

**Téma P07: Diagnostika anaerobních bakterií**Ke studiu: *Clostridium*; nesporeující anaeroby (učebnice, WWW atd.)

Z jarního semestru: Mikroskopie, kultivace, biochemická identifikace, pokus na zvířeti, neutralizace

**Tabulka pro hlavní výsledky úkolů 1 až 4 (k postupnému vyplnění):**

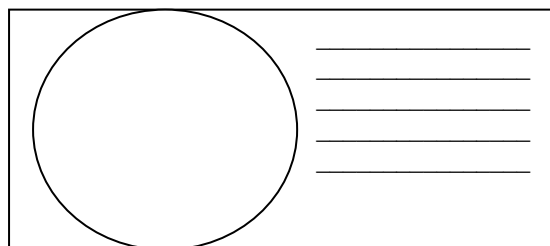
Kmen	K	L	M	N
Gramovo barvení – Úkol 1b (včetně případných údajů o tvorbě spor)				
Kultivace: úkol 3	Krevní (“KA”) Růst A/N			
	VL agar (“VLA”) Růst A/N			
	VL bujón Růst A/N			
	Popis kolonií na KA/VLA*			
<b>KONEČNÝ ZÁVĚR (výsledek Úkolu 4 – ANAEROtest, nebo, u ne-anaerobů, výsledky předchozích testů)</b>				

\*Použijte VLA (VL agar) u bakterií, které nerostou na krevním agaru

**Úkol 1: Mikroskopie klinického vzorku a mikroskopie kmene****a) Prohlídka klinického vzorku**

Prohlédněte si Gramem barvený preparát.

Pravděpodobně najdete směs různých bakterií, jak je to u anaerobních infekcí typické: za infekci nemůže jeden patogen, ale směs patogenů. Vedle bakterií můžete vidět leukocyty (zejména polymorfonukleary), případně epitelie, tkáňovou drť a tak dále.

Nezapomeňte obrázek **popsat** (použijte čáry)!**b) Mikroskopie podezřelých kmenů**

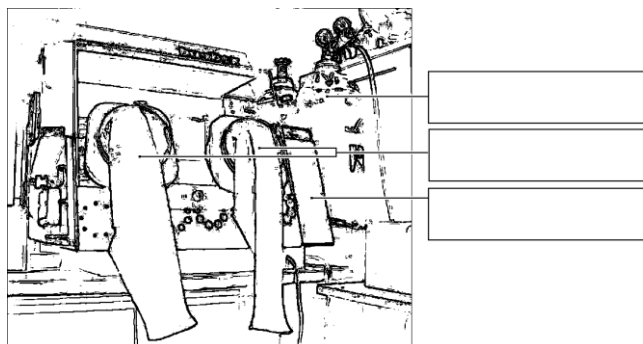
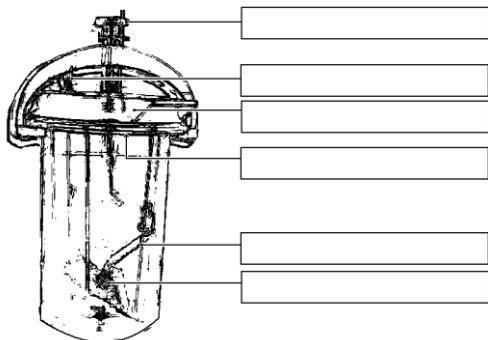
Anaerobní bakterie mohou být koky i tyčinky, grampozitivní i gramnegativní; v tom se neliší od jiných bakterií. Bývají ale pleomorfnější. U rodu *Clostridium* je přítomnost a pozice endospor užívána jako významný diagnostický znak. Pokuste se u jednoho z vašich kmenů (robustní G+ tyčinky) endospory najít.

**Úkol 2: Anaerostat a anaerobní box**

K získání anaerobiózy používáme v naší laboratoři tři způsoby:

- pro tekuté půdy se jako bariéra médium/atmosféra používá **parafinový olej** (není dokonalé)
- pevné půdy dáváme do **anaerostatu**, kde je kyslík chemicky nahrazen směsí plynů
- pevné půdy lze také umístit do **anaerobního boxu**; anaerobní atmosféra je vháněna z bomby.

Vepište do obrázků svůj popis (anaerostat uvidíte doopravdy a spolu s anaerobním boxem také na obrázku).



**Úkol 3: Kultivace na agarových půdách**

Popište kultivační výsledky daných kmenů na aerobních i anaerobních půdách.

**a) Aerobní kultivace na krevním agaru (KA)**

Napište, zda bakterie rostou či nikoli, případně též popište jejich kolonie.

**b) Anaerobní kultivace na VL agaru (VL krevním agaru)**

VL (krevní) agar je podobný krevnímu agaru, ale má snížený redoxní potenciál a kultivuje se v anaerostatu či anaerobním boxu. Napište, které kmeny zde rostou a ty, které nerostly na KA, popište.

**c) Pomnožení anaerobů ve VL bujónu**

VL bujón se používá pro pomnožení málo početných anaerobních bakterií. Zkontrolujte přítomnost zákalu (růstu) ve VL bujónu a porovnejte s výsledky části b).

**Úkol 4: Druhá diagnostika anaerobů biochemickými testy**

U kmenů určených jako anaeroby použijeme biochemický mikrotest (ANAEROTest 23 Lachema) naočkovaný o dva dny dříve. Odečtete podle schématu. Pozor, kódová kniha má tentokrát čtyři části, musíte tedy najít správnou část dle výsledků mikroskopie. Výsledky sloupců „B“ a „A“ se nezapočítávají, získáte tedy šestimístný kód za sloupce H až C.

Kmen:		H	G	F	E	D	C	B	A	Kód:	
	1									Identifikace:	
	2									% pravděpodobn.:	
	4									Index typičnosti:	
	Kód										
Kmen:		H	G	F	E	D	C	B	A	Kód:	
	1									Identifikace:	
	2									% pravděpodobn.:	
	4									Index typičnosti:	
	Kód										

Notes:

**Úkol 5 Citlivost anaerobů na antibiotika**

Na stole naleznete difusní diskové testy citlivosti na antibiotika u kmenů, které jste určili jako G– koky a které patří k patogenním druhům. Do tabulky dopište zkratky antibiotik dle přiložené kartičky a pro všechny testované kmeny změřte zóny citlivosti. Na kartičce máte napsány hraniční zóny – podle nich interpretujte zóny vámi zjištěné jako citlivé (C), rezistentní (R) a dubiózní (D).

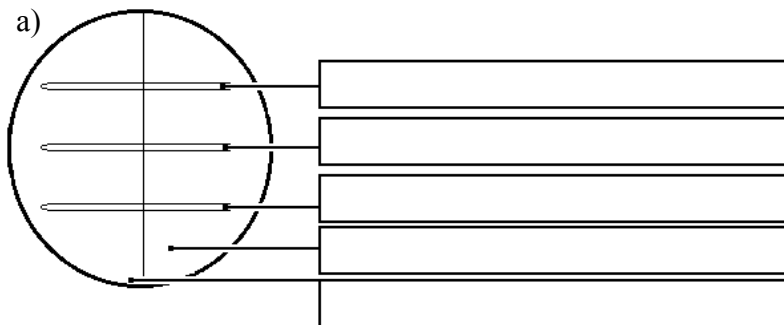
Kmen →				
Antibiotikum (celé jméno)	Ø zóny (mm)	Interpretace	Ø zóny (mm)	Interpretace

### Úkol 6: Detekce toxinů klostridií

U klostridií se používají různé testy produkce toxinu.

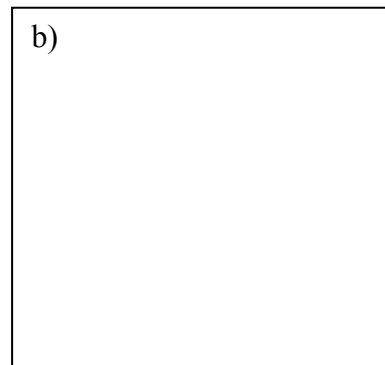
#### a) Průkaz toxinu (lecitinázy) *Clostridium perfringens*

*Clostridium perfringens* tvoří specifickou lecitinázu, neutralizovatelnou specifickou protilátkou. Polovina vaší misky je potřena protilátkou (anti-lecitinázou), druhá potřeba není. Toxický efekt lecitinázy spatříte jako oblast precipitace kolem kmene na žloutkovém agaru. Pravý toxin je neutralizován antitoxinem, jiné lecitinázy neutralizovány nejsou. Zakreslete výsledek do obrázku a přičiňte popis.



#### b) Průkaz toxinu *Clostridium tetani*

Zakreslete (dle prezentace) obrázek tetanické myši. Pověšiměte si pozice ocásku a končetin.



#### c) Detekce A a B toxinů *Clostridium difficile*

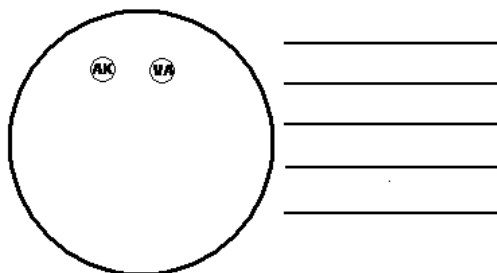
Pseudomembranózní kolitida způsobená toxiny *Clostridium difficile* je velmi nebezpečná, zejména u hospitalizovaných pacientů. Testování se provádí imunochromatografickým testem, který již byl prováděn v praxi J09. Pro praxi je důležité, že na toto vyšetření je nutno zasílat kusovou stolici (NESTACÍ výtěr z řiti). Prohlédněte výsledek průkazu toxinů A + B *Clostridium difficile* ve vzorcích stolice X and Y a zapište výsledky:

Vzorek X je pozitivní – negativní

Vzorek Y je pozitivní – negativní

### Úkol 7: Ukázka hledání anaerobů mezi fakultativně anaerobní flórou

V praxi (především u poševních výtěrů) je často nutné hledat anaeroby mezi jinými bakteriemi. Pro tento účel se používají misky s disky. Amikacin je účinný proti gramnegativním bakteriím, vankomycin proti grampozitivním; anaeroby však bývají rezistentní. Vyznačte, na kterém místě se zpravidla vyhledávají anaeroby, případně zaznamenejte i další nálezy. Při této kultivaci jsou často viditelné laktobacily (drobné šedé kolonie s viridací). Jsou mikroaerofilní, avšak naše (nedokonalá) anaerobióza jim vyhovuje rozhodně více než aerobní prostředí.



#### Kontrolní otázky:

1. Kde se v lidském těle vyskytují za fyziologických podmínek anaerobní bakterie? Jak se dostávají do jiných tkání, kde pak způsobují záněty?
2. Jaké jsou principy odběru a transportu vzorku při podezření na anaerobní infekce?
3. Pro která klostridia je typické

a) zbaštění jejich neurotoxinu?	b) neurotoxin šířící se z lokálního zánětu?
c) histotoxin vedoucí k plynatému sněti (jmenujte alespoň jedno)?	d) pseudomembranózní kolitida?

4. Jmenujte alespoň tři antibiotika vhodná k léčbě anaerobních infekcí