

Téma P07: Diagnostika anaerobních bakterií

Ke studiu: *Clostridium*; nesporeující anaeroby (učebnice, WWW atd.)

Z jarního semestru: Mikroskopie, kultivace, biochemická identifikace, pokus na zvířeti, neutralizace

Tabulka pro hlavní výsledky úkolů 1 až 4 (k postupnému vyplnění):

Kmen	K	L	M	N
Gramovo barvení – Úkol 1b (včetně případných údajů o tvorbě spor)				
Kultivace: úkol 3	Krevní (“KA”) Růst A/N			
	VL agar (“VLA”) Růst A/N			
	VL bujón Růst A/N			
	Popis kolonií na KA/VLA*			
KONEČNÝ ZÁVĚR (výsledek Úkolu 4 – ANAERObtest, nebo, u ne-anaerobů, výsledky předchozích testů)				

*Použijte VLA (VL agar) u bakterií, které nerostou na krevním agaru

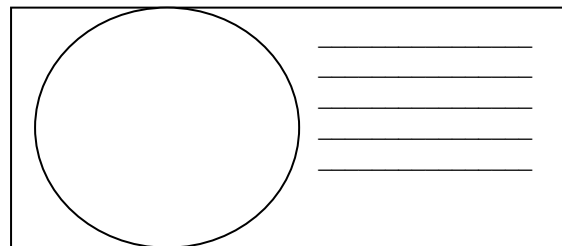
Úkol 1: Mikroskopie klinického vzorku a mikroskopie kmene

a) Prohlídka klinického vzorku

Prohlédněte si Gramem barvený preparát.

Pravděpodobně najdete směs různých bakterií, jak je to u anaerobních infekcí typické: za infekci nemůže jeden patogen, ale směs patogenů. Vedle bakterií můžete vidět leukocyty (zejména polymorfonukleary), případně epitelie, tkáňovou drť a tak dále.

Nezapomeňte obrázek **popsat** (použijte čáry)!



b) Mikroskopie podezřelých kmenů

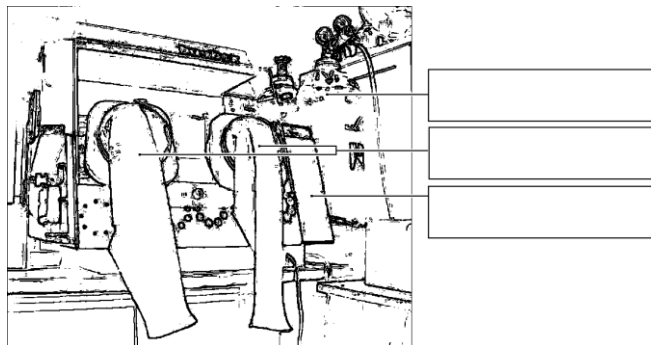
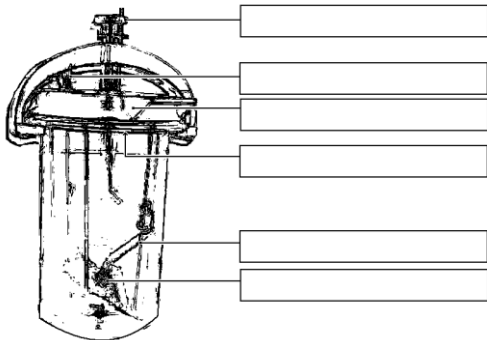
Anaerobní bakterie mohou být koky i tyčinky, grampozitivní i gramnegativní; v tom se neliší od jiných bakterií. Bývají ale pleomorfnější. U rodu *Clostridium* je přítomnost a pozice endospor užívána jako významný diagnostický znak. Pokuste se u jednoho z vašich kmenů (robustní G+ tyčinky) endospory najít.

Úkol 2: Anaerostat a anaerobní box

K získání anaerobiózy používáme v naší laboratoři tři způsoby:

- pro tekuté půdy se jako bariéra médium/atmosféra používá **parafinový olej** (není dokonalé)
- pevné půdy dáváme do **anaerostatu**, kde je kyslík chemicky nahrazen směsí plynů
- pevné půdy lze také umístit do **anaerobního boxu**; anaerobní atmosféra je vháněna z bomby.

Vepište do obrázků svůj popis (anaerostat uvidíte doopravdy a spolu s anaerobním boxem také na obrázku).



Úkol 3: Kultivace na agarových půdách

Popište kultivační výsledky daných kmenů na aerobních i anaerobních půdách.

a) Aerobní kultivace na krevním agaru (KA)

Napište, zda bakterie rostou či nikoli, případně též popište jejich kolonie.

b) Anaerobní kultivace na VL agaru (VL krevním agaru)

VL (krevní) agar je podobný krevnímu agaru, ale má snížený redoxní potenciál a kultivuje se v anaerostatu či anaerobním boxu. Napište, které kmeny zde rostou a ty, které nerostly na KA, popište.

c) Pomnožení anaerobů ve VL bujónu

VL bujón se používá pro pomnožení málo početných anaerobních bakterií. Zkontrolujte přítomnost zákalu (růstu) ve VL bujónu a porovnejte s výsledky části b).

Úkol 4: Druhá diagnostika anaerobů biochemickými testy

U kmenů určených jako anaeroby použijeme biochemický mikrotest (ANAEROTest 23 Lachema) naočkovaný o dva dny dříve. Odečtete podle schématu. Pozor, kódová kniha má tentokrát čtyři části, musíte tedy najít správnou část dle výsledků mikroskopie. Výsledky sloupců „B“ a „A“ se nezapočítávají, získáte tedy šestimístný kód za sloupce H až C.

Kmen:		H	G	F	E	D	C	B	A	Kód:	
	1									Identifikace:	
	2									% pravděpodobn.:	
	4									Index typičnosti:	
	Kód										
Kmen:		H	G	F	E	D	C	B	A	Kód:	
	1									Identifikace:	
	2									% pravděpodobn.:	
	4									Index typičnosti:	
	Kód										

Notes:

Úkol 5 Citlivost anaerobů na antibiotika

Na stole naleznete difusní diskové testy citlivosti na antibiotika u kmenů, které jste určili jako G– koky a které patří k patogenním druhům. Do tabulky dopište zkratky antibiotik dle přiložené kartičky a pro všechny testované kmeny změřte zóny citlivosti. Na kartičce máte napsány hraniční zóny – podle nich interpretujte zóny vámi zjištěné jako citlivé (C), rezistentní (R) a dubiózní (D).

Kmen →				
Antibiotikum (celé jméno)	Ø zóny (mm)	Interpretace	Ø zóny (mm)	Interpretace

Úkol 6 Detekce toxinů klostridií

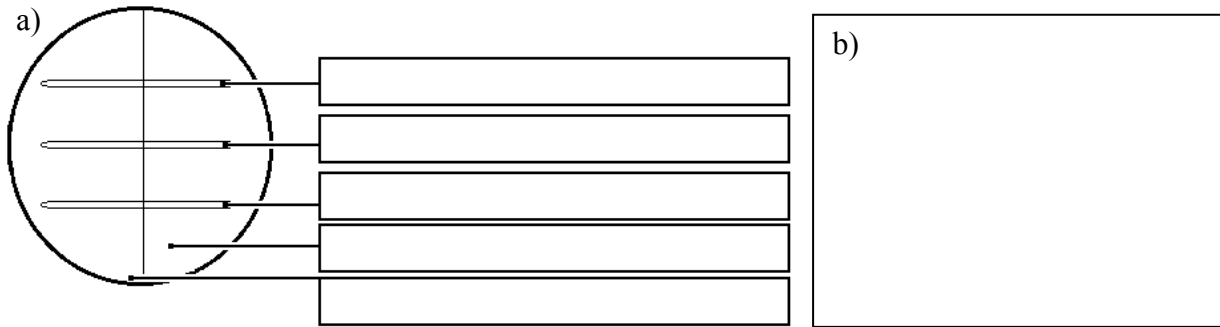
U klostridií se používají různé testy produkce toxinu.

a) Průkaz toxinu (lecitinázy) *Clostridium perfringens*

Clostridium perfringens tvoří specifickou lecitinázu, neutralizovatelnou specifickou protilátkou. Polovina vaší misky je potřena protilátkou (anti-lecitinázou), druhá potřeba není. Toxický efekt lecitinázy spatříte jako oblast precipitace kolem kmene na žlutkovém agaru; Pravý toxin je neutralizován antitoxinem, jiné lecitinázy neutralizovány nejsou. Zakreslete výsledek do obrázku a přičiňte popis.

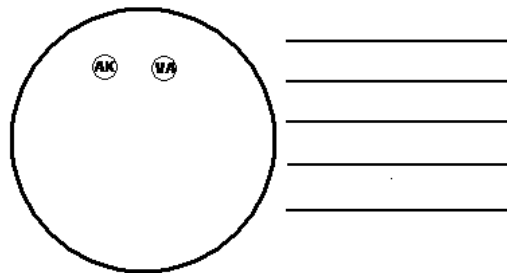
b) Průkaz toxinu *Clostridium tetani*

Zakreslete (dle prezentace) obrázek tetanické myši. Pověšiměte si pozice ocásku a končetin.



Úkol 7 Ukázka hledání anaerobů mezi fakultativně anaerobní flórou

V praxi (především u poševních výtěrů) je často nutné hledat anaeroby mezi jinými bakteriemi. Pro tento účel se používají misky s disky. Amikacin je účinný proti gramnegativním bakteriím, vankomycin proti grampozitivním; anaeroby však bývají rezistentní. Vyznačte, na kterém místě se zpravidla vyhledávají anaeroby. Při této kultivaci jsou často viditelné laktobacily (drobné šedé kolonie s viridací). Jsou mikroaerofilní, avšak naše (nedokonalá) anaerobióza jim vyhovuje rozhodně více než aerobní prostředí.



Kontrolní otázky:

1. Kde se v lidském těle vyskytují za fyziologických podmínek anaerobní bakterie? Jak se dostávají do jiných tkání, kde pak způsobují záněty?
2. Jaké jsou principy odběru a transportu vzorku při podezření na anaerobní infekce?
3. Pro která klostridia je typické
 - a) zbaštění jejich neurotoxinu?
 - b) neurotoxin šířící se z lokálního zánětu?
 - c) histotoxin vedoucí k plynatému sněti (jmenujte alespoň jedno)?
 - d) pseudomembranózní kolitida?
4. Jmenujte alespoň tři antibiotika vhodná k léčbě anaerobních infekcí