Lékařská mikrobiologie Úvod.

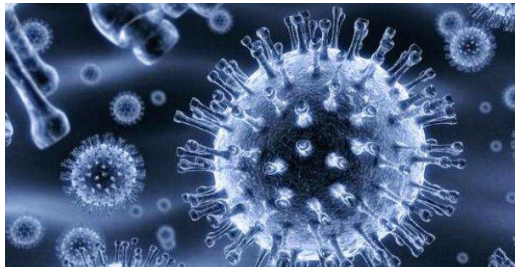
Helena Žemličková
Ústav mikrobiologie
3. LF UK

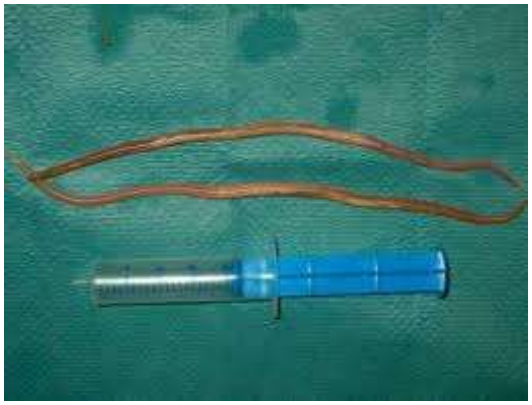
Mikrobiologie

Souhrn věd o vlastnostech a funkcích mikroorganismů

- Viry
- Priony
- Bakterie
- Mollicutes
- Chlamydie
- Rickettsie
- *Cyanobakterie (sinice)*
- Fungi (kvasinky a plísně)
- Protozoa, červi, členovci

- Virologie
- Bakteriologie
- *Botanika - algologie*
- Mykologie
- Parazitologie (protozoologie, helmintologie)





Mikroorganismy

- Osídlení planety Země - stromatolity
- Kosmopolitní
- Přenos na velké vzdálenosti
- Specializace
- Přežívání i v nevhodných podmínkách
- Genetická variabilita
- Molekulární analýzy – 97% genomu odlišná – jiná taxonomická jednotka
- Rychlý přenos genů – role v metabolismu
- 1,5 kg mikrobů v těle člověka (1 buňka – 100 mikrobů)
- Nezastupitelná role v ekosystémech

Základní otázky klinické mikrobiologie

- Je pozorované onemocnění způsobené infekčním agens?

- Jaký vzorek odebrat?

Preanalytická fáze

- Jak detekovat patogena?

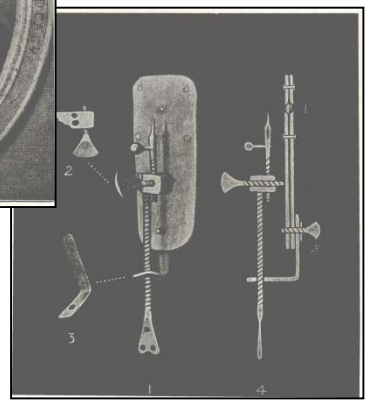
Analytická fáze

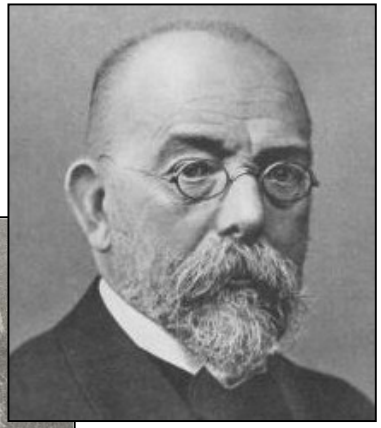
- Je mikrob, kterého jsme detekovali skutečně původcem dané choroby?

- Jakou léčbu podat?

Postanalytická fáze

Historie mikrobiologie





„Dřevní“ období → První pozorování mikrobů → **Mikrobi a onemocnění - období „lovců mikrobů“**

Antoni van Leeuwenhoek
(1632 - 1723)

Louis Pasteur (1822 - 1895)
Robert Koch (1843 - 1910)
Joseph Lister (1827 - 1912)

Historie mikrobiologie

„Klasické“ kultivační a identifikační metody

Molekulárně-genetické / proteomické metody

Antiinfekční terapie → Imunologie a serologie → „Klinická mikrobiologie“

Alexander Fleming
(1881 – 1955)

Historie mikrobiologie

- **4. st. př. n. l. Hippokrates** - základní lékařské postupy
- **Do 15. st. příčiny inf. chorob neznámé, za původce označována „miasma"**
- **Girolamo Fracastoro /**1483–1553/ - učení o „contagiích" - v mechanismu infekce předpokládá existenci malých živoucích nedělitelných částic, které šíří nemoci; epidemie syfilis
  - ***De contagionibus et contagiosismorbis et eorum curatione libri tres***
  - **(O nákaze a nakažlivých chorobách a jejich léčení, 1546)**
- **Johannes a Zacharias Jensenové**
  - - 1590 první pevné mikroskopy, dvoučočkové

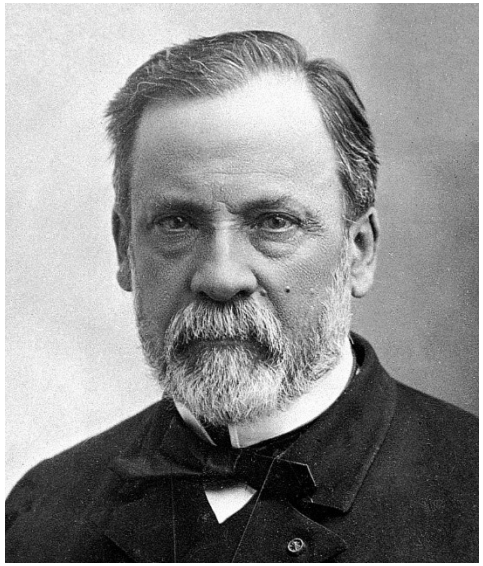
Historie mikrobiologie

Antoni van Leeuwenhoek (1632-1723)

- nizozemský obchodník se suknem a městský úředník
- sestrojil jednoduchý mikroskop ze zvětšovacích skel
- pozoroval různé materiály (voda, bláto, sliny, zubní plak…)
- nalezl četné pohybující se mikroorganismy „animalcula", např. bakterie, prvoky, kvasinky, nálevníky, červené krvinky, spermie ..
- výsledky pozorování publikoval v časopise společnosti Royal Society of London
- **1676 – popis bakterií**

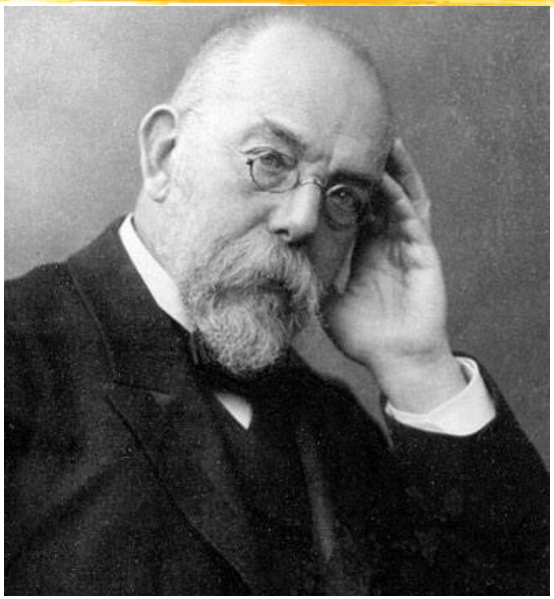
Objevy a objevitelé

Louis Pasteur (1822-1895)



- francouzský chemik a lékař, zakladatel mikrobiologie a imunologie
- vyvrátil teorii samoplození
  - prokázal, že bakterie mohou vzniknou zase jen ze živých organismů, že jsou příčinou, nikoli následkem kvašení, hnití a infekce (baňky s labutím hrdlem)
- Teorie – mikroorganismy jsou příčinou nemocí a zánětů
- objasnil proces kvašení (zjistil, že přeměnu cukru v alkohol a kysání mléka způsobují mikroorganismy)
  - pasterizace
- Prokázal anaerobiózu
- vakcína proti antraxu, kuřecí choleře, prasečímu moru, vzteklině

Objevy a objevitelé



Robert Koch (1843-1910)

- německý lékař a mikrobiolog
- Přinesl důkazy, že bakterie jsou etiologickým agens některých infekčních nemocí
- zavedl kultivační půdy s agarem, dokázal izolovat jednotlivé populace bakterií
- Pracoval s čistými kulturami bakterií
- 1879 - 1899: identifikace původců tyfu, cholery, záškrtu, tetanu, tuberkulózy
- 1905 –Nobelova cena za fyziologii a lékařství, za práce o TBC

Kochovy postuláty

Kauzální vztah mezi specifickou bakterií a specifickou nemocí

- Bakterie musí být přítomna v každém případu nemoci
- Musí být izolovatelná v čisté kultuře
- Naočkování kultury do zdravého hostitele způsobí charakteristický klinický obraz choroby
- Z infikovaného hostitele lze bakterii znovu izolovat

Objevy a objevitelé

Edward Jenner (1749-1823)

- anglický lékař
- 1796 očkování proti neštovicím (variola)
  virus varioly (pravých neštovic)
- při výrobě vakcíny použil kravské neštovice

- Slovo „vakcína" je odvozeno od slova „vaccinia", což je označení tzv. kravských neštovic – onemocnění, jehož vyvolavatelé byly použity jako vůbec první očkovací látka. Vakcína vyvolává u očkovaných jedinců tvorbu protilátek, tento proces je nazýván imunizace. Tyto protilátky mají ochranný vliv, očkovaní jedinci jsou proti chorobě imunní.

Karikatura Jennera provádějícího očkování

Významní mikrobiologové českého původu

- **August Josef Corda (1809-1849)**
  - jeden z prvních českých badatelů, který používal mikroskop, pozoroval řasy,nálevníky a mikroskopické houby

- **Vilém Dušan Lambl (1824-1895)**
  - popsal bičíkovce *Giardia* (*Lamblia*) *intestinalis*

Významní mikrobiologové českého původu

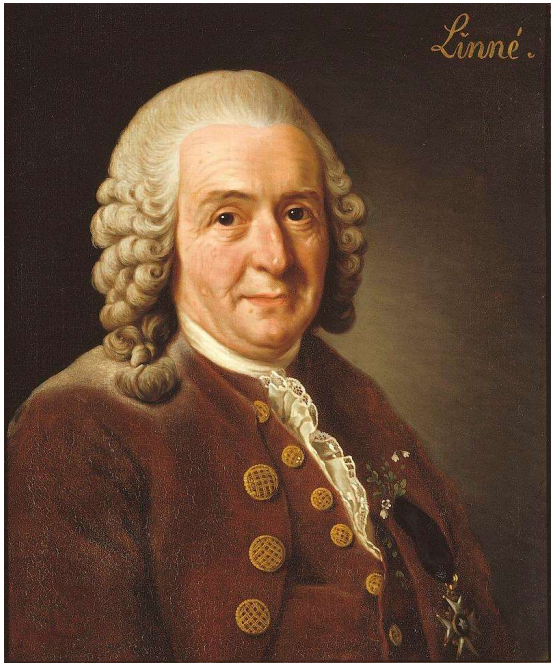
- **Stanislav Prowazek (1875-1915)**
  - rodák z Jindřichova Hradce, objevil *Rickettsia prowazeki*

- **Jaroslav Hlava (1855-1924)**
  - zakladatel české bakteriologie

- **Ivan Honl (1866-1936)**
  - Hlavův asistent, první profesor bakteriologie na Karlově univerzitě
  - studoval hlavně tuberkulózu
  - zavedl u nás sérologickou diagnostiku
  - jako jeden z prvních pozoroval antibiotický účinek pseudomonádových metabolitů na g+ koky (pyocyanasa -Anginolky)

Biologická systematika

- Carl von Linné (1707 – 1778)
- švédský přírodovědec a lékař, zakladatel botanické a zoologické systematické nomenklatury
- Zavedl binominální nomenklaturu (rodové a druhové jméno organismu)
- 1767 - zařadil mikroorganismy do třídy Chaos

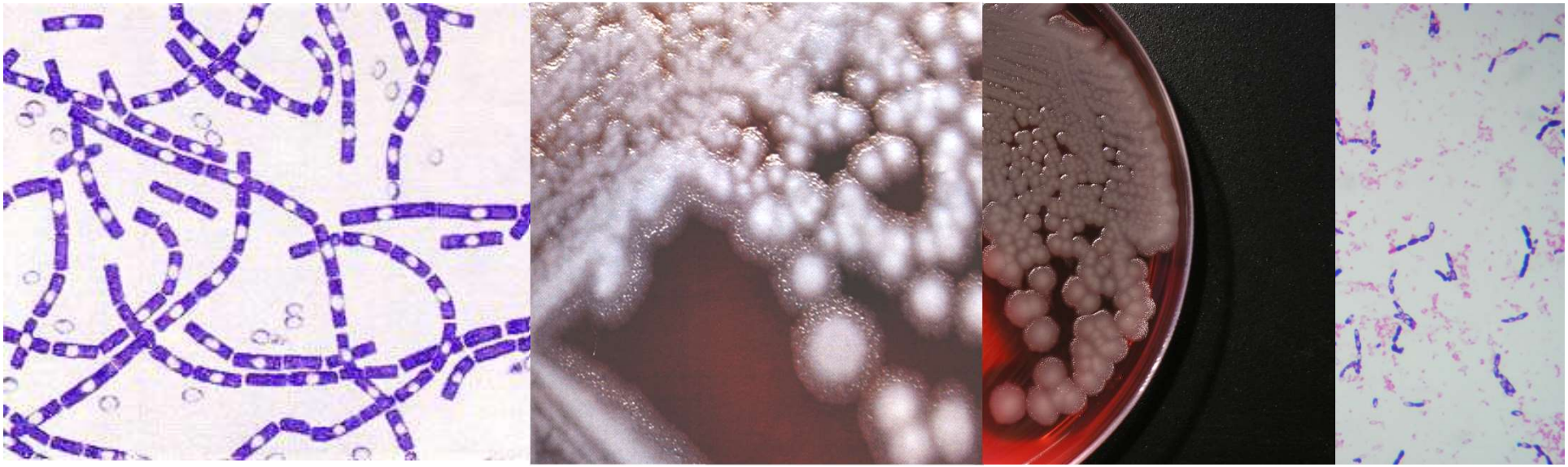


Biologická systematika

- zkoumá druhy a druhovou diverzitu organismů
- Taxonomie – teorie a praxe klasifikace organismů do hierarchicky uspořádaných kategorií (zakladatel Carl von Linné)
- Nejnižší taxon s nejvyšší podobností je druh (*Species*) – sobě podobné druhy jsou propojeny ve vyšší taxon – rod (*Genus*)
- Základní taxony v bakteriologii (rod a druh)

Bakteriální druh

Základní taxonomická jednotka bakterií – pojmenovaná skupina pod úrovní rodu, jejíž členové vykazují vysokou podobnost v porovnání s ostatními bakteriálními izoláty. Podobnost je srovnávána s tzv. typovým kmenem.



Taxonomie

- Rod (Genus) *Streptococcus*

- Druh (Species)

  Streptococcus pyogenes

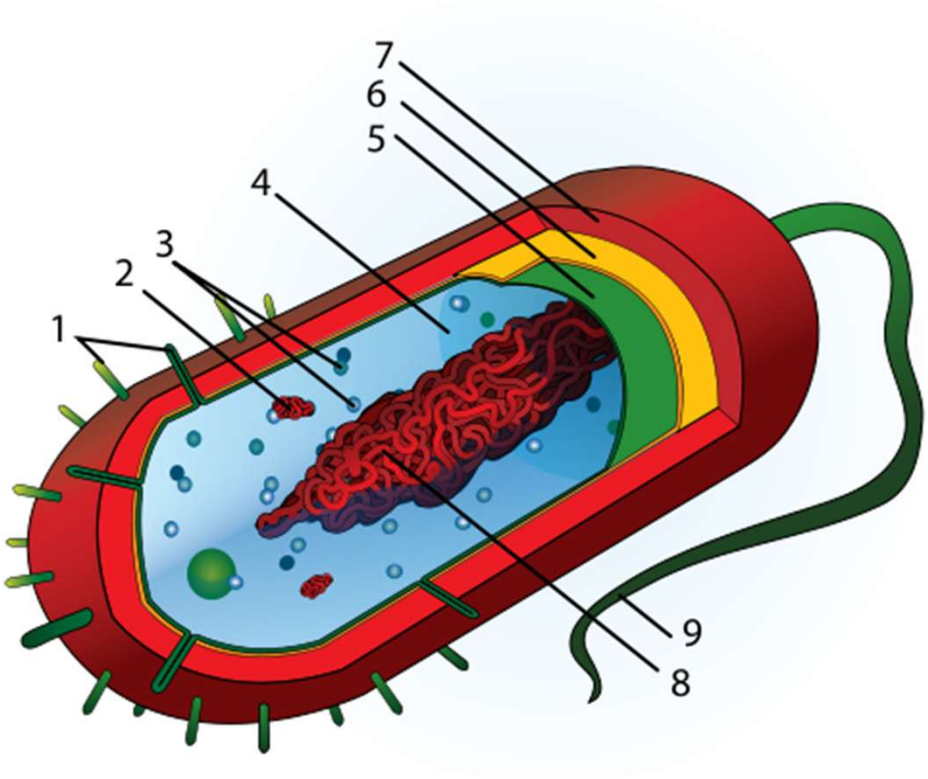
  Streptococcus agalactiae

  Streptococcus pneumoniae

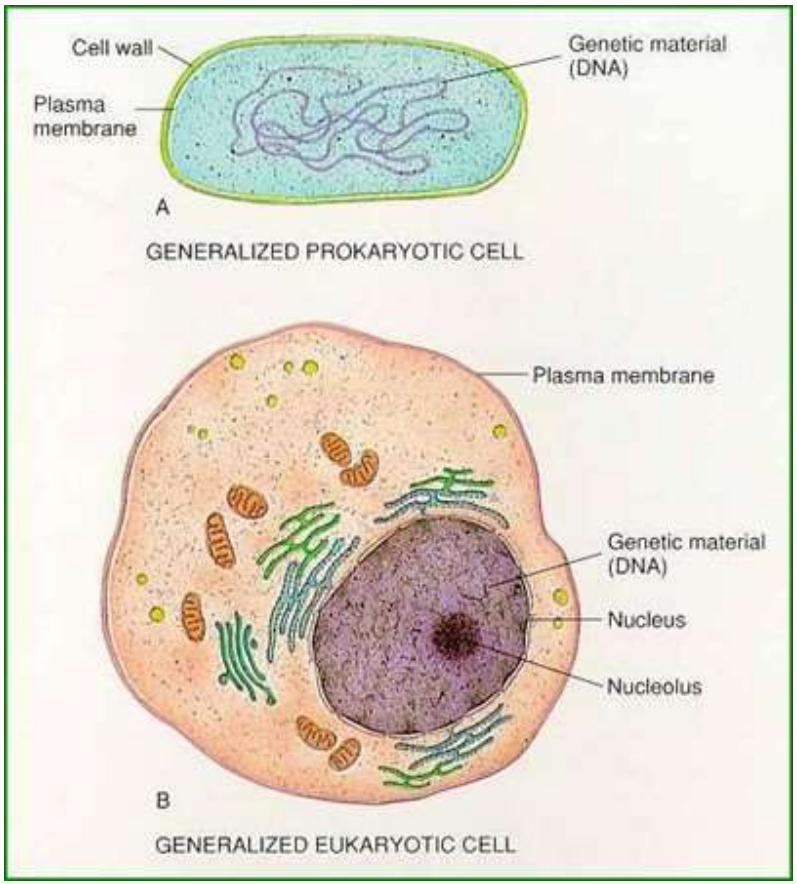
Bakterie

- Jednobuněčné prokaryotické organismy

- jádro bakteriální buňky (nukleoid)
- prokaryotické ribozomy
- cytoplazmatická membrána
- peptidoglykanová buněčná stěna



Prokaryotická vs. Eukaryotická buňka

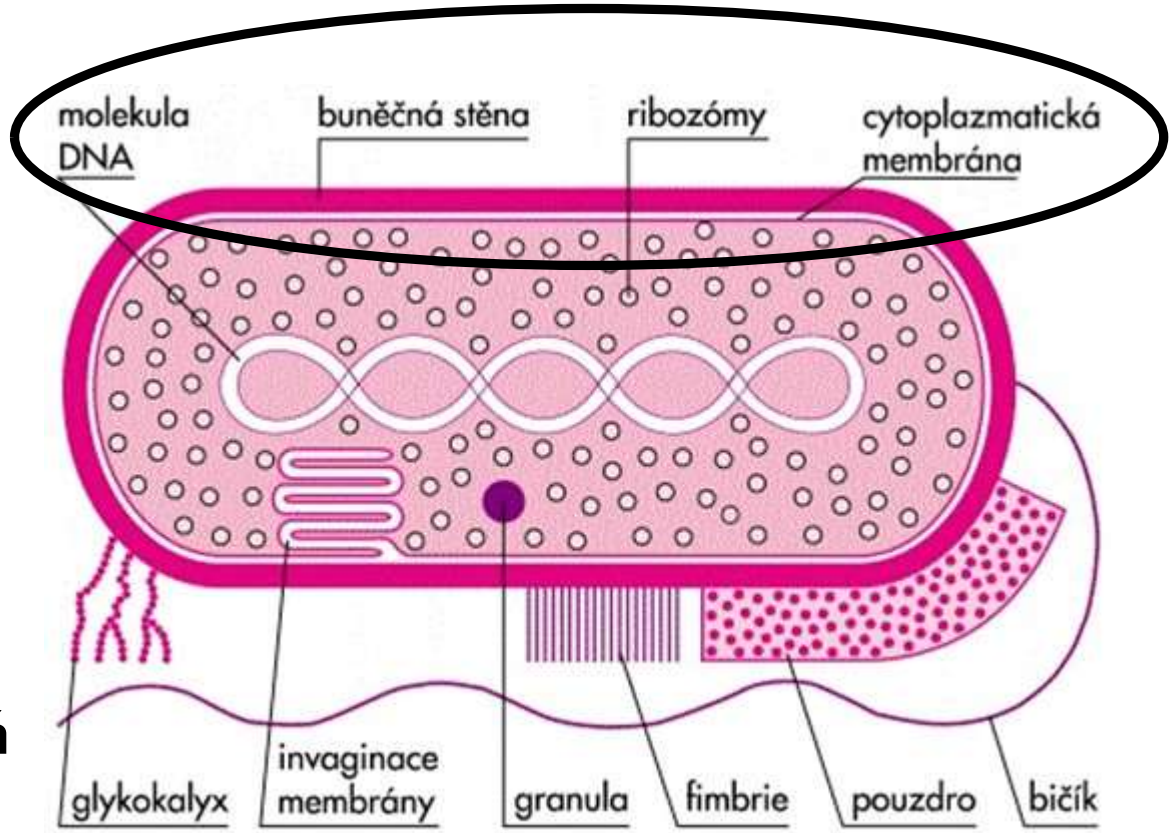


Bakteriální buňka

- velikost: buňky velmi malé (1-2μm)
- tvar: kulovitý, tyčinkovitý
- podstatně jednodušší než eukaryotické buňky
- metabolismus: velký poměr povrchu k objemu
  - ⇒ rychlejší komunikace s prostředím
  - ⇒ rychlejší metabolismus
- výživa:
  - chemotrofie, fotoautotrofie, fotoheterotrofie
- rozmnožování:
  - dělením

Schéma bakteriální buňky

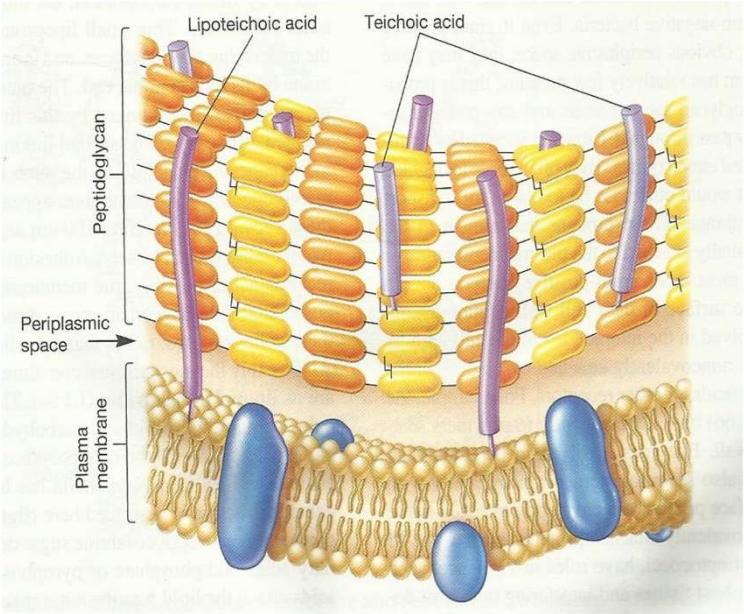
- jádro bakteriální buňky (nukleoid)
- prokaryotické ribozomy
- cytoplazmatická membrána
- peptidoglykanová buněčná stěna



Buněčná stěna

- u většiny prokaryot (výjimku tvoří mykoplazmata)
- stavba: (je mohutná) přisedá na lipoproteinovou membránu
- typickou látkou buněčné stěny je **peptidoglykan** / **lipopolysacharid** (v b.s. eukaryot není!)
- je pórovitá

Buněčná stěna
Gram pozitivní bakterie



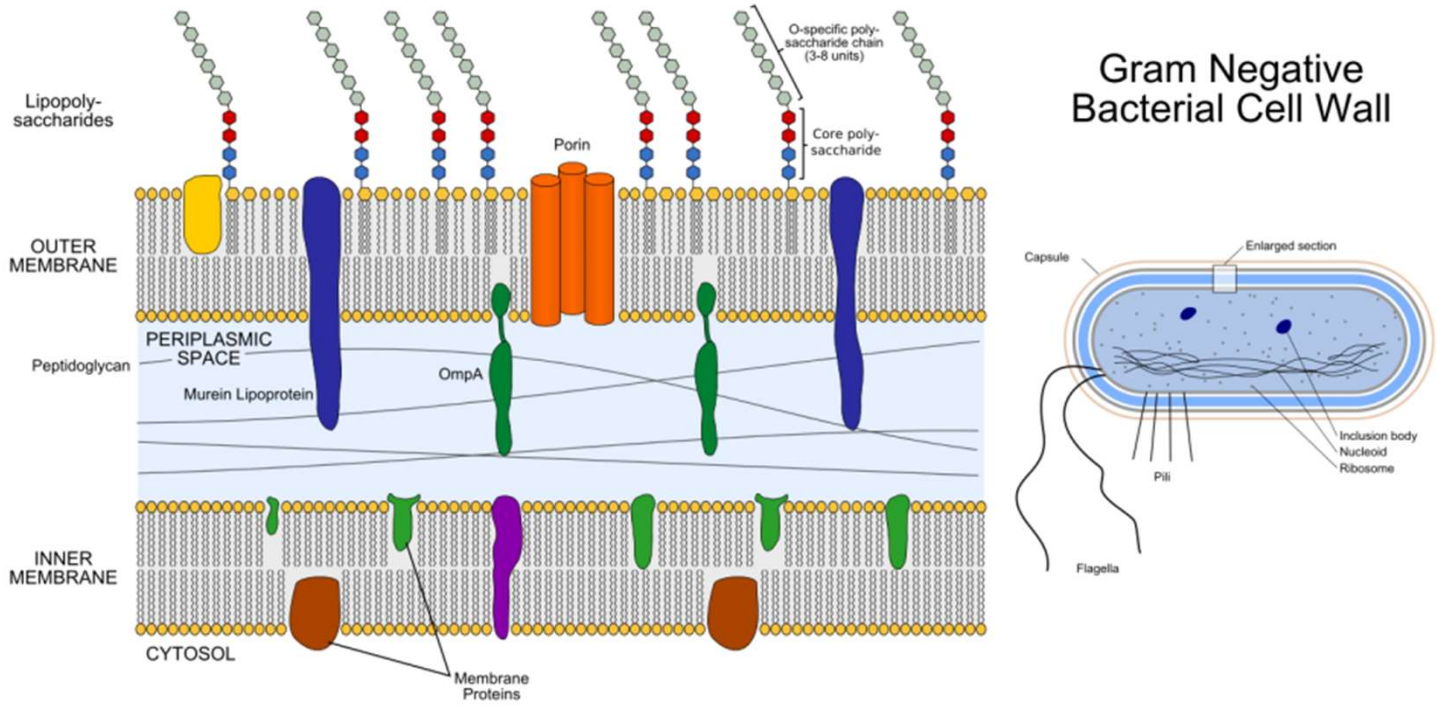
Gram Positive cell structure.

- N-acetyl glukosamin
- N-acetyl muramová kyselina
- (lipo)teichoová kyselina

- syntéza katalyzovaná enzymy - transpeptidázami označované jako PBP (penicillin binding proteins)

peptidoglykan

Buněčná stěna
Gram negativní bakterie



- Lipoprotein
- Lipopolysacharid (lipid A – endotoxin)
- Periplazmový prostor (betalaktamázy)
- OmpA protein – receptor pro konjugaci

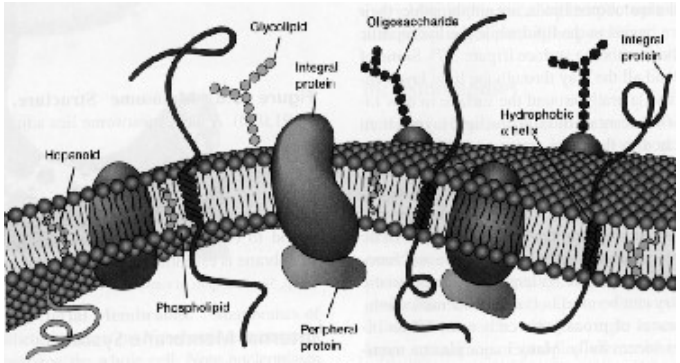
Funkce buněčné stěny

- Ochrana mechanická
- Ochrana chemická
- Udržuje vnitřní prostředí
- Udržuje tvar
- Kompenzuje vysoký osmotický přetlak uvnitř buňky
- Permeabilní (plně propustná)
- Povrch je nositelem antigenních vlastností

Cytoplazmatická membrána

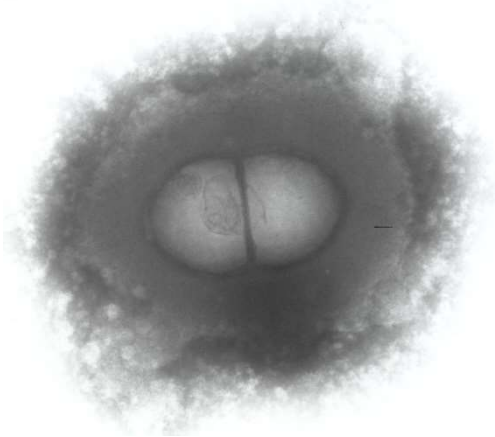
- jediná membrána u prokaryot
- stavba: fosfolipidová dvojvrstva, bílkoviny
- Pružná mozaikovitá struktura (příčný pohyb fosfolipidů)
- tloušťka 5-9 µm

- **Funkce**
  - Izolace od vnějšího prostředí - nepropustná pro vysoce polární molekuly (bílkoviny)
  - Transformace energie (sídlo ATPázy)
  - Sídlo enzymů nutných pro stavbu buněčné stěny



Pouzdro

- Vnější polysacharidový obal
- Není přítomen u všech bakterií
- Má antigenní vlasnosti
- Přispívá k virulenci bakterií
- Ochrana před fagocytózou
- Adherence - přichycení na různé povrchy,
  mohou tvořit jemná,
  krátká vlákénka (**glykokalyx**)
  - *Klebsiella pneumoniae*
  - streptokoky
  - neisserie



Pouzdro II

- Opouzdřené kmeny tvoří hladké kolonie **S-formy** (smooth), navalité mukózní **M-formy**, mutací mohou přecházet v drsné (rough) **R-formy**
- *Streptococcus pneumoniae* –ochranná funkce, *S. mutans* – přilnutí k zubům)

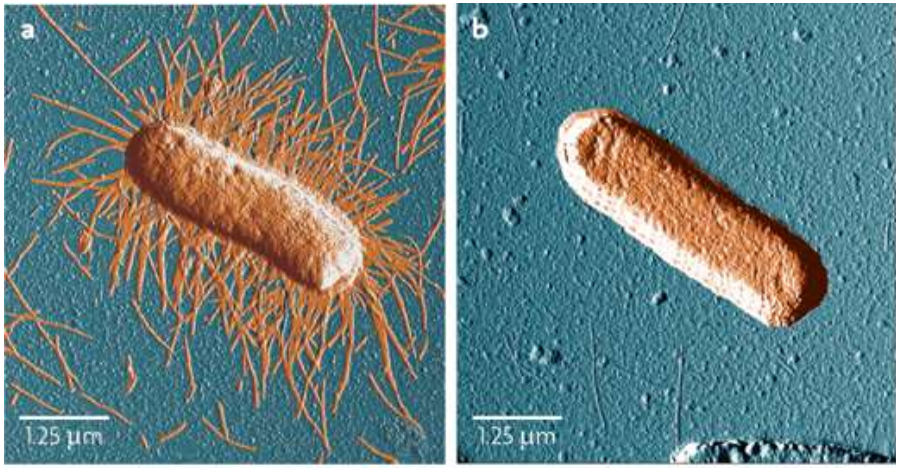
- **Sliz -** vznik vylučováním složek z pouzdra, volně připojená nepravidelná vrstva
- *Leuconostoc mesenteroides* (sacharózu z prostředí přemění na dextran)
- *Acetobacter aceti* (vylučuje celulózu - spojení buněk)

Bičík

- Umožňují pohyb, nejsou vždy přítomny
- Jeden bičík, svazek bičíků (na jednom nebo obou pólech buňky), bičíky po celém povrchu buňky
- molekuly globulárních bílkovin (flagelinů) podobných myozinu tvoří duté vlákno stočené do šroubovice, v cytoplazmě zakotven bazálním tělískem
- Funkce
  - pohyb: dvě kruhovité destičky se otáčejí proti sobě – stator a rotor, bičík táhne buňku
- Bakterie náhodně mění směr pohybu (kotrmelce)
- Chemotaxe – usměrnění pohybu

Fimbrie (pilusy)

- krátká křehká nepohyblivá vlákna na povrchu gramnegativních (i gram pozitivních) bakterií
- mnohočetné na povrchu bakterií
- Stavba - bílkoviny uspořádané do duté šroubovice
- Funkce - adhesiny

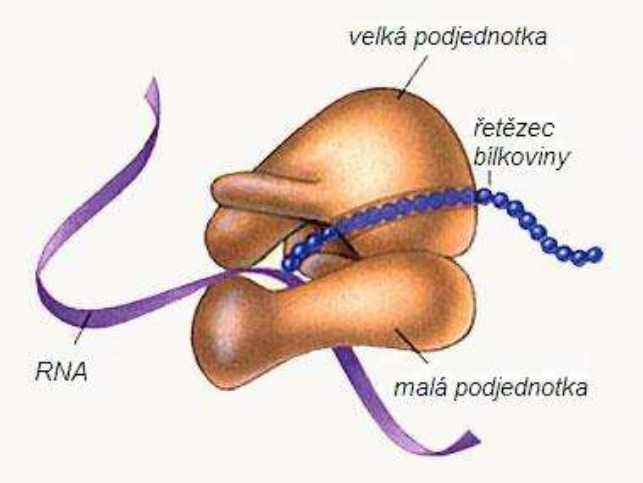


Jádro (nukleoid)

- 1 molekula DNA - chromozóm bakterií (cca 3 500 genů)
- Cca 15% objemu buňky
- není od cytoplazmy ohraničen membránou
- volně v plazmě, chemicky holá molekula DNA (kruhová dvoušroubovice)
- Neobsahuje histony, ale obsahuje proteiny histonům podobné
- nedělí se mitoticky (replikace v řádu desítek minut) – vysoká frekvence mutací

Ribozómy

- 70S jednotka tvořena 2 podjednotkami:
  - menší: 30S (1molekula RNA + 21 molekul bílkovin
  - větší: 50S (2molekuly RNA + 34 molekul bílkovin)
- nejsou ohraničeny membránou
- menší než u eukaryot
- volné či přisedlé zevnitř k povrchové membráně
- funkce: syntéza nových polypeptidů (bílkovin)

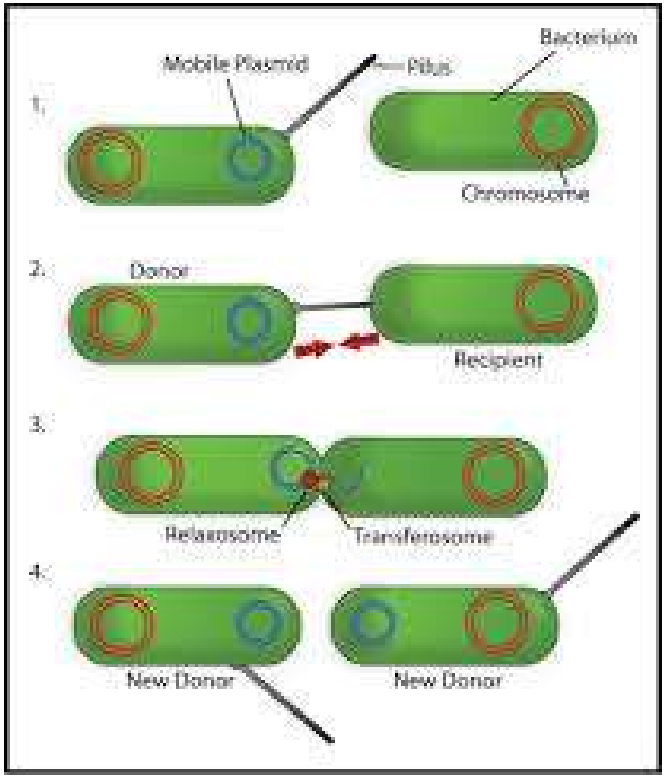


Cílové místo účinku vybraných skupin antibiotik

- Makrolidy
- Tetracyklin
- Chloramfenikol
- aminoglykosidy

Plazmidy

- malé cyklické molekuly DNA v cytoplazmě
- charakteristické pro bakterie
- v buňce více kopií i druhů plazmidů
- Mechanismy přenosu plazmidů
  - konjugace (konjugativní plazmidy)
  - transdukce (nekonjugativní plazmidy, bakteriofág)
  - transformace (přenos DNA do kompetentní buňky – in vitro genové manipulace)
  - Integrace – integron (začlenění plazmidů do chromozómu)



Plazmidy

Funkce

- rezistence na antibiotika
- rezistence k těžkým kovům
- produkce toxinů (difterický toxin)

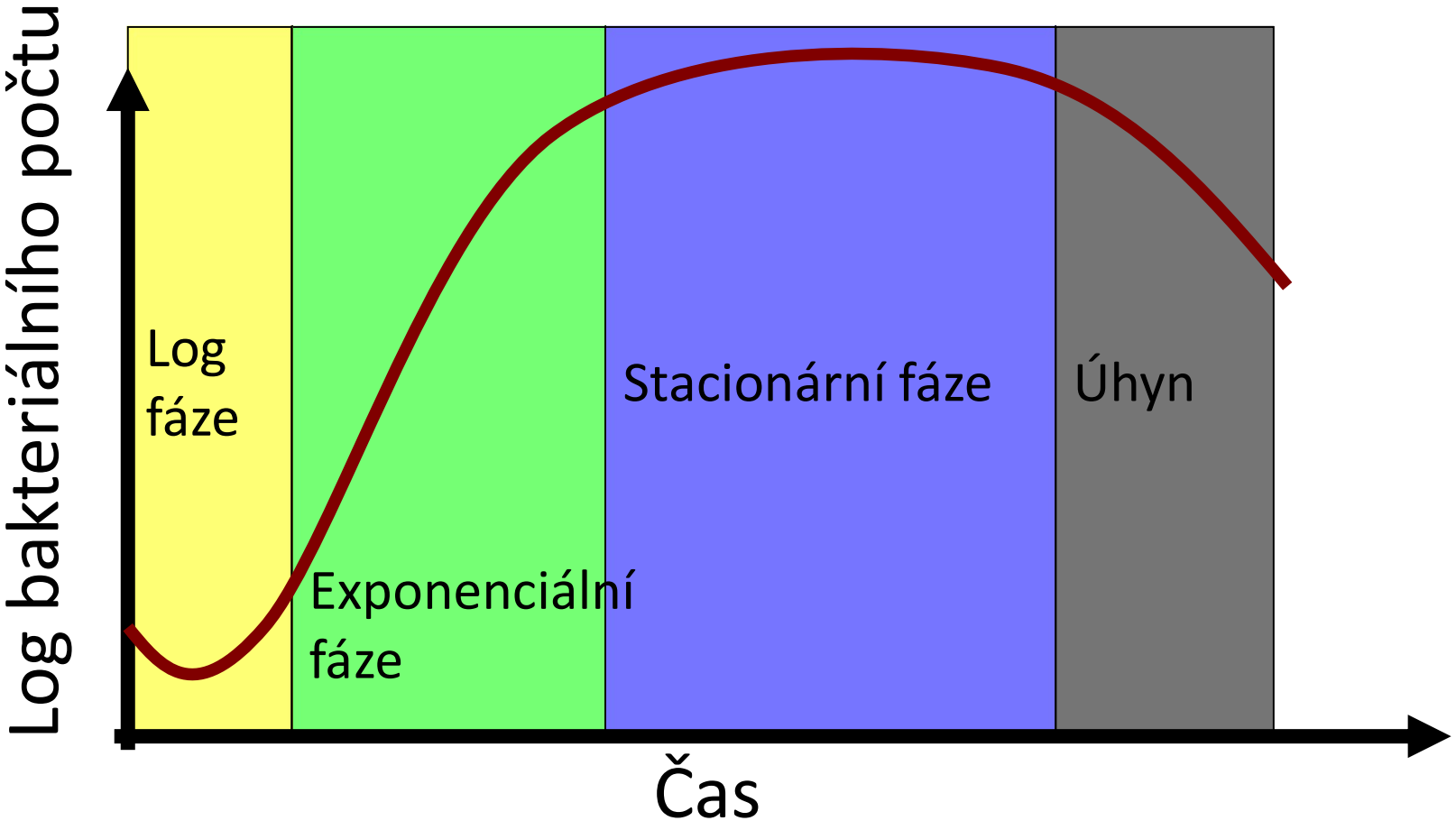
Bakteriální metabolismus a růst

- **Obligátní anaeroby**
  (např. *Clostridium* spp., *Fusobacterium* spp., *Peptostreptococcus* spp., ...)

- **Obligátní aeroby**
  (např. *Pseudomonas aeruginosa*)

- **Fakultativní anaeroby**
  (např. *Enterobacteriaceae, Staphylococcus spp.*, ...)

Fáze bakteriálního růstu



Výskyt bakterií

- Půda
  - ovlivňují úrodnost půdy
  - humus obsahuje saprofytické bakterie > rozkládají organické zbytky > mineralizace
  - **aktinomycety:** vytvářejí antibiotika (streptomycin, aureomycin, tetracyklin, ...)
- Vzduch
- Voda
- Lidský organismus

Člověk – přirozená mikroflóra

Komenzalismus (symbióza)

- **kůže** – hlavně vlhká místa (třísla, podpaží, …)
- **ústa, ústní dutina** – teplo, vlhko, živí se bílkovinami ze slin
  - *streptokoky*: z cukrů dělají kyselinu mléčnou > odvápnění zubní skloviny > vzniká zubní kaz
- **dýchací cesty** - jen v horní části (nosohltan, průdušky), zachyceny sliznicí v nose, řasinkovým epitelem v průdušnici, ve zdravých plicích bakterie nejsou
- **střeva**
  - Enterobakterie, anaerobní bakterie – zpracovávají zbytky potravin, přirozená ochrana před patogeny, stimulace imunitního systému, zdroj vitamínu K

Člověk vs. bakterie

- symbióza x parazitismus (infekce)

- Patogenita
  - podmíněna vlastnostmi mikroorganismu
  - Schopnost vyvolat onemocnění u konkrétního hostitele
- Virulence – míra patogenity (kvantitativní vyjádření)

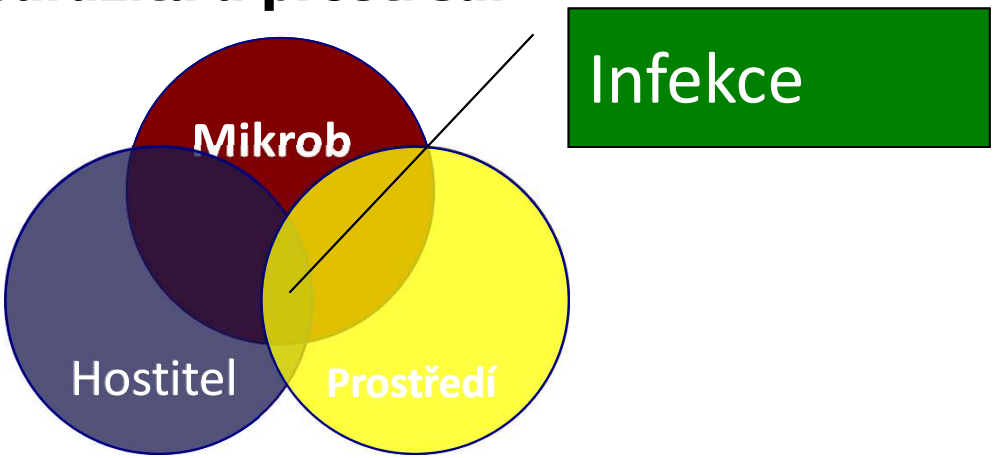
- Bakterie pro člověka
  - nepatogenní
  - primárně patogenní
  - podmíněně (oportunně) patogenní

Mikrobi jako paraziti

- Viry
  - Intracelulární parasitismus
- Bakterie
  - Extracelulární parasitismus
  - Fakultativně-intracelulární parasitismus
  - Obligátně intracelulární parasitismus
- Houby
- Paraziti

Kdy může mikrob vyvolat infekci

- **Vztah hostitele, parazita a prostředí**

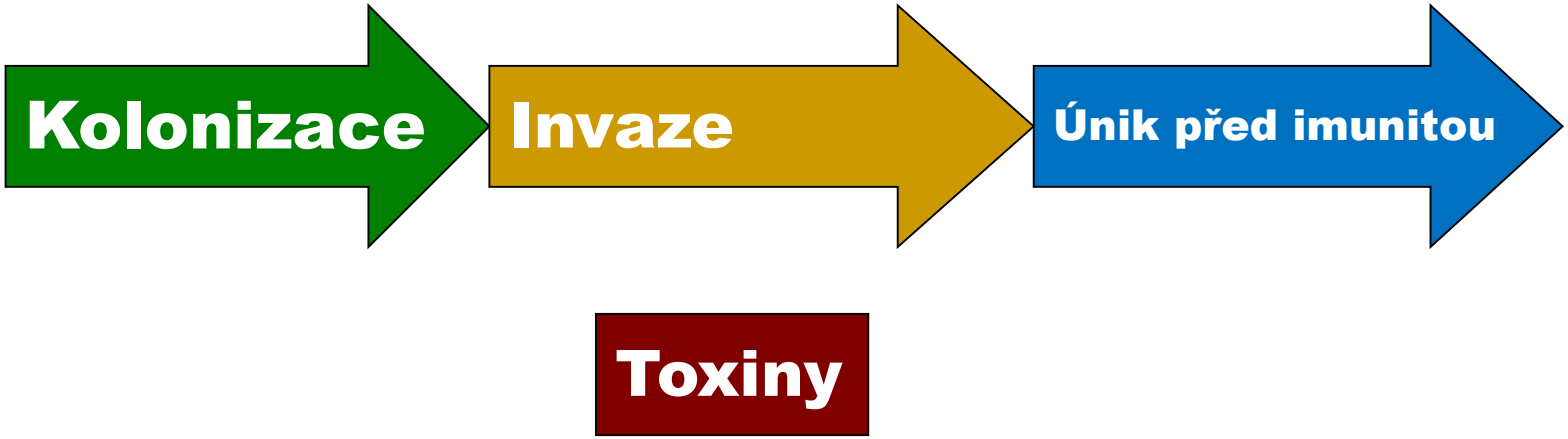


- **Virulence** – míra patogenity (schopnosti vyvolat onemocnění)
  - Invazivita
  - Toxinogenita

- **Velikost infekční dávky** – úspěšnost šíření nemoci

- **Ekologické faktory** – vektory, přežívání v prostředí atd.

Interakce s hostitelem



Patogenita: Schopnost vyvolat onemocnění.

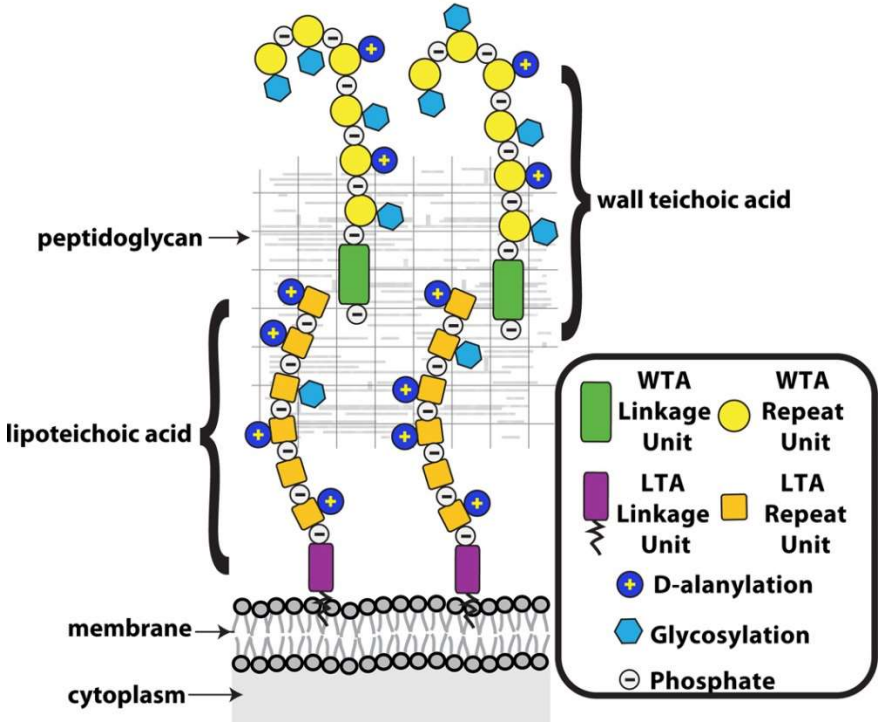
Virulence: Stupeň patogenity.

Faktory virulence: Molekuly produkované mikrobem zodpovědné za rozvoj onemocnění

Kolonizace a adheze

Adhesiny:
Fimbrie (pili)
– gramnegativní bakterie

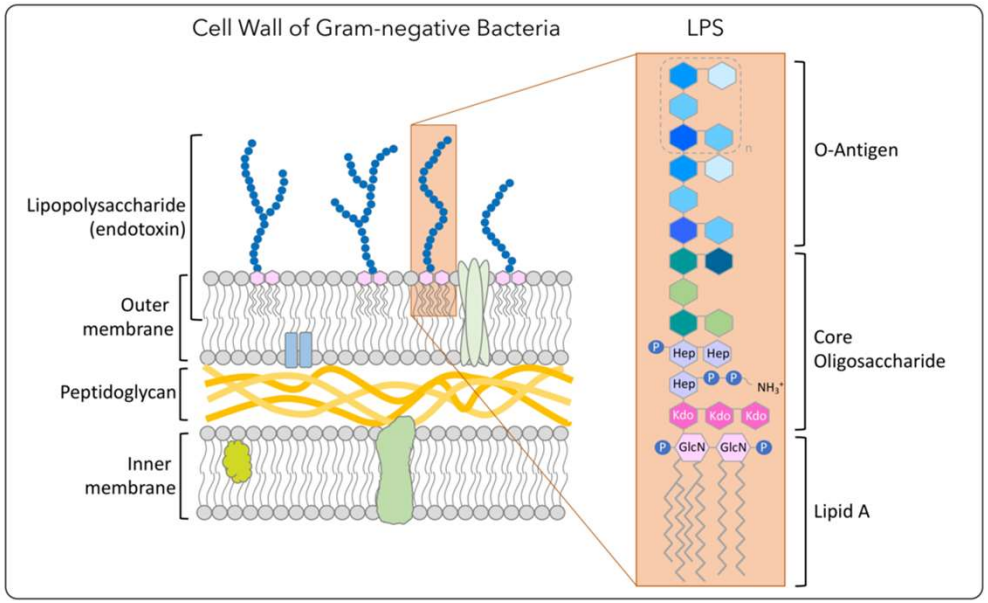
Lipoteichoová kyselina
– grampozitivní bakterie



Endotoxin

Lipopolysaccharid (LPS)

- Váže se na specifické receptory makrofágů (CD14 and TL4)
- Interakce s receptory makrofágů a B buněk
- Aktivace komplementu alternativní cestou
- Aktivuje makrofágy, neutrofily, B lymfocyty.
    - Horečka (uvolňování TNF a interleukinu (IL) 1, IL-6)
    - Vazodilatace
    - Hypotenze
    - Leukopenie
    - Trombocytopenie



Endotoxin

- Endotoxin se podílí na vzniku toxického šoku v souvislosti s nedostatečným přísunem kyslíku v šokových podmínkách různé etiologie (hypovolemie, stres, hypoperfúze střeva).
- Narušená střevní bariéra se pak stává propustnou a umožňuje penetraci endotoxinu.
- Za normálních okolností je endotoxin z gramnegativních bakterií rezidentní flóry tlustého střeva absorbován pouze minimálně a stimuluje imunitní systém.

Endotoxin

- Endotoxin se uvolňuje do krevního řečiště z míst kolonizovaných gramnegativní mikroflórou, nejčastěji při perforacích střeva, popáleninách, ucpaných močových cestách, infekcích žlučníku.
- Nejběžnějšími druhy jsou bakterie normální flóry, zejména tlustého střeva (*Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa, Bacteroides fragilis*).

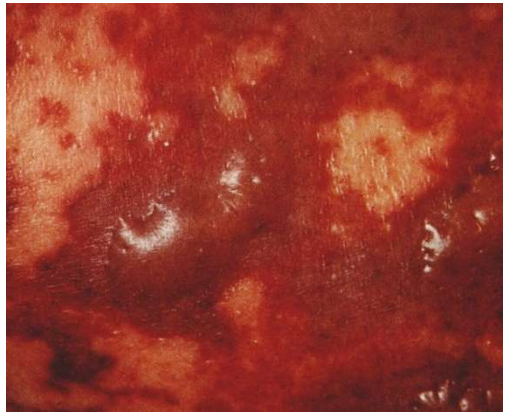
Endotoxin

Nízká koncentrace - pozitivní účinek

-stimulace imunity

Vysoká koncentrace - toxický šok

-vasodilatace a snížený výkon myokardu vedou k oxidačním poruchám a **multiorgánovému selhání** (MODS) a **diseminované intravaskulární koagulaci**



Petechie u pacienta s meningokokcemií (Murray et al.: Medical Microbiology, 2005)

Exotoxiny

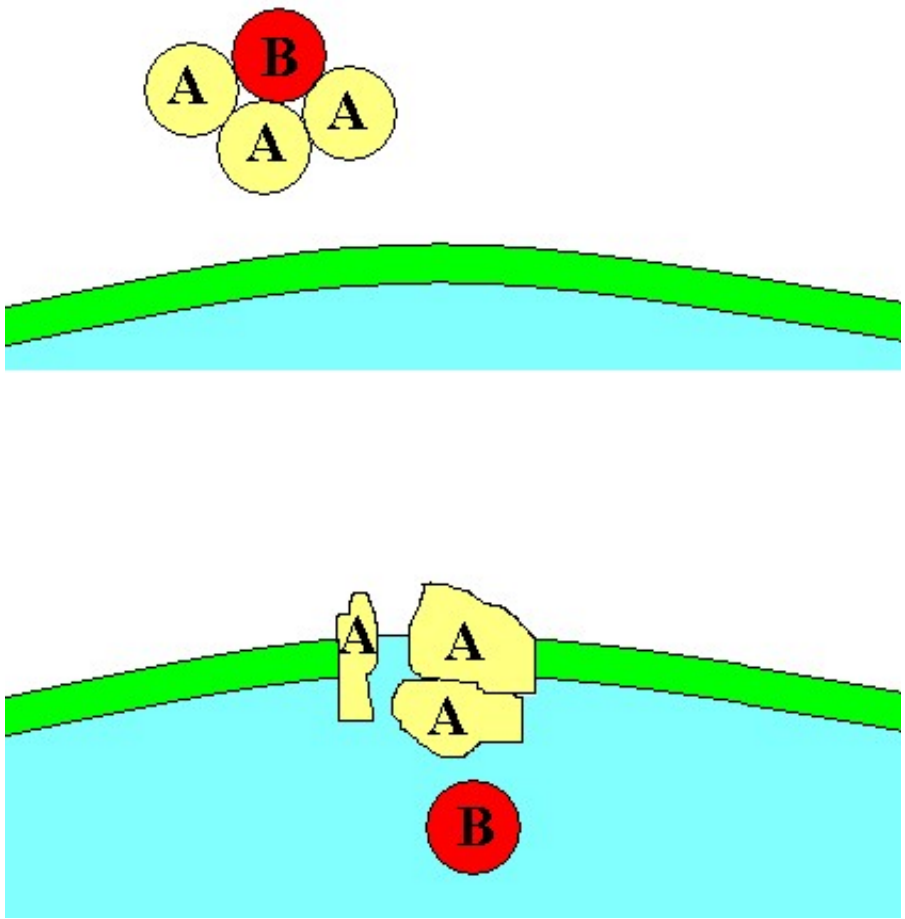
- Cytolytické enzymy (obvykle tvoří póry v buněčné stěně – např. hemolyziny)

- Nespecifické enzymy poškozující tkáně (invaze mikroba)

- Proteiny ovlivňující funkci buňky (A-B toxin)

- Enzymy ovlivňující imunitní systém hostitele (např. proteázy hydrolyzující imunoglobuliny)

A-B Toxiny

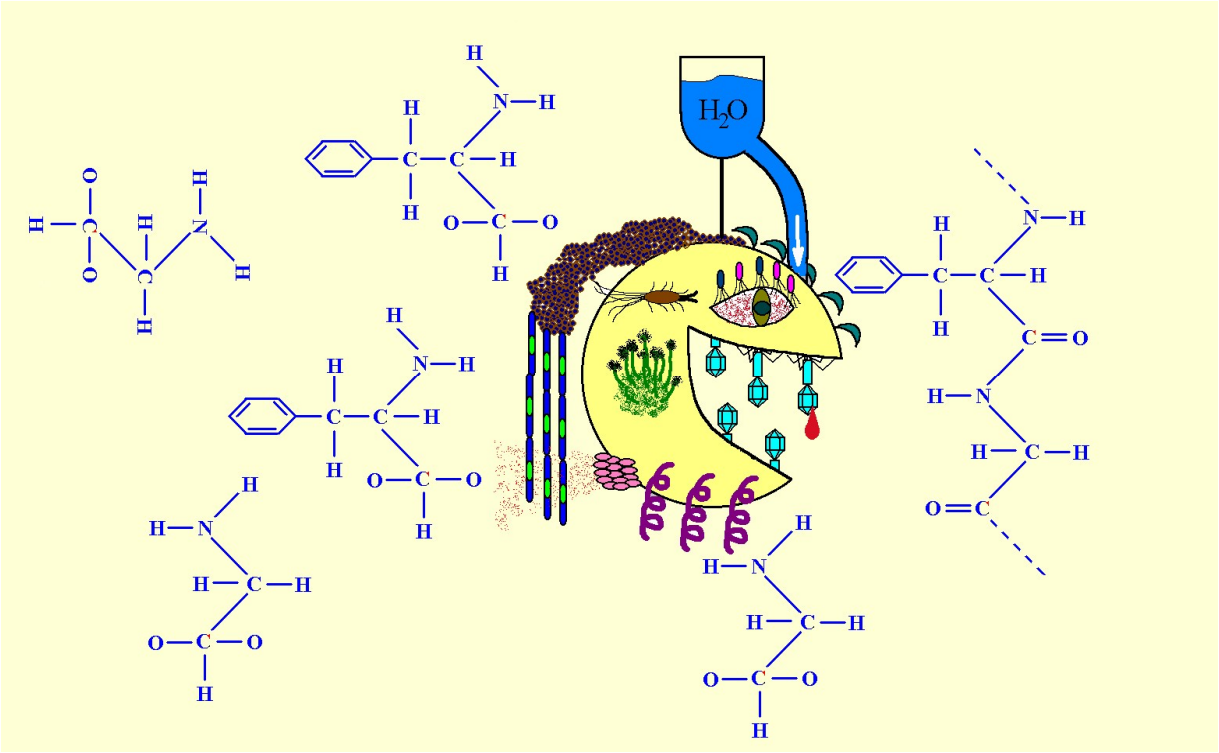


Příklady:

- Botulotoxin
- Tetanotoxin
- Shiga-toxin
- Antraxový toxin
- Pertussový toxin

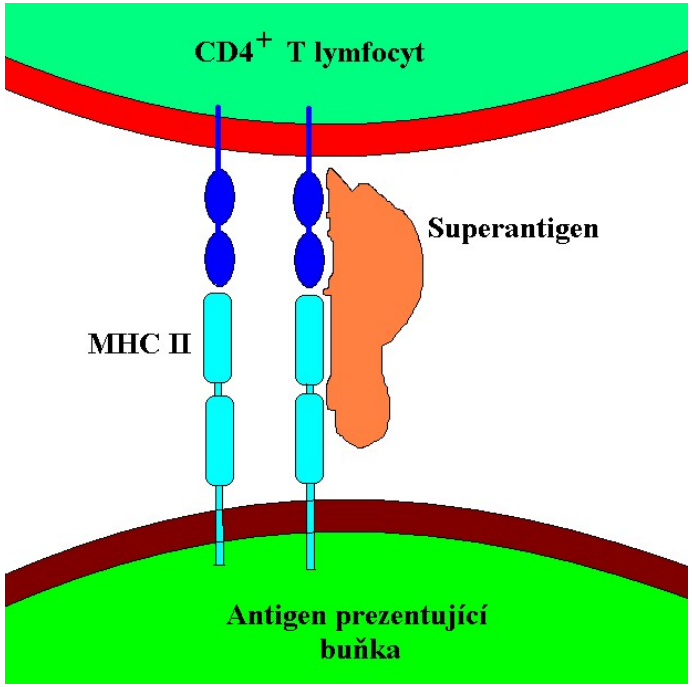
Penetrace mikrobů tkáněmi

- Proteázy
- Fosfolipázy
- Kolagenázy
- Hyaluronidázy



Superantigeny

Aktivace T-lymfocytů navázáním na T-receptor a MHC II (major histocompatibility complex) bez potřeby zpracování antigenu.



Příklady:

- enterotoxiny *Staphylococcus aureus*
- TSST-1 (toxic shock syndrom toxin) *S. aureus*
- erytrogenní toxin *Streptococcus pyogenes*

Mechanismus úniku před imunitou

Opouzdření

Antigenní mimikry

Antigenní maskování

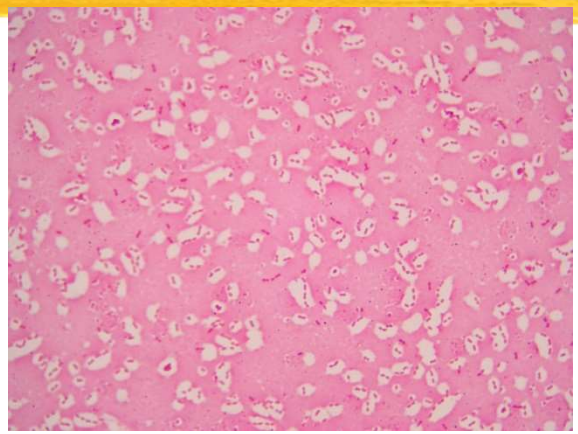
Produkce proteáz hydrolyzujících imunoglobuliny

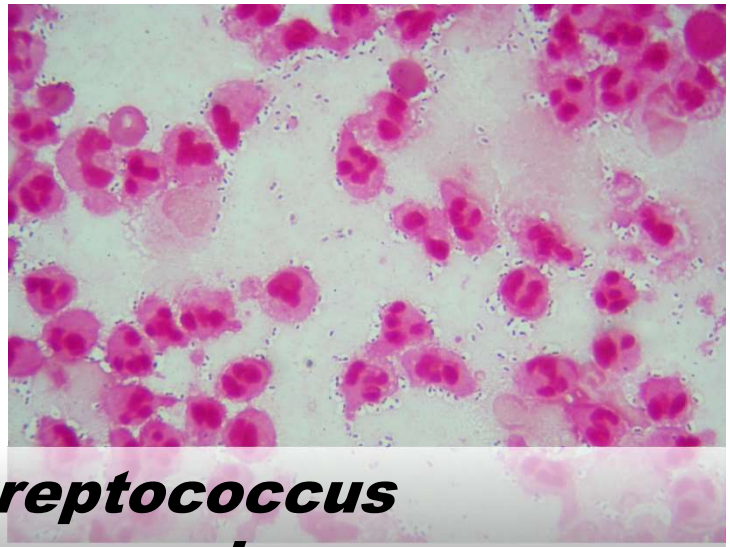
Destrukce fagocytů a inhibice fagocytózy

Rezistence k lysozymu

Produkce peroxidázy

Intracelulární parazitismus





Streptococcus pneumoniae

HISTORIE A BUDOUCNOST LÉKAŘSKÉ MIKROBIOLOGIE

- Do konce 1. světové války byla identifikována většina původců bakteriálních chorob
- Pokroky v prevenci a léčbě infekčních onemocnění souvisí s objevem antimikrobik
- S vývojem metod a přístrojů - rozvoj výzkumu virů
- Objevují se nové nemoci (legionářská nemoc, AIDS, lymská nemoc, hemorhagické horečky, syndrom toxického šoku, nemoc šílených krav, ptačí chřipka, SARS, MERS, Zika virus, COVID-19)
- Mnoho nemocí, které byly na ústupu, se začíná objevovat častěji (příušnice, černý kašel)
- Selekce organismů rezistentních vůči antibiotikům