

# Lékařská mikrobiologie

Alena Ševčíková

OKM, FN Brno

# Lékařská mikrobiologie

- zabývá se mikroorganismy patogenními pro člověka
  - vyvolávající u něj onemocnění
- mikroorganismy přirozeně se u člověka vyskytující

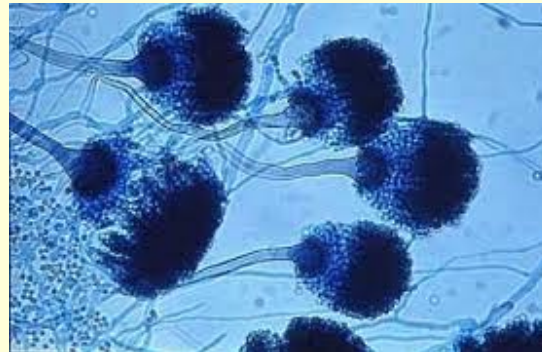
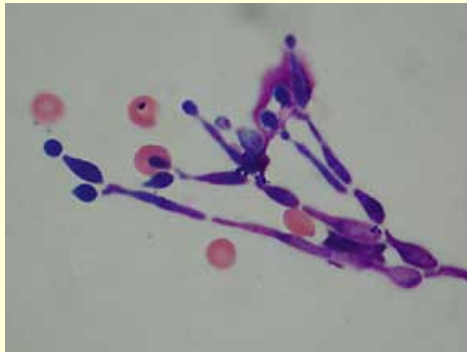
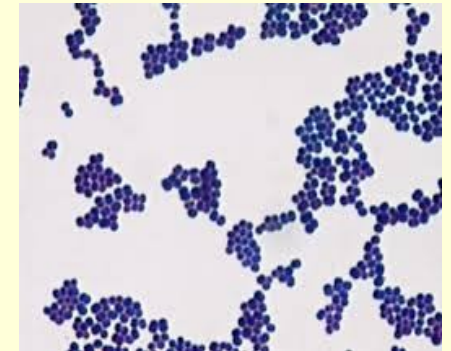
# Lékařská mikrobiologie

Virologie – 20 - 200nm

Bakteriologie - 1  $\mu\text{m}$

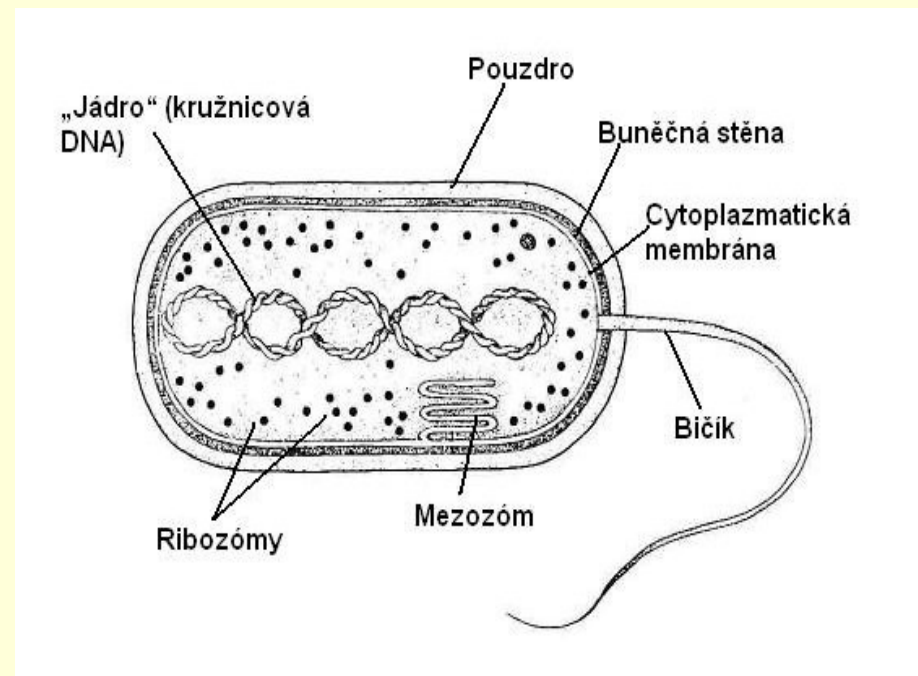
Mykologie - cca 10  $\mu\text{m}$

Parazitologie – 10 -150 $\mu\text{m}$



# Bakterie

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



- 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 800 000 let

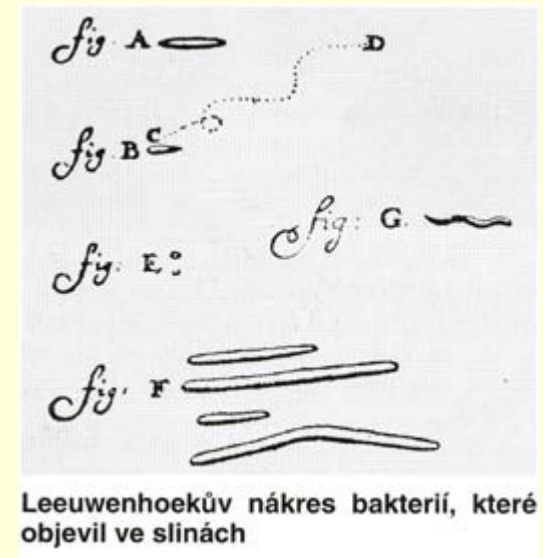
# Stručná historie



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

# Stručná historie

- **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



# 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

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



- 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 - 2015





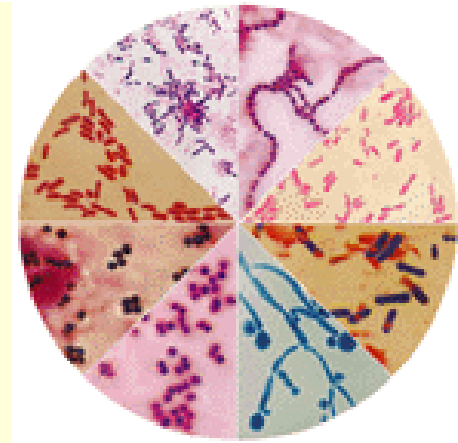
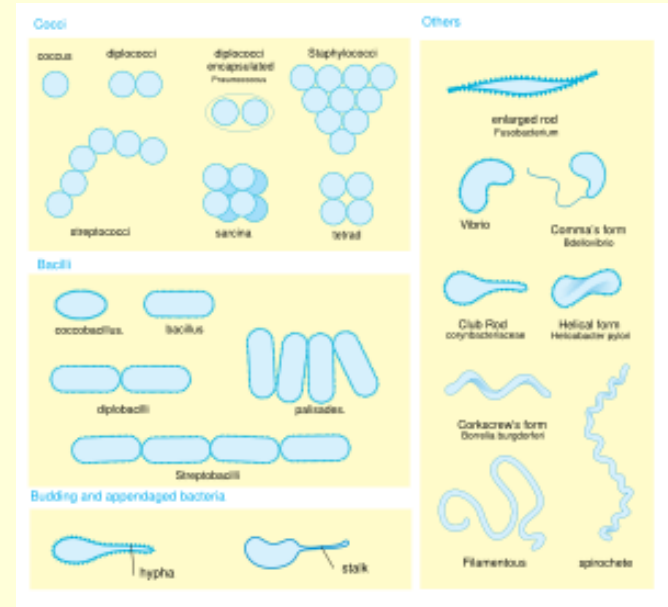
# Identifikace bakterií

- Postup, kterým zjistíme, že nově izolovaný kmen náleží do známého, pojmenovaného taxonu
  - **morfologické znaky** (tvar, velikost, uspořádání, barvitelnost bakteriálních 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

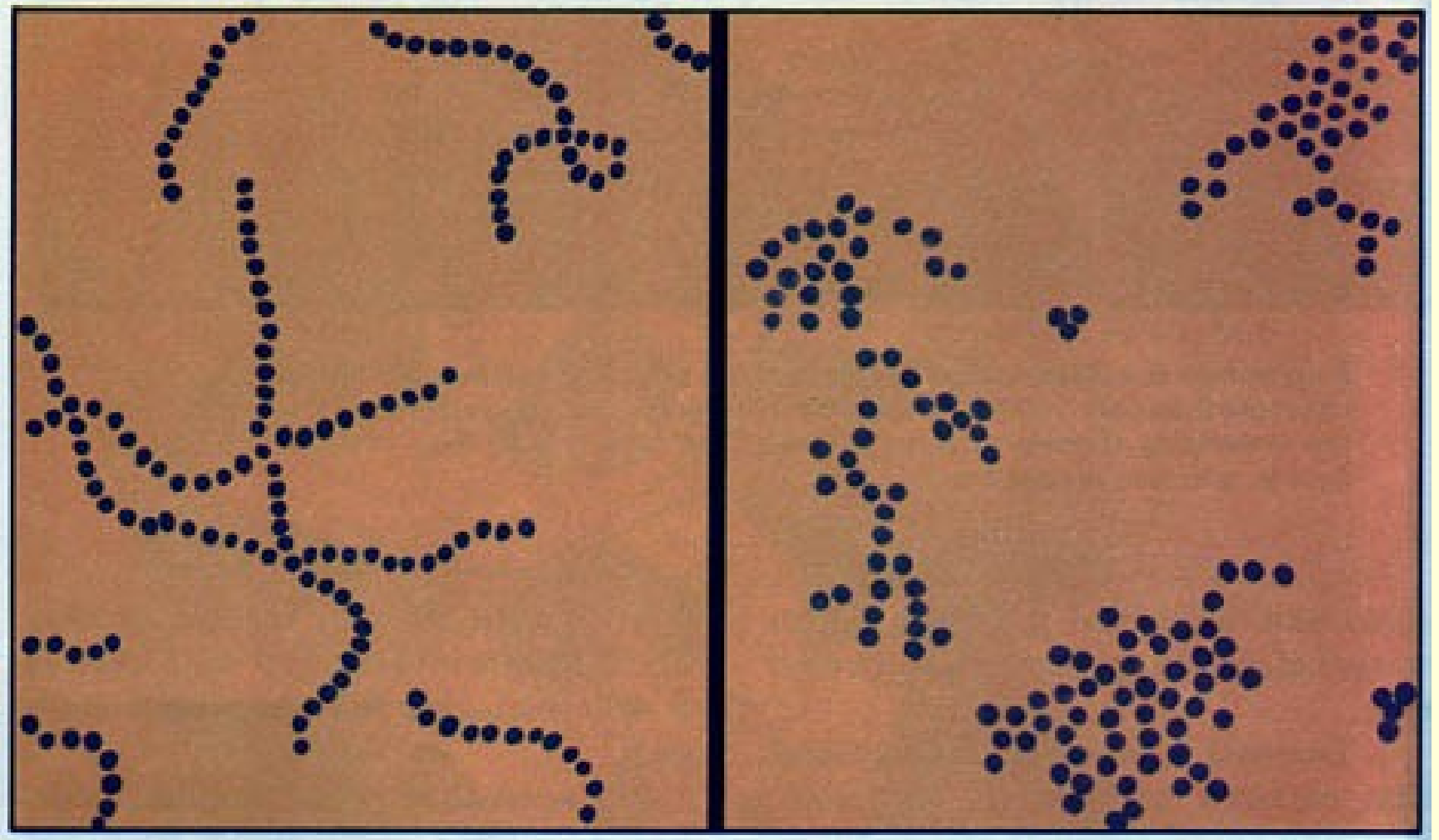
## mikroskopický preparát

- **Velikost** – většina patogenů 0,5 – 3  $\mu\text{m}$
- **Tvar a uspořádání**
  - koky ve dvojicích, řetězcích, shlucích, tetrádách
  - tyčinky
  - spirály
- **Barvitelnost** dle Grama
  - grampozitivní - modré
  - gramnegativní – červené
- dle acidorezistence



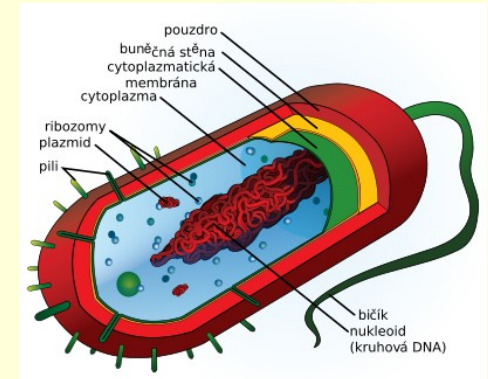


*Streptococcus* sp. - *Staphylococcus* sp.



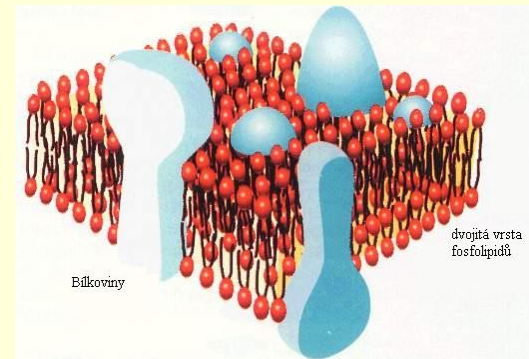
# Stavba bakteriální buňky

- **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



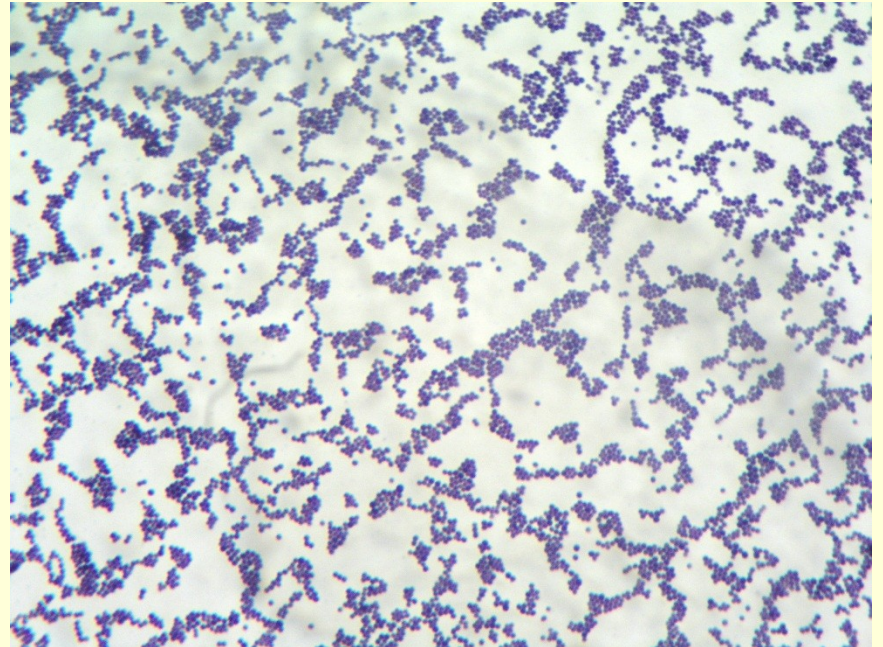
# Cytoplasmatická membrána

- 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)



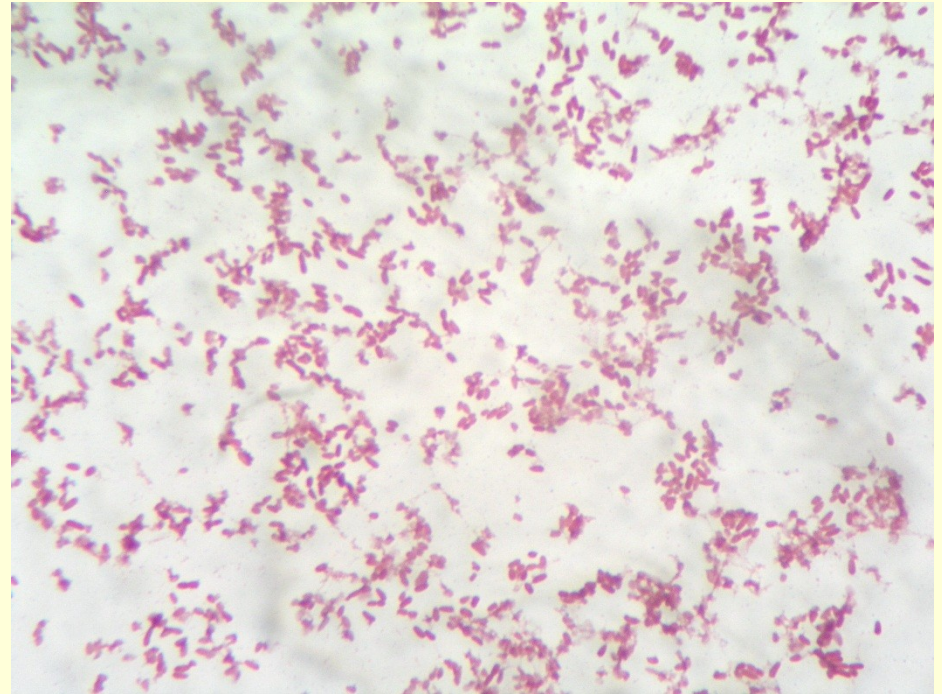
# Buněčná stěna

- 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



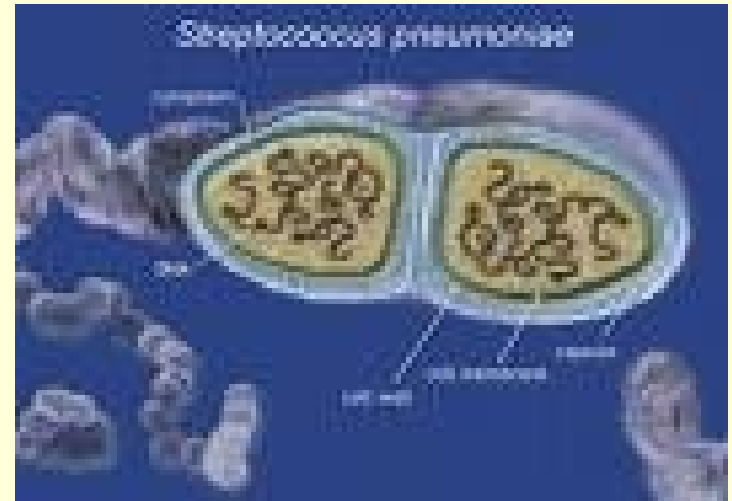
# Buněčná stěna

- 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



# 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 CO<sup>2</sup>: 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

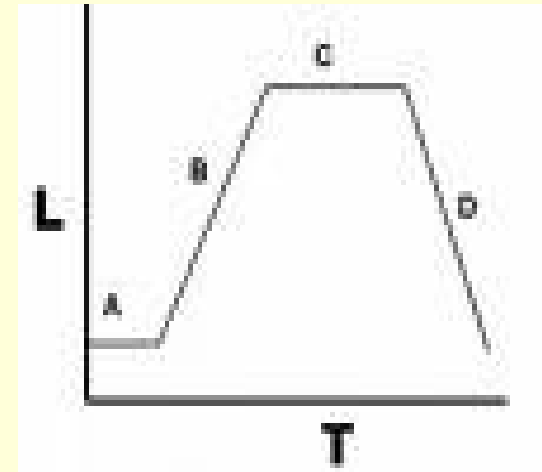
# Generační doba

- 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**

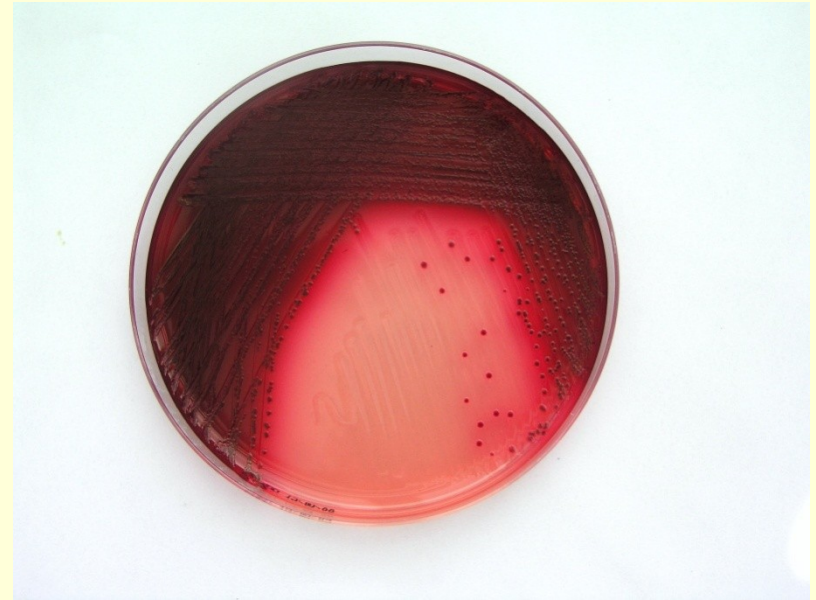
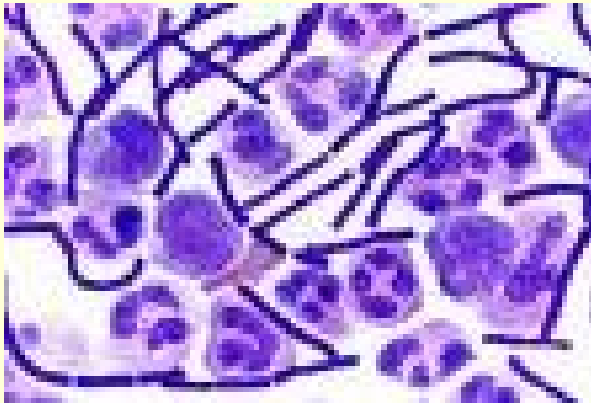
- Lag-fáze
- Logaritmická, exponenciální fáze
- Stacionární fáze
- Fáze odumírání



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

# Typy růstu

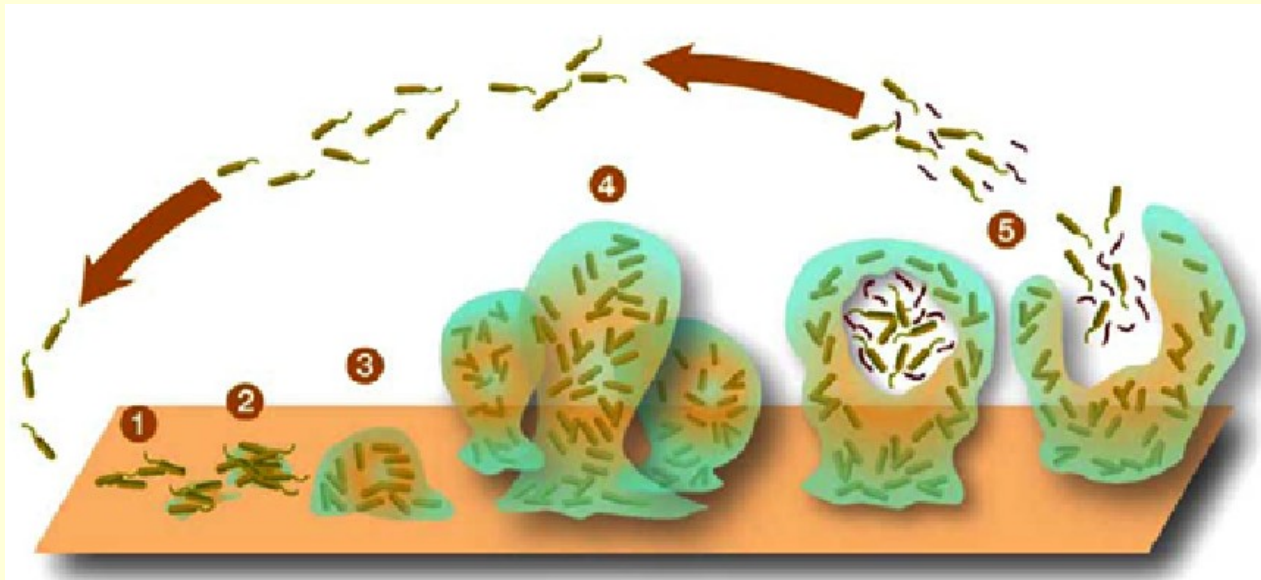
- **Planktonický růst**
  - v podobě izolovaných buněk





# 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 CO<sup>2</sup>
- **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 pŮidáním 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 ĉistou mikrobiální kulturu

# *Staphylococcus aureus* na krevním agaru

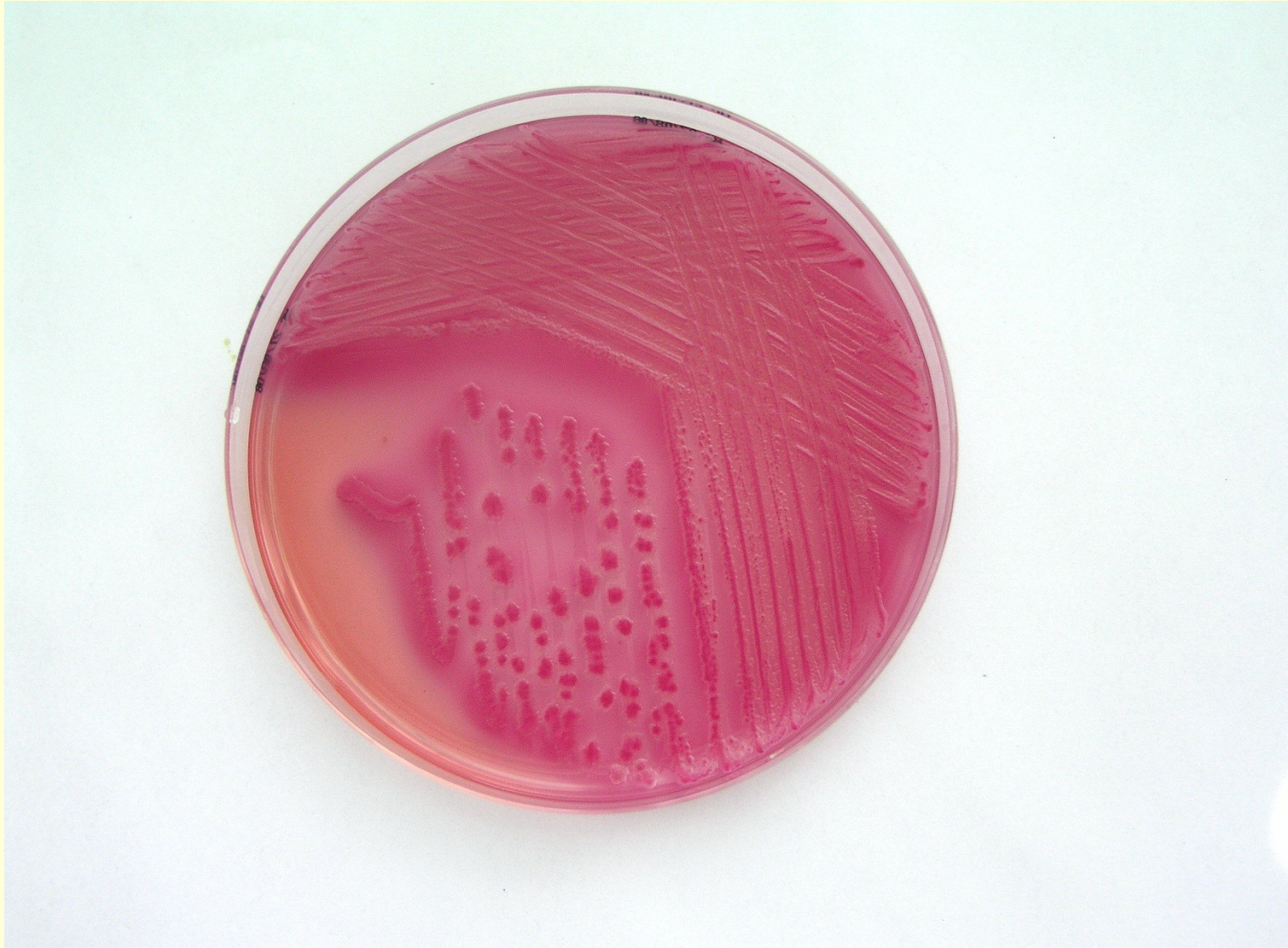


# Znaky bakteriální kolonie

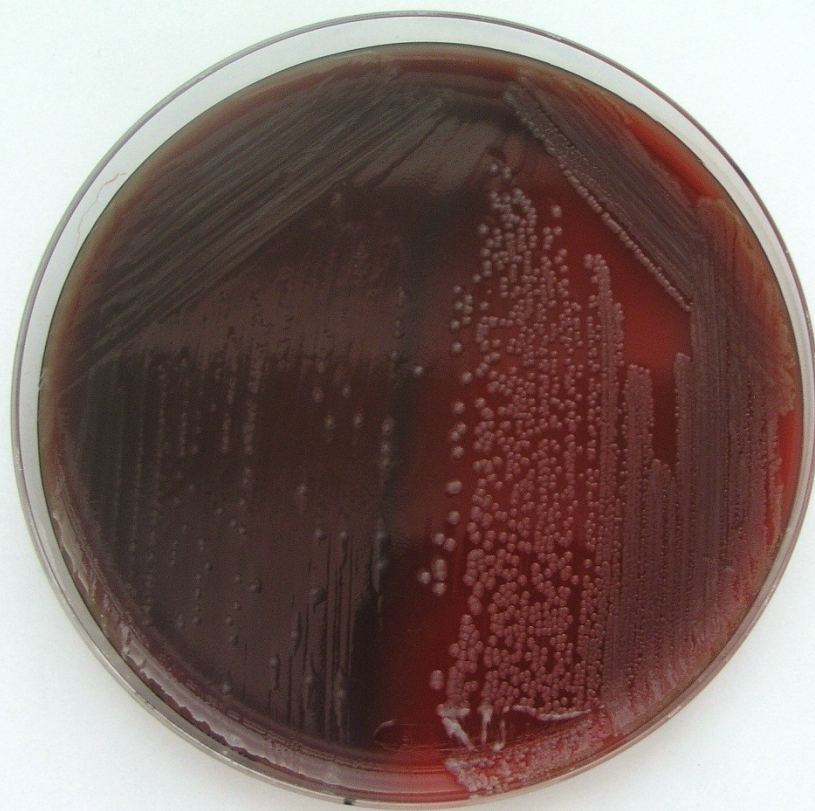
- **Velikost** – v mm
- **Tvar** – kulatý, laločnatý, plazící se
- **Profil** – plochý, vypouklý, miskovitý
- **Okraje** – rovné laločnaté
- **Povrch** – hladký, drsný, lesklý, matný
- **Transparence** – (ne)průhledná
- **Barva** – bílá, žlutá, bezbarvá
- **Změny v okolí** – zbarvení, hemolýza
- **Konsistence**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



*Escherichia coli*  
na MacConkey agaru



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



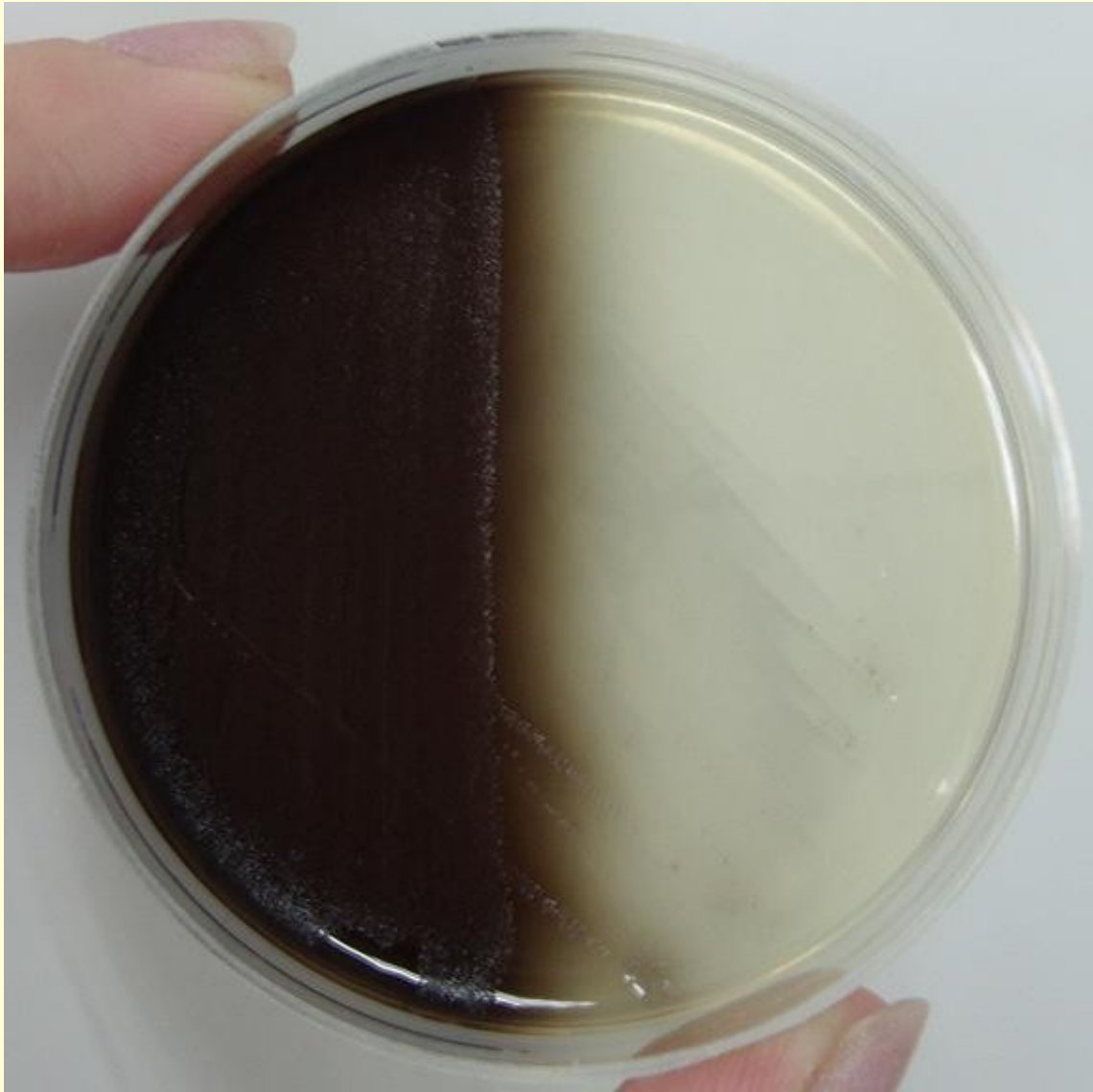
# Typy pŕd

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

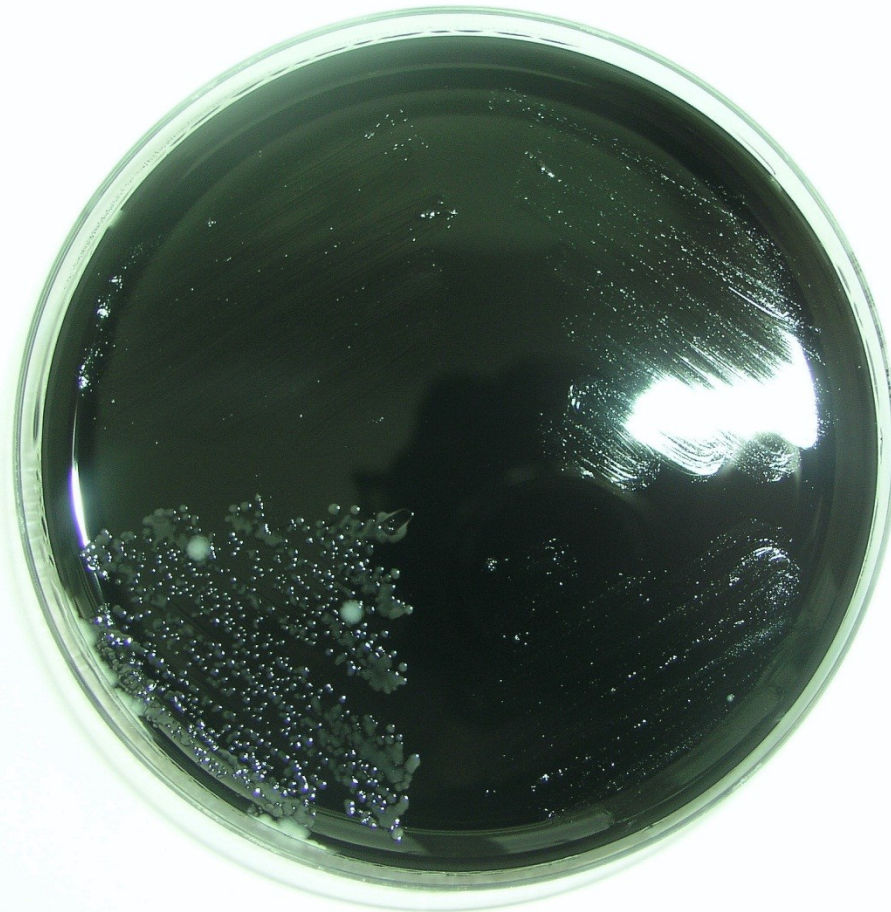
# Typy půd

- **Diagnostické půdy** – sledujeme, zda mikrob dokáže využít přidaný substrát,
  - štěpení cukrů, např. glukózy,
  - Desaminace fenylalaninu (proteus)
  - Dekarboxylace aminokyselin (lysin, arginin, ornithin)
  - Štěpení močoviny, redukce nitrátu,
  - Tvorba H<sub>2</sub>S, indolu, acetoinu, využití citrátu
  - Průkaz enzymu - kataláza, oxidáza, Pyr-test, ONPG
  - Chromogenní půdy, kombinované půdy Hajn,
  - Pestrá řada, komerční soupravy,

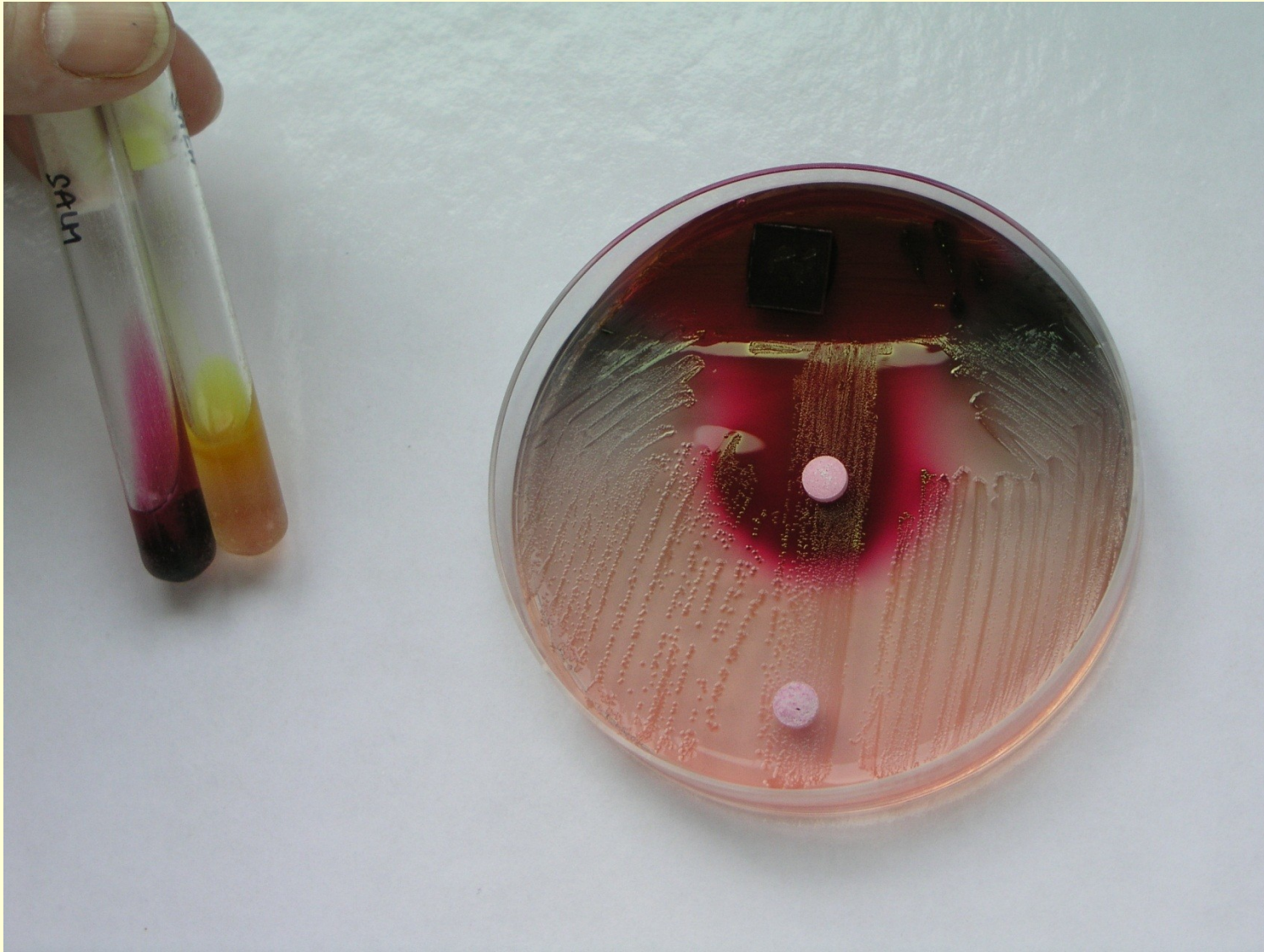
# Černé kolonie vankomycin rezistentního enterokoka na selektivní půdě



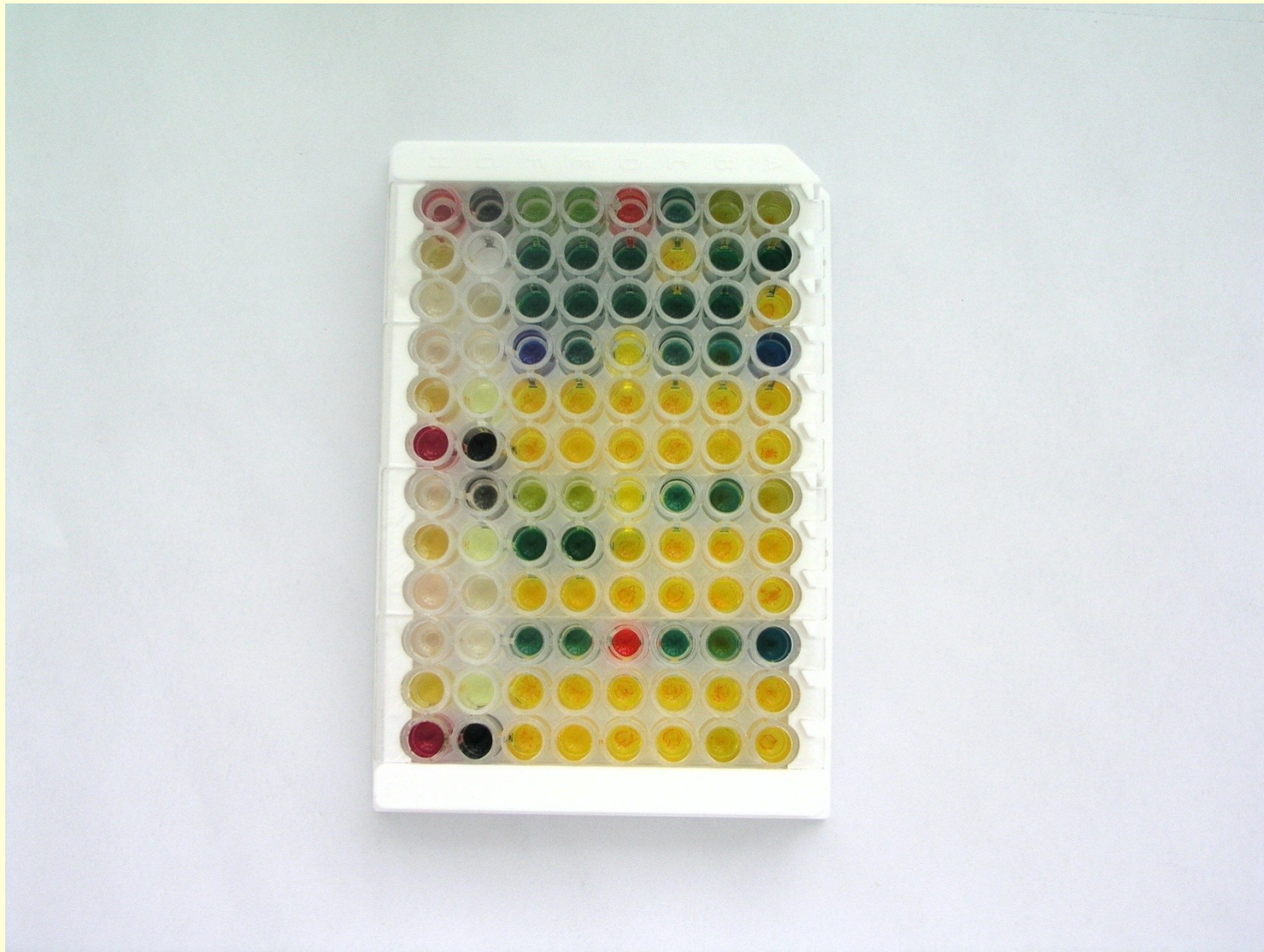
*Campylobacter* sp.  
na selektivní půdě



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

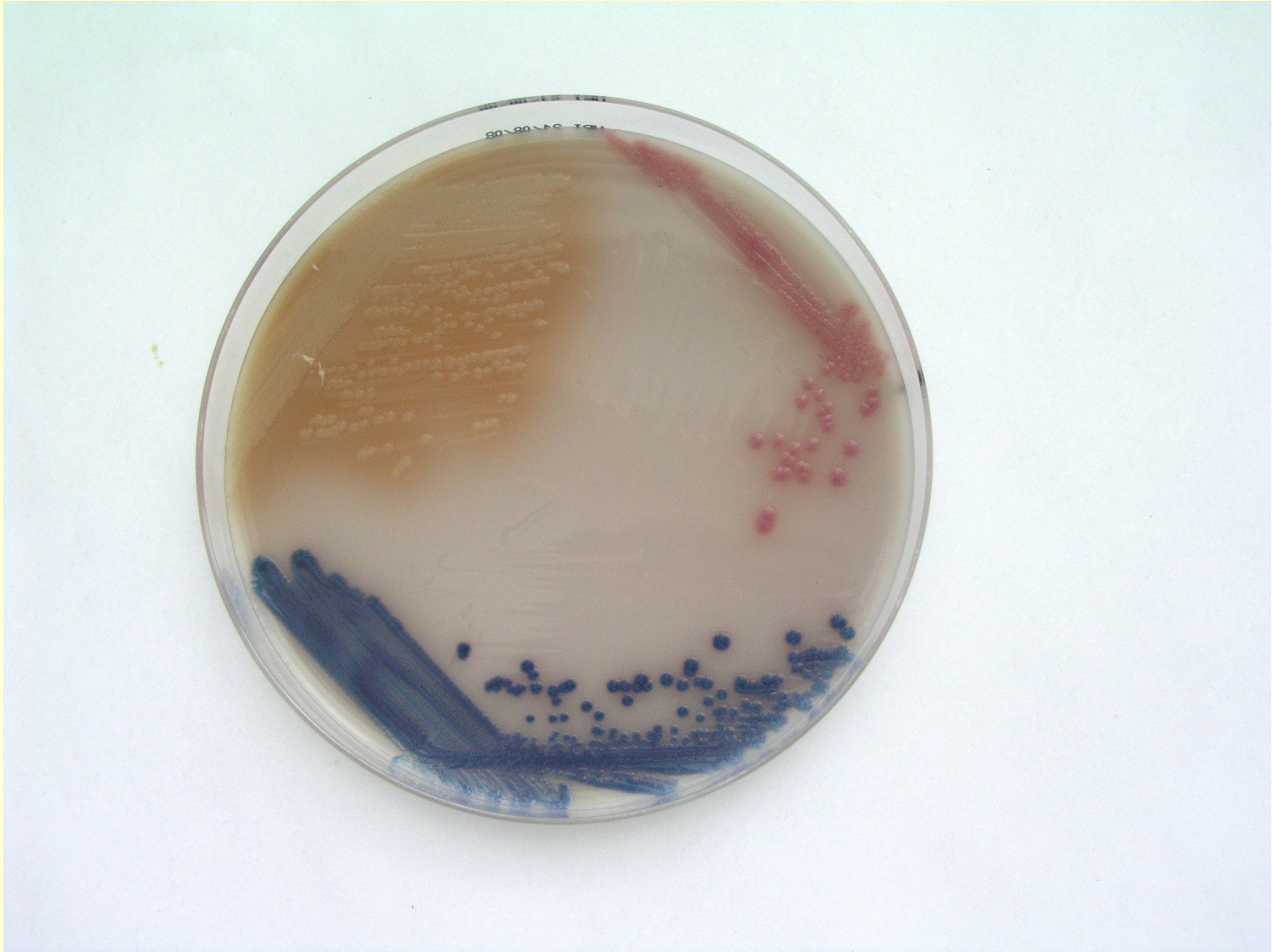


# Identifikace 4 kmenů enterobakterií na Enterotestu 24 (Lachema)





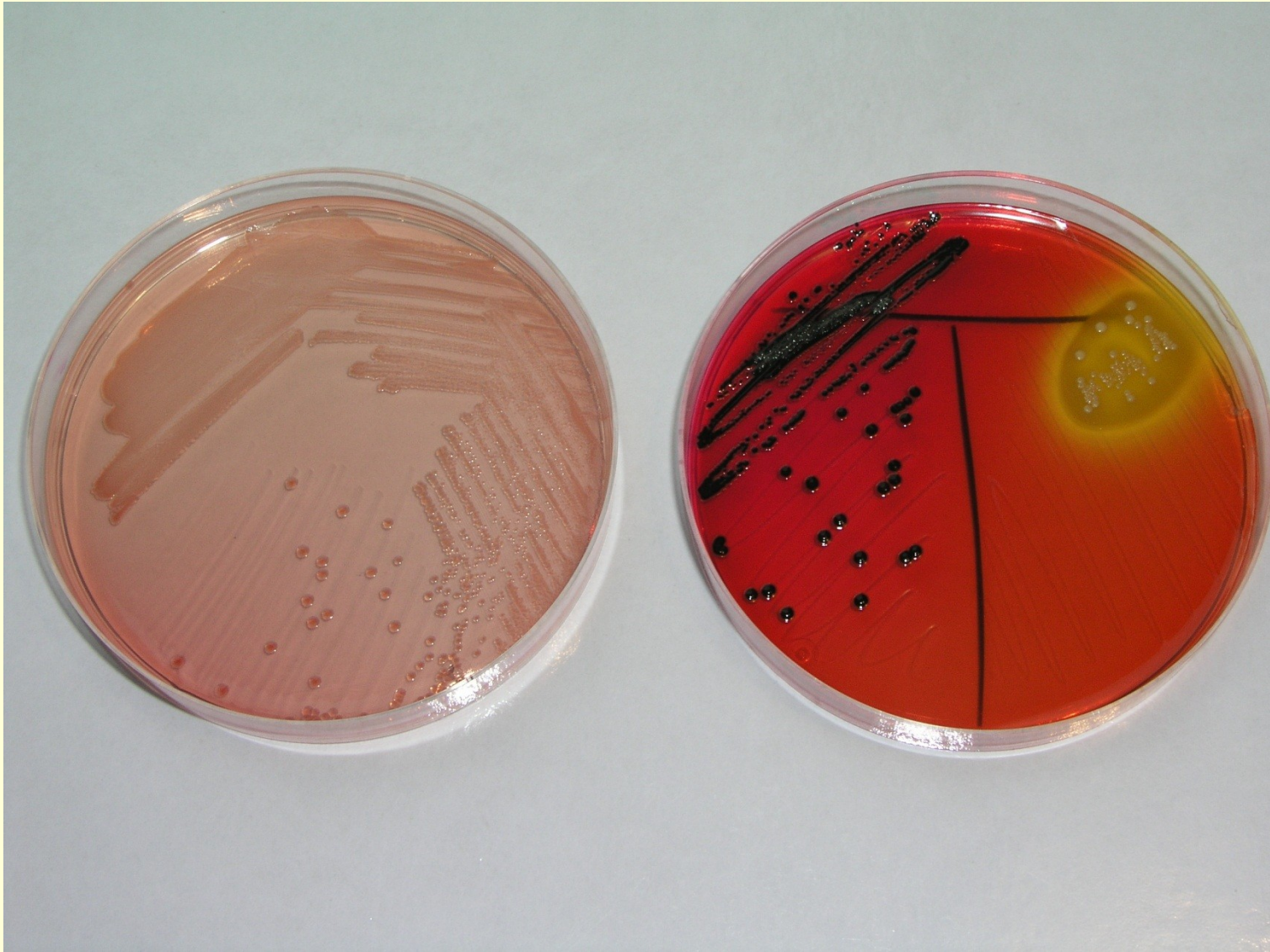
Chromogenní půda (žlutě roste *Proteus* sp.,  
červeně *Escherichia coli*, modře *Klebsiella* sp.)



# 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

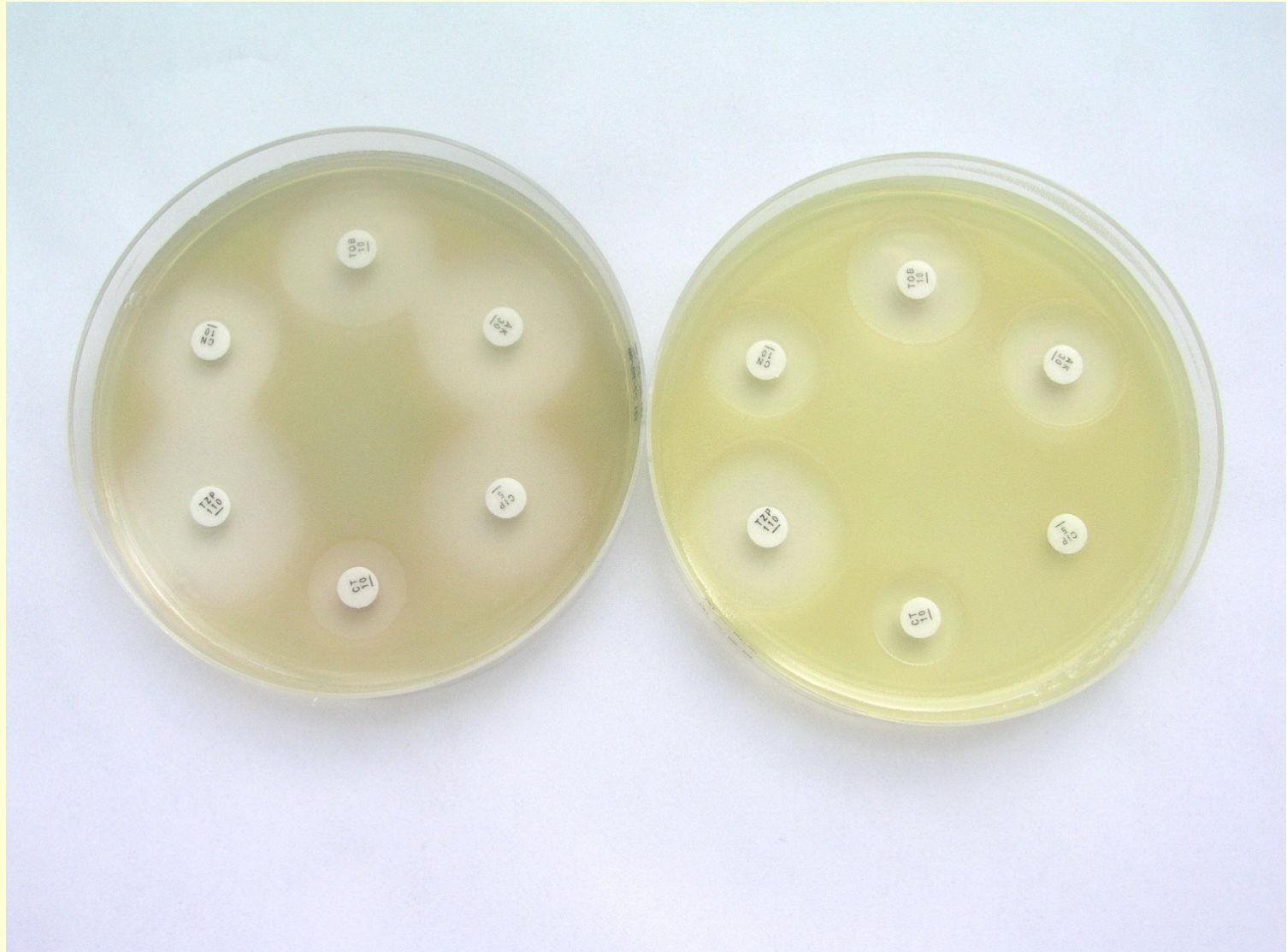
*Salmonella* sp. rostoucí na Endově půdě  
(průhledné kolonie) a na XLD (černě)



# 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

