

P07b

**Diagnostika anaerobních
bakterií**

Osnova

- rod *Clostridium*
- přehled nejběžnějších druhů nesporulujících anaerobů
- diagnostika anaerobů
- anaerobióza
- úkoly

Rod *Clostridium*

- **G+ tyčky, anaerobní, spóry** (oválné či kulaté endospory vyklenující buňku)
- kvůli správné funkci některých enzymů **vyžadují k růstu nižší redoxní potenciál** (snížení cysteinem, thioglykolátem apod.)
- **některé druhy tolerují malá množství kyslíku** (enzymy superoxiddismutáza, peroxidáza, kataláza)
- **saprofyté v půdě** (hnilobné procesy) a **ve vodě, součástí normální mikroflóry** člověka i živočichů
- k rozšíření napomáhá **tvorba vysoce odolných endospor** (přítomny v půdě, vodě, prachu → kontaminace potravin)
- **čím kratší inkubační doba, tím horší prognóza**

Clostridium tetani

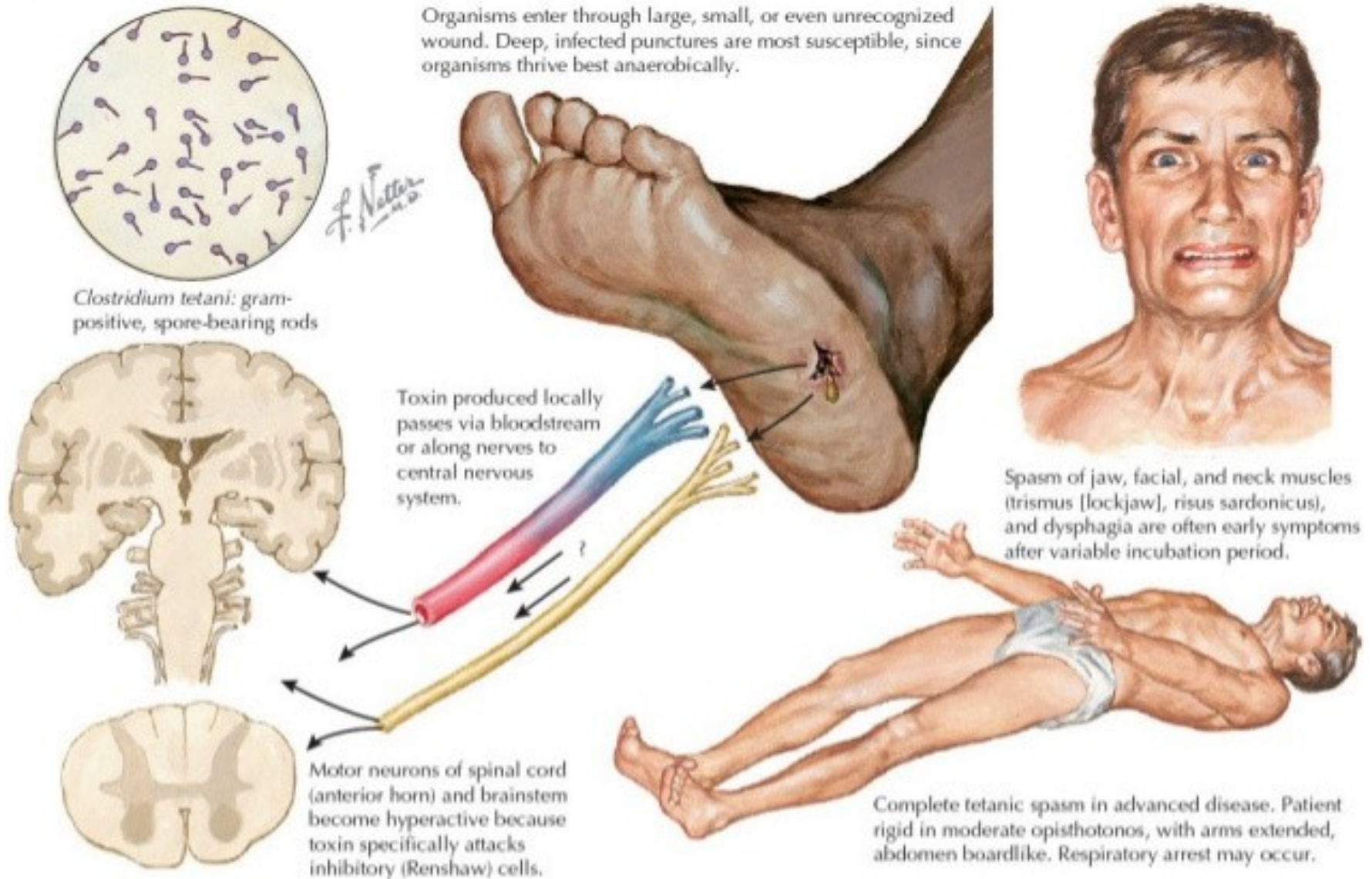
- **G+ tyčka**, anaerobní, rovné, štíhlé, **terminální endospora** („paličky na buben“)
- saprofyt savců (zejména koní)
- **původce tetanu** (vstupní branou obvykle **hlubší znečištěné rány**, méně často popáleniny, vředy apod.)
- **pro klíčení spor nutné anaerobní prostředí** (zhmožděné a ischemické okolí rány, hnisavé procesy, cizí těleso v ráně)
- **za projevy infekce zodpovědný tetanický toxin**
- **závažnost klinických projevů závislá na množství produkovaného neurotoxinu**
- **očkování součástí hexavakcíny, přeočkování jednou za 10 - 15 let**



Clostridium tetani (2)

- **tetanus - patofyziologie:**
 - **tetanospasmin proniká do neuronu → poškození exkretčního aparátu neuronů → zábrana uvolňování inhibičních mediátorů** (GABA, glycin) → zablokována normální inhibice motorických neuronů → **snížení prahu dráždivosti** motorických neuronů → **tonické křeče** příčně pruhovaného svalstva
- **tetanus - klinické příznaky:**
 - **tonické křeče** (při plném vědomí) žvýkacích svalů (**trismus**), mimických svalů (**risus sardonius**), svalů laryngu a krku, svalů trupu (**opisthotonus**), **dýchacích svalů** (vede k udušení)
 - zvýšené pocení a teplota, komplikace (zlomeniny, ...)

Clostridium tetani (3)

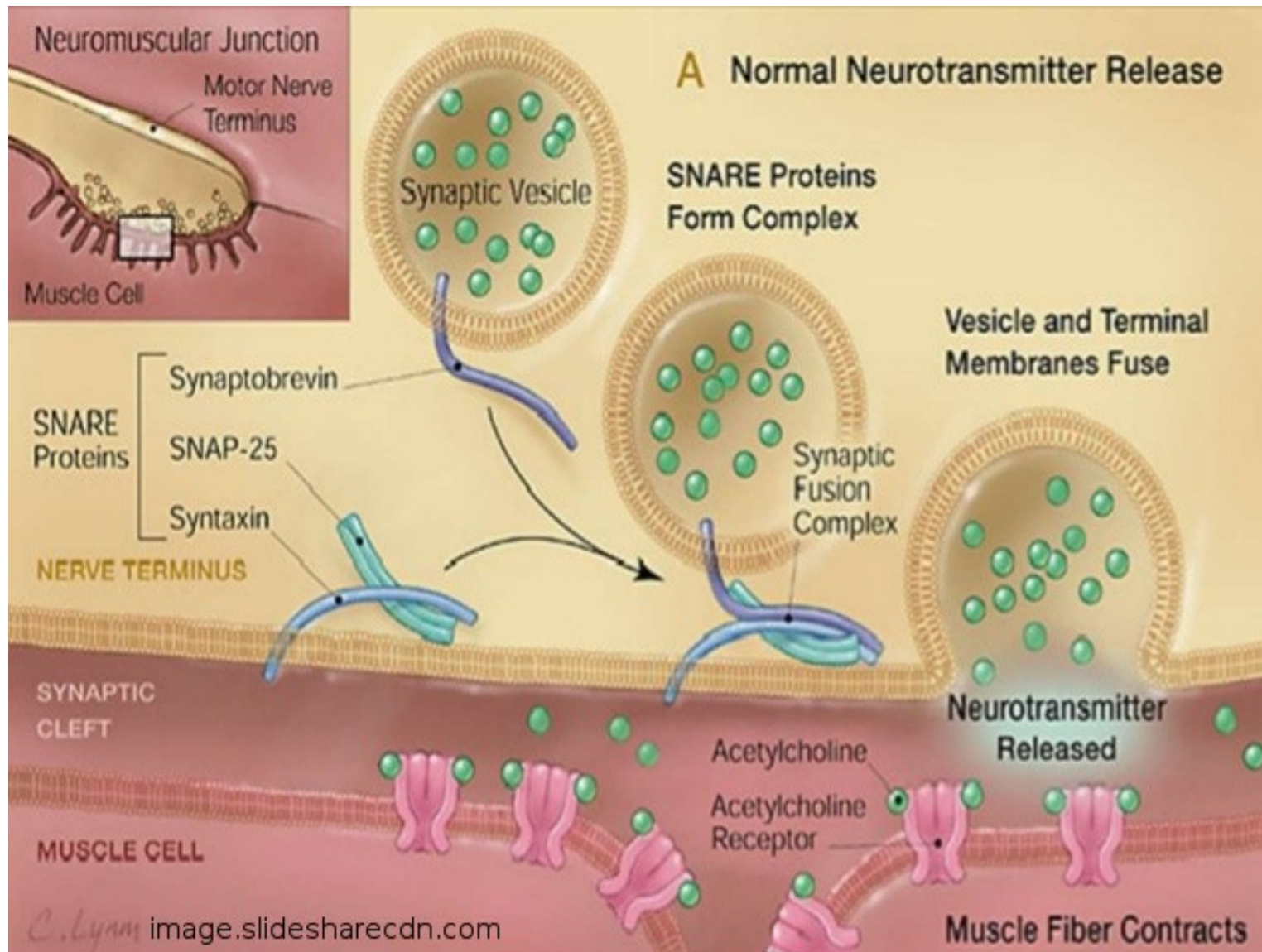


Clostridium botulinum

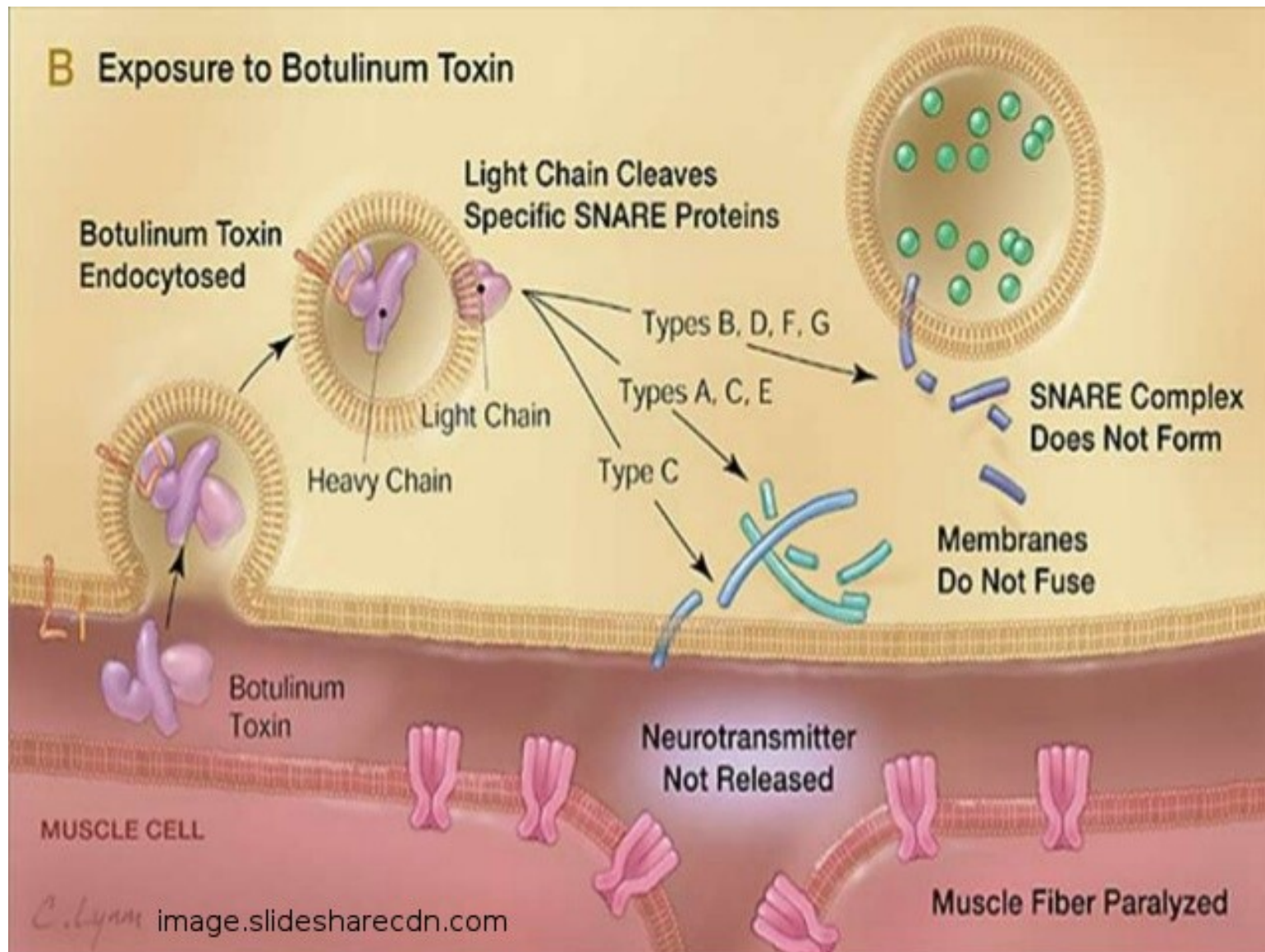


- **G+ tyčka**, anaerobní, rovné, velké, **oválná subterminální endospora**
- **komenzál ve střevech zvířat → ve vodě, půdě, ...**
- **tvoří botulotoxin → otravy potravinami kontaminovanými sporami**
(nedostatečně sterilizované masové a zeleninové konzervy; 100 °C 10–15 minut)
- **botulotoxin je endopeptidáza → hydrolýza proteinů zodpovědných za transport vezikul s acetylcholinem → inhibice uvolňování acetylcholinu → paralýza** příčně pruhovaných svalů
- využití v kosmetice (botox)

Clostridium botulinum (2)



Clostridium botulinum (3)



Clostridium botulinum (4)

- **formy botulismu:**
 - **alimentární botulismus:**
 - **požití toxinu v potravě** (mikrob samotný není v těle přítomen)
 - nevolnost, zvracení, bolesti břicha, pokles očního víčka (ptóza), rozšíření zornic (mydriáza), ztížené polykání, zácpa, zástava močení, symetrické sestupné paralýzy, **ochrnutí dýchacích svalů**
 - vědomí a citlivost zůstávají nezměněny
 - **traumatický botulismus** (infekce rány)
 - **kojenecký botulismus** (toxin produkován přímo ve střevě dítěte)

Klostridia anaerobních traumatóz

- *C. perfringens*, *C. septicum*, *C. novyi*
- různé klinické projevy (typicky infekce měkkých tkání - kůže, podkoží, svaly) od kontaminace ran, přes hnisavě-nekrotické procesy s lokálním účinkem toxinů po **plynatou sněť** (vysoce invazivní nekrotické procesy s celkovou intoxikací)
- některé kmeny způsobují svými toxiny **nekrotizující enterokolitidy**
- celková stabilizace pacienta, chirurgické ošetření ran, ATB, léčba kyslíkem v hyperbarické komoře

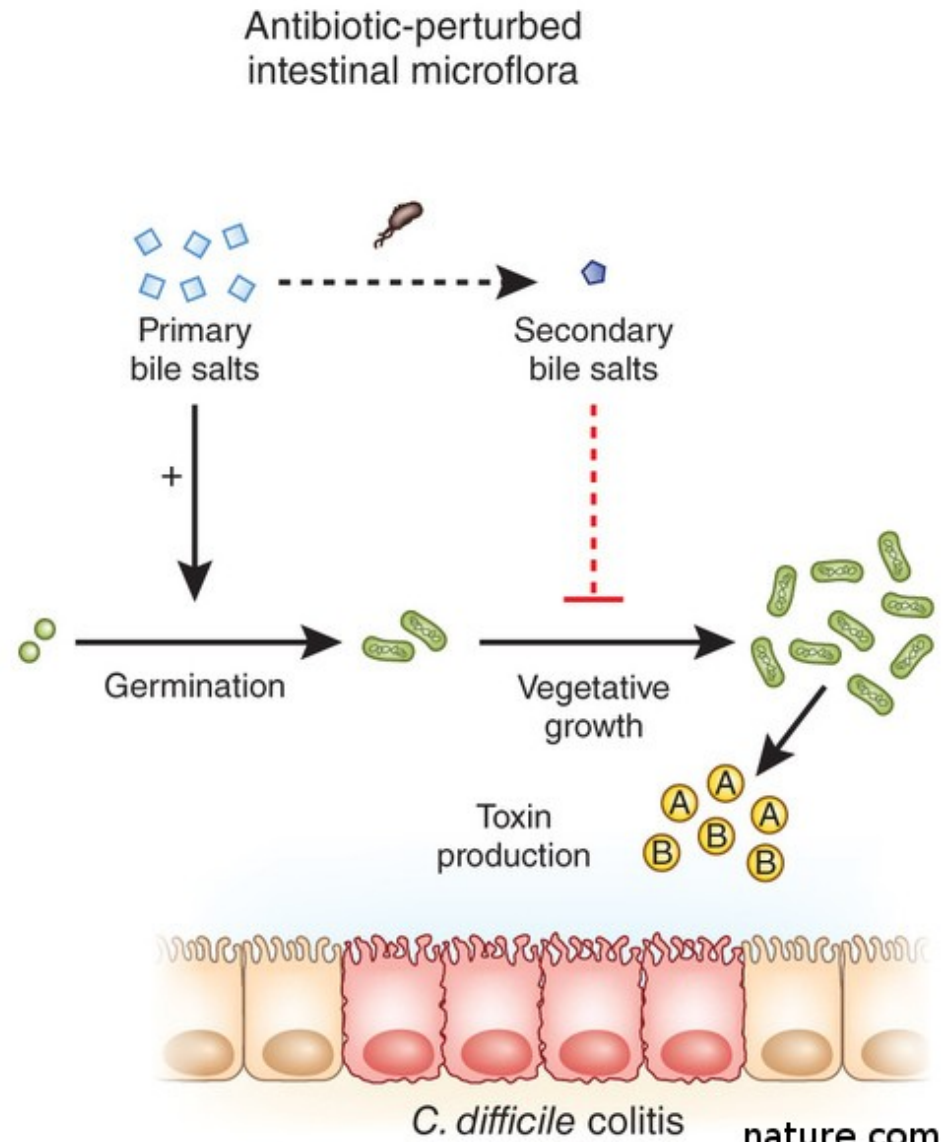
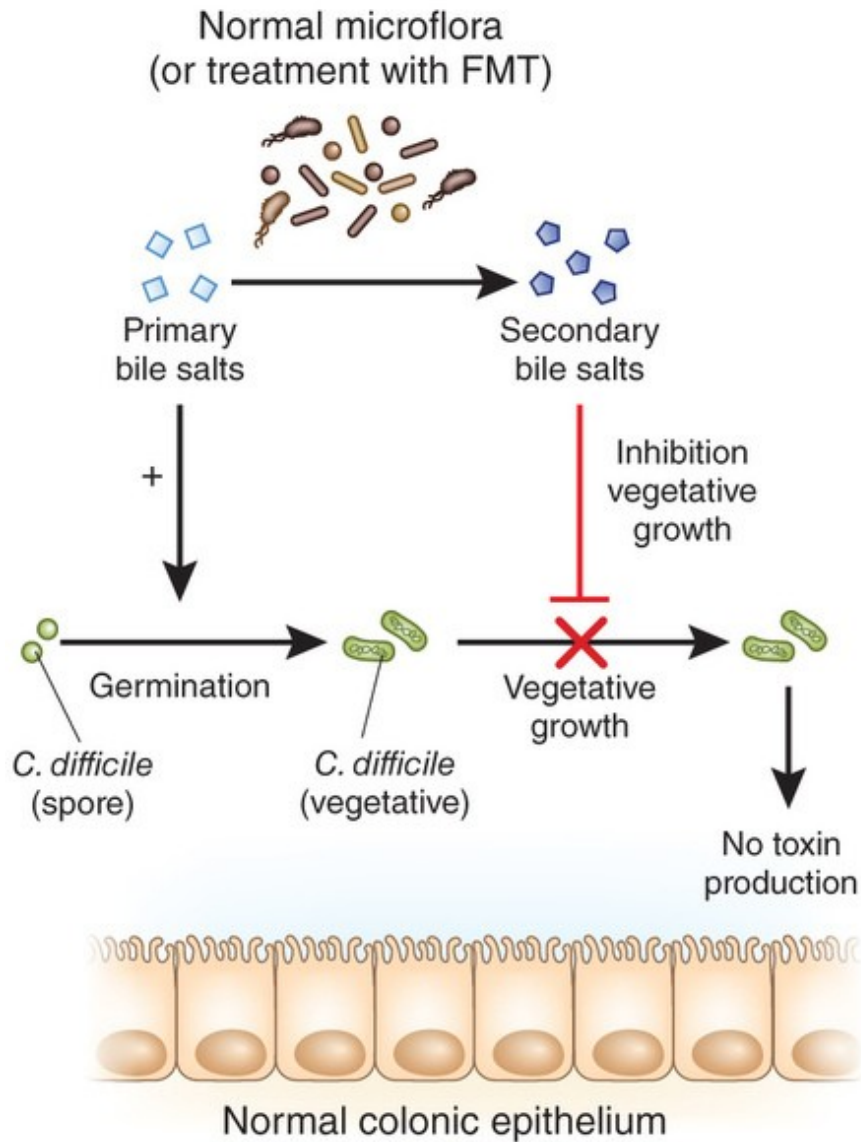
Plynatá sněť



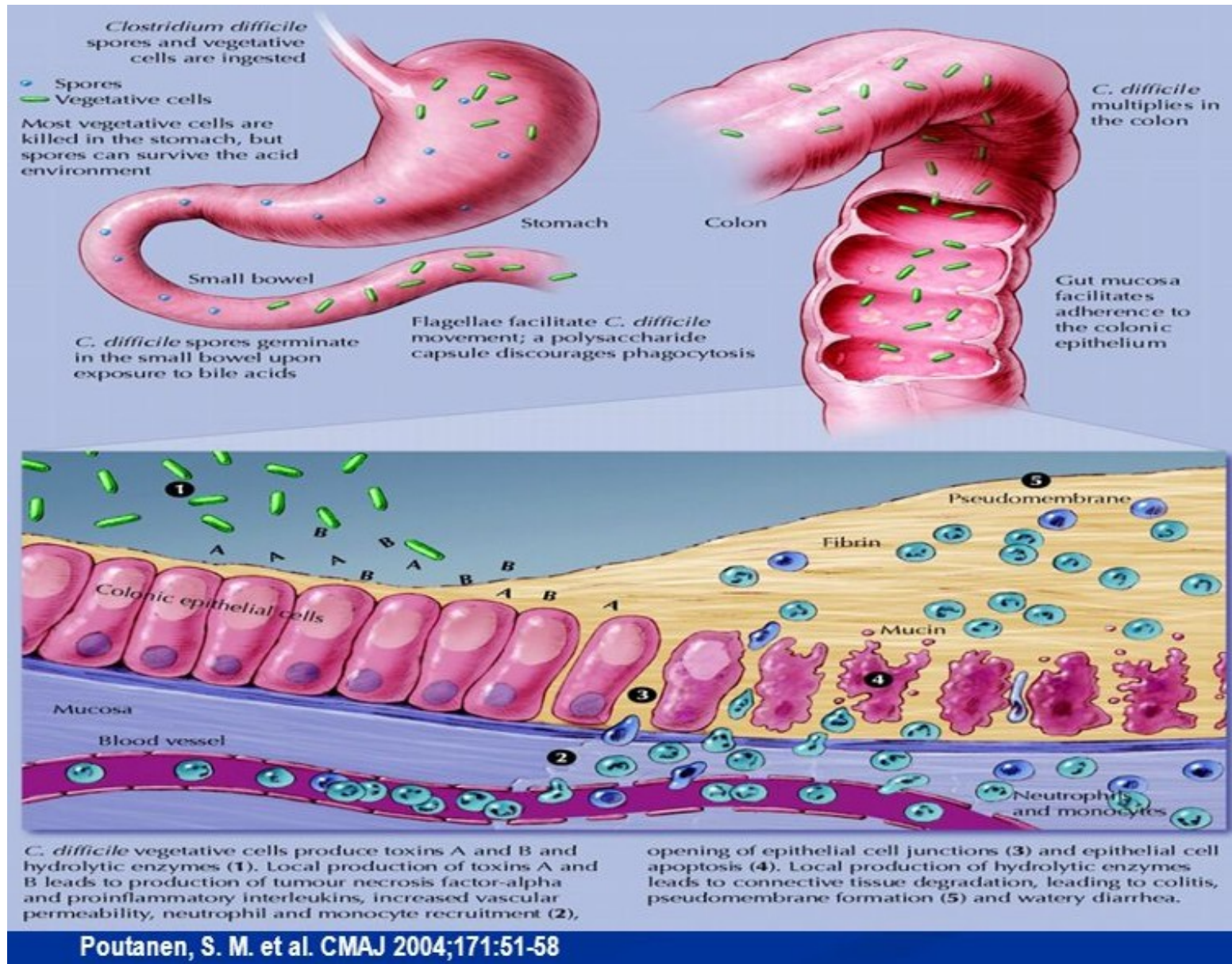
Clostridium difficile

- **přítomno ve střevech** (5 % zdravých dospělých, více u dětí a kojenců)
- **způsobuje** lehčí průjmy, ale i **pseudomembranózní kolitidu**
- **onemocnění často nozokomiálního původu (po podání antibiotik)**
 - především klindamycin, širokospektré peniciliny (amoxicilin+klavulanát) a cefalosporiny (cefoxitin)
 - tato ATB **eliminují normální střevní mikroflóru** → **přemnožení *C. difficile*** (rezistentní)
 - léčba **metronidazol, vankomycin per os, fekální transplantace** (FMT – fecal microbiota transplantation)

Clostridium difficile (2)



Clostridium difficile (3)



Přehled klostridií

<i>C. tetani</i>	původce tetanu
<i>C. botulinum</i>	producent botulotoxinu
<i>C. perfringens</i>, <i>C. septicum</i>, <i>C. novyi</i>, aj.	klostridia plynatých snětí (+ enteropatogenita)
<i>C. difficile</i>	enteropatogenní

Přehled nejběžnějších druhů nesporelujících anaerobů

	Koky	Tyčky
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> **

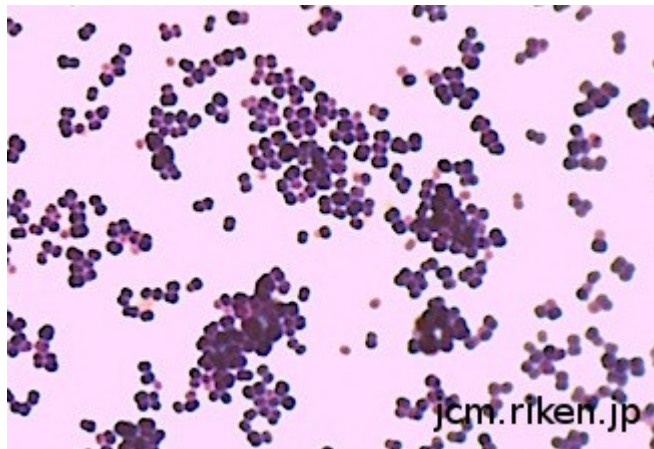
* tyčky se zašpičatělými konci

** tyčky s rovnými konci

*** není obligátní anaerob

Nesporulující anaerobní G+ koky

- rody *Peptococcus* a *Peptostreptococcus*
 - běžná mikroflóra GIT a vaginy → infekce endogenního původu
 - **zánětlivé procesy** v malé pánvi (poporodní endometritidy, ...), periodontitidy, **abscesy** (peritonsilární, plicní, ...), sinusitidy, otitidy, peritonitidy při proniknutí střevního obsahu do dutiny břišní

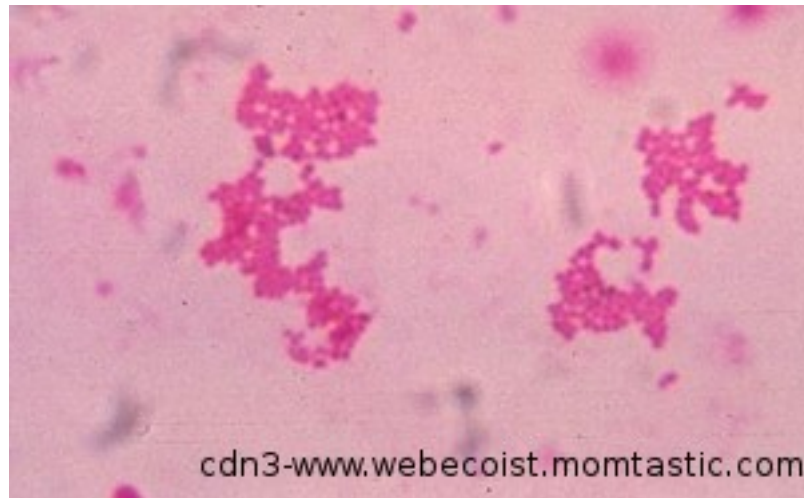


Nesporulující anaerobní G+ tyčky

- rod ***Propionibacterium***
 - tyčky kyjovitého tvaru morfologicky podobné rodu *Corynebacterium*
 - běžná mikroflóra dutiny ústní, GIT, urogen. traktu
 - nejvýznamnější ***Propionibacterium acnes***
 - produkuje lipázy → **vznik a rozvoj akné**
 - izolován i z hemokultur při endokarditidách a sepsích
- rod ***Eubacterium***
 - běžná mikroflóra dutiny ústní, GIT, urogen. traktu
 - bakteriální vaginózy, smíšené anaerobní infekce

Nesporulující anaerobní G- koky

- rod *Veillonella*
 - **běžná mikroflóra flóru dutiny ústní (součást zubního plaku)**, nosohltanu, GIT a urogen. traktu
 - smíšené anaerobní infekce (zejména) ústní dutiny, výjimečně meningitidy, osteomyelitidy
 - *Veillonella parvula* původcem **endokarditidy** či **sepsy**



Nesporulující anaerobní G- tyčky

- **běžná mikroflóra lidského těla** (dutina ústní, nosohltan, GIT, urogen. trakt)
- **značně pleomorfní** (obyčejně tyčky, ale i koky nebo vlákna), **netvoří spóry, pestrá biochemická aktivita**
→ **využití v diagnostice**
- původci **infekcí endogenního původu**
- terapie **ATB** (klindamycin, linkomycin, metronidazol, chloramfenikol, peniciliny s inhibitory beta-laktamáz)
většinou **v kombinaci s chirurgickým výkonem**

Nesporulující anaerobní G- tyčky (2)

- rod ***Bacteroides***
 - **nejčastěji izolované** z infekcí (dutina břišní, malá pánev, vagina, dutina ústní, ...)
 - *Bacteroides fragilis*
- rod ***Porphyromonas***
 - infekce dutiny ústní (gingivitidy, gingivostomatitidy) a urogenitálního traktu
 - *Porphyromonas gingivalis*
- rod ***Prevotella***
 - infekce HCD (anginy, sinusitidy)
 - *Prevotella melaninogenica*

Nesporulující anaerobní G- tyčky (3)

- rod ***Fusobacterium***
 - polymorfní, až vřetenovitý tvar
 - infekce chirurgických a traumatických ran, komplikují rány po kousnutí zvířetem, směsné kultury při pneumonii, hrudním empyému, intraabdominální infekci a abscesech
 - *Fusobacterium nucleatum* (součást zubního plaku)
 - *Fusobacterium necrophorum* (nekrotizující tonsilitida)
- rod ***Leptotrichia***
 - součást ústní mikroflóry
 - *Leptotrichia buccalis* (orodentální infekce)

„Veillonova flóra“

- **název pro skupinu anaerobních G+ a G- nesporulujících bakterií kolonizujících kůži a sliznice člověka**
- není možné jednoznačně označit hlavního původce onemocnění
- **za původce onemocnění se pokládají rovnoměrně všechny bakterie**, kterých bývá izolován větší počet → za etiologického původce se pokládá celá tzv. Veillonova flóra
- součástí např. rody *Peptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Veillonella*, *Eubacterium*, *Propionibacterium*, *Fusobacterium*, *Bacteroides*, ...

Lactobacillus acidophilus

- **nejvýznamnější** zástupce rodu („Döderleinův bacil“)
- **G+ tyčky**, často v **řetízcích**, **mikroaerofilní** (ne anaerobní, nicméně rostou v nedokonalé anaerobióze běžných anaerostatů)
- **běžná mikroflóra dutiny ústní, GIT, vaginy**
- **laktobacily využívají sacharidy na laktát → snížení pH → zastavuje množení hnilobných bakterií** (využití i v potravinářství)
- **utilizace glykogenu** (z rozpadajících se epitelí) **ve vagině → snížení pH brání usídlení patogenů**
- **může způsobovat endokarditidy, novorozenecké meningitidy, endometritidy, abscesy, ...**

Vztah bakterií ke kyslíku

Prostředí	Normální	↓ O ₂	↑ CO ₂	Bez O ₂
Striktní aeroby	ano	ano	ano	ne*
Fakultativ. anaeroby	ano	ano	ano	ano
Aerotolerantní bakt.	ano	ano	ano	ano
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.

Diagnostika anaerobů

- **mikroskopie:** barvíme **podle Grama**, rozlišujeme na koky a tyčky, G+ a G-; **anaerobní tyčky pleomorfní** (nacházíme i vláknité formy a koky), u **spor sledujeme morfologii a uložení (světlolomné útvary**, nikoliv jen ztluštění tyčky!)
- **kultivace:** pevné půdy (anaerobióza pomocí anaerostatu či anaerobního boxu), tekuté půdy přelité parafinem (VL bujón, VL krevní agar a různé speciální půdy); většinou prodloužená kultivace na 2 dny až týden
- **biochemie:** většinou KAT- a OXI-, možné vzájemné **rozlišení biochemicky** a analýza plynů chromatografií
- antigenní analýza a nepřímý průkaz se v diagnostice anaerobů příliš nepoužívají

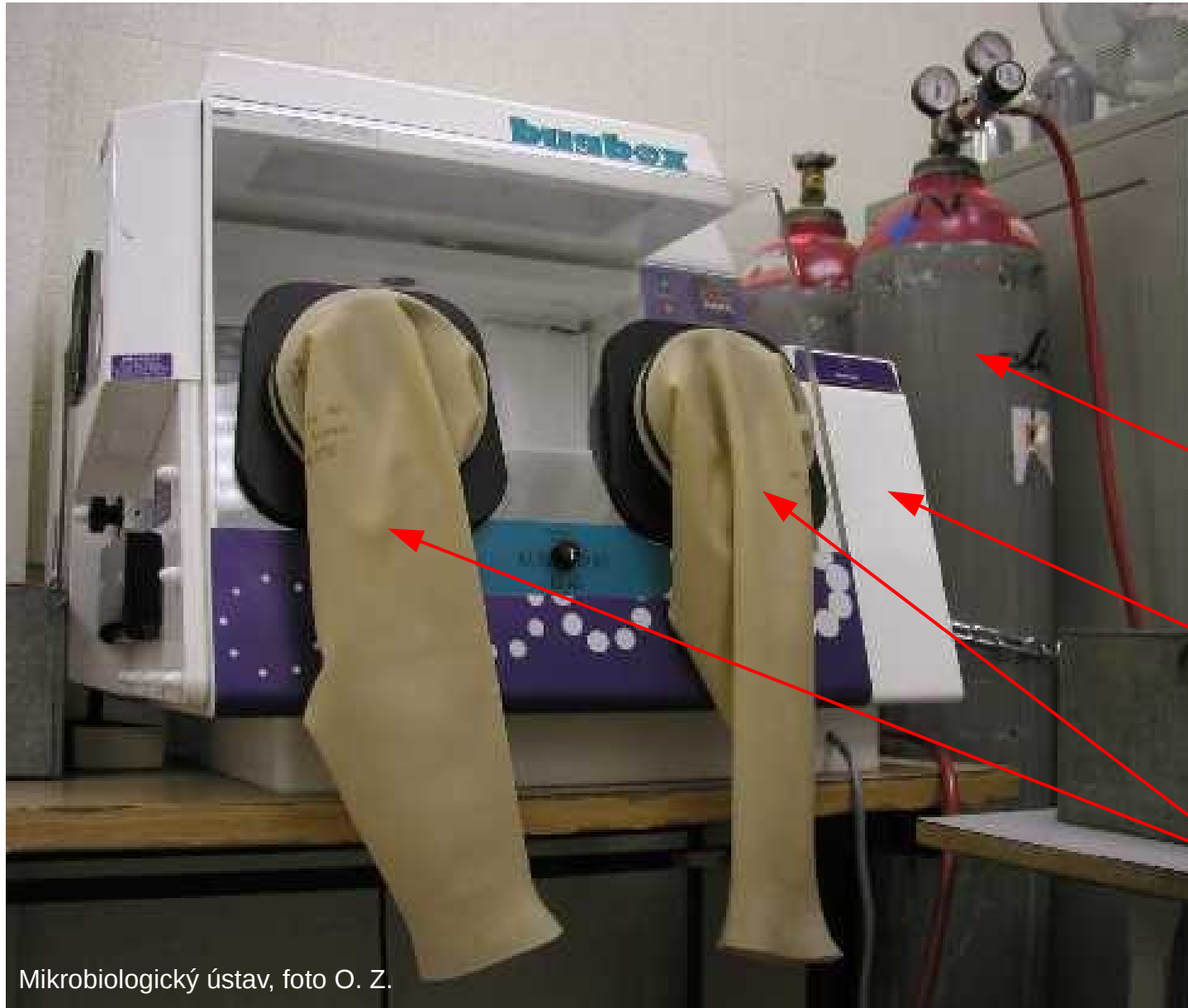
Diagnostika anaerobů (2)

- přednost má **tekutý vzorek**, např. hnis, nejlépe zaslaný **ve stříkačce s krytkou** (po odstříknutí přebytečného vzduchu) – dříve doporučený postup, kdy se na stříkačce ponechala jehla a zabodla do gumové zátky se již z bezpečnostních důvodů nedoporučuje
- **výtěr zanořen v transportní půdě** (např. Amiesova půda)
- lze domluvit s laboratoří naočkování vzorku přímo na půdy např. peroperačně

Kultivace anaerobních bakterií

- rostou často v **nepravidelných koloniích**, někdy **výběžkaté okraje**, někdy **pigment**
- typický je pro ně **značný (hnilobný) zápach**
- pro kultivaci anaerobů používáme **VL krevní agar**
- **získávání anaerobiózy:**
 - **mechanicky:** VL bujony přelijeme parafinovým olejem
 - **fyzikálně:** v anaerobním boxu se nahradí vzduch směsí anaerobních plynů, vháněných z bomby
 - **chemicky:** z organických kyselin tvoří H_2 a CO_2 → na palladiovém katalyzátoru reaguje H_2 s O_2 za vzniku vody → O_2 se spotřebovává

Anaerobní box



zdroj anaerobních plynů

prostor pro vkládání misek

vstupy pro ruce personálu

Anaerostat

tlakový ventil šroubovací uzávěr

vzduchotěsné víčko

palladiový katalyzátor
(pod víčkem)

konstrukce pro
ukládání Petriho misek

generátor anaerobiózy
(sáček s chemikáliemi)



Úkol 1: Mikroskopie klinického vzorku a mikroskopie kmene

- **úkol 1a: Prohlídka klinického vzorku** (popište směs patogenů, leukocyty, epitelie, atd.)
- **úkol 1b: Mikroskopie podezřelých kmenů** (rozlište G+ a G- koky a tyčky, **pokuste se najít spóry**)

Úkol 2: Anaerostat a anaerobní box

- **popište anaerostat a anaerobní box podle obrázku z prezentace**

Úkol 3: Kultivace na agarových půdách

- **popište kultivační výsledky** daných kmenů na aerobních i anaerobních půdách
- **popište morfolologii kolonií**

Úkol 4: Druhová diagnostika anaerobů biochemickými testy

- odečtete ANAEROtest 23
- 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 resistantního) rodu *Bacteroides*

Úkol 5: Citlivost anaerobů na antibiotika

- **lékem volby** u většiny anaerobů **penicilin**
- **rezistentní je však rod *Bacteroides*** (v užším slova smyslu – rody *Prevotella* a *Porphyromonas*, které se z něj kdysi odštěpily, jsou citlivé)
- antibiotická citlivost se u anaerobů dříve prováděla difusním diskovým testem (nikoli na MH, ale na VL krevním agaru)
- **nyní se ale zpravidla používá E-test**
- **odečtete hodnotu MIC a určete, zda je daný kmen citlivý nebo rezistentní** (odečítá se v místě, kde se kříží okraj zóny s testovacím proužkem)

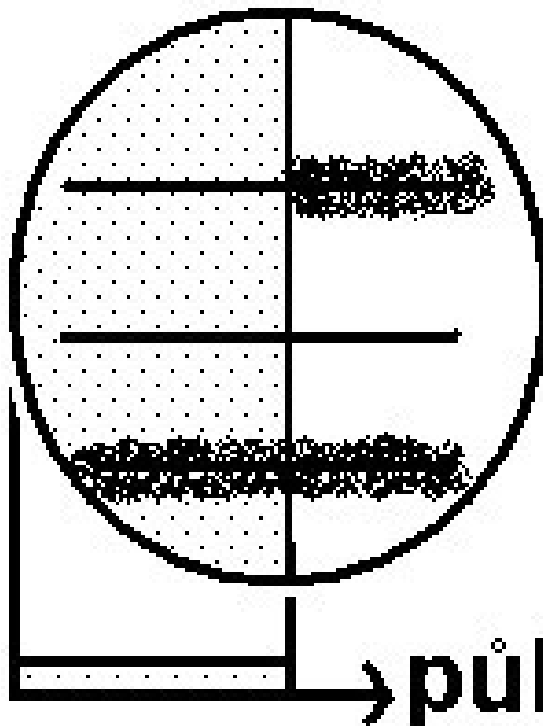
Úkol 6a: Průkaz toxinu (lecitinázy) *Clostridium perfringens*

- *Clostridium perfringens* tvoří **specifickou lecitinázu**, jež je možno **neutralizovat specifickou protilátkou**
- polovina 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**



Úkol 6a: Průkaz toxinu (lecitinázy) *Clostridium perfringens*

- pravý toxin je neutralizován antitoxinem, jiné lecitinázy neutralizovány nejsou
- „Negativní I“ vůbec neprodukuje lecitinázu
- „Negativní II“ produkuje, ale nějakou jinou, než nás zajímá



pozitivní
negativní I
negativní II

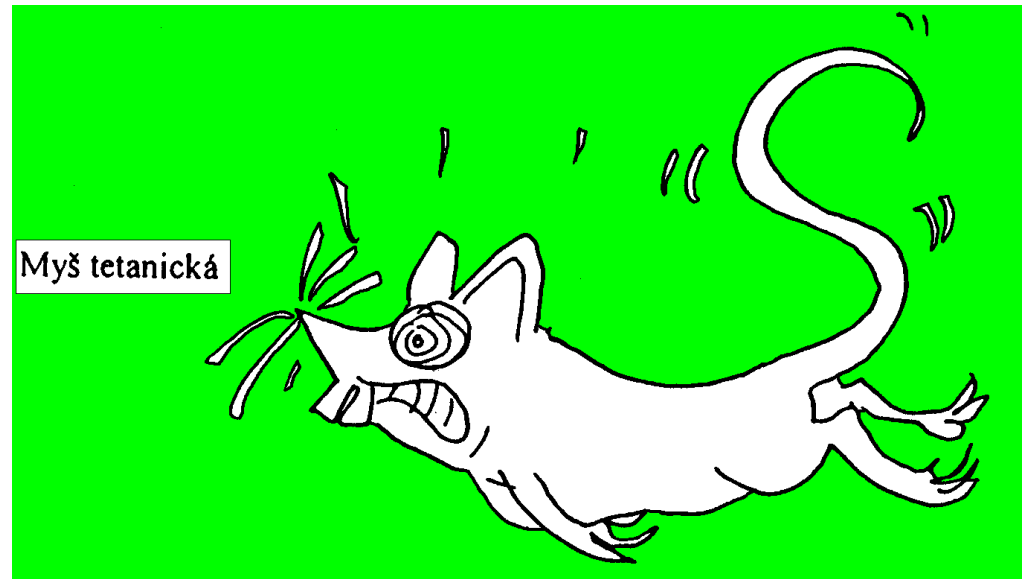
→ půlka s antitoxinem

Úkol 6b: Průkaz toxinu *Clostridium tetani*

- průkaz toxinu *Clostridium tetani* se provádí očkováním tetanické myš
- typická je pozice ocásku a končetin (zakreslete)



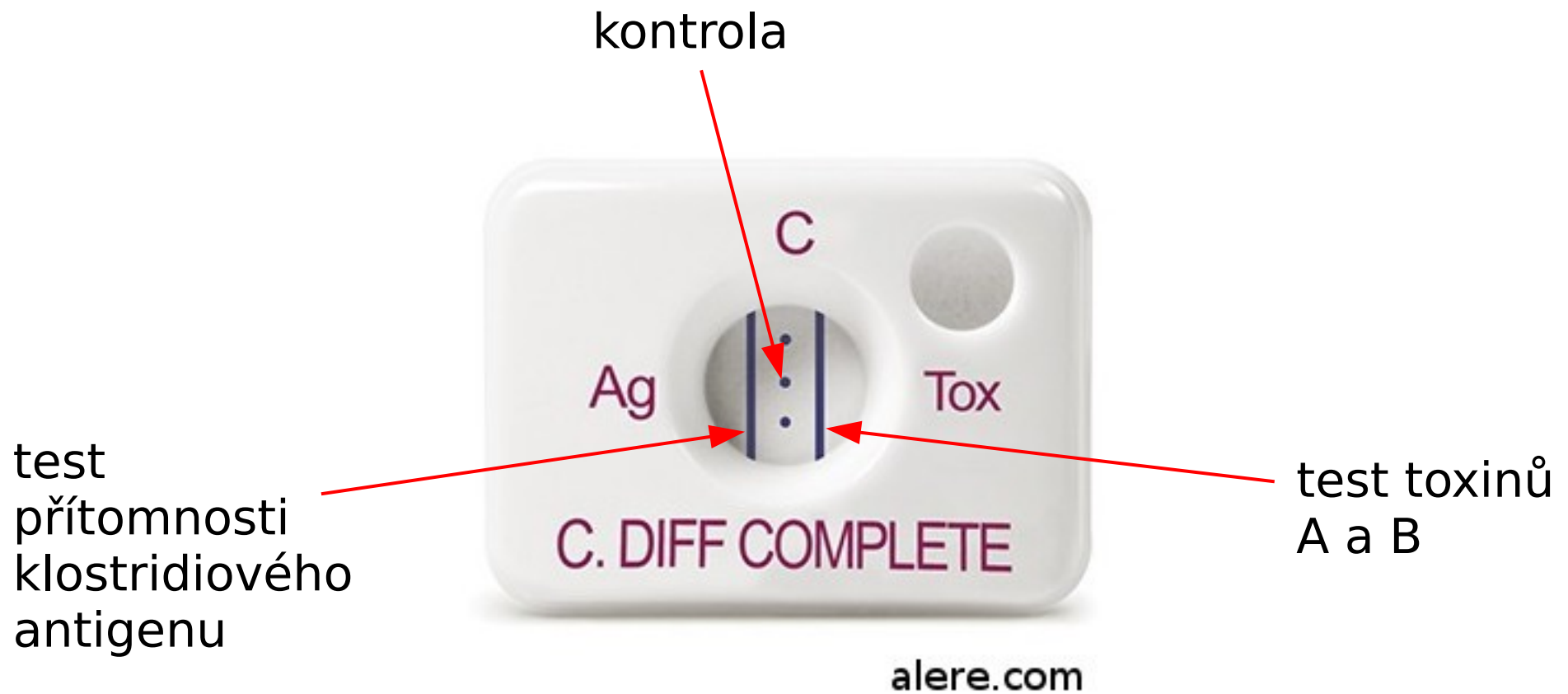
microvet.arizona.edu



Obrázek Petra Ondrovčíka (graficky upraveno)

Úkol 6c: Detekce A a B toxinů *Clostridium difficile*

- odečtete imunochromatografické testy tří pacientů



Po tomto cvičení byste měli umět:

- popsat hlavní zástupce rodu *Clostridium*, včetně testů, které slouží pro jejich identifikaci, popř. identifikaci jejich toxinů
- popsat nejběžnější druhy nesporulujících anaerobů, jejich diagnostiku a obvyklou léčbu
- popsat základy anaerobní kultivace a možnosti získání anaerobiózy