

# Lékařská mikrobiologie pro ZDRL

Týden 18:

Přehled anaerobů a mykobakterií

Autor prezentace: Ondřej Zahradníček

[zahradnicek@fnusa.cz](mailto:zahradnicek@fnusa.cz)

# Co nás dnes čeká

- Nesporulující anaerobní bakterie
- Klostridia (grampozitivní sporulující anaerobní tyčinky)
- Mykobakteria (původce tuberkulózy, původce lepry, atypická mykobakteria); zmínka o aktinomycetách a nokardiích

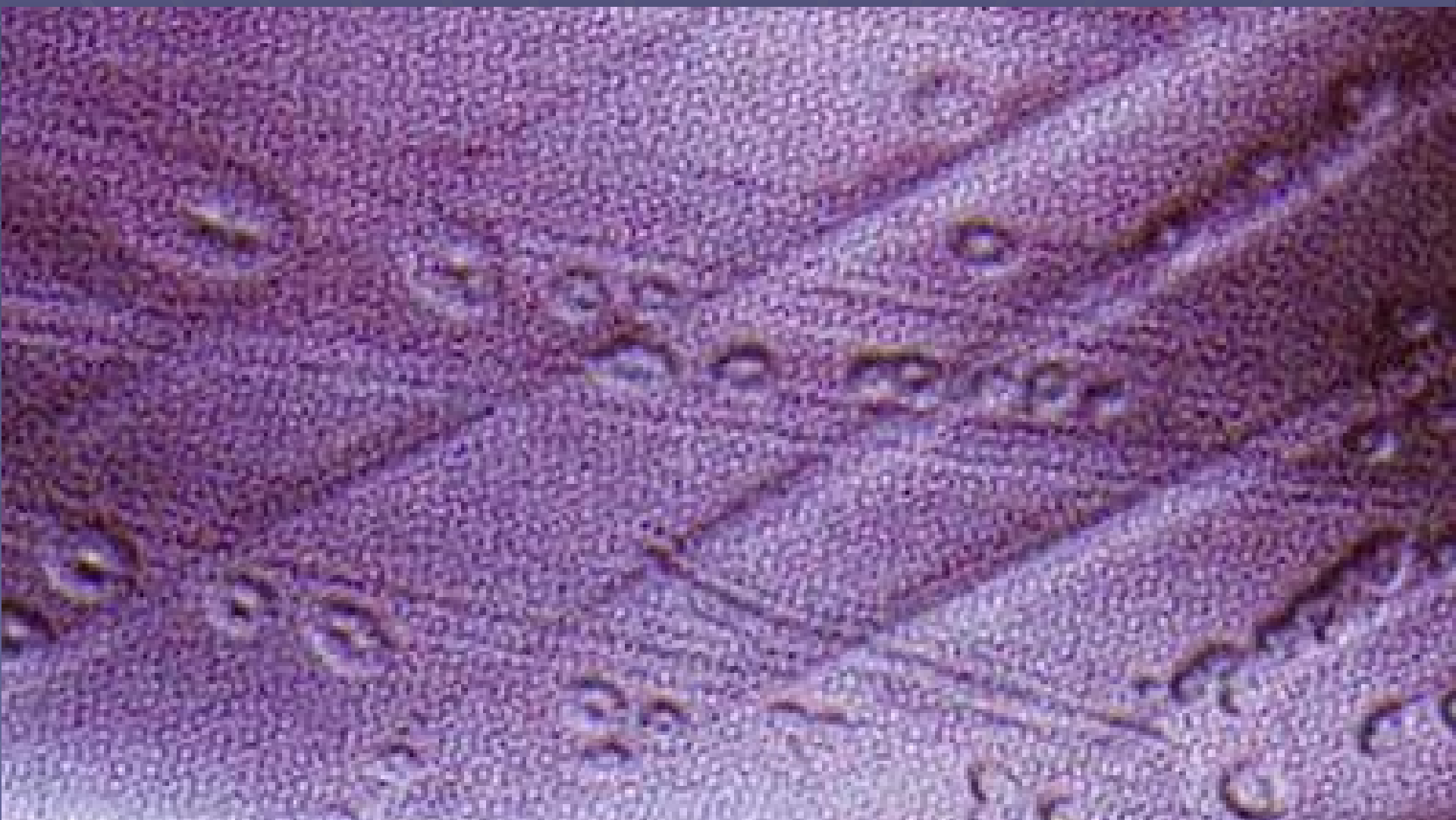
# Ještě než začneme...

- ...měli bychom si cosi uvědomit. Doted' (minulé dvě přednášky) jsme si povídali většinou (*až na výjimky, např. původce kapavky*) o bakteriích, které se projeví při běžné diagnostice.
- Doktor prostě pošle vzorek „na kultivaci“, a ono z něj „něco vyrostě“.
- S tím už je ale KONEC! Dál už nás čekají jen mikroby, pro které tohle neplatí.

# Takže:

- Pokud chce ošetřující lékař, aby byl jeho vzorek prověřen na přítomnost anaerobů, mykobakterií či aktinomycet, musí to uvést na žádance. Musí se užít speciální postupy.
- U dalších původců (třeba spirochet či chlamydií) se navíc zpravidla odebírá sérum a provádí se nepřímý průkaz
- Laborant si toho musí být vědom a případně upozornit na vhodný způsob odběru či označení průvodky

# 1. Nesporeující anaeroby



*Bacterioides ureolyticus*

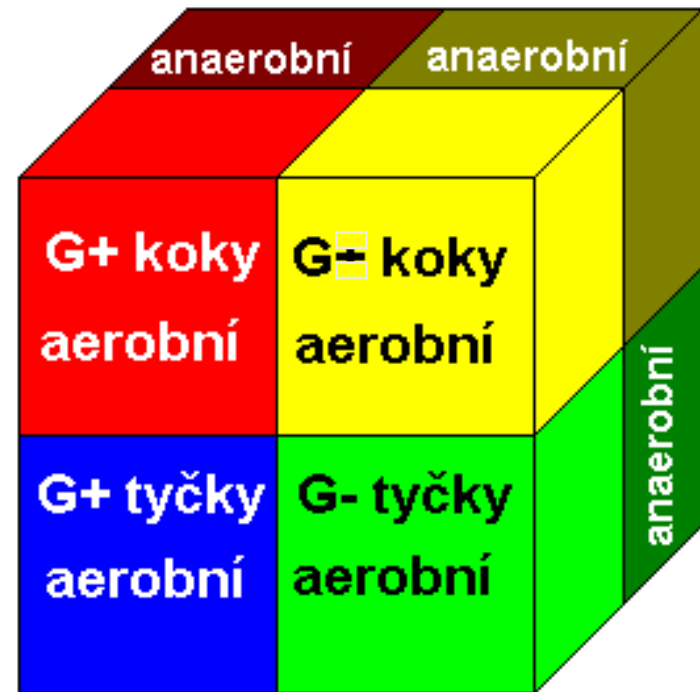
# Co jsme znali doted'

- Zatím jsme se seznámili se čtyřmi skupinami mikrobů, které **rostou za aerobních podmínek** – ať už jsou **striktně aerobní** jako např. pseudomonády, nebo **fakultativně anaerobní** jako třeba *Escherichia coli*.

<b>G+ koky</b>	<b>G- koky</b>
<b>G+ tyčky</b>	<b>G- tyčky</b>

# Nyní si přidáme další čtyři skupiny

- Každá z oněch čtyř skupin má totiž svoje **anaerobní „bratříčky“**. Jejich vlastnosti se výrazně liší od aerobních bakterií a naopak vykazují některé **společné charakteristiky**. Vymyká se jen rod *Clostridium*, protože umí tvořit spory



# Společné charakteristiky nesporelujících anaerobů

- Vyskytují se jako běžná flóra:
  - **v tlustém střevě**, kde tvoří 99 až 99,9 % (dle různých údajů) celkového objemu mikrobů, je jich tam kolem jednoho kilogramu
  - **v ústech**, kde mohou žít díky biofilmu – jsou do něj zavzaty tak, aby neměly přímý přístup ke vzduchu, které by je ohrožoval
  - **v pochvě**, kde nejsou přítomny u všech žen, ale uvádí se, že asi 70 % žen nějaké anaeroby v pochvě má a považuje se to za normální stav; jen pokud se zde přemnoží, jde o dysmikrobii, kterou je nutno léčit



# Veillonova flóra

- Při zánětu **obvykle neexistuje jeden původce**, ale uplatňuje se směs. Někdy se používá termín „Veillonova flóra“
- Velmi často se ovšem na takových infekcích podílejí vedle striktně anaerobních bakterií také **bakterie fakultativně anaerobní** (např. ze střeva)
- Často bakterie **nemusejí aktivně provádět invazi** (např. do břišní dutiny) – dostanou se tam spíše pasivně narušením stěny zánětem, nádorem či úrazem

# Kde se tedy typicky vyskytují anaerobní infekce?

- **V břišní dutině** (průnik bakterií ze střeva)
- **V pánevní oblasti** (průnik z pochvy)
- **Ve tkáních krku a hrudníku** (průnik z dutiny ústní – týká se také aktinomykózy, viz dále)
- **V plicích** (průnik z dutiny ústní nebo ze střeva, často tonutí nebo při vdechnutí zvratků – často u alkoholiků a lidí v kolapsovém stavu)
- **Někdy i v samotné dutině ústní, pochvě, výjimečně i ve střevě**

*Toto se týká nesporelujících anaerobů – klostridiové anaerobní infekce mívají jiné lokalizace (většinou se šíří z ran)*

# Anaerobní infekce z ústní dutiny



# Novorozenecká anaerobní pneumonie

aapredbook.aapublications.org

*Bacteroides* and *Prevotella* infections. *Bacteroides fragilis* pneumonia in newborn (*B. fragilis* isolated from the placenta and blood culture from the newborn). Anaerobic cultures were obtained because of a fecal odor in the amniotic fluid



# Gingivostomatitis: *Prevotella gingivalis*

[www.mamagums.com](http://www.mamagums.com)



# Přenos infekce

- Významný je **endogenní přenos** (= v rámci těla pacienta), jak již bylo řečeno
- Jiný než endogenní přenos je málo běžný; do rány se mohou anaeroby dostat při pokousání, do střeva s potravou
- Nezpůsobují velké nemocniční (nozokomiální) epidemie, nozokomiální endogenní infekce jsou však poměrně časté, někdy se i kvůli nim provádí profylaxe před chirurgickými zákroky

## Diagnostika

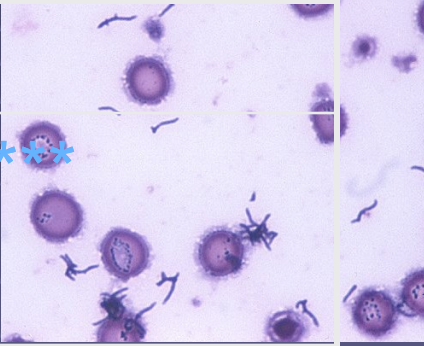
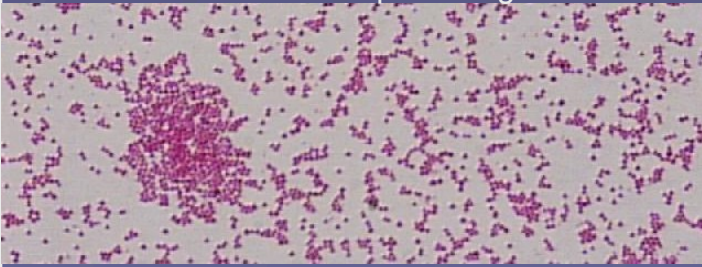
- Bude probrána až po probrání rodu *Clostridium* pro obě skupiny dohromady

# Léčba

- **Penicilin** je dle literatury lékem volby anaerobních infekcí kromě infekcí způsobovaných rodem *Bacteroides*, který je primárně rezistentní. V praxi se ale častěji využívají **aminopeniciliny**, případně i s inhibítorem betalaktamázy
- **Metronidazol** se používá např. u anaerobních poševních infekcí, jeho výhodou je zde současná účinnost na trichomonády
- Z **dalších antibiotik** se uplatňují například linkosamidy

# Přehled nesporelujících anaerobů (u člověka nejběžnější druhy)

<http://www.geocities.com>

	Koky	Tyčinky	
G+	<i>Peptococcus</i> <i>Peptostreptococcus</i>	<i>Propionibacterium</i> *** <i>Eubacterium</i>	
G-	<i>Veillonella</i>  <a href="http://www.geocities.com">http://www.geocities.com</a>	<i>Fusobacterium</i> , <i>Leptotrichia</i> * <i>Bacteroides</i> , <i>Prevotella</i> , <i>Porphyromonas</i> **	

\*se zašpičatělými konci

\*\*s rovnými konci tyčinky

\*\*\*není stoprocentní anaerob



# Rozdíly mezi gramnegativními anaerobními tyčinkami

Rod <i>Bacteroides</i>	<i>Prevotella</i> a <i>Porphyromonas</i>
Převážně ve střevě	Převážně v ústní dutině
Rezistentní na penicilin	Bývají citlivé na penicilin
Biochemicky aktivnější	Biochemicky méně aktivní
Netvoří pigment	Často tvoří pigment
Původně všechny patřily do rodu <i>Bacteroides</i>	



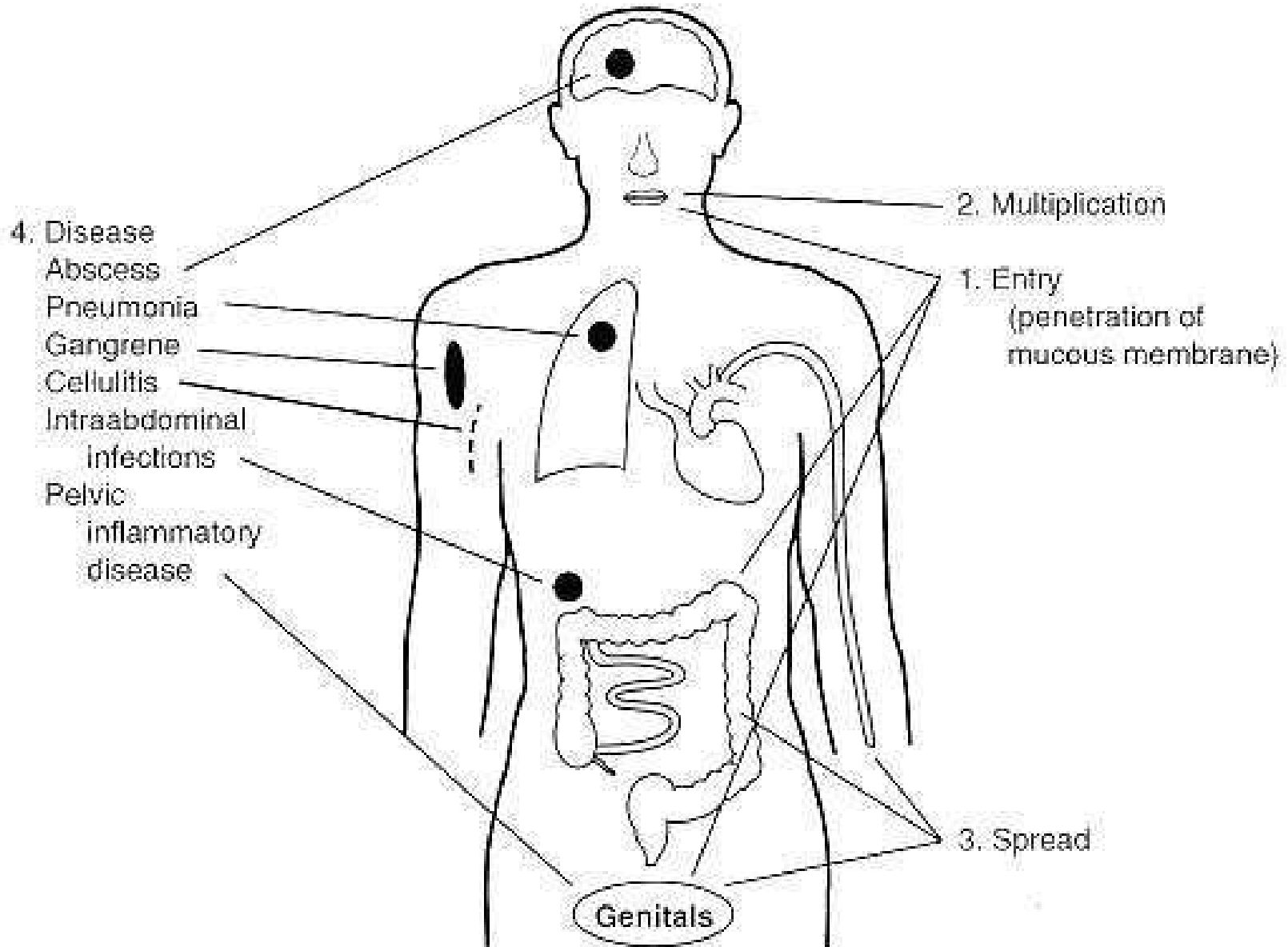
# Příběh

- Paní Raková byla přijata pro horečnatý stav a **intenzivní bolesti břicha**
- Zobrazovací metody ukázaly na **absces malé pánve**. Ukázaly však také **nádor na děložním čípku** – později se ukázalo že jde o **karcinom**
- U paní Rakové se naštěstí podařilo **operačně vyřešit** nejdříve absces a poté i nádor, byť za cenu provedení hysterektomie. Metastázy se naštěstí neobjevily.

# V abscesu se našla...

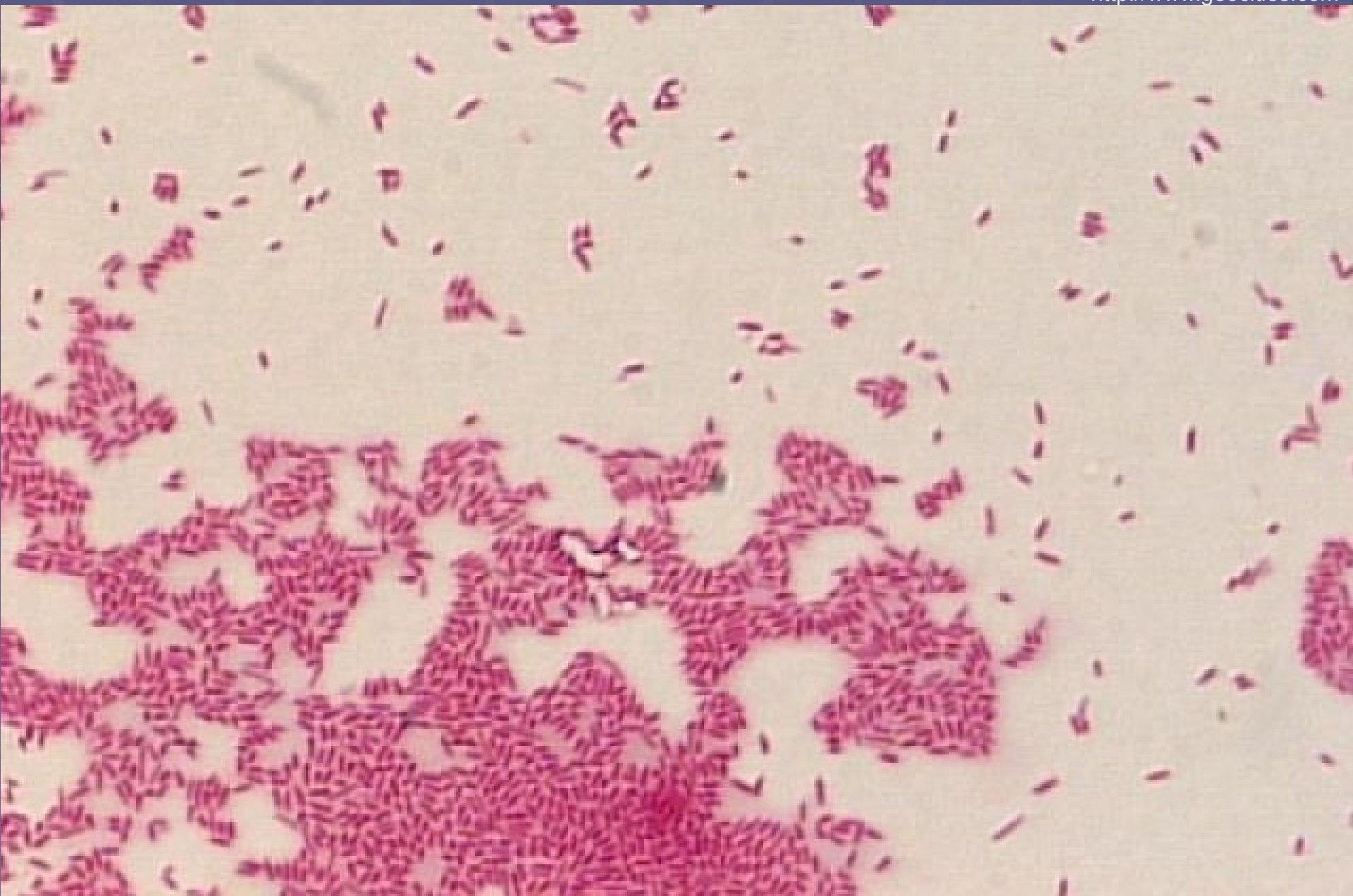
- ...směs striktně anaerobních, ale i fakultativně anaerobních bakterií
- Tato směs se zřejmě vyskytovala v pochvě paní Rakové, aniž by jí činila sebemenší problémy
- Nádor však porušil anatomickou bariéru, a mikroby se dostaly do míst, kde způsobily absces.

# Anaeroby v těle



# *Bacteroides fragilis*

<http://www.geocities.com>



# *Bacteroides* sp.

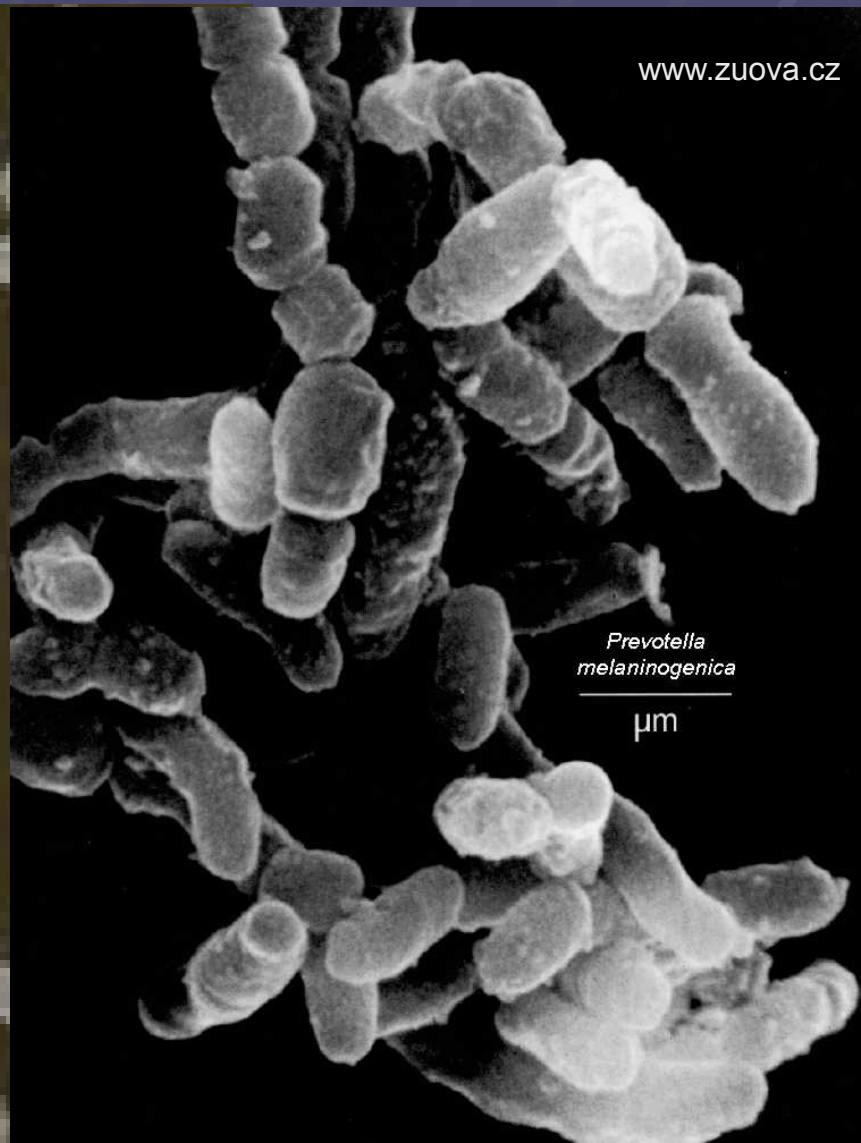
www.medmicro.info, foto O. Z.

Dříve se používal pro tyto útvary název  
„*Sphaerophorus necrophorus*“, tedy  
„Kulonoš smrtonosný“



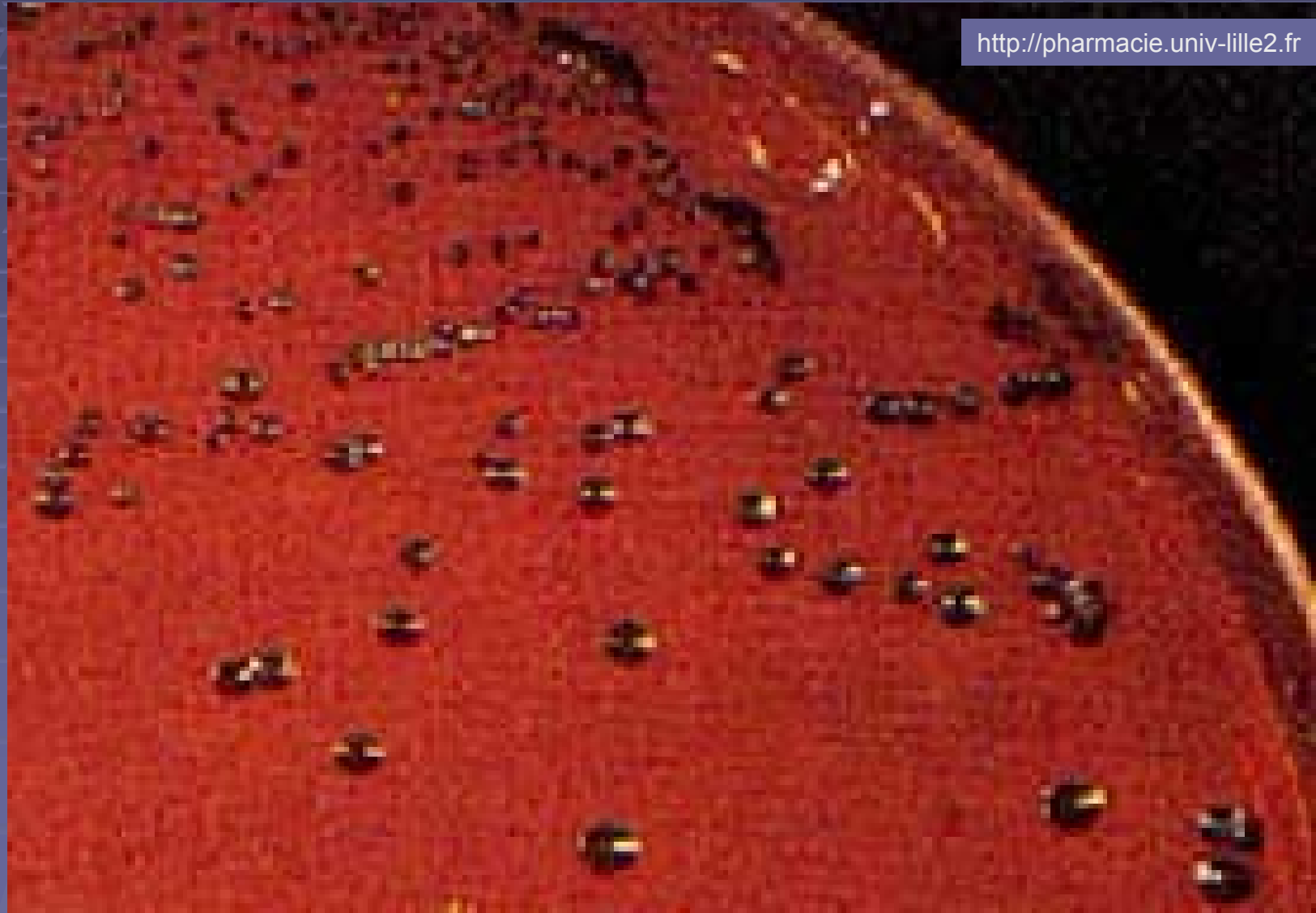
# *Porphyromonas gingivalis*

# *Prevotella melaninogenica*



# *Prevotella melaninogenica* (černý pigment)

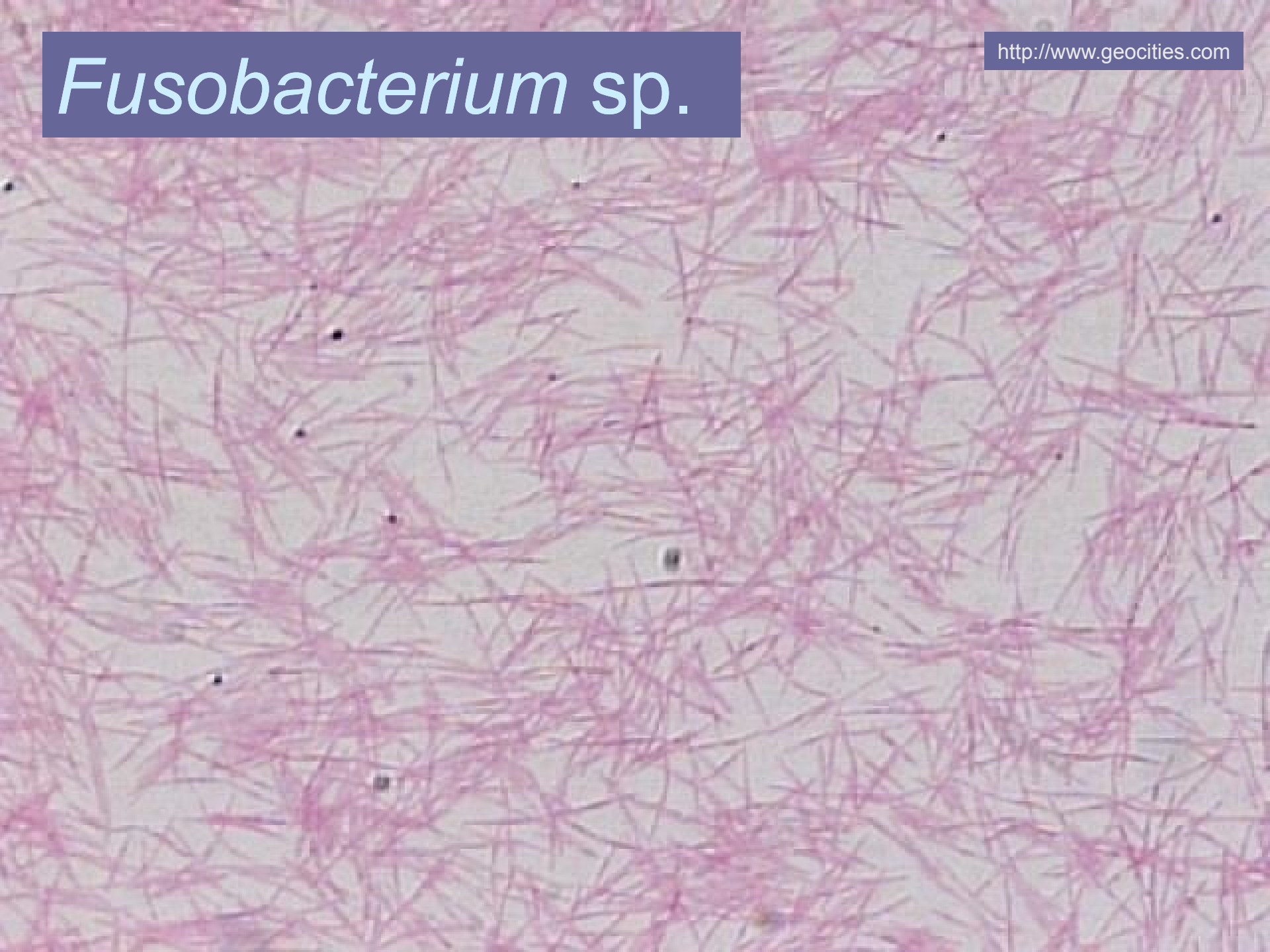
<http://pharmacie.univ-lille2.fr>





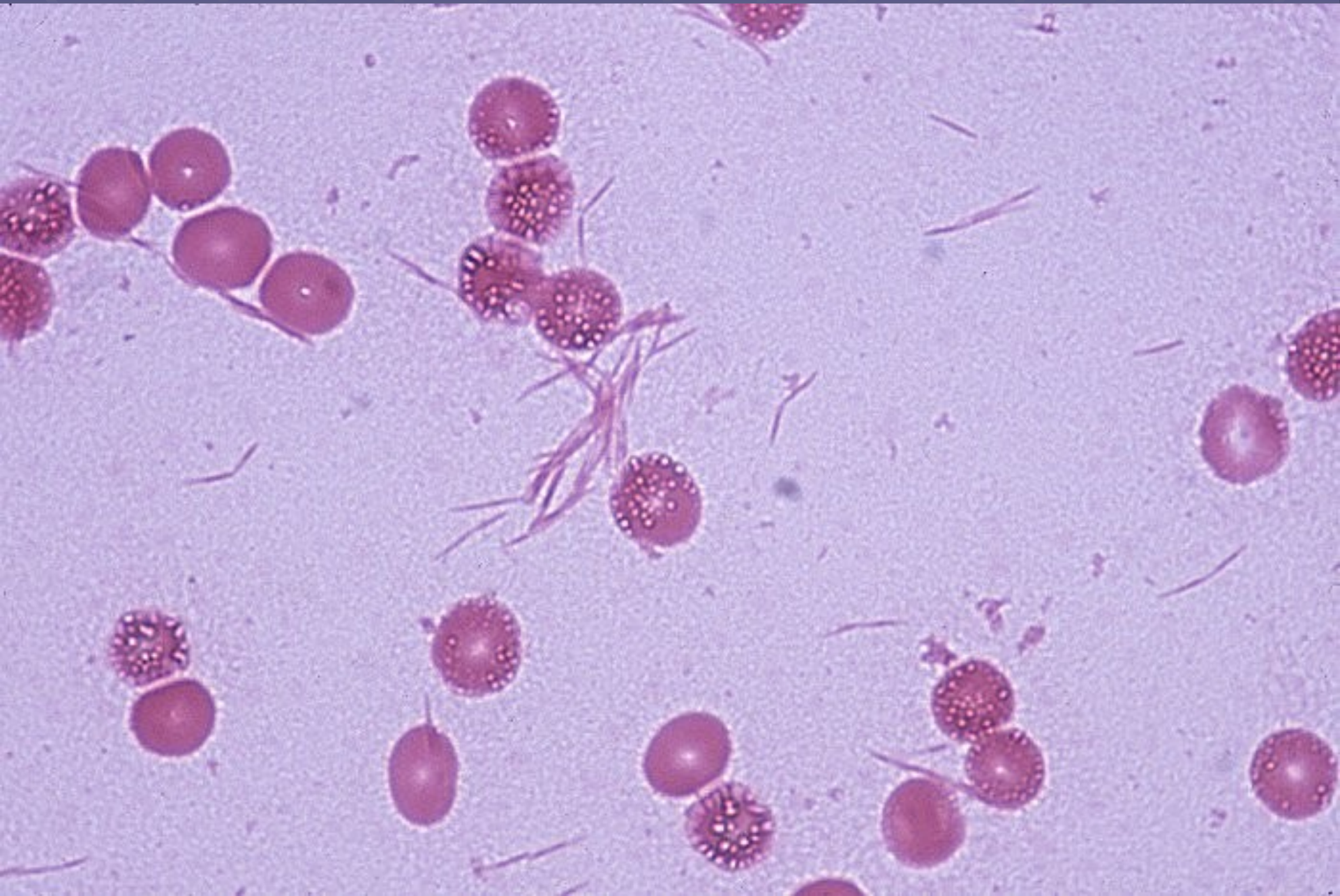
# *Fusobacterium* sp.

<http://www.geocities.com>



# *Fusobacterium nucleatum*

<http://www.geocities.com>



A petri dish containing a red agar medium. The surface of the agar is covered with a dense, dark, fuzzy growth of bacteria, characteristic of *Leptotrichia buccalis*. The growth is most prominent in the center and spreads towards the edges. The petri dish is placed on a light-colored surface.

*Leptotrichia  
buccalis*

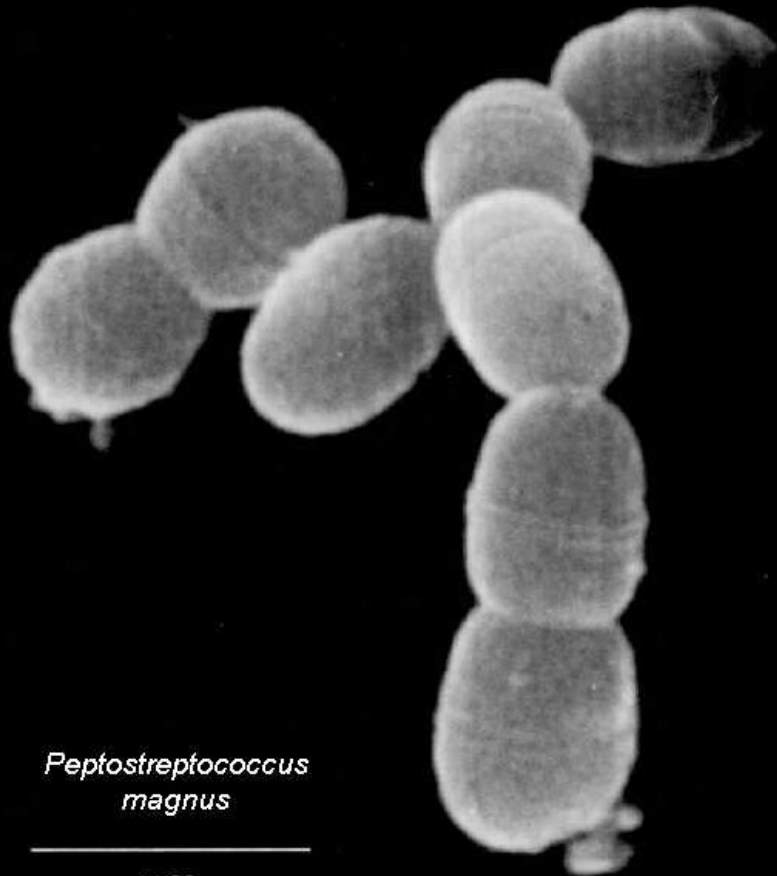
<http://pharmacie.univ-lille2.fr>

*Peptostreptococcus* sp.



# *Peptostreptococcus magnus*

www.zuova.cz



*Peptostreptococcus  
magnus*

µm



www.szu.cz

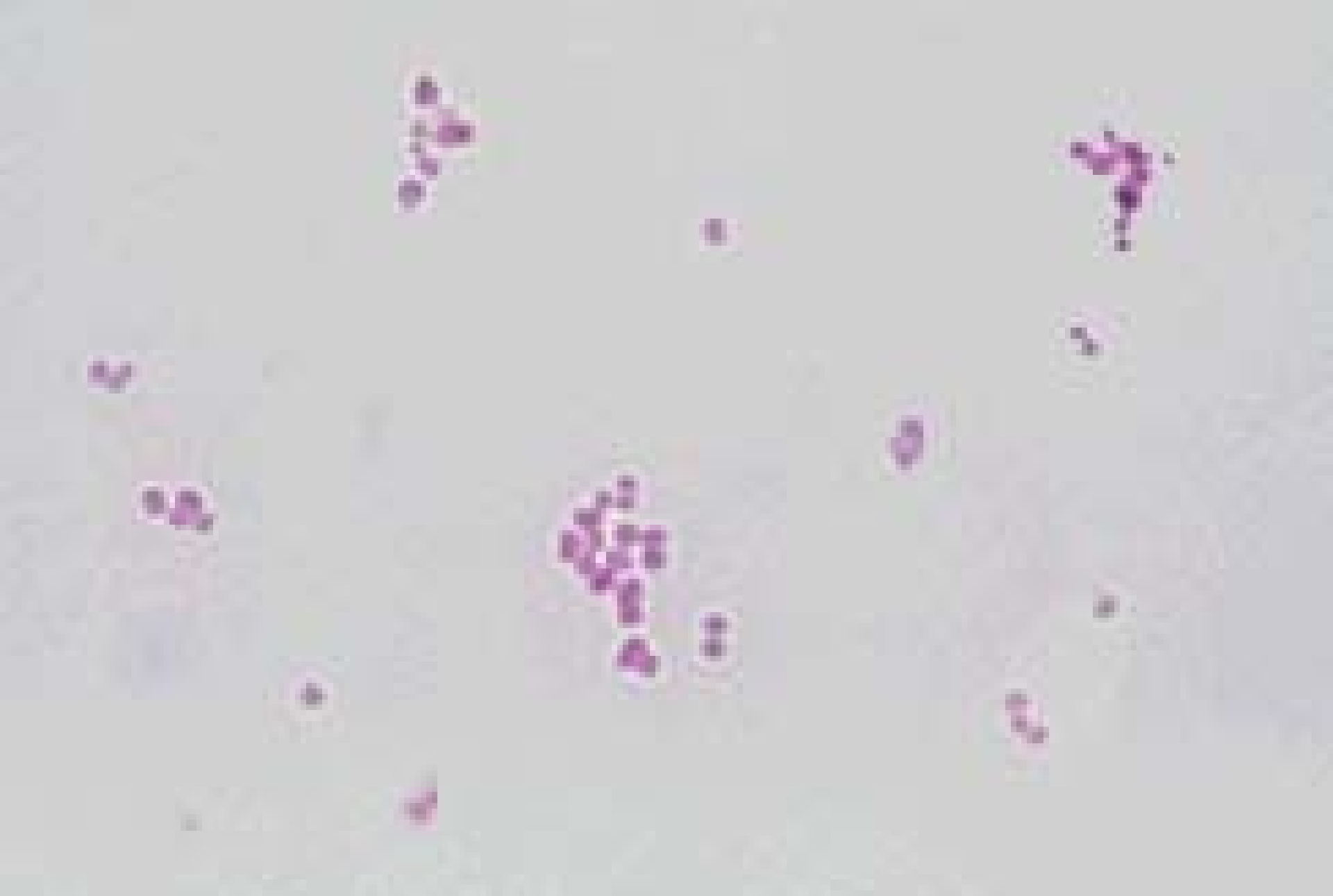
# *Peptostreptococcus anaerobius*

# *Peptococcus constellatus*



# *Veillonella* sp.

<http://www.primer.ru>



A microscopic image showing numerous dark, rod-shaped Clostridia bacteria scattered across a light blue background. The bacteria vary in length and some show internal structures. A red-bordered box with a light blue background is centered in the upper right, containing the text '2. Klostridia'.

## 2. Klostridia



# Úvod: Mikulecké pole trochu jinak

Mikulecké pole

hluboko zorané

Nejedno *Clostridium tetani*

v tom poli je schované

V poli je schované

zalezlé ve spoře

Čeká až syneček nějaký

to pole zas pooře...

*(Zpívá se jako*

*normální Mikulecké*

*pole od Fanoša*

*Mikuleckého)*

S takým klostridiem

Nedobře kočkovat

Nechaj sa, synečku zavčasú

pořádne přeočkovat...



Copyright © 2001 Dennis Kunkel Microscopy, Inc. / Dennis Kunkel

# Základní charakteristika

- Klostridia jsou **G+ sporující tyčinky**. Jsou také striktně anaerobní, některá dokonce ve vegetativní formě snášejí ještě méně kyslíku než nesporující anaeroby. Tvoří ale spory, a ve stadiu spory mohou přežívat nejen kyslík, ale i „mnohem horší věci“
- Mohou takto přežít dlouhodobé vyschnutí, vysoké teploty či desinfekci. Jsou ale o něco méně odolné než spory bacilů.
- Endospory mohou mít různou **polohu**, což lze využít v diagnostice

# Klinická charakteristika

- Mnohá klostridia se vyskytují **ve střevě** za normálních okolností. Škodit začnou při přemnožení, pokud jde o kmen produkující střevní toxiny
- Jejich patogenita se odvíjí především od **toxinů působících na nervovou soustavu** (tetanus, botulismus), **ve tkáni** (plynatá sněť) či **ve střevě** (různé toxiny různých klostridií)

*Více v dalším povídání u jednotlivých klostridií*

# Přenos infekce

- Na rozdíl od nesporulujících anaerobů je ***mnohem jednodušší přenos***, neboť spory mohou přežívat ve vnějším prostředí
- U **tetanu** dojde k infekci hlavně při bodné ráně, která je kontaminována půdou či hnojem a je špatný přístup kyslíku (trn, vidle)
- U **plynaté sněti** je zpravidla nutné rozsáhlejší poranění s narušením cév (válka, živelní pohromy)
- U **botulismu** člověk zkonsumuje botulotoxin

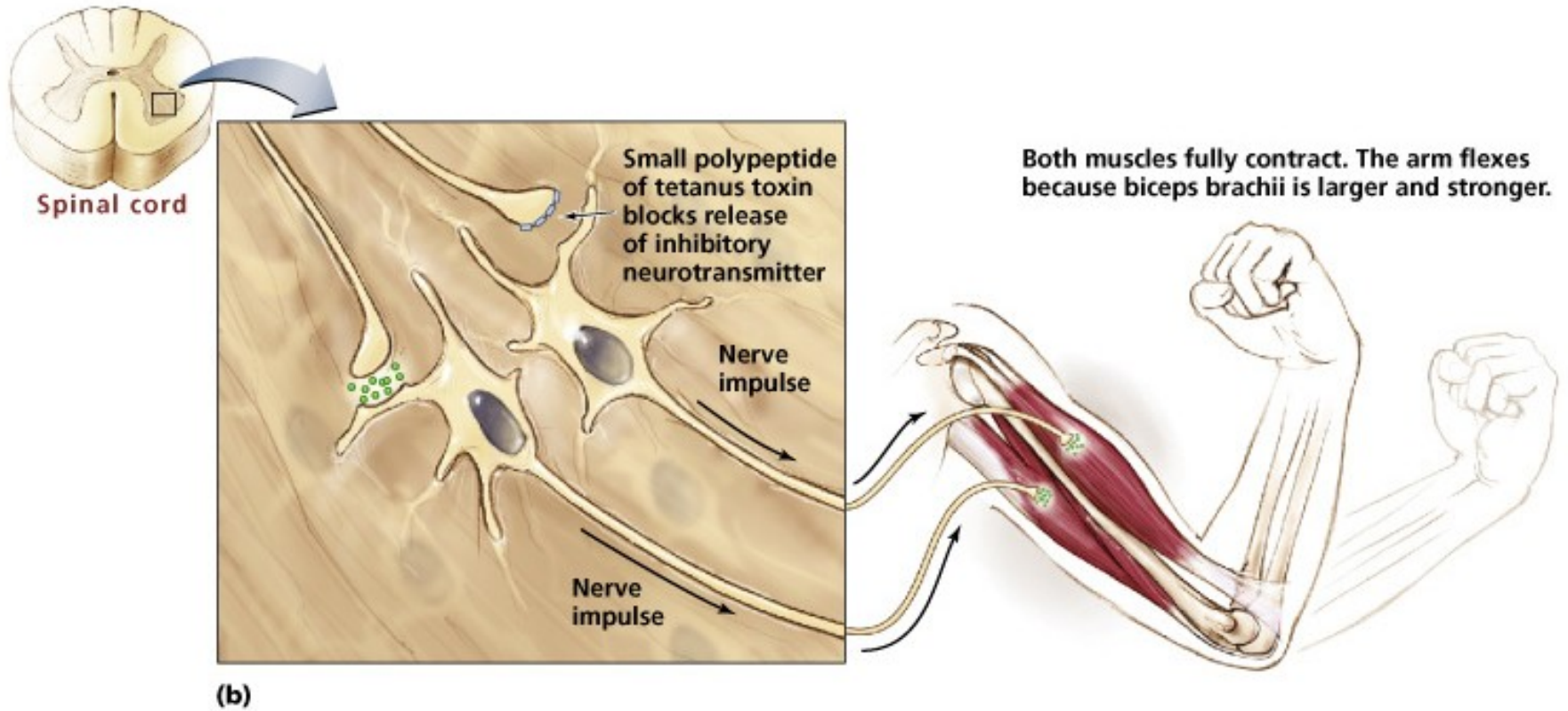
# Prevence, profylaxe a léčba

- **Prevence** tetanu se děje pomocí očkování (anatoxinem čili toxoidem = toxinem, který je zbaven toxicity, ale má zachované antigenní působení)
- **Profylaxe** tetanu se kromě očkování děje i pasivní imunizací protilátkami. Existuje také pasivní imunizace u plynaté sněti
- Také v **léčbě** lze použít antitoxiny, z antibiotik se používá často penicilin. U plynatých snětí je zásadní okysličení ložiska. U botulismu a tetanu je nutno pečovat o celkový stav pacienta

# Neurotoxická klostridia

- **Tato dvě klostridia mají společné to, že působí prostřednictvím neurotoxinů. Ve tkáni vyvolávají jen malý (u tetanu) nebo žádný (u botulismu) zánět.**
- ***Clostridium tetani*** je původcem **tetanu**. Nemoc je typická místním drobným zánětem, a celotělovým šířením toxinu. Toxin vyvolává **křeče**.
- Další neurotoxické klostridium je ***Clostridium botulinum***, původce **botulismu**. Zde původce vůbec nevstupuje do těla. Jen jeho toxin vstupuje do těla (zpravidla z nedostatečně upraveného konzervovaného masa) a opět účinkuje jako neurotoxin, zde však vyvolává **obrny**.

# Tetanus



# Tetanus

[www2.bc.cc.ca.us](http://www2.bc.cc.ca.us)





# Tetanický muž



# Ještě jednou tetanus

<http://pharmacie.univ-lille2.fr>



# Trismus (křeč čelistních svalů)

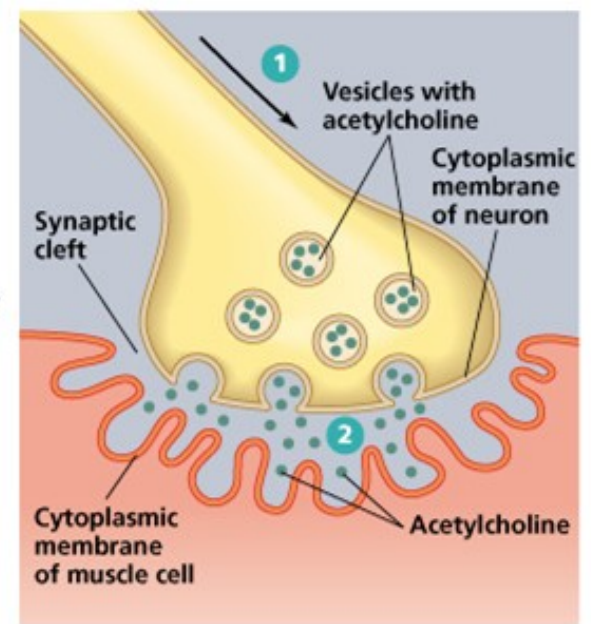
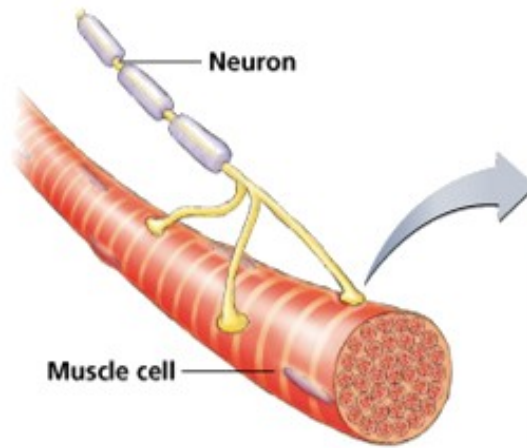
<http://pharmacie.univ-lille2.fr>



# Příběh první

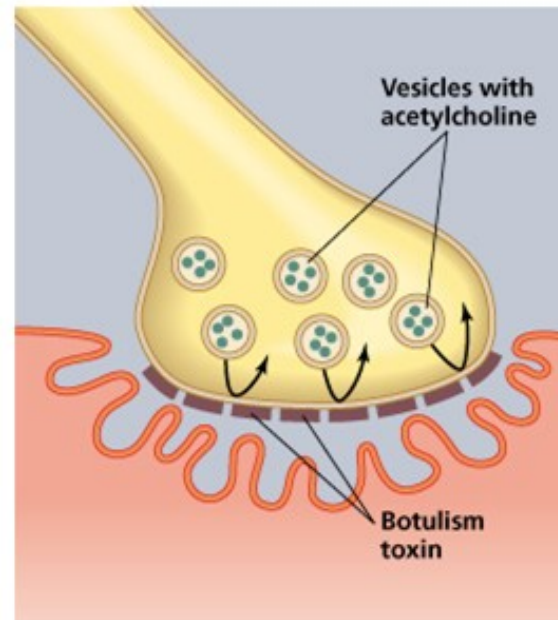
- Paní Kapustová byla celé dny k vidění v zahradě. Byl to její velký koníček. Jednou se **zranila na ruce, kvůli špičatému zbytku nějaké rostliny, ukrytému v půdě**. Šla ke svému obvodnímu lékaři.
- Obvodní lékař lokálně ošetřil ránu, a pak jí doporučil **přeočkování** proti tetanu
- Kromě špičatých kousků rostlin se uplatňují také zemědělské nástroje, zejména vidle

# Botulismus



[www2.bc.cc.ca.us](http://www2.bc.cc.ca.us)

(a) Normal neuromuscular junction



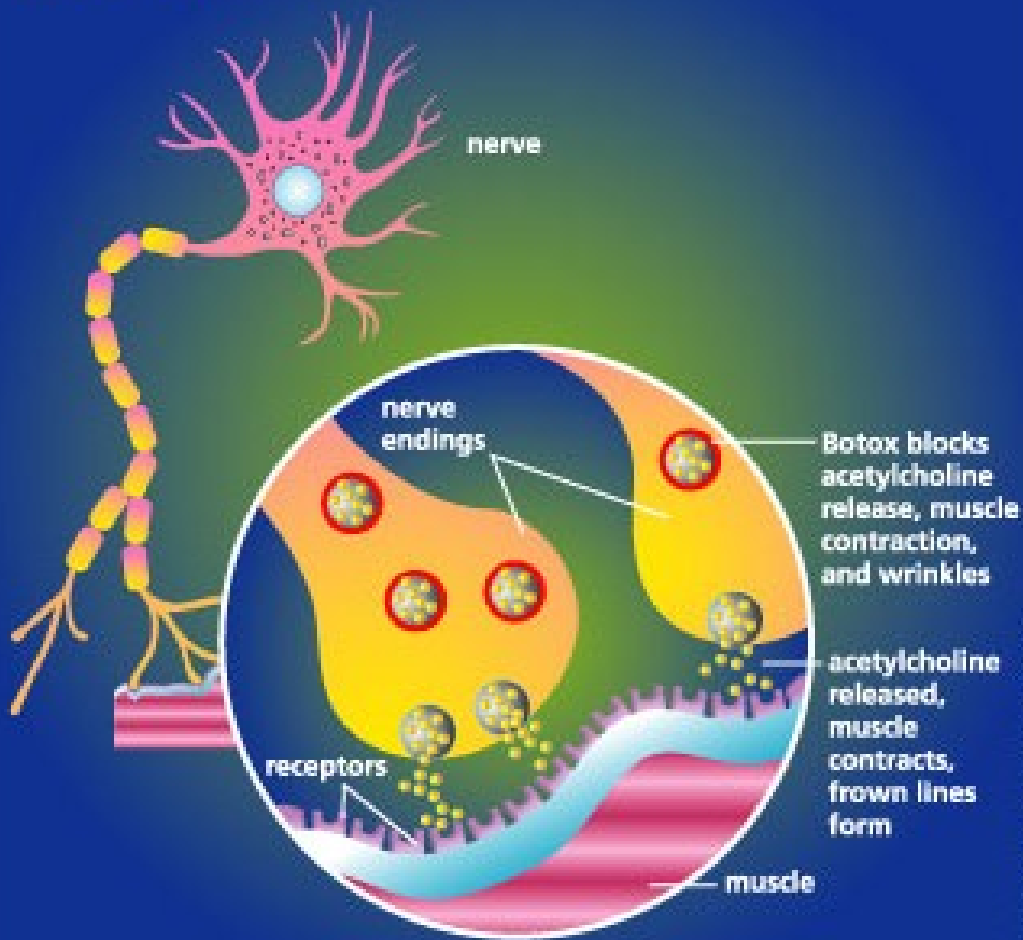
(b) Neuromuscular junction with botulism toxin present

# Typický vzhled jazyka při botulismu



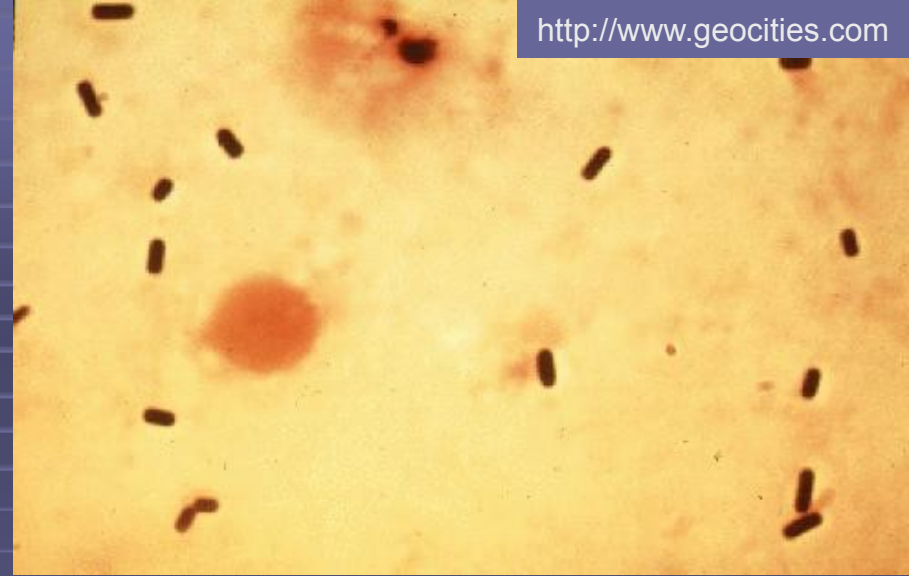
# Botox: použití jedu *Clostridium botulinum* pro mladistvý vzhled

## How Botox Works



Infographic by Renée Gordon

# Klostridia plynatých snětí



- *Clostridium perfringens* je spolu s *C. novyi*, *C. septicum* nejčastějším původcem
- Plynatá sněť je typické válečné onemocnění. Může se však vyskytnout i v dobách míru, například při živelných pohromách
- Klostridia plynatých snětí – respektive jejich enterotoxiny – se také uplatňují jako patogeny ve střevě



## Příběh druhý



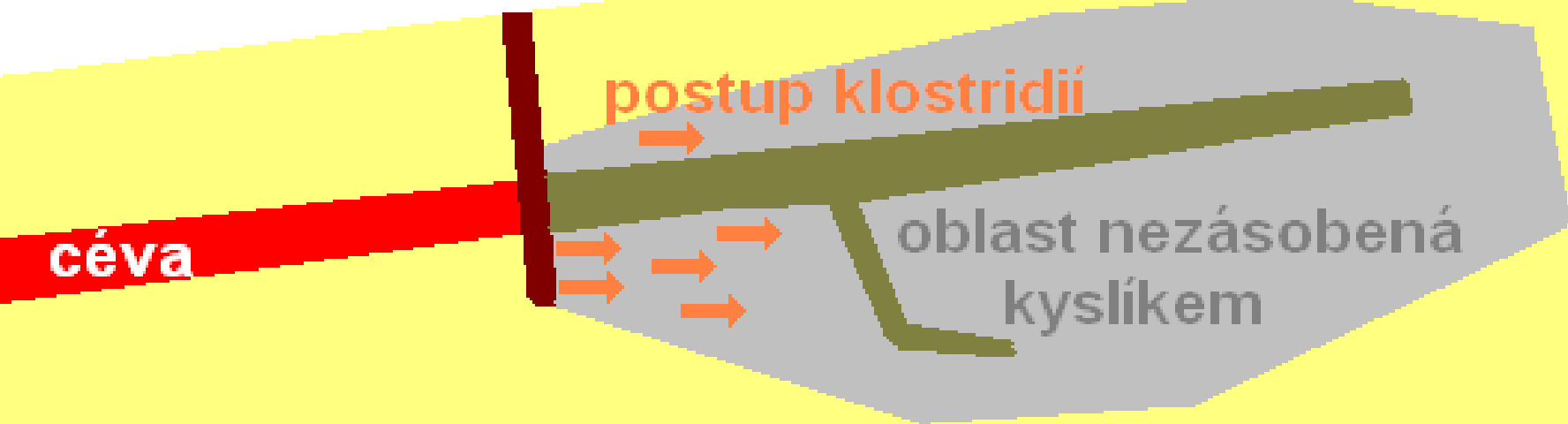
- **Mustafa, kosovský Albánec**, se rozhodl, že navštíví svého bratrance v sousední vesnici. Pole, přes které se vydal, již mělo být odminováno. Přesto se jedna nevybuchlá mina ještě našla. **Střepina, špinavá od bláta**, se Mustafovi zasekla **hluboko do stehna**.
- Za několik dní byl Mustafa přijat do jedné z polních nemocnic. Stehno měl zduřelé a při poklepu byl slyšitelný **zvuk praskajících bublinek**. Mustafa byl hned operován.

# Vznik plynaté sněti



<http://pharmacie.univ-lille2.fr>

## zranění



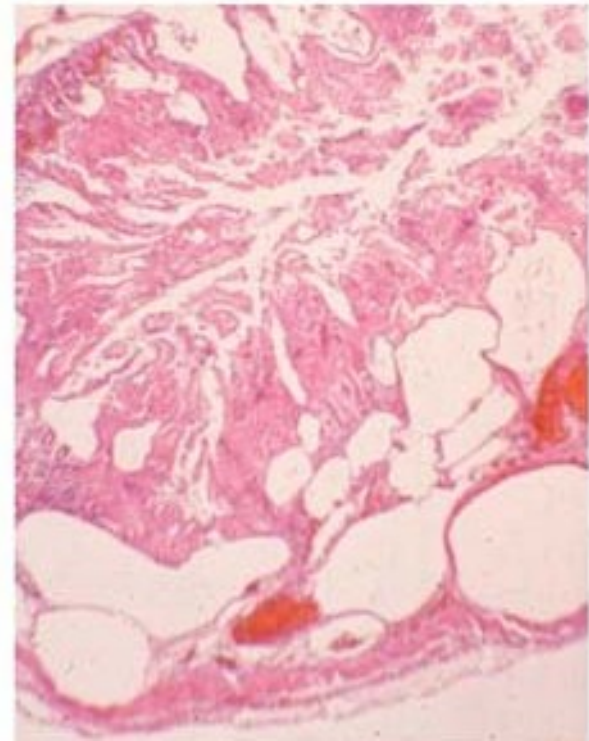
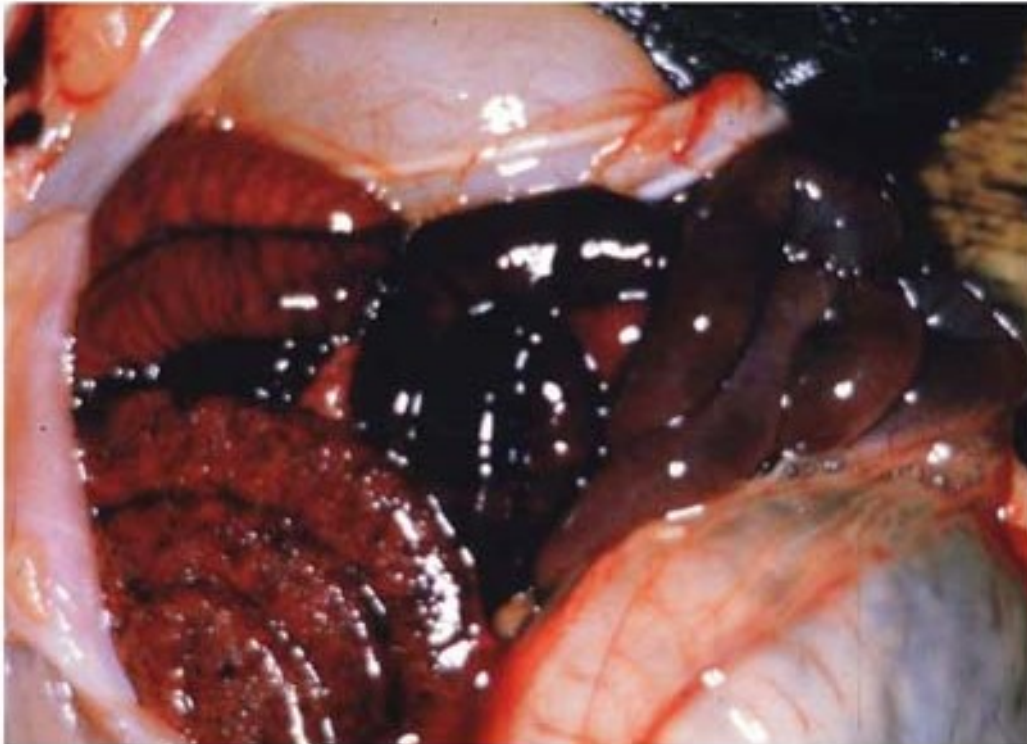
# Nekrotizující enterokolitida – i to může způsobovat *C. perfringens*

## 豚の壊死性腸炎 (Necrotic enteritis)

左: 小腸は出血しており、結腸には菌の産生したガスによる嚢胞が見られる。

右: 空腸の組織像。絨毛は壊死に陥り、固有層にはガスによる空胞が見られる。

<http://www.niah.affrc.go.jp>



# *Clostridium difficile*

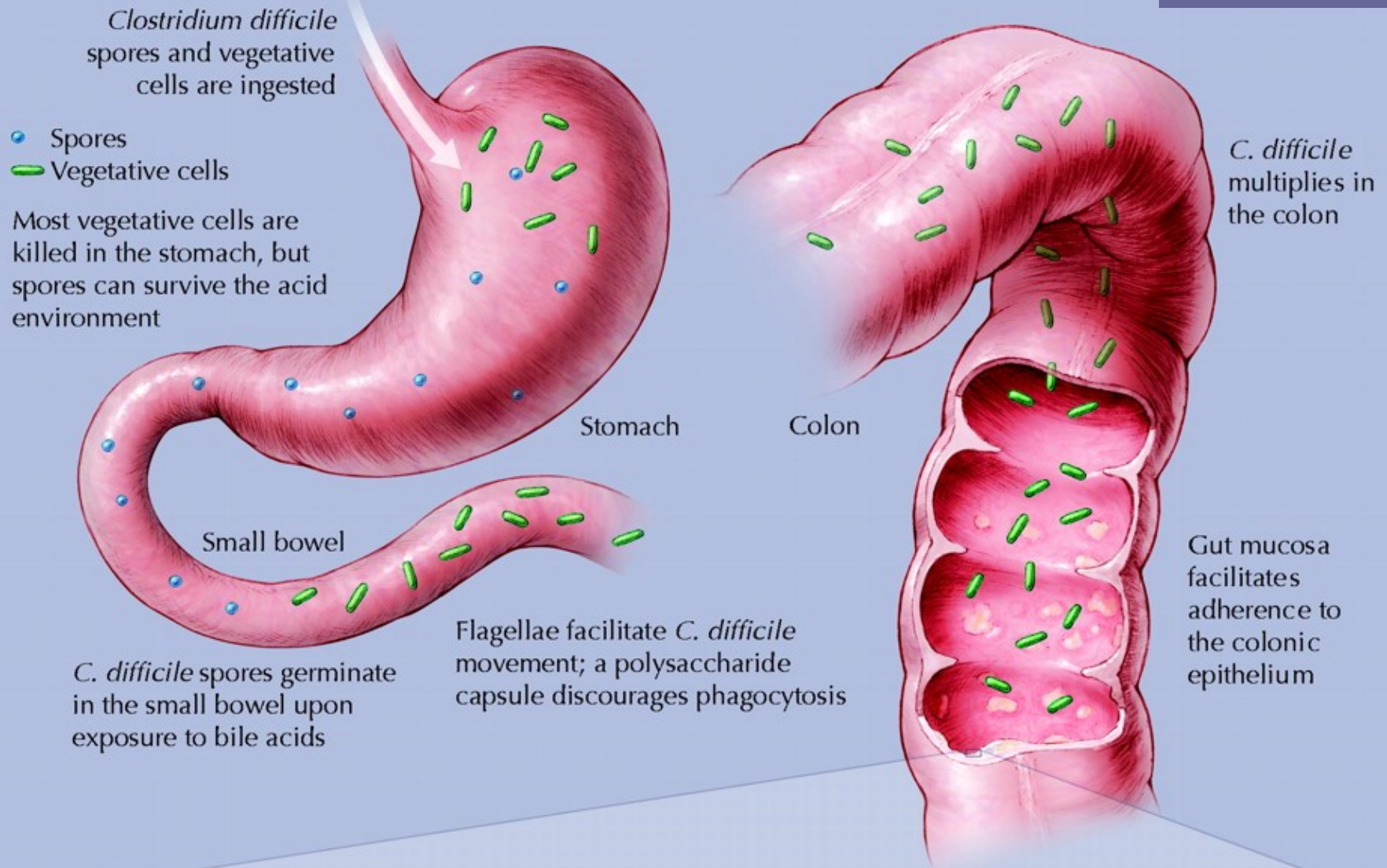
- Tento mikrob se vyskytuje ve střevě celkem běžně, problém však je, když začne produkovat toxin, a především, když mu někdo odstraní konkurenci a on se přemnoží.
- Odstranění konkurence způsobí nejčastěji **léčba některými typy antibiotik**, nejčastěji linkosamidy (ale v poslední době i např. ko-amoxicilinem). Linkosamidy jsou účinné proti většině striktně anaerobních bakterií, nikoli však proti *C. difficile*.
- Dnes se k léčbě používá nejčastěji bakteriální chemoterapeutikum **metronidazol**, dříve se používal poněkud zvláštní způsob – viz příběh

# Příběh třetí

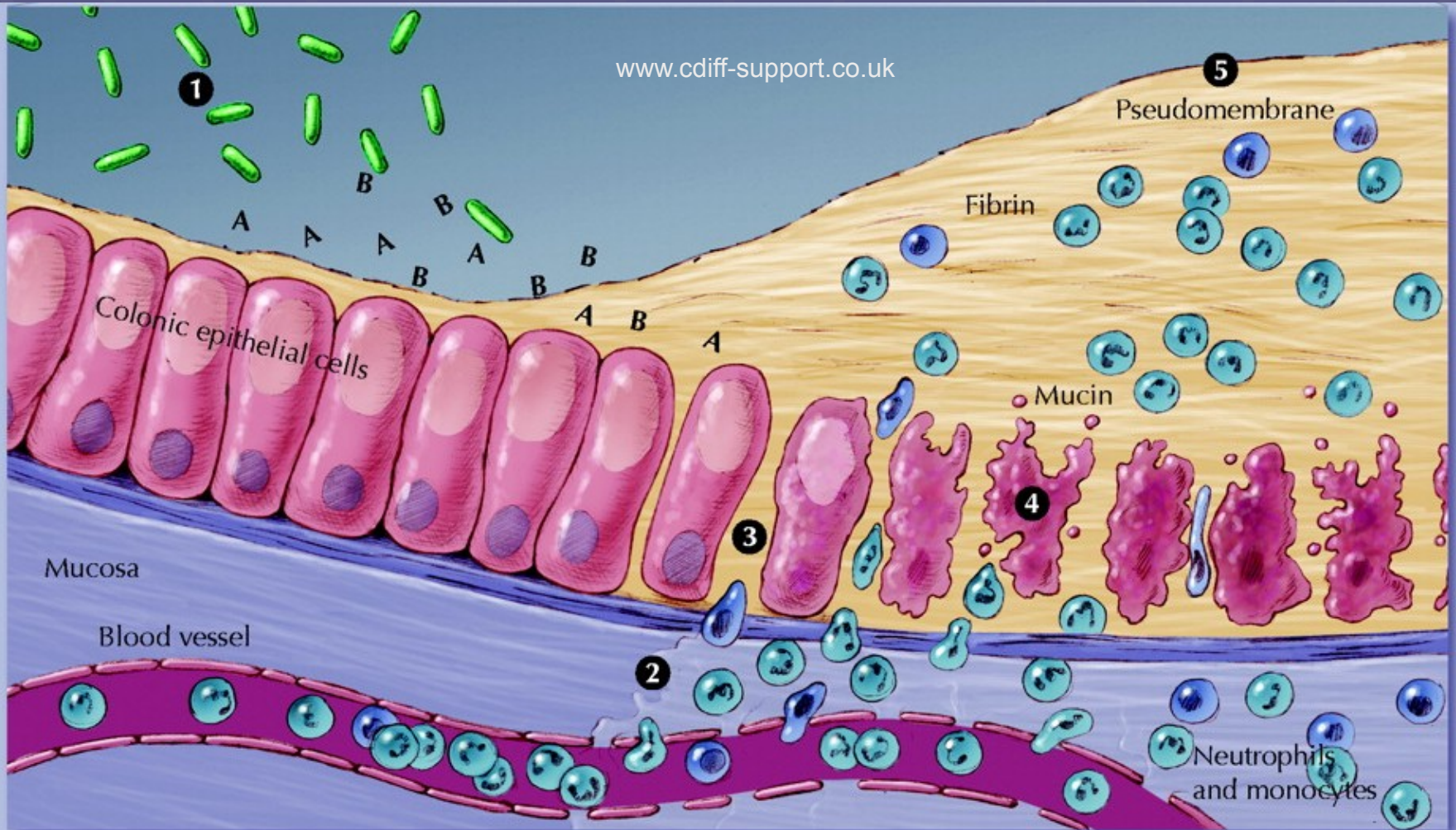
- Pan Kostečka ležel už třetí týden v nemocnici pro **bakteriální zánět kostní dřeně**. Zánět mu léčili **klindamycinem, linkosamidovým antibiotikem**. Náhle pan Kostečka dostal těžký průjem. Na oddělení zrovna neměli **metronidazol**, a tak sáhli po staré metodě: dali panu Kostečkovi **vypít ampulku vankomycinu**, antibiotika, které se normálně podává pouze injekčně, protože se nevstřebává ze střeva.

# *Clostridium difficile* a jeho činnost I

[www.cdifff-support.co.uk](http://www.cdifff-support.co.uk)



# *Clostridium difficile* a jeho činnost II



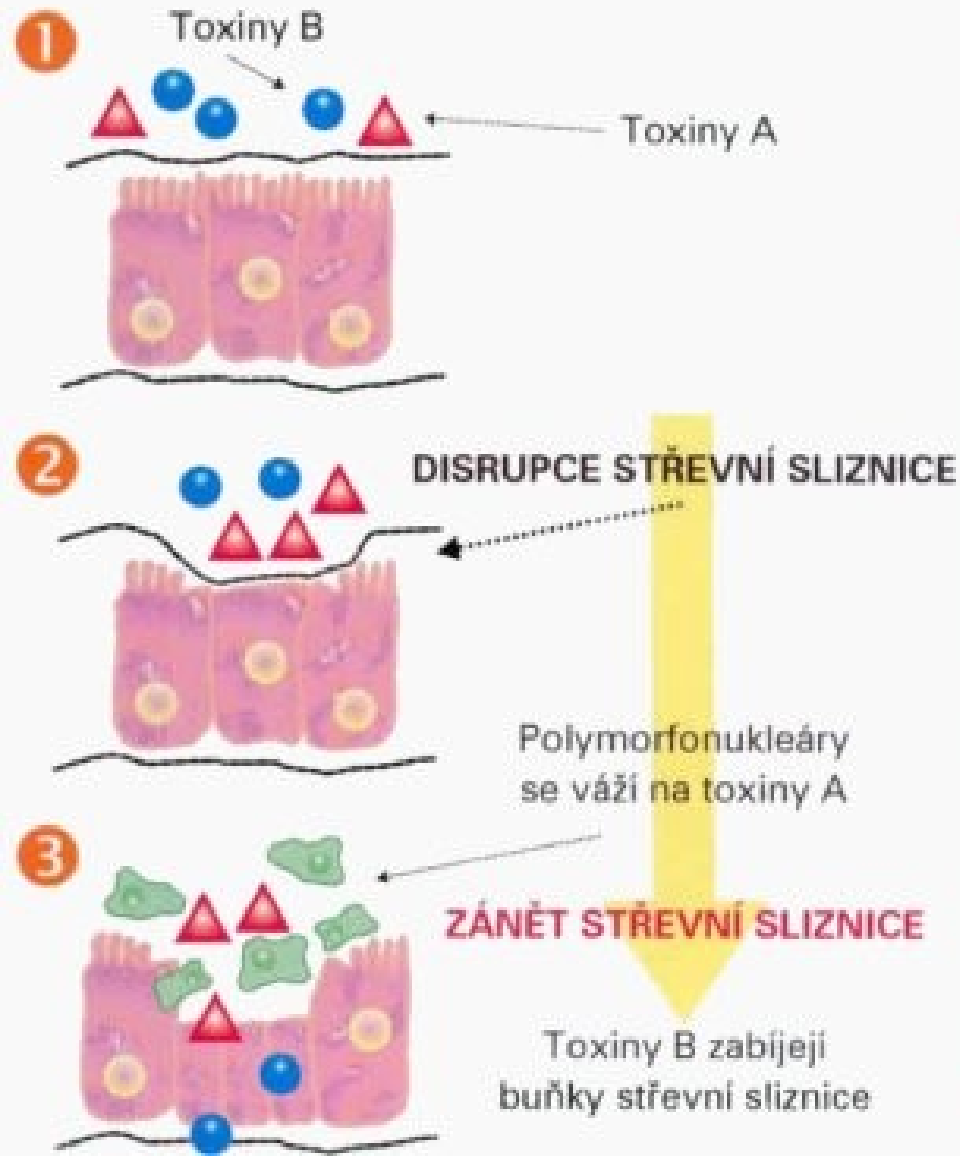
*C. difficile* vegetative cells produce toxins A and B and hydrolytic enzymes (1). Local production of toxins A and B leads to production of tumour necrosis factor-alpha and proinflammatory interleukins, increased vascular permeability, neutrophil and monocyte recruitment (2),

opening of epithelial cell junctions (3) and epithelial cell apoptosis (4). Local production of hydrolytic enzymes leads to connective tissue degradation, leading to colitis, pseudomembrane formation (5) and watery diarrhea.

# Toxiny *Clostridium difficile*

## Toxiny *Clostridium difficile*

www.zuova.cz

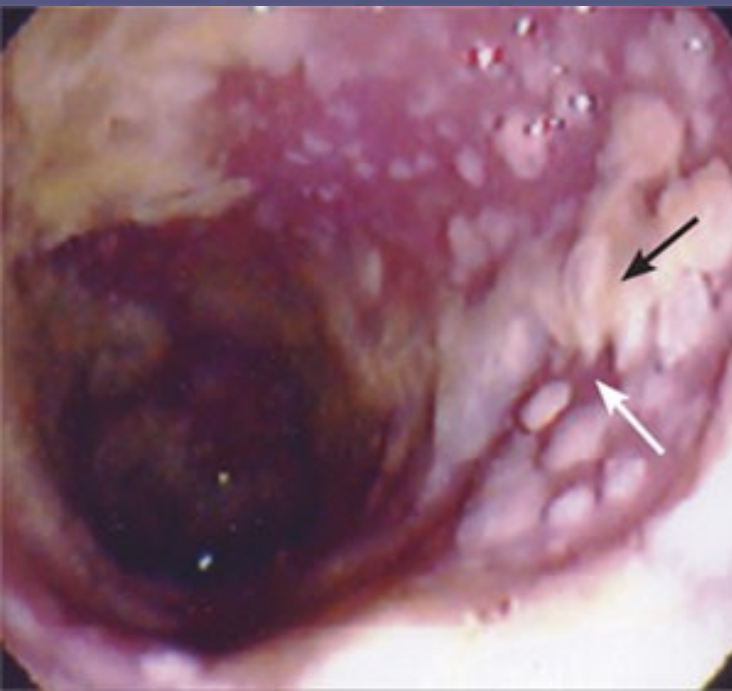




# Pseudomembranózní kolitida

www.zuova.cz

sitemaker.umich.edu



**Figure 2. Colon Specimen Obtained during a Colectomy in a Patient with Pseudomembranous Colitis.**

Characteristic raised, adherent yellow plaques that vary in size from 2 to 10 mm are visible on the colonic mucosa. The intervening mucosa is hyperemic but not ulcerated.

# Klostridia – přehled



*C. tetani*

Původce tetanu

*C. botulinum*

Producent botulotoxinu

*Clostridium perfringens*, *C. septicum*, *C. welchii* a aj.

Klostridia plynatých snětí  
(+ enteropatogenita)

*C. difficile*

Enteropatogenní

Je potřeba si uvědomit, že i **klostridia se úplně normálně podílejí na běžné střevní mikroflóře.**

Problém nastává, pokud se přemnoží, dostanou tam, kam nemají, vyskytne se kmen produkující velké množství toxinu apod.

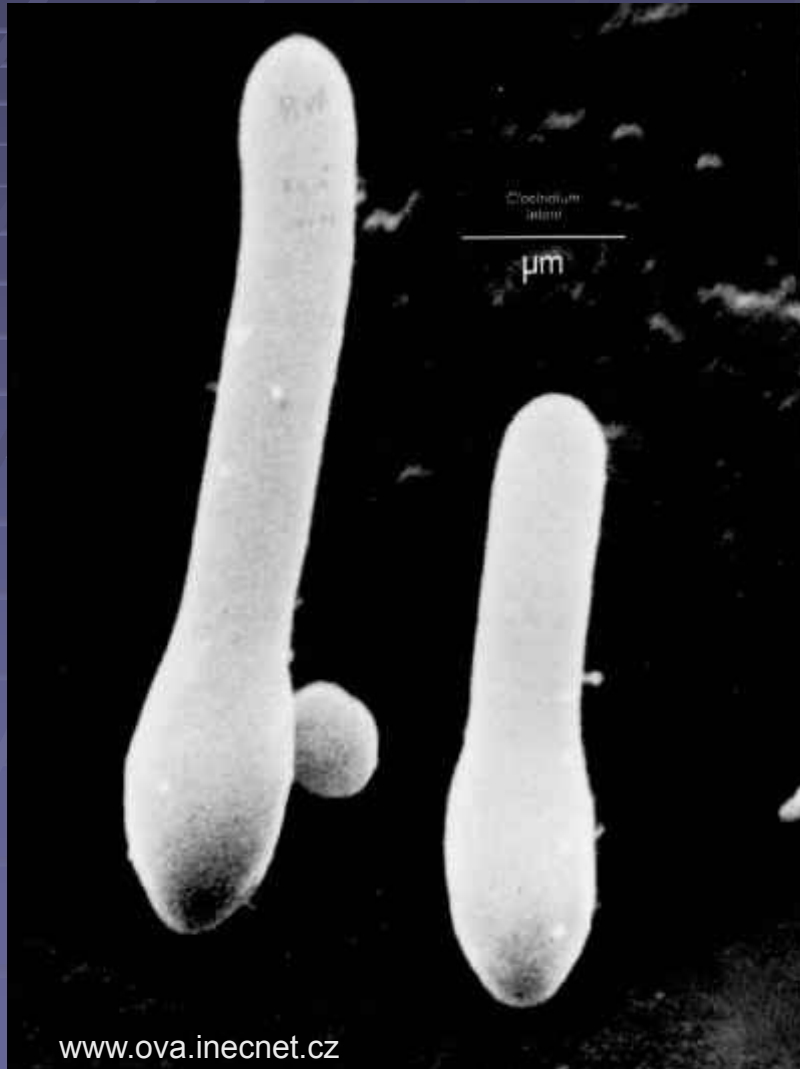
# Přehled zločinců: *Clostridium tetani*

<http://www.geocities.com>



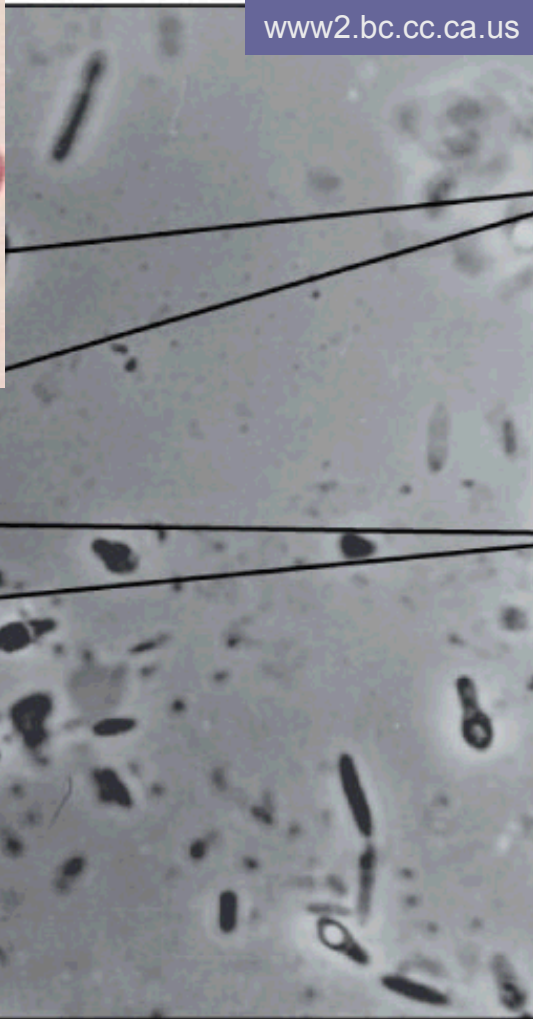
# *Clostridium tetani*

www.zuova.cz



# *C. botulinum*

www2.bc.cc.ca.us



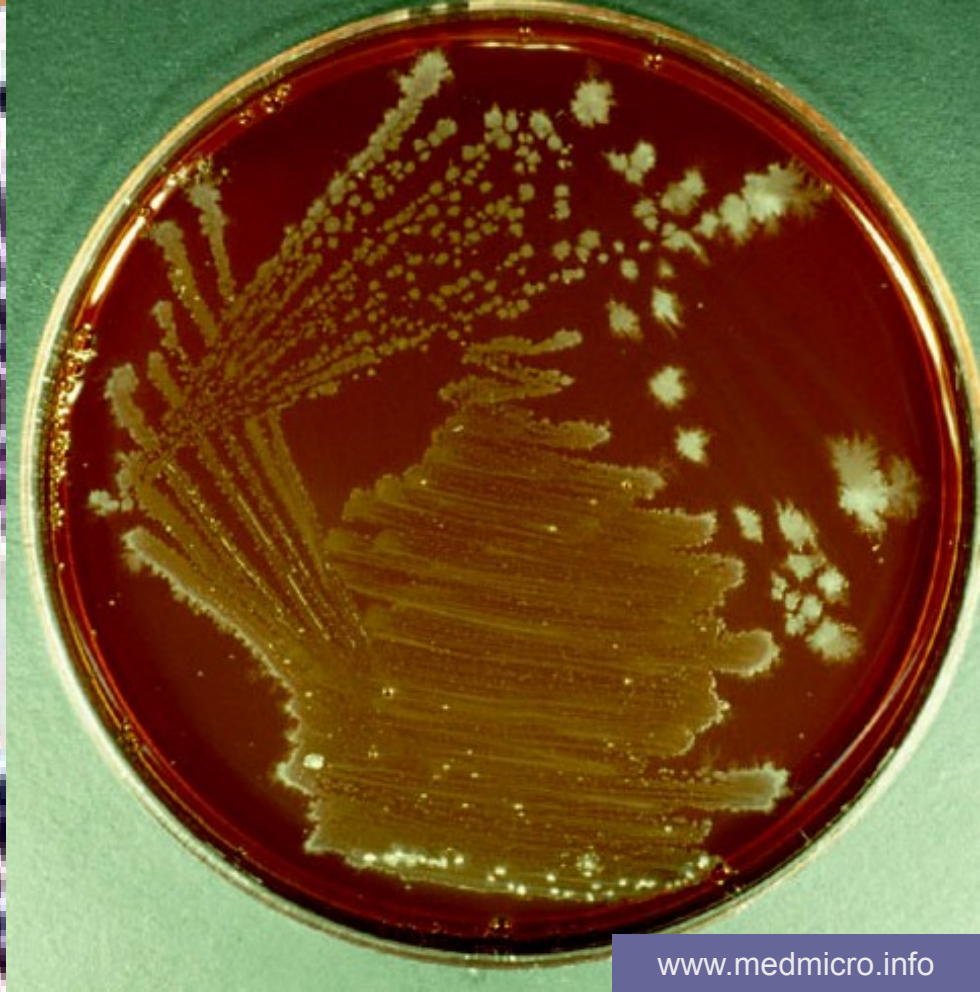
Vegetative cells

Endospore-bearing cells

10  $\mu$ m

# *Clostridium perfringens*

<http://www.geocities.com>



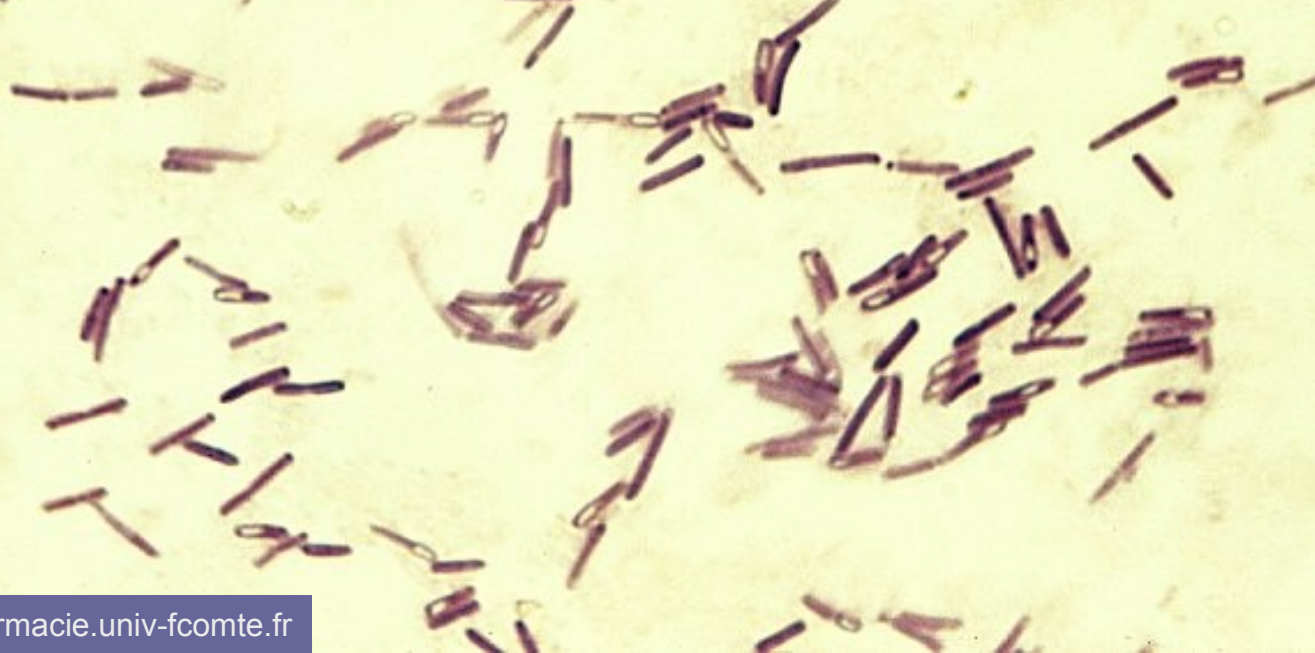
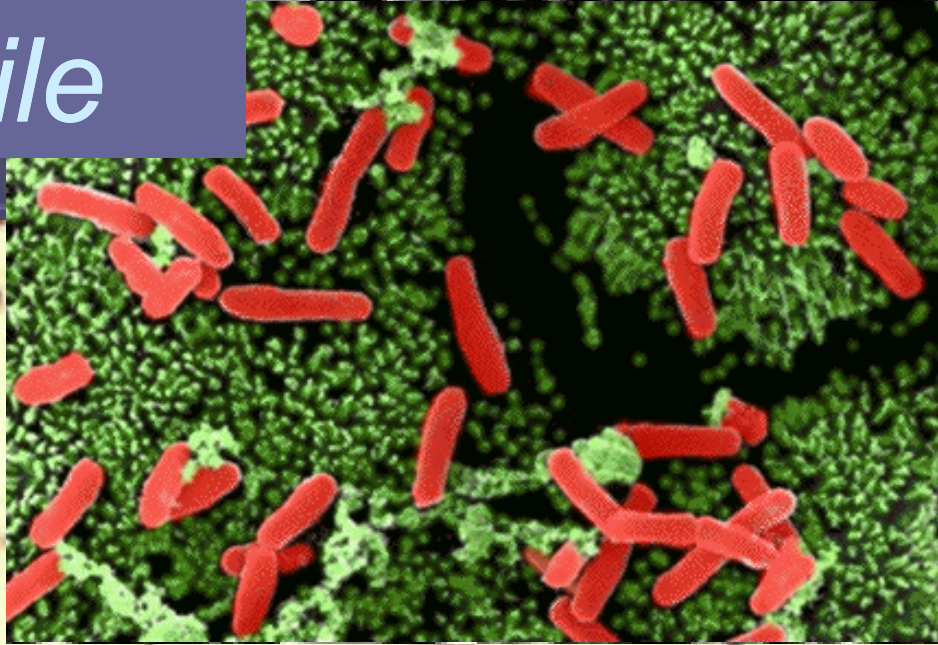
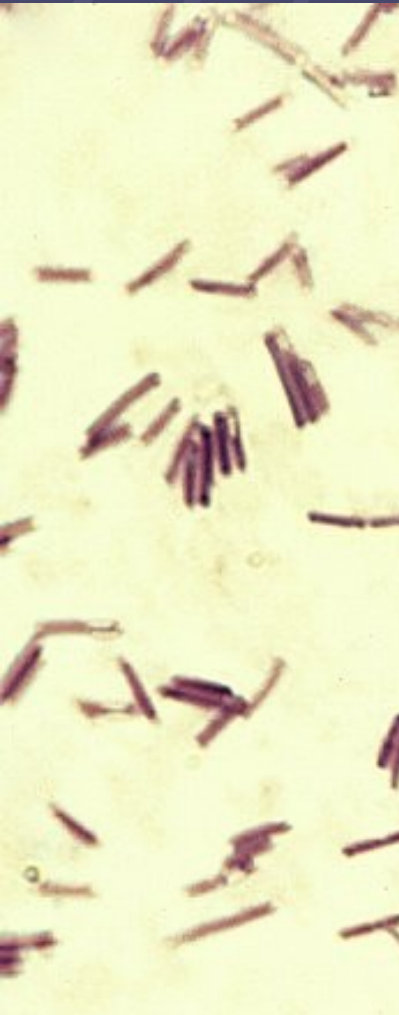


*Clostridium  
septicum*

# *Clostridium difficile*

sitemaker.umich.edu

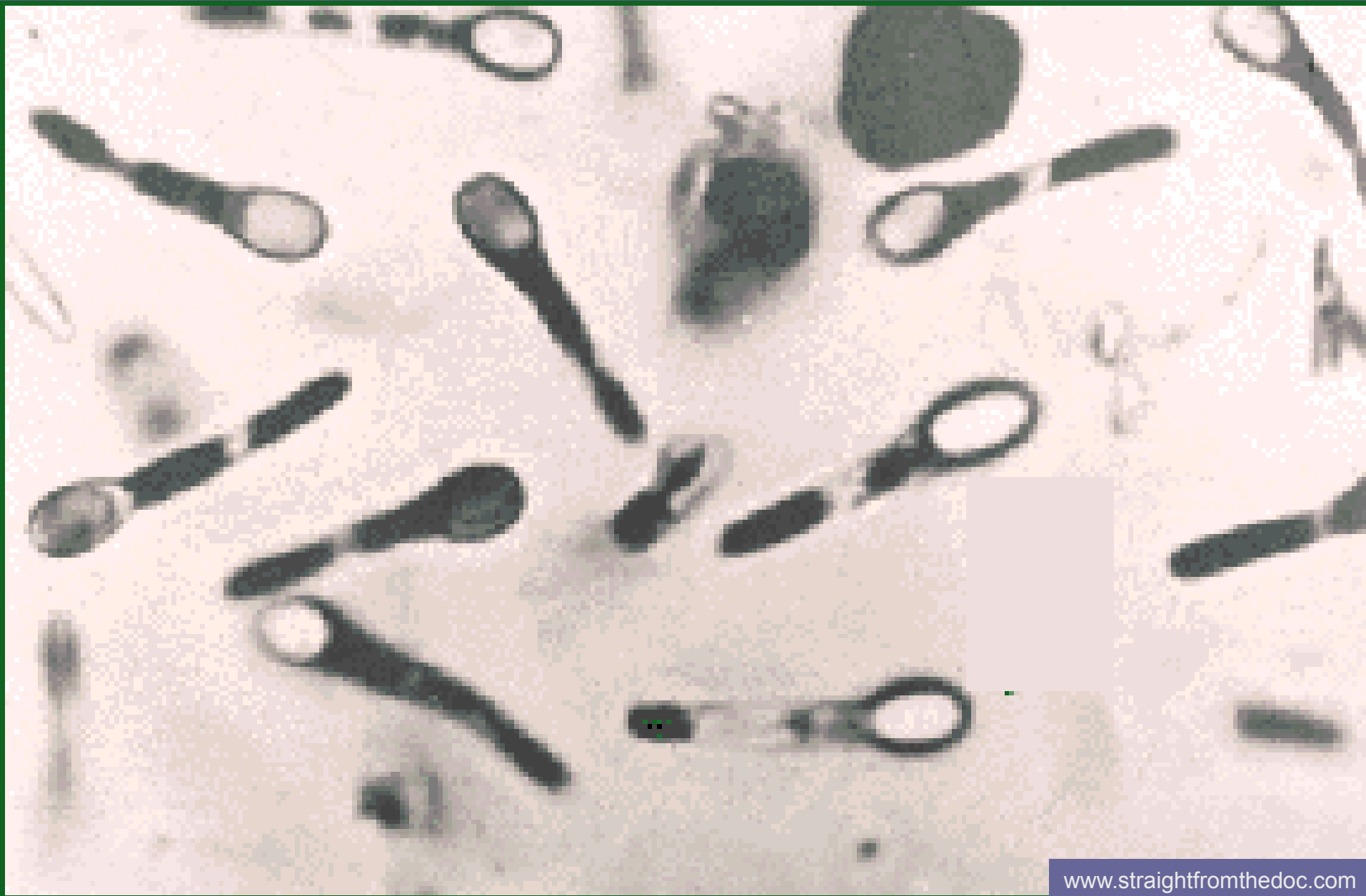
<http://www.health.qld.gov.au>



<http://medecinepharmacie.univ-fcomte.fr>



# *Clostridium difficile*



# *Clostridium scindens*



# *Clostridium innocuum*

<http://pharmacie.univ-lille2.fr>



# Jak pátrat po těch divných týpcích z Anaerobní čtvrti – I

- **Mikroskopie:** Má větší význam než u aerobů, vzhledem k morfologické různorodosti
- **Kultivace:** Je nutno zajistit anaerobiózu pomocí **anaerostatů** či **anaerobních boxů**. U tekutých půd postačuje **přelití parafinem**. Používá se **VL** (**viande levure**) bujón, VL krevní agar a různé speciální půdy
- **Biochemie:** kataláza a oxidáza většinou negativní, možné vzájemné rozlišení biochemicky, i analýza plynů chromatografií (jsou biochemicky aktivní)
- **Průkaz antigenu** se používá při dokazování některých toxinů (*C. perfringens*, *C. difficile*)
- **Nepřímý průkaz** se v diagnostice anaerobů příliš nepoužívá

# Jak pátrat po těch divných týpcích z Anaerobní čtvrti – II

- **Pokus na zvířeti** se používá u tetanu a botulismu k průkazu příslušných toxinů. U tetanu se myš svíjí v křeči, u botulismu jsou naopak patrné parézy.



Tetanická myš

# Mikroskopie anaerobů

- Zpravidla se používá Gramovo barvení. Anaeroby často mají rozmanité tvary.
- Pozor! Studenti někdy zaměňují spóru (útvár, který je neprobarvený, resp. jen slabě se rýsují jeho okraje) a **ztluštění tyčinky** (které se vyskytuje u některých tyčinek, které jsou nesporulující a zpravidla gramnegativní).
- U skutečných sporulujících mikrobů má význam sledovat **umístění spór**. U *Clostridium tetani* je spóra terminální (na konci umístěná)

C. tetani



jiné klostrid.



vřetenovité ztlustění  
("hodinková forma",  
často u rodu  
Bacteroides)



# Poznámka ke kultivaci anaerobů:

## Jak získat anaerobiózu

- **Mechanicky** – VL bujony přelijeme parafinovým olejem
- **Fyzikálně** – v **anaerobním boxu** se nahradí vzduch směsí anaerobních plynů, vháněných z bomby. Je také možnost vhánět plyny do **kapsy**, do které se umístí příslušné misky.
- **Chemicky** – v **anaerostatu** se
  - z organických kyselin tvoří **vodík a CO<sub>2</sub>**
  - v druhé fázi na palladiovém katalyzátoru **reaguje vodík s kyslíkem za vzniku vody**, takže se kyslík spotřebovává

# Kultivace anaerobů

- Nejčastěji se používá **VL bujón** (přelévá se parafinem) a **VL agar** (= VL krevní agar, vkládá se do anaerobních boxů a anaerostatů)
- **Další půdy** (půda na kultivaci *Clostridium difficile*, žloutkový agar na průkaz toxinu *Clostridium perfringens*) mají své specifické určení
- Kultivace **trvá déle než u aerobů**, zpravidla dva až pět dnů. U aktinomycet (viz dále) se prodlužuje.



# Přelévání VL-bujonů parafinem



# Anaerobní box



# Anaerostat

(uvidíte ho ještě jednou)

Palladiový kalalyzátor  
(pod víčkem) nezbytný  
pro druhou fázi reakce

Generátor anaerobiózy  
(sáček s chemikáliemi)  
nutný pro celou reakci



# Anaerostat

podrobnější popis

vzduchotěsné víčko

palladiový kalalyzátor  
(pod víčkem)

konstrukce pro  
ukládání Petriho misek

Generátor anaerobiózy  
(sáček s chemikáliemi)

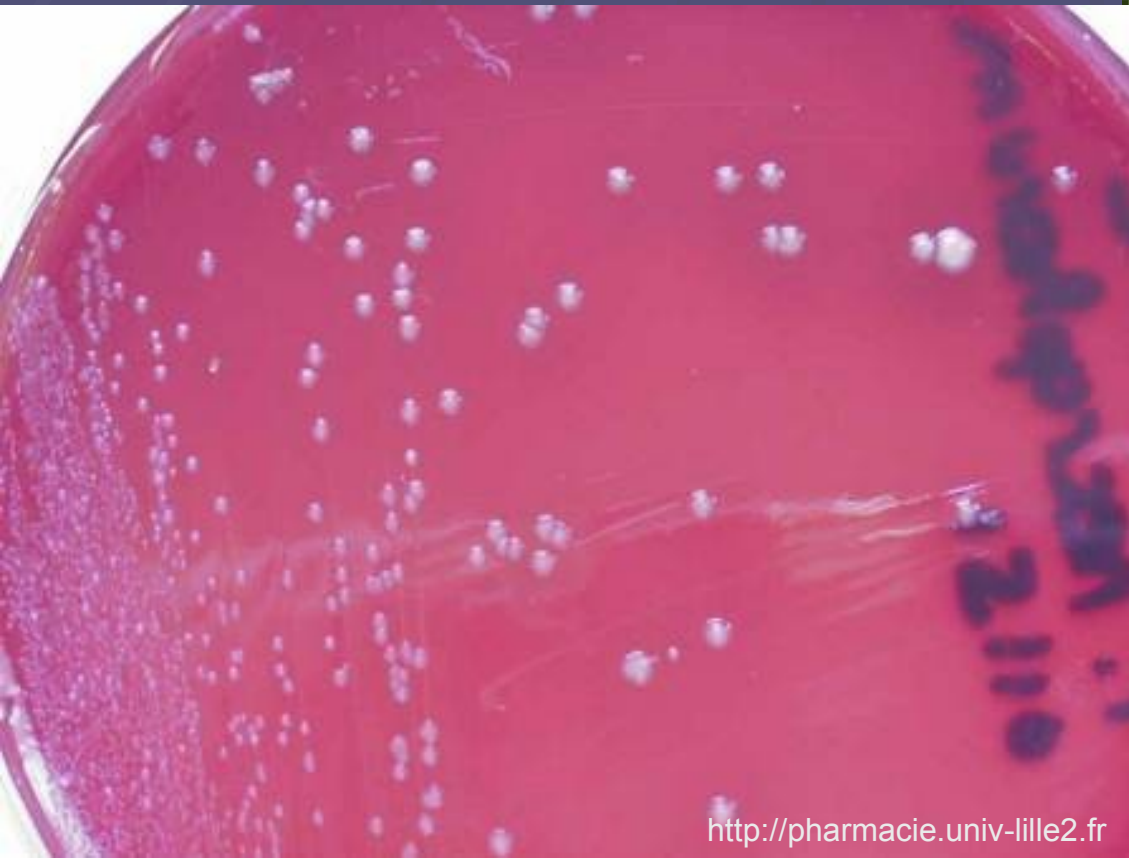
šroubovací  
uzávěr

tlakový  
ventil



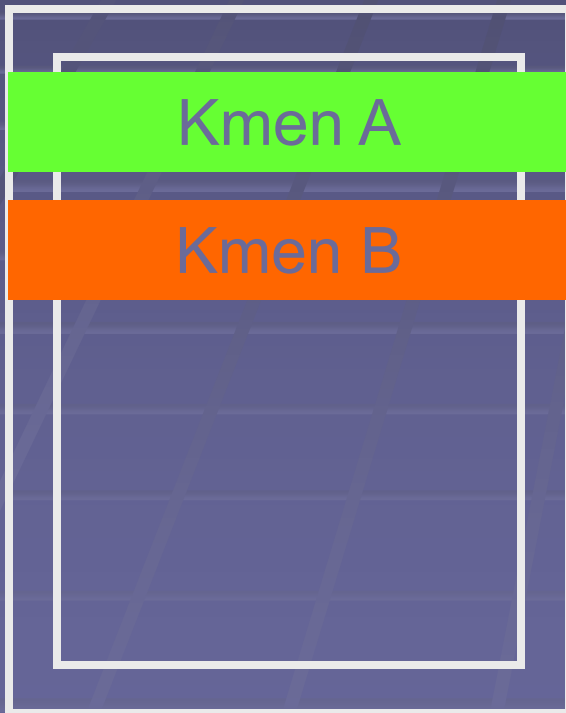
# Anaerostat jiné provenience

*Fusobacterium* sp.



# Biochemické rozlišení

- Používají se různé testy, v našich podmínkách především ANAEROtest 23 Lachema.

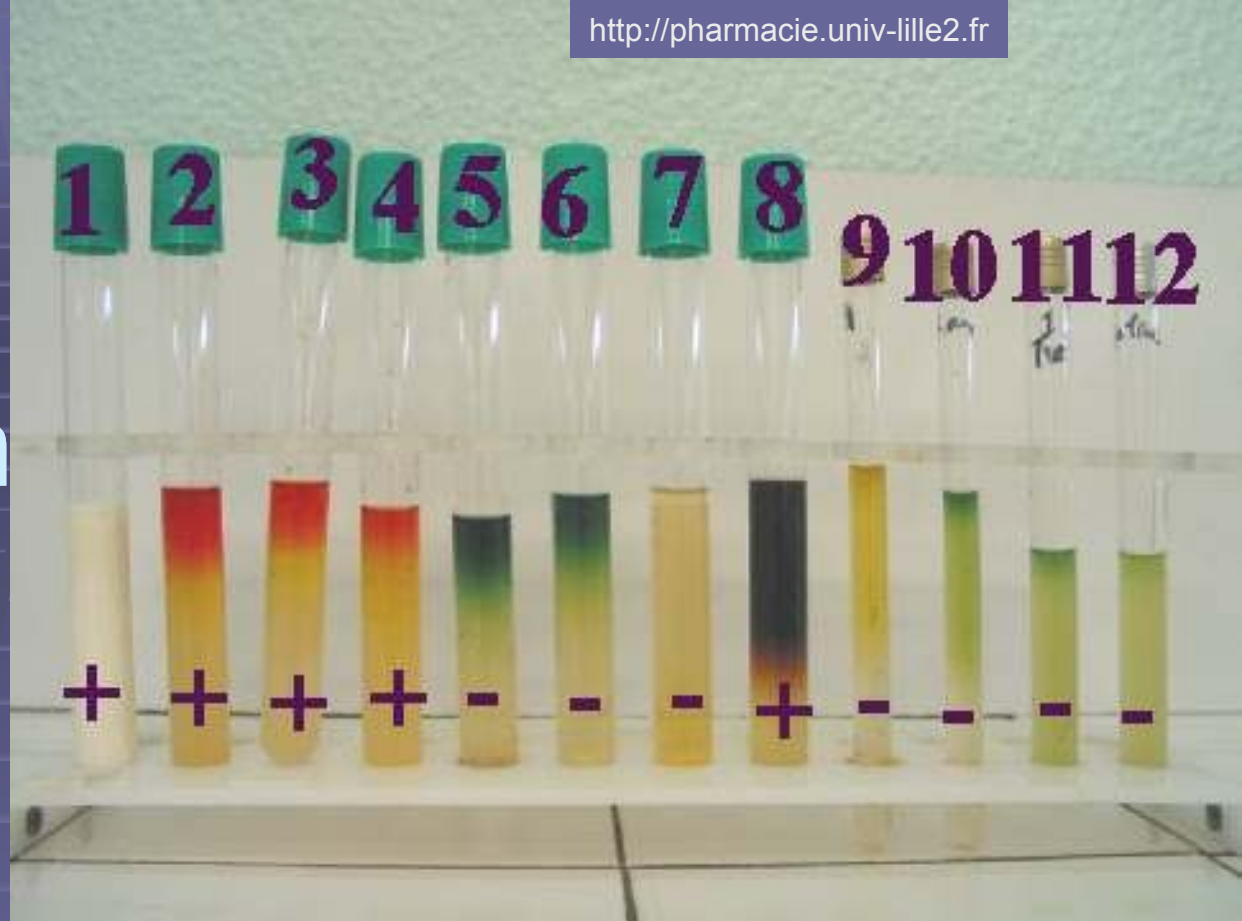


Kódová kniha je rozdělená na několik částí **podle morfologie anaerobních bakterií**. Je třeba hledat v té správné části kódové knihy

# Anaerotest - příklad odečítání

<b>+</b> <b>1</b>	<b>-</b> <b>1</b>	<b>+</b> <b>1</b>	<b>+</b> <b>1</b>	<b>-</b> <b>1</b>	<b>-</b> <b>1</b>	<b>-</b>	<b>+</b>
<b>-</b> <b>2</b>	<b>+</b> <b>2</b>	<b>+</b> <b>2</b>	<b>-</b> <b>2</b>	<b>+</b> <b>2</b>	<b>-</b> <b>2</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
<b>+</b> <b>4</b>	<b>-</b> <b>4</b>	<b>+</b> <b>4</b>	<b>+</b> <b>4</b>	<b>+</b> <b>4</b>	<b>-</b> <b>4</b>	<b>+</b>	<b>-</b>
<b>5</b>	<b>2</b>	<b>7</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>0</b>		

# Ukázky různých zahraničních testů pro identifikaci anaerobů



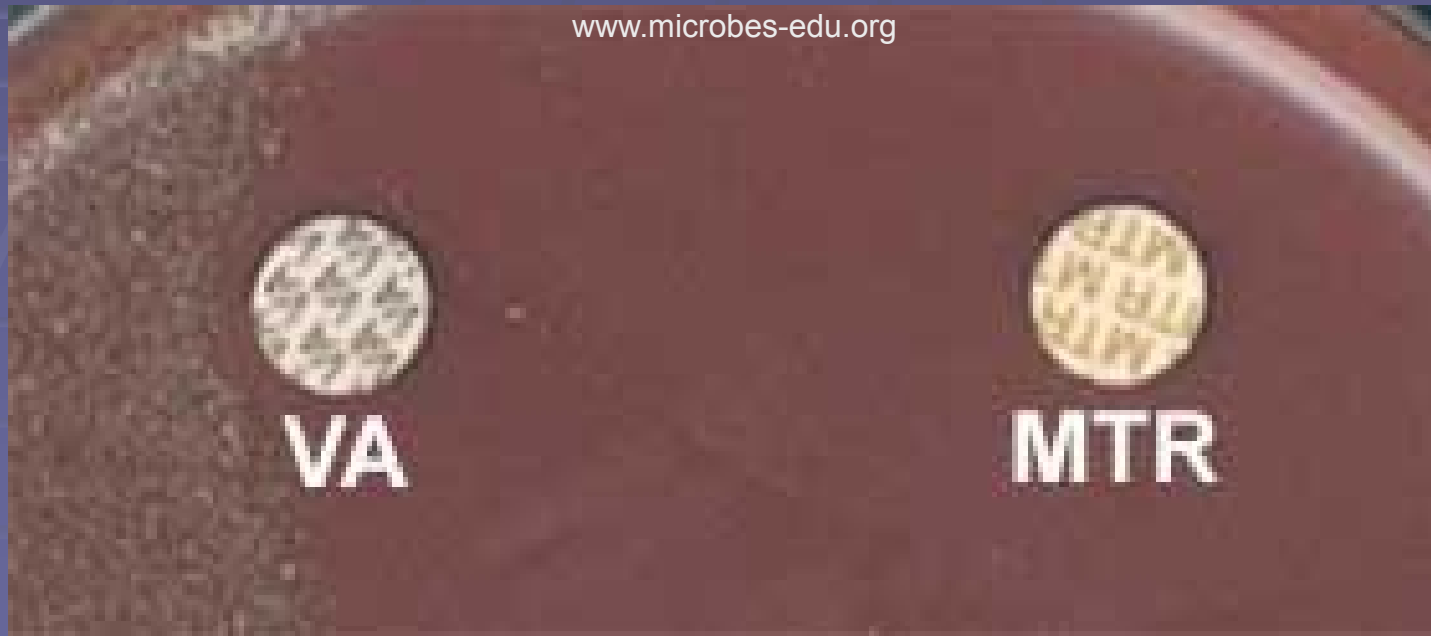


# Testy antibiotické citlivosti

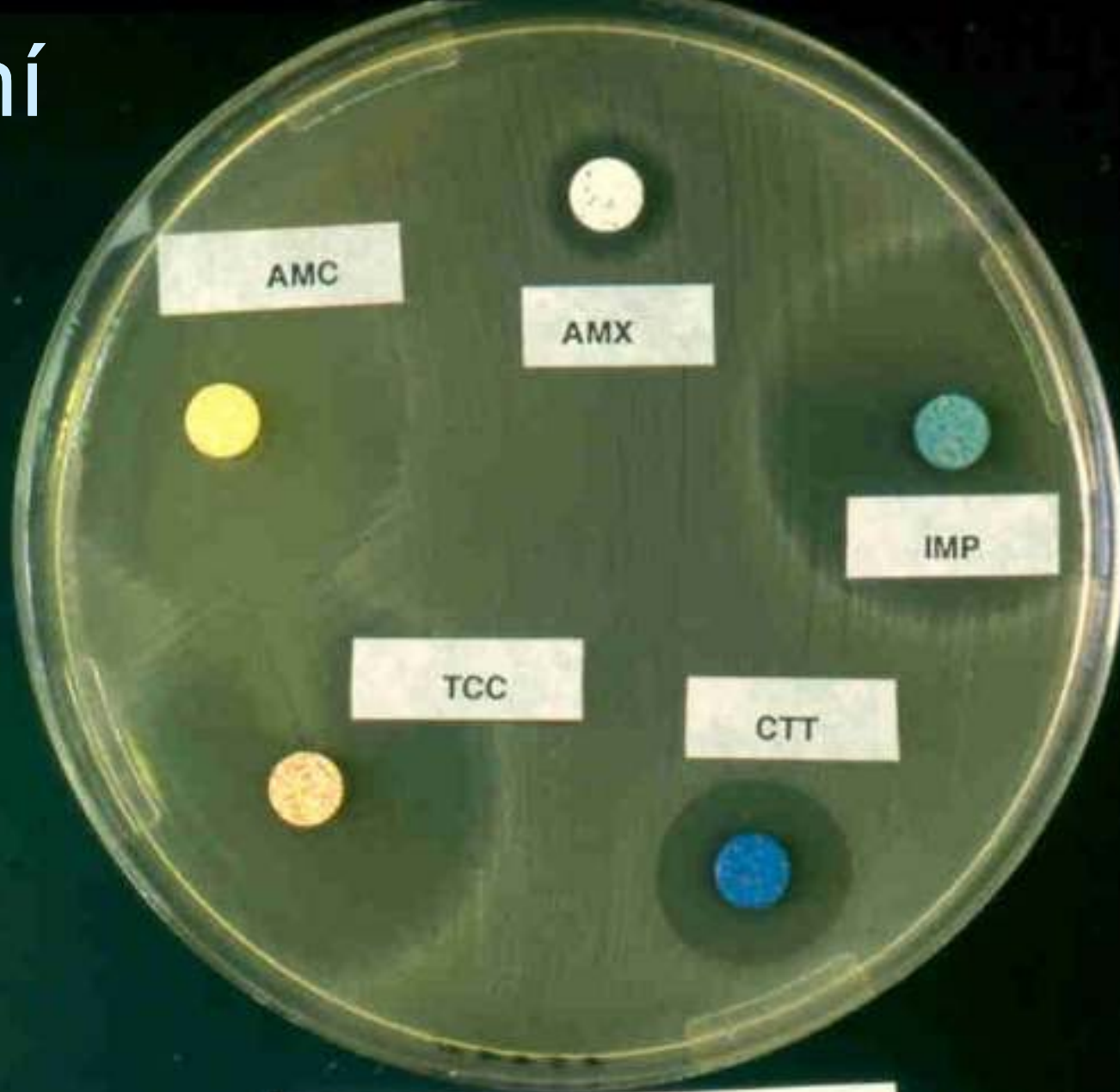
- **Antibiotická citlivost** se u anaerobů určuje na **půdách, na kterých jsou schopny růst**, tj. nikoli na MH agaru, ale zpravidla na VL krevním agaru
- V současné době **se upouští od difusních diskových testů vůbec**, evropská organizace EUCAST vůbec pro anaerobní bakterie neuvádí hodnoty hraničních zón. Trendem je tedy
  - **Kmeny neinvazivní** (např. poševní) netestovat a spoléhat na běžnou citlivost
  - **Kmeny invazivní** testovat pomocí E-testů

# Typické citlivosti

- Typické je, že mnohé anaeroby jsou rezistentní na vankomycin. Zároveň jsou přitom citlivé na „slabší“ antibiotika, jako je penicilin či metronidazol (na snímku)



# Ilustrační foto



*B. fragilis* ATCC 25285

# Průkaz tvorby lecitinázy – specialita v diagnostice *C. perfringens*

- Tvorba lecitinázy se projeví **precipitací kmene na žloutkovém agaru**. Protože však lecitináz je mnoho a nás zajímá **pouze lecitináza *Clostridium perfringens***, prověřujeme, zda je lecitináza inhibovatelná specifickým antitoxinem.

„**Negativní I**“

vůbec

neprodukuje  
lecitinázu.

„**Negativní II**“

produkuje, ale  
nějakou jinou,  
než nás zajímá

# Imunochromatografický průkaz toxinu *C. difficile*

- Imunochromatografické testy jsou založeny na **navazování jednotlivých komponent**, podobně jako u reakcí ELISA či a imunofluorescence
- Nejklasičtějším příkladem je **těhotenský test**
- V případě *Clostridium difficile* je důležité najít toxin, protože samotná přítomnost bakterie není příliš významná (ve střevě ji má mnoho zdravých).
- Nicméně **některé varianty testu zachycují nejen toxin, ale i strukturální antigen klostridia**

# Princip (přibližně)

+

Testo-  
vací  
oblast

Kontrol  
ní  
oblast



-



# Průkaz toxinu *Clostridium difficile*

Podobně jako u  
těhotenského testu i zde  
**jeden proužek (pouze  
CTRL = kontrola) znamená  
negativní výsledek** a **dva  
proužky (CTRL i TEST)  
pozitivitu**. Pokud by se  
nevytvořil žádný proužek, je  
test špatný.



# Průkaz antigenu i toxinu *Clostridium difficile*



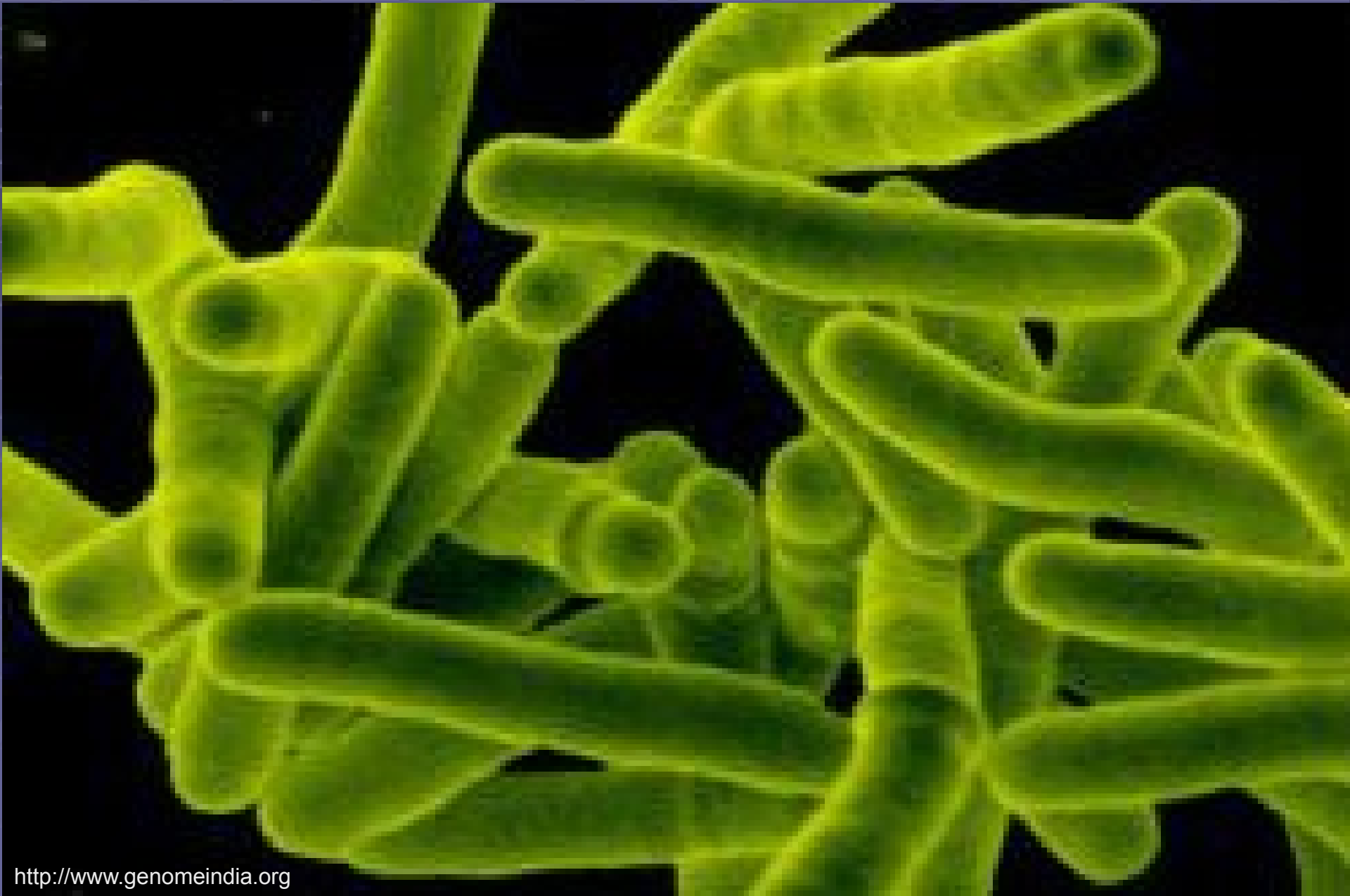
- Pozitivní pouze antigen

- Pozitivní antigen i toxin

- Toxin i antigen negativní



# 3. Mykobakteria, aktinomycety, nokardie



# Úvod: Plivátka v boji proti TBC

V době první republiky vyvinula společnost za osobní angažovanosti **prezidenta Masaryka** a jeho „**Ligy proti tuberkulóze**“ velké úsilí v boji proti této nemoci. Významnou součástí byla osvěta, aby lidé neplivali na zem, ale používali plivátka.



# Základní charakteristika

- Acidorezistentní bakterie se vyznačují **zvláštním typem buněčné stěny**. Je odvozena od grampozitivní stěny, ale obsahuje velké množství mykolových kyselin, které jsou hydrofobní.
- Mezi acidorezistentní tyčinky patří zejména **mykobakteria**, tedy původci TBC i jiných nemocí
- Částečně acidorezistentní jsou rody ***Actinomyces*** a ***Nocardia***

# Klinická charakteristika

- Způsobují **specifická onemocnění**, odlišná od onemocnění působených jinými mikroby
- Zejména **tuberkulóza** má specifický průběh, také imunitní reakce je zvláštní (převažuje **buněčná imunita**)
- **Lepra** je rovněž velmi zvláštní onemocnění
- **Atypická mykobakteria** způsobují choroby s nálezem tzv. granulomů
- **Aktinomycety a nokardie** vyvolávají hnisavá onemocnění různých tkání
- Všechna zmíněná onemocnění trvají **dlouho**

# Přenos infekce

- **Tuberkulóza** se přenáší zejména kašláním či kapénkovou infekcí
- **Atypické mykobakteriózy a nokardióza** se přenášejí nejspíše přímým kontaktem s kontaminovanou půdou, vodou a podobně
- **Aktinomykóza** je často endogenního původu, jelikož původce je anaerobní

# Léčba

- K léčbě TBC se používají zvláštní látky, zvané **antituberkulóza**. Jen některé z nich se používají zároveň i jako antibiotika. Speciální preparáty se používají i k léčbě lepry
- U aktinomykózy a nokardiózy se používají **běžná antibiotika, zejména penicilin**. Léčba však musí být dlouhodobá

# *Mycobacterium tuberculosis*

- *Mycobacterium tuberculosis*, Je nejdůležitějším původcem TBC, i když tuto nemoc může způsobovat i například *Mycobacterium bovis* (dnes už ale spíše vzácně, vzhledem ke změnám v zemědělství)
- Zajímavostí tohoto mikroba je záliba v životě **uvnitř buněk**. S tím také souvisí skutečnost, že na mykobakteria se **špatně tvoří protilátková odpověď** (takže se nedá prokazovat antigen ani protilátky) a že hlavní slovo má **buněčná imunita** – i při vakcinaci.
- Jelikož při HIV infekci je právě buněčná imunita postižena, je TBC jednou z **oportunních infekcí**.

# Tuberkulóza

- Při prvotním styku s infekcí dojde ke vzniku tzv. **primárního komplexu**. Je to ložisko (obvykle v plicích) a k němu přiléhající mízní uzlina.
- Při další infekci vzniká tzv. postprimární TBC, která je horší. Zpravidla vznikne granulomatózní útvar, který později podléhá kaseifikaci („zesýrovatění“) a pak už se dále nezvětšuje. Paradoxně za většinu škod v organismu může reakce hostitelského organismu (pozdní přecitlivělost – vlastně druh alergie)
- Po letech se může ložisko znovu **aktivizovat**, zejména ve stáří, při podlomení imunity, nebo i při abúzu alkoholu. Takový člověk může být velmi nebezpečný pro své okolí



- **Honza** již několik let věděl, že je **HIV pozitivní**. Dobře věděl, že je mnohem zranitelnější než ostatní lidé, že ho každá infekce dostihne rychleji než jiné
- Přesto ho zaskočilo, že **v poslední době začal kašlat**. Jeho ošetřující lékaři zkoušeli různé možnosti, až nakonec na základě rentgenu, PCR vyšetření a kultivačního vyšetření dospěli k názoru, že se jedná o **miliární (zrnkovitou) formu tuberkulózy**.

Příběh první



# Skutečný příběh

19. září 2007 15:17

Plzeňští kriminalisté našli muže, který má zřejmě TBC. Lékaři příznaky nemoci identifikovali u sedmačtyřicetiletého Marcela Pfeifera v pondělí, pacient jim slíbil, že přijde druhý den, ale už se neobjevil. Proto po něm bylo vyhlášeno pátrání.

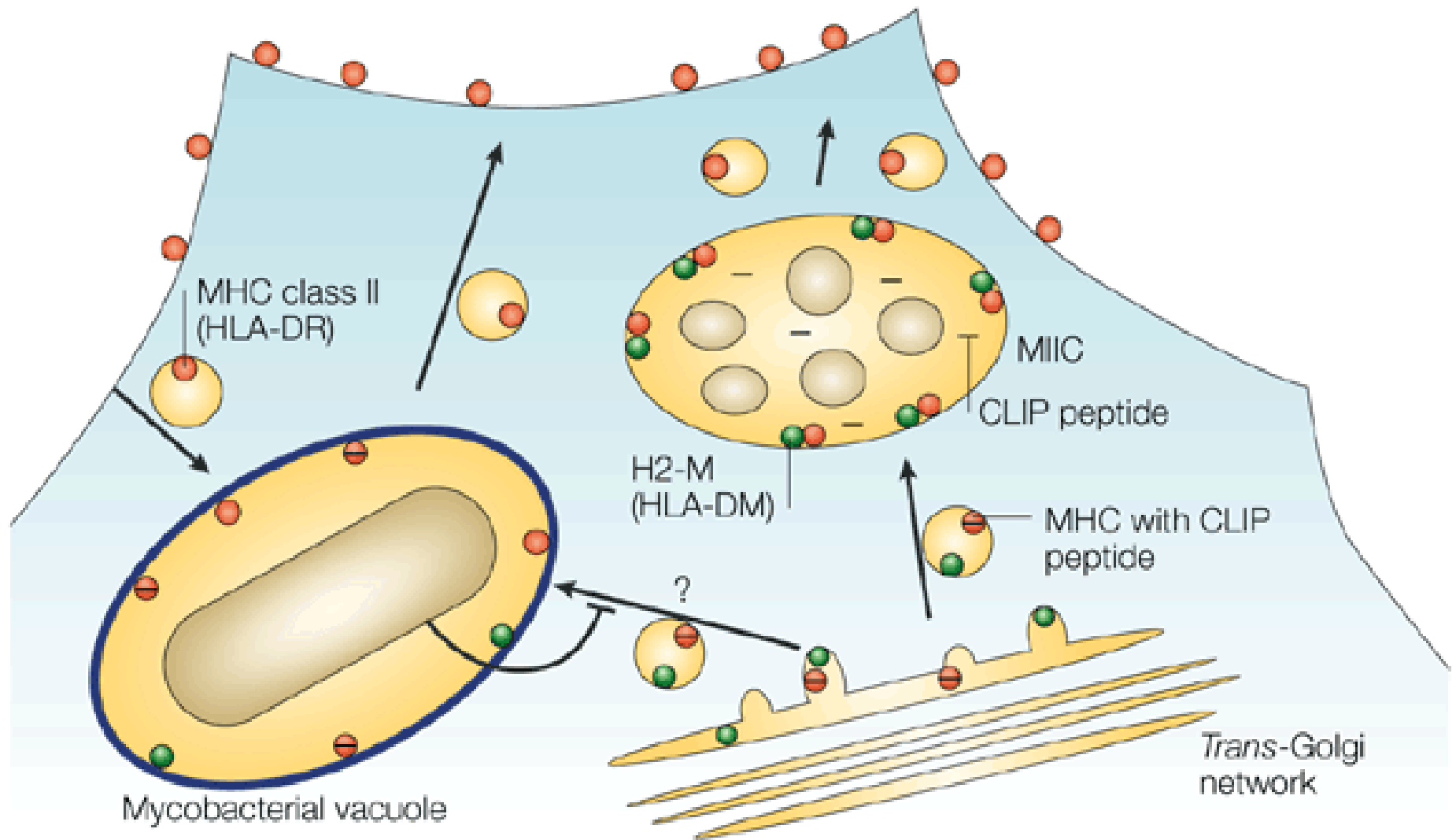
"Nemocný muž se dnes pohyboval po Slovanské třídě, v blízkosti křižovatky s Liliovou ulicí," uvedl mluvčí plzeňské policie Jaroslav Ibehej.

Kriminalistům po zveřejnění pátrání volala řada lidí. Poslední z nich policisty skutečně navedl na místo, kde Pfeifer byl. Nyní ho čeká převoz do zdravotnického zařízení v Janově na Rokycansku.

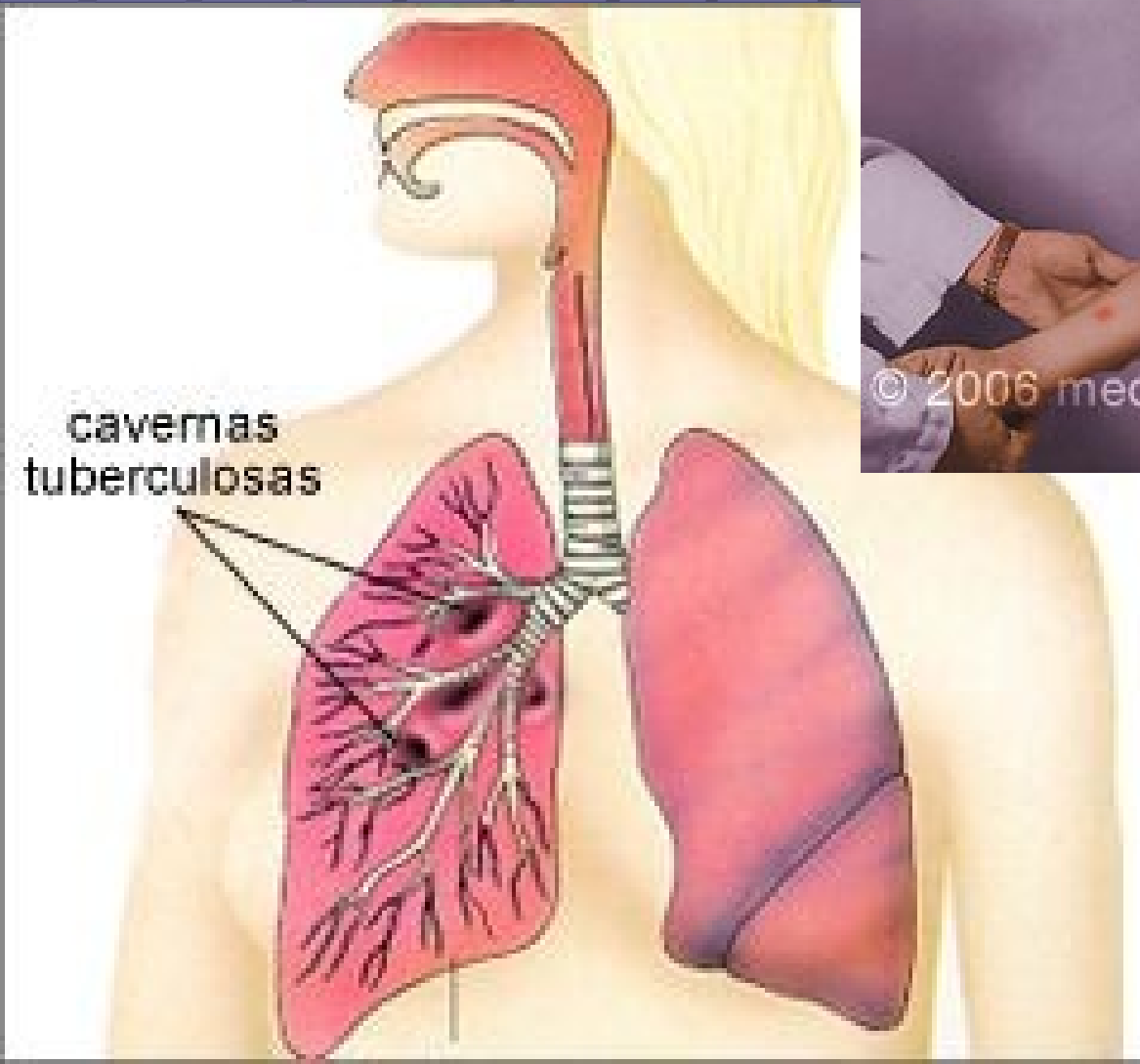
Tuberkulóza je nebezpečné nakažlivé onemocnění. Léčba pomalu se rozvíjející nemoci je velmi zdlouhavá. Po celou dobu je třeba být pod dohledem odborníků.

Kvůli zamezení šíření nákazy musí zdravotníci vyhledávat také lidi, kteří byli v kontaktu s tuberkulózním pacientem.

# *Mycobacterium* uvnitř buňky



# Tuberkulóza



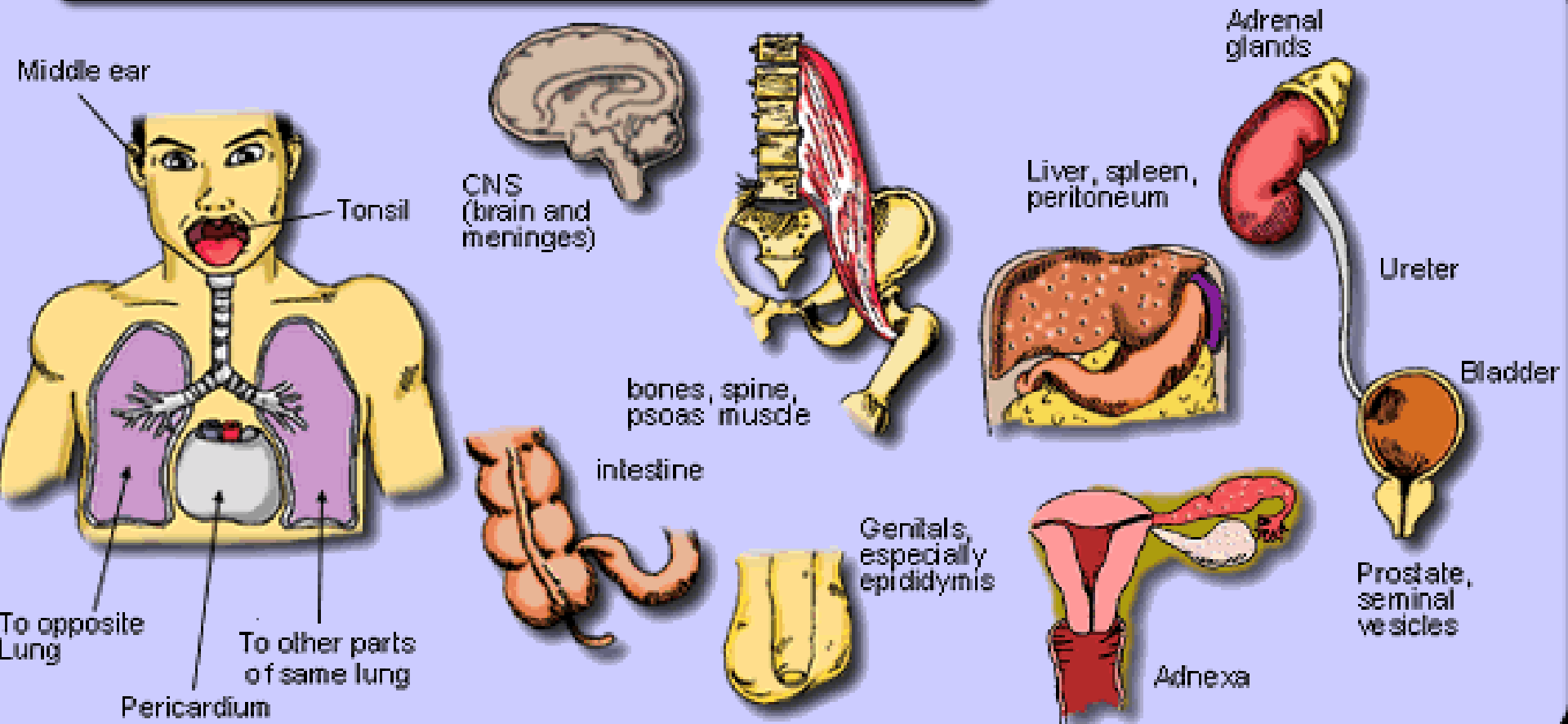
<http://www.stockmedicalart.com>

# Není jen plicní forma TBC

sitemaker.umich.edu (2x)

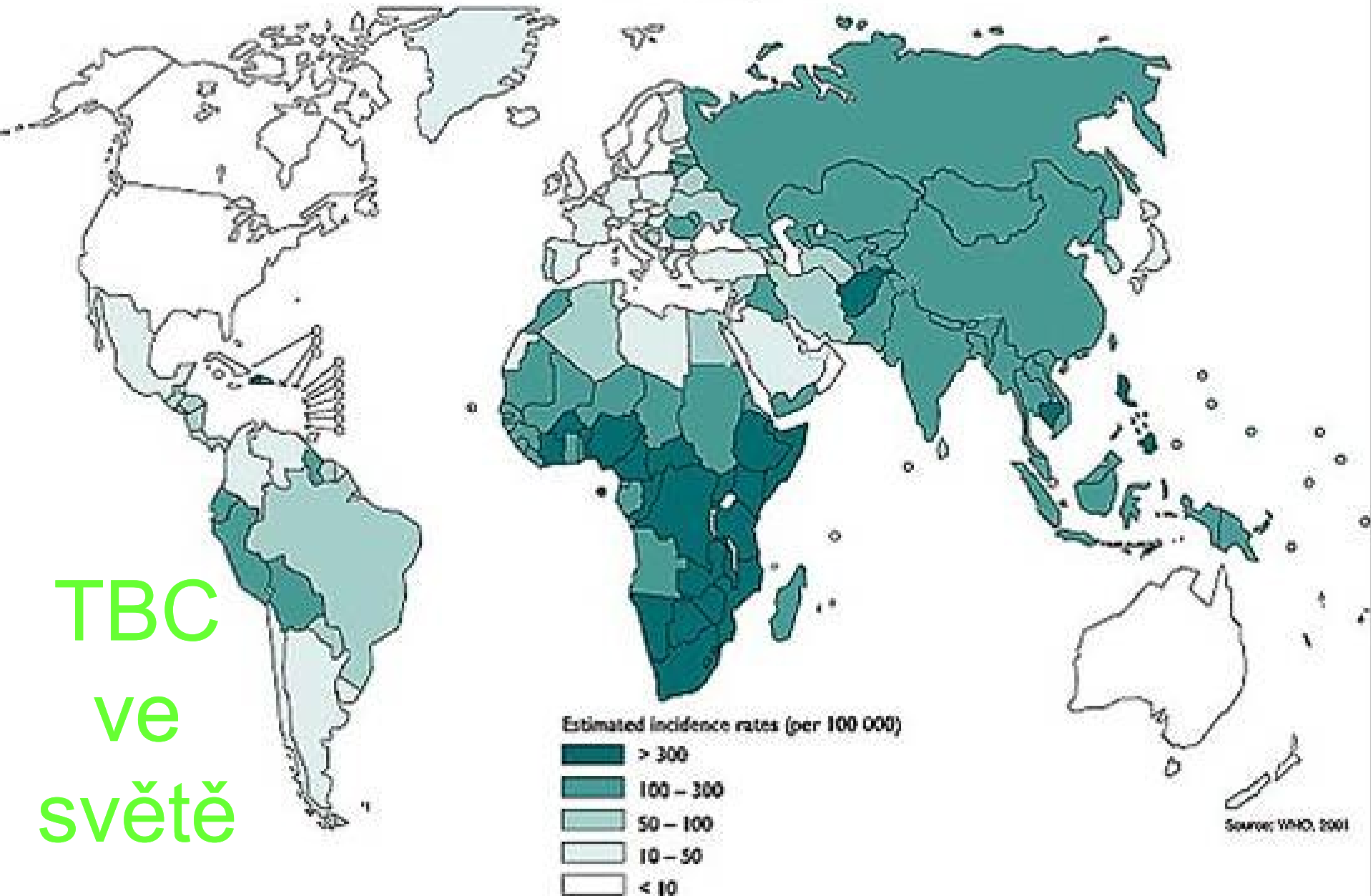


## Tuberculosis Affects Many Parts of the Body



# Tuberculosis, 2000

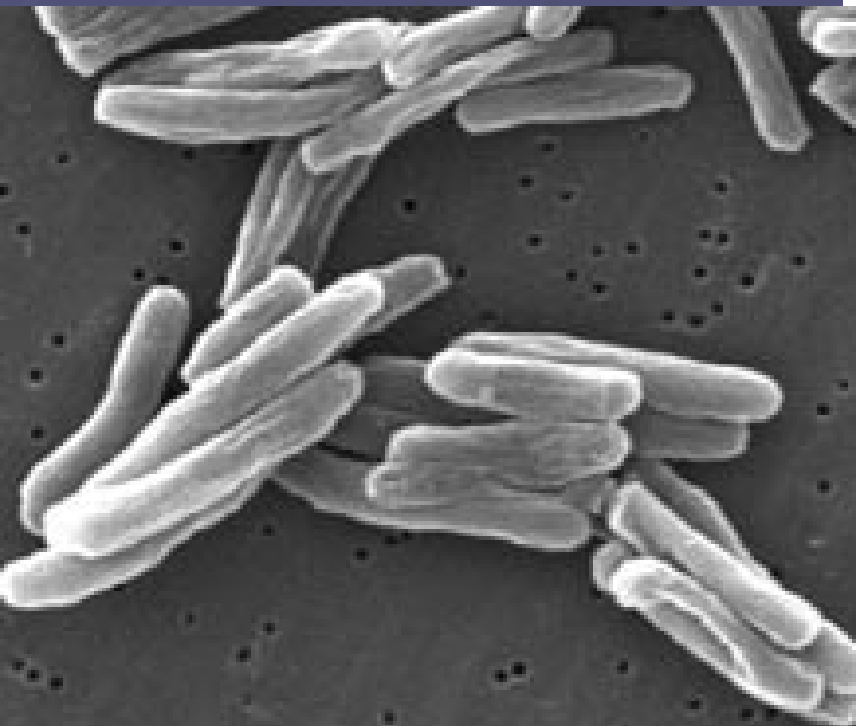
TBC  
ve  
světě



# Ještě jednou TBC

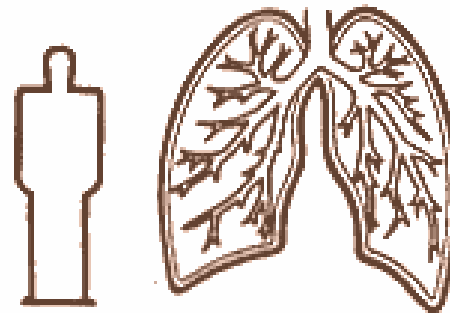
<http://www.lung.ca>

<http://www.cbc.ca>

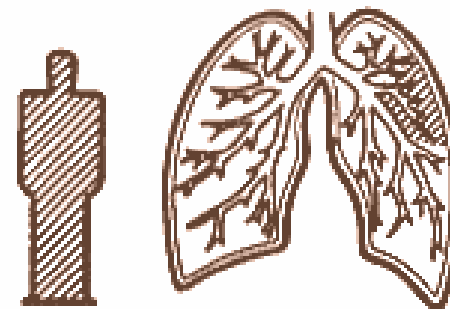


Det WD Exp |-----| 2.0µm  
SE 7.4 0 jhc

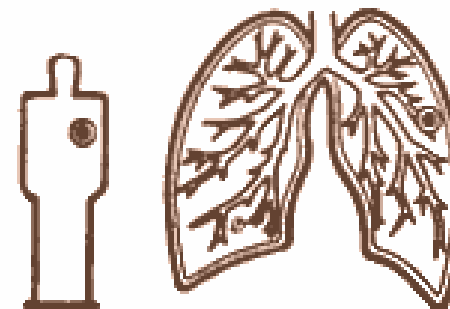
## Tuberculosis Develops by Stages



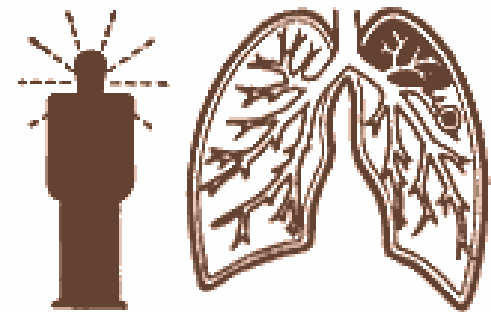
Every person is born with healthy lungs



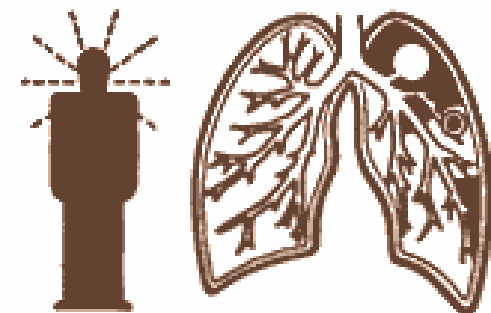
Many of us become infected from other people as we grow up.



The first infection usually heals. The person is well and no germs escape from his lungs. It is important to find this first infection in children.



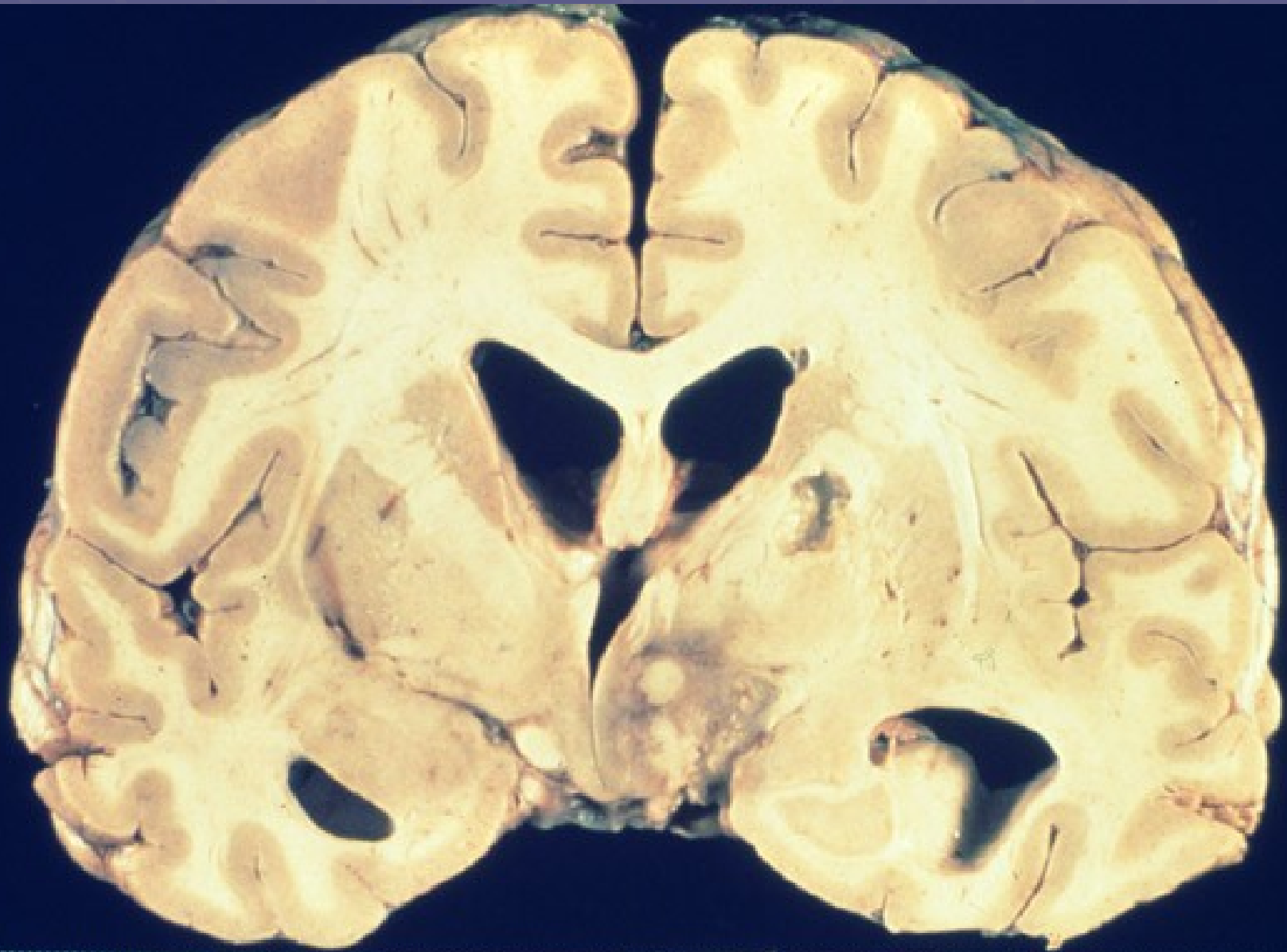
If later a person becomes infected again, the serious disease tuberculosis may begin. The germs that escape from the lungs are likely to infect others.



If tuberculosis is not discovered early, the disease spreads. A hole (cavity) may form in the lung which is an incubator of germs that escape and menace everybody who comes in contact with the sick person.

# Tuberkulom mozku

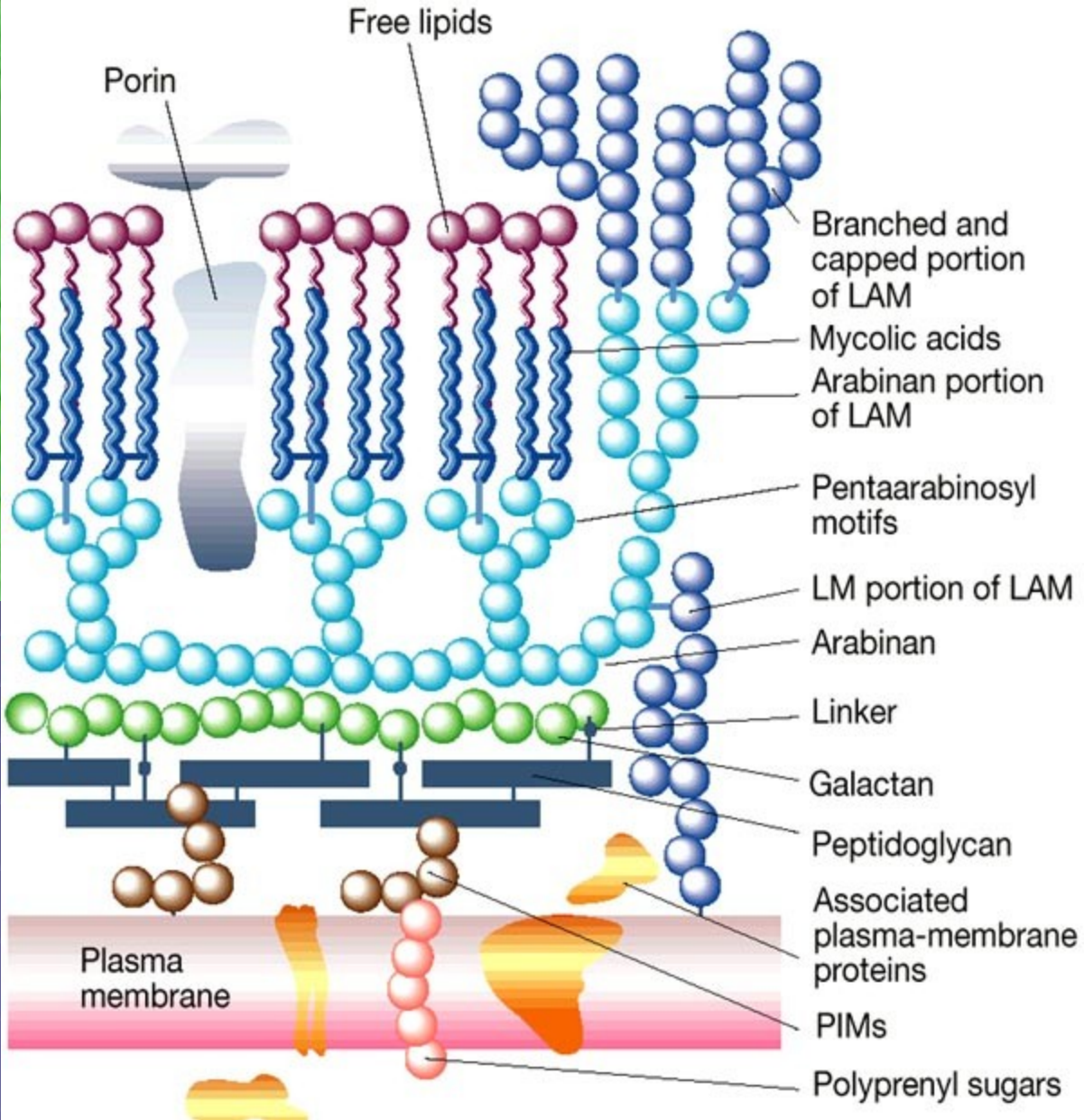
<http://pathology.mc.duke.edu>





# Další zvláštnosti mykobakterií

- Jejich buněčná stěna je vysoce hydrofobní, jsou v ní tzv. **mykolové kyseliny**. Téměř se nebarví podle Grama, jsou nutná speciální barvení.
- **Roste pomalu**, má dlouhou generační dobu, proto jsou pro kultivaci nutné speciální půdy
- Jsou velmi odolná k **desinfekčním prostředkům**. Nelze použít prostředky spektra „A“, proti běžným bakteriím, je nutné „T“ (proti TBC), případně „M“ (proti atypickým mykobakteriím)
- Jsou též **odolná k antimikrobiálním látkám**.



# Buněčná stěna mykobakterií

www.primer.ru

# Zmínky o TBC ve známých písních...

...tuberkulóza, no to je paráda...

(Jaromír Nohavica: Pochod marodů)

## Známí lidé, kteří zemřeli na TBC

*Například:* Václav II., Eliška Přemyslovna, Božena Němcová, Jiří Wolker, Karel Havlíček Borovský, Stanislav Rolínek (autor soch v Rudce u Kunštátu), Franz Kafka, George Orwell, Frederic Chopin, Anders Celsius (°C), Louis Braille (písmo), Gavrilo Princip (pachatel atentátu na následníka trůnu v Sarajevu), Beethovenova maminka, obr Drásal, sv. Terezie z Lisieux či svatý Kazimír

# *Mycobacterium leprae*

- Je to mikrob ještě zvláštnější než tuberkulózní mykobakterium
- Jeho generační doba je ještě výrazně delší. In vitro kultivace se podařila teprve nedávno a trvala celý jeden rok
- Základní léčba lepry není drahá, bohužel v zemích, kde se lepra vyskytuje, je i tato poměrně nízká cena příliš vysoká
- Proto se problémem lepry zabývá řada **nadací, nevládních a charitativních organizací** a podobně.

# Příběh druhý

- Pan Hassan žil v **pouštní části Súdánu**, zmítané neustálými válkami a nepokoji.
- V poslední době se od něj začali odvracet i ti přátelé, kteří ještě neuprchli ani nebyli povražděni.  
**Znetvoření obličeje** pana Hassana bylo neklamnou známkou, že pan Hassan trpí onemocněním, které se **v těchto zeměpisných šířkách ještě stále vyskytuje až příliš často.**
- Naštěstí se pan Hassan setkal s pracovníky jedné **nevládní organizace**, kterým rovněž byla diagnóza jasná. Pomocí **dapsonu** se podařilo panu Hassanovi pomoci.

# Lepra

[www2.bc.cc.ca.us](http://www2.bc.cc.ca.us) (2x)



# Atypická mykobakteria

- Kromě *M. tuberculosis* a *M. leprae* existuje i spousta **dalších mykobakterií**. Některá, např. *Mycobacterium marinum*, patří mezi tzv. **atypická mykobakteria**, která občas způsobují infekce ran a jiné problémy.
- **Některá jiná mykobakteria jsou nepatogenní** a jsou normální součástí lidské mikroflóry, např. *M. smegmatis* – viz obrázek



# Příběh třetí

- Pan Piraňa byl zuřivým akvaristou. Poslední měsíc měl problém: musel do akvárií nořit jen levou rukou, protože na pravé měl vřed.
- Po vyšetřování byl jeho případ uzavřen jako tzv. **fish tank granuloma**, běžný u akvaristů. Podobná nemoc plavců se nazývá **swimming pool granuloma**.



# Infekce *M. marinum*

<http://www.nlm.nih.gov>



# Aktinomycety



- Jsou to **vláknité bakterie**, v podstatě **grampozitivní**, ale **barví se Gramem špatně**, protože jejich buněčná stěna je hodně hydrofobní a obsahuje hodně mykolových kyselin
- **Aktinomycety (*Actinomyces* sp.) se běžně vyskytují v ústní dutině zdravých osob.** Odtud se za různých okolností mohou dostat do měkkých tkání krku, tváře či hrudníku. Jsou to anaerobní bakterie

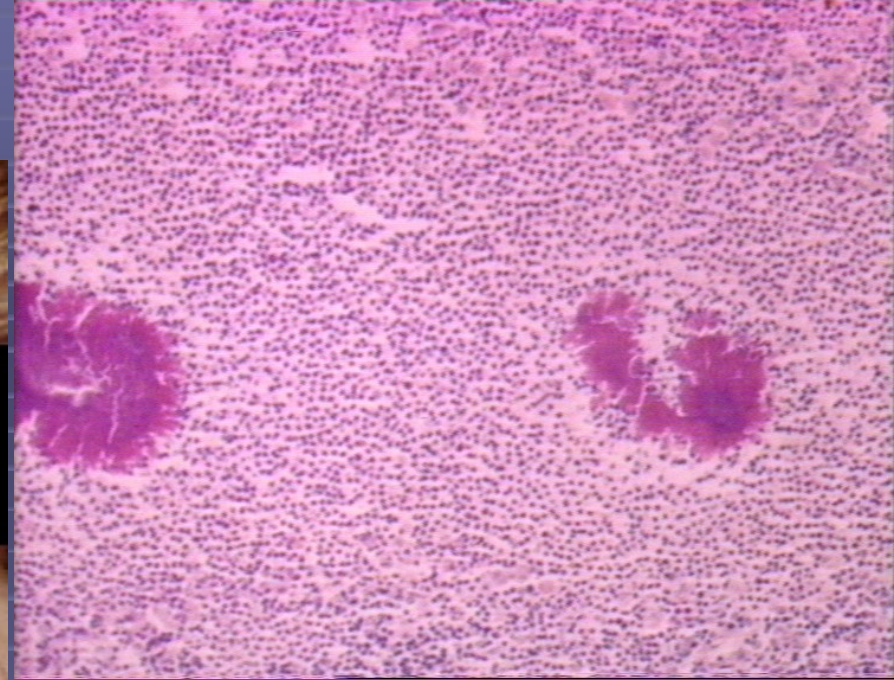
# Příběh čtvrtý

- Paní Píšťelková si už delší dobu hmatala pod kůží krku **drobné útvary**
- Nedávno se stalo, že jeden z těchto útvarů se **otevřel na povrch** a v ústí se objevil velmi hustý, žlutý páchnoucí hnis. To už paní Píšťelkovou donutilo zajít k lékaři.
- Lékaři poslali **hnis na mikrobiologické vyšetření**. Vyšetření **trvalo dlouho** – paní Píšťelková už spílala mikrobiologům, že si tam někde válejí šunky. Nakonec se ukázalo, že má aktinomykózu, takže dlouhá doba byla způsobena dlouhou kultivací těchto mikrobů

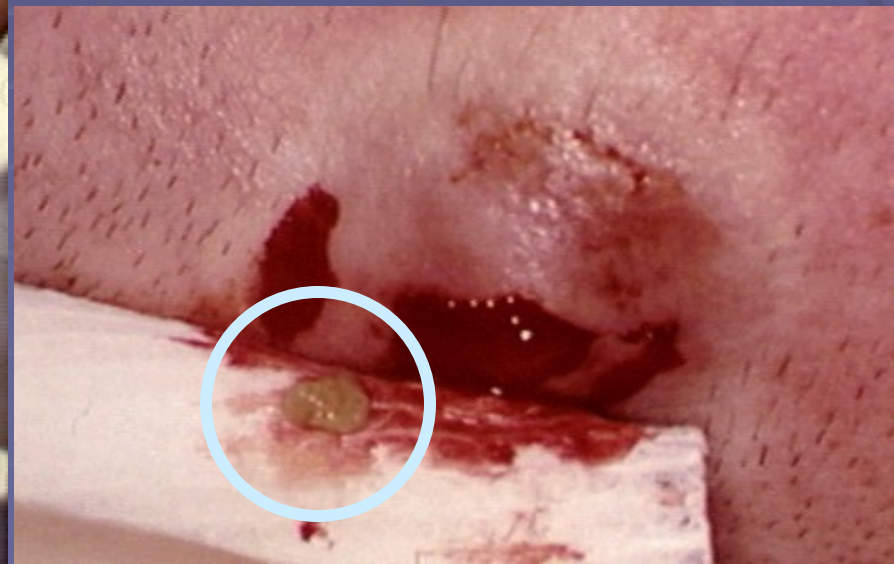
# Nokardie

- **Nokardie jsou podobné aktinomycetám.** Na rozdíl od nich však jsou naopak striktně aerobní. Jinak však mají hodně podobné vlastnosti, s výjimkou přenosu. Aktinomykóza bývá endogenní, naopak nokardióza exogenní, často z půdy
- Existují ještě různé **další příbuzné či podobné bakterie**, např. rothie, dermatofily, rhodokoky a další. Původci lidských onemocnění se však stávají jen zřídka

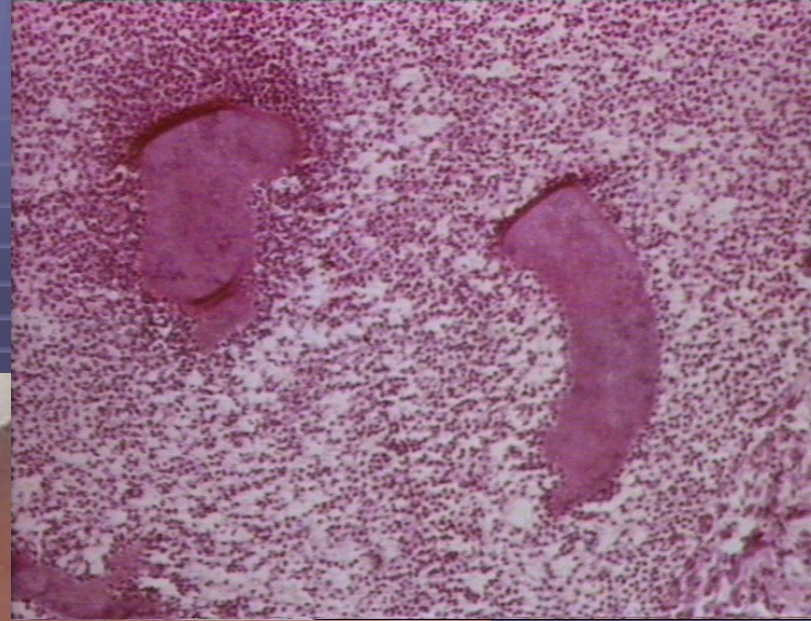
# Aktinomykóza



pathmicro.med.sc.edu (3x)



# Nokardióza



# Nokardiová pneumonie se sepsí



A previously well 57-year-old man ... 3-day history of severe dyspnoea. We conclude that *N. asteroides* infection can present as a fulminant community-acquired pneumonia with bacteraemia in the absence of immunosuppression or coexistent infection. (From the article related to the picture)

# Nokardióza mozku na CT





# Acidorezistence a alkalirezistence

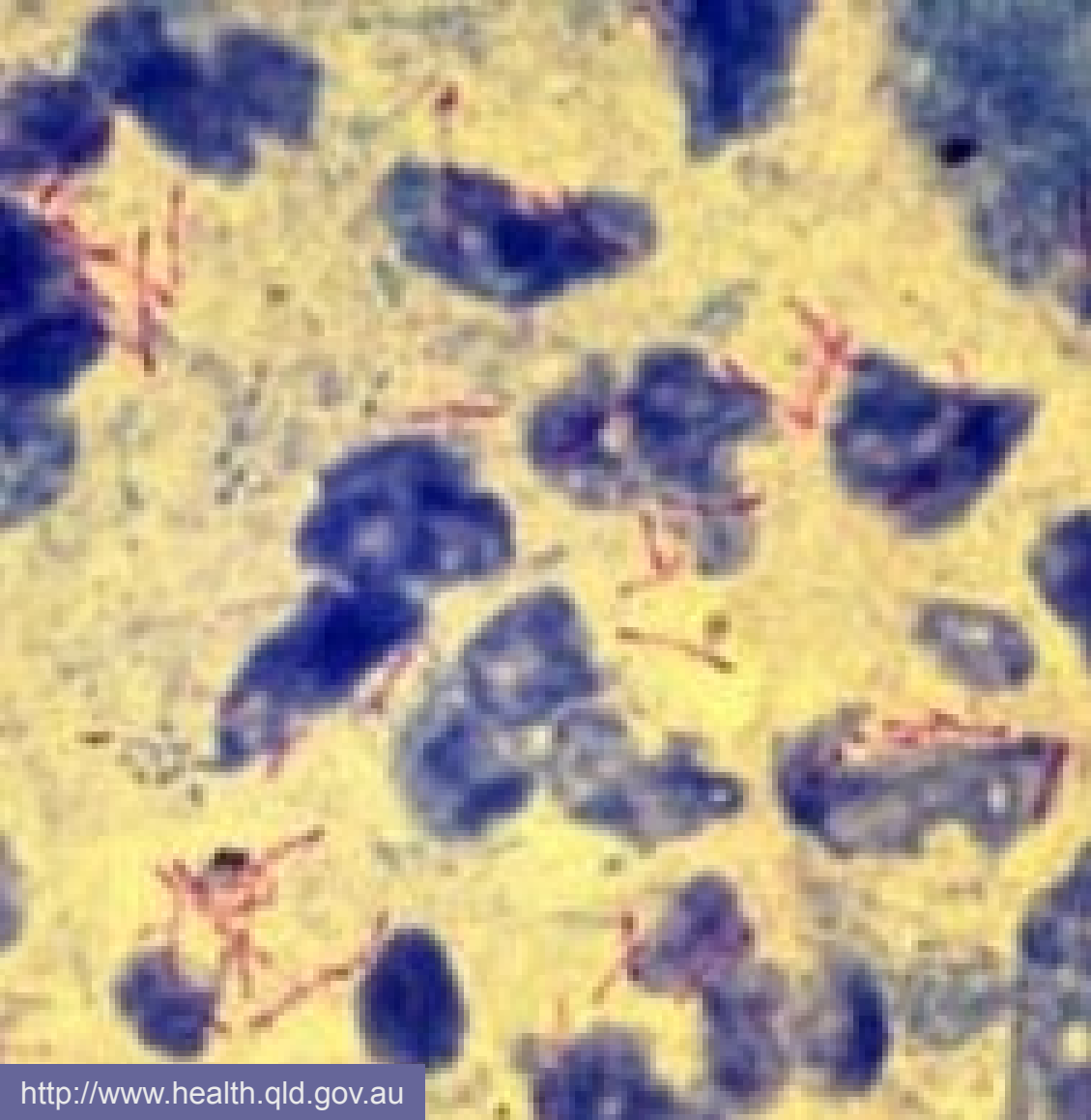
- Aby mohly na něco působit (jiné než ty nejsilnější) kyseliny či alkalie, musí to „něco“ být hydrofilní, tedy komunikovat s vodným prostředím. Pro mykobakteria však tohle neplatí.
- Nejsme tedy schopni je kyselinami či alkaliemi ničit (leda těmi úplně nejsilnějšími, kterým pak už neodolá nic)
- Nejsme také schopni je kyselinami odbarvovat, pokud tedy se je nějakým zázrakem podařilo obarvit
- Totiž: většina barviv je také hydrofilních, a tudíž se mykobakteria i špatně barví, zpravidla je nutno barvit je za horka, aby se vůbec obarvila
- Nokardie a aktinomycety jsou na rozdíl od mykobakterií acidorezistentní jen zčásti. Barvíme je proto podle Grama, ale musíme počítat s tím, že se barví nerovnoměrně a špatně.

# Co z toho vyplývá pro klinika?

- Pokud klinik pošle vzorek (sputum, moč, hnis či cokoli jiného) „na bakteriologickou kultivaci“, nemůže očekávat, že vyšetření odhalí případnou přítomnost mykobakterií
- Chce-li klinik zjistit, zda má pacient TBC, musí **poslat vzorek zvlášť a na průvodce výrazně označit, že má být vyšetřen kultivačně či PCR na tuberkulózu.** V tom případě laboratoř provede příslušné procedury
- **Sérum na protilátky proti TBC také posílat nelze,** (přesněji: lze, ale je to vcelku na kočku), protože protilátková odpověď je velmi špatná.

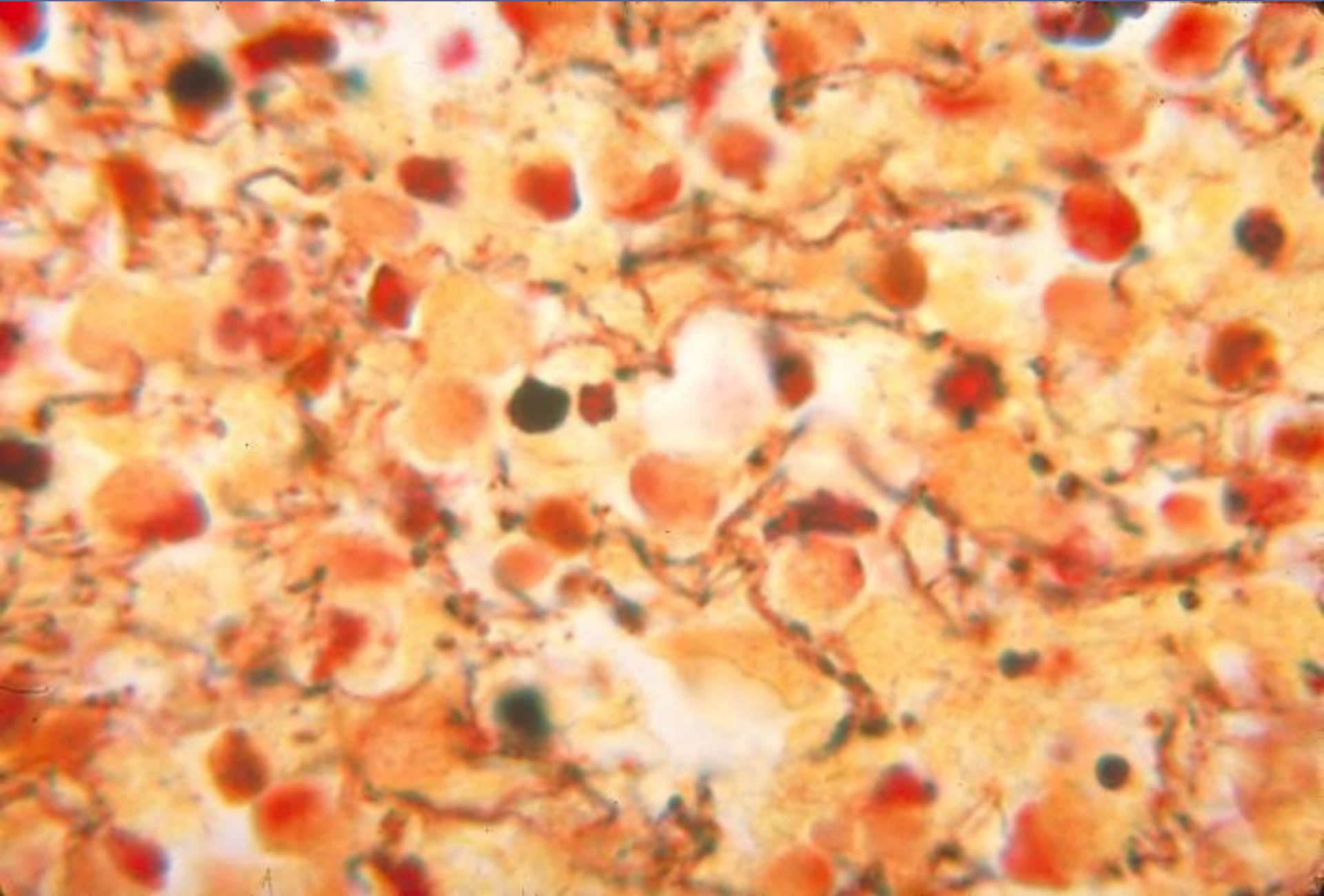
# Acidorezistentní bakterie

## *Mycobacterium tuberculosis*

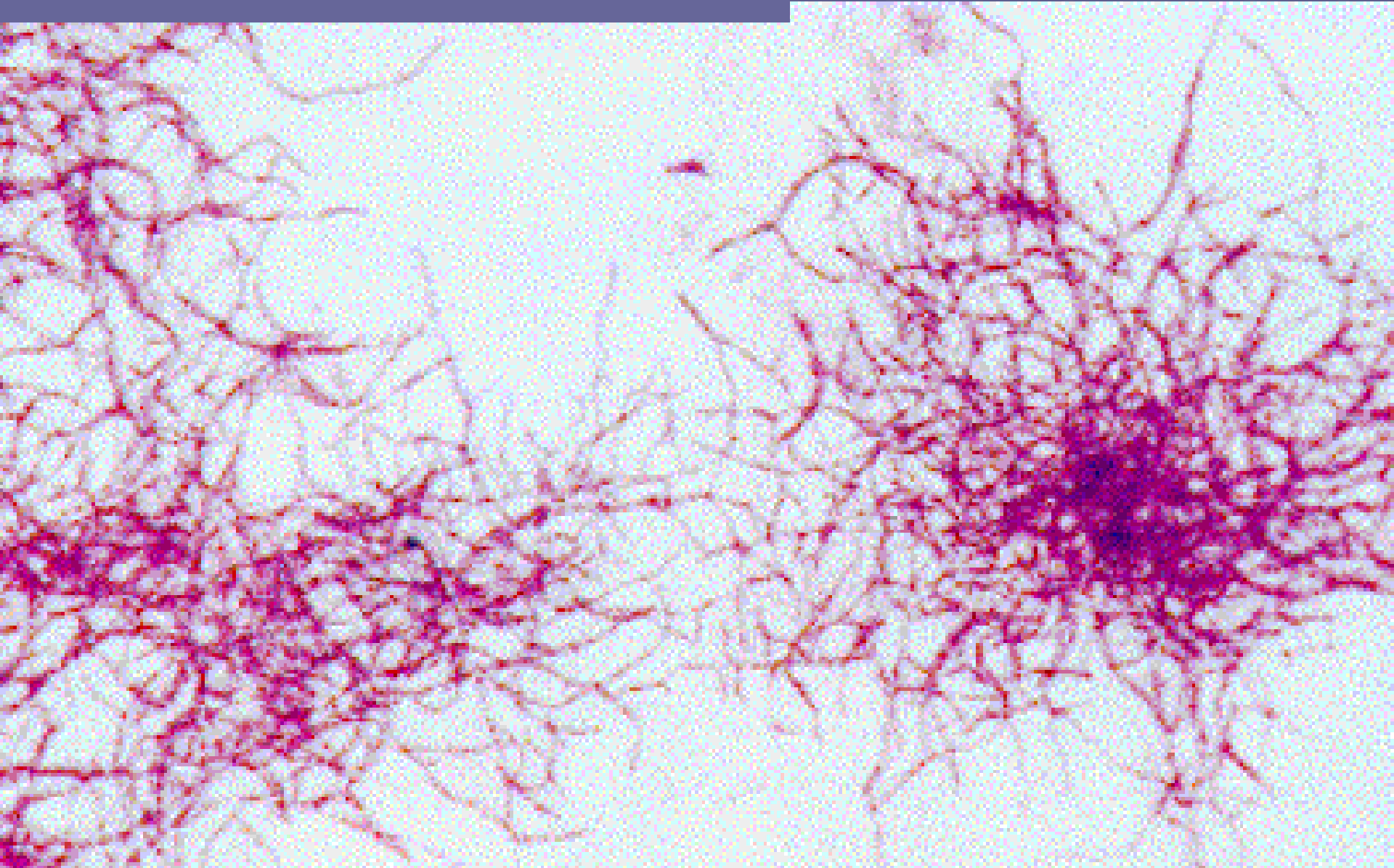


# *Actinomyces israeli*

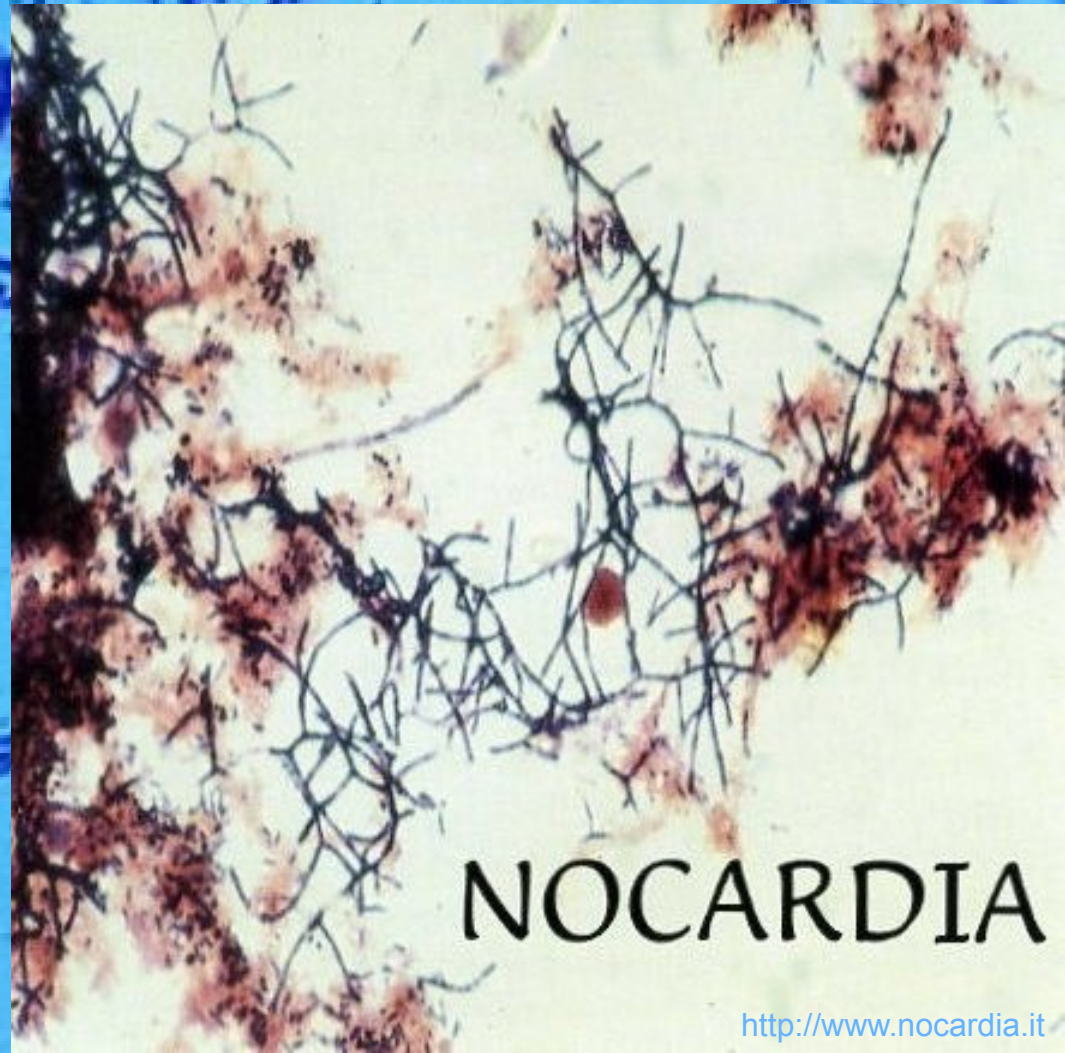
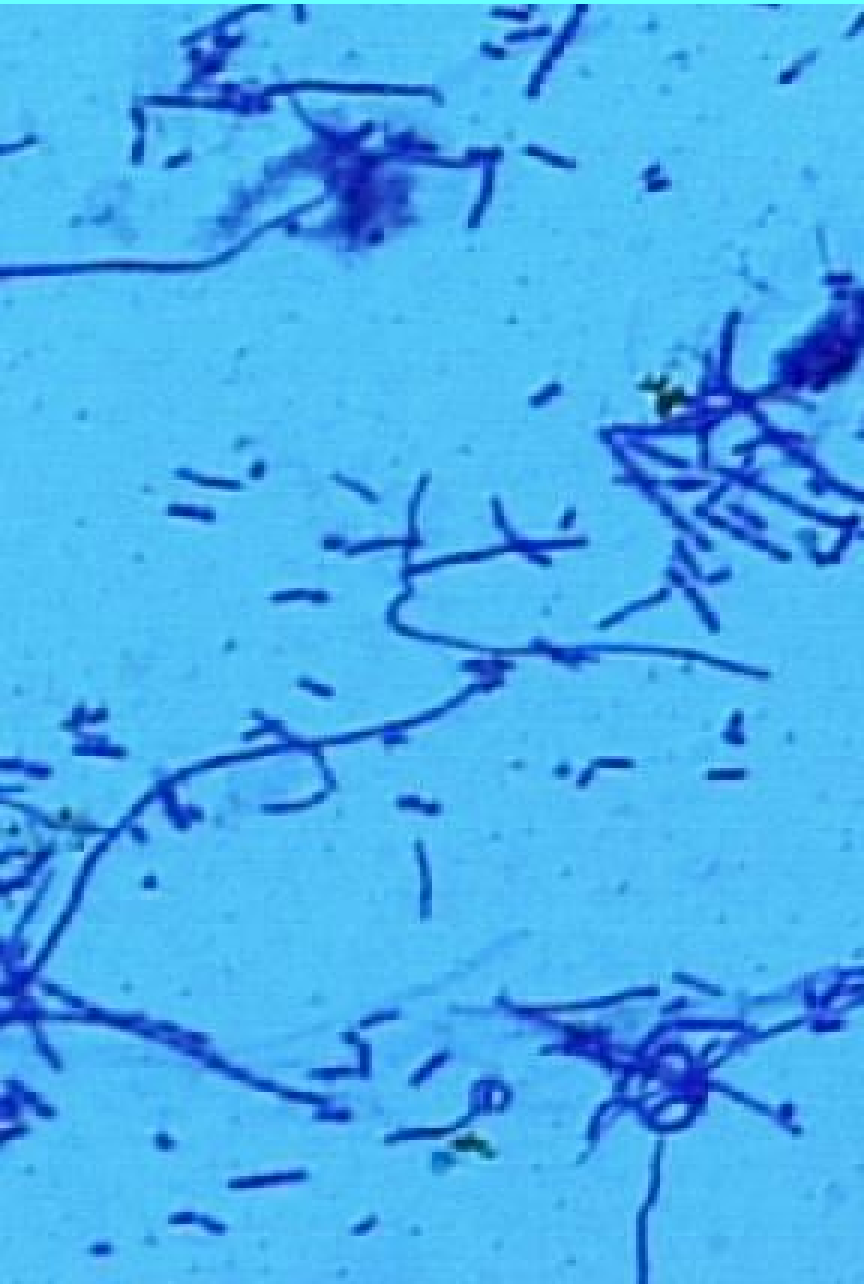
pathmicro.med.sc.edu



# *Nocardia asteroides*



# *Nocardia asteroides*

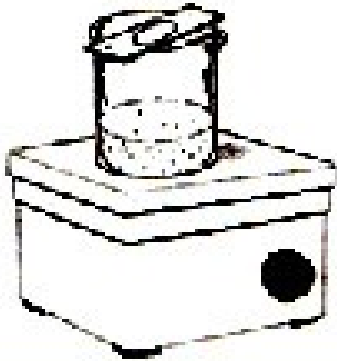


**NOCARDIA**

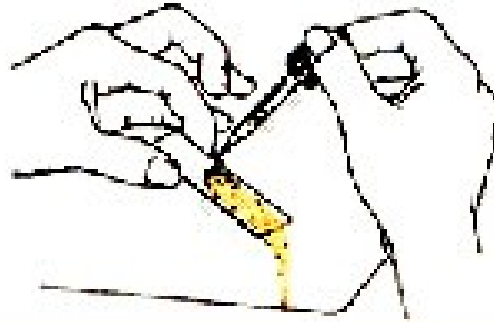
# Jak pátrat po mykobakteriích

- **Mikroskopie:** Používá se Ziehl-Neelsenovo barvení a fluorescenční barvení
- **Kultivace:** Používá se speciálních půd, přičemž před vlastní kultivací předchází **moření, obvykle louhem. Cílem moření je usmrtit ostatní bakterie**, které by při svém rychlém růstu byly kultivačně úspěšnější. Alkalirezistentní mykobakteria moření snadno přežijí. Kultivační výsledky se zpravidla odečítají po 1, 3, 6 a 9 týdnech; první odečítání slouží hlavně k vyřazení kontaminovaných půd, mykobakteria vyrostou minimálně za 3, častěji **6**, občas i **9 týdnů**.

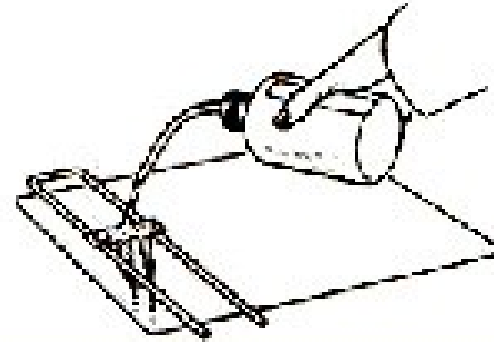
# Ziehl-Neelsenovo barvení



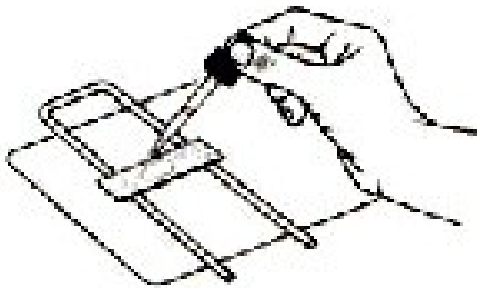
**1** Cover smear with carbolfuchsin. Steam over boiling water for 8 minutes. Add additional stain if stain boils off.



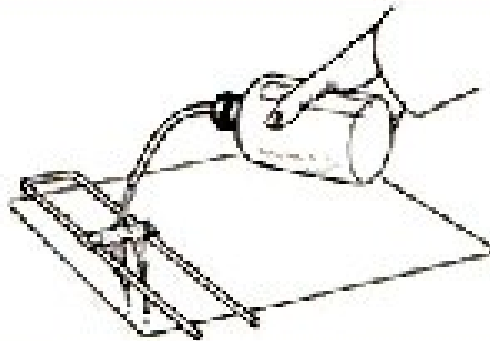
**2** After slide has cooled decolorize with acid-alcohol for 15 to 20 seconds.



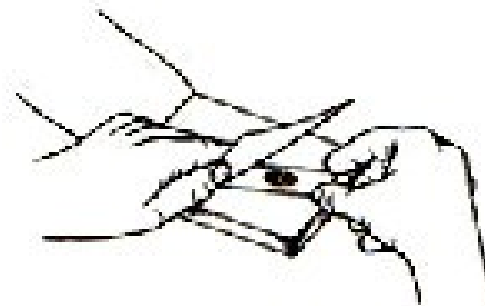
**3** Stop decolorization action of acid-rinsing briefly with water.



**4** Counterstain with methylene blue for 30 seconds.



**5** Rinse briefly with water to remove excess methylene blue.



**6** Blot dry with bibulous paper. Examine directly under oil immersion.

Ziehl-Neelsen acid-fast staining procedure



# K tekuté Šulově půdě

- I pozitivní zkumavka je na první pohled čirá, protože nárůst mykobakterií je patrný jen u dna („modrej bordel“, jak to trefně označila studentka J. H. 😊)



# Jak pátrat po mykobakteriích II

- **Automatická kultivace:** Používá se různých typů kultivačních automatů: mohou detekovat kultivační pozitivitu mnohem dříve než klasická kultivace
- **Biochemické rozlišení** je možné, je však vyhrazeno specializovaným laboratořím
- **Pokus na zvířeti:** občas se používá morče
- **PCR diagnostika** se stává čím dál důležitější
- Průkaz protilátek naopak nepoužívá: vzhledem k převažující buněčné imunitě nemá vyšetřování protilátek praktický smysl

# PCR kit pro diagnostiku TBC



# Nepřímý průkaz TBC

- Nejdůležitějším typem imunity u TBC je buněčná imunita. Tvorba **protilátek** se vyskytuje, ale měřitelná množství jsou přítomna jen u části případů. Pozitivní nález protilátek lze považovat za známku infekce, zato však negativní nález má minimální informační hodnotu.
- **Buněčnou imunitu lze testovat**
  - **kožním (tuberkulinovým) testem**, zvláště po vakcinaci
  - **quantiferonovým testem** (reakce pacientových buněk na antigenní výzvu)

# Kožní testy (Mantoux)

- Používá se pro **ověření účinnosti očkování**, ale také k průkazu případné latentní infekce
- Na testy je potřeba **celý pacient**, nejde tedy o laboratorní test. Test provádějí dermatovenerologická či jiná specializovaná pracoviště
- **Pozitivní** jsou tyto testy v případě, že je aktivována buněčná imunita; jde vlastně o jistý typ opožděné alergie

# Quantiferon

- Moderní možnosti k ověření buněčné imunity je vyšetření zvané „quantiferon“
- Bylo prokázáno, že při tuberkulóze, a to i latentní, dochází k tomu, že **tuberkulózní antigeny aktivují T-lymfocyty** a ty tvoří velká množství interferonu gama
- Podobně lze tyto T-lymfocyty aktivovat nespecificky např. takzvaným **mitogenem**, ten se proto používá jako pozitivní kontrola

# Quantiferon – tři zkumavky

- Odebírá se nesrážlivá (heparinizovaná) krev do tří zkumavek (potřebujeme lymfocyty!)
- první zkumavka obsahuje **mitogen** – zde by mělo za normálních okolností **vždy** dojít ke stimulaci tvorby interferonu gama
- druhá zkumavka obsahuje **antigeny TBC** – zde by mělo dojít ke stimulaci tvorby interferonu gama **pouze u infekce TBC**
- třetí zkumavka **neobsahuje nic** – zde by za normálních okolností **nemělo docházet** ke stimulaci tvorby interferonu gama

# Quantiferon – hodnocení

- Za **pozitivní** lze považovat výsledek, kdy T-lymfocyty reagují na stimulaci antigenem mykobakteria, avšak ve zkumavce neobsahující nic nedochází k tvorbě interferonu
- Za **negativní** lze považovat výsledek, kdy T-lymfocyty reagují na stimulaci mitogenem, ale nereagují na stimulaci antigenem mykobakteria
- **Neurčitý výsledek** se objeví v případě, že T-lymfocyty nejsou aktivovány ani mitogenem, nebo naopak se tvorba interferonu objeví i ve zkumavce, kde nic nebylo



# Příklad hodnocení\*

\*může se lišit u jednotlivých typů testu

<b>NIL [IU/ml]</b>	<b>TB minus NIL [IU/ml]</b>	<b>MIT minus NIL [IU/ml]</b>	<b>Výsledné hodnocení testu</b>	<b>přítomnost infekce <i>M. tuberculosis</i></b>
$\leq 8,0$	$< 0,35$	$\geq 0,5$	Negativní	nepravděpodobná
	$\geq 0,35$ a $< 25\%$ hodnoty NIL	$\geq 0,5$		
	$\geq 0,35$ a $\geq 25\%$ hodnoty NIL	libovolná hodnota	Pozitivní	pravděpodobná
	$< 0,35$	$< 0,5$	Neurčitý	nelze určit
$\geq 0,35$ a $< 25\%$ hodnoty NIL	$< 0,5$			
$> 8,0$	libovolná hodnota	libovolná hodnota		

# Quantiferon – zásady odběru

- uchovávat prázdné odběrové zkumavky důsledně při 4–25°C
- odebrat správný objem krve (3 x 1 ml)
- po odběru opakovaným obrácením zkumavky dostat do kontaktu vzorek krve s lyofilizovanými antigeny přítomnými na vnitřním povrchu zkumavky
- zkumavky po odběru uchovávat při teplotě 17–27 °C
- vzorek dopravit do laboratoře k dalšímu zpracování co nejdříve, nejpozději 16 hodin po odběru.

# Testy antituberkulotické citlivosti (nikoli antibiotické!)

- Nelze používat difúzní diskové testy
- Antituberkulotika přidáváme přímo do kultivační půdy
- Antituberkulotika jsou zvláštní látky, až na výjimky odlišné od antibiotik
- Vždy se užívají kombinace tří či čtyř:  
rychle totiž vznikají rezistence, navíc některá působí jen intra- a jiná zase extracelulárně

# Přehled běžně užívaných antituberkulotik

Foto L. Mezenský a J. Svobodová

Antibiotikum	Zkratka
Isoniazid	H, INH
Ethambutol	E
Rifampicin	R
Pyrazinamid	Z
Streptomycin	S, STM

Tuberkulózní játra  
pokusného morčete



# Diagnostika nokardií a aktinomycet

<http://filebox.vt.edu>

- Jsou jen částečně acidorezistentní. Barví se i podle Grama, ale poměrně špatně. Jsou to grampozitivní až gramlabilní vlákna
- Nokardie jsou aerobní, aktinomycety anaerobní



# Testy antibiotické citlivosti

- Antibiotická citlivost se na rozdíl od mykobakterií dá u nokardií a aktinomycet stanovit difusním diskovým testem.
- Musíme ale počítat s tím, že rostou pomalu a špatně – to se týká nejen testů citlivosti, ale i kultivace jako takové

Logo jednoho  
kongresu o TBC



Děkuji za pozornost