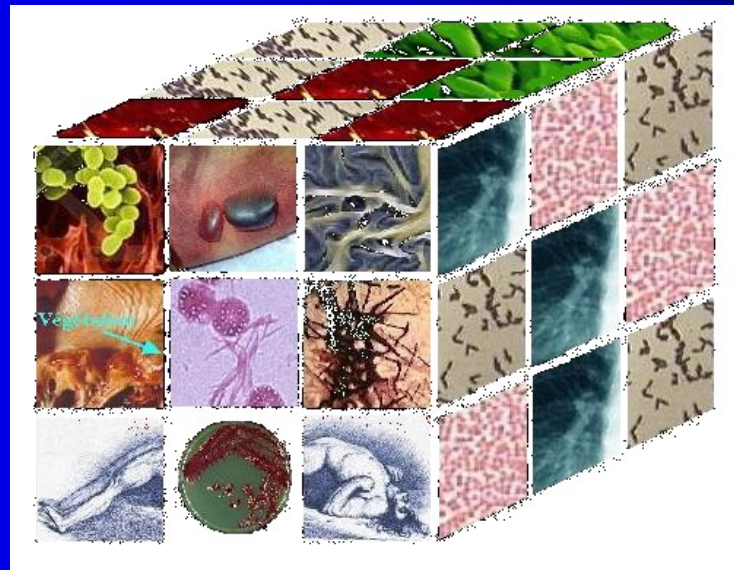


Mikroby a lidské tělo



Mikrobiologie a imunologie – RV2BP_MIKR

Ondřej Zahradníček

zahradnicek@fnusa.cz

Abych se představil

- MUDr. Ondřej Zahradníček
- povolání: **klinický mikrobiolog**, asistent na LF MU; učíme u nás bakalářské obory, mediky, zubaře i studenty PŘF a od předloňska 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 také visí **skripta**
- V případě zájmu mohu dodat různé další materiály

Náš
ústav



Výuka

Výzkum

Provoz
(analýza
klinických
vzorků)

Foto: Archiv MU

V naší praktikárně



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“, než 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 Kropáčka, 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

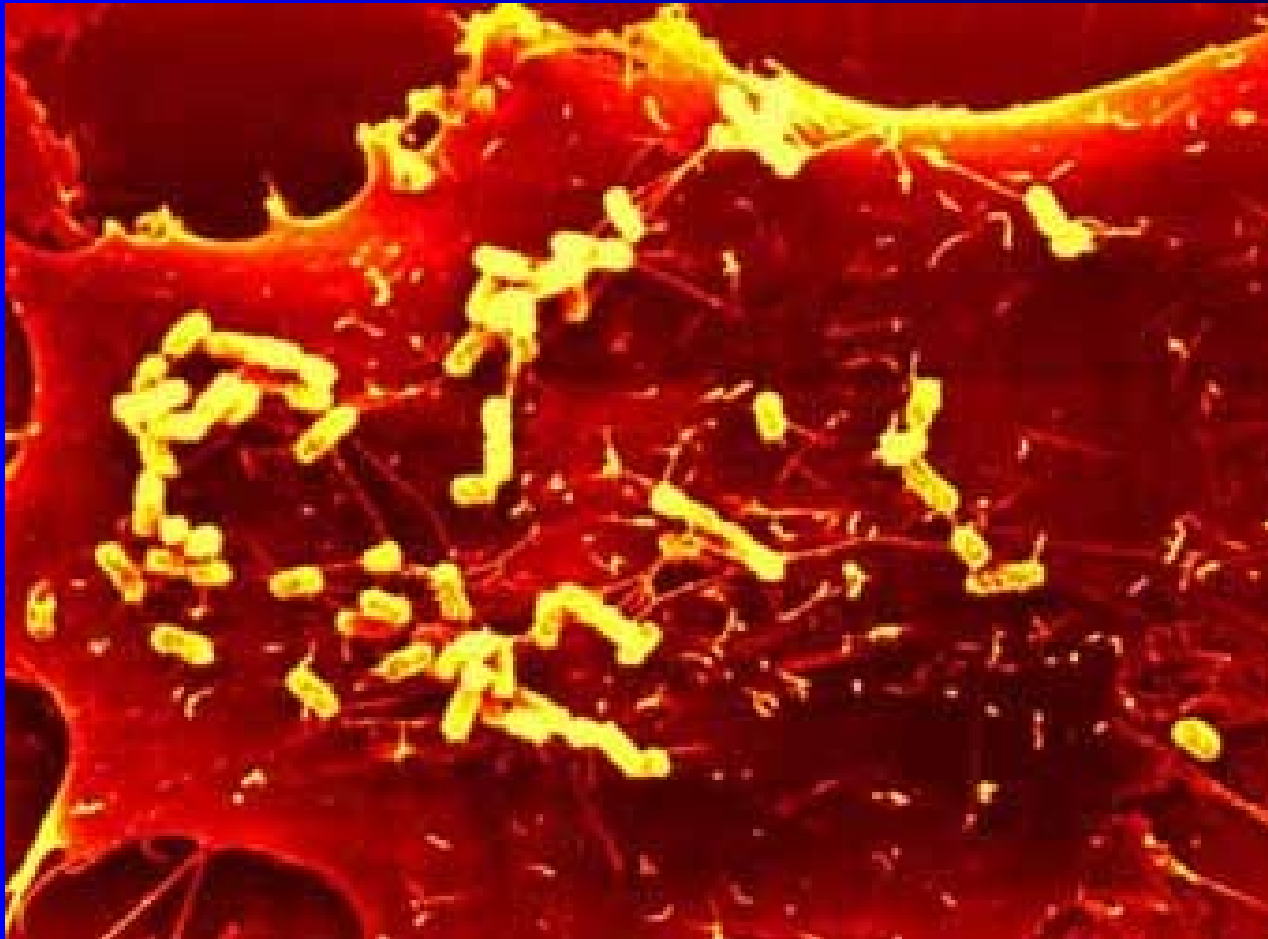
Kdo zkoumá mikroby

- **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

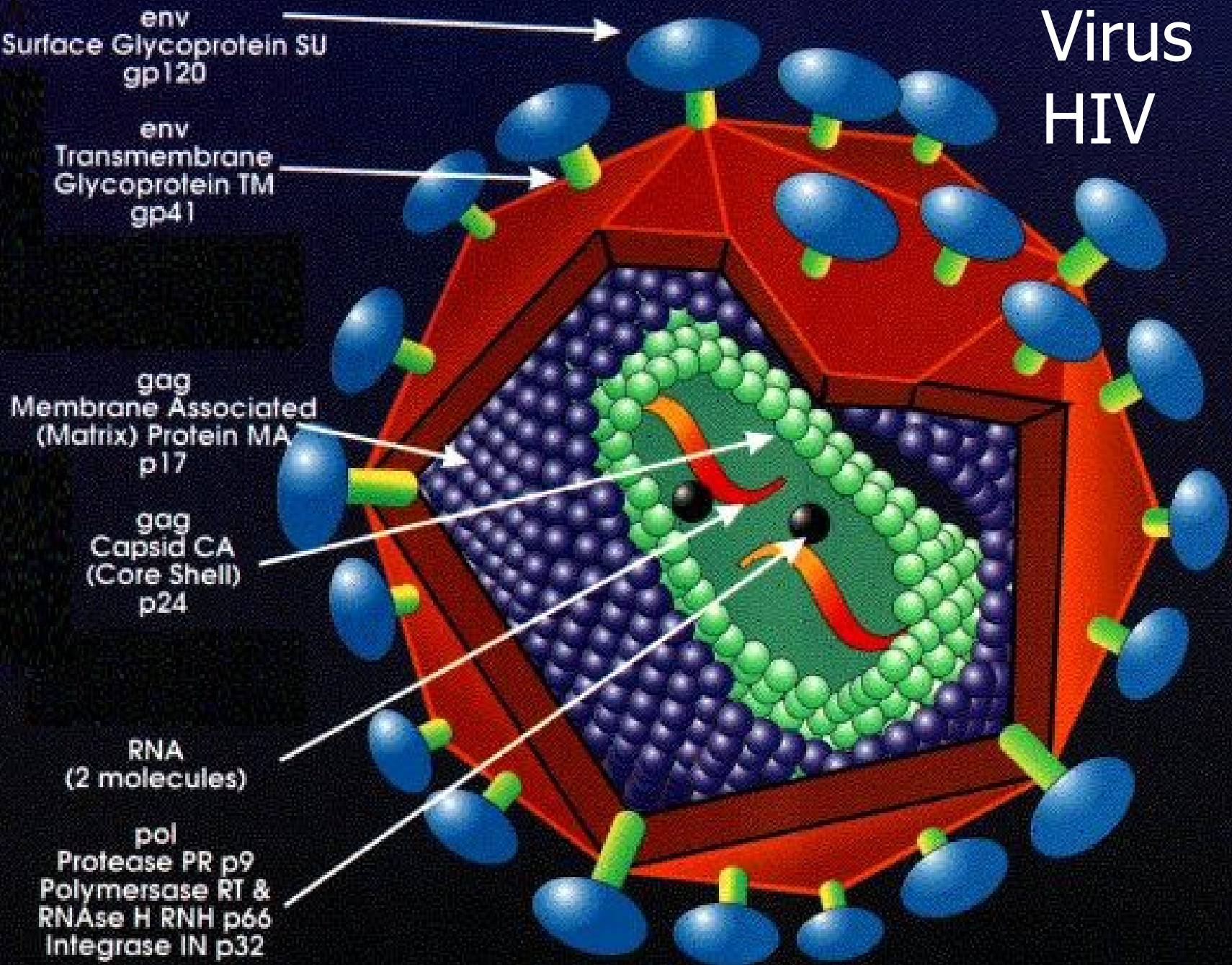
Co zkoumají kliničtí mikrobiologové

- 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 mikroblem 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



Virus HIV



Ebola

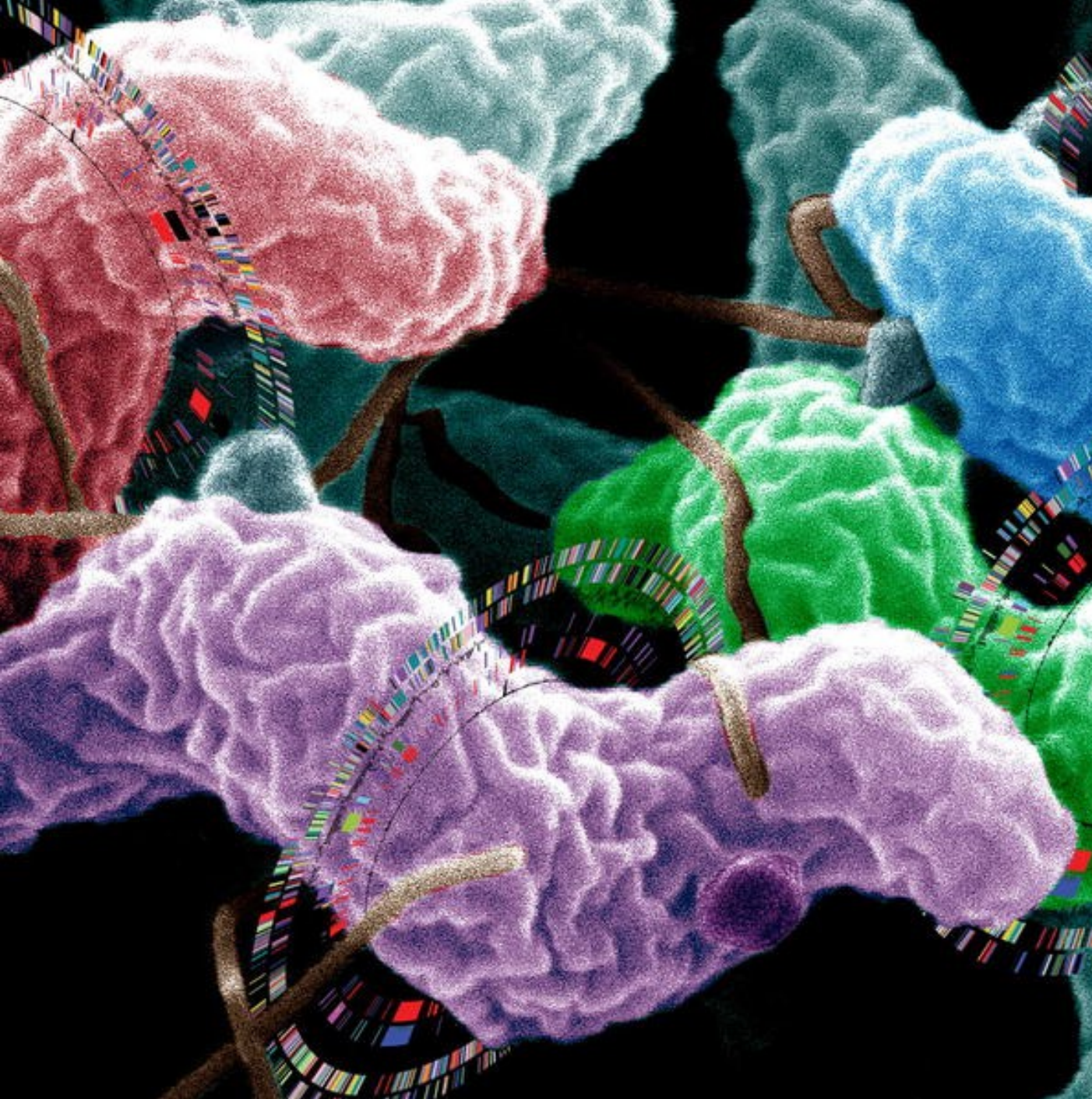


Co je to mikrob

- **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



Neisserie

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

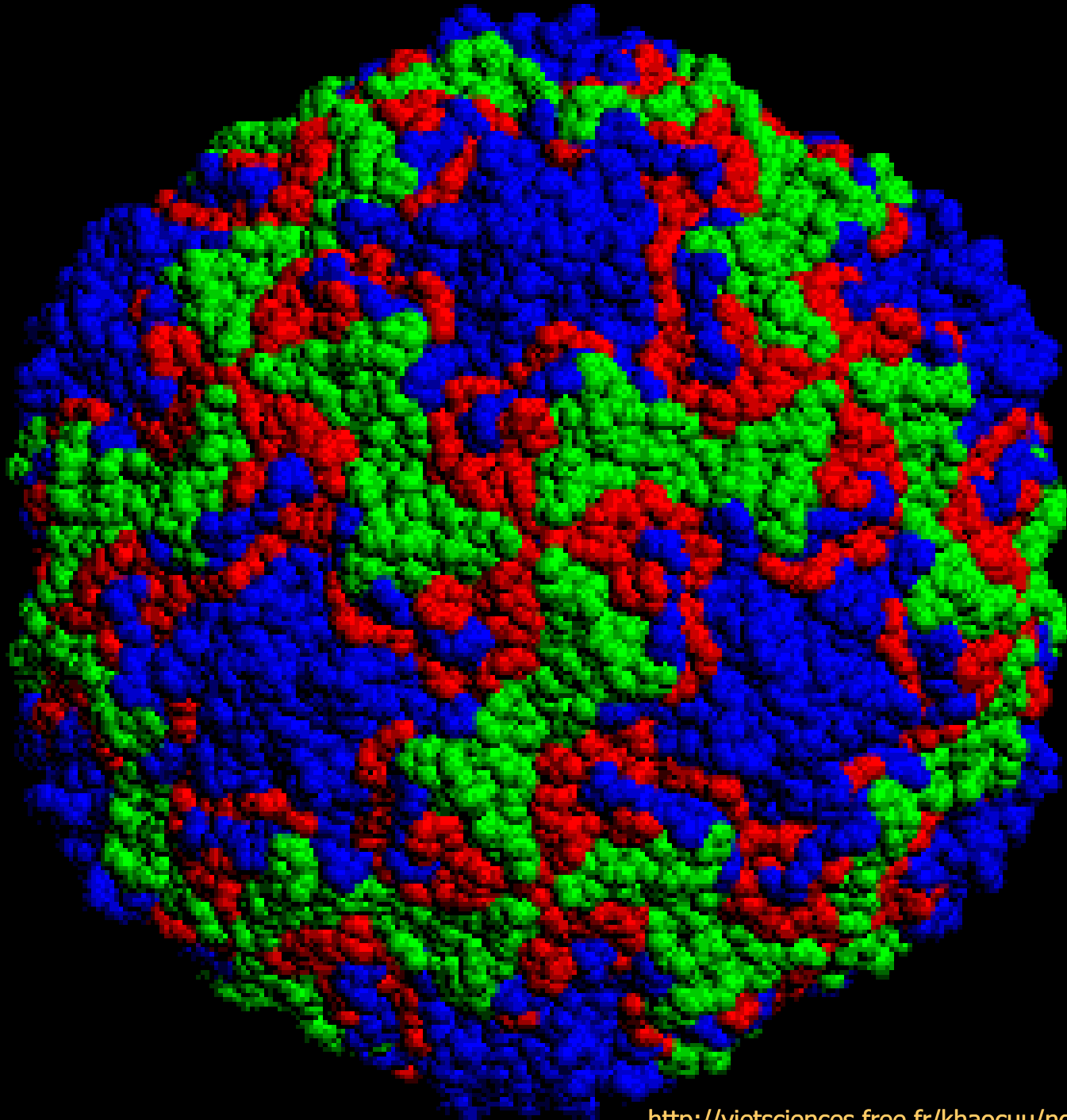


Hlavní klinicky významné mikroby

- **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)

Listeria monocytogenes



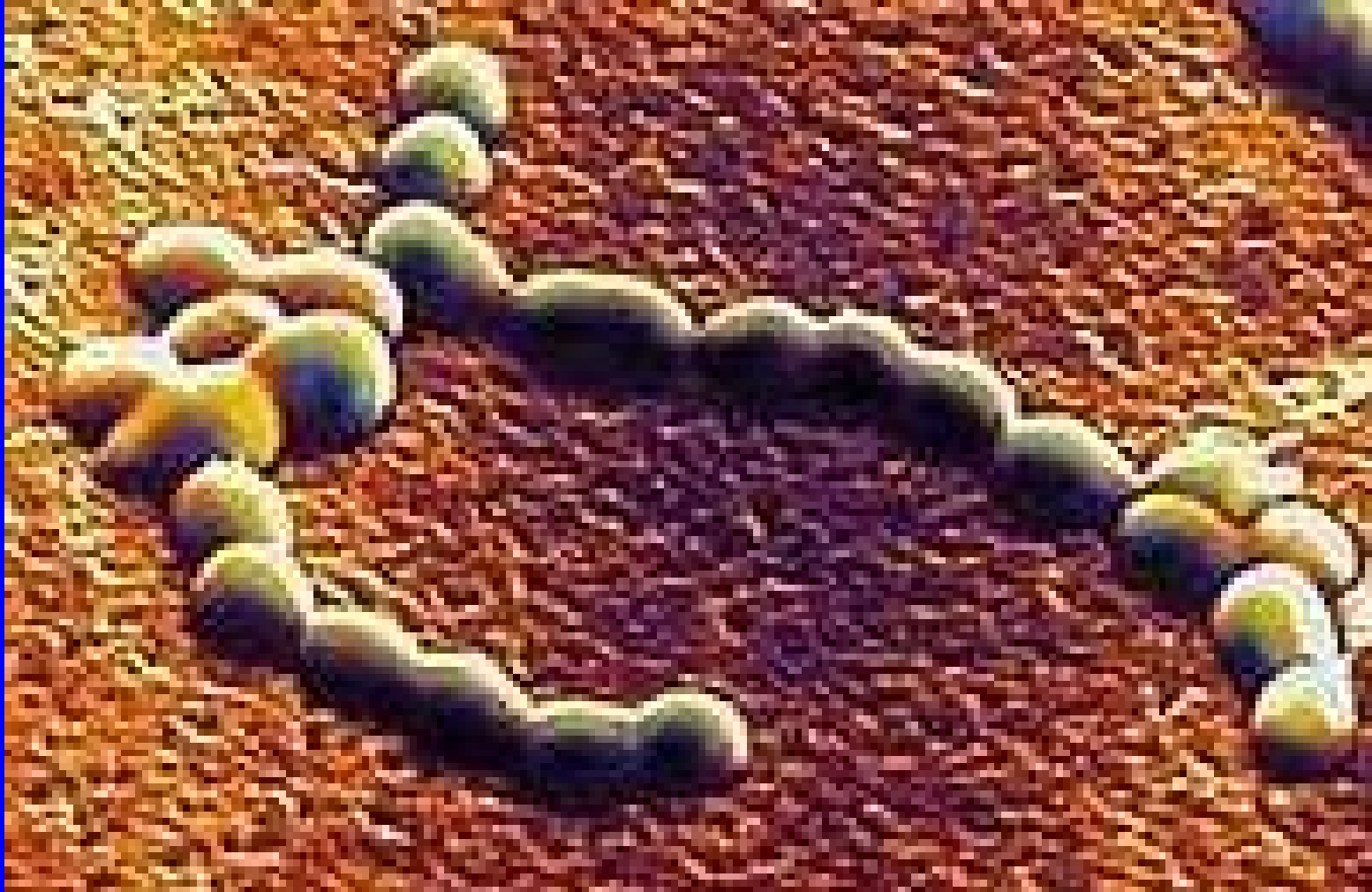


Virus
běžné
řýmy

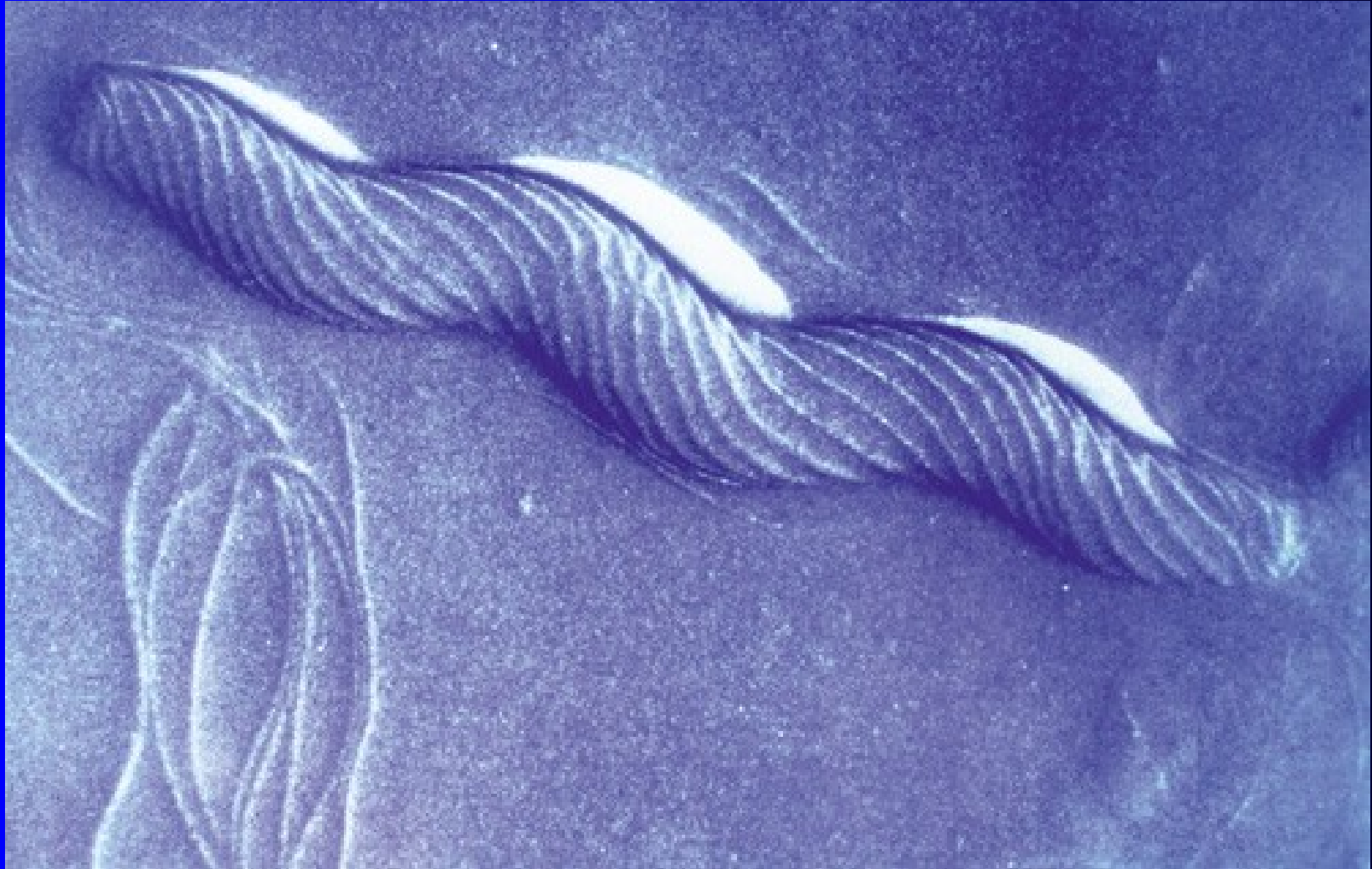
Tvary a uspořádání bakterií

- **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 mohou být různě uspořádané
- **Spirochety** – tenké spirálovité bakterie
- **Beztvaré bakterie**, například mykoplasmata (nemají buněčnou stěnu, takže nemají tvar)

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



Zprohýbaná tyčinka – helikobakter



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

Spirochety

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

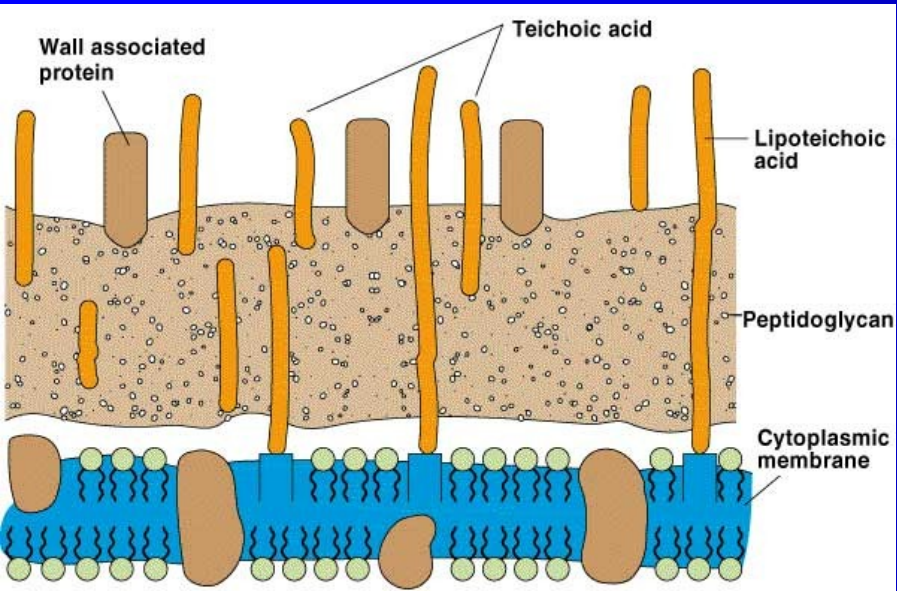


idsc.nih.gov/.../k03/k03_012/k03_012.html

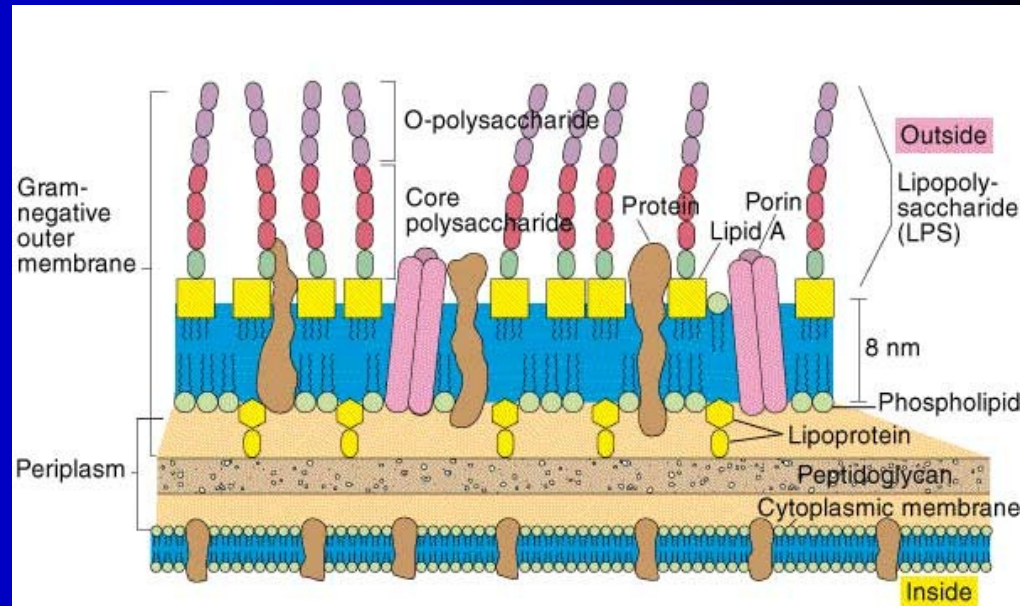
Typ buněčné stěny bakterií

- **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

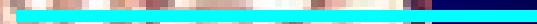


<http://www.arches.uga.edu/~emilyd/mibo3510/gm-%2520cell%2520wall.jpg>

G+



G-



Bakterie s bičíky (*Escherichia coli*)



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

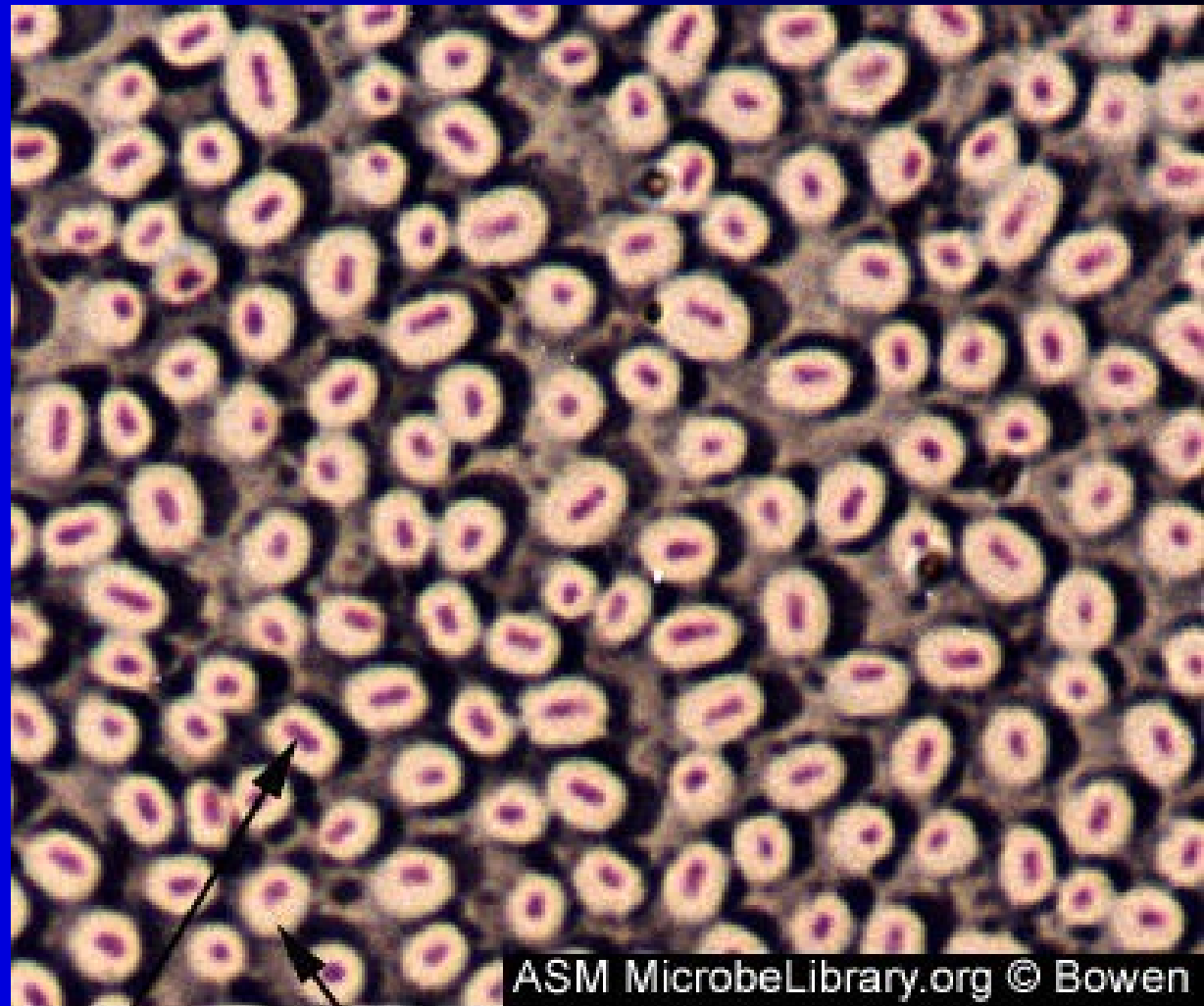
Pouzdro a biofilm

- **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 více v další části této prezentace

Neobarvené pouzdro

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

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



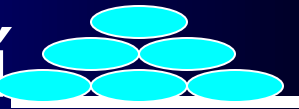
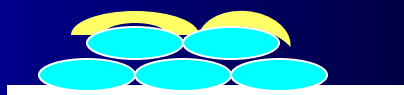
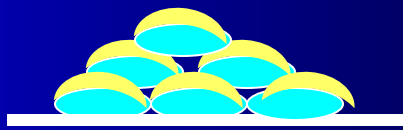


ASM MicrobeLibrary.org © Bowen

Cell

Capsule

Vznik biofilmu

- Na začátku je pevný povrch a plovoucí bakterie 
- Bakterie přilne na povrch 
- Následuje shlukování dalších bakterií 
- Bakterie začnou produkovat polysacharidovou hmotu 
- Až vznikne třídímenzionální struktura zvaná biofilm 

Detekce biofilmů na jazyku 😊



Červený jazyk jedné studentky v praktiku věnovaném průkazu ústního biofilmu

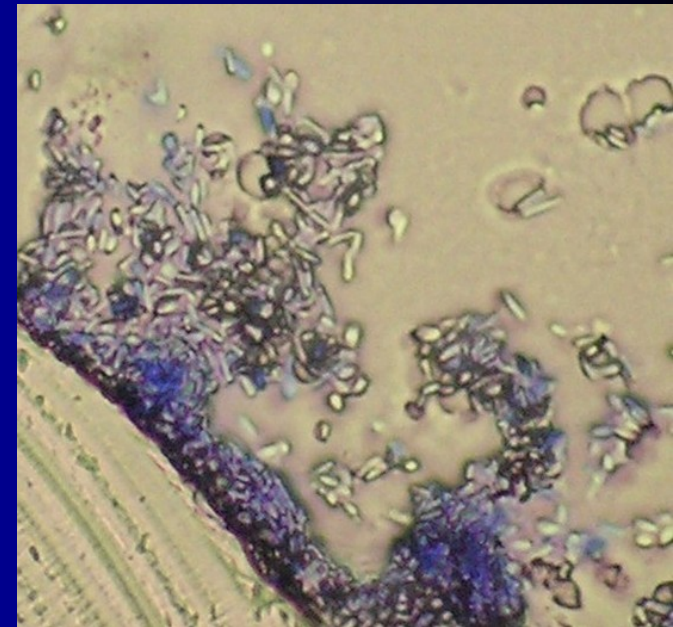
Význam tvorby biofilmu u bakterií

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 (nemusí zabrat!)
- imunitní reakci hostitele

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



Patologický biofilm – příběh

- Muž, 58 let, v roce 2001 zaveden kardiostimulátor, v roce 2002 opakovaně hospitalizován na interním oddělení s teplotami nejasného původu
- V kultivaci krve (hemokultivaci) prokázán *Staphylococcus epidermidis* s velmi dobrou citlivostí
- Několikrát dlouhodobě přeléčován vysokými dávkami antibiotik v kombinacích

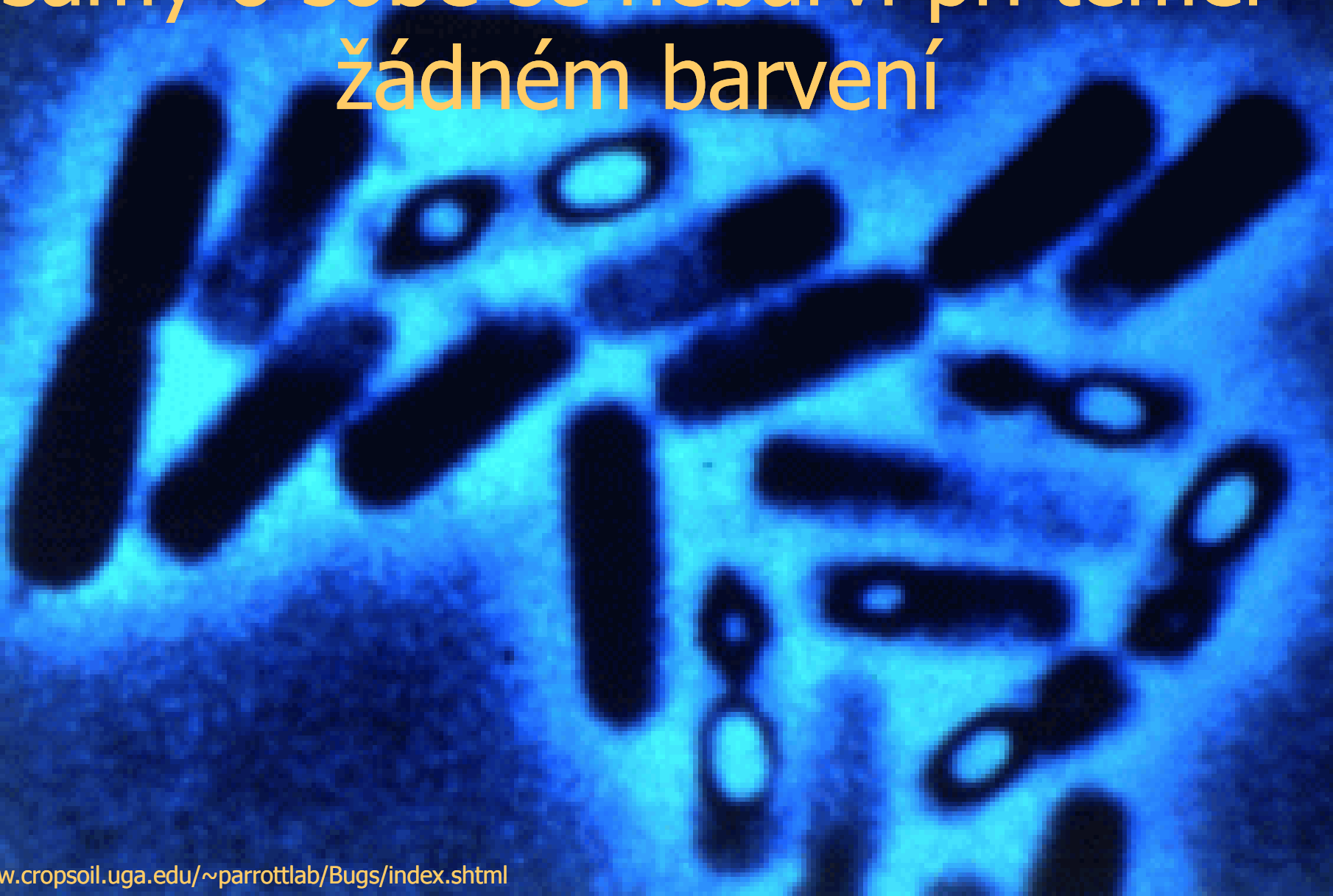
Příběh – pokračování

- Zpočátku vždy dobrá odezva, poté se ale vždycky objevují **znovu teploty**.
- Je proto nasazena terapie **velmi silnými antibiotiky**, po zlepšení stavu je pacientovi **vyměněna elektroda** a to vede k celkovému zlepšení stavu pacienta.

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**
- *Neplet' me si spory bakterií a spory hub!*

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



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, nepletme 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

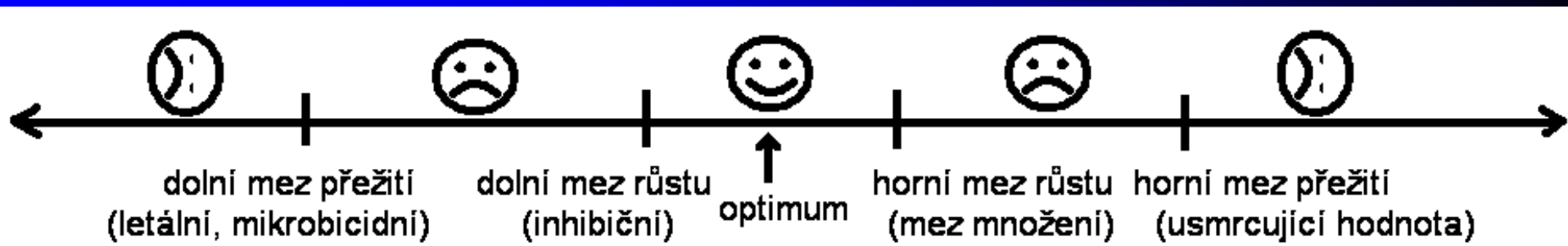
V jedné z našich laboratoří

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 přeživala. **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 mikroba a hostitele

- 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** (komezalismus, 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“



Plazivá bakterie *Proteus* se podílí na likvidaci nestrávených bílkovinných zbytků potravy. Je to typický saprofyt.

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

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, 1996 <http://mdchoice.com/>)

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**, zvláště 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.

Na čem záleží, jak těžký průběh bude mít infekční nemoc?

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

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 **menopauze**
- **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**, zvláště 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, <i>Entamoeba coli</i>
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, vaječnicích
 - **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)

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 kmény 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 violet'...
 - ...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. violet'	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

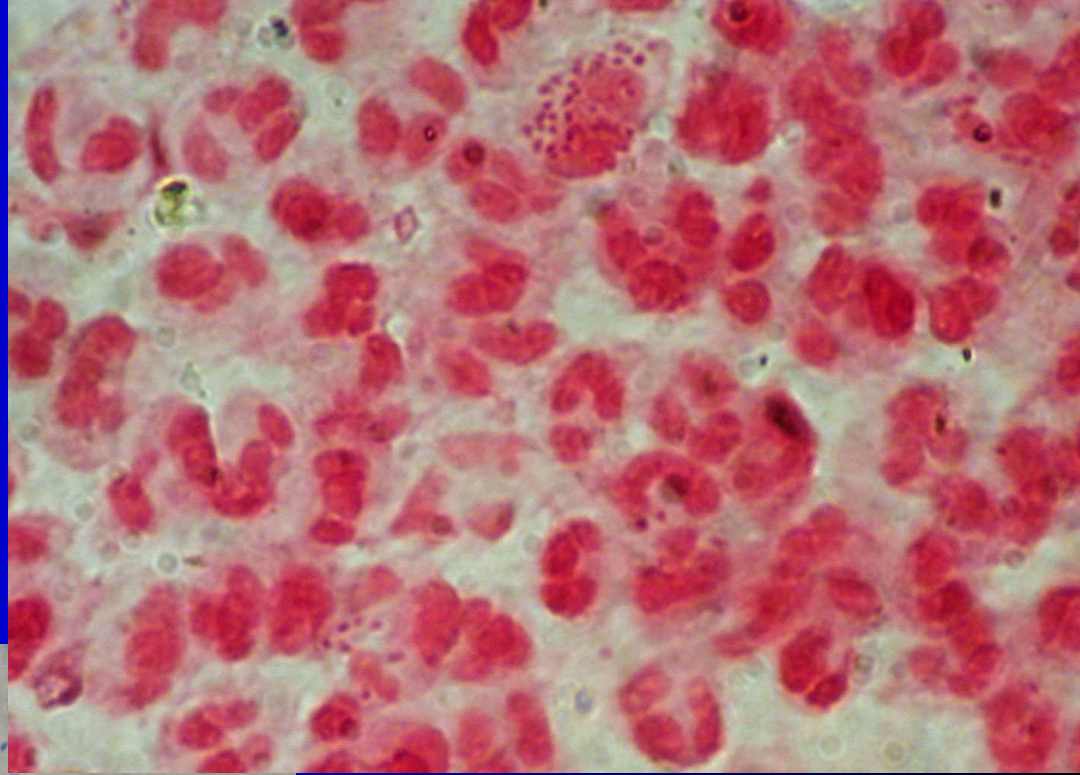
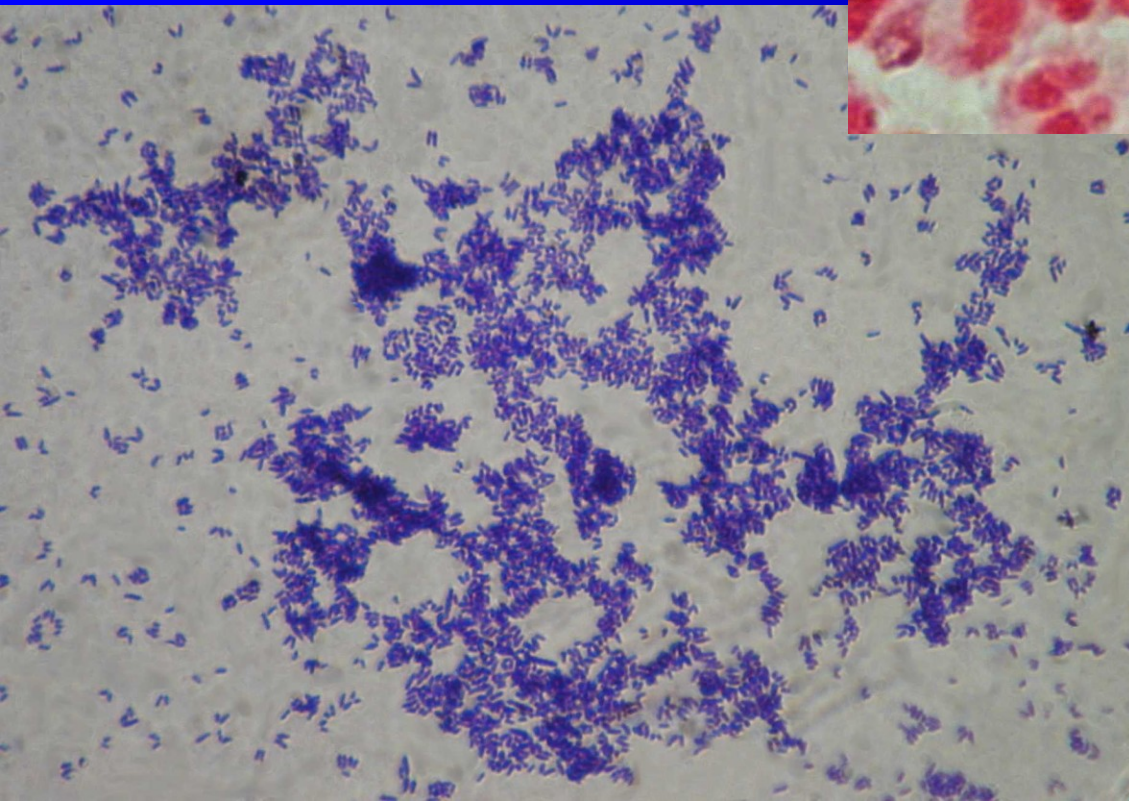


Foto: archiv MÚ



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 CO₂.

Připravené kultivační
půdy se uchovávají
v chladničce

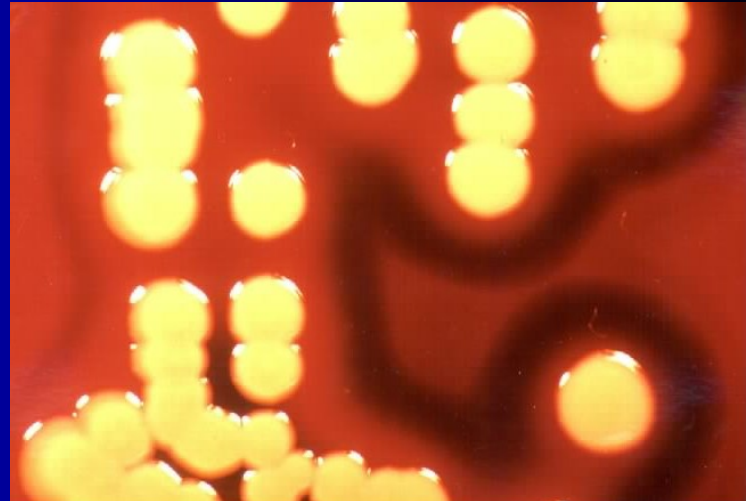
Foto: archiv MÚ



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

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 „kolonií 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

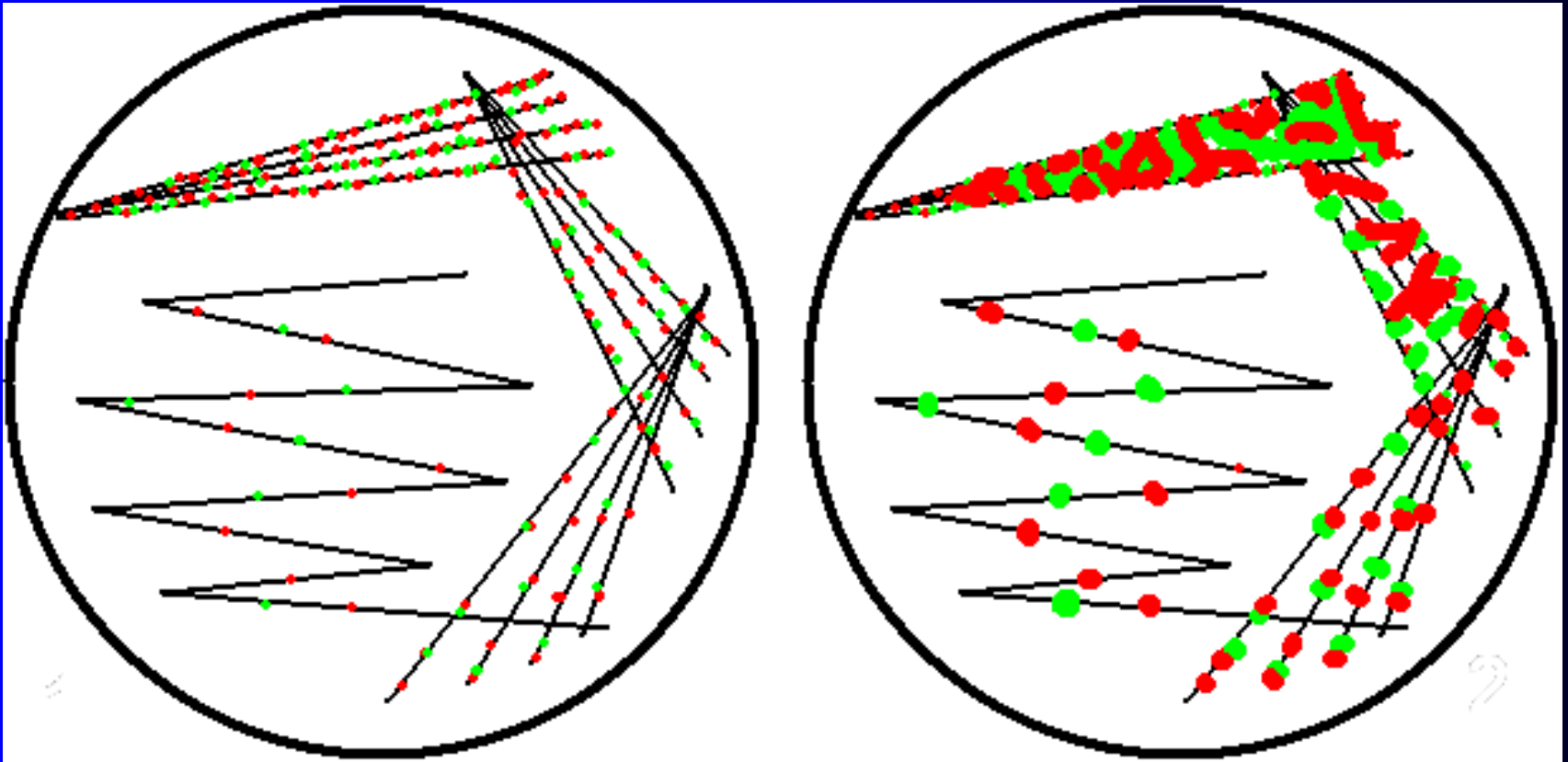


Co se dá popisovat u kolonií

- 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



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 = diagnostická)
- **Obohacené půdy** – k pěstování náročných bakterií (čokoládový agar, což je zahřátý krevní agar)
- **Speciální půdy** – mají své zvláštní určení (MH půda pro testy citlivosti kmene k antibiotikům)

Krevní agar

- Nejběžnější půda v klinické mikrobiologii. Roste na ní většina bakterií. Výhodný je také tím, že různé bakterie se na něm různě chovají (rozkládají či nerozkládají krvinky)



Příklad selektivně diagnostické půdy – Endova půda

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



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

Půdy se používají i k testování citlivosti na antibiotika

Foto: archiv MÚ

- 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

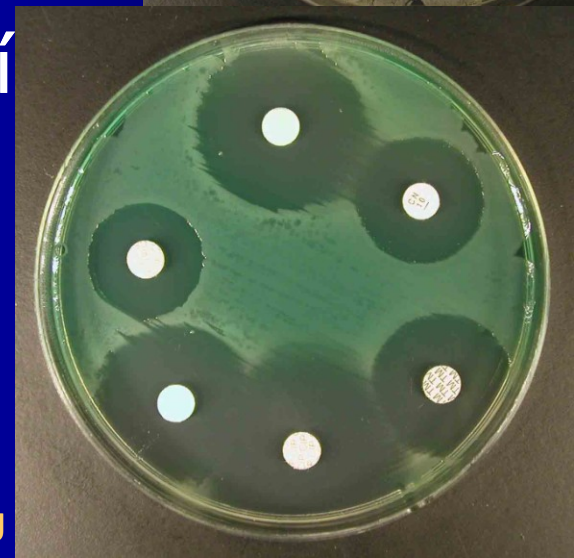
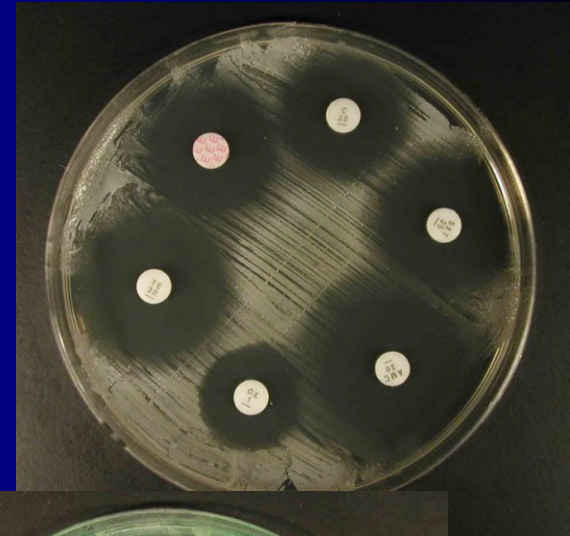
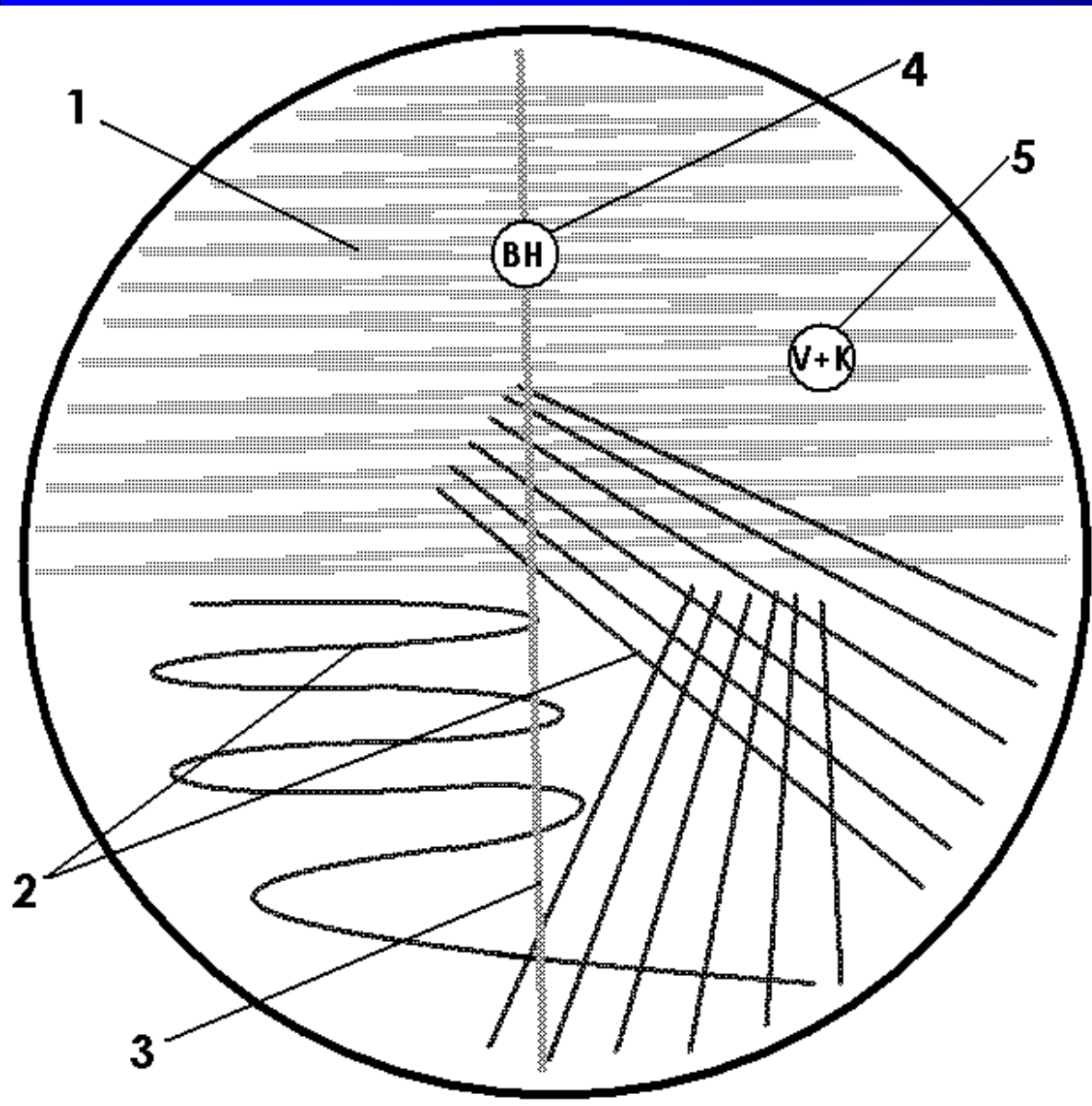


Foto: archiv MÚ

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 streptokokích (bezbarvé) a po stafylokokích (spíše bílé či zlatavé)

Výtěr z krku – reálný výsledek



Foto: archiv MÚ

Pěstování anaerobních bakterií

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

Foto: archiv MÚ



Foto: archiv MÚ



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, použijeme **indikátor**
- **Existuje přitom velké množství způsobů technického provedení tohoto typu testů.**

Jednoduchý příklad: Katalázový test

- **Katalázový test:** velmi jednoduchý, do substrátu (roztok H_2O_2) rozmícháme bakterie. Bublinky = pozitivita. **Princip:** $2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$

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

Catalase +



Catalase -

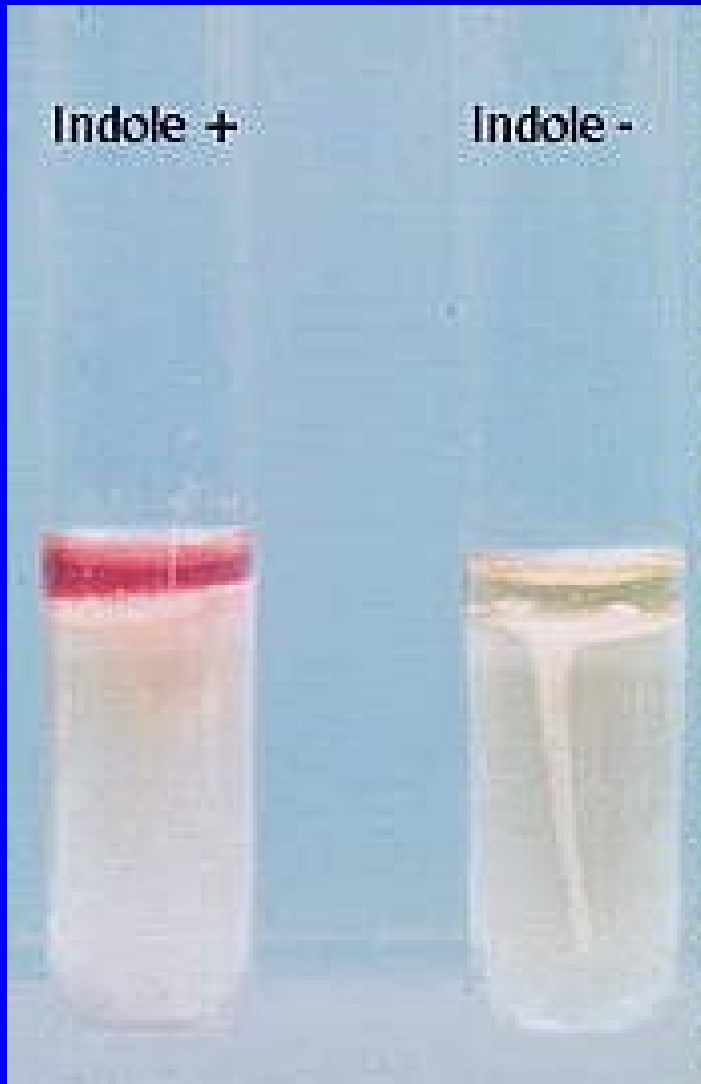


Jiný test



Foto: archiv MÚ

...a další testy



Někdy se zkoumají i vzájemné interakce dvou různých bakteriálních kmenů

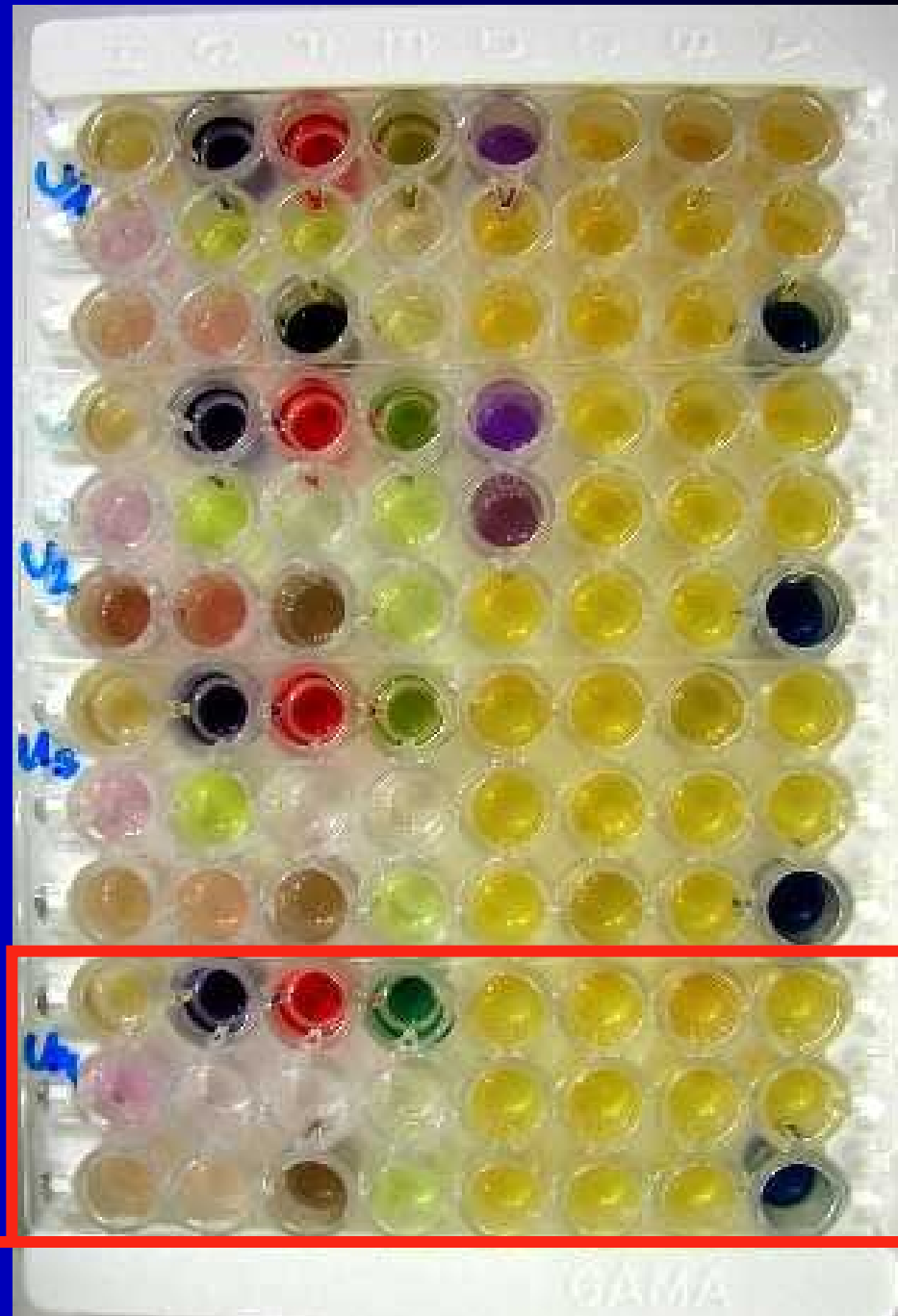


Foto: archiv MÚ

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

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

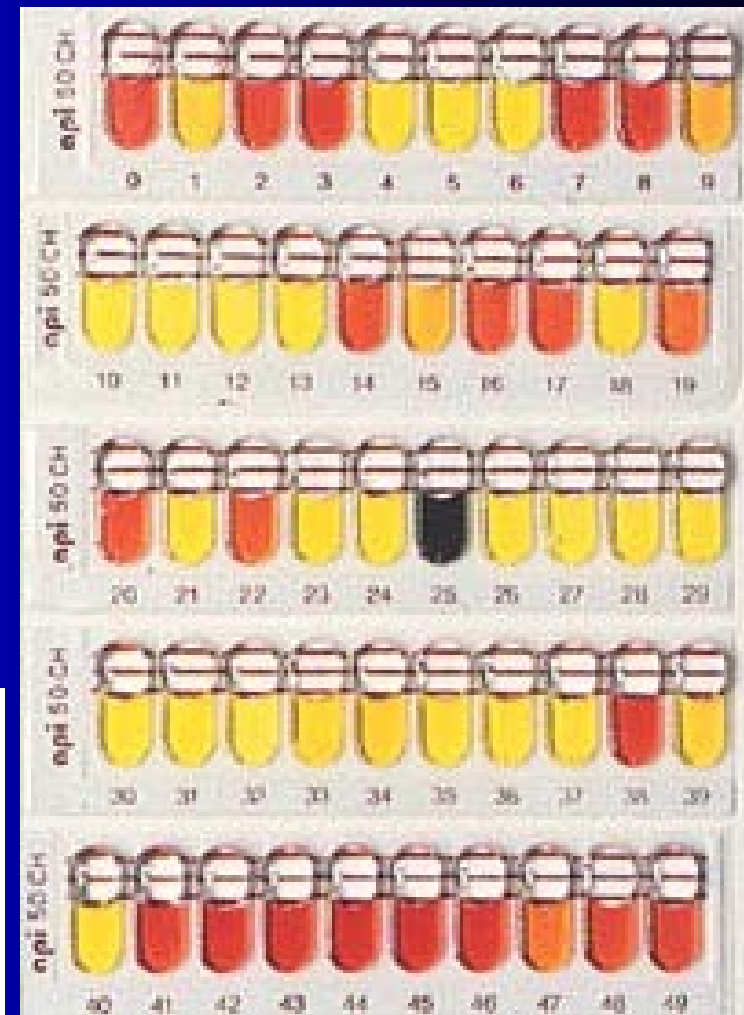


Zahraniční soupravy

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



Foto: O. Z.



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

<http://www.oxid.com/bluePress/uk/en/images/PR020505.jpg>





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.



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
antigenů +
průkaz
protilátek

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)

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)

LABORATOŘ

Děkuji za pozornost

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

