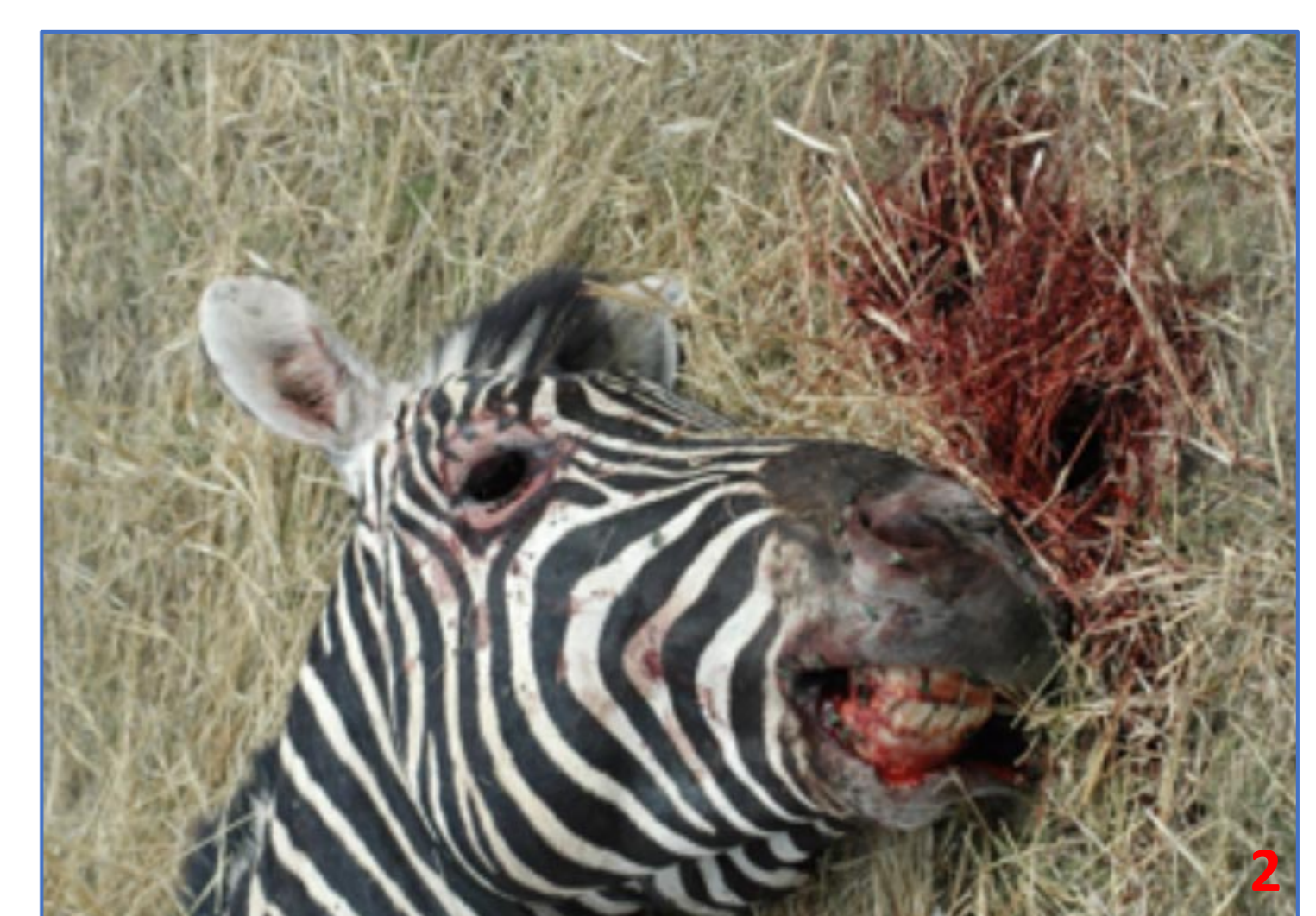


Většina druhů patřících do rodu *Bacillus* jsou velké, grampozitivní tyčinky s rovnými konci, které jsou uspořádány jednotlivě, po dvojicích nebo v řetězcích. Bacily tvoří vysoce rezistentní endospory uspořádané centrálně, které umožňují rozšíření v prostředí a dlouhodobé přežití v půdě. Jsou to kataláza pozitivní, oxidáza negativní, aerobní nebo fakultativně aerobní organismy, které jsou mimo hlavního patogena, *Bacillus anthracis*, pohyblivé. *Bacillus anthracis* je původcem antraxu, akutní infekce zvláště býložravců, která je přenosná na člověka (zoonóza). Některé kmeny dalšího významného druhu, *Bacillus cereus*, mohou být při množení v hotových jídlech odpovědné za alimentární intoxikace člověka. Jen sporadicky se mohou uplatnit i další druhy bacilů, a to při různých klinických infekcích (mastitidy, konjunktivitidy, aborty). Z rodu *Bacillus* se na základě genetické odlišnosti vyčlenil samostatný rod *Paenibacillus* s veterinárně významným zástupcem *P. larvae*, který je původcem moru včelího plodu.

DIAGNOSTIKA ANTRAXU

Kultivace a mikroskopie opouzdřených tyčinek jsou zlatým standardem diagnostiky antraxu. K potvrzení infekce u klinicky nemocných zvířat a čerstvých kadáverů je vhodným vzorkem periferní krev a tělní tekutiny. Čerstvá těla uhynulých zvířat s podezřením na antrax by se neměla pitvat a to z důvodu usnadnění sporulace původce a následného rizika dlouhodobé kontaminace prostředí odolnými spory. Kadávery jsou obvykle vzduté, rychle se rozkládají, chybí u nich *rigor mortis*, tmavá nesražená krev vytéká z přirozených otvorů tělních (obr. č. 1 a 2).

Jiné typy vzorků jako jsou suroviny z dovozu (kůže, vlna), vzorky prostředí (kontaminovaná půda) vyžadují pro úspěšnou kultivaci použití speciálních a velmi náročných postupů, proto se rutinně kultivačně nevyšetřují.



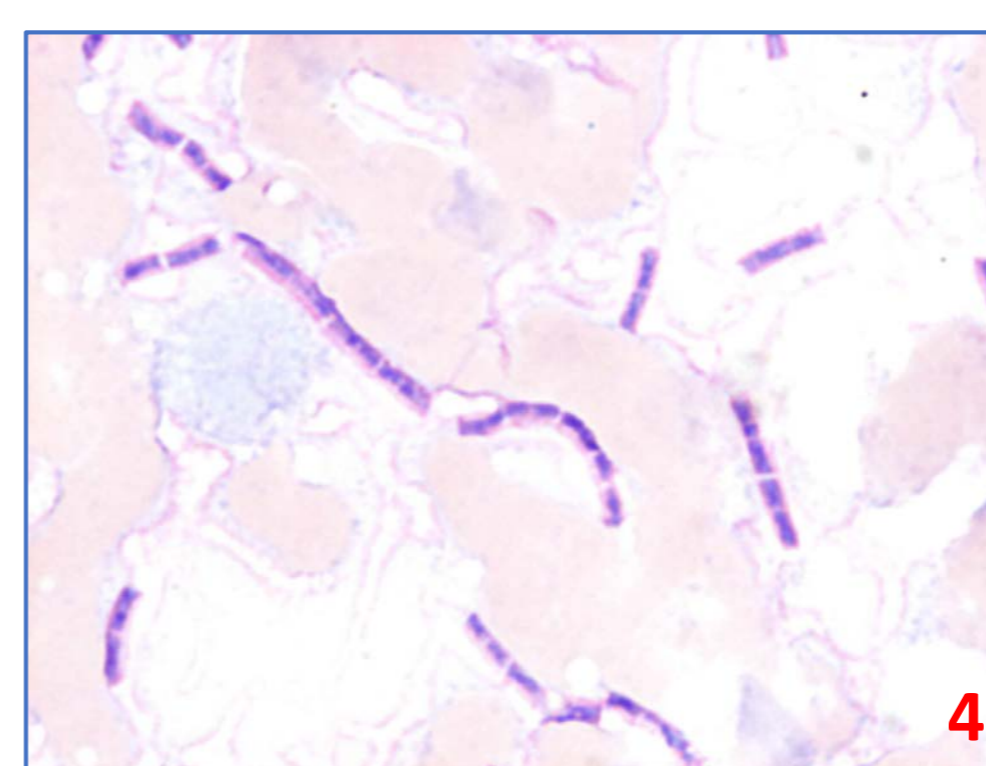
Odběr vzorků

Z podezřelých čerstvých kadáverů přežvýkavců odebíráme sterilní injekční stříkačkou periferní krev z ocasní žíly, z prasat peritoneální tekutinu nebo krev z ušní žíly. Z koní a prasat lze odebrat i edematózní tekutinu a tkáň superficiálních mizních uzlin. Při odběru minimalizujeme kontaminaci prostředí a místo odběru řádně dezinfikujeme. U kadáverů v rozkladu (např. pastevní skot nebo volně žijící zvěř) jsou vhodným materiálem pro izolaci původce nosní skořepky (přítomnost spor). K odběru vzorků surovin (např. usně/kůže z dovozu) se využívají speciální vzorkovače (děrovače) (obr. č. 3).



Mikroskopický průkaz pouzdra

V otiscích tkání a roztěrech krve a tělních tekutinách zvířat uhynulých na antrax se prokazují opouzdřené tyčinky *B. anthracis*. U kadáverů starších než 24 hodin lze pouzdra obtížně prokázat. Jednou z technik je **barvení na pouzdra dle Giemsy-Romanowského**. Preparát zaschlý na sklíčku fixujeme 2-3 minuty metylalkoholem. Osušíme filtračním papírem a převrstvíme Giemsovým barvivem na 10 minut, opláchneme vodou a osušíme. Pouzdro je cihlově červené a buněčná stěna tmavě modrá (obr. č. 4).



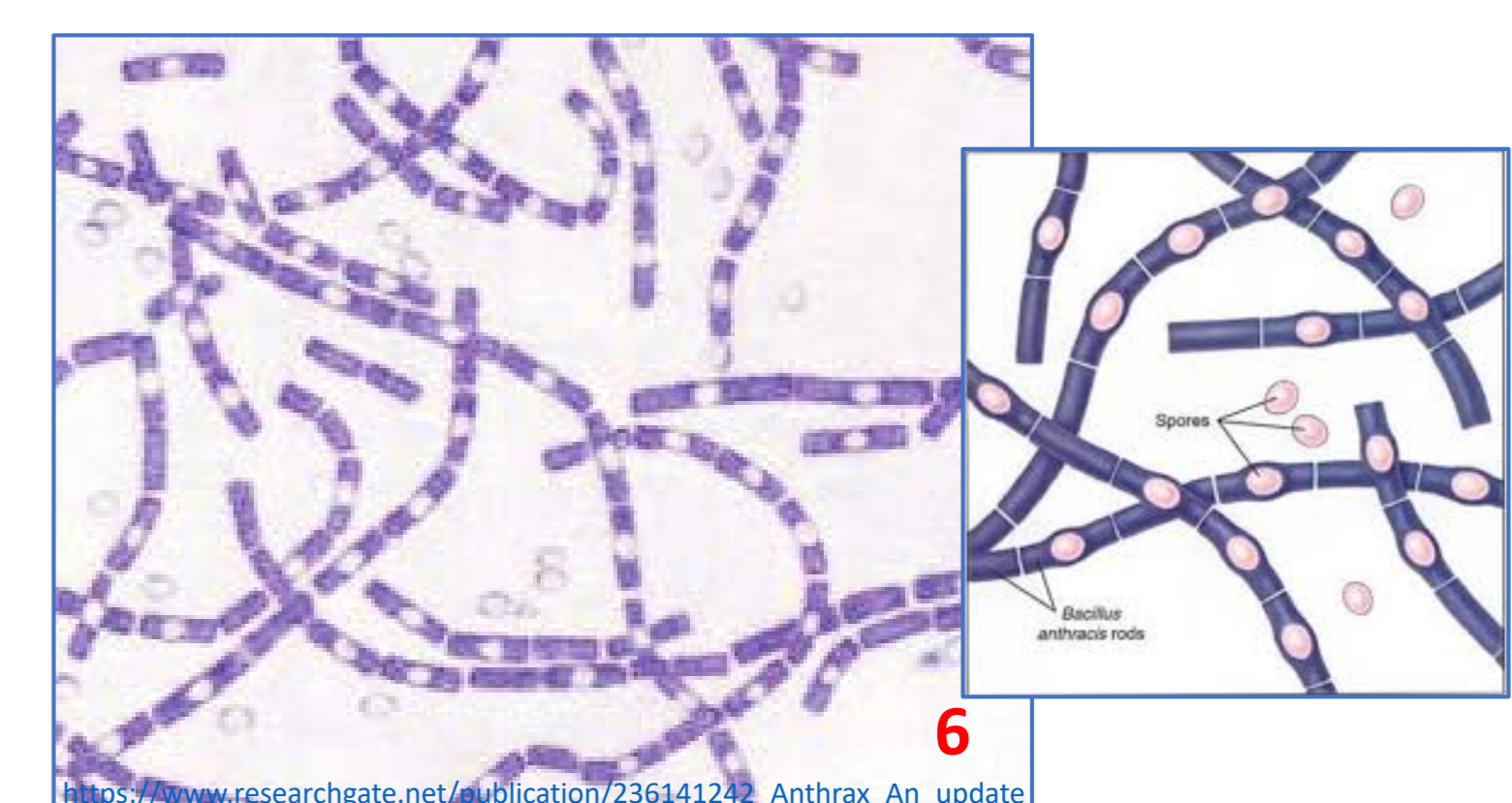
Kultivace a identifikace

Vzorky krve, tělních tekutin nebo tkání se kultivují s použitím sterilních tamponů na masopeptonové krevní agary. Po 24-48 hodinách aerobní inkubace při 37 °C *B. anthracis* vytváří nehemolytické kolonie, 5 mm v průměru, ploché, suché, šedé, lepkavé, s matným leskem. Celkový vzhled je přirovnáván k hlavě medúzy (*caput medusae*) (obr. č. 5).



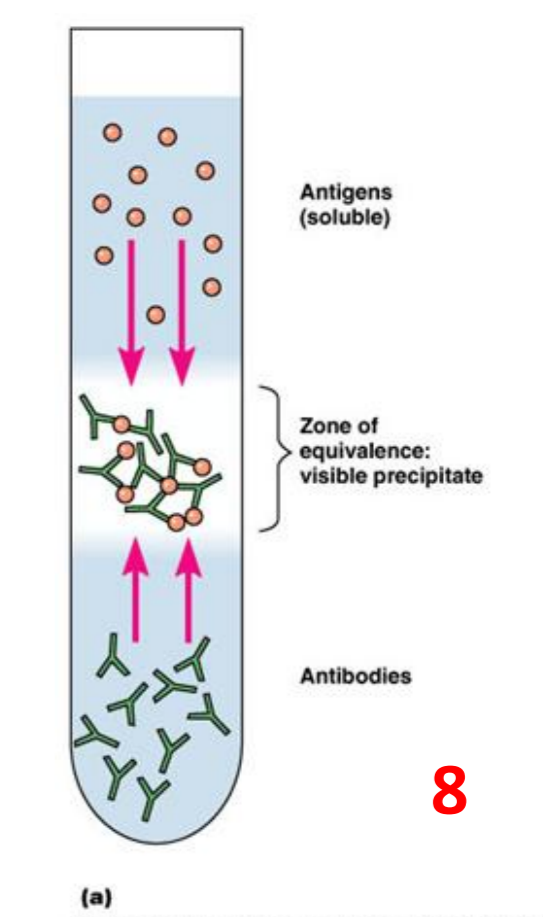
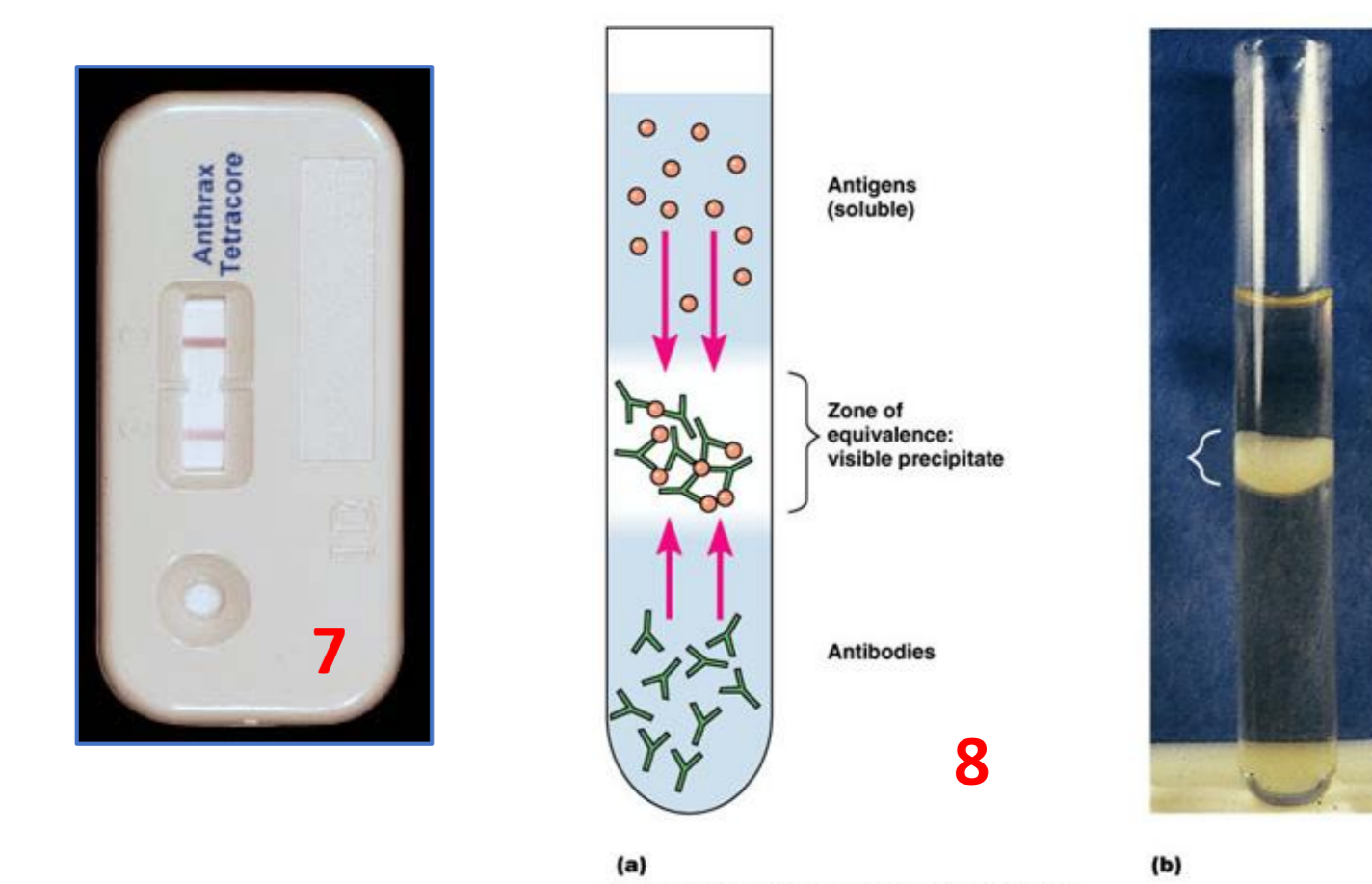
Kolonie *Bacillus anthracis* na krevním agaru. Foto Todd Parker/CDC

B. anthracis – barvení dle Grama, centrálně lokalizované spory



Konfirmace *B. anthracis*

Mikroskopicky se jedná grampozitivní sporulující tyčinky (obr. č. 6). Na rozdíl od antrakoidních bacilů (např. *B. cereus*, aj.) netvoří hemolýzu (obr. č. 5) a je v polotuhém agaru nebo želatině nepohyblivý. Ve specializovaných laboratořích se testuje **specifická lýza** souvislé kultury na agaru **gamma fágem**. **Perlový test** – *B. anthracis* roste na médiu s koncentrací 0,05-0,5 m. j. penicilínu na ml a přitom je ovlivněna syntéza buněčné stěny, takže původně tyčinkovité buňky se stávají sférické (kulaté) řazené v řetězích (šňůra perel). Tímto testem se jasně odliší *B. anthracis* od antrakoidních bacilů. Penicilin rezistentní kmeny se musí konfirmovat dalšími testy, např. **imunochromatografickým testem** (obr. č. 7) nebo PCR. **PCR** - lze využít ke konfirmaci faktorů asociovaných s virulencí, tedy genů kódujících protektivní antigen a pouzdro (rutinně se nepoužívá). Když uvedené metody selžou lze v odůvodněných případech **alternativně** použít **biologický pokus** na dospělých laboratorních myši nebo morčeti.



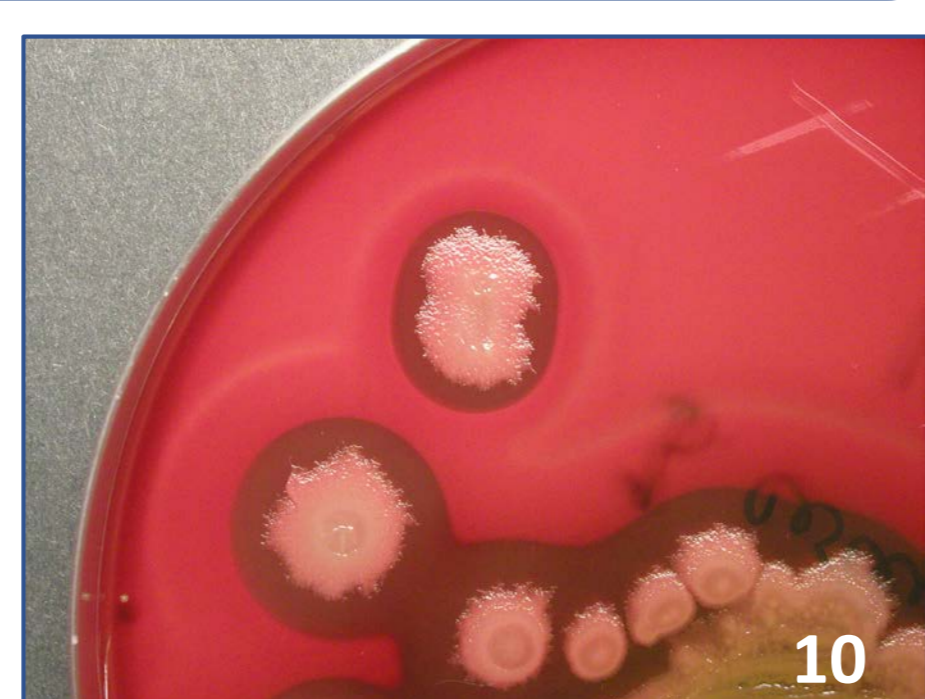
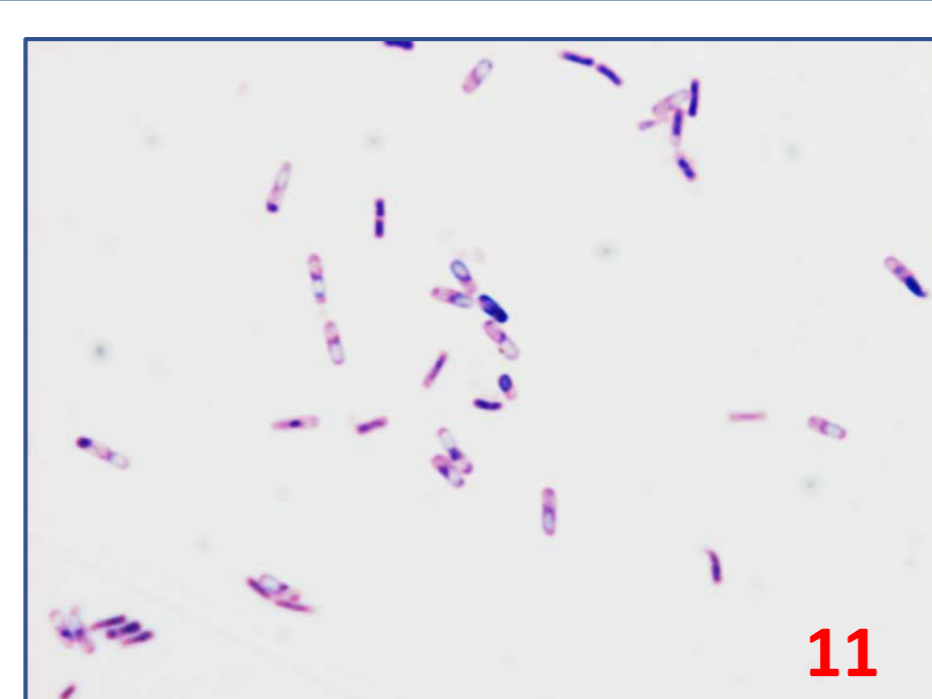
Průkaz antigenu Ascoliho reakcí

B. anthracis je antigenně blízké příbuzný s *B. cereus* a dalšími bacily, které jsou hojně rozšířené v prostředí. V průběhu antraxu v tkáních hostitele buňky *B. anthracis* tvoří pouzdro, které je možné prokázat specifickým antisérem v precipitačním testu. Již v roce 1911 Ascoli uveřejnil tento postup průkazu tzv. termostabilního antraxového antigenu (precipitinu) v tkáních zvířat a jejich produktech (kůže). **Postup:** 2 g tkáně vložíme do 5 ml fyz. roztoku s 1 % kyseliny octové a vaříme 5 minut. Po zchlazení filtrujeme před filtrační papír. Do malé skleněné oploštěné zkumavky kápneme několik kapek králíčího antiséra (získává se imunizací králíka oslabeným kmenem *B. anthracis*). Filtrát se opatrně vrství na antisérum. Pozitivní výsledek se projeví do 15 minut vznikem precipitátu v podobě proužku (obr. č. 8)

Bacillus cereus – alimentární intoxikace člověka

Druh blízké příbuzný *B. anthracis*, který se běžně vyskytuje v prostředí a příležitostně kontaminuje potraviny. Některé jeho kmeny při množení produkují toxiny, což bývá následně příčinou alimentárních infekcí člověka. Ty se projevují těžkou nevolností, průjmami a zvracením. Nevhodné nakládání s potravinami umožňuje klíčení spor (při 10 až 50 °C) a množení bacilů, při kterém se uvolňují termorezistentní a acidorezistentní enterotoxiny. Konzumace takového jídla může vyvolat dva typy syndromů, průjmový a emetický.

Podezřelé vzorky potravin se kultivují na selektivní MYP (Mannitol Yolk Polymyxin) agar s fenolovou červení (obr. č. 9) a masopeptonový krevní agar (obr. č. 10). Po 24 h inkubace při 37 °C vyrůstají charakteristické nepravidelné kolonie v R fázi, obklopené zónou úplné hemolýzy (fosfolipáza C). V mikroskopických preparátech jsou patrné spóry (obr. č. 11). Metodou PCR se prokazují geny kódující emetický toxin (cereulid) a enterotoxiny (*nhe*, *hbl* a *cytK*).



Paenibacillus larvae – původce moru včelího plodu

Mor včelího plodu patří mezi nebezpečné nákazy včely medonosné. Odolné spory původce se nacházejí i v prostředí zdravých včelstev, proto k potvrzení nákazy je třeba zjistit klinické projevy onemocnění (obr. č. 12) a současně kultivačním vyšetřením potvrdit průkazné počty kolonie tvořících jednotek původce (KTJ) ve včelím díle. Vhodným vzorkem je tzv. včelí měl, která se odebírá na speciální odběrovou podložku (obr. č. 13a, b). K izolaci se používá řada agarových médií, z nichž nejužívanější je MYPGP agar (obr. č. 14a, b).

Izolované kultury se konfirmují hodnocením morfologie a pigmentace kolonií, mikroskopie, biochemické aktivity (manitol, salicin, fosfatázová aktivita a další), výsledků hmotnostní spektrometrie MALDI TOF a specifické PCR.

