

# Anaerobní bakterie

Ivana Vítková

Masarykova univerzita

Katedra laboratorních metod



# Co jsou to anaerobní bakterie?

- Bakterie neschopné růstu za přítomnosti kyslíku
- „striktní“ anaeroby rostou na pevných půdách jen v prostředí do 0,5% kyslíku
- „umírněné“ anaeroby... do 2-8% kyslíku

# Rozdělení anaerobů

- **G- tyčinky**

*Bacteroides*

*Prevotella*

*Fusobacterium*

*Porphyromonas*

- **G- koky**

*Veillonella*

- **G+ sporulující tyčinky**

*Clostridium*

- **G+ nesporulující tyčinky**

*Actinomyces*

*Propionibacterium*

*Bifidobacterium*

*Eubacterium*

*Lactobacillus*

- **G+ koky**

*Peptostreptococcus*

*Peptococcus*

# Význam anaerobních bakterií

- Původci infekcí člověka
- Součást fyziologické flóry člověka (prevence kolonizace sliznic patogenní florou, stimulace imunitního systému, syntéza vitamínu K)

# Anaeroby jako fyziologická flóra

- Nosohltan: *Peptostreptococcus*,  
*Bacteroides*, *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Porfyromonas*, ..
- Dutina ústní (zubní plak, gingivální štěrbiny): viz nosohltan, navíc *Lactobacillus*, *Actinomyces*,..
- Tlusté střevo: nejvýznamnější rezervoár anaerobů v lidském těle,  $10^{11}$  anaerobních bakterií/ 1 g stolice  
*Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Bacteroides*,  
*Peptostreptococcus*,..

# Anaeroby jako fyziologická flóra

- **Vagina:** *Lactobacillus* (ženy ve fertilním věku),  
*Bacteroides*, *Prevotella*, *Actinomyces*,..
- **Distální úsek močové trubice:** *viz vagina*
- **Kůže** (mazové žlázy, vlasové folikuly):  
*Propionibacterium acnes*

# Vznik anaerobních infekcí

- Nejčastěji z endogenní flory člověka
- Vzácněji z exogenního zdroje:
  - Posttraumatické klostridiové infekce
  - Po kousnutí zvířetem
  - Otravy z potravin (*Clostridium botulini*, *Clostridium perfringens*)
  - Nozokomiální infekce (*Clostridium difficile*)

# Typy anaerobních infekcí

- **Infekce kůže a měkkých tkání:** kožní abscesy, zánět potních žláz, celulitida, flegmóna, klostridiová nekrotizující fasciitida, myonekróza, infekce dekubitů
- **Infekce v oblasti hlavy a krku:** absces mozku, infekce středního ucha a paranazálních dutin, mastoiditis, odontogenní infekce, submandibulární flegmona, nekrotizující tonzilitida, retrofaryngeální abscesy, aktinomykosa



# Typy anaerobních infekcí- gingivitis, dacryocystitis



Figure 1 - Clinical aspect at presentation. Note non axial proptosis and chemosis.

# Typy anaerobních infekcí

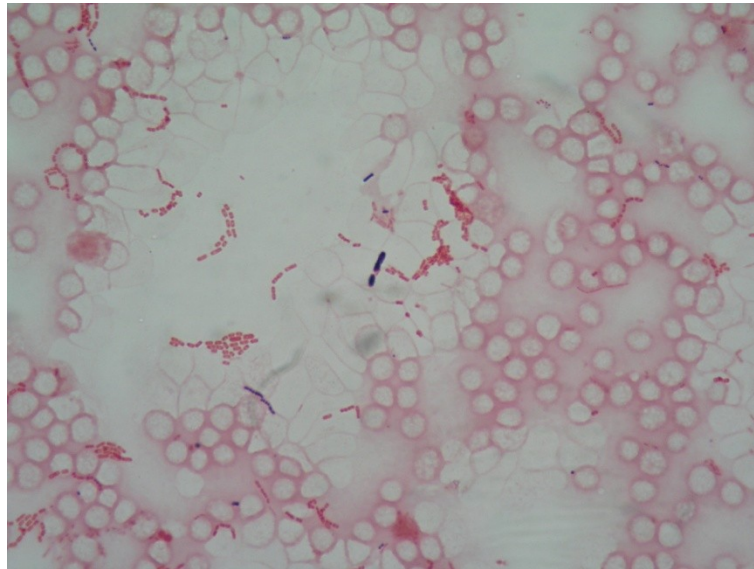
- **Infekce v oblasti hrudníku:** aspirační pneumonie, plicní absces, empyém hrudníku, mediastinitida (zánět mezihrudí), aktinomykosa
- **Nitrobřišní infekce:** cholecystitida, appendicitida, divertikulitida, peritonitida, jaterní absces, aktinomykosa
- **Urogenitální infekce:** septický potrat, aktinomykosa, endometritis

# Laboratorní diagnostika anaerobních infekcí

- **Validní vzorek:** tekutý materiál nejlépe v injekční stříkačce bez vzduchového sloupce s jehlou zapíchnutou v gumové zátce, kousky tkání, nitroděložní tělísko, anaerobní hemokultury
- Rychlý transport vzorku + správně vyplněná žádanka

# Laboratorní diagnostika anaerobních infekcí

- Zhotovení mikroskopického preparátu, Gramovo barvení
- Rychlá informace pro klinika - zhodnocení mikroskopického preparátu a doporučení antibiotické terapie



# Laboratorní diagnostika anaerobních infekcí

- Kultivace
- anaerobní atmosféra (10% CO<sup>2</sup> , 80% N, 10% H) – použití anaerobního boxu nebo anaerostatů
- kultivace 48 hodin a více
- půdy: obohacený krevní agar (např. VL agar, Wilkins-Chalgren agar), bujón (např. Schaedler anaerobní bujon)
- anaerobní hemokultury

# Laboratorní diagnostika anaerobních infekcí - kultivace anaerobní box





# Laboratorní diagnostika anaerobních infekcí – kultivace anaerostat



# Identifikace anaerobních bakterií

- Makroskopická morfologie kolonií
- Mikroskopická morfologie bakterií a barvitelnost dle Grama
- Diagnostické antibiotické disky: Kanamycin, Colistin, Vankomycin
- Biochemické diagnostické sady
- MALDI TOF





# Průkaz toxinů anaerobních mikrobů

- Průkaz toxinů *Clostridium difficile*
- Průkaz toxinů *Clostridium perfringens*
- Průkaz toxinu *Clostridium botulinum*

# Testování citlivosti k antibiotikům

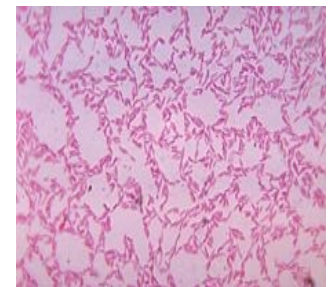
- Disková metoda
- Stanovení MIC (minimální inhibiční koncentrace) – pomocí E-testu



- Antibiotika používaná k terapii:  
penicilin, aminopenicilin s inhibitorem, metronidazol, klindamycin,  
chloramfenikol, meropenem

# Gramnegativní anaerobní tyčinky

- Většina součástí běžné mikroflóry člověka
- Potenciální původci endogenních infekcí
- Netvoří spory
- Pleomorfnní gram – tyčinky
- Kultivace 3 - 5 dní
- Patogenita – podmíněná, infekce endogenního původu (abscesy)



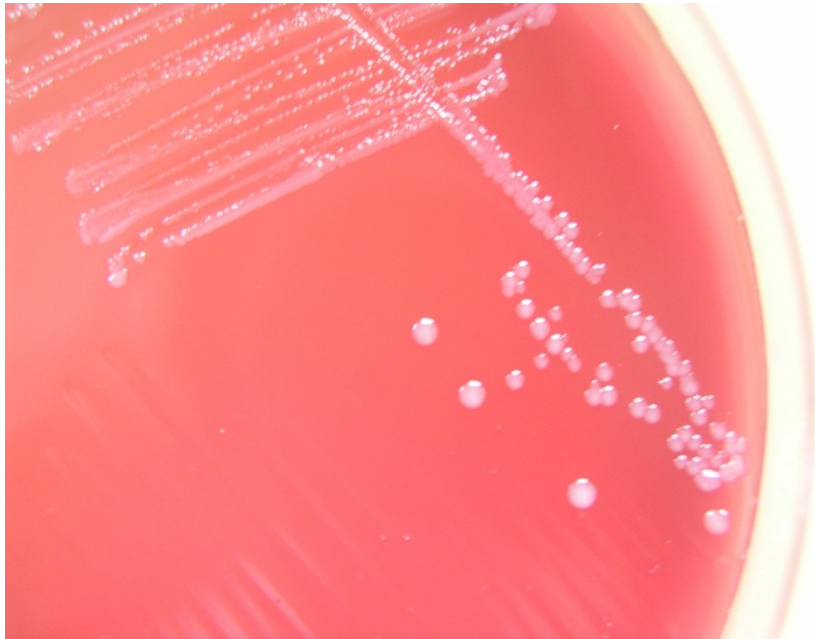
# Gramnegativní anaerobní tyčinky

## *Bacteroides*

- Součástí mikroflory trávicího traktu, dutiny ústní, vaginy
- Na pevných půdách tvoří šedé lesklé kolonie velikosti 1-4 mm
- Patogenita: infekce endogenního původu (v malé pánvi, dutině břišní, v dutině ústní, mediastinu,..)
- Schopnost tvorby beta-laktamáz, které rozkládají betalaktamová antibiotika

# Gramnegativní anaerobní tyčinky

## *Bacteroides*



# Gramnegativní anaerobní tyčinky

## *Prevotella*

- Produkuje černý pigment bez fluorescenčních vlastností
- Patogenita: infekce dutiny břišní, dutiny ústní, sinusitidy, ..
- Schopnost tvorby beta-laktamáz
- Nejčastěji izolovaný druh: *Prevotella melaninogenica*

# Gramnegativní anaerobní tyčinky

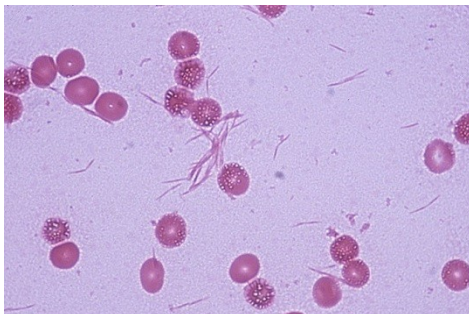
## *Porphyromonas*

- Produkuje hnědočerný pigment , který v ultrafialovém světle fluoreskuje
- Součástí mikroflory dutiny ústní, urogenitálního traktu
- Patogenita: infekce ve výše uvedených oblastech
- Schopnost tvorby betalaktamáz

# Gramnegativní anaerobní tyčinky

## *Fusobacterium*

- Gram negativní tyčinky až vlákna s typicky zašpičatělými konci
- Součástí fyziologické flory v trávicím traktu, vagině, dutině ústní
- Patogenita: infekce v těchto lokalizacích i jinde (např. aspirační pneumonie, plicní a jaterní abscesy, sinusitidy, osteomyelitida, Plaut-Vincentova angina-postihující výrazně oslabené jedince)





# Gramnegativní anaerobní tyčinky

## *Mobiluncus*

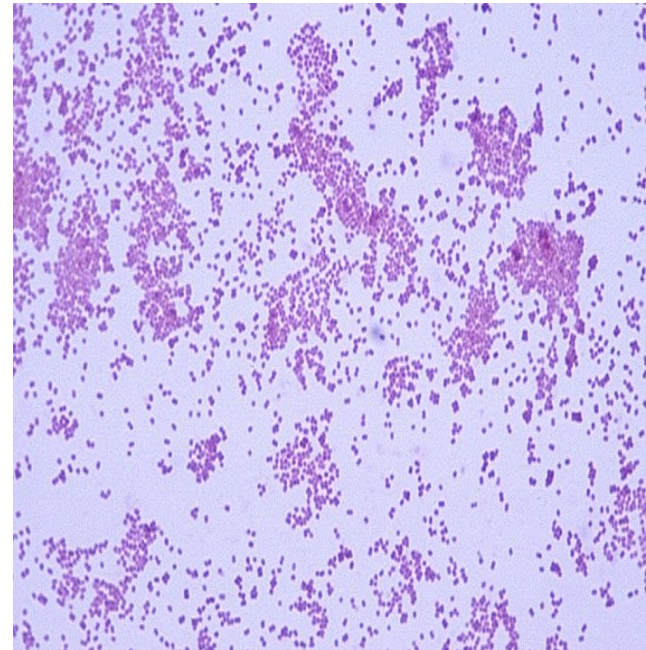
- Gramnegativní až gramlabilní zakřivené pohyblivé tyčinky
- Součástí fyziologické flory vaginy



# Gramnegativní anaerobní koky

## *Veillonella*

- Drobné gramnegativní koky
- Součástí fyziologické flory dutiny ústní, gastrointestinálního traktu, vaginy
- Patogenita: endogenní infekce, sepse, endokarditidy

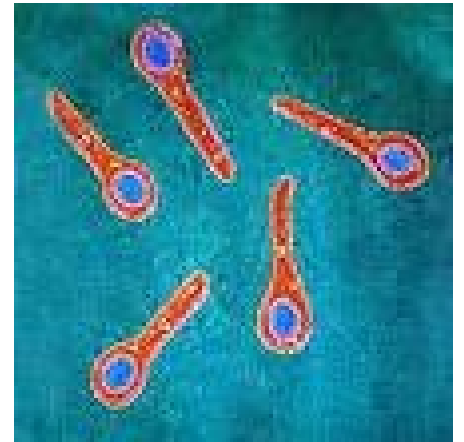


# Grampozitivní sporulující anaerobní tyčinky – rod *Clostridium*

- Jsou součástí střevní mikroflory
- Patogenita: mohou vyvolat nekrotizující infekce měkkých tkání, sepse, enterotoxikózy a neurotoxikózy
- Morfologie: velké grampozitivní tyčky
- Schopnost tvorby rezistentních endospor (které mohou kontaminovat nemocniční prostředí, potraviny, půdu, vodu,..)

# *Clostridium*

- Velká grampozitivní tyčka, velikost 1x10 $\mu$ m
- Morfologie kolonií na agaru: ploché nepravidelné kolonie, zóna betahemolýzy



# *Clostridium botulinum*

- Původce botulismu (otravy klobásovým jedem)
- Schopnost tvorby botulotoxinu
- Součást fyziologické střevní flóry zvířat, vyskytují se v půdě, vodě
- Může kontaminovat potraviny
- Příčina otravy: potraviny kontaminované sporami *Cl. botulinum*- typicky nedostatečně sterilované masové nebo zeleninové konzervy

# *Clostridium botulinum* - alimentární botulismus



- **Patogeneze onemocnění:**

V kontaminované nedostatečně tepelně upravené potravine probíhá produkce botulotoxinu, po požití takové potraviny dochází k resorpci botulotoxinu ze střeva, toxin se krví dostává k nervosvalovým ploténkám příčně pruhovaných svalů, zde způsobí blokádu přenosu nervového vzruchu, tím paralýzu příčně pruhovaných svalů, postihuje i vegetativní nervový systém

- **Inkubační doba:** nejčastěji 1-3 dny

# *Clostridium botulinum*

## alimentární botulismus

- Příznaky: 1. nevolnost, zvracení, bolesti břicha
  2. postižení hlavových nervů: rozostřené vidění, mydriáza, ptóza víček, ztížené polykání, špatná artikulace
  3. postižení vegetativních nervů: sucho v ústech, zácpa, zástava močení, peristaltiky střev
  4. obrny příčně pruhovaných nervů, smrt může nastat díky obrně svalů potřebných k dýchání

# *Clostridium botulinum*

## alimentární botulismus

- **Diagnostika:** anamnéza  
typický klinický obraz  
laboratorní průkaz botulotoxinu-pokus na myši
- **Terapie:** výplach žaludku – u čerstvě zjištěné otravy  
symptomatická (napojení na umělou plicní ventilaci,..)
- **Prevence:** správné postupy při konzervování potravin, 15 minutový var před konzumací rizikových potravin



# *Clostridium botulinum*

## další formy onemocnění

- **Kojenecký botulismus:** především do 6 měsíců věku dítěte, u nekojených dětí, zdroj: kontaminovaný med  
příznaky: úporná zácpa, hypotonie
- **Ranný botulismus:** výskyt u narkomanů, při kontaminaci vpichů a ran sporama *Clostridium botulinum*

# *Clostridium difficile*

- Původce postantibiotických průjemových onemocnění, až život ohrožující pseudomembranózní enterokolitidy
- Vznik zvláště po podávání širokospektrých antibiotik



# *Clostridium difficile*

- **Výskyt:** asi 5% populace v komunitě jako bezpříznakoví nosiči, rezervoár: zvířata  
asi 16-35% pacientů v nemocnici – nosiči
- Od r. 2003 nárůst onemocnění s těžkým průběhem- zvláště v severní Americe, západní Evropě závažný nozokomiální patogen
- V posledních letech nárůst onemocnění i v ČR

# *Clostridium difficile*

- **Toxiny:** enterotoxin(= toxin A), cytotoxin (=toxin B), binární toxin
- **Patogeneze onemocnění:** narušení fyziologické flóry ve střevě po léčbě antibiotiky, ingesce toxigenního kmene *Clostridium difficile*, poškození střevního epitelu, vznik průjmů, při závažné formě onemocnění vznik nekróz střevního epitelu, ulcerací...toxické megacolon, ileus, ruptura střeva...smrt
- **Rizikové faktory:** věk nad 65 let, předchozí ATB terapie, imunosuprese

# *Clostridium difficile*

- **Příznaky onemocnění:**  
bolesti břicha, průjem, nadýmání,  
febrilie
- **Prevence onemocnění v nemocnici:** omezení spotřeby antibiotik  
hygienu rukou, používání rukavic  
odpovídající dezinfekce
- **Terapie:** přerušení léčby antibiotiky, náhrada tekutin, metronidazol, vankomycin, fidaxomicin, chirurgická, transplantace stolice



# *Clostridium difficile*

- Laboratorní diagnostika:
- Materiál k vyšetření: stolice
- Průkaz toxinů A,B a antigenu glutamátdehydrogenázy přímo z materiálu: imunochromatografické metody, tkáňové kultury
- PCR přímo ze stolice
- Kultivace na selektivní půdě, stanovení citlivosti na antibiotika, typizace kmenů

# *Clostridium tetani*



- Grampozitivní tyčky
- Producent neurotoxinu, který způsobuje onemocnění tetanus
- **Rezervoár:** součást střevní mikroflóry savců, zvláště koní, s výkaly se dostává do půdy, zde spory přežívají roky  
Člověk se infikuje exogenně (spory z půdy,..)  
endogenně (z vlastního střeva, vaginy)

# *Clostridium tetani*

- Patogeneze onemocnění: v hluboké znečištěné ráně se *C. tetani* pomnoží a začne produkovat **toxin**, krví se toxin dostává **k motorickým neuronům** v centrální nervové soustavě, zde se přestane uvolňovat GABA, tím se **sníží práh citlivosti** motorických neuronů, dochází ke zvýšení reflexní odpovědi na podněty z periferie, vznikají **tonickoklonické křeče**, poruchy vegetativních nervů.
- Inkubační doba: 3 – 30 dní





# *Clostridium tetani*

- Příznaky onemocnění:

- tonické křeče

- trismus (postižení žvýkacích svalů)

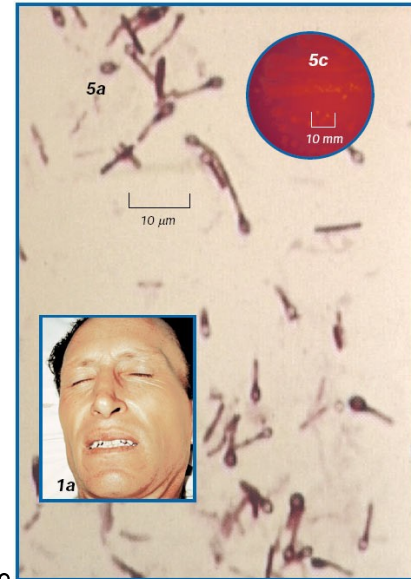
- risus sardonius (sardonický úsměv – postižení mimických svalů)

- spasmy svalů krku a laryngu

- spazmy svalů trupu – opisthotonus (lukovité prohnutí těla díky spasmu zádočných svalů)

- pocení, teplota, intenzivní strach ze smrti

- spasmus dýchacích svalů



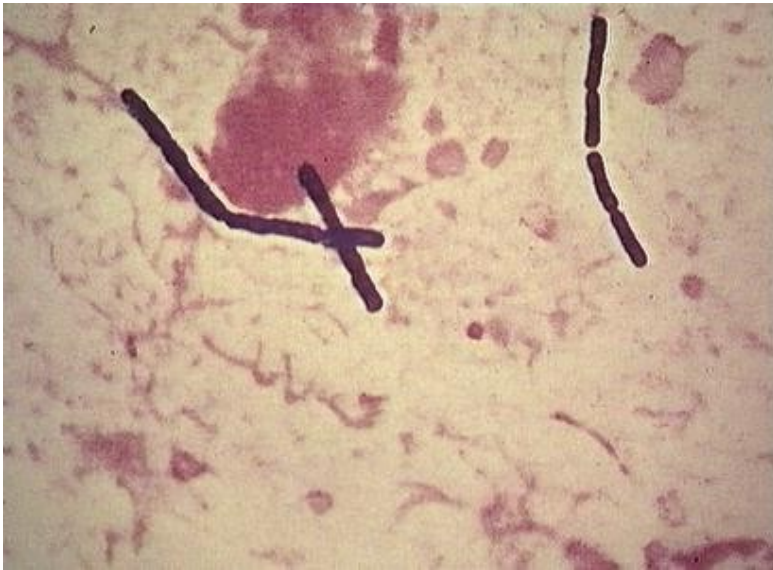
# *Clostridium tetani*

- **Diagnostika:** anamnéza  
klinický obraz  
mikroskopie  
kultivace + biochemické dourčení  
ověření toxigenity kmene
- **Terapie:** chirurgická revize rány, antitetanický globulin  
myorelaxancia, antibiotika
- **Prevence:** očkování, řádné ošetření rány, aplikace tetanického anatoxinu, nebo antitetanického globulinu

# *Clostridium perfringens*

- Původce plynaté sněti
- Rezervoár: střevní mikroflóra člověka i zvířat
- Spory běžně přítomny v půdě
- Člověk se může infikovat exogenně i endogenně

# *Clostridium perfringens*



# *Clostridium perfringens* faktory virulence

- *Clostridium perfringens* tvoří řadu toxinů
- 1. Toxin alfa = lecithinasa: nejdůležitější toxin, způsobuje rozpad membrán svalových buněk a leukocytů, tím nekrózu tkání**
  2. Enterotoxin k otravě dochází do 24 hodin po požití kontaminovaného masa, projevuje se bolestmi břicha a vodnatými průjmy
  3. Toxin beta = hemolytická lecithinasa: odpovídá za nekrotizující enteritidu a enterotoxemii u hladovějících  
(trypsin běžně obsažený ve střevě tento enzym inhibuje, u hladovějících však chybí)

# *Clostridium perfringens* patogenita

- Infekce ran:  
ohraničené hnisavě  
nekrotizující – flegmóna,  
fasciitida, projevuje se  
rozpadem tkáně a  
třáskáním (uvolněný plyn  
v podkoží, či mezi svaly)



# *Clostridium perfringens* - patogenita

**Infekce ran:** difuzně se šířící nekrotizující

toxiny se šíří z postižené tkáně do celého organismu

1. klostridiová celulitida: rychle se šířící nekrotické postižení kůže a podkoží

2. plynatá sněť (gangréna): nekróza kůže, podkoží i svalstva , nebo postižení vnitřních orgánů



Figure 7. Close-up of the lateral aspect of the left elbow region.

# *Clostridium perfringens*

## - patogenita - klinické příznaky při infekci ran

- **Kůže** v postižené oblasti je nápadně **bílá**, silná **bolestivost** v oblasti rány, později se objevují **puchýře** s černým obsahem, **černá ložiska nekrózy**, **krepitace** bublin plynu ve tkáni, během desítek hodin rozvoj **septicko-toxického šoku a smrt**





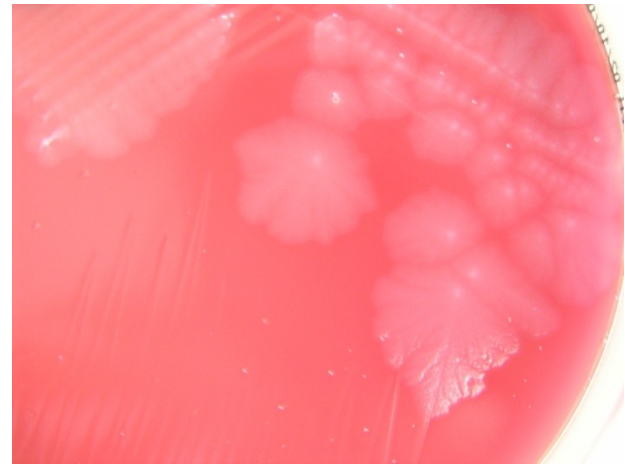
# *Clostridium perfringens* patogenita

- Postižení střeva: nekrotizující enteritida u hladovějících (toxin beta = hemolytická lecithinasa)

enterotoxikóza (enterotoxin)

# *Clostridium perfringens* diagnostika

- Důležitá rychlost!
- Validní materiál:  
nekrotická hmota, sekret,  
(výtěř z rány)
- Mikroskopický  
preparát z vyšetřovaného  
materiálu, průkaz G+ tyčí –  
rychlá informace pro klinika
- Kultivace,  
biochemické  
dourčení, MALDI TOF



# *Clostridium perfringens* diagnostika

- Stanovení citlivosti
- Průkaz toxinů: lecithinasa – srážení lecithinu na žloutkové půdě – precipitace

enterotoxin – RPLA (reverzní pasivní latexová  
aglutinace)

# *Clostridium perfringens* terapie

- Chirurgické ošetření ran
- Antibiotika: penicilin, klindamycin, metronidazol
- Celková podpůrná terapie
- Enterotoxikóza: symptomatická terapie

# Další klostridia způsobující ranné infekce

- *Clostridium novyi*
- *Clostridium sordelii*
- *Clostridium septicum*
- *Clostridium histolyticum*

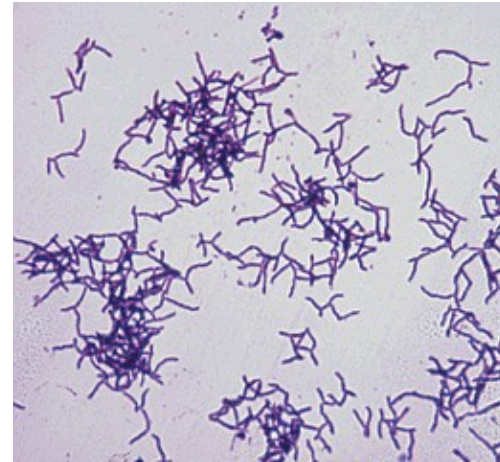
# Grampozitivní nesporeující tyčinky

- Součást fyziologické flóry člověka
- Možnost endogenních infekcí

# Grampozitivní nesporelující tyčinky

## *Actinomyces*

- Součást fyziologické flóry dutiny ústní, urogenitálního traktu
- Původce aktinomykózy
- Morfologie: Gram+ větví se tyčky



# Grampozitivní nesporelující tyčinky

## *Actinomyces*

- Velmi pomalý růst:  
kultivace až 14 dní
- Nejvýznamnější druh:  
*Actinomyces israelii*





# Grampozitivní nesporelující tyčinky

## *Actinomyces*

- Patogenita:  
aktinomykóza  
cervikofaciální,  
thorakální, abdominální  
forma, aktinomykóza  
dělohy při zavedém  
nitroděložním tělísku

abscesy s hustým hnisem  
s drůzami, píštěle,  
prknovité nebolestivé  
infiltráty pomalu rostoucí

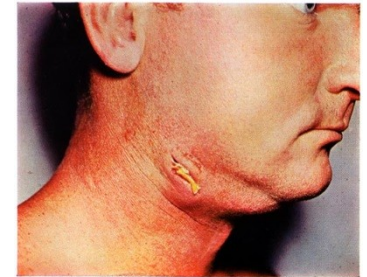
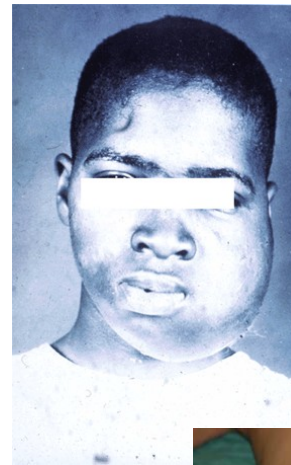


FIGURE 1—Actinomycosis, jaw, observed at Letterman General Hospital, San Francisco, Calif., in a sergeant who had punctured the floor of his mouth with a weed stem while picking his teeth.



# Grampozitivní nesporelující tyčinky

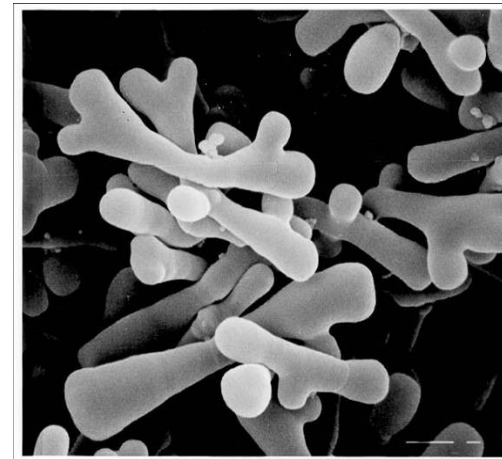
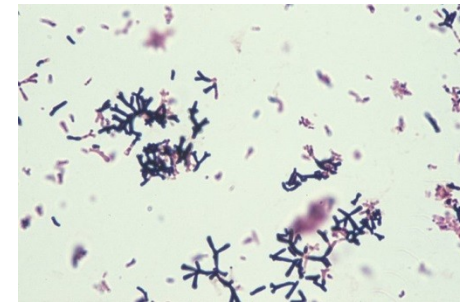
## *Actinomyces*

- Diagnostika: mikroskopie: G+ větvičí se tyčky  
kultivace až 14 dní, kolonie suché  
bělavé drobné, biochemické dourčení,  
MALDI TOF
- Terapie: penicilin, klindamycin, chirurgické  
ošetření

# Grampozitivní nesporelující tyčinky

## *Bifidobacterium*

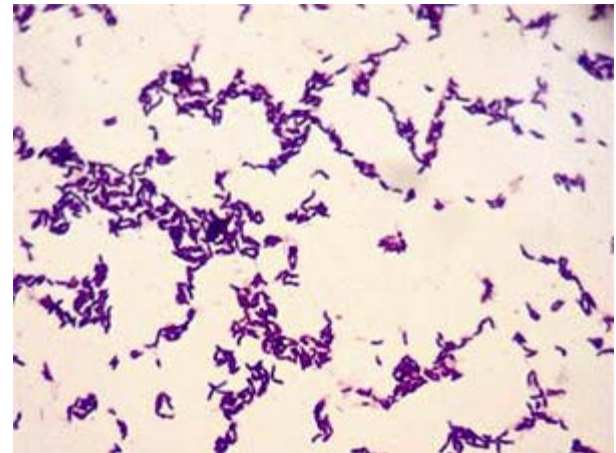
- Součást fyziologické flóry člověka
- Součást probiotik, potravinářství
- **Patogenita:** vznik zubního kazu, endokarditidy
- **Morfologie:** G+ tyčky rozštěpené na koncích- (připomínající kosti)



# Grampozitivní nesporelující tyčinky

## *Propionibacterium*

- Součást fyziologické flóry (kůže, dutina ústní, nosohltan, gastrointestinální trakt, urogenitální trakt)
- **Morfologie:** G+ tyčinky kyjovitého tvaru
- **Patogenita:** účastní se vzniku akné, abscesů, endokarditidy



# Grampozitivní nesporeující tyčinky

## *Lactobacillus*

- Součástí běžné mikroflory člověka (dutina ústní, střevo, vagina)
- Využití v potravinářství: výroba acidofilního mléka, jogurtů,..
- Součástí probiotik (normalizace střevní flóry)
- Patogenita: novorozenecké meningitidy, endometritidy, abscesy, endokarditidy
- Terapie: antibiotika (penicilin+gentamicin)

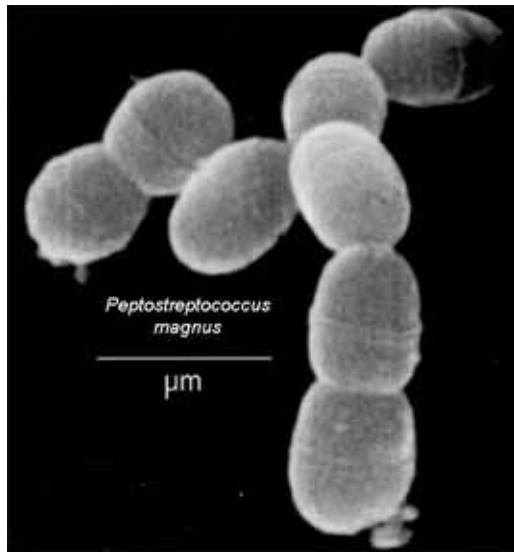
# Grampozitivní anaerobní koky

## *Peptococcus, Peptostreptococcus*

- Součást fyziologické flory člověka (dutina ústní, gastrointestinální trakt, urogenitální trakt, kůže)
- Způsobují endogenní infekce: infekce ran, kostí, abscesy, sinusitidy, otitidy, peritonitidy, pneumonie, endokarditida, sepse, poporodní endometritidy
- Morfologie: Peptostreptococcus: grampozitivní drobné koky

Peptococcus: grampozitivní větší koky

# Grampozitivní anaerobní koky – morfologie, patogenita





Děkuji Vám za pozornost

