

# Zástupci rodu *Clostridium* jako původci alimentárních infekcí

Andrea Slivková

---

Bakalářská práce  
2013



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav technologie potravin

akademický rok: 2012/2013

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Andrea SLIVKOVÁ**  
Osobní číslo: **T09132**  
Studijní program: **B2901 Chemie a technologie potravin**  
Studijní obor: **Chemie a technologie potravin**  
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Zástupci rodu Clostridium jako původci  
alimentárních infekcí**

Zásady pro vypracování:

1. Sumarizace základních a neaktuálnějších poznatků o výskytu clostridií v potravinách a jejich průkazu.
2. Popsání jednotlivých druhů alimentárních infekcí způsobených rodem Clostridium.
3. Shrnutí technologických postupů v potravinách zaměřených na prevenci alimentárních infekcí.

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

[1] ŠILHÁNKOVÁ, L. Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology. Praha: Academia 2002.

[2] PELCLOVÁ, D. Nejčastější otravy a jejich terapie. Praha: Galén 2009.

[3] GÖRNER, F. - VALÍK, L. Aplikovaná mikrobiologie poživatin. Bratislava: Vydavateľstvo Malé centrum 2004.

Vedoucí bakalářské práce:

**MVDr. Ivan Holko, Ph.D.**

Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

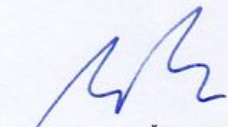
Datum zadání bakalářské práce:

**16. ledna 2013**

Termín odevzdání bakalářské práce:

**2. května 2013**

Ve Zlíně dne 4. února 2013

  
doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.  
*děkan*



  
doc. Ing. František Buňka, Ph.D.  
*ředitel ústavu*

Příjmení a jméno: SLIVKOVÁ ANDREA

Obor: OP

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby<sup>1)</sup>;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3<sup>2)</sup>;
- beru na vědomí, že podle § 60<sup>3)</sup> odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60<sup>3)</sup> odst. 2 a 3 mohu užit své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považuji se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně 30. 4. 2013

Slivková Andrea

<sup>1)</sup> zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevdělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.



(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

<sup>2)</sup> zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacímu zařízení (školní dílo).

<sup>3)</sup> zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odprá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jim dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlídně k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

## **ABSTRAKT**

Alimentární onemocnění a bezpečnost potravin jsou v současnosti velmi diskutovaným tématem vzhledem k přítomnosti patogenních mikroorganismů. Tato práce se zaměřuje konkrétně na bakterie rodu *Clostridium*, nejznámější zástupce z hlediska otrav z potravin, jejich morfologii, vlastnosti, výskyt v potravinách, jejich patogenitu a působení na lidský organismus. Zabývá se také preventivními opatřeními v boji proti těmto patogenům.

Klíčová slova: *Clostridium*, vlastnosti, alimentární onemocnění, rizikové potraviny, botulotoxin, prevence

## **ABSTRACT**

Foodborne disease and food safety are currently widely discussed topic due to the presence of pathogenic microorganisms. This paper focuses specifically on bacteria of the genus *Clostridium*, the most famous representative in terms of food poisoning, their morphology, properties, occurrence in food, pathogenicity and their effects on the human organism. It also discusses preventive measures in the fight against these pathogens.

Keywords: *Clostridium*, properties, foodborne diseases, risk foods, botulotoxin, prevention

Tímto bych chtěla poděkovat svému vedoucímu práce MVDr. Ivanu Holkovi Ph.D. za odbornou pomoc, trpělivost a rady poskytnuté při vedení bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat své mamince a přátelům za jejich podporu a trpělivost v průběhu mého studia.

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské/diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

# OBSAH

<b>ÚVOD</b> .....	<b>10</b>
<b>1 ALIMENTÁRNÍ INTOXIKACE</b> .....	<b>11</b>
1.1    PODMÍNKY OVLIVŇUJÍCÍ VÝSKYT ALIMENTÁRNÍCH ONEMOCNĚNÍ .....	12
1.2    BAKTERIÁLNÍ TOXINY .....	13
<b>2 ROD <i>CLOSTRIDIUM</i></b> .....	<b>15</b>
2.1    MORFOLOGIE.....	15
2.2    TAXONOMIE .....	16
2.3    METODY IDENTIFIKACE BAKTERIÍ RODU <i>CLOSTRIDIUM</i> .....	16
2.3.1    Identifikační metody.....	16
2.3.1.1    Mikroskopické vyšetření.....	17
2.3.1.2    Metody kultivace bakterií rodu <i>Clostridium</i> .....	18
2.3.1.3    Biochemické metody.....	19
2.3.1.4    Detekce antigenů.....	19
2.3.1.5    Citlivost k antibiotikům .....	20
2.3.1.6    Detekce DNA mikroba .....	22
2.4    KULTIVAČNÍ PŮDY.....	23
2.4.1    Anaerobic agar AA.....	23
2.4.2    Tryptose Cycloserine Agar Base TSC.....	23
2.4.3    Krevní agar pro stanovení anaerobních mikroorganismů .....	23
2.4.4    Žlutkový agar .....	24
2.5    METABOLISMUS .....	24
2.6    CITLIVOST K ANTIBIOTIKŮM .....	24
2.7    PATOGENITA.....	25
<b>3 <i>CLOSTRIDIUM PERFRINGENS</i></b> .....	<b>26</b>
3.1    MORFOLOGIE.....	26
3.2    FYZIOLOGICKÉ VLASTNOSTI .....	26
3.3    DIAGNOSTIKA.....	27
3.4    PREVENCE .....	27
3.5    HYGIENICKÁ OPATŘENÍ .....	27
3.6 <i>CLOSTRIDIUM PERFRINGENS</i> TYPU A .....	28
3.6.1    Charakteristika .....	28
3.6.2    Rizikové potraviny .....	28
3.6.3    Klinický obraz a diagnóza.....	28
3.6.4    Výskyt .....	29
3.7 <i>CLOSTRIDIUM PERFRINGENS</i> TYPU C.....	29
3.7.1    Charakteristika .....	29
3.7.2    Klinický obraz .....	29
3.7.3    Terapie.....	29



3.7.4	Nekrotizující enteritida u kojenců .....	30
<b>4</b>	<b><i>CLOSTRIDIUM DIFFICILE</i></b> .....	<b>31</b>
4.1	MORFOLOGIE.....	31
4.2	FYZIOLOGICKÉ VLASTNOSTI .....	31
4.3	TOXIN A.....	32
4.3.1	Epidemiologie .....	32
4.3.2	Infekční dávka a rizikové faktory.....	32
4.3.3	Patogeneze.....	32
4.3.4	Terapie.....	33
4.3.5	Vliv probiotik v prevenci onemocnění vyvolaného <i>Clostridium</i> <i>difficile</i> .....	33
<b>5</b>	<b><i>CLOSTRIDIUM BOTULINUM</i></b> .....	<b>35</b>
5.1	MORFOLOGIE.....	35
5.2	FYZIOLOGICKÉ VLASTNOSTI .....	35
5.3	HISTORIE .....	36
5.4	RIZIKOVÉ POTRAVINY .....	37
5.4.1	Rizikové technologie zpracování potravin.....	38
5.5	DEKONTAMINACE.....	38
5.6	KLINICKÉ FORMY BOTULISMU.....	39
5.7	PATOGENEZE.....	39
5.7.1	Inkubační doba .....	40
5.8	TOXOKINETIKA A MECHANISMUS ÚČINKU.....	40
5.9	DIAGNOSTIKA.....	41
5.10	TERAPIE .....	42
5.11	PREVENCE .....	42
5.12	KOJENECKÝ BOTULISMUS A MED .....	43
5.13	EPIDEMIOLOGIE .....	44
5.13.1	Ve světě .....	44
5.13.2	V České republice .....	44
	<b>ZÁVĚR</b> .....	<b>45</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY</b> .....	<b>46</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK</b> .....	<b>51</b>
	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ</b> .....	<b>52</b>
	<b>SEZNAM TABULEK</b> .....	<b>53</b>

## ÚVOD

Bakterie rodu *Clostridium* jsou anaerobní sporotvorné mikroorganismy tyčinkovitého tvaru. Byly popsány v roce 1880 polským mikrobiologem Adamem Pražmowskim (\*1853 – †1920). Tento rod bakterií produkuje toxiny, které jsou nebezpečné jak pro člověka, tak i pro ostatní živočichy. Nejčastěji dochází k ochrnutím nervů nebo je zničena svalová tkáň.

V přírodě se klostridie vyskytují především v půdě, odtud potom mohou přejít do otevřené rány jako to je v případě *Clostridium tetani*. Spory klostridií kontaminují také potraviny a vyvolávají tak alimentární onemocnění. Jako příklad druhu vyvolávající infekci z potravin může být uvedeno *Clostridium perfringens*, jehož toxiny způsobují benigní otravy, ale i závažnou nekrotizující enteritidu. Nejznámějším a nejobávanějším zástupcem tohoto rodu je *Clostridium botulinum*, které produkuje botulotoxin, tzv. klobásový jed a nejsilnější bakteriální jed vůbec. Toxin může proniknout do těla několika cestami a vyvolat v organismu onemocnění zvané botulismus. Nejčastější je smíšená otrava z kontaminovaných potravin, většinou podomácku vyráběných zeleninových a masových konzerv.

Ostatní druhy klostridií produkují histotoxiny, které způsobují myonekrózy, průjmy a pseudomembránózní enterokolitidy. Tyto nemoci jsou poměrně snadno léčitelné při dodržování hygienických pravidel. Proto se vyskytují nejčastěji v oblastech s nedostatečnými hygienickými návyky.

## 1 ALIMENTÁRNÍ INTOXIKACE

Alimentární intoxikací je onemocnění vyvolané toxickými látkami, které jsou obsaženy v potravinách. Existují intoxikace (otravy) vyvolané: [1].

- bakteriálními toxiny (enterotoxikózy, botulismus),
- chemickými jedy (těžkými kovy, toxiny životního prostředí),
- přírodními toxiny obsaženými např. v houbách (mycetismus), v námelu (ergotismus),
- mrtvolnými jedy (ptomainismus)

Alimentární nákazy a intoxikace vznikají v souvislosti s příjmem potravy a tekutin, které byly napadeny mikroorganismy. Patří sem široká škála infekčních onemocnění a otrav, kdy choroboplodné zárodky pronikají do lidského organismu ústy a nacházejí se pak zejména v trávicím ústrojí. Vylučují se stolicí nebo močí. Průběh a závažnost alimentárního onemocnění ovlivňuje druh a množství mikroorganismů a také specifická reakce organismu na vniknutí mikrobů. K přenosu mikroorganismů může dojít dvěma způsoby: primárním nebo sekundárním. Primární nákaza znamená, že se mikroorganismy vyskytují v surovině nebo ve vodě, kterou používáme k přípravě pokrmů. Jde zejména o maso a vejce, obsahující mikroorganismy z nakažených zvířat. Sekundární nákaza vzniká přenesením choroboplodných zárodků na potravinu během zpracování, skladování a distribuce. Nejčastěji vzniká křížením čistého a nečistého provozu (kontaminovaná kuchyňská prkénka, nástroje, nádoby, nože, chladničky, ruce). Je třeba zajistit, aby se potraviny, které jsou již určeny ke konzumaci a nebudou se dále tepelně zpracovávat, nesetkaly se syrovými surovinami. Alimentární onemocnění se vyskytují buď ojediněle nebo v menších či větších epidemiích. [2].

Epidemiologicky rizikovými potravinami jsou potraviny určené k přímé spotřebě podle § 1 a 2 Vyhlášky MZ č. 296/1997 Sb. zejména výrobky které neprošly tepelnou úpravou: [3].

1. **masné výrobky** (např. uzené studeným kouřem, čajovky, tatarské bifteky)
2. **ryby a ostatní vodní živočichové** a výrobky z nich (zchlazené ústřice, Sushi, krevety, sušené ryby, marinované ryby)

- nebo mají charakter lahůdkářského výrobku (nepravý losos, rybí salát nebo salát z vodních živočichů)

3. **mléko a mléčné výrobky** (včetně kozího a ovčího) - přírodní nezrající nebo tvarohové sýry, pomazánky, přibináčky, budapešťské pomazánky

4. **výrobky určené pro kojeneckou a dětskou výživu**

5. **balené vody** - kojenecké a stolní vody, přírodní minerální vody a balené pitné vody

Alimentární onemocnění se vyskytují buď ojediněle nebo v menších či větších epidemiích. Ke vzniku alimentárních onemocnění přispívá cestování, táboření, hromadné akce jako jsou svatby, promoce, různé domácí hostiny, zabíjačky [2].

### 1.1 Podmínky ovlivňující výskyt alimentárních onemocnění

Po 2. světové válce došlo v průmyslově vyspělých zemích k výraznému snižování výskytu infekčních nemocí. Vymizel u nás záškrť, břišní tyfus a paratyfus, černý kašel, spalničky, dětská obrna atd. Bylo to dáno zvýšením životní úrovně obyvatelstva, zlepšením hygienických a sociálních podmínek. Ovšem tato onemocnění byla nahrazena jinými, jako např. pneumokokové nákazy, spála, AIDS nebo borelióza [3,4].

Počet otrav z potravin stoupá jak ve vyspělých zemích, tak i v zemích třetího světa. V několika posledních desetiletích se začaly intenzivněji projevovat některé faktory, které ovlivňují častější výskyt alimentárních nákaz: [3,4]. Jsou to:

1. Zvyšující se počet obyvatel na planetě a nutnost zajistit jejich obživu
2. Zvyšující se turistický ruch, riziko přenosu chorob
3. Vzrůstající mezinárodní obchod se surovinami a potravinami
4. Znečišťování životního prostředí a s tím spojená kontaminace potravin
5. Rozsáhlé používání antibiotik, rozvoj rezistence
6. Vzrůstající sortiment potravinářských výrobků, rozvoj výroby potravin určených k rychlé úpravě a spotřebě

## 1.2 Bakteriální toxiny

Bakteriální toxiny byly objeveny v 19. století. Patří mezi nejsilnější působícími toxiny v přírodě vůbec. Klobásový jed (botulotoxin) a tetanotoxin jsou nejsilnější působícími toxiny, proto jsou označovány jako „supertoxiny“. Toxiny jsou uvolňovány do potravin během růstu bakterií v kontaminované potravine [5].

V této problematice se rozlišují endotoxiny a exotoxiny.

**Endotoxiny** jsou méně termorezistentní lipopolysacharidy, které jsou přirozenou součástí buněčné stěny gramnegativních bakterií a jsou tvořeny jednou polysacharidovou částí a jednou částí lipidovou. Po odumření jejich buněk v žaludku konzumenta se endotoxiny uvolní do prostředí a dochází k otravě. Endotoxiny způsobují již v malém množství průjemy, zvracení, zvýšení teploty, pokles krevního tlaku a další symptomy. **Exotoxiny** jsou proteiny, které se tvoří a uvolňují z buňky už v potravine, kde se příslušné bakterie rozmnožili nebo v žaludku konzumenta po pozření kontaminované potraviny. Místem působení většiny exotoxinů jsou střeva, proto v této souvislosti hovoříme o enterotoxinech. Výjimku tvoří pouze toxin *Clostridium botulinum*, který je neurotoxinem. Až na toxiny *Staphylococcus aureus* a enterotoxiny patogenních *Escherichia coli* jsou termolabilní [6].

Do organismu se toxiny bakterií dostávají pozřením kontaminované potraviny. Toxiny, které poškozují buňky střeva a u postiženého jedince vyvolávají průjemy a zvracení, jsou označovány jako tzv. enterotoxiny. Onemocnění se pak nazývá enterotoxikóza. Produkce toxinů je u těchto bakterií spojena s jejich přechodem z „aktivní“ formy (tzv. vegetativní) na formu „spící“ (tzv. spory) [5].

Jiné typy toxinů zasahují především nervové buňky (tzv. neurotoxiny). K těmto toxinům patří již zmiňovaný botulotoxin a tetanotoxin [5]. Přehled jednotlivých typů toxikóz je uveden v Tab. 1.

Tab. 1. Typy toxikóz [6].

Původci enterotoxikóz	<i>Bacillus cereus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Clostridium perfringens</i> , <i>Clostridium difficile</i> , toxin A
Původci neurotoxikóz	<i>Clostridium botulinum</i> , <i>Clostridium tetani</i>
Původci myotoxikóz	<i>Clostridium histolyticum</i> , <i>Clostridium novyi</i> , <i>Clostridium septicum</i>
Původci cytotoxikóz	<i>Clostridium difficile</i> , toxin B

## 2 ROD *CLOSTRIDIUM*

Pojmem *Clostridium* označujeme velký a velmi významný rod mikroorganismů, který se vyznačuje svou citlivostí ke kyslíku a schopností tvořit klidová stádia – spory. Klostridie jsou obligátně anaerobní. Kyslík inhibuje růst a po 5-10 minutách dochází k usmrcení vegetativních buněk. Některé druhy jsou ke kyslíku méně citlivé a za omezeného přístupu vzduchu jsou schopny se pomalým způsobem rozmnožovat. Některé druhy mají proteolytické a sacharolytické účinky (jsou schopny štěpit i celulózu), některé fixují vzdušný kyslík. Při anaerobní oxidaci tak dochází ke tvorbě plynu, který má nepříznivý dopad např. v sýrařském průmyslu. Vegetativní formy mají většinou tvar tyčinek, z hlediska Gramova barvení je označujeme jako grampozitivní (G+). Z velké části jsou to saprofytické bakterie, pro člověka mají význam jako producenti hospodářsky důležitých metabolitů (výroba octa, některých enzymů...). Několik druhů tohoto rodu je však schopno vyvolat u zvířat a lidí onemocnění svou schopností produkovat toxiny. Většinou jsou tato onemocnění neslučitelná se životem [7].

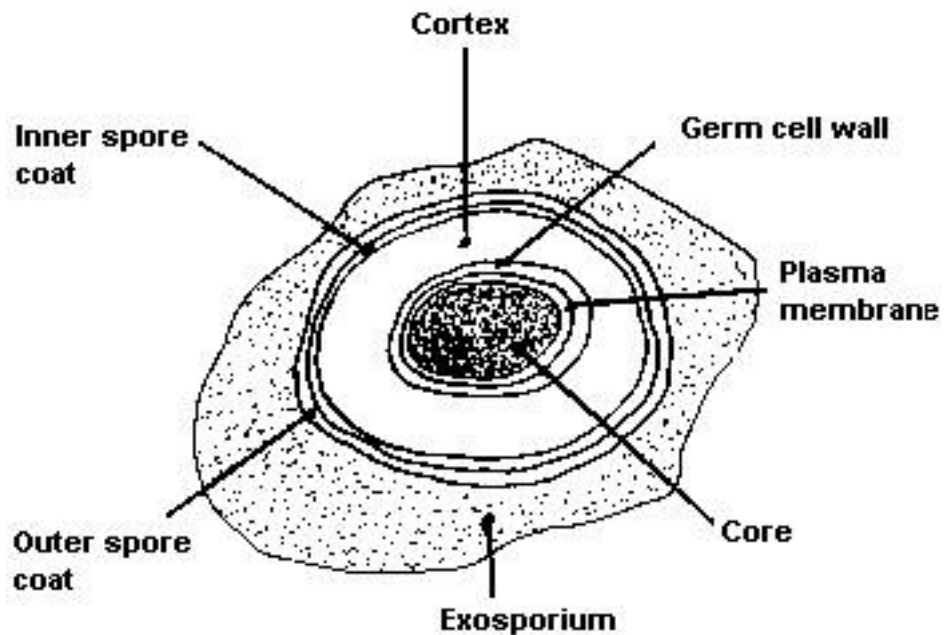
### 2.1 Morfologie

Vegetativní formy klostridií mají tyčinkovitý, protáhlý tvar, tyčinky jsou většinou rovné, mohou být ale také zahnuté, uspořádání je specifické pro jednotlivé druhy. Některé druhy tohoto rodu jsou pohyblivé díky peritrichálnímu bičíku, u některých druhů je pohyb zachycen pouze u mladých kultur, některé druhy bičík nemají, tudíž se nepohybují [7].

Spory klostridií (Obr. 1.), jsou klidové, nemnožící se formy, jimž ochranu před nepříznivými podmínkami (vyschnutí, záření, dezinfekční látky...) zajišťují obaly. Spory se od vegetativních forem liší složením, kromě vegetativních antigenů mají i své vlastní, stejně tak je ve sporách voda pevně vázaná ve sloučeninách. Spory jsou oválné, jsou uloženy subterminálně nebo i terminálně, většinou tyčinku vydouvají. Pohotovost tvořit spory se u jednotlivých druhů i zástupců téhož druhu liší a často závisí na prostředí, ve kterém se vegetativní buňky nachází (ve střevě je obvykle sporulace vydatná) [7].

Povrch klostridií je pokryt různorodými antigeny, které umožňují sérologické rozlišení kmenů téhož druhu a jeho identifikaci. Cytoplazma obsahuje velké množství volných bílkovin a nachází se v ní jak bakteriofágy, tak plazmidy, které kódují některé toxiny. Plazmidy je kódována rezistence vůči některým antibiotikům [7].





Obr. 1. Vnitřní struktura spory [52]

## 2.2 Taxonomie

Rod *Clostridium* je řazen do domény *Bacteria*, kmene *Firmicutes*, třídy *Clostridia*, řádu *Clostridiales* a čeledi *Clostridiaceae*. Třída obsahuje tři řády a řadu čeledí, i když většina zástupců je řazena taxonomicky v řádu *Clostridiales*. Všechny druhy klostridií patří do jediného rodu *Clostridium*, jenž v současnosti obsahuje přes 80 druhů [7,8].

## 2.3 Metody identifikace bakterií rodu *Clostridium*

Bakterie se rozlišují hlavně podle morfologie a barvení, které slouží jako předběžná kritéria pro zařazení neznámého kmene do příslušné skupiny.

### 2.3.1 Identifikační metody

Přímý průkaz přítomnosti mikroba (kultivace) nebo jeho částí (antigen, DNA).

- Mikroskopické vyšetření
- Kultivační vyšetření
- Biochemické testy
- Detekce antigenu

– Citlivost k ATB

– Detekce DNA

### **2.3.1.1 Mikroskopické vyšetření**

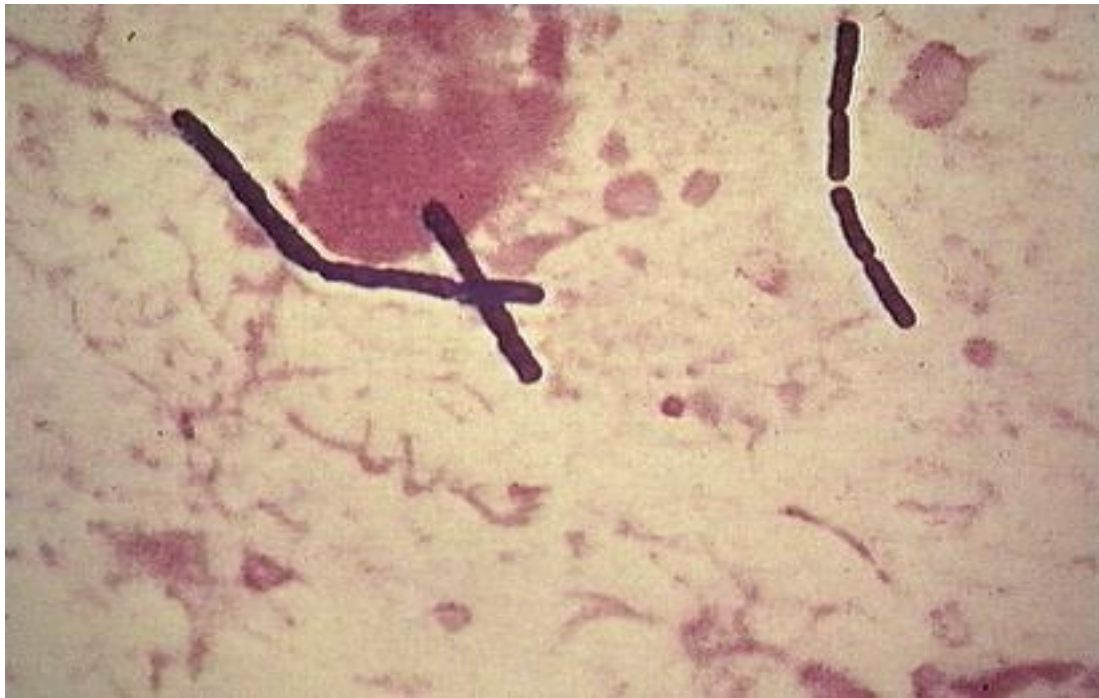
- Světelná mikroskopie

**Nativní** (nefixované a nebarvené preparáty) pozorované fázovým kontrastem nebo v zástinu – slouží jen k popisu základní morfologie.

**Fixované a barvené preparáty** – Gramovo barvení, Ziehl - Nielsenovo barvení.

#### 2.3.1.1.1 Gramovo barvení

Gramovo barvení (Obr. 2.), jež je výrazem základního rozdílu ve struktuře buněčné stěny, se třídí bakterie na grampozitivní bakterie a gramnegativní bakterie. Lze z něj získat informaci o barvitelnosti, velikosti, tvaru a vzájemném uspořádání buněk a v případě endospor o jejich umístění v buňce. Rozdíl mezi oběma skupinami je v tom, že grampozitivní bakterie po usmrcení a obarvení krystalovou violetí (trifenylmetanové barvivo) a následném moření Lugolovým roztokem (roztok jodidu draselného), zadržují komplex těchto dvou látek v buněčné stěně a neodbarvují se organickými rozpouštědly, jako je například aceton. U gramnegativních bakterií je tento komplex vymyt z buněčné stěny. Když se však po odbarvovacím procesu použije další barvivo – safranin nebo karbolfuchsin, zbarví se gramnegativní bakterie růžově a grampozitivní zůstanou fialové [9].



Obr. 2. Gramovo barvení aplikované na bakterie rodu *Clostridium* [49].

### 2.3.1.2 Metody kultivace bakterií rodu *Clostridium*

Bakterie rodu *Clostridium* patří mezi anaerobní bakterie, což znamená, že nejsou schopny růst za přítomnosti kyslíku. Podmínkou pro anaerobní kultivaci mikrobů je nízký oxidoredukční potenciál kultivačního prostředí, neboť u anaerobů neprobíhají při nevhodném redox potenciálu fosforylační reakce, které jsou nezbytné pro získání energie. U striktních anaerobů je limitující potenciál  $-200$  mV, u méně náročných anaerobů se pohybuje v rozmezí  $0$  až  $+150$  mV, kdežto půdy pro aerobní kultivaci mají hodnotu redox-potenciálu asi  $+300$  mV. Redukčního prostředí (záporné hodnoty redox potenciálu) dosahujeme v tekutých a polotuhých půdách použitím čerstvě připravené a rychle ochlazené půdy, nebo jejím povařením po dobu 20 minut a rychlým ochlazením těsně před použitím, dále přidavkem redukujících chemických substancí (nejčastěji kyseliny thioglykolové nebo její sodné soli, cysteinu, glukózy, redukovaného železa) nebo rozemleté živočišné tkáně (svalovina, játra, mozek). Lze využít i přidání malého množství agaru ( $0,1-0,3\%$ ), který podstatně omezuje difúzi vzdušného kyslíku do půdy. Takto redukované tekuté a polotuhé půdy se chrání před oxidací převrstvením povrchu sterilním parafinovým olejem. U pevných (agarových) půd používáme média čerstvě připravená nebo regenerovaná těsně před použitím a inkubujeme v anaerobní nádobě [10].

Prvním krokem je zbavit půdu přítomného kyslíku. Většinou se tak děje povařením. Následuje velmi rychlé zchlazení na teplotu 42 °C. Proběhne naočkování zvoleným inokulem, které se ihned zalévá asi 3 až 4 cm hrubou vrstvou sterilního média nebo sterilním parafínem (vazelinou či parafínovým olejem) [11].

Tato procedura se nedoporučuje dvakrát opakovat. Pevné půdy k anaerobní kultivaci se doporučuje mít uložené v anaerobní atmosféře [12].

Sporotvorné bakterie se mohou očkovat přímo do horkého média, čímž dojde k odstranění vegetativních buněk. Následně dochází k ochlazení ve vodní lázni. Pro zabránění proniknutí nežádoucího kyslíku dovnitř se musí nádoby co nejdříve dobře uzavřít. Proto je vhodné používat hermeticky uzavíratelné nádoby [11].

Po naočkování biologickým materiálem na kultivační půdy pro mikroaerofilní a anaerobní kultivaci jsou půdy následně vloženy do anaerobního boxu se směsí plynů: 80 % N<sub>2</sub>, 10 % CO<sub>2</sub>, 10 % H<sub>2</sub>. Výsledky jsou pak hodnoceny za 24 a 48 hodin, případně pro pomalý růst i déle. Naopak u rychle rostoucích anaerobních bakterií lze identifikace dosáhnout již třetí den po naočkování biologického materiálu [13].

### 2.3.1.3 *Biochemické metody*

Tyto postupy jsou založeny na schopnosti bakterií metabolizovat různé substráty, většina bakterií umí zpracovat pouze konkrétní substráty a kombinace substrátů typická pro bakterii pak tvoří její biochemický profil.

Pro biochemické stanovení bakterií rodu *Clostridium* se využívají komerčně vyráběné testové sady, například ANAEROTest 23 (Erba Lachema). U *Clostridium perfringens* je také stanovována tvorba lecithinázy, fermentace uhlohydrátů nebo extracelulární proteázy.

Pro biochemické stanovení jsou také důležité diagnostické půdy určené pro anaerobní bakterie (viz. kultivační půdy) [14,15,16].

### 2.3.1.4 *Detekce antigenů*

**ELISA** (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) je metoda, kdy je enzymaticky značená specifická protilátka (Ab) vázána na vhodný povrch (mikrotitrační destička na Obr. 3). Za přítomnosti antigenu (Ag specifické bakterie) vzniká komplex Ag - Ab. Ten je možné detekovat buď přímo spektrofotometricky, nebo vizualizovat konjugátem [17].

ELISA je obvykle nejvíce aplikovaným imunologickým formátem pro detekci toxinu *Clostridium botulinum*. Toxin ve vzorku se váže na pevnou testovací matici, která zachytává protilátky proti jednomu nebo více toxinům (sandwich ELISA). Druhá protilátka slouží jako vazebné místo pro toxin a antitoxinová molekula nese enzym, který slouží ke štěpení substrátu (např. alkalická fosfatáza). Citlivost komerčních ELISA testů je asi 10 – 100x menší, než pokusy na myších [18].



Obr. 3. Mikrotitrační destička [17]

### 2.3.1.5 Citlivost k antibiotikům

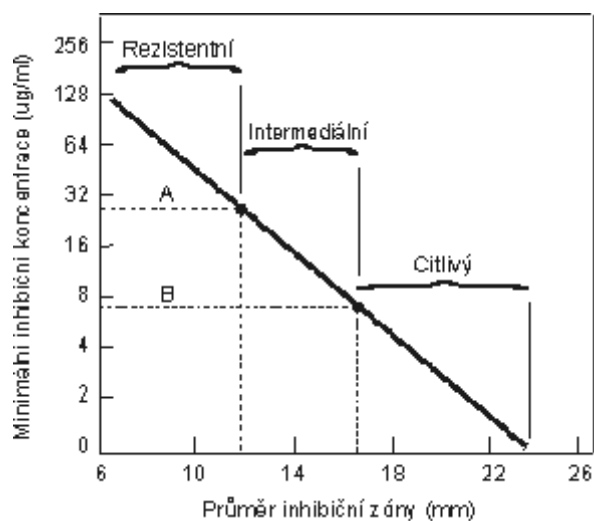
#### Disková difúzní metoda (Kirby - Bauerův test)

Nejčastější metoda. Je zde využíváno agarového média v Petriho misce – Mueller - Hinton agaru, Pro vyšetření grampozitivních bakterií (*Clostridium*) je do agaru přidávána ovčí krev, zatímco pro testování gramnegativních bakterií zůstává médium nezměněno. Antibiotikum difunduje z disku položeného na povrch naočkované agarové půdy. Hodnocení probíhá na základě měření velikosti inhibičních zón s následným porovnáním s referenčními hodnotami (Obr. 4.).

Testovaný kmen je na ATB citlivý: tzn. ATB difundující z disku zastaví růst bakteriálního kmene a dojde k vytvoření inhibiční zóny. Je však nutné však potřeba vycházet z referenčních hodnot [19].

- 1 Velikost inhibiční zóny je menší než referenční rozmezí = bakterie je k ATB rezistentní.

- 2 Velikost inhibiční zóny je větší (překračuje) referenční rozmezí = bakterie je na ATB citlivá.



Obr. 4. Interpretace diskové difúzní metody [19].

### Minimální inhibiční koncentrace

Kvantitativní vyšetření citlivosti na různé dávky antibiotik určí jeho nejmenší účinnou koncentraci, tzv. minimální inhibiční koncentraci (MIC). MIC vyjadřuje množství antibiotika (v g/ml), které potlačí růst kmene pěstovaného *in vitro*. Za citlivý je považován kmen, jehož MIC je 2x až 4x menší než koncentrace dosahovaná terapeuticky v krvi = klinický breakpoint (seznam těchto klinických breakpointů pro bakterie rodu *Clostridium* je uveden na stránce normy EUCAST, pod výčtem breakpointů pro grampozitivní anaeroby). Za rezistentní je pak považován kmen, jestliže je stupeň pomnožení při koncentraci antibiotika výrazně vyšší, než je průměrná MIC u kmenů téhož druhu. V tomto případě se jedná o získanou rezistenci. Primární rezistence vyjadřuje stav, kdy antibiotikum je primárně neúčinné na daný mikrobiální druh [19].

### E – test

Metoda pro kvantitativní vyšetření citlivosti k antibiotikům, jež je kombinací předchozích dvou metod. E – test (Obr. 5.), je komerčně vyráběný plastový proužek, chemicky inertní. Na jedné straně obsahuje exponenciální gradient koncentrací stabilizované antimikrobiální látky a na straně druhé je vyznačen kód této látky a stupnice odpovídající 15 ředěním antibiotika dvojnásobně geometrickou řadou. Stupnice je důležitá pro odečet MIC [20].



Obr. 5. Komerčně vyráběný E – test [19].

### 2.3.1.6 Detekce DNA mikroba

Metody detekce DNA mikroba jsou rozděleny do dvou úseků. Mezi hybridizační metody patří průkaz navázáním značených genových sond na specifické úseky DNA nebo RNA [17].

Dále rozlišujeme amplifikační metody, kam je zahrnut průkaz pomnožením specifických úseků DNA a z hlediska stanovení bakterií rodu *Clostridium* je významná polymerázová řetězová reakce PCR nebo metoda RFLP.

#### 2.3.1.6.2 Restrikční metoda RFLP

RFLP (polymorfismus délky štěpných fragmentů) je metoda, jejíž podstatou je enzymatické štěpení molekul DNA ve specifickém štěpném (restrikčním) místě enzymem. Vzniklé fragmenty jsou rozděleny pomocí pulzní gelové elektroforézy a na základě jejich velikosti a počtu jsou sledovány rozdíly ve studovaných sekvencích, tzv. polymorfizmy. Výhodou této metody je rychlé rozlišení taxonomických jednotek a je používána pro determinaci vysoce příbuzných druhů, např. diferencuje *Clostridium perfringens* od ostatních bakterií rodu *Clostridium* [16].



#### 2.3.1.6.1 Polymerázová řetězová reakce PCR

Tato metoda je založena na využití DNA polymerázy pro opakované kopírování templátové (vzorové) molekuly DNA. Syntéza je řízena krátkými oligonukleotidy (primery), které nasedají na templátovou DNA na začátku a konci amplifikovaného fragmentu, každý s jiným vláknem původní dvouřetězcové DNA. PCR je velice citlivá metoda umožňující detekce jediné buňky. Mnohonásobné amplifikace je dosaženo opakováním tří základních kroků - denaturace, hybridizace a syntézy nových vláken [17].

## 2.4 Kultivační půdy

Ke kultivaci klostridií slouží několik živných půd. Zde je uveden jejich výčet.

### 2.4.1 Anaerobic agar AA

Anaerobní agar obsahuje sojový pepton, pepton z kaseinu, dextrózu, thioglykolát sodný, sulfoxyformaldehyd sodný a metylenovou modř a slouží ke stanovení anaerobních bakterií. Počet kolonií na živné půdě odpovídá počtu bakteriálních kolonií ve zkoumané potravíně, popř. příslušnému ředění [21].

### 2.4.2 Tryptose Cycloserine Agar Base TSC

Slouží ke stanovení a kultivaci bakterií *Clostridium perfringens*. Kultivace je založena na lecithinázové reakci díky přidání žloutkové emulze a tvorbě sirovodíku, kterou lze detekovat v závislosti na obsahu disiřičitanu sodného a citrátu železitoamonného. Redukce lecithinu má za následek matnou zónu v oblasti výskytu kolonií, redukce siřičitanu pak černou barvu kolonií v důsledku zčernání indikátoru citrátu železitoamonného při reakci se sirovodíkem [21].

### 2.4.3 Krevní agar pro stanovení anaerobních mikroorganismů

Má podobné složení jako Blood Agar Base, skládá se tedy ze směsi srdcového extraktu, peptonů, NaCl a agaru. Na rozdíl od základního krevního agaru, má tento agar 5-10 % obsah beraní krve [21].

#### 2.4.4 Žlutkový agar

Slouží k identifikaci klostridií (průkaz tvorby lecitinázy a lipázy). *Clostridium perfringens* - v okolí kolonie je patrná precipitace [22].

### 2.5 Metabolismus

Klostridie jsou anaerobní bakterie, jejich citlivost ke kyslíku je dána jednotlivými druhy bakterií, nikdy se však nemnoží při kontaktu s kyslíkem a normální atmosférického tlaku. Ke striktním anaerobům patří druh *Clostridium haemolyticum*, snášející koncentraci kyslíku pouze do 0,5 %, naopak k tolerantnějším druhům patří *Clostridium perfringens* (do 5 %). V nedávné době bylo poukázáno na výskyt druhů extrémně citlivých ke kyslíku, ve střevě myši a křečků. Tyto druhy jsou označovány jako EOS (Extreme Oxygen Sensitive) a snáší koncentraci kyslíku pouze do 0,1 %. Lze však říct, že většina druhů je středně striktně anaerobní. Podstatou citlivosti klostridií ke kyslíku je fakt, že nemají katalázu, cytochrom, cytochromoxidázu, superoxididismutázu a téměř nulovou peroxidázu. Vzniklé peroxidy a superoxidy nemohou být bakteriální buňkou rozloženy a buňku otráví. Prostředí se záporným oxidoredukčním potenciálem (redukované), naopak umožňuje klostridiím pomnožovat se i při vyšší koncentraci kyslíku. energii pro životní procesy získávají klostridie z anaerobní glykolýzy. Nefermentující klostridie mohou energii získávat z tzv. Sticklandovy reakce (oxidoredukce mezi dvěma aminokyselinami). Podle toho z jakých substrátů získávají energii, se dělí na několik druhů: na druhy, které fermentují sacharidy, na druhy, které štěpí aminokyseliny z bílkovin a peptonů, na druhy, jež jsou schopny využívat jak sacharidy, tak proteiny a poslední skupinou jsou druhy, pro něž jsou substrátem puriny a pyrimidiny. Mezi biochemické produkty metabolismu patří jak organické kyseliny, alkoholy, plyny – sirovodík, vodík, amoniak, indol, skatol, enzymy [7].

### 2.6 Citlivost k antibiotikům

Všechny druhy klostridií jsou rezistentní na aminoglykosidová antibiotika (např. Streptomycin). Všechny druhy jsou citlivé k  $\beta$ -laktamovým antibiotikům, nejvíce pak k penicilinu G. Inhibují je také cefalosporiny. Vysoký účinek proti klostridiím má deoxylinkomycin nebo clindamycin. Klostridie inhibují dále tetracykliny, erytromycin a chloramfenikol. Jsou také citlivé na imidazolové preparáty. Citlivosti k antibiotikům se liší více či méně druhem, tak i v rámci jednoho druhu. Byla také zaznamenána rezistence získaná [7].

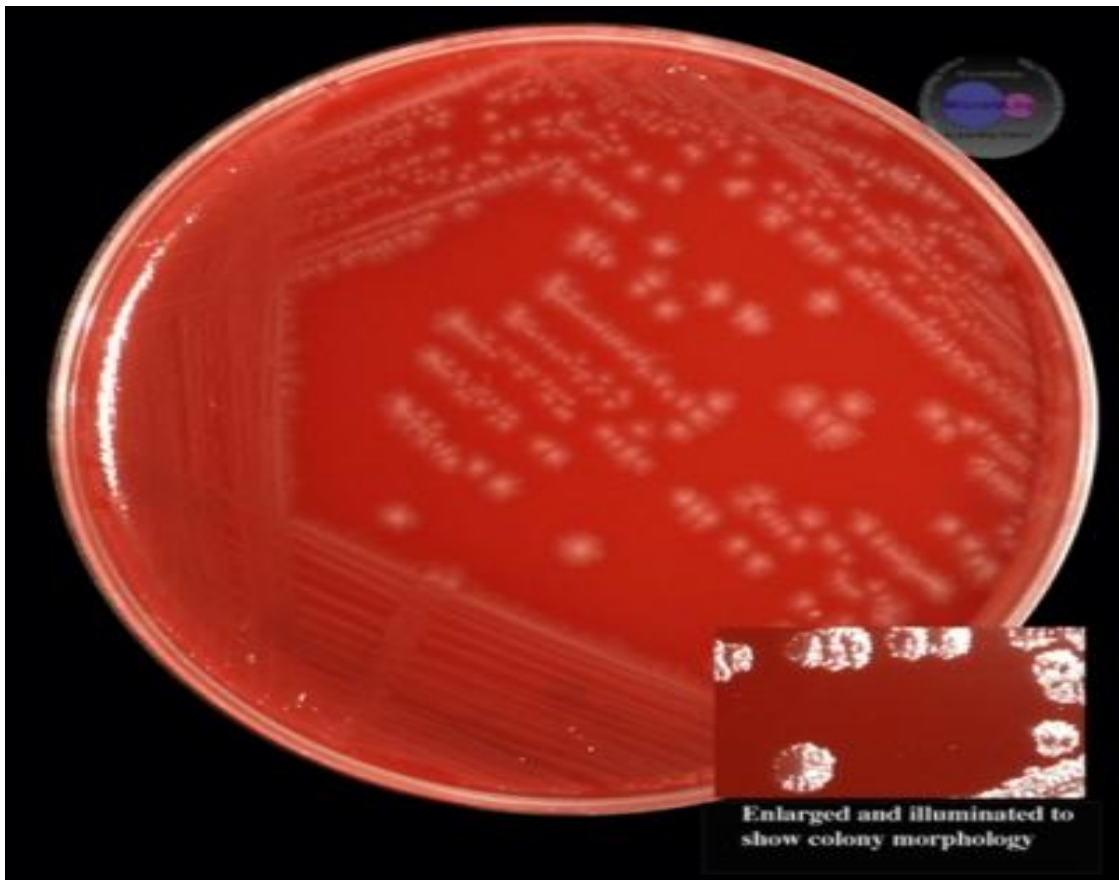
## 2.7 Patogenita

Klostridie jsou schopny vyvolat tři typy onemocnění: neurointoxikace, histointoxikace (nekrotizující toxoinfekce měkkých tkání a nitrobřišních orgánů obsahující svalovinu) a enterotoxikózy (chorobné procesy, jež se odehrávají ve střevě – průjmy, nekrotizující enterokolitida) [7].

### 3 *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS*

#### 3.1 Morfologie

Vegetativní buňky jsou nepohyblivé, ve většině případů silné, G+ tyčinky, krátké i dlouhé tyčinky. Někdy bývají opouzdřené polysacharidovým obalem. Spory jsou oválné a buňku vydouvají a jsou poměrně termorezistentní [7].



Obr. 6. Kolonie *Clostridium perfringens* [50].

#### 3.2 Fyziologické vlastnosti

*Clostridium perfringens* roste nejlépe při teplotě mezi 43 až 47 °C, může růst i při teplotě -12°C i při 50 °C, ale nikdy neroste při teplotě nižší než -12 °C. Roste v rozmezí pH 5,5 až 9,0, má minimální hodnotu aktivity vody a roste anaerobně. Může však růst také ve vysoce aerobním prostředí. Bakteriální buňky lze usmrtit horkem, ale spory jsou velmi termorezistentní, přežívají i hodinový var. Spory jsou inaktivovány chlornanem při hodnotě pH 8,5 nebo pod UV lampou. *Clostridium perfringens* produkuje 12 toxinů, včetně 4 letálních –

hemolýzy, proteázy, neuraminidázy a enterotoxin. Otravy potravinami způsobují jen ty kmeny *Clostridium perfringens* typu A, které tvoří polypeptidový enterotoxin s molekulovou hmotností 3,5 kDa. Identické exotoxiny produkují i určité kmeny typu C a D. Otrava touto bakterií nastává při vysokém kontaminování potravin *Clostridium perfringens*, při koncentraci  $10^6 \text{ g}^{-1}$ . Toxin je tvořen při sporulaci, která ve většině případů probíhá až v tenkém střevě člověka [7,23].

### 3.3 Diagnostika

Laboratorní diagnostika *Clostridium perfringens* v potravinách využívá detekci typu toxinu přítomného ve výkalech nemocného nebo testy, jenž určí počet kolonií bakterie ve výkalech. *Clostridium perfringens* je často normální součástí střevní mikroflóry, je k diagnostice zapotřebí nejméně  $10^6$  spor *Clostridium perfringens* na 1 gram stolice do 48 hodin od doby, kdy se projeví první příznaky [7].

### 3.4 Prevence

Potraviny, běžně spojené s infekcí jako je hovězí a drůbeží maso a omáčky, by měly být důkladně vařeny na teplotu alespoň  $145^\circ\text{C}$  -  $165^\circ\text{C}$  a pak udržována při teplotě, která je buď teplejší než  $140^\circ\text{C}$  nebo chladnější než  $41^\circ\text{C}$  po tepelném zpracování. Pokrmy z masa by měly být podávány teplé hned po vaření. Zbytky se musí být ohřívat na teplotu alespoň  $165^\circ\text{C}$  před podáváním. Zbylé potraviny musí být udržovány v chladném prostředí [24].

### 3.5 Hygienická opatření

Pravidla správné hygienické a výrobní praxe - mikrobiologické požadavky na potraviny [25].

<i>Clostridium perfringens</i>	nejvyšší mezní hodnota
Potraviny určené k přímé spotřebě	$10^5 / \text{g (ml)}$
Potraviny určené k přímé spotřebě	$10^4 / \text{g (ml)}$
Potraviny určené pro kojeneckou a dětskou výživu	$10^2 / \text{g (ml)}$

## 3.6 *Clostridium perfringens* typu A

### 3.6.1 Charakteristika

*Clostridium perfringens* typu A je původcem nejčastější klostridiové otravy způsobené potravinami. Je popsána jako akutní průjmové onemocnění s prudkými křečemi v břiše, po krátké inkubační době. (8 – 16 hodin) [26].

### 3.6.2 Rizikové potraviny

Potravinami, které mohou způsobit otravu tímto typem bakterie, jsou nejčastěji pokrmy z hovězího masa, drůbeže a také masové omáčky. Nejrozšířenějším zdrojem otravy je maso, ale také bezmasá jídla mohou být kontaminována touto bakterií. V takových případech jsou infekčními agens masové omáčky. Otrava z potravin se objevuje zejména v zimních a jarních měsících. Podle americké studie se spory *Clostridium perfringens* vyskytovaly v 6 % z celkových 510 různých potravin. Výskyt v potravinách dle této studie je popsán v Tab. 2. [26,27].

Tab. 2. Výskyt *Cl. perfringens* v potravinách [27].

Procentuální zastoupení	Druh potraviny
2,7 %	Zmražené potraviny
3,8 %	Ovoce a zelenina
16,4 %	Syrové maso, ryby, drůbež
14 – 24 %	Telecí, hovězí a vepřové maso

Zkoumané hovězí, telecí a vepřové maso obsahovalo žáruvzdorné endospory, zatímco všech 17 vzorků hodnoceného jehněčího masa bylo na průkaz *Clostridium perfringens* negativní. Bylo prokázáno, že tepelné zpracování nedokáže usmrtit tepelně odolné endospory. Při ochlazování a opětovném ohřátí pokrmu spory klíčí a rostou [27].

### 3.6.3 Klinický obraz a diagnóza

Do několika hodin po požití kontaminované potraviny dochází k bolestem břicha, ihned poté k průjmům. Horečka a zvracení se objevují vzácně. Diagnóza je obtížná, protože

*Clostridium perfringens* se normálně vyskytuje ve střevní mikroflóře. Tento patogen má být izolován ze stolice a také ze stravy v množství  $10^5$ /g a musí jít o shodný sérotyp jak v potravině, tak i ve stolici. Průběh onemocnění je benigní a k vyléčení stačí dostatečná rehydratace organismu [26].

#### 3.6.4 Výskyt

Výskyt je monitorován nejčastěji v epidemiích, kdy v jedné epidemii průměrně onemocnělo 80 lidí. Počty hlášených epidemií však ukazují jen zlomek skutečného výskytu, protože řada epidemií proběhne jako akutní průjmové onemocnění nejasné etiologie. Laboratorní průkaz toxinu *Cl. perfringens* a záchyt mikroba v potravinách není častý [26].

Epidemie závažného onemocnění s vysokou letalitou vyvolané *Cl. perfringens* typu C společně s nekrotizující enteritidou byly hlášeny po II. světové válce v Německu a Nové Guineji, od té doby ojediněle [28].

### 3.7 *Clostridium perfringens* typu C

#### 3.7.1 Charakteristika

*Clostridium perfringens* typu C vyvolává nekrotizující enteritidu. Toto onemocnění bylo poprvé popsáno po 2. světové válce v Německu a v oblasti Nové Guineje. K onemocnění dochází u hladovějících lidí, u pacientů po resekci pankreatu, po resekci žaludku, u alkoholiků trpících malnutricí [26].

#### 3.7.2 Klinický obraz

Dochází k nechutenství, zvracení, bolestem břicha, objevují se krvavé řídké stolice, dochází také k toxémii a šoku. Onemocnění může mít rychlý nebo vleklý průběh (i několik týdnů). Během vleklého průběhu nemoci se mohou vyskytnout komplikace – zánět tenkého střeva, peritonitida. Prognóza je vážná, až 50 % postižených nemoci podléhá [26].

#### 3.7.3 Terapie

Je třeba podat hyperimunitní sérum. V případě chirurgických komplikací se provádí resekce nekrotické části střeva [26].



### 3.7.4 Nekrotizující enteritida u kojenců

Nekrotizující enterokolitida nebo také enteritida je závažné, život ohrožující onemocnění GIT. Postihuje ve většině případů novorozence s porodní hmotností pod 1500 g. Onemocnění se projevuje nejčastěji během prvních 10 dnů života, k výskytu příznaků obvykle nedochází, protože jejich výskytu předchází zahájení perorálního příjmu potravy. Významnou roli hraje i nevyvinutý imunitní systém novorozenců. Výskyt NEC u kojenců je 5-10%. Nejvyšší výskyt je hlášen u dětí s porodní hmotností pod 1000 g a incidence klesá s rostoucí porodní hmotností. Jen velmi zřídka se nekrotizující enteritida vyskytuje u novorozenců narozených v termínu [29].

Onemocnění spočívá v poruše střevní sliznice. Ta je narušena nedostatečným krevním zásobením, jež je přeměřováno hlavně k mozku a srdci na úkor např. kůže, ledvin a GIT. Poškození střeva je různé, od slizničních změn (edém, prokrvácení) po gangrenózní a koagulační nekrózu celé stěny. Onemocnění může postihovat jeden úsek střeva, více úseků anebo může být postiženo více než 75 % střeva. Onemocnění se objevuje nejčastěji během prvních dnů po porodu. Dítě je apatické, zvrací a má vzedmuté břicho. Častý je edém břišní stěny s diskolorací. Stolice může být kombinována s přítomností krve ve stolici. Léčba zahrnuje nutné ukončení perorálního příjmu, antibiotickou léčbu v kombinaci s imunoglobuliny. Při komplikacích nekrózou a perforací střeva je nutné chirurgické řešení. Bylo navrženo, že enterální podávání probiotik předčasně narozeným dětem by mohlo zabránit infekci a tak předcházet NEC [29,30].

## 4 CLOSTRIDIUM DIFFICILE

### 4.1 Morfologie

*Clostridium difficile* (Obr. 7.), je grampozitivní tyčinka vyskytující se ve dvou formách. Buď jako štíhlá tyčinka s cylindrickými spory, které málo vydouvají vlastní bakterii nebo jako mohutné tyčinky, jejichž spory tyčinku vydouvají mnohem více. Ve střevě tato bakterie hojně sporuluje, při metodě in vitro je sporulace nižší, je však možné ji zvýšit přidáním žlučových solí a žloutku. Spory nejsou tak odolné vůči teplotě, jako u jiných druhů [7].



Obr. 7. Kolonie *Clostridium difficile* [51].

### 4.2 Fyziologické vlastnosti

Kolonie *Clostridium difficile* jsou málo pohyblivé. Krevní ani žloutkový agar nemění. Na půdách s vitamínem K a s heminem světle zeleně fluoreskují [7].

*Clostridium difficile* kvasí celé spektrum sacharidů, z bílkovin pouze želatinu, a to do 48 hodin. Bakterie je vysoce citlivá na vankomycin, ale je odolná vůči cefoxitinu a klindamycinu. Genom *Clostridium difficile* byl již kompletně zmapován. Vegetativní forma bakterie produkuje dva termolabilní proteinové toxiny: A (enterotoxin) a B (cytotoxin). Toxin

A způsobuje hypersekreci tekutin a hemoragicko-zánětlivý proces na sliznici střeva. Toxin B odpovídá za apoptózu ovlivněním aktinového cytoskeletu buňky [31].

## 4.3 Toxin A

### 4.3.1 Epidemiologie

Od roku 2002 je v Severní Americe, Evropě a Asii hlášen vyšší výskyt CDAD (*Clostridium difficile* associated disease) s mnohem těžším průběhem onemocnění, vyšší letalitou, tendencí k relapsům, delší dobou hospitalizace a zvýšenými náklady na terapie. Zprávy uvádějí onemocnění CDAD i ve skupině lidí, která byla dříve považována za minimálně ohroženou, např. mladší pacienti, těhotné ženy a ženy po porodu, ambulantní pacienti, pacienti bez anamnézy užívání antibiotik. Tyto epidemie jsou převážně spojeny s infekcí kmenem *Clostridium difficile*, v literatuře uváděným jako NAP1 (North American pulsed-field type 1). Tento kmen je hypertoxigenní, má schopnost epidemického šíření vzhledem k větší odolnosti jeho spor a vysoké rezistenci vůči různým antibiotikům [31].

### 4.3.2 Infekční dávka a rizikové faktory

Infekční dávka: Vylučováno je až  $10^9$  mikrobů v 1 g stolice. Infekční dávka je několik desítek až stovek spor. Může zamořit prostředí až na celé měsíce, v nemocnicích často ARO, JIP. Některá oddělení mají vysokou kolonizaci (až 57 %) [32].

Rizikovými faktory jsou především antibiotická léčba podávaná před rozvojem onemocnění a potlačení fyziologické mikroflóry. Častý vznik je po linkosamidech, aminopenicilínech, cefalosporínech, fluorochinonech. Dále snížení střevní motility: operace GIT, ulcerózní kolitis, ileus, imobilizace, gravidita, podávání léků tlumících peristaltiku. Věk nad 60, nejčastěji kolem 80 let. Chronické nemoci, onkologická onemocnění, malnutrice, imunosuprese. Hospitalizace, hemodialýza, stav po narkóze [32].

### 4.3.3 Patogeneze

Projevuje se ve většině případů jako akutní průjmové onemocnění, které může být doprovázeno horečkou a zvracením. Závažnější formy charakterizuje bolest břicha, plynatost a postupné oslabení střevní peristaltiky směrem k ileu. U mladších osob může být mírnější forma onemocnění, často bez horeček a zvracení. Bývá nevolnost, nechutenství, vyčerpání,

bolestivý pohmat břicha, někdy vysoký C – reaktivní protein. U starších nemocných může nastávat těžší průběh. Nejtěžší formou této kolitidy je tzv. toxické megakolon s enormní dilatací střevních kliček. Příznaky klostridiové kolitidy vyvolané toxinem A, uvádí Tab. 3. [31,33].

Tab. 3. Příznaky kolitidy vyvolané *Cl. difficile* [33].

- horečka >38,5 °C
- zimnice a třesavky
- hemodynamická nestabilita včetně septického šoku
- známky peritonitidy
- paralytický ileus
- leukocytóza > 15 x 10<sup>9</sup>/l
- posun doleva (> 20 % tyčí v diferenciálu leukocytů)
- vzestup kreatininu v séru (>50 % nad obvyklou hodnotu)
- vzestup hladiny laktátu v séru
- pseudomembranózní kolitida zjištěná koloskopicky

#### 4.3.4 Terapie

U mírné až středně závažné infekce se podává metronidazol 3 x 500 mg p. o. nebo i. v., po dobu 10 – 14 dnů. Alternativa 4 x 250 mg. Orálně se dobře vstřebává, do tlustého střeva se dostane krví. Infekce závažná: ( leukocyty více než 15000 ul nebo kreatinin více nebo roven jedenapůlnásobek normálu): vankomycin 4 x 125 mg p. o. na 10 – 14 dnů [33].

Ileus: vankomycin 4 x 500 mg + metronidazol 3 x 500 mg i. v., eventuálně 4 x 500 mg a 100 ml FR rektálně. Orálně, pokud existuje peristaltika. Další i. v.: imunoglobuliny [33].

Megacolon: vankomycin v klyzmatu 500 mg po 4 hod., současně s metronidazolem 500 mg 3 x denně i. v. Subtotální kolektomie (se zachováním rekta) je život zachraňujícím výkonem [33].

#### 4.3.5 Vliv probiotik v prevenci onemocnění vyvolaného *Clostridium difficile*

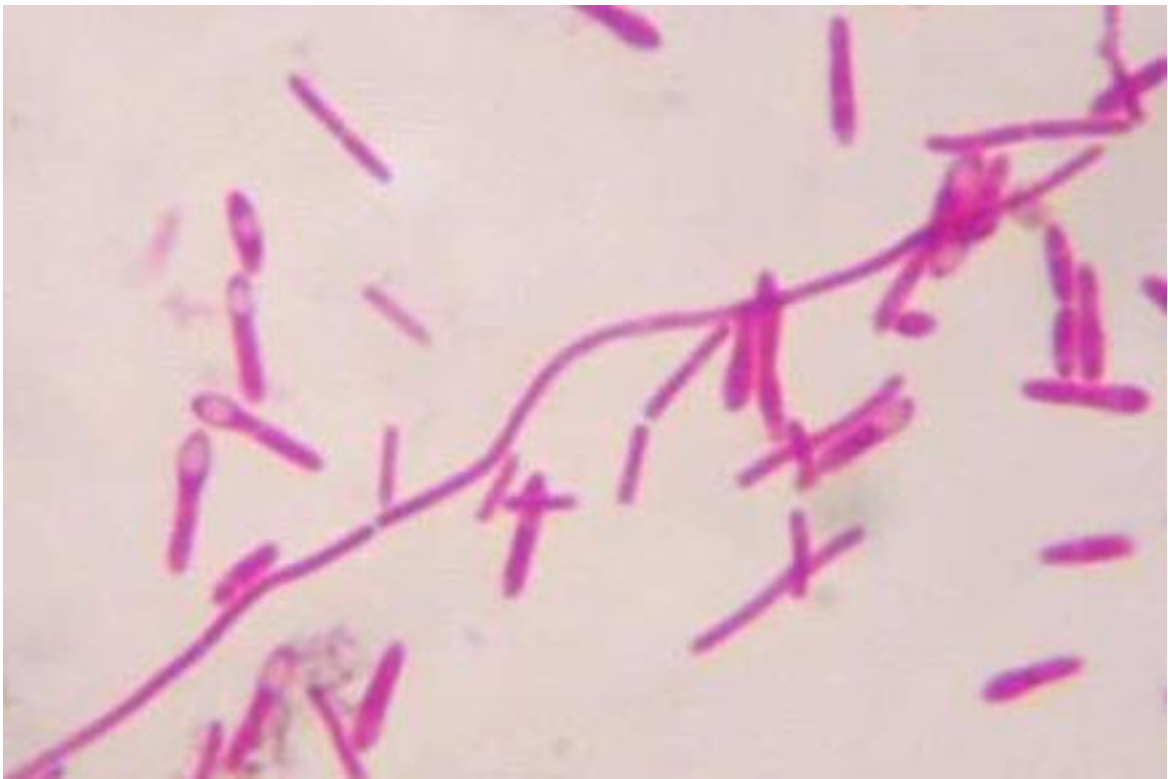
Při léčbě širokospektrými antibiotiky (např. po aminopenicilínech, cefalosporínech či chinolonech) se objevují střevní potíže v 5–30 % případů. Projevem této postantibiotické dysmikrobie jsou obvykle průjmy, které mohou mít závažný až fatální průběh. Příčinou je nejčastěji kolitida po podání antibiotika, vyvolaná toxinem *Clostridium difficile* [34].

Analýzou klinických studií byla prokázána účinnost některých probiotik v rámci prevence i terapie postantibiotické dysmikrobie. V doporučení Evropské společnosti pro pediatrickou gastroenterologii, hepatologii a výživu (ESPGHAN) z roku 2008 se probiotika na základě řady klinických studií, ve kterých byl prokázán jejich vliv na potlačení patogenních kmenů a obnovu fyziologické mikroflóry, uvádějí jako účinný doplněk k léčbě akutních průjmových onemocnění. Mezi nejvýznamnější v této problematice patří některé kvasinky rodu *Saccharomyces* a bakterie rodu *Lactobacillus* a *Bacillus*. Řada lékařů používá bakterie rodu *Lactobacillus* pravidelně jako prevenci v boji proti onemocněním vyvolaným *Clostridium difficile*. Pro účinek probiotických kmenů v průběhu antibiotické léčby je důležitá nejen jejich účinnost, ale také rezistence probiotika vůči užívaným antibiotikům. Největšímu zájmu se těší bakterie rodu *Lactobacillus*, jako velmi zajímavé z hlediska možného využití v prevenci postantibiotické dysmikrobie. Dále se jako perspektivní jeví bakterie rodu *Bacillus*, např. *Bacillus subtilis*. K významným probiotikům z této skupiny patří i *Bacillus clausii*, který patří k nejprobádanějším probiotikům z hlediska rezistence vůči antibiotikům a nepřenosnosti této rezistence na patogenní mikroorganismy [35,36].

## 5 *CLOSTRIDIUM BOTULINUM*

### 5.1 Morfologie

Tyčinky *Clostridium botulinum*, mají tvar charakteristický pro tento rod, jsou kratší, pohyblivé, šířka dosahuje asi 1  $\mu\text{m}$ , přičemž typ A je tenčí a typy E a G jsou mohutnější, šířka dosahuje asi 1,6  $\mu\text{m}$ . Délka je až 10  $\mu\text{m}$ . Spory (Obr. 8.) jsou oválné a tyčinku vydouvají. Jsou středně termorezistentní, ale některé mohou přežít až několikahodinový var. Rezistence spor typu E je proti výraznému teplu, záření i pH nižší [7].



Obr. 8. Spory *Clostridium botulinum* [44].

### 5.2 Fyziologické vlastnosti

Na krevním agaru tvoří kruhové, bělavé kolonie obklopené zónou úplné hemolýzy. Všechny typy až na typ G produkují lipázu. Typ G hydrolyzuje želatinu a natravuje masové částky vložené do tekuté půdy [7].

*Clostridium botulinum* jsou telurické (půdní), saprofytické mikroorganismy. Nejsou normální součástí střevní mikroflóry. Patří mezi tzv. neurotoxické klostridie, které vyvolávají otravu nervové soustavy – botulismus [7].

Pod název *Clostridium botulinum* patří 4 biologicky odlišné skupiny těchto mikroorganismů, jež jsou nositelem neurotoxinu stejných vlastností, ale jiného antigenu [7].

1 skupina: Proteolytické kmeny, které tvoří botulotoxiny typu A, B a F. Zdroje: polokonzervy, domácí konzervy (uzeniny, paštiky, vepřové maso, zeleniny, ryby), u typu F domácí játrová paštika. Vnímavými osobami jsou člověk, kuřata, norci, koně, vodní ptáci [7].

2 skupina: Sacharolytické kmeny, tvořící botulotoxiny typu B, E a F. Zdroji botulotoxinu typu E jsou syrové a zkažené mořské plody, nebezpečný je tento toxin jak pro mořskou faunu, vodní ptáky a lišky, tak pro člověka. Typy B a F jsou popsány výše [7].

3 skupina: Botulotoxiny typu C a D. Zdroji botulotoxinu jsou mršiny, alkalické rybníky, tlející rostliny. Vnímavými druhy jsou hlavně hovězí dobytek a kuřata, v případě botulotoxinu C také vodní ptáci a psi [7].

4 skupina: Proteolytické kmeny produkující botulotoxiny typu G. Hlavním zdrojem tohoto typu toxinu je půda a druhy vnímavé k tomuto typu toxinu jsou kromě člověka také primáti, kuřata a morčata [7].

### 5.3 Historie

První zmínka o otravě botulotoxinem vzešla od německého básníka, lékaře a spisovatele dr. Justina Christiana Kernerera (1786 – 1862). První případ, o kterém tehdy Kerner psal, bylo podivné úmrtí člověka po požití domácí klobásy. Kerner se domníval, že smrt nastala z přemíry mastných kyselin, které klobása obsahovala. Otravu pojmenoval botulismus (botulus – klobása) [37].

Bakterii *Clostridium botulinum* poprvé izoloval a jako původce botulismu určil Pierre Maria van Ermengen, žák Roberta Kocha, v roce 1897. Hermannu Sommerovi se roku 1920 podařilo poprvé izolovat botulotoxin typu A a v roce 1949 byl Burgenem objasněn mechanismus jeho účinku jako blokaci nervosvalové ploténky [37].

V klinické praxi byl botulotoxin poprvé využit v roce 1981 Alanem Scottem při léčbě strabismu. Koncem minulého století se začíná hovořit o možnosti využití botulotoxinu jako biologické zbraně. Bylo potvrzeno, že některé země ho měly v minulosti ve své výzbroji. Posléze se objevuje informace, že botulotoxin je předmětem zájmu teroristů a při vysoké toxicitě jakou botulotoxin má, nelze toto riziko podceňovat. I přesto, že botulotoxin nachá-

zí v dnešní době pozitivní uplatnění v kosmetickém průmyslu a medicíně, mohl by být jeho účinek zneužit k vyhlazování lidí [37].

#### 5.4 Rizikové potraviny

Potenciálně nebezpečnými potravinami jsou zejména kontaminované konzervované výrobky. Kromě nich sem patří také uzené šunky, klobásy, salámy, solené a uzené ryby [38].

Mezi další potraviny patří také zelenina s vyšším pH (kukuřice, fazole, mrkev), některé koření, nakládaná cibule, česnek v oleji, nakládané ořechy, arašídny, nedostatečně vykuchané ryby, jogurty nebo vybrané druhy měkkých sýrů [39].

Byly popsány otravy z různých domácky připravovaných omáček, např. ze sýrových, brambor pečených v oleji, z paštiky, klobásy, huspeniny, sekané, mandlí, ale také z jahodového kompotu [2,38,39].

Riziko intoxikace je největší při domácí přípravě masových nebo zeleninových konzerv. Spory, přítomné na nedostatečně umyté zelenině nebo špatně vypláchnutých střevech zvířat (domácí zabijačky). Za optimálních podmínek se ze spor vyvinou bakterie *Clostridium botulinum* a začnou produkovat toxin. Kmeny *Cl. botulinum* jsou uvedeny v Tab. 4. [28].

Tab. 4. Kmeny *Cl. botulinum* a jejich vlastnosti [27]

Vlastnosti	Proteolytické kmeny (A, B, F)	Neprteolytické kmeny (B, E, F)
Obzvlášť ohrožené potraviny	Typ A: zeleninové a masové konzervy Typ B: masové výrobky Typ F: maso a masové výrobky	Typ B: masové výrobky Typ E: ryby a rybí výrobky Typ F: maso a masové výrobky
Minimální hodnota pH	4,6	5,0
Minimální hodnota růstu	10 °C	3 °C
Maximální hodnota růstu	48 °C	45 °C

**Příklad rizikové potraviny:** Státní zemědělská a potravinářská inspekce (SZPI) nařídila ke dni 31. 10. 2011 okamžité stažení plněných bio oliv značky „Bio Gaudiano“ (Obr. 9.), vyrobených v Itálii, z tržní sítě. Důvodem opatření byl nález botulotoxinu. Výrobek byl



distribuován i do České republiky, konkrétní kontaminovaná šarže původem z Finska, se však do české tržní sítě nedostala. Oznámení o přítomnosti botulotoxinu v tomto druhu potravin obdržela SZPI díky systému rychlého varování pro potraviny a krmiva (RASFF), který spojuje země Evropské unie. Potravinářská inspekce vykonala kontrolu u českého dovozce a přijala opatření nutná k ochraně spotřebitelů [40].



Obr. 9. Kontaminované bioolivy [40]

#### 5.4.1 Rizikové technologie zpracování potravin

Z pohledu potravinářské technologie je důležitým sdělením, že spory *Clostridium botulinum* jsou velmi odolné, vydrží několikaminutový var, některé přežijí i teplotu 121 °C po dobu 2 – 3 minut. Pokud při tepelném opracování potravin, které by mohly nebo obsahují spory, nedojde k účinnému působení teploty, ať z hlediska její výše nebo doby působení, spory prožijí pouze teplotní šok. Pokles teploty do oblastí příznivých pro množení a růst (tj. pH 4,5 – 8,5, rozmezí teplot 3,3 – 50 °C) má za následek klíčení spor, množení klostridia a produkci botulotoxinu v potravine. Toxin může být inaktivován varem. Snížení pH potraviny poté, co v ní byl již toxin vytvořen, nevede k inaktivaci botulotoxinu [41].

#### 5.5 Dekontaminace

I přes skutečnost, že je botulotoxin vysoce toxický, lze jej poměrně lehce inaktivovat. Kontaminované potraviny, nápoje atd. musí být podrobeny záhřevu 85° C minimálně na 5 minut. Spory jsou mnohem odolnější, ničí je až 30 minutový vaření při teplotě 120 °C. Jedním z důležitých faktorů limitující růst těchto mikroorganismů je snížení vodní aktivity,

zvýšení obsahu chloridu sodného a uchovávání výrobků a potravin v chladnu. Dekontaminační účinky mají také dusitany. Výrobky, u nichž se prokázal výskyt botulotoxinu, musí být neprodleně staženy z prodeje a poslané k laboratornímu zpracování. Předměty napadené botulotoxinem jsou dezinfikovány 0,1 % chlornanem sodným nebo se nechají na pár dní odležet. Personál a ošetřující lékař, který se stará o pacienta s botulismem, dodržuje obvyklý režim práce. Pacienta není nutné izolovat [39].

## 5.6 Klinické formy botulismu

1. Alimentární botulismus – otrava z potravin [7,26,39].
2. Dětský botulismus – týká se dětí mladších než 1 rok života. Toxin napadá trávicí systém. Tento typ botulismu je dáván do souvislosti s požitím medu [7,39].
3. Raný botulismus – kontaminace sporami *Clostridium botulinum* do otevřené rány [7,39].

## 5.7 Patogeneze

Mezi první příznaky otravy botulotoxinem patří postižení hlavových nervů s charakteristickými projevy - sucho v ústech, chrapot, potíže s polykáním, hypomimie, neostře vidění atd. Pokud jde o smíšenou otravu, tj. z potravin, je možné pozorovat i poruchy trávicí soustavy jako nevolnost, zvracení, zácpa, později se může objevit až paralytický ileus [26,42]

Botulismus probíhá jako akutní, nehorečnatá a chabá obrna, začínající obrnou hlavových nervů. Intenzita může být různá, u raného botulismu lehká, v jiných případech může nastat až těžký komatózní stav s nutností umělého dýchání. Rychlost vzniku a rozsahu onemocnění závisí na množství botulotoxinu v krvi. Neléčení pacienti umírají na následek obrny dýchacích svalů, nemožnosti nádechu z důvodu obrny bránice a přídatných dýchacích svalů. Nemocný trpí úzkostí ze stále zhoršujícího stavu. Při otravě botulotoxinem jde o poruchu neuromuskulárního spojení na nervosvalové ploténce. Pokud pacient onemocnění přežije, obrny periferních nervů zcela vymizí a dojde k úplnému uzdravení. Rekonvalescence je však dlouhá, může trvat až 6 měsíců [26,39].

Pacienti jsou často při vědomí, protože k poškození mozku dochází až těsně před smrtí. [26].

Charakteristické symptomy botulismu jsou uvedeny v Tab. 5.

Tab. 5. Symptomy a příznaky při alimentárním botulismu [39].

Symptomy	v %	Příznaky	v %
Únava	77	Změna psychiky	90
Závratě	51	Ptóza víček	75
Dvojité vidění	91	Zúžení zorného pole	65
Neschopnost zaostření	65	Mydriáza, fixace pupil	44
Porucha polykání	96	Nystagmus	22
Sucho v ústech	93	Obrna lícních nervů	63
Dysartrie	84	Nedostatečné otevření úst	65
Bolest v krku	54	Omezení pohybů jazyka	58
Dušnost	60	Slabost rukou	75
Zácpa	73	Slabost nohou	69
Nevolnost a zvracení	59 – 64	Hyporeflexie, areflexie	40
Průjem a křeče v břiše	19 – 24	Ataxie	17
Parestézie	14		

### 5.7.1 Inkubační doba

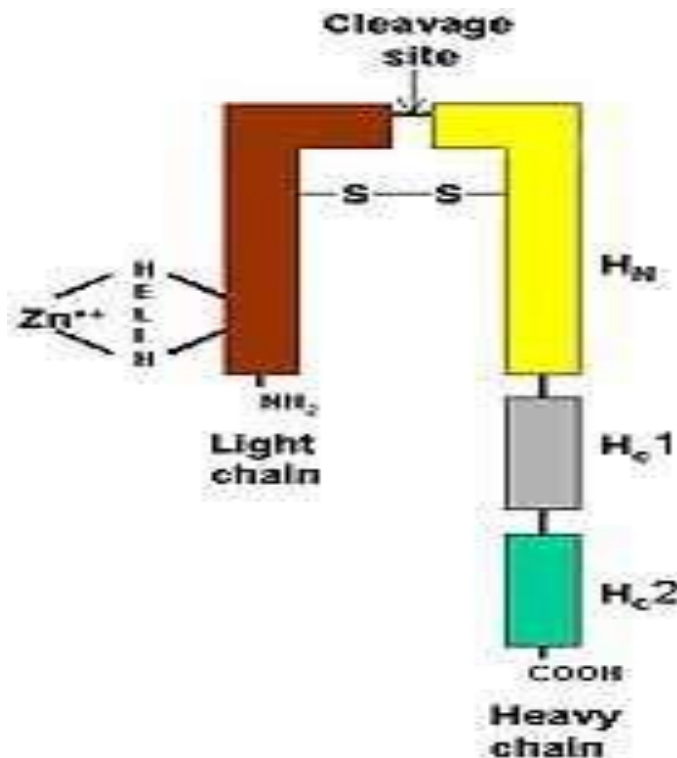
Inkubační doba je 6 až 72 hodin. Stejně jako závažnost onemocnění je závislá na velikosti infekční dávky. V některých případech je popisován také raný botulismus, kde je vstupem poranění, či otevřená rána. Toxin je v takových případech resorbován z infikované rány. Inkubační doba je potom 4 až 14 dní [26,39].

### 5.8 Toxokinetika a mechanismus účinku

Toxin se z kontaminované potraviny uvolňuje již v žaludku a je ihned poté absorbován. Krevním oběhem je pak přenesen na nervová zakončení periferního cholinergního systému,

kde se váže na proteinové receptory na motorických nervových zakončeních. Tak dochází ke generalizované nervové bloádě vlivem zamezení uvolňování acetylcholinu na cholinergních zakončeních [43].

Botulotoxin je syntetizován jako jediný polypeptidový řetězec s molekulovou hmotností přibližně 150 kDa a je složen z 19 aminokyselin (Obr. 10.). V této formě má toxin relativně nízkou účinnost. Toxin se skládá ze dvou řetězců: lehkého řetězce (fragmentu A) s molekulovou hmotností 50 kDa a těžkého řetězce (fragmentu B), s molekulovou hmotností 100kDa. Stejně jako u tetanospasminu zůstávají řetězce spojeny disulfidickými můstky [44,45].



Obr. 10. Struktura botulotoxinu [38]

## 5.9 Diagnostika

Pro diagnózu botulismu je nutno provést laboratorní vyšetření. K vyšetření se posílá asi 30 ml krve, stolice, obsah žaludku a pokud možno také potraviny podezřelá z intoxikace. Krev musí být vyšetřena před podáním antitoxického séra. K normálnímu průběhu vyšetření patří biologický pokus na myších, které jsou chráněny antitoxinem proti různým typům botu-

lismu. Výsledek je určen za 6 – 96 hodin. Vzorky stolice, obsahu žaludku a potravin se anaerobně kultivují po dobu 7 až 10 dní.

Botulismus lze snadno zaměnit s některými onemocněními CNS (klíšťová encefalitida, poliomyelitida, některé intoxikace, mozkové nádory...) [39].

## 5.10 Terapie

Intoxikace botulotoxinem je určena dle klinických příznaků, ale také laboratorním vyšetřením. K laboratornímu průkazu se užívají zbytky potravy, zvratky nebo krev nemocného. Tam se zjišťuje přítomnost botulotoxinu. Pacient, který trpí botulismem je hospitalizován na infekčním oddělení. Základem léčby je co nejčasnější podání polyvalentního antitoxického séra, které ruší účinky botulotoxinu na nervosvalové ploténce. V případě mírnějšího průběhu onemocnění (čistá otrava, nikoliv smíšená z potravin), se podává strychnin intramuskulárně po dobu tří dnů [26].

Důležitou roli hraje také podpůrná terapie - zajištění přívodu tekutin, potravy, podání antibiotika. Ty na samotnou otravu botulotoxinem vliv nemají, zajišťují však ochranu před vznikem sekundární infekce. K rychlejšímu vyloučení bakterií z organismu se může také podávat projímadlo nebo klyzma k očistění střeva. Jestliže k požití kontaminované potravy došlo několik hodin před návštěvou lékaře, může také pomoci podání látek vyvolávajících zvracení (emetik), nebo výplach žaludku. V případě, že došlo k obrně dýchacích svalů, je nutné postiženého hospitalizovat na jednotce intenzivní péče a zajistit mu umělou podporu dýchání. Nutnost připojení na přístrojové dýchání se posuzuje dle zastoupení kyslíku a oxidu uhličitého v krvi [26].

## 5.11 Prevence

Přítomnost botulotoxinu v potravě nelze poznat po vůni, ani po chuti. Toxická látka se také nemusí vyskytovat v celé např. konzervě, ale jen v její části. Důležité je proto dodržovat následující pravidla: [42,46]

Důsledné čištění masa, zeleniny, ovoce a ostatních surovin, které jsou určeny ke konzervování.

Je nutné dodržovat osobní hygienu pracovníků manipulujících s potravinami.

Při výrobě konzerv musí být dodržována sterilizační teplota a časy, zvláště u masových a zeleninových konzerv, jež jsou vyráběny podomácku.

Uskladňování konzervovaných potravinářských výrobků při nízkých teplotách jen po dobu minimální trvanlivosti.

Uchovávat potraviny a jídlo při teplotách pod 4 ° C.

Převařovat rizikové potraviny, protože botulotoxin je termolabilní.

Zvýšit zdravotní povědomí obyvatelstva o nebezpečí doma připravovaných a různým způsobem konzervovaných potravin a o nutnosti provaření konzervy před konzumací.

U raného botulismu úzkostlivá čistota operačních sálů, personálu i pacienta, dodržování hygienických podmínek při ošetřování a převazování ran, důrazné dodržování sterilizačních a dezinfekčních procedur.

## 5.12 Kojenecký botulismus a med

První případ botulismu u kojenců byl objeven v roce 1976 v USA. Ke kojeneckému botulismu dochází po konzumaci spor *Clostridium botulinum*. Mikroflóra střeva kojence není natolik vyvinutá, aby mohla potlačit jeho růst. Ideální prostředí pro růst této bakterie tvoří nekyselá žaludeční šťáva kojence, tělesná teplota a anaerobní prostředí. Botulotoxin blokuje uvolňování acetylcholinu z nervových zakončení a tím zastavuje jejich činnost. Symptomy jsou pak zácpa, apatie, obtíže s příjmem potravy až paralýza (ochrnutí) [47].

S kojeneckým botulismem je spojován med jako rezervoár *Clostridium botulinum*. Dětem do 1. roku věku by neměl být med podáván. Díky všeobecnému povědomí se med podílí asi jen na 5 % kojeneckého botulismu [47].

Nejvíce je kojenecký botulismus rozšířen v USA (výskyt zaznamenalo 49 států z 50) [47].

U nás se vyskytly 2 případy kojeneckého botulismu. V r. 1979 byl hlášen případ ve Východočeském kraji (okr. Havlíčkův Brod) u čtyřměsíčního kojence. Ve stolici byl prokázán botulotoxin B a bylo izolováno proteolytické *Clostridium botulinum*. Po 60 denní hospitalizaci se klinický stav dítěte s klasickými příznaky infekce a počínající bronchopneumonií upravil [42].

Druhý případ se vyskytl o deset let později, rovněž ve Východočeském kraji, u osmiměsíčního kojence, který na infekci zemřel. Příčinou syndromu náhlého úmrtí kojence by-

lo *Clostridium botulinum* typ B. Jako zdroj infekce byl v anamnéze označen med (dudlík namáčený do medu). V obou případech byl infekční činitel ověřen Mezinárodní referenční laboratoří v Londýně [42].

## 5.13 Epidemiologie

### 5.13.1 Ve světě

Onemocnění botulismem je rozšířeno po celém světě. Nejčastější výskyt *Clostridium botulinum* typu A hlásí USA, zdrojem intoxikace bývá zelenina a ovoce. *Clostridium botulinum* typu B má dominantní postavení především v Evropě a kontaminovanými potravinami je maso. Kmeny typu E jsou rozšířeny na Aljašce, v Kanadě, Dánsku, Íránu a v Japonsku a zdrojem otravy jsou hojně konzumované ryby [39,42,48].

### 5.13.2 V České republice

V rozmezí let 1960 – 2001 u nás bylo evidováno 102 případů otrav botulotoxinem, z toho bylo 56 mužů a 27 žen. U 19 osob se nezdařilo dohledat pohlaví. Vysoký výskyt onemocnění u mužů odborníci vysvětlují, tím, že muži často konzumují studenou kuchyni a konzervované potraviny. Případy byly zaznamenány v produktivním věku, od 20 – 44 let. Nejvyšší výskyt botulismu byl v kraji Moravskoslezském, Středočeském a Jihomoravském [42,48].

## ZÁVĚR

Otravy z potravin způsobené rodem *Clostridium* mají dva významné činitele, *Clostridium botulinum* a *Clostridium perfringens*. *Clostridium perfringens* typu A produkuje enterotoxin, který vyvolává poruchy trávicího ústrojí. Diagnóza je obtížná, protože tato bakterie se normálně vyskytuje v trávicím traktu, průběh onemocnění je však benigní a léčba jednoduchá. *Clostridium perfringens* typu C způsobuje nekrotizující enterokolitidu, která může být v některých případech i smrtelná.

Onemocnění botulismus, vyvolané toxinem, jenž produkuje *Clostridium botulinum* je velmi závažným alimentárním onemocněním. Infekčními agens jsou nejčastěji podomácku vyráběné konzervy a kompoty, častým zdrojem jsou také arašidy či nakládaná zelenina. Do těla se toxin dostává přes gastrointestinální trakt a odtud do krve a lymfy až k zakončení motorických nervů, kde způsobí přerušování vedení signálu z neuronu na neuron. Botulismus se léčí podáním séra nebo vakcínami.

Díky prevencím jako je např. mikrobiální kontrola potravin, eliminování kontaminace lidským faktorem nebo správné dodržování hygienických a technologických postupů, onemocnění způsobené bakteriemi rodu *Clostridium* pozvolna klesá. Stále však platí, že toxiny těchto mikroorganismů jsou jedny z nejnebezpečnějších a daly by se zneužít jako bojová látka. Přestože jsou tyto toxiny pro vnímavé organismy smrtelné, v menších dávkách se mohou využívat v lékařství nebo kosmetice.



**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

- [1] *Alimentární intoxikace*. [online]. [cit. 2012-12-07]. Dostupné z WWW: <http://lekarske.slovníky.cz/lexikon-pojem/alimentarni-intoxikace>
- [2] RAMBOUSKOVÁ, J., HRNČÍŘOVÁ, D. *Prevence onemocnění z potravin*. [online]. [cit. 2012-12-07]. Dostupné z WWW: [http://www.bezpecnostpotravin.cz/UserFiles/File/Publikace/Prevence\\_nahled\\_final.pdf](http://www.bezpecnostpotravin.cz/UserFiles/File/Publikace/Prevence_nahled_final.pdf)
- [3] MAYERHOFEROVÁ, S. *Alimentární nákazy, přednáška*. [online]. [cit. 2012-12-07]. Dostupné z WWW: <http://hygpraha.cz/files/alimentarninakazy.pdf>
- [4] VÍTOVÁ, E. *Hygienu potravin*. Vyd. 1. Brno: VUT FCH, 2004, 128 s. ISBN 80-214-2680-2.
- [5] BARTOŠOVÁ, L. *Bakteriální toxiny v potravinách*. [online]. [cit. 2012-12-07]. Dostupné z WWW: [http://www.szpi.gov.cz/docDetail.aspx?docid=1005714&nid=11325&hl=bakteriální toxiny](http://www.szpi.gov.cz/docDetail.aspx?docid=1005714&nid=11325&hl=bakteriální%20toxiny)
- [6] GÖRNER, F., VALÍK, L. *Aplikovaná mikrobiologie požívatin*. 1. vyd. Bratislava: Malé centrum, 2004, 528 s. ISBN 80-967-0649-7.
- [7] BEDNÁŘ, M., FRAŇKOVÁ, V., SCHINDLER, J., LOUČEK, A., VÁVRA, J.: *Lékařská mikrobiologie, bakteriologie, virologie, parazitologie*, Marvil, s.r.o., 1996.
- [8] SEDLÁČEK, I. *Taxonomie prokaryot*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2007, 270 s. ISBN 80-210-4207-9.
- [9] BUŇKOVÁ, L., DOLEŽALOVÁ, M. *Obecná mikrobiologie*. Vyd. 2., nezměň. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2010, 190 s. ISBN 978-80-7318-973-0.
- [10] *Praktikum č. 3: Kultivace bakterií*. [online]. [cit. 2012-12-07]. Dostupné z WWW: [http://fv1.vfu.cz/sekce\\_ustavy/mikrobiologie/mikrobiologie/praktikum03/index.html](http://fv1.vfu.cz/sekce_ustavy/mikrobiologie/mikrobiologie/praktikum03/index.html)
- [11] VOTAVA, M. *Lékařská mikrobiologie II. - Přehled vyšetřovacích metod v lékařské mikrobiologii*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2000, 309 s. ISBN 80-210-2272-8.
- [12] VOTAVA, M. *Kultivační půdy v lékařské mikrobiologii*. 1. vyd. Brno: HORTUS, 2000, 407 s. ISBN 80-238-5058-X.

- [13] *Předběžná identifikace anaerobních bakterií*. [online]. [cit. 2012-12-08]. Dostupné z WWW: <http://www.szu.cz/tema/pevence/predbezna-identifikace-anaerobnich-bakterii>
- [14] *Mikrobiální identifikace*. [online]. [cit. 2012-12-08]. Dostupné z WWW: [https://www.erbalachema.com/attachments/MLT\\_katalog\\_CZ.pdf](https://www.erbalachema.com/attachments/MLT_katalog_CZ.pdf)
- [15] Praktikum č. 14: *Mikrobiologická diagnostika veterinárně významných anaerobů*. [online]. [cit. 2012-12-08]. Dostupné z WWW: [http://fvl.vfu.cz/sekce\\_ustavy/mikrobiologie/mikrobiologie/praktikum14/index.html](http://fvl.vfu.cz/sekce_ustavy/mikrobiologie/mikrobiologie/praktikum14/index.html)
- [16] MAINIL, J. *Genus Clostridium: Clostridia in medical, veterinary and food microbiology : diagnosis and typing*. Brussels: European Commission Directorate General for Research, 2006. ISBN 92-790-0422-0.
- [17] *Kultivační metody záchytu MO, přednáška*. [online]. [cit. 2012-12-08]. Dostupné z WWW: [http://biomikro.vscht.cz/vyuka/mzp/Kultivacni\\_metody\\_mikroorganismu.pdf](http://biomikro.vscht.cz/vyuka/mzp/Kultivacni_metody_mikroorganismu.pdf)
- [18] LINDSTROM, M., KORKEALA, H. *Laboratory Diagnostics of Botulism*. Clinical Microbiology Reviews. roč. 19, č. 2, s. 298-314. ISSN 0893-8512. DOI: 10.1128/CMR.19.2.298-314.2006.
- [19] *Praktikum č. 5: Metody stanovení koncentrace bakterií*. [online]. [cit. 2012-12-08]. Dostupné z WWW: [http://fvl.vfu.cz/sekce\\_ustavy/infekcni\\_choroby\\_mikrobiologie/mikrobiologie\\_pro\\_farmaceuty/praktikum05/index.html](http://fvl.vfu.cz/sekce_ustavy/infekcni_choroby_mikrobiologie/mikrobiologie_pro_farmaceuty/praktikum05/index.html)
- [20] *Stanovení citlivosti na ATB kvantitativní metodou – E – test*. [online]. [cit. 2012-12-08]. Dostupné z WWW: <http://ulbld.lf1.cuni.cz/seznam-lab-vysetreni?vysetreni=1320>
- [21] ČERNÍKOVÁ, M., MÍŠKOVÁ, Z. *Praktická cvičení z potravinářské mikrobiologie*. Vyd. 1. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2010, 134 s. ISBN 978-80-7318-749-1.
- [22] *Kultivační půdy*. [online]. [cit. 2012-12-08]. Dostupné z WWW: <http://kirkae.blog.cz/0908/kultivacni-pudy>
- [23] ŠILHÁNKOVÁ, L. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. 3. oprav. a dopl. vyd. Praha: ACADEMIA, 2002, 363 s. ISBN 80-200-1024-6.

- [24] *Nákaza Clostridium perfringens*. [online]. [cit. 2012-12-08]. Dostupné z WWW: [http://www.viscojis.cz/teens/index.php?option=com\\_content&view=article&id=177:164&catid=90:po-mikrobalni&Itemid=140](http://www.viscojis.cz/teens/index.php?option=com_content&view=article&id=177:164&catid=90:po-mikrobalni&Itemid=140)
- [25] ČSN 56 9609. *Pravidla správné hygienické a výrobní praxe - Mikrobiologická kritéria pro potraviny. Principy stanovení a aplikace*. 2008. [online]. [cit. 2012-04-08] Dostupné z WWW: <http://shop.normy.biz/detail/80281>
- [26] HAVLÍK, J. *Infektologie: učebnice pro lékařské fakulty*. 2. vyd. Praha: Avicenum, 1990. 393 s., ob. ISBN 80-201-0062-8
- [27] JAY, J., M. *Modern food microbiology*. 7th ed. New York: Springer, 2005, 790 s. ISBN 03-872-3180-3.
- [28] ŠRÁMOVÁ, H. *Infekce a otravy z potravin: současný stav a trendy výskytu včetně protiepidemických opatření*. [online]. [cit. 2012-12-09]. Dostupné z: <http://www.chpr.szu.cz/vedvybor/vvp.htm>
- [29] BUBENÍKOVÁ, M. *Devastující nekrotizující enterokolitida u nedonošeného novorozence – KAZUISTIKA*. [online]. [cit. 2012-12-09]. Dostupné z WWW: <http://www.florence.cz/odborne-clanky/recenzovane-clanky/devastujici-nekrotizujici-enterokolitida-u-nedonoseneho-novorozence-kazuistika/>
- [30] SZAJEWSKA, H. *Probiotics and prebiotics in preterm infants: Where are we? Where are we going?* Early Hum Dev (2010), DOI:10.1016/j.earlhumdev.2010.01.019
- [31] VOJTILOVÁ, L., HUSA, P., SVOBODA, R. *Kolitida vyvolaná Clostridium difficile - rizikové faktory, hypervirulentní kmeny a nové terapeutické možnosti*. [online]. [cit. 2012-12-08]. Dostupné z WWW: <[http://www.csgh.info/arch\\_detail.php?stat=397](http://www.csgh.info/arch_detail.php?stat=397)>
- [32] RYANTOVÁ, V. *Infekce způsobené bakterií Clostridium difficile, seminární práce*. FN KV Praha.
- [33] BENEŠ, J., HUSA, P., NYČ, O. *Doporučený postup diagnostiky a léčby kolitidy vyvolané Clostridium difficile*. Společnost infekčního lékařství, pro epidemiologii a mikrobiologii a pro lékařskou mikrobiologii ČLS JEP.
- [34] HICKSON, M. *Probiotics in the prevention of antibiotic-associated diarrhoea and Clostridium difficile infection*. Therap Adv Gastroenterol 2011;4:185-197.

- [35] GUARINO, A. *European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition/European Society for Paediatric Infectious Diseases evidence-based guidelines for the management of acute gastroenteritis in children in Europe: executive summary*. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2008;46:619–621.
- [36] JOHNSTON, B., SUPINA, A., et al. *Probiotics for the prevention of pediatric antibiotic-associated diarrhea*. Cochrane Database of Syst Rev 2007, Issue 2. Art. No.: CD004827. DOI: 10.1002/14651858.CD004827.pub2.
- [37] PATOČKA, J. *Trendy v terapii botulismu*. Kontakt: Scientific Acta Faculty of Social and Health Studies : vědecký časopis Zdravotně sociální fakulty Jihočeské univerzity. 2010. ISSN 1212-4117.
- [38] DRGA, J., BURANSKÝ, J. *Mikrobiológia pre asistentov hygienickej služby*. Osveta, 1980, 190 s.
- [39] ARNON, S. - SCHLECHTER R. *Botulinum toxin as a biological weapon*. Medical and public health management. JAMA: 2001, č. 8, s. 1059 – 1070.
- [40] *Botulotoxin v olivách plněných mandlemi*. [online]. [cit. 2012-12-08]. Dostupné z WWW: <http://www.szpi.gov.cz/docDetail.aspx?docid=1033456&docType=ART&nid=11845>
- [41] KOMPRDA, T. *Obecná hygiena potravin*. 1. vyd. Brno: Mendlova zemědělská a lesnická univerzita, 2004, 145 s. ISBN 80-715-7757-X.
- [42] *Základy prevence infekčních onemocnění – Botulismus*. [online]. [cit. 2012-12-09]. Dostupné z WWW: <[centrumprev.sweb.cz/MANUAL/MANUALIV](http://centrumprev.sweb.cz/MANUAL/MANUALIV) – oddíl 1.htm#botulismus>
- [43] MODRÁ, H., SVOBODOVÁ, Z. *Speciální veterinární toxikologie: V Tribunu EU* vyd. 1. Brno: Tribun EU, 2009, 165 s. ISBN 978-80-7399-882-0. PATOČKA, J. *Trendy v terapii botulismu*. Kontakt: Scientific Acta Faculty of Social and Health Studies : vědecký časopis Zdravotně sociální fakulty Jihočeské univerzity. 2010. ISSN 1212-4117.
- [44] *Botulism*. [online]. [cit. 2012-12-08]. Dostupné z WWW: <http://textbookofbacteriology.net/themicrobialworld/Botulism.html>

- [45] VELÍŠEK, J. *Chemie potravin*. Rozš. a přeprac. 3. vyd. Tábor: OSSIS, 2009, xx, 623 s. ISBN 978-80-86659-17-6.
- [46] *Clostridium botulinum v potravinách* [online]. [cit. 2012-12-08]. Dostupné z WWW: [http://www.svps.sk/potraviny/info\\_clostridium\\_botulinum.asp](http://www.svps.sk/potraviny/info_clostridium_botulinum.asp)
- [47] KVASNIČKOVÁ, A. *Med a kojenecký botulismus*. [online]. [cit. 2012-12-08]. Dostupné z WWW: <http://www.bezpecnostpotravin.cz/med-a-kojenecky-botulismus.aspx>
- [48] ŠRÁMOVÁ, H. – BENEŠ, Č. *Výskyt botulismu v České republice v období 1990 - 1998*. Praktický lékař 79, 1999, č. 5
- [49] [https://www.google.cz/url?sa=i&rct=j&q=&esrc=s&source=images&cd=&cad=rja&docid=5dZ8cg8lJs2xTM&tbnid=ehDiKPFdGlxw9M:&ved=0CAUQjRw&url=http%3A%2F%2Fwww.lfhk.cuni.cz%2Fklinmikrob%2Fvyuka%2Fgit%2Fclostridium\\_perfringens.htm&ei=dH9wUazwEY\\_Osgahi4C4DA&psig=AFQjCNFuZftg8dBvCGefGV1CMrhe1n-clA&ust=1366413526118542](https://www.google.cz/url?sa=i&rct=j&q=&esrc=s&source=images&cd=&cad=rja&docid=5dZ8cg8lJs2xTM&tbnid=ehDiKPFdGlxw9M:&ved=0CAUQjRw&url=http%3A%2F%2Fwww.lfhk.cuni.cz%2Fklinmikrob%2Fvyuka%2Fgit%2Fclostridium_perfringens.htm&ei=dH9wUazwEY_Osgahi4C4DA&psig=AFQjCNFuZftg8dBvCGefGV1CMrhe1n-clA&ust=1366413526118542)
- [50] [https://www.google.cz/url?sa=i&rct=j&q=&esrc=s&source=images&cd=&cad=rja&docid=hSAqO4uXK7MOPM&tbnid=8nl2R2BzcluWFM:&ved=0CAUQjRw&url=http%3A%2F%2Fmicroblog.me.uk%2F119&ei=4X1wUd32I8\\_LsgaxoIHoDg&bvm=bv.45373924,d.Yms&psig=AFQjCNHHXKhHiKXrXN2UXi-mlyNGoNRwfg&ust=1366413133809958](https://www.google.cz/url?sa=i&rct=j&q=&esrc=s&source=images&cd=&cad=rja&docid=hSAqO4uXK7MOPM&tbnid=8nl2R2BzcluWFM:&ved=0CAUQjRw&url=http%3A%2F%2Fmicroblog.me.uk%2F119&ei=4X1wUd32I8_LsgaxoIHoDg&bvm=bv.45373924,d.Yms&psig=AFQjCNHHXKhHiKXrXN2UXi-mlyNGoNRwfg&ust=1366413133809958)
- [51] <https://www.google.cz/url?sa=i&rct=j&q=&esrc=s&source=images&cd=&cad=rja&docid=4EAHRvDtthKg-M&tbnid=sS6zn0sH0cKZdM:&ved=0CAUQjRw&url=http%3A%2F%2Fhaveyroot.blogspot.com%2F2009%2F07%2Fclostridium-difficile-or-c-diff.html&ei=ZX1wUeK-IcOutAbshYD-gBw&bvm=bv.45373924,d.Yms&psig=AFQjCNFAy9fzVyqqaqakPRV80iYfPhTntQ&ust=1366413021683714>
- [52] [https://www.google.cz/url?sa=i&rct=j&q=&esrc=s&source=images&cd=&cad=rja&docid=jf9Vn4dH\\_22hSM&tbnid=tPD7FRvdIdl04M:&ved=&url=http%3A%2F%2Fagentsmithwill.net84.net%2FForras%2Ftobbsejt.html&ei=AVB1Ufi4J-eA4gTxqIH4Dw&bvm=bv.45512109,d.bGE&psig=AFQjCNFZTDZQkVf0L6q\\_\\_ztY1Zqs2r-5Mw&ust=1366729089862527](https://www.google.cz/url?sa=i&rct=j&q=&esrc=s&source=images&cd=&cad=rja&docid=jf9Vn4dH_22hSM&tbnid=tPD7FRvdIdl04M:&ved=&url=http%3A%2F%2Fagentsmithwill.net84.net%2FForras%2Ftobbsejt.html&ei=AVB1Ufi4J-eA4gTxqIH4Dw&bvm=bv.45512109,d.bGE&psig=AFQjCNFZTDZQkVf0L6q__ztY1Zqs2r-5Mw&ust=1366729089862527)

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

ARO	Anesteziologicko – resuscitační oddělení
ATB	Antibiotika
CDAD	Clostridium difficile associated disease
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
ELISA	Enzyme-linked immunoSorbent Assay
ESPGHAN	Evropská společnost pro pediatrickou gastroenterologii, hepatologii a výživu
GIT	Gastrointestinální trakt
JIP	Jednotka intenzivní péče
MIC	Minimální inhibiční koncentrace
NEC	Nekrotizující enteritida
PCR	Polymerase chain reaction
RFLP	Restriction fragment length polymorphism
RNA	Ribonukleová kyselina

**SEZNAM OBRÁZKŮ**

<i>Obr. 1. Vnitřní struktura spory.....</i>	16
<i>Obr. 2. Gramovo barvení aplikované na bakterie rodu Clostridium.....</i>	18
<i>Obr. 3. Mikrotitrační destička.....</i>	20
<i>Obr. 4. Interpretace diskové difúzní metody.....</i>	21
<i>Obr. 5. Komerčně vyráběný E – test.....</i>	22
<i>Obr. 6. Kolonie Cl. perfringens.....</i>	26
<i>Obr. 7. Kolonie Cl. difficile.....</i>	31
<i>Obr. 8. Spory Cl. botulinum.....</i>	35
<i>Obr. 9. Kontaminované bioolivky.....</i>	38
<i>Obr. 10. Struktura botulotoxinu.....</i>	41

**SEZNAM TABULEK**

<i>Tab. 1 Typy toxikóz a jejich původci.....</i>	14
<i>Tab. 2. Výskyt Cl. perfringens v potravinách.....</i>	28
<i>Tab. 3. Příznaky kolitidy vyvolané Cl. difficile.....</i>	33
<i>Tab. 4. Kmeny Cl. botulinum a jejich vlastnosti.....</i>	37
<i>Tab. 5. Symptomy a příznaky alimentárního botulismu.....</i>	40