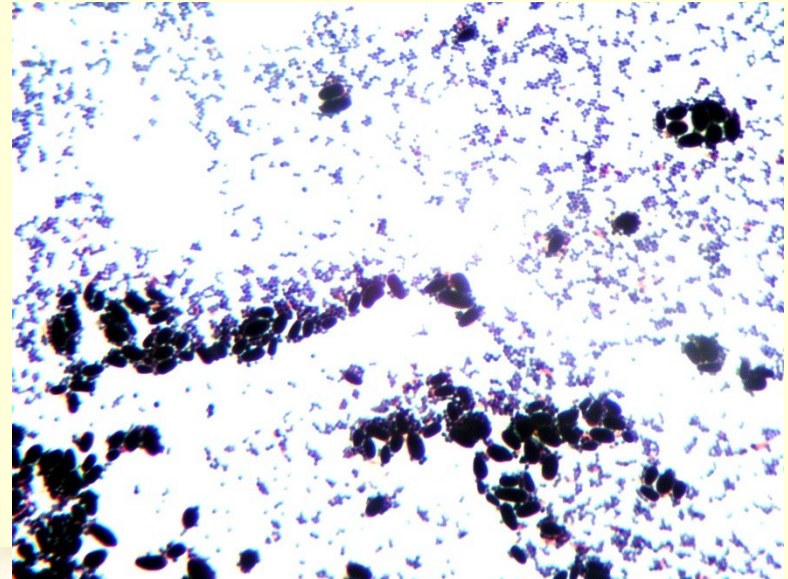
- **Mikrobiologie**
(z řeckého *micron* = *malý*,
biologia = *studium života*) je
věda studující
mikroorganismy

Virologie – 20 - 200nm

Bakteriologie - 1 μm

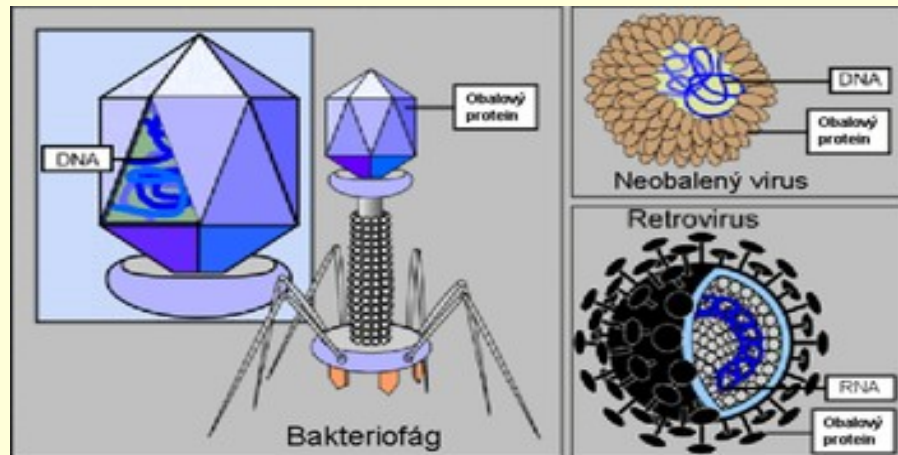
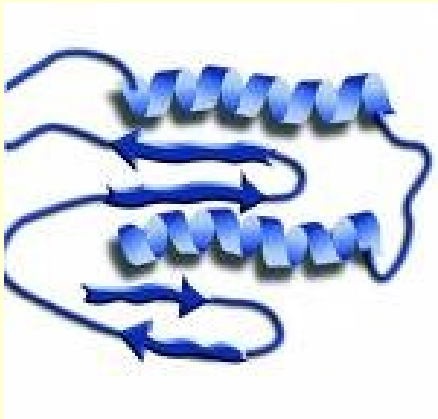
Mykologie - cca 10 μm

Parazitologie – 10 -150 μm

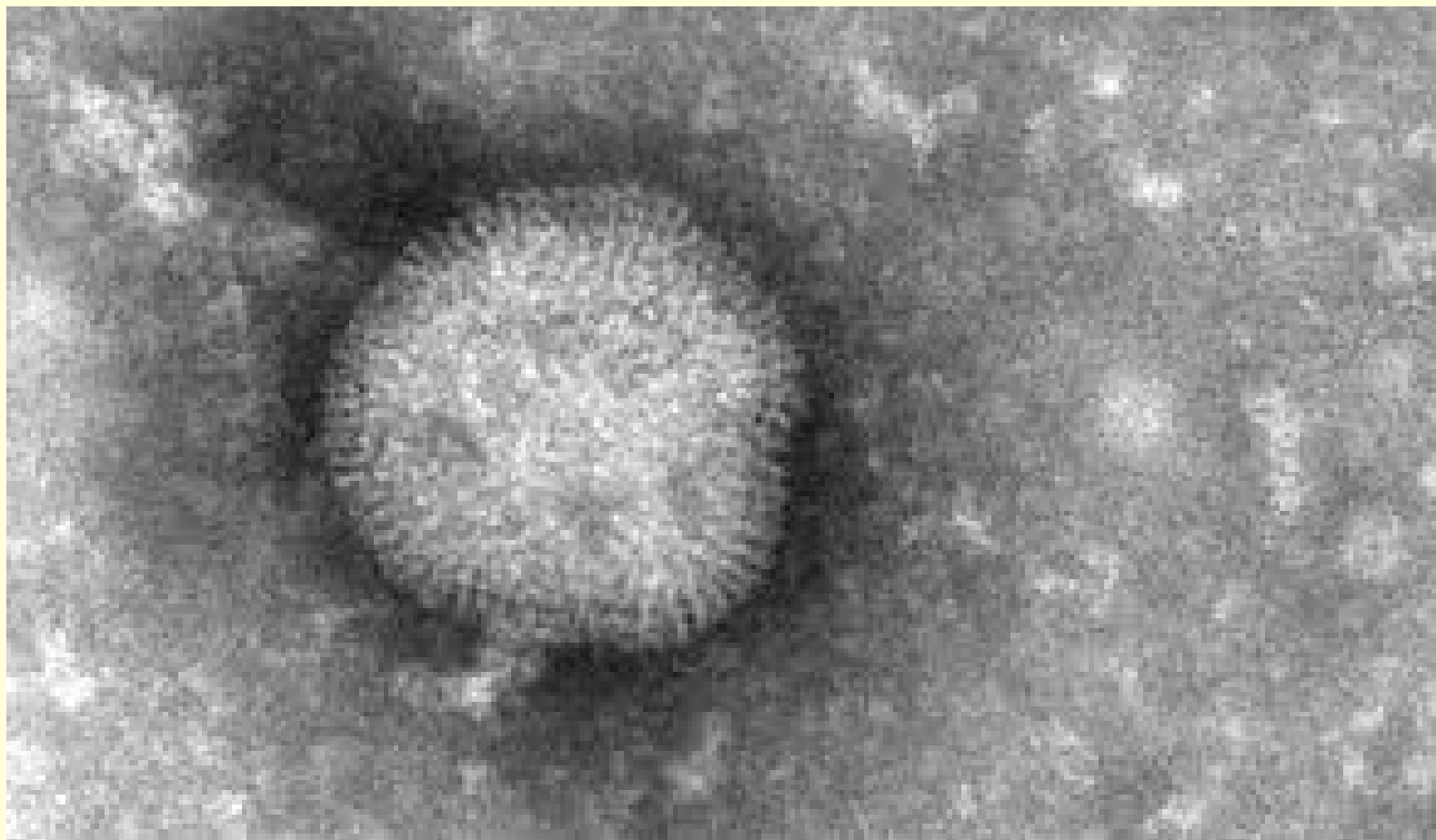


Virus

- nejjednodušší živý útvar
- bez buněčné stavby
- obsahuje jediný typ NK (DNA nebo RNA)
- množí se syntézou svých složek, nikoliv dělením
- v této syntéze je závislý na ribosomech hostitelské buňky
- **priony** - proteinové infekční částice, vyvolávající některá onemocnění CNS



Chřipka A



Rotaviry

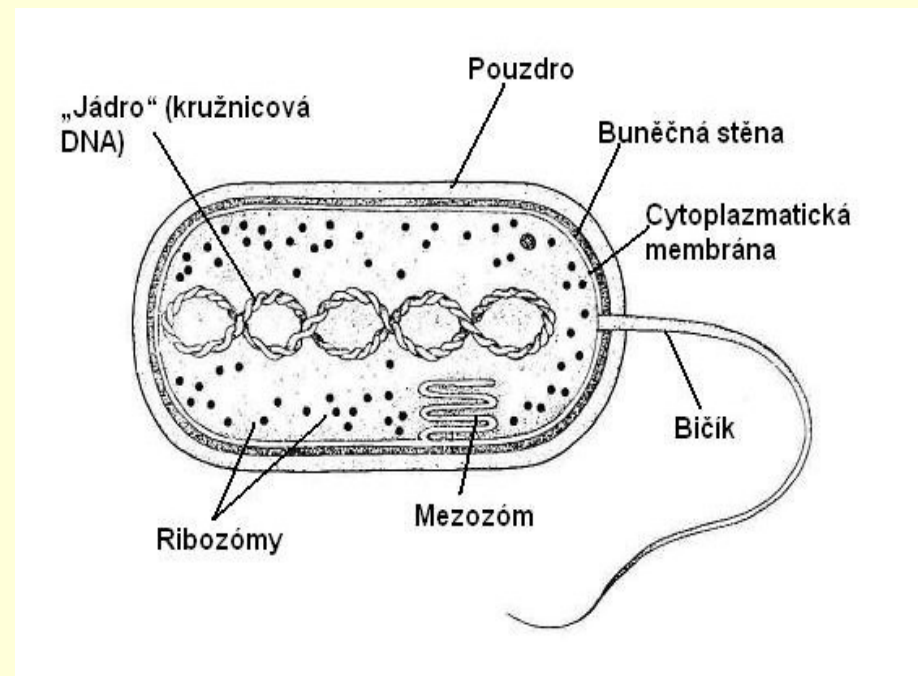


Virus Eboly

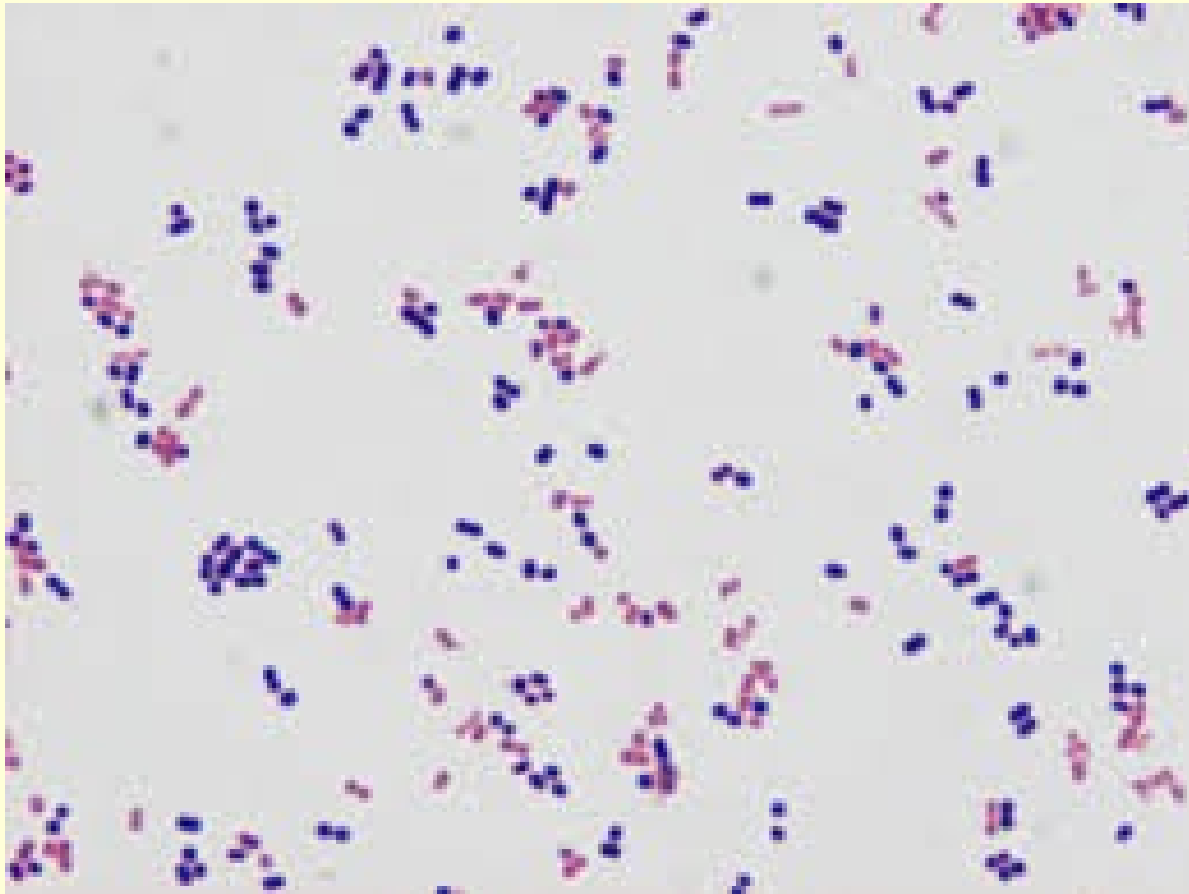


Bakterie

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



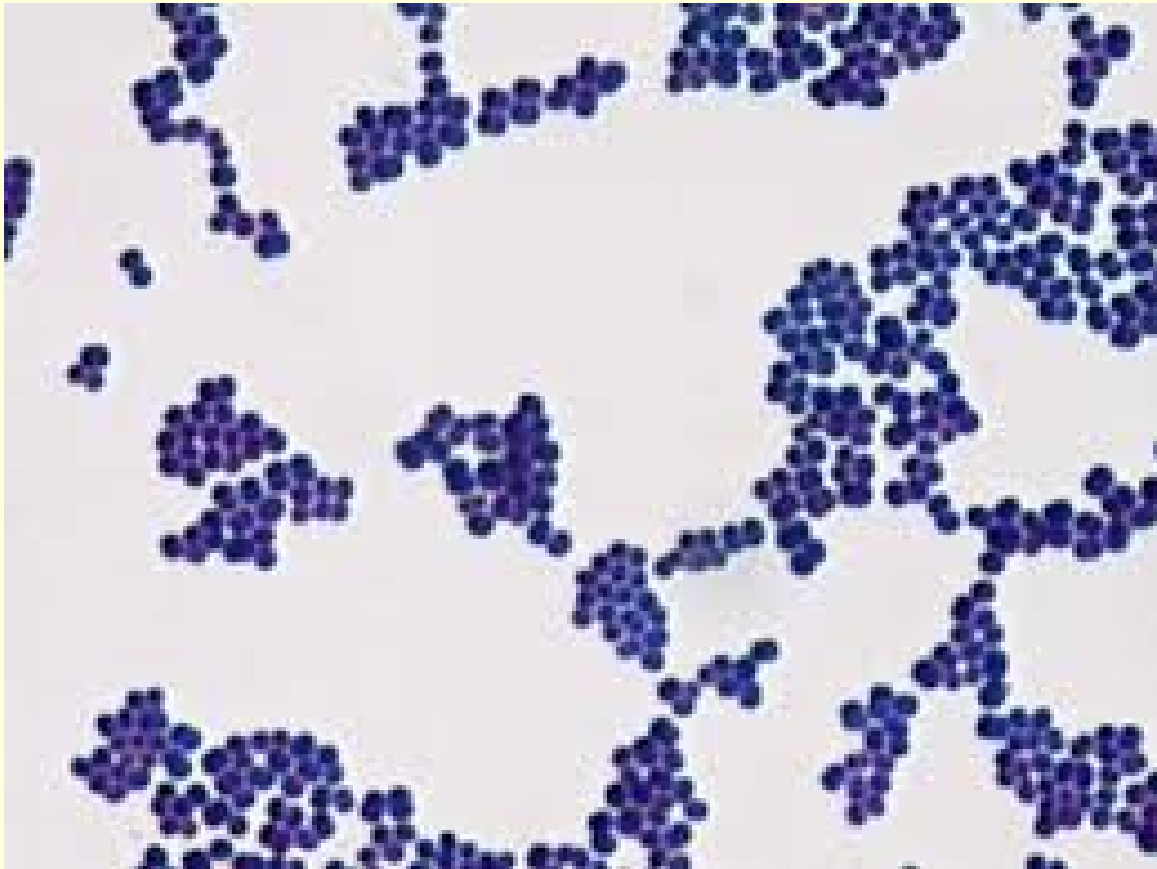
Grampozitivní a gramnegativní bakterie



Gramnegativní tyčky

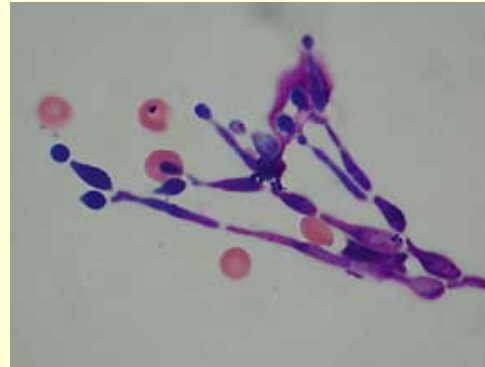


Grampozitivní stafylokoky



Buňky eukaryotické

- Kvasinky a plísně



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

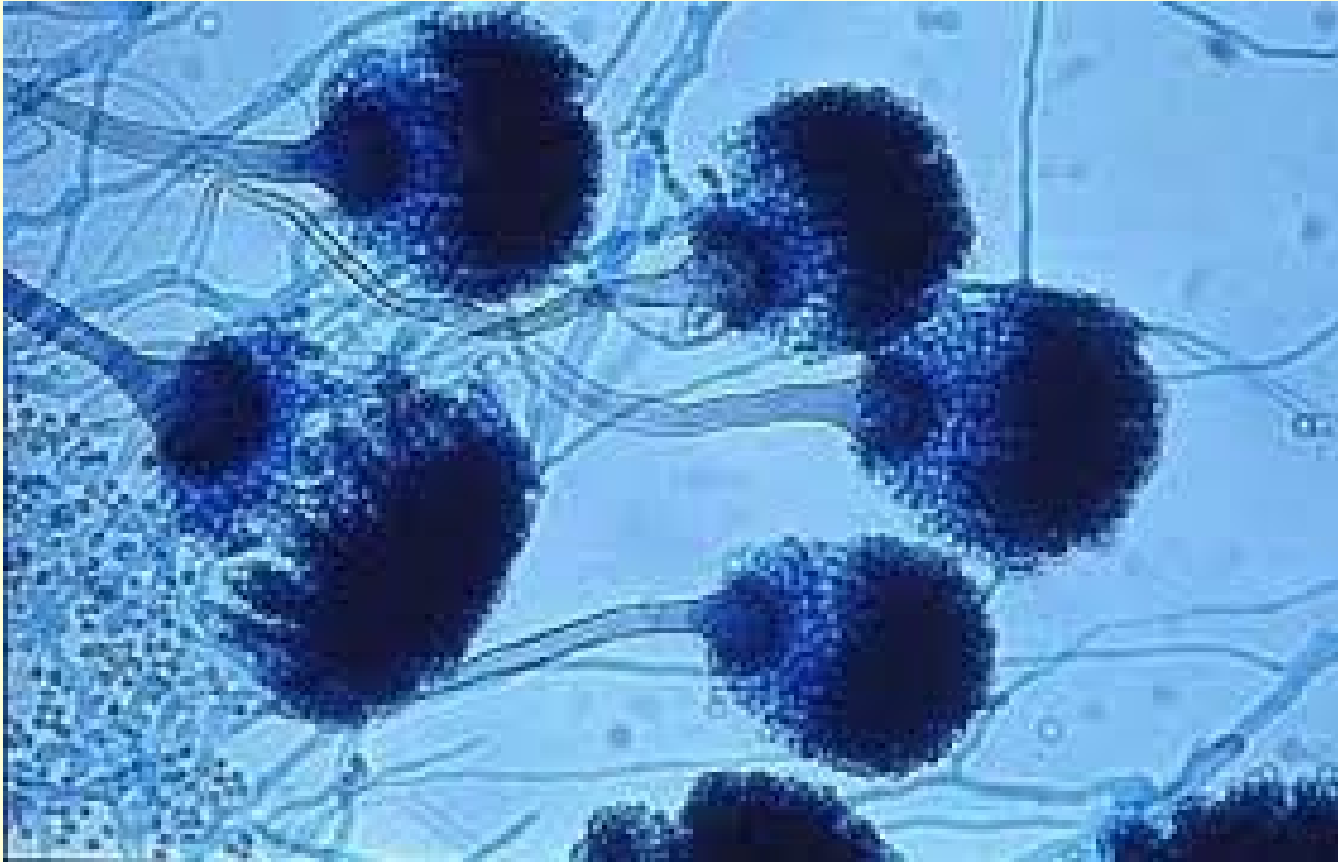
- Rostliny
- Živočichové



Candida



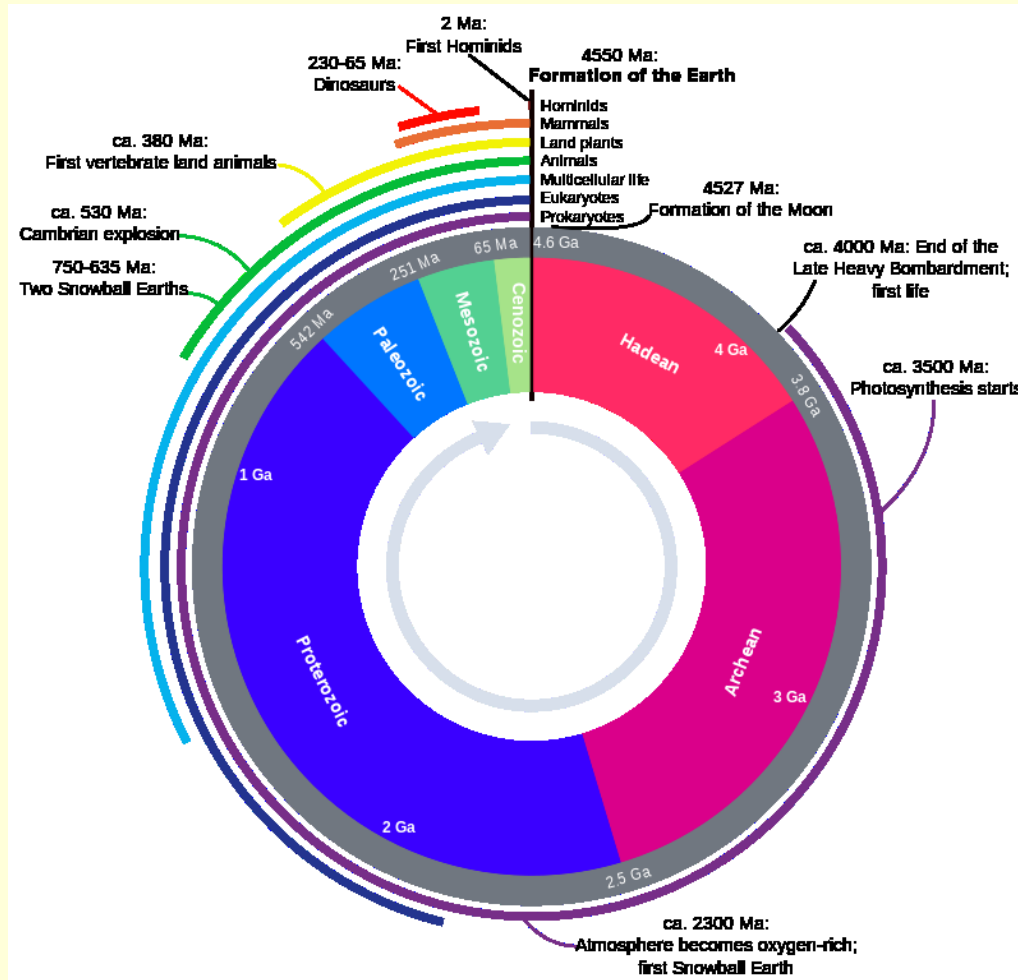
Aspergillus



Stručná historie

- Stáří planety cca 4,5 miliardy let
- Prokaryotické buňky – archea, bakterie cca 3,5 miliardy let
- Eukaryotické buňky jednobuněčné – cca 2 miliardy let
- Eukaryotické vícebuněčné organismy – cca 700 miliónů let
- Obratlovci - cca 250 milionů let
- Savci - cca 70 miliónů let
- Člověk – cca 2 milióny let – 100 000 let

Celá minulost planety zkrácená na velikost hodinového ciferníku



Stručná historie



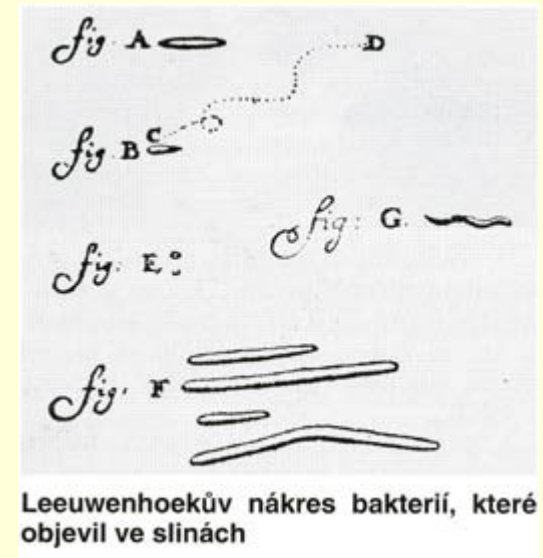
- Lidé již ve starověku tušili, že některé choroby jsou infekční a podezřívali z přenosu „neviditelné tvorečky“
- Italský lékař Fracastoro, (1485-1553)

Stručná historie



Stručná historie

- **1676 Antony van Leeuwenhoek** sestrojil jednoduchý mikroskop a pozoroval „malá zvířátka“ v hlenu svých zubů
- **1796 Edward Jenner** zavedl očkování proti pravým neštovicím



Leeuwenhoekův náčrt bakterií, které objevil ve slinách

Stručná historie

- **Ignác Semmelweis** (1818-1865) mytí rukou



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



Stručná historie

- **Joseph Lister** 1827 – 1912 začal operovat pod sprškou kyseliny karbolové, aby zamezil infekci ran mikroby ze vzduchu - antiseptika



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

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

- Podle metod a postupů zavedených Pasteurem a Kochem byla postupně objevena většina původců bakteriálních infekcí
- Zakladatelem virologie je považován **Ivanovskij**, který v roce 1892 popsal přenos mozaikové choroby tabáku
- 1898 – objeven první živočišný virus
- 1911 – první lidský virus, žlutá zimnice
- 1915 – viry bakterií - bakteriofágy

1900 - 2013



Mikrobiologie

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

Taxonomie

věda zabývající se rozdělením a zařazením organismů podle určitých pravidel

- Počet nově popisovaných mikroorganismů vzrůstá a je třeba je pojmenovat, uspořádat na základě vzájemných vztahů do taxonomických skupin a nově izolovaný kmen řádně identifikovat a zařadit do známého pojmenovaného taxonu

Součástí taxonomie

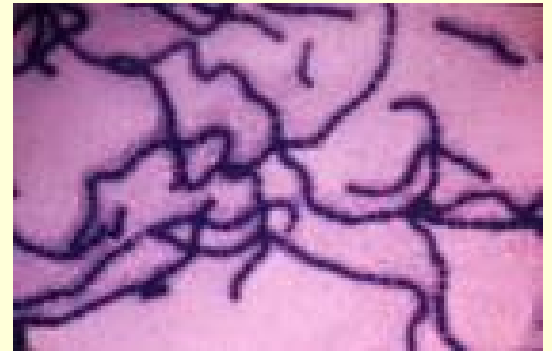
- **Nomenklatura** – názvosloví
- **Klasifikace** - třídění
- **Identifikace** – určování

Klasifikace - třídění

- Uspořádání mikroorganismů na základě vzájemných vztahů do taxonomických skupin, taxonů
- Základním taxonem je **bakteriální druh** (**species**) –soubor kmenů sdílejících stálé vlastnosti a lišící se od kmenů jiné skupiny
- **Kmen** je populace mikrobů pocházející z jediné mikrobiální buňky

Nomenklatura – názvosloví

- Pojmenování taxonu, bakteriálního druhu, podle mezinárodně dohodnutých pravidel
- Název bakterií se skládá ze jména rodového (**rod, genus**) a jména druhového (**druh, species**)
 - *Streptococcus pyogenes*
 - *Rickettsia prowazekii*
 - *Kocuria kristinae, Yersinia aldovae*

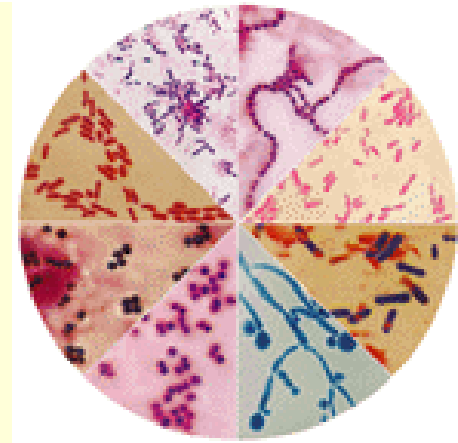
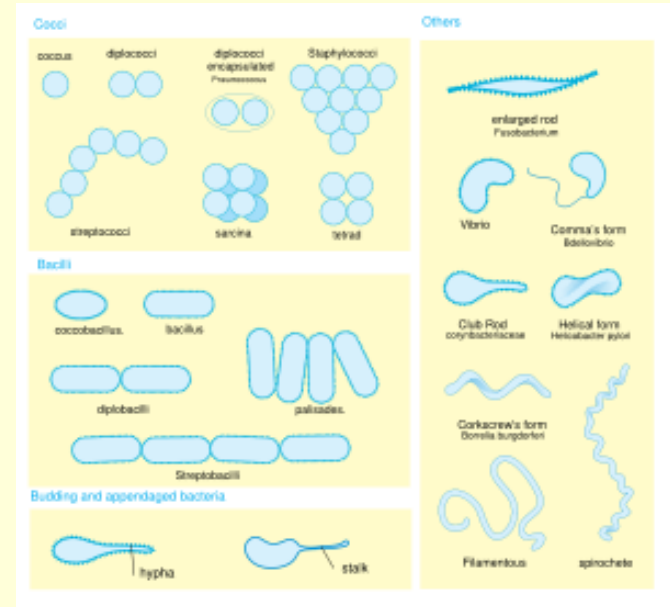


Identifikace – určování

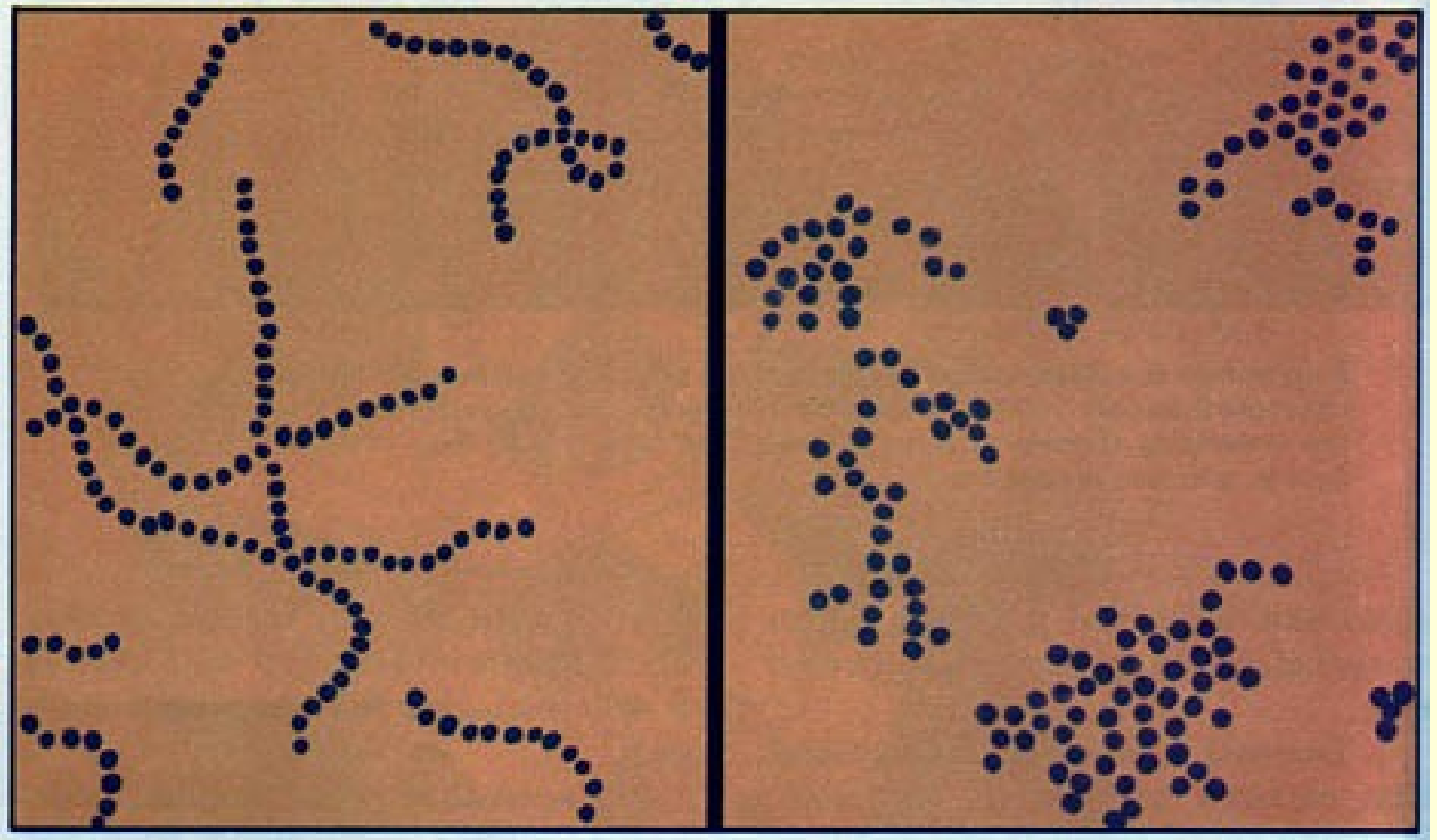
- Postup, kterým zjistíme, že nově izolovaný kmen náleží do známého, pojmenovaného taxonu
 - **morfologické znaky** (tvar, velikost, uspořádání, barvitelnost buněk, vzhled kolonií)
 - **fyziologické znaky** (tvorba nebo štěpení různých sloučenin)
 - **chemotaxonomické znaky** (složení buněčné stěny,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

Základní morfologie bakterií

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

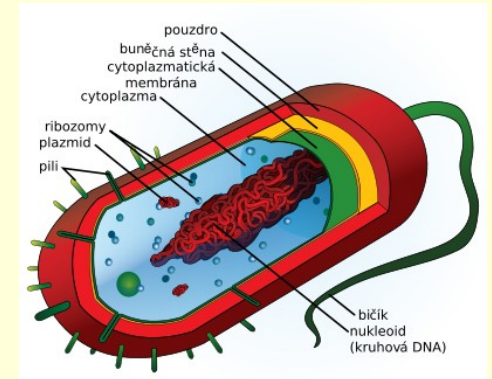


Streptococcus sp. - *Staphylococcus* sp.



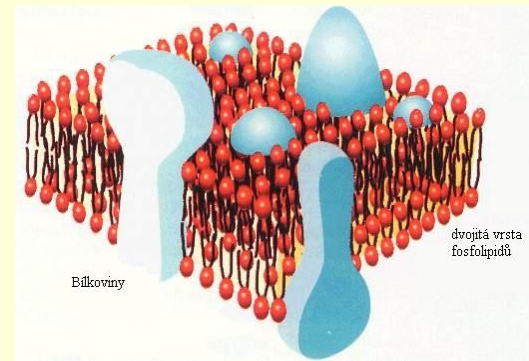
Stavba bakteriální buňky

- **Cytoplasma** buňky obsahuje
 - nukleoid-jaderný ekvivalent, cirkulární DNA
 - ribosomy a inkluzní tělíska, vakuoly,
 - Plasmidy – malé molekuly DNA
- **Cytoplasmatická membrána**
- **Buněčná stěna**
- **Polysacharidová pouzdra nebo slizová vrstva** – glykoprotein, chrání před fagocytózou
- **Bičinky** – orgány pohybu a **fimbrie** – adheze bakterií k epitelu



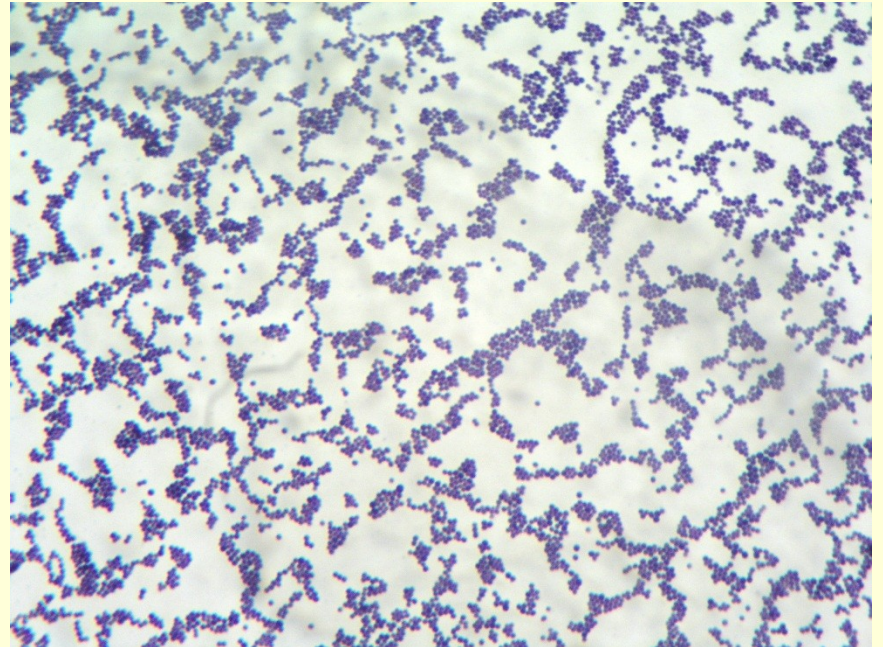
Cytoplasmatická membrána

- Složena z dvojité vrstvy fosfolipidu a různých bílkovin
- Bílkoviny se uplatňují
 - v transportu živin do buňky
 - v respiračních pochodech
 - v syntéze některých složek membrány, stěny i slizové vrstvy
 - v sekreci látek z cytoplasmy do zevního prostředí (bakteriální toxiny, extracelulární enzymy)



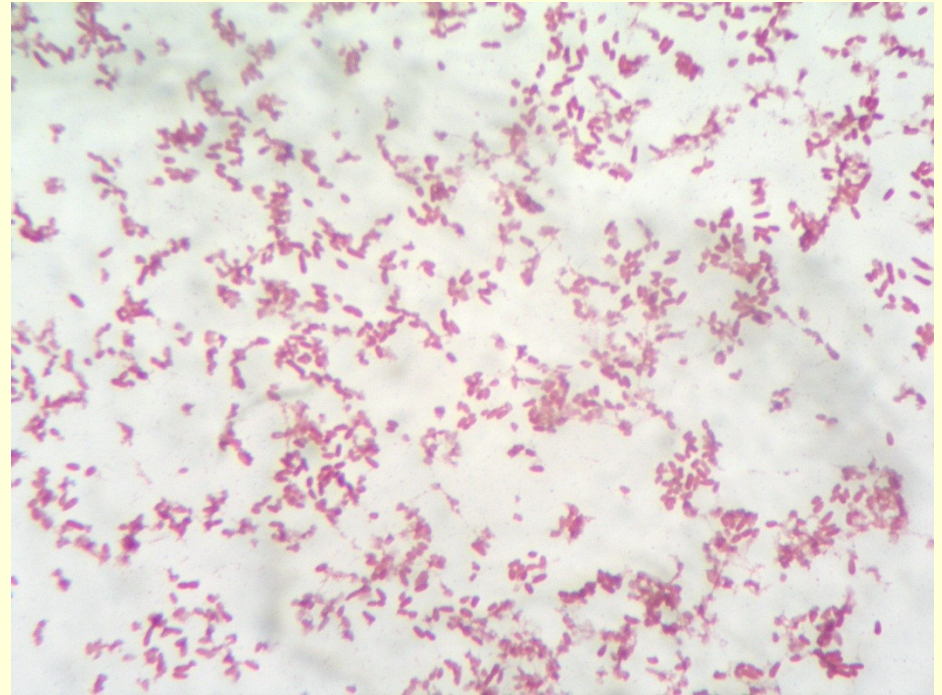
Buněčná stěna

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



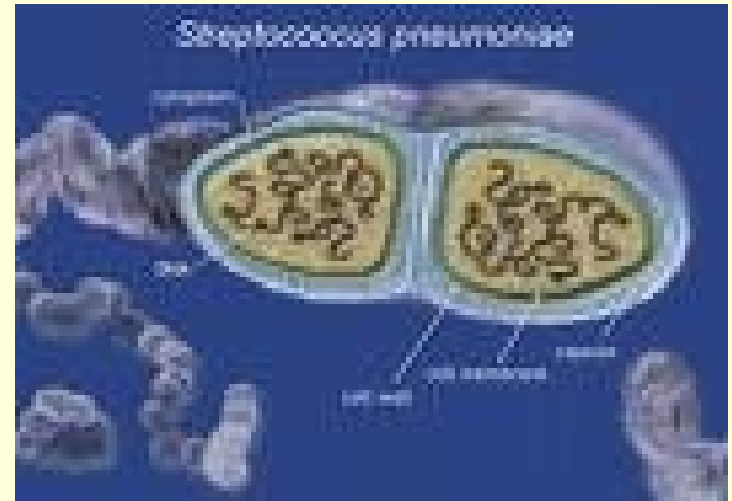
Buněčná stěna

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



Vnější vrstvy

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



Bakteriální spory

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

Clostridium tetani



Odolnost spor

- Vůči teplu, UV záření, vysychání, některým desinfekčním prostředkům (ethanol, fenol)
- Spory jsou ničeny
 - *Clostridium tetani* při 100° C za 90 min
 - *C.botulinum* Autoklávováním při tlaku 2 atm (121° C) za 20 min
 - Oproti tomu vegetativní buňka – je zničena při 70° C za 10 min

Metabolismus bakterií

- **Katabolismus** – štěpením složitějších sloučenin vzniká adenosintrifosfát (ATP) slouží jako pohotový zdroj energie
- **Anabolismus** – biosyntéza
- Většina procesů je katalyzována **enzymy**, které snižují aktivační energii chemických reakcí, aby probíhaly dostatečně rychle a nedošlo k narušení vnitřního prostředí

Zdroj energie

- Přeměna energie slunečního světla na energii chemickou - **fototrofy** - sinice
- Získávání energie oxidací redukovaných látek **chemotrofy**
 - Bakterie redukující látky anorganické (**chemolitotrofy**) bakterie siřné a železité
 - Bakterie redukující látky organické (**chemoorganotrofy**) – patogeny

Katabolické procesy – získávání energie

- **Fermentace – kvašení** – bez přítomnosti kyslíku, proces je anaerobní
 - Alkoholové, mléčné, propionové
- **Respirace** – uvolněné elektrony jsou přenášeny na dýchací řetězec Krebsova cyklu na cytoplasmatické membráně, proces je aerobní za přístupu vzduchu (po energetické stránce vydatnější) kyslík je konečným příjemcem elektronů
 - Výroba octa, kyseliny citronové
- **Obligátní intracelulární parazité** – nedovedou sami získávat energii, potřebují živou hostitelskou buňku – viry, chlamydie

Rozdělení mikrobů podle vztahu ke kyslíku

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

Termostaty



Anaerostaty



Biosyntéza

- **Zdroj uhlíku** – organické sloučeniny
(monosacharidy, disacharidy, škrob, glykogen, pektin, chitin, celulóza, lipidy, proteiny, nukleové kyseliny)
- **Zdroj dusíku** – vzdušný N_2 , amoniak
- **Síra, fosfor**
- **Mg, Ca, K** – vysoké koncentrace
- **Mn, Zn, Mo, Se, Co, Cu** – stopové prvky
- **Růstové faktory** – vitaminy, aminokyseliny

Bakteriální růstový cyklus



- **Růst buňky**
 - koordinovaná tvorba makromolekul a buněčných složek
 - po dosažení určité velikosti (iniciační perioda) je zahájena replikace chromosomu, vzniknou dvě kruhové molekuly dvojřetězcové DNA
- **Tvorba septa**
- **Dělení buňky** – každá dceřinná buňka získává svou kopii DNA a polovinu cytoplasmatického obsahu

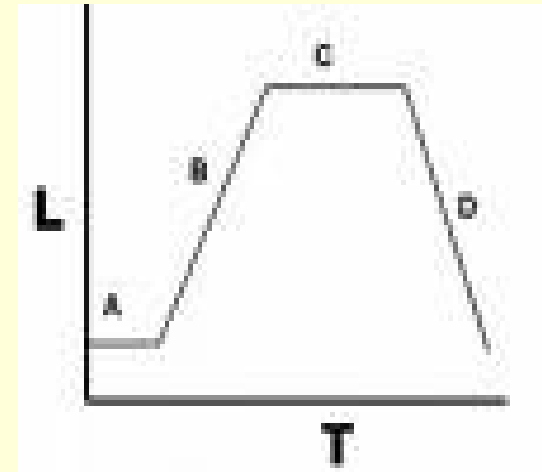
Generační doba

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

Bakteriální růstový cyklus

- **Stacionární růstová křivka**

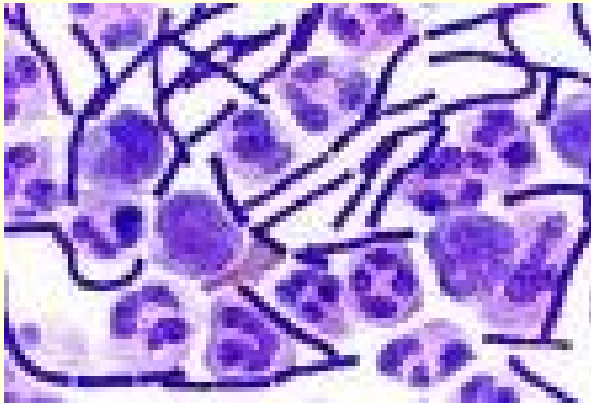
- Lag-fáze
- Logaritmická, exponenciální fáze
- Stacionární fáze
- Fáze odumírání



- **Kontinuální kultivace** – udržení populace v logaritmické fázi růst
 - v průmyslové mikrobiologii
 - růst bakterií v zažívacím traktu

Typy růstu

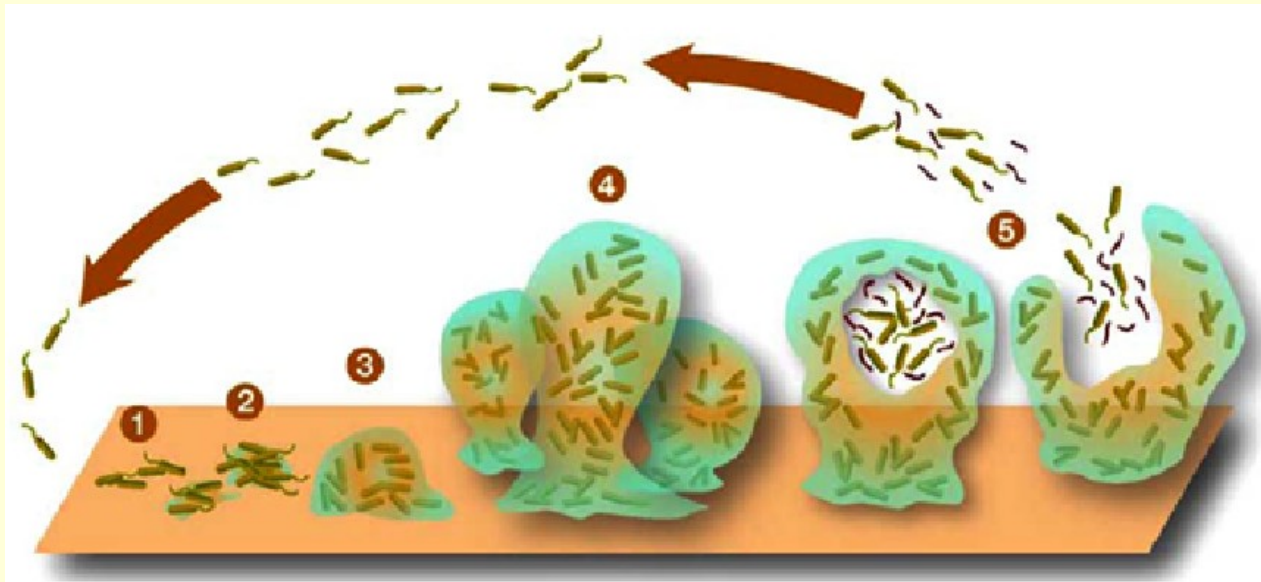
- **Planktonický růst**
 - v podobě izolovaných buněk



Typy růstu

- **Růst bakterií v podobě biofilmu**

- Biofilmy jsou strukturovaná mikrobiální společenství, uložená v mezibuněčné hmotě a adherující k inertním i živým povrchům
- Jsou více chráněny proti vysychání, desinfekčním látkám, ale také proti účinku fagocytů, protilátek a antibiotik



Vznik biofilmu

- Na umělých materiálech: intravenozní katetry, umělé srdeční chlopně, kloubní náhrady, nitroděložní tělíška, močové katetry (koagulázanegativní stafylokoky, *Staphylococcus aureus*, aktinomycéty)
- Zubní povlak, zubní kaz, záněty středního ucha, osteomyelitida, zánět žlučových cest, endokarditida, záněty plic při cystické fibróze

Podmínky pro kultivaci mikroorganismů

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

Podmínky pro kultivaci mikroorganismů

- **Teplota**

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

Podmínky pro kultivaci mikroorganismů

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

Podmínky pro kultivaci mikroorganismů

- **Hydrostatický tlak**
 - Stoupá o 1atm na 10m vody
 - Do hloubky 2000m převažují mikroorganismy **barotolerantní**
 - V extrémních hloubkách žijí **barofily**

Podmínky pro kultivaci mikroorganismů

- **Osmotický tlak**

- Většinou v hypotonickém prostředí chrání mikroby pevná buněčná stěna
- V hypertonickém prostředí ztrácejí vodu, přestávají se množit, podléhají plasmolýze (princip konzervace potravin pomocí soli, cukru)
 - enterokoky tolerují 6,5% NaCl, stafylokoky 10%
 - Vibria bez přídavku 1% NaCl většinou nevyrostou

Podmínky pro kultivaci mikroorganismů

- **Koncentrace vodíkových iontů**

- Většinou je optimální pH neutrální pH6-pH8
- *Vibrio cholerae* – vyhovuje zásadité prostředí pH 7,4 – 9,6, při kyselém rychle hynou
- Enterokoky jsou vysoce tolerantní pH 4,8 – 11
- Při kultivaci v uzavřeném systému vznikají metabolity převážně kyselé, po vyčerpání nárazníkové kapacity růst se mikroorganismů zastavuje

Podmínky pro kultivaci mikroorganismů

- **Oxidoredukční potenciál**
 - Odráží poměr mezi oxidovanými a redukovanými látkami v daném prostředí
 - Oxidované prostředí vyhovuje **aerobům**, i když při svém metabolismu redox potenciál snižují a umožňují množení anaerobů
 - **Anaeroby** vyžadují redukované prostředí, nízký redox potenciál

Pěstování bakterií

- Tekuté kultivační půdy (**Pasteur, Koch**)
- Kultivace na pevných agarových půdách (**Walter Hesse**)
- 1887 **Richard Petri** zavedl skleněné misky s plochým víčkem – Petriho misky
- 1914 – první komerčně připravované sušené kultivační půdy

Podmínky pěstování bakterií

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

Druhy kultivačních pŮd

- **Tekuté pŮd**

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

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

- **Cukrové pŮdy**

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



Druhy kultivačních pŮd

- **Pevné pŮdy** - ztužení pŮvodnĚ tekutĚho zŮkladu pŮdáním 1-2% agaru, (5%)
- VŮhoda - pĚstování mikrobŮ v izolovaných koloniích
- Bakteriální kolonie je společenství bunĚk vzniklé z pŮvodnĚ tŮeba z jedné ŮivotaschopnĚ mikrobiální buňky
- Viditelnou kolonii tvoŮí nĚkolik set miliard bunĚk
- Rozočkováním jedné kolonie zŮskáme ěistou mikrobiální kulturu

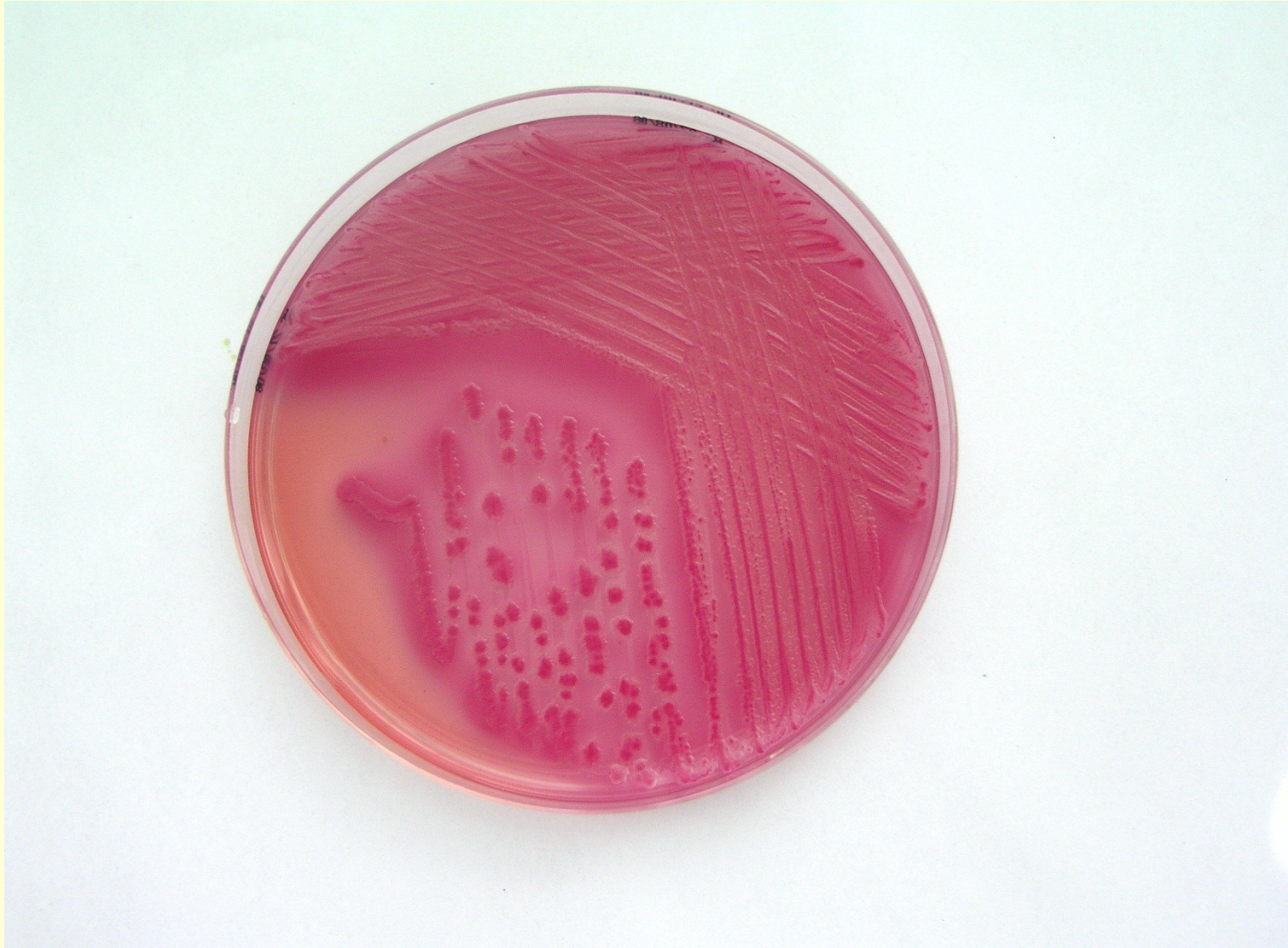
Staphylococcus aureus na krevním agaru



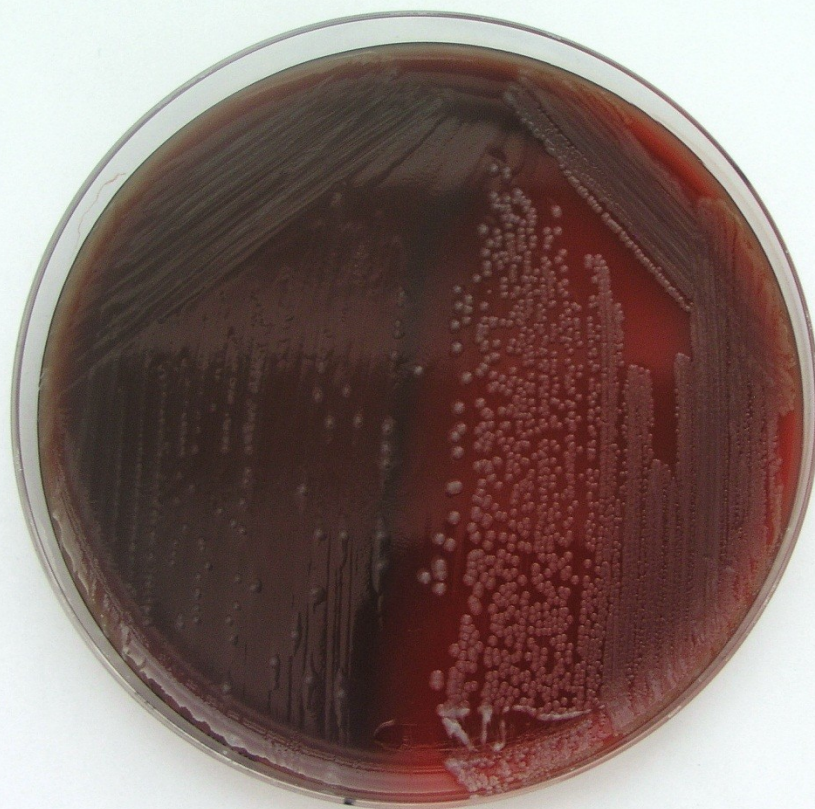
Znaky bakteriální kolonie

- **Velikost** – v mm
- **Tvar** – kulatý, laločnatý, plazící se
- **Profil** – plochý, vypouklý, miskovitý
- **Okraje** – rovné laločnaté
- **Povrch** – hladký, drsný, lesklý, matný
- **Transparence** – (ne)průhledná
- **Barva** – bílá, žlutá, bezbarvá
- **Změny v okolí** – zbarvení, hemolýza
- **Konsistence** – hlenovitá, drobivá, vrůstající do agaru
- **Zápach** – po jasmínu,

Escherichia coli
na MacConkey agaru



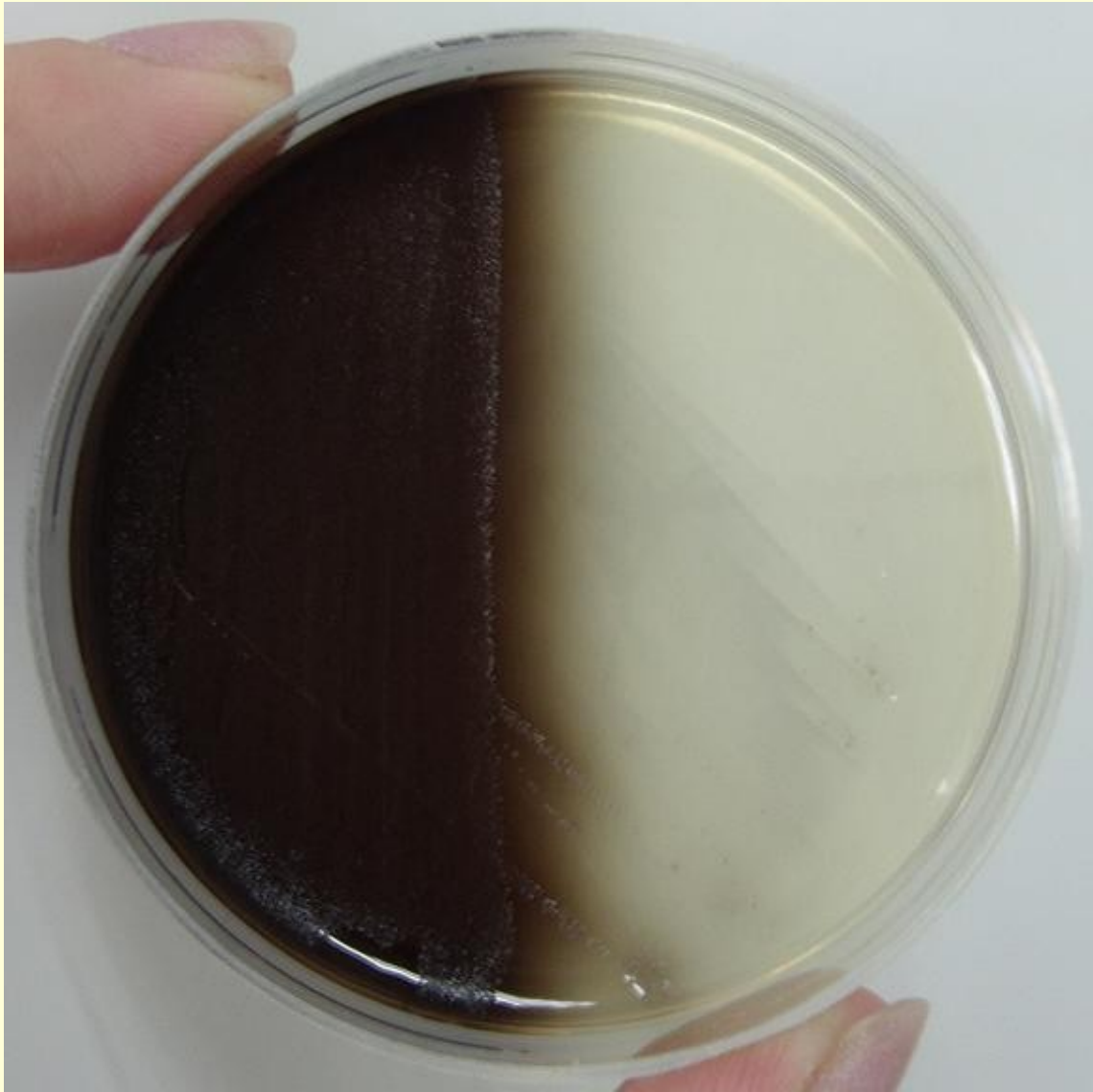
Plazivý růst *Proteus hauseri* a izolované kolonie *Escherichia coli*



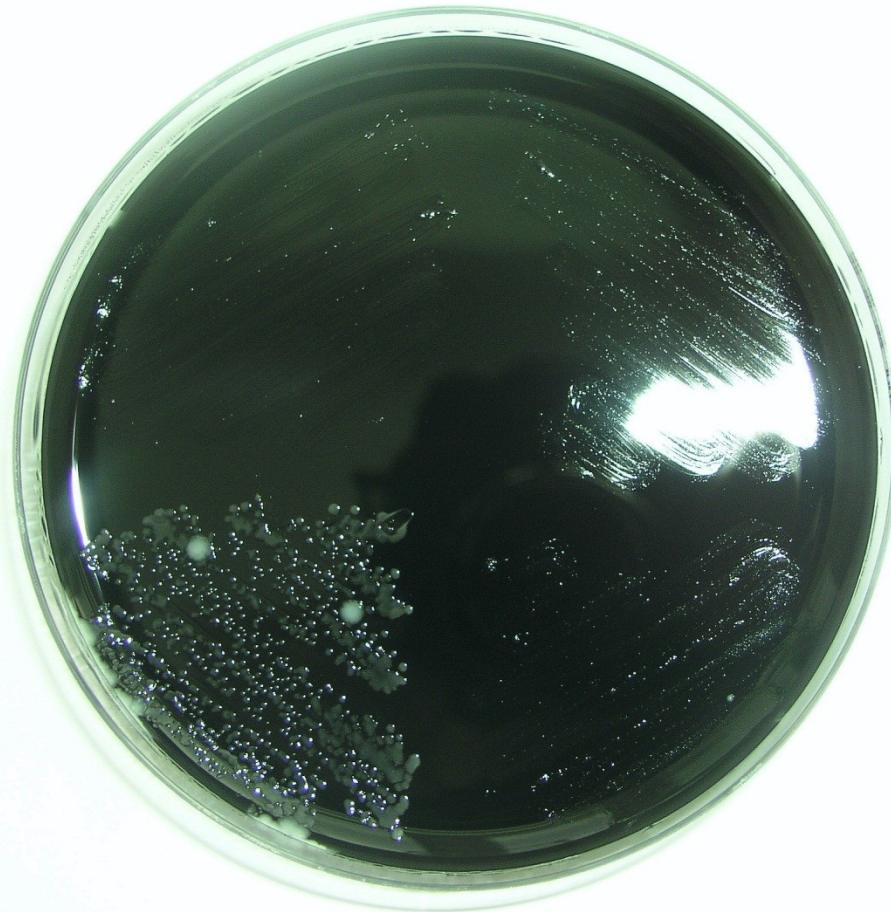
Typy pŮd

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

Černé kolonie vankomycin rezistentního enterokoka na selektivní půdě



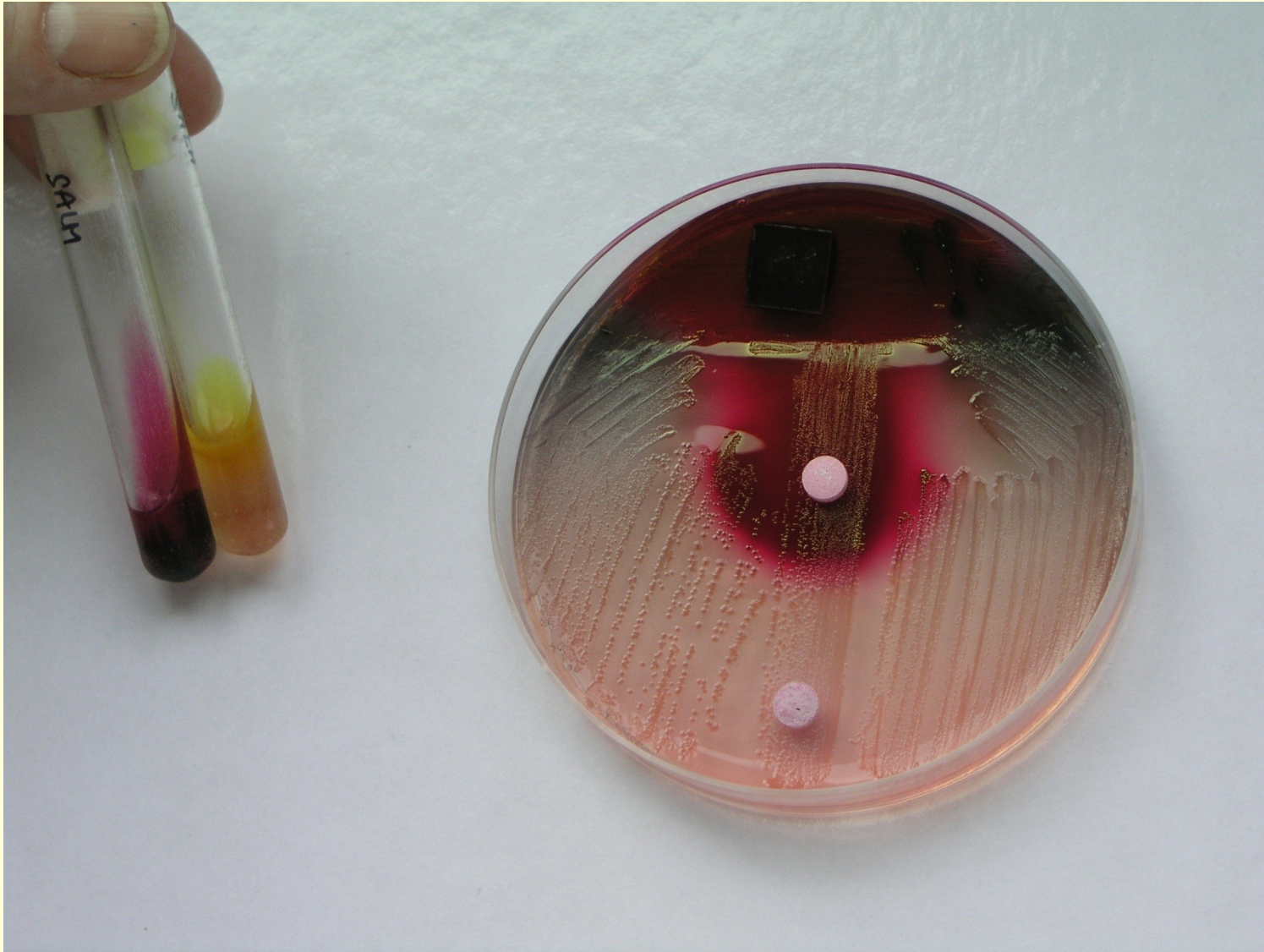
Campylobacter sp.
na selektivní půdě



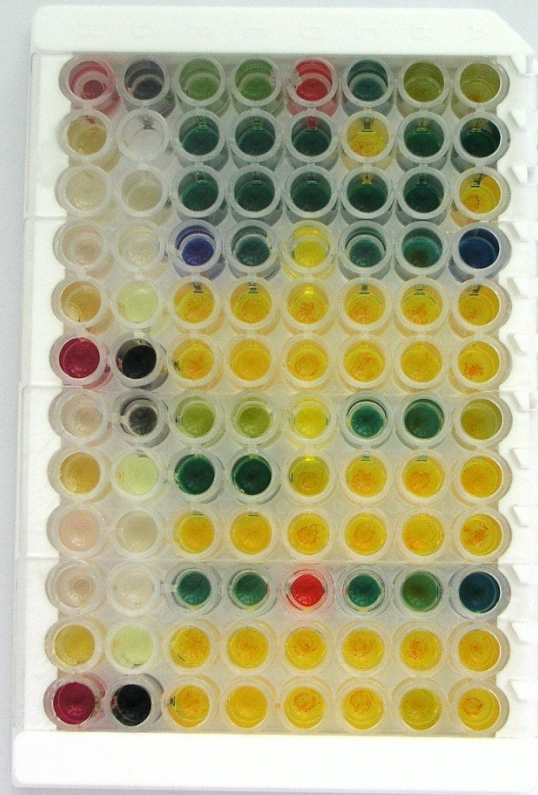
Typy půd

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

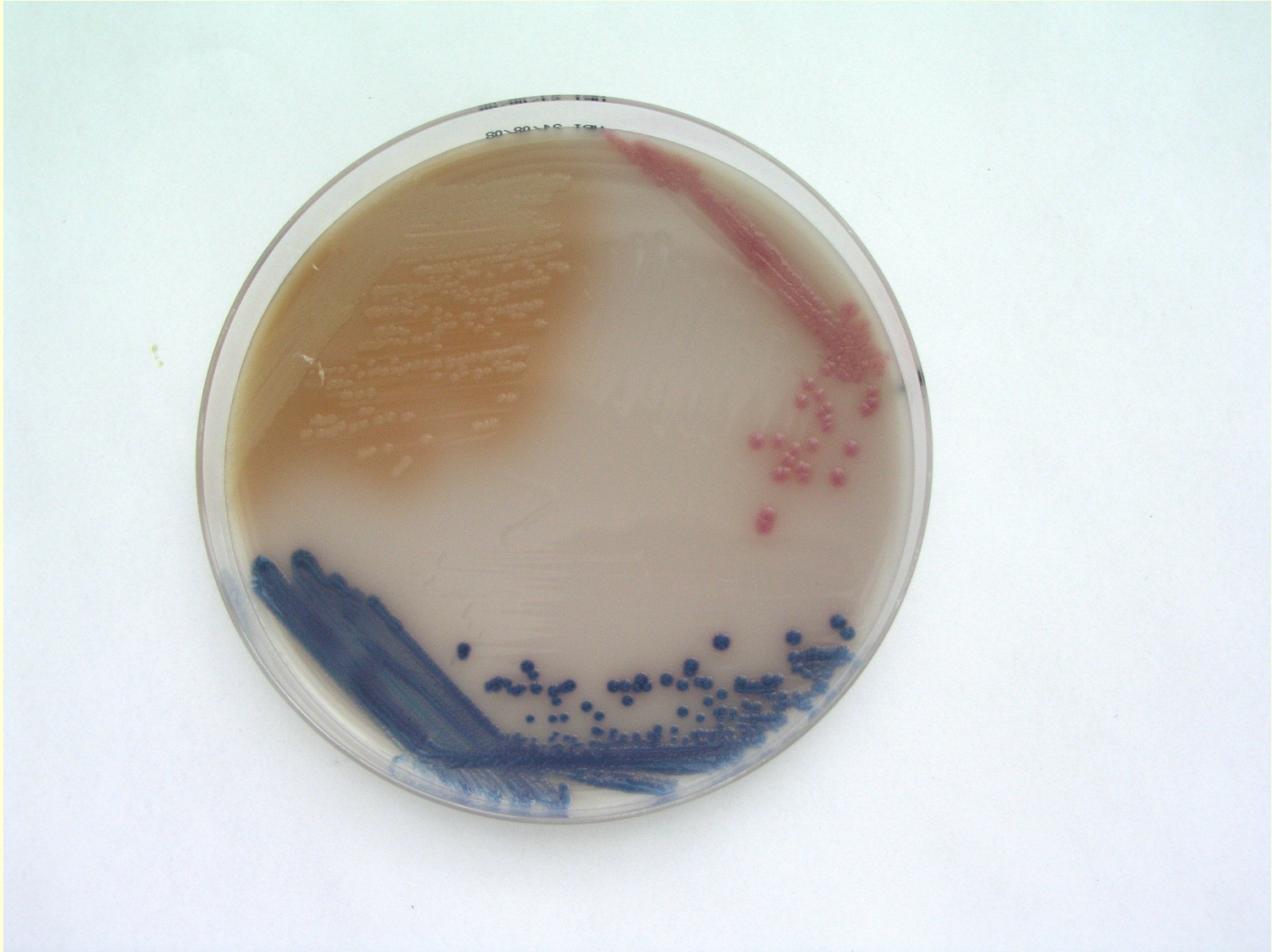
Charakteristické znaky *Salmonella* sp. na půdě dle Hajna a na půdě dle Švejcara



Identifikace 4 kmenů enterobakterií na Enterotestu 24 (Lachema)



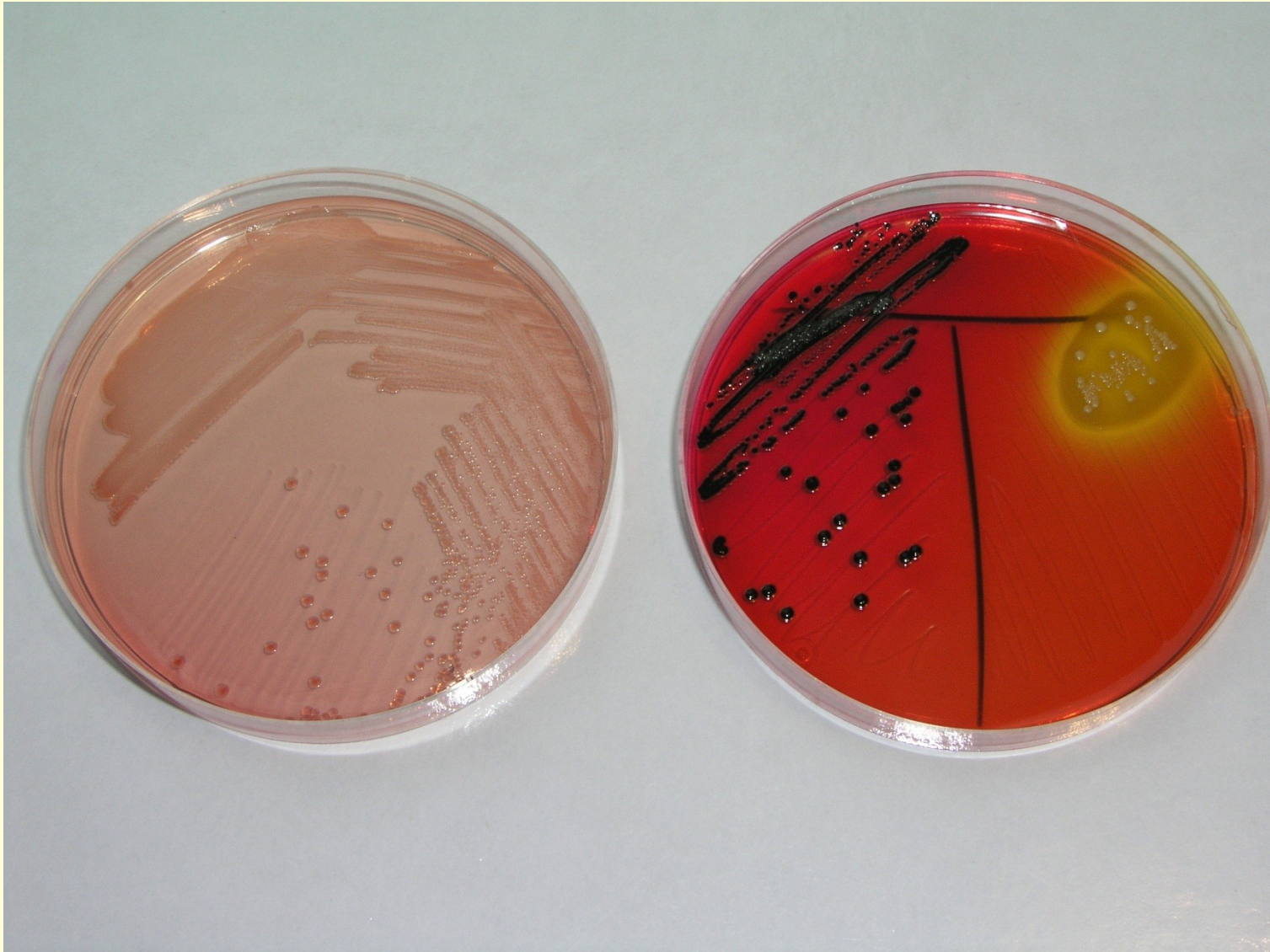
Chromogenní půda (žlutě roste *Proteus* sp.,
červeně *Escherichia coli*, modře *Klebsiella* sp.)



Typy půd

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

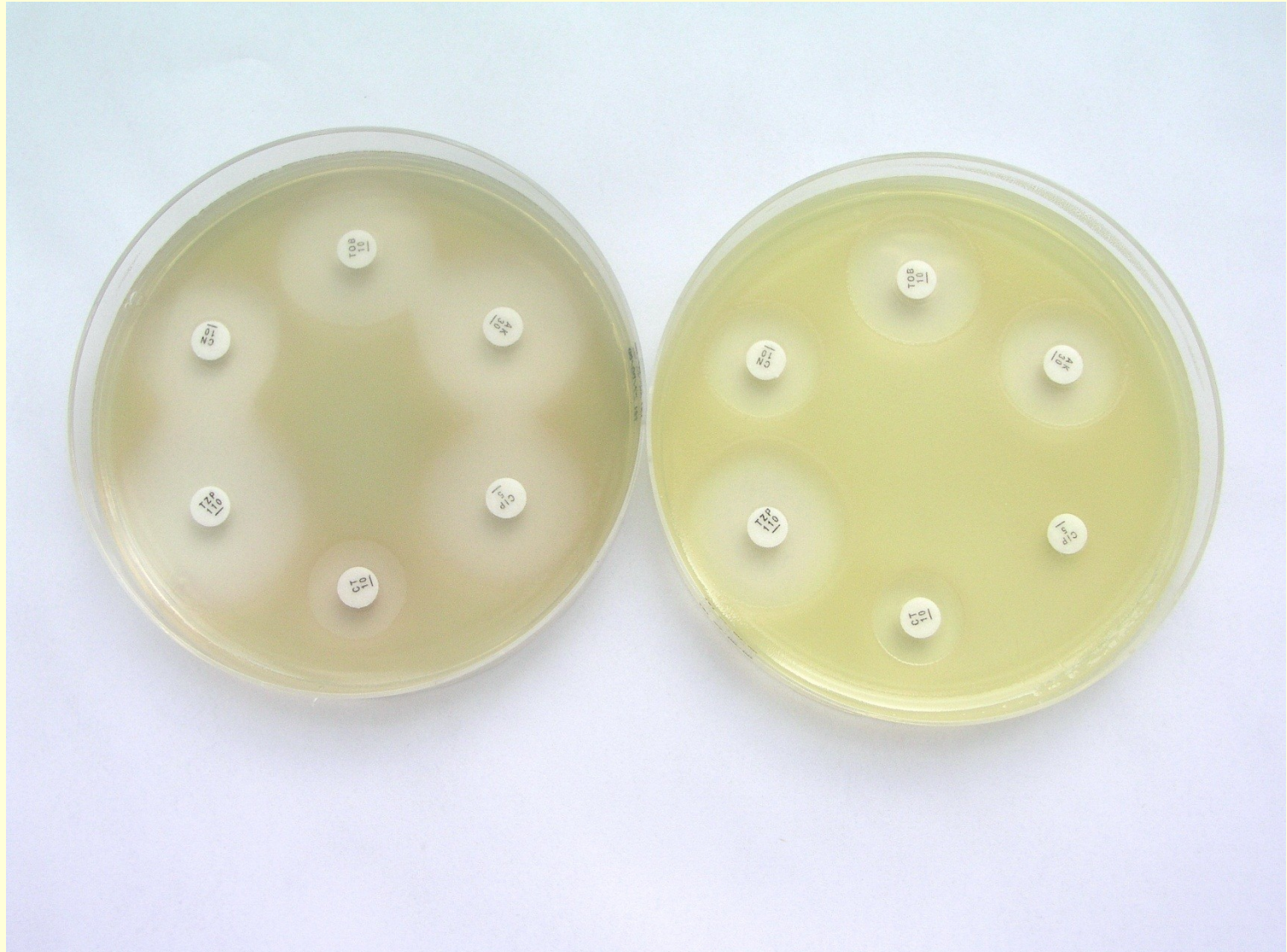
Salmonella sp. rostoucí na Endově půdě
(průhledné kolonie) a na XLD (černě)



Typy pŮd

- **PŮdy ke zjišťování testů citlivost**
 - MH – agar (Muellerův-Hintonové)
 - MH - bujón
- **PŮdy k uchování kultur**
 - Glycerolový sérový bujón
- **PŮdy transportní**
 - Amies

Testy citlivosti



Transportní půda s Amiesem



Lahvičky na hemokultury



