

Mikrobiologický ústav uvádí

NA STOPĚ PACHATELE



Díl sedmý:

Anaerobní pachatelé

Opět začneme testíkem...

- Které jsou klinicky významné G+ koky?

Stafylokoky, streptokoky, enterokoky

- A které klinicky významné G+ tyčinky?

Např. listerie, koryneformní tyčinky, bacily

- Které bakterie rostou na Endově půdě?

Enterobakterie, *Vibrionaceae* a nefermentující

- Které gramnegativní na Endu nerostou?

Například kamylobaktery, helikobaktery, hemofily, neisserie, legionely a mnoho dalších

Testík pokračuje...

- Které půdy se používají na enterobakterie?

Např. Endova, XLD, MAL, CIN a další

- Jak poznáte nefermentující od enterobakterií?

Nefermentující nefermentují glukózu, např.

Hajnova půda zůstává celá červená

- Jaká je typická mikroskopie u neisserií?

Gramnegativní diplokoky, intraleukocytární

- Jaká je u neisserií a branhamel OXI a INAC?

Oxidáza pozitivní u obou, INAC u branhamel

A testík ještě pokračuje...

- Které cukry štěpí která patogenní neisserie?

Gonokok štěpí jen glukózu, meningokok glukózu a maltózu

- Co se kultivuje na BCYE a co na BG půdě?

Na BCYE legionely, na BG bordetelly

- Proč má *Brucella melitensis* své jméno?

Podle ostrova Malta, kde žijí ovce a kozy

- Jaký je nejběžnější průkaz francisel?

Nepřímý – například aglutinací v panelu

Úvod: Mikulecké pole trochu jinak

Mikulecké pole

hluboko zorané

Nejedno *Clostridium tetani*

v tom poli je schované

V poli je schované

zalezlé ve spoře

Čeká až syneček nějaký

to pole zas poore...

*(Zpívá se jako normální Mikulecké
pole of Fanoša Mikuleckého)*

S takým klostridiem

Nedobře kočkovat

Nechaj sa, synečku

zavčasú

pořádně přeočkovat...



Ještě než začneme...

- ...měli bychom si cosi uvědomit. Doted' (P1 až P6) jsme si povídali o bakteriích, na které není třeba nijak zvlášť myslet.
- Klinik prostě pošle vzorek „na kultivaci“, a ono z něj „něco vyroste“.
- **S tím už je ale KONEC!** Dál už nás čekají jen mikroby, pro které tohle neplatí.

Takže:



- Pokud chce klinik, aby byl jeho vzorek prověřen na přítomnost anaerobů, mykobakterií či aktinomycet, musí to uvést na průvodce. Musí se užít speciální postupy.
- U dalších původců (třeba spirochet či chlamydií) se navíc zpravidla odebírá sérum a provádí se nepřímý průkaz
- To si pamatujte hlavně pro budoucí praxi. Zkoušku třeba nějak uděláte – ale *tohle* byste si měli umět uvědomit třeba i za dvacet let.

Příběh první

- Mustafa, kosovský Albánec, se rozhodl, že navštíví svého bratrance v sousední vesnici. Pole, přes které se vydal, již mělo být odminováno. Přesto se jedna nevybuchlá mina ještě našla. Střepina, špinavá od bláta, se Mustafovi zasekla hluboko do stehna.
- Za několik dní byl Mustafa přijat do jedné z polních nemocnic. Stehno měl zduřelé a při poklepu byl slyšitelný zvuk praskajících bublinek. Mustafa byl hned operován.

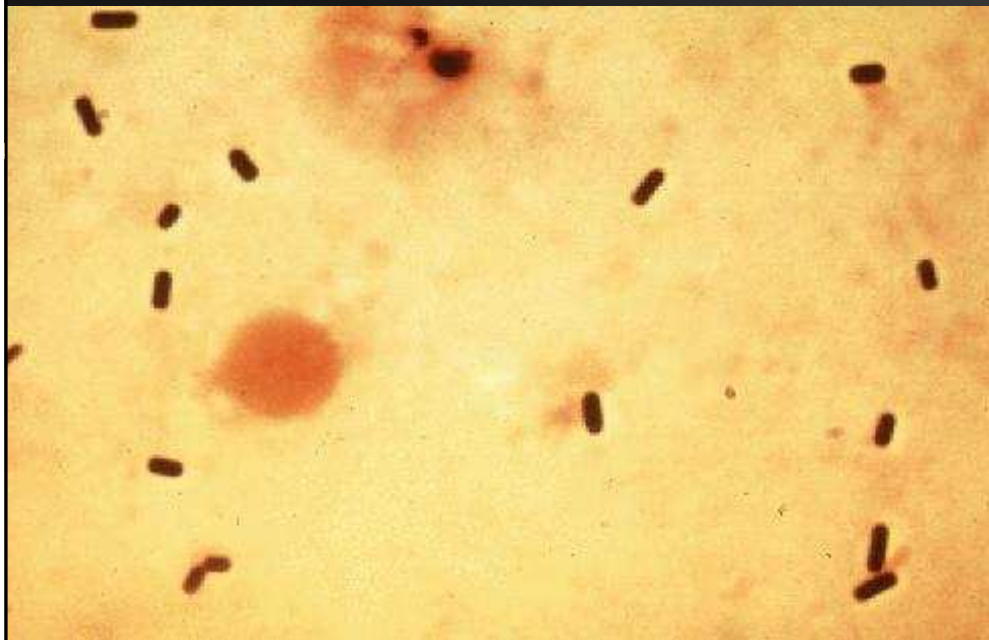


Viníkem je tentokrát

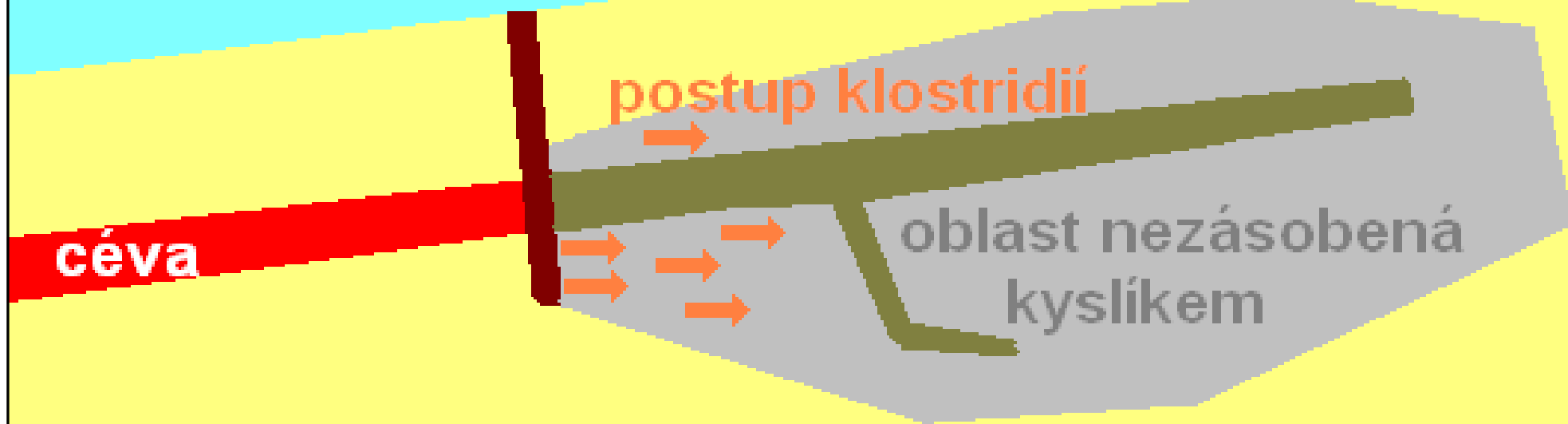


- *Clostridium perfringens*, jeden z původců plynaté sněti (spolu s *C. novyi*, *C. septicum* aj.)
- Plynatá sněť je typické **válečné onemocnění**.
Může se však vyskytnout i v dobách míru, například při živelných pohromách
- **Klostridia plynatých snětí** – respektive jejich enterotoxiny – se také uplatňují jako patogeny ve střevě

Vznik plynaté sněti



zranění

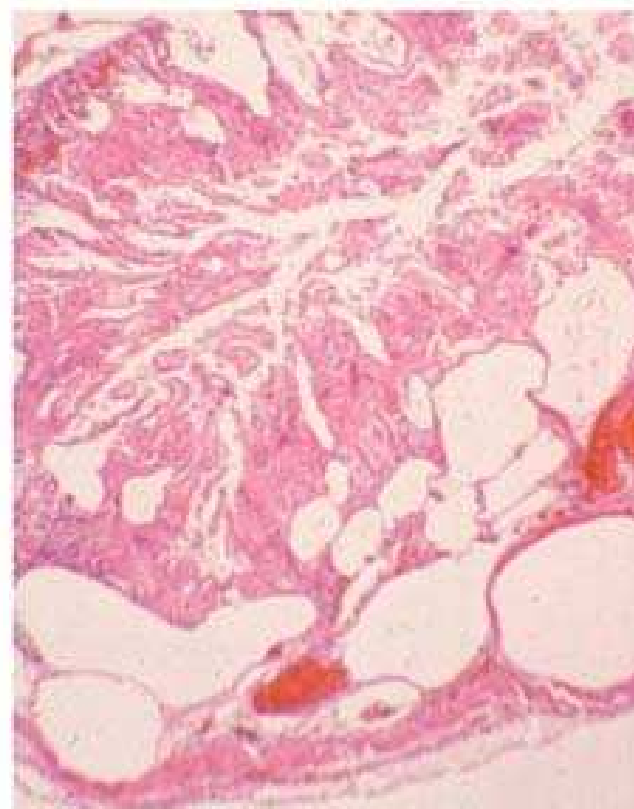
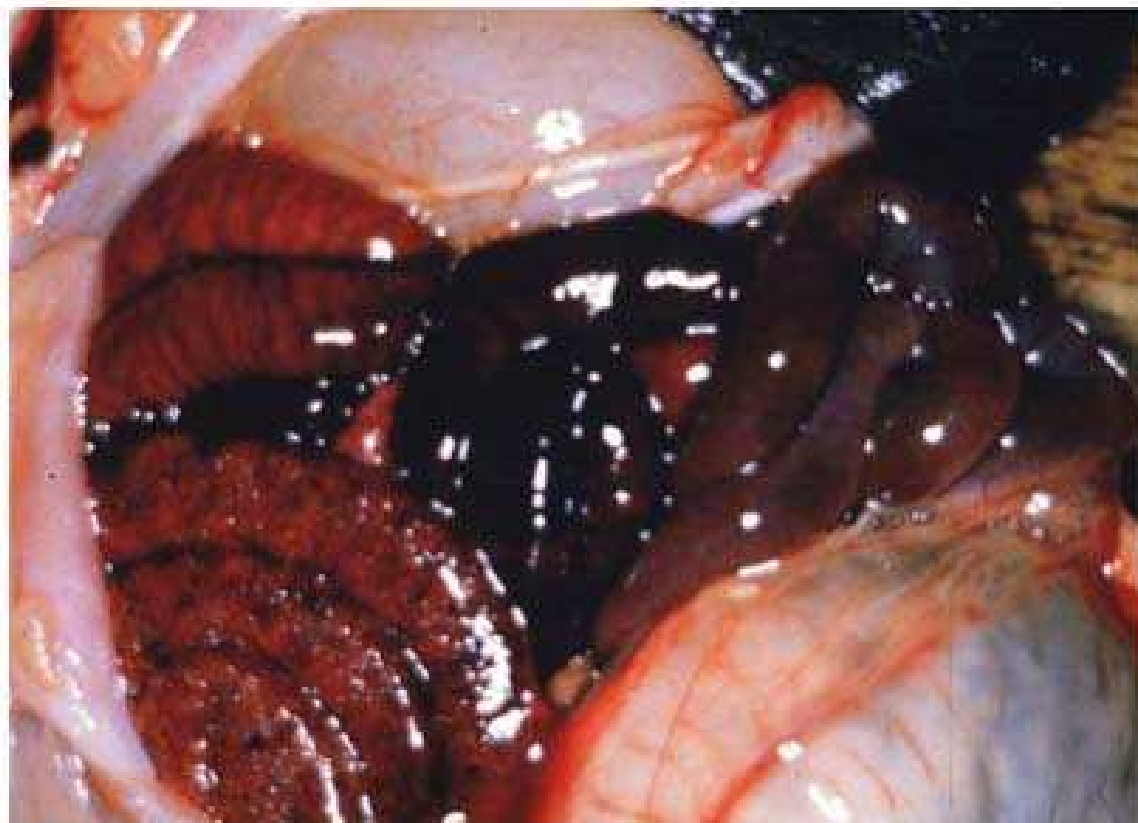


Nekrotizující enterokolitida – i to může způsobovat *C. perfringens*

豚の壊死性腸炎 (Necrotic enteritis)

左:小腸は出血しており、結腸には菌の産生したガスによる嚢胞が見られる。

右:空腸の組織像。絨毛は壊死に陥り、固有層にはガスによる空胞が見られる。



Příběh druhý

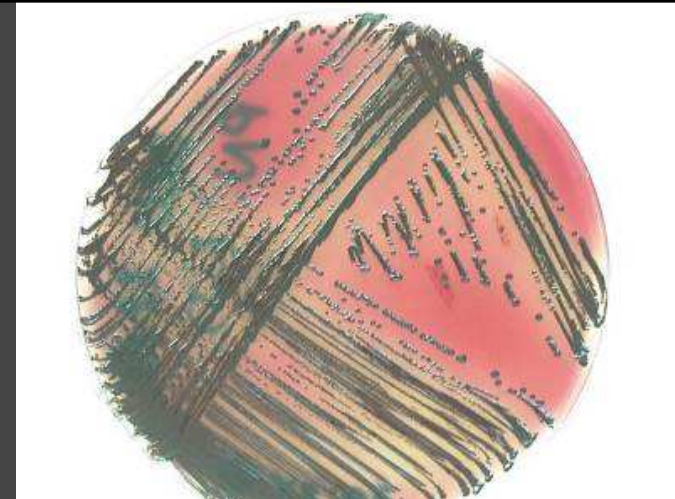
- Pan Kostečka ležel už třetí týden v nemocnici pro bakteriální zánět kostní dřeně. Zánět mu léčili klindamycinem, linkosamidovým antibiotikem. Náhle pan Kostečka dostal těžký průjem. Na oddělení zrovna neměli metronidazol, a tak sáhli po staré metodě: dali panu Kostečkovi vypít ampulku vankomycinu, antibiotika, které se normálně podává pouze injekčně, protože se nevstřebává ze střeva.

Viníkem je

- *Clostridium difficile*, respektive jeho **toxin**
- Tento mikrob se vyskytuje ve střevě celkem běžně, problém však je, když začne produkovat toxin, a především, když mu někdo odstraní konkurenci a on se přemnoží.
- Odstranění konkurence způsobí nejčastěji **léčba některými typy antibiotik**, nejčastěji linkosamidy. Linkosamidy jsou účinné proti většině striktně anaerobních bakterií, nikoli však proti *C. difficile*.
- Dnes se k léčbě používá nejčastěji bakteriální chemoterapeutikum **metronidazol**



Příběh třetí



- Paní Raková byla přijata pro horečnatý stav a **intenzivní bolesti břicha**
- Zobrazovací metody ukázaly na **absces malé pánve**. Ukázaly však také **nádor na děložním čípku** – později se ukázalo že jde o **karcinom**
- U paní Rakové se naštěstí podařilo **operačně vyřešit** nejdříve absces a poté i nádor, byť za cenu provedení hysterektomie. Metastázy se naštěstí neobjevily.

Viníkem je

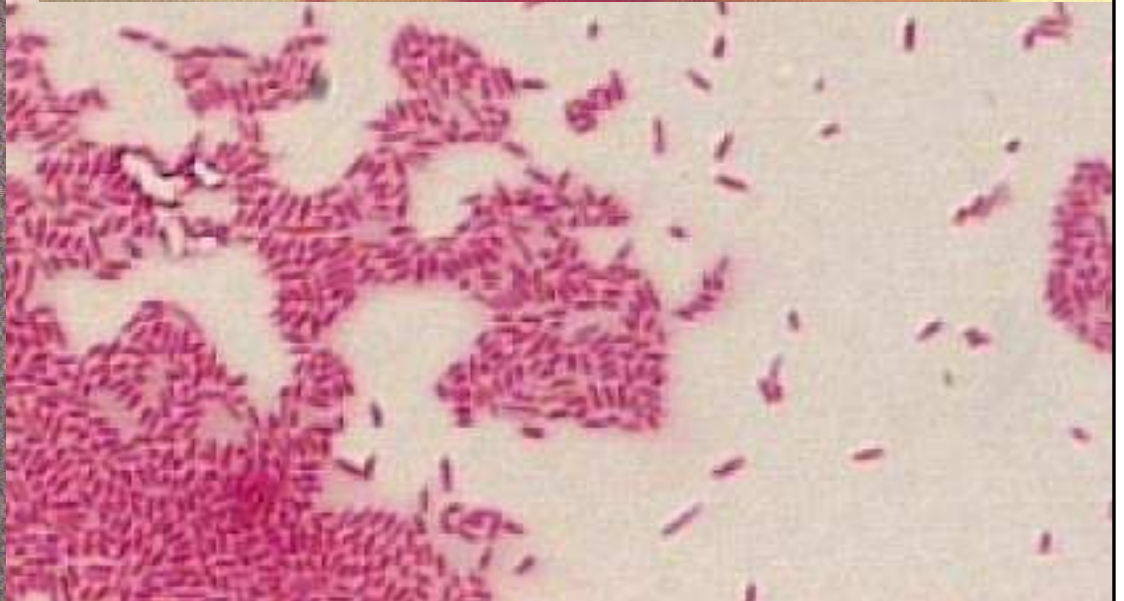
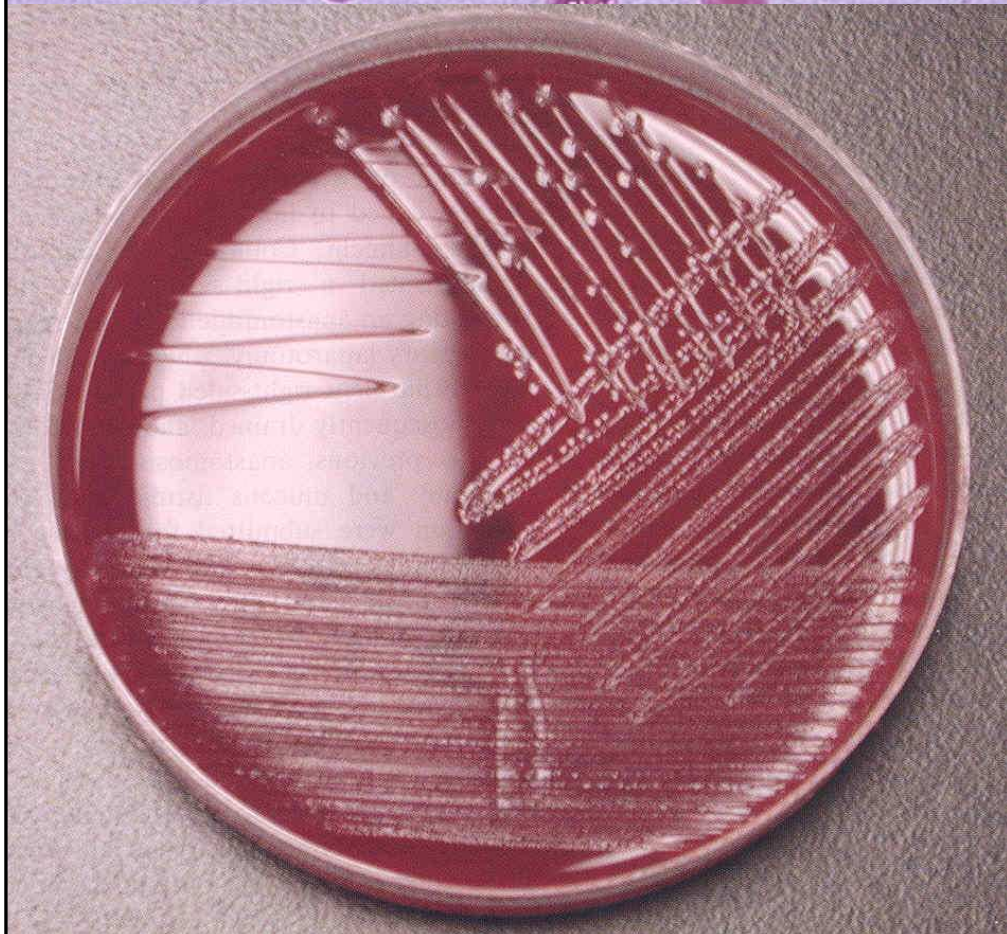
- Směs striktně anaerobních, ale i fakultativně anaerobních bakterií
- Tato směs se zřejmě vyskytovala v pochvě paní Rakové, aniž by jí činila sebemenší problémy
- Nádor však porušil anatomickou bariéru, a mikroby se dostaly do míst, kde způsobily absces.
- Nesporující striktně anaerobní mikroby mají vzhledem ke svým vlastnostem velmi omezené možnosti přenosu.
- Velká část infekcí je tedy endogenního původu

Připomeňme si, za jakých podmínek rostou jaké bakterie

Prostředí	Normální	↓ O ₂	↑ CO ₂	Bez O ₂
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** – **E**xtrémely **o**xxygen **s**ensitive) běžně nelze kultivovat



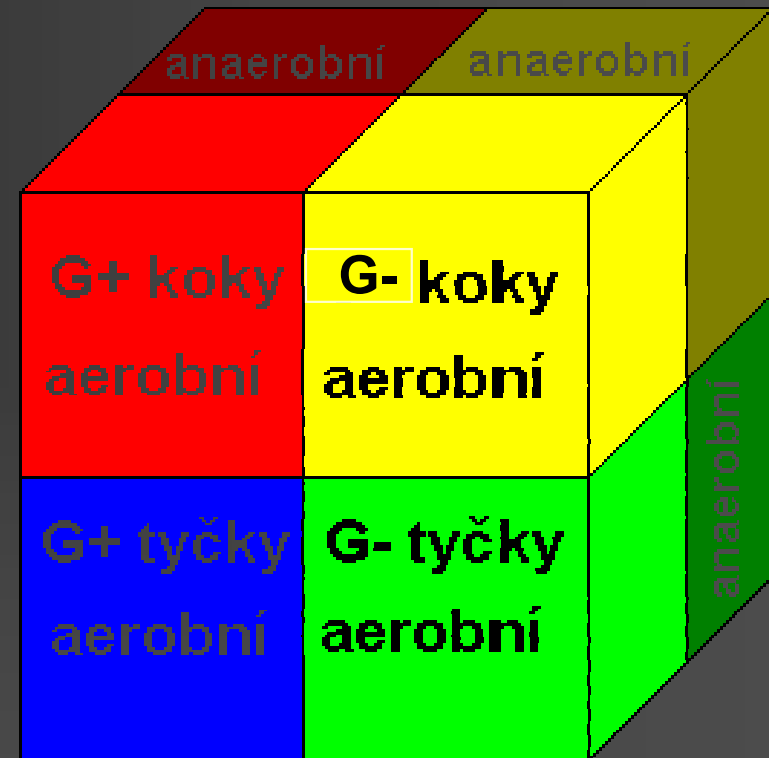
Co jsme znali doted'

- V prakticích P1 až P6 jsme se seznámili se čtyřmi skupinami mikrobů, které **rostou za aerobních podmínek** – ať už jsou **striktně aerobní** jako např. pseudomonády, nebo **fakultativně anaerobní** jako třeba *Escherichia coli*.

G+ koky	G- koky
G+ tyčky	G- tyčky

Nyní si přidáme další čtyři skupiny

- Každá z oněch čtyř skupin má totiž svoje **anaerobní „bratříčky“**. Jejich vlastnosti se výrazně liší od **aerobních bakterií** a naopak vykazují některé **společné charakteristiky**. Vymyká se jen rod *Clostridium*, protože umí tvořit spory

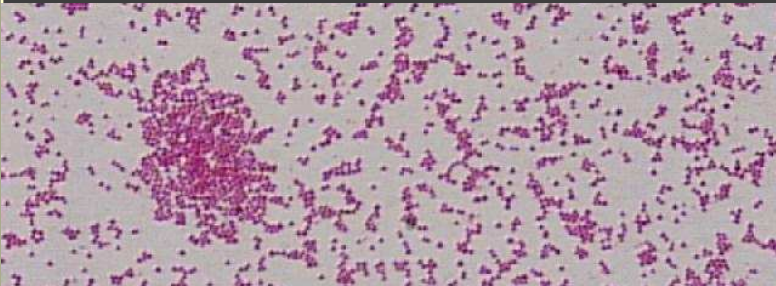


Společné charakteristiky nesporelujících anaerobů



- Vyskytují se jako **běžná flóra**:
 - **v tlustém střevě** tvoří 99,9 % celkového objemu mikrobů, je jich tam kolem jednoho kilogramu
 - **v ústech** mohou žít díky biofilmu – jsou do něj zavzaty tak, aby neměly přímý přístup ke vzduchu, které by je ohrožoval
 - **v pochvě** nejsou přítomny u všech žen, ale uvádí se, že asi 70 % žen nějaké anaeroby v pochvě má; pokud se zde ovšem přemnoží, jde o dysmikrobii, kterou je nutno léčit
- Při zánětu **obvykle neexistuje jeden původce**, ale uplatňuje se směs. Někdy se používá termín „Veillonova flóra“

Přehled nesporelujících anaerobů (u člověka nejběžnější druhy)

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



*se zašpičatělými konci

**s rovnými konci tyčinky

***není stoprocentní anaerob

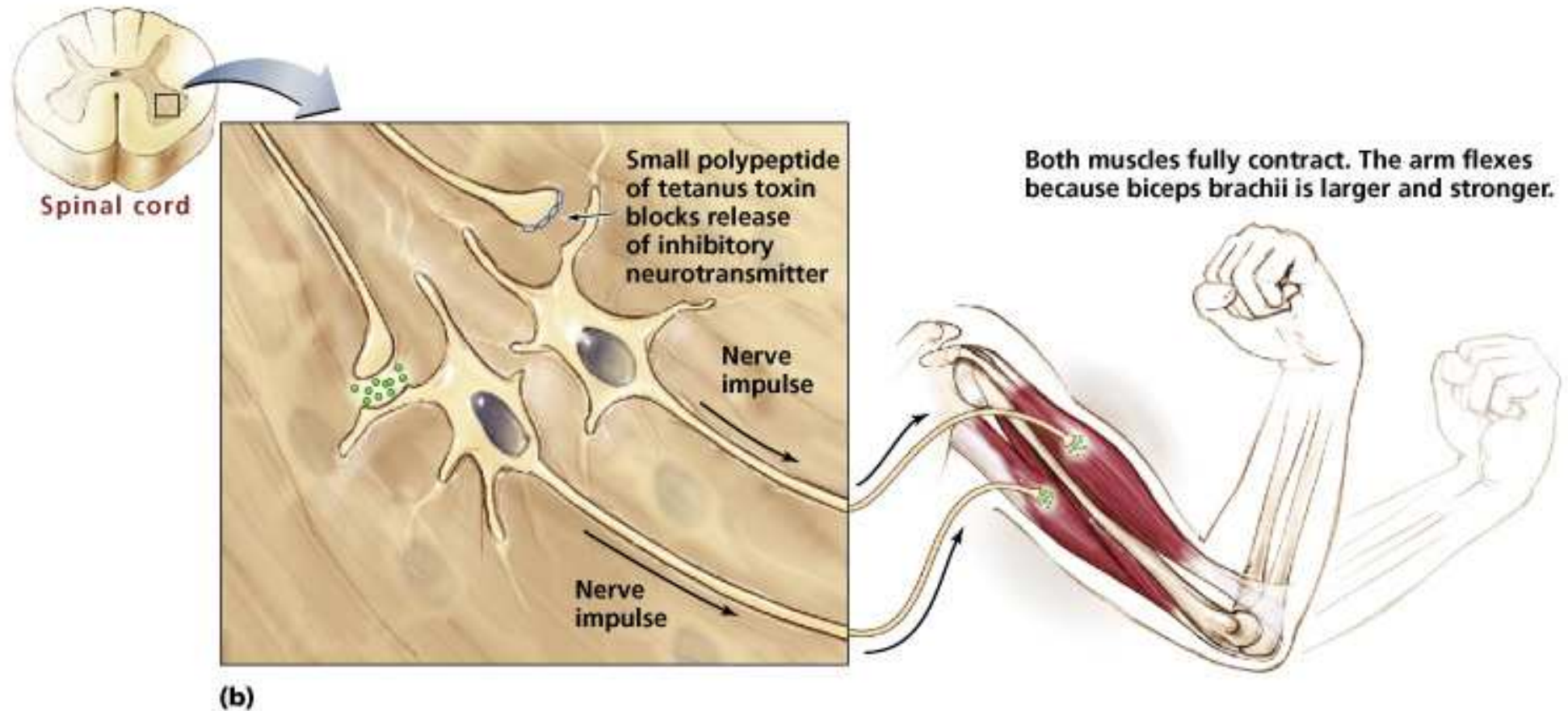
Klostridia – přehled



<i>C. tetani</i>	Původce tetanu
<i>C. botulinum</i>	Producent botulotoxinu
<i>Clostridium perfringens</i> , <i>C. septicum</i> , <i>C. welchii</i> a aj.	Klostridia plynatých snětí
<i>C. difficile</i>	Enteropatogenní

Je potřeba si uvědomit, že i klostridia se úplně normálně podílejí na běžné střevní mikroflóře. Problém nastává, pokud se přemnoží, dostanou tam, kam nemají, vyskytne se kmen produkující velké množství toxinu apod.

Tetanus



Tetanus



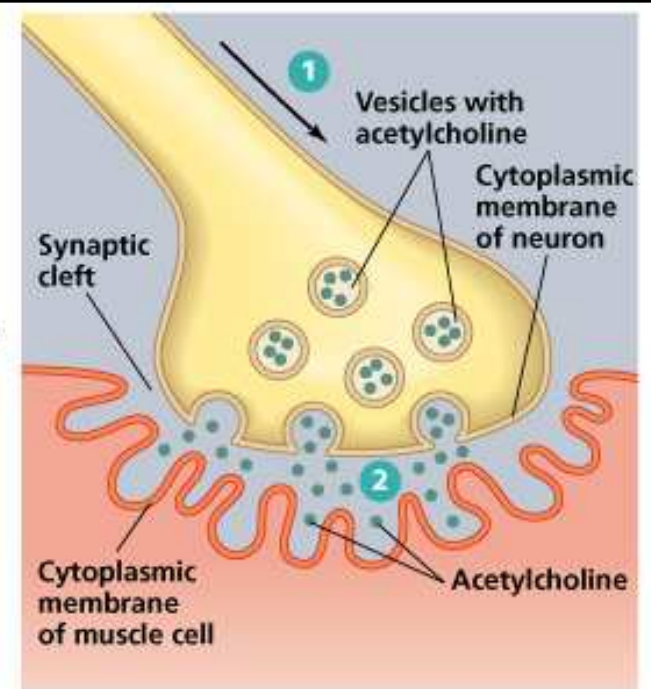
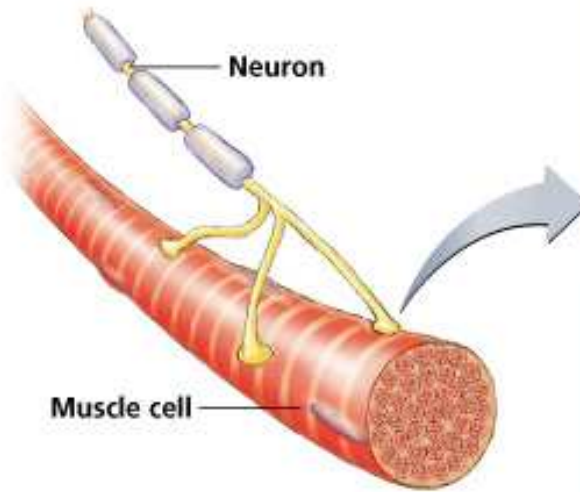
Ještě jednou tetanus



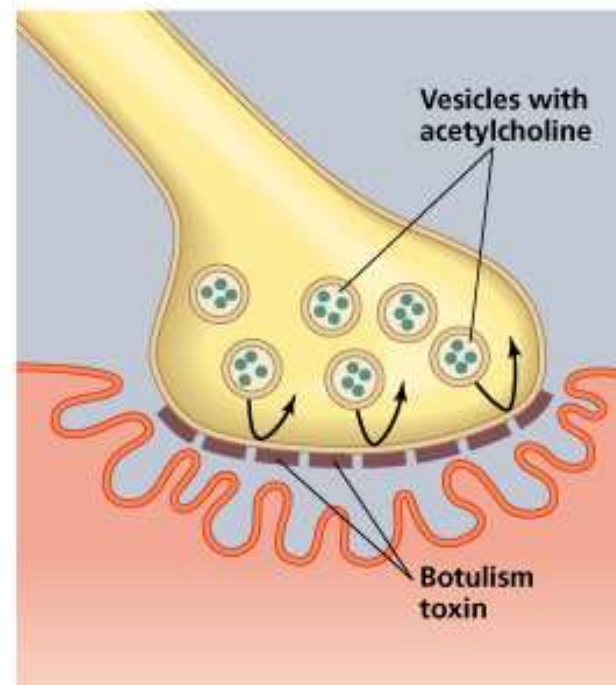
Trismus (křeč čelistních svalů)



Botulismus



(a) Normal neuromuscular junction



(b) Neuromuscular junction with botulism toxin present

Typický vzhled jazyka při botulismu



Defilé zločinců: *C. botulinum* (vlevo), *C. perfringens* (vpravo)



Vegetative cells

Endospore-bearing cells

10 μm



Jak pátrat po těch divných týpcích z Anaerobní čtvrti - I

- **Mikroskopie:** Má větší význam než u aerobů, vzhledem k morfologické různorodosti
- **Kultivace:** Je nutno zajistit anaerobiózu pomocí **anaerostatů** či **anaerobních boxů**. U tekutých půd postačuje **přelití parafinem**. Používá se **VL** (**viande levure**) bujón, VL krevní agar a různé speciální půdy
- **Biochemie:** kataláza a oxidáza většinou negativní, možné vzájemné rozlišení biochemicky, i analýza plynů chromatografií (jsou biochemicky aktivní)
- **Antigenní analýza a nepřímý průkaz** se v diagnostice anaerobů příliš nepoužívají

Jak pátrat po těch divných týpcích z Anaerobní čtvrti - II

- **Pokus na zvířeti** se používá u tetanu a botulismu. U tetanu se myš svíjí v křeči, u botulismu jsou naopak patrné parézy.



Tetanická myš

Poznámka k mikroskopii anaerobů: různé tvary anaerobů

- Studenti někdy zaměňují spóru (útvár, který je neprobarvený, resp. jen slabě se rýsují jeho okraje) a **ztluštění tyčinky** (které se vyskytuje u některých tyčinek, které jsou nesporulující a zpravidla gramnegativní).
- U skutečných sporulujících mikrobů má význam sledovat **umístění spór**. U *Clostridium tetani* je spóra terminální (na konci umístěná)

C. tetani



jiné klostrid.



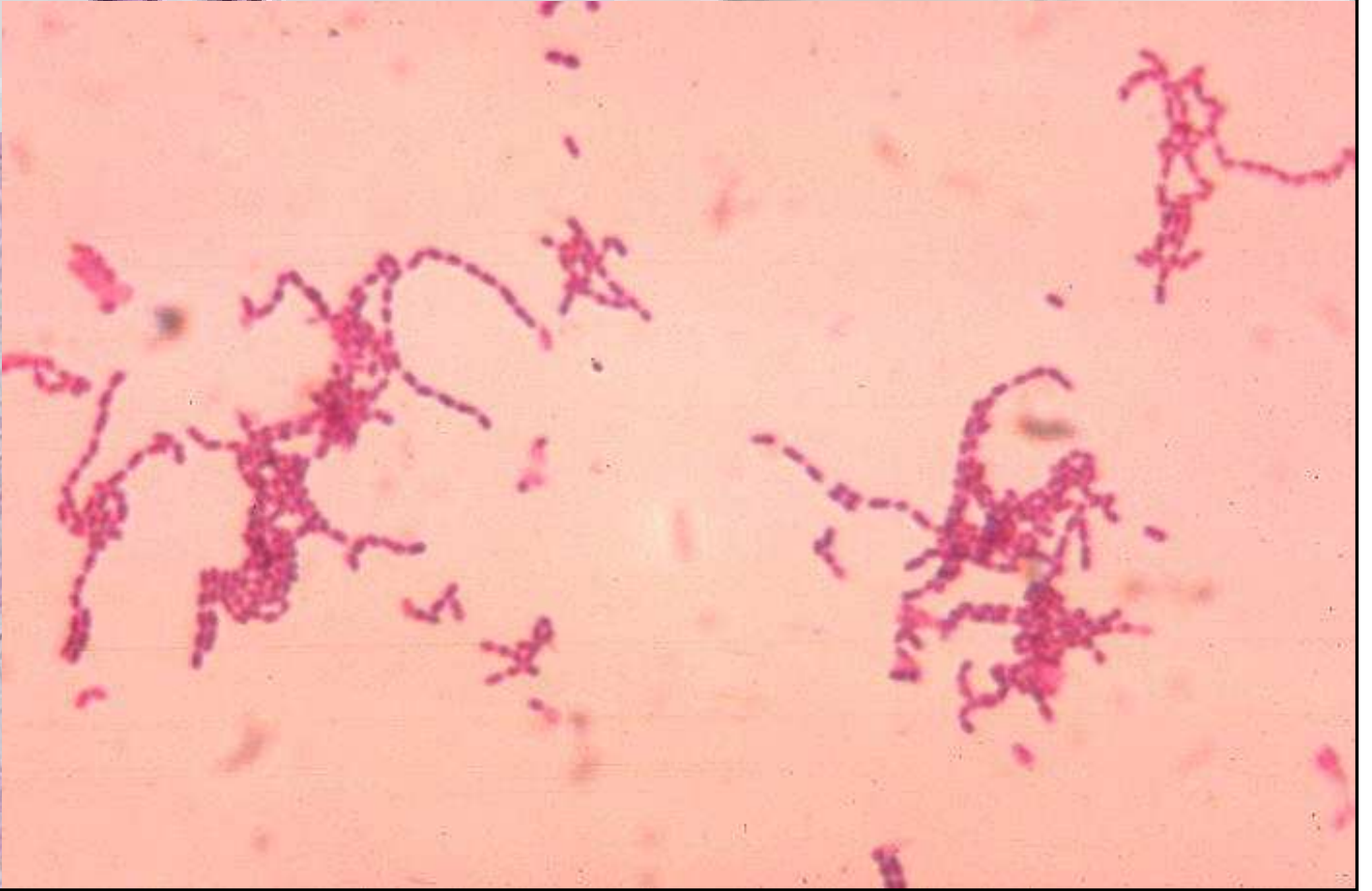
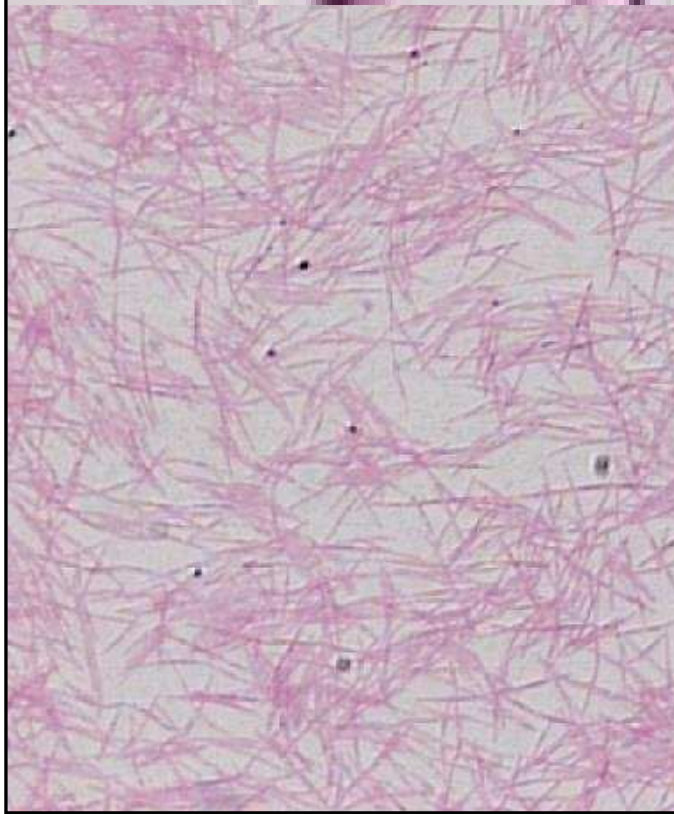
vřetenovité ztlustění
("hodinková forma",
často u rodu
Bacteroides)



Bacteroides

Dříve se používal pro tyto
útvary název
„Sphaerophorus
necrophorus“, tedy
„Kulonoš smrtonosný“





Poznámka ke kultivaci anaerobů: Jak získat anaerobiózu

- **Mechanicky** – VL bujony přelijeme parafinovým olejem
- **Fyzikálně** – v anaerobním boxu se nahradí vzduch směsí anaerobních plynů, vháněných z bomby
- **Chemicky** – v anaerostatu se
 - z organických kyselin tvoří **vodík a CO₂**
 - v druhé fázi na palladiovém katalyzátoru **reaguje vodík s kyslíkem za vzniku vody**, takže se kyslík spotřebovává

Přelévání VL-bujonů parafinem



Anaerobní box



Anaerostat

(uvidíte ho ještě jednou)

Palladiový kalalyzátor
(pod víčkem) nezbytný
pro druhou fázi reakce

Generátor anaerobiózy
(sáček s chemikáliemi)
nutný pro celou reakci



Úkol 1: mikroskopie vzorků

Úkol 2: mikroskopie kultur

- Podezřelé kmeny již jsou obarveny podle Grama
- Rozlišíte bakterie podle tvaru a typu buněčné stěny. Pro vzájemné rozlišení musíte samozřejmě pokračovat dál
- Anaerobní tyčinky jsou někdy velice různotvaré – v jednom preparátu najdete útvary od vláknitých až po prakticky kokovité

Ú3: Anaerostat

ano, je tu znovu:

vzduchotěsné víčko

palladiový kalalyzátor
(pod víčkem)

konstrukce pro
ukládání Petriho misek

Generátor anaerobiózy
(sáček s chemikáliemi)



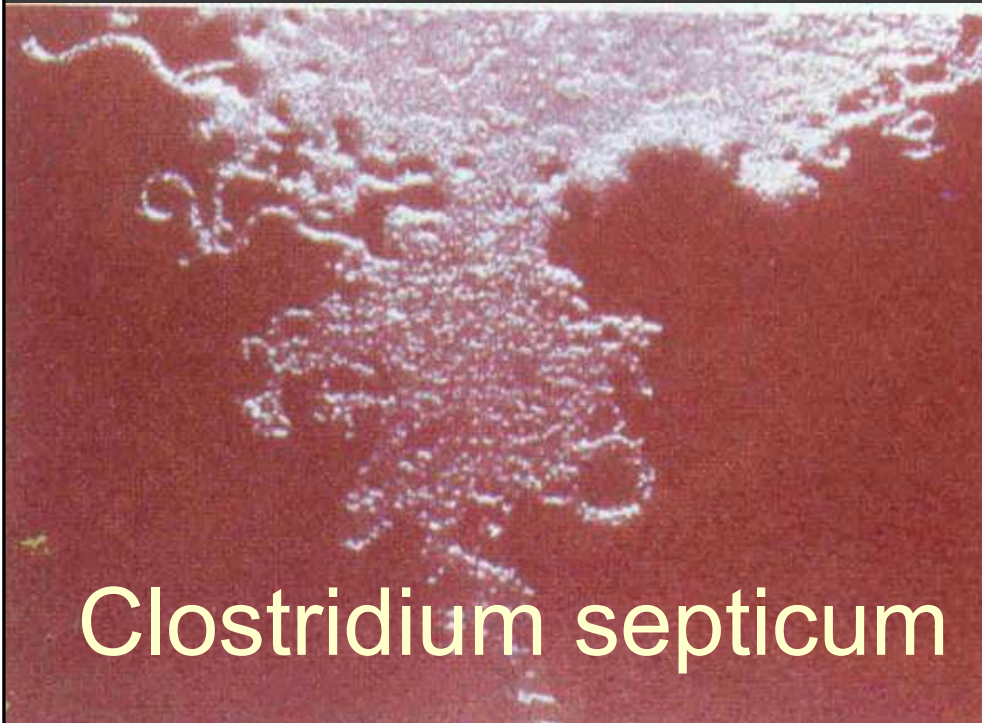
Anaerostat jiné provenience

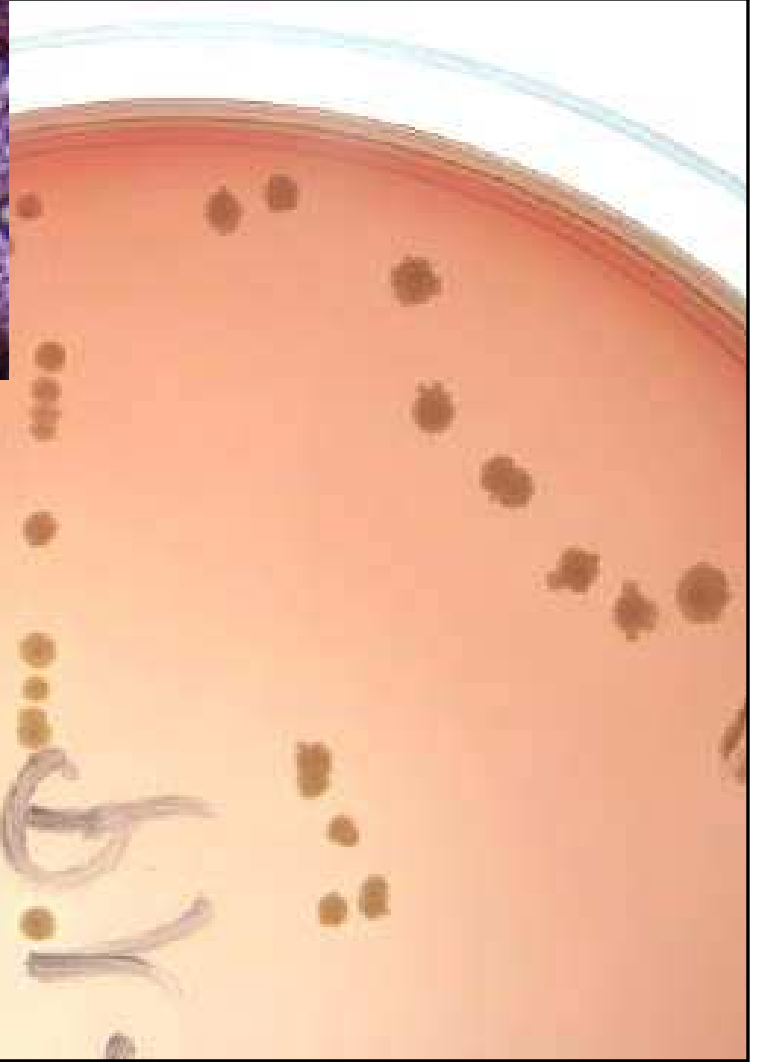
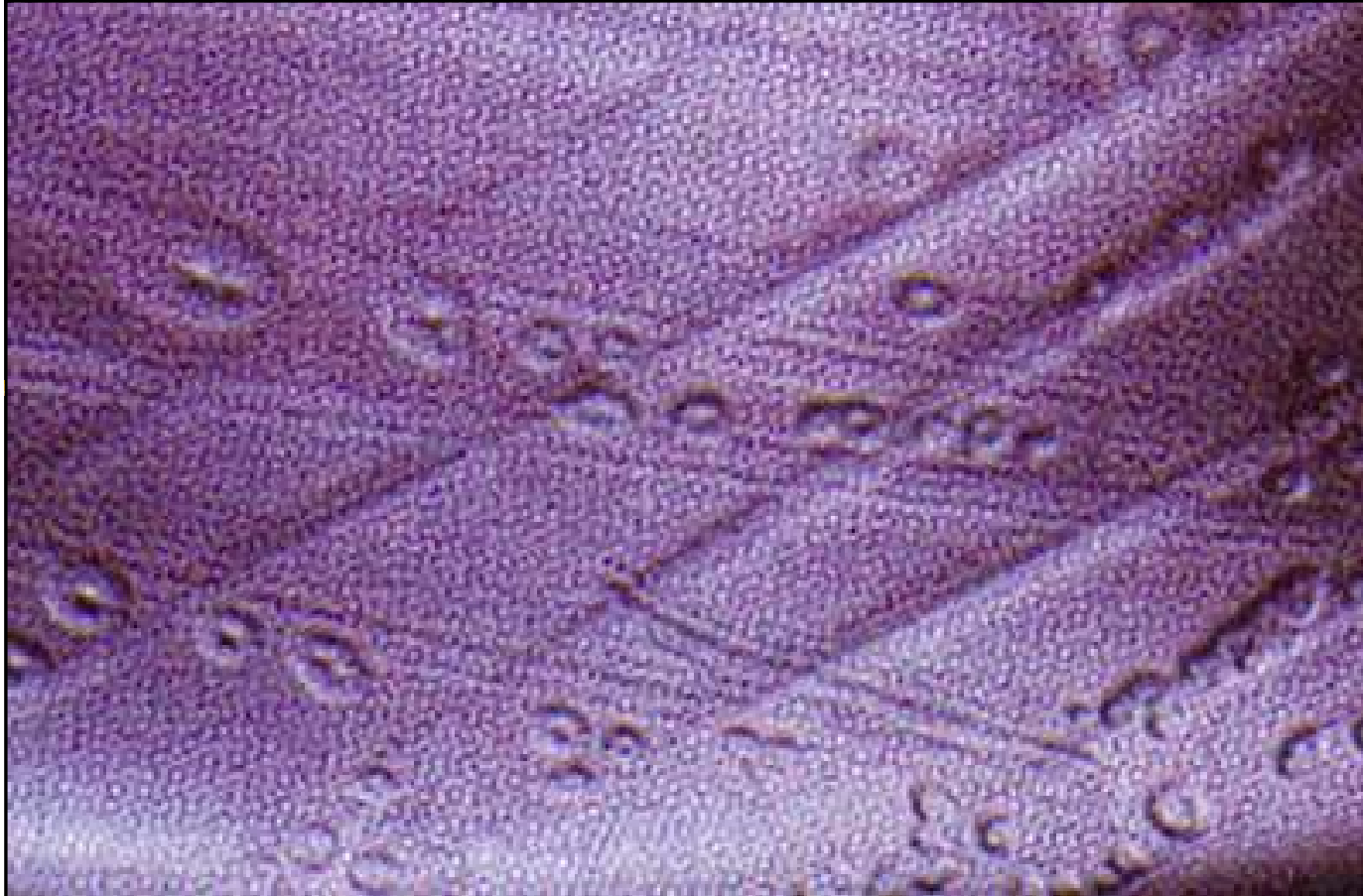
Fusobacterium sp.



Úkoly 4 a 5 Otisky prstů (kultivace)

- Zjistěte, kde co roste, a to co roste, popište.
- Všimněte si, že anaerobní bakterie rostou často v drobných, nepravidelných koloniích, které mají někdy výběžkaté okraje. Typický je pro ně také značný zápach.





Kolonie různých
anaerobních
baktérií

K úkolům 4 a 5

- V úkolu 4 si povšimněte VL bujónu a VL (krevním) agaru*, zapište si, co obsahují a jakou mají barvu
- V úkolu 5 zapište vzhled kolonií bakterií na VL (krevním) agaru* a také vzhled růstu kmenů bakterií ve VL bujónu (pozor, toto není uvedeno v protokolu).
- Všimněte si toho, že **z našich čtyř kmenů jen dva jsou striktní anaeroby**. Jeden je fakultativní anaerob a jeden je striktní aerob

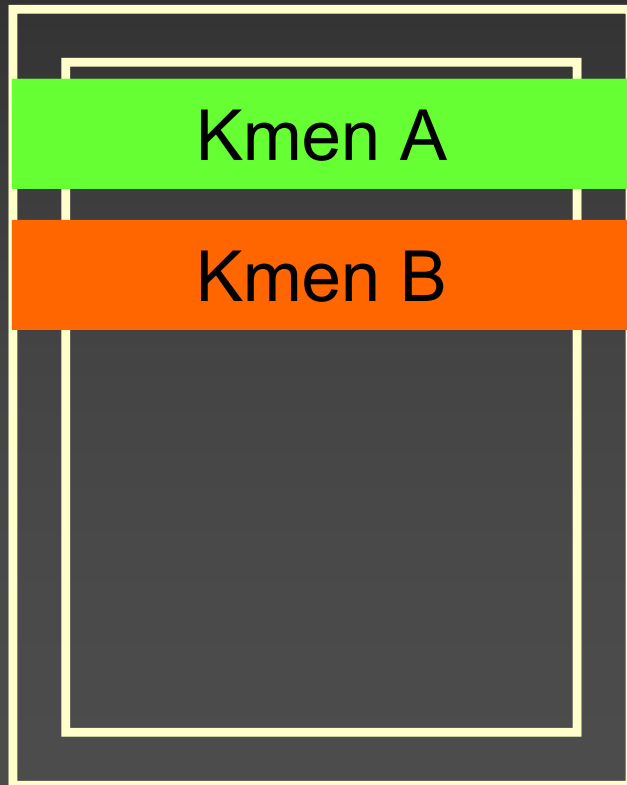
**VL krevnímu agaru se běžně říká pouze „VL agar“, protože VL agar bez krve se v praxi nevyužívá*

Už mne nebudete potřebovat!
Vypnuli jste mne, očistili a zakryli?



Úkol 6: Biochemické rozlišení

- Používají se různé testy, v našich podmínkách především ANAEROtest 23 Lachema.



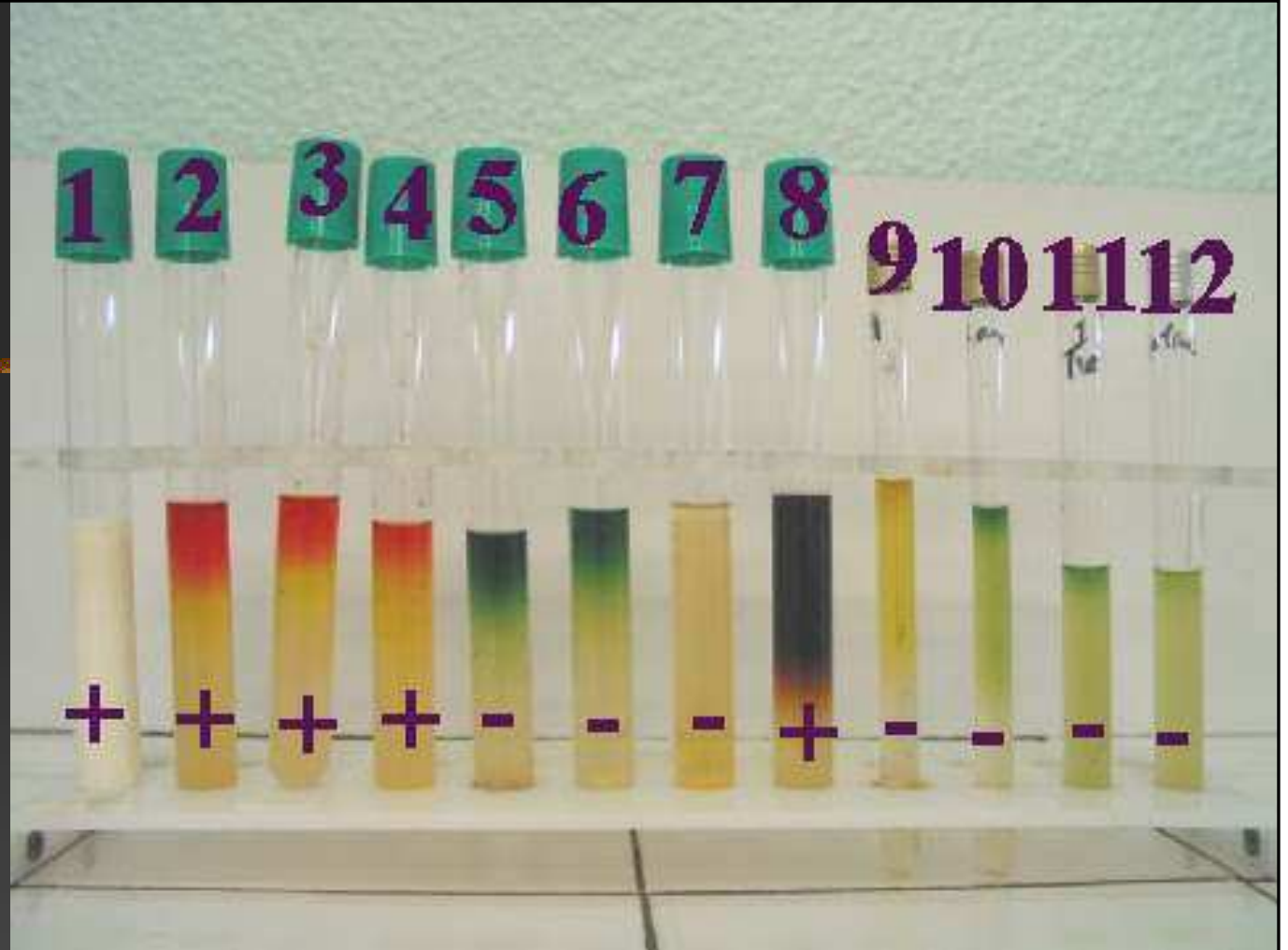
Zapište **výsledky jednotlivých reakcí** („+“ nebo „-“) a spočítejte oktalogový kód

Výsledek určete podle **kódové knihy**
POZOR – kódová kniha je rozdělená na několik částí **podle morfologie anaerobních bakterií**. Je třeba hledat v té správné části **kódové knihy**

Anaerotest - příklad odečítání

+ 1	- 1	+ 1	+ 1	- 1	- 1	-	+
- 2	+ 2	+ 2	- 2	+ 2	- 2	-	-
+ 4	- 4	+ 4	+ 4	+ 4	- 4	+	-
5	2	7	5	6	0		

Ukázky různých zahraničních testů pro identifikaci anaerobů



Úkol 7 – testy antibiotické citlivosti

- **Antibiotická citlivost** se u patogenních neisserií určuje **na půdách, na kterých jsou schopny růst**, tj. nikoli na MH agaru, ale zpravidla na VL krevním agaru
- Lékem volby u většiny anaerobů je opět **klasický penicilin**. Rezistentní je však rod *Bacteroides* (v užším slova smyslu – rody *Prevotella* a *Porphyromonas*, které se z něj kdysi odštěpily, jsou citlivé)

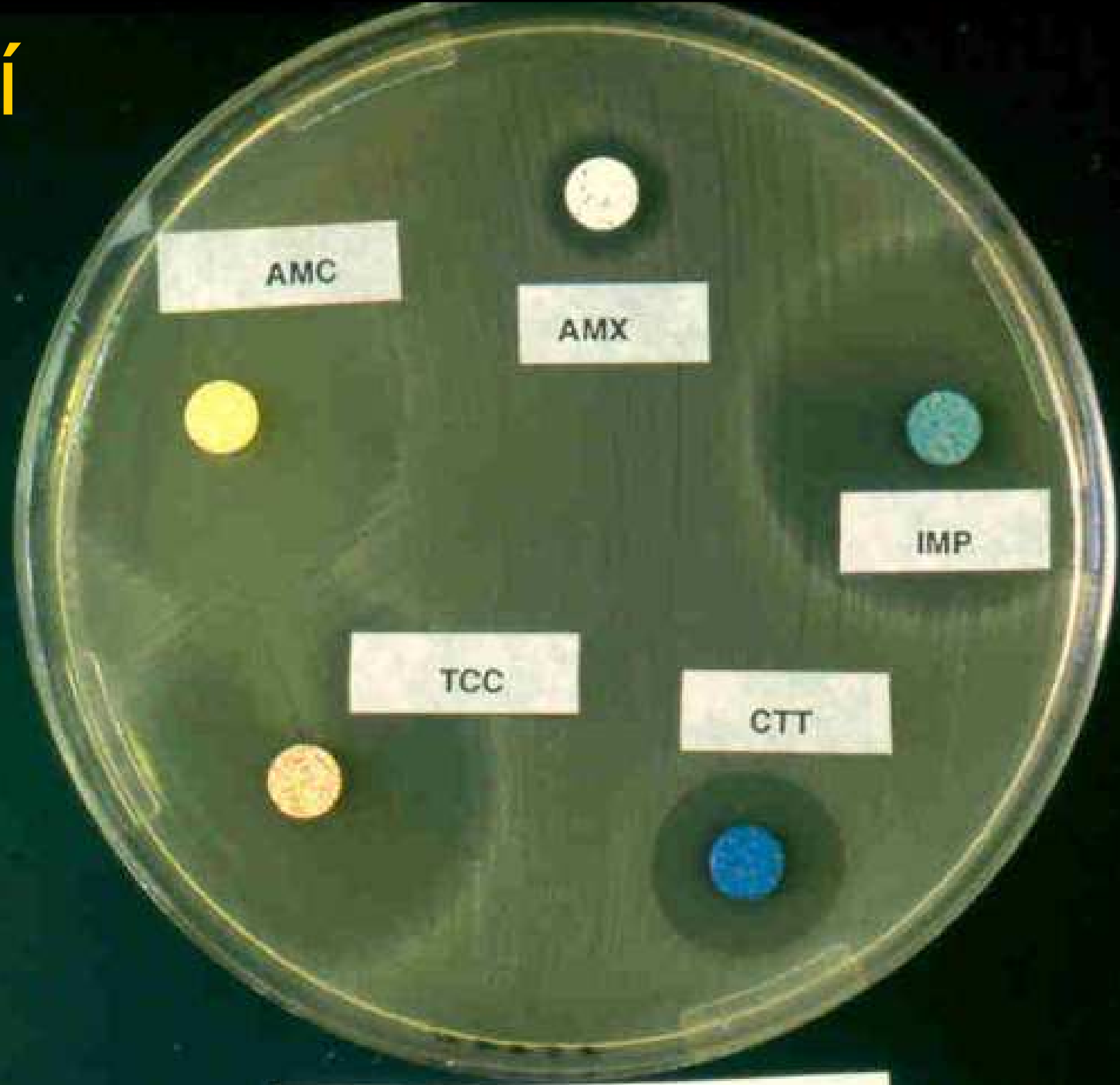
Typické citlivosti

- Typické je, že mnohé anaeroby jsou rezistentní na vankomycin. Zároveň jsou přitom citlivé na „slabší“ antibiotika, jako je penicilin či metronidazol (na snímku)



Porovnejte zóny citlivosti s referenčními zónami, uvedenými v materiálech na stole. Mějte na paměti, že zóny mohou být velmi velké a splývavé, bakterie někdy téměř není vidět.

Ilustrační foto



B. fragilis ATCC 25285

Úkol 8 – průkaz tvorby lecitinázy

- Tvorba lecitinázy se projeví **precipitací kmene na žloutkovém agaru**. Protože však lecitináz je mnoho a nás zajímá **pouze lecitináza *Clostridium perfringens***, prověříme, zda je lecitináza inhibovatelná specifickým antitoxinem.

„Negativní I“

vůbec
neprodukuje
lecitinázu.

„Negativní II“
produkuje, ale
nějakou jinou,
než nás zajímá



pozitivní
negativní I
negativní II

→ půlka s antitoxinem

Úkol 9: Průkaz toxinu pokusem na zvířeti

- Prohlédněte si videoklip, zabývající se pokusem na zvířeti. Povšimněte si zejména použité pokusné myši pro průkaz tetanu (botulickou myš byste tam hledali marně!)



Podobně jako myš se do opistotonu dostává i pacient

Použity obrázky z adres:

01-05 www2.bc.cc.ca.us/bio16/20_Nervpictures.htm.

06 http://de.wikipedia.org/wiki/Bild:Clostridium_botulinum.jpg

07 <http://www.health.qld.gov.au/EndoscopeReprocessing/Module13d.htm>

08 - 10 www.biotox.cz

11 http://medecinepharmacie.univ-fcomte.fr/bacterio_web/exa_microscopiques/ana/Clostridium_difficile_spores.htm

12 <http://kherr14.myweb.uga.edu/botulism.html>

13 <http://vietsciences.free.fr/khaocuu/nguyenlandung/cacnhomvikhuanchuyeu2.htm>

14 http://www.ecureme.com/emyhealth/data/Clostridium_Difficile_Colitis.asp

15 - 18 <http://www.niah.affrc.go.jp/disease/EM/atlas/bacteria0.html>

Clostridium prohlédnuto po stranu 5 včetně

19 <http://www.ulb.ac.be/sciences/biodic/ImBacterie20002.html>

20 21 gold.aecom.yu.edu/id/micro/anaerobicjar.htm

22 http://focus.hms.harvard.edu/2005/Sep16_2005/research_briefs.shtml

23 - 45 <http://www.geocities.com/CapeCanaveral/3504/gallery.htm>

46 - 49 www.microbes-edu.org/etudiant/anaerobies.html.

50 - 69 <http://pharmacie.univ-lille2.fr/recherche/labos/Bacteriologie/photos/index.php?album=7>

70 microvet.arizona.edu/.../c_tetani.html.

71 http://www.bbc.co.uk/czech/svet/021007_botox_pckg.shtml



Než opustíte
praktikárnu...

...pláště laskavě nepohazujte po
praktikárně, nýbrž je pověste na
věšák tak, aby nespadly.

Nashledanou při dalším dílu!

