

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

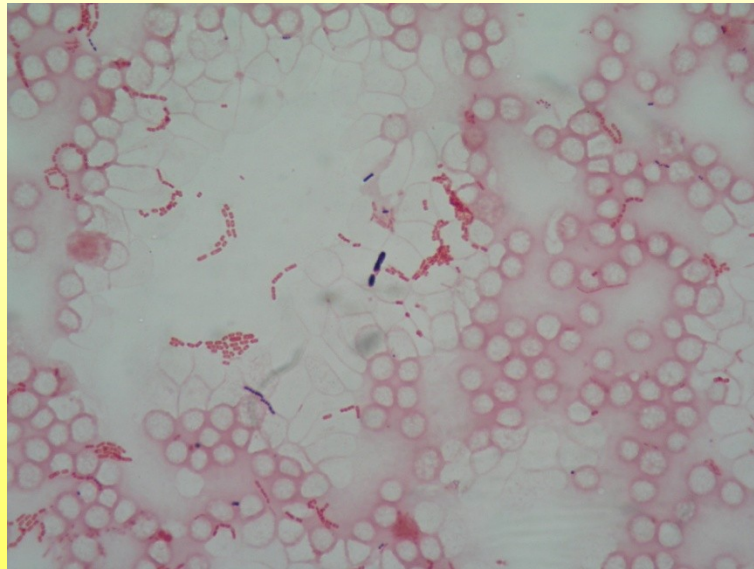
- **Infekce v oblasti hrudníku:** aspirační pneumonie, plicní absces, empyém hrudníku, mediastinitida (zánět mezihrudí), aktinomykosa
- **Nitrobřišní infekce:** cholecystitida, appendicitida, divertikulitida, peritonitida, jaterní absces, aktinomykosa
- **Urogenitální infekce:** septický potrat, aktinomykosa, 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% CO² , 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

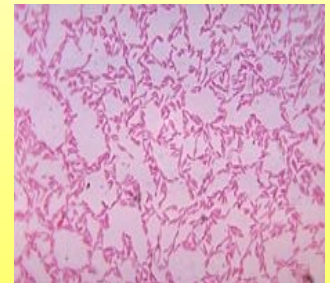


- Antibiotika používaná k terapii:

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 2 - 5 dní
- Patogenita – podmíněná, infekce endogenního původu (abscesy)



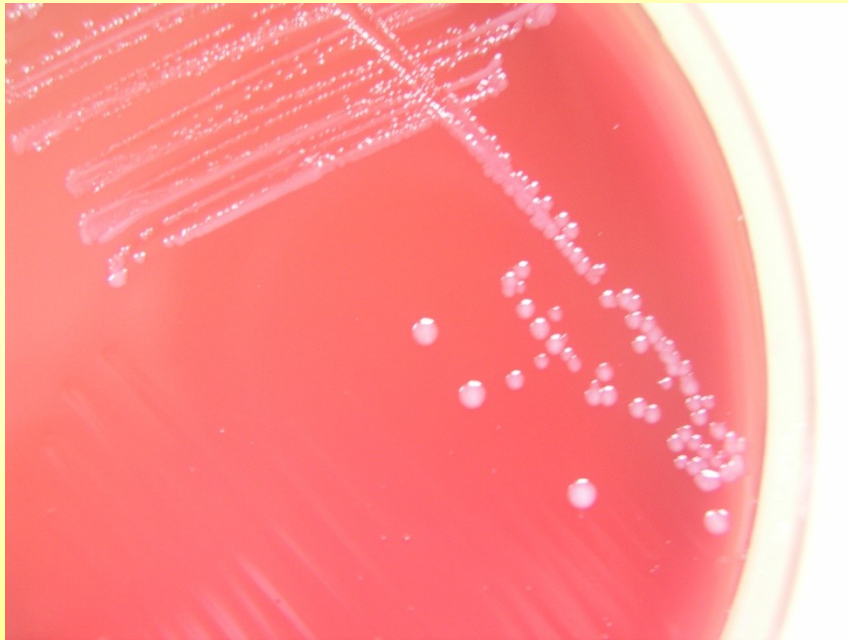
Gramnegativní anaerobní tyčinky

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

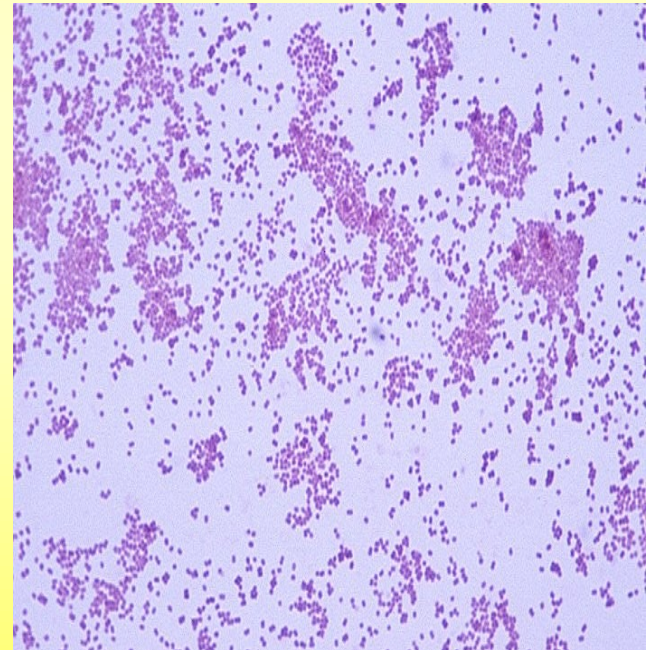
- Gramnegativní až gramlabilní zakřivené pohyblivé tyčinky
- Součástí fyziologické flory vaginy



Gramnegativní anaerobní koky

Veillonella

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

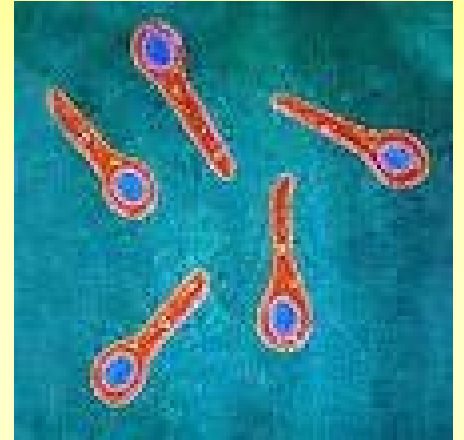


Grampozitivní sporulující anaerobní tyčinky – rod *Clostridium*

- 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 μ 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

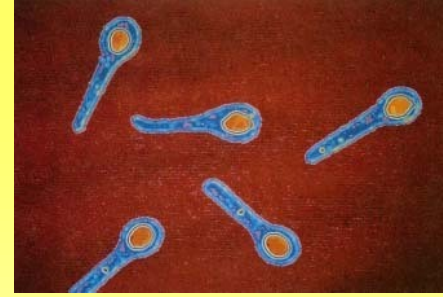
- **Příznaky onemocnění:**
bolesti břicha, průjem, nadýmání,
febrilie
- **Prevence onemocnění v nemocnici:** omezení spotřeby antibiotik
hygienu rukou, používání rukavic
odpovídající dezinfekce
- **Terapie:** přerušení léčby antibiotiky, náhrada tekutin, metronidazol, vankomycin, fidaxomicin, chirurgická,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



Clostridium difficile

- Laboratorní diagnostika:
- Materiál k vyšetření: stolice
- Průkaz toxinů A,B a antigenu glutamátdehydrogenázy přímo z materiálu: imunochromatografické metody, FIA, ELISA, 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)

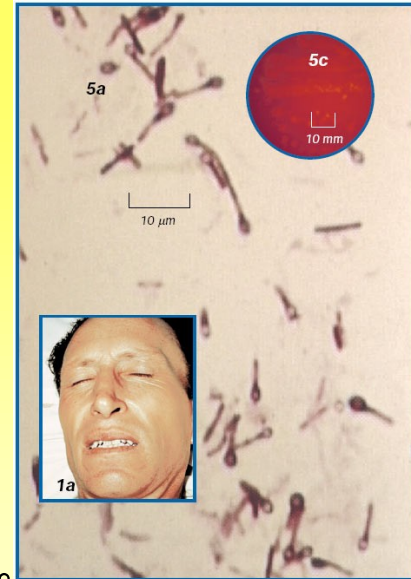
risus sardonius (sardonický úsměv –
postižení mimických svalů)

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**



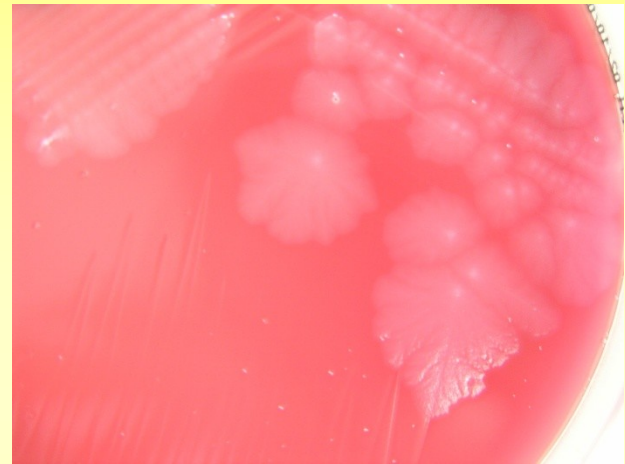
Clostridium perfringens patogenita

- 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 nesporulující tyčinky

Actinomyces

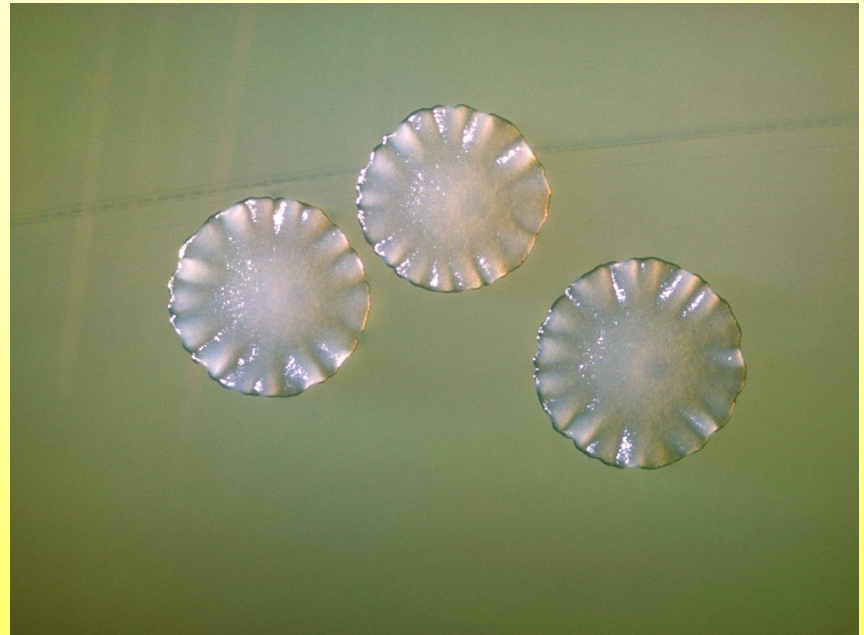
- Součást fyziologické flóry dutiny ústní, urogenitálního traktu
- Původce aktinomykózy
- Morfologie: Gram+ větvicí se tyčky



Grampozitivní nesporulující 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

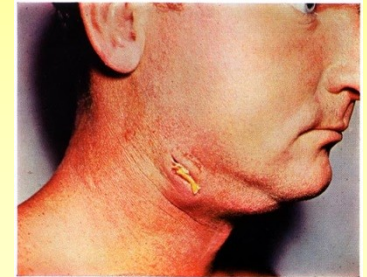
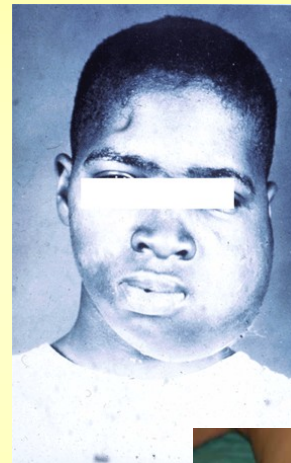


FIGURE 1—Actinomycosis, jaw, observed at Letterman General Hospital, San Francisco, Calif., in a sergeant who had punctured the floor of his mouth with a weed stem while picking his teeth.



Grampozitivní nesporelující tyčinky

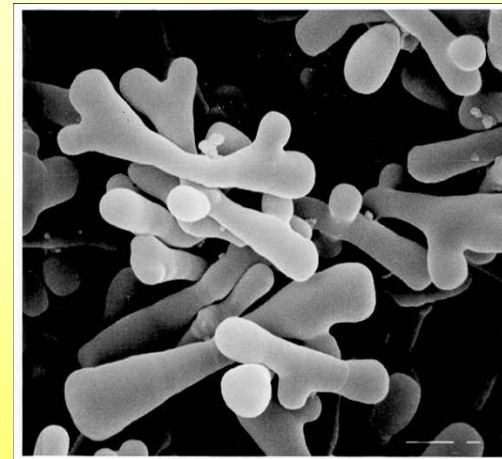
Actinomyces

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

Grampozitivní nesporulující tyčinky

Bifidobacterium

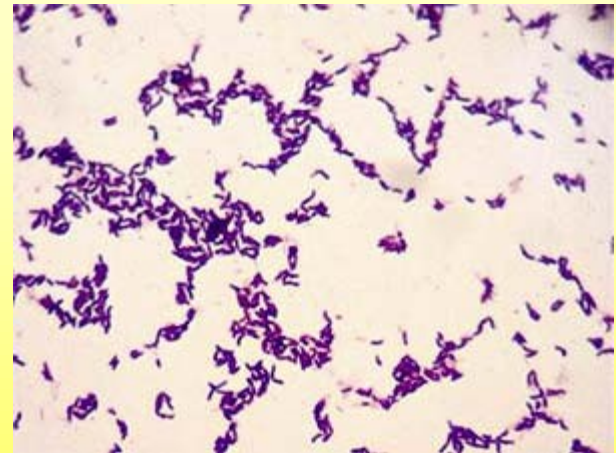
- Součást fyziologické flóry člověka
- Součást probiotik, potravinářství
- Patogenita: vznik zubního kazu, endokarditidy
- Morfologie: G+ tyčky rozštěpené na koncích- (připomínající kosti)



Grampozitivní nesporulující 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

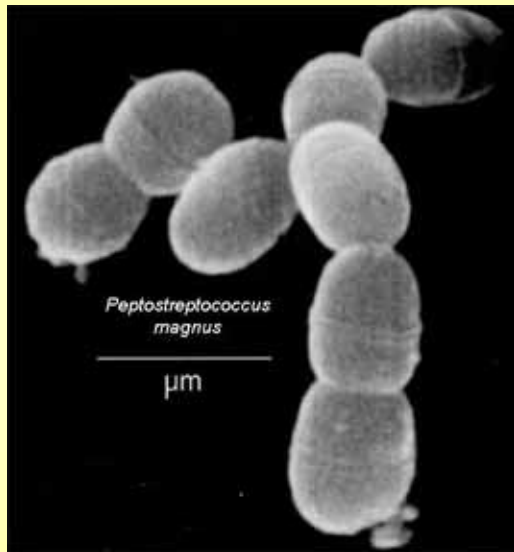
- Součástí běžné mikroflory člověka (dutina ústní, střevo, vagina)
- Využití v potravinářství: výroba acidofilního mléka, jogurtů,..
- Součástí probiotik (normalizace střevní flóry)
- Patogenita: novorozenecké meningitidy, endometritidy, abscesy, endokarditidy
- Terapie: antibiotika (penicilin+gentamicin)

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

