

**P07**

# **Diagnostika anaerobních bakterií**

# Osnova

- rod *Clostridium*
- přehled nejběžnějších druhů nesporulujících anaerobů
- diagnostika anaerobů
- anaerobióza
- úkoly

# Rod *Clostridium*

- **G+ tyčky, anaerobní, spóry** (oválné či kulaté endospory vyklenující buňku)
- kvůli správné funkci některých enzymů **vyžadují k růstu nižší redoxní potenciál** (snížení cysteinem, thioglykolátem apod.)
- **některé druhy tolerují malá množství kyslíku** (enzymy superoxiddismutáza, peroxidáza, kataláza)
- **saprofyté v půdě** (hnilobné procesy) a **ve vodě, součástí normální mikroflóry** člověka i živočichů
- k rozšíření napomáhá **tvorba vysoce odolných endospor** (přítomny v půdě, vodě, prachu → kontaminace potravin)
- **čím kratší inkubační doba, tím horší prognóza**

# *Clostridium tetani*

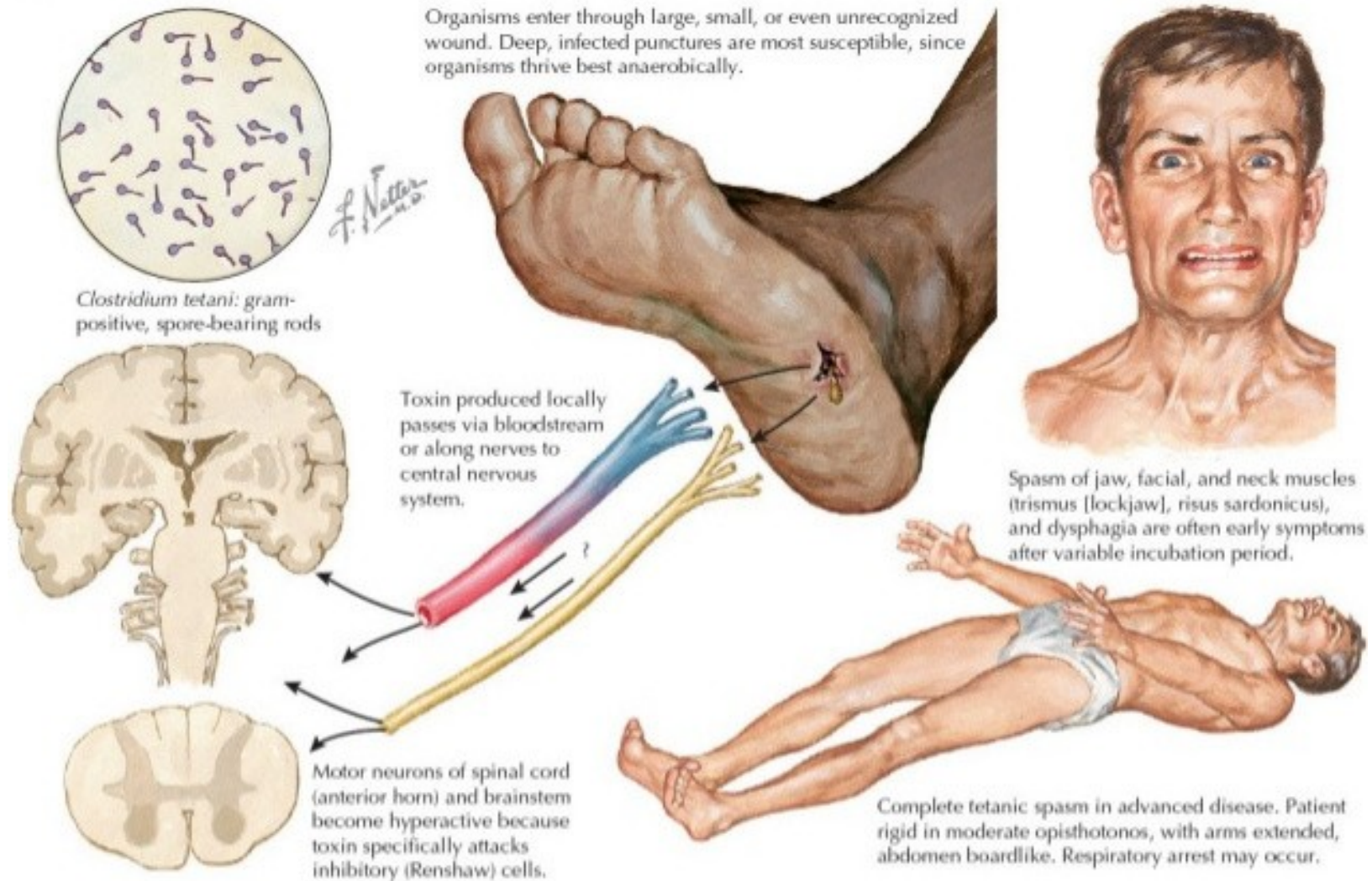
- **G+ tyčka**, anaerobní, rovné, štíhlé, **terminální endospora** („paličky na buben“)
- saprofyt savců (zejména koní)
- **původce tetanu** (vstupní branou obvykle **hlubší znečištěné rány**, méně často popáleniny, vředy apod.)
- **pro klíčení spor nutné anaerobní prostředí** (zhmožděné a ischemické okolí rány, hnisavé procesy, cizí těleso v ráně)
- **za projevy infekce zodpovědný tetanický toxin**
- **závažnost klinických projevů závislá na množství produkovaného neurotoxinu**
- **očkování součástí hexavakcíny, přeočkování jednou za 10 – 15 let**



# *Clostridium tetani* (2)

- **tetanus – patofyziologie:**
  - **tetanospasmin proniká do neuronu → poškození exkretčního aparátu neuronů → zábrana uvolňování inhibičních mediátorů (GABA, glycin) → zablokována normální inhibice motorických neuronů → snížení prahu dráždivosti motorických neuronů → tonické křeče** příčně pruhovaného svalstva
- **tetanus – klinické příznaky:**
  - **tonické křeče** (při plném vědomí) žvýkacích svalů (**trismus**), mimických svalů (**risus sardonius**), svalů laryngu a krku, svalů trupu (**opisthonus**), **dýchacích svalů** (vede k udušení)
  - zvýšené pocení a teplota, komplikace (zlomeniny, ...)

# *Clostridium tetani* (3)



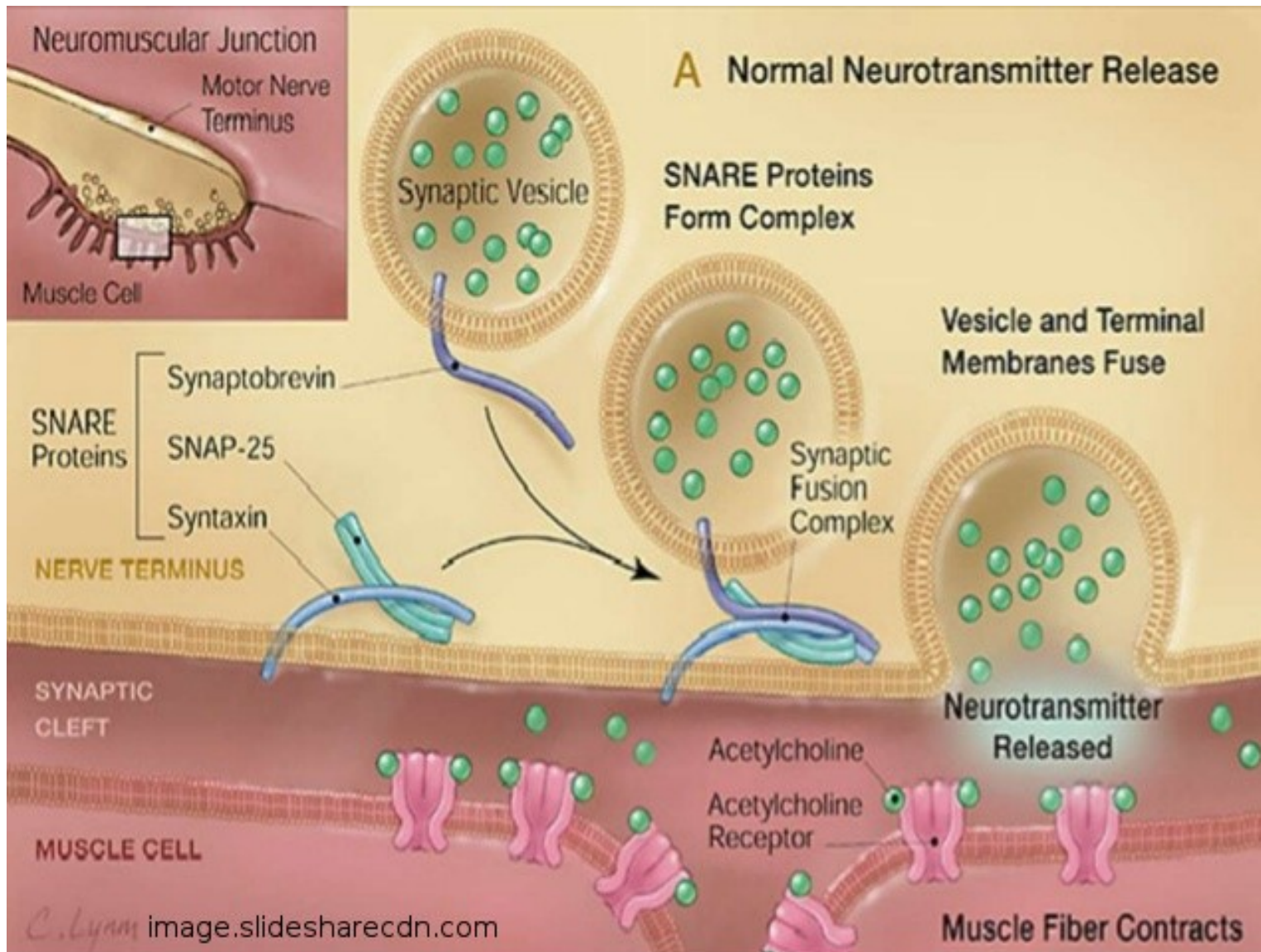
# *Clostridium botulinum*



- **G+ tyčka**, anaerobní, rovné, velké, **oválná subterminální endospora**
- **komenzál ve střevech zvířat → ve vodě, půdě, ...**
- **tvoří botulotoxin → otravy potravinami kontaminovanými sporami** (nedostatečně sterilizované masové a zeleninové konzervy; 100 °C 10–15 minut)
- **botulotoxin je endopeptidáza → hydrolýza proteinů zodpovědných za transport vezikul s acetylcholinem → inhibice uvolňování acetylcholinu → paralýza příčně pruhovaných svalů**
- využití v kosmetice (botox)

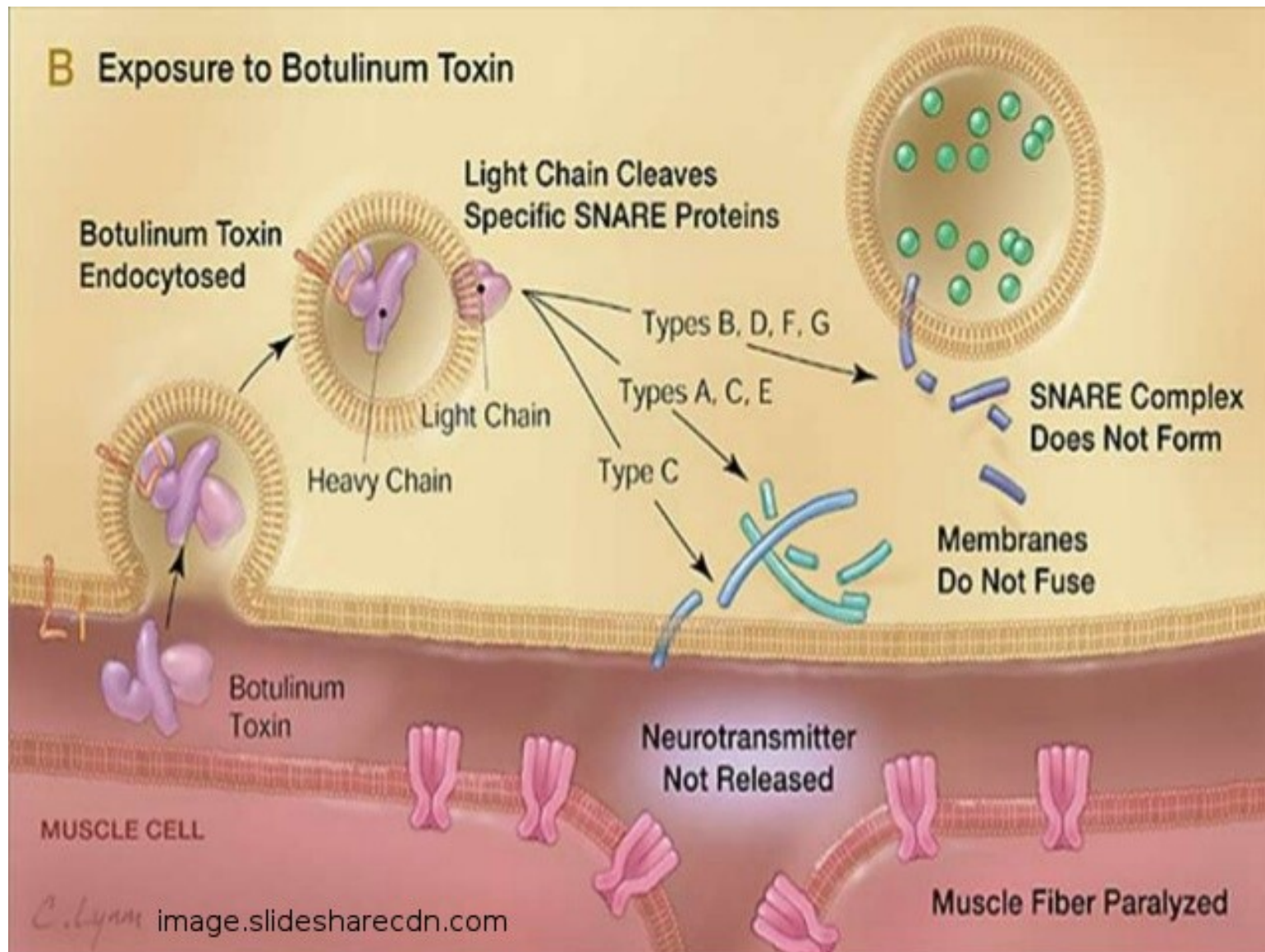


# *Clostridium botulinum* (2)





# *Clostridium botulinum* (3)



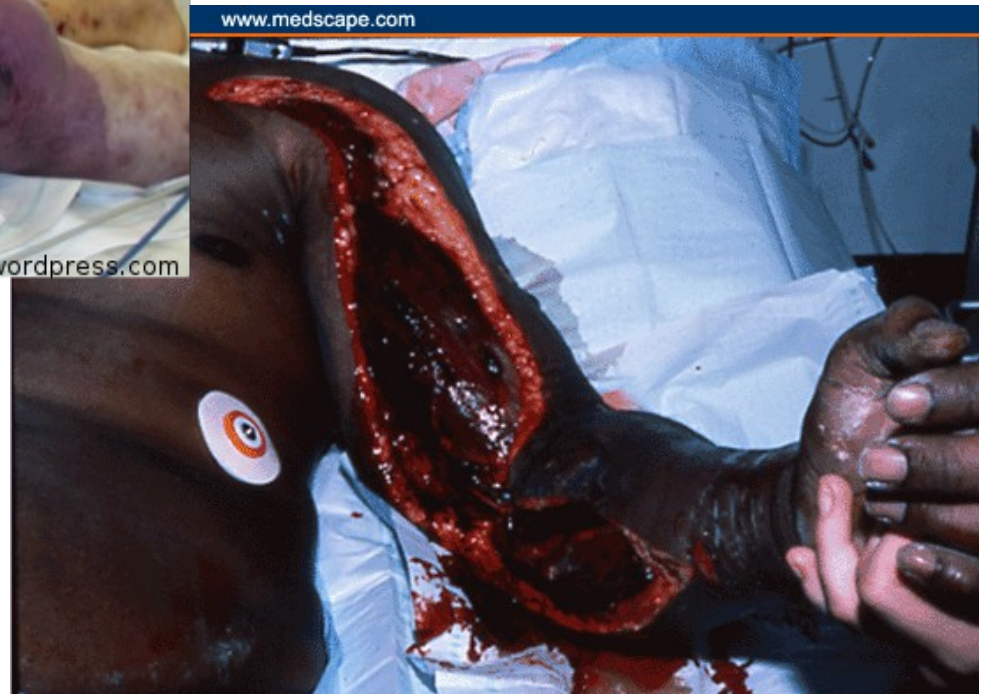
# *Clostridium botulinum* (4)

- **formy botulismu:**
  - **alimentární botulismus:**
    - **požití toxinu v potravě** (mikrob samotný není v těle přítomen)
    - nevolnost, zvracení, bolesti břicha, pokles očního víčka (ptóza), rozšíření zornic (mydriáza), ztížené polykání, zácpa, zástava močení, symetrické sestupné paralýzy, ochrnutí dýchacích svalů
    - 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**
- celková stabilizace pacienta, chirurgické ošetření ran, ATB, léčba kyslíkem v hyperbarické komoře

# Plynatá sněť

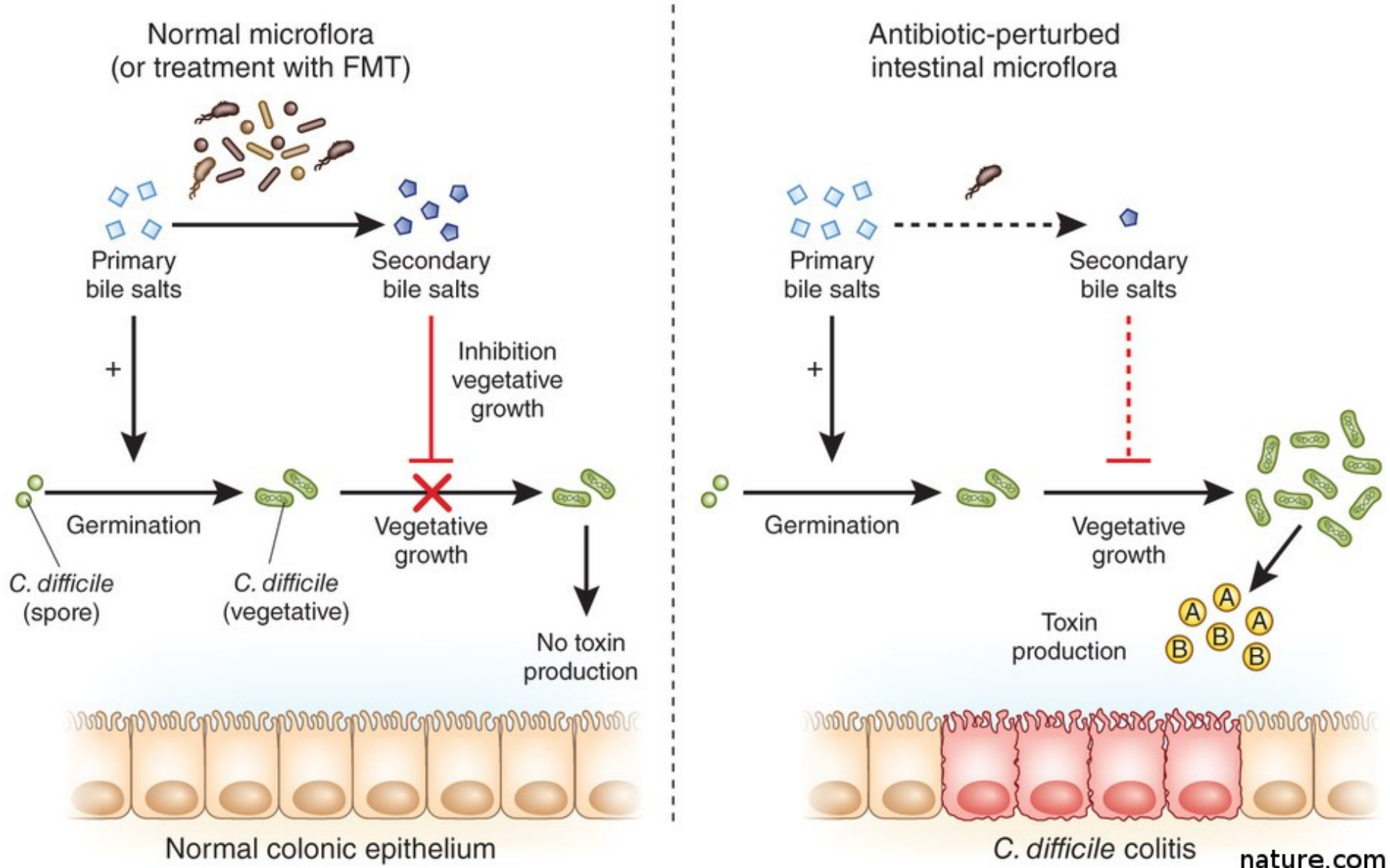


# *Clostridium difficile*

- **přítomno ve střevech** (5 % zdravých dospělých, více u dětí a kojenců)
- **způsobuje** lehčí průjmy, ale i **pseudomembranózní kolitidu**
- **onemocnění často nozokomiálního původu (po podání antibiotik)**
  - především klindamycin, širokospektré peniciliny (amoxicilin+klavulanát) a cefalosporiny (cefoxitin)
  - tato ATB **eliminují normální střevní mikroflóru** → **přemnožení *C. difficile*** (rezistentní)
  - léčba **metronidazol, vankomycin per os, fekální transplantace** (FMT – fecal microbiota transplantation)



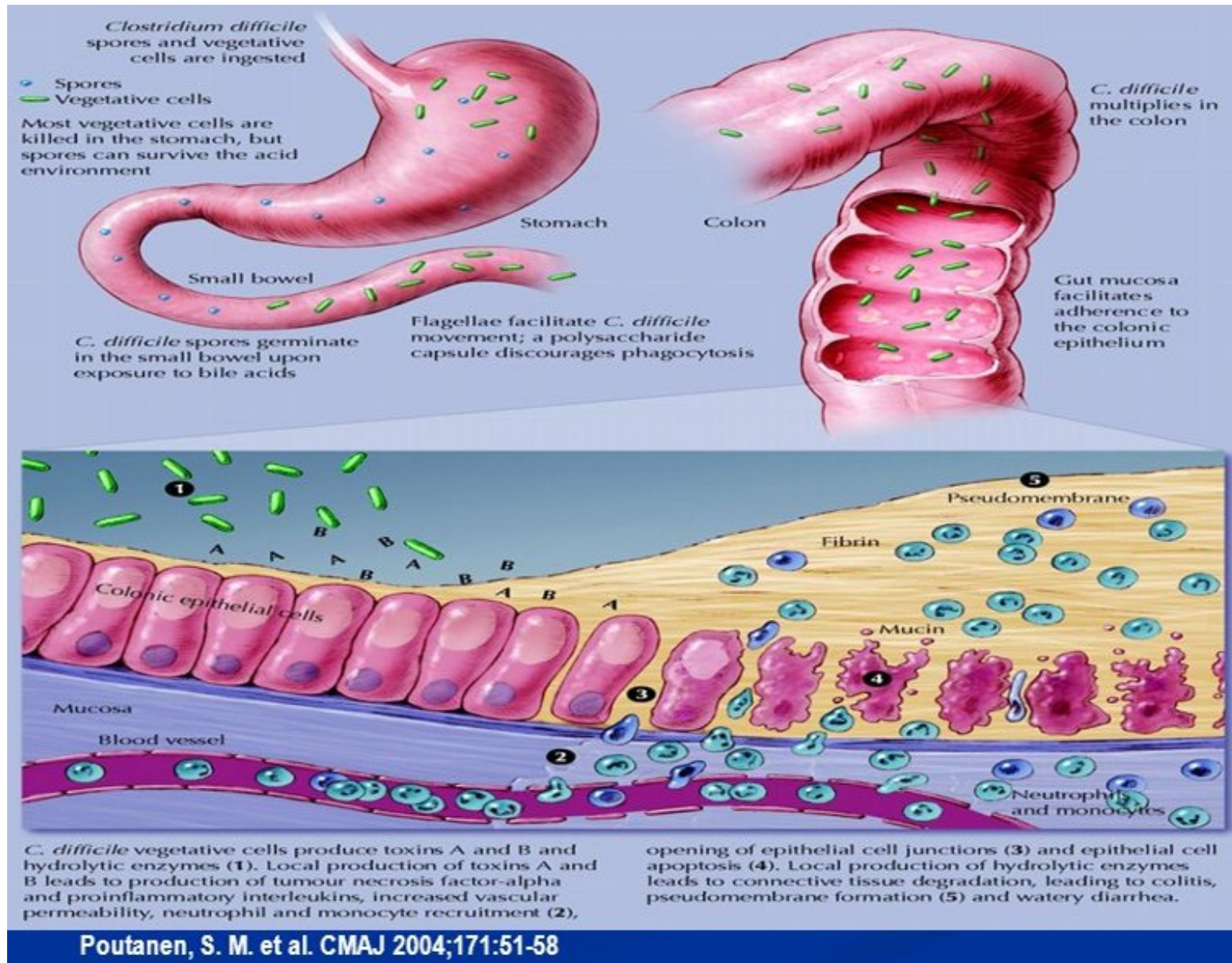
# *Clostridium difficile* (2)



nature.com



# Clostridium difficile (3)



# 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

# Přehled nejběžnějších druhů nesporelujících anaerobů

	<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> **

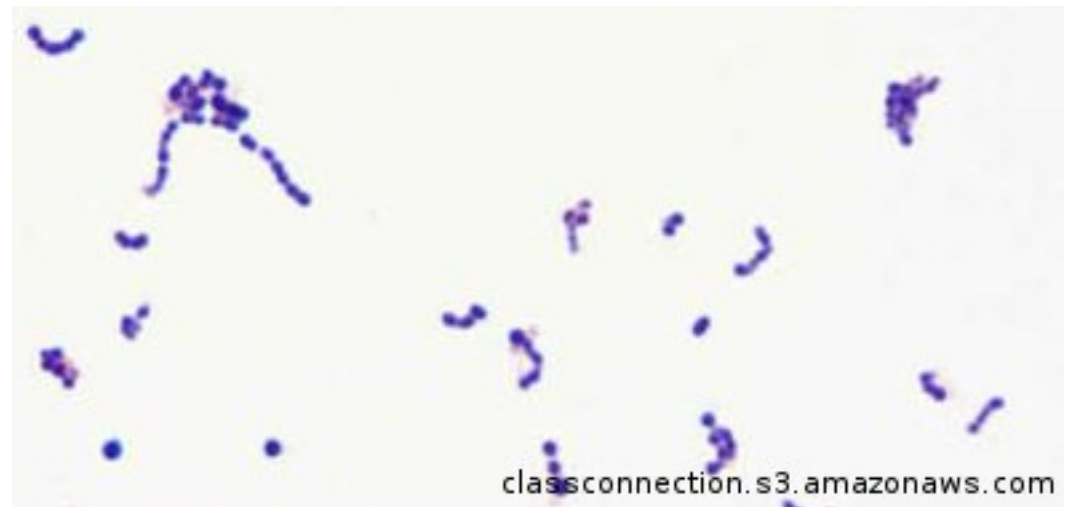
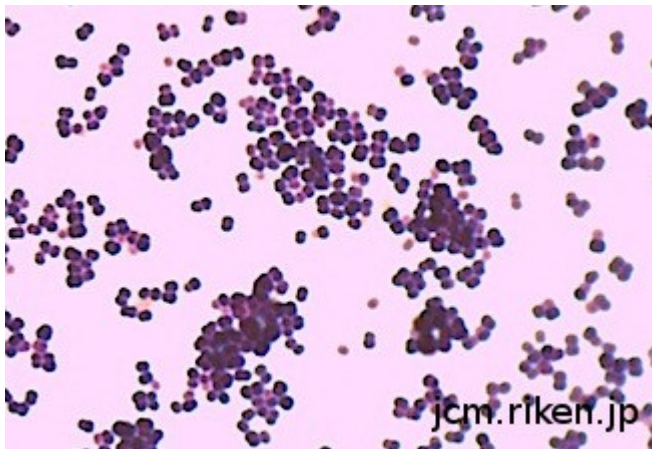
\* tyčky se zašpičatělými konci

\*\* tyčky s rovnými konci

\*\*\* není obligátní anaerob

# Nesporulující anaerobní G+ koky

- rody *Peptococcus* a *Peptostreptococcus*
  - běžná mikroflóra GIT a vaginy → infekce endogenního původu
  - **zánětlivé procesy** v malé pánvi (poporodní endometritidy, ...), periodontitidy, **abscesy** (peritonsilární, plicní, ...), sinusitidy, otitidy, peritonitidy při proniknutí střevního obsahu do dutiny břišní

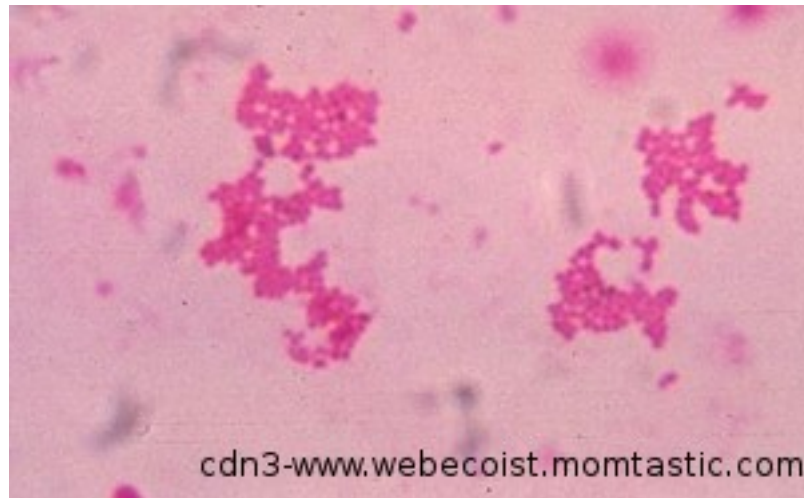


# Nesporulující anaerobní G+ tyčky

- rod ***Propionibacterium***
  - tyčky kyjovitého tvaru morfologicky podobné rodu *Corynebacterium*
  - běžná mikroflóra dutiny ústní, GIT, urogen. traktu
  - nejvýznamnější ***Propionibacterium acnes***
  - produkuje lipázy → **vznik a rozvoj akné**
  - izolován i z hemokultur při endokarditidách a sepsích
- rod ***Eubacterium***
  - běžná mikroflóra dutiny ústní, GIT, urogen. traktu
  - bakteriální vaginózy, smíšené anaerobní infekce

# Nesporulující anaerobní 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 **sepsy**





# Nesporulující anaerobní G- tyčky

- **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 anaerobní G- tyčky (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 anaerobní G- tyčky (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 flóra“

- **název pro skupinu anaerobních G+ a G- nesporulujících 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 v **řetízcích**, **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 epitelii) **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.	ano	ano	ano	ano
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

- **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 ztluštění 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

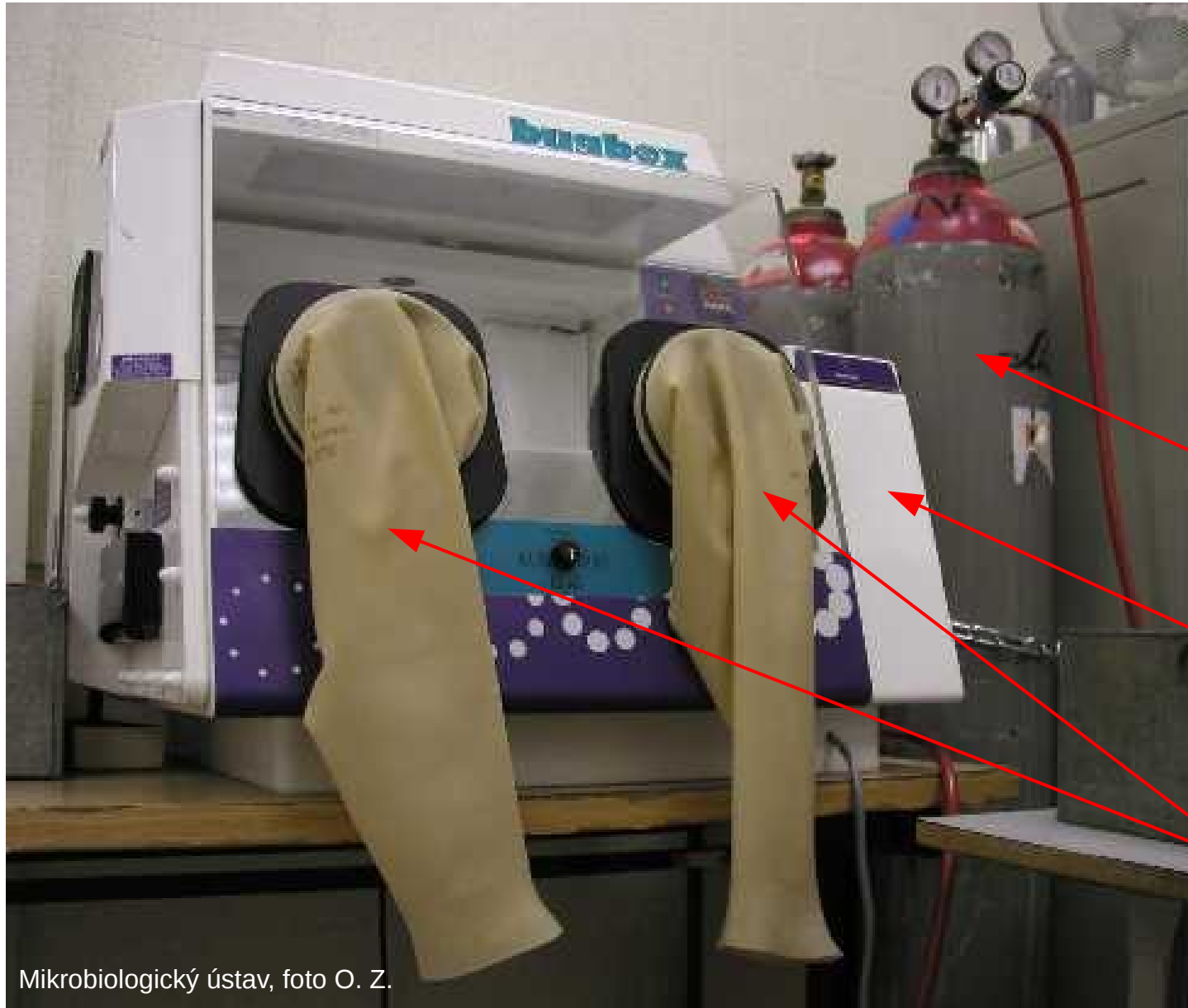
# Diagnostika anaerobů (2)

- 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 anaerobních bakterií

- rostou často v **nepravidelných koloniích**, někdy **výběžkaté okraje**, někdy **pigment**
- typický je pro ně **značný (hnilobný) zápach**
- pro kultivaci anaerobů používáme **VL krevní agar**
- **získávání anaerobiózy:**
  - **mechanicky:** VL bujony přelijeme parafinovým olejem
  - **fyzikálně:** v anaerobním boxu se nahradí vzduch směsí anaerobních plynů, vháněných z bomby
  - **chemicky:** z organických kyselin tvoří  $H_2$  a  $CO_2$  → na palladiovém katalyzátoru reaguje  $H_2$  s  $O_2$  za vzniku vody →  $O_2$  se spotřebovává

# Anaerobní box



**zdroj anaerobních plynů**

**prostor pro vkládání misek**

**vstupy pro ruce personálu**

# Anaerostat

tlakový ventil

šroubovací uzávěr

vzduchotěsné víčko

palladiový katalyzátor  
(pod víčkem)

konstrukce pro  
ukládání Petriho misek

generátor anaerobiózy  
(sáček s chemikáliemi)



# Úkol 1: Mikroskopie klinického vzorku a mikroskopie kmene

- **úkol 1a: Prohlídka klinického vzorku** (popište směs patogenů, leukocyty, epitelie, atd.)
- **úkol 1b: Mikroskopie podezřelých kmenů** (rozlište G+ a G- koky a tyčky, **pokuste se najít spóry**)

# Úkol 2: Anaerostat a anaerobní box

- **popište anaerostat a anaerobní box podle obrázku z prezentace**



# Úkol 3: Kultivace na agarových půdách

- **popište kultivační výsledky** daných kmenů na aerobních i anaerobních půdách
- **popište morfolologii kolonií**

# Úkol 4: Druhová diagnostika anaerobů biochemickými testy

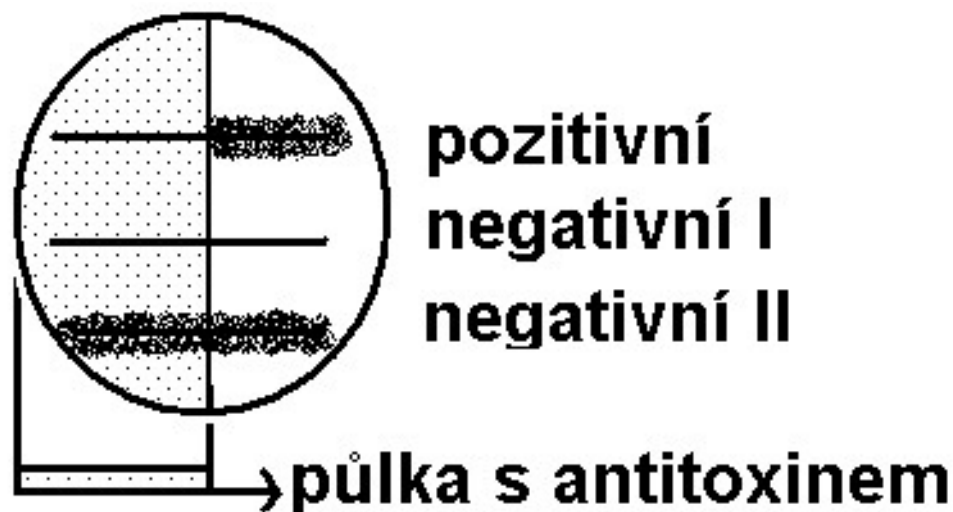
- odečtěte ANAEROtest 23
- výsledky sloupců „B“ a „A“ se při výpočtu kódu nezapočítávají, získáte tedy šestimístný kód za sloupce H až C
- u druhého z kmenů vyjdou dvě možnosti výsledku
- předpokládejte, že tento kmen byl již testován na citlivost na **penicilin** a byl shledán **citlivým** → nejde tedy o zástupce (primárně na penicilin resistantního) rodu *Bacteroides*

# Úkol 5: Citlivost anaerobů na antibiotika

- **lékem volby** u většiny anaerobů **penicilin**
- **rezistentní je však rod *Bacteroides*** (v užším slova smyslu – rody *Prevotella* a *Porphyromonas*, které se z něj kdysi odštěpily, jsou citlivé)
- antibiotická citlivost se u anaerobů dříve prováděla difusním diskovým testem (nikoli na MH, ale na VL krevním agaru)
- **nyní se ale zpravidla používá 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)

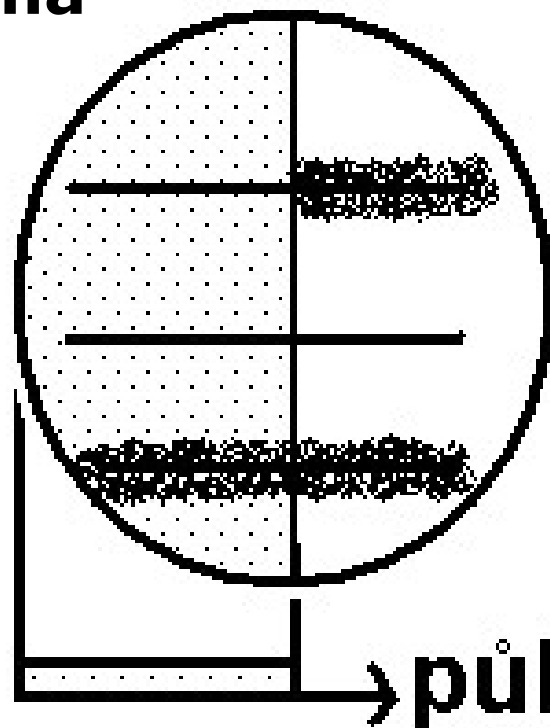
# Úkol 6a: Průkaz toxinu (lecitinázy) *Clostridium perfringens*

- *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 6a: Průkaz toxinu (lecitinázy) *Clostridium perfringens*

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



pozitivní  
negativní I  
negativní II

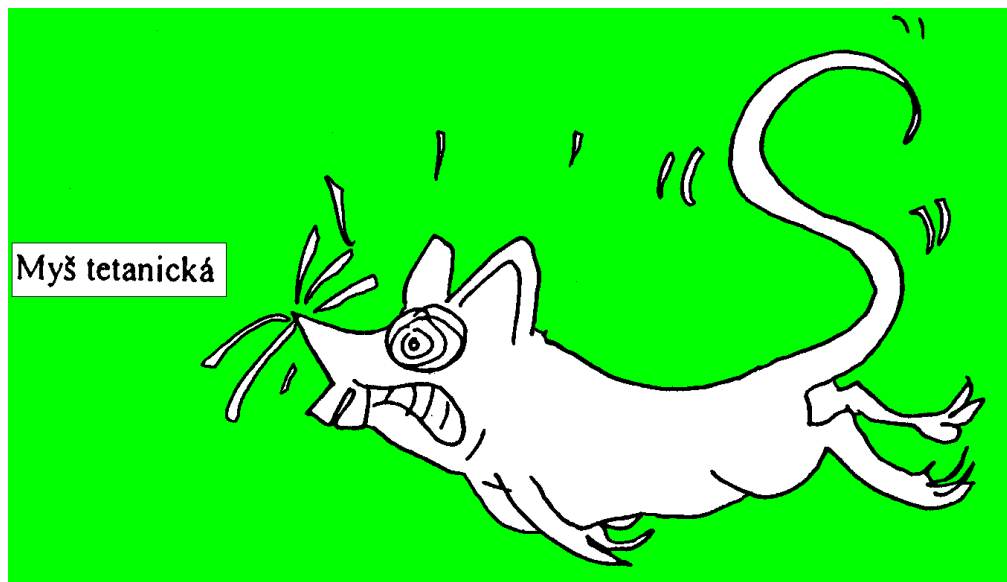
→ půlka s antitoxinem

# Úkol 6b: Průkaz toxinu *Clostridium tetani*

- průkaz toxinu *Clostridium tetani* se provádí očkováním tetanické myš
- typická je pozice ocásku a končetin (zakreslete)



microvet.arizona.edu

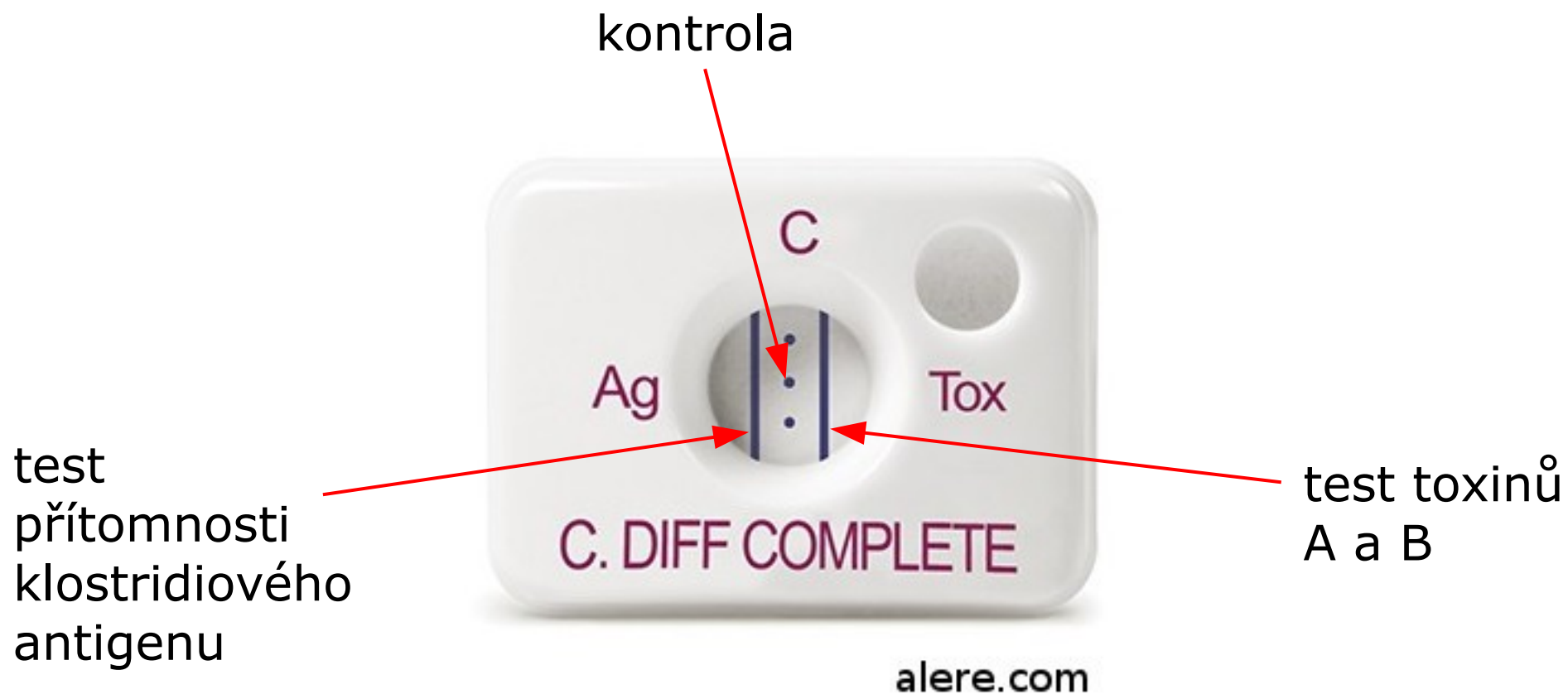


Obrázek Petra Ondrovčíka (graficky upraveno)



# Úkol 6c: Detekce A a B toxinů *Clostridium difficile*

- odečtete imunochromatografické testy tří pacientů



# Po tomto cvičení byste měli umět:

- popsat hlavní zástupce rodu *Clostridium*, včetně testů, které slouží pro jejich identifikaci, popř. identifikaci jejich toxinů
- popsat nejběžnější druhy nesporelujících anaerobů, jejich diagnostiku a obvyklou léčbu
- popsat základy anaerobní kultivace a možnosti získání anaerobiózy