

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Clostridium tetani

Bakalářská práce

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2021/2022

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Jitka Půšová**
Osobní číslo: **C18183**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Klinická biologie a chemie**
Téma práce: ***Clostridium tetani***
Téma práce anglicky: ***Clostridium tetani***
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

1. Vypracujte literární rešerši popisující bakterii *Clostridium tetani*. Zaměřte se na výskyt, možnosti infekce, průběh onemocnění, léčbu. Věnujte se i prevenci onemocnění, vakcinaci, epidemiologické situaci v ČR i zahraničí i historickému kontextu. Seznamte se zajímavými kazuistikami.
2. Literární zdroje čerpejte zejména z databází WOS a Medline. Prostudujte hlášení služby Epidat státního zdravotního ústavu.
3. Bakalářskou práci zpracujte dle směrnice Univerzity Pardubice upravující formální zpracování závěrečných prací.

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Vedoucí bakalářské práce: **doc. Ing. Marcela Pejchalová, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **18. prosince 2021**
Termín odevzdání bakalářské práce: **1. července 2022**

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc. v.r.
děkan

L.S.

prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2022

Prohlašuji:

Práci s názvem *Clostridium tetani* jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 29.6. 2022

Jitka Půšová

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych zde poděkovala mé vedoucí bakalářské práce, již je doc. Ing. Marcela Pejchalová, Ph.D., která mi věnovala svůj čas, poskytla cenné rady a důležité připomínky k vypracování bakalářské práce. Také bych ráda poděkovala své rodině, která mě podporovala po celou dobu studia.

ANOTACE

V této práci je v několika kapitolách popsána bakterie *Clostridium tetani*. Mezi prvními kapitolami jsou základní údaje o taxonomickém zařazení bakterie do rodu, něco málo o historii rodu a obecný popis bakterií rodu *Clostridium*. Dále se práce zaměřuje na podrobnější popis *C. tetani* jako je její morfologie, kultivační vlastnosti, výskyt, produkce toxinů, průběh onemocnění a jeho léčba. Součástí práce jsou konkrétní případy tetanu a jejich popis.

KLÍČOVÁ SLOVA

Clostridium tetani, grampozitivní bakterie, tetanový toxin, tetanus, svalová křeč, očkování

TITLE

Clostridium tetani

ANNOTATION

In this bachelor thesis, the bacterium *Clostridium tetani* is described in several paragraphs. Among the first chapters there is a basic data concerning the taxonomic classification of the bacterium in the genus, a little about the history of the genus and a general description of the bacteria of the genus *Clostridium*. The thesis then focuses on a more detailed description of *C. tetani* such as its morphology, culture characteristics, occurrence, toxin production, disease progression and treatment. The thesis includes specific cases of tetanus and their description.

KEYWORDS

Clostridium tetani, gram-positive bacteria, tetanus toxin, tetanus, muscle spasm, vaccination

OBSAH

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK.....	10
SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK	11
ÚVOD	12
1 TAXONOMIE.....	13
2 HISTORIE.....	14
3 ROD <i>CLOSTRIDIUM</i>	15
3.1 Charakteristika	15
3.2 Epidemiologie	15
4 <i>CLOSTRIDIUM TETANI</i>	16
4.1 Morfologie.....	16
4.2 Výskyt a epidemiologie.....	16
4.3 Faktory virulence a antigenní struktury	17
4.3.1 Tetanospasmin.....	17
4.3.2 Tetanolysin	18
4.3.3 Regulace a syntéza tetanového toxinu.....	18
4.3.4 Produkce a zrání toxinů.....	19
4.4 Biochemické a kultivační vlastnosti <i>C. tetani</i>	19
4.4.1 Spotřeba histidinových peptidů z komplexních zdrojů aminokyselin	20
4.4.2 Spotřeba glukózy během kultivace <i>C. tetani</i>	20
4.4.3 Účinky železa na růst <i>C. tetani</i>	21
4.4.4 Vliv minerálních solí na růst <i>C. tetani</i>	21
4.4.5 Vitamíny potřebné pro růst <i>C. tetani</i>	22
4.5 Genomika <i>C. tetani</i>	22
4.5.1 Sekvence genomu <i>C. tetani</i>	22
4.6 Centrální metabolismus <i>C. tetani</i>	26

4.7 Onemocnění a patogeneze	27
4.7.1 Generalizovaný tetanus	28
4.7.2 Lokalizovaný tetanus	28
4.7.3 Novorozenecký tetanus (<i>tetanus neonatorum</i>).....	29
4.7.4 Tetanus související s potratem	29
4.7.5 <i>Clostridium tetani</i> ve spojení s autismem	30
4.8 Laboratorní diagnostika	30
4.8.1 Detekce a kvantifikace <i>Clostridium tetani</i> pomocí metody qPCR.....	31
4.8.2 Flokulační metoda pro detekci toxinu.....	31
4.8.3 Metoda minimální letální dávky	31
4.8.4 Enzymově vázaný imunosorbentový test.....	31
4.9 Prevence	32
4.9.1 Očkování	32
4.10 Terapie	34
4.10.1 léčba antibiotiky	35
4.10.2 Parenterální antitoxin	35
4.10.3 Intratekální antitoxin	36
4.10.4 Podpůrná léčba	36
4.11 Kazuistika	37
První případ bakteriémie způsobené bakterií <i>C. tetani</i>	37
Případ smrtelného tetanu, Muž 86 let, Portoriko 2002	38
Případ lokalizovaného tetanu, muž 55 let	38
Případ lokalizovaného tetanu, muž 35 let	39
Chlapec nakažený tetanem v ČR	40
Dívka nenačkovaná proti tetanu.....	40
Případ generalizovaného tetanu v ČR.....	41
ZÁVĚR	42

POUŽITÁ LITERATURA	43
PŘÍLOHY	48

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obrázek 1- <i>Clostridium tetani</i>	15
Obrázek 2 – Proces zrání toxinu <i>C. tetani</i>	19
Obrázek 3 – Srovnání pěti plazmidů na základě BiBlastu s referenčním plazmidem pE88.....	24
Obrázek 4 – Srovnání pěti plazmidů na základě BiBlastu s referenčním plazmidem p184.08.....	25
Obrázek 5- Infikované poranění palce levé nohy.....	38
Tabulka 1 – Taxonomický přehled.....	13
Tabulka 2 – Vlastnosti plazmidů kódujících tetanový toxin.....	23
Tabulka 3- Ablett klasifikace závažnosti tetanu.....	27

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

CNS	Centrální nervová soustava
Da	Dalton-atomová hmotnostní jednotka
TCS	Dvousložkový systém (two-component systems)
AMK	Aminokyselina
RNA	Ribonukleová kyselina
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
TeNT	Tetanový toxin
GC	Obsah guaninu a cytosinu
CDS	Kódující sekvence
WHO	Světová zdravotní organizace (World health organization)
MLD	minimální letální dávka
TTCV	Vakcína proti tetanu (Tetanus toxoid-containing vaccination)
GABA	Kyselina gama-aminomáselná

ÚVOD

Clostridium tetani je grampozitivní anaerobní tyčinka, která je velká, pohyblivá a vytváří spory, díky kterým je velice odolná. Jde o všudypřítomnou bakterii, kterou je možné nalézt kdekoli v půdě. *C. tetani* produkuje tetanový toxin a vyvolává onemocnění zvané tetanus. Jedná se o nebezpečnou nemoc, která postihuje centrální nervovou soustavu a ve většině závažných případech končí smrtí. V řadě zemí došlo téměř k úplnému vymýcení tetanu díky povinnému očkování, ale to neplatí pro rozvojové země, kde je úmrtnost spojená s tímto onemocněním stále vysoká.

Cílem této práce je seznámit čtenáře s touto zákeřnou nemocí a s bakterií, která ji způsobuje. Práce se zabývá základní morfologickou charakteristikou bakterie, jejím výskytem, metabolismem, popisuje produkované toxiny, jejich stavbu a účinek na organismus. Dále jsou zde vyjmenovány formy onemocnění tetanem, klinické příznaky nemoci a léčba. Jsou zde popsány biochemické i kultivační vlastnosti a některé metody stanovení *C. tetani* a tetanového toxinu. V závěru práce jsou podrobně identifikovány a popsány případy onemocnění vyskytujících se typově u některých jedinců.

1 TAXONOMIE

Taxonomie je vědní obor zabývající se klasifikací, nomenklaturou a identifikací organismů. Cílem je klasifikovat všechny skupiny bakterií. Taxonomie se překrývá s biologickou systematikou, která kromě klasifikace studuje obecné principy variability jednotlivých druhů (Drozd, 2004).

V průběhu let se taxonomie bakterií stále vyvíjela a docházelo v ní k různým změnám. Taxonomické určování bylo založeno hlavně na morfologii bakterií a jejich metabolické aktivitě. Významné bylo a stále je Gramovo barvení, podle kterého rozdělujeme bakterie na grampozitivní a gramnegativní v závislosti na složení jejich buněčné stěny. Podle shodností znaků a vlastností bakterií rozlišujeme jednotlivé taxonomické skupiny. Základním taxonem bakterií je druh, zahrnující rodové a druhové jméno bakterie (*Clostridium tetani*). Druh je soubor izolátů s některými společnými vlastnostmi na fenotypové úrovni se společnými genovými klustery. Reprezentant každého bakteriálního druhu se nazývá typový kmen (Kolářová et al., 2020). Nejvyšší kategorií v taxonomickém systému je doména, které máme tři. Je to Archaea, Bacteria a Eukarya (Hurych, Štícha et al., 2020).

Jednou z nejkompexnějších prací v oblasti bakteriální taxonomie je Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Garrity et al., 2005).

Pro identifikaci neznámé bakterie se používají fenotypové charakteristiky (např. Gramovo barvení, biochemické a fyzikální vlastnosti, sérotyp) případně vlastnosti genetické (např. specifická sekvence podjednotky 16S ribosomální RNA), pomocí kterých se neznámý izolát srovnává s typovými kmeny. Právě tyto molekulárněgenetické metody znamenaly změnu v taxonomii bakterií (Kolářová et al., 2020).

Taxonomický přehled *Clostridium tetani* je znázorněn v tabulce 1.

Tabulka 1 – Taxonomický přehled (Kolářová et al., 2020)

Kmen	Třída	Řád	Čeleď	Rod	Druh
<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridiales</i>	<i>Clostridiaceae</i>	<i>Clostridium</i>	<i>Clostridium tetani</i>

2 HISTORIE

Bakterie rodu *Clostridium* byly poprvé popsány v roce 1880 Prazmowskim (Andreesen et al., 1989). Historicky byly do rodu zařazeny všechny anaerobní grampozitivní tyčinky schopné tvořit spory. Rod byl definován čtyřmi vlastnostmi: přítomnost endospor, striktní anaerobní metabolismus, neschopnost redukovat síran na siřičitan a grampozitivní struktura buněčné stěny. I přesto jsou některé bakterie špatně klasifikovány a do rodu jsou zařazeny například i druhy u kterých vznikají spory jen vzácně (*Clostridium perfringens*, *Clostridium ramosum*), dále jsem patří i některé aerotolerantní druhy (*Clostridium tertium*) nebo bakterie které se trvale barví gramnegativní (*Clostridium ramosum*, *Clostridium clostridioforme*) (Murray, Rosenthal, Pfaller, 2013).

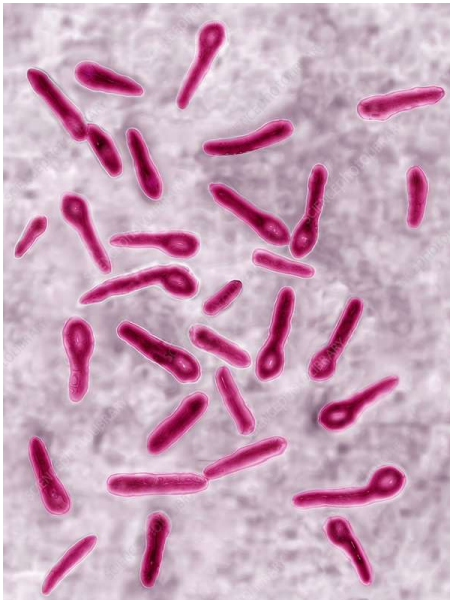
Onemocnění způsobené bakterií *C. tetani* je jedním z nejdramatičtějších a celosvětově nejrozšířenějších onemocnění lidí a obratlovců, které se vyskytuje již více než 24 století (Brüggemann et al., 2003). V roce 1951 zemřelo na tetanus v České republice 140 lidí a v 60. letech 20. století bylo hlášeno 60-90 případů onemocnění ročně. K významnému poklesu výskytu tetanu došlo díky celonárodnímu očkování dospělých v letech 1974 až 1976 (Národní zdravotnický informační portál).

3 ROD *CLOSTRIDIUM*

3.1 Charakteristika

Clostridia jsou variabilní rody anaerobních organismů tvořené nejméně 209 druhy a pěti poddruhy (George et al., 2021). Jsou to grampozitivní anaerobní sporulující tyčinky. Mají různou toleranci ke kyslíku, pro některé je kyslík velmi toxický i při nízkých dávkách, jiné mohou být vůči kyslíku tolerantní. Některé druhy vytvářejí velmi silné a odolné spory, díky nimž jsou chráněny před řadou fyzikálně chemických vlivů a přežijí i var. Spory bývají uloženy terminálně (např. *C. tetani*), subterminálně nebo centrálně. U některých druhů mohou spory deformovat průměr tyčinky. Mají různou rychlost růstu, obvykle jde o rychle rostoucí mikroby (Kolářová et al., 2020).

Obrázek 1 – *Clostridium tetani* (Vědecká knihovna fotografií (sciencephoto.com))



3.2 Epidemiologie

Mikrobi jsou všudypřítomní, vyskytují se v prostředí, zejména v půdě, kontaminované zvířecími a lidskými výkaly, protože jsou také součástí jejich střevní mikroflóry. Většinou se jedná o nepatogenní saprofyty, ale některé druhy způsobují závažné infekce, které mohou vést až ke smrti postiženého jedince. Klostridia způsobují infekce tkání způsobené produkcí histolytických toxinů (např. *C. perfringens*, *C. novyi*, *C. septicum*, *C. histolyticum*), působením neurotoxinů postihují nervový systém (např. *C. tetani*, *C. botulinum*), nebo se jedná o střevní patogeny (např. *C. difficile*). Nejčastěji postihují měkké tkáně, rány nebo gastrointestinální trakt (Kolářová et al., 2020).

4 *CLOSTRIDIUM TETANI*

4.1 Morfologie

C. tetani je velká, pohyblivá tyčinka vytvářející typickou sférickou terminální sporu, připomínající tvar paličky na buben, což můžeme vidět při mikroskopickém pozorování (Kolářová et al., 2020). V některých publikacích se tvar přirovnává špendlíku s hlavičkou, protože tyčinka je rovná a tenká (Hurych, Štícha et al., 2020). Její velikost je v rozmezí 0,5 až 2 x 2 až 18 µm (Murray, Rosenthal, Pfaller, 2013).

Jak už bylo zmíněno výše, jedná se o grampozitivní, neinvazivní, anaerobní bakterie s extrémní citlivostí ke kyslíku, a jejich dlouhodobé přežívání v zevních podmínkách jim umožňují velice odolné spory (Kolářová et al., 2020).

Tyčinky jsou opatřené peritrichálně uloženými bičíky, díky nimž jsou bakterie pohyblivé (Hurych, Štícha et al., 2020).

4.2 Výskyt a epidemiologie

C. tetani je všudypřítomná bakterie. Nachází se v úrodné půdě a přechodně kolonizuje gastrointestinální trakt mnoha zvířat i lidí (Murray, Rosenthal, Pfaller, 2013). S jejich výkaly se dostává do půdy, kde díky sporám přežije i desítky let (Hurych, Štícha et al., 2020). Enviromentální faktory, jako jsou floděje a tajfuny, mohou zvýšit počet spor *C. tetani* v půdě, což potenciálně zvyšuje riziko nákazy tetanem po přírodních katastrofách (Thwaites, Beeching, Newton, 2015).

Výzkum půdy ve Spojených státech ukázal, že výskyt *C. tetani* nesouvisí s žádným konkrétním typem půdy nebo klimatickým územím (Smith, 1978).

Nemoc spojená s touto bakterií je v mnoha státech relativně vzácná díky vysokému výskytu imunity vyvolané vakcínou. Případnými pacienty jsou především starší lidé s ubývajícím imunitou. Tetanus je však stále zodpovědný za mnoho úmrtí v rozvojových zemích, kde je očkování nedostupné. Odhaduje se, že celosvětově se vyskytuje více než 1 milion případů s úmrtností v rozmezí od 30 % do 50 % a z toho nejméně polovina úmrtí je u novorozenců (Murray, Rosenthal, Pfaller, 2013).

4.3 Faktory virulence a antigenní struktury

Kmeny *C. tetani* lze rozlišit podle rozdílů ve flagelárních antigenech a schopnosti produkovat tetanový toxin. Sekvenování genomu odhalilo přítomnost mnoha faktorů virulence, včetně tetanolysinu O, hemolysinu a fibronectinu, jakož i proteinů podílejících se na vazbě buněčné stěny. Pouze bakterie schopné produkovat tetanový toxin jsou schopny vyvolat onemocnění. Tento toxin je jedním z nejsilnějších identifikovaných toxinů s průměrnou smrtelnou dávkou pro člověka nižší než 2-5 ng/kg (Thwaites, Beeching, Newton, 2015).

Dalším faktorem může být např. morfologické vybavení buňky, v případě *C. tetani* je to pouzdro a bičíky, ale hlavním faktorem je produkce toxinů (Kolářová et al., 2020).

4.3.1 Tetanospasmin

Tento tepelně labilní neurotoxin blokuje uvolnění inhibičních mediátorů (glycin, kyselina gama-aminomáselná), čímž způsobí zvýšení odpovědi motoneuronů na periferní podněty a vyvolává spasmus příčně pruhovaného svalstva (Hurych, Štícha et al., 2020). Tuto blokádu inhibičních neurotransmiterů způsobuje nekonjugativní plazmid pE88, který nese geny pro tento silný neurotoxin. Původ tohoto plazmidu je nejasný, protože velká část jeho sekvence je jedinečná pro *C. tetani*. Do CNS se nejčastěji šíří nervosvalovým spojením, proniká podél motorických nervů, inhibuje uvolňování acetylcholinu na nervových zakončeních a tím brání převodu neuromuskulárních vzruchů (Slaný, Slaná, 2015). Tato schopnost retrográdně cestovat uvnitř neuronů vedla v poslední době k zájmu o tetanový toxin jako prostředek mapování neuronálních spojení, nebo jako prostředek pro transport terapeutických látek do CNS (Thwaites, Beeching, Newton, 2015).

Tetanospasmin je produkován během stacionární fáze růstu a uvolňuje se při lýze buňky. Jedná se o peptid, který vzniká jako jednořetězcový a následně se štěpí do dvou částí, a to je lehká (A-řetězec) a těžká (B-řetězec) podjednotka. Celková molekulová hmotnost peptidu je 150 000 Da, z čehož má 100 000 Da B-řetězec a 50 000 Da A-řetězec. Oba řetězce drží pohromadě disulfidová vazba a nekovalentní síly (Murray, Rosenthal, Pfaller, 2013).

Sacharid-vazebná doména karboxylového konce těžkého řetězce se váže na specifické receptory kyseliny sialové (např. disialogangliosidy) a na přilehlé glykoproteiny na povrchu motorických neuronů. Neporušené molekuly toxinu jsou internalizovány v endozomálních váčcích a transportovány axonem do soma neuronu umístěného v míše. V tomto místě se endozom okyselí, což má za následek konformační změnu v N-koncové doméně těžkého řetězce, který umožní průchod lehkého řetězce toxinu do cytosolu buňky skrz membránu

endozomu. Lehký řetězec je zinková endopeptidáza, která štěpí proteiny jádra zapojené do přenosu a uvolňování neurotransmiterů. Vazba toxinu je nevratná, takže zotavení závisí na tom, zda se vytvoří nová axonální zakončení (Murray, Rosenthal, Pfaller, 2013).

4.3.2 Tetanolysin

Je sérologicky příbuzný streptolysinu O a hemolyzinům produkovaným *C. perfringens* a *Listeria monocytogenes*. Jeho klinický význam je zatím nejasný, protože je inhibovaný kyslíkem a sérovým cholesterolem (Murray, Rosenthal, Pfaller, 2013).

4.3.3 Regulace a syntéza tetanového toxinu

Regulace je možná několika následujícími způsoby.

První možností je regulace alternativním sigma faktorem TetR, který se váže na RNA polymerázový jádrový enzym, aby zahájil transkripci genu *tetX*, který kóduje tetanový toxin. Geny kódující jak tetanový toxin, tak i jeho regulátor jsou umístěny na stejném mega-plazmidu (Raffestin et al., 2005).

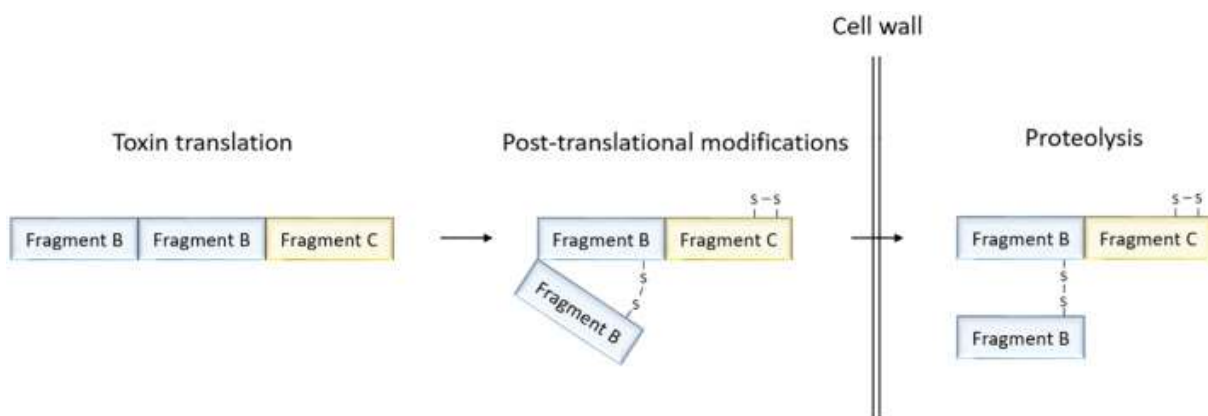
Jednou z dalších je regulace toxinů dvousložkovými systémy. Syntéza toxinu je regulována komplexní sítí TCS. Pro syntézu toxinů byly identifikovány dva pozitivní regulátory TCS a jeden negativní TCS regulátor. První pozitivní regulátor se nachází 25 kb proti proudu *tetX* na plazmidu, v blízkosti genů kódujících proteiny vázající ATP, ale nevykazuje žádnou homologii u jiných bakterií. Druhý pozitivní regulátor TCS je umístěn na chromozomu a je údajně spojen s autolýzou. U těchto dvou pozitivních regulátorů TCS je možné, že regulují syntézu toxinů nepřímo, protože jejich proteiny se nevážou na promotor TetR nebo TetX. Kdežto negativní regulátor TCS přímo potlačuje syntézu toxinů vazbou na promotor TetR a TetX. Na základě homologie se tento TCS, umístěný na chromozomu, podílí na buněčném dělení (Chapeton-Montes et al., 2020).

Regulace také souvisí s faktory virulence a buněčným dělením. Ukázalo se, že syntéza toxinů byla také regulována pomocí CodY. Tento protein vykazoval vazbu na promotor *tetX*, jinak se podílí na regulaci toxinů a virulence i u jiných grampozitivních patogenních bakterií. Zvyšuje transkripci *tetX*, která pozitivně reguluje syntézu toxinů. Vzhledem k tomu, že CodY reaguje na hladovění, autoři této studie navrhli, že tato regulace toxinů by mohla souviset s nutričním stresem (Chapeton-Montes et al., 2020). Produkci toxinů také ovlivnil pokles

exprese genů pro povrchovou (buněčnou) adhezi a bičíkové geny související s virulencí (Orellana et al., 2020).

4.3.4 Produkce a zrání toxinů

Tetanový toxin je syntetizován v bakteriálním cytosolu jako protein řetězce 151kDa (1315 AMK). Proces zrání toxinu je znázorněn na obrázku 2. Po translaci RNA na protein se odstraní první zbytek methioninu a vytvoří se dva cystein disulfidové můstky. Tetanový toxin se uvolňuje v kultivačním médiu. Peptidový řetězec toxinu je pak hydrolyzován proteázou v kultivačním vývaru, což vede ke vzniku lehkého a těžkého řetězce (Helting, Parschat, Engelhardt, 1979). Jedna disulfidová vazba spojuje těžký řetězec s lehkým a další tvoří smyčku na těžkém řetězci (Krieglstein et al., 1991). Byly nalezeny tři aktivní proteázy v kultivačním vývaru. Jedna z nich štěpí toxin s jedním řetězcem, druhá hydrolyzuje glycy-l-histidin bez modifikace konformace toxinu a u třetí proteázy nebyla aktivita přesně identifikována (Helting et al., 1977).



Obrázek 2 – Proces zrání toxinu *C. tetani* (Garrigues et al., 2022).

4.4 Biochemické a kultivační vlastnosti *C. tetani*

Bakterie roste dobře na krevním agaru za striktně dodržovaných anaerobních podmínek. Oproti jiným druhům mají slabě viditelnou hemolýzu a díky svému pohybu vytváří na celém povrchu agarů tenký povlak (Hurych, Štícha et al., 2020).

Růstové médium *C. tetani* bylo poprvé navrženo v roce 1942 v laboratoři Mueller and Miller pomocí harvardského kmene. Až do roku 1960 se jejich práce soustředila na zlepšení konečného titru toxinů kultur *C. tetani* v tomto médiu. Konečné Muellerovo a Millerovo

médium se skládalo hlavně z hydrolyzátu kaseinu (obvykle NZ-Case), glukózy a vitamínů. Další médium bylo vytvořeno v roce 1962 Lathamem, které bylo nazváno Massachusetts medium a je nejčastěji využíváno v laboratořích. Mezi další media patří Sójové a TGY médium (Latham et al., 1962). Porovnání složek jednotlivých medií je zobrazeno v příloze C.

Pro správné pěstování *C. tetani* je důležité znát optimální pH. V kontinuální kultuře bylo pro produkci toxinů zjištěno optimální pH 7,8. Bylo však doporučeno, aby kultivace byla prováděna při pH 7,4, protože vyšší pH vede ke srážení železa, což vytváří černou barvu, která narušuje stanovení biomasy. Pro lepší pochopení účinku pH byla hodnocena stabilita toxinu při nižších a vyšších hodnotách pH (Zacharias, Björklund, 1968).

V dávkových kulturách není pH obvykle regulováno. Počáteční pH je obvykle v rozmezí 6,8–7,2. Ukázalo se, že počáteční pH mělo vliv na fázi autolýzy. Procento lýzy buněk se snižovalo se zvyšujícími se počátečními hodnotami pH. Autoři získali nejlepší titr toxinů (67,5 Lf/ml) při počátečním pH 6,1, což odpovídá konečnému pH 7,75 (Garrigues et al., 2022).

Aby bakterie rostla a produkovala toxin má určité nutriční potřeby. Ke svému růstu využívá řadu látek jako jsou např. histidinové a kaseinové peptidy, volné aminokyseliny, glukózu, anorganické sloučeniny, minerální soli a vitamíny (Garrigues et al., 2022).

4.4.1 Spotřeba histidinových peptidů z komplexních zdrojů aminokyselin

K určení spotřeby AMK uvolněných při hydrolýze peptidů byl studován účinek pankreatického digestu kaseinu, který byl frakcionován na tři části (kyselé, neutrální a zásadité). Bylo zjištěno, že vynechání kterékoli části eliminovalo produkci toxinu. Produkce toxinů byla také inhibována, když byla jedna z frakcí hydrolyzována kyselinou. Vědci se také dozvěděli, že volný histidin nespĺňuje požadavky. Histidin musel být přítomen ve formě peptidů, jako je glycyl-histidin nebo acetyl-histidin, aby se zahájila produkce toxinů (Mueller, Miller, 1953). Další experimenty studovali použití syntetických peptidů, z čehož nejúčinnější byl glycyl-histidin, protože jeho použití produkovalo tolik toxinu jako použití celého pankreatického digestu kaseinu (Mueller, Miller, 1956).

4.4.2 Spotřeba glukózy během kultivace *C. tetani*

Na polosyntetickém médiu kyseliny casamino bylo na čtyřech kmenech z laboratoří University of Kentucky ukázáno, že glukóza je pro růst *C. tetani* nepodstatná a nestimulační. Na chemicky definovaném médiu však glukóza nebyla pro polovinu kmenů nezbytná, ale stimulační pro ostatní kmeny. S vynecháním glukózy vykazovaly dva kmeny normální růst

(51% propustnost světla), zatímco ostatní dva vykazovaly horší růst (87% propustnost světla) (Kaufman, Humphries, 1958). Při růstu na komplexním médiu obsahujícím kasein, kvasnicový extrakt a glukózu byla glukóza spotřebována až po 24 až 30 hodinách. Od tohoto časového bodu se růst zvýšil úměrně s přidavkem glukózy v médiu. Pozorováním fosforylace glukózy v bezbuněčném extraktu pak autoři potvrdili přítomnost glukokinázy v kmenech *C. tetani Harvard* a *45e*. Tento jev byl specifický pro glukózu, protože jiné hexózy nebyly ovlivněny (Martinez, Rittenberg, 1959).

V kontinuální kultuře na komplexním médiu (kmen Harvardova derivátu), bez ohledu na to, zda byla změněna rychlost ředění nebo počáteční koncentrace glukózy, nebyl v supernatantu nalezen žádný toxin, dokud nebyla glukóza zcela spotřebována. Uvolňování toxinů pak souviselo s omezením glukózy (Zacharias, Björklund, 1968).

4.4.3 Účinky železa na růst *C. tetani*

Úloha některých růstových faktorů může záviset na jiných složkách. Buňky v médiu s nedostatkem železa nebyly schopny fermentovat glukózu. Spotřeba glukózy byla semilogaritmičticky úměrná obsahu železa a byla odhadnuta prostřednictvím produkce oxidu uhličitého. Bylo navrženo, že enzym nebo koenzym glukózové dráhy je závislý na železe. Později byl tento enzym identifikován jako pyruvát ferredoxin oxidoreduktáza, obsahující shluky FeS, které katalyzují degradaci pyruvátu na acetyl-CoA (Brüggemann, Gottschalk, 2004). Tento enzym potřebuje oxidovaný ferredoxin jako substrát a uvolňuje ho ve své redukované formě. Proběhl také experiment s přidavkem glutaminu v komplexním médiu s nedostatkem železa. To mělo za následek stimulovanou produkci oxidu uhličitého, blížíci se úrovní produkce pozorovaným v médiu s vysokým obsahem železa. Přidání glutaminu by tedy mohlo překonat nedostatek železa (Lerner, Mueller, 1949).

Podle dalších studií z roku 1943 a 1954 byla na kaseinovém hydrolyzátovém médiu optimální koncentrace železa 50 mg/l redukovaného železa (prášek) nebo 0,3 mg/l FeSO₄·7H₂O. V obou studiích byl při koncentracích nad těmito hodnotami růst lepší, ale produkce toxinů se snížila. Růst i produkce toxinů byly proto závislé na obsahu železa (Feeney et al., 1943; Mueller, Miller, 1954).

4.4.4 Vliv minerálních solí na růst *C. tetani*

Bylo zjištěno, že pro růst *C. tetani* jsou zapotřebí anorganické soli draslíku, hořčíku a fosfátů (Mueller et al., 1943). Proběhla řada výzkumů, kde se ukázalo, že přidáním 0,1 g/l chloridu draselného v kontinuální kultuře v modifikovaném massachusettském médiu

zdvojnásobilo produkci toxinu v derivátu harvardského kmene. Také zjistili, že draslík má schopnost zvýšit propustnost buněčné membrány a pozorovali opačný jev s přidavkem chloridu vápenatého, který propustnost snižuje (Zacharias, Björklund, 1968).

4.4.5 Vitamíny potřebné pro růst *C. tetani*

Vitamíny a stopové prvky byly dodávány infuzí hovězího srdce do Muellerova a Millerova média pro růst *C. tetani*. Ukázalo se, že infuze hovězího srdce není nezbytná pro růst a produkci toxinů. Hovězí srdeční infuze může být úspěšně nahrazena kyselinou nikotinovou, vitamínem B12 a železem (Latham et al., 1962).

Pro růst harvardských kmenů je nutných těchto 10 vitamínů a asimilovaný sloučenin, které se nacházejí v chemicky definovaném médiu: biotin, pantothenát vápenatý, kyselina listová, kyselina nikotinová, kyselina olejová, riboflavin, pyridoxin, thiamin, adenin a uracil (Feeney et al., 1943).

4.5 Genomika *C. tetani*

Na rozdíl od botulotoxinů, které vykazují širokou genetickou diverzitu, byl dosud popsán jenom jeden typ tetanového toxinu (TeNT). Předpokládá se, že kmeny *C. tetani* vykazují omezenou genetickou variabilitu. Předchozí studie provedená pomocí hybridizace DNA ukázala, že 10 neurotoxigenních a 3 netoxigenní kmeny *C. tetani* jsou homogenetické (Nakamura et al., 1979). Poprvé bylo prokázáno, že gen tetanového toxinu se nachází na plazmidu velké velikosti a že při ztrátě tohoto plazmidu vznikají netoxigenní kmeny (Finn JR et al., 1984). První kompletní sekvence genomu toxigenního kmene byla určena v roce 2003 (Brüggemann et al., 2003). Genom obsahoval chromozom o velikosti přibližně 2,8 Mb a plazmid kódující tetanový toxin o velikosti 74 kb. Jeden další genom byl určen v roce 2014 (Levy et al., 2014).

4.5.1 Sekvence genomu *C. tetani*

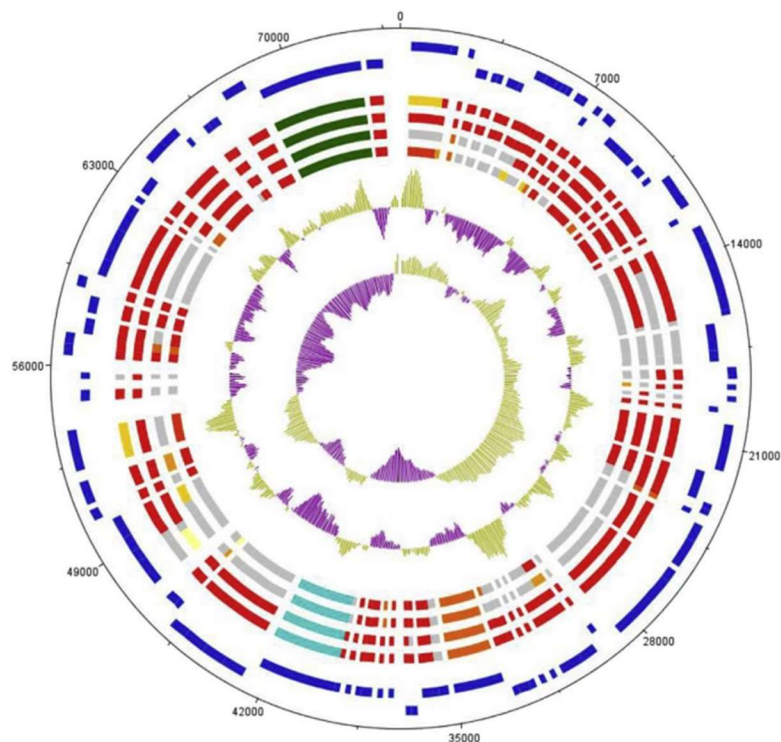
Identifikace a analýza všech genů v genomu *C. tetani* přispěla a dále přispěje k pochopení změny životního stylu z neškodné půdní bakterie na potenciálně devastující organismus poškozující neurosystém po proniknutí a infikování savčího hostitele (Marvaud et al., 2000).

Sekvenováním genomu se zabývala i studie katedry biomedicíny Aarhuské univerzity v Dánsku, která porovnávala plazmidy kódující tetanový toxin u pěti kmenů *C. tetani*. Jednalo

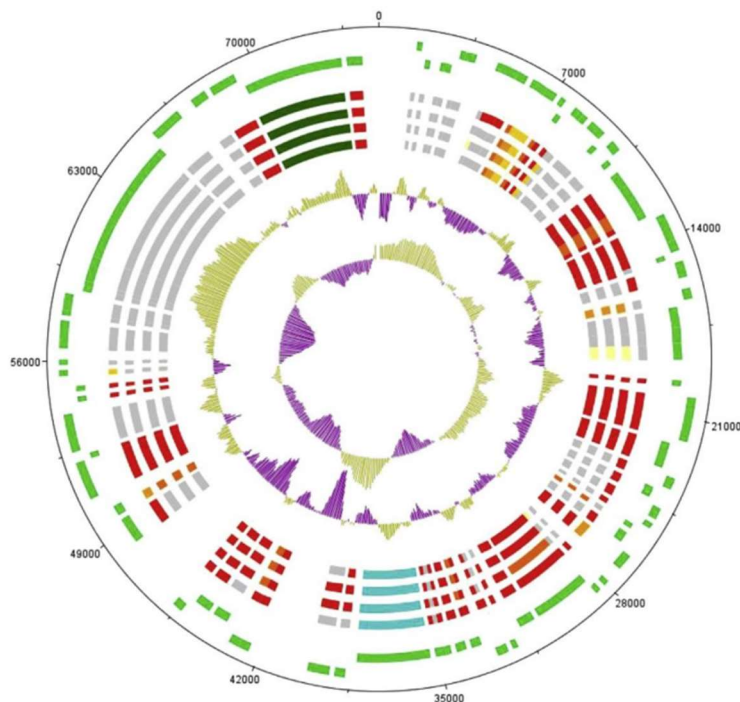
se o kmeny E88 a kmen 12124569, které už byly sekvenovány dříve, a kmeny 184.08, kmen A a CN655 u kterých provedla sekvenování sama univerzita. Došli k závěru, že všech pět kmenů má plazmid kódující tetanový toxin, obsah GC (guaninu a cytosinu), velikost a počet kódujících sekvencí (CDS) se mírně liší, kromě kmene 12124569, který nese výrazně menší plazmid (tabulka 2). Tyto plazmidy obsahují vysoce konzervované geny nejen pro TeNT ale také TetR (transkripční regulátor TeNT) a ColT (kolagenáza). Porovnání sekvencí ukázalo, že plazmidy kmenů E88 (pE88), CN665 (pCN665) a A (pA) jsou si navzájem velmi podobné, jak můžeme vidět na obrázku 3. A plazmidy kmenů 184.08 (p184.08) a 12124569 (p12124569) se silně liší, což znázorňuje obrázek 4. Obousměrná komparace (BIBlast) odhalila míru sekvenční divergence. Některé geny pE88, pCN665 a pA nejsou přítomny na p184.08 a p12124569, včetně dvousložkového systému a ABC transportního systému. Naproti tomu p184.08 obsahuje další geny, včetně restriktivně-modifikačního systému typu III, fágové integrázy a předpokládaného transportního systému rezistence k bacitracinu.

Tabulka 2 – Vlastnosti plazmidů kódujících tetanový toxin (Brüggemann et al., 2015).

Název plazmidu	Velikost	Obsah GC (%)	CDS
pE88	74,0 kb	24,5	98
P184.08	Cca. 73,0 kb	24,9	93
pA	Cca. 71,7 kb	24,5	90
pCN655	Cca. 69,6 kb	24,3	90
P12124569	58,4 kb	24,0	77



Obrázek 3 – Srovnání pěti plazmidů na základě BiBlastu s referenčním plazmidem pE88. Modré vnější kroužky znázorňují CDS pE88 a čtyři vnitřní se týkají ostatních plazmidů pCN655, pA, p12124569 a p184.08. Jednotlivé barvy ukazují míru podobnosti s referenčním plazmidem. Červená-vysoká podobnost; oranžová-střední podobnost; žlutá-nízká podobnost; šedá-absence. Vysoce konzervované geny pro TeNT a kolagenázu jsou znázorněny tmavě zelenou a azurovou barvou. Dva vnitřní kruhy znázorňují obsah GC (Brüggemann et al., 2015).



Obrázek 4 – Srovnání pěti plazmidů na základě BiBlastu s referenčním plazmidem p184.08. Zelené vnější kroužky znázorňují CDS p184.08 a čtyři vnitřní se týkají ostatních plazmidů p12124569, pE88, pCN655 a pA. Jednotlivé barvy ukazují míru podobnosti s referenčním plazmidem. Červená-vysoká podobnost; oranžová-střední podobnost; žlutá-nízká podobnost; šedá-absence. Vysoce konzervované geny pro TeNT a kolagenázu jsou znázorněny tmavě zelenou a azurovou barvou. Dva vnitřní kruhy znázorňují obsah GC (Brüggemann et al., 2015).

Dnes již bylo izolováno 43 kmenů *C. tetani*, zejména z lidských ran, v různých geografických lokalitách po celém světě (Chapeton-Montes et al., 2020). Kmeny jsou rozděleny do dvou hlavních skupin: Harvardské kmeny odvozené z rodového harvardského kmene (Clade 1A) a kmeny divokého typu izolované z klinických případů (Clades 1B-H a 2). Rodový harvardský kmen byl shromážděn Hygienickou laboratoří americké veřejné zdravotní služby do konce první světové války. Tento kmen byl pak distribuován do laboratoří výrobců vakcín od roku 1920 do roku 1950. To vedlo k vývoji kmenů harvardské rodiny, které se vyznačují nízkou sporulací a vysokou produkcí toxinů a jsou vhodné pro výrobu vakcín. Kmeny E88 a CN655, izolované z harvardské rodiny, se běžně používají v evropských laboratořích (Garrigues et al., 2022).

4.6 Centrální metabolismus *C. tetani*

Substráty, které *C. tetani* nejčastěji používá jsou aminokyseliny (AMK), protože v genomu bakterie bylo identifikováno mnoho genů pro jejich transport a degradaci (Příloha A). transport AMK se zdá být závislý hlavně na sodíku, vyskytující se prostřednictvím dovozců (Brüggemann, Gottschalk, 2004). Pro lepší pochopení, jak byly cesty degradace AMK exprimovány, byl použit časový komparativní transkriptomický přístup. Bylo porovnáno pěstování kmene E88 v komplexním médiu s pěstováním bez doplnění pěti aminokyselin (Orellana et al., 2020).

Vzhledem k tomu, že *C. tetani* asimiluje mnoho aminokyselin, jeho genom postrádá biosyntetické cesty pro fenylalanin, histidin, izoleucin, lysin, leucin, methionin, tryptofan a valin, což způsobuje auxotrofii aminokyselin. To je typické pro patogenní bakterie s malými genomy, které nevyvíjejí cesty pro biosyntézu aminokyselin, protože žijí v hostiteli (YU et al., 2009). Kromě genů pro transport a degradaci AMK obsahuje bakterie *C. tetani* četné extracelulární a intracelulární geny kódující peptidázu a fosfolipázu. Tato sada peptidáz, které jsou charakteristické pro patogenní Clostridia, poskytuje bakteriím volné aminokyseliny (González-Pajuelo et al., 2006).

C. tetani fermentuje pouze glukózu jako zdroj cukru. Při pěstování v komplexním médiu bylo zjištěno, že harvardské kmeny galaktózu, fruktózu, manózu, maltózu, sacharózu a laktózu neberou (Martinez, Rittenberg, 1959). *C. tetani* obsahuje geny kódující enzymy pro glykolýzu, transport glukózy PTS nebo aktivitu symporteru sodíku, ale žádný gen pro degradaci polysacharidů. Degradace glukózy a mnoha aminokyselin vede hlavně k tvorbě pyruvátů. V genomu nebyly nalezeny žádné geny kódující enzymy citrátového cyklu. Pyruvát se přeměňuje na acetyl-CoA prostřednictvím pyruvátu ferredoxin oxidoreduktázy. Acetyl-CoA může vést ke vzniku acetátu, butyrátu, ethanolu nebo butanolu (Brüggemann, Gottschalk, 2004).

Obecná metabolická síť je nastíněna v příloze B. Enzymy zapojené do tohoto metabolismu jsou popsány číslem kódujícího genu. Jejich funkčnost in vivo nebyla prokázána (Buckel, Barker, 1974).

4.7 Onemocnění a patogeneze

„*Clostridium tetani* je původcem neuromuskulárního onemocnění zvaného tetanus“ (Hurych, Štícha et al., 2020). U tetanu rozlišujeme tři formy onemocnění. Mezi ně náleží generalizovaný, lokalizovaný a novorozenecký nebo mateřský tetanus (Murray, Rosenthal, Pfaller, 2013).

Inkubační doba bývá 7-14 dní u starších dětí a dospělých, u novorozenců je kratší v průměru 5-7 dní (Thwaites, Beeching, Newton, 2015). Inkubační doba přímo souvisí se vzdáleností primární infekce rány od centrálního nervového systému (Murray, Rosenthal, Pfaller, 2013). Doba inkubace je definována jako doba mezi kontaminací rány a prvním příznakem a je to období, během kterého dochází k uvolňování a transportu toxinu. Doba nástupu je doba, během níž se následně vyvinou generalizované svalové křeče (Thwaites, Beeching, Newton, 2015).

Po prodělání infekce se v těle nevytvoří specifická imunita, jelikož toxin proniká do nervových buněk příliš rychle (Hurych, Štícha et al., 2020).

Uvádí se několik klasifikačních systémů podle závažnosti onemocnění tetanem, z čehož nejpoužívanější je systém od společnosti Ablett, znázorněný v následující tabulce 3 (Ablett, 1967).

Tabulka 3- Ablett klasifikace závažnosti tetanu (Ablett, 1967).

Třída	Průběh	Klinické rysy
I	Mírný	Mírný až středně závažný trismus; obecná spasticita; žádné dýchací rozpaky; žádné křeče; malá nebo žádná dysfagie.
II	Střední	Mírný trismus; dobře označená tuhost; mírné až středně těžké, ale krátké křeče; mírné respirační rozpaky se zvýšenou respirační frekvencí vyšší než 30; mírná dysfagie.
III	Těžký	Těžký trismus; generalizovaná spasticita; reflexní prodloužené křeče; zvýšila respirační frekvenci vyšší než 40; apnoeická kouzla; těžká dysfagie; tachykardie větší než 120.
IV	Velmi závažné	Stupeň III a násilné autonomní poruchy zahrnující kardiovaskulární systém. Těžká hypertenze a tachykardie střídající se s relativní hypotenzí a bradykardií, z nichž každá může být perzistentní.

4.7.1 Generalizovaný tetanus

Generalizovaný tetanus je nejčastější forma onemocnění, při které dochází ke křečím svalů, včetně svalů dýchacích, a tak dochází k dechové nedostatečnosti s vysokým rizikem úmrtí za plného vědomí (Kolářová et al., 2020).

Infekce vzniká nejčastěji v hluboké a znečištěné ráně, kde vzniknou vhodné anaerobní podmínky. Typickým příkladem je rána způsobená rezavým hřebíkem nebo zahradním náradím, do které se dostala zemina nebo jiné nečistoty. Vstupní branou může být také chronické poškození kůže nebo i popáleniny. Do rány se společně s cizím tělesem dostanou spory, ze kterých vznikají buňky produkující již zmíněné toxiny, šířící se do krve nebo lymfy. Dále se toxiny dostávají do nervových zakončení a jsou transportovány do CNS. Kromě exogenní cesty existuje nákaza endogenní, kde je zdrojem spor střevo nebo vagina (Hurych, Štícha et al., 2020).

Tetanus má velmi typický klinický obraz. Hlavním projevem jsou tonické křeče s narůstající frekvencí a dobou trvání. Celkový stav je závislý na umístění rány a množství produkovaného toxinu. U pacientů můžeme pozorovat řadu symptomů, jako je například křeč. Křeče mimického svalstva způsobují tzv. sardonický úsměv (*risus sardonicus*), dochází také ke křečím žvýkacího svalstva (trismus) a poruše polykání, laryngospasmus a postižení interkostálních svalů. Dále je postiženo svalstvo zad, břicha a šíje což vede k typickému prohnutí těla ve tvaru luku (opistotonus), způsobené kontrakcí svalů trupu, zejména extenzorů páteře. (Kolářová et al., 2020). Ovlivněná je i funkce autonomního nervového systému, dochází k poruše regulace teploty, pocení, slintání a krevní tlak je nestabilní (Hurych, Štícha et al., 2020).

U mírného tetanu je zachována funkce ledvin. Při závažném onemocnění je častá snížená rychlost glomerulární filtrace a porucha funkce ledvin. Mezi příčiny selhání ledvin patří dehydratace, sepse, rhabdomyolóza a změny průtoku krve ledvinami. Selhání ledvin může být oligurické nebo polyurické. Klinicky významná porucha funkce ledvin je spojena s autonomní nestabilitou a histologie je normální nebo vykazuje akutní tubulární nekrózu (Seedat et al., 1981).

4.7.2 Lokalizovaný tetanus

V případě nižší dávky se může objevit lokální tetanus a svaly jsou postiženy pouze v oblasti vstupu infekce. Tato forma tetanu se nejčastěji vyskytuje u starších osob, u kterých nebyla provedena včas vakcinace, ale jsou částečně imunní (Hurych, Štícha et al., 2020).

VARIANTOU JE CEFALICKÝ TETANUS, KDE JE PRIMÁRNÍM MÍSTEM INFEKCE HLAVA. U TĚCHTO PACIENTŮ JE PROGNOZA VELMI ŠPATNÁ NA ROZDÍL OD LIDÍ S KLASICKÝM LOKALIZOVANÝM TETANEM (MURRAY, ROSENTHAL, PFALLER, 2013).

4.7.3 Novorozenecký tetanus (*tetanus neonatorum*)

Další formou je tetanus novorozenecký, který může být způsoben infekcí pupeční jizvy u novorozenců nenačkované matky (Kolářová et al., 2020). U dětí se objevuje odmítání potravy kvůli špatnému otevírání úst v důsledku trismu. Dítě přestává sát a spasmus obličejových svalů může vyvolat risus sardonius. Ruce se často sevrou, spolu s dorziflexí nohou a zvýšeným svalovým tonusem, který přechází ve ztuhlost a opistotonus. Křeče končetin se objevují brzy, zpočátku jsou vyvolány fyzickými, sluchovými nebo zrakovými podněty, ale nakonec se objevují spontánně (Thwaites, Beeching, Newton, 2015). Počáteční infekce pupeční šňůry, která může být způsobena přestřížením nesterilními nástroji při porodu, dále postupuje a vyvine se v generalizovaný tetanus. Úmrtnost u kojenců přesahuje 90 % a u přeživších jsou přítomny vývojové vady (Murray, Rosenthal, Pfaller, 2013). Autoři jedné studie zjistili, že 20-40 % osob, které přežily novorozenecký tetanus, mělo známky poškození mozku, které se projevilo mikrocefalií a mírnými neurologickými, vývojovými nebo behaviorálními problémy. Komplikace v podobě mozkové obrny, kognitivního opoždění a hluchoty byly popsány u 20 % přeživších v jedné nigerijské sérii případů (Thwaites, Beeching, Newton, 2015). Jedná se téměř výhradně o onemocnění v rozvojových zemích (Murray, Rosenthal, Pfaller, 2013).

V roce 2015 zemřelo na tetanus přibližně 34 000 novorozenců (World health organization, 2017).

4.7.4 Tetanus související s potratem

Ve srovnání s tetanem vzniklým při jiných vstupech má tento tetanus (tzv. postabortivní tetanus) vyšší úmrtnost. Studie provedené v Bangladéši koncem 90. let 20. století naznačily, že 55 % úmrtí na tetanus u žen a dívek ve věku 10-50 let bylo způsobeno postabortivním tetanem. Národní údaje ukázaly, že 35 % úmrtí na tetanus v souvislosti s těhotenstvím bylo způsobeno potratem. V rozvojových zemích dělají tradiční potraty, které běžně zahrnují rizikové postupy, jako je zavádění tyčinek, bylin nebo kořenů do děložního hrdla nebo používání nesterilních chirurgických nástrojů. Odhaduje se, že v roce 2008 došlo k 22 milionům nebezpečných potratů (Thwaites, Beeching, Newton, 2015)

4.7.5 *Clostridium tetani* ve spojení s autismem

Vědecké studie ukazují, že základní příčiny příznaků autismu pozorovaných u některých jedinců mohou způsobovat subakutní, chronické tetanické infekce střevního traktu. Významné procento jedinců s autismem má v anamnéze rozsáhlé užívání antibiotik. Perorální antibiotika významně narušují ochrannou střevní mikroflóru a vytvářejí příznivé prostředí pro kolonizaci oportunními patogeny. *Clostridium tetani* je všudypřítomný anaerobní bacil, který produkuje silný neurotoxin. Střevní kolonizace *C. tetani* a následné uvolňování neurotoxinů byly prokázány u laboratorních zvířat, která byla krmena vegetativními buňkami. Bloudivý nerv je schopen transportovat neurotoxin tetanu (TeNT) a poskytuje cestu vzestupu ze střevního traktu do CNS. Tato cesta obchází normální preferenční vazebná místa TeNT v míše, a proto příznaky typické infekce tetanu nejsou zřejmé. Jakmile je TeNT v mozku, narušuje uvolňování neurotransmiterů proteolytickým štěpením synaptobrevinu, synaptického membránového proteinu vezikuly. Tato inhibice uvolňování neurotransmiterů by vysvětlila širokou škálu behaviorálních deficitů zjevných u autismu. Laboratorní zvířata injekčně podávaná do mozku s TeNT vykazovala mnoho z těchto chování. Některé děti s autismem také prokázaly významné snížení stereotypního chování při léčbě antimikrobiálními látkami účinnými proti střevním klostridiím (Bolte, 1998).

4.8 Laboratorní diagnostika

Důležitou roli v diagnostice tetanu hraje přítomnost klinických příznaků. Kvůli vysoké citlivosti ke kyslíku je kultivace obtížná a je úspěšná pouze u cca 30 % případů. Dochází k rychlému vyvázání toxinu na motorické neurony v cílovém místě, kvůli čemuž bývá detekce z klinického materiálu neúspěšná a jeho produkce se ověřuje u bakteriální kultury (Kolářová et al., 2020). Pokud je organismus získán v kultuře, lze produkci toxinu izolátem potvrdit tetanovým antitoxinovým neutralizačním testem na myších (Murray, Rosenthal, Pfaller, 2013). Dalším z ukazatelů je hlubší poranění nebo chybějící očkování (Hurych, Štícha et al., 2020).

Diagnóza novorozeneckého tetanu zahrnuje porodní asfyxii, hypoglykémii, hypokalcemickou tetanii a záchvaty. Jen málo stavů skutečně napodobuje generalizovaný mateřský tetanus (Thwaites, Beeching, Newton, 2015).

Pro detekci lze také použít biologický test, nebo PCR detekci tetanového toxinu v plazmě nebo v exsudátech z rány, i když jsou ve většině zařízení zřídka dostupné (Thwaites, Beeching, Newton, 2015).

4.8.1 Detekce a kvantifikace *Clostridium tetani* pomocí metody qPCR

Metoda je založena na detekci vybraného genu specifického lokusu. Podstatou zkoušky je Polymerázová řetězová reakce v reálném čase. Jedná se o duplexní real-time PCR, kde je do každé reakce přidána interní amplifikační kontrola, která upozorní na falešně negativní výsledek v důsledku přítomnosti inhibitorů ovlivňujících průběh reakce. Pro kvantifikaci se používá kalibrační křivka desetinásobných ředění gradientu plazmidového konstrukt, do kterého byl naklonován amplifikovaný fragment (Slaný, Slaná, 2015).

4.8.2 Flokulační metoda pro detekci toxinu

Historicky se množství tetanového toxinu vyhodnocuje vizuálně pomocí Ramonovy flokulační metody. Tato metoda byla nejprve navržena pro titraci difterického toxinu a následně byla převzata pro tetanový toxin. Tato titrace spočívá v reakci antigenu s protilátkou. Antigen se nachází na toxinu a protilátka je antitetanové sérum. Uvedená metoda vyžaduje řadu standardních zkumavek připravených se sérem, v němž je koncentrace antitetanové protilátky dobře známa. Po přidání vzorku se pak ve zkumavce s nejlepším poměrem mezi toxinem a sérem objeví bílé vločky. Právě první zkumavka, ve které dojde k flokulaci, udává titr toxinu ve vzorku. Pro rychlejší flokulaci by měly být zkumavky inkubovány ve vodní lázni při teplotě do 45 °C. Titry stanovené Ramonovou metodou se vyjadřují v Lf/ml supernatantu (kde Lf znamená mez flokulace) (Ramon, 1923).

4.8.3 Metoda minimální letální dávky

Jen málo vědců používá minimální letální hodnotu dávky (MLD / ml supernatantu) k vyhodnocení obsahu toxinu a aktivity. Tento test, často prováděný na myších, spočívá v podání injekce zředěného supernatantu zvířatům, čímž se zjistí největší ředění spojené se smrtí zvířat a poté je možné vypočítat jednotky MLD obsažené v jednom vzorku. Pro srovnání, MLD pro člověka je 2,5 ng/kg. Metoda MLD přinesla přesnější výsledky. Vzhledem k tomu, že vyžaduje živočišné zdroje a je náročná na pracovní sílu, tato metoda se často nepoužívá (Gill, 1982).

4.8.4 Enzymově vázaný imunosorbentový test

Rutinní test na detekci protilátek proti tetanu byl popsán Světovou zdravotnickou organizací. Tento test, založený na imunosorbentním testu ELISA (capture enzyme-linked immunosorbent), určuje obsah toxoidů tetanu ve vakcíně. Postup spočívá v potahování monoklonální protilátky na mikrodestičkách. Tato protilátka spojuje těžký řetězec toxoidu. Jamky jsou pak naplněny standardy a vzorky. Poté se do jamek upustí polyklonální protilátka. Tato protilátka je rozpoznána značenou sekundární protilátkou, která je

vizualizována kolorimetrickým substrátem. Optická hustota vzorku koreluje v logaritmické stupnici s množstvím toxoidu ve vzorku. Detekční limit této metody je 0,002 Lf/ml.

Vzhledem k tomu, že toxin a toxoid mají stejná místa pro rozpoznávání protilátek, může být tento test proveden pro kvantifikaci toxinů. Monoklonální a polyklonální protilátky lze přepínat pomocí vhodné sekundární protilátky. Tato metoda je pro stanovení toxinů přesnější než flokulační test nebo měření MLD. Není však běžně používán, protože není schválen Světovou zdravotnickou organizací (World health organization, 2013).

4.9 Prevence

Hlavní ochranou před vznikem tohoto onemocnění je očkování, a při hlubším poranění důkladné ošetření rány. Když přijde pacient s rizikovou ránou, v první řadě se zjišťuje, zda u něho proběhlo v posledních pěti letech očkování proti tetanu. Pokud nikoli, podá se jedna dávka látky. U jedinců, kteří nebyli v minulosti očkovaní vůbec se podává antitetanický imunoglobulin, který poskytne dočasnou ochranu proti nenavázanému toxinu (Hurych, Štícha et al., 2020).

Za nejvíce rizikové rány se považují popáleniny, pokousání zvířetem, rány významně kontaminované půdou či cizím předmětem, poranění v oblasti hlavy a krku (Hurych, Štícha et al., 2020).

4.9.1 Očkování

Očkování proti tetanu je jedním z povinných očkování dětí a je součástí hexavakcíny i trivakcíny. U dospělých se přeočkovává ve 25 letech a poté každých 10-15 let nebo v případě rizikových poranění (Hurych, Štícha et al., 2020). Cílem očkování proti tetanu je dosáhnout globální mateřské a neonatální eliminace tetanu a zajistit celoživotní ochranu proti tetanu u všech lidí. Všechny děti na celém světě by měly být imunizovány proti tetanu. Každá země by měla usilovat o dosažení včasného očkování kojenců zahájeného od šesti týdnů věku. Měli by udržovat vysoké pokrytí kompletní 3dávkové primární série plus 3dávkové posilovací série před dospíváním. V zemích, kde eliminace tetanu dosud nebylo dosaženo, a v oblastech, kde mateřský a novorozenecký tetanus zůstává problémem pro veřejné zdraví, je třeba věnovat zvláštní pozornost zajištění imunizace žen v reprodukčním věku. Jakmile však bude realizováno vysoké pokrytí 6dávkovým dětským a dospívajícím tetanusovým schématem, budoucí těhotné ženy budou chráněny před tetanem během svých reprodukčních let a dále (World health organization, 2017).

4.9.1.1 Výroba vakcíny proti tetanu

Vakcína proti tetanu se vyrábí z kultury *C. tetani*. Produkovaný nativní tetanový toxin je inaktivován formaldehydem za vzniku toxoidu. Kvůli této inaktivaci je nutné přidání adjuvans k vyvolání imunitní odpovědi bez letality (Smith et al., 2011). Pro výrobu vakcíny se kmeny *C. tetani* průmyslově pěstují v komplexních médiích odvozených z Muellerova a Millerova média. Toto médium se skládá hlavně z hydrolyzátu kaseinu, glukózy, infuze hovězího srdce a vitamínů. Vzhledem k tomu, že pankreatické digesty kaseinu a hovězího srdce jsou nedefinované komplexní materiály, způsobují důležitou variabilitu mezi jednotlivými šaržemi. Mueller hlásil snížení titerů toxinů na polovinu při použití nové šarže kaseinových digestů. Po analýze vzorků z různých fází výroby kaseinu zůstala variabilita mezi jednotlivými šaržemi nevysvětlena (Mueller a Miller, 1954). Vzhledem k této variabilitě a aby se zabránilo toxickým nebo alergickým reakcím z neúplného trávení savčích proteinů v komplexních médiích, Světová zdravotnická organizace doporučuje všem výrobcům vakcín, aby pěstovali *C. tetani* v chemicky definovaných médiích (Garrigues et al., 2022).

4.9.1.2 Základní očkování u dětí

Doporučuje se primární série 3 dávek vakcíny TTCV s první dávkou podávanou od 6 týdnů věku. Následné dávky by měly být podávány s minimálním intervalem 4 týdnů mezi dávkami. Třetí dávka primární série by měla být dokončena do 6 měsíců věku, pokud je to možné. 3dávková primární série je základem pro budování celoživotní imunity vůči tetanu. Vzhledem k historicky nízkému pokrytí v mnoha zemích by měly být všechny příležitosti k poskytnutí primární série pro děti, které tyto dávky vynechaly v dětství, plně využity v jakémkoli věku (World health organization, 2017).

Imunizační programy by měly zajistit, aby byly poskytnuty 3 posilovací dávky v dětství a během dospívání. Měly by být podávány ve věku 12-23 měsíců, 4-7 let a 9-15 let. V ideálním případě by mezi posilovacími dávkami měly být nejméně 4 roky. Jednotlivé státy by si měly upravit očkovací schémata v rámci věkových hranic a přizpůsobit plány na základě místní epidemiologie a současně sladit očkování proti tetanu s jinými vakcínami, zejména proti černému kašli a záškrtu. Vakcíny TTCV mohou být použity u imunokompromitovaných osob, včetně jedinců infikovaných virem lidské imunodeficiency (HIV), ale imunitní odpověď může být nižší než u plně imunokompetentních osob. Všechny děti infikované HIV by měly být očkovány proti tetanu podle doporučení vakcíny pro běžnou populaci (World health organization, 2017).

Při podání vakcíny proti tetanu spolu s dalšími vakcínami nedochází k interferenci s odpovědí na žádný z těchto dalších antigenů. Všechny vakcíny, které jsou přiměřené věku a v souladu s předchozí imunizační anamnézou dítěte, mohou být podány během stejné návštěvy. Zejména TTCV může být podáván současně s HPV (lidský papilomavirus), inaktivovanou vakcínou proti dětské obrně (IPV), perorální vakcínou proti obrně (OPV), PCV, rotavirem, MCV a meningokokovými konjugovanými vakcínami. Pokud jsou během stejné návštěvy podány 2 nebo více vakcín, mohou být injekčně aplikovány do různých končetin. Pokud jsou podány 3 vakcíny, 2 mohou být injekčně aplikovány do stejné končetiny a třetí by měla být injekčně podána do druhé končetiny. Injekce do stejné končetiny by měly být od sebe vzdáleny nejméně 2,5 cm, aby bylo možné rozlišit lokální reakce. Existují účinné metody pro zmírnění bolesti v době očkování (World health organization, 2017).

4.9.1.3 Očkování těhotných žen a zlepšení porodní hygieny

Světová zdravotnická organizace (WHO) vydala jasná doporučení týkající se očkování žen a zajištění čistých porodů za účelem eliminace mateřského a novorozeneckého tetanu (World health organization, et al., 2004). Neimunizované těhotné ženy nebo ženy bez dokladu o imunizaci by měly na počátku těhotenství dostat dvě dávky tetanového toxoidu s odstupem jednoho měsíce, a poté každý rok do celkového počtu pěti dávek k zajištění celoživotní ochrany (Borrow, Balmer, Roper, 2007). Pro snižování výskytu novorozeneckého tetanu je důležité dodržování porodní hygieny. WHO prosazuje používání šesti čistých opatření: čistý porodní povrch, čisté ruce, čisté perineum (hráz mezi pochvou a konečníkem), čisté přestřížení pupečníku jeho podvázání a péče o něj (Blencowe et al., 2011). Čisté porodní postupy v domácnosti mohou zabránit 30 % úmrtí na novorozenecký tetanu, v přítomnosti kvalifikovaného personálu je to 35 % a pokud porod proběhne ve zdravotnickém zařízení s poporodními opatřeními je zachráněno až 40 % novorozenců. Tento výzkum potvrzuje i studie v Pákistánu, kde díky čistým porodním soupravám zabránili přibližně čtvrtině případů novorozeneckého tetanu (Raza, Avan, 2013).

4.10 Terapie

V první fázi komplexní léčby se zajišťuje funkce dýchacích cest a zabraňuje se rozvoji křečí. Následuje podání antitoxinu a chirurgické vyčištění infikované rány. Nakonec se podá vhodné antibiotikum, první volbou je Metronidazol, popřípadě penicilin G (Kolářová et al.,

2020). Tato antibiotika se používají pro dekontaminaci znečištěné rány a eliminaci vegetativních bakterií produkujících toxin. U vážných stavů se musí zahájit podpora dýchání aplikováním myorelaxancia příčně pruhovaného svalstva (Hurych, Štícha et al., 2020).

Léčba mateřského a novorozeneckého tetanu zahrnuje neutralizaci toxinu, eliminaci bakterií a symptomatickou kontrolu s podpůrnou péčí. Většina údajů pro léčbu vychází z pozorování nebo studií tetanu u dospělých. Protože se novorozenecký tetanus vyskytuje v středně příjmových zemích s malými zdroji, kde není možné dostatečně financovat výzkum, existuje jen málo zpráv o specializované péči o novorozence (Thwaites, Beeching, Newton, 2015).

4.10.1 léčba antibiotiky

Intravenózní penicilin a Metronidazol, jak už bylo zmíněno, jsou léky první volby u tetanu. Testování na antibiotika není rutinní, ale studie izolátů *C. tetani* ve Vietnamu odhalila, že všechny izoláty byly citlivé na Metronidazol a penicilin, ale rezistentní na ko-trimoxazol. V této studii došlo k prodloužené infekci navzdory léčbě antibiotiky, protože *C. tetani* roste v devitalizovaných anaerobních podmínkách, ve kterých antibiotika špatně pronikají (Thwaites, Beeching, Newton, 2015).

Metronidazol a penicilin mají ekvivalentní aktivitu proti *C. tetani*. Někteří však doporučují léčbu Metronidazolem, protože penicilin, stejně jako tetanospasmin, inhibuje aktivitu GABA, která může způsobit excitaci centrálního nervového systému. Toxin vázaný na nervová zakončení je chráněn před protilátkami. Proto musí být toxické účinky kontrolovány symptomaticky, dokud se neobnoví normální regulace synaptického přenosu (Murray, Rosenthal, Pfaller, 2013).

4.10.2 Parenterální antitoxin

Parenterální aplikace je mimostřevní podání jako je např. nitrožilní či nitrosvalové. Je prokázáno, že léčba antitoxinem snižuje úmrtnost. Používají se dva antitoxiny, koňský antitetanový sérum nebo lidský tetanový imunoglobulin (Blake, Paul, et al., 1976). Výsledky mezi pacienty léčenými koňským či lidským antitoxinem se neliší. V celosvětovém měřítku se nejčastěji používá antitetanové sérum odvozené od koní, ačkoli se dává přednost lidskému tetanovému imunoglobulinu. Současné dávky vycházejí ze studií provedených v 60. letech 20. století (Thwaites, Beeching, Newton, 2015).

4.10.3 Intratekální antitoxin

Jedná se o aplikaci do intratekálního prostoru, zpravidla v oblasti bederní páteře, kde se nachází mozkomíšní mok (likvor). Provádí se lumbální punkce, nejprve se musí odebrat část likvoru a zpět aplikovat stejné množství tekutiny. Podávání antitoxinu intratekální cestou je předmětem zájmu již několik desetiletí. Tato cesta umožňuje neutralizovat toxin v nervovém systému a zvýšit intratekální koncentraci antitoxinu ve srovnání s koncentracemi dosaženými po intramuskulárním podání. Při pozorování stavu pacientů po intramuskulárním a intratekálním podání bylo zjištěno, že ačkoli se míra úmrtnosti mezi oběma skupinami nelišila, doba hospitalizace a progresse onemocnění byla kratší ve skupině intratekální a léčba významně snížila náklady na jednotku intenzivní péče i pobyt v nemocnici (Miranda-Filho, Demócrito, et al., 2013).

4.10.4 Podpůrná léčba

Kromě zajištění základních životních funkcí k uvedenému postupu patří také kontrola křečí a jejich zmírnění. K tomuto účelu se používá intravenózní diazepam nebo intramuskulární paraldehyd. V mnoha rozvojových zemích jsou základem léčby dostupná sedativa jako je chlorpromazin a fenobarbiton, které se aplikují nasogastricky nebo intravenózně (Thwaites, Beeching, Newton, 2015).

Pacientům je možné podávat také síran hořečnatý, který má svalové relaxační, vazodilatační a negativně chronotropní vlastnosti, čímž představuje potenciálně jednoduchou a levnou metodu léčby tetanu. První údaje z observačních sérií případů u dospělých ukázaly, že pečlivá titrace dávky proti patelárnímu reflexu může umožnit zvládnutí křečí bez nutnosti mechanické ventilace (Attigalle, Rodrigo, 2002). Nicméně další studie ukázaly, že léčbu hořčíkem lze samostatně použít jen u lehčích případů tetanu a nebylo možné prokázat snížení úmrtnosti u pacientů léčených hořčíkem ve srovnání s léčbou diazepamem (Rodrigo, Fernando, Rajapakse, 2014).

4.11 Kazuistika

První případ bakteriémie způsobené bakterií *C. tetani*

87letá Afroameričanka s gastrointestinálními potížemi, astmatem, hypertenzí, diabetem a chronickou obstrukční plicní nemocí byla v roce 1965 byla původně pro dušnost přijata do nemocnice. Během jejího pobytu v nemocnici byl ve dvou anaerobních lahvičkách krevních kultur odebraných při přijetí zjištěn 48hodinový růst gram-variabilních tyčinek a u pacientky byla zahájena léčba cefepimem. Její opakované kultivace odebrané o dva 2 dny později byly negativní. Pacientka se zlepšila a byla propuštěna domů na perorálním vantinu na 5 dní. Po propuštění se jí zhoršila chuť k jídlu a začala se cítit postupně slabší. Vrátila se do nemocnice a 3 dny si stěžovala na generalizovanou slabost a průjem. Popírala krev ve stolici, nevolnost, zvracení, horečku nebo zimnici. Při fyzikálním vyšetření byla pacientka bez horečky s normální teplotou, ale měla tachykardii 112 tepů za minutu. Další nálezy byly pozoruhodné velkou neredukovatelnou ventrální kýlou o rozměrech asi 7x4 cm, bolestivou na pohmat, spolu s okolním erytémem. Zbytek fyzikálního vyšetření byl bez pozoruhodností, zejména kůže byla neporušená bez známek poranění nebo kožních poruch. Laboratorní testy ukázaly počet bílých krvinek $6,8 \times 10^3$ na μl (72 % neutrofilů, 11 % lymfocytů a 15 % monocytů), hemoglobin 10,5 g na dl a počet krevních destiček 214×10^3 na μl . Jaterní enzymy byly v normě. Stolice pacientky byla pozitivní na toxiny *Clostridium difficile* a byla zahájena perorální léčba metronidazolem. Krevní kultivace odhalila přítomnost *C. tetani*, který byl identifikován čtvrtý den spolu s *Clostridium clostridioforme* a *Bacteroides fragilis*. Pacientka neměl žádné příznaky odpovídající tetanu. Počítačová tomografie břicha a pánve odhalila divertikulózu tlustého střeva s možným mírným zánětem sigmoideálního segmentu spolu s velkou neobstrukční ventrální kýlou. Na zobrazovacích metodách nebyl zjištěn žádný absces. Pacientka podstoupila kolonoskopii, která prokázala středně těžký zánět tlustého střeva, divertikulózu, vnitřní hemoroidy a velkou kýlu zasahující do vzestupného tračnicku se zúžením lumen, které ztěžovalo průchod endoskopu. Endoskop se nacházel uvnitř kýlního vaku, který byl proximálně od ileocékální chlopně a slepého střeva. Byla podána posilovací dávka vakcíny proti tetanu a záškrtu. Stav ženy se následně zlepšil a byla propuštěna s perorálním Metronidazolem (Hallit et al., 2013).

Případ smrtelného tetanu, Muž 86 let, Portoriko 2002

86letý muž navštívil lékaře kvůli třísece v pravé ruce, kterou si zarazil o 3 dny dříve při zahradničení. Nebyl léčen vakcínou proti toxoidu ani imunoglobulinem proti tetanu. O sedm dní později se u něj rozvinula faryngitida a po dalších třech dnech se dostavil do nemocnice s potížemi s mluvením, polykáním a dýcháním, s bolestí na hrudi a dezorientací. Byl přijat do nemocnice s diagnózou mrtvice. Čtvrtý den v nemocnici se u něj objevila ztuhlost krku a respirační selhání, což vyžadovalo tracheostomii a mechanickou ventilaci. Byl převezen na jednotku intenzivní péče, kde byla provedena klinická diagnóza tetanu. I přes léčbu tetanovým toxoidem a imunoglobulinem pacient zemřel 1 měsíc po přijetí do nemocnice (CDC, 2002).

Případ lokalizovaného tetanu, muž 55 let

55letý muž, zemědělec, se 7 dní před prezentací dostavil s anamnézou poranění prstu levé nohy (obr. 5), po kterém následoval nedávný nástup horečky, zimnice a bolesti hlavy. Nechal se ošetřit u místního lékaře a během 24 hodin se u něj objevily stížnosti na bolest levé dolní končetiny spojené s občasnými svalovými křečemi postihujícími levou dolní končetinu. Při kompletním neurologickém vyšetření nebyly zjištěny žádné známky postižení střev ani měchýře, alterace senzorky ani známky generalizovaného tetanu, jako je trismus, bolest a ztuhlost svalů, bolest zad, opistotonus, nebo potíže při polykání. V anamnéze neměl žádné očkování. Dále neuvedl žádnou anamnézu požití jedovatých látek nebo alternativních léků. Při laboratorním vyšetření krve byla zjištěna leukocytóza, normální funkce ledvin a jater se zvýšenou hodnotou C-reaktivního proteinu. Rentgenologické vyšetření kyčle, kolene a kotníků pravé i levé končetiny bylo normální. Vzhledem ke křečovitým stahům lokalizovaným převážně do levé dolní končetiny byla stanovena rychlá diagnóza lokalizovaného tetanu a pacientovi byly okamžitě podány lidské tetanové imunoglobuliny, 1000 IU IM, k neutralizaci cirkulujících toxinů. Urychleně bylo provedeno chirurgické ošetření rány spolu s podáním tetanového toxoidu. Pro svalové křeče mu byl podán diazepam v infuzi 1 mg/kg/den, s jehož pomocí křeče ustoupily a byly během 3 dnů zkráceny a převedeny na perorální formu. K dalšímu zhoršení u něj nedošlo. Nevyžadoval tracheostomii, protože křeče negeneralizovaly. Jako antibiotické krytí byl podáván cefalosporin a metronidazol. Za 7 dní byl propuštěn a byl sledován s cílem zjistit odpověď. Je stabilní, při kontrole po 6 měsících nemá žádný reziduální deficit (Sharma, Shah, 2018).



Obrázek 5- Infikované poranění palce levé nohy (Sharma, Shah, 2018).

Případ lokalizovaného tetanu, muž 35 let

Na oddělení urgentního příjmu konkrétní nemocnice se dostavil 35letý pravák s anamnézou bolestivého otoku pravého palce. Pacient pracoval v továrně na výrobu kovů, zabýval se řezáním a svařováním různých kovů. V dětství pacient absolvoval kompletní očkovací program, ale žádná další přeočkování již neměl. V anamnéze neměl žádný akutní úraz a systémově byl v pořádku. Byl poslán domů s perorálním flukloxacilinem a bylo mu doporučeno, aby se vrátil, pokud se příznaky zhorší. O několik hodin později se u něj objevila vysoká teplota se zimnicí a vrátil se na pohotovostní oddělení, kde byl odeslán na pohotovostní ortopedický tým. Při dalším výslechu bylo zjištěno, že příhoda začala bolestí a otokem distální falangy palce už předchozí dne. Při večeri prodělal 30-60 s trvající epizodu, kdy mu palec ztuhl a nemohl použít příbor, což však spontánně odeznělo. Při vyšetření byl jeho pravý palec silně oteklý, erytematózní a na pohmat velmi citlivý. Palec držel ve flexi, přičemž pohyby v interfalangeálním a metakarpofalangeálním kloubu byly velmi omezené a bolestivé. Dále byla zaznamenána malá, téměř zcela zhojená bodná rána na špičce prstu. Vzpomněl si, že před 2 týdny byl poraněn kovovou třískou, kterou se mu podařilo extrahovat pomocí jehly. Rána se

však infikovala. Několik dní z ní vytékal hnis a pak se zdánlivě vyřešila sama od sebe, takže pomoc nevyhledal. Pacient byl poté přijat k intravenóznímu podání antibiotik a přísné elevaci. Krevní testy prokázaly mírnou neutrofilii a zvýšený C-reaktivní protein. Vápník, hořčík, jaterní funkce a funkční testy štítné žlázy byly v rozmezí. Druhý den ráno byl pacient převezen na sál k formální exploraci a výplachu rány. V průběhu ošetření se jeho pravá ruka dostala do karpopedální křeče s plnou flexí metakarpofalangeálních kloubů a zápěstního kloubu pravé ruky s extenzí interfalangeálních kloubů. Ruka zůstávala v této poloze, dokud nebyla podána infuze svalového relaxantu, aby bylo možné pokračovat v operaci. Při operaci byla zjištěna pouze povrchová rána bez postižení šlachových pochev.

Neobvyklé intraoperační příhody byly projednány s konzultantem mikrobiologem, který se shodl, že příznaky by odpovídaly případu lokalizovaného tetanu. K antibiotickému režimu byl přidán metronidazol a byla podána jednorázová infuze lidského imunoglobulinu. Jako posilovací dávka byla podána také jedna dávka tetanového toxoidu a pacient byl poté po 48 hodinách sledování odeslán domů. Ve výtěru z rány odebraném intraoperačně nebyly nalezeny žádné organismy (Gulamhussein, Guha, 2016).

Chlapec nakažený tetanem v ČR

V srpnu roku 2019 se do Fakultní nemocnice Brno dostal tříletý chlapec, který měl v nose zaraženou knoflíkovou baterii. Lékaři ji odstranili a předepsali chlapci antibiotika. Na začátku září se u dítěte objevilo svalové napětí, drobné křeče v obličeji a jiných částech těla. Chlapec byl hospitalizován na jednotce intenzivní péče v brněnské dětské nemocnici, kde byl stabilizován a nákazu se podařilo lékařům zastavit. Baterie způsobila v nose oděrku a bakterie se tak dostala do těla. Lékaři se dozvěděli, že i přes povinné očkování proti tetanu, matka dítě naočkovat nenechala (Ondráčková, 2019).

Dívka nenačkovaná proti tetanu

V roce 2020 do českobudějovické nemocnice přivezla záchranná služba matku s desetiletou dívkou, která utrpěla tržnou ránu na hlavě způsobenou koněm. Lékaři dívku ošetřili, nasadili antibiotika a imunoglobulin, protože dívka nebyla očkovaná doporučili očkování proti tetanu, které matka odmítla. Matka nechtěla nechat dívku v nemocnici, obávala se, že by ji tam naočkovali, a tak lékaři dívku propustili na reverz s tím, že není v ohrožení života. Nemocnice vydala předběžné opatření o předání dítěte do péče nemocnice a případ se začal řešit soudní cestou, žena odmítla dítě vydat. Matka nechala dceru vyšetřit u praktické lékařky, podle které je dívka zdravá, v dobrém celkovém stavu, bez neurologických příznaků,

a rodina požádala o zrušení předběžného opatření. Soud opatření zrušil a varoval, že nemoc se i po залечení může po několika týdnech rozvinout (Dolejší, 2020).

Případ generalizovaného tetanu v ČR

V srpnu roku 2011 byl 96letý pacient přeložen z neurologického oddělení Vojenské nemocnice Brno na Kliniku infekčních chorob (KICH) kvůli podezření na tetanus. Muž měl polykací potíže a bolest šíjového svalstva, před přijetím na lůžko byl vyšetřen na interním pracovišti, kde stav uzavřeli jako potíže s páteří a doporučili nesteroidní antiflogistika a myorelaxans.

V nálezů při přijetí dominovala porucha polykání, huhňavá řeč, porucha dynamiky krční páteře, laboratorní vyšetření bylo bez pozoruhodností, CT vyšetření mozku prokázalo pouze mozkovou atrofii odpovídající věku pacienta a na rentgenu krční páteře byly popsány degenerativní změny.

Druhý den hospitalizace došlo u pacienta k respiračním potížím, byla nutná umělá plicní ventilace a pacient byl přeložen na jednotku intenzivní péče (JIP). Byla provedena lumbální punkce, ale likvorologický nález byl negativní. Postupně se u muže rozvinulo strnutí šíje, trismus, risus sardonius, hypertonus končetinového a zádového svalstva. Vzhledem k pravděpodobné absenci přeočkování proti tetanu byl pacientovi diagnostikován generalizovaný tetanus.

Pacientovi byl aplikován tetanický imunoglobulin, byla zahájena léčba podáním tetanického anatoxinu a současně byla nasazena antibiotika. Čtvrtý den od přijetí dochází k levostranné bronchopneumonii, kultivací byl prokázán *Staphylococcus aureus* kvůli kterému byla změněna antibiotika. U pacienta se začaly objevovat další komplikace, krvácení z dutiny ústní, rozvoj renální insuficience, oligurie až anurie. Přes veškerou terapii pacient umírá 14. den hospitalizace na srdeční a renální selhání, což bylo potvrzené pitvou (Pýchová et al., 2013).

ZÁVĚR

Tato práce shrnuje základní charakteristiku bakterie *Clostridium tetani* a jejího onemocnění. *C. tetani* spadá do rodu *Clostridium* a je známá už několik století. Její tyčinky vytvářejí spory, díky kterým přežívá v půdě a v gastrointestinálním traktu zvířat i lidí. Bakterie má několik známých patogenních kmenů, které produkují nebezpečné toxiny, ale i několik kmenů, které žádné nemoci nezpůsobují. Hlavním produktem bakterie je tetanový toxin, který šíří se do centrální nervové soustavy a způsobuje svalové křeče v různých částech těla.

Onemocnění, které popisovaná bakterie způsobuje, se nazývá tetanus a má několik forem. V okamžiku, kdy křeče postihují téměř celé tělo, jedná se o generalizovaný tetanus. Druhou variantou je lokalizovaný tetanus, při kterém je postižena jen určitá část v blízkosti vstupu infekce do těla, nejčastěji některá z končetin. Tetanus může zasáhnout i těhotné ženy a novorozence, jak je tomu především v rozvojových zemích, pak se jev označuje jako mateřský či novorozenecký tetanus.

Práce zahrnuje popis laboratorní diagnostiky, která souvisí s klinickými příznaky onemocnění, jako jsou např. křeče mimického svalstva (sardonický úsměv), křeče žvýkačického svalu (trismus) a prohnutí těla ve tvaru luku (opistotonus). Nastiňuje rovněž některé metody detekce *C. tetani* a jejího toxinu, kterými jsou např. flokulační metoda, metoda MLD nebo enzymově vázaný imunisorbentový test. V dalších oddílech jsou také popsány základní kultivační média a látky potřebné pro růst *C. tetani*. Aby bakterie dobře rostla, potřebuje glukózu, peptidy, železo, minerální soli a řadu vitamínů.

Důležitou kapitolou je prevence, která zahrnuje informace o očkování proti tetanu, díky kterému se tetanus v mnoha zemích téměř nevyskytuje. Napomohla tomu mezinárodně působící světová zdravotnická organizace, která vytvořila základní očkovací schéma zahrnující 6 dávek vakcíny v průběhu dětství a dospívání.

Uvedené konkrétní případy, zmíněné v závěru celé práce mimo jiné ukazují, že z prvních příznaků onemocnění nemusí být v první fázi zřejmé, zda se jedná o tetanus, což jenom vyzdvihuje, jak je očkování proti tetanu důležité.

POUŽITÁ LITERATURA

1. ABLETT, J. J. L. Analysis and main experience in 82 patients treated in Leeds tetanus unit. In: *Symposium on tetanus in Great Britain, 1967*. Natinal Lending Library, 1967. p. 1-10.
2. ANDREESSEN, Jan R.; BAHL, Hubert; GOTTSCHALK, Gerhard. Introduction to the physiology and biochemistry of the genus *Clostridium*. In: *Clostridia*. Springer, Boston, MA, 1989. p. 27-62.
3. ATTYGALLE, D.; RODRIGO, N. Magnesium as first line therapy in the management of tetanus: a prospective study of 40 patients. *Anaesthesia*, 2002, 57.8: 778-817.
4. BLAKE, Paul A., et al. Serologic therapy of tetanus in the United States, 1965-1971. *Jama*, 1976, 235.1: 42-44.
5. BLENCOWE, Hannah, et al. Clean birth and postnatal care practices to reduce neonatal deaths from sepsis and tetanus: a systematic review and Delphi estimation of mortality effect. *BMC Public Health*, 2011, 11.3: 1-19.
6. BOLTE, E.R. Autism and *clostridium tetani*. *Medical Hypotheses*. August 1998, 1998(2), 133-144. ISSN 0306-9877.
7. BORROW, Ray; BALMER, Paul; ROPER, Martha H. VBThe immunological basis for immunization series Module 3: Tetanus. 2007.
8. BRÜGGEMANN, Holger, et al. Genomics of *Clostridium tetani*. *Research in Microbiology*, 2015, 166.4: 326-331.
9. BRÜGGEMANN, Holger, et al. The genome sequence of *Clostridium tetani*, the causative agent of tetanus disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2003, 100.3: 1316-1321.
10. BRÜGGEMANN, Holger; GOTTSCHALK, Gerhard. Insights in metabolism and toxin production from the complete genome sequence of *Clostridium tetani*. *Anaerobe*, 2004, 10.2: 53-68.
11. BUCKEL, Wolfgang; BARKER, HA246608. Two pathways of glutamate fermentation by anaerobic bacteria. *Journal of bacteriology*, 1974, 117.3: 1248-1260.
12. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Tetanus – Puerto Rico, 2002. MMWR. Morb Mortal Wkly Rep. 2002 July; 51 (28): 613-615. PMID: 12236301.
13. COOK, T. M.; PROTHEROE, R. T.; HANDEL, J. M. Tetanus: a review of the literature. *British Journal of Anaesthesia*, 2001, 87.3: 477-487.

14. DOLEJŠÍ, Milan. *Dítě bez tetanovky zůstává po ošetření praktikem u matky. Soud zrušil předběžné opatření* [online]. Praha, 17. 12. 2020, 2020 [cit. 2022-06-19]. Dostupné z: <https://ct24.ceskatelevize.cz/domaci/3242246-dite-bez-tetanovky-zustava-po-osetreni-praktikem-u-matky-soud-zrusil-predbezne>
15. DROZD, Pavel. *Principy systematiky a taxonomie*. Ostrava: Ostravská univerzita, 2004. ISBN 80-7042-995-x.
16. FEENEY, Robert E.; MUELLER, J. Howard; MILLER, Pauline A. Growth requirements of *clostridium tetani*: II. Factors exhausted by growth of the organism. *Journal of Bacteriology*, 1943, 46.6: 559-562.
17. FEENEY, Robert E.; MUELLER, J. Howard; MILLER, Pauline A. Growth requirements of *clostridium tetani*: III. A “Synthetic” Medium. *Journal of Bacteriology*, 1943, 46.6: 563-571.
18. FINN JR, Charles W., et al. The structural gene for tetanus neurotoxin is on a plasmid. *Science*, 1984, 224.4651: 881-884.
19. GARRIGUES, Lucile, et al. Insights into *Clostridium tetani*: From genome to bioreactors. *Biotechnology Advances*, 2022, 54: 107781.
20. GARRITY, George M., et al. Systematic bacteriology. The Proteobacteria, Part C: The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria, Bergey’s Manual Trust, Department of Microbiology and Molecular Genetics, 2005, 2.
21. GEORGE, Elizabeth K.; DE JESUS, Orlando; VIVEKANANDAN, Renuga. *Clostridium tetani*. In: *StatPearls [Internet]*. StatPearls Publishing, 2021.
22. GILL, D. Michael. Bacterial toxins: a table of lethal amounts. *Microbiological reviews*, 1982, 46.1: 86-94.
23. GONZÁLEZ-PAJUELO, María, et al. Microbial conversion of glycerol to 1, 3-propanediol: physiological comparison of a natural producer, *Clostridium butyricum* VPI 3266, and an engineered strain, *Clostridium acetobutylicum* DG1 (pSPD5). *Applied and environmental mikrobiology*, 2006, 72.1: 96-101.
24. GULAMHUSSEIN, Mohamed Amirali; LI, Yueyang; GUHA, Abhijit. Localized tetanus in an adult patient: case report. *Journal of Orthopaedic Case Reports*, 2016, 6.4: 100.
25. HALLIT, Rabih Riad, et al. *Clostridium tetani* bacteraemia. *Journal of medical microbiology*, 2013, 62.1: 155-156.
26. HELTING, Torsten B.; PARSCHE, Sieglinde; ENGELHARDT, Hermann. Structure of tetanus toxin. Demonstration and separation of a specific enzyme converting

- intracellular tetanus toxin to the extracellular form. *Journal of Biological Chemistry*, 1979, 254.21: 10728-10733.
27. HELTING, TORSTEN B.; ZWISLER, OSWALD. Structure of tetanus toxin. I. Breakdown of the toxin molecule and discrimination between polypeptide fragments. *Journal of Biological Chemistry*, 1977, 252.1: 187-193.
 28. HURYCH, Jakub a Roman ŠTÍCHA. *Lékařská mikrobiologie: repetitorium*. Praha: Stanislav Juhaňák – Triton, 2020. ISBN 978-80-7553-844-4.
 29. CHAPETON-MONTES, Diana, et al. Tetanus toxin synthesis is under the control of a complex network of 45ikrobiolo genes in *clostridium tetani*. *Toxins*, 2020, 12.5: 328.
 30. KAUFMAN, L.; HUMPHRIES, J. C. Studies of the Nutritional Requirements of *Clostridium tetani*: I. A Chemically Defined Medium. *Applied Microbiology*, 1958, 6.5: 311-315.
 31. KOLÁŘOVÁ, Libuše. *Obecná a klinická mikrobiologie*. Praha: Galén, [2020]. ISBN 978-80-7492-477-4.
 32. KRIEGLSTEIN, Kerstin G., et al. Limited proteolysis of tetanus toxin: relation to 45ikrobio and identification of cleavage sites. *European journal of biochemistry*, 1991, 202.1: 41-51.
 33. LATHAM, William C.; BENT, Donald F.; LEVINE, Leo. Tetanus toxin production in the absence of protein. *Applied 45ikrobiology*, 1962, 10.2: 146-152.
 34. LERNER, Edwin M.; MUELLER, J. Howard. The role of glutamine in the glucose metabolism of *Clostridium tetani*. *Journal of Biological Chemistry*, 1949, 181.1: 43-45.
 35. LEVY, Pierre-Yves, et al. *Clostridium tetani* osteitis without tetanus. *Emerging Infectious Diseases*, 2014, 20.9: 1571.
 36. MARTINEZ, Rafael J.; RITTENBERG, Sydney C. Glucose dissimilation by *Clostridium tetani*. *Journal of Bacteriology*, 1959, 77.2: 156-163.
 37. MARVAUD, Jean-Christophe, et al. Regulation of the toxinogenesis in *Clostridium botulinum* and *Clostridium tetani*. *Biology of the Cell*, 2000, 92.6: 455-457.
 38. MIRANDA-FILHO, Demócrito B., et al. Incremental costs of treating tetanus with intrathecal antitetanus immunoglobulin. *Tropical medicine & international health*, 2013, 18.5: 555-563.
 39. MUELLER, J. Howard, et al. Production of tetanus toxin on peptone-free media. *The Journal of Clinical Investigation*, 1943, 22.2: 315-318.
 40. MUELLER, J. Howard; MILLER, Pauline A. Essential role of histidine peptides in tetanus toxin production. *Journal of Biological Chemistry*, 1956, 223.1: 185-194.

41. MUELLER, J. HOWARD; MILLER, PAULINE A. Participation of peptides in tetanus toxin production. *Transactions of the New York Academy of Sciences*, 1953, 16.1 Series II: 20-23.
42. MUELLER, J. Howard; MILLER, Pauline A. Variable factors influencing the production of tetanus toxin. *Journal of Bacteriology*, 1954, 67.3: 271-277.
43. MURRAY, Patrick R., Ken S. ROSENTHAL a Michael A. PFALLER. *MEDICAL MICROBIOLOGY*. Seventh Edition. Philadelphia: ELSEVIER SAUNDERS, 2013. ISBN 978-0-323-08692-9.
44. NAKAMURA, S., et al. Taxonomy of *Clostridium tetani* and related species. *Microbiology*, 1979, 113.1: 29-35.
45. Národní zdravotnický informační portál: Ministerstvo zdravotnictví ČR a Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR [online]. Praha, 2022 [cit. 2022-06-19]. Dostupné z: <https://www.nzip.cz/clanek/39-tetanus>
46. ONDRÁČKOVÁ, Tereza. *Neočkované dítě se nakazilo nebezpečným tetanem, v Česku jde o raritní případ* [online]. 26. 9. 2019 [cit. 2022-06-19]. Dostupné z: <https://ct24.ceskatelevize.cz/regiony/jihomoravsky-kraj/2935178-v-brnenske-nemocnici-lezi-chlapec-s-tetanem-nebyl-ockovany>
47. ORELLANA, Camila A., et al. Time-course transcriptomics reveals that amino acids catabolism plays a key role in toxinogenesis and morphology in *Clostridium tetani*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology: Official Journal of the Society for Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2020, 47.12: 1059-1073.
48. PÝCHOVÁ, M., L. VOJTILOVÁ, M. FREIBERGEROVÁ, R. PAŘÍZKOVÁ, M. ŠNELEROVÁ a P. HUSA. Tetanus – staronová diagnóza? Kazuistika. *Cesk Slov Neurol N* [online]. 2013(1) [cit. 2022-06-19]. ISSN 1802-4041. Dostupné z: <https://www.csmn.eu/casopisy/ceska-slovenska-neurologie/2013-1-6/tetanus-staronova-diagnoza-kazuistika-39602>
49. RAFFESTIN, Stéphanie, et al. BotR/A and TetR are alternative RNA polymerase sigma factors controlling the expression of the neurotoxin and associated protein genes in *Clostridium botulinum* type A and *Clostridium tetani*. *Molecular Microbiology*, 2005, 55.1: 235-249.
50. RAMON, Gaston. La floculation dans les mélanges de toxine et de sérum antidiphthérique. *Ann. Inst. Pasteur*, 1923, 37.12: 1001-1011.

51. RAZA, Syed A.; AVAN, Bilal I. Disposable clean delivery kits and prevention of neonatal tetanus in the presence of skilled birth attendants. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, 2013, 120.2: 148-151.
52. RODRIGO, Chaturaka; FERNANDO, Deepika; RAJAPAKSE, Senaka. Pharmacological management of tetanus: an evidence-based review. *Critical care*, 2014, 18.2: 1-10.
53. SEEDAT, Y. K., et al. Renal failure in tetanus. *British Medical Journal (Clinical research ed.)*, 1981, 282.6261: 360.
54. SHARMA, Deepak S.; SHAH, Mit B. A rare case of localized tetanus. *Indian Journal of Critical Care Medicine: Peer-reviewed, Official Publication of Indian Society of Critical Care Medicine*, 2018, 22.9: 678.
55. SLANÝ, Michal a Iva SLANÁ. *Detekce a kvantifikace Clostridium tetani pomocí metody qPCR*. Brno: Výzkumný ústav veterinárního lékařství, 2015. ISBN 978-80-86895-64-2.
56. SMITH, Jon; LIPSITCH, Marc; ALMOND, Jeffrey W. Vaccine production, distribution, access, and uptake. *The Lancet*, 2011, 378.9789: 428-438.
57. SMITH, L. Ds. The occurrence of *Clostridium botulinum* and *Clostridium tetani* in the soil of the United States. *Health laboratory science*, 1978, 15.2: 74-80.
58. Tetanus. *Národní zdravotnický informační portál: Ministerstvo zdravotnictví ČR a Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR* [online]. Praha, 2022 [cit. 2022-06-19]. ISSN 2695-0340. Dostupné z: <https://www.nzip.cz/clanek/39-tetanus>
59. THWAITES, C Louise, Nicholas J BEECHING a Charles R. Maternal and neonatal tetanus. *The Lancet*. January 2015, 2015(9965), 362-370. ISSN 0140-6736.
60. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Tetanus vaccines: WHO position paper, February 2017—recommendations. *Vaccine*, 2018, 36.25: 3573-3575.
61. WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Making pregnancy safer: the critical role of the skilled attendant: a joint statement by WHO, ICM and FIGO*. World health organization, 2004.
62. WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Manual for quality control of diphtheria, tetanus and 47ikrobio vaccines*. World Health Organization, 2013.
63. YU, Xue-Jie, et al. Amino acid biosynthesis deficiency in bacteria associated with human and animal hosts. *Infection, Genetics and Evolution*, 2009, 9.4: 514-517.
64. ZACHARIAS, Bengt; BJÖRKLUND, Marianne. Continuous production of *Clostridium tetani* toxin. *Applied Microbiology*, 1968, 16.1: 69-72

PŘÍLOHY

Příloha A *Anotace transportéru aminokyselin a degradačních genů*

Příloha B *Mapa centrálního metabolismu C. tetani*

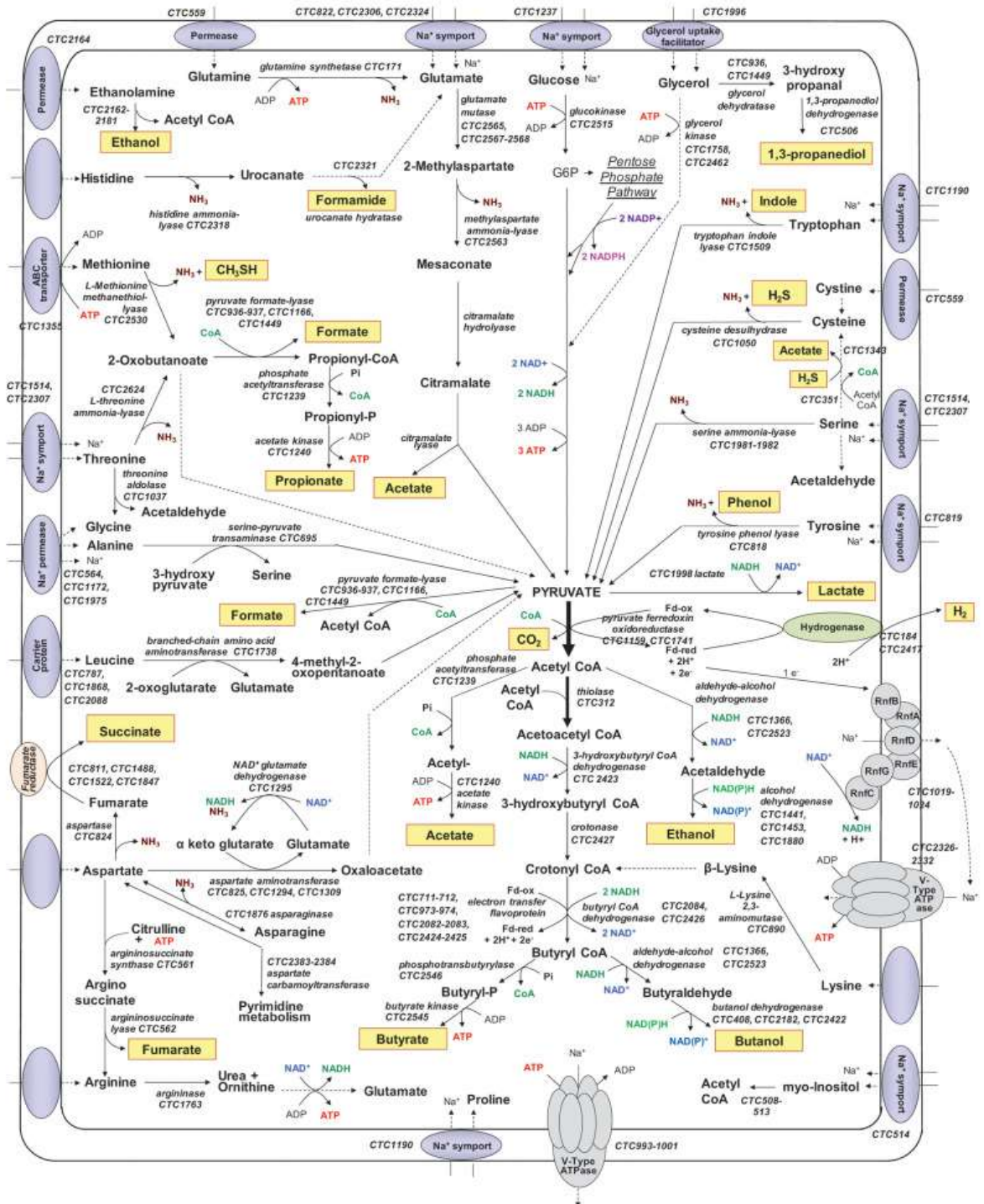
Příloha C *Srovnání složení Mueller a Miller, Massachusetts, sójového a TGY media*

Příloha D *Klinické projevy tetanu*

Příloha A *Anotace transportéru aminokyselin a degradačních genů* (Garrigues et al., 2022)

Aminokyselina	Anotace genu transportéru AMK	Anotace genu pro degradaci AMK
Alanin	CTC564, CTC1172, CTC1975	CTC695
Arginin	Bez poznámek	CTC1763
Kyselina asparagová	Bez poznámek	CTC561–562, CTC824–825, CTC1294, CTC1309, CTC1876, CTC2383–2384
Cystin / Cystein	CTC559	CTC1050
Glutaman sodný	CTC822, CTC2306, CTC2324	CTC1295, CTC2563, CTC2565, CTC2567–2568
Glutamin	CTC559	CTC171
Glycin	CTC564, CTC1172, CTC1975	Bez poznámek
Histidin	Bez poznámek	CTC2318, CTC2321
Leucin	CTC787, CTC1868, CTC2088	CTC1738
Lysin	Bez poznámek	CTC890
Methionin	CTC1355	CTC2530
Prolin	CTC1190	Bez poznámek
Serin	CTC1514, CTC2307	CTC1981–1982
Threonin	CTC1514, CTC2307	CTC2624
Tryptofan	CTC1190	CTC1509
Tyrozín	CTC819	CTC818

Príloha B Mapa centrálniho metabolismu *C. tetani* (Garrigues et al., 2022).



Příloha C Srovnání složení Mueller a Miller, Massachusetts, sójového a TGY media (Garrigues et al., 2022).

Složky na litr	Mueller a Miller medium	Massachusetts medium	Sójové medium	TGY médium
Digest kaseinu	22,5 g	25 g	–	30 g
Hovězí srdeční infuze	50 ml	–	–	–
Kvasnicový extrakt	–	–	–	20 g
Sójový pepton	–	–	34 g	–
Glukóza	11 g	8,0 g	7,5 g	5 g
NaCl	2,5 g	2,5 g	5,0 g	–
Sodík ₂ HPO ₄	2 g	–	0,5 g	–
KH ₂	0,15 g	–	0,175 g	–
MgSO ₄	0,15 g	0,1 g	0,024 g	–
Cystin	0,25 g	0,125 g	–	–
Cystein	–	–	0,125 g	–
Cystein HCl				0.5 g
Tyrozín	0,5 g	–	0,125 g	–
Pantothenát vápenatý	1,0 mg	1,0 mg	–	–
Uracil	2,5 mg	1,25 mg	–	–
Kyselina nikotinová	–	0,25 mg	–	–
Thiamin	0,25 mg	0,25 mg	–	–
Riboflavin	0,25 mg	0,25 mg	–	–
Pyridoxin	0,25 mg	0,25 mg	–	–
Biotin	2,5 µg	2,5 µg	–	–
Vitamín B ₁₂	–	0,05 µg	–	–
Redukované železo (prášek)	0,5 g	–	0,5 g	–
FeCl ₃ · 3 · 2O	–	32 mg	–	–
Úprava pH	7,0-7,2	7,0 ± 0,2	6,8	7,5

Příloha D *Klinické projevy tetanu* (Cook et al., 2001; Farrar a Dr. C. Parry z University of Oxford Clinical Research Unit, Centre for Tropical Diseases, Ho Chi Minh City, Vietnam).

Risus sardonicus



Těžký opistotonus při novorozeneckém tetanu

