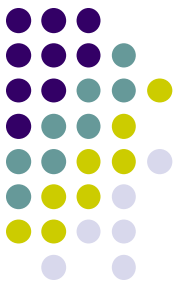


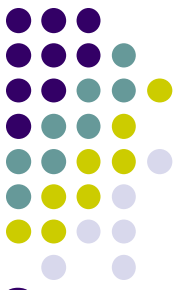
P07

**DIAGNOSTIKA
ANAEROBNÍCH
BAKTERIÍ**





- Jaký je nejčastější původce angíny?
Streptococcus pyogenes
- Které bakterie rostou na Endově půdě?
Enterobakterie, *Vibrionaceae* a nefermentující
- Které jsou obligátně patogenní enterobakterie?
Yersinie, salmonelly, shigelly
- Jak poznáte fermentaci glukózy?
Změnou barvy Hajnovy půdy



- Na jaké půdě roste gonokok?
Na čokoládovém agaru
- Jaká je typická mikroskopie u neisserií a moraxel?
Gramnegativní diplokoky, intraleukocytární
- Jaká je u neisserií a moraxel OXI a INAC?
Oxidáza pozitivní u obou (**modrá**), INAC u moraxel (**zelená**)
- Které faktory vyžaduje *H. influenzae*?
X- hemin, V- NADP
- Které bakterie tvoří spóry?
Bacily, klostridie

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 – Extremely oxygen sensitive) běžně nelze kultivovat

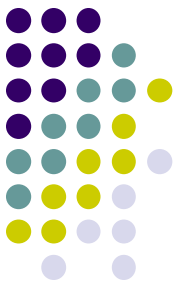


Co jsme znali doted'

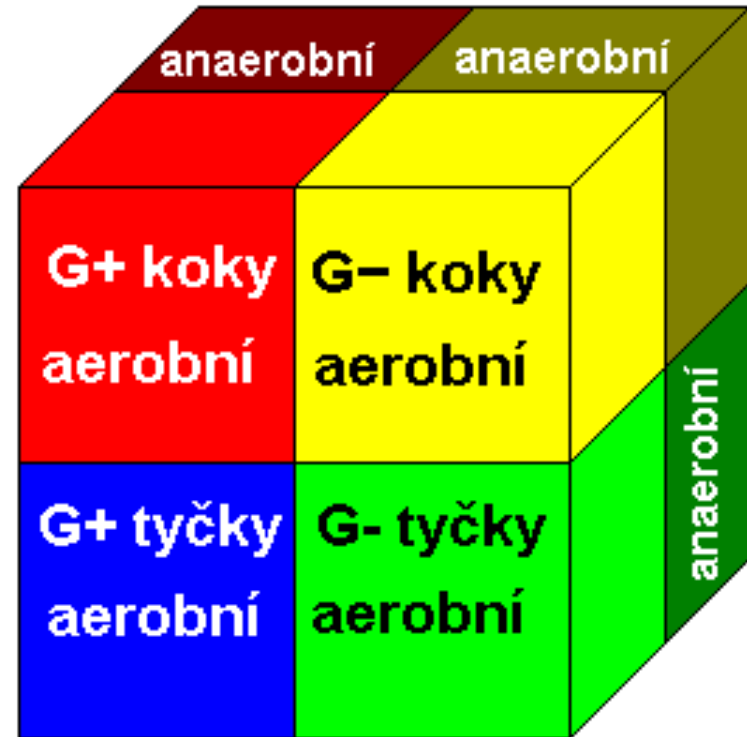
- V prakticích P1 až P6 jsme se seznámili se čtyřmi skupinami mikrobů, které rostou za aerobních podmínek – ať už jsou striktně aerobní jako např. pseudomonády, nebo fakultativně anaerobní jako třeba *Escherichia coli*.

| | |
|----------|----------|
| 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





Praktická poznámka

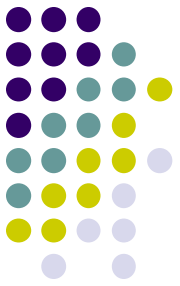
- Pokud chce klinik, aby byl jeho vzorek prověřen na přítomnost **anaerobů**, mykobakterií či aktinomycet, musí to uvést na průvodce. Musí se užít speciální postupy.
- U dalších původců (třeba spirochet či chlamydií) se navíc zpravidla odebírá **sérum** a provádí se nepřímý průkaz
- To si pamatujte hlavně pro budoucí praxi.

Rod *Clostridium*



- Grampozitivní (relativně velké) tyčinky
- Schopny tvořit spóry-vyklenují buňku
- Rostou za anaerobních podmínek v prostředí s nízkým redoxním potenciálem, některé tolerují malé množství kyslíku v prostředí
- Vyskytují se jako saprofyté ve střevě zvířat a člověka (hnilobné procesy), spóry v prostředí (v půdě, bahně rybníků, v řekách, v prachu i na vegetaci)
- Jen málo patogenních druhů. Způsobují neurotoxikózy, enterotoxikózy, a nekrotizující infekce měkkých tkání (vysoká smrtnost)

Neurotoxická klostridia



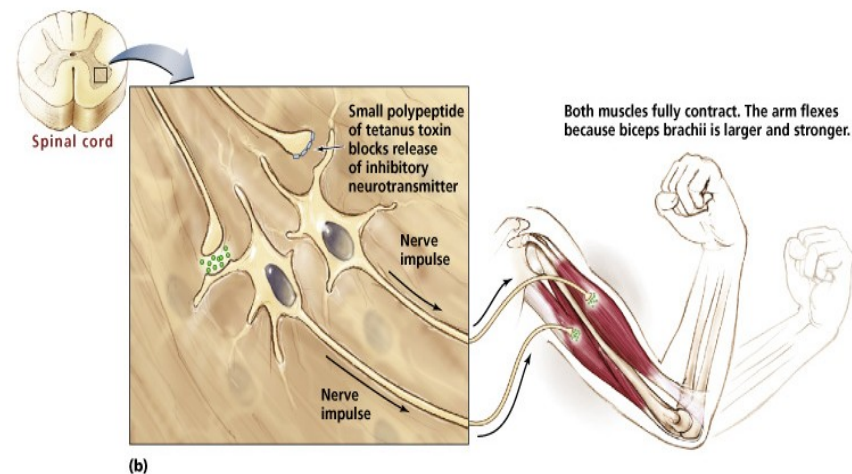
Clostridium tetani

- Štíhlé tyčinky tvořící endospóry uložené terminálně (paličky na buben)
- Součást normální střevní mikroflóry savců, zejména koní, spóry v půdě
- Původce **tetanu (ztrnutí šíje)**



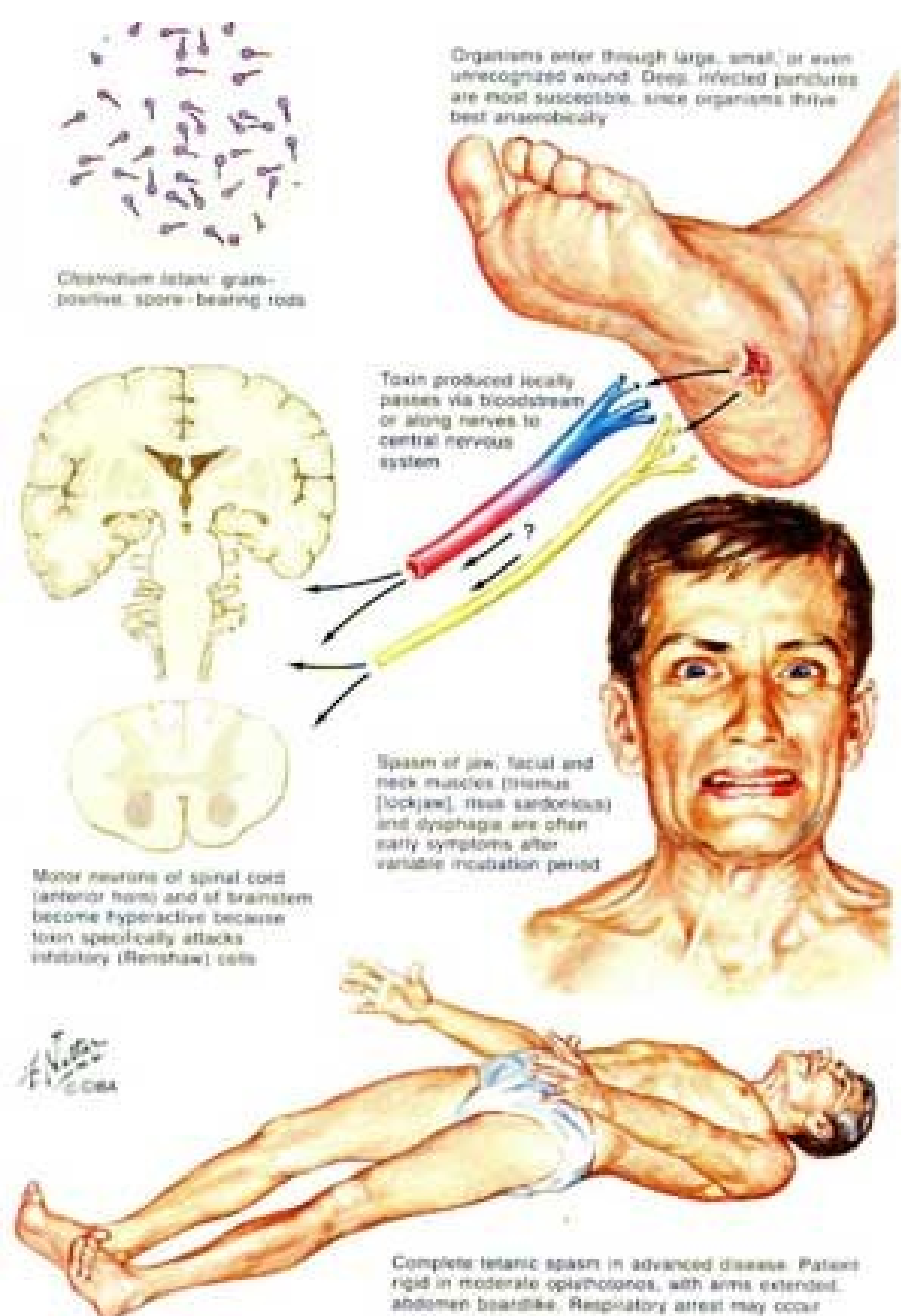
Tetanus

- Endogenní (vagina či střevo člověka) či **exogenní**
- Sporami infikované hlubší znečištěné či zhmožděné rány, v ráně klíčení spór
- Za klinické projevy infekce je zodpovědný **tetanický toxin**, který blokuje inhibici motorických neuronů (brání uvolňování mediátorů této inhibice)
- Projevuje se **tonickými křečemi** příčně pruhovaného svalstva

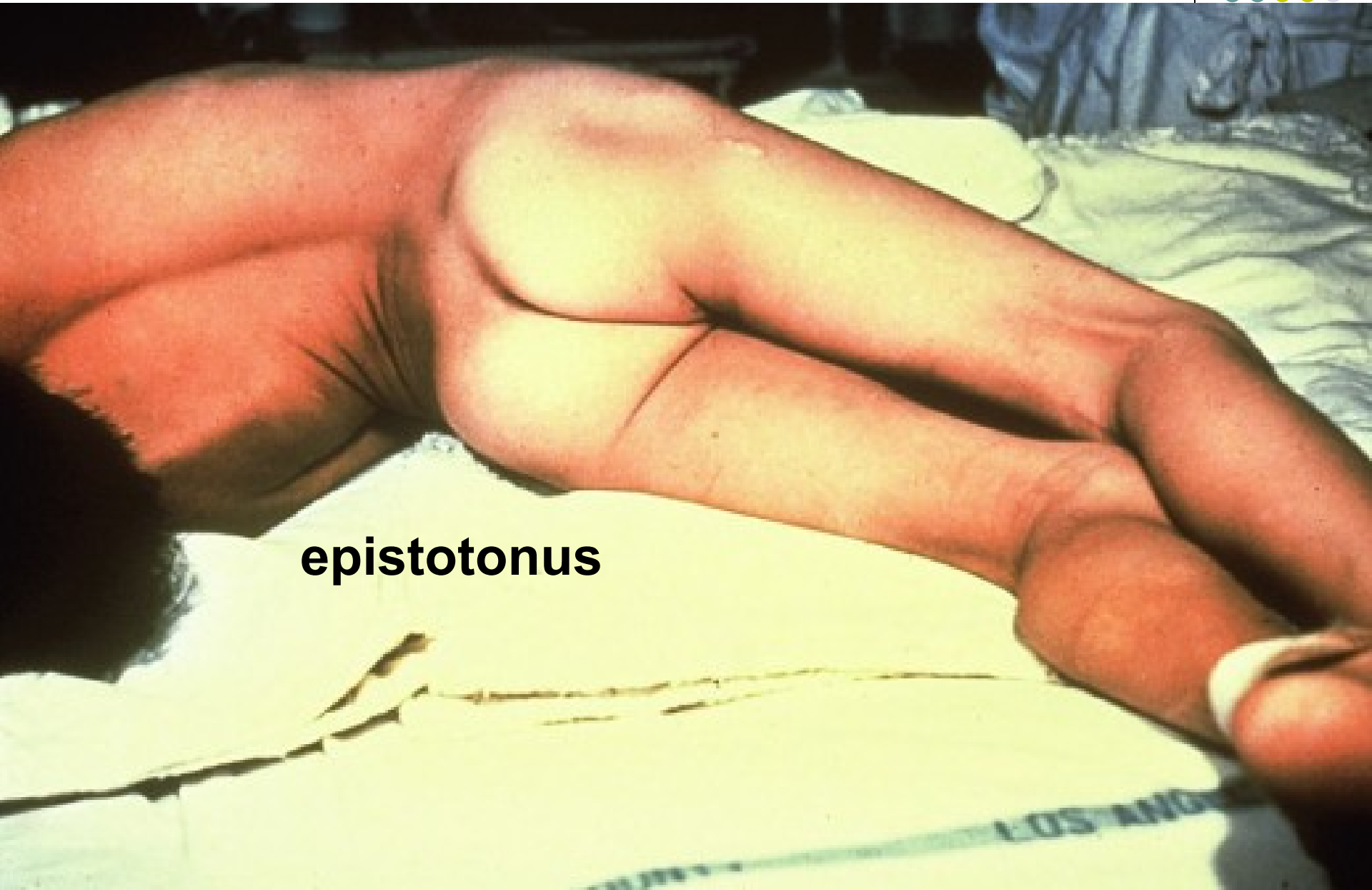


Tetanus

- Žvýkáčcí svaly (trismus)
- Mimické svaly
- Spasmy svalů trupu
- Postižení dýchacích svalů
- Svalové ruptury, zlomeniny
- Srdeční zástava



Tetanus



epistotonus

Clostridium botulinum



- Ve střevním ústrojí zvířat, spóry v půdě, prachu, ve vodě, kontaminanta potravin
- Původce **botulismu**.
- Typy:
 - **Kojenecký** botulismus- toxin produkován ve střevě dítěte, *C. botulinum* se zde pomnoží
 - **Traumatický** botulismus
 - **Alimentární** botulismus

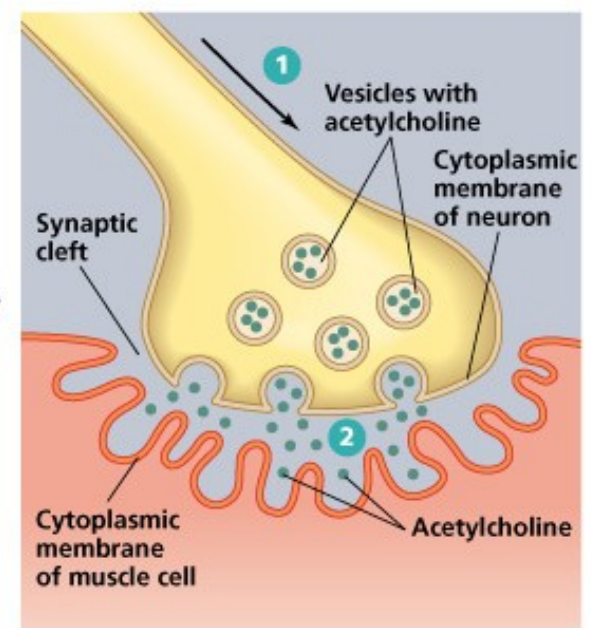
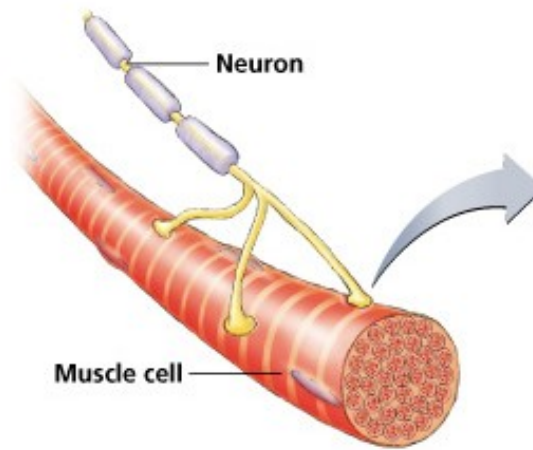
Alimentární botulismus

- Zde původce vůbec nevstupuje do těla. Jen jeho toxin (**botulotoxin**) vstupuje do těla (zpravidla z nedostatečně upraveného konzervovaného masa- domácí konzervy)
- Opět účinkuje jako neurotoxin (zabraňuje uvolňování acetylcholinu do synapse a dochází k přerušení vedení vzruchu)
- Vyvolává **obrny- paralýzy příčně pruhovaných svalů**

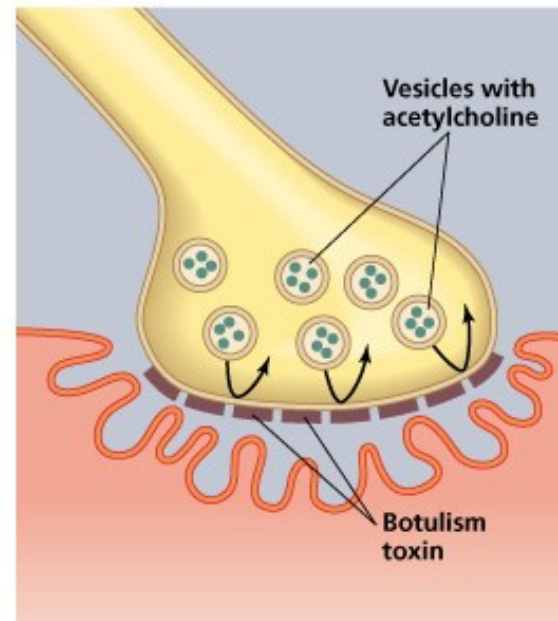
gastrointestinální projevy, rozostřené vidění, ztížené polykání, poruchy artikulace, zástava střevní peristaltiky, zástava močení



Botulismus



(a) Normal neuromuscular junction



(b) Neuromuscular junction with botulism toxin present

Histotoxická klostridia

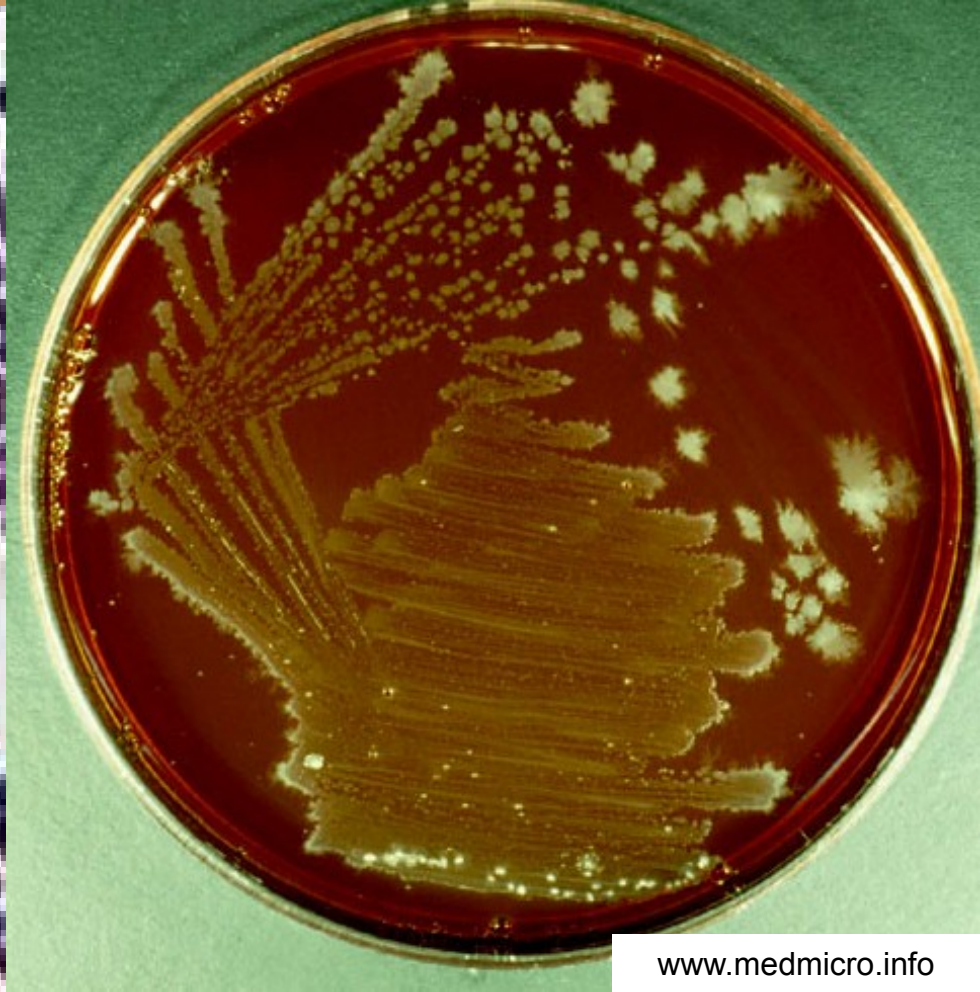
Clostridium perfringens

- Jeden z původců **plynaté sněti** (spolu s *C. novyi*, *C. septicum* aj.)- infekce měkkých tkání (nekróza kůže, podkoží a svalstva)
- Plynatá sněť je typické **válečné onemocnění**. Může se však vyskytnout i při živelných pohromách
- **Klostridia plynatých snětí** – respektive jejich enterotoxiny – se také uplatňují jako patogeny ve střevě
- Exogenní a endogenní infekce



Clostridium perfringens

<http://www.geocities.com>



Clostridium difficile

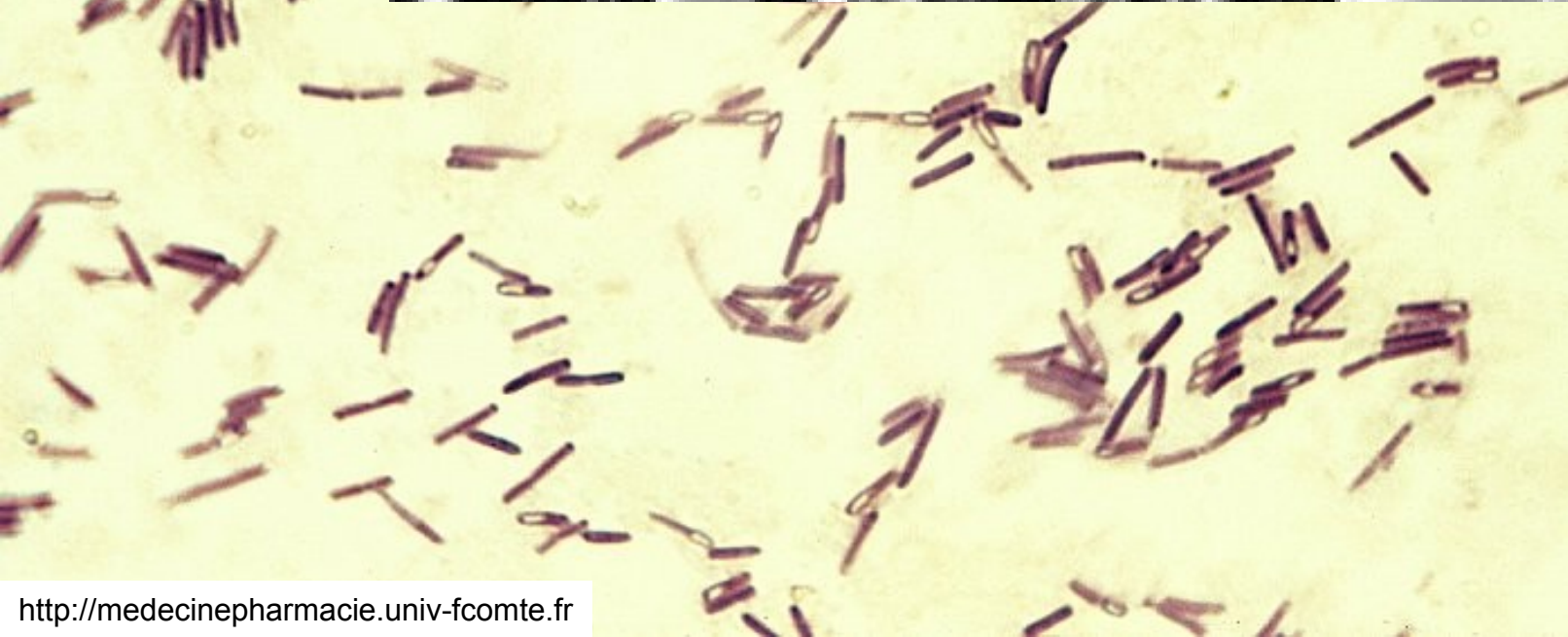
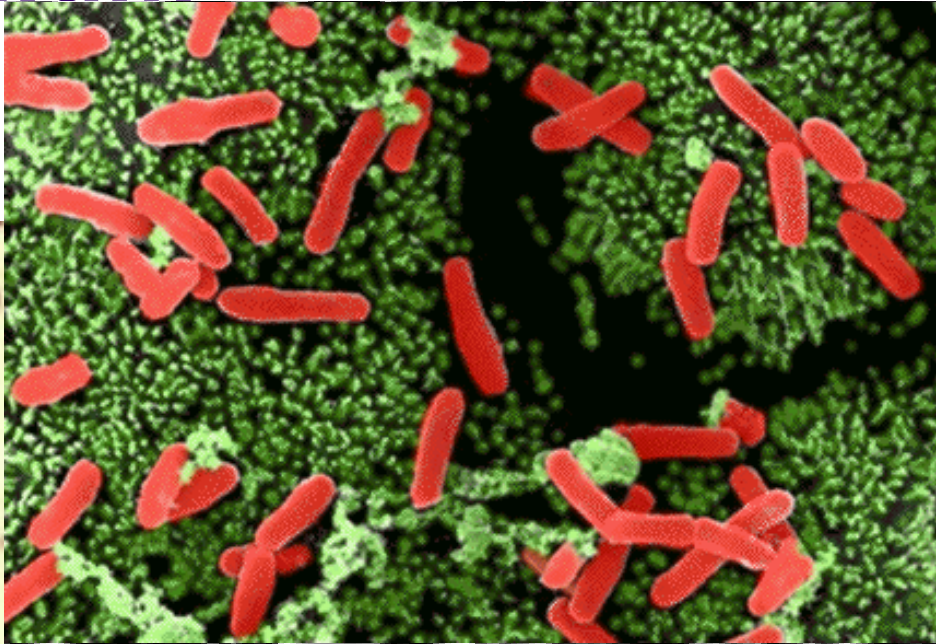
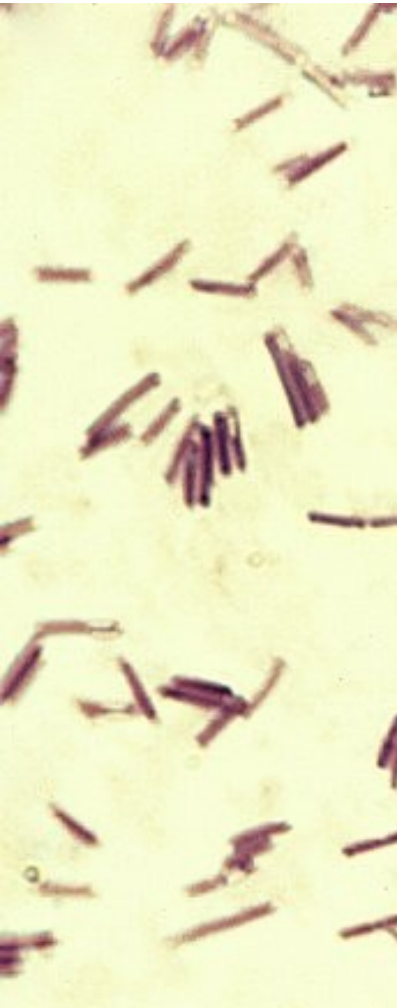


- Tento mikrob se vyskytuje ve střevě celkem běžně, problém však je, když začne produkovat toxin, a především, když mu někdo odstraní konkurenci a on se přemnoží.
- Odstranění konkurence způsobí nejčastěji **léčba některými typy antibiotik**, nejčastěji linkosamidy. **Linkosamidy** jsou účinné proti většině striktně anaerobních bakterií, nikoli však proti *C. difficile*.
- Lehčí průjemová onemocnění až **pseudomembranózní enterokolitidy** (často nozokomiální nákazy)
- Poškození střevního epitelu, kumulace tekutin ve střevě, nekróza nakažených tkání
- Dnes se k léčbě používá nejčastěji bakteriální chemoterapeutikum **metronidazol**

Clostridium difficile

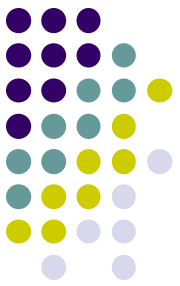
sitemaker.umich.edu

<http://www.health.qld.gov.au>



<http://medecinepharmacie.univ-fcomte.fr>

Přehled klostridií



| | |
|---|--|
| <i>C. tetani</i> | Původce tetanu |
| <i>C. botulinum</i> | Producent botulotoxinu |
| <i>Clostridium perfringens</i> , <i>C. septicum</i> aj. | Klostridia plynatých snětí (+ enteropatogenita) |
| <i>C. difficile</i> | Enteropatogenní |

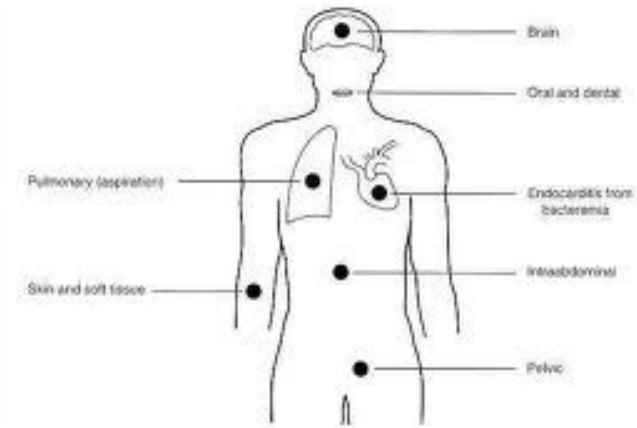
Je potřeba si uvědomit, že i klostridia se úplně normálně podílejí na běžné střevní mikroflóře. Problém nastává, pokud se přemnoží, dostanou tam, kam nemají, vyskytne se kmen produkující velké množství toxinu apod.



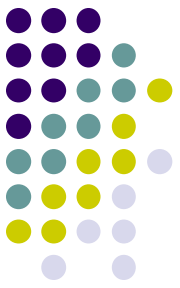
Společné charakteristiky nesporelujících anaerobů

- 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, který 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
 - Některé i na kůži

- Při zánětu obvykle neexistuje jeden původce, ale uplatňuje se směs. Někdy se používá termín „Veillonova flóra“
- Směs striktně anaerobních, ale i fakultativně anaerobních bakterií
- Nesporující striktně anaerobní mikroby mají vzhledem ke svým vlastnostem velmi omezené možnosti přenosu.
- Velká část infekcí je tedy endogenního původu



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, Leptotrichia</i> * <i>Bacteroides, Prevotella,</i> <i>Porphyromonas</i> ** |

*se zašpičatělými konci

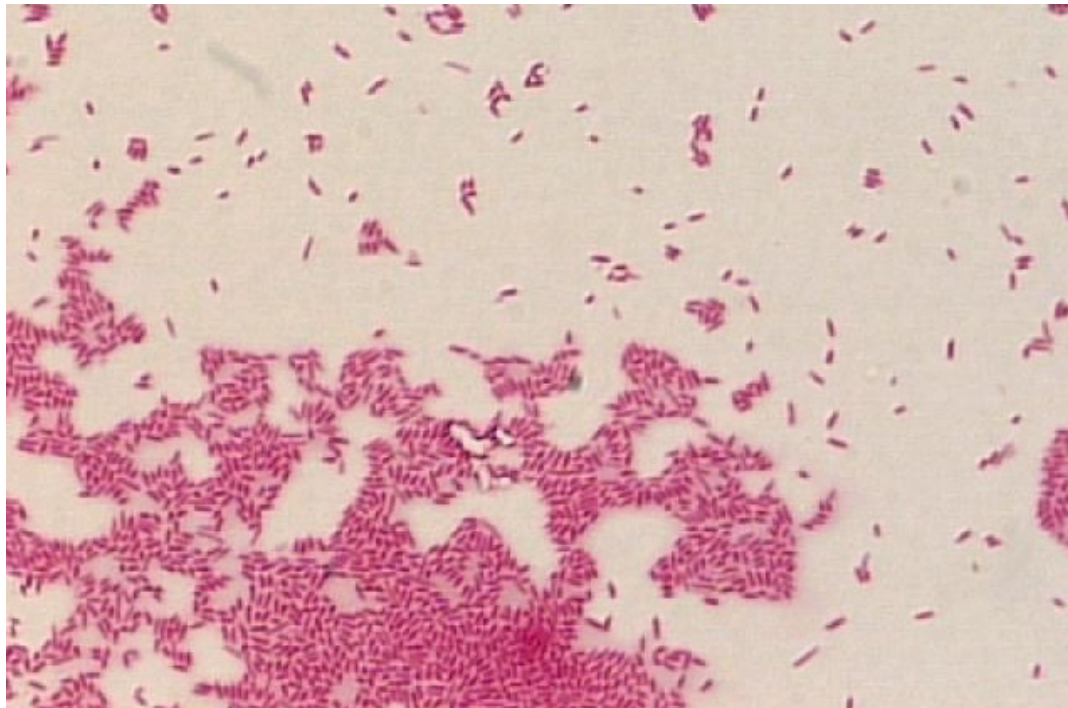
**s rovnými konci tyčinky

***není stoprocentní anaerob

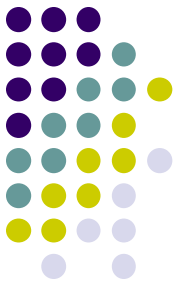
Bacteroides fragilis



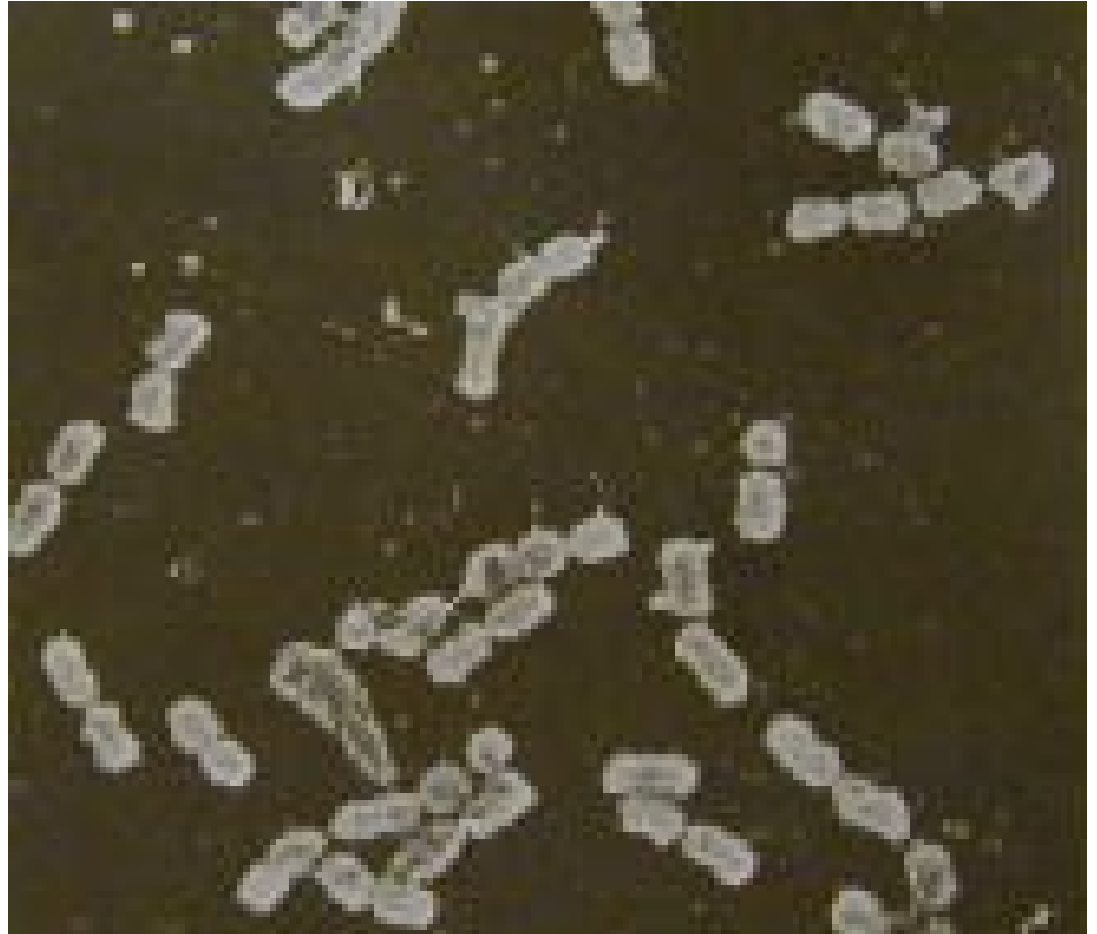
- Pleomorfní tvary (koky, tyčinky či vlákna)
- Běžně obývají zažívací trakt, dutinu ústní či vaginu, kde se také mohou uplatnit jako patogeny



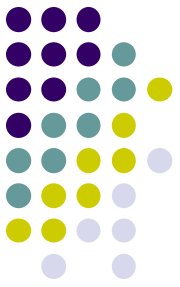
Porphyromonas gingivalis



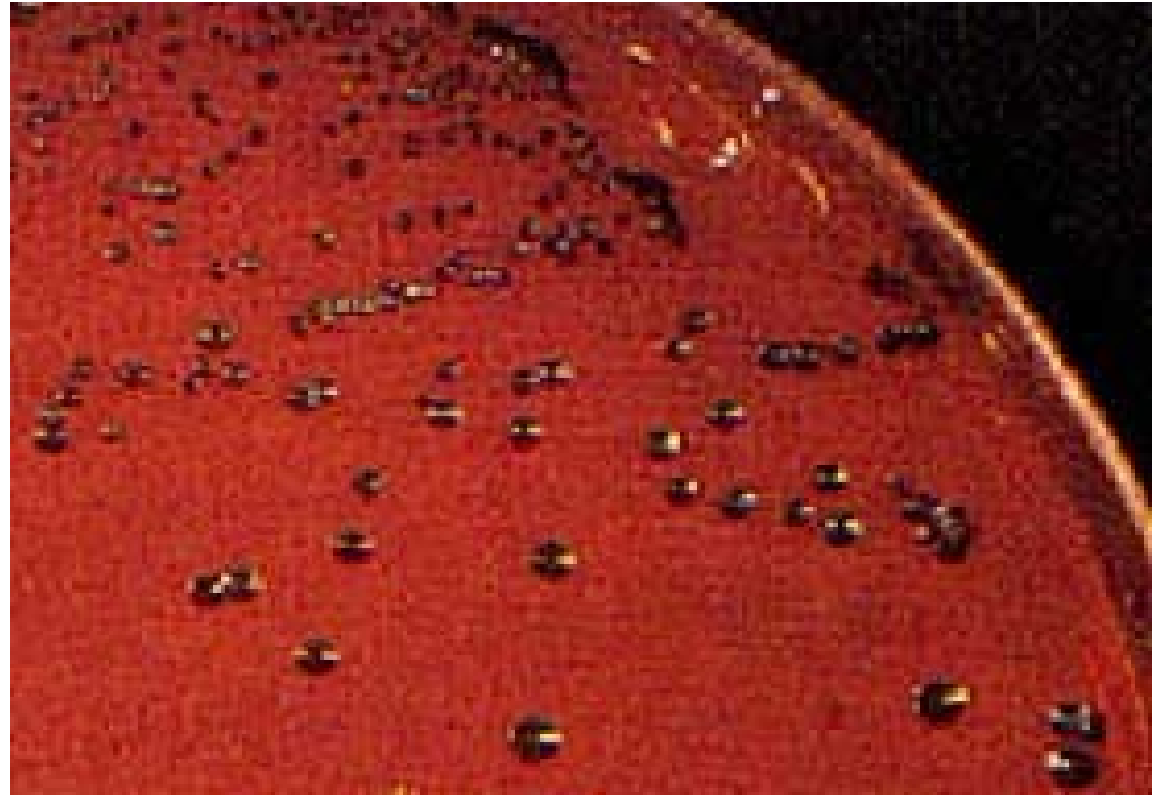
- Hnědočerně pigmentované kolonie
- Dutina ústní, Urogenitální trakt



Prevotella melaninogenica

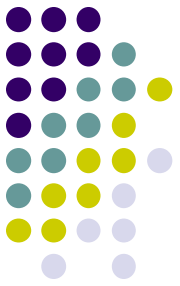


- Černý pigment
- Onemocnění
HCD (anginy,
sinusitidy)



Gingivostomatitis: *Prevotella gingivalis*

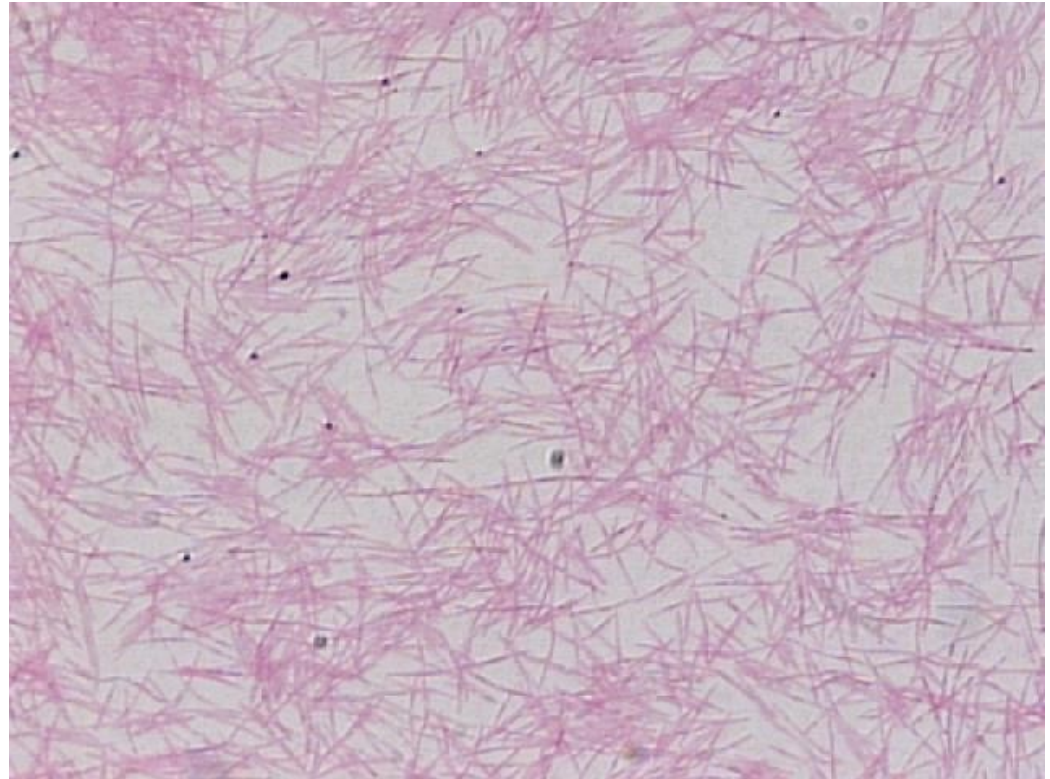
www.mamagums.com



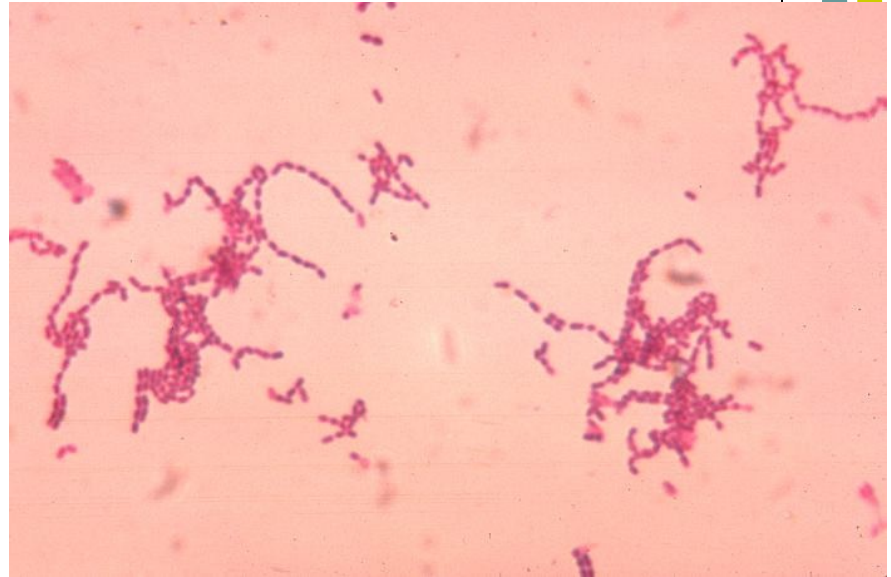
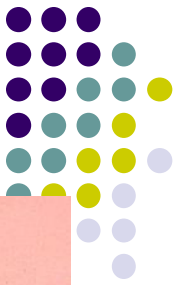
Fusobacterium sp.



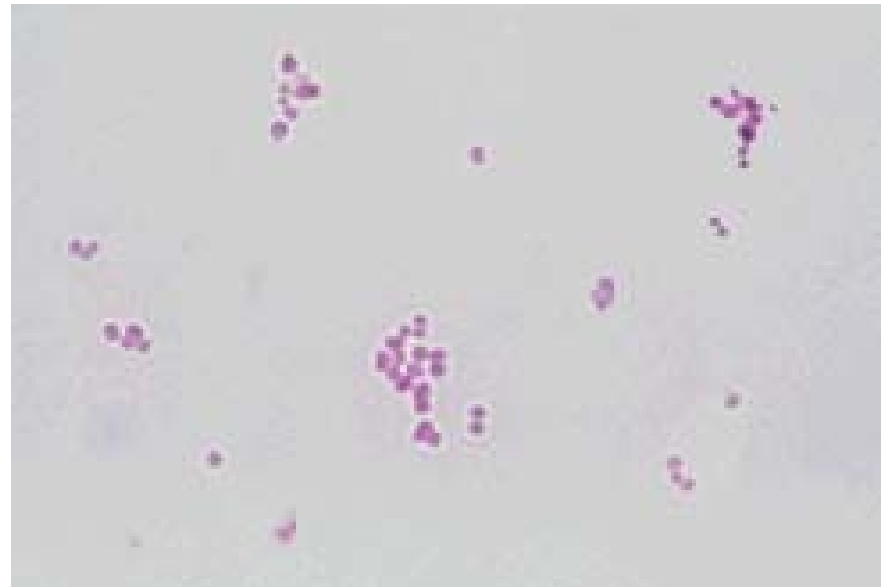
- Polymorfní bakterie (vlákna)
- Pleuropulmonární infekce, chronické sinusitidy, mozkové abscesy...

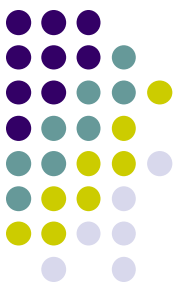


Peptostreptococcus sp.



Veillonella sp.





Diferenciální diagnostika– 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 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

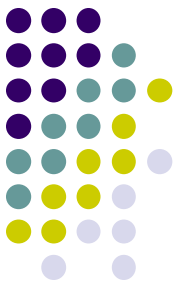


Diferenciální diagnostika– II

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



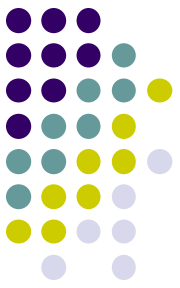
Tetanická myš



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 (uvidíte ho ještě jednou)



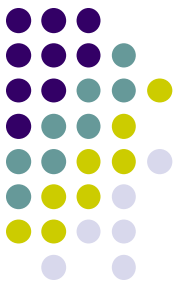
Anaerostat

Palladiový kalalyzátor
(pod víčkem) nezbytný
pro druhou fázi reakce

Generátor anaerobiózy
(sáček s chemikáliemi)
nutný pro celou reakci



Úkol 1a + 1b: mikroskopie vzorků a 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

Úkol 2a: Anaerostat

šroubovací uzávěr

tlakový ventil

vzduchotěsné víčko

palladiový kalalyzátor
(pod víčkem)

konstrukce pro
ukládání Petriho misek

Generátor anaerobiózy
(sáček s chemikáliemi)



Úkol 2b: Anaerobní box

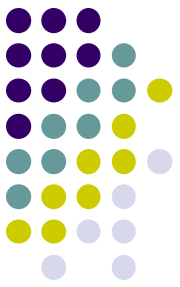


zdroj anaerobních
plynů

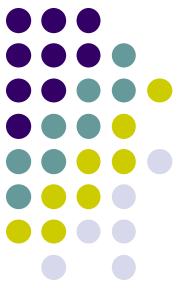
prostor pro
vkládání misek

vstupy pro ruce
personálu

Úkol 3: Kultivace bakterií



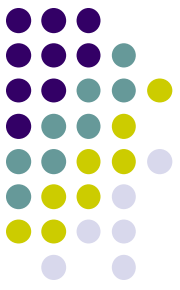
- Zjistěte, kde co roste, a to co roste, popište.
- Všimněte si, že anaerobní bakterie rostou často v drobných, nepravidelných koloniích, které mají někdy výběžkaté okraje. Typický je pro ně také značný zápach.
- **Úkol 3a:** Aerobní kultivace na krevním agaru umožňuje růst striktně aerobních a fakultativně anaerobních bakterií. Když tu tedy bakterie neroste, avšak roste na anaerobních půdách, je to striktní anaerob.



Úkoly 3b a 3c

- V úkolu 3b zapište vzhled kolonií bakterií na VL (krevním) agaru
- V úkolu 3c zapište vzhled růstu kmenů bakterií ve VL bujónu
- Všimněte si toho, že z našich čtyř kmenů jen dva jsou striktní anaeroby. Jeden je fakultativní anaerob a jeden je striktní aerob

Úkol 4: Biochemické rozlišení



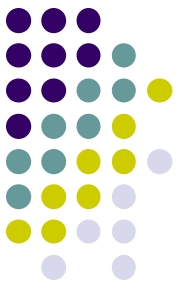
- Používají se různé testy, v našich podmínkách především ANAEROtest 23 (Erba Lachema).

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

Úkol 5 – testy antibiotické citlivosti



- Antibiotická citlivost se u anaerobů 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* (rody *Prevotella* a *Porphyromonas*, které se z něj kdysi odštěpily, jsou citlivé)

Úkol 6a – průkaz tvorby lecitinázy



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

„Negativní I“

vůbec

neprodukuje

lecitinázu.

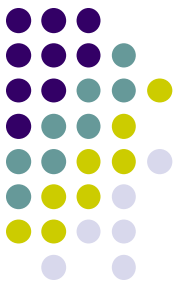
„Negativní II“

produkuje, ale

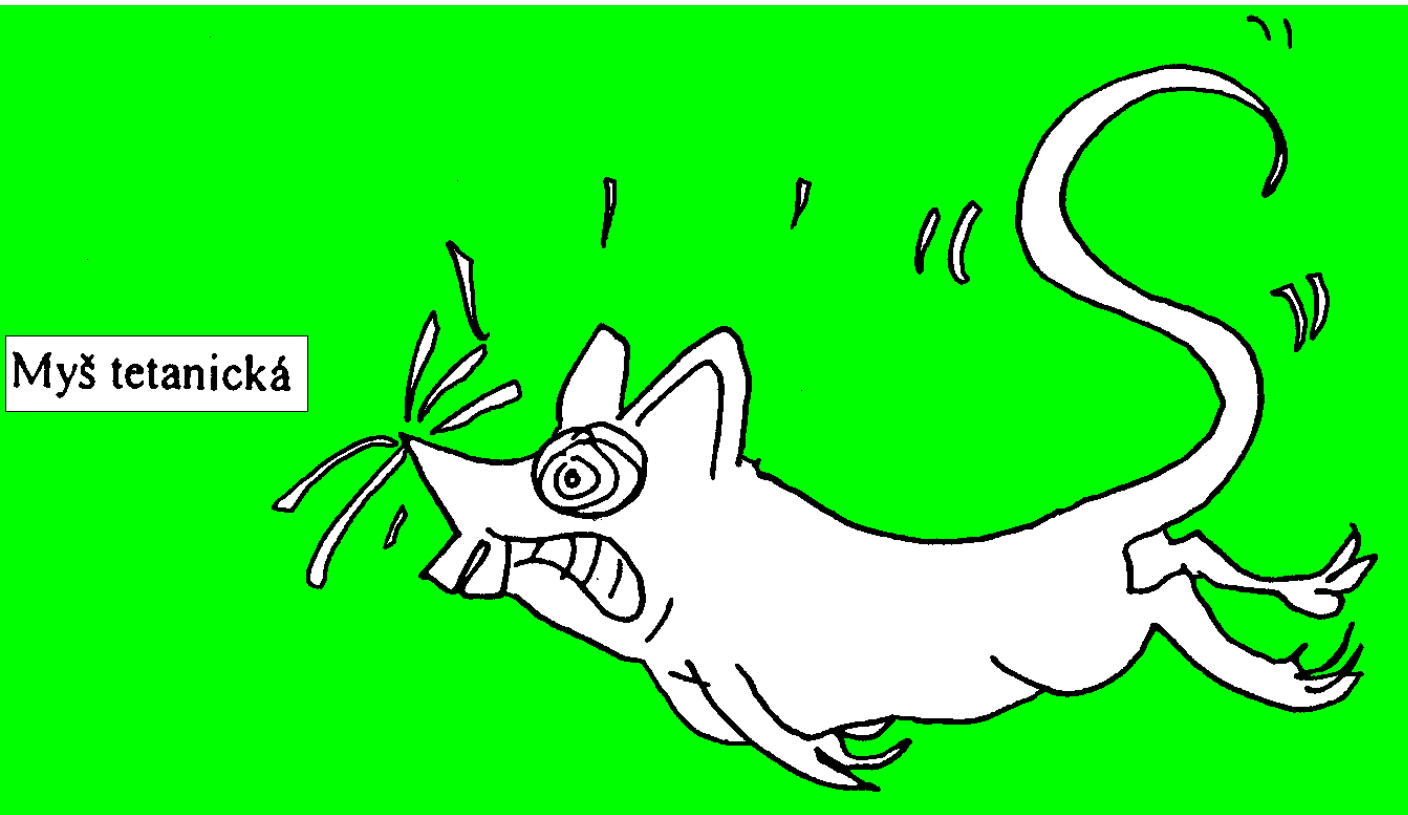
nějakou jinou,

než nás zajímá

Úkol 6b: Průkaz toxinu pokusem na zvířeti



- Prohlédněte si obrázek tetanické myši.



Obrázek Petra Ondrovčíka
(1959–2007)

www.biotox.cz

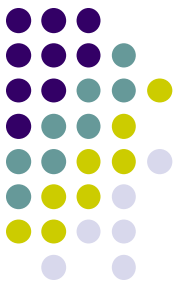


Podobně jako myš se do opistotonu dostává i pacient

Úkol 6c: Imunochromatografický průkaz toxinu *C. difficile*

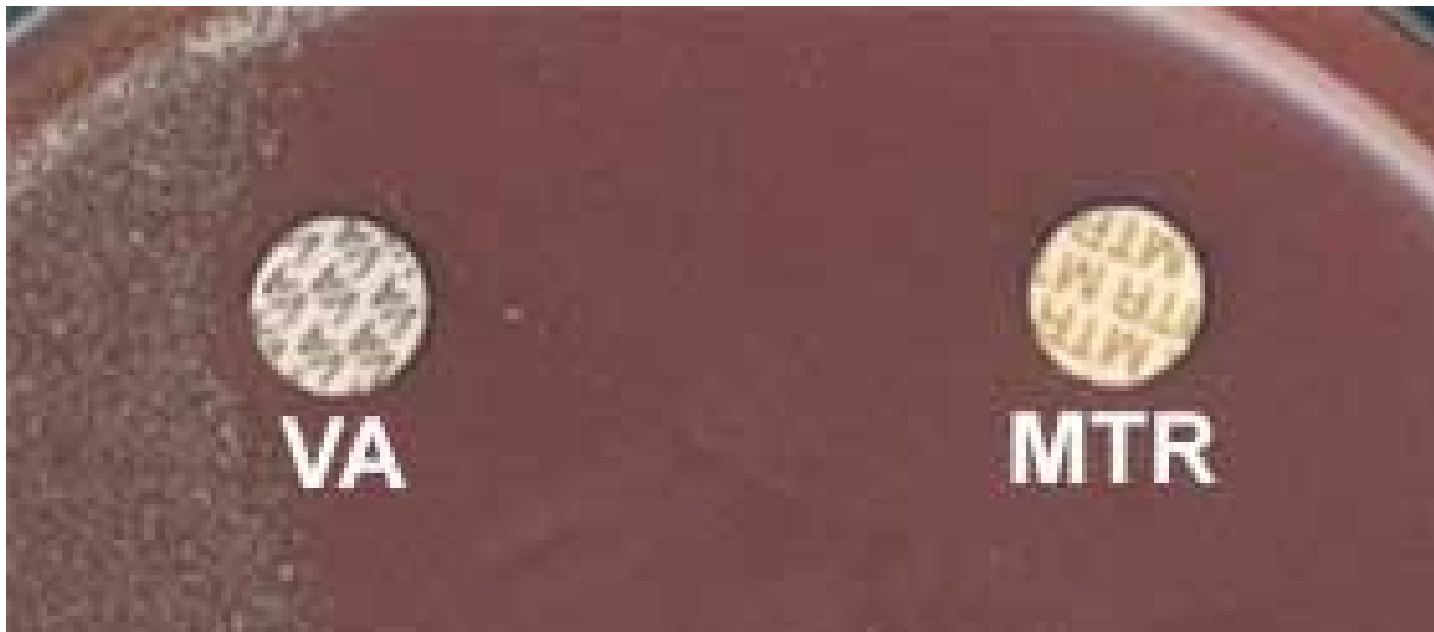
- Imunochromatografické testy jsou založeny na **navazování jednotlivých komponent**, podobně jako u reakcí ELISA či a imunofluorescence
- Nejklasičtějším příkladem je **těhotenský test**
- Týká se především kmenů ***Clostridium difficile* produkujících toxin.**

V **pozitivním** případě je zpravidla viditelný **proužek reakce i proužek kontroly** . V negativním případě je viditelný pouze proužek kontroly.

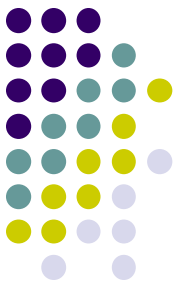


Typické citlivosti

- Typické je, že mnohé anaeroby jsou rezistentní na **vankomycin** a/nebo **amikacin**. (Zároveň jsou přítom citlivé na „slabší“ antibiotika, jako je **penicilin** či **metronidazol**; na snímku)



Úkol 7



- Podívejte se na VL s disky vankomycinu a amikacinu. Anaerobní bakterie zpravidla rostou mezi těmito dvěma disky. Vaše agary jsou na anaeroby negativní (případně může být přítomno několik málo kolonií anaerobů)
- Na druhé straně můžete vidět mnoho kolonií **poševních laktobacilů**, mikroaerofilních bakterií často nalézaných v poševních výtěrech.