

FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

Studijní program: Specializace ve zdravotnictví B5345

Šárka Brandtlová

Studijní obor: Zdravotní laborant 5345R020

Klostridia a jejich výskyt u pacientů FN Plzeň

Bakalářská práce

Vedoucí práce: MUDr. Lenka Geigerová

PLZEŇ 2017

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a všechny použité zdroje jsem uvedla v seznamu použitých zdrojů.

V Plzni dne 24. 3. 2017

.....

vlastnoruční podpis

Děkuji MUDr. Lence Geigerové za odborné vedení bakalářské práce, poskytování cenných rad, věcných připomínek, trpělivost a ochotu, kterou mi věnovala.

Mé poděkování patří též Ústavu mikrobiologie Fakultní nemocnice Plzeň za spolupráci při získávání údajů pro praktickou část práce. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Janu Kotalíkovi za korekturu textu a za morální podporu.

Anotace

Příjmení a jméno: Brandtlová Šárka
Katedra: Katedra teoretických oborů
Název práce: Klostridia a jejich výskyt u pacientů FN Plzeň
Vedoucí práce: MUDr. Lenka Geigerová

Počet stran – číslované: 46

Počet stran – nečíslované: 14

Počet příloh: 8

Počet titulů použité literatury: 34

Klíčová slova: *Clostridium*, tetanus, botulismus, klostridia anaerobních traumatóz, *Clostridium difficile*, real-time PCR, enzymová membránová imunoanalýza, výskyt

Souhrn:

Bakalářská práce se zabývá anaerobními sporulujícími bakteriemi rodu *Clostridium* se zaměřením na *Clostridium difficile*. Je rozdělena na teoretickou a praktickou část. Teoretická část nejprve obecně popisuje rod *Clostridium*, dále charakterizuje nejvýznamnější zástupce, popisuje jejich výskyt a patogenitu. Rozebírá také diagnostiku a léčbu jimi způsobených onemocnění. Praktická část se soustředí na diagnostiku a výskyt *Clostridium difficile* ve Fakultní nemocnici v Plzni v letech 2012–2016. Výsledkem je sestavená statistika dat z membránové enzymatické imunoanalýzy a real-time PCR vyšetření stolice se zaměřením na počet vyšetřených vzorků, na věk a pohlaví pacientů jako rizikových faktorů vzniku CDI (*Clostridium difficile* infection).

Annotation

Surname and name: Brandtlová Šárka
Department: Department of Theoretical Fields
Title of thesis: Clostridia and their occurrence in patients of
University Hospital Pilsen
Consultant: MUDr. Lenka Geigerová

Number of pages – numbered: 46

Number of pages – unnumbered: 14

Number of appendices: 8

Number of literature items used: 34

Keywords: *Clostridium*, tetanus, botulism, Clostridia of anaerobic injury, *Clostridium difficile*, real-time PCR, enzyme membrane immunoassay, occurrence

Summary:

Bachelor thesis deals with anaerobic spore-forming bacteria of the *Clostridium* genus focusing on *Clostridium difficile*. The thesis is dividend into theoretical and practical part. The theoretical part generally describes the *Clostridium* genus, further it characterizes the most signifiant representatives, it describes their prevalence and pathogenicity. It also describes the diagnosis and treatment of diseases caused by them. The practical part focuses on diagnostics and the incidence of *Clostridium difficile* at University Hospital Pilsen in the years 2012–2016. The result is a compilation of statistical data of membrane enzyme immunoassay and real-time PCR stool examination. It focuses on the number of tested samples, age and sex of patients as risk factors of CDI (*Clostridium difficile* infection).

OBSAH

ÚVOD	11
TEORETICKÁ ČÁST	12
1 ROD <i>CLOSTRIDIUM</i>	12
1.1 Taxonomie	12
1.2 Morfologie	12
1.3 Metabolismus	14
1.4 Růst	14
1.5 Výskyt	15
1.6 Patogenita	15
2 <i>CLOSTRIDIUM TETANI</i>	16
2.1 Tetanus	16
2.1.1 Diagnostika	17
2.1.2 Prevence a léčba	17
3 <i>CLOSTRIDIUM BOTULINUM</i>	18
3.1 Botulismus	19
3.1.1 Diagnostika	19
3.1.2 Prevence a léčba	19
4 KLOSTRIDIA ANAEROBNÍCH TRAUMATÓZ	20
4.1 <i>Clostridium perfringens</i>	21
4.1.1 Patogenita	21
4.1.2 Diagnostika	21
4.1.3 Léčba	22
4.2 <i>Clostridium histolyticum</i>	22
4.3 <i>Clostridium septicum</i>	22
4.4 <i>Clostridium novyi</i>	23
4.5 <i>Clostridium sordellii</i>	23
4.6 <i>Clostridium sporogenes</i>	23
4.7 <i>Clostridium tertium</i>	23
5 <i>CLOSTRIDIUM DIFFICILE</i>	24
5.1 Patogenita	24
5.2 Klinický obraz	25
5.3 Diagnostika	25
5.3.1 Průkaz glutamátdehydrogenázy a toxinů A a B	25

5.3.2	Kultivace.....	26
5.3.3	Polymerázová řetězová reakce	27
5.3.4	Průkaz cytopatického efektu na tkáňových kulturách	27
5.4	Léčba.....	28
5.5	Epidemiologie	29
PRAKTICKÁ ČÁST.....		30
6	Cíl a úkol průzkumu.....	30
7	Hypotézy	31
8	Zkoumaný soubor pacientů	32
9	Metody průzkumu	33
9.1	Algoritmus vyšetření <i>Clostridium difficile</i> ve FN Plzeň	33
9.2	Metoda membránové enzymové imunanalýzy	33
9.2.1	Pomůcky	33
9.2.2	Příprava činidel.....	34
9.2.3	Pracovní postup	34
9.2.4	Výsledky.....	34
9.3	Polymerázová řetězová reakce s vyhodnocením v reálném čase	35
9.3.1	Pomůcky	35
9.3.2	Pracovní postup	36
9.3.3	Výsledky.....	37
10	Prezentace a interpretace získaných výsledků.....	38
10.1	Množství vzorků	38
10.2	Věk pacientů	39
10.3	Pohlaví pacientů.....	41
11	DISKUZE	43
ZÁVĚR		45
POUŽITÁ LITERATURA		
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK		
SEZNAM TABULEK		
SEZNAM GRAFŮ		
SEZNAM OBRÁZKŮ		
SEZNAM PŘÍLOH		
PŘÍLOHY		

ÚVOD

Práce pojednává o bakteriích rodu *Clostridium*, zejména o druhu *Cl. difficile*. Jsou to grampozitivní sporulující anaerobní tyčinky, které kvůli produkci toxinů mohou člověku způsobit vážná onemocnění. Mezi ty známější patří botulismus neboli otrava klobásovým jedem, tetanus, známý díky pravidelnému očkování, plynatá sněť, často se vyskytující u válečných zranění či pseudomembranózní kolitida, o které se dnes mluví převážně v souvislosti s léčbou antibiotiky. Pokud nemají správné podmínky pro růst, vytvoří klidové stádium, tzv. sporu, ve kterém mohou přežít až stovky let. Kultivace klostridií se od běžné kultivace liší tím, že musí probíhat bez přístupu kyslíku.

Téma bakalářské práce jsem si vybrala kvůli zájmu o mikrobiologii a také o další vzdělávání v oboru bakteriologie. Klostridia mě zaujala nejvíce právě díky jejich odlišnostem od ostatních běžných bakterií. Dalším důvodem byl můj zájem o onemocnění, která způsobují.

Při studiu literatury jsem se dozvěděla, že onemocnění způsobená *Cl. difficile* mají souvislost s masivní destrukcí mikroflóry ve střevě, což může být způsobeno např. léčbou antibiotiky. Ta bývají v dnešní době často neuváženě předepisována, proto patří střevní onemocnění způsobovaná *Cl. difficile* mezi jedny z nejčastějších nozokomiálních nákaz. Toto zjištění mě přimělo zajímat se o četnost výskytu *Cl. difficile* v mém okolí, v Plzni. Cílem práce je tedy zpracovat a zhodnotit statistická data pocházející z výsledků vyšetření stolice na průkaz antigenu či toxinu *Cl. difficile* ve FN Plzeň v letech 2012–2016. Dále prozkoumat faktory, které mají vliv na vznik CDI, zejména věk a pohlaví pacientů, a popsat průběh laboratorní diagnostiky *Cl. difficile* ve FN Plzeň.

K dosažení stanovených cílů jsem zpracovávala literární a internetové zdroje. Pracovala jsem především s knihami pana profesora Votavy, a to s Lékařskou mikrobiologií obecnou, speciální a vyšetřovacími metodami. Čerpala jsem také z odborných publikací, zejména z časopisu Klinická mikrobiologie a infekční lékařství.

Pro správné pochopení práce jsou potřebné alespoň minimální znalosti v oblasti mikrobiologie a medicíny.

TEORETICKÁ ČÁST

1 ROD *CLOSTRIDIUM*

Klostridia jsou grampozitivní sporulující anaerobní tyčinky vyskytující se hojně v přírodě, v půdě, ve stolici lidí a zvířat. Většinou jsou to saprofyty, některá mohou kvůli produkci toxinů vyvolat závažná onemocnění u člověka. Společným znakem je jejich citlivost ke kyslíku, která je u jednotlivých druhů různá, ale nikdy se nemnoží v jeho přítomnosti. Některé druhy (např. *Cl. perfringens*, *Cl. histolyticum*, *Cl. tertium*) jsou aerotolerantní, ostatní jsou většinou striktně anaerobní. Nejčastěji se vyskytující klostridium je *Cl. perfringens* patřící mezi histotoxická klostridia, je původcem plynaté sněti. K dalším zástupcům rodu patří *Cl. sordellii*, *Cl. bifermentans*, *Cl. sporogenes*, *Cl. innocuum* – neprodukují toxiny a jsou méně patogenní. Dalšími významnými druhy jsou *Cl. tetani* – původce tetanu, *Cl. botulinum* – původce botulismu, *Cl. difficile* – původce pseudomembranózní kolitidy. (1, 2)

1.1 Taxonomie

Taxony:	Doména	Bacteria
	Kmen	Firmicutes
	Třída	Clostridia
	Řád	Clostridiales
	Čeleď	Clostridiaceae
	Rod	<i>Clostridium</i>

1.2 Morfologie

Vegetativní forma bakterie má tvar tyčinky s rovnými nebo zaoblenými konci, které jsou díky bičíkům většinou pohyblivé. Některé druhy bičíky netvoří, jsou nepohyblivé, např. *Cl. perfringens*. Charakteristickou vlastností klostridií je tvorba spor, klidových forem bakterie. Jejich jaderná hmota a cytoplazma jsou obklopeny několika obaly, díky kterým je tato forma bakterie vysoce rezistentní k nepříznivým podmínkám. Spory se tvoří uvnitř bakteriální buňky, jedná se tedy o endospory. Bakterie ji vytvoří, pokud

se dostane do nepříznivých podmínek. Například má-li nedostatek živin, nebo pokud je vystavena vysoké teplotě, případně suchu. Proces tvorby spor se nazývá sporulace. Bakteriální chromozom se rozbalí do dlouhého vlákna, cytoplazmatická membrána se vchlípí do buňky a rozdělí ji na dvě části. Do obou částí se rozdělí DNA. Menší část se obalí membránami, mezi kterými je peptidoglykan, na povrchu se tvoří proteinové obaly. Nakonec se mateřská buňka rozpadne a uvolní se spora. Po sporulaci buňka nemetabolizuje, nemnoží se ani neroste, ale pouze přežívá, dokud se v okolním prostředí nevytvoří lepší podmínky pro život vegetativního stádia. Pokud se do těchto podmínek dostane, vyklíčí. Tomuto procesu se říká germinace. Začíná většinou spontánní aktivací spory, která začne přijímat vodu, ztratí rezistenci, bílkoviny se začnou rozkládat a vznikají nové aminokyseliny. Pukají sporové obaly a bakterie vyklíčí ve vegetativní stádium. (3, 4)

Spory jsou rezistentní vůči vlivům vnějšího prostředí. Odolávají vysokým teplotám, vysychání, UV záření, kyselinám, organickým rozpouštědlům a desinfekci. Například spory *Cl. botulinum* nezabije ani vaření při 100 °C po dobu 5 hodin. Všechny spory spolehlivě zničí autoklavace, při které se musí vystavit 20 minut tlaku 0,2 Mpa a teplotě 121 °C. (3, 4)

Sporulující bakterie se dají velmi dobře rozpoznat podle tvaru, velikosti a uložení spory. Podle tvaru se dělí na oválné (*Cl. botulinum*) a kulaté (*Cl. tetani*). Velikost určujeme vzhledem k tloušťce buňky ve vegetativním stádiu. Spory mohou být buď větší (*Cl. botulinum*, *Cl. tetani*, *Cl. histolyticum* a *Cl. novyi*) nebo menší. Uloženy mohou být terminálně, tzn. na konci tyčky (*Cl. tetani*), centrálně, tzn. uprostřed (*Cl. histolyticum*, *Cl. novyi* a *Cl. septicum*) nebo subterminálně, tj. mezi středem a koncem tyčinky (*Cl. botulinum*). (4) Pro představu toho, jak klostridiální spory vypadají je v Příloze 1 vyobrazen jejich mikroskopický preparát.

Buněčná stěna je silná vrstva, mezi jejíž funkce patří ochrana obsahu buňky a udržování tvaru bakterie. Základní složkou je peptidoglykan tvořený z několika vrstev polysacharidových řetězců. Tyto řetězce jsou tvořeny příčně, krátkými peptidy, které jsou navzájem spojené peptidovými vazbami. Další stavba je u grampozitivních a gramnegativních bakterií odlišná. Grampozitivní bakterie, tedy i klostridia, mají buněčnou stěnu jednodušší a silnější (kolem 20 nm). Je složena pouze z peptidoglykanu a z řetězců kyseliny teichoové. Díky tomuto složení se grampozitivní bakterie barví

dle Grama tmavě modře. Cytoplazmatická membrána je složena z dvojvrstvy fosfolipidů. Jsou v ní ukotvené i bílkoviny, které slouží k transportu živin do bakterie a odstranění odpadních látek mimo buňku pomocí aktivního či pasivního transportu. (4)

Bakterie rodu *Clostridium* jsou schopné pohybu díky specializovaným vláknitým útvarům – bičíkům. Sestávají z vlákna, kolénka a bazálního tělíska. Vlákno se skládá z bílkoviny flagelinu. Kolénko může měnit směr bičíku až o 90° a bazální tělísko funguje jako stator. Bičíky mohou mít různé uložení. Klostridia ho mají uložený peritrichálně neboli po celém povrchu. (4)

1.3 Metabolismus

Klostridia jsou anaerobní organismy, jsou tedy citlivé na kyslík. Některé druhy, např. *Cl. perfringens* a *Cl. histolyticum*, jsou však schopny snést až 10 % kyslíku ve vzduchu. (5, 6)

Podstatou anaerobního metabolismu je nepřítomnost katalázy, cytochromů, cytochromoxidázy, peroxidázy, event. dalších enzymů. Vzniklé produkty (peroxydy) proto nemohou být rozloženy a klostridia hynou. Dále také potřebují prostředí s nízkým oxidoredukčním potenciálem (cca -100 až -200 mV), který jim umožní se množit. Této skutečnosti se využívá při jejich kultivaci. (2, 5)

Klostridia získávají energii anaerobní glykolýzou. Podle schopnosti metabolizovat různé substráty a využívat z nich energii se dělí do několika skupin. Mohou štěpit proteiny, kvasit sacharidy nebo obojí. (1)

1.4 Růst

Růstový cyklus klostridií je stejný jako u ostatních bakterií. Je to soubor chemických a fyzikálních procesů, které vedou ke vzniku nové buňky. Začíná, když se oddělí dceřiná buňka od rodičovské a končí jejím dalším rozdělením. Mezi tím probíhají tři fáze:

1. růst buňky, při kterém se zdvojuje DNA chromosomu,
2. tvorba septa vrůstajícího do buňky a
3. dělení buňky.

Kopie DNA a polovina obsahu cytoplazmy půjde do obou dceřiných buněk, které se poté pomocí septa úplně oddělí. (6)

Délka jednoho růstového cyklu (tzv. generační doba) je u každé bakterie jiná, v normálních podmínkách se řádově se jedná o desítky minut až 12 hodin. (6)

Pro kultivaci klostridií musíme zajistit optimální podmínky – správnou teplotu (37°C), pH (7–7,4) a čas, který je odlišný u každého druhu (12–48 hodin). Důležitou součástí správných kultivačních podmínek je anaerobní prostředí, které je zajištěno v anaerostatech a anaerobních boxech, kde se využívá místo kyslíku dusík a oxid uhličitý. Půdy k pěstování anaerobů se vyznačují nízkým oxidoredukčním potenciálem. Toho se docílí přidáním redukujících látek, např. glukózy, L-cysteinu, kyseliny askorbové nebo vitamínu K. Příkladem takových půd je VL bujon (maso-kyvasničný), Schaedlerův bujon s heminem a cysteinem nebo Wilkinsův-Chalgrenův bujon s vitamínem K. Tyto půdy se vyrábějí i v pevné agarové podobě. (6, 7)

1.5 Výskyt

Klostridia se vyživují saprofyticky, jsou součástí běžné střevní mikroflóry lidí i zvířat. Účastní se hnilobných procesů, kde jsou pro ně optimální podmínky pro život, protože je zde minimální přísun kyslíku. Spory se mohou vyskytovat v půdě, ve vodě, v prachu a mohou kontaminovat i potraviny. (1)

1.6 Patogenita

Z velkého množství druhů klostridií jich jen relativně málo může způsobit onemocnění u lidí. Podle patogenity se klostridia dělí na histotoxická a neurotoxická. Neurotoxická klostridia produkují toxiny, které působí na nervový systém. Jsou to *Cl. tetani* a *Cl. botulinum*. Histotoxická klostridia způsobují nekrotizující infekce měkkých tkání. Patří sem především *Cl. perfringens*, dále pak *Cl. novyi*, *Cl. septicum* a *Cl. histolyticum*. Zvláštní skupinu tvoří *Cl. difficile*, které produkcí enterotoxinu způsobuje enterokolitidy. (6)

2 *CLOSTRIDIUM TETANI*

Cl. tetani je původcem tetanu. Je to rovná a štíhlá tyčinka schopná pohybu. Její rozměry jsou 0,5×5–7 μm. Spory *Cl. tetani* jsou okrouhlé, vysoce rezistentní a jsou umístěny terminálně. (1)

Tento druh se vyskytuje po celém světě. Je součástí mikroflóry střeva savců, především koní, s jejichž výkaly se dostává do půdy, kde ve formě spor přežívá i několik desítek let. Člověk se infikuje právě sporami, které se zanesou do rány. K nákaze dochází nejčastěji při dopravních nehodách, poraněních v přírodě nebo v zemědělství, kdy dojde ke zhmoždění tkáně a její ischemii, což umožní vyklíčení spor. (8, 9)

Cl. tetani tvoří ve vegetativní formě dva účinné toxiny tetanolyzin a tetanospasmin. Tetanolyzin destrukuje erythrocyty, leukocyty a další buňky, ale pro patogenezi tetanu nemá žádný význam. Tetanospasmin způsobuje klasické klinické příznaky tetanu – křeče kosterního svalstva. Je to protein skládající se ze tří částí (A, B a C). Část A je hlavní účinná složka toxinu, zatímco díky částem B a C je toxin schopen pronikat ke svým cílovým místům. Spasmy vyvolané tetanospasminem vznikají působením toxinu na presynaptická zakončení zejména v míše a mozgovém kmeni, kde je zamezeno uvolňování inhibičních mediátorů GABA a glycinu. Toxin dále působí na vegetativní nervový systém. Vazba je ireverzibilní. (10)

2.1 Tetanus

Tetanus je akutní onemocnění CNS způsobené toxiny. Jeho hlavním příznakem jsou křeče kosterního svalstva. Začínají v místě poranění a rozšiřují se na svaly obličejové, zádové, svaly břicha a nakonec postihnou i svaly dýchací, což má za následek smrt. (9)

Každý rok je na celém světě hlášeno téměř milion případů. Díky účinné imunizaci je tetanus ve vyspělých zemích vzácnou chorobou, v rozvojových zemích se však vyskytuje častěji. V České republice je výskyt tetanu velmi nízký, vyskytují se 2–3 případy ročně. Nejvíce jsou nakažením ohroženi imunokomprimovaní jedinci. Novorozenecký tetanus vzniká zanesením infekce do pupečnickového pahýlu, je velmi vzácný. (1, 8, 11)

Inkubační doba je od 3 do 30 dnů, obvykle 7–14 dní, čím je kratší, tím je průběh onemocnění závažnější. Blokádou inhibice motorických neuronů dochází ke vzniku tonických křečí. Postižení žvýkacích svalů se označuje jako trismus, křeč mimických svalů jako risus sardonius, dále se objevují spasmy svalů laryngu a krku, které se rozšiřují na celé tělo. Postižení dýchacích svalů vede nakonec k udušení. Nemocný je celou dobu při vědomí. (10)

Při menším množství produkovaného neurotoxinu dochází k lokalizovanému tetanu, kdy se křeče objevují jen u určité skupiny svalů, např. v okolí vstupu bakterie do těla. (1)

2.1.1 Diagnostika

Základ diagnostiky tetanu je v klinickém obrazu a anamnéze. Pozitivní mikrobiologické vyšetření diagnózu potvrdí, ale negativní výsledek ji nevyloučí. Mikroskopicky se dá *Cl. tetani* prokázat v preparátu barveném dle Grama jako grampozitivní tyčinka, která má terminální spory. Kultivace probíhá za anaerobních podmínek, *Cl. tetani* je charakteristické plazivým růstem. Lze prokázat i toxin, a to neutralizačním pokusem na myších. (1)

2.1.2 Prevence a léčba

Léčba tetanu spočívá v podání lidského antitetanického globulinu. Důležitou součástí léčby je chirurgické ošetření rány, odstranění nekrotické tkáně, podpora dýchání a medikamentózní snížení dráždivosti. Antibiotická léčba penicilinem má pouze podpůrný charakter. (12)

Jako účinná prevence tetanu se používá imunizace toxoidem, který chrání očkovaného 10 a více let po poslední dávce. (2)

V České republice je očkování proti tetanu povinné. Provádí se nejprve u dětí jako součást hexavakcíny Infanrix hexa. Očkuje se ve čtyřech dávkách. První dávka se aplikuje ve 3. měsíci věku dítěte. Další dvě dávky poté vždy minimálně po měsíci od předešlé dávky, tj. ve 4. a 5. měsíci. Čtvrtá dávka se očkuje minimálně 6 měsíců po podání třetí dávky a maximálně do 18. měsíce života. Následují další dávky v pěti, deseti, dvanácti, čtrnácti a ve dvacetipěti letech. Poté se očkuje vždy po deseti až patnácti letech. (13)

3 *CLOSTRIDIUM BOTULINUM*

Cl. botulinum je pohyblivá tyčinka s rozměry přibližně $1 \times 10 \mu\text{m}$. Spory jsou uloženy subterminálně, jsou velmi odolné vůči teplotě. Vyskytuje se v trávicím traktu zvířat, odkud se spory dostávají do vnějšího prostředí a mohou kontaminovat potraviny. (1, 2, 6, 14)

Cl. botulinum, původce botulismu, produkuje 7 typů toxinů, tzv. botulotoxinů (A–G). U člověka mohou způsobit onemocnění pouze toxiny typu A, B, E, F a G. V Evropě se botulotoxin objevuje v masných výrobcích (toxin typu A), vzácněji v nakládané zelenině či ovoci (typ B) a v rybách (typ E). Do těchto potravin se botulotoxin dostává z nedostatečně vypraných střev či z nedodržení správné hygieny při přípravě jídla. Botulotoxiny jsou makromolekuly tvořené lehkým řetězcem, značeným L, a těžkým řetězcem, značeným H. Oba řetězce jsou spojeny disulfidickými můstky. H-řetězec má molekulovou hmotnost asi 100 kDa, zatímco L-řetězec je přibližně o polovinu lehčí. Funkce H-řetězce spočívá ve vazbě na nervové buňky a pomoc při průniku L-řetězce do cytoplazmy buňky. L-řetězec hydrolyzuje proteiny, které pomáhají při transportu malých vesikul obsahujících acetylcholin. Tímto toxin působí na nervosvalové ploténky, brání zde uvolňování acetylcholinu a tím přenosu nervového vzruchu. (6, 9, 14, 15, 16)

Botulotoxin je zařazen mezi nejedovatější látky na světě, proto by mohl být zneužit bioteroristy nebo jako biologická zbraň. Šlo by jím kontaminovat vodu a potraviny. Nejvíce nebezpečné by bylo rozšíření ve formě aerosolu, kdy by se špatně rozpoznatelnou inhalační formou nakazilo nejvíce lidí. (6, 15)

Botulotoxin se používá v kosmetice pro vyhlazení vrásek. V medicíně se jím léčí blepharospasmus a některé choroby, při nichž dochází ke vzestupu svalového tonu. (1)

Podle produkce toxinů a dalších vlastností se *Cl. botulinum* dělí do 4 skupin. Do skupiny I patří proteolytické kmeny produkující toxiny typu A, B a F. Druhou skupinu tvoří sacharolytické kmeny, které produkují toxiny B, E a F. Třetí skupina je tvořena kmeny produkující toxiny C a D. Do poslední, čtvrté skupiny, se řadí kmeny tvořící toxin typu G. (1)

3.1 Botulismus

Botulismus neboli otrava klobásovým jedem, se nejčastěji projevuje jako alimentární intoxikace. Inkubační doba je nejčastěji 12–36 hodin. Botulotoxin je přítomen v potravě, nejčastěji v domácích nebo i komerčně vyráběných masových nebo zeleninových konzervách, které jsou nedostatečně tepelně upravené. Ze zažívacího traktu se toxin dostává do krve a odtud do centrálního nervového systému k zakončení motorických nervů, kde blokuje přenos vzruchu na nervosvalové ploténce. Proto dochází k obrnám svalů nejdříve na hlavě a postupně přechází na kosterní svaly. Život ohrožuje ochrnutí dýchacích svalů. (1, 2)

Ostatní formy botulismu jsou vzácné. Jedná se o kojenecký a traumatický botulismus. Kojenecký botulismus, který je způsoben vyklíčením spor do vegetativního stádia v anaerobním prostředí střeva. Většinou se tato forma vyskytuje u kojenců do 6 měsíců živených umělou výživou, kdy dochází ke změně střevní mikroflóry. Jako zdroj se uvádí kontaminovaný včelí med. Traumatický botulismus vzniká při kontaminaci rány. Jde o velmi vzácný typ botulismu, který se v České republice zatím neobjevil. Vyskytuje se především u i.v. narkomanů. (9, 16, 17)

3.1.1 Diagnostika

Při diagnostice botulismu se bere v úvahu epidemiologická anamnéza, klinické příznaky, především poruchy nervového systému a laboratorní vyšetření. (9)

Laboratorní diagnostika je založena na průkazu toxinu ve zbytcích potravy, zvracích nebo stolici, nejčastěji neutralizačním pokusem na laboratorních myších. V pozitivním případě hynou myši nechráněné sérem do 24 hodin. Samotná izolace kmene bez produkce toxinu ke stanovení diagnózy nestačí. (12)

3.1.2 Prevence a léčba

Léčba botulismu spočívá v podání polyvalentního antitoxického séra s antitoxiny A, B, E a symptomatická terapie. U traumatického botulismu se doporučuje chirurgická revize rány. (17)

Nejúčinnější prevence proti nákaze botulismem je dodržování hygieny a správné technologie při výrobě potravin, především dostatečně dlouhý var. Toxiny se zničí už při povaření po dobu 10–15 minut. (12)

4 KLOSTRIDIA ANAEROBNÍCH TRAUMATÓZ

Nejčastější zástupcem této skupiny je *Cl. perfringens* typu A. Dalšími vzácnějšími původci jsou *Cl. novyi*, *Cl. septicum*, *Cl. histolytikum*, *Cl. sporogenes*, *Cl. sordellii* a *Cl. fallax*. Tyto infekce jsou často smíšené, doprovázené dalšími bakteriemi, a rozdělují se do 3 skupin:

1. Infekce ran kde se klostridia nedostávají do měkkých tkání a neprodukují toxiny. Jedná se o prostou kolonizaci rány bez klinických příznaků.

2. Hnisavě nekrotické infekce, které jsou lokalizované. V těchto případech jsou produkovány toxiny. Při postižení měkkých tkání vně fascie vzniká epifasciální klostridiová flegmóna, při postižení fascie se jedná o nekrotizující fasciitidu.

3. Závažné nekrotizující infekce s celkovou intoxikací – klostridiová celulitida při postižení kůže a podkoží, myonekróza – postižení svalstva, tzv. plynatá sněť. Ta může postihnout i vnitřní orgány, např. stěnu žlučníku, dělohy nebo střeva. (1, 18)

Podle zdroje infekce způsobené klostridii rozdělujeme na exogenní a endogenní. Při exogenní infekci se spory klostridií dostanou do rány s nečistotou ze zevního prostředí. Endogenní infekce vznikají při průniku klostridií z míst jejich přirozeného osídlení, nejčastěji ze střeva při narušení jeho stěny – zánětem, nádorem nebo při operacích v dutině břišní. (1)

Nejlepší podmínky pro množení klostridií jsou v hypoxické, nekrotické tkáni, kdy dochází ke snížení oxidačně-redukčního potenciálu a vzniku anaerobního prostředí v ráně. K tomu často přispívá přítomnost cizího tělesa. V tomto prostředí vyklíčí spory, bakterie se začnou množit a produkovat toxiny, tvoří se plyn a vzniká otok tkáně a její destrukce. Klinické příznaky se u infekcí vyvolaných *Cl. perfringens* rozvíjejí poměrně rychle – do 24 hodin. Nejprve se objevuje bolest v ráně, otok, hnisavá sekrece, při pohmatu je cítit „třaskání plynu“. Dochází k sepsi a rozvoji toxického šoku s postižením vnitřních orgánů. Bez léčby pacient zemře během několika hodin. (1, 18)

Včasná diagnostika je z důvodu zahájení správné léčby nezbytná. Laboratorní diagnostika je založena především na mikroskopickém a kultivačním vyšetření materiálu z postižené tkáně, exsudátu nebo stěru z rány. Během transportu musí být zajištěné anaerobní podmínky. Mikroskopicky vidíme klostridiové tyčinky, při plynaté

sněti bez polymorfonukleárních leukocytů. Při smíšených infekcích jsou přítomny i ostatní bakterie. K diagnostice přispívá i klinický obraz nemocného. (2)

Při léčbě je důležité chirurgické ošetření (široké otevření rány, odstranění nekróz), desinfekce, udržení krevního oběhu, náhrada ztracených bílkovin a tekutin. V počátcích onemocnění je výhodná také léčba v hyperbarické komoře. Podávají se vysoké dávky antibiotik (krystalický penicilin G, metronidazol, klindamycin). (1)

4.1 *Clostridium perfringens*

Cl. perfringens, starším názvem *Cl. welchii*, je velmi invazivní, aerotolerantní tyčinka. Její rozměry se pohybují v rozmezí 0,6–2,4×1,3–19,0 μm. Jak je vidět na obrázku mikroskopického preparátu v Příloze 2, tyčinky mohou být uspořádány i do malých řetízků. Stejně jako ostatní klostridia se vyskytuje jak ve vegetativním stádiu, tak ve formě spor. Ty jsou oválné, subterminální a mění tvar bakterie. Spory se nikdy netvoří v napadené tkáni, ale pouze ve střevě. Jsou termorezistentní. (1, 2, 6, 19)

Vegetativní buňky se dělí do pěti toxigenních typů (A–E) podle produkce toxinů alfa, beta, epsilon, iota a enterotoxinu. Jsou to nejdůležitější faktory virulence. Toxigenní typ A je pro člověka nejvíce patogenní. Po požití masa, kontaminovaného vegetativní formou *Cl. perfringens*, dochází ve střevě ke sporulaci, začne se tvořit enterotoxin a vznikají koliky a vodnaté průjmy. (1, 20)

4.1.1 Patogenita

Cl. perfringens způsobuje infekce měkkých tkání nebo gastroenteritidy. Klostridiová celulitida se projevuje lokalizovaným otokem, zarudnutím a tvorbou plynu v měkké tkáni. Hnisavá myositida se projevuje hromaděním hnisu ve svalech. Není zde přítomna nekróza. Nejzávažnější formou infekce měkkých tkání zapříčiněná *Cl. perfringens* je myonekróza. Je to bolestivá a rychlá destrukce svalové tkáně, šíří se do celého organismu, je smrtelná. Tento patogen způsobuje i akutní nekrotizující enteritidu projevující se zvracením, bolestí břicha a krvavým průjmem. (19)

4.1.2 Diagnostika

Pro diagnostiku je důležitá epidemiologická anamnéza, klinické příznaky i laboratorní vyšetření. Materiál na vyšetření se odebere podle druhu onemocnění.

Při infekci měkkých tkání se odebírá exsudát, případně kousek tkáně nebo výtěr do transportního média. U gastroenteritid se odebere vzorek stolice, u enterotoxikóz i vzorek kontaminované potravy. Klinický materiál se prohlíží mikroskopicky po obarvení dle Grama, kde jsou vidět grampozitivní silné tyčinky. *Cl. perfringens* je kultivačně nenáročná, růst je rychlý. Kultivace se provádí na běžných anaerobních půdách, kde roste ve velkých koloniích s dvojitou hemolýzou (viz obrázek v Příloze 3). Dále také na žlutkové půdě, kde se prokazuje toxin alfa (lecithinasa) zónou opalescence, která je vidět v Příloze 4. Enterotoxin se prokazuje reverzní pasivní aglutinací nebo imunologicky. (1, 6)

4.1.3 Léčba

U klostridiových infekcí měkkých tkání je nezbytný včasný chirurgický zákrok – excize do zdravé tkáně. Při postižení končetiny je často nutná amputace. Důležitou součástí léčby je komplexní intenzivní péče včetně vysokých dávek antibiotik (penicilin, klindamycin, metronidazol). Je možná léčba v hyperbarické komoře, dříve používané antigangrenózní sérum se již nedoporučuje. (19)

4.2 *Clostridium histolyticum*

Pohyblivé, štíhlé ($0,5 \times 10 \mu\text{m}$) tyčinky této bakterie tvoří spory, které vyklenují buňku. *Cl. histolyticum* patří do skupiny aerotolerantních klostridií. Štěpí proteiny, ne však sacharidy. Produkuje kyselinu octovou a malé množství plynu. Jeho toxiny alfa a beta způsobují myonekrózu. Při kultivaci za anaerobních podmínek tvoří bílé, drobné kolonie s hemolýzou. (1, 2)

4.3 *Clostridium septicum*

Rozměry vegetativního stádia druhu *Cl. septicum* jsou značně variabilní, v průměru $2\text{--}30 \times 0,6\text{--}1,9 \mu\text{m}$. Může být uspořádáno i do řetízků. Jeho spory jsou subterminální a oválné. Kultivuje se na běžných půdách, kde tvoří šedé kolonie s nepravidelnými okraji. Vytváří β -hemolýzu a není striktně anaerobní. (1)

Cl. septicum produkuje hemolytický alfa-toxin, beta-toxin (leukocidin), gama-toxin (hyaluronidáza) a delta toxin (oxygen-labilní hemolyzin) a neuraminidázy. (20)

Tento patogen způsobuje neúrazovou myonekrózu, často bývá u pacientů s karcinomem tlustého střeva, objevuje se při akutní leukemii nebo diabetu.

Je-li ohrožena integrita střevní sliznice a pacient má oslabenou imunitu, *Cl. septicum* se může šířit do tkání, množit se, začne produkovat plyn a nakonec zničí tkáň. (19)

4.4 *Clostridium novyi*

Tento druh je striktně anaerobní tyčinka. Běžně ho najdeme v trávicím traktu zvířat. Podle typu toxinů, které produkuje, se dělí na typ A, produkující alfa-toxin. Ten vyvolává sněť a má nekrotizující účinky. Dále pak na typ B, který produkuje beta-toxickou lecitinázu. *Cl. novyi* má i netoxický kmen označující se jako typ C. Poslední je typ D, který se dnes uvádí jako nový druh – *Clostridium hemolyticum*. Buňky typu A a D mají rozměry 0,6–1,4×1,6–17 μm. Rozměry typu B se pohybují mezi 1,1–2,5×22 μm. Spory jsou oválné, subterminální a středně termorezistentní. *Cl. novyi* způsobuje vznik typického tuhého edému. (2, 6, 21)

4.5 *Clostridium sordellii*

Druh *Cl. sordellii* je pohyblivá, rovná tyčinka. Rozměry se pohybují v rozmezí 5–15×0,6–1 μm. Spory tohoto druhu jsou drobné, oválné a subterminálně až centrálně uložené. Je středně striktním anaerobem, tvoří ureázu a štěpí proteiny a sacharidy. Produkuje toxin alfa a beta. Zatímco toxin alfa není toxický, toxin beta je protein tvořící nekrózy a edémy. *Cl. sordellii* způsobuje smrtelný syndrom toxického šoku, který vzniká v důsledku porodu nebo potratu. Dále může způsobit endometritidu a nekrotizující fasciitidu po injekčním požití heroinu. (2, 19, 20)

4.6 *Clostridium sporogenes*

Druh *Cl. sporogenes* je pohyblivá bakterie rostoucí ve velkých, plochých koloniích. Tyto kolonie mají nepravidelné okraje a drsný povrch. Tvoří beta hemolýzu. Infikuje rány a ve většině případů je součástí polymikrobiálních infekcí. (1)

4.7 *Clostridium tertium*

Cl. tertium patří k aerotolerantním druhům, je často vykultivováno aerobně ze stolice jako součást střevní flóry. Bývá často spojeno s traumatickými infekcemi ran, např. s válečnými zraněními nebo poraněními, která jsou znečištěná půdou. (19)

5 CLOSTRIDIUM DIFFICILE

Vegetativní formy *Cl. difficile* jsou rovné, štíhlé, grampozitivní tyčinky o velikosti asi $0,6 \times 4-6 \mu\text{m}$ nebo větší tyčinky s rozměry cca $1,2-1,6 \times 6-16 \mu\text{m}$. Subterminálně uložené spory, jen nepatrně vydouvající tyčinku, mají sklon k autolýze a jsou málo termorezistentní. Vysoká teplota poškozuje jejich germinaci. (2)

Cl. difficile produkuje 2 proteinové toxiny: toxin A (enterotoxin) a toxin B (nekrotizující cytotoxin), hlavní faktory virulence. Oba toxiny vyvolávají postižení střeva, od nejmehčí formy – průjmu, přes pseudomembranózní kolitidu až k nejtěžší formě – toxické megakolon. Toxin A je typický enterotoxin. Poškozuje buňky střevního epitelu a způsobuje kumulaci tekutin, čímž vzniká vodnatý, někdy hemoragický průjem. Zároveň poškozuje buňky imunitního systému, dochází k zánětu střevní sliznice. Toxin B je cytotoxin, který způsobuje nekrózu postižené sliznice, kde vznikají ulcerace pokryté pablánami. Nejzávažnější formou onemocnění je toxické megakolon se zástavou peristaltiky, končící rupturou střeva a ohrožením pacienta na životě. (19, 22)

Cl. difficile se běžně vyskytuje ve střevě přibližně u 5 % zdravé dospělé populace, u dětí v prvních měsících života je výskyt vyšší, a to kolem 50 %. (22)

5.1 Patogenita

V současné době se *Cl. difficile* řadí mezi významné původce nozokomiálních infekcí. Zdroj infekce může být exogenní i endogenní. Exogenní infekce vznikají kolonizací střeva nemocničních pacientů z vnějšího prostředí např. při sdílení pokoje s nakaženým pacientem, který vylučuje miliony spor v každém mililitru průjmové stolice a kontaminuje tak okolí. Endogenní infekce jsou častější. Vznikají při léčbě širokospektrými antibiotiky, kdy dojde k narušení přirozené střevní mikroflóry a následnému přemnožení *Cl. difficile*, které začne produkovat toxiny a vyvolá postantibiotickou kolitidu. Její rozvoj bývá nejčastěji popsán ve spojení s podáváním aminopenicilinů, cefalosporinů, linkosamidů a fluorochinolonů. Mezi další faktory podporující rozvoj onemocnění patří imobilita střeva (např. po operaci v dutině břišní), celková imobilita, věk ≥ 65 let, porucha slizniční imunity v GIT, nespecifické střevní záněty jako např. ulcerózní kolitida, Crohnova choroba a další. Riziko nákazy stoupá

se zvyšující se délkou pobytu v nemocnici, více náchylní jsou také imunosuprimovaní pacienti. (22, 23)

5.2 Klinický obraz

Onemocnění vyvolané *Cl. difficile* (*Clostridium difficile* infection, CDI) se projevuje jako akutní průjemové onemocnění s různým stupněm závažnosti od dysmikrobie, přes průjem, pseudomembranózní kolitidu až k toxickému megakolon s ileem. Průjemové stolice jsou četné, málo objemné, někdy páchnoucí. Může být přítomno i zvracení a horečky. Příznaky svědčící pro těžký průběh jsou: horečka $> 38,5$ °C, známky peritonitidy, paralytický ileus, leukocytóza v krevním obraze $> 15 \times 10^9/l$, vzestup kreatininu a laktátu v séru, pseudomembranózní kolitida zjištěná kolonoskopicky. (7, 22)

Dokud se ve střevě neobnoví přirozená mikroflóra, může vzniknout relaps – opětovné vzplanutí infekce v důsledku přítomnosti klostridií ve střevě nebo reinfekce – vznik nové exogenní infekce. Dochází k nim cca do 2 měsíců od předchozí infekce. U pacientů s častými rekurencemi se objevuje dehydratace, malnutrice a vyčerpání. (22)

5.3 Diagnostika

Mikrobiologický průkaz *Cl. difficile* ze stolice se provádí pacientům s klinickým podezřením na CDI (předchozí ATB terapie, horečka, průjem, paralytický ileus, leukocytóza, hypoalbuminémie). Neprovádí se u dětí do 2 let věku, u nosičů, nedoporučují se opakovaná vyšetření v průběhu léčby. (24)

Na vyšetření se odebírá nativní stolice cca 2 ml do sterilní zkušavky, zpracování materiálu by mělo proběhnout do 2 hodin po odběru z důvodu snižující se aktivity toxinů. Pokud není možné provést vyšetření stolice ihned, vzorek se uchovává v chladničce při 5 °C maximálně 48 hodin. Dlouhodobě se vzorky uchovávají zmražené na -70 °C. (22)

5.3.1 Průkaz glutamátdehydrogenázy a toxinů A a B

GDH je specifický antigen *Cl. difficile*, jeho stanovení společně s toxiny A a B se provádí pomocí membránové enzymatické imunoassay. Ve FN Plzeň se používá komerčně vyráběný set od firmy Techlab® – *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE™*.

Princip testu spočívá v reakci specifické protilátky, proti antigenům ve vzorku. V testovací kazetě je reakční okno obsahující 3 vertikální linie s navázanými imobilizovanými protilátkami. Linie pro antigeny obsahuje protilátky proti GDH. V kontrolní linii jsou protilátky proti křenové peroxidáze. Linie pro toxiny A a B obsahuje protilátky proti antigenům těchto toxinů. Vzorek se nejprve přidá do zkumavky s konjugátem a diluentem (roztok pufovaného proteinu). Tato směs se převede do aplikační jamky pro vzorek a 15 minut se inkubuje při pokojové teplotě. Jsou-li přítomny GDH a toxiny A a B, váží se na specifické protilátky, které jsou součástí konjugátu s křenovou peroxidázou. Vzniklý komplex migruje až k reakčnímu oknu, kde se váže na imobilizované protilátky proti bakteriální GDH a toxinům A a B. Do reakčního okna se přidá promývací pufr a substrát, následuje inkubace 10 minut a poté se odečítá výsledek. (24, 25)

Výsledky:

1. negativní GDH, negativní toxin: pravděpodobně se nejedná o CDI
2. pozitivní GDH, pozitivní toxin: CDI je vysoce pravděpodobné
3. pozitivní GDH, negativní toxin: suspektní CDI, nutno provést PCR (24)

Mezi výhody vyšetření patří vysoká negativní prediktivní hodnota (negativní výsledek spolehlivě vylučuje CDI), jednoduchost, rychlost (15–45 minut) a vysoká citlivost (90–100 %). Nevýhoda naopak je, že nelze nerozlišit toxigenní a netoxigenní kmeny. Také je možnost zkřížené reakce a jinými anaeroby. (22)

5.3.2 Kultivace

Anaerobní kultivace se provádí při pozitivitě GDH, a to včetně toxin negativních vzorků. Stolice se cca 1 hodinu před kultivací musí inkubovat s 96% etanolem nebo 70% metylalkoholem. Alkohol napomáhá klíčení spor a tím zvyšuje citlivost kultivace. Samotná kultivace probíhá na selektivních půdách v anaerobní atmosféře. Po 48–72 hodinách vyrůstá *Cl. difficile* ve formě šedých kolonií bez hemolýzy, jak je vidět v Příloze 5. Izolované kmeny, zvláště od pacientů s těžkou formou CDI, se archivují pro případnou ribotypizaci při -80°C. (22, 24)

Hlavními výhodami kultivace je schopnost určit citlivost k antibiotikům (vankomycin a metronidazol), možnost molekulární typizace a vysoká citlivost

(99–100 %). Naopak nelze nerozlišit toxicitu kmenů a je nutná dlouhá doba kultivace (2–3 dny). (22)

5.3.3 Polymerázová řetězová reakce

PCR je molekulárně biologická metoda založená na enzymatické amplifikaci *in vitro*. Kopie vybrané sekvence DNA se syntetizují v cyklické reakci (obvykle 35–50 cyklů) o třech teplotních fázích:

1. Dvouvláknová DNA se tepelně denaturuje na dva jednovláknové řetězce (templáty) při teplotě 95 °C.
2. Vzorek se ochladí na 50–60 °C a dojde k připojení primerů na komplementární 3' konec oddělených řetězců DNA.
3. Následuje syntéza nových vláken DNA, která je katalyzována termostabilní DNA polymerázou od 5' konce k 3' konci. Reakce probíhá při teplotě 65–75 °C.

Součásti nezbytné pro proběhnutí PCR reakce jsou DNA templát, primery, DNA polymeráza, směs všech čtyř deoxyribonukleotidtrifosfátů, Mg²⁺ ionty, PCR pufr a PCR voda. (26)

Pro diagnostiku *Cl. difficile* se používá modifikace běžné PCR, a to real-time PCR. Při této modifikaci se po každém amplifikačním kroku zaznamenává nárůst řetězců DNA pomocí hybridizační sondy a následného uvolnění fluorescenční barvy, která získá schopnost fluorescence. Využívá se k ověření správnosti diagnózy u těžkého průběhu CDI, nebo pokud mají jiné testy nejasné výsledky. Ze schématu v Příloze 6 lze vidět, že PCR se provádí, pokud průkaz GDH vyšel pozitivní a toxin negativní. Je-li výsledek PCR pozitivní, jedná se o toxigenní kmen *Cl. difficile*, vyjde-li negativní, pak je to buď netoxigenní kmen nebo falešně pozitivní GDH. (22, 24, 27)

Tato metoda je velmi citlivá (99–100 %) a rychlá (cca 1 hodina). Její hlavní nevýhodou je neschopnost rozlišit běžnou kolonizaci od infekce. (22)

5.3.4 Průkaz cytopatického efektu na tkáňových kulturách

Tato metoda se dnes považuje za zlatý standard. Je to vyšetření náročné na vybavení, je u něj nutná interpretační zkušenost, a proto ho provádí jen referenční laboratoře. Kultivace na tkáňových kulturách probíhá cca 2 dny, což je spolu s rizikem falešné positivity další nevýhoda, díky které má spíše historický význam. (22)

5.4 Léčba

Léčba CDI vyžaduje komplexní přístup a závisí na tíži onemocnění, věku pacienta a jeho dalších nemocech. Obecně platí následující zásady:

1. Pokud je to možné, okamžitě ukončit stávající antibiotickou léčbu, která CDI vyvolala.
2. U některých nemocných je možné nahradit stávající antibiotikum jiným s užším spektrem.
3. Důležitá je rehydratace pacienta, nenadýmavá dieta. U těžších případů je možná parenterální výživa.
4. Nepodávat léky tlumící střevní peristaltiku, hrozí rozvoj toxického megakolon.
5. Zahájení léčby antibiotiky vankomycinem nebo metronidazolem. (22, 28)

Vankomycin je baktericidní vůči grampozitivním bakteriím. Při normální peristaltice se podává perorálně, popřípadě nasogastrickou sondou. Při poruše peristaltiky je možné podání klysmaty. Z GIT se nevstřebává a je tedy ve stolici obsažen ve vysoké koncentraci. Podává se při těžších formách CDI. K jeho výhodám patří rychlejší nástup účinku, nevýhodou je riziko dysmikrobie, rekurence, selekce vankomycin rezistentních enterokoků. (24, 28)

Metronidazol je antibiotikum působící na většinu anaerobů. Aplikovat lze perorálně a intravenózně. Dobře a rychle se vstřebává z GIT, stolicí jsou z 6–15 % vylučovány jeho metabolity. Doporučuje se podávat při lehčích formách CDI. Hlavní nevýhodou metronidazolu je pomalejší nástup účinku než u vankomycinu a vyšší riziko selhání léčby. (28)

Mezi další možnosti antibiotické terapie patří fidaxomicin, tigecyclin a teicoplanin. Hlavní výhodou fidaxomicinu je selektivní účinek na *Cl. difficile*, nižší riziko rekurencí CDI a rychlý účinek. Nevýhodou je jeho vysoká cena. Užívá se perorálně. Tigecyclin lze použít při zástavě peristaltiky, protože se podává v infuzi. Teicoplanin je antibiotikum podobné vankomycinu, nevstřebává se z GIT a podává se perorálně. (22, 28)

Fekální bakterioterapie (transplantace stolice) je přenos homogenizované stolice zdravého dárce z důvodu obnovení normální střevní mikroflóry. Příjemce je léčen

vankomycinem 10–14 dní, následně dostane nálev stolice dárce nejčastěji nasogastrickou sondou do jejunu, méně často kolonoskopicky do vzestupného tračníku nebo klysmatem. Tato metoda není způsob léčby, ale prevence rekurencí. (28)

5.5 Epidemiologie

Cl.difficile je významným původcem nozokomiální postantibiotické kolitidy. V současné době dochází k nárůstu onemocnění v souvislosti s nadužíváním antibiotik, přibývá hypervirulentních ribotypů a rekurencí. V nemocničním zařízení je důležité zabránit šíření nákazy na další pacienty, proto je nezbytné hlášení pozitivních nálezů a následná izolace nemocného s bariérovým ošetřováním a důkladnou desinfekcí pokoje (sporicidní přípravky). Zásadní význam pro zabránění šíření infekce má hygiena rukou ošetřujícího personálu, který by měl být řádně poučen. (24)

PRAKTICKÁ ČÁST

6 Cíl a úkol průzkumu

Prvním z cílů této bakalářské práce je představit nejznámější zástupce bakterií rodu *Clostridium*, onemocnění, která způsobují, jejich diagnostiku a následnou léčbu. Důraz je kladen na druh *Cl. difficile*, který způsobuje nozokomiální nákazy a je spjat s antibiotickou léčbou.

Druhým cílem je popsat algoritmus laboratorní diagnostiky *Cl. difficile* ve FN Plzeň.

Třetím cílem je zpracovat statistická data získaná z výsledků imunochromatografického testu *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE™* a real-time PCR vyšetření stolice provedená v Ústavu mikrobiologie ve FN Plzeň (dále jen MIKRO FN Plzeň) v letech 2012–2016 a zhodnotit je. Dále zjistit četnost výskytu toxigenního *Cl. difficile* a vliv věku a pohlaví pacientů na vznik CDI (*Cl. difficile infections*).

7 Hypotézy

H1: Množství laboratorně prokázaných toxigenních *Cl. difficile* se ve FN Plzeň v letech 2012–2016 zvyšuje.

H2: Věk ≥ 65 let je rizikový faktor pro přítomnost toxigenního *Cl. difficile* u pacientů FN Plzeň v letech 2012–2016.

- kritérium H2: rizikový faktor = více než 50 % pacientů s prokázaným toxigenním *Cl. difficile* bylo ve věku ≥ 65 let.

H3: Ženy trpí CDI (*Clostridium difficile infection*) častěji než muži.

- kritérium H3: častěji = vzorky s prokázaným toxigenním *Cl. difficile* pocházejí z více než 50 % od pacientů ženského pohlaví.

8 Zkoumaný soubor pacientů

Jako podklady ke stanovení četnosti výskytu *Cl. difficile*, byly použity výsledky vyšetření pacientů zaslanych na MIKRO FN Plzeň v období 2012–2016. Vyšetření se provádělo imunochromatografickým testem *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE™*. Pokud byl prokázán jen antigen bez toxinu, bylo mikrobiologem indikováno vyšetření real-time PCR.

MIKRO FN Plzeň vyšetřuje materiál i pro jiné menší nemocnice či ambulance lékařů, proto byl pro tuto práci záměrně vybrán pouze materiál těchto oddělení FN Plzeň:

- I. Interní klinika
- II. Interní klinika
- Anesteziologicko-resuscitační oddělení
- Hematologicko-onkologické oddělení
- Chirurgická klinika
- Chirurgické oddělení
- Infekční klinika
- Interní oddělení, sociální lůžka, LDN
- Kardiochirurgické oddělení
- Kardiologické oddělení
- Klinika anestezie, resuscitace a intenzivní medicíny
- Klinika ortopedie a traumatologie pohybového ústrojí
- Klinika pneumologie a ftizeologie
- Neurochirurgická klinika
- Oddělení klinické farmakologie
- Onkologická a radioterapeutická klinika

Z ostatních oddělení se vyšetřuje materiál pouze výjimečně, proto tato data nebyla pro tuto práci statisticky významná.

9 Metody průzkumu

V této práci jsem prováděla kvantitativní průzkum četnosti výskytu *Cl. difficile* ve FN Plzeň v letech 2012–2016. Jako metodu sběru dat jsem volila retrospektivní studii dat z interního laboratorního systému MIKRO FN Plzeň a z dokumentace pacienta. Získaná data jsem zpracovala pomocí programu Microsoft Office Excel 2007.

9.1 Algoritmus vyšetření *Clostridium difficile* ve FN Plzeň

Příloha 6 schematicky ukazuje strategii používanou pro laboratorní diagnostiku *Cl. difficile* ve FN Plzeň. Lze z ní vyčíst, že se vzorek stolice nejprve vyšetří imunochromatografickým testem *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE™*. Je-li výsledek testu pozitivní, jak u GDH, tak u toxinu, znamená to přítomnost toxigenního *Cl. difficile*. K ověření výsledku se zakládá anaerobní kultivace a v případě positivity se z narostlého kmene stanovuje citlivost k vankomycinu a metronidazolu E-testem (viz Příloha 7). Při negativním výsledku toxinu i GDH, jsou pokládány výsledky za negativní, *Cl. difficile* tedy není ve vzorku přítomno. Pokud test určí pozitivní GDH a negativní toxin, je nutno provést real-time PCR a založit anaerobní kultivaci. V případě positivity se opět stanovuje citlivost k vankomycinu a metronidazolu E-testem. Pokud je vyšetření real-time PCR negativní, znamená to, že ve vzorku je netoxigenní kmen *Cl. difficile* nebo byl při testu *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE™* falešně pozitivní GDH. Je-li real-time PCR pozitivní, je ve vzorku přítomen toxigenní kmen *Cl. difficile*. (29)

Každý pozitivní nález toxinů i GDH je ihned hlášen ošetřujícímu lékaři a oddělení epidemiologie. (29)

9.2 Metoda membránové enzymové imunoanalýzy

Ve FN Plzeň je tato metoda zastoupena komerčně dodávaným kitem *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE™* firmy TECHLAB®. Princip je zmíněn v teoretické části práce, v kapitole „5. 3. 1 Průkaz glutamátdehydrogenázy a toxinů A a B“.

9.2.1 Pomůcky

Součástí kitu je testovací kazeta, diluent, promývací pufr, substrát, konjugát, pozitivní kontrola a jednorázové plastové pipety. Dále potřebujeme mikroskopavky,

vortex, pipetu, špičky, aplikační tyčinky, stopky a jednorázové rukavice. Tento materiál není součástí kitu, ale je běžně přítomen v laboratoři. Balení je třeba uchovávat v lednici při 2–8°C pouze po dobu výrobcem určené expirace. Současně s vyšetřením testovaného vzorku je možné provádět externí pozitivní a negativní kontrolu. (25, 29)

9.2.2 Příprava činidel

1. Vytemperujeme činidla a požadovaný počet kazet na pokojovou teplotu.
2. Pomocí černě značeného kapátka přidáme 750 µl diuletu do každé zkumavky.
3. Do každé zkumavky přidáme 1 kapku konjugátu.
4. Přeneseme vzorek stolice do připravené směsi:
 - a. Tekuté vzorky: 25 µl vzorku stolice přeneseme do směsi pomocí jednorázových kalibrovaných plastových pipet a zvortexujeme.
 - b. Formované vzorky: vzorek o průměru 2 mm přeneseme do směsi pomocí dřevěné aplikační tyčinky. Zvortexujeme. (25, 29)

9.2.3 Pracovní postup

1. Pomocí kalibrované pipety aplikujeme 500 µl zředěného vzorku do aplikační jamky (Sample Well) příslušné kazety.
2. Inkubujeme 15 minut při pokojové teplotě.
3. Pomocí bíle označeného kapátka přidáme 300 µl promývacího pufru (Wash buffer) do reakčního okna kazety (Reaction Windows) a necháme ho rovnoměrně vsáknout.
4. Do reakčního okna kazety (Reaction Windows) aplikujeme ještě 2 kapky substrátu.
5. Výsledek odečítáme po 10 minutách. (25, 29)

9.2.4 Výsledky

Nejprve odečítáme linie modrých teček ve střední části reakčního okna, což je pozitivní kontrola testu. Musí se objevit alespoň jedna tečka, abychom mohli kontrolu považovat za validní a přejít k odečítání GDH a toxinů. Pokud se tato linie nezobrazí, test je chybný a musíme ho opakovat. (25, 29)

Modré linie na obou stranách reakčního okna kazety se objevují při pozitivitě antigenu „Ag“ a toxinu „Tox“. (25, 29)

Kombinaci výsledků, které mohou nastat, zobrazují obrázky níže:



Obrázek 1: Negativní GDH i toxin: nepřítomnost *Cl. difficile* ve vzorku.



Obrázek 2: Pozitivní GDH, negativní toxin: přítomnost antigenu *Cl. difficile* ve vzorku.



Obrázek 3: Pozitivní GDH i toxin: přítomnost toxigenního *Cl. difficile* ve vzorku.

Zdroje obrázků 1–3: foto autor

9.3 Polymerázová řetězová reakce s vyhodnocením v reálném čase

Real-time PCR se používá pro molekulární průkaz specifických genů *Cl. difficile* a pro průkaz genů, které kódují toxiny A a B. Princip je zmíněn v teoretické části práce, v kapitole „5. 3. 3 Polymerázová řetězová reakce“. Současně s vyšetřením testovaného vzorku je možné provádět externí pozitivní a negativní kontrolu.(27)

9.3.1 Pomůcky

K provedení reakce je potřeba následujících přístrojů a pomůcek, které jsou běžnou součástí laboratoře: SmartCycler II, SaCycler-96 Real Time PCR Systém, centrifugy, mikrocentrifugy, termoblok s třepačkou, vortex, pipety, pipetovací špičky, zkumavky pro SmartCycler a jednorázové rukavice. Součástí kitu pro izolaci DNA je pufr B3, koncentrát pufru B5, pufrы BW a BE, dále pak lyofilizovaná proteináza K, proteinázou pufr, DNA kolonky a centrifugační zkumavky. Kit pro přípravu MasterMixu obsahuje

reakční mix, Taq polymerázu, interní kontrolu, PCR vodu a pozitivní kontrolu. (27, 30, 31)

9.3.2 Pracovní postup

Nejprve musíme ze vzorku izolovat DNA. K tomu použijeme *PathogenFree DNA Isolation Kit* firmy GeneProof.

1. Připravíme si materiál:
 - a. Tekutý vzorek: 100 μ l vzorku nepipetujeme do 100 μ l sterilní deionizované vody.
 - b. Tuhý vzorek: část stolice přidáme do 100 μ l sterilní deionizované vody a zvortexujeme.
2. Do zkumavky nepipetujeme 25 μ l proteinázy K, 200 μ l vzorku, 200 μ l činidla B3 a promícháme.
3. Inkubujeme 30 minut při 70°C a následně centrifugujeme.
4. Přidáme 210 μ l absolutního etanolu, zvortexujeme a krátce centrifugujeme.
5. Vzorek přepipetujeme do kolonky a centrifugujeme 1 minutu při 11 000 g.
6. Kolonku přeneseme do čisté zkumavky, přidáme 500 μ l pufru BW a centrifugujeme 1 minutu při 11 000 g.
7. Kolonku opět přeneseme do čisté zkumavky, přidáme 600 μ l pufru B5 a opět centrifugujeme 1 minutu při 11 000 g.
8. Odstraníme obsah zkumavky a kolonku vložíme zpět. Opět centrifugujeme 1 minutu při 11 000 g.
9. Kolonku vložíme do čisté zkumavky a přidáme 50 μ l pufru BE.
10. Inkubujeme 3 minuty při pokojové teplotě a centrifugujeme 1 minutu při 11 000 g.
11. Na kolonku znovu nanese 50 μ l pufru BE.
12. Opět inkubujeme 3 minuty při pokojové teplotě a centrifugujeme 1 minutu při 11 000 g.

Dále připravíme MasterMix. Použijeme kit *RIDA[®] GENE Clostridium difficile* firmy Biopharm.

1. Do speciální zkumavky, která se používá v přístroji SmartCycler napipetujeme 19,9 µl reakčního mixu, 0,1 µl Taq polymerázy a 1 µl interní kontroly.
2. Do zkumavky s MasterMixem přidáme 5 µl vyizolované DNA a krátce centrifugujeme v mikrocentrifuze.

Podle návodu si nastavíme si detekční kanály FAM (*Cl. difficile*), Cy3 (interní kontrola) a Cy5 (gen toxinu *Cl. difficile*). Po vložení vzorku do přístroje proběhne vlastní PCR reakce dle předdefinovaného programu:

1. Počáteční denaturace – 1 minuta, 95 °C
2. Počet cyklů – 45
3. Denaturace – 10 sekund, 95 °C
4. Annealing/Extenze – 15 sekund, 60 °C (27, 30, 31)

9.3.3 Výsledky

Vyhodnocení výsledků můžeme interpretovat jen, pokud je pozitivní kontrola pozitivní a negativní kontrola negativní. Zároveň hodnotíme charakter amplifikační křivky. Mohou nastat tyto kombinace:

- Toxigenní kmen *Cl. difficile*: pozitivní reakce ve všech kanálech.
- Netoxigenní kmen *Cl. difficile*: pozitivní signál v kanálech FAM a Cy3. Negativní signál v kanálu Cy5.
- Negativní vzorek: negativní signál v kanálech FAM a Cy5. Pozitivní signál v kanálu Cy3.
- Inhibovaná reakce: negativní signál ve všech kanálech. (27, 30, 31)

10 Prezentace a interpretace získaných výsledků

10.1 Množství vzorků

V letech 2012–2016 bylo ve FN Plzeň vyšetřeno testem *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE™* a metodou real-time PCR 8 224 vzorků, z toho bylo 958 pozitivních případů.

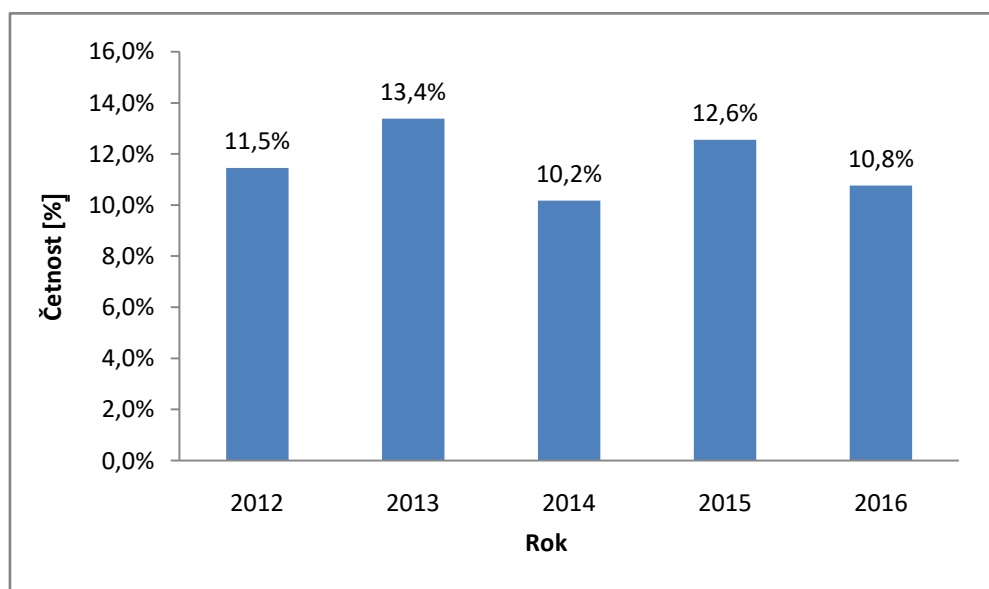
Z Grafu 1 vyčteme, že nejméně pozitivních vzorků bylo v roce 2014 (10,2 %), naopak nejvíce jich bylo v roce 2013 (13,4 %) v poměru k jejich celkovému počtu. Dále, že trend pozitivit není ani stoupající, ani klesající.

Tabulka 1: Množství vyšetřených vzorků ve FN Plzeň v letech 2012–2016.

rok	pozitivní	negativní	celkem
2012	155	1198	1353
2013	212	1373	1585
2014	168	1483	1651
2015	223	1553	1776
2016	200	1659	1859
celkem	958	7266	8224

Zdroj: vlastní výzkum dle interního laboratorního systému MIKRO FN Plzeň

Graf 1: Poměrné zastoupení laboratorně prokázaných *Cl. difficile* ve vzorcích vyšetřených ve FN Plzeň v letech 2012–2016.



Zdroj: vlastní výzkum dle interního laboratorního systému MIKRO FN Plzeň

10.2 Věk pacientů

Ve FN Plzeň bylo v letech 2012–2016 prokázáno toxigenní *Cl. difficile* celkem u 958 pacientů, z toho jich bylo 364 ve věku < 65 let a 594 ve věku ≥ 65 let. Tyto hodnoty jsou graficky zvýrazněné v Grafu 2. Je vidět, že toxigenní *Cl. difficile* bylo prokázáno u 38,0 % pacientů mladších 65 let a 62,0 % pacientů ve věku ≥ 65 let.

Z Grafu 3 je jasné, že pacientů s prokázaným toxigenním *Cl. difficile* ve věku ≥ 65 let je procentuálně více (13,7 %) i s přihlédnutím k věku negativních pacientů.

Průměrný věk pozitivních pacientů byl 66,4 let, medián byl 69,0 let. Nejmladšímu pacientovi bylo 5 let a nejstaršímu 95 let.

Tabulka 2: Statistické údaje týkající se vzorků vyšetřených ve FN Plzeň v letech 2012–2016 v souvislosti s věkem pacienta.

	< 65 let	≥ 65 let	celkem
pozitivní	364	594	958
negativní	3515	3751	7266
celkem	3879	4345	8224

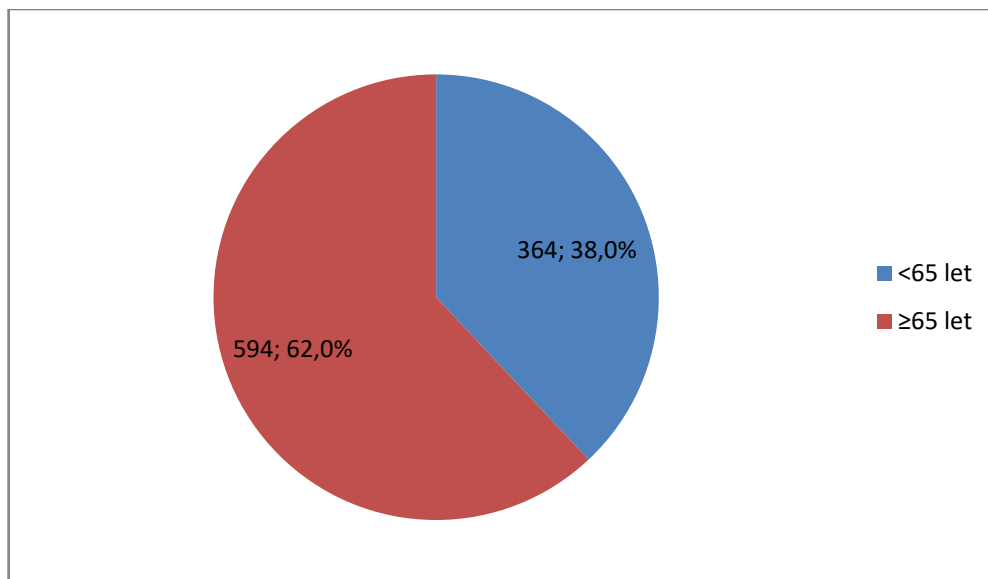
Zdroj: vlastní výzkum dle interního laboratorního systému MIKRO FN Plzeň

Tabulka 3: Statistické údaje týkající věku pacienta s prokázaným toxigenním *Cl. difficile* ve FN Plzeň v letech 2012–2016.

minimum [roky]	maximum [roky]	průměr [roky]	medián [roky]
5	95	66,4	69,0

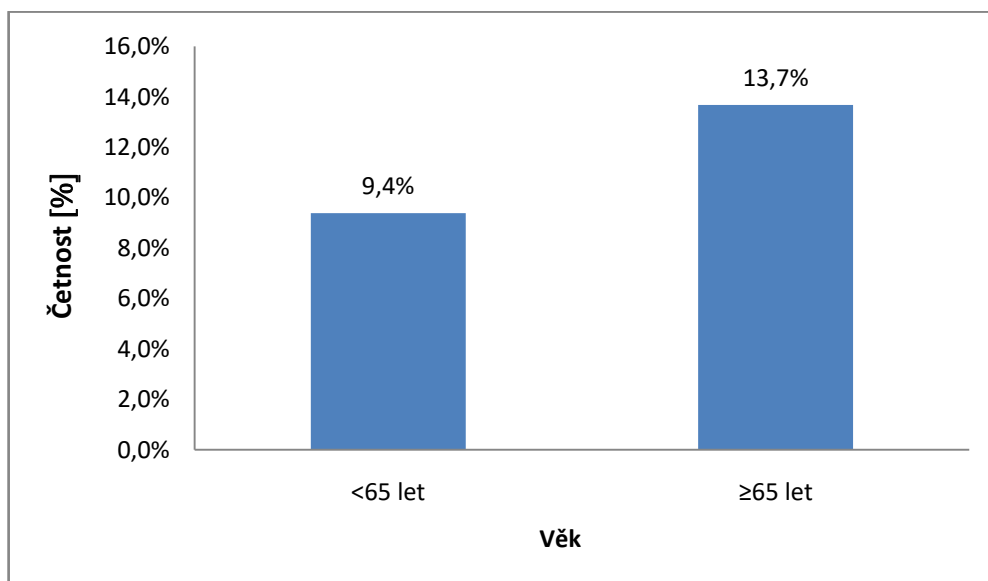
Zdroj: vlastní výzkum dle interního laboratorního systému MIKRO FN Plzeň

Graf 2: Procentuální zastoupení pacientů ve věku < 65 a ≥ 65 let, kterým bylo ve FN Plzeň v letech 2012–2016 prokázáno toxigenní *Cl. difficile*.



Zdroj: vlastní výzkum dle interního laboratorního systému MIKRO FN Plzeň

Graf 3: Četnost pacientů FN Plzeň s prokázaným toxigenním *Cl. difficile* ve věku < 65 a ≥ 65 let v poměru ke stáří všech vyšetřených pacientů.



Zdroj: vlastní výzkum dle interního laboratorního systému MIKRO FN Plzeň

10.3 Pohlaví pacientů

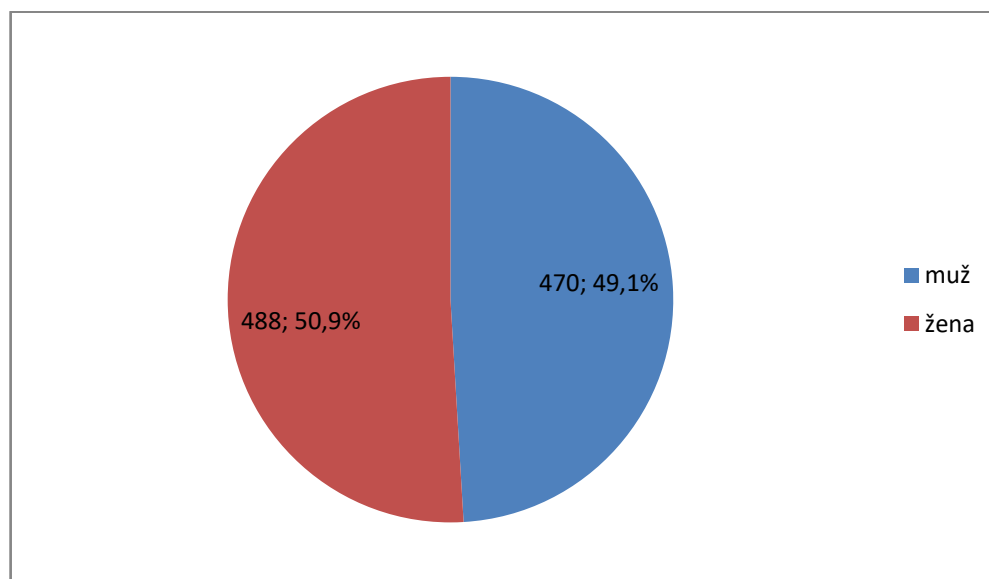
Ve FN Plzeň bylo v letech 2012–2016 prokázáno toxigenní *Cl. difficile* celkem 958 pacientům, z toho bylo 488 pozitivních žen (50,9 %) a 470 mužů (49,1 %), což graficky znázorňuje Graf 4. Vidíme, že rozdíl mezi muži a ženami je zanedbatelný, pouze 1,8 %. Tento rozdíl se ještě snižuje, přihlédneme-li i k věku negativních pacientů, což ukazuje Graf 5 (11,5 % mužů a 11,8 % žen).

Tabulka 4: Počet vzorků vyšetřených ve FN Plzeň v letech 2012–2016 v souvislosti s pohlavím pacienta.

	muž	žena	celkem
pozitivní	470	488	958
negativní	3630	3636	7266
celkem	4100	4124	8224

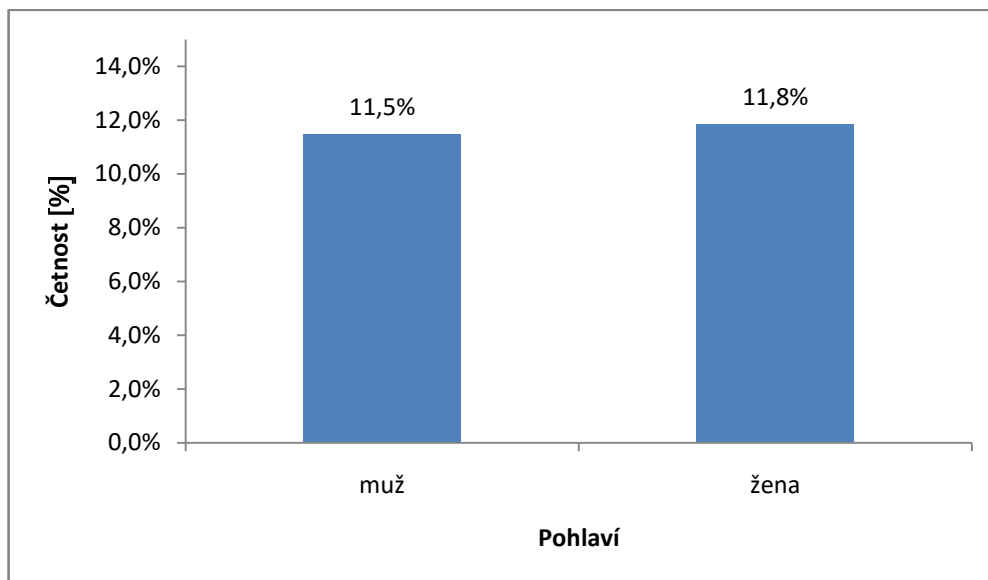
Zdroj: vlastní výzkum dle interního laboratorního systému MIKRO FN Plzeň

Graf 4: Procentuální zastoupení pohlaví pacientů FN Plzeň, jimž bylo v letech 2012–2016 diagnosticky prokázáno toxigenní *Cl. difficile*.



Zdroj: vlastní výzkum dle interního laboratorního systému MIKRO FN Plzeň

Graf 5: Četnost pohlaví pacientů FN Plzeň s prokázaným toxigenním *Cl. difficile* v poměru k celkovému počtu pacientů.



Zdroj: vlastní výzkum dle interního laboratorního systému MIKRO FN Plzeň

11 DISKUZE

Na začátku práce byl určen cíl, kterého jsem chtěla v průběhu tvorby práce dosáhnout. Stanovila jsem tři hypotézy a mým úkolem bylo je potvrdit či vyvrátit a získané výsledky porovnat s literaturou.

Podstatou sepsání teoretické části bylo získání informací o nejznámějších zástupcích bakterií rodu *Clostridium*, o jejich patogenitě, diagnostice a následné léčbě. Převážně jsem se zaměřila na *Cl. difficile*, jako na potencionálního patogena v trávicím traktu člověka, jehož výskyt je spjat s antibiotickou léčbou. Na základě nabytých znalostí bylo možné v praktické části práce popsat průběh laboratorní diagnostiky *Cl. difficile* ve FN Plzeň, zpracovat a zhodnotit získaná statistická data z let 2012–2016.

První hypotéza „Množství laboratorně prokázaných toxigenních *Cl. difficile* se ve FN Plzeň v letech 2012–2016 zvyšuje.“ se nepotvrdila. Četnost prokázaných toxigenních *Cl. difficile* znázorňuje Graf 1, z něhož vyčteme, že v roce 2013 se počet pozitivit oproti roku 2012 zvýšil. V roce 2014 bylo zaznamenáno nejméně pozitivních pacientů, jejichž počet opět stoupl v roce 2015 a následně klesl v roce 2016.

Zjištění této práce se tedy neshoduje s literaturou, protože Husa et al. (32, s. 201) tvrdí, že celosvětový trend v počtu CDI je vzestupný, přičemž odhadem přibude více než 300 000 nových případů ročně. Tento názor sdílí i další odborné články, např. Vojtilová et al. (33, s. 208) tvrdí, že počet onemocnění CDI na Klinice infekčních chorob v Brně v posledních letech stoupá. Naopak mé výsledky podpořila diplomová práce Májové (34, s. 64): „V roce 2011 se počet pacientů s CDI zvýšil oproti roku 2010, ale v letech 2012–2015 byl počet pacientů nižší než v roce 2011.“

Druhá hypotéza „Věk ≥ 65 let je rizikový faktor pro přítomnost toxigenního *Cl. difficile* u pacientů FN Plzeň v letech 2012–2016.“ se potvrdila. K této hypotéze jsem stanovila kritérium vysvětlující, co je *rizikový faktor* – více než 50 % pacientů s prokázaným toxigenním *Cl. difficile* bylo ve věku ≥ 65 let. V letech 2012–2016 bylo ve FN Plzeň prokázano toxigenní *Cl. difficile* bylo u 62,0 % pacientů ve věku ≥ 65 let a pouze 38,0 % pacientů mladších 65 let. To dokazuje, že věk ≥ 65 let je rizikový faktor pro vznik CDI. Tento fakt se potvrdil také zařazením věku negativních pacientů

do výpočtu rizikového faktoru. Výsledek znázorňuje Graf 3, kdy je 13,7 % všech pacientů ≥ 65 let a 9,4 % pacientů mladších 65 let.

Výsledky této práce odpovídají četným studiím, které probíhají po celé České republice, např. Vojtilová et al. (33, s. 208) ve své studii uvádí, že k rizikovým faktorům vzniku CDI patří mimo jiné i věk nad 65 let. Zjistila, že 77,5 % pacientů i infekcí CDI hospitalizovaných na Klinice infekčních chorob v Brně v letech 2007–2010, bylo starších 65 let. Májová (34, s. 42) ve své diplomové práci uvedla, že ve zkoumaném souboru z let 2009–2015 bylo 59,2 % pacientů starších 65 let.

Třetí hypotéza „Ženy trpí CDI (*Clostridium difficile* infection) častěji než muži.“ se taktéž potvrdila. I zde jsem stanovila kritérium. Tentokrát vysvětluje, že pojmem *častěji* je myšleno, že vzorky s prokázaným toxigenním *Cl. difficile* pocházejí z více než 50 % od pacientů ženského pohlaví. Ve sledovaném období bylo ve FN Plzeň prokázáno toxigenní *Cl. difficile* u 50,9 % žen a 49,1 % mužů.

Hypotéza se tímto sice potvrdila, ale jelikož je rozdíl získaného výsledku od stanoveného kritéria pouze 0,9 %, myslím si, že pohlaví pacientů nemá zásadní vliv na výskyt CDI. Tímto názorem se shodují s Brabencovou (7, s. 49), která ve své bakalářské práci uvádí: „I když nebyla prokázána souvislost mezi výskytem *Cl. difficile* a pohlavím, můžeme vidět, že pozitivita výsledků je vyšší u žen než u mužů.“ Jejím zkoumaným souborem byly výsledky vyšetření z období září až listopad 2010 získaných ve FN Brno. Existují ale i výzkumy, kde je v souboru pacientů větší podíl mužů než žen, např. podle Májové (34, s. 44) bylo v letech 2010–2015 na oddělení intenzivní péče v dané nemocnici 63 % mužů a 37 % žen s CDI. Musím ale podotknout, že rozdíly ve sledovaných souborech jsou velké, čímž může dojít ke zkreslení informací.

ZÁVĚR

Závěrem lze říci, že klostridia, přestože se s nimi dnes setkáváme méně často, mohou způsobit vážná onemocnění i v dnešní době smrtelná. Připomeňme si například botulismus, plynatou sněť nebo tetanus. Důvod, proč je jejich výskyt nižší, než v předchozích letech, spočívá především v dodržování správných hygienických návyků, jak v oblasti osobní hygieny, výroby potravin, tak ve správném ošetření rány. V případě prevence tetanu je účinné povinné očkování.

Samostatnou kapitolou je *Cl. difficile*, jehož význam v současné době narůstá v souvislosti se zdokonalující se intenzivní péčí a nadužíváním antibiotik. Je to významný nozokomiální patogen, způsobující různé formy CDI vznikající po narušení střevní mikroflóry a následném přemnožení bakterie. Podle literatury se výskyt CDI v posledních letech zvyšuje. Právě díky tomuto zjištění jsem praktickou část věnovala výskytu *Cl. difficile* u pacientů FN Plzeň. Retrospektivně jsem sbírala data týkající se vzorků vyšetřených imunochromatografickým testem *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE™* nebo metodou real-time PCR a následně jsem je statisticky vyhodnotila. Sledované období jsem určila na roky 2012–2016. Díky jednomu z mých cílů (popsat algoritmus laboratorní diagnostiky *Cl. difficile* v MIKRO FN Plzeň) jsem se seznámila s mikrobiologickou laboratoří a s metodami, které se používají pro záchyt anaerobních bakterií, převážně *Cl. difficile*.

Na začátku vypracování práce jsem stanovila tři hypotézy, z nichž jsem dvě potvrdila a jednu vyvrátila. Vyvrácená hypotéza se týkala četnosti výskytu toxigenního *Cl. difficile* u pacientů FN Plzeň. Má domněnka, že se jejich výskyt bude zvyšovat, se nepotvrdila. Procentuální zastoupení pozitivních vzorků nemělo ani klesající, ani stoupající trend. Dále z mého šetření vyplývá, že věk nad 65 let je rizikový faktor pro vznik CDI. Hypotézu týkající se věku, jsem také potvrdila. Jelikož byl rozdíl mezi procentuálním zastoupením mužů a žen rozdílný pouze o necelé dvě procenta, myslím si, že pohlaví nemá významný vliv na vznik CDI.

Podle mého názoru by bylo vhodné dále sledovat četnost výskytu *Cl. difficile* ve FN Plzeň s cílem zjistit, jestli trend pozitivních pacientů bude v dalších letech klesat nebo jestli se potvrdí výroky z literatury a trend bude stoupající. Dnes je velkým tématem nadužívání antibiotik, přičemž je snaha o informování lékařů, potažmo

veřejnosti o rizicích z toho plynoucích. Myslím si, že výskyt CDI by mohl být v příštích letech nižší, právě kvůli snaze o adekvátní antibiotickou léčbu. Protože se do rozsahu mé práce nevešly další možné rizikové faktory vzniku CDI, chtěla bych se jim v budoucnu nadále věnovat.

POUŽITÁ LITERATURA

1. VOTAVA, Miroslav a kol. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun, 2003. 495 s. ISBN 80-902896-6-5.
2. BEDNÁŘ, Marek, Andrej SOUČEK a Jiří VÁVRA. *Lékařská speciální mikrobiologie a parazitologie*. Praha: Stanislav Juhaňák – Triton, 1994, 226 s. ISBN 80-901521-4-7.
3. SCHINDLER, Jiří. *Mikrobiologie: Pro studenty zdravotnických oborů*. 2., dopl. a přeprac. vyd.. Praha: Grada Publishing a.s., 2014, 248 s. ISBN 978-80-247-4771-2.
4. VOTAVA, Miroslav. *Lékařská mikrobiologie obecná*. 2. přeprac. vyd. Brno: Neptun, 2005. 351 s. ISBN 80-86850-00-5.
5. KAŠPÁRKOVÁ, Věra. *Toxiny bakterií rodu Clostridium* [online]. Zlín, 2009 [cit. 2016-08-03]. Bakalářská práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická. Vedoucí práce Magda Doležalová. Dostupné z: http://digilib.k.utb.cz/bitstream/handle/10563/10081/ka%C5%A1p%C3%A1rkov%C3%A1_2009_bp.pdf?sequence=1.
6. VOTAVA, Miroslav a kol. *Lékařská mikrobiologie vyšetřovací metody*. Brno: Neptun, 2010, 495 s. ISBN 978-80-86850-04-8.
7. BRABENCOVÁ, Sylva. *Diagnostika Clostridium difficile a jeho výskyt ve FN Brno* [online]. Brno, 2011 [cit. 2016-08-03]. Bakalářská práce. Masarykova univerzita, Lékařská fakulta. Vedoucí práce Jana Juránková. Dostupné z: https://is.muni.cz/th/258751/lf_b/DIAGNOSTIKA_CLOSTRIDIUM_DIFFICILE_A_JEHO_VYSKYT_VE_FN_BRNO.pdf.
8. BROOK, Itzhak. Current concepts in the management of Clostridium tetani infection. *Expert review of anti-infective therapy*. 2008, **6**(3), 327–336. ISSN 1478-7210.
9. HAMPLOVÁ, Lidmila a kol. *Mikrobiologie, imunologie, epidemiologie, hygiena pro bakalářské studium a všechny typy zdravotnických škol*. Praha: Stanislav Juhaňák – Triton. 263 s. 978-80-7387-934-1.
10. PÝCHOVÁ, Martina, Lenka VOJTILOVÁ, Michaela FREIBERGEROVÁ, Radana PAŘÍZKOVÁ, Markéta ŠNELEROVÁ a Petr HUSA. Tetanus – staronová diagnóza? *Kazuistika. Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie*. 2013, **76**(1), 100–103. ISSN 1210-7859.

11. SKARIYACHAN, Sinosh, Nisha PRAKASH and Navya BHARADWAJ. In silico exploration of novel phytoligands against probable drug target of *Clostridium tetani*. *Interdisciplinary Sciences: Computational Life Sciences*, 2012, 4(4), 273–281. ISSN 1913-2751.
12. GOERING, Richard V., Hazel M. DOCKRELL a Mark A. ZUCKERMAN. *Mimsova lékařská mikrobiologie*. 5. vydání. Praha: Stanislav Juhaňák – Triton, 2016. xiv, 568 s. ISBN 978-80-7387-928-0.
13. PETRÁŠ, Marek. OČKOVACÍ KALENDÁŘ v ČR (2010). In: *Vakciny.net* [online]. 2010 [cit. 2016-07-27]. Dostupné z: http://www.vakciny.net/principy_ockovani/pr_04.htm
14. DRYMLOVÁ, Veronika. Botulismus. *112*. 2007, 6(3), 16. ISSN 1213-7057.
15. ROZSYPAL, Hanuš. *Základy infekčního lékařství*. Praha: Univerzita Karlova v Praze: Karolinum, 2015, 566 s. ISBN 978-80-246-2932-2.
16. DLHÝ, Jozef. Vyhodnocení rizika výskytu ranného botulizmu u injekčních narkomanů. *Zprávy epidemiologie a mikrobiologie*. 2009, 18(3), 90. ISSN 1803-6422
17. GÖPFERTO VÁ, Dana, Petr PAZDIORA, Lenka PETROUŠOVÁ a Jana DÁŇOVÁ. *100 infekcí (epidemiologie pro praxi)*. Praha: Stanislav Juhaňák – Triton, 2015, 284 s. ISBN 978-80-7387-846-7.
18. REVIS, Don R. Clostridial Gas Gangrene. In: *Medscape* [online]. New York: Medscape Network, 2014 [cit. 2016-08-03]. Dostupné z: <http://emedicine.medscape.com/article/214992-overview#a5>
19. MURRAY, Patrick R., Ken S. ROSENTHAL and Michael A. PFALLER. *Medical Microbiology*. 7th ed. Philadelphia: Elsevier/Saunders, 2013, 874 s. ISBN 978-0-323-08692-9.
20. GYLES, Carlton, John PRESCOTT, Glenn SONGER and Charles THOEN. *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals*, 4th ed. Ames, Iowa: Wiley – Blackwell Publishing, 2010, 640 s. ISBN 978-0-813-81237-3.
21. SLÁDKOVÁ, Pavla a Jana HLA VÁČOVÁ. *Speciální mikrobiologie*. 1. Brno: Mendelova univerzita v Brně, 2011, 88 s. ISBN 978-80-7375-558-4.

22. BENEŠ, Jiří, Petr HUSA a Otakar NYČ. Doporučený postup diagnostiky a léčby kolitidy vyvolané *Clostridium difficile*. *Klinická mikrobiologie a infekční lékařství*. Praha: Trios, 2012, **18**(5), 160–167. ISSN 1211-264X.
23. CHMELAŘOVÁ, Eva a T. ŠKAPOVÁ. Praktické zkušenosti s diagnostikou *Clostridium difficile*. *Klinická mikrobiologie a infekční lékařství*. Praha: Trios, 2010, **16**(3), 86–89. ISSN 1211-264X.
24. CEVA EDUCATION a Lenka GEIGEROVÁ. *Clostridium difficile* – principy laboratorní diagnostiky a léčba. In: *Youtube* [online]. Zveřejněno 27. 8. 2013 [vid. 2016-09-11]. Dostupné z: <https://www.youtube.com/watch?v=M4949hvrUqU>.
25. TECHLAB®. *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE™* – příbalový leták. USA: TECHLAB®, Inc., Vydáno: 04/2009. Dostupné také z: http://www.medial.cz/data/files/medial/download/pribalovy_list/techlab/clostridium_pribalovy_list.pdf
26. SEDLÁČEK, Zbyněk. *Produkce vodíku bakteriemi rodu Clostridium* [online]. Brno, 2010 [cit. 2016-09-11]. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická. Vedoucí práce Bohuslav Rittich. Dostupné z: <https://dspace.vutbr.cz/bitstream/handle/11012/935/Sedl%C3%A1%C4%8Dek-BP.pdf?sequence=1>.
27. HRBÁK, Jaroslav a Anna SKÁLOVÁ. *SOP – Průkaz toxinů A/B Clostridium difficile metodou PCR*. Ústav mikrobiologie FN Plzeň. Účinnost od 1. 3. 2016. SOPV/MIKRO_BAK/043/00/04.
28. NYČ, Otakar. Přístupy k léčbě střevních infekcí vyvolaných *Clostridium difficile*. *Klinická mikrobiologie a infekční lékařství*. Praha: Trios, 2010, **16**(3), 93–96. ISSN 1211-264X.
29. GEIGEROVÁ, Lenka. *SOP – Průkaz toxinu Clostridium difficile imunochromatografickou metodou a kultivační vyšetření pozitivních nálezů*. Ústav mikrobiologie FN Plzeň.
30. GENEPROF. *PathogenFree DNA Isolation Kit* – příbalový leták [online]. Brno: GeneProof a.s., Platnost od: 02/2016 [cit. 2017-02-11]. Dostupné z: <http://www.geneproof.com/upload/files/b7b67632f22ef28/geneproof-pathogenfree-dna-isolation-kit-cz-2.pdf>

31. R-BIOPHARM AG, *RIDA®GENE Clostridium difficile* – příbalový leták [online]. Darmstadt, Německo: R-Biopharm AG, Platnost od: 04/2013 [cit. 2017-02-11]. Dostupné z:http://www.r-biopharm.com/wp-content/uploads/items/ridagene-clostridium-difficile-19868/PG0835RIDAGENE_C.-difficile_ENG_2013_04_171.pdf
32. HUSA, Petr, Jiří BENEŠ a Otakar NYČ. Klostridiová kolitida – stále narůstající nabezpečí. *Interní medicína pro praxi*. Olomouc: Solen, s.r.o, 2013, **15**(6–7), 201–204. ISSN 1212-7299.
33. VOJTILOVÁ, L., M. FREIBERGEROVÁ, J. JURÁNKOVÁ, P. HUSA, P. POLÁK a H. KOCOURKOVÁ. Analýza souboru pacientů s onemocněním vyvolaným toxinem *Clostridium difficile* hospitalizovaných na Klinice infekčních chorob v Brně v letech 2007–2010. *Klinická mikrobiologie a infekční lékařství*. Praha: Trios, 2011, **17**(6), 208–213. ISSN 1211-264X.
34. MÁJOVÁ, Eva. *Clostridiové infekce u pacientů JIP* [online]. Pardubice, 2016 [cit. 2017-02-22]. Diplomová práce. Univerzita Pardubice, Fakulta zdravotnických studií. Vedoucí práce Karel Havlíček. Dostupné z:
http://dspace.upce.cz/bitstream/handle/10195/65029/MajovaE_ClostridioveInfekce_KH_2016.pdf?sequence=3&isAllowed=y.

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

°C – stupeň Celsia

μl - mikrolitr

μm – mikrometr

apod. – a podobně

ATB – antibiotika

CDI – *Clostridium difficile infection*

Cl. – Clostridium

DNA – deoxyribonukleová kyselina

ELISA – Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay

event. – eventuálně

FN – fakultní nemocnice

GABA – kyseliny gama-aminomáselná

GDH – glutamátdehydrogenáza

GIT – gastrointestinální trakt

i.v. – intravenózní

kDA – kilodaltony

MIKRO FN Plzeň – Ústav mikrobiologie Fakultní nemocnice Plzeň

Mpa – megapascal

mV – milivolt

např. – například

nm – nanometry

PCR – polymerázová řetězová reakce

tj. – to je

tzn. – to znamená

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Množství vyšetřených vzorků ve FN Plzeň v letech 2012–2016.

Tabulka 2: Statistické údaje týkající se vzorků vyšetřených ve FN Plzeň v letech 2012–2016 v souvislosti s věkem pacienta.

Tabulka 3: Statistické údaje týkající věku pacienta s prokázaným toxigenním *Cl. difficile* ve FN Plzeň v letech 2012–2016.

Tabulka 4: Počet vzorků vyšetřených ve FN Plzeň v letech 2012–2016 v souvislosti s pohlavím pacienta.

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1: Poměrné zastoupení laboratorně prokázaných *Cl. difficile* ve vzorcích vyšetřených ve FN Plzeň v letech 2012–2016.

Graf 2: Procentuální zastoupení pacientů ve věku < 65 a ≥ 65 let, kterým bylo ve FN Plzeň v letech 2012–2016 prokázáno toxigenní *Cl. difficile*.

Graf 3: Četnost pacientů FN Plzeň s prokázaným toxigenním *Cl. difficile* ve věku < 65 a ≥ 65 let v poměru ke stáří všech vyšetřených pacientů.

Graf 4: Procentuální zastoupení pohlaví pacientů FN Plzeň, jimž bylo v letech 2012–2016 diagnosticky prokázáno toxigenní *Cl. difficile*.

Graf 5: Četnost pohlaví pacientů FN Plzeň s prokázaným toxigenním *Cl. difficile* v poměru k celkovému počtu pacientů.

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Negativní GDH i toxin: nepřítomnost *Cl. difficile* ve vzorku.

Obrázek 2: Pozitivní GDH, negativní toxin: přítomnost antigenu *Cl. difficile* ve vzorku.

Obrázek 3: Pozitivní GDH i toxin: přítomnost toxigenního *Cl difficile* ve vzorku.

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1: Mikroskopický preparát spor klostridia vytvořený z narostlých kultur.

Příloha 2: Mikroskopický preparát *Cl. perfringens* vytvořený z narostlých kultur.

Příloha 3: Kolonie *Cl. perfringens* s dvojitou hemolýzou na Schaedlerově agaru.

Příloha 4: Kolonie *Cl. perfringens* se zónou opalescence na žlutkovém agaru.

Příloha 5: Šedé kolonie *Cl. difficile* na Schaedlerově agaru.

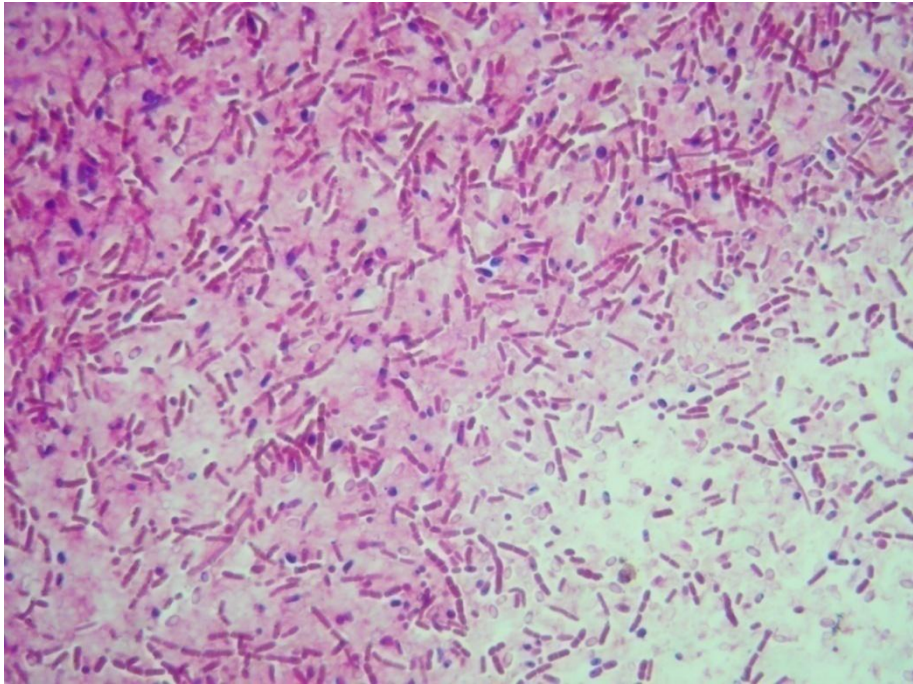
Příloha 6: Algoritmus vyšetření *Cl. difficile* ve FN Plzeň.

Příloha 7: E-test – stanovení citlivosti k vankomycinu a metronidazolu u *Cl. difficile*.

Příloha 8: Povolení sběru informací ve FN Plzeň.

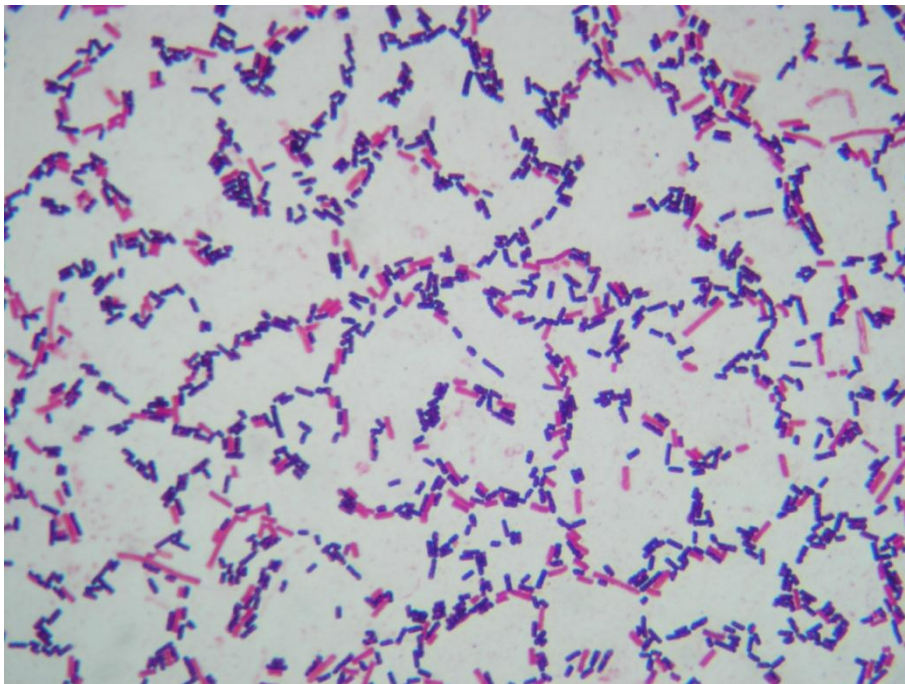
PŘÍLOHY

Příloha 1: Mikroskopický preparát spor klostridia vytvořený z narostlých kultur.



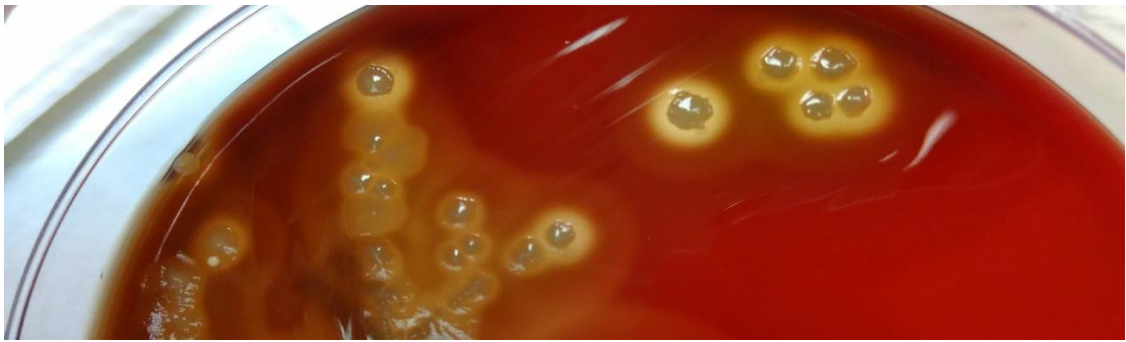
Zdroj: foto autor

Příloha 2: Mikroskopický preparát *Cl. perfringens* vytvořený z narostlých kultur.



Zdroj: foto autor

Příloha 3: Kolonie *Cl. perfringens* s dvojitou hemolýzou na Schaedlerově agaru.



Zdroj: foto autor

Příloha 4: Kolonie *Cl. perfringens* se zónou opalescence na žlutkovém agaru.



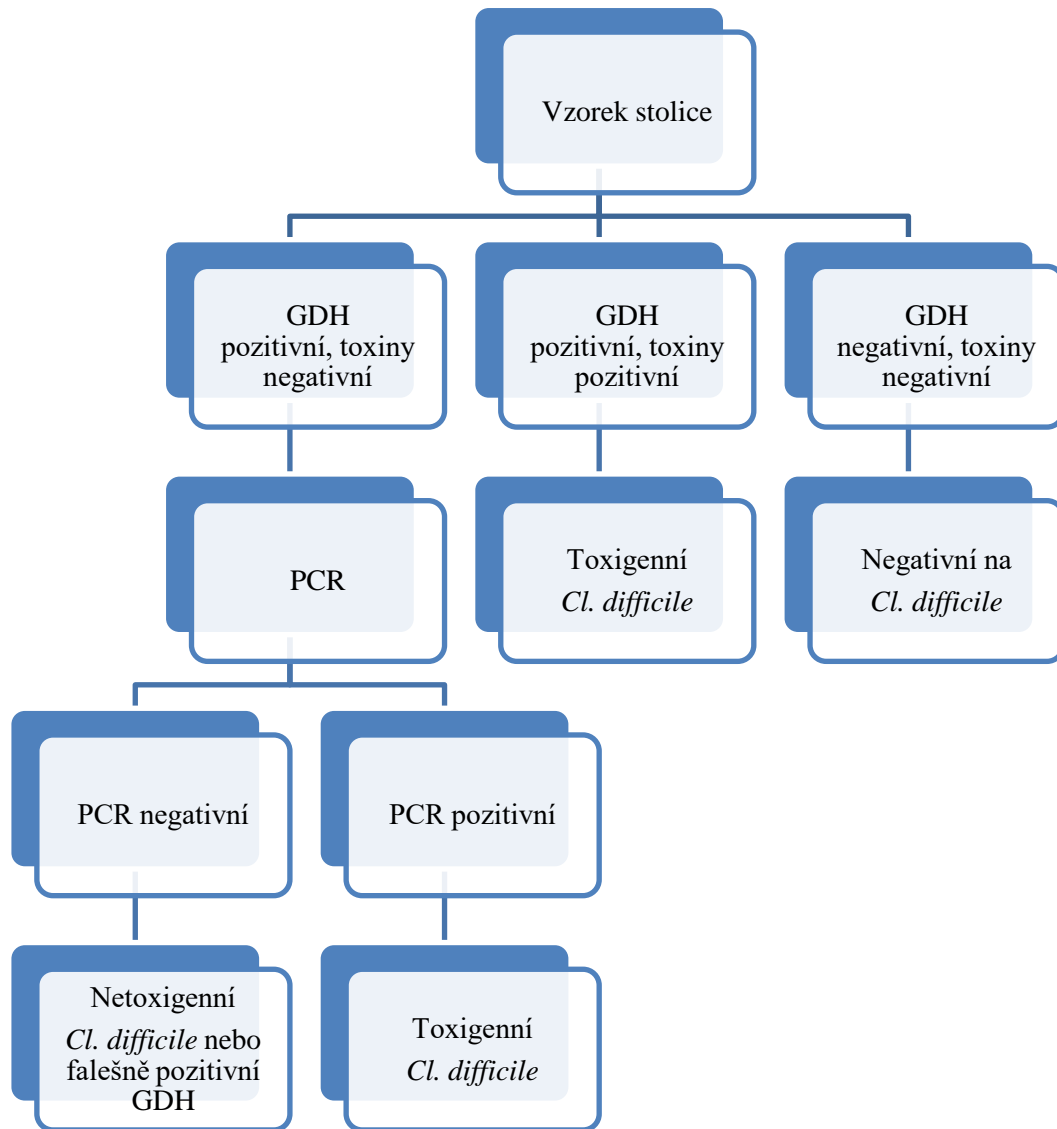
Zdroj: foto autor

Příloha 5: Šedé kolonie *Cl. difficile* na Schaedlerově agaru.



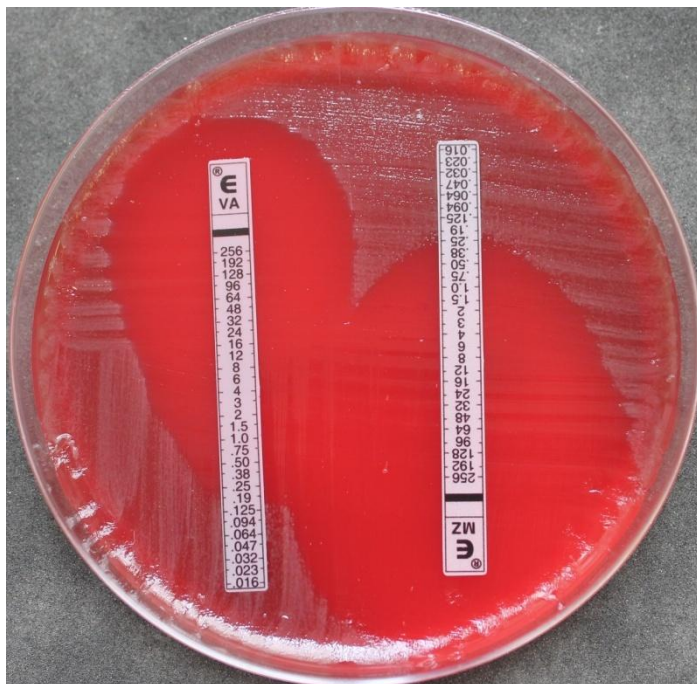
Zdroj: foto autor

Příloha 6: Algoritmus vyšetření *Cl. difficile* ve FN Plzeň.



Zdroj:(29)

Příloha 7: E-test – stanovení citlivosti k vankomycinu a metronidazolu u *Cl. difficile*.



Zdroj: foto autor

Příloha 8: Povolení sběru informací ve FN Plzeň.



FAKULTNÍ NEMOCNICE PLZEŇ
Útvar náměstka pro ošetrovatelskou péči
Edvarda Beneše 13, 305 99 Plzeň - Bory
alej Svobody 80, 304 60 Plzeň - Lochotín
IČO 00669806 tel.: 377 401 111, 377 103 111

Vážená paní
Šárka Brandtlová
Studentka oboru Zdravotní laborant
Fakulta zdravotnických studií, Katedra teoretických oborů
Západočeská univerzita v Plzni

Povolení sběru informací ve FN Plzeň

Na základě Vaší žádosti Vám jménem Útvaru náměstkyně pro ošetrovatelskou péči FN Plzeň **uděluji souhlas** se sběrem a zpracováním anonymizovaných dat z výsledků laboratorních metod, používaných v Ústavu mikrobiologie (MIKRO) FN Plzeň. Tento souhlas je vydáván, při splnění níže uvedených podmínek, v souvislosti s vypracováním Vaší bakalářské práce s názvem „Klostridia a jejich výskyt u pacientů FN Plzeň“.

Podmínky, za kterých Vám bude umožněna realizace Vašeho šetření ve FN Plzeň:

- Vrchní zdravotní laborantka MIKRO souhlasí s Vaším postupem.
- Osobně provedete svoje šetření.
- Vaše šetření nenaruší chod pracoviště ve smyslu provozního zajištění dle platných směrnic FN Plzeň, ochrany dat pacientů a dodržování Hygienického plánu FN Plzeň. **Vaše šetření bude provedeno za dodržení všech legislativních norem, zejména s ohledem na platnost zákona č. 372/2011 Sb.,** o zdravotních službách a podmínkách jejich poskytování, v platném znění.
- Údaje ze zdravotnické dokumentace pacientů, které budou uvedeny ve Vaší bakalářské práci, musí být anonymizovány.
- Sběr informací budete provádět v době Vaší, školou schválené, odborné praxe a pod přímým vedením oprávněného zdravotnického pracovníka, kterým je **MUDr. Lenka Geigerová, lékařka MIKRO FN Plzeň.**

Po zpracování Vámi zjištěných údajů poskytnete zdravotnickému oddělení / klinice či organizačnímu celku FN Plzeň závěry Vašeho šetření, pokud o ně projeví oprávněný pracovník ZOK / OC zájem a budete se aktivně podílet na případné prezentaci výsledků Vašeho šetření na vzdělávacích akcích pořádaných FN Plzeň.

Toto povolení nezakládá povinnost zdravotnických pracovníků s Vámi spolupracovat, pokud by spolupráce s Vámi narušovala plnění pracovních povinností zaměstnanců. Spolupráce zaměstnanců FN Plzeň na Vašem šetření je dobrovolná.

Přeji Vám hodně úspěchů při studiu.

Mgr. Bc. Světluše Chabrová
manažerka pro vzdělávání a výuku NELZP
zástupkyně náměstkyně pro oš. péči

Útvar náměstkyně pro oš. péči FN Plzeň
tel.: 377 103 204, 377 402 207
e-mail: chabrovas@fnplzen.cz

22. 9. 2016