

## Téma P07b: 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* (jen jednoduše v několika bodech)			
<b>KONEČNÝ ZÁVĚR (výsledek Úkolu 4 – ANAERObtest, nebo, u „ne-anaerobů“, výsledky předchozích testů)</b>				

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

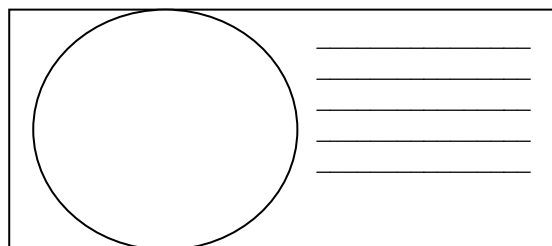
### Úkol 1: Mikroskopie klinického vzorku a mikroskopie kmene

#### 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

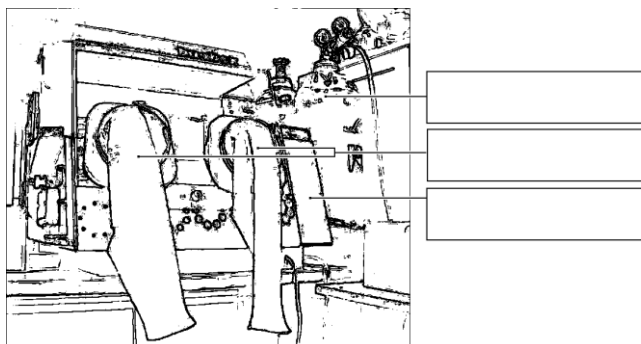
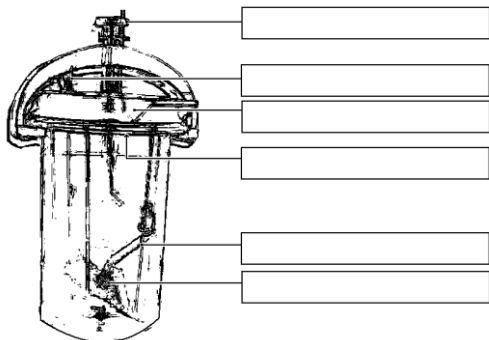
Anaerobní bakterie mohou být koky i tyčinky, grampozitivní i gramnegativní; v tom se neliší od jiných bakterií. Bývají ale pleomorfnější. U rodu *Clostridium* je přítomnost a pozice endospor užívána jako významný diagnostický znak. Pokuste se u jednoho z vašich kmenů (robustní G+ tyčinky) endospory najít.

### 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 Erba-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 při výpočtu kódu nezapočítávají, získáte tedy šestimístný kód za sloupce H až C.

U druhého z kmenů vyjdou dvě možnosti výsledku. Předpokládejte, že tento kmen byl již testován na citlivost na penicilin a byl shledán citlivým. Nejde tedy o zástupce (primárně na penicilin rezistentního) rodu *Bacteroides*.

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									

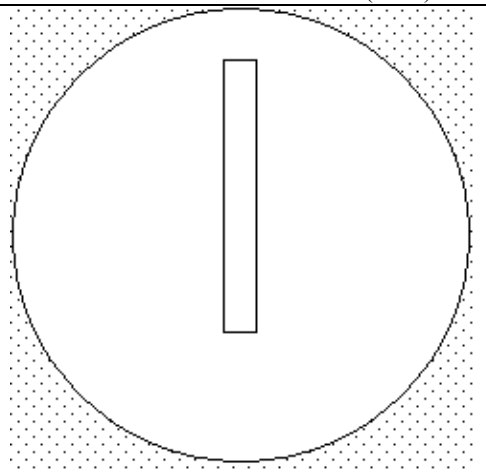
Poznámky:

### Úkol 5: Citlivost anaerobů na antibiotika

Anaerobní bakterie bývaly testovány difusním diskovým testem, avšak bylo prokázáno, že difusní diskový test není pro anaerobní bakterie dostatečně spolehlivý. V současnosti se dle instrukcí EUCAST se infekce způsobené anaerobními bakteriemi buďto léčí bez in vitro testování, nebo, zvláště u závažných infekcí, se k in vitro testování používají E-testy.

Odečtete E-test na anaerobní bakterii. Zakreslete a vyhodnoťte výsledek.

Nezapomeňte, že i když je principiálně podobný jako difusní diskový test, je E-test kvantitativním testem. Hodnoty koncentrací jsou napsány přímo na proužku. Místo, kde okraj zóny kříží proužek, nám ukazuje hodnotu minimální inhibiční koncentrace (MIC).

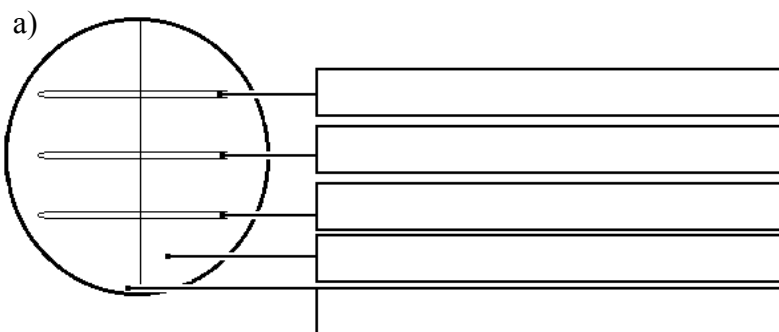
	Testovaný kmen
	Testované antibiotikum / antimykotikum
	Hodnota MIC
	Breakpoint:
Závěr (kmen je citlivý/rezistentní k danému antibiotiku)	

### 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 potřena 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*

U *Clostridium tetani* se průkaz toxinu provádí očkováním tetanické myši. Typická je pozice ocásku a končetin. Studenti PřF úkol neprovádějí.

#### 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 je podobný těm, které jsme prováděli v praktiku J08, ale je složitější: zjišťuje se jak produkce klostridiového antigenu, tak i jeho toxinů. Pro praxi je důležité, že na toto vyšetření je nutno zasílat kusovou stolicí (NESTAČÍ výtěr z konečníku). Test se skládá ze dvou částí, v obou případech se pozitivita projeví přítomností příslušné linie (modré čáry):

(1) test přítomnosti klostridiového antigenu a

(2) SPOLEČNÝ test toxinů A a B (pozitivní linie je výsledkem přítomnosti toxinu A *nebo* B *nebo* obou).

Interpretace testu:

Toxin pozitivní, antigen pozitivní <b>(Situace 1)</b>	Pokud odpovídají příznaky, infekci <i>Clostridium difficile</i> (CDI) lze považovat za prokázanou a léčbu za nezbytnou. Po léčbě se neprovádí kontrolní testování; klinický průběh vypovídá o efektu léčby lépe.
Toxin negativní, antigen pozitivní <b>(Situace 2)</b>	Při odpovídajících příznacích je stále nutno CDI považovat za možnou či dokonce pravděpodobnou, protože výsledek průkazu toxinu nelze považovat za zcela spolehlivý. Podle klinického stavu se tedy volí i léčba.
Toxin i antigen negativní <b>(Situace 3)</b>	CDI je považována za velmi nepravděpodobnou
Toxin pozitivní, antigen negativní	Chyba testu
Chybění tří teček (kontrola)	Chyba testu

Prohlédněte výsledek průkazu antigenu *Clostridium difficile* (CD) a klostridiových toxinů A + B u vzorků stolice X, Y a Z a запиšte výsledky:

Pacient	Kontroly	Toxiny A + B CD	Antigen CD	Číslo situace
X	OK – není OK	pozitivní – negativní	pozitivní – negativní	
Y	OK – není OK	pozitivní – negativní	pozitivní – negativní	
Z	OK – není OK	pozitivní – negativní	pozitivní – negativní	