

ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI  
FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

# **BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

**2022**

**Adéla Vávrová**

FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

Studijní program: Specializace ve zdravotnictví (B5345)

**Adéla Vávrová**

Studijní obor: Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví (B0914P360004)

**DIAGNOSTIKA RODU *CLOSTRIDIUM* A JEHO VÝSKYT  
VE FN PLZEŇ**

**Bakalářská práce**

Vedoucí práce: RNDr. Karel Fajfrlík, Ph.D.

PLZEŇ 2022

Na této straně se v tištěné verzi nachází zadání bakalářské práce.

Na této straně se v tištěné verzi nachází zadání bakalářské práce.

### **Prohlášení**

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

V Plzni dne 15. 3. 2022.

.....

vlastnoruční podpis

## **Abstrakt**

Příjmení a jméno: Vávrová Adéla

Katedra: Katedra záchranářství, diagnostických oborů a veřejného zdravotnictví

Název práce: Diagnostika rodu *Clostridium* a jeho výskyt ve FN Plzeň

Vedoucí práce: RNDr. Karel Fajfrlík, Ph.D.

Počet stran – číslované: 50

Počet stran – nečíslované: 25

Počet příloh: 8

Počet titulů použité literatury: 38

Klíčová slova: klostridia, *Clostridioides difficile*, LAMP, imunochromatografické stanovení, vankomycin, botulotoxin, tetanus, toxiny, spory, anaerobní grampozitivní tyčinka

### **Souhrn:**

V posledních letech dochází k nárůstu výskytu *C. difficile*. Infekce vyvolané tímto klostridiem jsou vnímané jako nozokomiální infekce, souvisí totiž s antibiotickou léčbou. Tato bakalářská práce se nezabývá pouze *C. difficile* ale i ostatními zástupci rodu *Clostridium*. Bakalářská práce je rozdělena na dvě části, a to teoretickou a praktickou.

Teoretická část je věnovaná jednotlivým zástupcům tohoto bakteriálního rodu, kde obecně popisujeme jejich morfologii, výskyt, patogenitu, onemocnění, diagnostiku a léčbu jimi vyvolaných onemocnění. Praktická část je zaměřena pouze na zástupce *C. difficile*. Týká se laboratorní diagnostiky *C. difficile* na ÚM FN Plzeň, zvýšení výskytu toxigenních kmenů, výskytu CLDI onemocnění v různých věkových kategoriích a ovlivněním pandemie COVID-19 na počtu vyšetření.

## **Abstract**

Surname and name: Vávrová Adéla

Department: Department of Rescue Services, Diagnostic Fields and Public Health

Title of thesis: Diagnostics of the genus *Clostridium* and his occurrence at the University Hospital Pilsen

Consultant: RNDr. Karel Fajfrlík, Ph.D.

Number of pages – numbered: 50

Number of pages – unnumbered: 25

Number of appendices: 8

Number of literature items used: 38

Keywords: clostridia, *Clostridioides difficile*, LAMP, imunochromatographic determination, vancomycin, botulinum toxin, tetanus, toxins, spores, anaerobic Gram-positive bar

### Summary:

In recent years, the occurrence of *C. difficile* has increased. Infections caused by this clostridium are perceived as nosocomial infections, because they are related to antibiotic treatment. This bachelor thesis does not deal only with *C. difficile* but also with other members of the genus *Clostridium*. The bachelor thesis is divided into two parts, theoretical and practical.

The theoretical part is devoted to individual representatives of this bacterial genus, where are generally describe their morphology, occurrence, pathogenicity, disease, diagnosis and treatment of diseases caused by them. The practical part is focused only on *C. difficile*. It concerns the laboratory diagnosis of *C. difficile* at the University Hospital Pilsen, an increase in the incidence of toxigenic strains, the incidence of CLDI disease in various age categories and the influence of the COVID-19 pandemic on the number of examinations.

## **Poděkování**

Děkuji RNDr. Karlovi Fajfrlíkovi, Ph.D. za odborné vedení práce, ochotu a čas strávený nad bakalářskou prací. Dále děkuji MUDr. Lence Geigerové za poskytnutí cenných rad a materiálních podkladů. Mé další poděkování patří Mgr. Kateřině Vlkové za konzultace a korekturu textu. Poslední poděkování je pro Mgr. Markétu Stejskalovou za pomoc při zpracování získaných dat z laboratorního informačního systému.



# OBSAH

ÚVOD.....	12
TEORETICKÁ ČÁST .....	13
1 ROD CLOSTRIDIUM.....	13
1.1 Klasifikace rodu .....	13
1.2 Morfologie .....	14
1.3 Výskyt.....	16
1.4 Fyziologie a růst.....	17
1.5 Patogeneze a patogenita.....	18
1.6 Toxiny.....	19
1.7 Epidemiologie .....	19
2 CLOSTRIDIUM DIFFICILE .....	20
2.1 Morfologie .....	20
2.2 Kultivace a diagnostika.....	20
2.2.1 Enzym glutamátdehydrogenáza.....	21
2.2.2 PCR metoda.....	21
2.2.3 Cytotoxinová assay.....	22
2.3 Klinický obraz.....	22
2.3.1 Klostridiová kolitida.....	22
2.3.2 Pseudomembránozní kolitida .....	23
2.3.3 Post-antibiotická kolitida.....	24
2.4 Patogenita a patogenese .....	24
2.5 Terapie a prevence .....	24
2.5.1 Metronidazol.....	25
2.5.2 Vankomycin .....	25
2.5.3 Fidaxomicin.....	25
2.5.4 Fekální bakterioterapie – „transplantace stolice“ .....	26
3 CLOSTRIDIUM BOTULINUM .....	27
3.1 Morfologie .....	27
3.2 Kultivace .....	27
3.3 Klinický obraz.....	27
3.4 Diagnostika .....	28
3.5 Patogenita.....	28
3.6 Terapie a prevence .....	28
3.7 Epidemiologie .....	28
3.8 Botulismus .....	29

4	CLOSTRIDIUM TETANI.....	31
4.1	Morfologie .....	31
4.2	Kultivace .....	31
4.3	Klinický obraz a patogeneze .....	32
4.4	Diagnostika .....	32
4.5	Terapie a prevence .....	32
4.6	Epidemiologie .....	32
4.7	Tetanus (Strnutí šíje).....	33
5	KLOSTRIDIA ANAEROBNÍCH TRAUMATÓZ .....	35
5.1	Rozdělení ranných infekcí .....	35
5.1.1	Infekce ran .....	35
5.1.2	Hnisavé nekrotické infekce .....	35
5.1.3	Závažné nekrotizující infekce.....	35
5.2	Klinický obraz.....	35
5.3	Diagnostika .....	36
5.4	Patogeneze .....	36
5.5	Terapie a prevence .....	36
5.6	Epidemiologie .....	36
5.7	<i>Clostridium perfringens</i> .....	36
5.7.1	Morfologie a vlastnosti.....	36
5.7.2	Kultivace.....	37
5.7.3	Patogenita .....	37
5.7.4	Onemocnění a patogeneze .....	37
5.7.5	Intoxikace <i>Clostridium perfringens</i> typu A .....	39
5.7.6	Enterotoxikóza.....	39
5.7.7	Nekrotizující enteritida.....	39
5.7.8	Laboratorní diagnostika.....	40
5.7.9	Terapie a prevence.....	40
5.8	<i>Clostridium septicum</i> .....	40
5.9	<i>Clostridium novyi</i> .....	40
5.10	<i>Clostridium histolyticum</i> .....	40
5.11	Další speciální klostridia .....	40
5.11.1	<i>Clostridium sordelii</i> .....	40
5.11.2	<i>Clostridium sporogenes</i> .....	41
	PRAKTICKÁ ČÁST .....	42
6	CÍL A ÚKOLY PRÁCE .....	42
7	VÝZKUMNÉ OTÁZKY .....	43

7.1	Výzkumná otázka č. 1 .....	43
7.2	Výzkumná otázka č. 2 .....	43
7.3	Výzkumná otázka č. 3 .....	43
7.4	Výzkumná otázka č. 4 .....	43
8	CHARAKTERISTIKA SLEDOVANÉHO SOUBORU .....	44
9	METODIKA PRÁCE .....	45
9.1	Laboratorní diagnostika <i>Clostridium difficile</i> .....	45
9.2	Princip stanovení imunochromatografického testu .....	45
9.3	Odběr a příprava vzorku .....	45
9.4	Přístroje, pomůcky a reagensie .....	46
9.5	Pracovní postup .....	46
9.5.1	Cílená anaerobní kultivace .....	47
9.5.2	Zamražení čerstvého kmene <i>Clostridium difficile</i> .....	47
9.6	Interpretace výsledků, konzultace a hlášení .....	48
9.7	Pracovní postup pro LAMP .....	48
9.8	Algoritmus pro laboratorní diagnostiku <i>C. difficile</i> ve FN Plzeň .....	50
10	ANALÝZA A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ .....	51
10.1	Počty vyšetření během let 2018-2021 .....	51
10.2	Věkové kategorie pacientů a jejich výskyt .....	54
10.3	Vliv pandemie COVID-19 na počty žádostí o vyšetření na <i>C. difficile</i> .....	57
	DISKUZE .....	59
	ZÁVĚR .....	61
	SEZNAM LITERATURY .....	63
	SEZNAM OBRÁZKŮ .....	67
	SEZNAM TABULEK .....	68
	SEZNAM GRAFŮ .....	69
	SEZNAM ZKRATEK .....	70
	SEZNAM PŘÍLOH .....	71
	PŘÍLOHY .....	72

## ÚVOD

V bakalářské práci se zabývám bakteriemi rodu *Clostridium* s hlavním zaměřením na druh *C. difficile*. Jedná se o anaerobní sporulující grampozitivní tyčinky, které produkují toxiny. V malém množství jsou součástí fyziologické mikroflóry střev.

Při poškození střevní stěny mohou vyprodukované toxiny způsobit vážná onemocnění. Mezi onemocnění vyvolaná klostridii patří například tetanus, botulismus, pseudomembránová kolitida, post-antibiotická kolitida ale i gangréna nebo celulitida. Zajímavostí klostridií je, že při nepříznivých podmínkách vytváří sporu, ve které jsou schopny přežít i nepříznivé podmínky.

*C. difficile* se objeví jako patogen při poškození střevní stěny, která může být vyvolána například antibiotickou léčbou. Kvůli pandemii COVID-19 byly nemocnice přeplněné pacienty s pozitivními výsledky na SARS-CoV-2. Pacienti podstupovali antibiotickou léčbu a právě při dlouhodobém používání antibiotik dochází k poškození střevní stěny.

Téma bakalářské práce jsem si vybrala na základě posledních dvou let a probíhající pandemie. Rozhodla jsem se zjistit, jaký vliv měl koronavirus na výskyt *C. difficile*.

Bakalářská práce má dvě části, teoretickou a praktickou část. V teoretické části se zabývám jednotlivými zástupci. Věnuji se jejich morfologii, výskytu, onemocněním, patogenitě a patogenezi, ale i léčbě. V teoretické části jsem se nejvíce zaměřila na *C. difficile* a onemocnění, které způsobuje. Praktická část je o postupu laboratorní diagnostiky *C. difficile*, jaké testy a metody se používají ve FN Plzeň. Ale také se zabývám jeho výskytem, kdy jsem prováděla kvantitativní výzkum. Vyhodnocuji data z ÚM FN Plzeň v letech 2018-2021. Také porovnávám výskyt během covidového a necovidového období.

Cílem bakalářské práce je ukázat způsob laboratorní diagnostiky, porovnat výskyt během posledních čtyř let. Také poukázat na to, že infekce vyvolané *C. difficile* patří mezi nejčastější nozokomiální infekce.

# TEORETICKÁ ČÁST

## 1 ROD CLOSTRIDIUM

Bakterie z rodu *Clostridium* jsou anaerobní grampozitivní sporulující tyčinky, které se fyziologicky vyskytují ve střevní mikroflóře. Najít je ale také můžeme v přírodě, kde se vyskytují v podobě spor v půdě a ve vodě. Klostridia lze také nalézt v potravě kontaminované spory při jejím zpracování. Spory jsou velmi odolné útvary, uložené uvnitř buňky bakterií, které pomáhají mikroorganismům dlouhodobě přežít v nepříznivých podmínkách. Klostridia se vyskytují jako saprofyty, kteří ale vzhledem k tvorbě toxinů mohou vyvolat těžká onemocnění u člověka. [1, 2]

Bakterie rodu *Clostridium* se dělí podle produkce toxinů, efektu na cílové orgány a mechanismu účinků. Rozděluje se na klostridia neurotoxická (*Clostridium botulinum* a *Clostridium tetani*), enterotoxická (*Clostridium perfringens*), enterotoxická a cytotoxická (*Clostridium difficile*) a histotoxická (např. *C. perfringens*, *Clostridium histolyticum*, *Clostridium novyi* a *Clostridium septicum*). [1]

Anaerobní prostředí je pro růst a klíčení spor klostridií důležitý, ale i přesto existují některé rody, které jsou aerotolerantní, což znamená, že jsou schopné tolerovat malé množství kyslíku v prostředí (např. *C. perfringens* a *C. tetani*). [1, 2, 3]

### 1.1 Klasifikace rodu

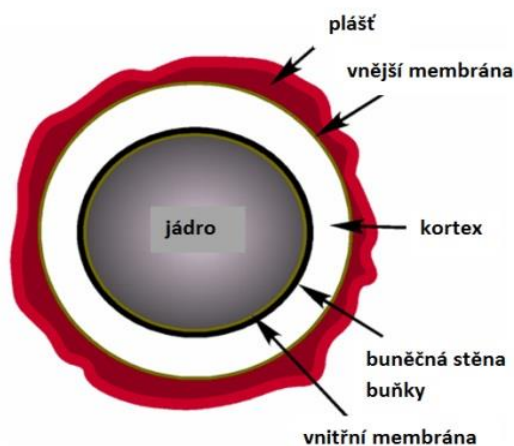
Taxony:	Doména	<i>Bacteria</i>
	Kmen	<i>Firminicutes</i>
	Třída	<i>Clostridia</i>
	Řád	<i>Clostridiales</i>
	Čeleď	<i>Clostridiaceae</i>
	Rod	<i>Clostridium</i>

## 1.2 Morfologie

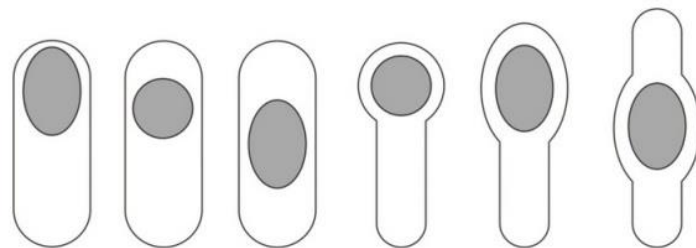
Vegetativní formy klostridií mají tvar tyčinek, které jsou relativně velké, silné, širší než 0,5  $\mu\text{m}$  a většinou díky bičíkům pohyblivé. Typickou vlastností je tvorba kulatých nebo oválných spor. [4]

Spory se vyskytují uvnitř bakteriální buňky, a proto se nazývají endospory. Umístění spor se může lišit, protože mohou být uloženy centrálně, subterminálně nebo terminálně. Tvorba spor se nazývá sporulace. Začíná ve chvíli, kdy dojde ke zhoršení životních podmínek. Tento proces začíná replikací DNA, kdy dochází ke vzniku nové dvoušroubovice DNA. Nově vzniklé dvoušroubovice jsou tvořené původním a nově syntetizovaném vláknem. Dojde k rozvinutí chromosomu do dlouhého vlákna, aby mohla proběhnout replikace. Invaginací plasmatické membrány se vytvoří septum, tím dojde k rozdělení buňky na dva celky. Oba dva vzniklé celky obsahují DNA. Menší část se nazývá prespora, která je obalená septem a má dvojitou membránu. V prostoru mezi membránami se vyskytuje cortex, který je tuhý a je tvořen peptidoglykanem. V prespoře je uložené značné množství kalcia a tvoří se zde kyselina dipikolinová. Dipikolát vápenatý se vyskytuje pouze ve sporách. Další vrstva peptidoglykanu vzniká pod kortexem a na povrchu útvaru jsou uloženy proteinové obaly, které obsahují velké množství cysteinu. Sporulace je ukončena rozpadem mateřské buňky. [4, 5]

Spory jsou velmi rezistentní k vysokým teplotám, kyselinám, organickým rozpouštědlům a dezinfekčním látkám. Ničí se vystavením vysoké teploty 120  $^{\circ}\text{C}$  po dobu dvaceti minut – autoklavace. [4, 6]

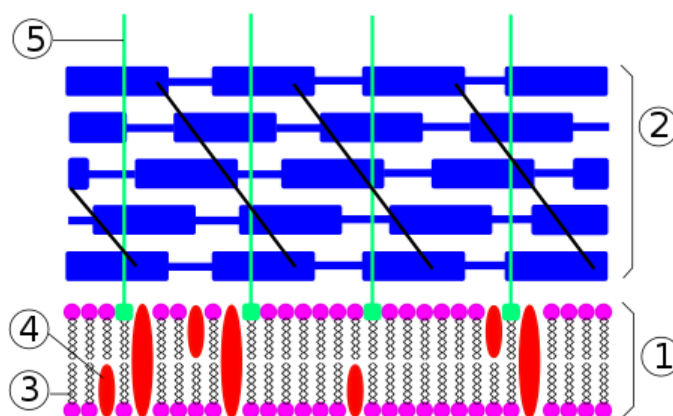


Obrázek 1: Struktura bakteriální endospory, převzato z [22]



Obrázek 2: Uložení endospor v buňce, převzato z [22]

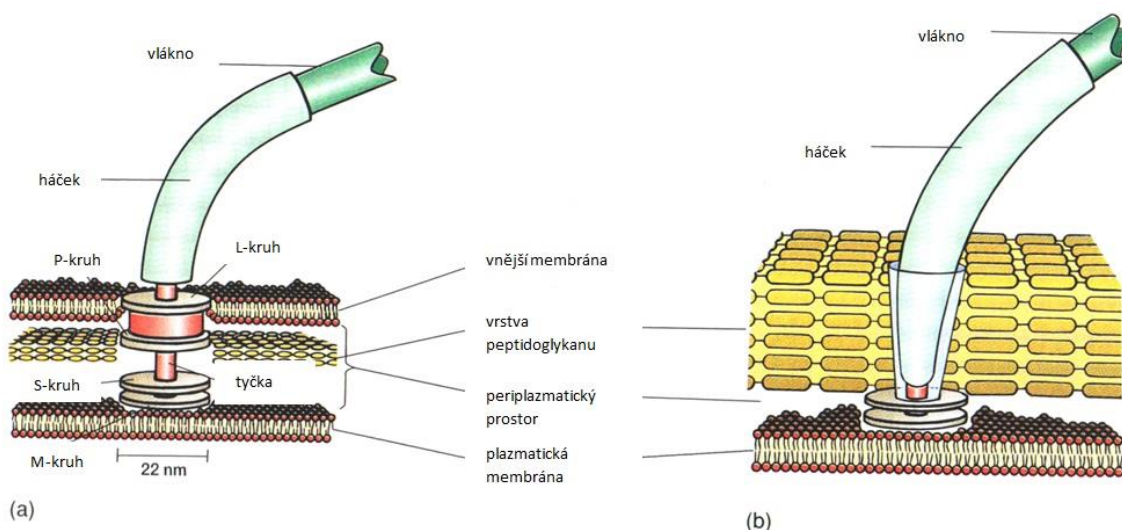
Buněčná stěna je pevná a silná vrstva, která chrání obsah buňky a slouží k udržení tvaru bakterie. Základem buněčné stěny je peptidoglykan, který se skládá z vrstev polysacharidových řetězců. Struktura buněčné stěny se hlavně liší u grampozitivních a gramnegativních buněk. Grampozitivní bakterie, takže i klostridia, mají silnou vrstvu (20 nm) peptidoglykanu s řetězci kyseliny teichoové, což je kyselý polysacharid, a i řetězce kyseliny lipoteichoové. Během Gramova barvení nedochází v buňce k vymytí krystalové violeti s jodem, tím pádem buňka pod mikroskopem je modrá. Gramnegativní buňky mají složitější stavbu stěny, i když je tenčí (15 nm). Obsahuje periplasmatický prostor, poriny a lipopolysacharidy. [4]



Obrázek 3: Stavba stěny grampozitivní bakterie, převzato a upraveno z [23]

1. Cytoplazmatická membrána
2. Peptidoglykan
3. Fosfolipidy
4. Membránové proteiny
5. Kyselina lipoteichová

Klostridia jsou pohyblivá díky zvlněným vláknitým útvarům, kterým říkáme bičíky. U bičků rozeznáváme vlákno, kolénko a bazální tělísko. Vlákno je tvořeno podjednotkami bílkoviny flagelinu. Podjednotky flagelinu jsou poskládány spirálovitě s dutým centrem vlákna. Směr bičku mění kolénko až o 90 ° a bazální tělísko, sloužící jako stator, se skládá z prstenců. Klostridia mají po celém svém povrchu bičíky. [4]



Obrázek 4: Stavba bičiku u gramnegativních (a) a grampozitivních (b) bakterií, převzato z [24]

### 1.3 Výskyt

Většina bakterií z rodu *Clostridium* se vyskytují jako neškodní saprofyty. Jen některá klostridia jsou patogenní pro člověka, mohou způsobovat choroby jako je kolitida a průjem, botulismus či tetanus. Saprofyty jsou organismy, které pro svůj život využívají hnilobné procesy jiného organismu. Hnilobné procesy jsou anaerobní, což jsou vhodné podmínky pro život bakterií rodu *Clostridium*. Schopnost klostridií tvořit spory je důležitá pro jejich přežívání ve velmi nepříznivých podmínkách a tím dochází k velkému rozšíření v přírodě. Do nepříznivých podmínek můžeme zahrnout teplotu, chemické látky, vyschnutí nebo záření. [2, 7]

Spory se nacházejí v prachu, ve vodě, v půdě ale také je můžeme najít v kontaminovaných potravinách. [2]



## 1.4 Fyziologie a růst

Nižší redoxní potenciál, přibližně – 100 mV, je velmi podstatný pro růst klostridií. Poskytuje správné fungování enzymů, které se podílí na oxidačně-redukčních procesech v buňce. Proto se ke kultivaci používají půdy obohacené o redukující látky jako je například cystein, glukosa a vitamín K. Právě Wilkinsův-Chalgrenův agar využívající se ke kultivaci klostridií je obohacen o vitamín K. Většinu patogenních bakterií pro člověka z rodu *Clostridium*, ale můžeme kultivovat i na klasickém krevním agaru v anaerobním prostředí. [2]

*Clostridium haemolyticum* je velmi citlivé ke kyslíku, snese pouze 0,5% koncentraci. Méně citlivé je *C. perfringens*, které snese až 5 % kyslíku v prostředí. Základem citlivosti bakterií z rodu *Clostridium* je fakt, že nemají cytochromy, katalázu a většinou žádnou peroxidázu. Peroxidázu má *C. perfringens*, ale málo funkční. Díky tomu může nastat rozpad vzniklých peroxidů a superoxidů, a následně tím dojde k otrávení buňky. Přechodné produkty vzniklé reakcí mezi prostředím a kyslíkem mohou také poškodit buňky klostridií. [8]

Redukované prostředí, se záporným oxidoredukčním potenciálem, dovoluje bakteriím z rodu *Clostridium* se rozmnožit i při vyšším množství kyslíku v okolí. Enzymy s dvojmocným železem, takzvané feredoxiny, využívají klostridia při svých oxidoredukčních procesech. Začínají pracovat až při záporném oxidoredukčním potenciálu v prostředí, rozmezí -100 až -200 mV, a rozmnožování klostridií začíná při dosažení zmíněného rozmezí. [8]

Energii získávají anaerobní glykolýzou neboli jinak řečeno fermentačními procesy. Klostridia mají hojnou enzymatickou výbavu umožňující většině bakterií tohoto rodu kvasit sacharidy nebo rozkládat proteiny. Na základě jejich metabolismu je můžeme rozdělit na druhy rozkládající bílkoviny, druhy schopné využívat bílkoviny i sacharidy, druhy štěpící jenom sacharidy a druhy schopné využívat puriny a pyrimidiny. Zkombinováním výše uvedených druhů vzniknou 4 skupiny klostridií. Do 5. skupiny řadíme druhy množící se na kultivačních půdách obsahující purin nebo pyrimidin. Klostridia mají velmi pestré biochemické procesy. Mezi produkty metabolismu zařazujeme plyny, alkoholy, indol, organické kyseliny, popřípadě skatol a enzymy. Některé produkty se využívají diagnosticky

v takzvaných pestrých řadách, ale například alkoholy se obvykle stanovují plynovou chromatografií. Chromatogramy některých druhů jsou velmi podstatné pro určení diagnózy. [2,8]

## 1.5 Patogeneze a patogenita

Jen některé druhy z rodu *Clostridium* jsou schopné vyvolat nemoci u člověka. Patogenní klostridia pro člověka jsou např. *C. tetani*, *C. perfringens*, *C. difficile* a *C. botulinum*. Mohou způsobit kolitidy a průjmy, botulismus, tetanus, otravy jídlem a myonekrózu. Nemoci jsou způsobené jejich schopností přežít v nepříznivých životních podmínkách. Jak už jsem zmínila v předchozích odstavcích, klostridia se rozdělují podle produkce toxinu, mechanismus účinku a efektu na cílové orgány na klostridia enterotoxická a cytotoxická, neurotoxická, enterotoxická a histotoxická. [1, 2, 9]

Mezi enterotoxická klostridia patří *C. perfringens*, které způsobuje otravy jídlem spojené s masnými výrobky udržovány při teplotách mezi 5 – 60 °C. Mohou také způsobit infekce měkkých tkání. *C. difficile* se řadí mezi enterotoxická a cytotoxická klostridia, způsobující nozokomiální průjmy, které mohou vést až ke smrti. Průjmy se objevují 5 – 10 dní po zahájení léčby antibiotiky. Také způsobuje pseudomembránózní kolitidu. Kolitida je závažné onemocnění, při kterém pacient trpí silnými křečemi v břiše, horečkou, průjmy a ulcerací střešní sliznice. Do neurotoxických klostridií patří *C. tetani* a *C. botulinum*. Oba dva tyto patogeny u člověka způsobují závažná onemocnění. *Clostridium tetani* vyvolává onemocnění zvané tetanus projevující se tonickými křečemi a ztrátou koordinace pohybu. *C. botulinum* způsobuje botulismus, který se projevuje bloádou parasympatiku a paralýzou příčně pruhovaných svalů. *C. perfringens*, *C. septicum*, *C. novyi* a *C. histolyticum* patří mezi histotoxická klostridia, která způsobují infekce měkkých tkání (např. plynatá sněť), enterotoxikózy a nekrotizující enteritidu. [1, 9]

Hlavním faktorem v patogenезi je tvorba toxinů, hlavně se jedná o toxiny letální a klasické nekrotizující. Dalšími faktory podílející se na patogenезi jsou proteinázy, DNáza, hemoliziny, hyaluronidázy, jiné lecithinázy c. Dále se procesu účastní také produkty metabolismu například histamin, sirovodík, čpavek a serotonin. Určité druhy klostridií, jako je *C. perfringens* a *C. septicum*, mají schopnost rychle pronikat do krevního oběhu a tkání a vyvolávat sepsi. Převážně je invazivita omezená až nulová. [8]

## 1.6 Toxiny

Z exoproduktů bakterií rodu *Clostridium* jsou nejpodstatnější jejich toxiny a látky s nimi synergicky působící. K jejich tvorbě dochází přímo v bakterii. Toxiny vznikají dvěma způsoby. Do okolí se uvolňují buď při rozmnožování kmene (toxin alfa *C. perfringens*), nebo při rozpadu buňky (např. toxiny *C. difficile*). Toxiny se mohou vyskytovat i ve sporách. Molekuly toxinu s letálním účinkem se označují jako hlavní toxiny neboli alfa toxiny. Letální toxin má současně účinek jak nekrotizační tak i hemolytický. Množství toxinu stanovujeme v minimálních dávkách, které jsou schopné vyvolat stanovený efekt jako je například smrt (minimální letální dávka – DLM) či nekróza určité velikosti (minimální nekrotizační dávka – DMN). Mezinárodní antitoxické jednotky (UA) používáme u velmi efektivních toxinů, jako jsou neurotoxiny *C. tetani* a *C. botulinum*. [8]

Exotoxiny mají bílkovinný nebo polypeptidický charakter. Při vpravení exotoxinů parentální cestou do organismu, na ně začne naše tělo reagovat tvorbou protilátky – antitoxinu. Formule můžeme některé toxiny polymerizovat v imunogenní toxoidy. Jediný toxoid, který se používá je toxoid *C. tetani* k předcházení tetanu. [8]

## 1.7 Epidemiologie

Klostridiové toxoinfekce mají endogenní nebo exogenní původ. Mezi exogenní příčiny patří například úrazy v přírodě, kdy se do rány dostanou pomocí prachu a nečistot z okolí spory klostridií. Do endogenních původců zařazujeme spory v potravinách, které zkonzumujeme, mohou být ve formě spor či už toxinů. Ale také zde patří mikroflóra tlustého střeva, občas z vagíny nebo žlučníku. Plynaté sněti a sepse při poškození střev jsou výsledkem endogenních původců. [8]

Autoinfekce je neobvyklým stavem endogenní infekce. Mluvíme o infekci způsobenou kontaminací při operaci, kdy se do rány z kůže dostanou spory *C. perfringens*, které infikovali folikuly. Jedná se o nozokomiální toxoinfekci. Říká se, že čím blíže operujeme k řitnímu otvoru, tím je výskyt spor *C. perfringens* vyšší. [8]

## 2 CLOSTRIDIUM DIFFICILE

*C. difficile* se vyskytuje ve střevě přibližně u 5 % zdravých jedinců. Původ infekce může být endogenní nebo exogenní. Endogenní infekce vzniká po podání antibiotik, především cefalosporinů, širokospektrálního penicilinu a klindamycinu, kdy dojde ke změně fyziologické mikroflóry. Antibiotika svým účinkem eliminují střevní mikroflóru a *C. difficile*, které je velmi rezistentní se přemnoží, a poškozuje střevní sliznici. Exogenní infekce jsou způsobené spory, které jsou velmi odolné a mohou kontaminovat nemocniční prostředí. *C. difficile* způsobuje nejčastěji infekce, které jsou spojené se změnou střevní mikroflóry, ale způsobuje i poruchu střevní imunity a celkovou imobilitu pacienta. Kojenci mají v gastrointestinálním traktu vyšší výskyt *C. difficile* než dospělí jedinci. U dětí tento výskyt nesouvisí s klinickým onemocněním. K šíření v komunitě dochází pomocí domácích zvířat a je možné, že i některé masné produkty mohou být prostředkem pro přenos. Určité ribotypy *C. difficile* mají hypervirulentní charakter díky kterému se mohou šířit ve zdravotnických zařízeních. Patří mezi ně například ribotyp 027. Zjistilo se, že produkuje větší množství toxinů A a B než ostatní nemocniční kmeny. Způsobuje těžké průjemy. [2, 7, 10]

### 2.1 Morfologie

Jedná se o grampozitivní sporulující anaerobní tyčinky, které mají variabilní velikost buněk. Buňky ve vegetativní formě jsou menší, dosahující rozměrů  $0,6 \times 4-6 \mu\text{m}$ , nebo velké  $1,2-1,6 \times 6-16 \mu\text{m}$ . Dochází k volné tvorbě spor in vivo a v kultuře, ačkoliv buňky ve vegetativní formě (bez spor) umírají rychle v prostředí, kde je kyslík. Spory *C. difficile* jsou velmi odolné vůči vysokým teplotám. [1, 2, 9]

*C. difficile* masivně sporuluje ve střevech, ale in vitro už není sporulace tak vydatná, proto pro její navýšení přidáváme do kultivačních půd žloutky a žlučové soli. Kolonie klostridia mají okrouhlý tvar. *C. difficile* je rezistentní k cefoxitinu a velké množství kmenů i ke klindamycinu na rozdíl od ostatních druhů klostridií. K vankomycinu je velmi citlivé. [8]

### 2.2 Kultivace a diagnostika

Kultivace *C. difficile* je poměrně náročná, jak časově, tak i provedením. Vyžaduje pouze anaerobní prostředí. Pro snazší kultivaci se používají selektivní půdy, které obsahují

antibiotika. Určují se jak toxigenní, tak i netoxigenní kmeny. Vždy se musí doplnit test na průkaz toxinu. [11, 12]

Pro diagnostiku je určeno několik molekulárně-genetických a mikrobiologických testů. V praxi se využívá jen určitá část testů. Důležité je také správné odebrání vzorku a jeho skladování. Stolice se nesmí skladovat déle než 24 hodin. Toxiny ve stolici jsou totiž bílkovinné povahy a mohly by denaturovat. Výsledek by tím pádem mohl vyjít falešně negativní. V laboratoři se nejvíce používají enzymové immuno-assay metody na průkaz toxinu A a B. Výhodou této metody je rychlost, nízká cena a vysoká specifita. Nevýhodou je relativně nízká senzitivita. [12]

### **2.2.1 Enzym glutamátdehydrogenáza**

Jedná se o specifický marker pro *C. difficile*. Dříve se stanovoval latex-aglutinačním testem, který měl nízkou senzitivitu, nyní EIA testy mají lepší senzitivitu a specifitu. [12]

### **2.2.2 PCR metoda**

Metodou PCR se stanovují geny pro toxiny A a B ze vzorku stolice či v buněčné kultuře. Nevýhodou této metody je vyšší cena a odborná náročnost. Tato metoda se spíše používá ve výzkumu. [12]

## **Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)**

Jedná se o nově vyvinutou metodu genové amplifikace kombinující jednoduchost, rychlost a vysokou specifičnost. Při LAMP reakci jsou dané geny amplifikovány při stálé teplotě opakovaní dvou typů elongačních reakcí. Na základě této metody se vyvinulo několik testů, kdy je jednoduchost zachována ve všech krocích od extrakce nukleových kyselin až po detekci amplifikace. Reakce LAMP má širokou škálu využití. [13]

Při LAMP reakci využíváme genovou amplifikaci, která opakuje dva typy elongačních reakcí. Elongační reakce probíhá přes smyčkové oblasti. Při této reakci se používá dvojice vnitřních a vnějších primerů. Každý z vnitřních primerů má sekvenci doplňující jeden řetězec amplifikační oblasti na 3' konci a je totožná s vnitřní částí stejného řetězce na 5' konci. Při elongaci syntetizuje se nové vlákno DNA pomocí DNA polymerázy. Tato metoda funguje na základním principu výroby velkého množství produktů amplifikací DNA. [13]

### 2.2.3 Cytotoxinová assay

Metoda je založena na přidání stolice do buněčné kultury fibroblastů. Sleduje se cytotoxický efekt toxinu. Nevýhodou je vyšší cena a vyšší časová náročnost. [12]

## 2.3 Klinický obraz

Klostridiová kolitida nejčastěji vzniká jako následek předešlé antibiotické léčby a projevuje se většinou jako akutní průjemové onemocnění. Označujeme ji jako CDI - *Clostridium difficile* infection. Vzniká zejména po aminopenicilínech, fluorochinolonech a cefalosporínech všech generací. Nezáleží na síle antibiotik, protože všechna antibiotika narušují přirozenou mikroflóru střeva. Vznik CDI je několik dní až týdnů. Může se projevit už během antibiotické léčby nebo až 3 měsíce po jejím konci. CDI probíhá buď asymptomaticky, nebo jako nekomplikovaná kolitida. Může dojít ke zvratu, kdy dojde až k pseudomembránovní kolitidě. [14, 15]

Těžké formy kolitidy jsou doprovázené meteorismem, bolestmi břicha a progresivním oslabováním peristaltiky střev vedoucí až k rozvoji ileu. Horečka a zvracení se pokaždé nevyskytují, onemocnění může probíhat i bez nich. Průjmy jsou četné, občas páchnoucí, většinou nejsou silné a objemné. Laboratorně prokazujeme lehce zvýšenou hladinu C-reaktivního proteinu s výraznou leukocytózou. [15]

Nejtěžší formou kolitidy je toxické megakolon, při kterém dochází k rozvoji paralytického ileu a nadměrné dilataci kliček tlustého střeva, následně i tenkého. Velmi ohrožuje život pacienta. Smrtnost je 30–50 %. [15]

K rekurencím dochází většinou do dvou měsíců od předešlé ataky. Vyskytly se i případy, kdy pacient jich měl více než dvacet. Pacienti s rekurencemi jsou ohroženi minerálovým rozvratem, malnutricí, dehydratací a celkovou slabostí. Opakované ataky nemocného velmi vyčerpávají, obzvláště pokud se jedná o polymorbidní nebo starší jedince. Rekurence jsou druhou významnou příčinou úmrtí na klostridiovou infekci. [15]

### 2.3.1 Klostridiová kolitida

Toxigenní kmeny bakterie *C. difficile* jsou původcem kolitidy. Jedná se o akutní infekční onemocnění, které zahrnujeme do skupiny střevních infekcí. Přenos probíhá orálně-fekálně. Závažnost kolitidy je různá. Může dojít až k ohrožení pacienta na životě.

Rekurentní kolitida je jiný projev onemocnění, kdy pacient trpí opakovanými průjmy, které ho oslabují jak fyzicky, tak i psychicky. [12, 14, 15]

### 2.3.2 Pseudomembrázní kolitida

Onemocnění, při kterém na stěně tračníku dochází ke vzniku charakteristických pablán. Pablány jsou viditelné pouhým okem při operaci, můžeme je prokázat endoskopickým vyšetřením. Závažnými komplikacemi jsou šok a toxické megakolon s paralytickým ileem. [14, 15, 16]



Obrázek 5: Střevní sliznice s pseudomembrázní kolitidou, převzato z [25]



Obrázek 6: Endoskopický pohled na pseudomembrázní kolitidu, převzato z [25]

### 2.3.3 Post-antibiotická kolitida

Jedná se o střevní dysmikrobii, která vznikla následkem užívání antibiotik. *C. difficile* je sice častým původcem zmíněného typu kolitidy, ale není jediný, který je schopný vyvolat tento typ. Například kvasinky rodu *Candida* mohou vyvolat obdobný klinický obraz. [15]

## 2.4 Patogenita a patogeneze

*C. difficile* vytváří dva proteinové toxiny, které jsou termolabilní. Po rozpadu buňky se dostávají do prostředí. Toxiny nazýváme Toxin A a Toxin B. Toxin A je enterotoxin vyvolávající vodnaté, občas málo hemoragické průjmy. Poškozuje střevní stěnu, která pak není schopná vstřebávat vodu. Způsobuje chemotaxi a tím pádem i zánět střevní stěny. Toxin B patří mezi nekrotizující cytotoxiny. Ničí buňky sliznice, kdy následně vznikají pseudomembrány a ulcerace. Působením současně obou toxinů vzniká enterokolitida. Existuje i binární toxin, ale jeho význam doposud není objasněn. Nacházíme ho u kmenů, který způsobují těžké infekce. [1, 8]

Toxin B působí na vegetativní nervy a hladkou svalovinu v tračníku. Způsobí zástavu střevní peristaltiky a rozvoj ileu. Ileus podporuje růst a množení mikrobů. Postupně dochází ke ztrátě bariérové funkce střevní sliznice a bakterie ve střevech mohou pronikat do hlubších tkání. Rychle nastane sepse s vysokou smrtností. [14]

## 2.5 Terapie a prevence

Léčba CDI je individuální, postup je hlavně založen na vážnosti kolitidy a počtu rekurencí. Ohled ale musíme také brát na věk a přítomné komorbidity pacienta. Ataka je v dnešní době definovaná jako klinický obraz průjmového onemocnění, kdy dotyčný má tři a více řídkých stolic během 24 hodin, nález toxického megakolon nebo ileózního stavu. Nově při nález toxigenního kmene klostridií je vyžadováno vyloučení zaměnitelných příčin průjmů. Aktuálně experti vytvářejí nový oficiální doporučený postup pro léčbu CDI. [15, 17]

Antibiotická léčba vedoucí ke vzniku CDI se ukončuje, pokud je to přípustné. Specifická terapie proti *C. difficile* se nemusí podávat, jedná-li se o lehkou formu CDI. Toto opatření může způsobit úzdravu. Pokud nelze zastavit antibiotickou léčbu, nahrazují se



používaná antibiotika jiným lékem s nižším potenciálem vzniku CDI a užším spektrem účinku. [15]

Nemocný pacient má kolitickou dietu a je rehydratován. Dieta musí být nedráždivá a nenadýmavá. Při těžké formě CDI je pacientovi nařízena parenterální výživa. Spasmolytika a opiáty, což jsou léky tlumící střevní peristaltiku, jsou eliminovány. Po podání těchto léků hrozí vznik toxického megakolon se zástavou peristaltiky střev a perforace střeva. Léky na ztlumení žaludeční acidity vedou ke vzniku CDI. V České republice jsou evidovány tři přípravky CDI k léčbě – vankomycin, metronidazol a fidaxomicin. [15, 17]

### **2.5.1 Metronidazol**

Působí na velkou část anaerobních bakterií. Při CDI se jako jediný může užívat orálně ale i parenterálně. Antibiotikum je levné a běžné používané. Nevýhodou tohoto antibiotika je nižší účinnost, než má fidaxomicin a vankomycin. Účinnost se projevuje opožděným nástupem uzdravení, ale také zvýšenou možností léčebného selhání. [15]

### **2.5.2 Vankomycin**

Lék, který se hlavně využívá pro léčbu těžkých infekcích způsobených grampozitivními bakteriemi. Gastrointestinální trakt neumí vstřebat vankomycin, a proto tedy není spojován s orgánovou toxicitou. Tabletové přípravky s vankomycinem v České republice nejsou evidovány. Lék se připravuje rozpuštěním 500 mg prášku v 20 ml vody na injekci. Lék je vyráběn přímo na oddělení. Pacient vzniklý roztok vypije ve čtyřech dávkách po šesti hodinách. [15]

### **2.5.3 Fidaxomicin**

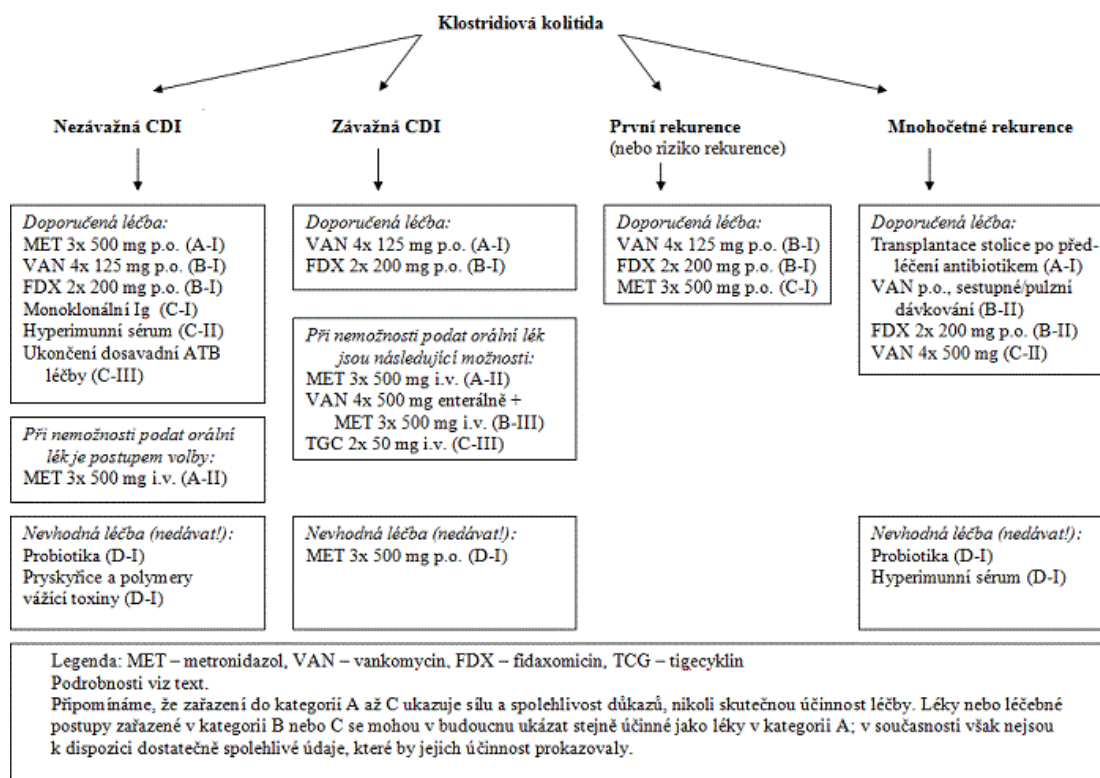
Je registrovaný pouze pro léčbu CDI. Je nejnovější a má úzké spektrum. Gastrointestinální trakt ho nevstřebává a tím pádem nemá žádné systémové nežádoucí účinky. Fidaxomicin tlumí tvorbu proteinů na ribozomech a tím dojde k zastavení tvorbě toxinů. Jeho účinek je rychlejší než účinek vankomycinu a metronidazolu. Podává se jedna tabletu, obsahující 200 mg po 12 hodinách. [15]

Tabulka 1: Přehled antibiotik rizikových z indukce klostridiové kolitidy [17]

<i>Bezpečné</i>	<i>Rizikové</i>	<i>Vysoce rizikové</i>
Metronidazol Aminoglykosidy Tetracykliny	Cotrimoxazol Makrolidy Ostatní peniciliny	Cefalosporiny Fluorochinolony Ampicilin/amoxicilin

#### 2.5.4 Fekální bakterioterapie – „transplantace stolice“

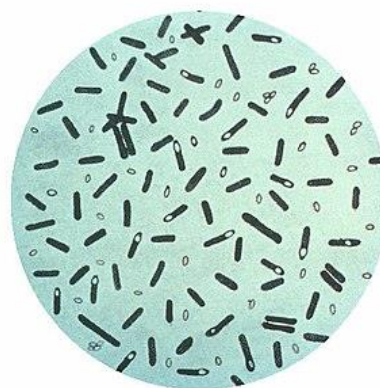
Ve čtvrtém století se v Číně ústně podávala stolice v kašovitě formě při silných průjmech. Později v šestnáctém století se používala žlutá polévka (voda se stolicí) při léčení nejrůznějších střevních onemocnění. V roce 1958 proběhla první léčba pseudomembranózní kolitidy fekálními klystýry, která byla úspěšná. Několik klinických studií ukázalo, že transplantace stolice je nejúčinnější léčba. Ukázaly, že pouhou transplantací stolice lze vyléčit smrtelné onemocnění. Přes nasojejunální sondu nebo klystýrem podáváme 30–500 g fekální kaše. Dárci se musí podrobit přísnému vyšetření na přítomnost patogenů a kontroluje se, zda nemají v chorobopisu používání antibiotik a potíže s průjmy. Před začátkem transplantace stolice je pacient léčen vankomycinem 10–14 dní. Také podáváme inhibitor protonové pumpy večer a ráno před transplantací. [15, 18]



Obrázek 7: Terapeutické možnosti CDI, převzato z [15]

### 3 CLOSTRIDIUM BOTULINUM

Jedná se o druh, který obsahuje nejméně čtyři biologicky odlišné skupiny. Produkuje neurotoxin, který má stejné fyziologické vlastnosti, ale antigenně se liší. Antigenní typy jsou A–G. Obvykle se vyskytují ve střevech u zvířat, kdy se právě *C. botulinum* šíří přes jejich výkaly do vody a půdy. Toto klostridium vytváří jednu z nejtoxičtějších látek a tou je botulotoxin. Jinak se mu říká „klobásový jed“.  
[1, 6, 8]



Obrázek 8: *Clostridium botulinum*, převzato z [26]

Do první skupiny se zahrnují proteolytické kmeny tvořící botulotoxin typu A, B a F. Také se zde zařazuje *Clostridium sporogenes*. Ve druhé skupině jsou zařazeny sacharolytické kmeny produkující botulotoxiny typu E, B a F. Třetí skupinu tvoří kmeny, které produkují nekrotizující a letální toxin. Zde jsou uvedeny botulotoxiny typu C, D a *C. novyi*. Ve čtvrté skupině je zařazeno proteolytické klostridium a tím je *Clostridium subterminale*, které produkuje botulotoxin typu G. [8]

#### 3.1 Morfologie

*C. botulinum* je typická klostridiová tyčinka, která je grampozitivní. Tyčinky jsou rovné, pohyblivé, dlouhé deset a více mikrometrů a široké něco málo přes jeden mikrometr. Spory *C. botulinum* jsou velmi odolné, přežijí totiž i několika hodinový var. Jsou subterminálně uloženy a oválné. Podle glykoproteinového antigenu je rozděleno do skupin. Typ A má mírně zahnuté tenké tyčinky, zatímco typy E a G mají robustní tyčinky. [1, 6, 8]

#### 3.2 Kultivace

*C. botulinum* na krevním agaru za anaerobních podmínek vytváří bělavé, kruhové kolonie s nepravidelnými okraji. Kolem kolonií se vyskytuje  $\beta$  – hemolýza. [1, 2, 8]

#### 3.3 Klinický obraz

Při alimentární formě botulismu mají pacienti zesláblý organismus, závratě se mohou vyskytnout do tří dnů. Dochází k rozmazanému dvojitému vidění (diplopie), rozšířeným zorničkám, suchu v ústech, průjmům nebo zácpám. Také se dochází k těžšímu polykání

a poruchám artikulace. Vyskytuje se vyčerpání a únava. Bez výskytu horečky. K úplné úpravě dochází do 6-8 měsíců u pacientů, kteří přežili botulismus. [2, 3]

Čím je inkubace kratší, tím je průběh botulismu těžší a prognóza horší. Otrava může být mírná, příznaky nemusí být klinicky vyjádřené. V případě těžké formy botulismu nemocný do 24 hodin umírá. Kmeny typu A většinou způsobují těžší průběh onemocnění než kmeny typu B. [2]

### **3.4 Diagnostika**

Prokazuje se aktivita toxinu ve vzorku, kterým může být stolice nebo sérum, a v kontaminované potravě. Základní metodou je neutralizace toxinu antitoxinem a průkaz na zvířeti. V dnešní době jsou novější přístroje jako je MALDI – TOF MS, které pomáhají zviditelnovat substrát a jeho štěpné produkty. Metody jsou založené na štěpení substrátu toxinem. MALDI – TOF MS umožňuje přesnou typizaci toxinu. [7]

### **3.5 Patogenita**

Botulotoxin je zodpovědný za vznik onemocnění. Jedná se o takzvaný A-B toxin. Toxin se skládá z několika podjednotek a vlastního toxinu. Cílový protein v buňce je proteolyticky štěpen a následně dojde k utlumení uvolňování acetylcholinu. Tím nastane inhibice přenosu vzruchu na nervosvalové ploténce. Vznikají chabé parézy a paralýzy nervového systému a gastrointestinálního systému. Jako první jsou zasaženy kraniální nervy s příznaky diplopie a chabé svalové paralýzy postupují směrem dolů. Pro člověka je smrtelná dávka botulotoxinu zhruba 0,6 nanogramů. [6, 7]

### **3.6 Terapie a prevence**

Léčba botulismu je založena na poskytnutí polyvalentního antitoxického koňského séra. Penicilin G se podává u traumatického botulismu a ošetřuje se kontaminovaná rána. Dětem penicilin G se nepodává. Prevencí botulismu je čtvrt hodinový var při přípravě nebo správná sterilizace při výrobě. [6, 7]

### **3.7 Epidemiologie**

*C. botulinum* se běžně vyskytuje ve vodě a v půdě po celém světě. Kmeny typu A se nachází hlavně v neutrální nebo v alkalické půdě. Kontaminují především zeleninu a ovoce.

Kmeny typu B se nacházejí zejména v bohaté organické půdě a kontaminují hlavně masové výrobky. Typ E se vyskytuje jenom ve vlhké půdě a je příčinou otrav rybím masem. [2, 3]

### 3.8 Botulismus

Onemocnění je způsobeno snížením množství uvolněného acetylcholinu. Paralýza příčně pruhovaných svalů a blokáda parasymptiku jsou hlavní symptomy botulismu. Vzniká působením botulotoxinu blokující uvolnění acetylcholinu. Blokování vede k inhibici nervového vzruchu. Uměle vytvořený botulotoxin se používá k léčbě spasticity a mimovolních pohybů. Toxin je složený ze dvou bílkovinných řetězců H a L. L řetězec hydrolyzuje proteiny v neuronu určené k transportu vezikul. Tím pádem nemůže dojít k uvolnění acetylcholinu. H řetězec má za úkol navázání se na neuron. Inkubace trvá hodinu až dny. Po inkubaci nastávají gastrointestinální příznaky, jako jsou průjemy, nauzea ale i zácpy. Nemocný má i suché sliznice a profuzně se potí. Následují nervové poruchy, paréz okohybných svalů a smíšený nervový systém. U botulismu se teploty nevyskytují a likvor je fyziologický. Pokud dojde k postižení centra srdeční činnosti a dechu nastává smrt. Botulismus se diagnostikuje EMG vyšetřením a průkazem toxinu v séru. Prognóza u pacientů, kteří porazí botulismus je příznivá. Parézy se léčí až několik měsíců. Úmrtnost je až 20 %. [1, 19]

Botulismus má tři formy – alimentární, kojeneckou a traumatickou. Nejčastější formou je alimentární forma. Je způsobena požitím infikovaného jídla botulotoxinem. Na začátku onemocnění se zřídka vyskytují gastrointestinální příznaky. Nevyskytuje se zvýšená teplota. Typické pro tuto formu je postižení parasymptického nervového systému, hlavových nervů a paralýza příčně pruhovaných svalů. Inkubační doba je přibližně 12–72 hodin. Příčinou smrti je udušení díky obrně dýchacích svalů. Úmrtnost je až 7,5 %. U kojenecké formy proniká do střeva *C. botulinum*, ve kterém se množí a tvoří toxin. Traumatická forma nastává u kontaminace sporami z injekční jehly u drogově závislých a sporami z hlíny. Zde je inkubační doba delší než u alimentární formy, protože toxin je tvořen klíčovými sporami v ráně. Inkubace je 4–14dnů. [1]

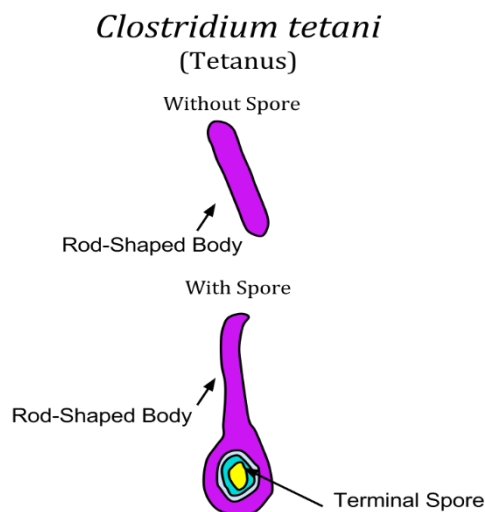


Obrázek 9: Infekce *Clostridium botulinum*

vpravo – mydriáza, vlevo – ptóza víček, převzato z [27]

## 4 CLOSTRIDIUM TETANI

Jedná se o původce tetanu, což je neuromuskulární onemocnění. *C. tetani* produkuje neurotoxin blokující uvolňování inhibičních neurotransmiterů. Následkem jsou křeče příčně pruhovaných svalů, kdy může dojít až ke smrti. [1]



Obrázek 10: *Clostridium tetani*

horní část obrázku – *C. tetani* bez spory, dolní část obrázku – *C. tetani* se sporou, převzato a upraveno z [28]

### 4.1 Morfologie

*C. tetani* je rovná, tenká a velká (0,5-2 x 2-18  $\mu\text{m}$ ) tyčinka, která je pohyblivá. Tvoří spory terminálně uložené, které určují vzhled tyčinky, ta svým tvarem připomíná paličku na buben. Spory *C. tetani* jsou velmi odolné a schopny přežít desítky let. Vyskytují se jako saprofyty ve střevech některých savců, hlavně koní. Přes jejich výkaly se mohou dostat do půdy. Bičíky, díky kterým je bakterie pohyblivá jsou peritrichálně uložené. Bakterie jsou proteolytické, ale nejsou schopny fermentovat sacharidy. [1, 3]

### 4.2 Kultivace

*C. tetani* je extrémně citlivé na kyslík, a proto je jeho kultivace obtížná. Roste na obohaceném krevním agaru za dodržených anaerobních podmínek. Oproti ostatním druhům klostridií je vidět pouze slabá hemolýza a po celém povrchu agaru je tenký povlak. Plazivý růst je dán pohyblivostí bakterie. [1]

### **4.3 Klinický obraz a patogeneze**

Nejčastěji dochází k nákaze kontaminací poraněné tkáně sporami *C. tetani*. Bakterie jako taková má minimální invazivitu, ale příznaky tetanu způsobuje účinný toxin. Toxin se vstřebává z rány do krve a lymfy. Skládá se ze tří složek. Tetanospasmin, tetanolysin, což je podobná látka streptolysinu O, a třetí složkou je enzym reninového účinku. Hlavní složkou je tetanospasmin (neurotoxin). Váže se na specifické gangliosidy vyskytující se na povrchu buněk a podél nervových vláken pokračuje do centrální nervové soustavy. Blokuje uvolňování inhibičních neurotransmiterů a tím způsobuje výrazné svalové křeče. Inkubační doba je 3-21 dní, při kratší inkubační době je horší prognóza u onemocnění. [8, 20]

### **4.4 Diagnostika**

Diagnostika se provádí na základě klinického obrazu. Mikrobiologické vyšetření vzorku se provádí z materiálu získaného z místa rány. Mikroskopická detekce je užitečná, ale často neúspěšná. Pozitivní výsledky u kultivace jsou přibližně jenom u 30 %. Onemocnění může být způsobené i malým množstvím bakterií. Pomalu rostoucí bakterie jsou rychle usmrceny v přítomnosti kyslíku, s tím souvisí i obtížná diagnostika. [1, 3]

### **4.5 Terapie a prevence**

Při příchodu pacienta s rizikovou ránou se zjišťuje, kdy naposled byl očkovaný proti tetanu. Jestliže nebyl naočkovaný, podává se jedna očkovací dávka. Dále se zvažuje nutnost podání antitetanického imunoglobulinu, který dočasně chrání proti nenavázanému toxinu. Podává se u pacientů, kteří nikdy nebyli očkováni. Rány kontaminované půdou či cizími předměty, popáleniny, pokousání zvířetem, poranění oblasti krku a hlavy jsou nejvíce rizikové. Pro dekontaminaci rány a eliminaci vegetativních bakterií používáme penicilin G a metronidazol. Ošetření rány je podstatnou součástí léčby. [1]

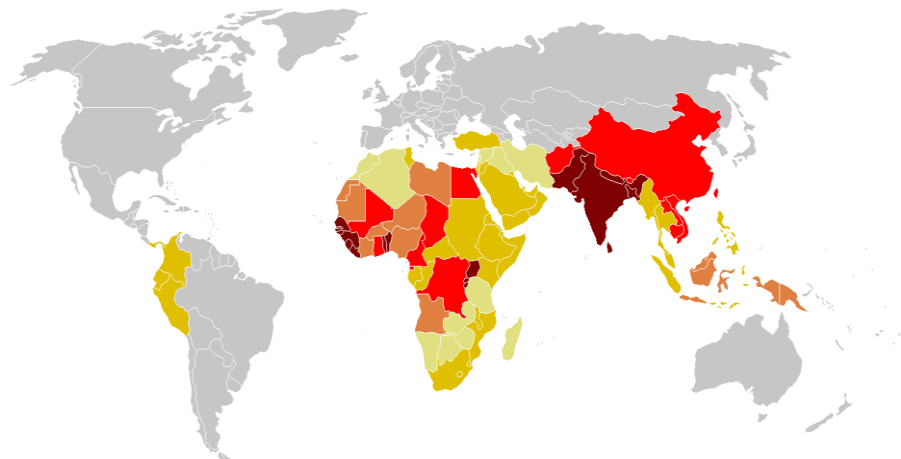
Do povinného očkování dětí patří právě i očkování proti tetanu. Je součástí trivakcíny a i hexavakcíny. Toxoid je typem vakcinační látky. Přeočkovávat se začíná v 25 letech a následně každých 10-15 let. Někdy v mimořádných případech při ošetření ran. [1]

### **4.6 Epidemiologie**

Spory *C. tetani* jsou všudypřítomné. Vyskytuje se jako saprofyt střevní mikroflóry savců, hlavně u koní. Přes výkaly se dostává do půdy prostřednictvím spor, které



kontaminují ránu. V půdě přežívají několik desítek let. Endogenní zdroje jsou střevo a vagína člověka. Díky očkování je minimální výskyt tetanu v České republice. Jedinci vyššího věku se sníženou imunitou jsou více ohroženi. [2, 3]



Obrázek 11: Celosvětově hlášené případy tetanu v letech 1990-2004, rozmezí je od velmi běžného (tmavočerveně) po velmi vzácné případy (světle žlutá), převzato z [29]

#### 4.7 Tetanus (Strnutí šíje)

Jedná se o rannou infekci způsobenou neurotoxinem. Projevuje se křečemi, zvýšeným napětím kosterních svalů a poruchami vegetativní regulace. Původcem infekce je *C. tetani*. Spory klostridia se dostanou přes kontaminovanou půdu nebo přes kontaminované cizí těleso do rány. V ráně se bakterie množí a produkuje toxiny - tetanospasmin, který odpovídá za vznik spasmu a poruchu vegetativního nervového systému. Neurotoxin působí především na míchu a mozkový kmen. Na synapsích blokuje uvolňování inhibičních neurotransmiterů. Dojde ke zvýšení alfa aktivity, která způsobuje křeče příčně pruhované svaloviny. Inkubační doba je 3-30 dnů. Zprvu se objeví parestézie a bolesti v ráně. Následně se objeví horečky, potí se, je febrilní a žíznivý. Dochází ke střídání bradykardie s tachykardií, tlak je nestabilní. Jedinec není schopný otevřít ústa, což nazýváme trismus. Postupně dochází k rozšiřování napětí i na další svalové skupiny. Risus sardonius neboli ironický úsměv jsou křeče obličejového svalstva. V zádech jedinec pociťuje bolestivé napětí. Později při infekci pacient trpí křečemi jícnu při pokusech o polknutí, křečemi zádových svalů, kdy pacient prohne trup do oblouku, a křečemi bránice nebo laryngospasmus se zástavou dechu. Izolace původce z rány je obtížná a málokdy úspěšná. Diagnózu tedy

stanovujeme podle klinického obrazu, chybějícího očkování a údajích o poranění. Smrtnost je 20-50 %. Následkem spasmu dýchacích svalů, arytmii a srdečního selhání může dojít ke smrti. Křeče jsou tak silné, že mohou být příčinou ruptury svalů a fraktury obratle. Pacienti se ukládají do klidného prostředí a monitorují se jejich vitální funkce. Základní léčbou je podávání metronidazolu a lidského hyperimunního globulinu. [21]



Obrázek 12: Tetanus u novorozence, převzato z [30]

## **5 KLOSTRIDIA ANAEROBNÍCH TRAUMATÓZ**

Klostridia anaerobních traumatóz se také nazývají histotoxická. Z označení „histotoxická“ vyplývá, že se jedná o bakterie ničící tkáň. Do této skupiny náleží *C. perfringens*, *C. novyi*, *C. histolyticum* a *C. septicum*. Toxiny těchto bakterií mají široké spektrum, stejně jako jejich účinky na tkáň. Letální toxiny mají traumatizující efekt odpovídající za infekce měkkých tkání, podkoží a kůže. Patří do skupiny infekcí ohrožujících na životě. [1]

### **5.1 Rozdělení ranných infekcí**

Klinické projevy infekcí mají široké spektrum. Příznaky začínají nevýznamnou kontaminací rány a přechází až po těžké anaerobní invazivní infekce. Při těžkých infekcích se mohou vyskytovat i nekrózy a může dojít k rozvinutí septicko-toxického šoku. [2]

#### **5.1.1 Infekce ran**

Jedná se o infekce, kdy se klostridia chovají jako běžné patogeny. Při těchto infekcích nedochází k invazi do měkkých tkání a nejsou projevy produkce toxinů. Avšak při vhodných podmínkách může infekce progredovat. [2]

#### **5.1.2 Hnisavé nekrotické infekce**

Klostridiové toxiny mají lokální účinek. Pokud dojde k postižení měkkých tkání mimo fascii, jedná se o epifasciální klostridiovou flegmónu. Při nekrotizující fasciitidě je fascie poškozená. Tvorba plynu probíhá mezi svaly a v podkoží. Příznaky jsou viditelné, ale mírné. [2]

#### **5.1.3 Závažné nekrotizující infekce**

Infekce jsou vysoce invazivní. Při těchto infekcích dochází k celkové intoxikaci (klostridiová celulitida) a k difusně šířící se nekróze. Může dojít k poškození stěny dutých orgánů snětí. [2]

### **5.2 Klinický obraz**

Příznaky u infekcí vyvolané *C. perfringens* se vyskytují poměrně brzy, většinou do 24 hodin. U *C. septicum* přibližně za 1-3 dny a u ostatních klostridií až později. V ráně se objevuje otok, bolest, zkalený exsudát a při palpaci je cítit krepitace bublin. Toxiny a rozkladné produkty způsobují těžkou alteraci, rozvíjí se septicko-toxický šok a poškozují

se orgány. Ke smrti může dojít i během několika hodin až dnů, protože proces je velmi rychlý. [2]

### **5.3 Diagnostika**

Základem úspěšné léčby je rychlá diagnóza. Diagnostika je založena na mikroskopickém vyšetření a kultivaci. Odebíráme exsudát, nekrotickou hmotu a občas výtěr z rány. U smíšených infekcí se nachází i další bakterie. [2]

### **5.4 Patogeneze**

Podstatné je anaerobní prostředí a nízký oxidačně-redukční potenciál. A proto jsou zhmožděné rány s nekrotickou tkání, hypoxií a s přítomností cizích těles ideálním prostředím pro vyklíčení spor. [2]

### **5.5 Terapie a prevence**

Při léčbě se musí stabilizovat celkový stav pacienta a podstatné je chirurgické ošetření. Obvykle se pacientům podávají antibiotika: peniciliny, metronidazol, linkosamidy. V prevenci je důležité právě to správné ošetření a vhodná péče o ránu. [2]

### **5.6 Epidemiologie**

Půda nebo kontaminované předměty jsou nejčastějším exogenním původcem. Exogenní původci jsou typické u válečných poranění a při dopravních úrazech. Endogenní původci jsou vlastní klostridia ze střeva pacienta. Rizikové jsou operace, poranění v oblasti břicha a dolních končetin v okolí rekta. [2]

### **5.7 *Clostridium perfringens***

Jedná se o grampozitivní sporulující anaerobní tyčinku. Je zařazeno do histotoxických klostridií. *C. perfringens* je nejčastějším zástupcem této skupiny. [1]

#### **5.7.1 Morfologie a vlastnosti**

Spory jsou oválné a subterminálně uložené. Tyčinka je nepohyblivá. *C. perfringens* je mnohdy součástí fyziologické mikroflóry. Bakterie je aerotolerantní. Vytváří proteolytické a sacharolytické enzymy. Velké množství plynů je produktem metabolismu. Vytváří klasický obraz plynaté sněti, kdy dochází k akumulaci plynu v měkkých tkání. Produkce jednoho nebo více letálních toxinů rozdělujeme do 5 typů (A až E). [1, 3, 6]

### 5.7.2 Kultivace

Kolonie *C. perfringens* jsou charakterizované rychlým, šířícím se růstem. Rostou v anaerobním prostředí. Nejlépe rostou za teploty 42 °C. Na krevním agaru vytváří dvojistou hemolýzu, kdy zevní zónu způsobuje lecitináza a vnitřní zónu hemolýzy vytváří oxygenlabilní hemolyzin. [1, 3, 6]

### 5.7.3 Patogenita

Toxiny jsou hlavním faktorem virulence. Podle produkce toxinů rozdělujeme bakterii na typy A až E. Nejčastějším patogenem je *C. perfringens* typu A. Mezi nejčastěji syntetizované toxiny patří toxin  $\alpha$ , toxin  $\beta$ , kolagenáza, hyaluronidáza, enterotoxin a oxygenlabilní hemolyzin. Nejvýznamnějším toxinem je toxin  $\alpha$  (lecitináza, fosfolipáza C). Může se vyskytovat u všech typů. Toxin  $\alpha$  je cytolytický faktor, který narušuje buněčné membrány. Když dojde k uplatnění patogenního efektu toxinu, následná léčba gangrény a myonekrózy má nejistý výsledek. Typy B a C produkují toxin  $\beta$ , který vyvolává nekrózu buněk. Kmeny A, B a D produkují enterotoxin. Do trávicího traktu se klostridie dostávají přes kontaminované jídlo a způsobují alteraci enterocytů. Enterotoxin je termolabilní, není schopen přežít vysoké teploty. [1]

### 5.7.4 Onemocnění a patogeneze

Infekce měkkých tkání jsou buď endogenního, nebo exogenního původu. Vznikají například při znečištění rány stolicí při operaci, nebo z vlastní fyziologické mikroflóry při ischemizujících procesech či invazivních chirurgických zásazích v oblasti tlustého střeva. Infekce histotoxickými klostridii se rozdělují podle invazivity kmene na neinvazivní bez účasti toxinů a invazivní infekce s účastí toxinů. Při neinvazivních infekcích se klostridia chovají jako pyogenní patogeny. Ve vyšetřovaném materiálu se k nim i přesto přistupuje jako k toxigennímu původci. Invazivní infekce buď celkově alterují stav, nebo působí jenom lokálně. Infekce se také rozdělují podle rozsahu a lokalizace. Patří sem celulitida, nekrotizující fasciitida a myonekróza až gangréna. Viditelná tvorba plynu v epifasciální tkáni a v kůži je celulitida. Myonekróza a gangréna jsou infekce hlubokých měkkých tkání. Dochází k produkci plynu, který rozvolňuje tkáň. Společně s enzymy pomáhají bakteriím k průniku a invazi. [1]



Obrázek 13: Gangréna, převzato z [32]



Obrázek 14: Nekrotizující fasciitida, převzato z [31]

Toxiny mají ireverzibilní účinek. Když se infekce začne šířit z primárního ložiska venózní cestou, mohou se účinky projevit i ve vzdálených místech organismu. Při toxickém šoku a toxémii může dojít ke smrti následkem kardiálního selhání. Jedná se ale o vzácnější případy. [1]

Tabulka 2: *C. perfringens* a jeho toxiny podle typu klostridia [2]

<b>Typ</b> <i>C. perfringens</i>	<b>Toxin</b>				
	<i>Alfa</i>	<i>Beta</i>	<i>Epsilon</i>	<i>Iota</i>	<i>Enterotoxin</i>
<b>A</b>	+	-	-	-	+
<b>B</b>	+	+	+	-	
<b>C</b>	+	+	-	-	+
<b>D</b>	+	-	+	-	+
<b>E</b>	+	-	-	+	

Nízký redoxní potenciál a anaerobní prostředí je podstatný pro rozvoj infekce. Vznikají v ranách s nekrózou, ischemií, s prokrvácením, nebo s přítomností cizích těles. Spory v ráně vyklíčí a začnou vytvářet toxiny. Produkce toxinů určuje šíření infekce. Toxin  $\alpha$  poškozuje buňky a do zdravé tkáně se šíří bakterie. Toxin může být velmi rychle introdukovaný do vzdálených míst makroorganismu. [1]

Hlavními příznaky infekce jsou bolest v ráně, sekrece exsudátu a otok. Tvorba plynu spojená s krepitací je nález již pokročilé infekce. Při pokročilé infekci je také přítomen otok. Dochází až k rozvoji septicko-toxického šoku. Infekce může být fulminantní, což znamená, že probíhá hodně rychle. [1]

### 5.7.5 Intoxikace *Clostridium perfringens* typu A

Intoxikace je způsobena především požitím kontaminované potravy spory. Nejčastěji se spory nachází v nedostatečně tepelně upraveném masu. Jelikož je toxin termolabilní nemůže se vyskytnout v dostatečně tepelně upravené potravě. V tenkém střevě vyklíčí spory a bakterie začne produkovat enterotoxin. Klasické při této intoxikaci jsou průjemy bez zvracení a kolikovitě břišní bolesti. Občas průběh intoxikace vypadá jako akutní průjemové onemocnění. Dehydratace ohrožuje slabší jedince a starší lidi. [1]

### 5.7.6 Enterotoxikóza

Je vyvolána především *C. perfringens* typu A a C. Toto klostridium patří mezi histotoxická klostridia. Infekce je způsobena kontaminovaným masem. Membrána enterocytů je poškozena enteroxiny. Dochází k poruše resorpční schopnosti tenkého střeva. Voda se nevstřebává a vznikají průjemy. Inkubační doba enterotoxikózy je 6-12 hodin. Léčí se symptomy, nepodávají se žádná antibiotika. [1]

### 5.7.7 Nekrotizující enteritida

Jedná se o život ohrožující onemocnění, které je vzácné. Při této nemoci má jedinec alteraci úseku tlustého střeva. Je vyvolané spory *C. perfringens* typu C, občas typem B, s produkcí toxinu  $\beta$ . Trypsin tento toxin inhibuje, a proto mezi rizikové faktory řadíme malnutrici a příjem potravy, které obsahují inhibitory trypsinu. [1]



Obrázek 15: Nekrotizující enterokolitida, převzato z [33]

### **5.7.8 Laboratorní diagnostika**

Prvotní diagnóza je stanovena na základě klinických příznaků. Jelikož je onemocnění velmi závažné, terapie musí být ihned zahájena, i bez výsledku laboratorního vyšetření. Kombinace klinických příznaků a mikrobiologického vyšetření je základem diagnostiky. Používá se přímý průkaz. Důležitá je mikroskopická identifikace grampozitivních tyčinek. Spolehlivá je i kultivační diagnostika. [1, 7]

### **5.7.9 Terapie a prevence**

Penicilin G je antibiotikem první volby, které podáváme společně s klindamycinem. Infekce měkkých tkání se léčí protišokovou terapií a důkladným chirurgickým ošetřením rány. Musí se odstranit všechna nekrotická tkáň. Jinou možností je podání penicilinu G v kombinaci s metronidazolem. Imipen se podává jako náhrada penicilinu u alergiků. [1, 7]

## **5.8 *Clostridium septicum***

Už z názvu vyplývá, že klostridium je schopné vyvolat sepsi. Jedná se o celkem častého původce anaerobní myonekrózy. *C. septicum* produkuje toxin  $\alpha$ . Vyskytuje se jako součást střevní fyziologické mikroflóry lidí a zvířat. Při narušení střevní fyziologické mikroflóry se může *C. septicum* rychle šířit do tkáně, množit se, produkovat plyn a způsobovat destrukci střev. [1, 3]

## **5.9 *Clostridium novyi***

*C. novyi* produkuje menší množství plynu než *C. perfringens*. Ale místo toho dochází k tvorbě mohutného tuhého edému. Může být také původcem plynaté sněti. [1]

## **5.10 *Clostridium histolyticum***

Jedná se o dalšího původce myonekrózy. Vyskytuje se ojediněle. Onemocnění probíhá bez tvorby plynů. Při myonekróze způsobenou *C. histolyticum* jsou tkáně extrémně rozbředlé až úplně roztavené. [1]

## **5.11 Další speciální klostridia**

### **5.11.1 *Clostridium sordelii***

*C. sordelii* způsobuje fatální syndrom toxického šoku spojeného s přirozeným porodem nebo vyvolaným potratem. [3]



### 5.11.2 *Clostridium sporogenes*

Kolonie *C. sporogenes* jsou ploché, velké, mají drsný povrch, nepravidelné okraje s  $\beta$  – hemolýzou. Toto klostridium je pohyblivé, vyskytuje se v půdě a střevech savců. Spory *C. sporogenes* jsou termorezistentní. [2]

## ***PRAKTICKÁ ČÁST***

### ***6 CÍL A ÚKOLY PRÁCE***

Prvním cílem bakalářské práce je seznámit se s rodem *Clostridium*, jeho charakteristikou, onemocněními, diagnostikou a léčbou. Hlavním zaměřením bakalářské práce je *C. difficile*. Jedná se o nejčastějšího zástupce nozokomiálních infekcí.

Jedním z dalších cílů je ukázat laboratorní diagnostiku *C. difficile*. Popsat postup stanovení specifického antigenu glutamátdehydrogenázy a toxinů A a B imunochromatografickým testem a postup pro LAMP. Dalším cílem je statistické zpracování dat získaných od Ústavu mikrobiologie ve FN Plzeň. Porovnává se výskyt *C. difficile* během let 2018-2021 v ÚM FN Plzeň, zda se zvýšil nebo snížil. Do statistického zpracování je také zařazen výskyt dle věkové kategorie a počet žádostí o laboratorní vyšetření *C. difficile*.

## **7 VÝZKUMNÉ OTÁZKY**

### **7.1 Výzkumná otázka č. 1**

Jaká je laboratorní diagnostika bakterie *C. difficile* v ÚM FN Plzeň?

### **7.2 Výzkumná otázka č. 2**

Zvýšil se výskyt toxigenních kmenů *C. difficile* během let 2018-2021 ve FN Plzeň?

### **7.3 Výzkumná otázka č. 3**

Změnil se výskyt diagnostikovaného toxigenního *C. difficile* v různých věkových kategoriích?

### **7.4 Výzkumná otázka č. 4**

Měla pandemie COVID-19 vliv na počty žádostí o vyšetření na *C. difficile* během pandemického období?

## **8 CHARAKTERISTIKA SLEDOVANÉHO SOUBORU**

V praktické části jsem zkoumala vzorky klinického materiálu (stolice) vyšetřené na Ústavu mikrobiologie ve Fakultní nemocnici v Plzni od 1. 1. 2018 do 31. 12. 2021. Vzorky pocházely hlavně od pacientů z Fakultní nemocnice v Plzni, ale mimořádně i z jiných nemocnic nebo ambulancí. Celkem za čtyři roky se vyšetřilo 9910 vzorků stolice nejprve imunochromatografickým testem a následně se postupovalo podle výsledku vyšetření.

## **9 METODIKA PRÁCE**

V praktické části bakalářské práce se zabývám diagnostikou a výskytem *C. difficile*. Na ÚM FN Plzeň jsem prováděla kvantitativní výzkum týkající se právě výskytu již zmíněného klostridia během let 2018-2021. Chci zjistit, zda pandemie COVID-19 měla vliv na zvýšený výskyt tohoto klostridia.

Pro sběr dat jsem zvolila retrospektivní analýzu. Data jsem získala z laboratorního informačního systému ÚM FN Plzeň. Získaná data jsem zpracovala pomocí Microsoft Office Excel 2013.

### **9.1 Laboratorní diagnostika *Clostridium difficile***

Ve FN Plzeň na ÚM se používá dodávaná souprava *CoproStrip<sup>TM</sup> C. difficile GDH + Toxin A + Toxin B*. Jedná se o soupravu, která slouží k rychlé diagnostice *C. difficile*. Balení obsahuje 20 jednotlivých testů. [34]

### **9.2 Princip stanovení imunochromatografického testu**

Při laboratorní diagnostice na ÚM FN Plzeň se nejdříve provádí imunochromatografický test pro průkaz toxinu A, B a glutamátdehydrogenázy (GDH). Jestliže je pozitivní jenom GDH, tak se u vyšetřovaného vzorku zahájí anaerobní kultivace. Díky ní je možné stanovit toxigenitu kmene z narostlých kolonií metodou LAMP. Při pozitivitě jak GDH tak i toxinů je zahájena cílená anaerobní kultivace z důvodu archivace kmene a k potencionální ribotypizaci. Pomocí MALDI TOF se provádí identifikace kmene. [34]

Membrány testů jsou potažené monoklonálními protilátkami. Test A má na membráně navázané protilátky proti antigenu glutamátdehydrogenáze. Protilátky proti toxinu A jsou na membráně testu B. Test C má membránu potaženou protilátkami proti toxinu B. [35]

### **9.3 Odběr a příprava vzorku**

Stolice o velikosti 1-2 g, v případě tekuté stolice 1-2 ml, se odebírá do čisté nádoby bez transportního media. Protože dochází k úbytku aktivity toxinu, vzorek by měl být zpracovaný do dvou hodin. Jestliže to není možné, je potřeba ho skladovat při teplotě 2-8 °C a nejdéle zpracovat do 24 hodin. Při příjmu je lékař okamžitě informovaný o požadavku

na vyšetření CLDI. Po správně provedeném příjmu je vzorku přiděleno číslo a následně je předán ke zpracování na laboratoř. Vzorek můžeme pro delší uchování zamrazit na  $-70\pm 5$  °C. Po rozmrazení musí mít vzorek laboratorní teplotu pro použití. [34, 35]

#### **9.4 Přístroje, pomůcky a reagensie**

- Anaerobní box
- Laminární box
- Bakteriologické kličky
- Plynový kahan
- Vortex
- Termoblok
- Inkubátor Genie II [34]

#### **Reagensie**

- Eazyplex *C. difficile* komplete
- Selektivní agar pro kultivaci *C. difficile*
- CoproStrip *C. difficile* Sanyon diagnostic [34]

#### **Spotřební materiál**

- Popisovací tužky
- Latexové rukavice
- Sterilní zkumavky
- Jednorázová kalibrované plastové pipety
- Nádob a pytel na infekční odpad [34]

#### **9.5 Pracovní postup**

Před zpracováním je důležitá kontrola kvality a množství vyšetřované stolice lékařem. Na víčku zkumavky je přidělané kapátko, kterým se odebere přibližně 125 mg stolice. Pokud je stolice řídká, odebere se kapátkem cca 125  $\mu$ l. Do zkumavky s diluentem se přenesou vzorek. Zkumavku se vzorkem zvortexujeme přibližně 15 sekund. [34, 35]

Teprve těsně před použitím se kazeta otevírá z hliníkové folie. Pro každý vzorek se používá vlastní kazeta. Zkumavka se vzorkem se promíchá, ulomí se špička víčka a do všech tří jamek se kapou 4 kapky vzorku. Až po 10 minutách odečítáme výsledek. [34]

Pokud je pozitivní pouze GDH, dojde k založení kultivace a následně se z narostlé kultury provede molekulárně biologický test LAMP. LAMP prokazuje toxigenitu kmene. Do žádanky je nutné připsat vyšetření CLDI-LAMP. Když je pozitivní GDH a i toxiny, zahajuje se cílené anaerobní kultivační vyšetřením z důvodu izolace kmene. Ty se následně archivují při  $-70\pm 5$  °C, případně k ribotypizaci v NRL. [34]



Obrázek 16: Příprava vzorku stolice pro imunochromatografický test, převzato z [34]

### 9.5.1 Cílená anaerobní kultivace

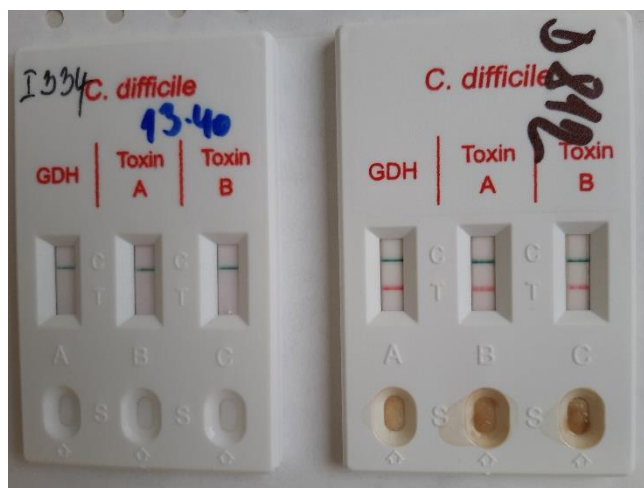
Kultivaci provádíme při pozitivitě glutamátdehydrogenázy a toxinů. Tato kultivace se také nazývá „alkoholový šok“. Stolice o přibližné hmotnosti 0,5 g se smíchá s 0,5 ml 95% etanolu. Následně pomocí vortexu se homogenizuje roztok se vzorkem. Poté probíhá inkubace při pokojové teplotě. Inkubace trvá 30-40 minut. Na pevnou selektivní půdu se rozočkují dvě kapky roztoku. Naočkovaná půda se vloží do anaerobního boxu, kde probíhá další inkubace. Inkubace trvá 24-72 hodin při teplotě  $35\pm 2$  °C. Kolonie *C. difficile* jsou ploché, šedobílé až bílé kolonie bez hemolýzy. K diagnostice slouží mikroskopické vyšetření – barvení dle Grama. Pro přesnou identifikaci se používá MALDI TOF. [34]

### 9.5.2 Zamražení čerstvého kmene *Clostridium difficile*

Na štítku pro zamražení kmene *C. difficile* musí být uvedené rodné číslo, příjmení pacienta a laboratorní číslo. Pomocí tampónu se nabere dostatečné množství narostlé kultury, které se vloží do glycerol-sérového bujónu. Následně se nechá vzorek půl hodiny stát při pokojové teplotě a poté se zamrazí do  $-80$ °C. [34]

## 9.6 Interpretace výsledků, konzultace a hlášení

Pozitivní výsledek glutamátdehydrogenázy a toxinů se musí ihned hlásit telefonicky ošetřujícímu lékaři. Pacient s pozitivním nálezem je podroben konzultaci ohledně antibiotické léčby a izolaci na oddělení. Nutné je také hlásit nález na oddělení epidemiologie. Do laboratorního informačního systému je zaznamenáno hlášení pozitivních nálezů, údaje o klinickém stavu pacienta a navrhované antibiotické terapii. [34]



Obrázek 17: Imunochromatografický test  
vlevo – Negativní výsledek,  
vpravo – pozitivní výsledek (GDH + TOX A+ TOX B+)  
Zdroj: ÚM FN Plzeň

## 9.7 Pracovní postup pro LAMP

### Přístroje:

- GENIE II se softwarem eazyReport
- Suchý termoblok FastGene® Mini Dry Bath [36]

### Postup:

Nejdříve zapneme termoblok, přibližně 10 minut před začátkem vyšetření. Musíme zkontrolovat nastavení teploty. Teplota musí být nastavena na 99 °C. Tlačítko Start se může zmáčkнуть až v tu chvíli, kdy je termoblok zahřátý na 99 °C. [36]

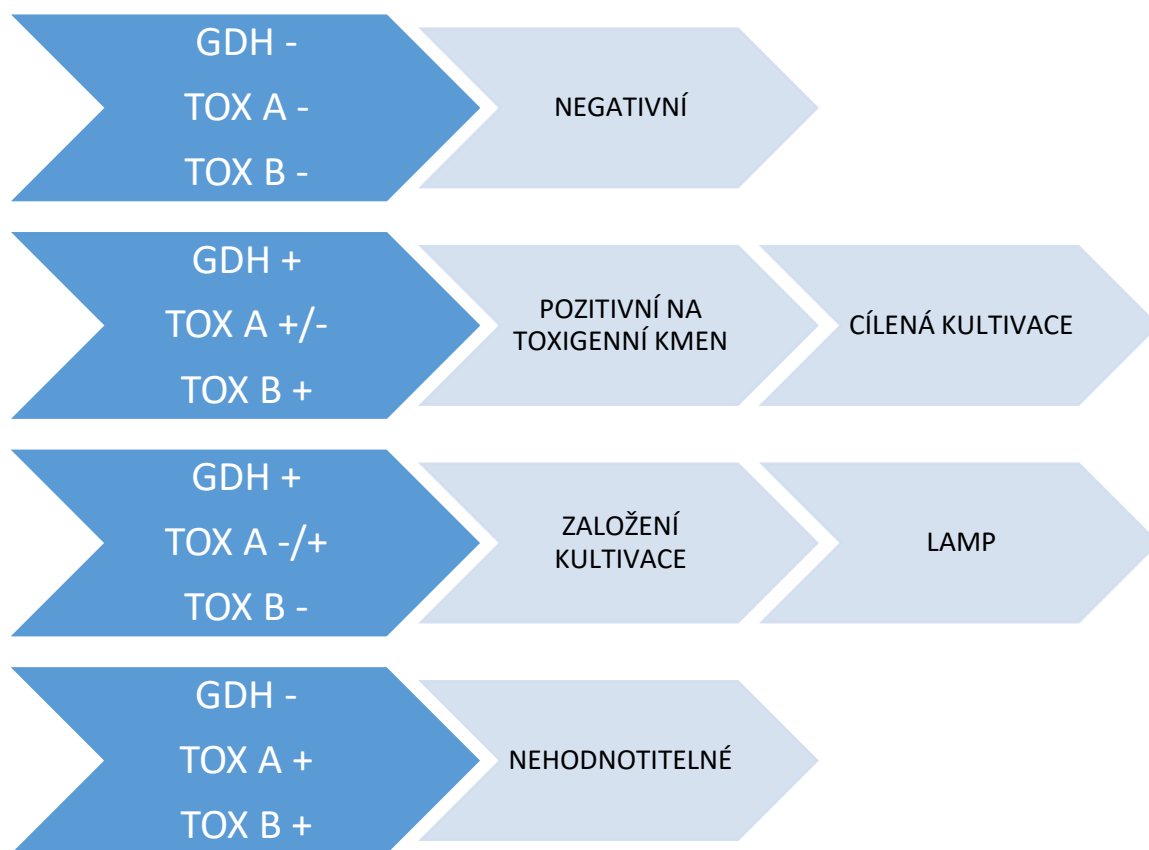
Až po zahřátí přístroje je možné začít připravovat vzorek. Vzorek stolice se odebere kličkou do průhledné zkumavky označené LPTV. Množství odebrané stolice musí být velmi malé. Při velkém množství by mohlo dojít k inhibici reakce. Kličkou se vzorek ve zkumavce promíchá a popřípadě zvortexuje. Následně se vzorek ve zkumavce inkubuje při 99 °C



po dobu 3 minut. Po inkubaci se vzorek zcentrifuguje po dobu 1 minuty při 4000 otáčkách. Do červené RS zkumavky se přepipetuje 125 µl supernatantu a pomocí pipety se promíchá. Poté se připraví strip mikrozkuavek. Z červené RS zkumavky se napipetuje 25 µl směsi do mikrozkuavek. [36]

Po připravení mikrozkuavek se zapne přístroj GENIE II. Načte se čárový kód, nebo se ručně vybere požadované vyšetření. Při vyšetření *C. difficile* se se zadává celé laboratorní číslo. Strip s mikrozkuavkami se vloží do bloku a zavře se poklop. Poté se spustí přístroj a začne probíhat analýza vzorku. [36]

## 9.8 Algoritmus pro laboratorní diagnostiku *C. difficile* ve FN Plzeň



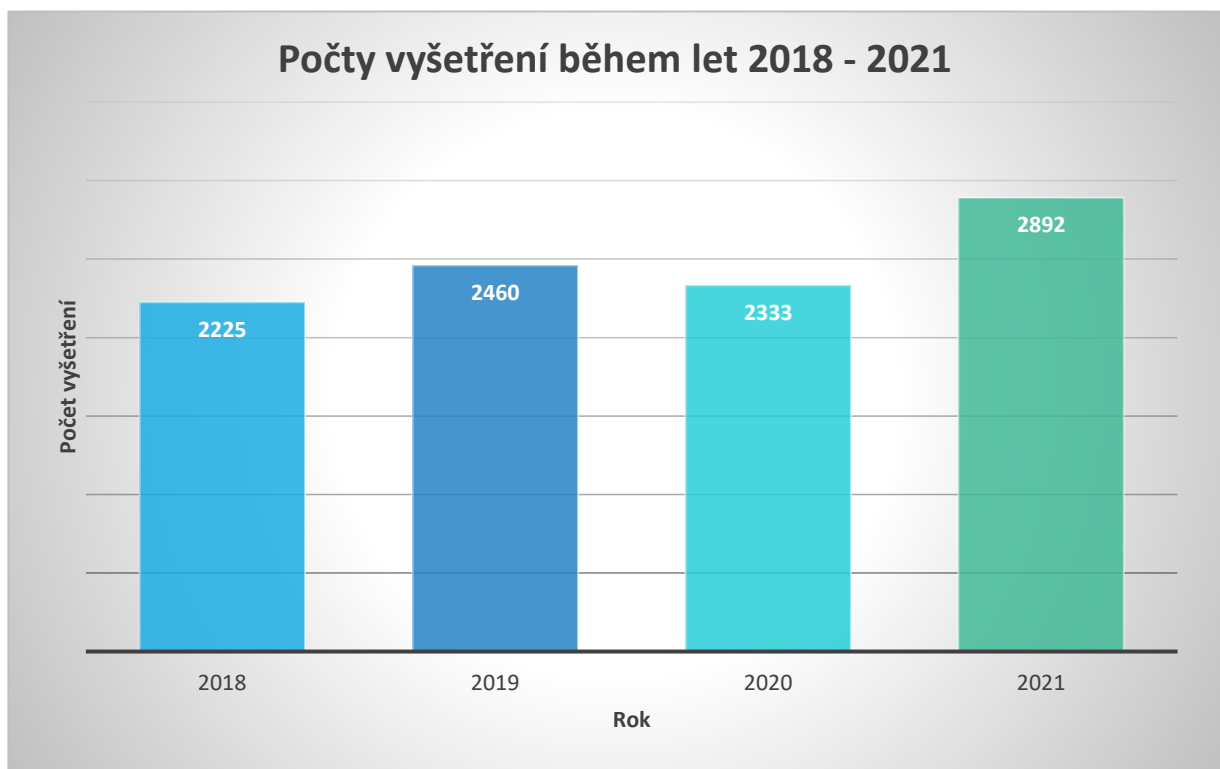
Zdroj: [35]

## 10 ANALÝZA A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

### 10.1 Počty vyšetření během let 2018-2021

Pomocí dodávané soupravy *CoproStrip<sup>TM</sup> C. difficile GDH + Toxin A + Toxin B* se ve FN Plzeň v letech 2018-2021 vyšetřilo 9 910 vzorků stolice na průkaz GDH a toxinů A a B *C. difficile*. Z 9 910 vzorků jich bylo 8 363 negativních a 1 547 pozitivních.

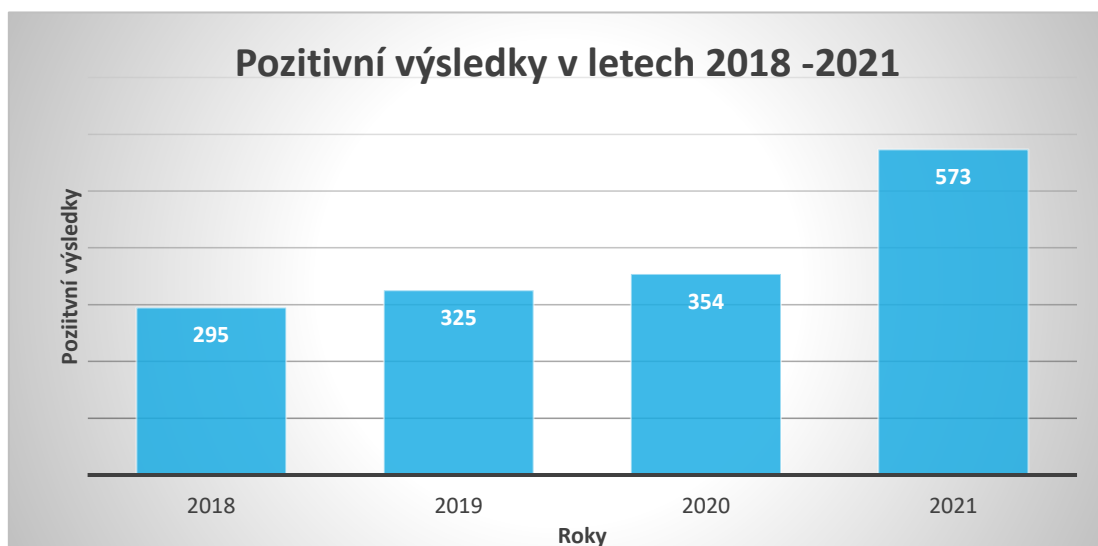
Graf 1: Graficky znázorněny počty vyšetření dle jednotlivých let



Zdroj: Autorův výzkum ze získaných dat od ÚM FN Plzeň

Z Grafu 1 jsme schopni vyčíst, že nejvíce provedených testů soupravou *CoproStrip<sup>TM</sup> C. difficile GDH + Toxin A + Toxin B* bylo v roce 2021. Nejméně vyšetření bylo v roce 2018. Počty vyšetření se zvyšují každým uvedeným rokem, až na výjimku z roku 2020. Týká se epidemiologických opatření ohledně COVID-19.

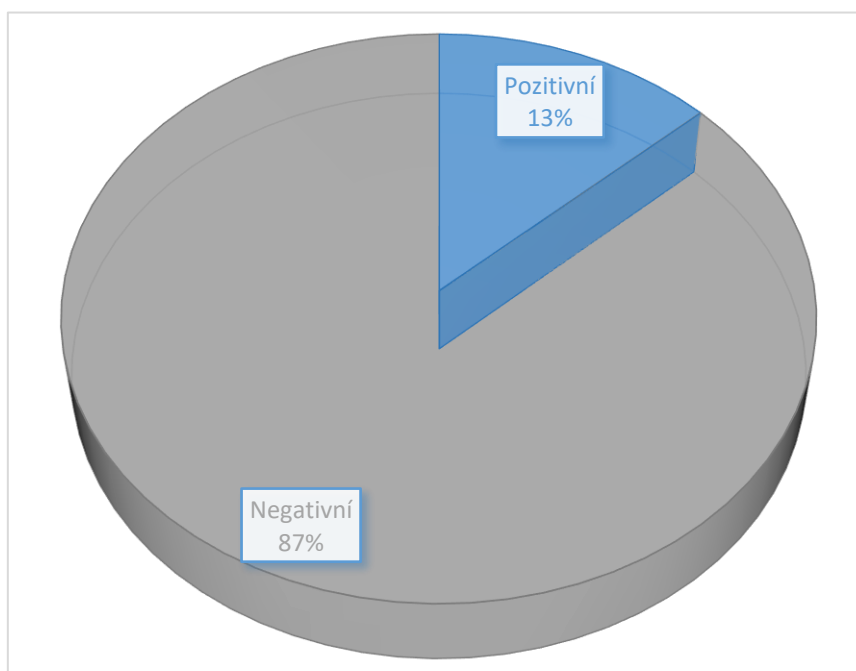
Graf 2: Pozitivní výsledky v letech 2018-2021



Zdroj: Autorův výzkum ze získaných dat od ÚM FN Plzeň

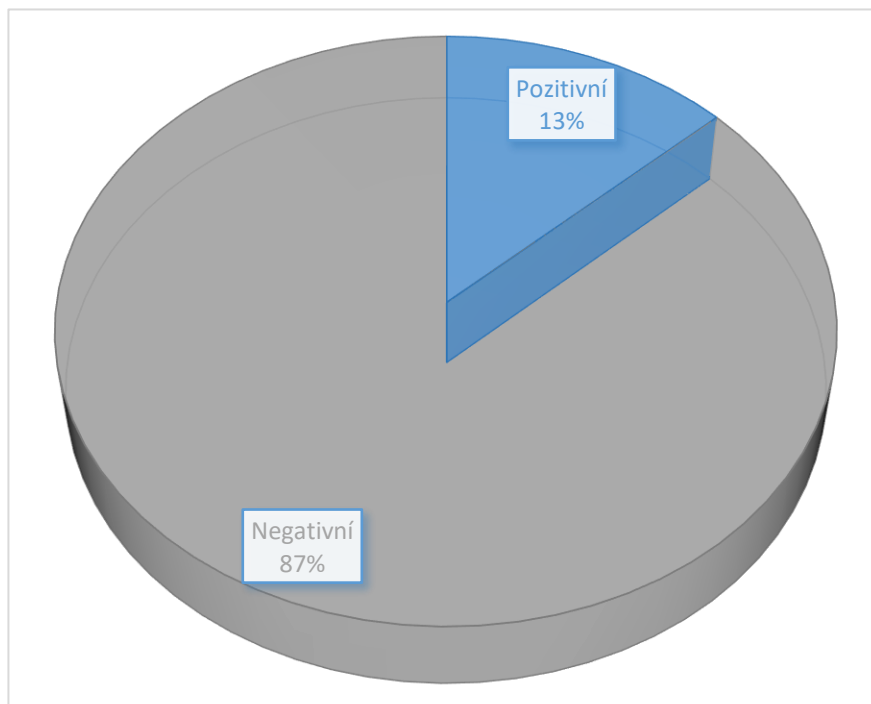
Graf 2 nám potvrzuje trend literatury, že výskyt *C. difficile* je stoupající. V roce 2021 bylo diagnostikované nejvyšší množství toxigenních kmenů. Oproti roku 2018 se jejich četnost zvýšila až 1,9x. Největší rozdíl mezi jednotlivými roky v počtu pozitivních výsledků byl mezi lety 2020 a 2021. Zde je rozdíl 219 pozitivních výsledků.

Graf 3: Porovnání výsledků vyšetření *C. difficile* za rok 2018



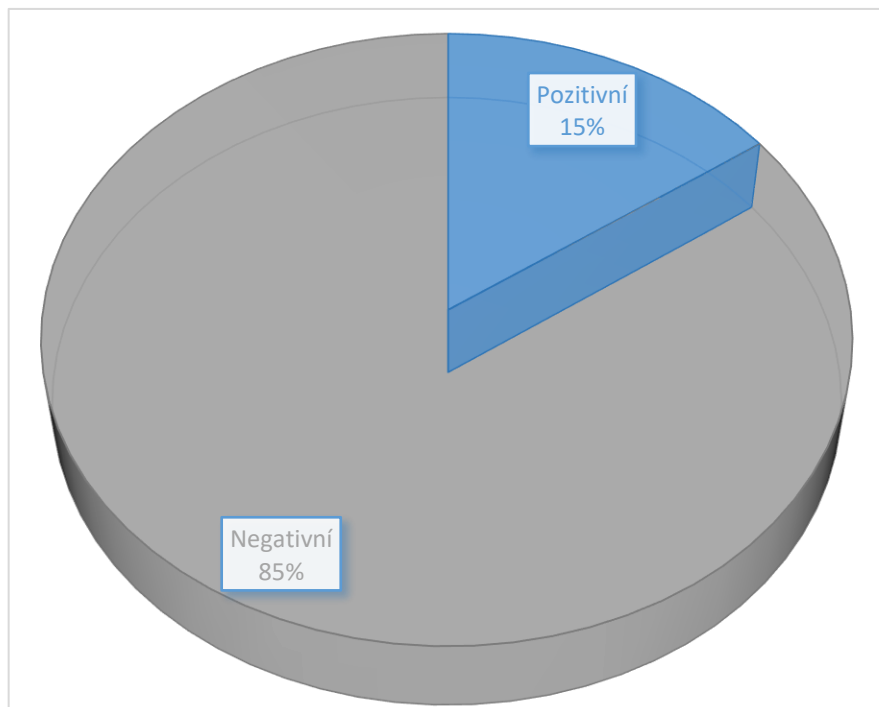
Zdroj: Autorův výzkum ze získaných dat od ÚM FN Plzeň

Graf 4: Porovnání výsledků vyšetření *C. difficile* za rok 2019



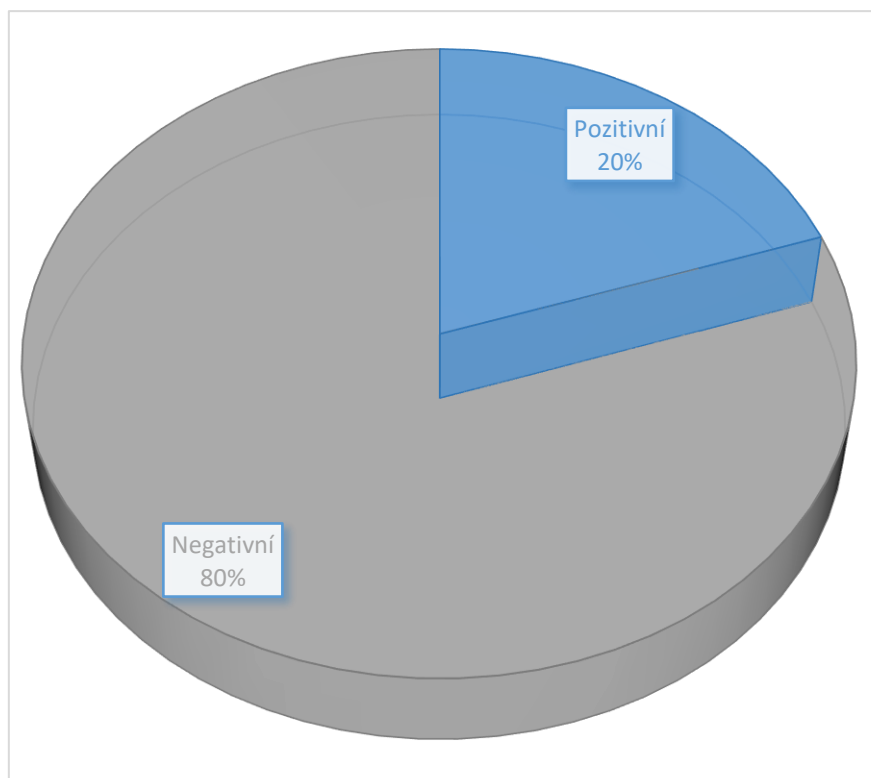
*Zdroj: Autorův výzkum ze získaných dat od ÚM FN Plzeň*

Graf 5: Porovnání výsledků vyšetření *C. difficile* za rok 2020



*Zdroj: Autorův výzkum ze získaných dat od ÚM FN Plzeň*

Graf 6: Porovnání výsledků vyšetření *C. difficile* za rok 2021



Zdroj: Autorův výzkum ze získaných dat od ÚM FN Plzeň

Grafy 3 a 4 ukazují, že procentuální četnost mezi negativními a pozitivními výsledky se během let 2018 a 2019 nezměnila. Pozitivních výsledků bylo 13 % a negativních 87 % z celkového počtu vyšetření za jeden rok. V roce 2020 se procentuální četnost pozitivních výsledků zvedla o 2 % a tím pádem se o 2 % snížila četnost u negativních výsledků. Toto tvrzení nám potvrzuje Graf 5. Graf 6 znázorňuje rok 2021, kdy se oproti rokům 2018 a 2019 zvýšily pozitivní výsledky až o 7 %.

## 10.2 Věkové kategorie pacientů a jejich výskyt

Z Tabulky 3 je viditelné, že nejvyšší výskyt toxigenních kmenů *C. difficile* je u pacientů v poproduktivním věku. Oproti věku produktivnímu je výskyt téměř až 4x vyšší. Nejnižší výskyt klostridia je ve věkové kategorii předproduktivní věk. Z Tabulky 3 lze také vyčíst, že s přibýváním let se zvyšuje výskyt toxigenních kmenů *C. difficile*. K nejvyššímu nárůstu za jeden rok došlo v roce 2021. Celkem pozitivních pacientů za čtyři roky (2018-2021) bylo 1547.

Tabulka 3: Stádium vývoje výskytu toxigenních kmenů *C. difficile* dle věkové kategorie během let 2018 – 2021

Rok	Předproduk- tivní věk (0-19 let)	Produktivní věk (20-59 let)	Poproduktivní věk (60+ let)	Celkem
<b>2018</b>	6	68	221	295
<b>2019</b>	6	45	274	325
<b>2020</b>	17	69	268	354
<b>2021</b>	16	132	425	573
<b>Celkem</b>	45	314	1188	1547

Zdroj: Autorův výzkum ze získaných dat od ÚM FN Plzeň

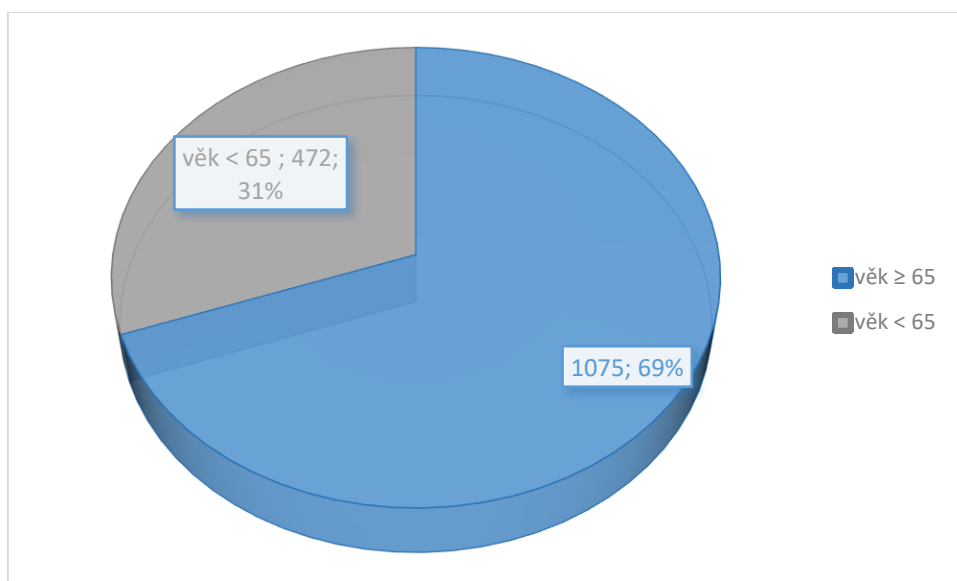
Tabulka 4: Zhodnocení údajů týkajících se věku pacientů během let 2018-2021 ve FN Plzeň

	Věk	Výskyt (2018-2021)
<b>Nejnižší věk</b>	0	5
<b>Nejvyšší věk</b>	99	1
<b>Průměrný věk</b>	67,2	

Zdroj: Autorův výzkum ze získaných dat od ÚM FN Plzeň

V Tabulce 4 je uveden nejnižší, nejvyšší a průměrný věk pacientů, kterým bylo diagnostikované toxigenní *C. difficile*. Nejstaršímu pacientovi bylo 99 let. Naopak nejmladším pacientům nebyl ani jeden rok – v případě pěti dětských pacientů. Průměrný věk u lidí se stanoveným *C. difficile* je 67,2 let.

Graf 7: Procentuální zastoupení pozitivních vzorků u pacientů ve věku  $\geq 65$



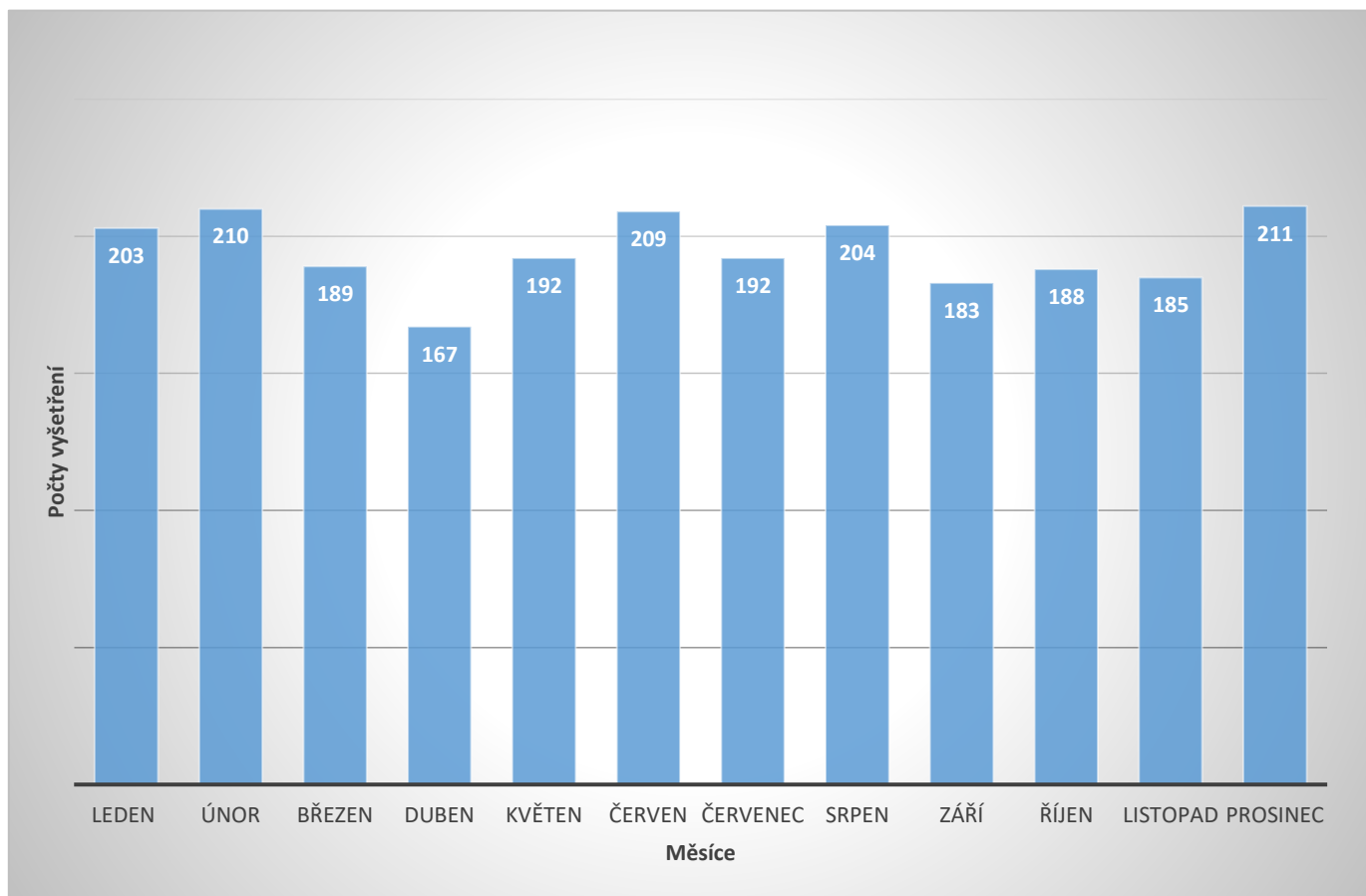
*Zdroj: Autorův výzkum ze získaných dat od ÚM FN Plzeň*

Z Grafu 7 můžeme vyčíst, že pacientů s věkem 65 a více je 69% ze všech pozitivních vzorků za čtyři roky. Pacientů s věkem pod 65 let je 31%.



### 10.3 Vliv pandemie COVID-19 na počty žádostí o vyšetření na *C. difficile*

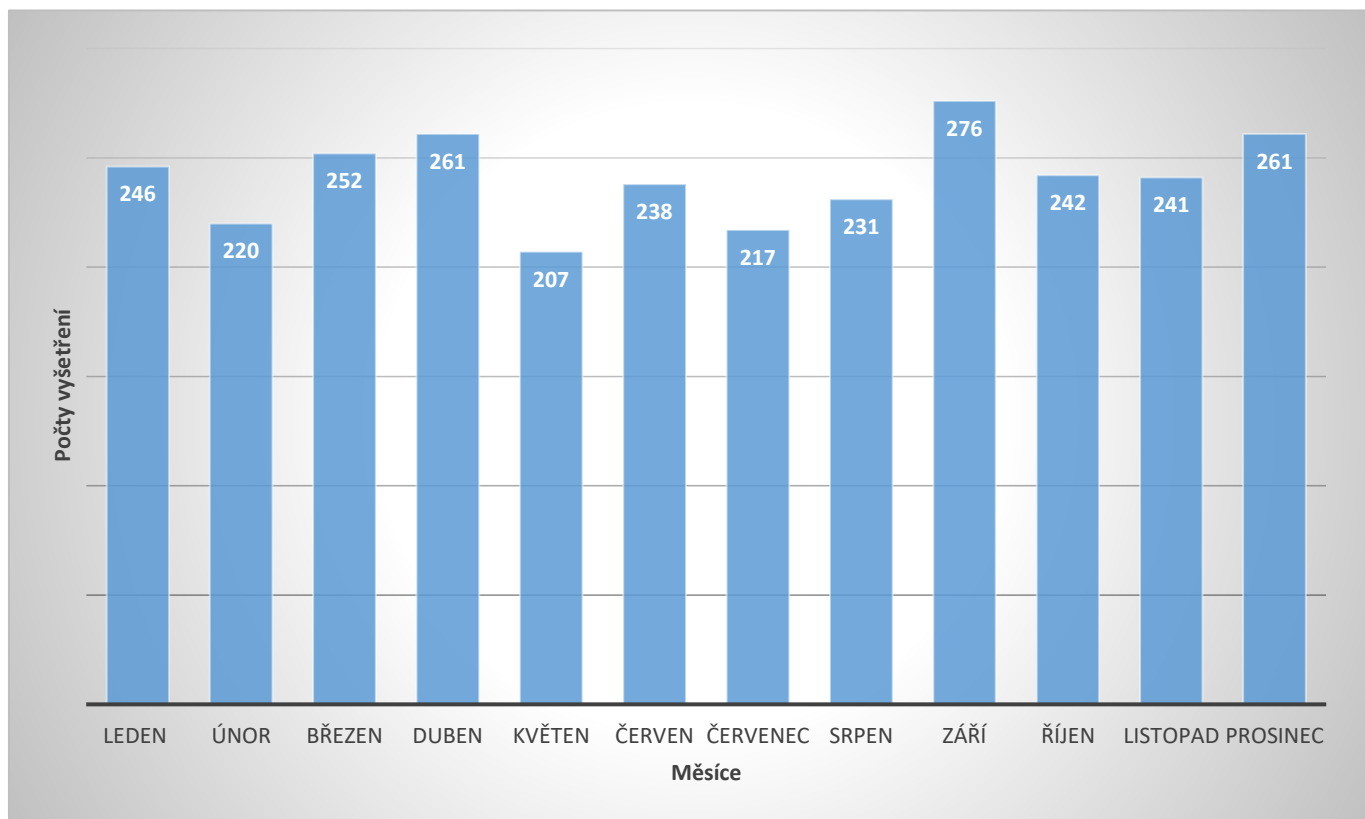
Graf 8: Počty vyšetření během roku 2020



*Zdroj: Autorův výzkum ze získaných dat od ÚM FN Plzeň*

Z Grafu 8 lze vyčíst, že nejméně žádostí o vyšetření bylo v dubnu roku 2020. Během dubna se vyšetřilo jenom 167 vzorků, což je o 22 vzorků méně než v březnu. Měsíc po tom, co v České republice vypukla první vlna pandemie COVID-19. Během následujících dvou měsíců došlo k navyšování počtu vyšetření. Druhá vlna pandemie COVID-19 přišla v září roku 2020. V tomto měsíci také došlo k poklesu vyšetření oproti předešlému měsíci. Počet byl snížen o 21 vyšetření. Nejvyšší počet žádostí na vyšetření *C. difficile* za rok 2020 bylo v prosinci.

Graf 9: Počty vyšetření v průběhu roku 2021



*Zdroj: Autorův výzkum ze získaných dat od ÚM FN Plzeň*

Při porovnání Grafů 8 a 9 je viditelné zvýšení počtu žádostí o laboratorní vyšetření v roce 2021. Nejvyšší počet žádostí o vyšetření bylo v září 2021, kdy jich ÚM FN Plzeň vyšetřil 276. V této době začínala probíhat třetí vlna pandemie COVID-19. V květnu roku 2021 bylo vyšetřeno nejmenší množství vzorků, bylo jich 207. Oproti dubnu bylo v květnu vyšetřeno o 54 vzorků méně.

## **DISKUZE**

Na začátku psaní mé bakalářské práce byl zvolen cíl a výzkumné otázky. Cílem je seznámit čtenáře s problematikou bakteriálního rodu *Clostridium*. Cílem praktické části je popsat laboratorní diagnostiku *C. difficile* v ÚM FN Plzeň. Stanovila jsem si čtyři výzkumné otázky, které jsem zodpověděla.

### 1) Jaká je laboratorní diagnostika bakterie *C. difficile* v ÚM FN Plzeň?

Zde popisuji, jaká souprava se používá na ÚM FN Plzeň a laboratorní postupy vyšetření na toxigenní kmen *C. difficile*. Vytvořila jsem diagram znázorňující algoritmus pro laboratorní diagnostiku klostridia na ÚM FN Plzeň. Zaobírám se také složením imunochromatografického testu. Také se zabývám správným odběrem a přípravou vzorku, cílenou anaerobní kultivací, zmražením čerstvého kmene klostridia a interpretací výsledků. Zaměřila jsem se i na provedení metodiky LAMP. Stručně jsem popsala postup laboratorní diagnostiky na ÚM FN Plzeň.

### 2) Zvýšil se výskyt toxigenních kmenů *C. difficile* během let 2018-2021 ve FN Plzeň?

Během let 2018-2021 bylo v ÚM FN Plzeň vyšetřeno 9910 stolic na průkaz GDH a toxinů *Clostridium difficile* a z toho bylo 1547 pozitivních vzorků. Husa et al. říká, že trend v počtu celosvětového výskytu *C. difficile* je vzestupný. Z Grafu 2 můžeme vyčíst, že má Husa et al. pravdu, a tím pádem trend z literatury můžeme potvrdit. Naopak vyvrátit můžeme tvrzení od Brandtlové Šárky. Ve své bakalářské práci vyvrací tvrzení od Husy et al. Každým rokem totiž bylo více pozitivních výsledků než rok předešlý. K nejvyššímu nárůstu došlo v roce 2021, kdy za jeden rok bylo 547 pozitivních vzorků, což je o 219 diagnostikovaných stolic více než v roce 2020. V roce 2021 bylo nejvíce pozitivních vzorků během let 2018-2021 v ÚM FN Plzeň. V necovidovém období v letech 2018 a 2019 bylo pozitivních 620 vzorků, což je skoro 1,5x méně, než za covidového období. V covidovém období bylo za dva roky 2020 a 2021 pozitivních 927 vzorků. [13, 38]

Odpověď na mou výzkumnou otázku tedy je, že se výskyt toxigenního kmene *C. difficile* zvyšuje v posledních čtyřech letech.

3) Změnil se výskyt diagnostikovaného toxigenního *C. difficile* v různých věkových kategoriích?

Tabulka 3 nám ukazuje, že se ve všech věkových kategoriích zvýšil výskyt *C. difficile*. V předproduktivním věku se výskyt během let 2018-2021 zvýšil 1,6x, v produktivním věku 1,9x a v poproduktivním věku také 1,9x. V roce 2018 bylo v předproduktivním věku diagnostikováno pouze šest pozitivních stolic. O čtyři roky déle jich bylo diagnostikováno o deset více, což je šestnáct pozitivních stolic. Nejvíce stanovených pozitivních nálezů bylo v roce 2020, kdy jich bylo 17. V produktivním věku v roce 2018 bylo stanoveno 68 stolic a v roce 2021 jich bylo 132, což bylo nejvíce za 4 roky. V poproduktivním věku se klostridium vyskytuje nejvíce. V roce 2018 jich bylo 221, což je nejvyšší výskyt ze všech věkových kategorií za rok 2018. Za čtyři roky se četnost výskytu zvýšila až na 425 pozitivních vyšetření. Celkově za 4 roky se toxigenní kmen *C. difficile* vyskytuje nejčastěji v poproduktivním věku, kdy je výskyt 26,4x vyšší. Takže ano, výskyt se změnil v různých věkových kategoriích. Ve všech vzrostl.

Brandtlová Šárka ve své bakalářské práci tvrdí, že věk  $\geq 65$  let je rizikový faktor pro přítomnost *C. difficile*. V mé bakalářské práci je 69 % pacientů s pozitivním *C. difficile*, což je na četnost 1075 vzorků. Za rizikový faktor se považuje více než 50% pacientů s věkem  $\geq 65$  let s pozitivním výsledkem. Výsledky z mé bakalářské práce odpovídají studii od Brandtlové Šárky v její bakalářské práci. Odpovídají i dalším studiím z České republiky, jako je například studie od Vojtilové et al. [37, 38]

4) Měla pandemie COVID-19 vliv na počty žádostí o vyšetření na *C. difficile* během pandemického období?

V březnu roku 2020 vypukla pandemie COVID-19 v České republice. Mým úkolem bylo zjistit, zda měla pandemie vliv na počty žádostí o vyšetření na toxigenní kmen *C. difficile*. Pandemie měla vliv na celkový počet vyšetření během let 2020 a 2021. Pacienti byli při těžkém průběhu onemocnění COVID 19 často vystaveni nadměrnému užívání širokospektrých antibiotik, což vedlo k nárůstu výskytu toxigenních kmenů *C. difficile*. V dubnu bylo vyšetřeno nejméně vzorků z roku 2020. Měsíc poté, co vznikla pandemie. Pandemie neměla vliv na jednotlivá období, s výjimkou začátku pandemie. Byly měsíce, kdy při pandemické vlně se zvýšily žádosti o vyšetření.

## ZÁVĚR

Cílem teoretické části mé bakalářské práce je seznámení s bakteriálním rodem *Clostridium* a jeho zástupci. Nejvíce jsem se zaměřila na grampozitivní tyčinku *C. difficile*. Zmíněné klostridium je jedním z nejčastějších zástupců nozokomiálních infekcí. Často souvisí s antibiotickou léčbou. U zástupců tohoto bakteriálního rodu se zabývám jejich charakteristikou, patogenitou, diagnostikou a léčbou.

V první kapitole jsem popisovala obecně rod *Clostridium*. Popisovala jsem morfologii, výskyt, proces sporulace, patogenitu, patogenezí, rozdělení klostridií a toxiny. V druhé kapitole jsem se zabývala zástupcem *C. difficile*. Popisovala jsem přímo morfologii zmíněného klostridia, kultivaci a diagnostiku, vyvolaná onemocnění, patogenezí, patogenitu a léčbu. U diagnostiky jsem se věnovala jednotlivým metodám stanovení toxigenního kmene *C. difficile*. V dalších kapitolách jsem popisovala ostatní jednotlivé zástupce zmíněného bakteriálního rodu.

Pro praktickou část jsem si stanovila čtyři výzkumné otázky. První otázka se týkala laboratorní diagnostiky *C. difficile* na ÚM FN Plzeň. Popsala jsem postup laboratorní diagnostiky na tomto pracovišti. Zabývala jsem se odběrem a přípravou vzorku, popsala jsem postup stanovení jak pro imunochromatografický test, tak i pro metodu LAMP.

Druhá otázka byla zaměřena na zvýšení výskytu toxigenních kmenů *C. difficile*. Po zpracování dat získaných z laboratorního informačního systému ÚM FN Plzeň, jsem sestavila grafy. Grafy nám viditelně znázornily nárůst toxigenních kmenů *C. difficile* během posledních čtyř let (2018-2021). U této otázky můžeme tedy potvrdit trend literatury, který uvádí Husa et. al. v článku ohledně Klostridiové kolitidy.

Ve třetí otázce se zabývám výskytem CLDI onemocnění v různých věkových kategoriích. Ze získaných dat můžeme potvrdit, že ve všech věkových kategoriích se výskyt zvýšil. Nejvíce se četnost zvýšila v poproduktivním věku, ve kterém jsou zahrnuti pacienti ve věku 60 let a výše.

Poslední otázka se týkala pandemie COVID-19 a jejího vlivu na počty vyšetření. Zjistila jsem, že měla vliv na celkové zvýšení počtu žádostí o laboratorní diagnostiku *C. difficile*. Větší vliv měla na svém začátku, kdy v dubnu bylo vyšetřeno menší množství

vzorků. V ostatních pandemických vlnách neměla vliv na určité měsíce, jednou byl počet vyšetření větší a jednou zase nižší.

Při psaní bakalářské práce jsem zjistila, jak je problematika onemocnění vyvolaných klostridiami závažná. Myslím si, že v budoucnu bychom měli přemýšlet o množství a vhodnosti podávaných antibiotik z důvodu vzniku nežádoucích rezistencí a CDI onemocnění. Myslím si, že by bylo vhodné tento výzkum v budoucnu zopakovat. Potvrdila jsem si, že bych se i nadále v budoucnu chtěla věnovat mikrobiologii.

## SEZNAM LITERATURY

1. HURYCH, Jakub a Roman ŠTÍCHA. *Lékařská mikrobiologie: repetitorium*. Praha: Stanislav Juhaňák - Triton, 2020, 638s. ISBN 978-80-7553-844-4.
2. VOTAVA, Miroslav. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun, 2003, 495s. ISBN 80-902896-6-5.
3. MURRAY, Patrick R., Ken S. ROSENTHAL a Michael A. PFALLER. *Medical Microbiology*. 9th edition. Philadelphia: Elsevier, 2020, 872s. ISBN 978-0-323-67322-8.
4. VOTAVA, Miroslav. *Lékařská mikrobiologie obecná*. Brno: Neptun, 2001, 247s. ISBN 80-902896-2-2.
5. OTOVÁ, Berta, Romana MIHALOVÁ a Klára BOBKOVÁ. *Základy biologie a genetiky člověka*. Vydání druhé. Praha: Univerzita Karlova, nakladatelství Karolinum, 2021, 244s. ISBN 978-80-246-4565-0.
6. SCHINDLER, Jiří. *Mikrobiologie: pro studenty zdravotnických oborů*. 2., dopl. a přeprac. vyd. Praha: Grada, 2014. Sestra (Grada), 248s. ISBN 978-80-247-4771-2.
7. KOLÁŘOVÁ, Libuše. *Obecná a klinická mikrobiologie*. Praha: Galén, 2020, 441s. ISBN 978-80-7492-477-4.
8. BEDNÁŘ, Marek, Věra FRAŇKOVÁ, Jiří SCHINDLER, Andrej SOUČEK a Jiří VÁVRA. *Lékařská mikrobiologie – bakteriologie, virologie a parazitologie*. Praha: Marvil, 1996, 558s. ISBN 80-238-0297-6.
9. MURRAY, Patrick R., Ken S. ROSENTHAL a Michael A. PFALLER. *Medical Microbiology*. 7th ed. Philadelphia: Elsevier/Saunders, 2013. ISBN 978-0-323- 08692-9.
10. GOERING, Richard V., Hazel M. DOCKRELL, Mark A. ZUCKERMAN a Peter L. CHIODINI, JULÁK, Jaroslav, ed. *Mimsova lékařská mikrobiologie*. 5. vydání. Přeložil Jan BOBEK, přeložil Renáta ČERMÁKOVÁ, přeložil Karel HOLADA, přeložil Zora MĚLKOVÁ, přeložil Tibor MOŠKO, přeložil Jan NOVÁK, přeložil Ludmila PROKEŠOVÁ, přeložil Jiřina SUCHANOVÁ. Praha: Stanislav Juhaňák - Triton, 2016, 568s. ISBN 978-80-7387-928-0.

11. VOTAVA, Miroslav. *Lékařská mikrobiologie - vyšetřovací metody*. Brno: Neptun, 2010, 495s. ISBN 978-80-86850-04-7.
12. ZELA, Ondřej a Petr VÍTEK. *Infekce Clostridium difficile – stav v roce 2012*. *Medicína pro praxi*, 2012, 9(10), 391–394s, ISSN 1803-5310.
13. Notomi, T., Mori, Y., Tomita, N., & Kanda, H. (2015). *Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): principle, features, and future prospects*. *Journal of Microbiology*, 53(1), 1–5. doi:10.1007/s12275-015-4656-9
14. HUSA, Petr, BENEŠ, Jiří a Otakar NYČ. *Klostridiová kolitida – stále narůstající nebezpečí*. *Interní medicína pro praxi*, 2013, 15(6–7): 201–204s, ISSN 1803-5310.
15. BENEŠ, Jiří, HUSA, Petr, NYČ, Otakar a Sylvia Polívková. (červen 2014). *Infekce.cz* [online, cit. 14.10.2021]. Dostupné z [www.infekce.cz/dpCDI14.htm](http://www.infekce.cz/dpCDI14.htm)
16. ROZSYPAL, Hanuš, Michal HOLUB a Monika KOSÁKOVÁ. *Infekční nemoci ve standardní a intenzivní péči*. Praha: Karolinum, 2013, 396s. ISBN 978-80-246-2197-5
17. STEBEL, Roman, Vojtilová Lenka a Petr HUSA. *Aktuality v léčbě a prevenci klostridiové kolitidy*. *Vnitř Lék*, 2020, 66(E-2): e24–e28s, ISSN 1801–7592.
18. FINLAY, B. Brett a Jessica M. FINLAY. *Mikrobiom lidského těla: jak spolupracovat s mikroby v těle a prostředí a žít déle a zdravěji*. Přeložil Václav PETR. Praha: Stanislav Juhaňák - Triton, 2020, 348s. ISBN 978-80-7553-777-5.
19. SEIDL, Zdeněk. *Neurologie pro studium i praxi*. 2., přeprac. a dopl. vyd. Praha: Grada, 2015, 384s. ISBN 978-80-247-5247-1.
20. SMÍŠKOVÁ, Dita a Vilma Marešová. *Současnost očkování proti tetanu*. *Medicína pro praxi*, 2014, 11 (4): 147–148s, ISSN 1803-5310.
21. ROZSYPAL, Hanuš. *Základy infekčního lékařství*. V Praze: Univerzita Karlova, nakladatelství Karolinum, 2015, 566s. ISBN 978-80-246-2932-2.
22. KOPECKÁ, Jana a Gabriela Rotková, (c2017). *Is.muni.cz* [online, cit. 14.02.2022]. Dostupné z [is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/js17/cviceni\\_mikrobiologie/web/pages/bakterialni\\_endospory.html](http://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/js17/cviceni_mikrobiologie/web/pages/bakterialni_endospory.html)



23. *Příspěvatelé WikiSkript, Buněčná stěna bakterií, (c2021). Wikiskripta.eu [online, cit. 14. 02. 2022]. Dostupné z www.wikiskripta.eu/w/Bun%C4%9B%C4%8Dn%C3%A1\_st%C4%9Bna\_bakteri%C3%AD*
24. *KOPECKÁ, Jana a Gabriela Rotková, (c2017). Is.muni.cz [online, cit. 14.02.2022]. Dostupné z is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/js17/cviceni\_mikrobiologie/web/pages/pohyb\_bunek.html*
25. *Příspěvatelé WikiSkript, Pseudomembranózní enterokolitida, (2018). Wikiskripta.eu [online, cit. 14. 02. 2022]. Dostupné z www.wikiskripta.eu/w/Pseudomembran%C3%B3zn%C3%AD\_enterokolitida*
26. *Příspěvatelé Wikipedie, Clostridium botulinum. (c2021), Wikipedie: Otevřená encyklopedie, [online, cit. 14. 02. 2022]. Dostupné z cs.wikipedia.org/wiki/Clostridium\_botulinum*
27. *Příspěvatelé WikiSkript, Botulismus, (c2019). Wikiskripta.eu [online, cit. 14. 02. 2022]. Dostupné z www.wikiskripta.eu/w/Botulismus*
28. *Příspěvatelé Wikipedie, Clostridium tetani, (2021, November 7). Wikipedia, The Free Encyclopedia, [online, cit. 10. 03. 2022]. Dostupné z en.wikipedia.org/wiki/Clostridium\_tetani*
29. *Příspěvatelé Wikipedie, Tetanus, (c2021). Wikipedie: Otevřená encyklopedie, [online, cit. 14. 02. 2022] ]. Dostupné z cs.wikipedia.org/wiki/Tetanus#Epidemiologie*
30. *Příspěvatelé WikiSkript, Tetanus, (c2020). Wikiskripta.eu [online, cit. 14. 02. 2022]. Dostupné z www.wikiskripta.eu/w/Tetanus*
31. *Příspěvatelé WikiSkript, Nekrotizující fasciitida, (c2020). Wikiskripta.eu [online, cit. 14. 02. 2022]. Dostupné z www.wikiskripta.eu/w/Nekrotizuj%C3%ADc%C3%AD\_fasciitida*
32. *Příspěvatelé Wikipedie, Gangrene, (c2022). Wikipedia, The Free Encyclopedia, [online, cit. 14. 02. 2022]. Dostupné z en.wikipedia.org/wiki/Gangrene*
33. *Příspěvatelé WikiSkript, Nekrotizující enterokolitida, (c2020). Wikiskripta.eu [online, cit. 14. 02. 2022]. Dostupné z www.wikiskripta.eu/w/Nekrotizuj%C3%ADc%C3%AD\_enterokolitida*

34. GEIGEROVÁ, Lenka. SOP - *Clostridium difficile* – průkaz antigenu imunochromatografickou metodou, průkaz toxinů molekulárně biologickou metodou a cílená kultivace. Ústav mikrobiologie FN Plzeň. Účinnost od 1. 6. 2020. SOPV/MIKRO\_BAK/030/00/07
35. Savyon® Diagnostics Ltd. CoproStrip<sup>T</sup>. *C. difficile* GDH + Toxin A + Toxin B – příbalový leták. Israel: Savyon® Diagnostics Ltd. Vydáno: 06/2021. Dostupné z [www.savyondiagnositics.com/wp-content/uploads/2017/07/CoproStrip\\_C.difficile\\_GDHTox\\_ATox\\_B\\_41220E.V06-06.2021.pdf](http://www.savyondiagnositics.com/wp-content/uploads/2017/07/CoproStrip_C.difficile_GDHTox_ATox_B_41220E.V06-06.2021.pdf)
36. VLČKOVÁ, Dagmar. MAN – Manuál GENIE II. Ústav mikrobiologie FN Plzeň. Účinnost od 1. 12. 2019. MAN/MIKRO/16/03
37. Vojtilová L, Pýchová M, Freiburgerová M, Juránková J, Bortlíček Z, Husa P. Rizikové faktory rekurentního a těžkého průběhu kolitidy vyvolané infekcí *Clostridium difficile*. *Vnitř Lék* 2013; 59(1): 23–30.
38. BRANDTLOVÁ, Šárka. *Klostridia a jejich výskyt u pacientů FN Plzeň [online]*. Plzeň, 2017 [cit. 07. 03. 2022]. Bakalářská práce. Západočeská univerzita, Fakulta zdravotnických studií. Vedoucí práce MUDr. Lenka Geigerová.

## **SEZNAM OBRÁZKŮ**

Obrázek 1: Struktura bakteriální endospory, převzato z [22].....	14
Obrázek 2: Uložení endospor v buňce, převzato z [22] .....	15
Obrázek 3: Stavba stěny grampozitivní bakterie, převzato a upraveno z [23] .....	15
Obrázek 4: Stavba bičíku u gramnegativních (a) a grampozitivních (b) bakterií, převzato z [24] .....	16
Obrázek 5: Střevní sliznice s pseudomembrázní kolitidou, převzato z [25] .....	23
Obrázek 6: Endoskopický pohled na pseudomembrázní kolitidu, převzato z [25] .....	23
Obrázek 7: Terapeutické možnosti CDI, převzato z [15].....	26
Obrázek 8: <i>Clostridium botulinum</i> , převzato z [26] .....	27
Obrázek 9: Infekce <i>Clostridium botulinum</i> .....	30
Obrázek 10: <i>Clostridium tetani</i> .....	31
Obrázek 11: Celosvětově hlášené případy tetanu v letech 1990-2004,.....	33
Obrázek 12: Tetanus u novorozence, převzato z [30] .....	34
Obrázek 13: Gangréna, převzato z [32].....	38
Obrázek 14: Nekrotizující fasciitida, převzato z [31].....	38
Obrázek 15: Nekrotizující enterokolitida, převzato z [33] .....	39
Obrázek 16: Příprava vzorku stolice pro imunochromatografický test, převzato z [34].....	47
Obrázek 17: Imunochromatografický test .....	48

## ***SEZNAM TABULEK***

Tabulka 1: Přehled antibiotik rizikových z indukce klostridiové kolitidy [17].....	26
Tabulka 2: <i>C. perfringens</i> a jeho toxiny podle typu klostridia [2] .....	38
Tabulka 3: Stádium vývoje výskytu toxigenních kmenů <i>C. difficile</i> dle věkové kategorie během let 2018 – 2021 .....	55
Tabulka 4: Zhodnocení údajů týkajících se věku pacientů během let 2018-2021 ve FN Plzeň .....	55

## **SEZNAM GRAFŮ**

Graf 1: Graficky znázorněny počty vyšetření dle jednotlivých let.....	51
Graf 2: Pozitivní výsledky v letech 2018-2021 .....	52
Graf 3: Porovnání výsledků vyšetření <i>C. difficile</i> za rok 2018 .....	52
Graf 4: Porovnání výsledků vyšetření <i>C. difficile</i> za rok 2019 .....	53
Graf 5: Porovnání výsledků vyšetření <i>C. difficile</i> za rok 2020 .....	53
Graf 6: Porovnání výsledků vyšetření <i>C. difficile</i> za rok 2021 .....	54
Graf 7: Procentuální zastoupení pozitivních vzorků u pacientů ve věku $\geq 65$ .....	56
Graf 8: Počty vyšetření během roku 2020 .....	57
Graf 9: Počty vyšetření v průběhu roku 2021.....	58

## ***SEZNAM ZKRATEK***

FN – fakultní nemocnice

ÚM – Ústav mikrobiologie

NRL – národní referenční laboratoř

DNA – deoxyribonukleová kyselina

DLM – minimální letální dávka

DMN – minimální nekrotizační dávka

UA – antitoxické jednotky

CDI – *Clostridium difficile* infection

CLDI – *Clostridium difficile*

LAMP – Loop-mediated isothermal amplification

PCR – polymerázová řetězová reakce

EIA – enzymová imunoanalýza

GDH – glutamátdehydrogenáza

MALDI TOF – matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight

## ***SEZNAM PŘÍLOH***

**Příloha 1:** Povolení sběru informací ve FN Plzeň

**Příloha 2:** Kolonie *C. difficile*

**Příloha 3:** Izolované *C. difficile* na Schaedlerově agaru

**Příloha 4:** *C. perfringens*

**Příloha 5:** Anaerobní box v ÚM FN Plzeň

**Příloha 6:** Bomby se stlačeným plynem

**Příloha 7:** Mikroskopický preparát *C. difficile*

**Příloha 8:** Mikroskopický preparát *C. perfringens* z anaerobního bujónu

# PŘÍLOHY

## Příloha 1: Povolení sběru informací ve FN Plzeň

Vážená paní

Adéla Vávrová

Studentka oboru *Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví*

*Fakulta zdravotnických studií, Katedra záchranářství, diagnostických oborů a veřejného zdravotnictví*

*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 a 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 „*Diagnostika rodu Clostridium a jeho výskyt ve 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 **RNDr. Karel Fajfrlík Ph.D., přednosta 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](mailto:chabrovas@fnplzen.cz)*

22. 11. 2021



**Příloha 2:** Kolonie *C. difficile*



Zdroj: Autor

**Příloha 3:** Izolované *C. difficile* na Schaedlerově agaru



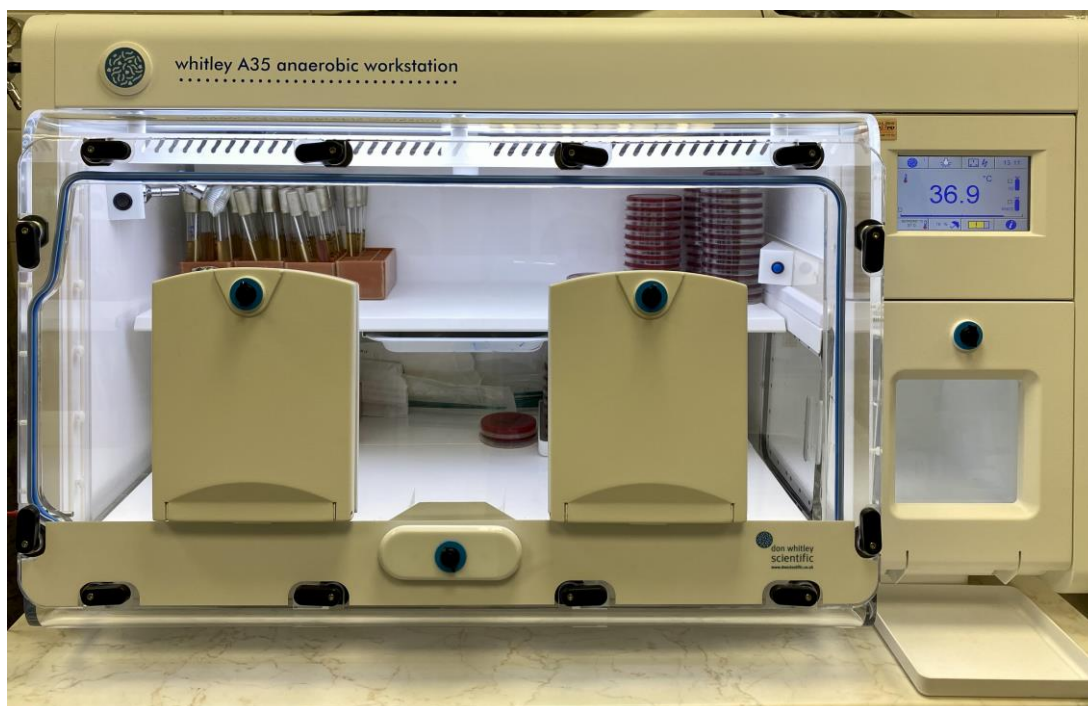
Zdroj: Autor

**Příloha 4:** *C. perfringens*



Zdroj: Autor

**Příloha 5:** Anaerobní box v ÚM FN Plzeň



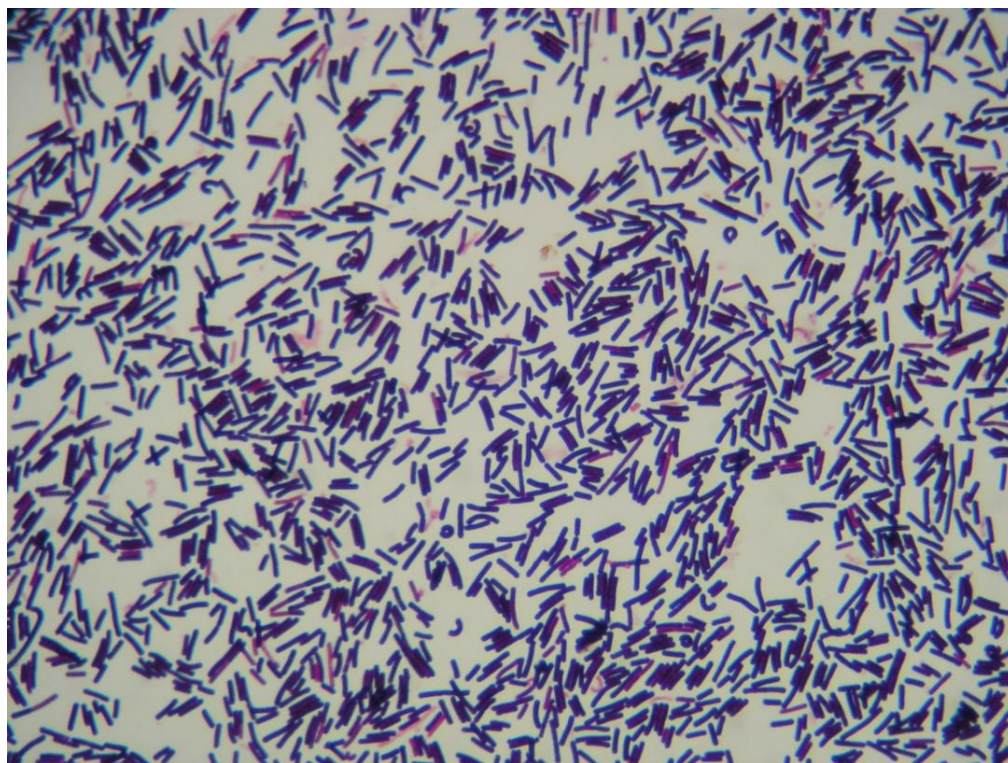
Zdroj: Autor

## Příloha 6: Bomby se stlačeným plynem



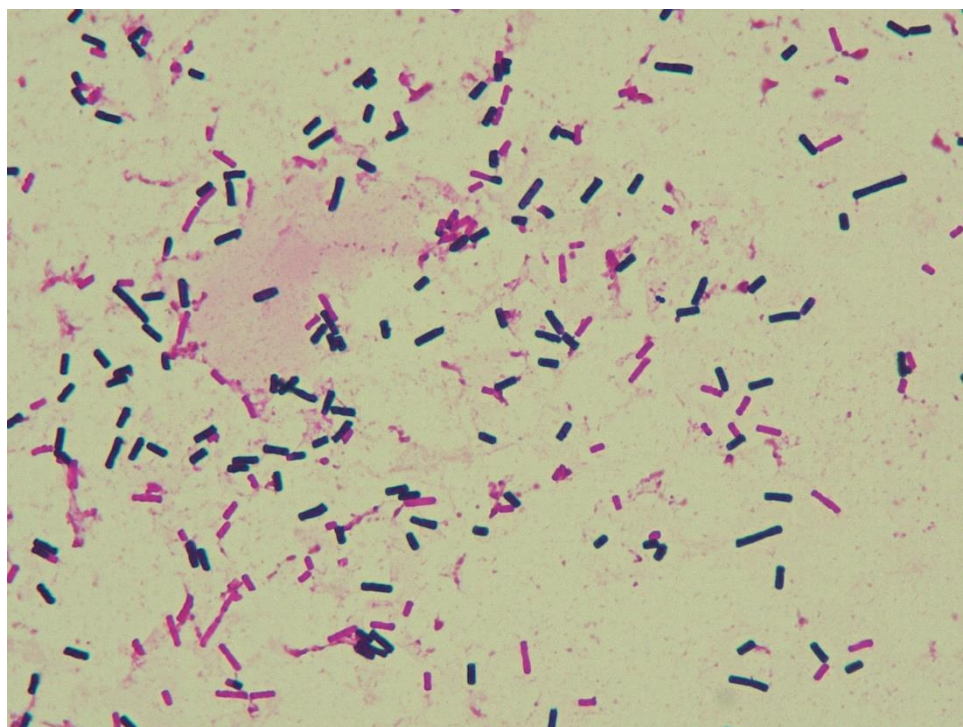
Zdroj: Autor

**Příloha 7:** Mikroskopický preparát *C. difficile*



Zdroj: ÚM FN Plzeň

**Příloha 8:** Mikroskopický preparát *C. perfringens* z anaerobního bujónu



Zdroj: ÚM FN Plzeň