

# Anaerobní bakterie praktikum č. 7

Lékařská mikrobiologie – cvičení  
Mikrobiologický ústav LF MU

# Obsah cvičení

---

- ▶ Rod *Clostridium*
- ▶ Nesporulující anaeroby
- ▶ Diagnostika anaerobních bakterií



# Rod *Clostridium*

---

- ▶ Anaerobní G<sup>+</sup> tyčinky tvořící spory (**endospory** bubřící/vyklenující buňku oválného či kulatého tvaru).
- ▶ Vyžadují pro růst **nižší redoxní potenciál** (přídavek např. cysteinu do půdy).
- ▶ Některé druhy mohou být mikroaerotolerantní – tyto druhy pak produkují enzymy peroxidáza, kataláza, superoxiddismutáza.
- ▶ **Výskyt:** saprofytický v půdě a vodě, mikroflóra živočichů včetně člověka. Rozšiřují se pomocí vysoce odolných spor – ty jsou přítomny ve vodě, půdě, prachu → snadná kontaminace.
- ▶ Platí pravidlo, že čím kratší inkubační dobu má onemocnění vyvolané klostridii, tím horší je jeho prognóza.

# *Clostridium tetani* (1)

---

- ▶ Anaerobní G+ tyčinka tvořící terminální endospory (vzhled „paliček na buben“).
- ▶ **Výskyt:** saprofyt savců, především koní
- ▶ **Onemocnění:** tetanus → způsobeno
- ▶ produkcí neurotoxinu = tetanický toxin.
- ▶ **Brána vstupu patogena:** většinu hlubší, znečištěné rány (typicky poranění od zahradních nástrojů, zrezivělých nářadí atd.), vzácněji vředy, popáleniny. Nutno, aby spora vyklíčila v anaerobním prostředí → typicky v ischemickém okolí rány, uprostřed hnisavých procesů.
- ▶ **Očkování:** součást hexavakcíny, přeočkování jednou za 10-15 let.



# *Clostridium tetani* (2)

---

## ▶ **Mechanismus působení tetanického toxinu:**

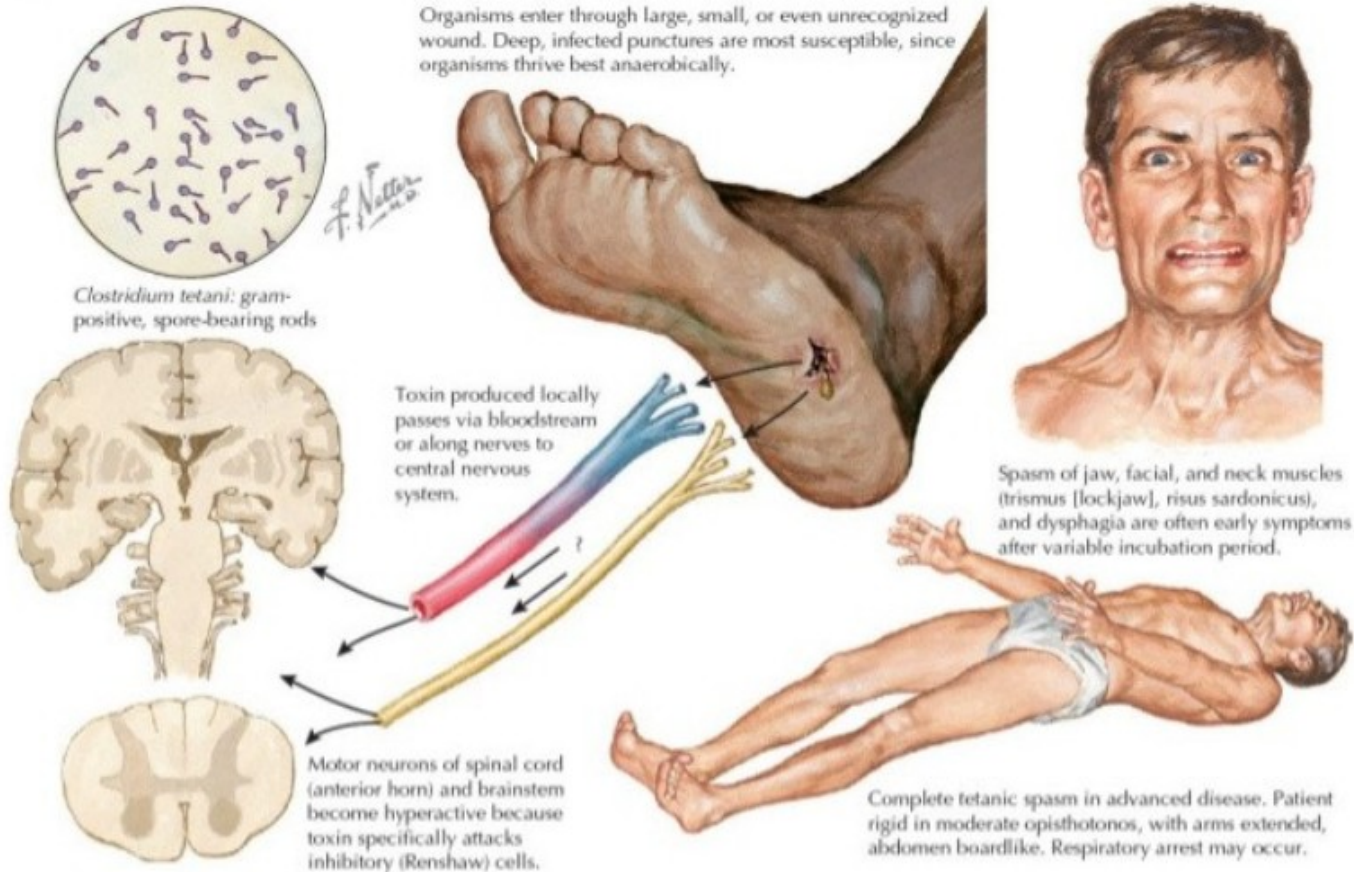
- Tetanospasmin pronikne do neuronu → poškození exkrečního aparátu neuronů → dojde k zábraně uvolňování inhibičních mediátorů (GABA, glycin) → blokáce normální inhibice motorických neuronů → snížení prahu dráždivosti motorických neuronů → tonické křeče příčně pruhovaného svalstva.

## ▶ **Klinické příznaky:**

- Tonické křeče žvýkacích svalů (trismus), mimických svalů (risus sardonius), svalů laryngu a krku, svalů trupu (opisthotonus), dýchacích svalů → udušení.
- Časté zvýšené pocení a teplota.



# Clostridium tetani (3)



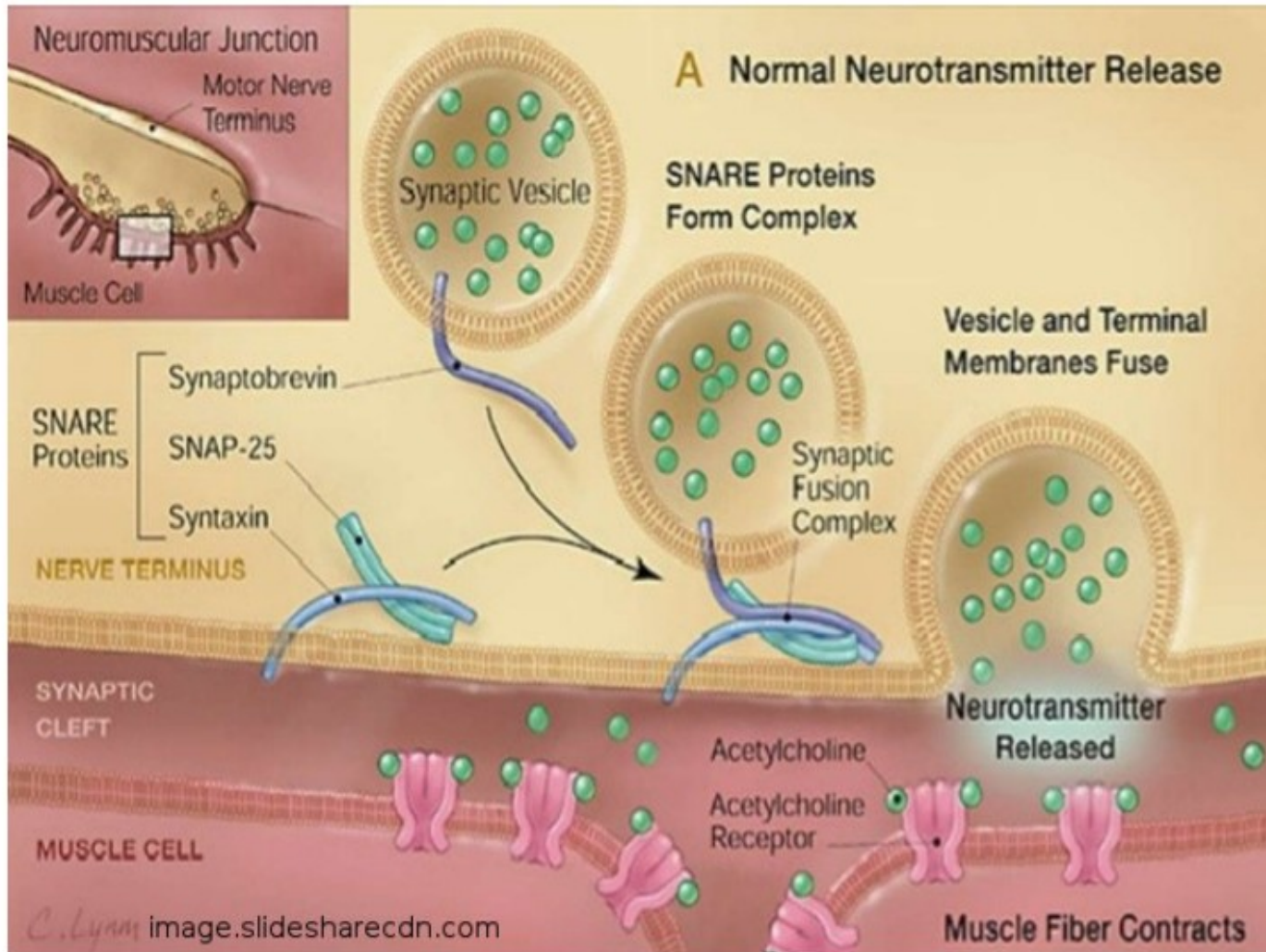
# *Clostridium botulinum* (1)

---

- ▶ Anaerobní G<sup>+</sup> tyčinky, velká, oválná, subterminální endospora
- ▶ **Výskyt:** komenzál ve střevech zvířat ve vodě, půdě, ...
- ▶ Neurotoxin botulotoxin → otravy potravinami, které jsou kontaminované sporami (nejčastěji nedostatečně sterilizované masové a zeleninové konzervy. Adekvátní sterilizace: 100 °C 10–15 minut).
- ▶ **Botulotoxin:** endopeptidáza způsobující hydrolýzu proteinů zodpovědných za transport vezikul s acetylcholinem → inhibice uvolňování acetylcholinu → paralýza příčně pruhovaných svalů.
- ▶ Možné komerční využití v kosmetice (botox).

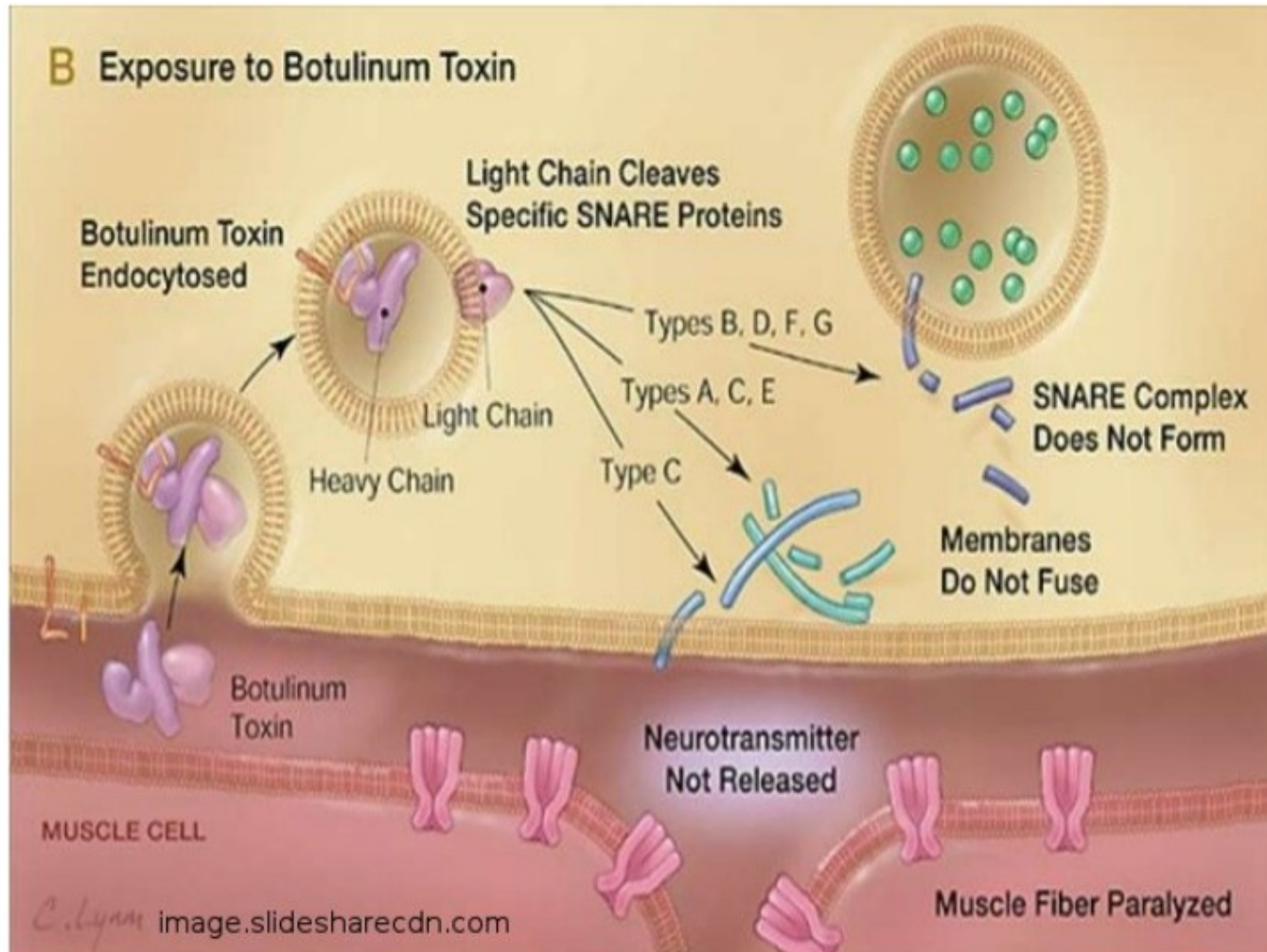


# *Clostridium botulinum* (2)





# Clostridium botulinum (3)



# *Clostridium botulinum* (4)

---

## ▶ **Formy botulismu:**

- **alimentární botulismus:** požití toxinu v potravě (v těle přítomen pouze toxin, ne celý mikrob). **Příznaky:** nevolnost, zvracení, bolesti břicha, pokles očního víčka (ptóza), rozšíření zornic (mydriáza), ztížené polykání, zácpa, zástava močení, symetrické sestupné paralýzy, ochrnutí dýchacích svalů, ale vědomí a citlivost zůstávají nezměněny.
- **traumatický botulismus** (infekce rány)
- **kojenecký botulismus** (toxin produkován přímo ve střevě dítěte)



# Klostridia anaerobních traumatóz

---

- ▶ *C. perfringens*, *C. septicum*, *C. novyi*
- ▶ **Různé klinické projevy** (typicky infekce měkkých tkání – kůže, podkoží, svaly) od kontaminace ran, přes hnisavě-nekrotické procesy s lokálním účinkem toxinů po plynatou sněť (vysoce invazivní nekrotické procesy s celkovou intoxikací).
- ▶ Některé kmeny způsobují svými toxiny **nekrotizující enterokolitidy**.
- ▶ **Terapie:** celková stabilizace pacienta, chirurgické ošetření ran, ATB, léčba kyslíkem v hyperbarické komoře.



# Plynatá sněť

---



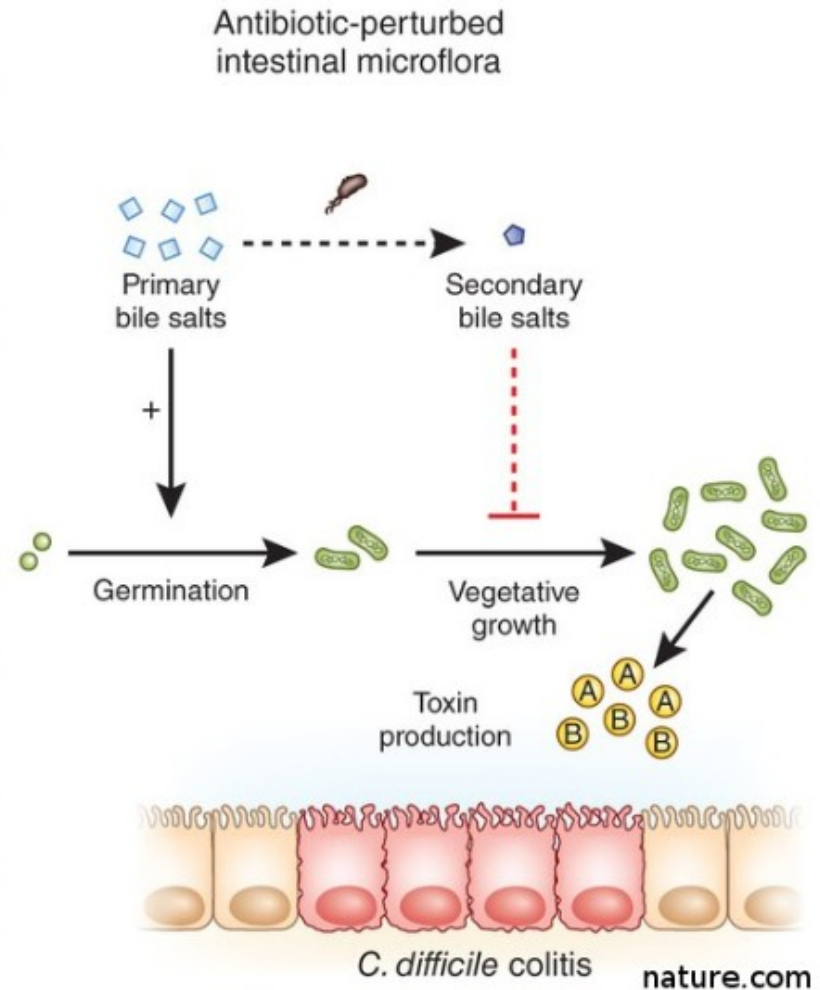
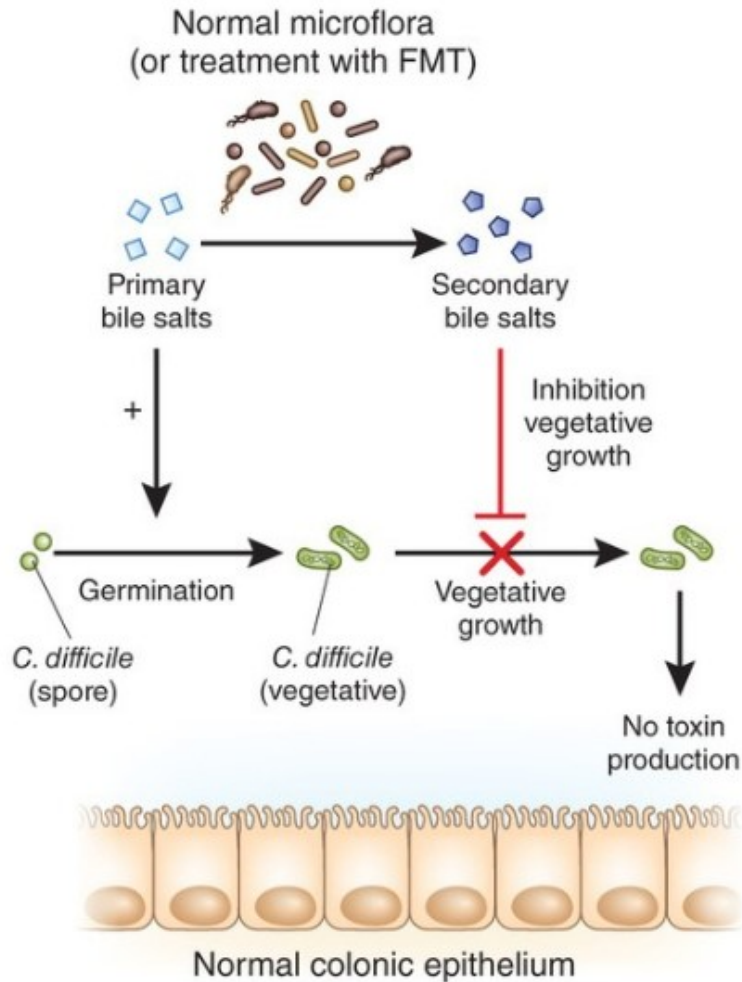
# *Clostridium difficile* (1)

---

- ▶ Ve střevech u 5 % zdravých jedinců, častěji u dětí a kojenců.
- ▶ **Onemocnění:** lehčí průjmy, ale v kritických případech až pseudomembranózní kolitidu.
- ▶ **Často nozokomiální původ – po podání ATB** (především klindamycin, širokospektré peniciliny (amoxycilin+klavulanát) a cefalosporiny (cefoxitin)) → eliminace normální střevní mikroflóry → přemnožení *Clostridium difficile* (rezistentní vůči těmto ATB).
- ▶ **Léčba:** metronidazol, vankomycin per os, fekální transplantace (FMT – fecal microbiota transplantation).



# Clostridium difficile (2)



# Přehled klostridií

---

<b><i>C. tetani</i></b>	původce tetanu
<b><i>C. botulinum</i></b>	producent botulotoxinu
<b><i>C. perfringens,</i> <i>C. septicum, C. novyi,</i> aj.</b>	klostridia plynatých snětí (+ enteropatogenita)
<b><i>C. difficile</i></b>	enteropatogenní



# Nesporulující anaeroby - přehled

---

	<b>Koky</b>	<b>Tyčky</b>
<b>G+</b>	<i>Peptococcus</i> <i>Peptostreptococcus</i>	<i>Propionibacterium</i> *** <i>Eubacterium</i>
<b>G-</b>	<i>Veillonella</i>	<i>Fusobacterium, Leptotrichia</i> * <i>Bacteroides, Prevotella,</i> <i>Porphyromonas</i> **

\* tyčky se zašpičatělými konci

\*\* tyčky s rovnými konci

\*\*\* není obligátní anaerob

---

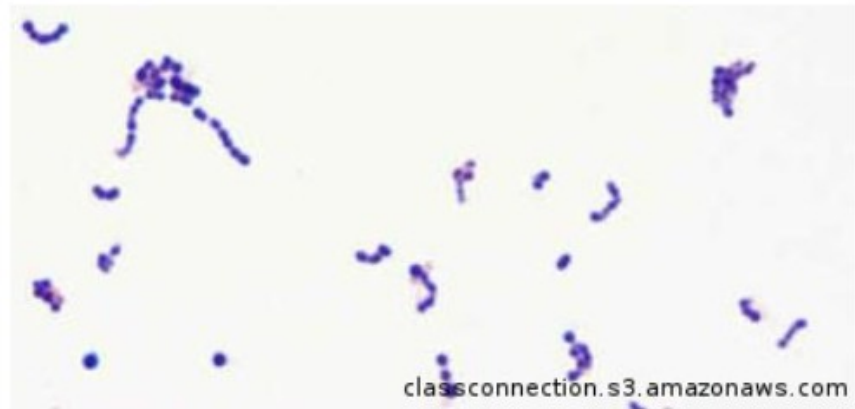




# Nesporulující anaeroby – G+ koky

---

- ▶ Rody *Peptococcus* a *Peptostreptococcus*
  - Běžná mikroflóra GIT a vagíny → infekce endogenního původu
  - Zánětlivé procesy v malé pánvi (poporodní endometritidy, ...), periodontitidy, abscesy (peritonsilární, plicní, ...), sinusitidy, otitidy, peritonitidy při proniknutí střevního obsahu



# Nesporulující anaeroby – G+ tyčinky

---

## ▶ Rod *Propionibacterium*

- tyčky kyjovitého tvaru morfoloicky podobné rodu *Corynebacterium*
- běžná mikroflóra dutiny ústní, GIT, urogen. traktu
- nejvýznamnější *Propionibacterium acnes* – produkuje lipázy → vznik a rozvoj akné
- izolován také z hemokultur při endokarditidách a sepsích

## ▶ Rod *Eubacterium*

- běžná mikroflóra dutiny ústní, GIT, urogen. traktu
- bakteriální vaginózy, smíšené anaerobní infekce

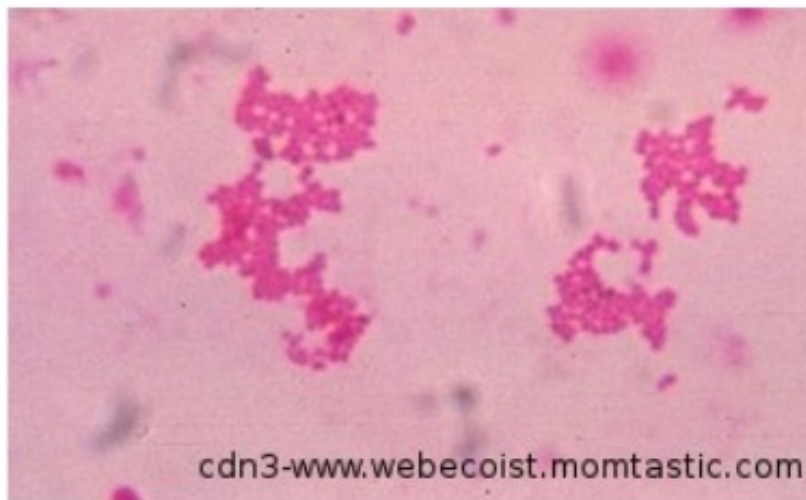


# Nesporulující anaeroby – G- koky

---

## ▶ Rod *Veillonella*

- běžná mikroflóra flóru dutiny ústní (součást zubního plaku), nosohltanu, GIT a urogen. traktu
- smíšené anaerobní infekce (zejména) ústní dutiny, výjimečně meningitidy, osteomyelitidy
- *Veillonella parvula* – původcem endokarditidy či sepse



# Nesporulující anaeroby – G- tyčinky

## (1)

---

- ▶ **Běžná mikroflóra lidského těla** (dutina ústní, nosohltan, GIT, urogen. trakt).
- ▶ Značně pleomorfní (obyčejně tyčky, ale i koky nebo vlákna), netvoří spóry, pestrá biochemická aktivita využití v diagnostice → **původci infekcí endogenního původu.**
- ▶ **Terapie:** ATB (klindamycin, linkomycin, metronidazol, chloramfenikol, peniciliny s inhibitory beta-laktamáz) většinou v kombinaci s chirurgickým výkonem.



# Nesporulující anaeroby – G- tyčinky

## (2)

---

### ▶ Rod ***Bacteroides***

- nejčastěji izolované z infekcí (dutina břišní, malá pánev, vagina, dutina ústní, ...)
- *Bacteroides fragilis*

### ▶ Rod ***Porphyromonas***

- infekce dutiny ústní (gingivitidy, gingivostomatitidy) a urogenitálního traktu
- *Porphyromonas gingivalis*

### ▶ Rod ***Prevotella***

- infekce HCD (anginy, sinusitidy)
  - *Prevotella melaninogenica*
- 



# Nesporulující anaeroby – G- tyčinky

## (3)

---

### ▶ Rod *Fusobacterium*

- polymorfní, až vřetenovitý tvar
- infekce chirurgických a traumatických ran, komplikují rány po kousnutí zvířetem, směsné kultury při pneumonii, hrudním empyému, intraabdominální infekci a abscesech
- *Fusobacterium nucleatum* (součást zubního plaku)
- *Fusobacterium necrophorum* (nekrotizující tonsilitida)

### ▶ Rod *Leptotrichia*

- součást ústní mikroflóry
  - *Leptotrichia buccalis* (orodentální infekce)
- 



# „Veillonova mikroflóra“

---

- ▶ Název pro skupinu anaerobních G+ a G– nesporelujících bakterií kolonizujících kůži a sliznice člověka.
- ▶ Není možné jednoznačně označit hlavního původce onemocnění.
- ▶ Za původce onemocnění se pokládají rovnoměrně všechny bakterie, kterých bývá izolován větší počet → za etiologického původce se pokládá celá tzv. **Veillonova flóra**.
- ▶ Součástí např. rody *Peptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Veillonella*, *Eubacterium*, *Propionibacterium*, *Fusobacterium*, *Bacteroides*, ...



# *Lactobacillus acidophilus*

---

- ▶ Nejvýznamnější zástupce rodu („Döderleinův bacil“)
  - ▶ G+ tyčky, často řetízkují, mikroaerofilní (ne anaerobní, nicméně rostou v nedokonalé anaerobióze běžných anaerostatů)
  - ▶ Běžná mikroflóra dutiny ústní, GIT, vaginy
  - ▶ Laktobacily využívají **sacharidy na laktát** → **snížení pH** → zastavuje množení hnilobných bakterií → (využití i v potravinářství)
  - ▶ **Utilizace glykogenu** (z rozpadajících se epitelů) ve vagině snížení pH brání usídlení patogenů → může způsobovat endokarditidy, novorozenecké meningitidy, endometritidy, abscesy, ...
- 





# Vztah bakterií ke kyslíku

Prostředí	Normální	↓ O <sub>2</sub>	↑ CO <sub>2</sub>	Bez O <sub>2</sub>
Striktní aeroby	ano	ano	ano	ne*
Fakultativ. anaeroby	ano	ano	ano	ano
Aerotolerantní bakt.				
Mikroaerofilní bakt.	ne	ano	(ano)	ne*
Kapnofilní bakterie	ne	(ano)	ano	ne*
Striktní anaeroby	ne	ne	ne	ano**

\* V praxi někdy vyrostou – běžně dosahovaná anaerobióza není dokonalá.

\*\* V praxi někdy nevyrostou – běžně dosahovaná anaerobióza není dokonalá. Takové bakterie (EOS – Extremely oxygen sensitive) běžně nelze kultivovat.

# Diagnostika anaerobů (1)

---

- ▶ **Mikroskopie:** barvíme podle Grama, rozlišujeme na koky a tyčky, G+ a G–; anaerobní tyčky pleomorfní (nacházíme i vláknité formy a koky), u spor sledujeme morfologii a uložení (světlolomné útvary, nikoliv jen ztlustění tyčky!)
- ▶ **Kultivace:** pevné půdy (anaerobióza pomocí anaerostatu či anaerobního boxu), tekuté půdy přelité parafinem (VL bujón, VL krevní agar a různé speciální půdy); většinou prodloužená kultivace na 2 dny až týden.
- ▶ **Biochemie:** většinou KAT– a OXI–, možné vzájemné rozlišení biochemicky a analýza plynů chromatografií.
- ▶ Antigenní analýza a nepřímý průkaz se v diagnostice anaerobů příliš nepoužívají.



## Diagnostika anaerobů (2)

---

- ▶ Přednost má tekutý vzorek, např. hnis, nejlépe zaslaný ve stříkačce s krytkou (po odstříknutí přebytečného vzduchu) – dříve doporučený postup, kdy se na stříkačce ponechala jehla a zabodla do gumové zátky se již z bezpečnostních důvodů nedoporučuje.
- ▶ **Výtěr zanořen v transportní půdě** (např. Amiesova půda).
- ▶ Lze domluvit s laboratoří naočkování vzorku přímo na půdy např. peroperačně.



# Kultivace anaerobů

---

- ▶ Často nepravidelné kolonie, někdy výběžkaté kolonie, někdy pigment.
- ▶ Typický **zápach – hnilobný.**
- ▶ VL krevní agar.
- ▶ **Docílení anaerobiózy:**
  - **Mechanicky:** překrytí VL bujónů parafínovým olejem
  - **Fyzikálně:** v anaerobním boxu se nahradí vzduch směsí anaerobních plynů vháněných z bomby
  - **Chemicky:** z organických kyselin tvoří vodík a oxid uhličitý  
→ na palladiovém katalyzátoru reaguje vodík a kyslík za vzniku vody → kyslík se tak spotřebovává



# Úkol č. 1 – Mikroskopie

---

- ▶ **1a)** Prohlídka klinického vzorku (popište směs patogenů, leukocyty, epitelie, atd.)
- ▶ **1b)** Mikroskopie podezřelých kmenů (rozlište G+ a G– koky a tyčky, pokuste se najít spóry)
  - Obarvěte podle Grama 12 podezřelých kmenů (pro zopakování: natřít → nechat uschnout → fixovat plamenem → poté barvit: Gram 30 s → Lugol 20-30 s → **opláchnout vodou** → alkohol 15-20 s → opláchnout vodou → safranin 60 → opláchnout vodou → **osušit filtračním papírem (nedrhnout buničinou ani ničím jiným!)** → imerzní objektiv - olej)



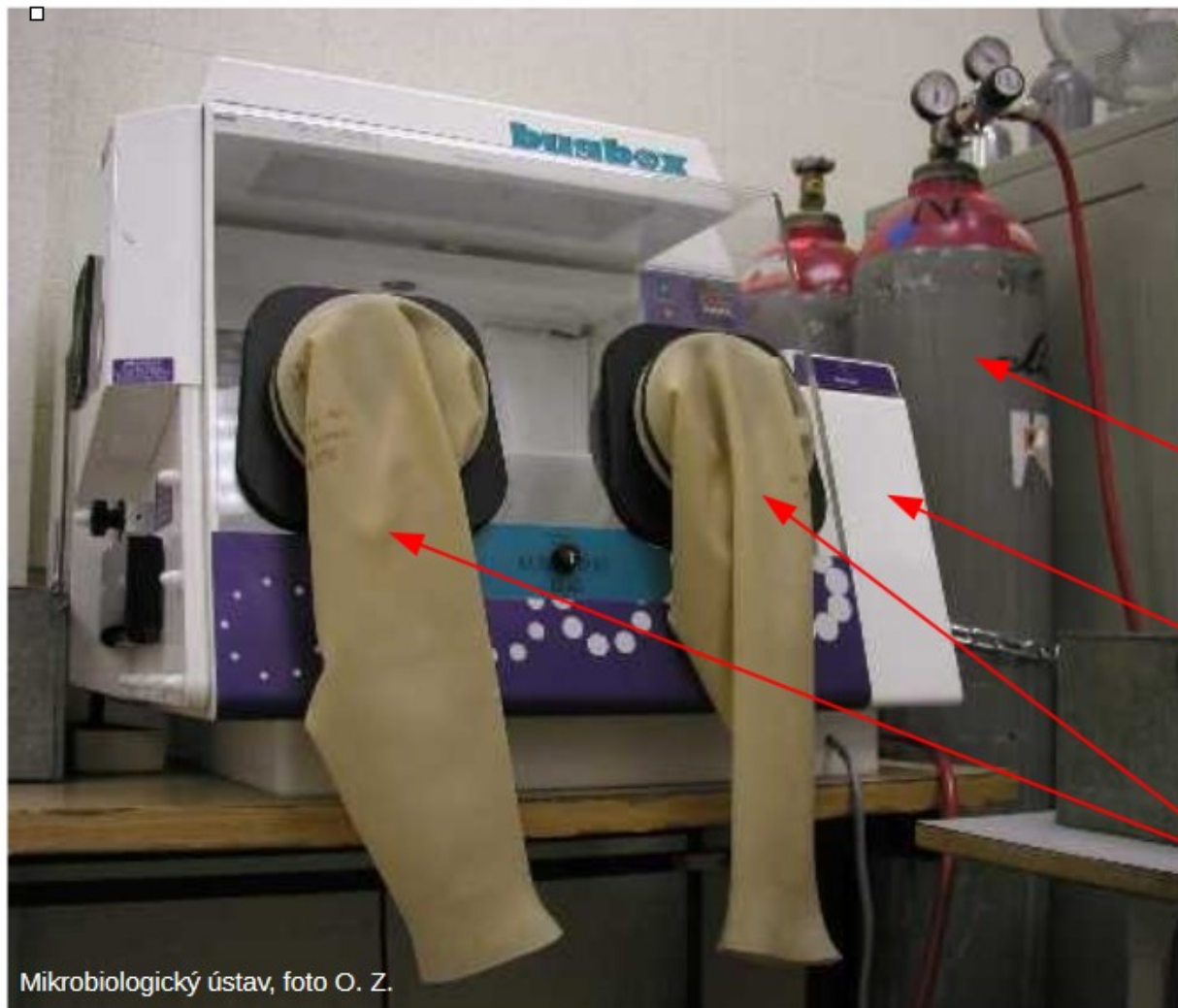
# Úkol č. 2 – Anaerostat a anaerobní box

---

- ▶ Popište!



# Anaerobní box



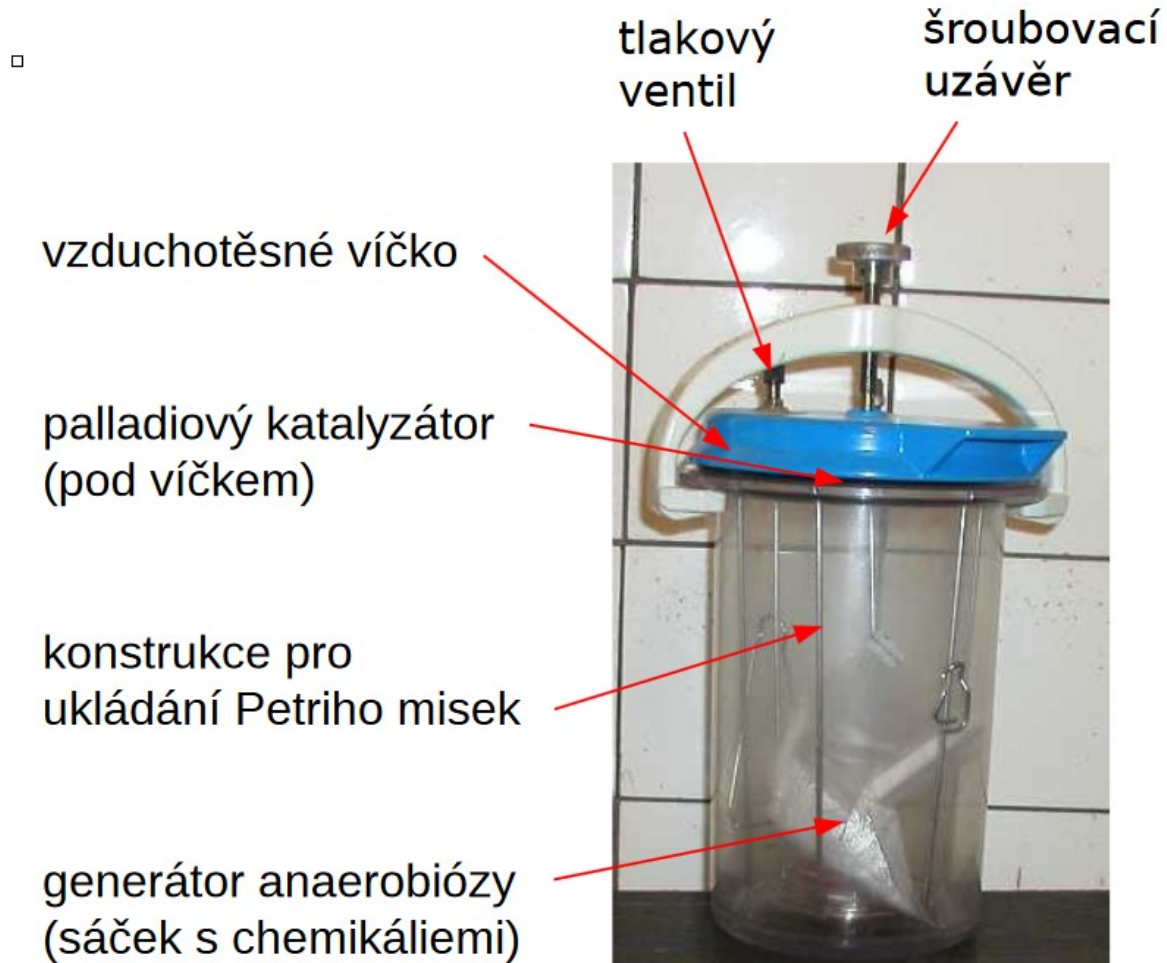
**zdroj anaerobních plynů**

**prostor pro vkládání misek**

**vstupy pro ruce personálu**

# Anaerostat

---





# Úkol č. 3 – Kultivace na agarových půdách

---


- ▶ Popište kultivační výsledky daných kmenů na aerobních i anaerobních půdách.
- ▶ Popište morfologii kolonií.



# Úkol č. 4 – Biochemická diagnostika anaerobů

---

## ANAEROTest 23

- ▶ Výsledky sloupců „B“ a „A“ se při výpočtu kódu nezapočítávají, získáte tedy šestimístný kód za sloupce H až C.
  - ▶ U druhého z kmenů vyjdou dvě možnosti výsledku.
  - ▶ Předpokládejte, že tento kmen byl již testován na citlivost na penicilin a byl shledán citlivým → **nejde tedy o zástupce** (primárně na penicilin resistantního) **rodu *Bacteroides***.
- 
- 

# Úkol č. 5 – Citlivost anaerobů na ATB

---

- ▶ **Lék volby:** penicilin (rezistentní je však rod *Bacteroides*, v užším slova smyslu – rody *Prevotella* a *Porphyromonas*, které se z něj kdysi odštěpily, jsou citlivé).
- ▶ E-test
- ▶ Odečtete hodnotu MIC a určete, zda je daný kmen citlivý nebo rezistentní (odečítá se v místě, kde se kříží okraj zóny s testovacím proužkem).



# Úkol č. 6a – Průkaz toxinu (lecitinázy) u *C. perfringens* (1)

- ▶ *Clostridium perfringens* tvoří specifickou lecitinázu, jež je možno neutralizovat specifickou protilátkou.
- ▶ Polovina misky je potřena protilátkou (anti-lecitinázou), druhá potřena není.
- ▶ Toxický efekt lecitinázy spatříte jako oblast precipitace kolem kmene na žloutkovém agaru.

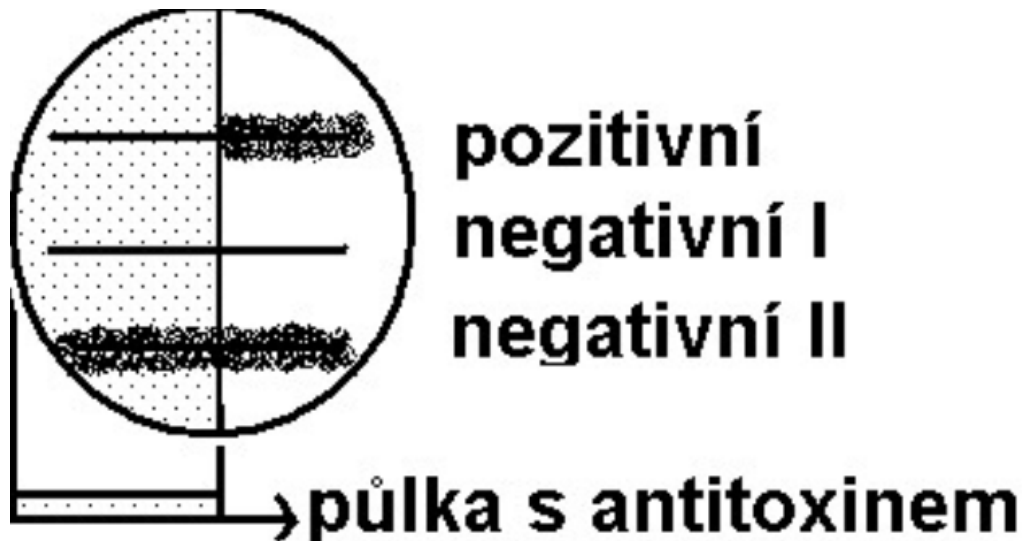
- **pravý toxin je neutralizován antitoxinem, jiné lecitinázy neutralizovány nejsou**



# Úkol č. 6a – Průkaz toxinu (lecitinázy) u *C. perfringens* (2)

---

- ▶ Pravý toxin je neutralizován antitoxinem, jiné lecitinázy neutralizovány nejsou.
- ▶ „Negativní I“ vůbec neprodukuje lecitinázu.
- ▶ „Negativní II“ produkuje, ale nějakou jinou, než nás zajímá.

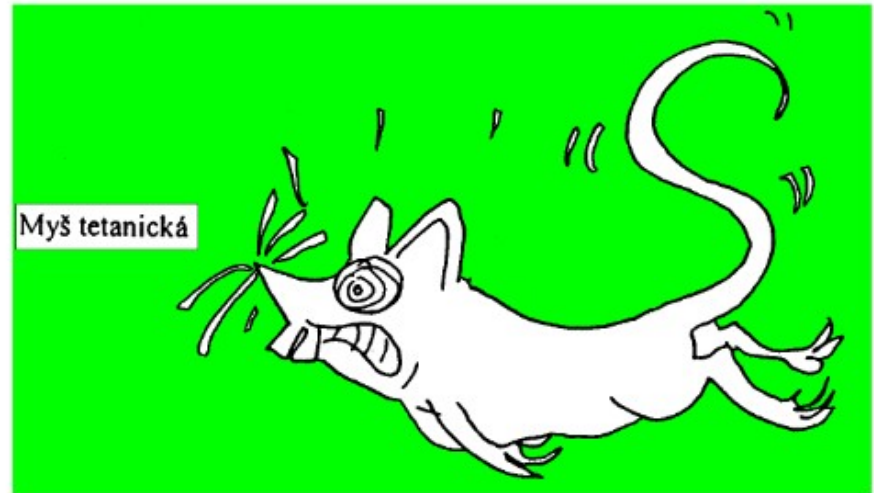


# Úkol č. 6b – Průkaz toxinu u *C. tetani*

- ▶ Průkaz toxinu *Clostridium tetani* se provádí očkováním tetanické myši.
- ▶ Typická je pozice ocásku a končetin (zakreslete).



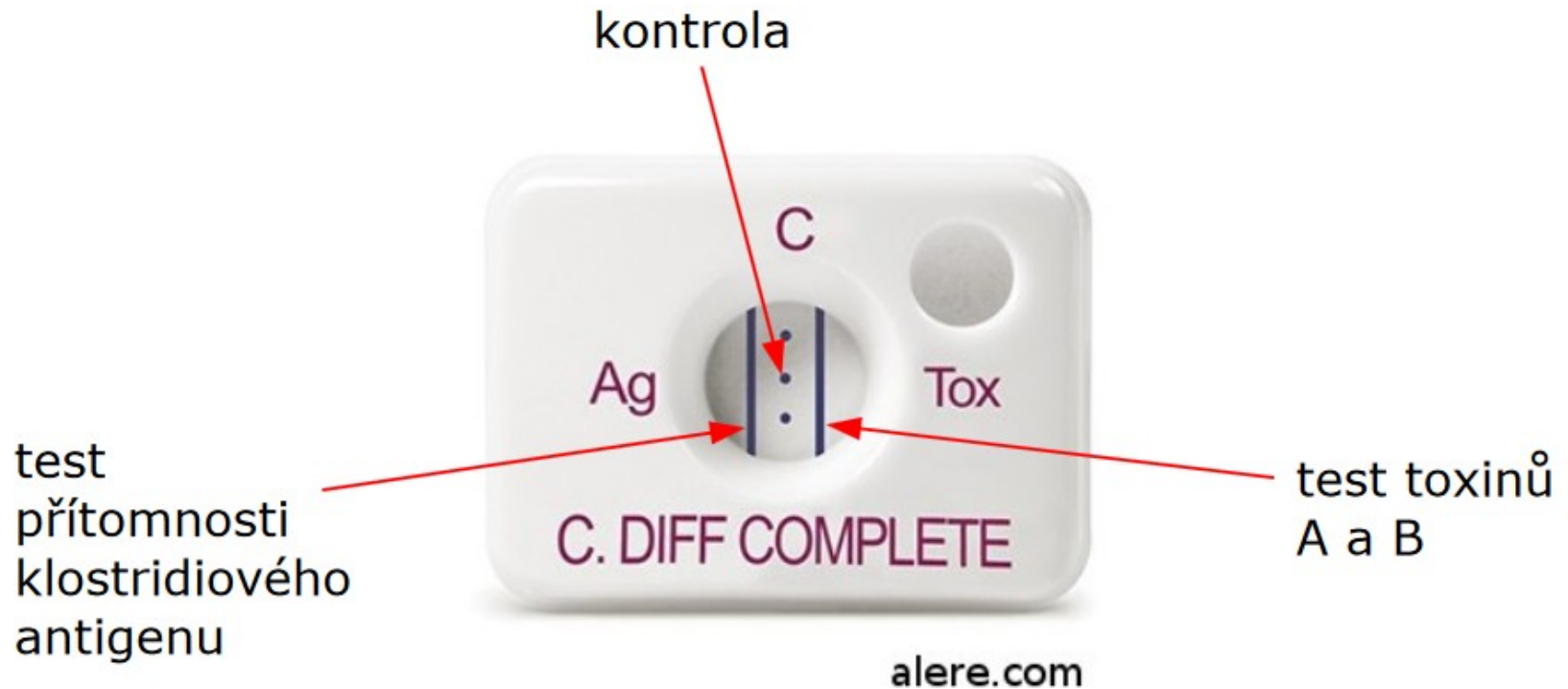
microvet.arizona.edu



Obrázek Petra Ondrovčika (graficky upraveno)

# Úkol č. 6c – Detekce toxinů A a B *C. difficile*

- ▶ Odečtěte imunochromatografické testy tří pacientů.



# Po tomto cvičení byste měli znát:

---

- ▶ Hlavní zástupce rodu *Clostridium*, jejich diagnostika a klinický význam.
- ▶ Nesporulující anaerobní G+/G- tyčinky/koky.

