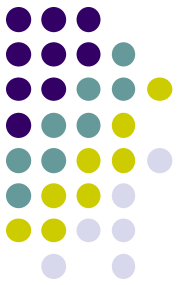


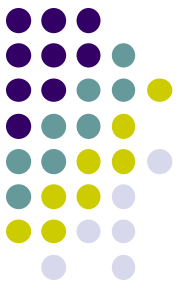
P07 + P08

**DIAGNOSTIKA ANAEROBNÍCH
A ACIDOREZISTENTNÍCH
BAKTERIÍ**



ANAEROBNÍ BAKTERIE

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 (aerotolerantní)
- 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



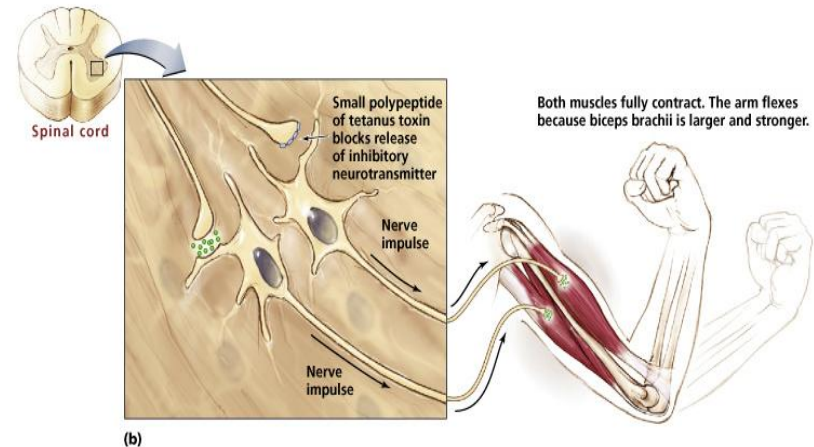
Clostridium tetani

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



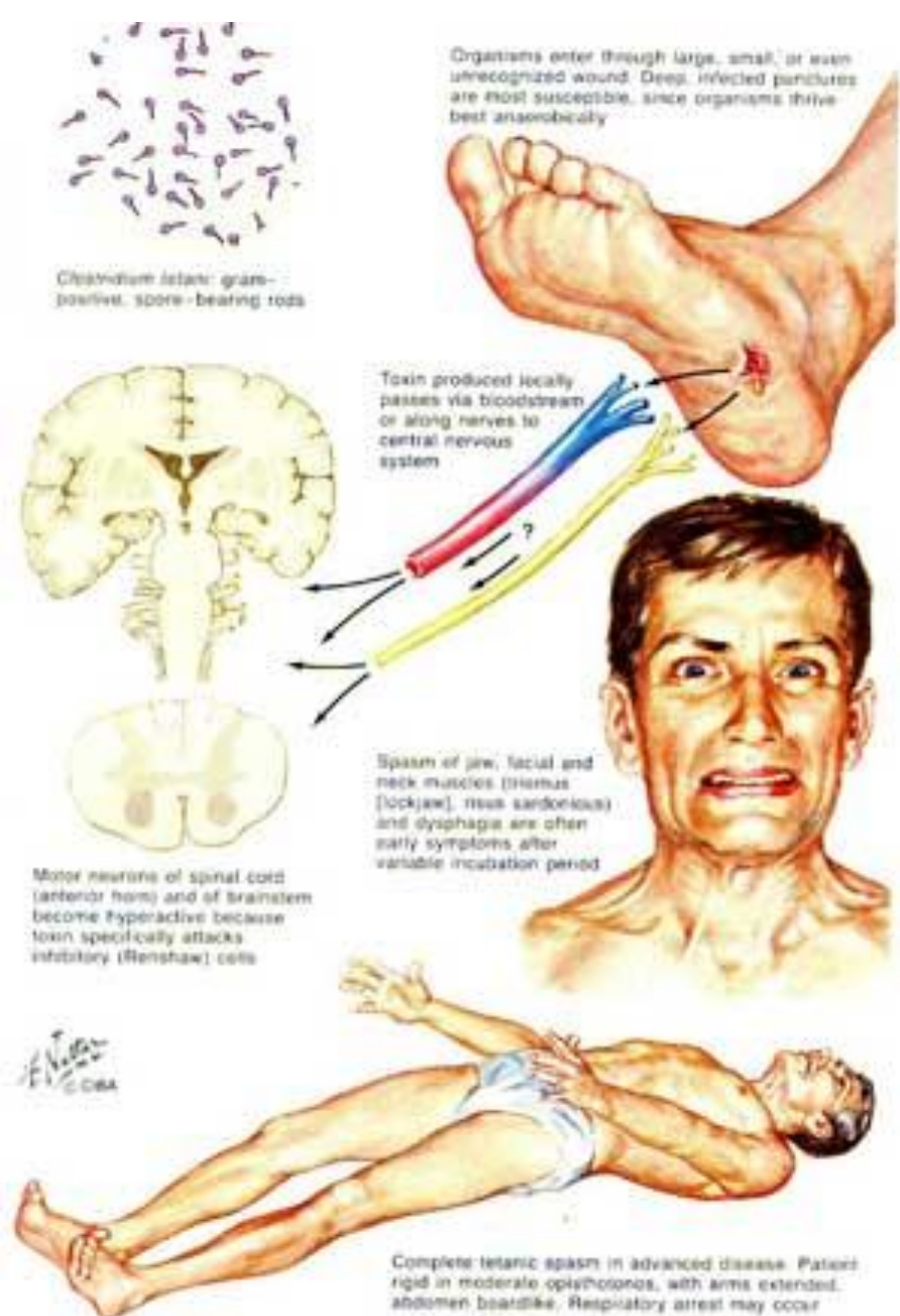
Tetanus

- **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 (tetanospasmin)**, který blokuje inhibici motorických neuronů (brání uvolňování mediátorů této inhibice)
- Projevuje se **tonickými křečemi** příčně pruhovaného svalstva

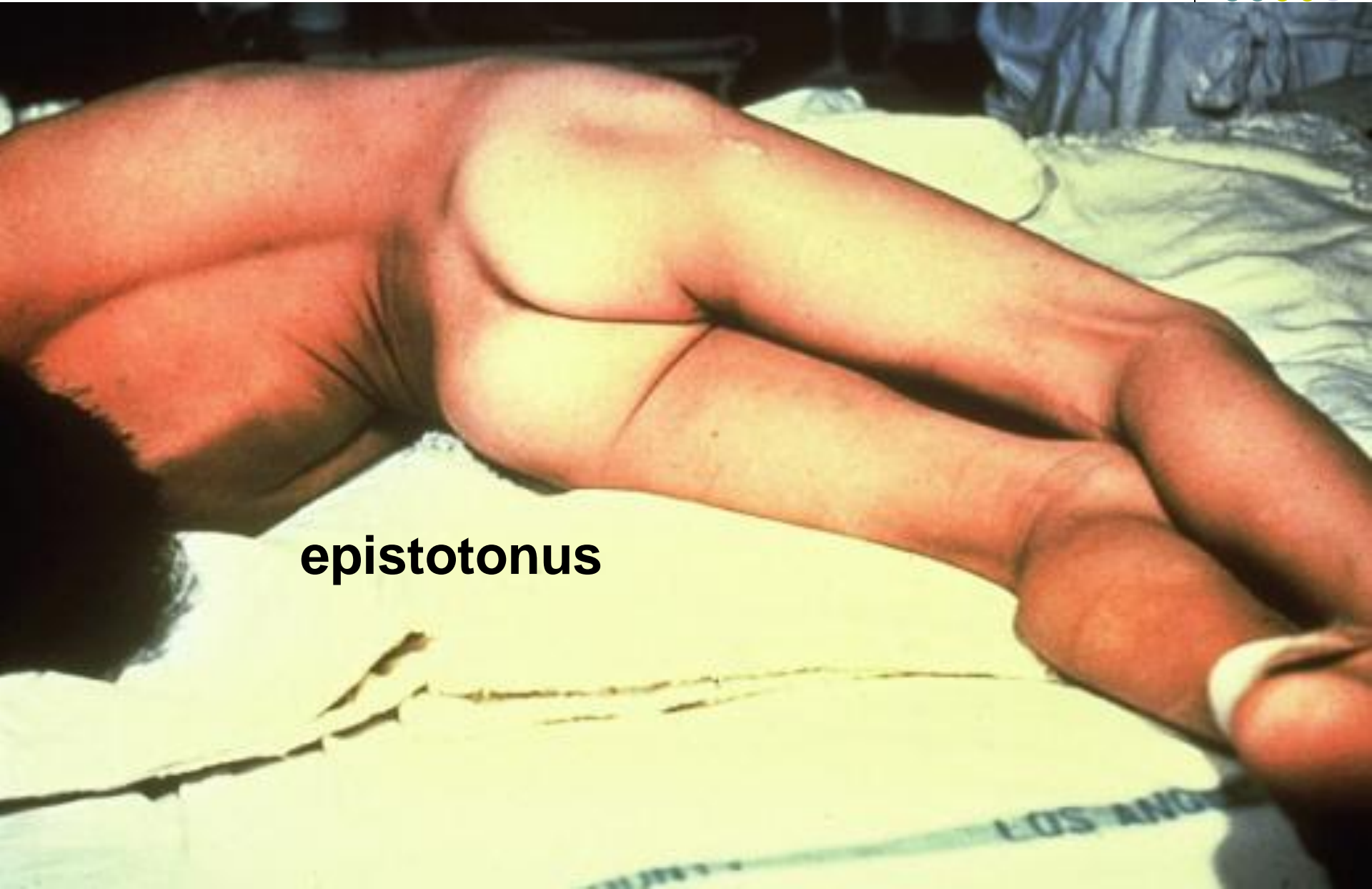


Tetanus

- 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

- Do těla nevstupuje původce, ale jen jeho toxin (**botulotoxin**), 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



Histotoxická klostridia

Clostridium perfringens



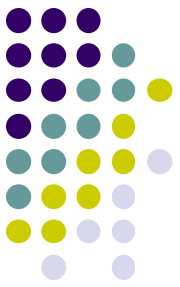
- Půda, rostliny, střevní trakt zvířat i lidí
- Jeden z původců **plynaté sněti** (spolu s *C. novyi*, *C. septicum* aj.)- infekce měkkých tkání (nekróza kůže, podkoží a svalstva), rychle se šířící edém
- Plynatá sněť je typické **válečné onemocnění**. Může se však vyskytnout i při živelných pohromách, úrazy v zemědělství
- Exogenní a endogenní infekce (perforace tlustého střeva)
- Produkce **toxinů**- rozpouštění tkání v okolí, destrukce leukocytů, šíření nekrózy
- **Produkce** enterotoxinů – alimentární intoxikace

Clostridium difficile



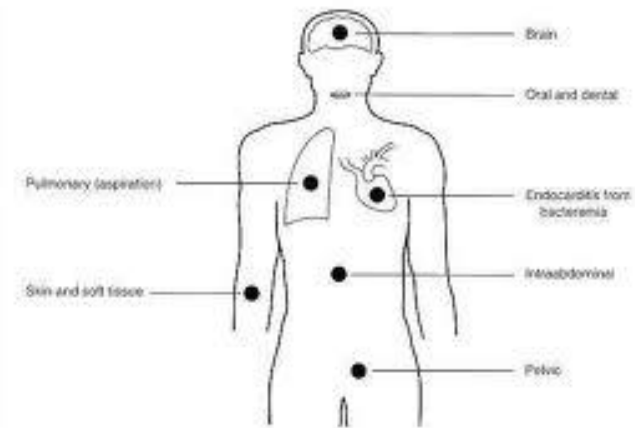
- Významný nozokomiální patogen
- Vyskytuje se celkem běžně ve střevě lidí (3-5 %)
- Přirozená rezistence k betalaktamovým antibiotikům a linkosamidům, i k běžným dezinfekčním prostředkům. Mytí rukou!!
- Některé kmeny produkují toxiny A (enterotoxin) a B (cytotoxin)
- Lehčí průjemová onemocnění až **pseudomembranózní enterokolitidy, toxické megakolon** (často nozokomiální nákazy)
- Dnes se k léčbě používá nejčastěji bakteriální chemoterapeutikum **metronidazol**

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

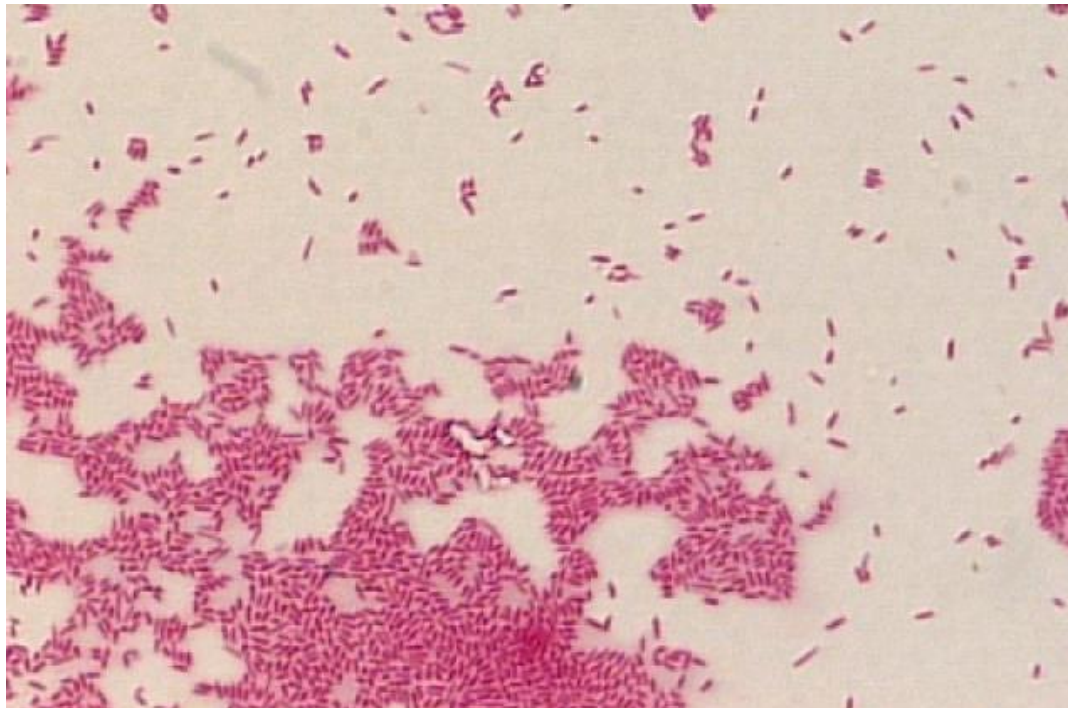
- Při zánětu obvykle neexistuje jeden původce, ale uplatňuje se směs. Někdy se používá termín „Veillonova flóra“
- Směs striktně anaerobních, ale i fakultativně anaerobních bakterií
- Nesporulující striktně anaerobní mikroby mají vzhledem ke svým vlastnostem velmi omezené možnosti přenosu.
- Velká část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



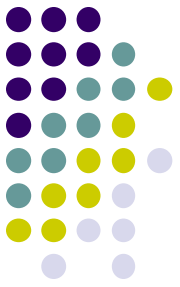
Bacteroides fragilis



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



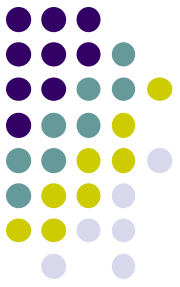
Porphyromonas gingivalis



- Hnědočerně pigmentované kolonie
- Dutina ústní, Urogenitální trakt



Prevotella melaninogenica



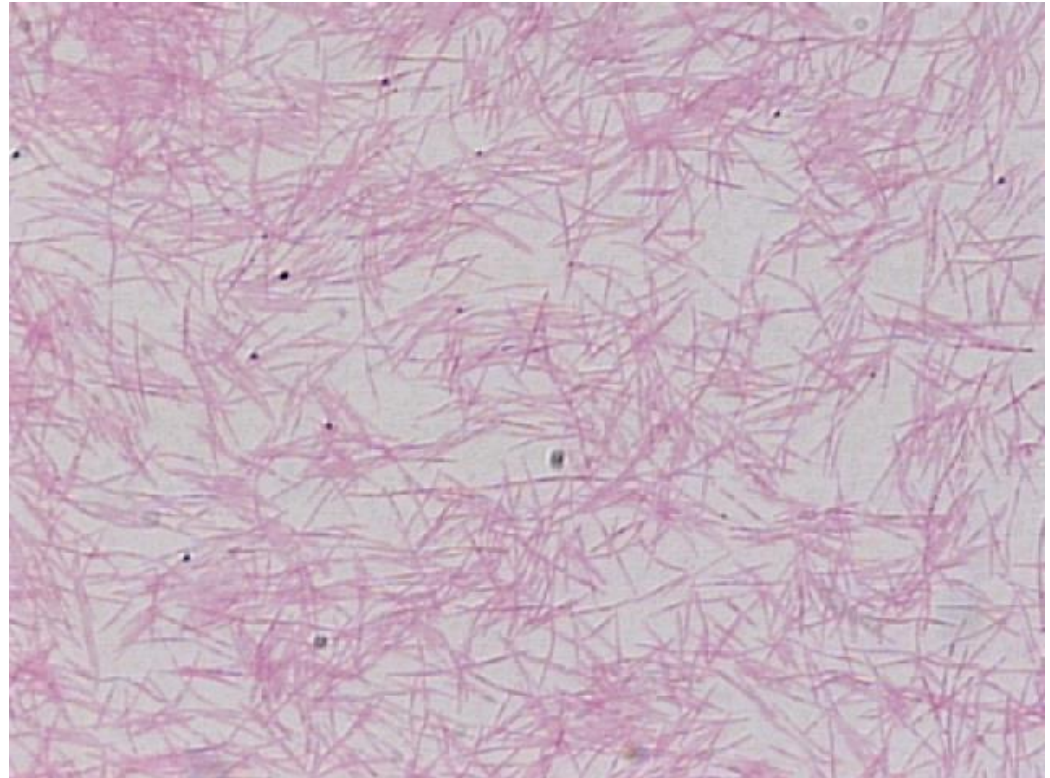
- Černý pigment
- Onemocnění
HCD (anginy,
sinusitidy)



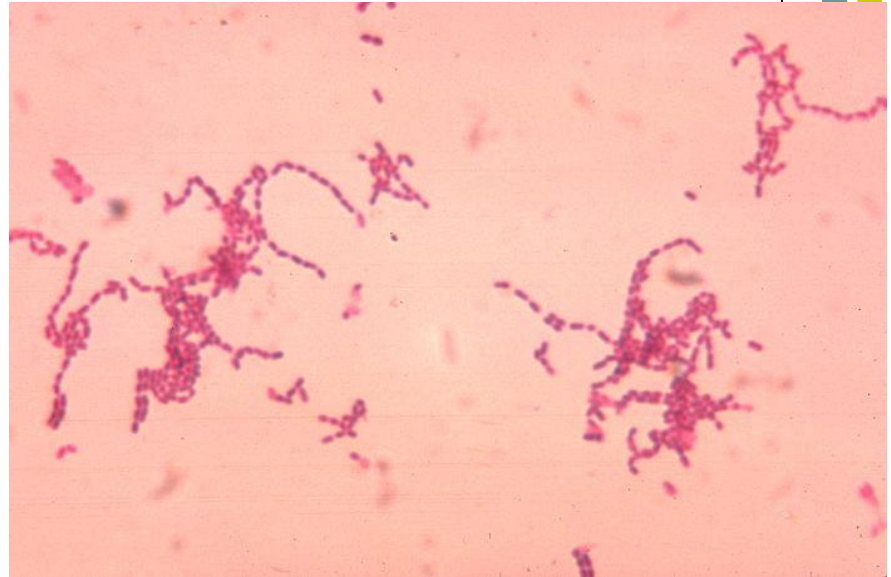
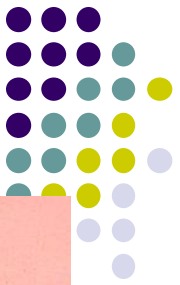
Fusobacterium sp.



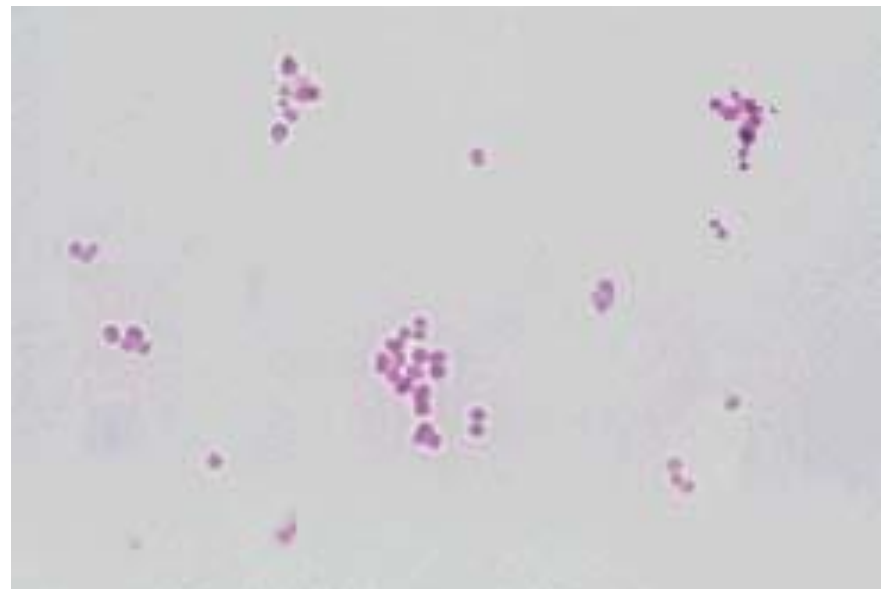
- Polymorfní bakterie (vlákna)
- Pleuropulmonární infekce, chronické sinusitidy, mozkové abscesy...

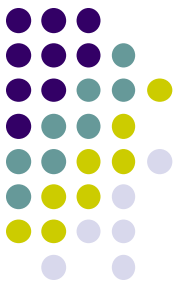


Peptostreptococcus sp.



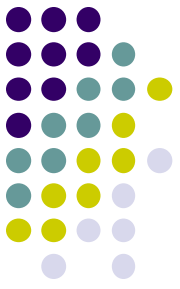
Veillonella sp.





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



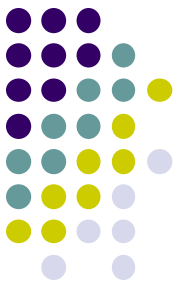
Diferenciální diagnostika– II

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



Tetanická myš

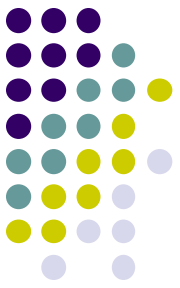
Jak získat anaerobiózu



1) Mechanicky – VL bujony přelijeme parafinovým olejem

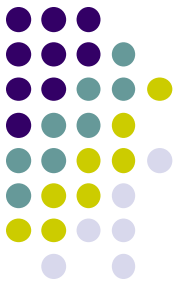


2) Fyzikálně – v anaerobním boxu se nahradí vzduch směsí anaerobních plynů, vháněných z bomby



3) 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





ACIDOREZISTENTNÍ BAKTERIE

Rod *Mycobacterium*



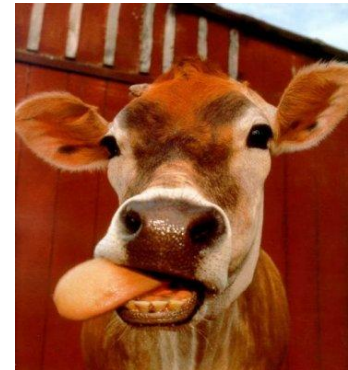
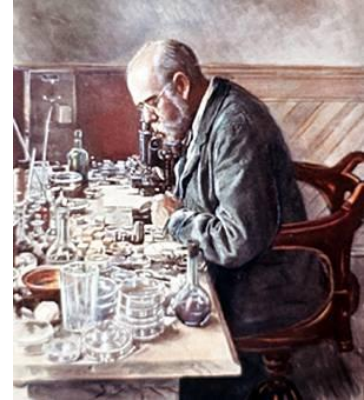
- G+ nepohyblivé krátké rovné či lehce zahnuté tyčky, vzácně větvící se formy
- obligátně aerobní, acidorezistentní i alkalorezistentní
- dlouhá generační doba (15-20 hodin), růst na speciálních kultivačních půdách několik týdnů (4-6)
- vysoce hydrofóbní buněčná stěna s tzv. mykolovými kyselinami, nelze barvit dle Grama
- schopnost přežívat uvnitř makrofágů – významnou roli při infekci hraje tedy buněčná imunita
- odolné k vysychání a chemickým látkám
- patogenní druhy: ***M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. leprae***



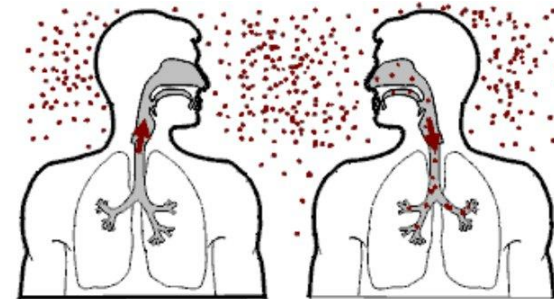
Tuberkulóza (TBC)

Původci TBC:

- ***Mycobacterium tuberculosis*** (Kochův bacil, BK)
- *M. bovis* - tuberkulóza krav, vzácně i lidí – infekce z nepasterizovaného mléka, TBC krčních a mesenterálních lymfatických uzlin
- *M. africanum*- vzácně, TBC v tropické Africe

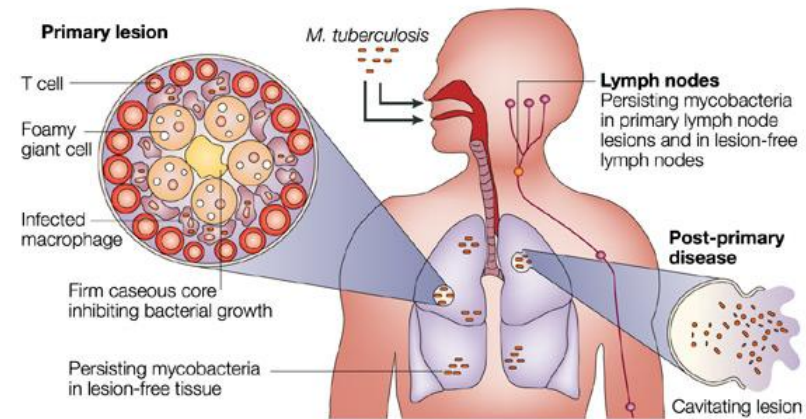


- Asi 1/3 populace nakažena.
- Infekce se projeví jen asi u 10% osob.

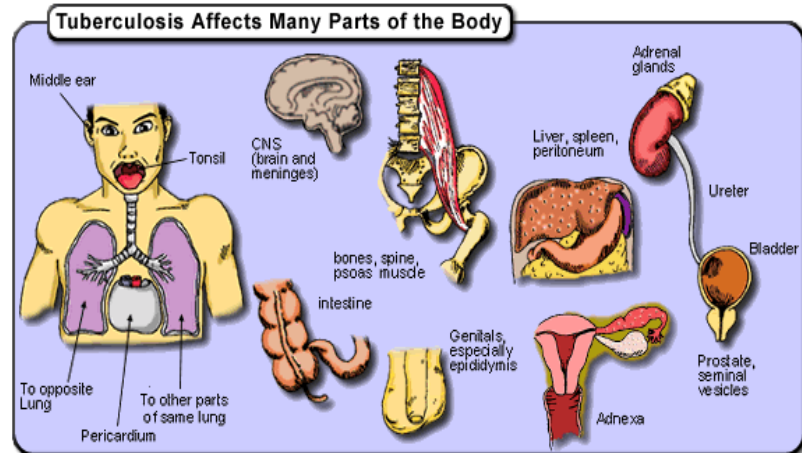
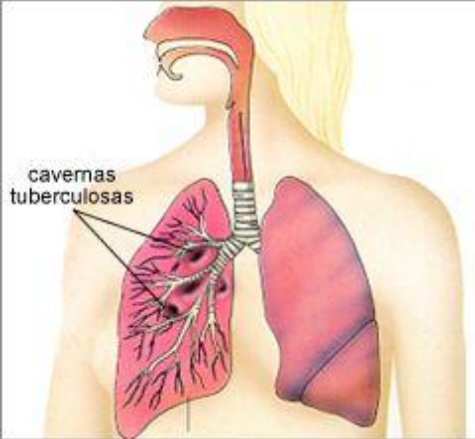


Patogeneze onemocnění

I. Primární TBC

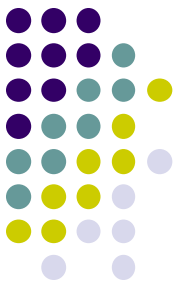


- Mykobakterie se dostávají do plic (méně často přes zažívací trakt či rány) a zde se množí do rozvoje buněčné imunity, poté dochází k centrální nekróze, vzniká **granulom, tzv. tuberkl** (lymfocyty, epiteloidní b.),
- Mykobakteria se šíří do regionálních mízních uzlin a vytváří se tzv. **Primární tuberkulózní komplex**
- Za klinické příznaky je zodpovědná imunitní reakce organismu



Další průběh primární TBC:

- Spontánní celkové zhojení
- Granulom v plicích kaseifikuje či kavernizuje- latentní forma
- Hematogenní šíření- do různých orgánů. Miliární tuberkulóza- napadá několik míst zároveň (v ledvinách, mozku, kůži a kostech)



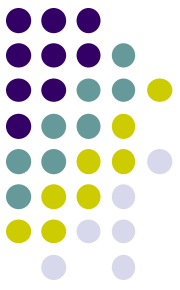
II. Postprimární TB

- U osob infikovaných řadu let po primoinfekci (asi u 10%)
- Vzniká za předpokladu:
 - Exogenní infekce- inhalací mykobakterií
 - Progrese primární infekce (těžká respirační inf., hladovění, gravidita)
- tzv. otevřená tuberkulóza (tuberkulom)
- může probíhat bezpříznakově, ale u většiny viditelné symptomy (kašel, hemoptysa, zvýšená teplota, hubnutí,...), zasahuje většinou plíce

Léčba TBC



- Podávání kombinace několika **antituberkulotik** – zamezení vzniku rezistentních mutant
- Nejčastěji používaná: **isoniazid, rifampicin, pyrazinamid, ethambutol, streptomycin**
- Obvykle 4- 12 měsíců- fáze:
 - Iniciální- snížení počtu bakterií
 - Pokračovací- sterilizace ložiska
- **Multirezistentní TB** (MDR TB)- onemocnění vyvolané kmenem *M. t.* rezistentním minimálně ke dvěma základním antituberkulotikům- isoniazid a rifampicin
- Očkování- BCG vakcína (*bacillus Calmette-Guérin*)



Atypická mykobakteria

- Podmíněně patogenní mykobakterie (PPM)
- Tzv. Mykobakteriózy
- Lidská onemocnění: Komplex *M. avium*, *M. kansasii*, *M. xenopi*
- Chronická plicní onemocnění, lokalizované lymfadenitidy. Vzácně způsobují infekce ran (fish tank granuloma, swimming pool granuloma),
- Některá jiná mykobakteria jsou nepatogenní a jsou normální součástí lidské mikroflóry, např. *M. smegmatis*

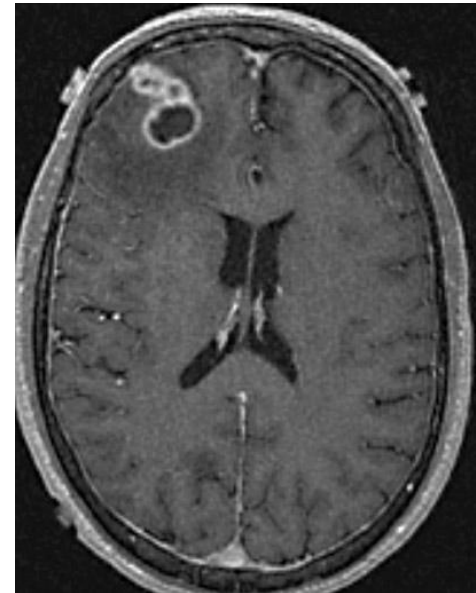
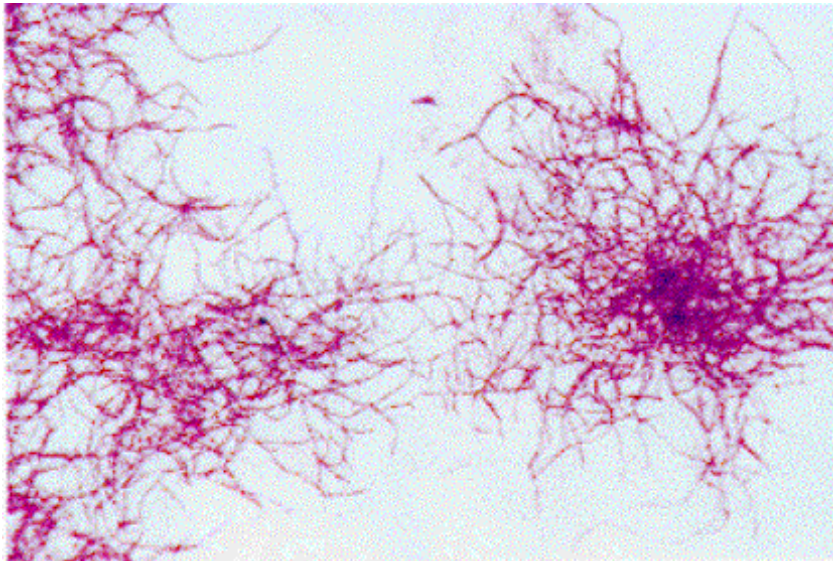
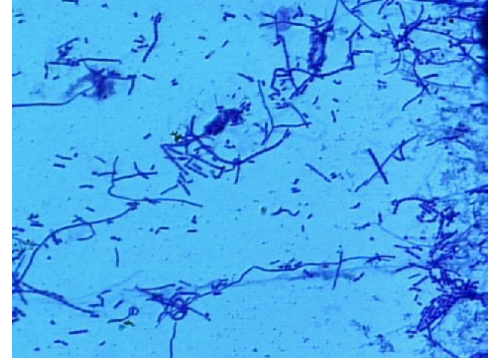
Actinomyces israelii

- Jsou to **anaerobní** bakterie **vláknité** bakterie, v podstatě **grampozitivní**, ale barví se Gramem špatně, protože jejich buněčná stěna je hodně hydrofobní a obsahuje hodně mykolových kyselin
- Běžně se vyskytují v **ústní dutině zdravých osob**, odtud se za různých okolností mohou dostat do měkkých tkání krku, tváře či hrudníku- **aktinomykóza** (abscesy)
- V poslední době hlavně infekce dělohy u žen s nitroděložními tělísky



Nocardia asteroides

- G+ aerobní, půdní bakterie
- U lidí s oslabenou T-imunitou - lokalizované infekce plic, diseminace - mozkové abscesy
- Tropy (*N. brasiliensis*) – podkožní abscesy



Detekce mykobakterií

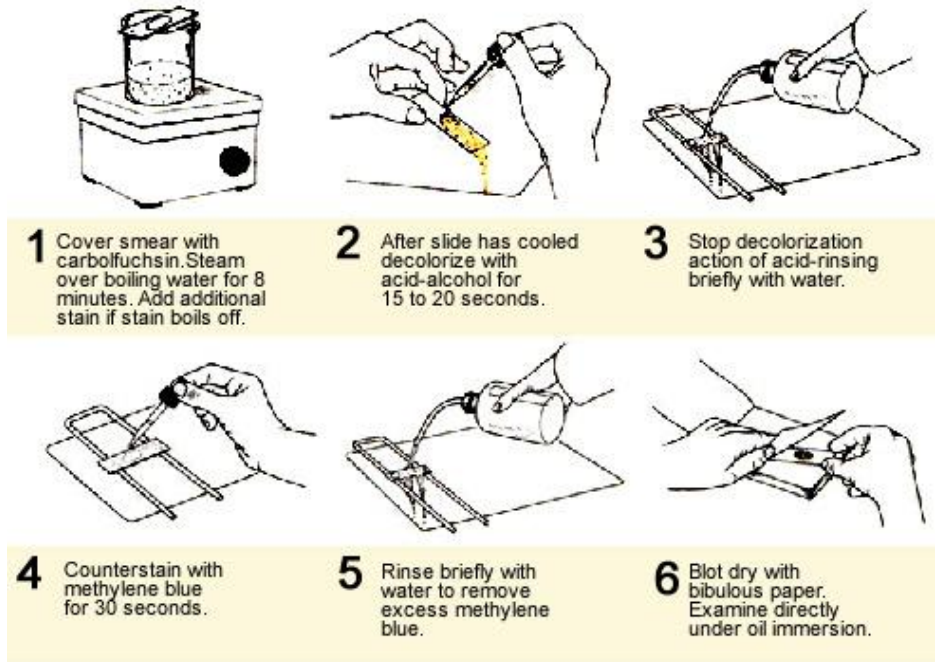


- **Mikroskopie:** Používá se **Ziehl-Neelsenovo** barvení
- **Kultivace:** Speciální půdy, přičemž před vlastní kultivací předchází moření, obvykle louhem. Cílem moření je usmrtit ostatní bakterie, které by při svém rychlém růstu byly kultivačně úspěšnější. Alkalirezistentní mykobakteria moření přežijí.
- **Automatická kultivace:** Používá se různých typů kultivačních automatů: mohou detekovat kultivační pozitivitu mnohem dříve než klasická kultivace
- Biochemické rozlišení je možné, je však vyhrazeno specializovaným laboratořím
- **PCR** diagnostika se stává čím dál důležitější

Úkol 1a: Barvení dle Ziehl-Neelsena



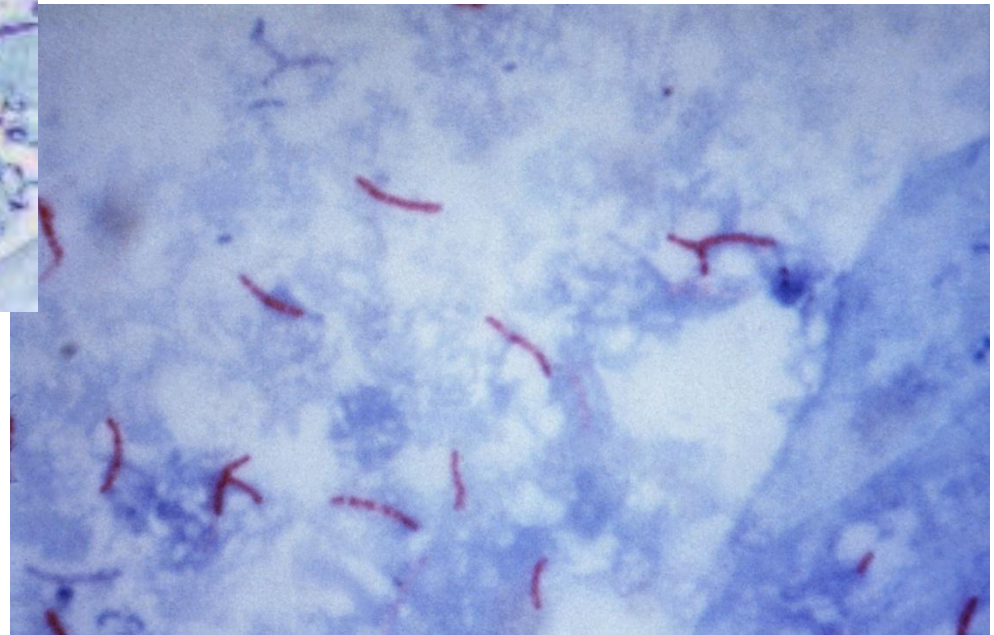
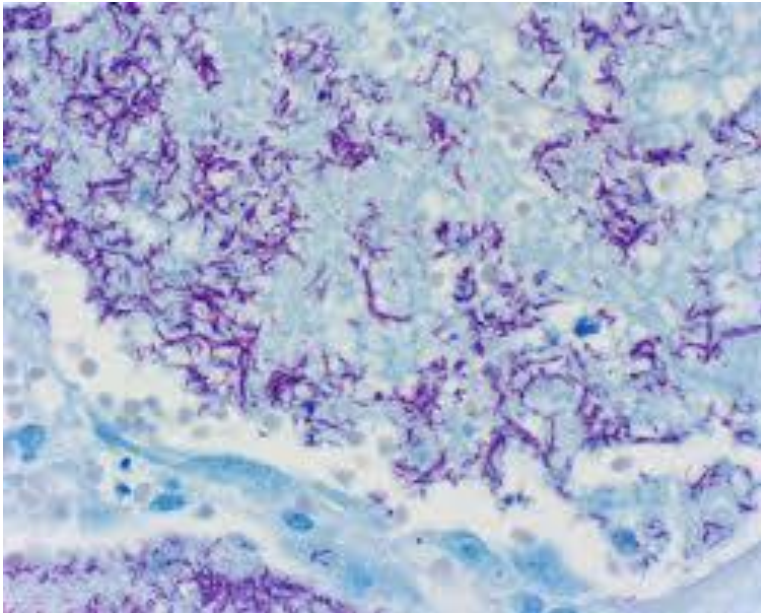
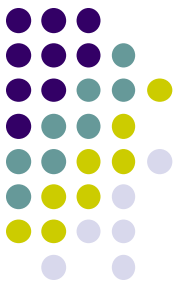
- V prvním kroku barvíme **karbolfuchsinem** za horka až do výstupu par, bez zahřívání by mykobakteria vůbec nešlo obarvit.
- V druhém kroku odbarvujeme „kyselým alkoholem“, což je směs alkoholu s minerální kyselinou, nejčastěji HCl



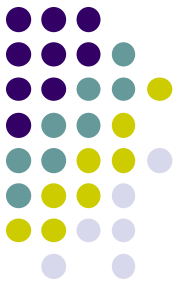
Ziehl-Neelsen acid-fast staining procedure

- Ve třetím kroku dobarvujeme pozadí, tj. vše, co jsme ve druhém kroku odbarvili. Dobarvujeme **malachitovou zelení** nebo **metylenovou modří**. Výsledkem jsou **červené** acidorezistentní tyčinky na **modrém** nebo **zeleném** pozadí

Úkol 1b: Mikroskopie mykobakteriální kultury



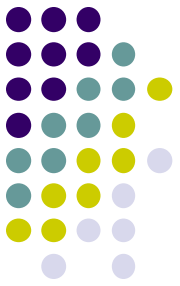
Úkol 2: kultivace mykobakterií, aktinomycet a nokardií



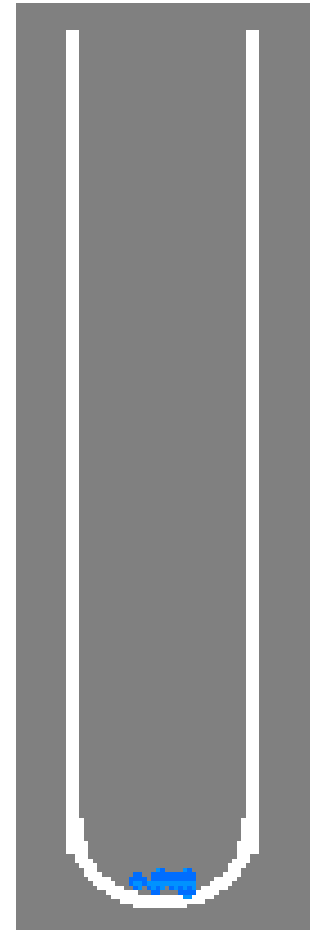
- Před kultivací musí být provedeno moření
- Používáme tekutou půdu Šulovu či Baničovu a vaječné půdy Ogawovu či Löwenstein-Jenssenovu.
- Dlouhá generační doba (>20 hod) - výsledky se odečítají po 3, 6 a pro jistotu i 9 týdnech kultivace.
- Aktinomycety –VLA, za anaerobních podmínek, nokardie KA



K tekuté Šulově pūdě



- I pozitivní zkumavka je na první pohled čirá, protože nárůst mykobakterií je patrný jen u dna



Úkol 3: testy antituberkulotické citlivosti



- Nelze používat difúzní diskové testy
- Antituberkulotika přidáváme přímo do kultivační půdy
- Antituberkulotika jsou zvláštní látky, až na výjimky odlišné od antibiotik
- Vždy se užívají kombinace tří či čtyř: rychle totiž vznikají rezistence, navíc některá působí jen intra- a jiná zase extracelulárně
- Mykobakterium roste → je rezistentní
- Mykobakterium neroste → je citlivé

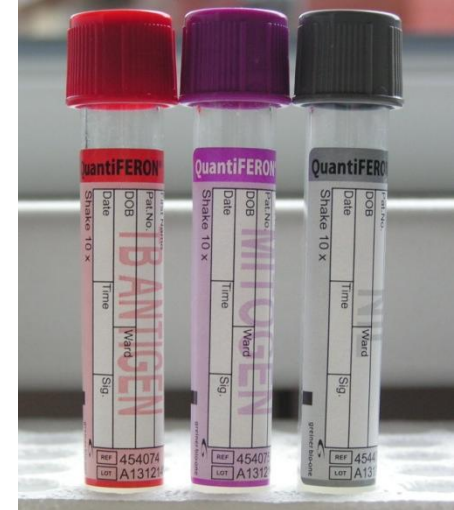
Test uvolnění interferonu gama (Quantiferon[©] TB-GOLD)

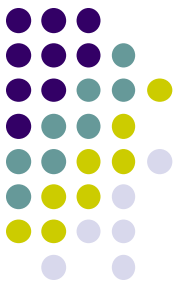


- Moderní možností k ověření buněčné imunity je vyšetření **indukovaného uvolňování interferonu gama**, v praxi se používá prakticky výhradně komerčně dostupný test Quantiferon TB-GOLD, proto budeme dále hovořit jen o něm
- Bylo prokázáno, že při tuberkulóze, a to i latentní, dochází k tomu, že **tuberkulózní antigeny aktivují T-lymfocyty** a ty tvoří velká množství interferonu gama
- Podobně lze tyto T-lymfocyty aktivovat nespecificky např. takzvaným **mitogenem**, ten se proto používá jako pozitivní kontrola

Quantiferon – tři zkumavky

- Odebírá se nesrážlivá krev do tří zkumavek (potřebujeme lymfocyty!)
- první zkumavka obsahuje **mitogen (MIT)** – zde by mělo za normálních okolností **vždy** dojít ke stimulaci tvorby interferonu gama
- druhá zkumavka obsahuje **antigeny TBC (TB)** – zde by mělo dojít ke stimulaci tvorby interferonu gama **pouze u infekce TBC**
- třetí zkumavka **neobsahuje nic (NIL)** – zde by za normálních okolností **nemělo docházet** ke stimulaci tvorby interferonu gama





Quantiferon – hodnocení

- Za **pozitivní** lze považovat výsledek, kdy T-lymfocyty reagují na stimulaci antigenem mykobakteria, avšak ve zkumavce NIL nedochází k tvorbě interferonu
- Za **negativní** lze považovat výsledek, kdy T-lymfocyty reagují na stimulaci mitogenem, ale nereagují na stimulaci antigenem mykobakteria
- **Neurčitý výsledek** se objeví v případě, že T-lymfocyty nejsou aktivovány ani mitogenem, nebo naopak se tvorba interferonu objeví i ve zkumavce, kde nic nebylo

Úkol 6: Interpretace výsledku testu Quantiferon TB Gold

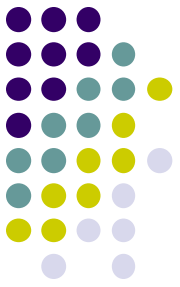


Pomocí tabulky ve svém protokolu se pokuste interpretovat následující výsledky testu Quantiferon TB Gold examination u čtyř pacientů:

- **Anna:** MIT = 4,8 TB = 1,2 NIL = 1,1
- **Berta:** MIT = 5,3 TB = 4,8 NIL = 2,1
- **Cecil:** MIT = 0,9 TB = 0,9 NIL = 0,8
- **Dimos:** MIT = 8,4 TB = 8,3 NIL = 8,2

(všechny hodnoty jsou uvedeny IU/ml)

Úkol 11: mikroskopie vzorků



- 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 12a: Anaerostat

šroubovací uzávěr

tlakový ventil

vzduchotěsné víčko

palladiový kalalyzátor
(pod víčkem)

konstrukce pro
ukládání Petriho misek

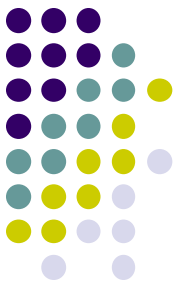
Generátor anaerobiózy
(sáček s chemikáliemi)



Úkol 2b: Anaerobní box

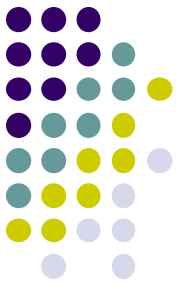


Úkol 13: Kultivace bakterií



- 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.

Úkol 15 – 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 16c: 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.