

učební texty Univerzity Karlovy v Praze

PRINCIPY Oto Melter
Annika Malmgren
A PRAKTIKA
LÉKAŘSKÉ
MIKROBIOLOGIE

Principy a praktika lékařské mikrobiologie

MVDr. Oto Melter, Ph.D.

Annika Malmgren

Recenzovaly:

MUDr. Eliška Běbrová

MUDr. Tamara Bergerová

Autoři:

MVDr. Oto Melter, Ph.D.

Ústav lékařské mikrobiologie

2. lékařská fakulta, Univerzita Karlova, Praha

Annika Malmgren, studentka medicíny

2. lékařská fakulta, Univerzita Karlova, Praha

Vydala Univerzita Karlova v Praze, Nakladatelství Karolinum

jako učební text pro 2. lékařskou fakultu UK

Obálka Kateřina Řezáčová

Sazba DTP Nakladatelství Karolinum

1. vydání

© Univerzita Karlova v Praze, 2014

© Oto Melter, Annika Malmgren, 2014

Text neprošel jazykovou ani redakční úpravou nakladatelství

ISBN 978-80-246-2414-3

ISBN 978-80-246-2545-4 (online : pdf)



Univerzita Karlova v Praze
Nakladatelství Karolinum 2014

<http://www.cupress.cuni.cz>

OBSAH

Úvod	9
1. Pravidla bezpečnosti práce	11
1.1 Cíle dodržování pravidel bezpečnosti	11
1.2 Principy	11
OBEČNÁ MIKROBIOLOGIE	
2. Odběr materiálu a principy diagnostiky	13
2.1 Odběr materiálu a transport	13
2.2 Materiál a metody	13
2.3 Podmínky pro odběr a transport vzorků	14
2.4 Žádanka	15
2.5 Principy diagnostiky v lékařské mikrobiologii	15
2.6 Světelná mikroskopie	15
2.7 Základní barvení v klinické mikrobiologii	16
2.7.1 Příprava preparátu	16
2.7.2 Bakteriální buněčná stěna a barvení podle Grama	16
2.8 Praktická část – odběr materiálu a principy diagnostiky	17
2.9 Kvíz	19
3. Přímý průkaz a typizace původců infekce	21
3.1 Definice přímé detekce a typizace	21
3.2 Mikroskopické techniky	21
3.3 Aplikace genotypových metod	23
3.3.1 Princip amplifikace DNA pomocí polymerázové řetězové reakce	23
3.3.2 Princip hybridizace DNA	24
3.3.3 Princip sekvenčních metod	24
3.4 Přímý průkaz původce jinými metodami	25
3.4.1 Imunochromatografické metody	25
3.5 Praktická část – přímý průkaz a typizace původců infekce	25
3.6 Kvíz	27
4. Kultivace původců infekčních nemocí	29
4.1 Definice kultivace	29
4.2 Kultivace bakterií, virů a parazitů	29
4.3 Půdy pro kultivaci bakterií	30
4.4 Bakteriální kultury	31
4.5 Podmínky kultivace	32
4.6 Speciální barvicí techniky	32

4.7	Praktická část – kultivace původců infekce	32
4.8	Kvíz	34
5.	Testování citlivosti k antibiotikům	35
5.1	Antibiotika – mechanismus účinku a rezistence	35
5.2	Testování citlivosti k antibiotikům	35
5.3	Základní metody	35
5.4	Interpretace výsledků	36
5.5	Ostatní metody	37
5.6	Praktická část – testování citlivosti k antibiotikům	38
5.7	Kvíz	39
6.	Identifikace původců infekčních nemocí	41
6.1	Definice identifikace a klasifikace	41
6.2	Fenotypové metody identifikace	42
6.3	Aplikace fenotypových metod	44
6.4	Genotypová identifikace	45
6.5	Praktická část – identifikace původců infekčních nemocí	46
6.6	Kvíz	47
7.	Sérologie – průkaz specifických protilátek	49
7.1	Imunitní odpověď	49
7.2	Antigen a protilátky	49
7.3	Základní sérologické metody	50
7.4	Aplikace sérologických metod	51
7.5	Praktická část – sérologie	53
7.6	Kvíz	54
8.	Obecná mykologie	55
8.1	Houby	55
8.2	Dělení hub	55
8.3	Diagnostika	56
8.3.1	Mikroskopie	56
8.3.2	Kultivace	57
8.3.3	Identifikace	57
8.4	Stanovení citlivosti na antimykotika	60
8.5	Sérologické metody	60
8.6	Detekce hub pomocí molekulárních metod přímo v klinickém materiálu	60
8.7	Praktická část – obecná mykologie	61
8.8	Kvíz	62
9.	Obecná virologie	63
9.1	Definice viru	63
9.2	Historie	64
9.3	Elektronová mikroskopie	64
9.4	Průkaz virů jinými metodami	64
9.5	Praktická část – obecná virologie	67
9.6	Kvíz	68
10.	Obecná parazitologie	69
10.1	Parazitismus, parazit a hostitelé parazitů	69
10.2	Obecná klasifikace parazitů	69
10.3	Diagnostické metody	71
10.4	Vzorky a diagnostika	71
10.5	Praktická část – identifikace původců parazitárních infekcí	72
10.6	Kvíz	74

11. Molekulární mikrobiologie a epidemiologie	75
11.1 Definice	75
11.2 Syntéza bakteriální buněčné stěny	75
11.3 Geny rezistence k antibiotikům	76
11.4 Regulace genů rezistence	76
11.5 Klonální analýza (typizace)	77
11.6 Praktická část – molekulární mikrobiologie a epidemiologie	78
11.7 Kvíz	79

SPECIÁLNÍ MIKROBIOLOGIE

12. Stafylokoky	81
12.1 Obecné vlastnosti	81
12.2 Faktory virulence a patogeneze	81
12.3 Infekce	82
12.4 Léčba a prevence	82
12.5 Diagnostika	82
12.6 Praktická část – stafylokoky	84
12.7 Kvíz	85
13. Streptokoky a enterokoky	87
13.1 Obecné vlastnosti	87
13.2 Klasifikace	87
13.3 Faktory virulence a patogeneze	87
13.4 Infekce a pozdní následky streptokokových infekcí	88
13.5 Léčba a prevence	88
13.6 Diagnostika	88
13.7 Praktická část – streptokoky a enterokoky	91
13.8 Kvíz	92
14. Korynebakterie a listerie	93
14.1 Obecné vlastnosti	93
14.2 Faktory virulence a patogeneze	93
14.3 Infekce a epidemiologie	94
14.4 Léčba a prevence	94
14.5 Diagnostika	94
14.6 Praktická část – korynebakterie a listerie	96
14.7 Kvíz	98
15. Enterobakterie a enteropatogeny	99
15.1 Obecné vlastnosti	99
15.2 Faktory virulence a patogeneze	99
15.3 Infekce a epidemiologie	100
15.4 Léčba a prevence	100
15.5 Diagnostika	100
15.6 Praktická část – enterobakterie a enteropatogeny	102
15.7 Kvíz	104
16. Anaerobní bakterie	105
16.1 Obecné vlastnosti	105
16.2 Faktory virulence a patogeneze	105
16.3 Infekce a epidemiologie	105
16.4 Léčba a prevence	106
16.5 Diagnostika	106
16.6 Praktická část – anaerobní bakterie	108
16.7 Kvíz	110

17. <i>Neisseria, Bordetella a Haemophilus</i>	111
17.1 Obecné vlastnosti	111
17.2 Faktory virulence a patogeneze	111
17.3 Infekce a epidemiologie	111
17.4 Léčba a prevence	112
17.5 Diagnostika	113
17.6 Praktická část – <i>Neisseria, Bordetella, Haemophilus</i>	115
17.7 Kvíz	116
18. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> a nefermentující tyčinky	117
18.1 Obecné vlastnosti	117
18.2 Faktory virulence a patogeneze	117
18.3 Infekce a epidemiologie	118
18.4 Léčba a prevence	118
18.5 Diagnostika	118
18.6 Praktická část – <i>Pseudomonas aeruginosa</i> a nefermentující tyčinky	120
18.7 Kvíz	122
19. Mykobakterie	123
19.1 Obecné vlastnosti	123
19.2 Klasifikace mykobakterií	123
19.3 Faktory virulence a patogeneze	123
19.4 Infekce a epidemiologie	124
19.5 Léčba a prevence	124
19.6 Diagnostika	125
19.7 Praktická část – mykobakterie	126
19.8 Kvíz	128
20. Kvasinky	129
20.1 Obecné vlastnosti	129
20.2 Faktory virulence a patogeneze	129
20.3 Infekce a epidemiologie	129
20.4 Léčba a prevence	130
20.5 Diagnostika	130
20.6 Praktická část – kvasinky	132
20.7 Kvíz	133
21. Členovci	135
21.1 Obecné vlastnosti	135
21.2 Klasifikace	135
21.3 Patogeneze	135
21.4 Infekce způsobené nebo přenášené členovci	135
21.5 Léčba a prevence	136
21.6 Diagnostika	137
21.7 Praktická část – členovci (<i>Arthropoda</i>)	138
21.8 Kvíz	139

ÚVOD

V lékařské mikrobiologii denně přibývá ohromné množství nových informací. Detailní informace jsou často však tak komplexní, že mohou značně komplikovat situaci jak studentů medicíny, tak lékařů samotných. Tato publikace byla vytvořena s cílem zjednodušit pochopení vztahů mezi teorií a praxí současné lékařské mikrobiologie. Základní mikrobiologické informace jsou v jednotlivých kapitolách přehledně zpracovány podle údajů v prestižních publikacích (Brooks et al.: *Jawetz, Melnick & Adelbergs' Medical Microbiology*, 24th edition, LANGE, 2007; *Lippincott's Illustrated Reviews, Microbiology*, 2nd edition, Lippincott Williams & Wilkins, 2007; Murray et al.: *Medical Microbiology*, 5th edition, Elsevier Mosby, 2005) a na základě vlastních zkušeností obou autorů.

Každá kapitola obsahuje teoretickou část, poskytující studentům základní informace, a praktickou část, která jim umožní vyzkoušet si v laboratoři lékařské mikrobiologie některé základní postupy v diagnostice infekčních nemocí. Věříme, že originální fotografie a schémata pomohou k pochopení základních principů mikrobiologické diagnostiky. Kvíz na konci každé kapitoly umožňuje studentům otestovat si své znalosti z dané problematiky.

Poděkování

Děkujeme za přečtení rukopisu a mimořádně cenné připomínky MUDr. Jiřímu Kadeřábkoví. Rádi bychom také poděkovali všem kolegům a zejména těm, kteří připravili kapitoly z parazitologie (Ing. Jan Urban, Ph.D.), virologie (MUDr. Petr Hubáček, Ph.D.) a mykologie (MUDr. Vanda Chrenková) včetně obrazové přílohy. Jsme rovněž rádi, že se recenze ujali zkušení kolegové prim. MUDr. Eliška Běbrová (Ústav lékařské mikrobiologie 2. LF UK v Motole) a prim. MUDr. Tamara Bergerová (Ústav mikrobiologie, FN Plzeň).

1 PRAVIDLA BEZPEČNOSTI PRÁCE

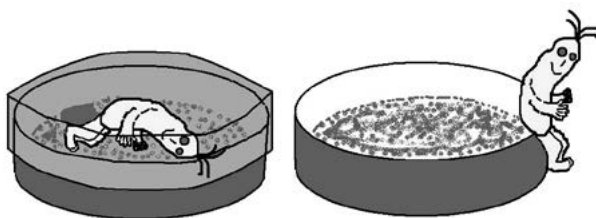
1.1 Cíle dodržování pravidel bezpečnosti

Cílem dodržování pravidel bezpečnosti v mikrobiologické laboratoři je snížit nebo eliminovat riziko expozice původci infekčních nemocí:

- a) laboratorních pracovníků
- b) jiných osob
- c) prostředí

1.2 Principy

1. Používejte pracovní plášť a jiné ochranné pomůcky při manipulaci s infekčním materiálem nebo bakteriálními kulturami. Tyto ochranné pomůcky používejte pouze v prostorách laboratoře.
2. Nejezte, nepijte, nekuřte a nedotýkejte se úst, očí a nosu v laboratoři.
3. Materiál pro mikrobiologické vyšetření zpracovávejte pouze na vyhrazeném místě.
4. Udržujte pořádek v pracovním prostoru.
5. Sterilizujte bakteriologické kličky nad plamenem nebo používejte jednorázové kličky.
6. Po práci s mikrobiální kulturou uzavřete víčkem Petriho misky, zkumavky a lahvičky (obr. 1.1).
7. Desinfikujte použité laboratorní sklo nebo jiné předměty uložením do desinfekčního roztoku. V případě použití se jednorázový materiál odstraňuje do speciálního kontejneru.
8. Desinfikujte kůži, sliznici ústní dutiny nebo pracovní povrchy okamžitě po kontaminaci mikrobiální kulturou nebo klinickým materiálem.
9. Po manipulaci s potenciálně infekčním materiálem nebo mikrobiálními kulturami si umyjte a vydesinfikujte ruce.
10. Všechny nehody v laboratoři, jako je např. rozlití infekčního materiálu, rozbití zkumavky apod., se musí okamžitě nahlásit vyučujícímu.
11. Dodržujte požární předpisy při práci s otevřeným ohněm.
12. Odnášet materiál z laboratoře je přísně zakázáno.



Obr. 1.1 Dodržujte pravidla bezpečnosti, abyste zamezili kontaminaci prostředí a předcházeli vzniku infekce

2 ODBĚR MATERIÁLU A PRINCIPY DIAGNOSTIKY

2.1 Odběr materiálu a transport

Kvalita mikrobiologického výsledku je přímo závislá na kvalitě vzorku (obr. 2.1)! Nezbytným předpokladem pro příjem vzorku je řádná **identifikace pacienta** – jméno, příjmení, rodné číslo nebo číslo pojištění.



Obr. 2.1 Tři nezbytné součásti mikrobiologického vyšetření: 1. odběr materiálu a transport, 2. výsledky, 3. interpretace

2.2 Materiál a metody

Vzorky jsou odebírány od pacientů na oddělení nebo v ambulanci přítlačným a rotujícím sterilním vatovým nebo dakronovým výtěrovým tampónem do zkumavek, kontejnerů apod. (obr. 2.2). Výtěrovkou se odebírá vzorek zejména z povrchů (sliznice, kůže), případně ran. Výtěrovka se zanoří do transportního média (médium bez živin – počet mikrobiálních zárodků se nezvyšuje během skladování nebo transportu a zárodky nevysychají). Tekutiny a tkáně jsou odebírány do zkumavek a kontejnerů. Hemokultury, zejména od febrilních pacientů za účelem diagnostiky infekce krevního řečiště při systémových infekcích, se po desinfekci místa odběru asepticky odebírají do hemokultivačních lahvíček pro kultivaci aerobní, anaerobní a kultivaci hub – poslední pouze při podezření na systémovou mykotickou infekci (obr. 2.2). U dospělých pacientů se odebírá 10–20 ml krve a u dětí podle věku 0,5–4 ml krve. Frekvence (obvykle opakovaný odběr pro aerobní a anaerobní hemokultivaci) a časování odběrů hemokultur se řídí charakterem klinického obrazu a teplotní křivky.

Označené vzorky (chyba – záměna pacienta) jsou zasílané spolu se žádankou do laboratoře co nejrychleji (tab. 2.1). Detailní postup pro odběr, transport, zpracování a interpretaci výsledků je uveden v laboratorní příručce příslušné laboratoře.



Obr. 2.2 Pomůcky pro odběr vzorků z respiračních cest a systémové infekce: výtěrové tampóny (1, 2), výtěrové tampóny s transportním médiem (3, 4), spatula (5), odběrový kontejner (6) a hemokultura anaerobní (7), aerobní (8) a mykologická (9)

2.3 Podmínky pro odběr a transport vzorků

Principy odběru jsou uvedeny v tab. 2.1, detaily v laboratorní příručce každé laboratoře. Tabulka 2.1 neuvádí postup na získání séra, který se nejčastěji využívá pro sérologickou diagnostiku virových infekcí, ale v indikovaných případech i pro diagnostiku bakteriálních, mykotických a parazitárních infekcí. Venózní krev pacienta, která byla odebrána aseptickou venepunkcí, se centrifuguje a získá se tak sérum (supernatant). Sérum se krátkodobě uchovává v chladu při 4–8 °C a při dlouhodobém skladování v mrazu. Tabulka rovněž neuvádí postup pro odběr moči při močové infekci. Střední proud ranní moči se odebírá do sterilního odběrového kontejneru po umytí zevních genitálií vlažnou vodou a jejich osušení. Vzorek se až do odeslání do laboratoře téhož dne skladuje při teplotě 4–8 °C, aby nedošlo k pomnožení bakterií. Postup pro odběr hemokultury je uveden v předchozím odstavci 2.2.

Tab. 2.1 Podmínky pro odběr a transport vzorků (PT – pokojová teplota)

Původce	Materiál/podmínky	Uchovávání, transport
Bakterie	výtěrka do transportního média	PT
Viry	výtěrka, tekutina, tkáň transportní médium = kultivační m.	4–8 °C
Paraziti/vajíčka	odběr 3× (stolice každý druhý den) (kontejner/zkumavka)	PT (uchovávání 4–8 °C do týdne)
Anaeroby	tekutina, tkáň (zamezit kontaktu s kyslíkem)	PT
Růstově náročné bakterie	speciální podmínky (př. <i>Neisseria</i> spp.)	různé (při prodlení – zamrazit)

2.4 Žádanka

Žádanka musí být přiložena ke každému vzorku (tab. 2.2).

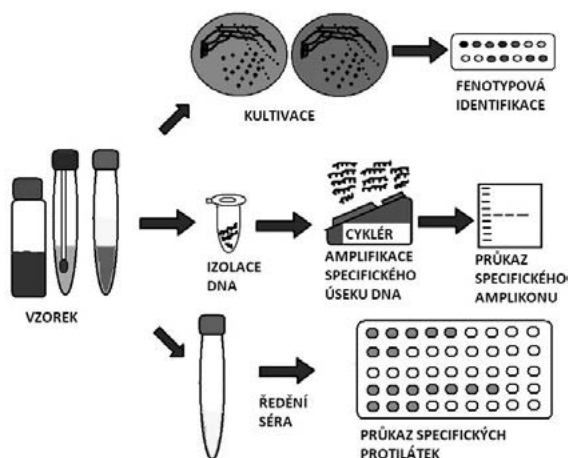
Tab. 2.2 Příklad žádanky

Číslo vzorku	2489
Datum odběru materiálu	28. 8. 2008
Příjmení a jméno pacienta	Nádherná Simona 680811/1458
Oddělení	chirurgické, FN v Motole
Lékař, kontakt	Dr. Pečlivý Petr, 224 430 000
Vzorek	sputum
Klinická diagnóza	bronchopneumonie
Požadované vyšetření	mikroskopie, kultivace, citlivost k ATB

(pozn.: ATB – antibiotika)

2.5 Principy diagnostiky v lékařské mikrobiologii

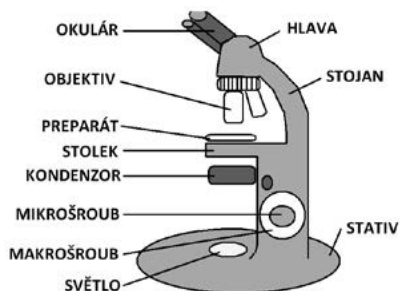
Původce infekční nemoci může být prokázán v klinickém materiálu **přímo** (mikroskopie, kultivace, průkazem antigenu, průkazem DNA, RNA, jinak) nebo **nepřímo** průkazem specifických protilátek (obr. 2.3).



Obr. 2.3 Principy diagnostiky v lékařské mikrobiologii; poznámka: viry potřebují ke kultivaci živou hostitelskou buňku (kultivace na tkáňových kulturách)

2.6 Světelná mikroskopie

Principy světelné mikroskopie: viditelné světlo procházející vzorkem a čočkami mikroskopu umožňuje zvětšit pozorovaný objekt. Obraz se pozoruje přímo očima, nebo je zachycen fotograficky (obr. 2.4).

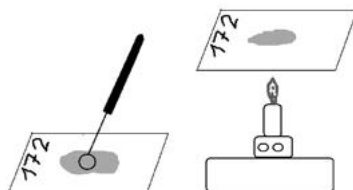


Obr. 2.4 Světelný mikroskop a jeho součásti

2.7 Základní barvení v klinické mikrobiologii

2.7.1 Příprava preparátu

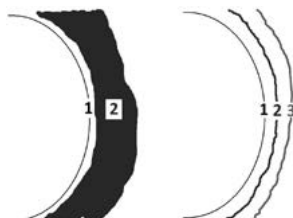
Postup přípravy mikroskopického preparátu je znázorněn na obr. 2.5.



Obr. 2.5 Příprava preparátu: 1. označení sklíčka; 2. rozetření tenké vrstvy klinického vzorku nebo mikrobiální kultury; 3. vysušení při pokojové teplotě; 4. fixování preparátu teplem (např. třikrát protažením preparátu nad plamenem) nebo metanolem

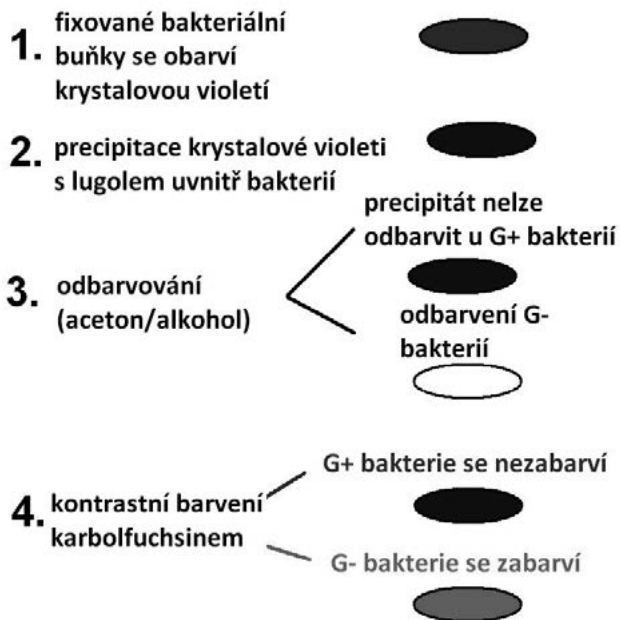
2.7.2 Bakteriální buněčná stěna a barvení podle Grama

Povrchové struktury grampozitivních (G+, vlevo) a gramnegativních (G-, vpravo) bakterií jsou znázorněné na obr. 2.6.



Obr. 2.6 Diagram znázorňující povrchové struktury grampozitivních a gramnegativních bakterií: 1. cytoplasmatická membrána, 2. buněčná stěna (peptidoglykan je tvořen polymerními polysacharidy propojenými aminokyselinami; u grampozitivních bakterií je buněčná stěna velmi silná), 3. vnější membrána

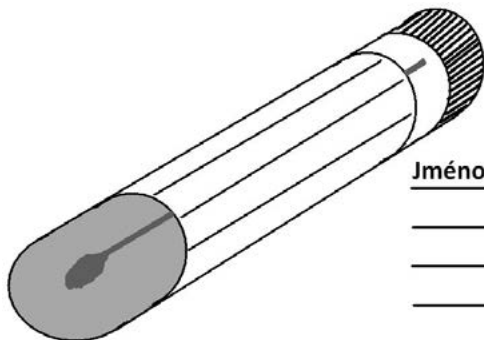
Metoda barvení podle Grama je uvedena na obr. 2.7.



Obr. 2.7 Schéma barvení podle Grama

2.8 Praktická část – odběr materiálu a principy diagnostiky

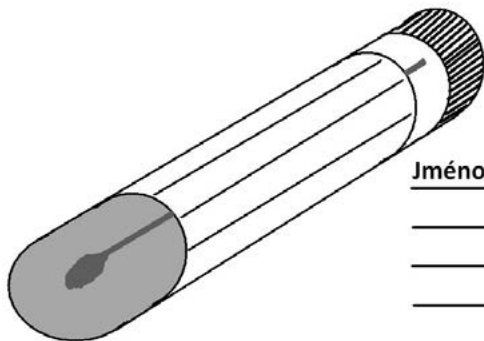
2.8.1 Cvičení: VÝTĚŘ Z TONZIL. Fixujte jazyk kolegy/pacienta spatulou a rotujícím výtěrovým tampónem odeberte vzorek z tonzil bez dotyku jazyka a bukální sliznice. Vzorek by měl být zpracován v laboratoři do dvou hodin. Pečlivě označte vzorek a přiložte k němu vyplněnou žádanku. Pokud ke zpracování dojde později, zanořte tampón do transportního média a uchovávejte ho při pokojové teplotě.



ŽÁDANKA

Jméno a příjmení: _____

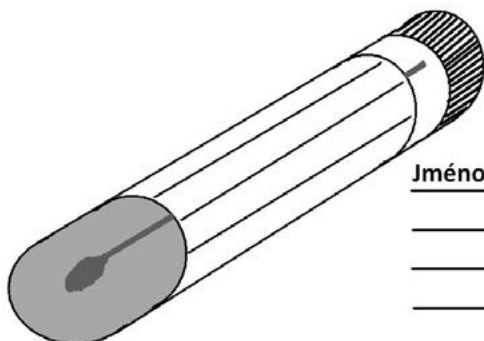
2.8.2 Cvičení: VÝTĚR ZE ZVUKOVODU. Rotujícím výtěrovým tampónem odeberte vzorek ze zvukovodu kolegy/pacienta. Vzorek by měl být zpracován v laboratoři do dvou hodin. Pečlivě označte vzorek a přiložte k němu vyplněnou žádanku. Pokud ke zpracování dojde později, zanořte tampón do transportního média a uchovávejte ho při pokojové teplotě.



ŽÁDANKA

Jméno a příjmení: _____

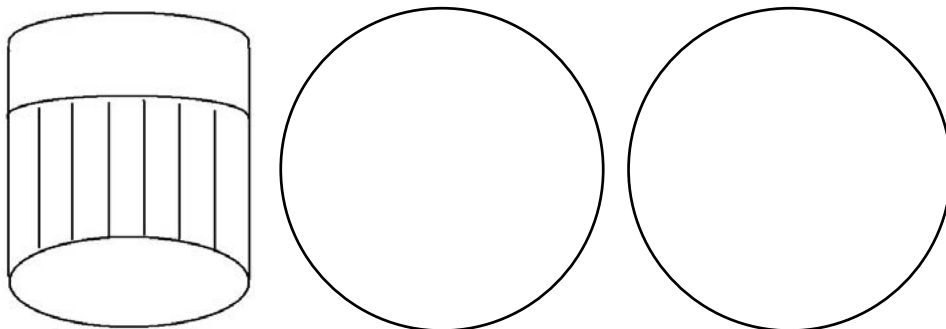
2.8.3 Cvičení: VÝTĚR Z NOSU. Rotujícím výtěrovým tampónem odeberte vzorek z přední části (antra) nosu kolegy/pacienta. Vzorek by měl být zpracován v laboratoři do dvou hodin. Pečlivě označte vzorek a přiložte k němu vyplněnou žádanku. Pokud ke zpracování dojde později, zanořte tampón do transportního média a uchovávejte ho při pokojové teplotě.



ŽÁDANKA

Jméno a příjmení: _____

2.8.4 Cvičení: ZPRACOVÁNÍ SPUTA. Zpracujte sputum pacienta, které bylo odebrané do sterilního kontejneru. Připravte roztěr z materiálu, fixujte ho a obarvěte podle Grama. Zakreslete epitelie dýchacího aparátu a mikroflóru, kterou jste pozorovali, a popište nález.



2.9 Kvíz

- 2.9.1 Vyjmenujte tři nezbytné části mikrobiologického vyšetření. Blíže specifikujte první část (pomůcky, podmínky).
- 2.9.2 Popište postup pro získání séra.
- 2.9.3 Proč používáme transportní médium?
- 2.9.4 Obsahuje transportní médium pro bakteriologické vyšetření nějaké živiny?
- 2.9.5 Jsou všechny klinické vzorky potenciálně infekční?

