

Lékařská mikrobiologie pro ZDRL

Týden 16:

Přehled gramnegativních bakterií

Ondřej Zahradníček 777 031 969

zahradnicek@fnusa.cz ICQ 242-234-100

Co nás dnes čeká

- Není možné se během této přednášky naučit vše o gramnegativních bakteriích
- Musíte se je tedy naučit z učebnic
- Tato přednáška může jen pomoci udělat si v nich trochu přehled a pochopit základní charakteristiku jednotlivých skupin

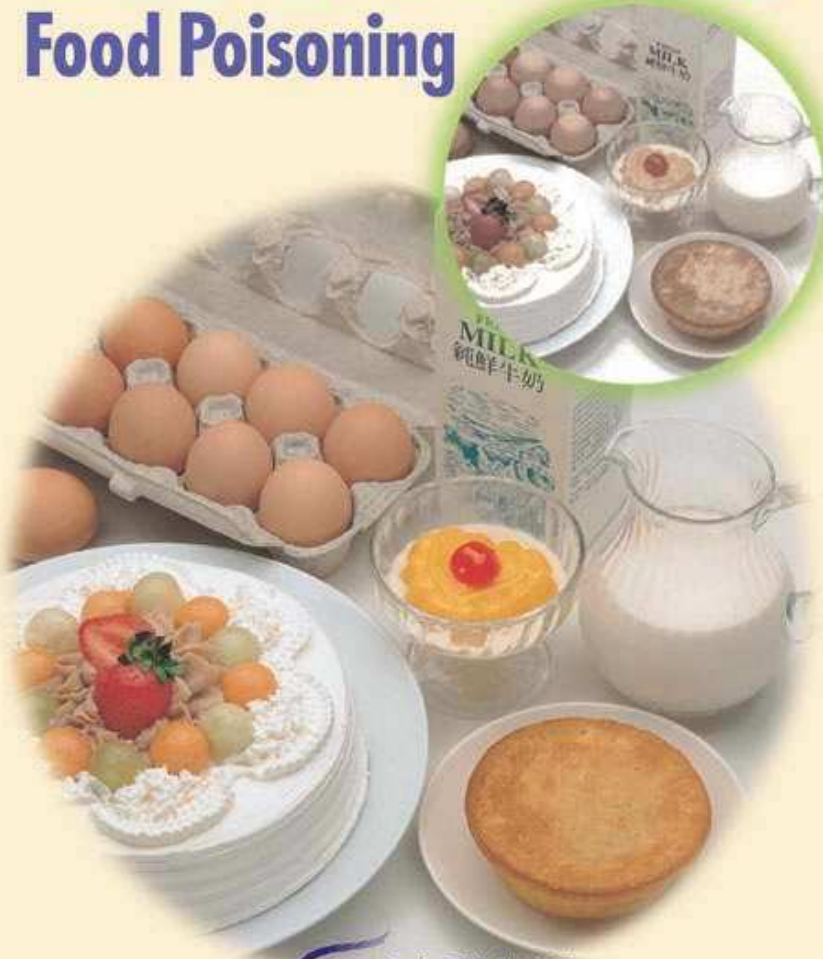
Gramnegativní bakterie

- Ty které rostou na Endově půdě
 - *Enterobacteriaceae* (enterobakterie) – tyčinky
 - *Vibrionaceae* – zahnuté tyčinky
 - Gramnegativní nefermentující bakterie – tyčinky i koky
- Ty které nerostou na Endově půdě
 - *Kampylobakter* a *helikobakter* – zahnuté či spirálovité tyčinky
 - *Pasteurellaceae* (hemofily a pasteurelly) – tyčinky
 - Skupina „le-br-bo-fr“ – tyčinky
 - *Neisserie* a *moraxelly* – převážně koky
 - *Gardnerella* – tyčinka a ostatní gramnegativní bakterie

1. Enterobakterie

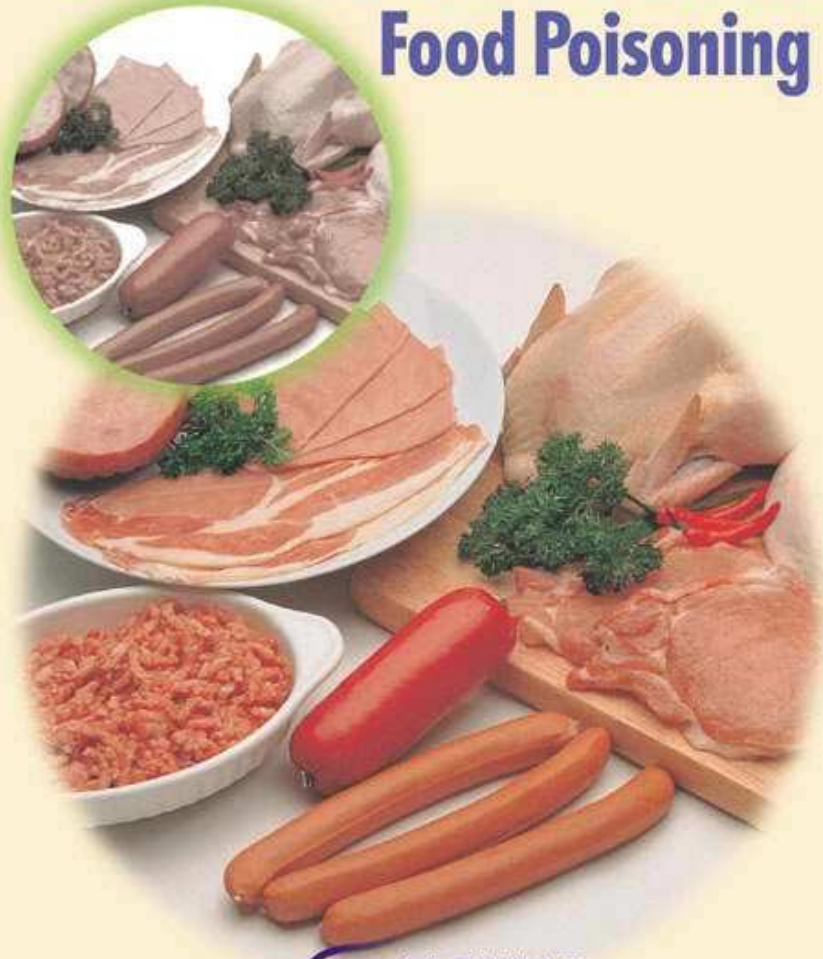
Salmonella

Food Poisoning



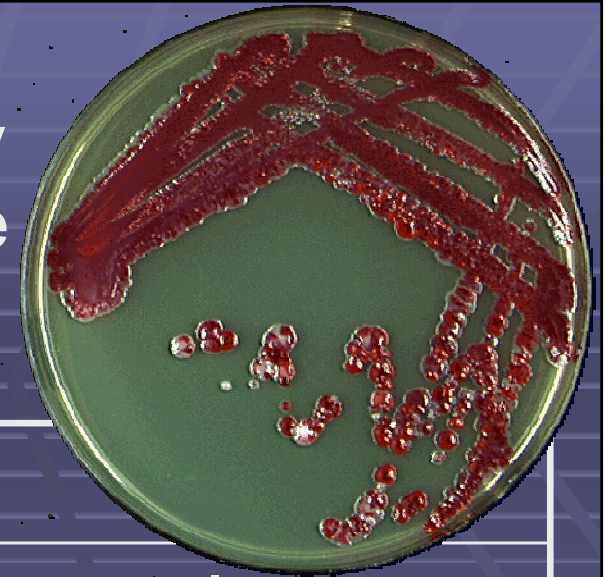
Salmonella

Food Poisoning



Přehled enterobaktérií

Červeně pigmentovaný kmen serracie



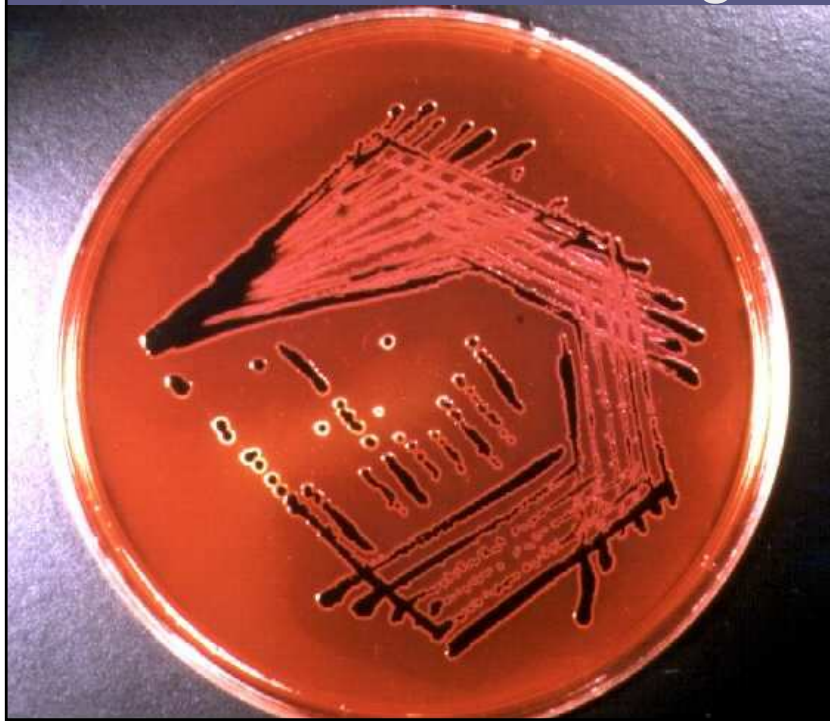
	Patogenita	Příklady
	Systemová	<i>Y. pestis</i> , AP** salmonely
	Střevní	ZP* salmonely, shigely, yersinie
	Potenciální	Klebsiely, enterobaktery, protey, providencie, morganely, citrobaktery, serracie a jiné
	Téměř nulová	Mnoho druhů, například <i>Pragia fontium</i> a <i>Budvicia aquatica</i>

*zoopatogenení **antropopatogenní

Na začátek báseň...



Salmonella na MAL agaru



Nemůžem vždy slepici
kontrolovat stolici.

Jednou projdem drůbežárnou
a stolici najdem zdárnou.

Přiletí však holub bílý
zanese tam salmonely.

Odnesou pak vejce
pro cukráře – strejce

Cukrář – strýček nevinný
nadělá z ní zmrzliny

Mládež sní ji s důvěrou
a všichni se...

Příběh první

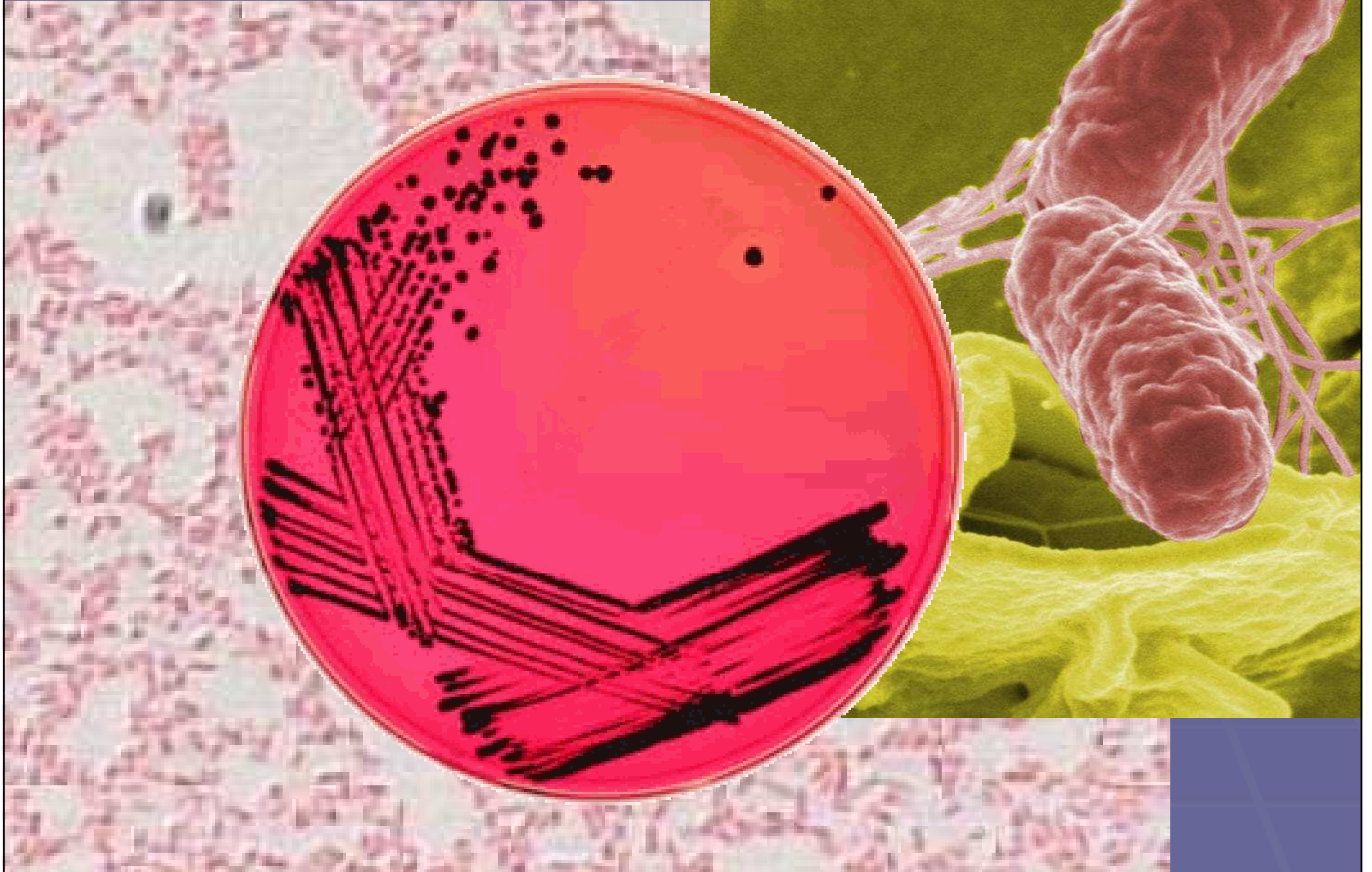
- Slečna Tereza je mlsná. Dnes si po obědě dala krémový zákusek. Odpoledne ji začalo bolet břicho, a pochopila, že vzdálit se na delší dobu z domu nelze. Navštívila lékaře, ten jí odebral výtěr z řitního kanálu. Za několik dní volali Tereze z územního pracoviště krajské hygienické stanice. Tereza si byla jistá, že za všechno může krémový zákusek. Ukázalo se však, že její podezření bylo falešné...

Kdo je tedy skutečný viník?

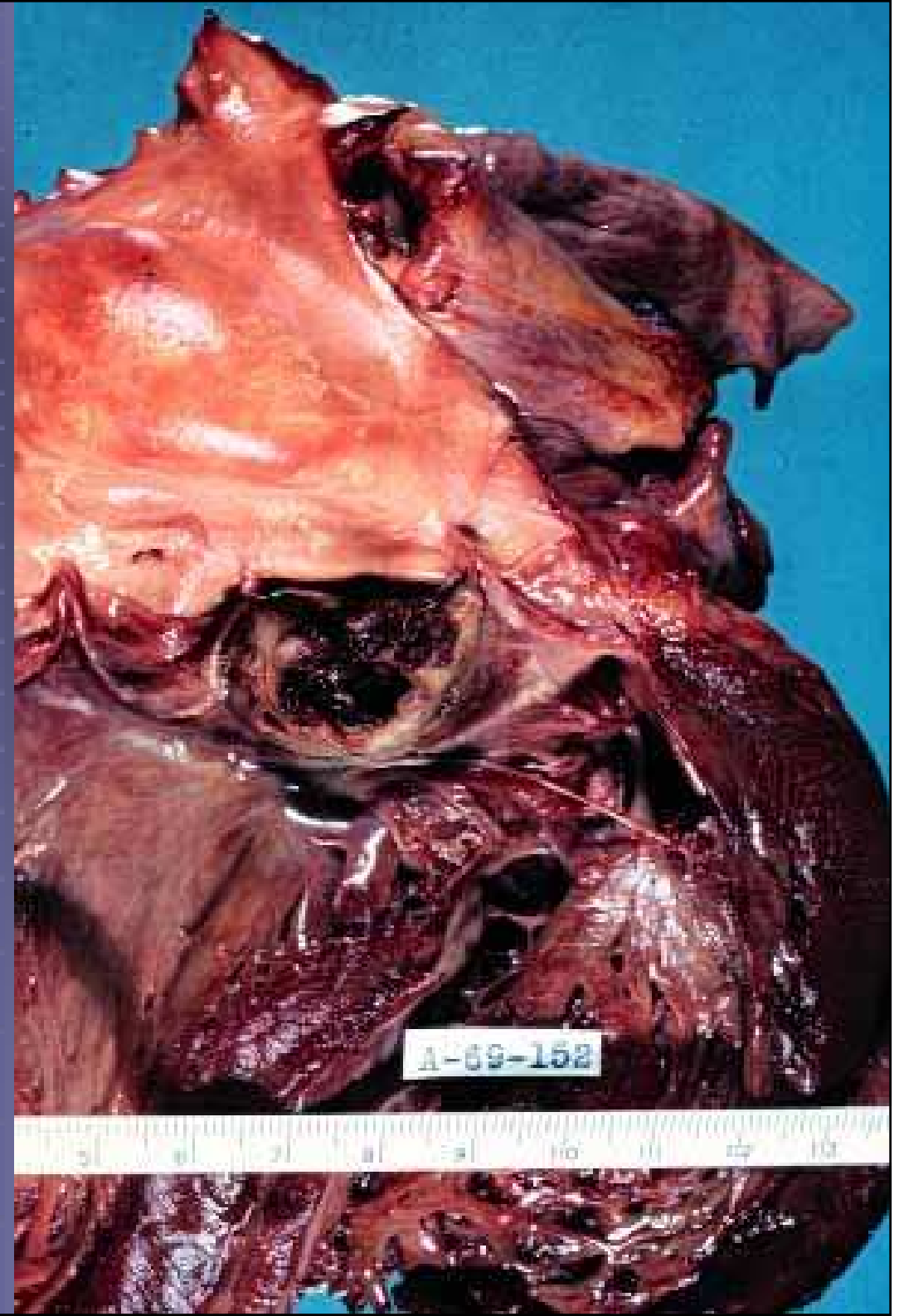
- Bakteriálním viníkem je *Salmonella enterica* serovar Enteritidis, zkráceně *Salmonella* Enteritidis
- Viník – jídlo nemůže být krémový zákusek! Neodpovídá totiž inkubační doba, které je u salmonelóz zpravidla dva dny, někdy ale i týden
- Viníkem – jídlem se nakonec ukázal být žloutkový věneček, který Tereza zbaštila o dva dny dřív
- Lidským viníkem bude pravděpodobně někdo v cukrárně „U hysterické cukrářky“, kde někdo něco nejspíš zanedbal. Právě teď po tom pátrá oddělení hygieny výživy KHS. Může jít o primární či sekundární kontaminaci jídla.



Salmonella



Salmonelová endokarditis



Primární patogeny z řad enterobakterií

- *Enterobacteriaceae* je klinicky nejdůležitější čeleď gramnegativních tyčinek (ale důležitá je i pro ne-klinická odvětví mikrobiologie)
- Nejhorší patogeny způsobují celkové infekce: je to *Yersinia pestis* a tzv. antropopatogenní serovary salmonel (serovary Typhi, Paratyphi A, Paratyphi B a Paratyphi C)
- Závažné jsou ale i obligátní patogeny působící zpravidla „jen“ střevní infekce. I u nich je však riziko sepse, hlavně u oslabených osob
- Týká se to rodů *Salmonella*, *Shigella* a *Yersinia*

Mor (*Yersinia pestis*)

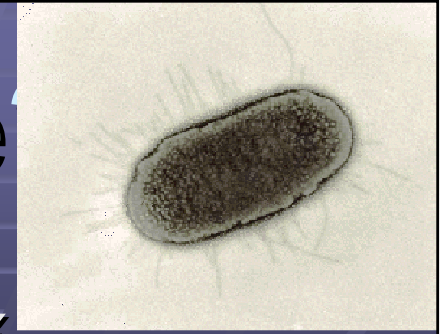


Příběh druhý

- Paní Mokrá je v péči urologické kliniky pro přetrvávající potíže při močení
- Paní Mokrá má podobné potíže opakovaně. Po třech porodech má narušenou svalovinu pánevního dna, léčila se i pro inkontinenci moče. Lékaři ji upozornili, že riziko močové infekce je u ní zvýšené, protože má narušené mechanismy normální obrany proti infekci. Je to trochu bludný kruh, protože opakované infekce stav sliznic dále zhoršují

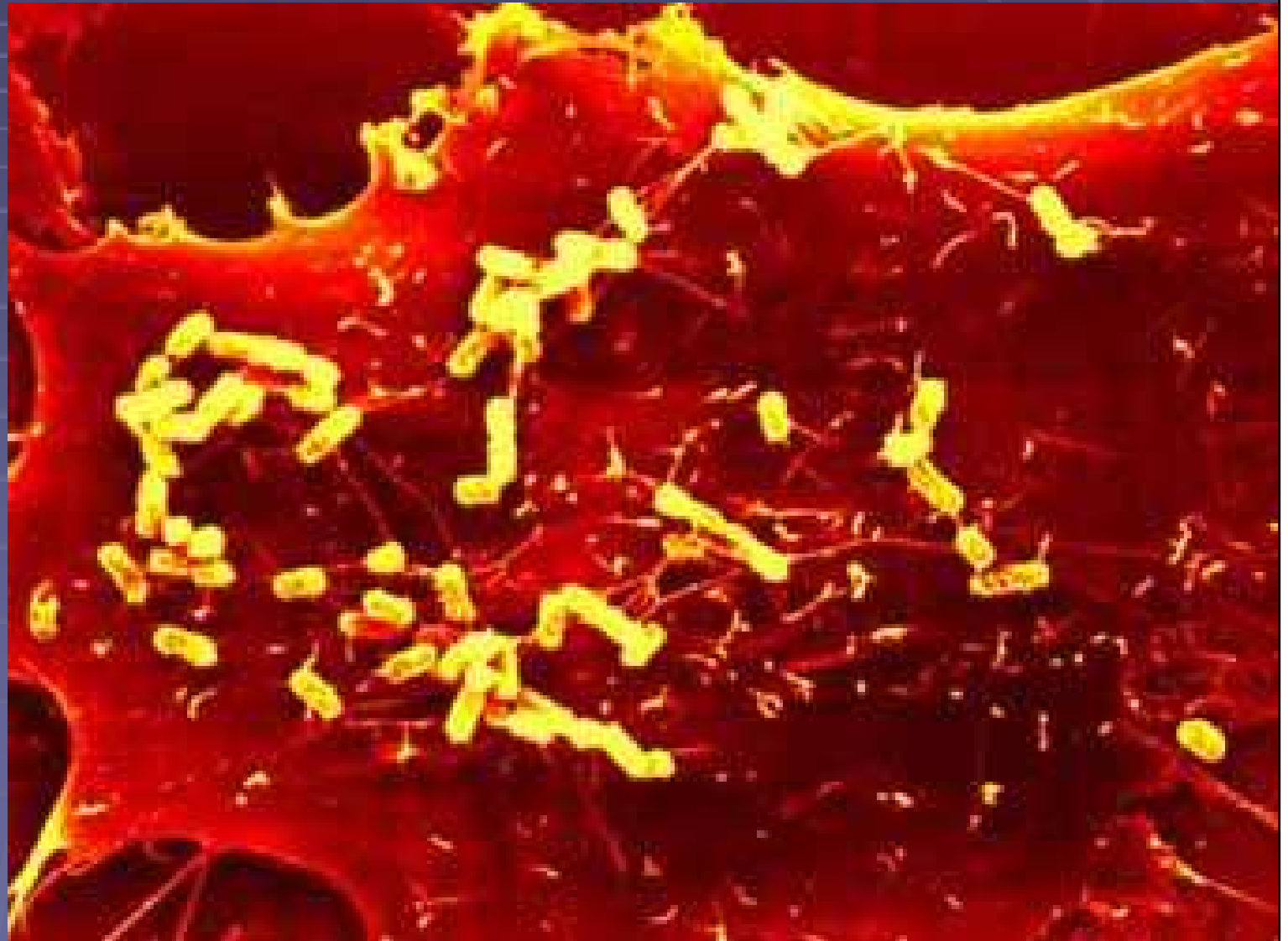


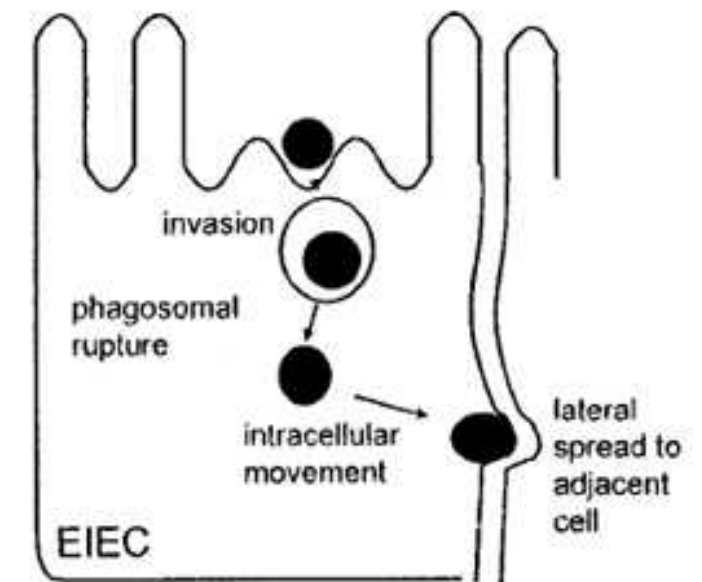
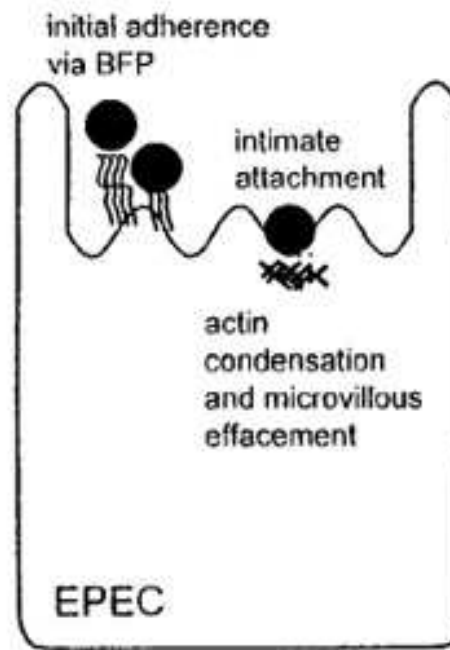
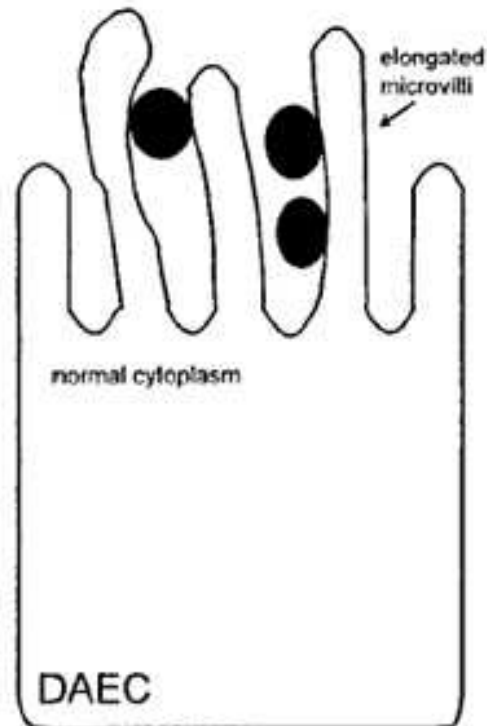
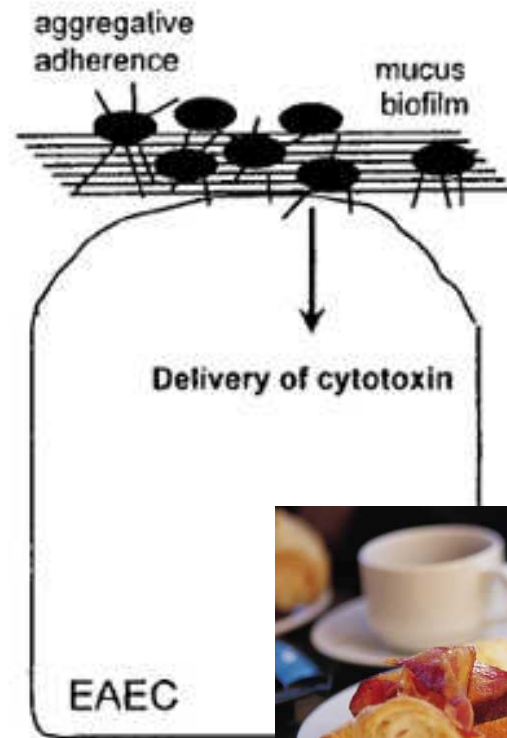
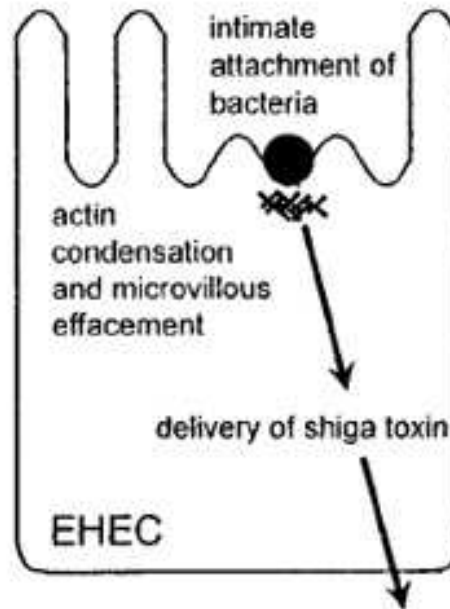
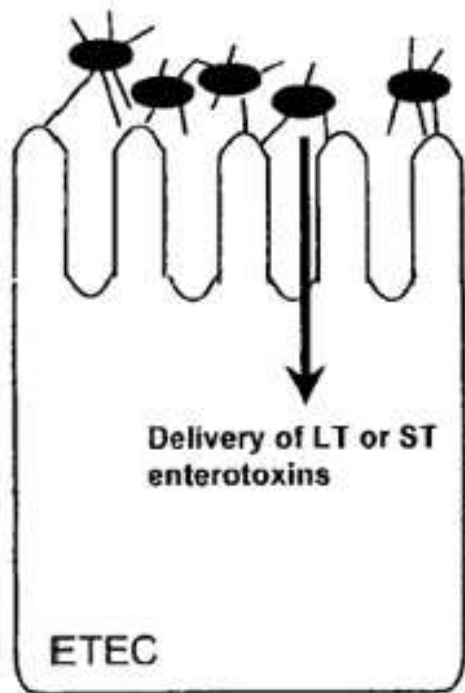
Kdo za to tentokrát může



- Viníkem je *Escherichia coli*, respektive její uropatogenní kmen (uropatogenní *E. coli* – UPEC)
- Viníkem by mohla být i kterákoli jiná z podmíněně patogenních enterobakterií (ale i obligátně patogenní kmeny, např. salmonely, se uplatňují)
- *Escherichia coli* je jednou z nejdůležitějších součástí střevní mikroflóry, kde je zdraví prospěšná. Může však i škodit, a týká se to hlavně specifických kmenů: ve střevě EPEC (enteropatogenní EC), ETEC (enterotoxické EC), EIEC (enteroinvazivní EC), STEC (shiga-like toxigenní EC), mimo střevo hlavně zmíněné UPEC.

Stěna močového měchýře s adherovanými escherichiiemi





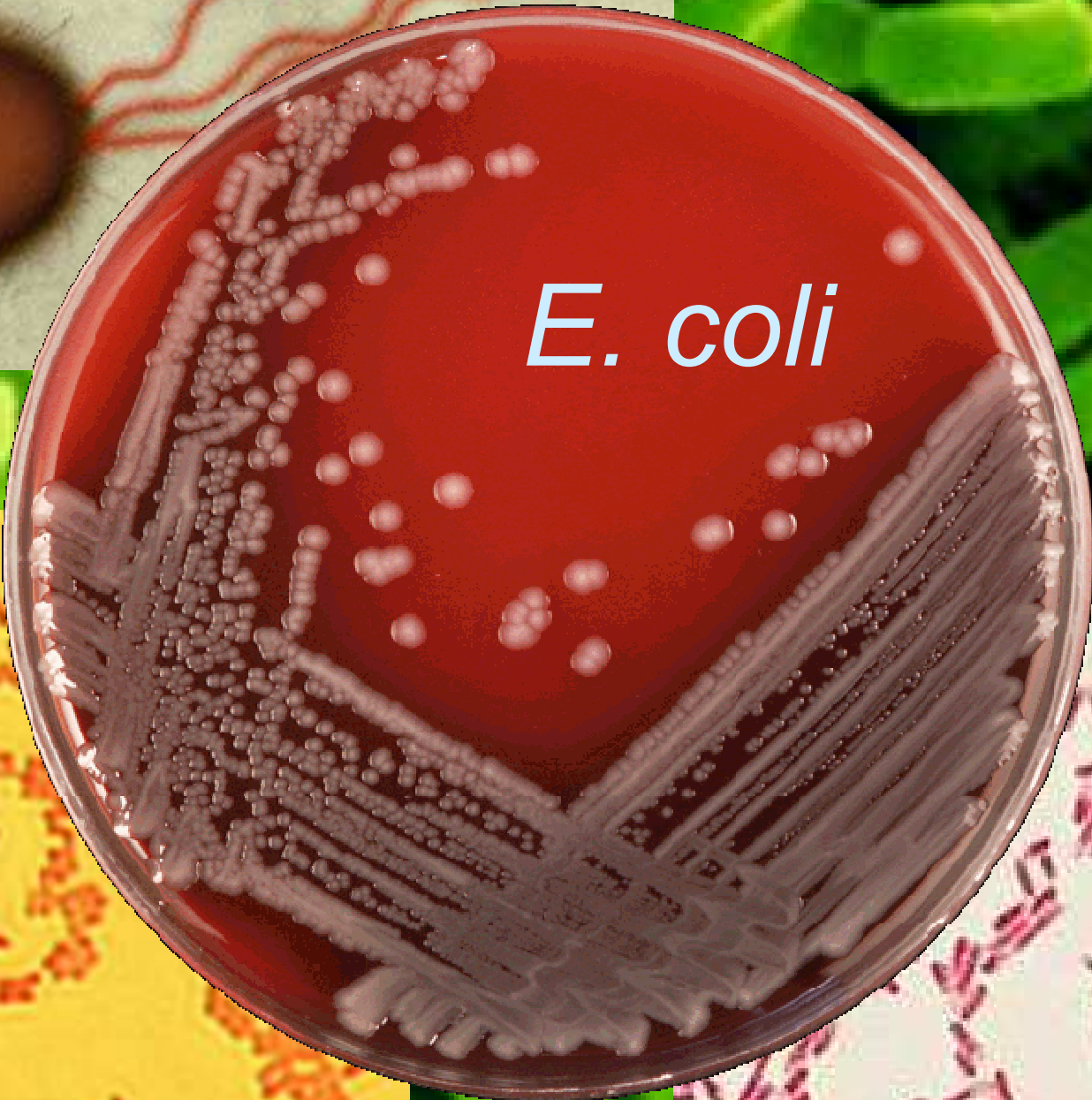


- Miláčku, proč jsi nervózní? Dělá ti starosti OTEC?

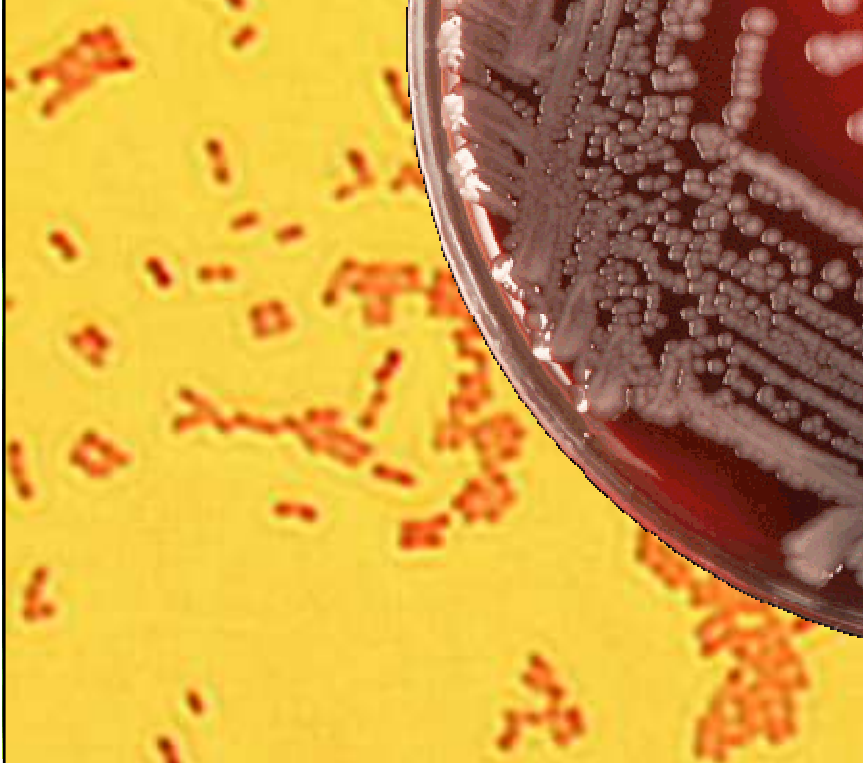
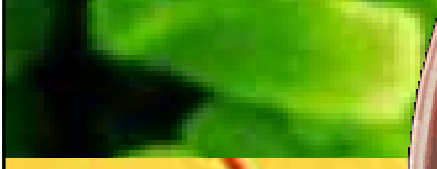
- Ne, ETEC...

I korneální vřed může
způsobit *Escherichia coli*





E. coli



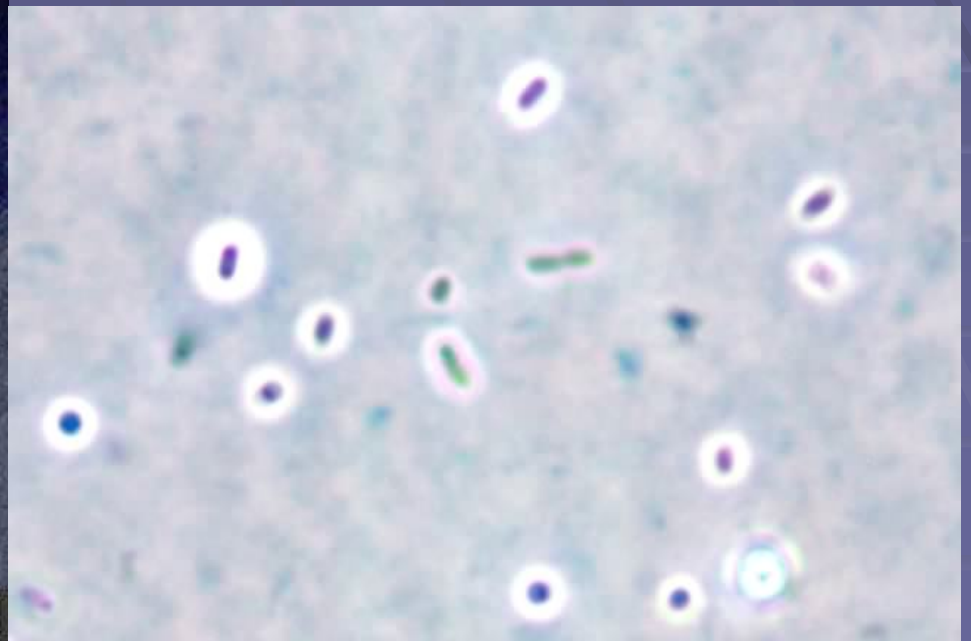
© Minister of Pub



Podmíněně patogenní enterobakterie

- Většina z nich je součástí normální flóry střeva
- Výjimkou jsou serracie a částečně klebsielly, které najdeme spíš ve vnějším prostředí
- Mohou existovat patogenní kmeny ve střevě (zejména u *Escherichia coli*)
- Častěji se chovají jako patogeny mimo střevo, nejčastěji v urogenitálním systému
- Nejběžnější jsou rody *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Pantoea*, *Serracia*, *Proteus*, *Providentia*, *Morganella*, *Citrobacter*, *Hafnia*.

Co tropí klebsielly...



Nepatogenní enterobakterie

- Kromě obligátně patogenních enterobakterií, jako jsou salmonely, a potenciálně patogenních, jako jsou escherichie, existují také nepatogenní enterobakterie.
- Některé z nich byly objeveny na území Česka, například *Pragia fontium* či *Budvicia aquatica*.

Enterobakterie – metody

■ Přímé metody

- Mikroskopie – v praxi má malý význam, protože je jich mnoho a v mikroskopu jsou všechny stejné.
- Kultivace – používá se mnoho různých půd
- Biochemická identifikace – velmi důležitá
- Antigenní analýza – salmonely, shigely, EPEC

■ Nepřímé metody (protilátky)

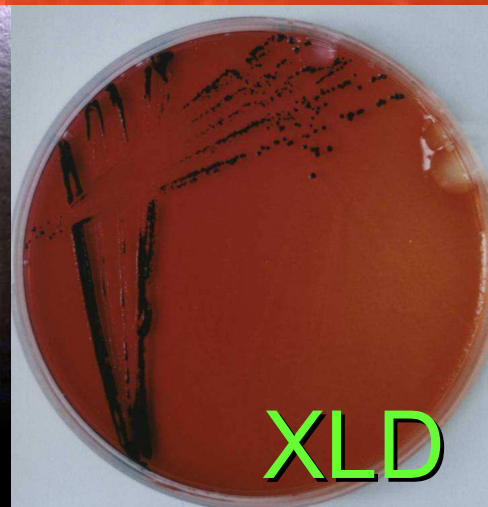
- Widalova reakce u tyfu, protilátky proti yersiniím

Štěpení laktózy

Endova půda rozliší bakterie fermentující a nefermentující laktózu. Obligátní patogeny zpravidla laktózu nefermentují, je to tedy i předběžný test, jestli „to vypadá, že by to mohl být patogen“.



Fotografie z databáze zločinců 1: Salmonela

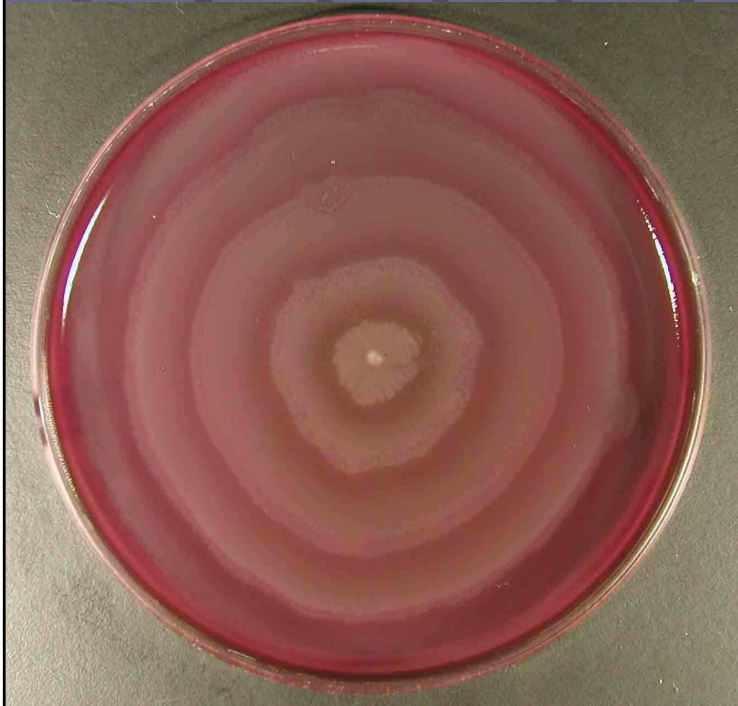




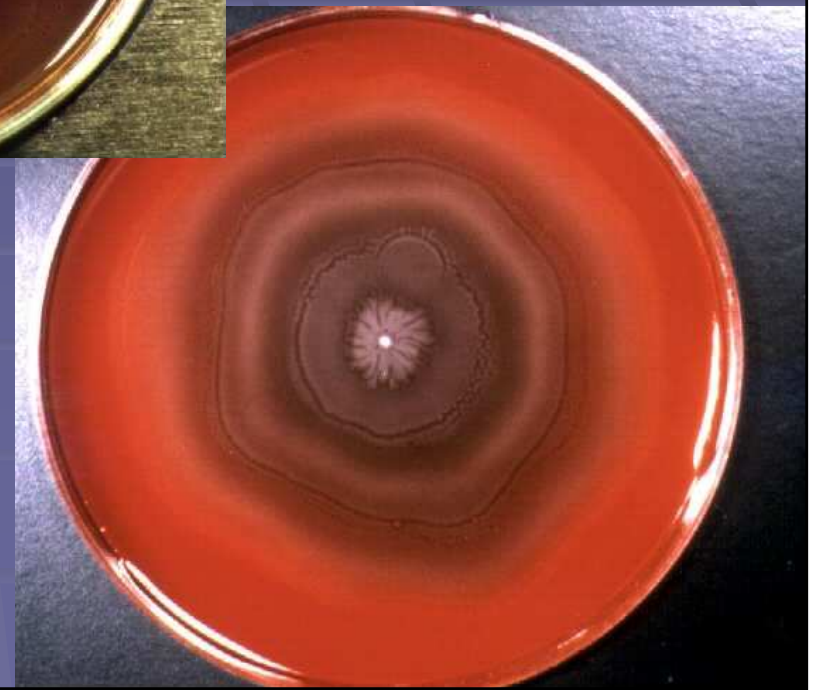
Salmonela na
MAL agaru

Fotografie z databáze zločinců 2

Proteus mirabilis, *P. vulgaris* (dole)

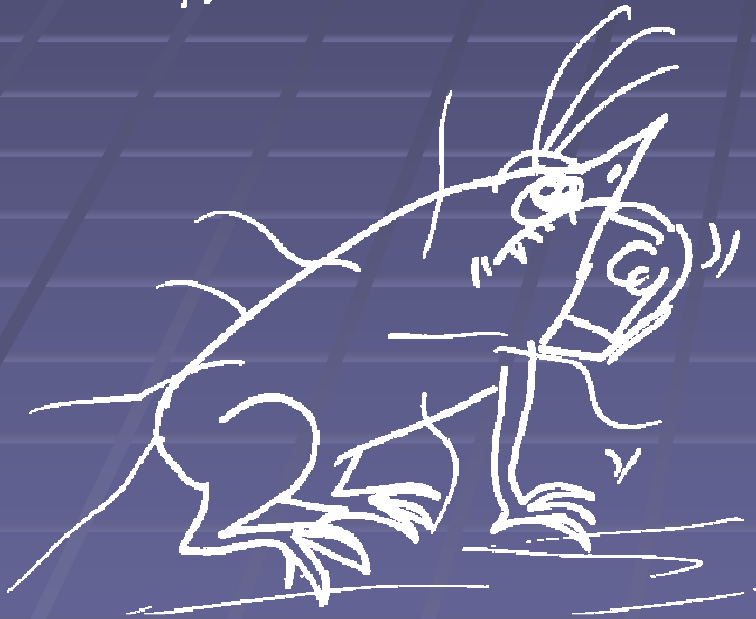


Pro protey je typické, že nerostou jen v.místě inokulace, ale šíří se po povrchu agaru do stran (plazivý růst, Raussův fenomén, také fenomén příbojové vlny)



Proteus dle as. Petra Ondrovčíka

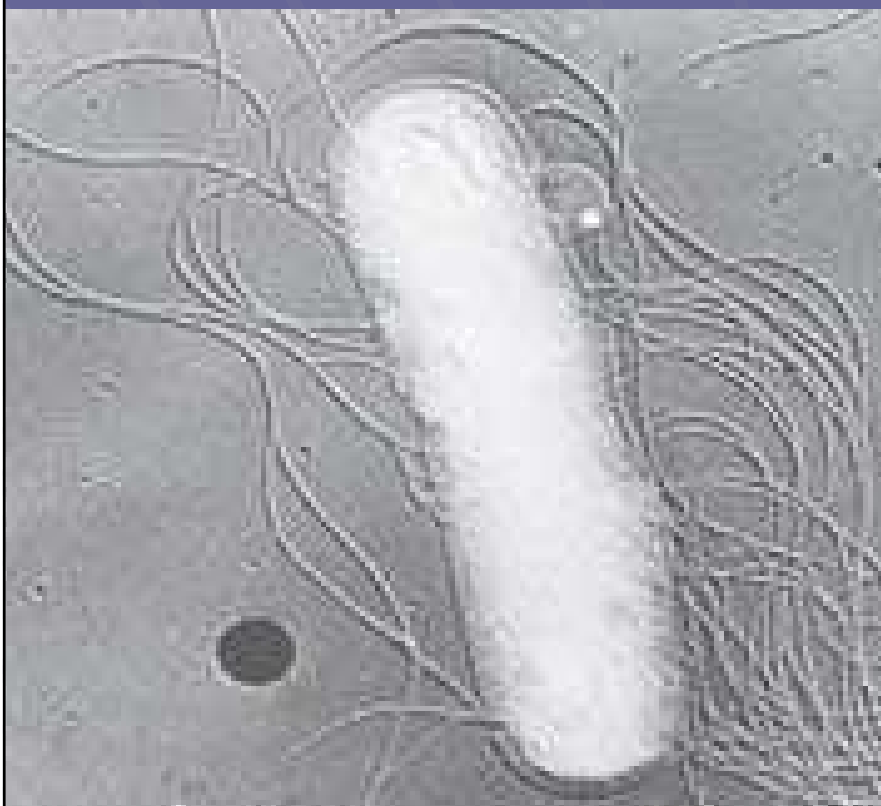
Proteus mirabilis



Proteus vulgaris



„Je sice pěkné, kolego, že dovedete dekarboxylovat ornitin;
mnohem smutnější ovšem je, že se ve většině případů
neumíte pořádně plazit!“



Proteus

Fotografie z databáze zločinců 3

Klebsiely a escherichie I



Kolonie klebsiel na KA jsou hlenovitější a bělejší než kolonie *E. coli*...



... i když zrovna tohle *E. coli* je taky poměrně bílé a hlenovité 😊

Fotografie z databáze zločinců 4

Escherichie II



Pokud escherichie na KA hemolyzují (a to je dost často), uvede se to případně do výsledku, ale nehodnotí se to jako zvláštní diagnostický znak

Odlišení od ostatních podezřelých (diferenciální diagnostika)

- Gramovo barvení odliší gramnegativní tyčinky od ostatních bakterií
- Endova půda poprvé: rostou na ní z klinicky významných jen enterobaktérie, příslušníci čeledi *Vibrionaceae* a gramnegativní nefermentující tyčinky
- Nefermentující odliší to, že nefermentují glukózu (např. Hajnova půda zůstává po kultivaci celá červená, nezmění vůbec barvu)
Vibrionaceae odliší pozitivní oxidáza

Shrnutí – jak rozlišíme bakterie, které rostou na Endově půdě























































- Enterobakterie jsou oxidáza negativní (s výjimkou rodu *Plesiomonas*, který k nim byl nedávno přiřazen) a vždy fermentují glukózu
- *Vibria* a aeromonády také fermentují glukózu, ale jsou vždy oxidáza pozitivní
- Gramnegativní nefermentující bakterie (mohou to být tyčinky, ale i kokotyčinky či koky) nikdy nefermentují glukózu. Oxidázu mohou mít pozitivní i negativní

Rozlišení enterobakterií navzájem

- Endova půda podruhé: orientační rozlišení obligátních patogenů (většinou L-) a potenciálních patogenů (zpravidla L+)
- Spousta dalších půd: XLD, MAL, DC, WB a další na salmonely, CIN na yersinie aj.
- Biochemické testy: Hajnova půda, test MIU, Švejcarova plotna, ENTEROtesty aj.
- Antigenní analýza zpravidla sklíčkovou aglutinací

Příklad ENTEROtestu16

(530 063 = E. coli, 99,89 %, $T_{in}=1,00$)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	
Zkum	H	G	F	E	D	C	B	A	H	G	F	E	D	C	B	A		
	První řádek panelu								Druhý řádek panelu									
+																		
-																		
?																		
?	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	
	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	
	5		3			0		0			6		3					

Příklad ENTEROtestu16

(265 003 = *Prot. mirabilis*, 100,0 %, $T_{in}=0,59$)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	
Zkum	H	G	F	E	D	C	B	A	H	G	F	E	D	C	B	A		
	První řádek panelu								Druhý řádek panelu									
+																		
-																		
?																		
?	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	
	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	
	2		6			5		0			0		3					

Příklad ENTEROtestu16

(546 773 = *Kl. pneumoniae*, 98,83 %, $T_{in}=1,00$)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	
Zkum	H	G	F	E	D	C	B	A	H	G	F	E	D	C	B	A		
	První řádek panelu								Druhý řádek panelu									
+																		
-																		
?																		
?	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	
	5		4			6			7				7			3		

Použití antigenní analýzy

- Antigenní analýza se nepoužívá zdaleka vždycky
- Použití je v zásadě dvojí:
 - U obligátních patogenů (salmonely, shigely, yersinie) pro potvrzení diagnózy a pro epidemiologické účely
 - U střevních izolátů *E. coli* v případě, že je podezření na EPEC nebo STEC (ostatní skupiny se zpravidla takto neurčují)

Aglutinace salmonel

- Při aglutinaci kterékoli pohyblivé enterobakterie hodnotíme dva typy antigenů: tělové, tzv. O antigeny, a bičíkové, tzv. H antigeny (výjimečně i kapsulární K antigeny).
- Tak i každá salmonela má svou specifickou antigenní strukturu. Například salmonela serovaru Enteritidis disponuje tělovými antigeny 9, 12 a bičíkovým H m.
- **Je-li tedy naše salmonela *Salmonella* Enteritidis, musí být pozitivní (aglutinace přítomna) jak při aglutinaci tělových, tak i bičíkových antigenů.**

Testy antibiotické citlivosti

- Antibiotická citlivost se zásadně neurčuje u kmenů ze stolice. Až na výjimky je tu totiž podání antibiotik kontraindikováno, neboť prodlužuje dobu, po kterou trvá dysmikrobie a paradoxně prodlužuje dobu vylučování patogena ze střeva
- Určuje se tedy zpravidla u kmenů z moče, proto i antibiotika zahrnují léky používané k léčbě močových infekcí (např. furantoin)

Některá používaná antibiotika (u močových infekcí)

Antibiotikum	Zkratka	Referenční zóna
Ampicilin (rozšíř. penic.)	AMP	17 mm
Cefalotin (CS 1 gen)	KF	18 mm
Ko-trimoxazol (směs)	SXT	16 mm
Nitrofurantoin (nirofuran)	F	17 mm
Ciprofloxacin (chinol 3G)	CIP	21 mm
Kyselina oxolinová*(ch1G)	OA	19 mm
Doxycyklin (tetracyklin)	DO	16 mm

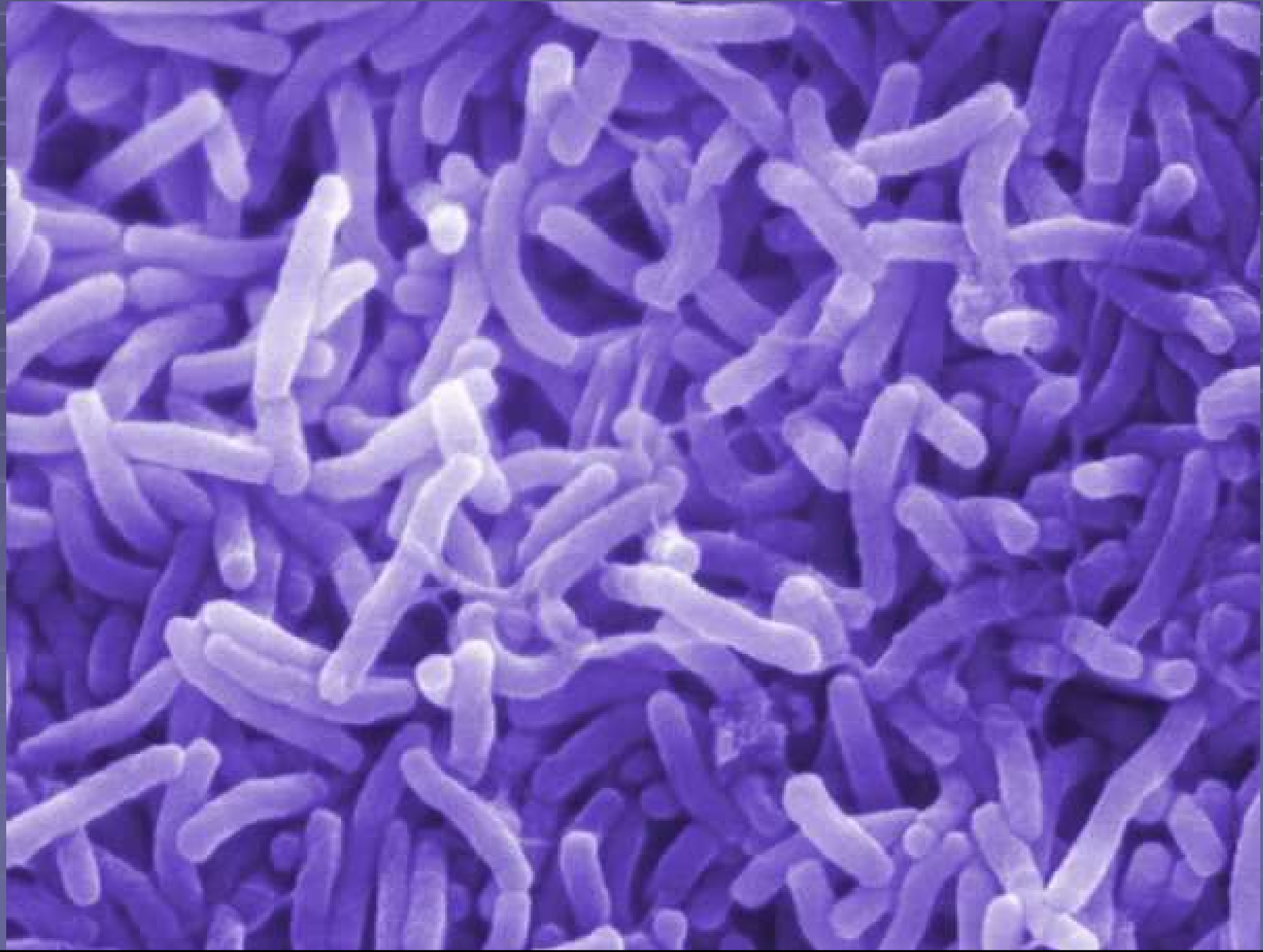
**alternativně norfloxacin (NOR)*

Některá rezervní antibiotika (při rezistenci na základní řadu)

Antibiotikum	Zkratka	Referenč. zóna
Cefuroxim (CS 2 gen)	CXM	23 mm
Cefotaxim (CS 3 gen)	CTX	23 mm
Ceftazidim (CS 3 gen)	CAZ	18 mm
Ko-amoxicilin (aminopnc*)	AMC	18 mm
Aztreonam (monobaktam)	ATM	22 mm
Chloramfenikol	C	18 mm
Kolistin	CT	10 mm

amoxicilin + kyselina klavulanová coby inhibitor betalaktamázy

2. Vibrionaceae



Příběh

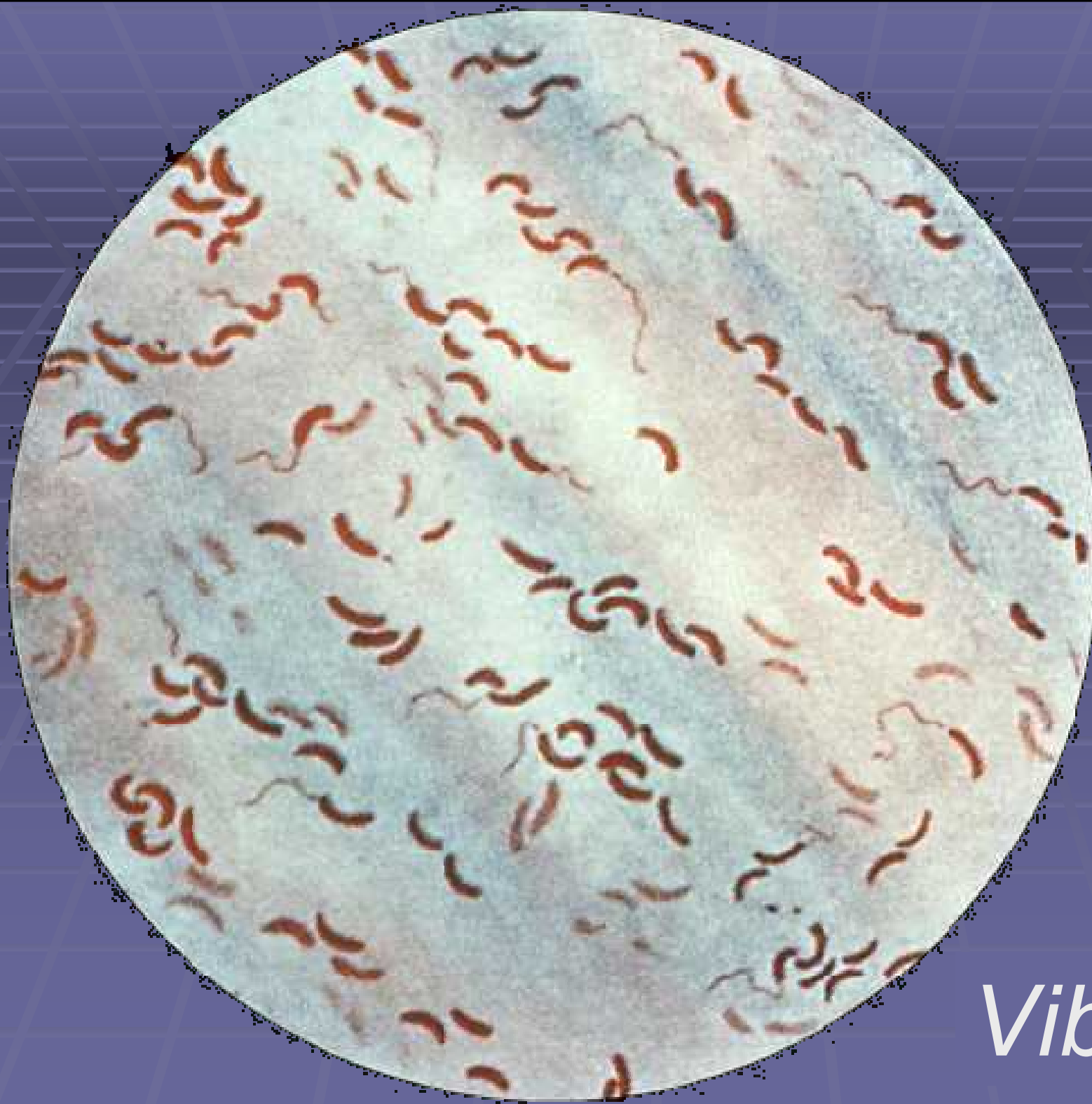
- Leo byl cestovatel. Vypravil se do Jemenu. Pobýval tu s místními obyvateli, jedl, co jedli oni, pil, co pili oni. Náhle ho přepadl těžký průjem – v podstatě z něj vycházela jen voda. Pochopil, že to nebude jen tak obyčejný cestovatelský průjem.
- Jeden místní felčar mu radil bylinky, druhý antibiotika. Leo si však poradil – proléval se litry a litry pitné vody. A věděl, že kdyby nestačilo vodu pít, musel by ji dostávat v infuzích.
- Leo tušil, že má cholera, nemoc způsobenou bakterií *Vibrio cholerae*.

Čeľad' *Vibrionaceae*

- Jsou to gramnegativní tyčinky podobné enterobakteriím. Liší se od nich tím, že jsou oxidáza pozitivní. Morfologicky jsou často zahnuté a výrazně pohyblivé
- *Vibrio cholerae* způsobuje cholera. Nejdůležitější jsou serotypy O139 a zejména O1. Ten se ještě dělí na biotypy; biotyp El Tor je nakažlivější, infekce biotypem Classic mají zase závažnější průběh
- Halofilní vibria a příslušníci rodu *Aeromonas* způsobují občasné infekce ran např. při kuchání ryb nebo při koupání v poloslaných lagunách

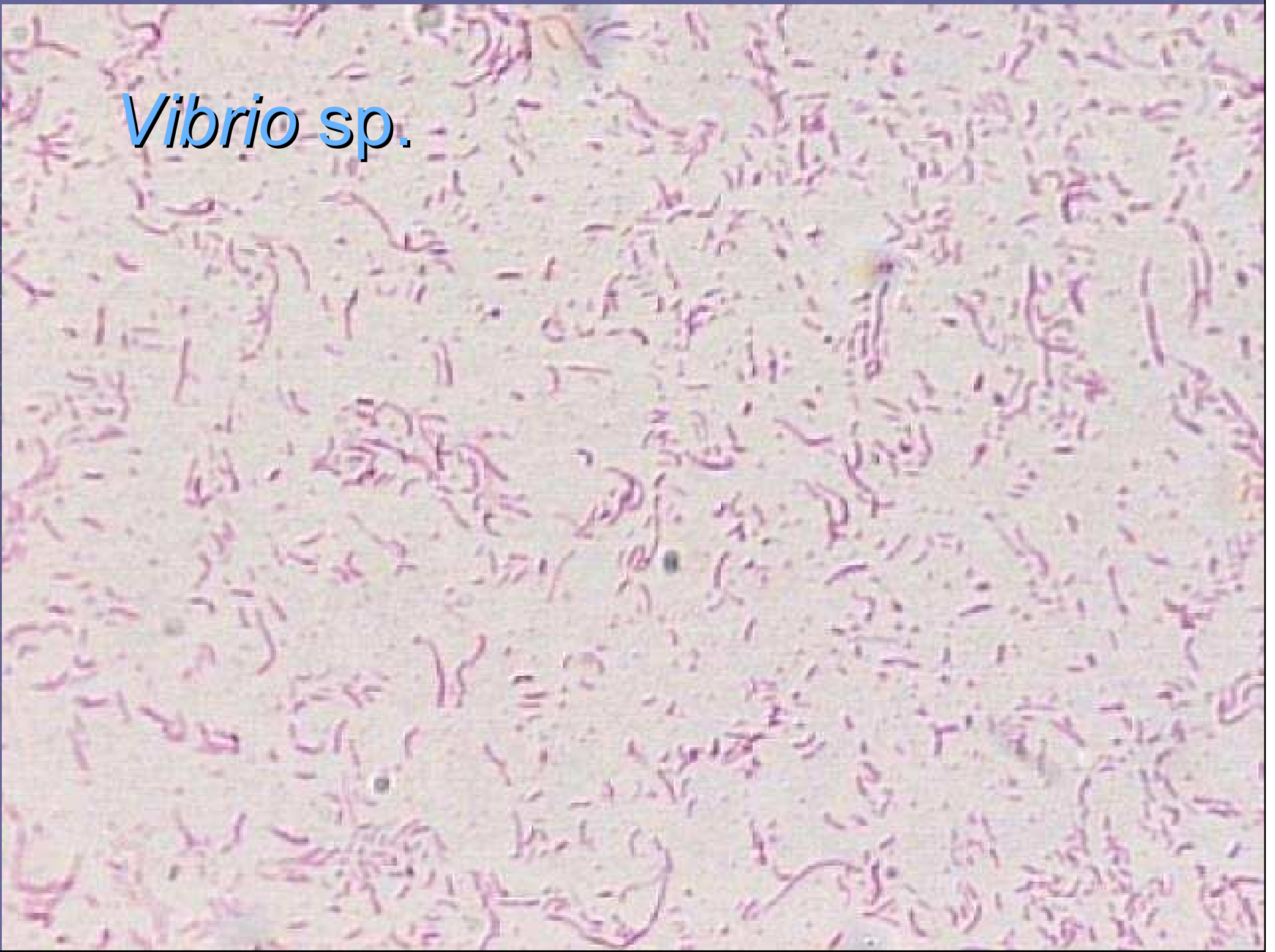
Diagnostika čeledi *Vibrionaceae*

- Provádí se podobně jako u enterobakterií, ale jsou oxidáza pozitivní.
- Mikroskopicky jsou vibria pohyblivé, zahnuté tyčinky
- Používá se také speciálních půd, například alkalická peptonová voda a TCŽS (Thioglykolát, cystein, žlučové soli)
- Používá se obdobných biochemických testů, jako u enterobaktérií (včetně Enterotestu 16)
- Musí se ovšem vybrat správná matice



Vibrio sp.

Vibrio sp.



3. Gramnegativní nefermentující bakterie

- Většina z nich jsou tyčinky, ale rod *Acinetobacter* jsou kokotyčinky až koky!



Bylo nevlídno, že
by PSAE ven
nevyhnal...

(PSAE – zkratka pro
*Pseudomonas
aeruginosa*)

Příběh



- Pan Zápalka je pyroman. Nedávno na svou vášeň doplatil a nehezky se popálil. Nyní se mu popálenina zanítla. Leží na popáleninovém centru a je na tom velice špatně. Lékaři naštěstí pochopili, že běžná antibiotika jsou mu platná jako mrtvému zimník a provedli stěr. Díky tomu se podařilo najít cílenou terapii a pana Zápalku vyléčit – do doby, než zase něco zapálí a způsobí si další popáleniny.

Kdo za to tentokrát může?

- Viníkem je *Pseudomonas aeruginosa*, nejběžnější bakterie ze skupiny gramnegativních nefermentujících baktérií
- Viníkem by stejně dobře mohla být i kterákoli jiná bakterie z této skupiny, např. *Acinetobacter*, *Burkholderia cepacia* nebo *Stenotrophomonas maltophilia*
- Obecně: Jsou to bakterie z vnějšího prostředí, často rostlinné patogeny, „bakterie-zbabělci“, které si netroufnou na zdravého člověka. Jejich terčem jsou pacienti s popáleninami, klienti ARK, JIP, transplantačních center a podobně.

U oslabených
osob mohou
způsobovat
např. i zánět
nehtového
lůžka.



Autokasuistika as. Zahradníčka

Pseudomonády napadají i jinak zdravé lidi při porušení anatomické kožní bariéry. Infekce však bývá jen lokální.

- 13. 1. 2006, pátek, Padang, Západní Sumatra, Indonésie: as. Zahradníček padá do nezakryté dešťové kanalizace s následkem poměrně velké rány sahající na tibiální okostici
- O několik týdnů později: rána je intenzivně cítit pseudomonádou, která je následně z rány i vykultivována. Naštěstí je dobře citlivá
- Terapie: lokální – ušní kapky otosporin (gentamicin + polymyxin B, obě složky účinné)
- Terapie úspěšná

Padang



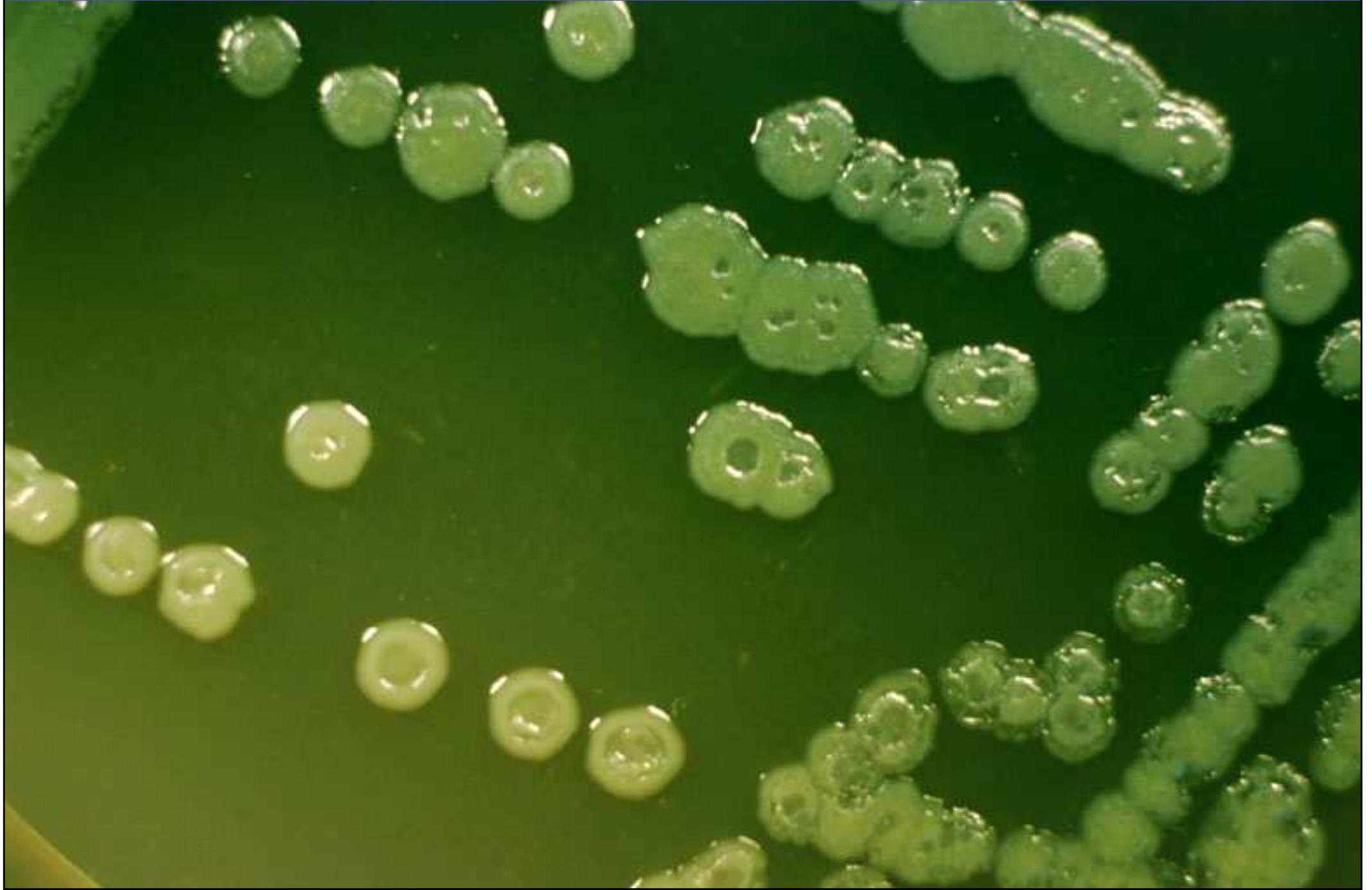
Jak se naučit některé názvy

- Zatímco některé bakteriální názvy se i chytrý student musí naučit z paměti, u některých si bystrouš může pomoci.
- Například *Burkholderia cepacia* způsobuje hnilobu cibule (*Allium cepa*), je to tedy opravdu klasický rostlinný patogen
- *Stenotrophomonas maltophilia* je zase vlastně zúžené-výživy-jednotka maltózu-milující, tedy taková panda mezi mikroby, která místo bambusu okusuje maltózu.

Toho logického je tu i víc!

- Jak víte, klinicky významné bakterie používají zpravidla jeden ze dvou typů metabolismu: fermentaci a aerobní respiraci.
- *Escherichia coli*, která má dost živin, ale málo kyslíku (i když jiných plynů si užije dost 😊) preferuje fermentaci glukózy i jiných cukrů. **Je fakultativně anaerobní**
- Naopak pseudomonády mají kyslíku habaděj, ale živin málo. Volí tedy aerobní respiraci, která jim umožní to málo dostupných živin využít úplně. **Bývají často striktně aerobní**
- Adaptace na vnější prostředí se projevuje i pigmenty – viz následující obrazovka.

Pseudomonas aeruginosa na MH



Přehled metod použitelných k dopadení dnes probíraných zločinců

- **Přímé metody**
 - Mikroskopie – pokud ji potřebujeme pro odlišení od bakterií jiné morfologie
 - Kultivace – nefermentující rostou na většině půd
 - Biochemická identifikace – je založena na reakcích aerobní respirace, vyžaduje ↓ teplotu a 2 dny kultivace

Nepřímé metody se téměř nepoužívají

Odlišení od ostatních podezřelých (diferenciální diagnostika)

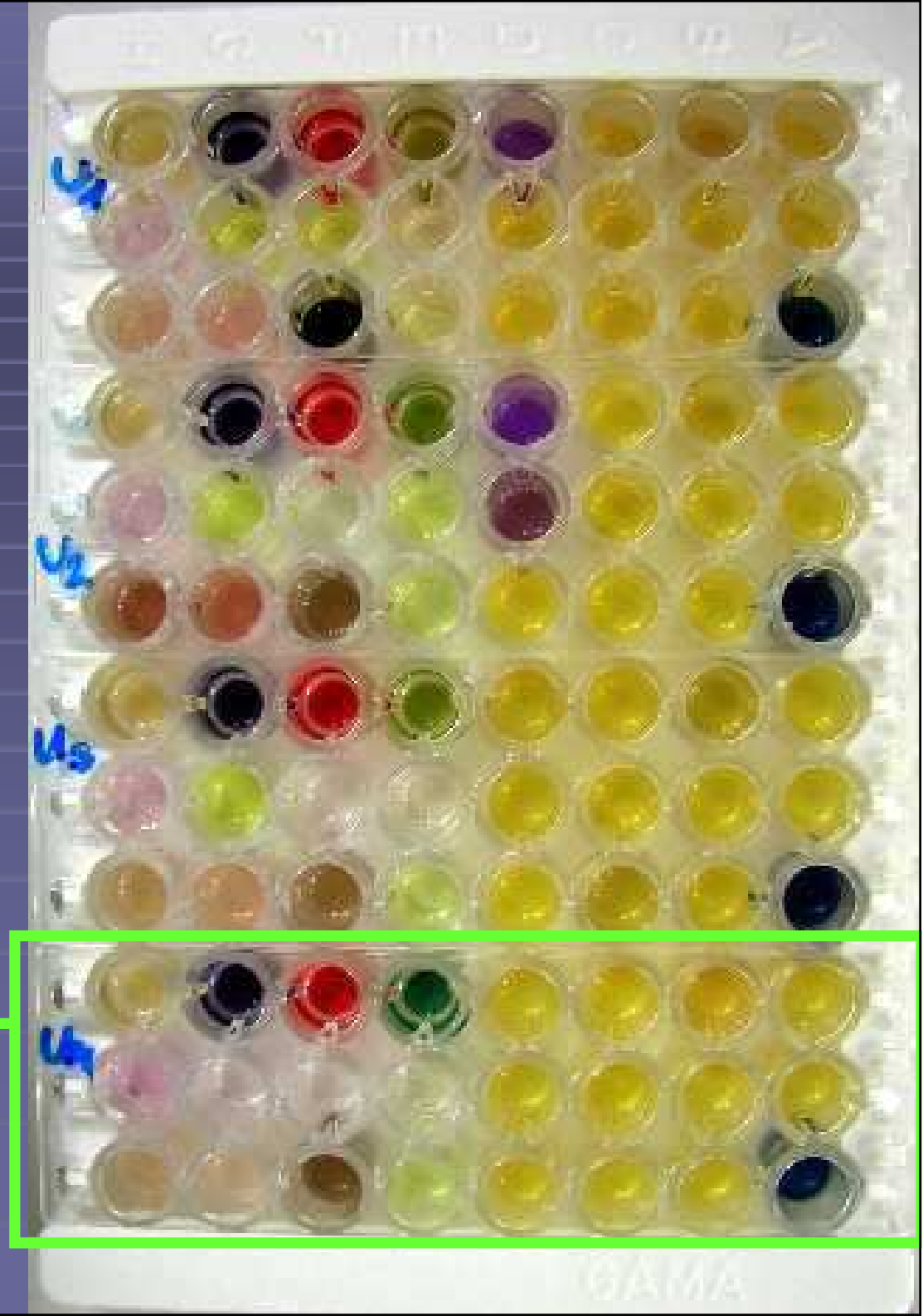
- Gramovo barvení odliší gramnegativní tyčinky od ostatních bakterií
- Endova půda: jak již víme, rostou na ní z klinicky významných jen enterobaktérie, příslušníci čeledi *Vibrionaceae* a gramnegativní nefermentující tyčinky
- Nefermentující odliší to, že nefermentují glukózu (např. Hajnova půda zůstává po kultivaci celá červená, nezmění vůbec barvu)

K diagnostice nefermentujících

- Pseudomonády se zpravidla poznají:
 - Mají typickou vůni (mladé kultury)
 - Tvoří pigmenty, nejčastěji **zelené**, někdy modré či rezavé. Nejlépe jsou viditelné na MH, ale trochu i na KA či Endově agaru
 - Mají pozitivní oxidázu
- Ostatní nefermentující, případně sporné pseudomonády, musíme rozlišit biochemicky, například NEFERMtestem 24

NEFERMtest 24

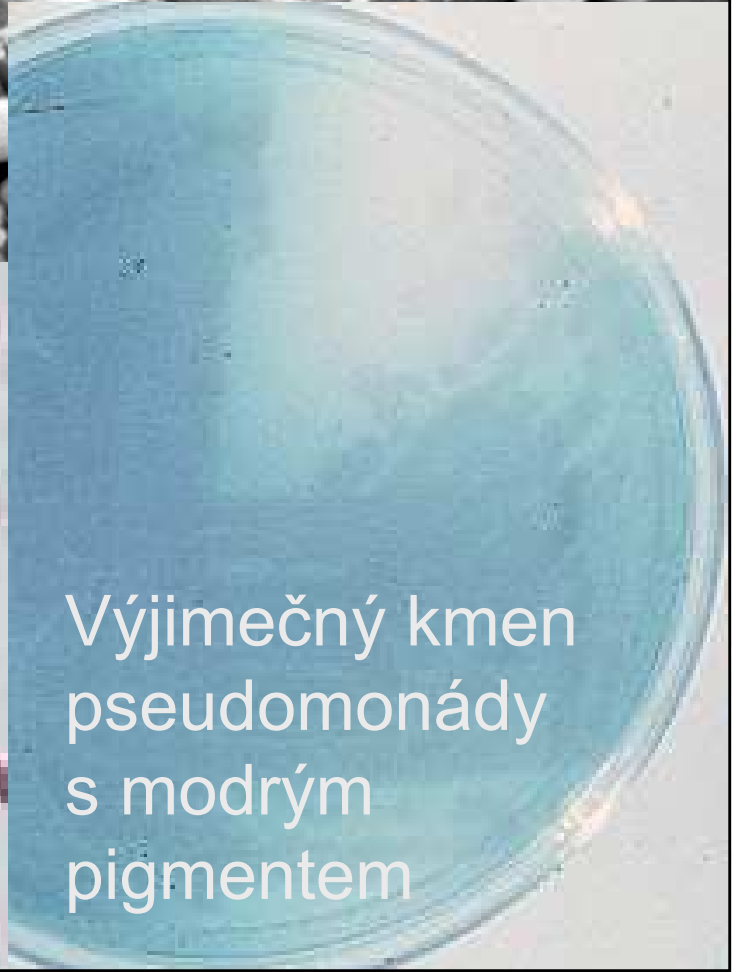
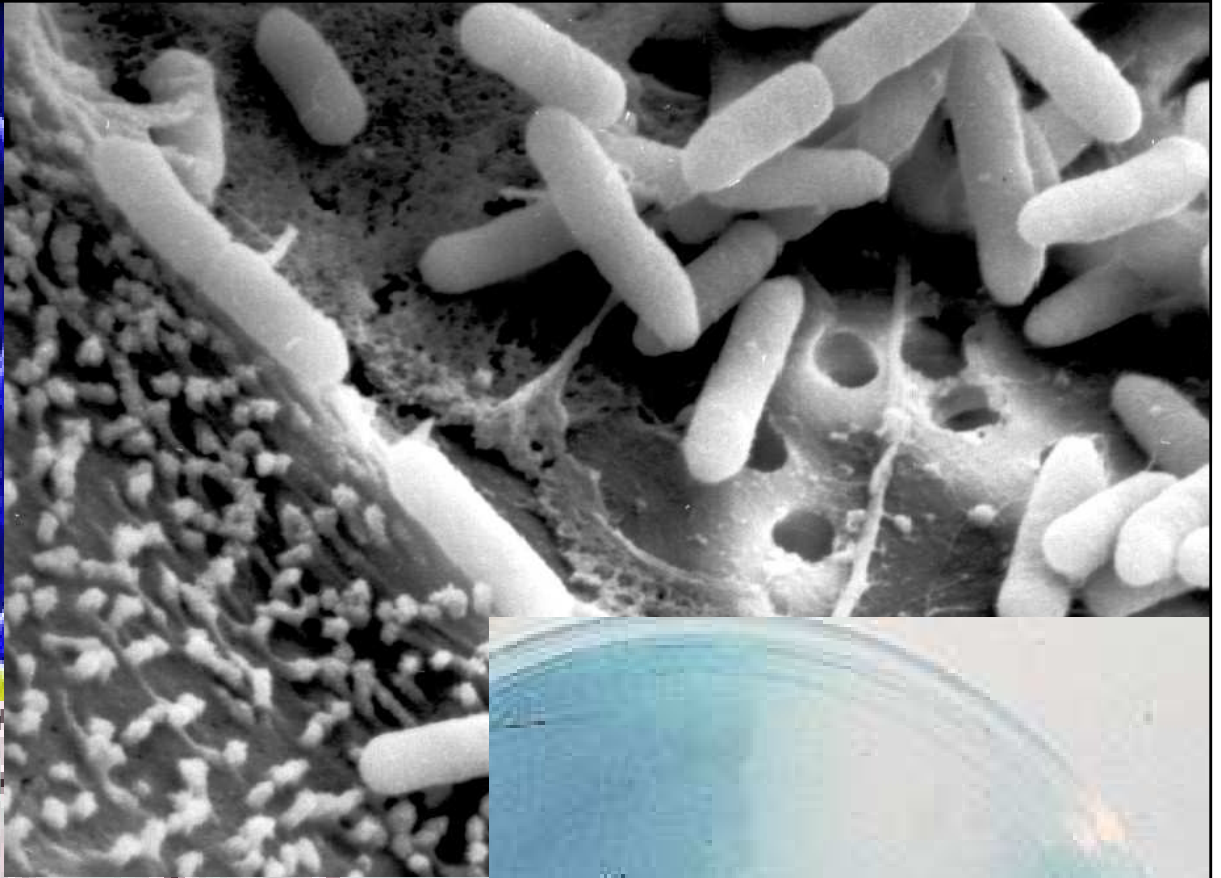
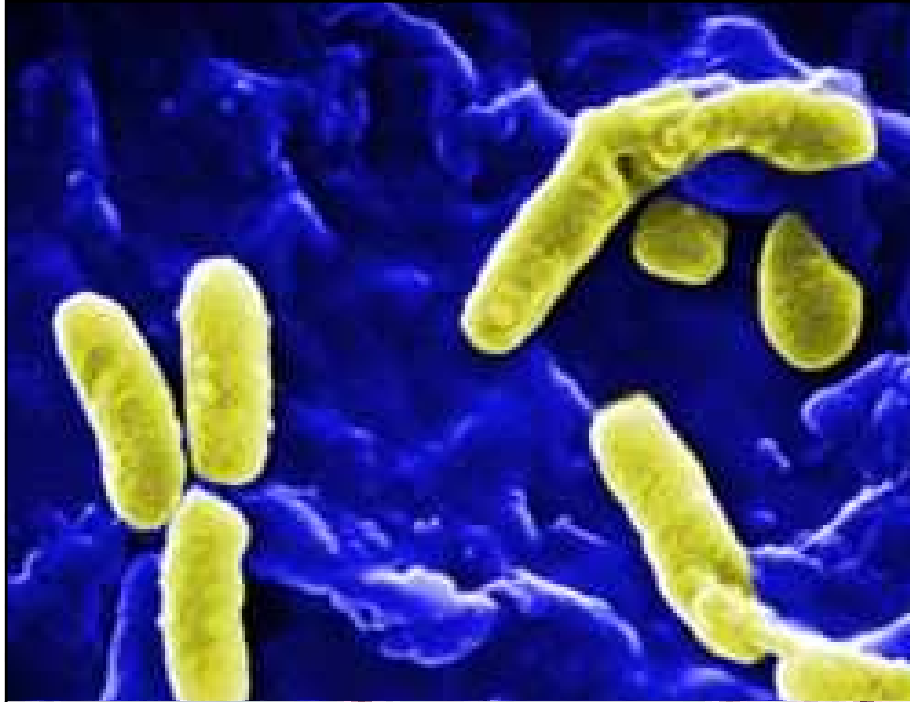
- Do jednoho rámečku lze vložit čtyři trojřádky pro čtyři kmeny, každý se identifikuje pomocí 24 reakcí



Fotografie z databáze zločinců

Pseudomonas aeruginosa





Výjimečný kmen
pseudomonády
s modrým
pigmentem

Testy antibiotické citlivosti

- Nefermentující bakterie rostou na nejrůznějších půdách včetně MH
- Používají se speciální protipseudomonádová antibiotika
- Samozřejmě i na atb testech pseudomonáda barví MH agar na zeleno

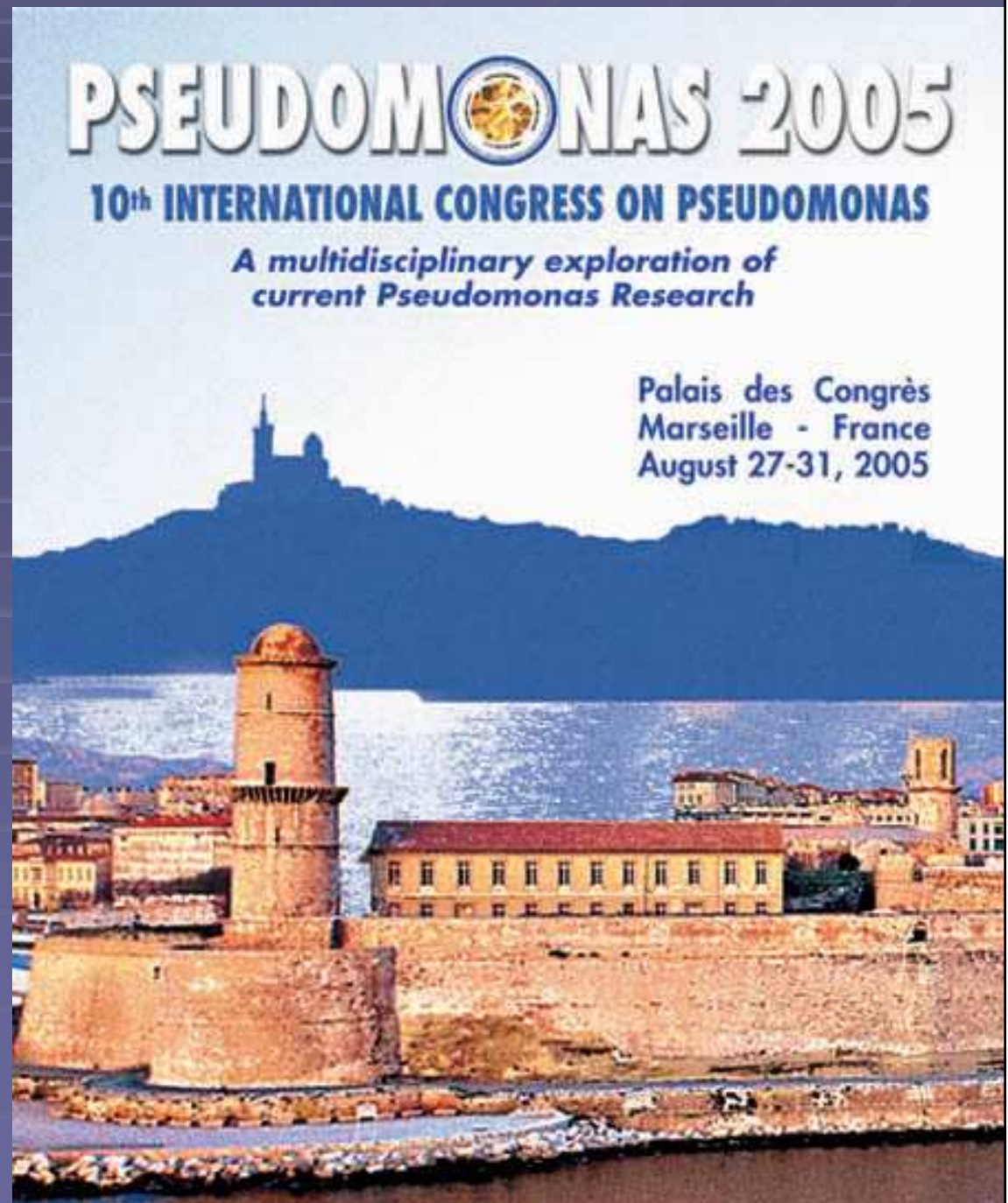
Používaná antibiotika

Antibiotikum	Zkratka	Referenč. zóna*
Piperacilin + tazobaktam	TZP	22 mm
Gentamicin (aminoglykos.)	CN	18 mm
Imipenem (karbapenem)	IMP/IMI	22 mm
Ciprofloxacin (chin 3 gen)	CIP	29 mm
Ceftazidim (CS 3 gen)	CAZ	16 mm
Colistin	CT	12 mm

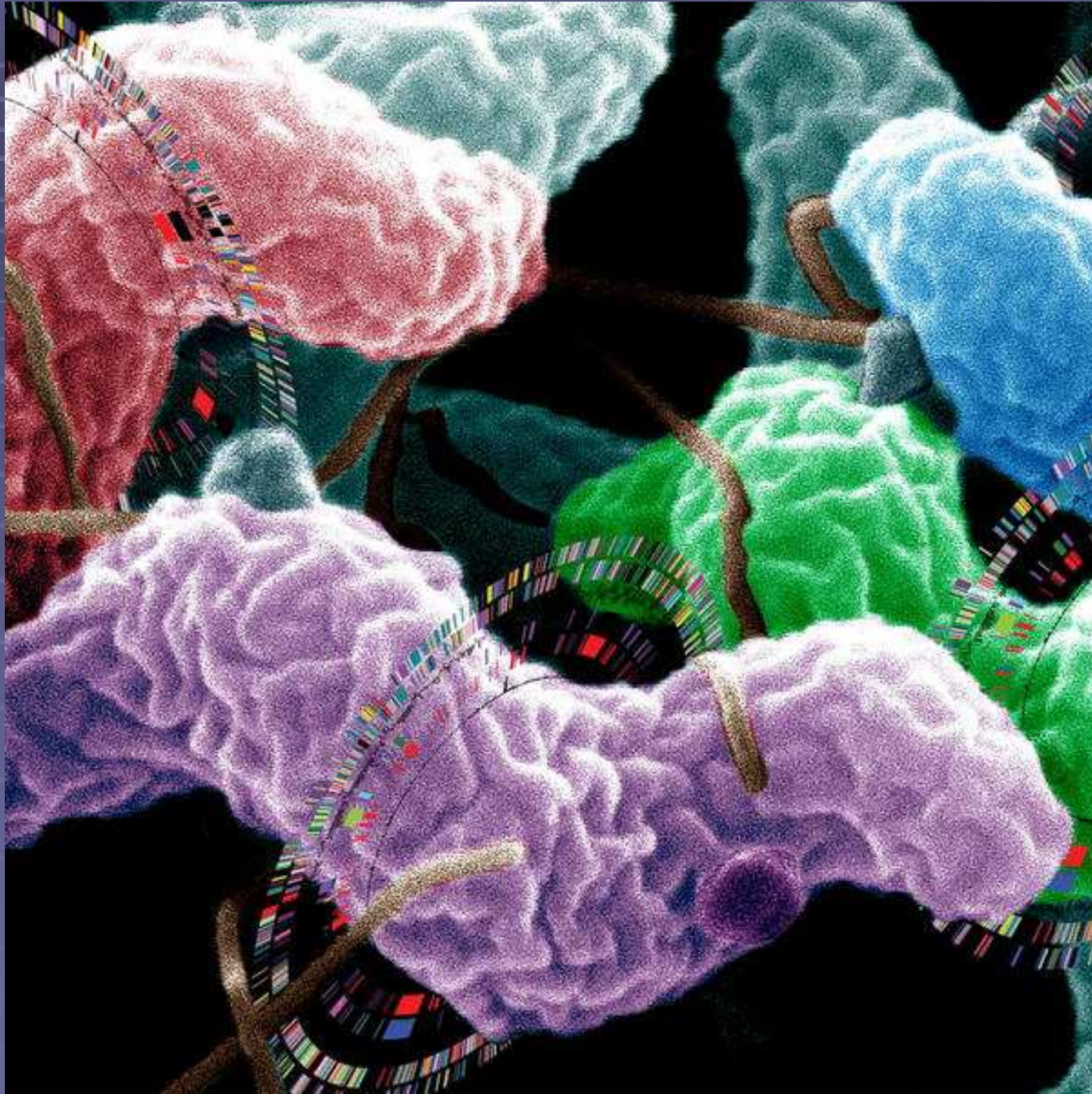
Šlo by to i E-testem



O pseudomonádách se, jak vidíte, pořádají i celé konference.



4. Kamylobakter a helikobakter



Příběh první

- Student František je častým návštěvníkem fast-foodů. Hlavně si rád a často pochutnává na jídlech z kuřecího masa.
- Proto ani hygienici nepřišli na to, které konkrétní jídlo mohlo za jeho průjemové potíže. František si myslel, že má nejspíš salmonelózu. Hygienici mu však vysvětlili, že salmonelóza se přenáší hlavně z vajíček, kdežto náš viník spíše z kuřecího masa.

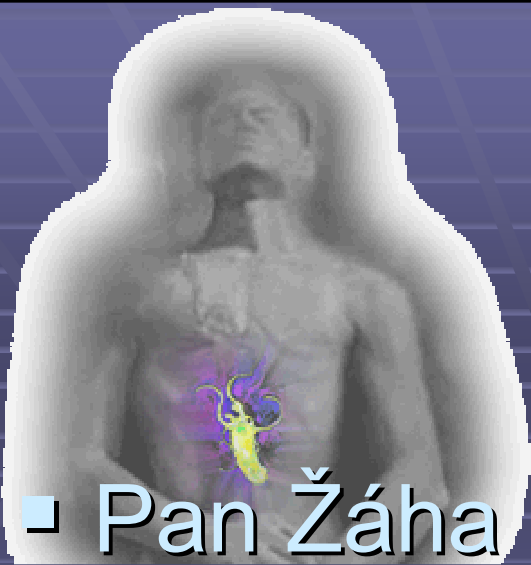
Viníkem je totiž



- *Campylobacter jejuni*, gramnegativní zahnutá tyčinka. Nepatří mezi enterobakterie, ale kamylobakteri6za je sv6m pr6b6hem a z6vaŹností srovnateln6 se salmonel6zou
- Po6et p6ípad6 u n6s je v posledn6ch letech p6ibliŹn6 stejn6 jako v p6ípad6 salmonel6zy. T6Źko řici, do jak6 m6ry kamylobakteri6zy skute6n6 p6ibylo a do jak6 je jen l6pe diagnostikov6na neŹ d6íve

Příběh druhý

- Pan Žáha má problém: pálí ho žáha.
- Pomalu už neví, jestli je víc doma doma, nebo na gastroenterologii, a fibroskopy polyká častěji než své dříve oblíbené utopence.
- Při poslední gastrofibroskopii mu endoskopicky odebrali dva vzorky – jeden poslali na histologické, druhý na mikrobiologické vyšetření
- Obě vyšetření potvrdila totéž: *zločinec je tam.*



Tentokrát jen spolupachatel...



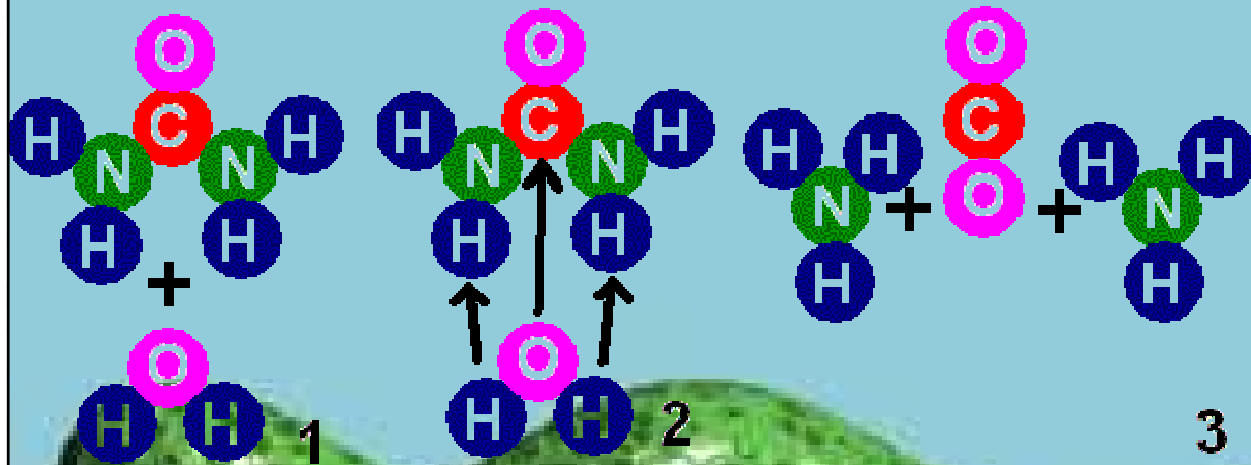
- Peptické (tedy gastrické či duodenální) vředy jsou onemocněním, které vzniká souhrou více příčin. Takovým onemocněním říkáme obvykle multifaktoriální.
- Dodnes se nejen mezi praktickými lékaři, ale i mezi odborníky liší názory na podíl bakterie *Helicobacter pylori* na vředové onemocnění. Jisto je, že jsou i zdraví lidé s helikobakterem, stejně tak je ale jisto, že helikobakter svůj, nikoli nevýznamný, podíl na onemocnění má.

Jak zločinec přežívá v extrémně nepříznivém prostředí žaludku?

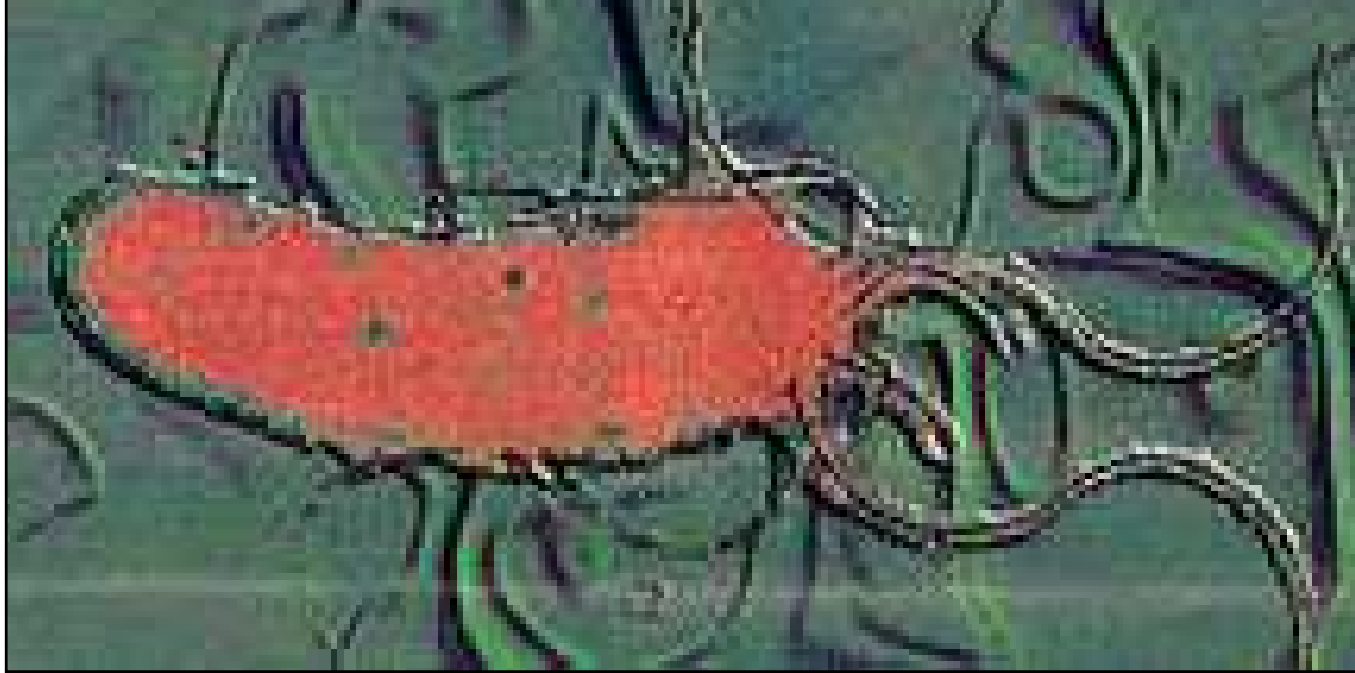
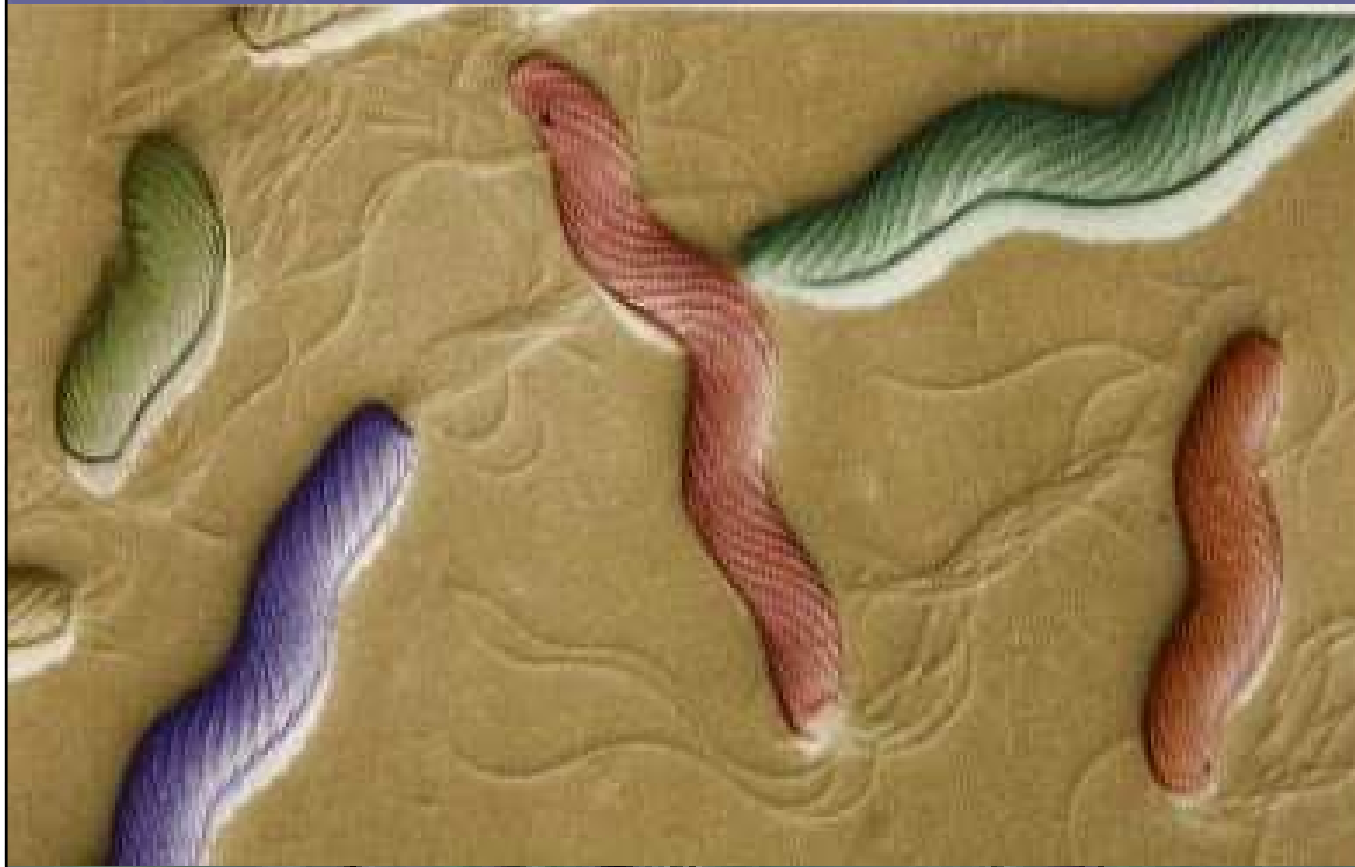
- Upravuje si své mikroprostředí – alkalizuje si ho, štěpě močovinu
- Močovina se rozštěpí na kyselý oxid uhličitý, který vyprchá, a zásaditý čpavek, který zůstane a alkalizuje prostředí
- Štěpení močoviny probíhá podle reakce:



Ještě jednou štěpení močoviny



(zde místo čpavku NH_4OH figuruje amoniak NH_3 , proto také do reakce vstupuje jen jedna molekula vody – NH_3 se ovšem jako plyn okamžitě slučuje s další molekulou vody na NH_4OH)



Komplikace helikobakterového onemocnění

Helicobacter-Infektion und die Folgen

Kommen Risikofaktoren wie Rauchen, Stress, Alkohol oder Veranlagung hinzu, können sich Magen- oder Zwölffingerdarmgeschwüre entwickeln.

Magengeschwür

Um sich vor der Magensäure zu schützen, bildet *Helicobacter pylori* das Enzym Urease.

Gastritis

Dadurch werden die Stoffwechselvorgänge der Magenschleimhaut gestört. Der Säurehaushalt des Magens gerät ins Ungleichgewicht. Folge ist eine Entzündungsreaktion (Gastritis).

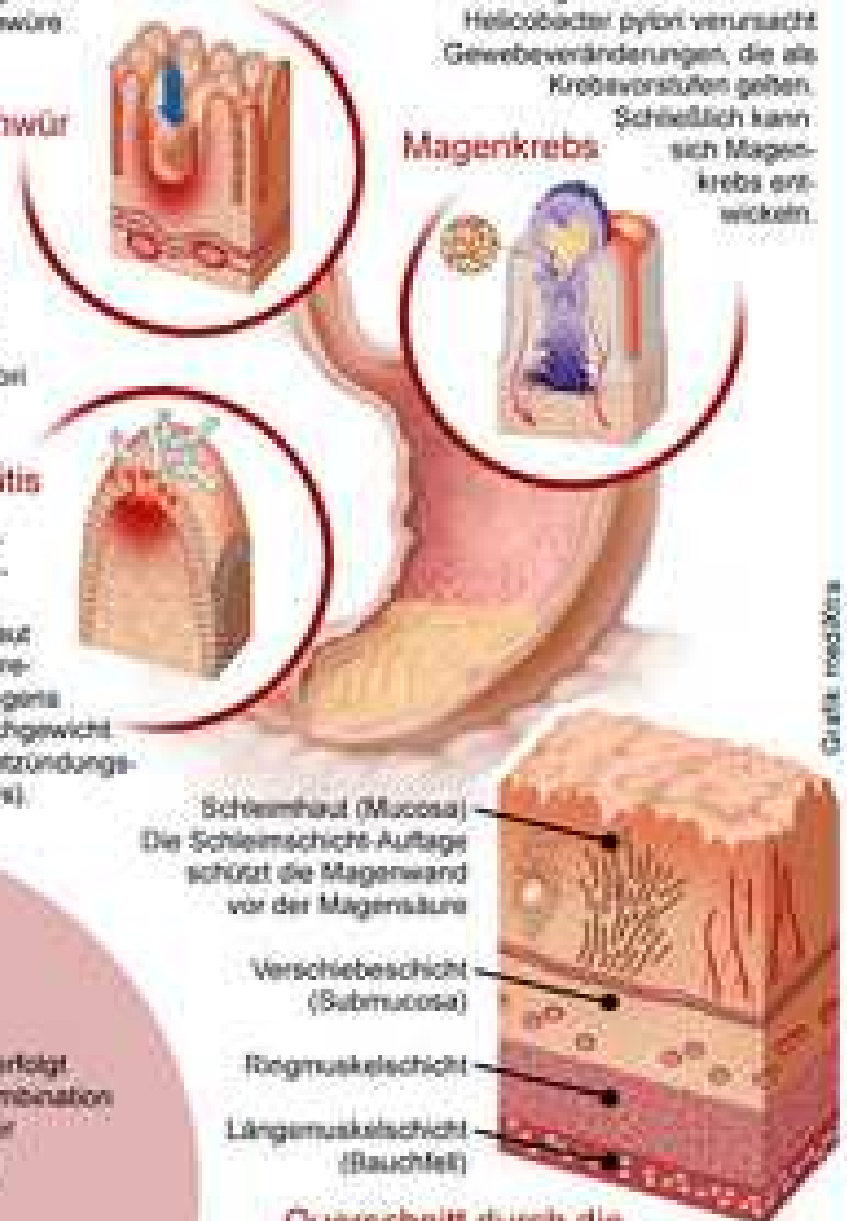
Therapie

Die Therapie erfolgt durch eine Kombination verschiedener Medikamente.

Die chronische Entzündung der Magenschleimhaut durch *Helicobacter pylori* verursacht Gewebeveränderungen, die als Krebsvorstufen gelten. Schließlich kann sich Magenkrebs entwickeln.

Magenkrebs

Schließlich kann sich Magenkrebs entwickeln.



Několik poznámek k diagnostice kamylobakterů

- Kamylobaktery vyžadují v zásadě čtyři věci:
 - Svoji černou půdu – nemá specifický název, říkáme jí „půda pro kamylobaktery“
 - Zvýšenou teplotu na cca 42 °C. Jsou to totiž primárně ptačí patogeny a ptáci mají vyšší tělesnou teplotu
 - Zvýšenou tenzi CO₂
 - Prodlouženou dobu kultivace – nikoli 24, ale 48 hodin

Několik poznámek k diagnostice helikobakterů

- V jejich diagnostice se používají speciality:
 - Mikroskopický a kultivační průkaz
 - Průkaz ureázové aktivity přímo ve vzorku tkáně. Je to jediná výjimka z pravidla, že biochemické určení se vždy týká kmene a nikdy vzorku. Je to proto, že za ureázovou aktivitu ve vzorku zde nic jiného než helikobakter nemůže být zodpovědno.
 - Ještě obskurnější je tzv. urea breath test – jediné mikrobiologické vyšetření, na které potřebujete celého pacienta

Jeden méně známý helikobakter

Helicobacter cinaedi



AstraZeneca  Hut-Test®

Patient: *Z. STAMM*

Datum/Date: 2005-09-09

Corpus Antrum

Befund/Result:

neg:



pos:



Ctrl-B/lot:

FJ2809A1

www. bis/Exp.:

09-2005

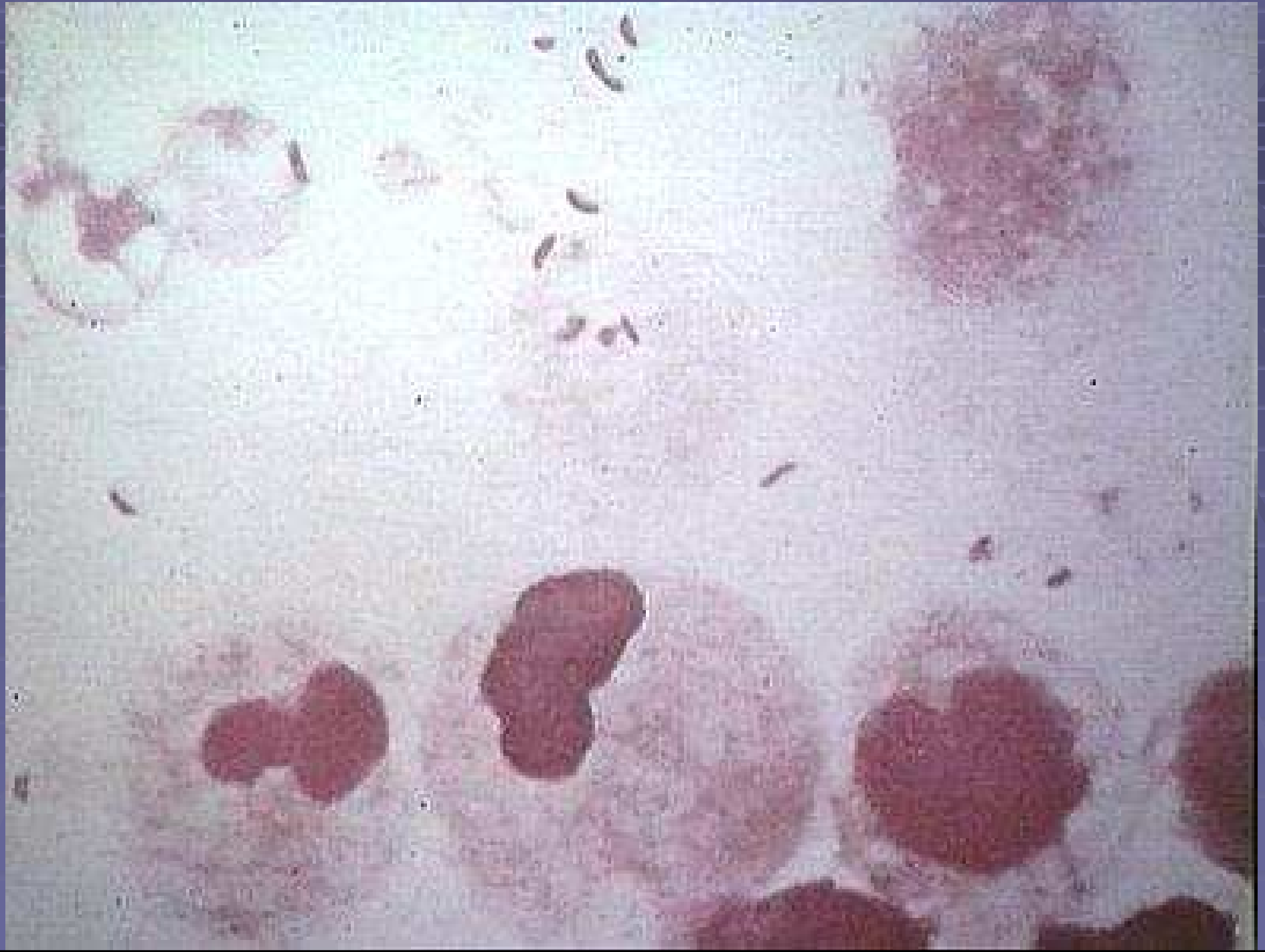


Rychlý ureázový test

Urea breath test

- Pacientovi se podá radioaktivně značená močovina
- U zdravého močovina projde do dolní části trávicího traktu a vyloučí se stolicí
- Je-li přítomen helikobakter, rozštěpí se už v žaludku a značený CO_2 se objeví ve vydechaném vzduchu. Čím více značeného CO_2 , tím více helikobaktera
- **Pojišťovna proplácí jen u dětí (pokud víme)**

5. Čeled' *Pasteurellaceae*



Příběh



- Kubík je hodný kluk, ale jeho rodiče jsou členy jakési sekty a nechtějí Kubíka nechat očkovat. Nejraději by ho měli pořád doma, ale nakonec ho přece dali do školky...
- Po měsíci ve školce začal být Kubík nachlazený, smrkal, kašlal, a nakonec se začal dusit a sípavě dýchat. Volali RZP, ukázalo se, že Kubík má zánět příklopky hrtanové – nemoc, která se dnes už moc často nevidí...

Kdo to Kubíkovi udělal?

- Viník: *Haemophilus influenzae* serotyp b (Hib)
- Hemofily jsou krátké gramnegativní tyčinky. Nerostou na Endu, ale dokonce ani na KA
- Ze všech hemofilů je nejhorší *H. influenzae*. Ze všech kmenů *H. influenzae* jsou nejhorší kmeny opouzdřené. A ze všech opouzdřených pak ty, které vlastní pouzdrerný typ b
- Způsobují epiglottitidy, meningitidy a sepse. Ale zároveň hemofily (zvláště ty, které nepatří mezi „Hib“) jsou úplně běžně nalézány v krcích.

Čeď *Pasteurellaceae*: Pasteurely a hemofily

- *Pasteurella multocida* je běžnou flórou v psích tlamách. U člověka způsobuje zejména zhnisání ran po pokousání psem či jiným zvířetem. Má podobný charakteristický pach jako hemofil, ale na rozdíl od něj roste na krevním agaru. Vypadá tam jako něco mezi streptokokem a enterokokem, ale je rezistentní na vankomycin, což obvykle mikrobiologa „trkne“.
- Nejznámější hemofily jsou *Haemophilus influenzae* (často sekundární infekce při „chřipkovitých“ virózách), *H. parainfluenzae* a *H. aphrophilus*. Původcem měkkého vředu je *H. ducreyi*.

Přehled metod použitelných k dopadení těchto bakterií

■ Přímé metody

- Mikroskopie – teoreticky, pokud by byla potřeba; jsou to gramnegativní krátké tyčinky
- Kultivace – pasterurely rostou na krevním agaru, hemofily jen na čokoládovém, na Endově půdě neroste ani jedna z těchto bakterií
- Biochemická identifikace – u nás není vhodná souprava, v zahraničí soupravy existují
- Antigenní analýza – zejména u hemofilů (Hib)

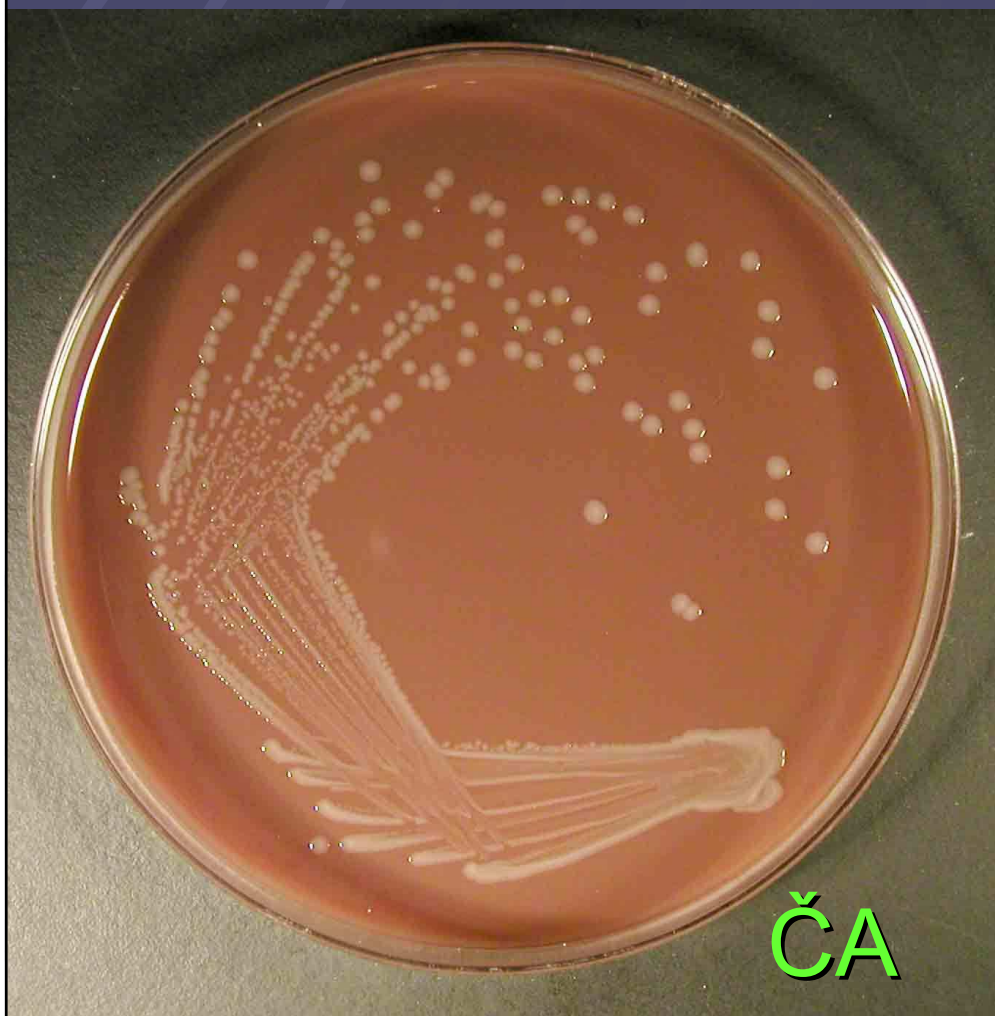
Nepřímé metody se téměř nepoužívají

K diagnostice hemofilů a pasteurel



- Pasteurely rostou na krevním agaru
- Hemofily na krevním agaru růst neumějí, protože si neumějí „otevřít“ krvinku
- Rostou tedy na čokoládovém agaru
- Na KA rostou v přítomnosti takové bakterie, která jim krvinku „otevře“ (satelitový fenomén). Takovou bakterií je například zlatý stafylokok
- Mají droboučké kolonie, proto se používá disk k odclonění ostatních bakterií (bacitracin, ale ve vyšší koncentraci než v bacitracinovém testu)

Fotografie z databáze zločinců: Hemofily

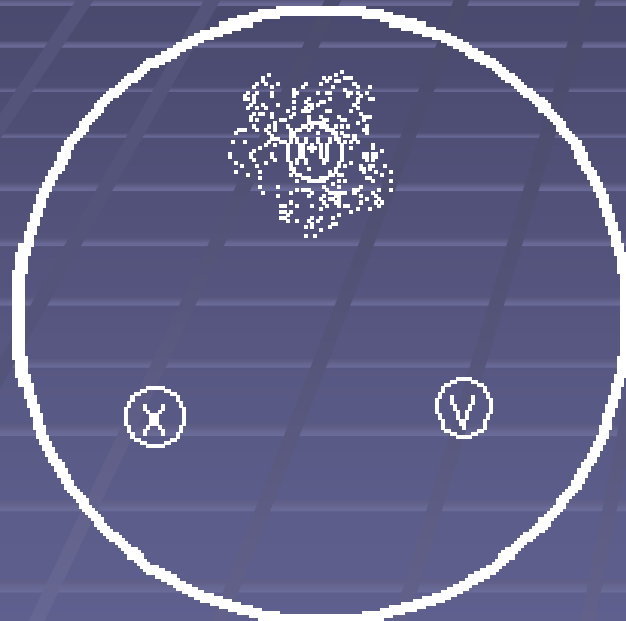


Hemofily a růstové faktory

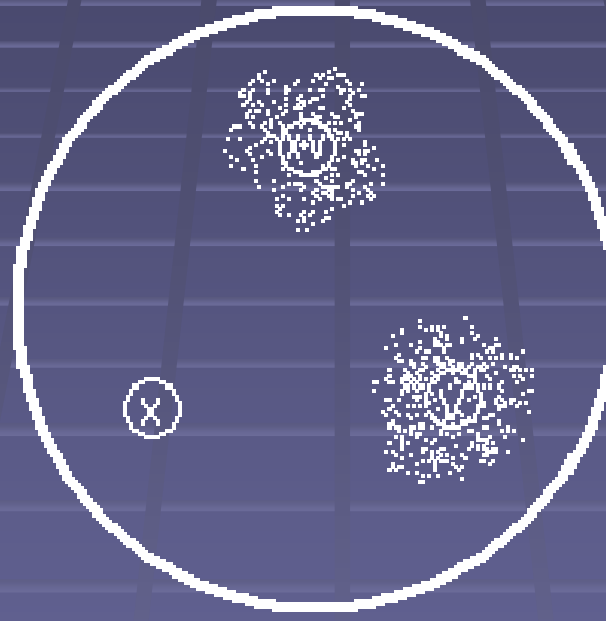
- Ne všechny hemofily potřebují stejné faktory.
- *H. parainfluenzae* potřebuje faktor V (NAD)
- *H. aphrophilus* faktor X (což je hemin)
- *H. influenzae* potřebuje oba. Používáme disky napuštěné těmito faktory.

Test růstových faktorů hemofilů

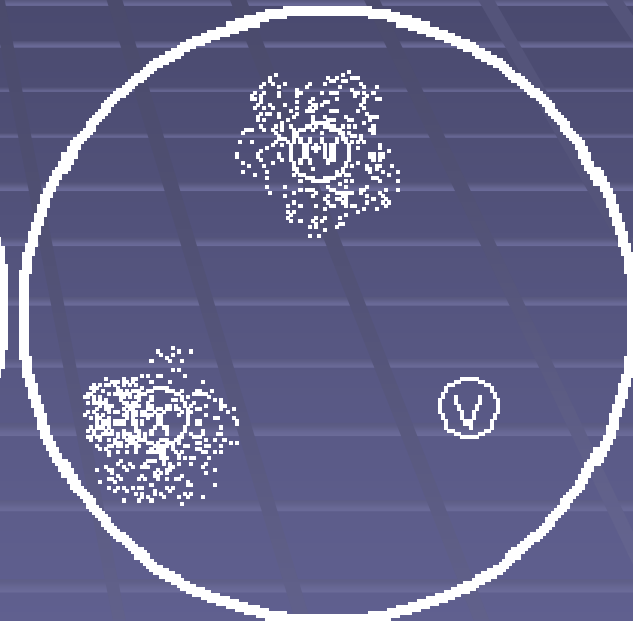
Jeden disk obsahuje faktor X, druhý faktor V, třetí směs obou



Haemophilus influenzae



Haemophilus parainfluenzae



Haemophilus aphrophilus

H. influenzae (vlevo),
H. parainfluenzae (vpravo)



Antigenní analýza

- Antigenní analýza se u hemofilů provádí obdobným způsobem jako u jiných bakterií. Dnes jsou zpravidla k dispozici komerční soupravy, obsahující např. i latexové částice a další součásti
- Dříve se využívalo jevu tzv. koaglutinace se stafylokokem, kdy aglutinát byl hustší díky navázání stafylokoka na Fc konec protilátky proti hemofilovi

Testy antibiotické citlivosti

- Hemofily nerostou na MH agaru
- Zpravidla se používá Levinthalův agar (přefiltrovaný čokoládový agar), na kterém jsou zóny lépe viditelné než na klasickém čokoládovém agaru
- V naší laboratoři se používá „hemofilový agar“, což je půda blízká agaru Levinthalovu
- Případnou diskovou rezistenci k ampicilinu je třeba ověřit testem produkce betalaktamázy

Upozornění

- Hemofily tvoří velmi mrňavé kolonie. Pokud je očkujeme nahusto (jako při testování citlivosti na antibiotika), jsou ještě mrňavější.
- Proto je na agaru není moc vidět. Je třeba najít vhodné úhly mezi vaším okem, miskou s hemofilem a dopadajícím světlem – zprvu se zdá, že tam nic není!

Antibiotika používaná u hemofilů

Antibiotikum	Zkratka	Referenč. zóna*
Ampicilin (aminopenicilin)	AMP	22 mm
Ko-amoxicilin (am.+inhib.)	AMC	18 mm
Chloramfenikol	C	29 mm
Tetracyklin (tetracyklin)	DO	29 mm
Ko-trimoxazol (směs)	SXT	16 mm
Azithromycin (makrolid)	AZM	12 mm

6. Legionella pneumophila, Brucella abortus, Bordetella pertussis, Francisella tularensis



Copyright © 2004 Dennis Kunkel Microscopy, Inc.

Příběh

- Pan Vomáčka se zotavoval po těžkém úraze na ARO. Vedle něj ležel pan Vopička, a oba byli napojeni na ventilátor.
- Náhle se stav obou pacientů prudce zhoršil. Totéž se stalo ale i dvěma jiným pacientům na druhém konci oddělení. Jen klimatizační trubky byly společné...
- Nakonec se ukázalo, že původcem je *Legionella pneumophila*, která často osidluje právě klimatizační trubky...

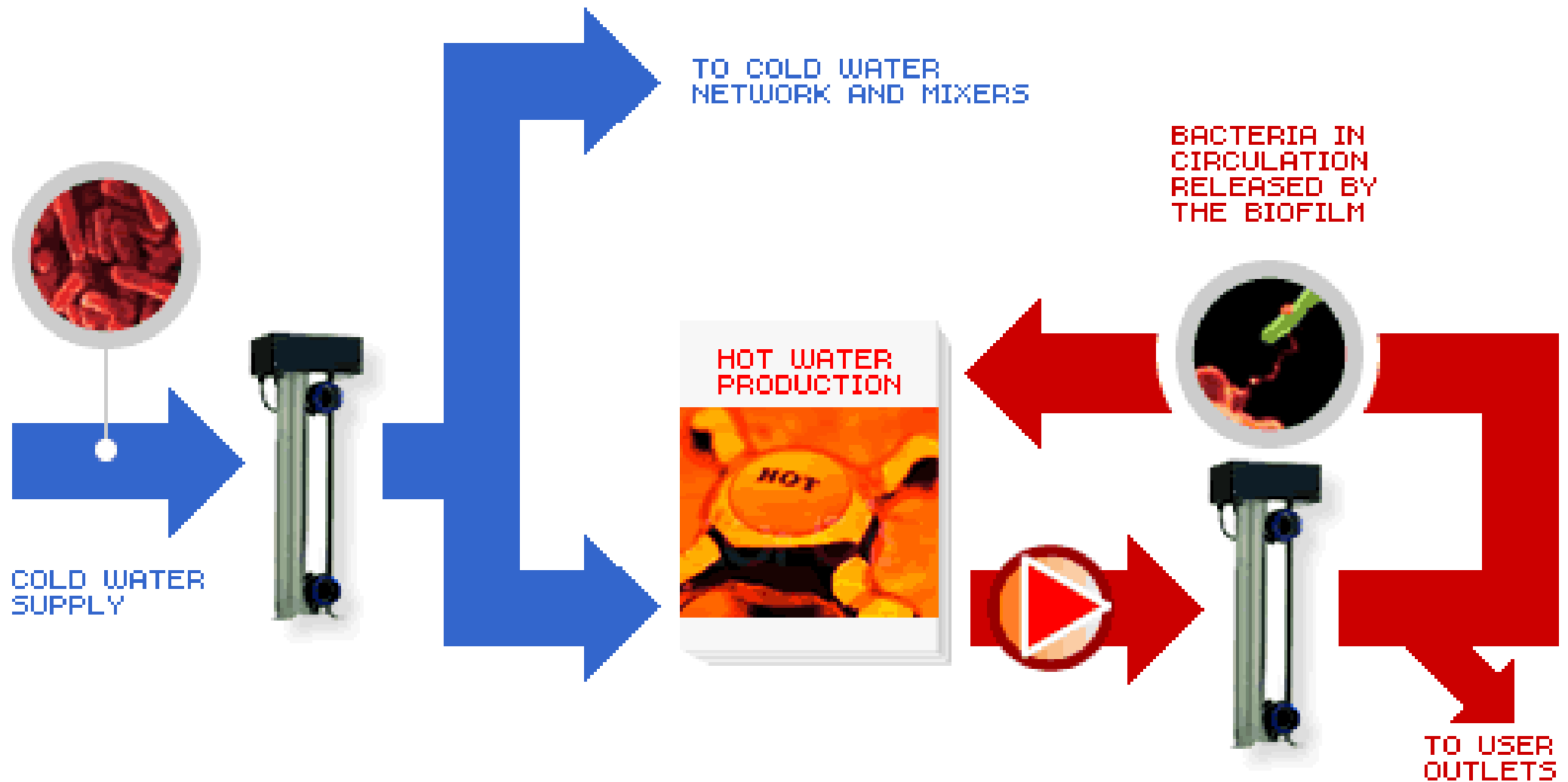
Diagnostika bordetel, brucel, legionel a francisel

- Různé gramnegativní tyčinky, které nerostou na Endově půdě a většinou ani na krevním agaru
- K jejich diagnostice se používají speciální půdy nebo nepřímá diagnostika (průkaz protilátek)
- Infekce jsou méně časté, ale mohou být velmi závažné

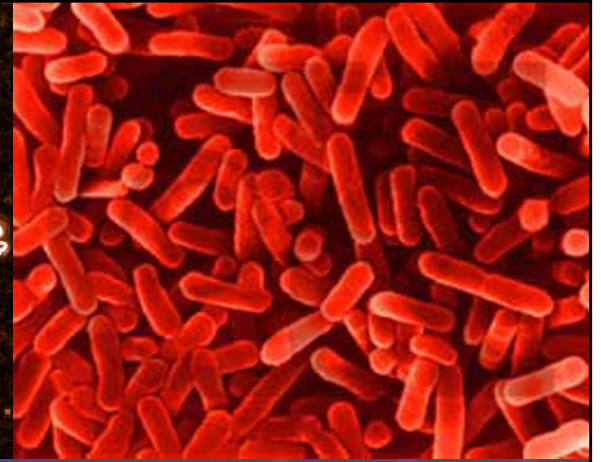
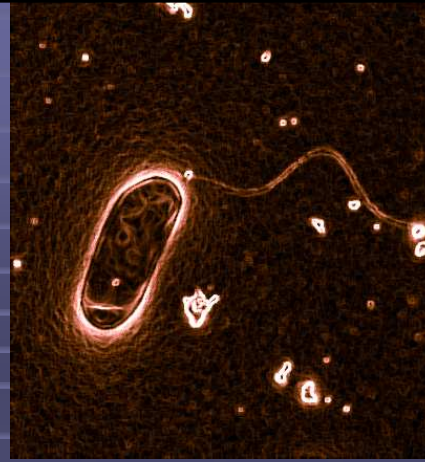
Legionely

- Legionely způsobují legionářskou nemoc. Tato nemoc je známa teprve několik desetiletí – poprvé byla zaznamenána při jednom sjezdu amerických válečných veteránů, a proto se jmenuje tak, jak se jmenuje.
- Kromě klimatizace je rizikové také potrubí na teplou vodu, především jeho slepá ramena, která se nedají propláchnout
- V diagnostice se používá zejména kultivace na půdě BCYE.

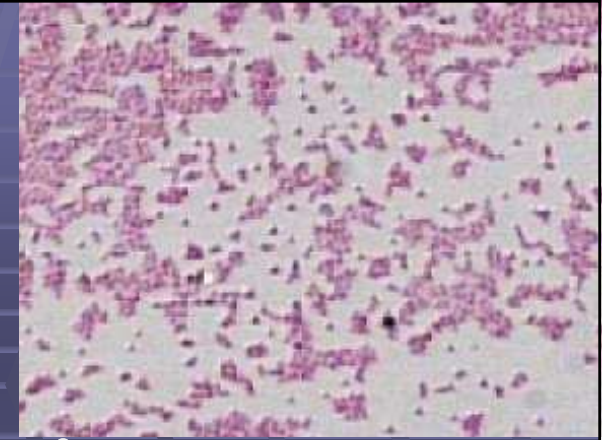
Prevenca legionelózu v nemocnicích



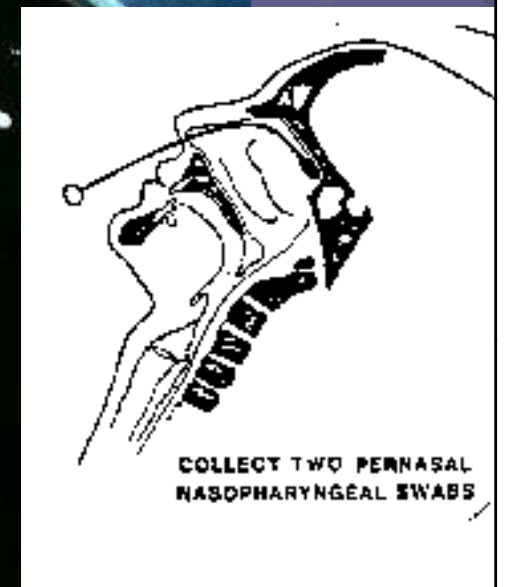
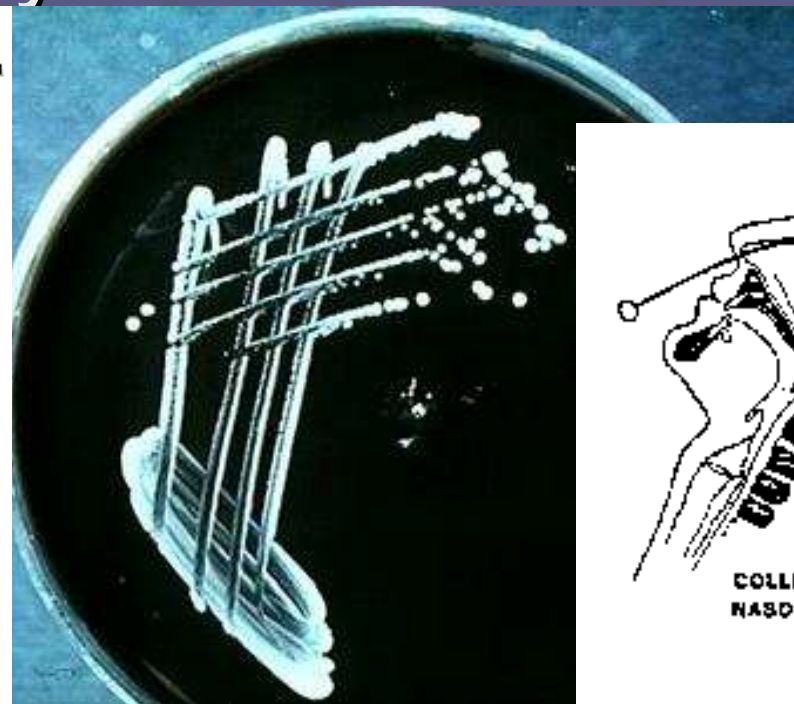
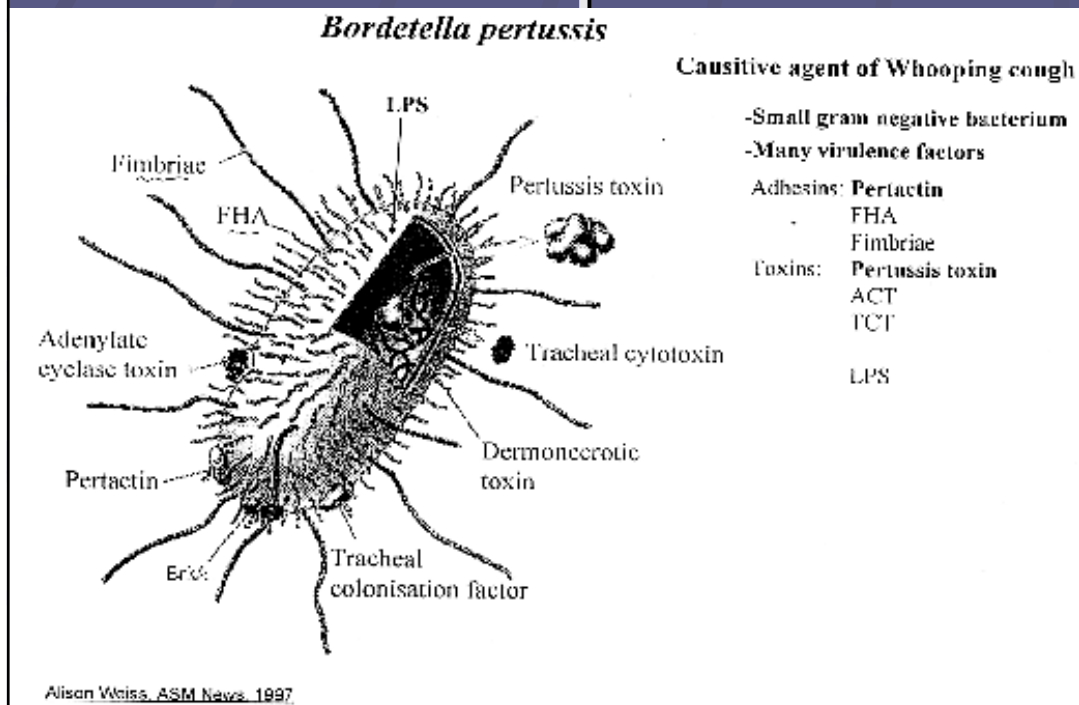
Legionella



Bordetelly



- *B. pertussis* a *B. parapertussis* způsobují dávivý kašel. *B. bronchiseptica* vyvolává různé patologické stavy u lidí i zvířat.
- Užíval se pernazální výtěr



Bordetella bronchiseptica:
infekce kočky

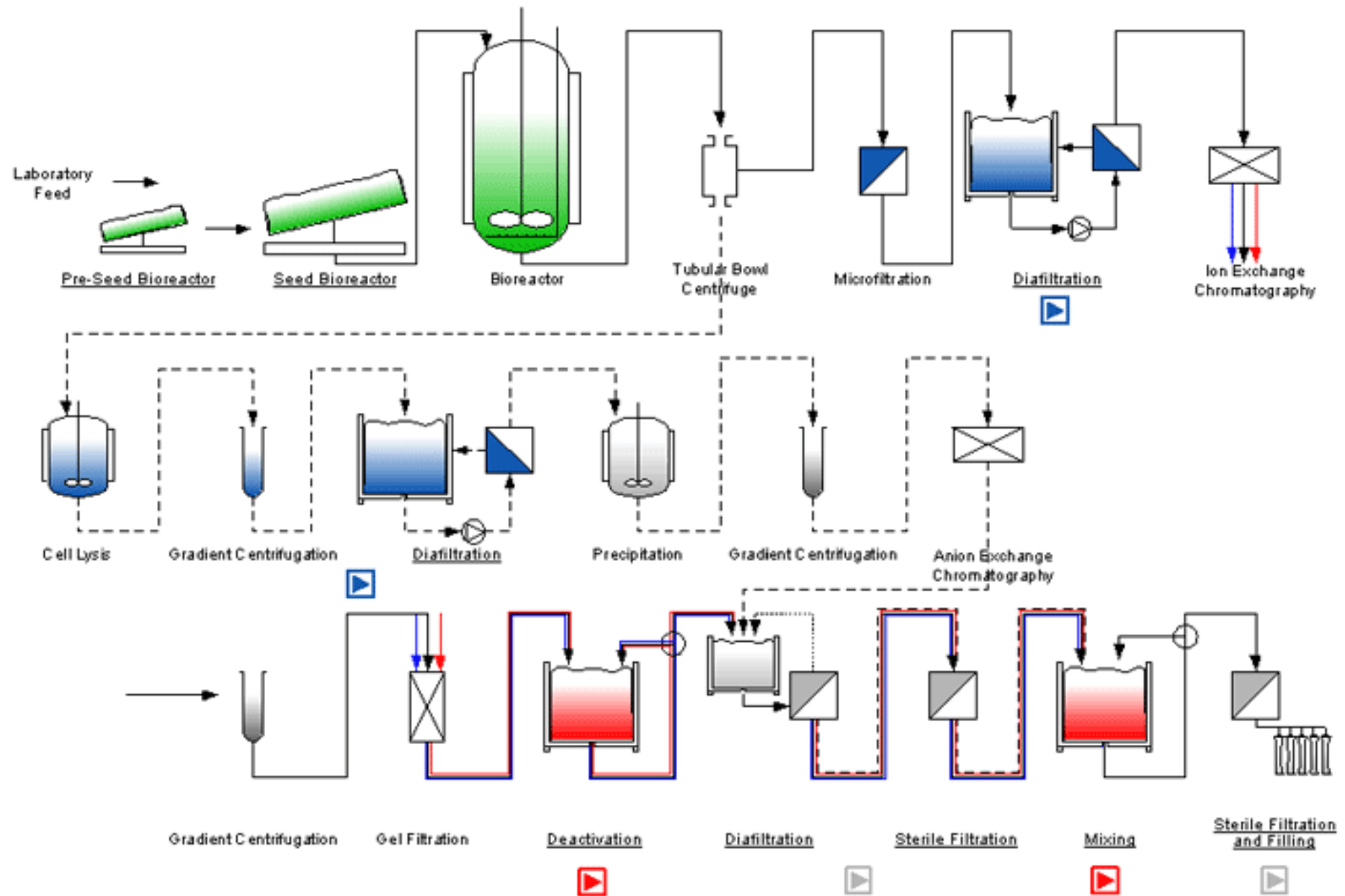
Postup očkování na BG agar

Tento zvláštní způsob se používá proto, že zkušenost ukázala, že zvyšuje záchyt bordetel.

- 1) Naočkování středového pole do kapky penicilinu
- 2) Spirála směrem k.okraji
- 3) Radiální paprsky

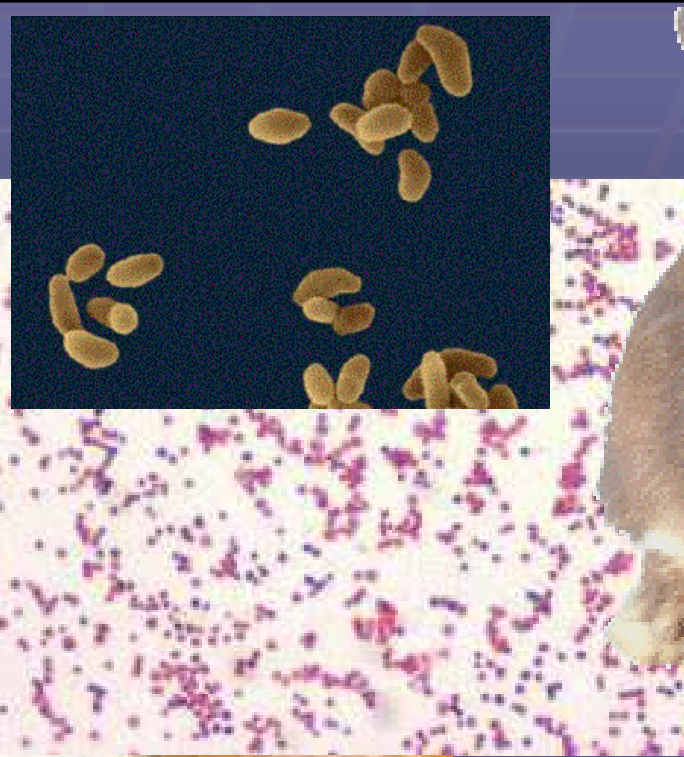


Jak se dělá pertusová vakcína



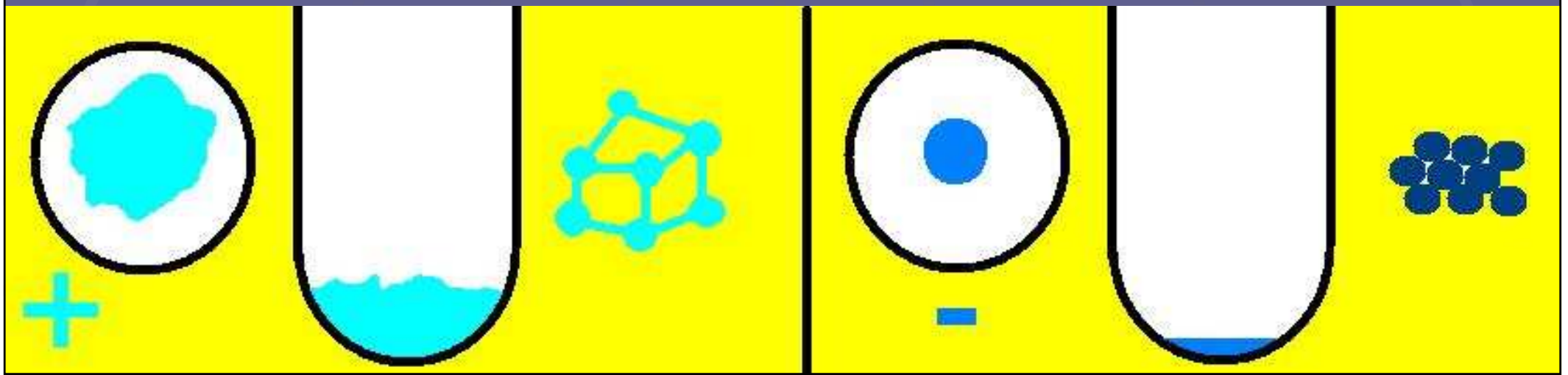
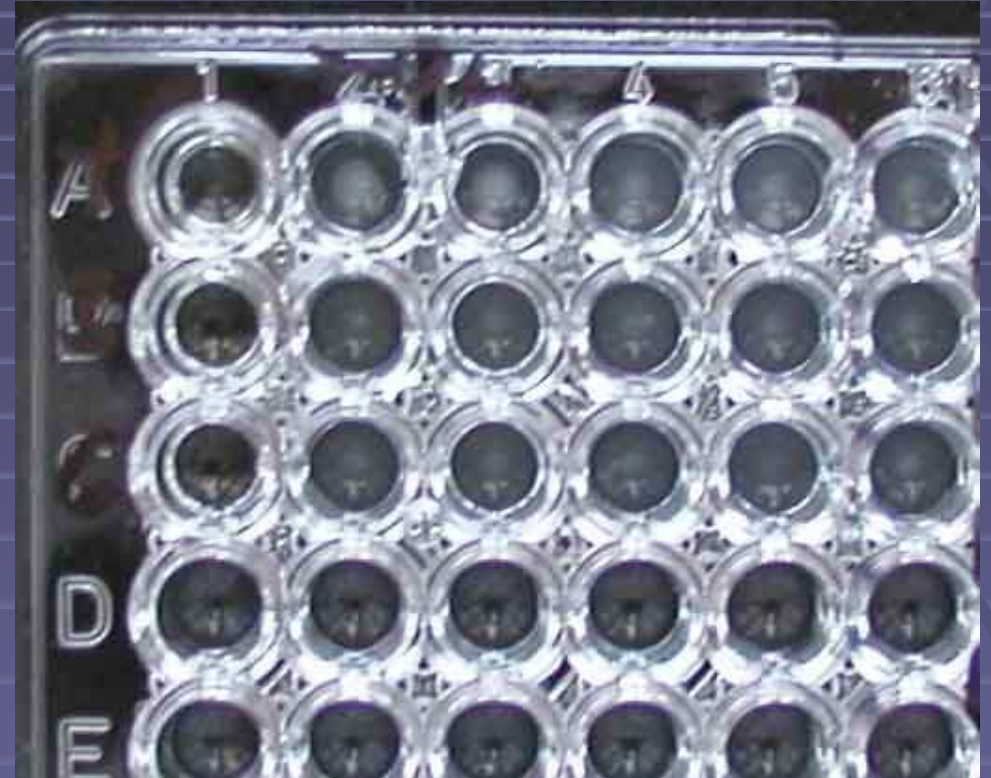
Francisella

- Původce tularemie – zaječího moru



Odečet aglutinačního setu

- Používá se nepřímý průkaz aglutinací
- Počítá se titer – tedy nejvyšší ředění, kdy ještě nalézáme pozitivní reakci



Brucelly – zvířecí patogeny

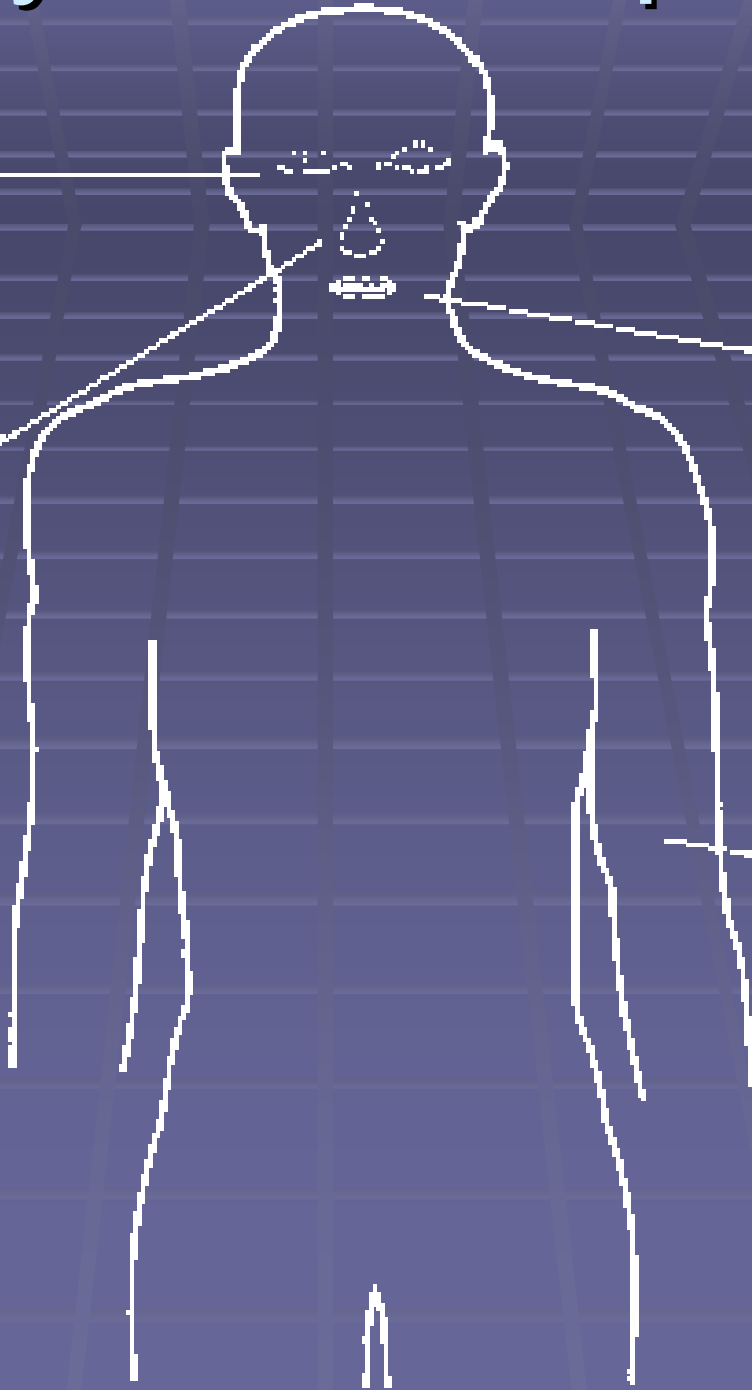
Conjunctivae
by aerosols or fingers

Inhaled aerosols
Slaughterhouse procedures
Laboratory accidents
Veterinary manipulations

Ingestion
Dairy products
Contaminated fingers

Abraded skin
Veterinarians
Abattoir workers

Brány vstupu



Brucella-infected
phagocytic cell

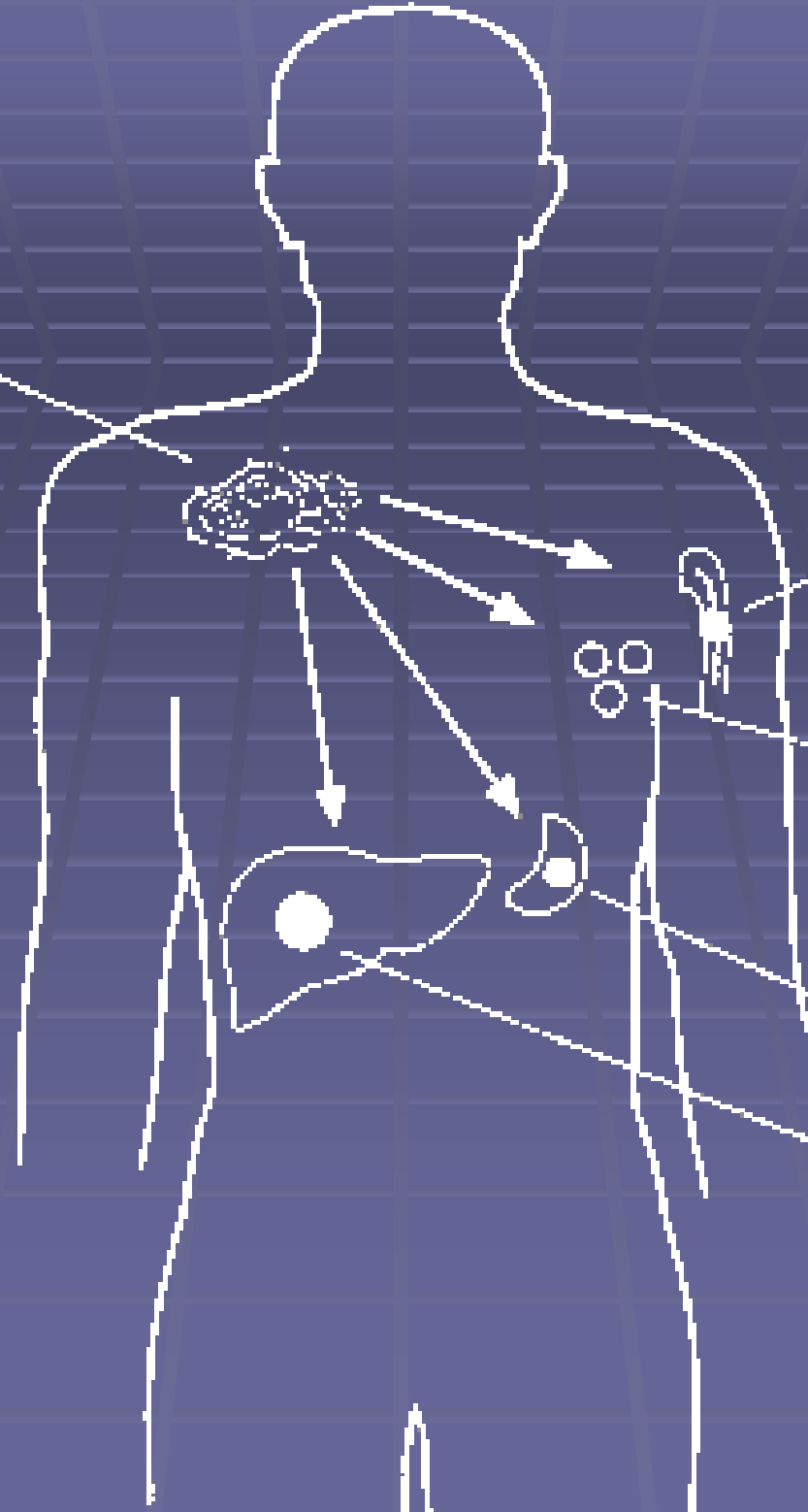
Bone marrow

Lymph nodes

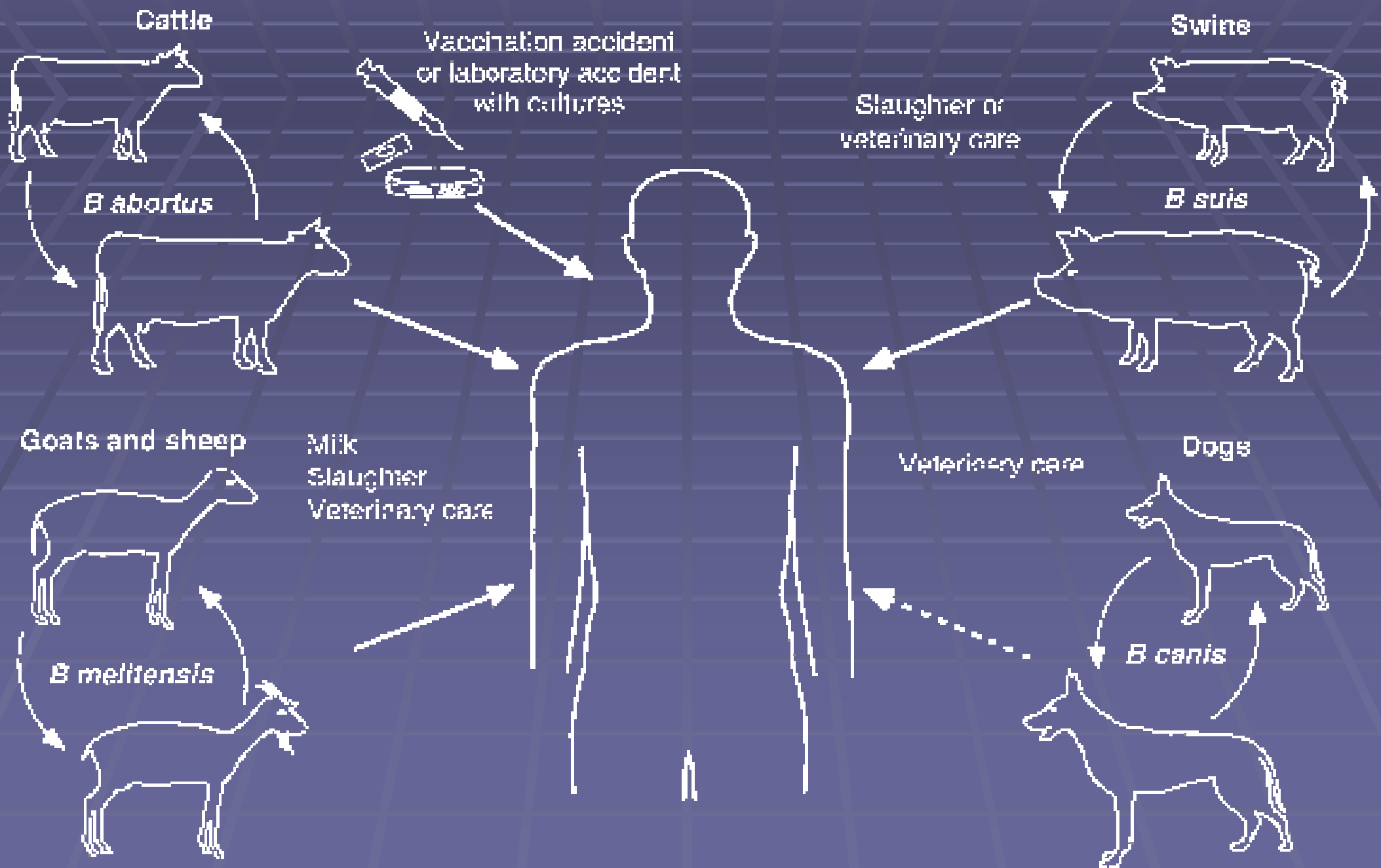
Spleen

Liver

Postižené tkáně



Jednotlivé druhy a jejich zvířecí hostitelé

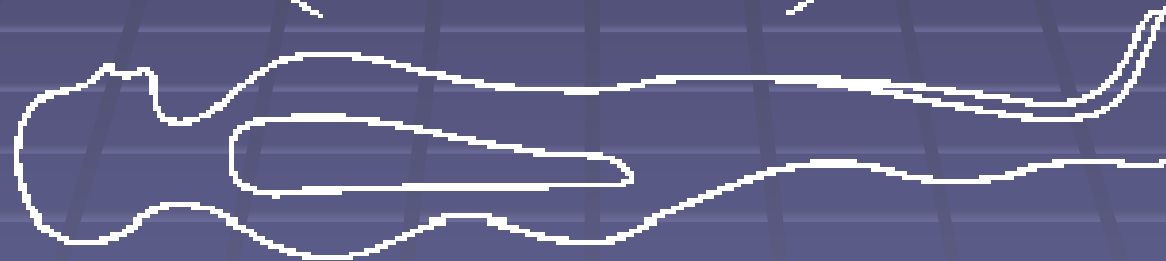
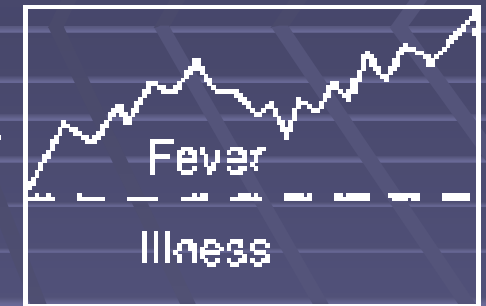


History and Physical Exam

Clinical

Occupation
Raw milk
Fresh cheese
Travel
Symptoms
Signs

Course of disease

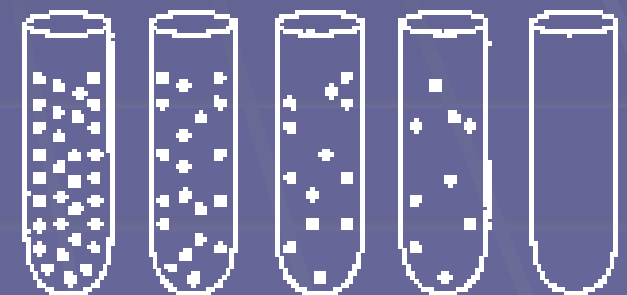


Laboratory

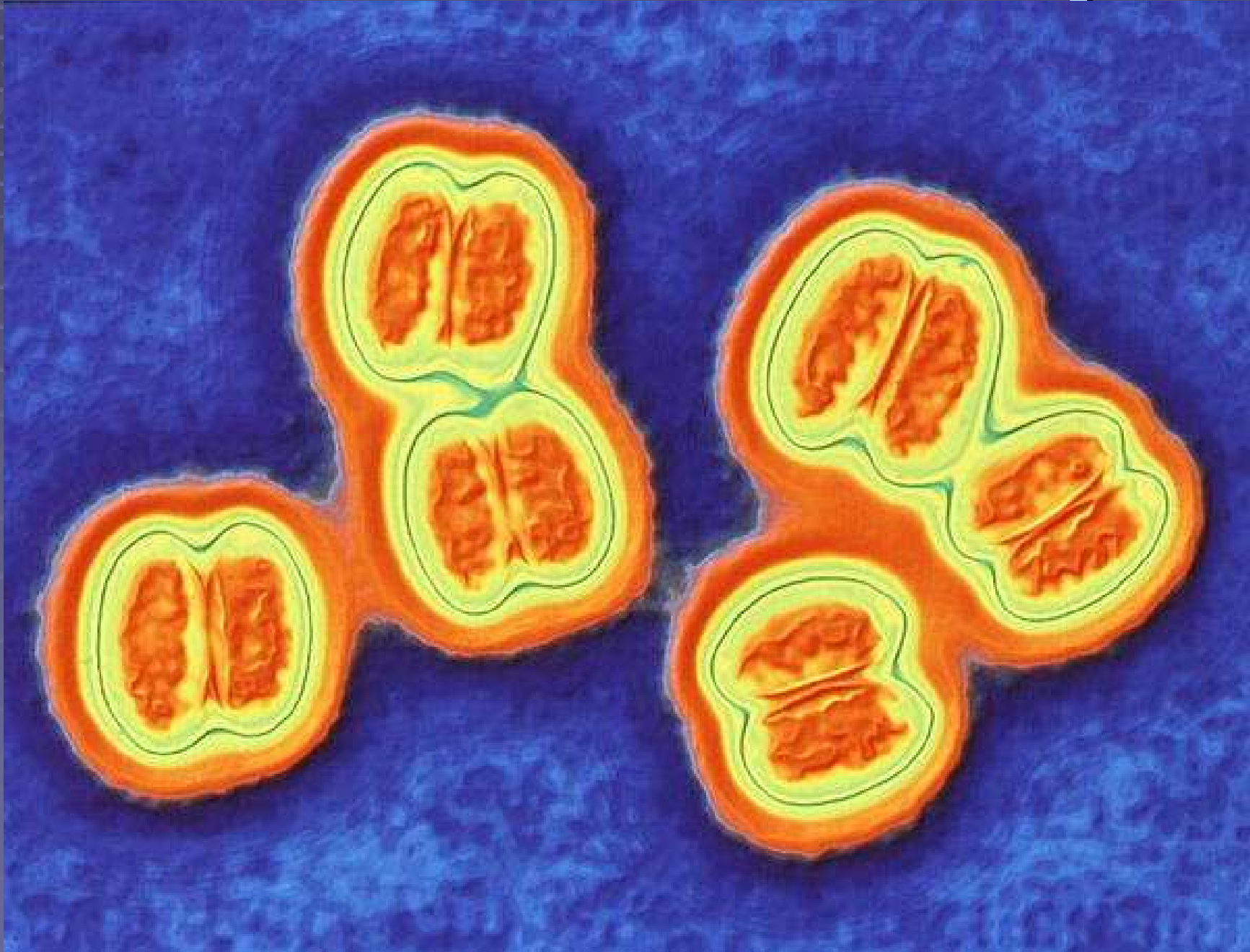
Blood cultures



Quantitative serology



7. Neisserie a moraxelly



Úvod: Medická sprostonárodní

Na patologické anatomii
hrabou se medičky ve shnilém pyji
Nevěří svému oku
co je tam gonokoků
Co mi to vytéká z močové roury?
Chytil jsem kapavku od nějaké coury
Hnis mi tam odkapuje
Trenýrky zaplavuje

(Zpívá se jako Tálinskej rybník)



Příběh první



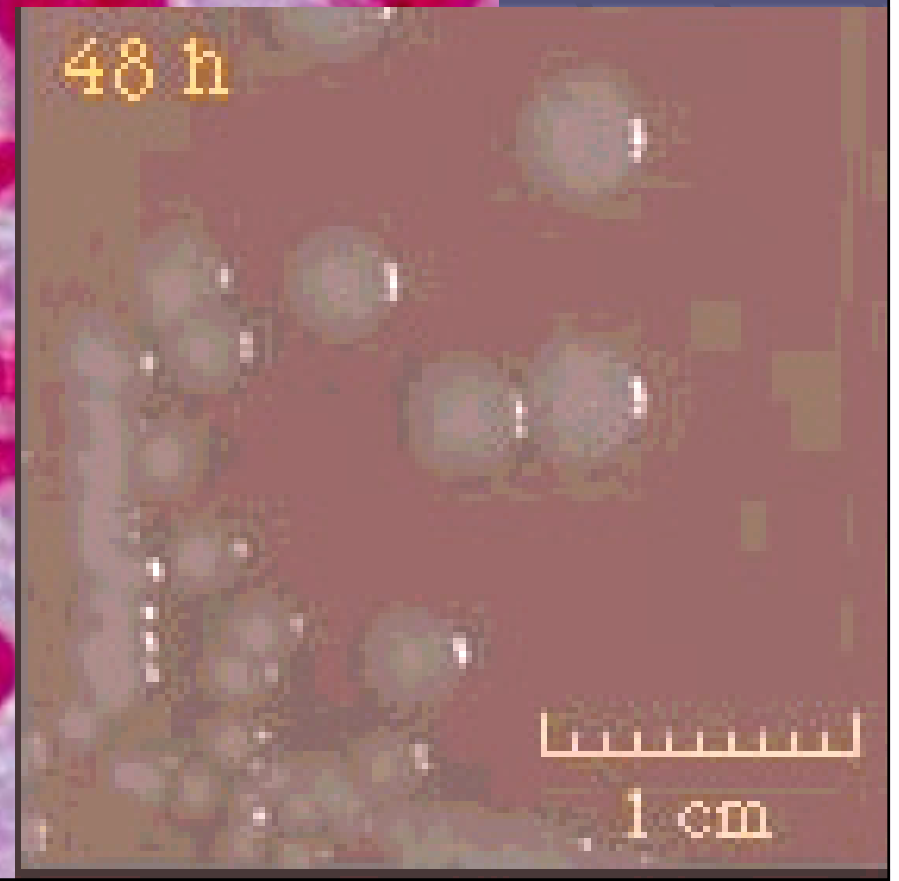
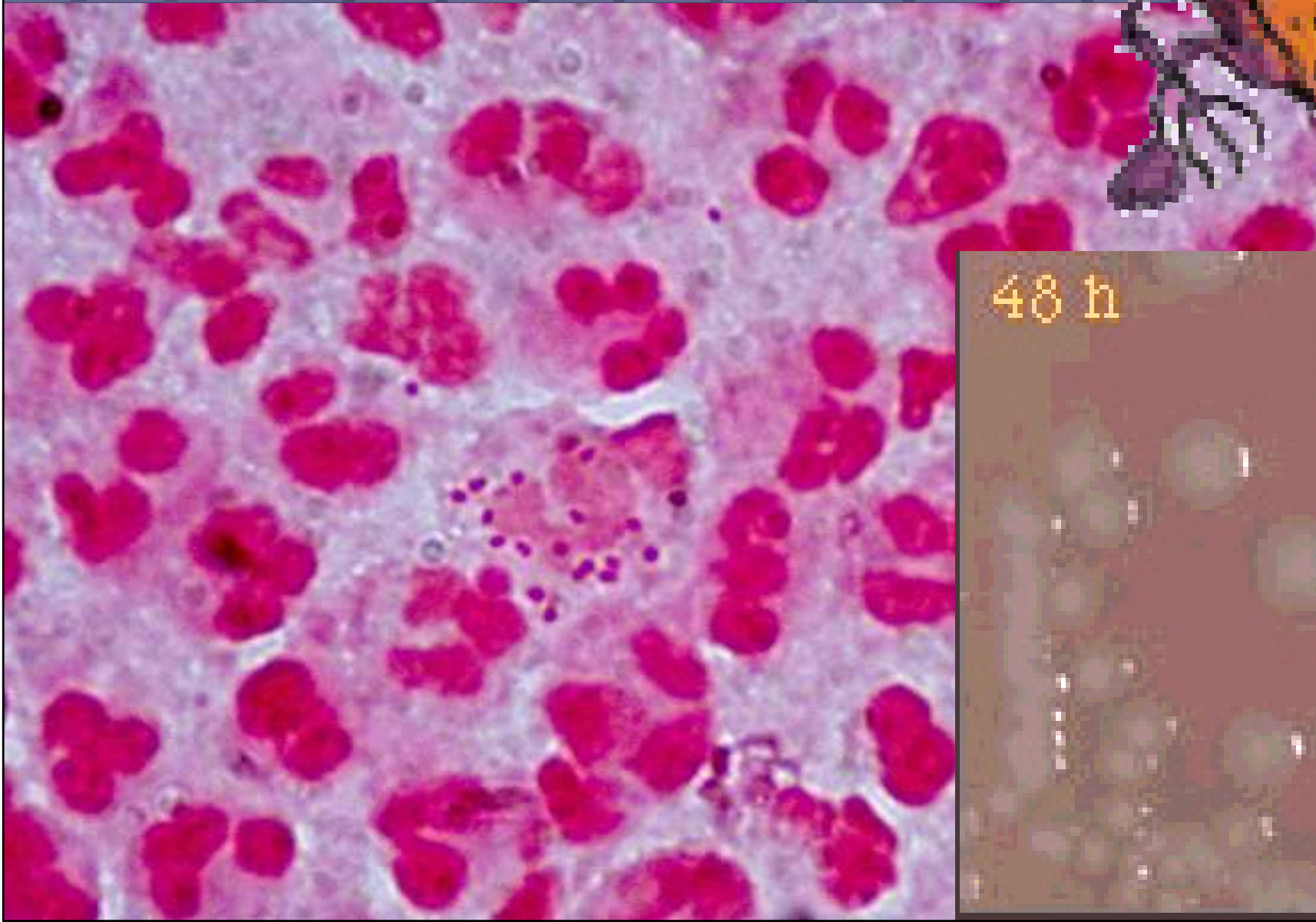
- Honza byl mamincin mazlíček a s holkami to neuměl. Tak se stalo, že ještě ve dvaceti neměl žádnou sexuální zkušenost. Kamarádi z něj měli legraci. Jednou se na něj domluvili, opili ho a zaplatili mu „společníci“ na večer. Honza měl pocit, že je konečně mužem... do doby, než začal mít pocit, že je netěsnícím vodovodním kohoutkem, z kterého neustále něco odkapává (totiž hnis...)

Určitě tušíte, kdo je viníkem

- Samozřejmě, je to *Neisseria gonorrhoeae*, (gonokok) původce kapavky.
- Kapavka se projevuje jako zánět uretry, u žen také cervixu; asymptomaticky či symptomaticky se gonokoky vyskytují i ve faryngu a v rektu.
- U žen naopak nejde o kolpitudu (zánět pochvy) a proto pochva není místem, odkud by bylo doporučeno odebírat u podezření na kapavku výtěry



Gonokoky



Příběh druhý

- Lucie se už čtyři týdny učila na zkoušku z fyziologie. Vůbec nevycházela z domu a jen seděla na zadnici. U zkoušky měla pocit, že ze sebe nic nevydoluje, ale nakonec si na cosi vzpomněla a prolezla s trojkou
- Večer to s kamarádkami šla oslavit na taneční party. Bylo tam nakouřeno a tancovalo se do hluboké noci. Druhý den Lucce nebylo dobře, začala mít teploty a pak se objevila i vyrážka.

(pokračování)



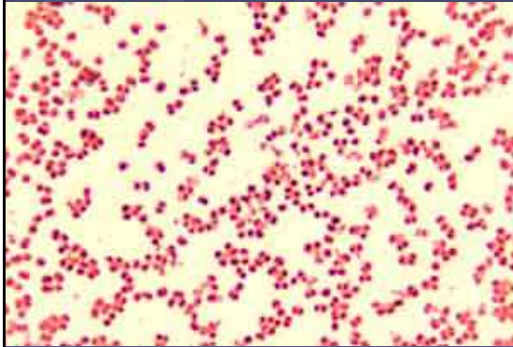
- Až tehdy se nechala odvézt do nemocnice na infekční oddělení. V sanitce upadla do bezvědomí a lékaři konstatovali rozvrat metabolismu. Po deseti hodinách marné snahy o zachování základních životních funkcí Lucka zemřela.
- Takový průběh může bohužel někdy mít infekce způsobovaná velmi zákeřným pachatelem. Některé jeho kmeny jsou přítomny v krku zcela zdravých osob...

A tímto viníkem je...

- ... *Neisseria meningitidis* neboli meningokok
- Meningokok způsobuje meningitidy, ale i sepse a jiné závažné stavy; to vše se týká tzv. klonálních kmenů. Jiné kmeny jsou ale docela nevinné a udává se, že asi deset procent populace má meningokoka v krku
- Meningokok se přenáší těsným kontaktem. Invazivní infekci napomáhá narušení sliznice, např. i kouřením či předchozí virovou infekcí.
- Infekce propukne často tehdy, když je tělo oslabeno neúměrnou fyzickou námahou po předchozí inaktivitě

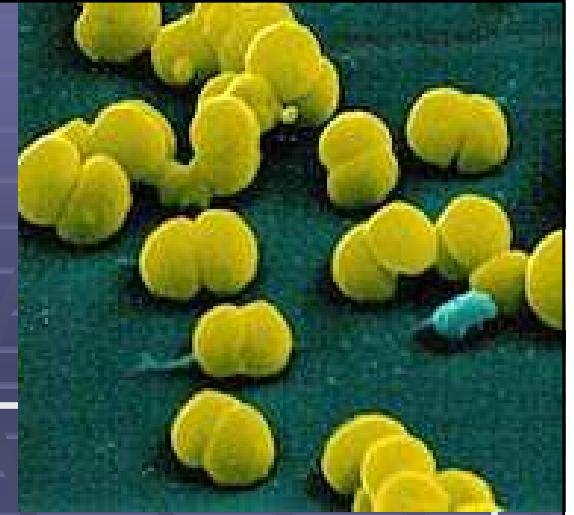


Meningokoková meningitida je celosvětově velmi závažná



„Meningitis belt“,
kde se hodně
vyskytuje
meningokoková
meningitis

Porovnejme neisserie:



	In vivo	In vitro
Gonokok	Nejchoulostivější, přenos jen sexuální	Nejchoulostivější, roste jen na čokoládovém agaru
Meningokok	Méně choulostivý, přenos na krátké vzdálenosti i kapénkami	Méně choulostivý, je-li krevní agar obohacen, může na něm růst
Tzv. „ústní“ neisserie	Nejméně choulostivé	Roste i na chudém krevním agaru

Fotografie z databáze zločinců



Ještě jeden zločinec: *Moraxella* (*Branhamella*) *catarrhalis*

Moraxely (dříve branhamely) se vyskytují v malém množství v krku i u zdravých osob. V čisté kultuře se však považují za původce různých infekcí dýchacích cest

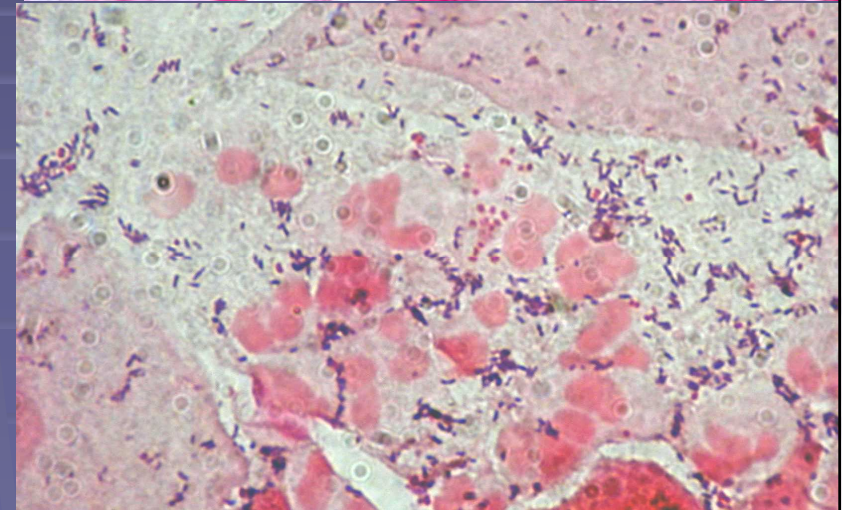
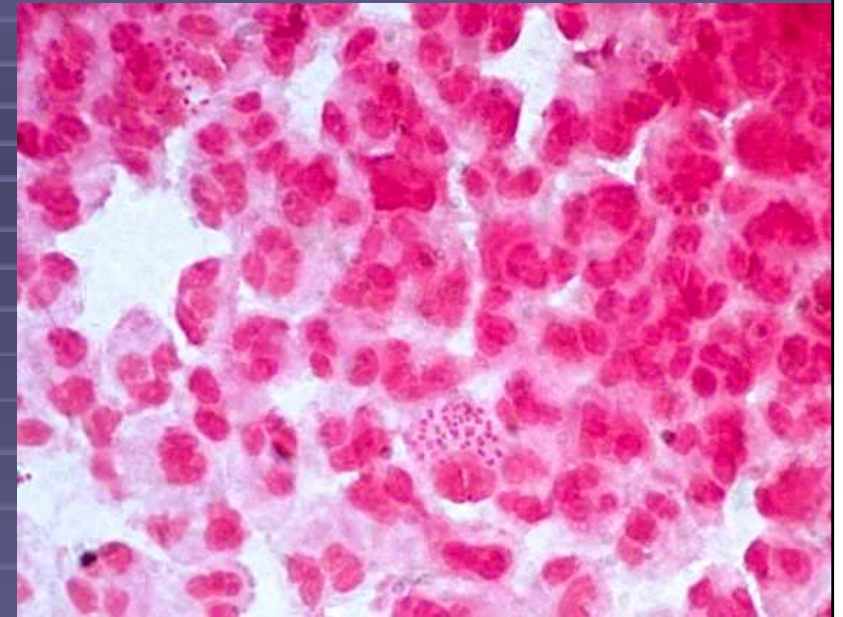


Neisserie – charakteristika

- Mikroskopie: G – diplokoky tvaru kávového zrna, často intrecelulárně lokalizované
- Kultivace: drobné, bezbarvé nebo nažloutlé (podle druhu) kolonie, rostoucí (podle druhu) na krevním či čokoládovém agaru
- Biochemie: kataláza pozitivní, oxidáza pozitivní, vzájemně biochemicky rozlišitelné
- Antigenní analýza: velký význam u meningokoka, seroskupina B není preventabilní očkováním!

Mikroskopie kapavky

- Všimněte si gramnegativních diplokoků tvaru kávového zrna, zejména intracelulárních. Intracelulární uložení je jejich typickou vlastností.



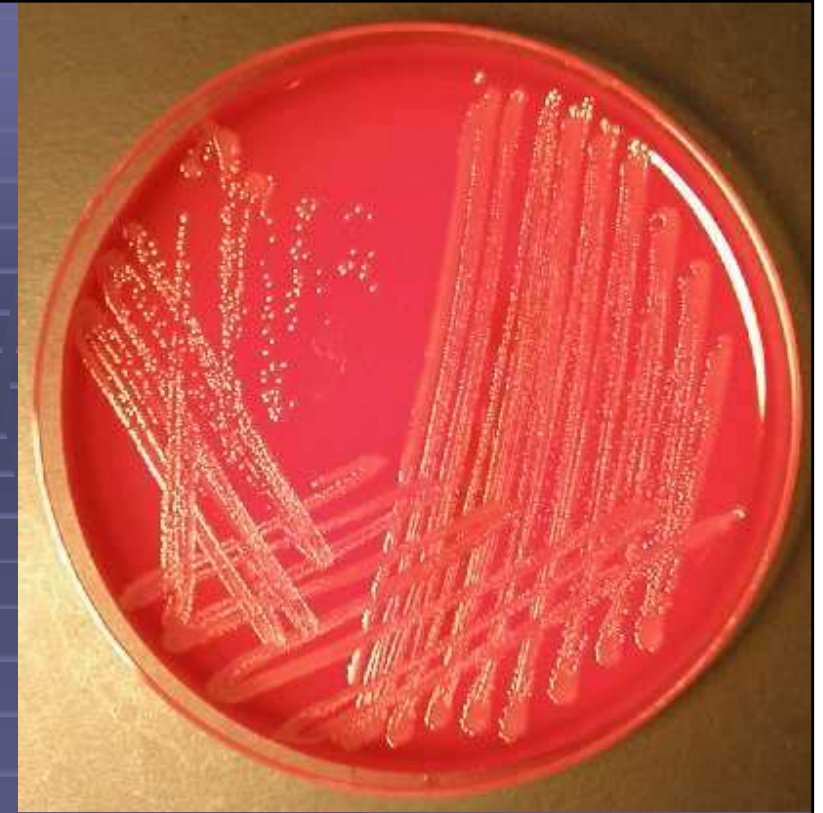
Poněkud se liší vzhled preparátů od muže a od ženy

leukocyt s gonokoky



Kultivace

- Popište kolonie gramnegativních koků na různých půdách, a hlavně si všimněte, jestli tam vůbec rostou.



Základní biochemické testy

- Rychlé testy s diagnostickými proužky velmi usnadňují diagnostiku
- Neisserie jsou oxidáza pozitivní, moraxely také, ale mohou mít opožděnou reakci.
- Moraxely se poznají podle pozitivního INAC testu
- U INAC testu se postupuje jako u oxidázy, ale proužek je nutno zvlhčit a je nutno pět minut počkat. Zbarvení je modrozelené.

Druhové určení neisserií

- K druhovému určení neisserií se používají biochemické testy různé provenience, u nás zpravidla NEISSERIAtest
- Poměrně málo biochemicky aktivní jsou obě patogenní neisserie: gonokok štěpí jen glukózu, meningokok jen glukózu a maltózu.

<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
Glucose and Maltose are oxidized to acids.	Only Glucose is oxidized to acid.
 <p><i>N. meningitidis</i></p> <p>C G M L S DNase β-Lac</p>	 <p><i>N. gonorrhoeae</i></p> <p>C G M L S DNase β-Lac</p>
Yol! Glucose and M altose for MC .	G lucose only for GC .



NEISSERIA 4H

CONT.	GLU	MAL	FRU	SAC	ONPG	TRI	PS
NEG.	+	+	-	-	-	-	24h
GGT	NO₃	NO₂	NO₂	1395			
+	-	(1)	-/23				

Testy antibiotické citlivosti

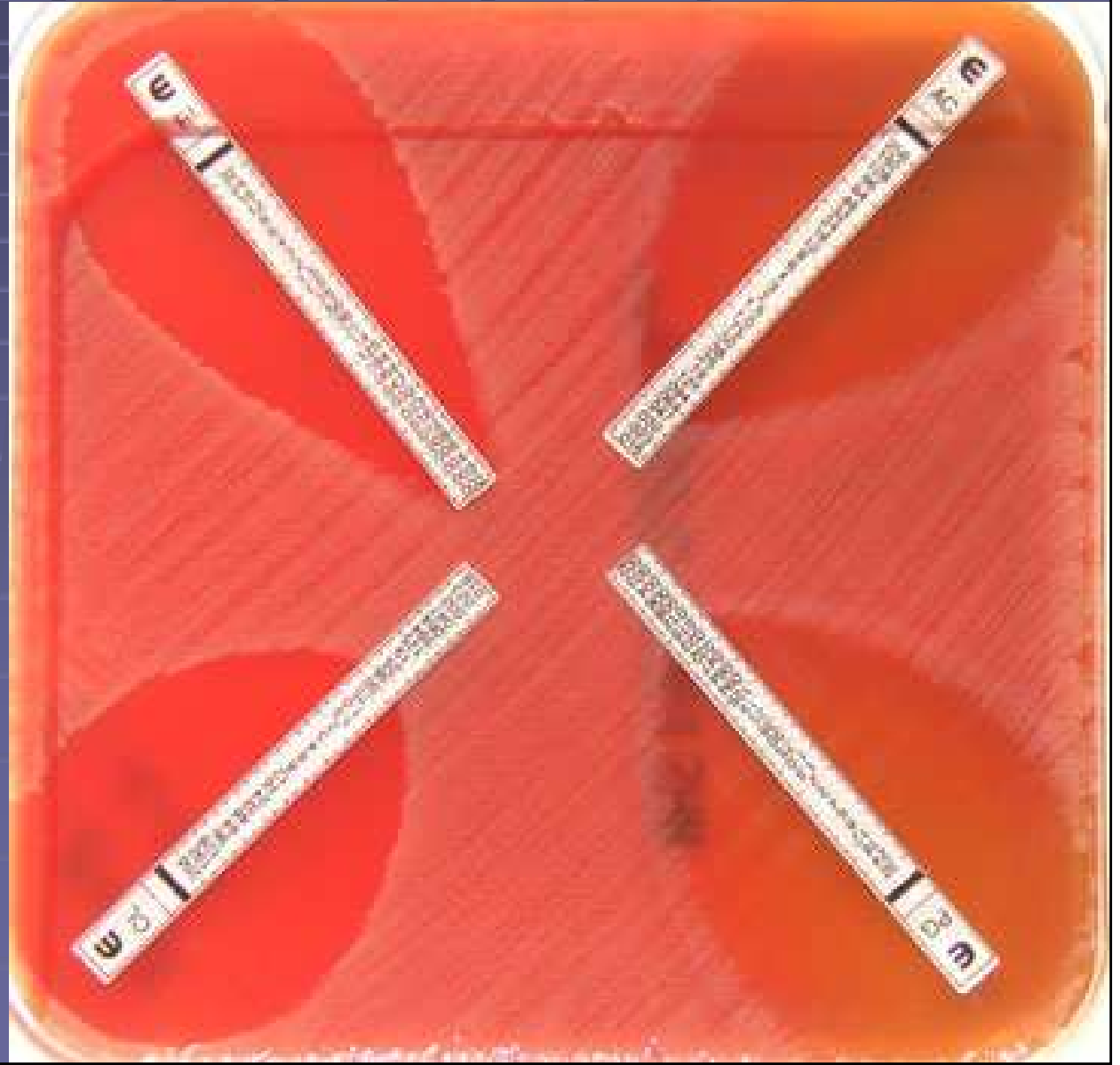
- Antibiotická citlivost se u patogenních neisserií určuje na půdách, na kterých jsou schopny růst, tj. nikoli na MH agaru
- Lékem volby u meningokoka je stále klasický penicilin. Ten se osvědčují i u gonokoka. Další možností jsou makrolidy, chinolony či ceftriaxon.

Antibiotika užívaná u meningokokových infekcí

Antibiotikum	Zkratka	Referenční zóna
Penicilin (základ. penicilin)	P	28 mm*
Chloramfenikol	C	18 mm
Azithromycin (makrolid)	AZM	12 mm
Doxycyklin (tetracyklin)	DO	19 mm
Ampicilin (aminopenicilin)	AMP	29 mm*
Ko-trimoxazol (směs)	SXT	16 mm

**avšak rozhodující je výsledek betalaktamového proužku*

Někde používají i E-test



Antigenní analýza

- Používá se jednak k přímému průkazu meningokoka (i jiných patogenů) ve vzorku mozkomíšního moku, jednak k analýze již vypěstovaného kmene



8. Ostatní

- Existuje ještě spousta většinou kultivačně náročných gramnegativních tyčinek, jejich význam však není velký. Zmiňme aspoň
- *Gardnerella vaginalis* se podílí na nehnisavých tzv. poševních vaginózách. Pěstuje se na speciálním typu krevního agaru, kde dělá typickou hemolýzu. Mikroskopicky je to gramlabilní pleomorfní kokobacil.
- *Spirillum minus* je původce horečky sodoku
- *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, původce infekcí připomínajících aktinomykózu a někdy ji i doprovázející
- Rody *Eikenella*, *Kingella*, *Cardiobacterium* a některé další jsou vzácní původci infekcí

Děkuji za pozornost

