Téma P07b: Diagnostika anaerobních bakterií

Ke studiu:*Clostridium;* nesporulující 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)				
KONEČNÝ ZÁVĚR (výsledek Úkolu 4 – ANAEROtest, nebo, u „ne-anaerobů", výsledky předchozích testů)					

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

Úkol 1: Mikroskopie klinického vzorku a mikroskopie kmene

a) Prohlídka klinického vzorku

Studenti Bi7170c tuto část neprovádějí

b) Mikroskopie podezřelých kmenů

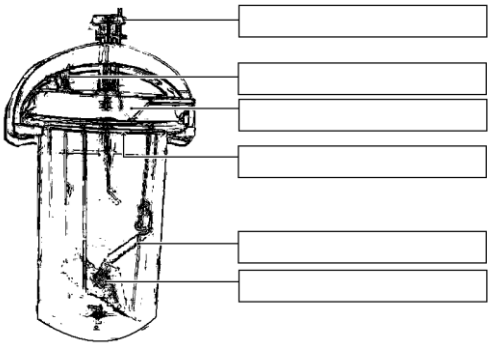
Anaerobní bakterie mohou být koky i tyčinky, grampozitivní i gramnegativní; v tom se neliší od jiných bakterií. Bývají ale pleomorfnější. U rodu *Clostridium* je přítomnost a pozice endospor užívána jako významný diagnostický znak. Pokuste se u jednoho z vašich kmenů (robustní G+ tyčinky) endospory najít.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

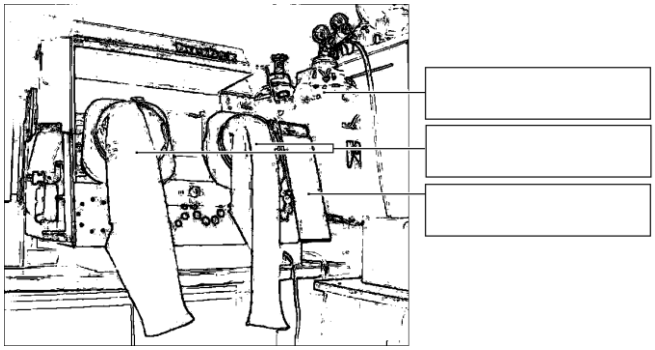
Úkol 2: Anaerostat a anaerobní box

K získání anaerobiózy používáme v naší laboratoři tři způsoby:

a) pro tekuté půdy se jako bariéra médium/atmosféra používá **parafinový olej** (není dokonalé)
b) pevné půdy dáváme do **anaerostatu**, kde je kyslík chemicky nahrazen směsí plynů
c) pevné půdy lze také umístit do **anaerobního boxu**; anaerobní atmosféra je vháněna z tlakové lahve (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: Druhová diagnostika anaerobů biochemickými testy

U kmenů určených jako anaeroby použijeme biochemický mikrotest (ANAEROtest 23 Erba-Lachema) naočkovaný o dva dny dříve. Provedení je podobné jako u jiných biochemických testů (STREPTOtest, ENTEROtest aj.), s tím rozdílem, že test má tři řádky a nikoli jen dva. Studenti Bi7170c z časových důvodů neprovádějí.

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.

Odečtěte E-test na anaerobní bakterii. Zakreslete jeden z výsledků, vyhodnoťte všechny výsledky.

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).

Kmen →	**Kmen ___ určený jako _____**			**Kmen ___ určený jako _____**		
Antibiotikum ↓	**Kritéria**	**Hodnota MIC**	**Závěr**	**Kritéria**	**Hodnota MIC**	**Závěr**
Klindamycin (DA)	C když MIC ≤ 4 R když MIC > 4			C když MIC ≤ 4 R když MIC > 4		
Amoxicilin/ klavulanát (AMC)	C když MIC ≤ 4 I když MIC = 8 R když MIC > 8			C když MIC ≤ 4 I když MIC = 8 R když MIC > 8		
Metronidazol (MTZ)	C když MIC ≤ 4 R když MIC > 4			C když MIC ≤ 4 R když MIC > 4		

Všechny hodnoty jsou v mg/l. C = citlivý, I = intermediární, R = resistentní

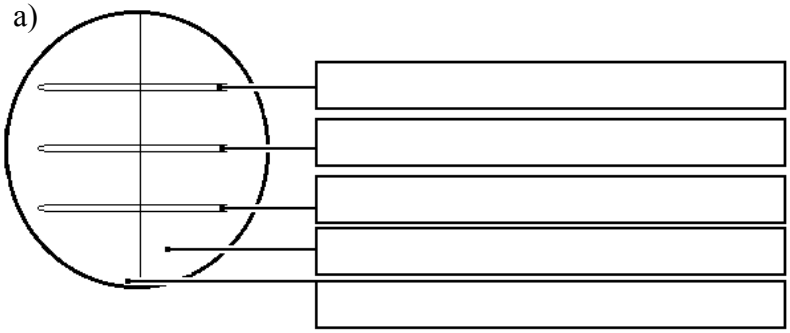
Úkol 6: Detekce toxinů klostridií

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.

a)



b) Průkaz toxinu *Clostridium tetani*

U Clostridium tetani se průkaz toxinu prování 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. Patogena je možno kultivovat na speciálních médiích, ale doporučuje se spíše provést test na toxiny a strukturální antigen.

Testování se provádí imunochromatografickým testem, který je podobný např. těhotenskému testu, ale je složitější: zjišťuje se jak produkce klostridiového antigenu, tak i jeho toxinů. Pro praxi je důležité, že na toto vyšetření je nutno zasílat vzorek stolice (**nestačí** výtěr z konečníku). Stolice by měla být tekutá – pokud je formovaná (kusová), není zřejmě důvod toto vyšetření provádět.

Test se skládá ze dvou částí, v obou případech se pozitivita projeví přítomností příslušné linie (modré čáry):
(1) test přítomnosti klostridiového strukturálního 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 **(Situace 1)**	Pokud odpovídají příznaky, infekci *Clostridium difficile* (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 **(Situace 2)**	Při odpovídajících příznacích je stale 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 **(Situace 3)**	CDI je považována za velmi nepravděpodobnou
Toxin pozitivní, antigen negativní	*Chyba testu*
Chybění tří teček (kontrola)	*Chyba testu*

**Také se doporučuje pokusit se o kultivaci kmene Clostridium difficile (ze stejného vzorku) a poté zopakovat tento test s tím, že místo vzorku stolice se použije tento vypěstovaný kmen.*

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

Pacient	Kontroly	Toxiny A + B CD	Antigen CD	Číslo situace (1/2/3)
X	OK – není OK	pozitivní – negativní	pozitivní – negativní	
Y	OK – není OK	pozitivní – negativní	pozitivní – negativní	
Z	OK – není OK	pozitivní – negativní	pozitivní – negativní	