

P04

**Diagnostika enterobakterií a
bakteriálních původců
gastrointestinálních infekcí**

Osnova

- čeled' *Enterobacteriaceae*
- rod *Campylobacter*, rod *Helicobacter*
- čeled' *Vibrionaceae*
- úkoly

Čeľed' *Enterobacteriaceae*

- G- tyčky, většinou pohyblivé (kromě shigel, klebsiel a *Y. pestis*),
- OXI- (KAT+), biochemicky značně aktivní
- komezálové, saprofyté, patogeny střevní i mimostřevní (obligátní i oportunní patogeny)
- klinicky nejdůležitější čeľed' G- tyček

Čeľed' *Enterobacteriaceae*: patogeny

- spôsobujúci **celkové (systémové) infekcie**:
 - ***Yersinia pestis*** (mor)
 - **antropopatogenní serovary salmonel** (sérovary Typhi, Paratyphi A, B a C – břišní tyfus)
- obligátní patogeny spôsobujúci zpravidla **střevní infekcie**:
 - **zoopatogenní serovary salmonel** (sérovary Enteritidis, Typhimurium – salmonelózy)
 - **shigely, *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis***
- **podmíněně patogenní** enterobakterie:
 - rody *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Serratia*, *Enterobacter*, ...

Yersinia pestis

- **původce moru**
- přenašeč: **blecha morová** (*Xenopsylla cheopsis*)
- zdroj: krysy, potkani a jiní hlodavci
- formy onemocnění:
 - dýmějový (bubonický) mor
 - plicní forma
 - septická forma



Dýmějový (bubonický) mor



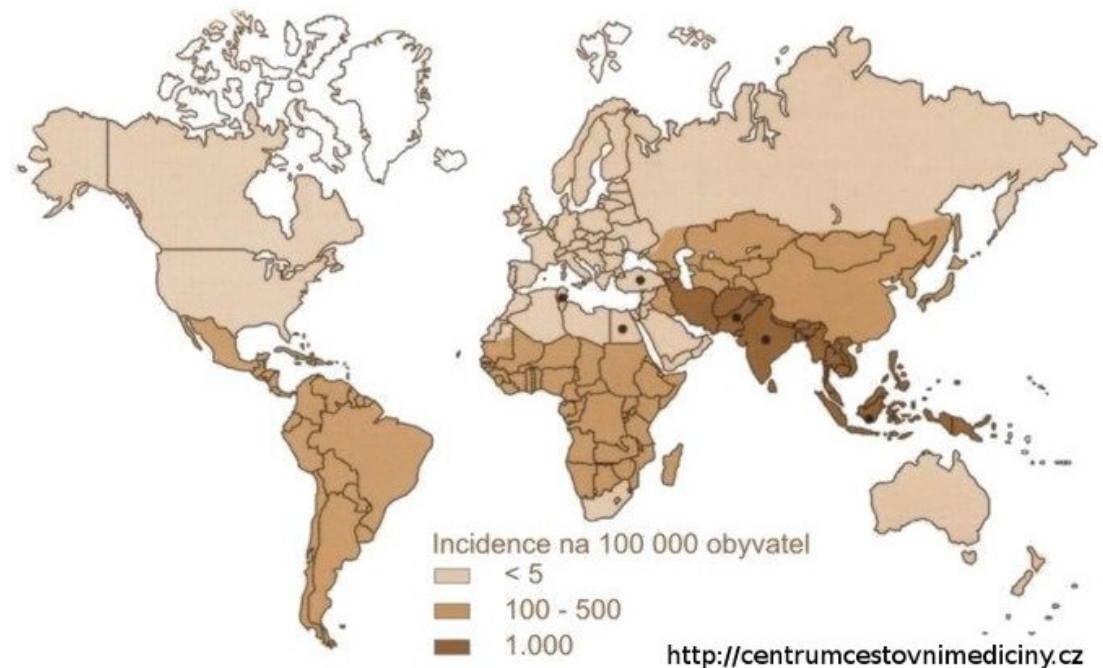
bubon (zvětšená uzlina) v podpaží



hemoragie a srážení krve →
odtud označení černá smrt

Antropopatogenní salmonely

- *S. enterica* spp. *enterica* sérovary **Typhi** a **Paratyphi**
- septická onemocnění **břišní tyfus/paratyfus**
- vstupní branou je trávicí trakt (kontaminovaná voda) → inkubační doba 10–14 dní → primární bakteriémie, vysoké teploty, silné bolesti hlavy
- **S. Typhi**
 - antigeny O: **9, 12**
 - antigeny H: **d**
 - antigeny pouzdra: **Vi**
- Widalova reakce (aglutinace)



Zoopatogenní salmonely

- *S. enterica* spp. *enterica* sérovary **Enteritidis**, **Typhimurium**, aj.
- fekálně-orální přenos – kontaminované potraviny (zejména **vejce**, syrové drůbeží a vepřové maso)
- **salmonelózy** (průjmy bez krve, horečka, zvracení, u oslabených jedinců možná sepse)
- **vysoká infekční dávka** (cca 10^5 - 10^8 bakterií) = nutnost pomnožit se v nějaké potravíně
- **S. Enteritidis**
 - antigeny O: **1, 9, 12**
 - antigeny H: **g, m**

Rod *Shigella*

- *Shigella dysenteriae*, *S. flexneri*, ...
- fekálně-orální přenos, typická nemoc „špinavých rukou“, možný i alimentární přenos (voda, mléko, ...)
- **shigelóza = bacilární úplavice/dysenterie** (průjmy s krví a hlenem, horečka, křeče v břiše, zvracení)
- **nízká infekční dávka** (cca 10^2 bakterií)

Escherichia coli

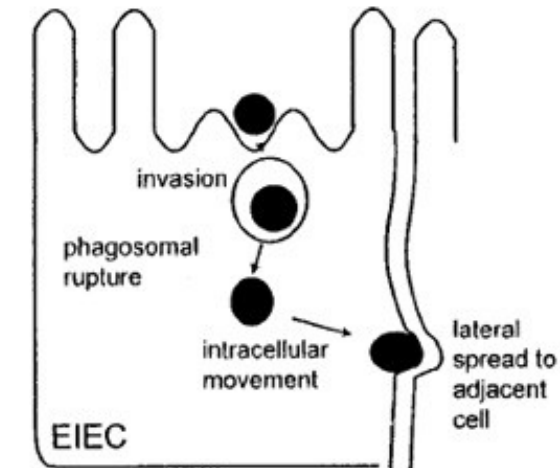
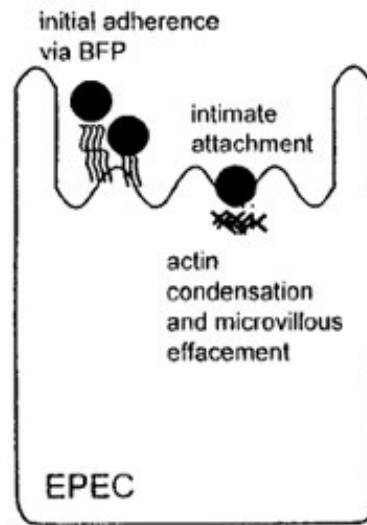
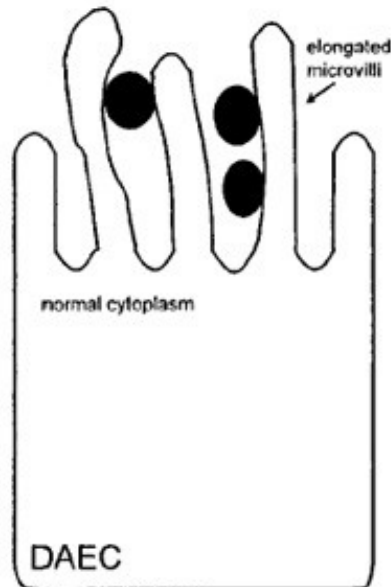
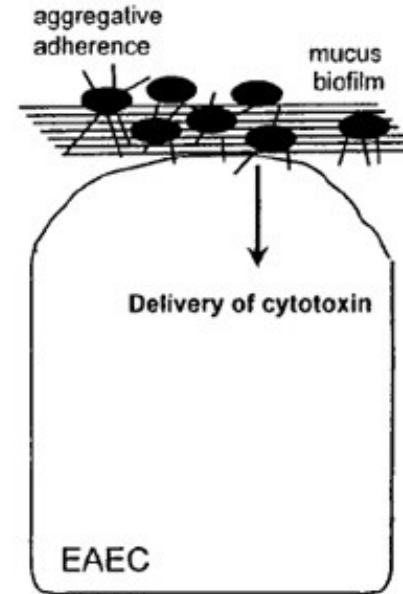
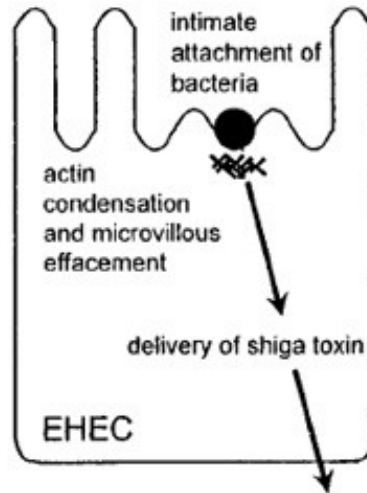
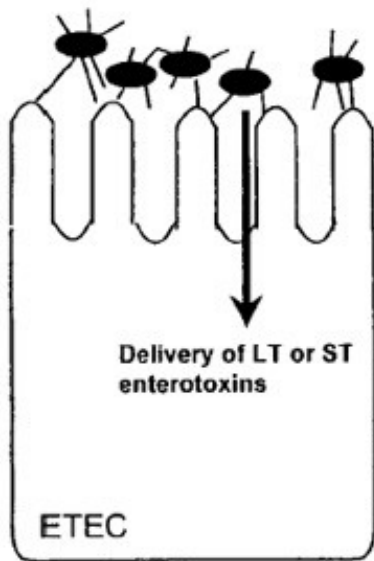
- důležitá součást střevní mikroflóry (produkce kolicinů a mikrocinů), omezuje kolonizaci střeva jinými bakteriemi
- patogeny ve střevě:
 - **EPEC** (enteropatogenní EC) – novorozenecké průjmy
 - **ETEC** (enterotoxigenní EC) – průjmy (cestovatelské)
 - **EIEC** (enteroinvazivní EC) – krvavé průjmy
 - **EHEC** = **STEC** (enterohemoragické, shiga-like toxigenní EC) – **hemolyticko-uremický syndrom** (průjem, zvracení, horečka, následuje anémie, petechie, ... až selhání ledvin a neurologické příznaky)
 - zejména **sérotyp O157:H7** (dále **O26**, O55, O111)
 - **nízká infekční dávka** (< 50 bakterií)

Escherichia coli (2)

- patogeny ve střevě:
 - **EAEC** (enteroagregativní EC) – cestovatelské průjmy
 - **DAEC** (difúzně-adherentní EC) – cestovatelské vodnaté průjmy se zvracením
- patogeny mimo střevo:
 - **UPEC** (uropatogenní EC)
 - kmeny způsobující respirační infekce, sepse, infekce ran, novorozenecké meningitidy...
- epidemie v Německu 2011 (EAEC **O104:H4**, která získala geny pro shiga toxin od STEC horizontálním přenosem)

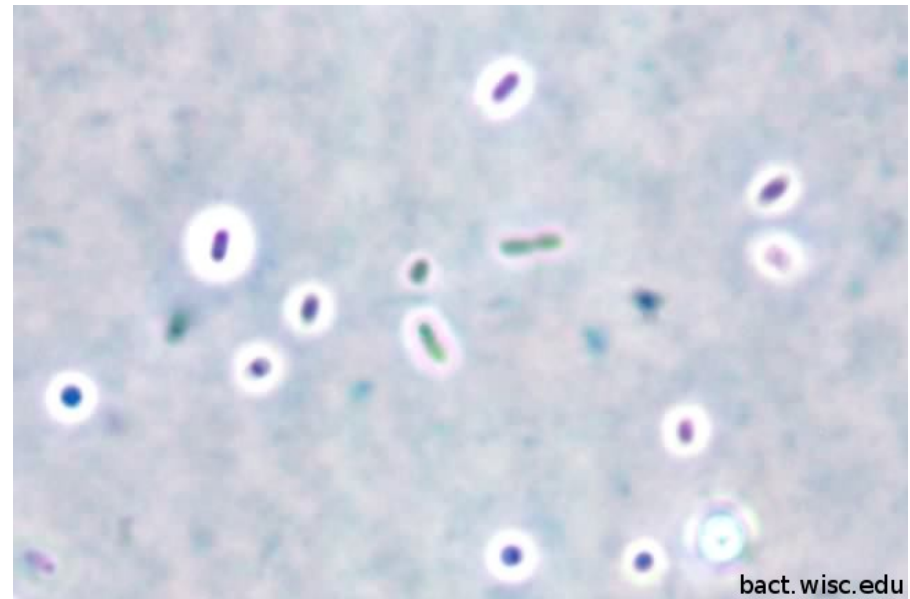
Escherichia coli (3)

microbewiki.kenyon.edu



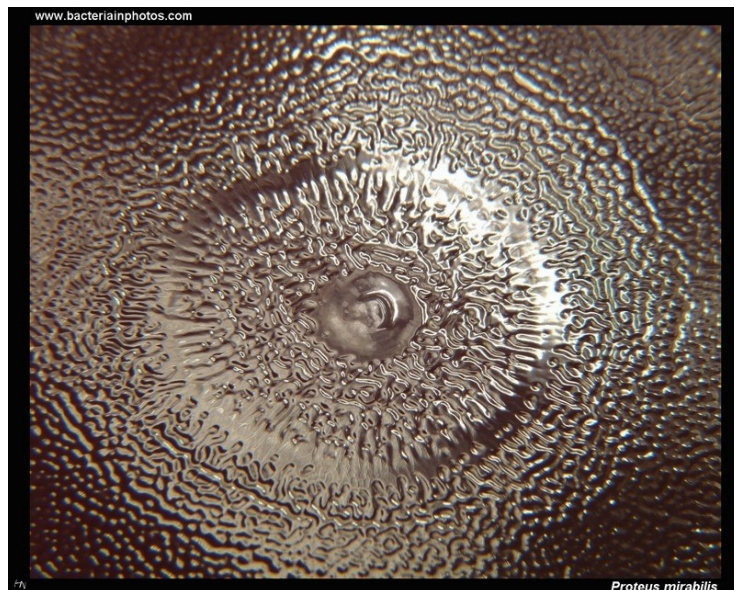
Rod *Klebsiella*

- opouzdřené bakterie
- ***Klebsiella pneumoniae***, *K. oxytoca*, *K. ozaenae*
- **nozokomiální patogeny**
 - infekce močových cest
 - pneumonie, sepse



Rod *Proteus*

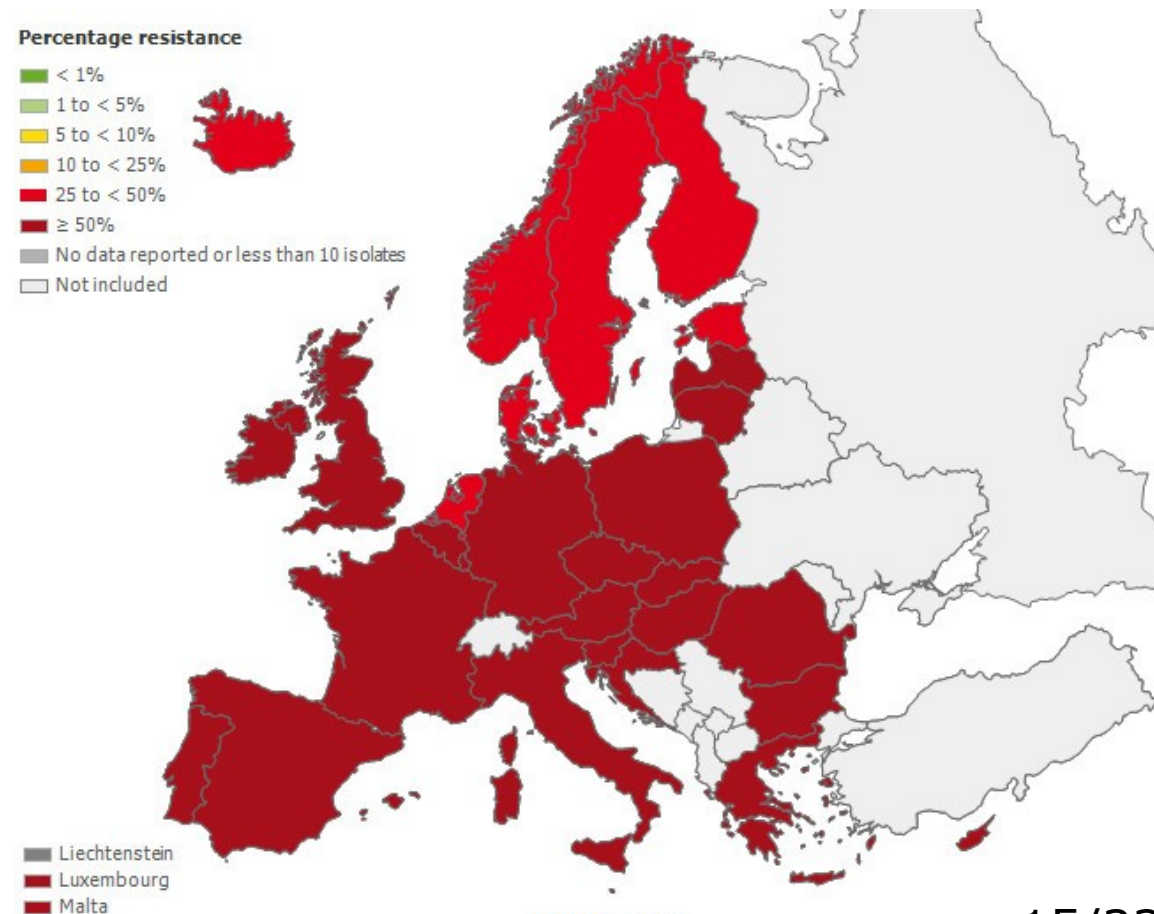
- *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*
- **původci močových infekcí**
- typický je **plazivý růst** (tj. neroste jen v místě inokulace, ale šíří se po povrchu agaru do stran), tzv. Raussův fenomén či fenomén příbojové vlny



Multirezistentní enterobakterie

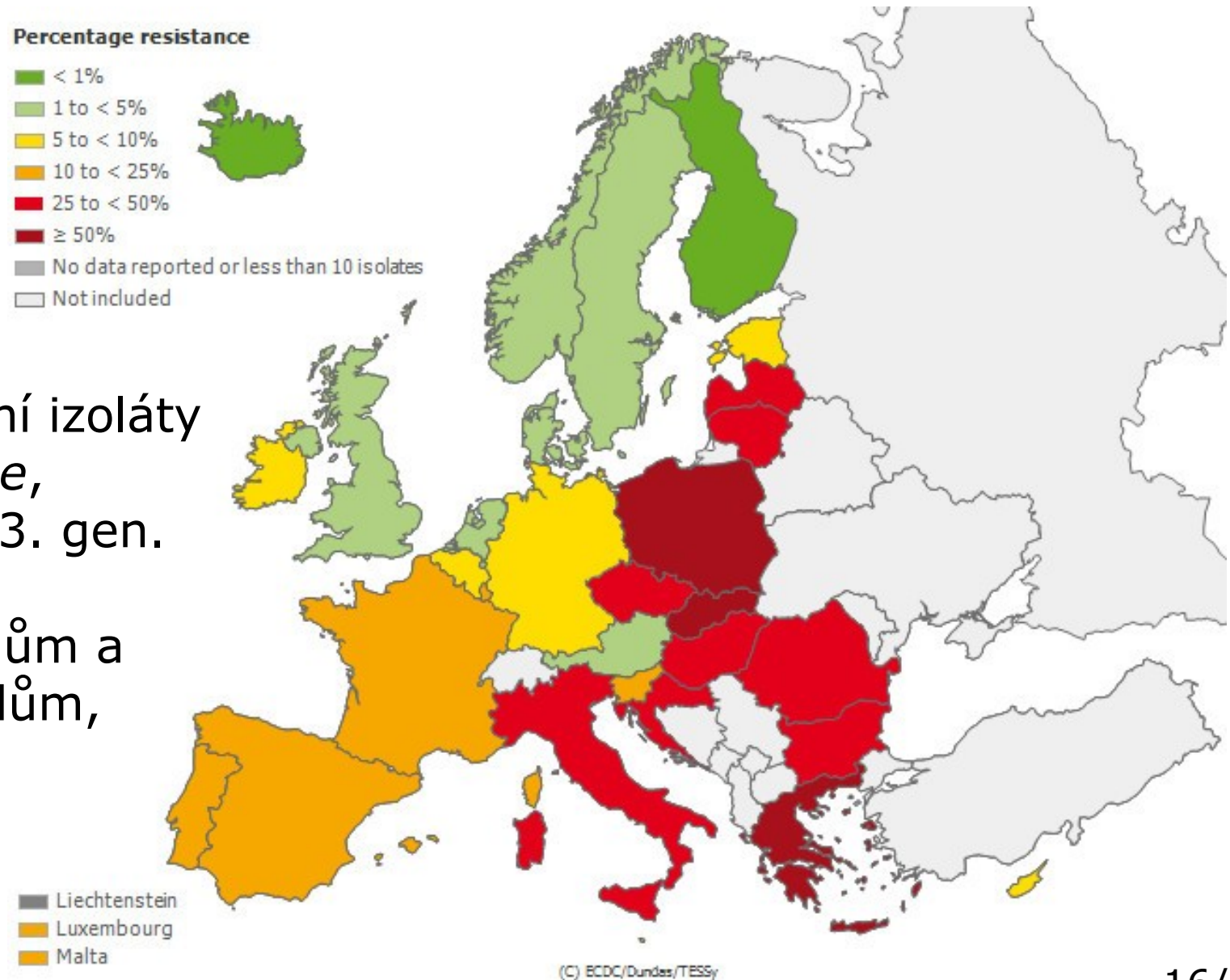
- rezistence na větší množství antibiotik
- častí producenti širokospektrých betalaktamáz typu ESBL popř. ampC

Izoláty *E. coli*
rezistentní
k aminopenicilinům,
rok 2013



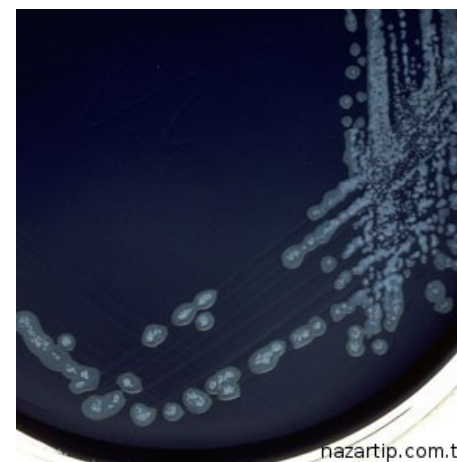
Multirezistentní enterobakterie (2)

Multirezistentní izoláty *K. pneumoniae*, rezistence ke 3. gen. cefalosporinů, fluorochinolonům a aminoglykosidům, rok 2013



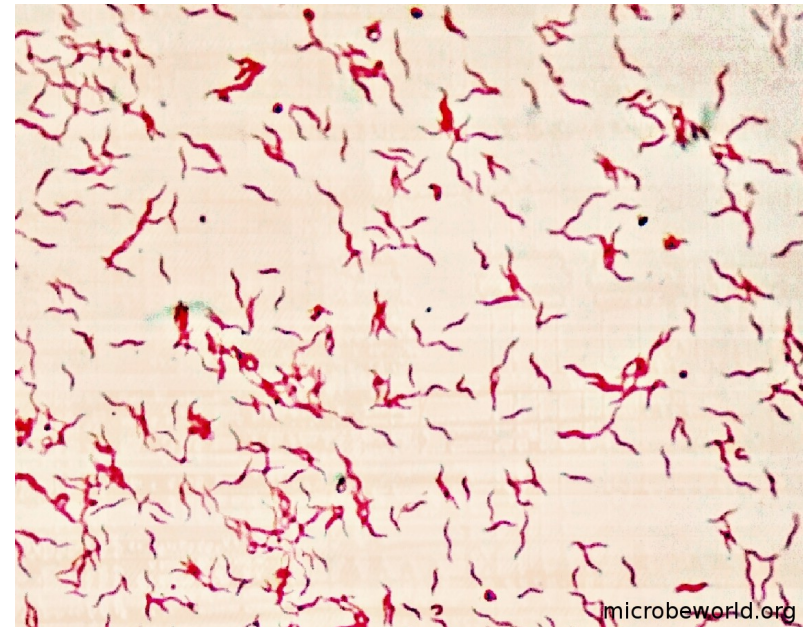
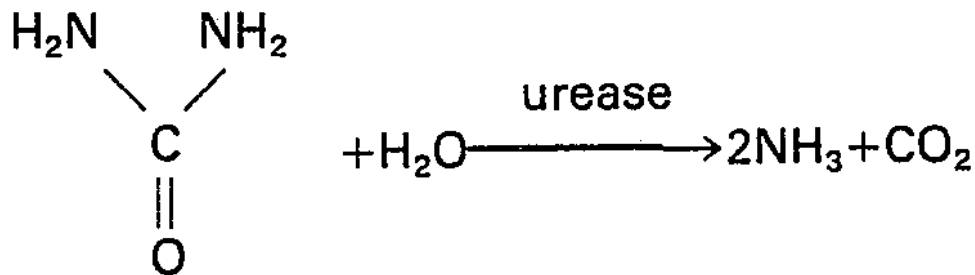
Campylobacter jejuni

- G- zahnutá tyčka (nepatří mezi enterobakterie), OXI+
- **kampylobakteriόza** - průběh a závažnost onemocnění srovnatelná se salmonelózou (nebývá zvracení)
- fekálně-orální přenos – kontaminované potraviny (zejména **drůbeží maso**)
- **speciální kultivace** (viz úkol č. 7):
 - černá „půda pro kampylobaktery“ (CCDA - charcoal-cefoperazone-deoxycholate agar); neroste na KA a ENDO
 - teplota 42 °C
 - zvýšená tenze CO₂
 - prodloužená kultivace na 48 hodin



Helicobacter pylori

- G- zahnutá (spirálovitá) tyčka (nepatří mezi enterobakterie)
- v žaludku → mohutnou **ureázovou aktivitou** si upravuje mikroprostředí (využití pro dg.)
- podíl na vzniku **gastroduodenálních vředů**
- speciální půda (kultivace 5 dní)



Čeľed': *Vibrionaceae*

- G- krátké zakřivené tyčky, pohyblivé, OXI+
- ve vodě v teplých oblastech
- ***Vibrio cholerae* – cholera** (těžké průjmové onemocnění, zvracení), **sérotypy O1 a O139**
- halofilní vibria:
 - *V. parahaemolyticus* (gastroenteritis, krvavé průjmy)
 - *V. vulnificus* (infekce ran, sepse)



Diferenciální diagnostika

- **Gramovo barvení** pro odlišení G- tyček
- **ENDO:** z klinicky významných rostou enterobakterie, *Vibrionaceae* a G- nefermentující tyčky (GNFB; praktikum P06)
- **Hajnova půda** pro odlišení GNFB (vše negativní)
- **Oxidáza** pro odlišení vibrií (pozor, některé GNFB mohou mít také pozitivní oxidázu; rod *Plesiomonas* má také pozitivní oxidázu, ačkoliv patří do čeledi *Enterobacteriaceae*)

Rozlišení enterobakterií

- ENDO: možné **orientační rozlišení** obligátních patogenů (většinou L-) a potenciálních patogenů (většinou L+)
- další půdy:
 - **XLD** (**salmonely černé**, **shigely růžové**, ostatní enterobakterie žluté, G+ bakterie jsou inhibovány)
 - **MAL**, Deoxycholát-citrátový (DC) agar (obě půdy podobné XLD, určené pro enterobakterie)
 - **CIN** pro yersinie
- **biochemické testy** (Hajna, MIU, ENTEROtesty aj.)
- **antigenní analýza** (zpravidla sklíčková aglutinace)

Úkol 1: Mikroskopie kmenů

- **obarvěte podle Grama sedm kmenů** (kromě kmenu N, ten je pro Vás již obarven)
- jeden z kmenů bude G+, výsledek si poznamenejte, dále už s ním ale nebudeme pracovat

Úkol 2: Kultivace na KA a ENDO

- popište **kolonie na KA a ENDO**
- na KA můžete vidět hemolýzu, není ale důležitá pro diagnostiku
- nezapomeňte že **L+ kmeny mají** nejen **červené** (též růžovočervené nebo kovový lesk) **kolonie, ale i okolní půdu** (jinak je to jen pigment)
- kmeny, které **nerostou ani na jedné z půd** a morfologicky se jeví jako **zahnuté** mohou být **kampylobakter**
 - tyčky, které nejsou zahnuté budou probírány až v dalším z praktik

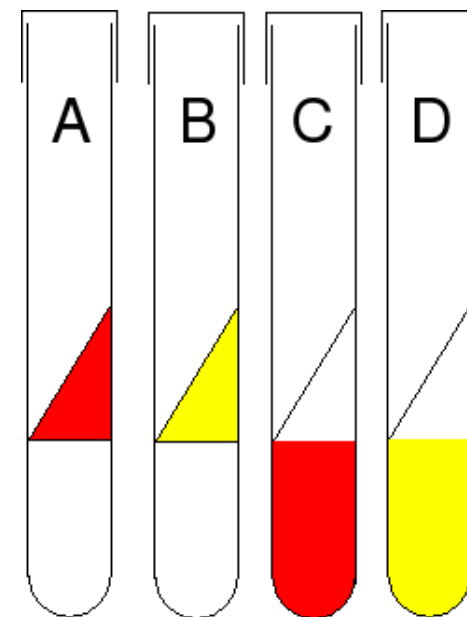
Úkol 3: Skupinová dg. G- tyček rostoucích na ENDO

- **úkol 3a: Hajna** – pátráme po **GNFB**, **biochemicky neaktivním kmenu** (tj. **celá půda je červená**), pokud je půda žlutá, tvoří kmen fermentuje Glc nebo Lac, pokud je černá, pak kmen tvoří sirovodík
- **úkol 3b: Oxidáza** – pro odlišení **vibrií (OXI+)** a enterobakterií (OXI-), GNFB mohou být OXI+ i OXI-

Úkol 3: Skupinová dg. G- tyček rostoucích na ENDO - HAJNA

- **Hajnova půda** (Kligler's Iron Agar, KIA)

- štěpení laktózy (A = NEG, B = POZ)
- štěpení glukózy (C = NEG, D = POZ)
- produkce H_2S (POZ = zčernání půdy)
- tvorba plynu (POZ = potrhaná půda, bublinky, půda vysunutá nahoru)



fr.wikipedia.org

- očkování vpichem a tzv. hádkem



Úkol 4: Další kultivační a biochemické testy

- **úkol 4a: popište kmeny na XLD** (salmonely mají bledé kolonie s černým středem) a dalších selektivních půdách



- **úkol 4b: ENTEROtest 16 (17 reakcí: 1. je ONPG, 2. až 9. jsou v prvním řádku, 10. až 17. ve druhém řádku)**

Úkol 5: Antigenní analýza

- **úkol 5a: vyloučení EPEC** (sklíčková aglutinace se dvěma polyvalentními séry)
 - pro detekci 12 serovarů EPEC **nonavalentní sérum** (I, II, III) a **trivalentní sérum** (IV)
 - pokud je jedno z nich pozitivní, pokračujeme s příslušnými trivalentními resp. monovalentními séry
 - **neužívá se vždy**, obvykle však u obligátních patogenů (salmonely, shigely, yersinie) a u střevních izolátů *E. coli* při podezření na EPEC (děti do 3 let) nebo STEC
- **úkol 5b: určení sérovaru salmonely** (sklíčková aglutinace se dvěma séry, **obě musí být pozitivní;** **S. Enteritidis** pozitivní tělový antigen 9, bičíkový g, m)

Úkol 6: test citlivosti na ATB

- **antibiotická citlivost se neurčuje u kmenů ze stolice**
(u bakteriálních průjmů podání ATB prodlužuje dobu vylučování patogenů ze střeva, doporučují se probiotika)
- **antibiotická citlivost se určuje u kmenů z moče**
 - spektrum testovaných ATB zahrnuje i léky používané při léčbě močových infekcí (např. nitrofurantoin)

Úkol 7: Dg. kamylobakterů

- **speciální kultivace:**
 - **černá „půda pro kamylobaktery“** (CCDA - charcoal-cefoperazone-deoxycholate agar);
neroste na KA a ENDO
 - teplota 42 °C
 - zvýšená tenze CO₂
 - prodloužená kultivace na 48 hodin
- **OXI+** (typicky opožděná pozitivita)



Úkol 8: Ureázový test v diagnostice helikobakterů

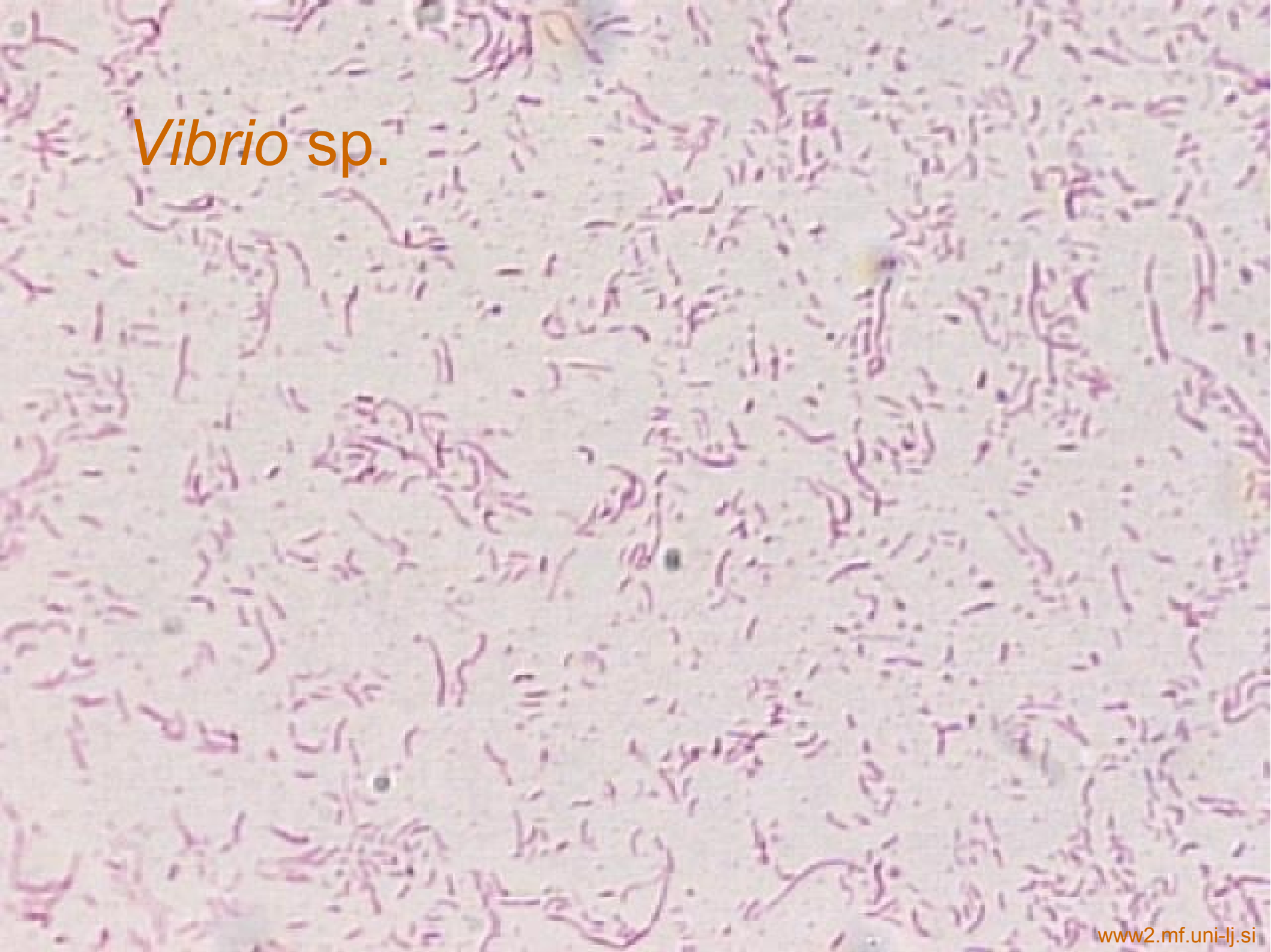
- helikobaktery nerostou na běžných půdách (mají speciální půdu, kultivace 5 dní)
- využívá se štěpení urey (ureázová aktivita je tak silná, že můžeme pracovat přímo s odebraným vzorkem (žaludeční tkáň))
- **POZ = červená**
- **NEG = žlutá**



Úkol 9: Dg. čeledi *Vibrionaceae*

- mikroskopicky zahnutá tyčka
- kultivace:
 - pomnožení v **alkalické peptonové vodě**
 - pevná půda **TCŽS** (thiosíran-citrát-žluč-sacharóza)
- pro biochemickou identifikaci můžeme použít sadu ENTEROtest 16, ale s jinou maticí
- antigenní analýza: **sérovary O1 a O139**
- další biochemické testování sérovaru O1 (**biovary Classic a El Tor**)

Vibrio sp.



Po tomto cvičení byste měli umět:

- správně použít dekontaminační metody (dezinfekce, vyšší stupeň dezinfekce, sterilizace) pro různé druhy materiálů a situací
- správně si mýt a dezinfikovat ruce
- popsat nejdůležitější zástupce čeledí *Enterobacteriaceae* a *Vibrionaceae* a rodů *Campylobacter* a *Helicobacter* vč. diagnostických postupů, které vedou k úspěšné identifikaci
- posoudit, kdy je vhodné využít antigenní analýzu
- jmenovat klinicky nejdůležitější sérovary salmonel, escherichií a vibrií