



# G- enterobakterie, bakteriální původci GIT infekcí

Lékařská mikrobiologie – cvičení  
Mikrobiologický ústav LF MU

# Obsah cvičení

---

- ▶ Čeď *Enterobacteriaceae*
- ▶ Rody *Campylobacter* a *Helicobacter*
- ▶ Čeď *Vibrionaceae*



# Čeľeď *Enterobacteriaceae*

---

- ▶ G- tyčinky, většinou pohyblivé (nepohyblivé jsou pouze shigelly, klebsiely a *Yersinia pestis*)
- ▶ Kataláza pozitivní, oxidáza negativní
- ▶ Vykazují značnou biochemickou aktivitu
- ▶ Běžní komenzálové, ale také patogeny obligátní i oportunní → klinicky vůbec nejdůležitější skupina G-tyčinek



# Patogeny čeledi *Enterobacteriaceae*

---

## ▶ Původci systémových infekcí:

- *Yersinia pestis* – původce moru
- Antropopatogenní sérovary salmonel – Typhi, Paratyphi A, B a C – původci břišního tyfu

## ▶ Původci střevních infekcí (obligátní patogeny):

- Zoopatogenní sérovary salmonel – Enteritidis, Typhimurium – původci salmonelóz
- Shigelly, *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis*

## ▶ Podmíněně patogenní enterobakterie:

- Rody *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Serratia*, *Enterobacter*
- 



# *Yersinia pestis*

---

- ▶ **Onemocnění:** mor – formy moru:
  - Dýmějový (bubonický) mor
  - Plicní forma moru
  - Septická forma moru
- ▶ **Přenašeč:** blecha morová (*Xenopsylla cheopis*)
- ▶ **Zdroj:** krysy, potkani a další hlodavci



# Dýmějový (bubonický) mor

---



bubon (zvětšená uzlina) v podpaží



hemoragie a srážení krve →  
odtud označení černá smrt

---



# Antropopatogenní salmonely

---

- ▶ *Salmonella enterica* spp. *enterica* sérovary **Typhi** a **Paratyphi**
  - ▶ **Onemocnění:** septická onemocnění břišní tyfus/paratyfus
  - ▶ **Přenos:** vstupní brána infekce = trávicí trakt (většinou kontaminovaná voda) → 10 až 14 dní inkubační doba → primární bakteriémie s vysokými teplotami a bolestmi hlavy.
  - ▶ *Salmonella* Typhi:
    - antigeny O (tělové): 9, 12
    - antigeny H (bičíkové): d
    - antigeny pozdra: Vi
- 
- ▶▶ **Widalova reakce** (aglutinace)

# Zoopatogenní salmonely

---

- ▶ *Salmonella enterica* spp. *enterica* sérovary Enteritidi, Typhimurium a další.
  - ▶ **Přenos:** fekálně-orální (kontaminované potraviny, především syrové či nedostatečně tepelně upravené kuřecí a vepřové maso, vejce)
  - ▶ **Onemocnění:** salmonelózy = průjmy bez krve, horečky, zvracení, u imunokompromitovaných až septické stavy.
  - ▶ Pro vyvolání onemocnění je nezbytná **vysoká infekční dávka** (cca  $10^5$  až  $10^8$  bakterií → nezbytné je tedy pomnožení v potravíně, nestačí se „dotknout špinavýma rukama“)
  - ▶ *Salmonella* Enteritidis:
    - antigeny O: 1, 9, 12
    - antigeny H: g, m
-



# Rod *Shigella*

---

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



# *Escherichia coli* (1)

---

- ▶ Důležitá součást střevní mikroflóry (produkce kolicinů a mikrocinů), omezuje kolonizaci střeva jinými bakteriemi. *E. coli* zásobuje dokonce tělo vitamíny (hlavně E a K).
  - ▶ **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) -→ **Onemocnění:** hemolyticko-uremický syndrom (průjem, zvracení, horečka, následuje anémie, petechie, ... až selhání ledvin a neurologické příznaky).
  - ▶ Zejména sérotyp O157:H7 (dále O26, O55, O111)
  - ▶ Nutná **nízká infekční dávka** (< 50 bakterií).
- 



# *Escherichia coli* (2)

---

## ▶ **Patogeny ve střevě:**

- **EAEC** (EAggEC, enteroagregativní EC) – cestovatelské průjmy
- **DAEC** (difúzně-adherentní EC) – cestovatelské vodnaté průjmy se zvracením

## ▶ **Patogeny mimo střevo:**

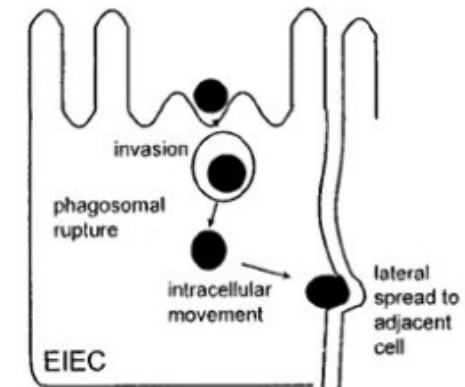
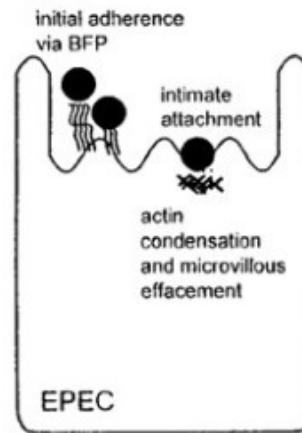
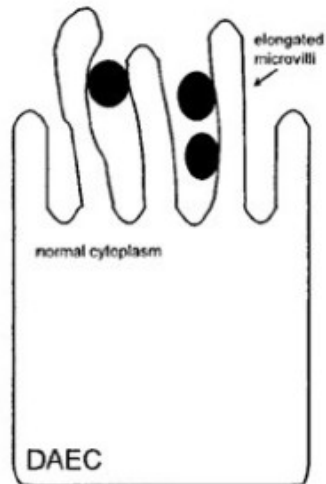
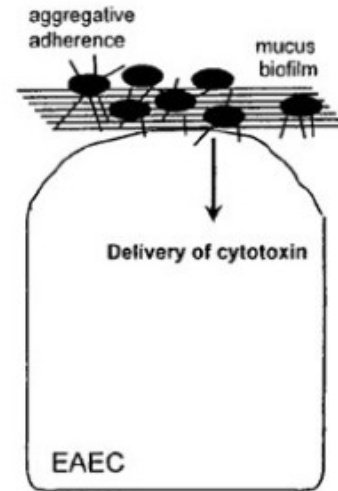
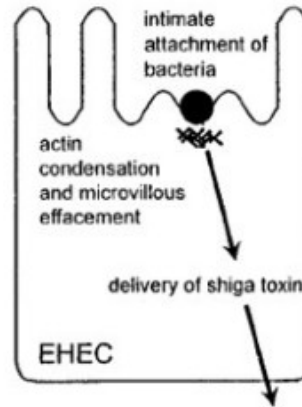
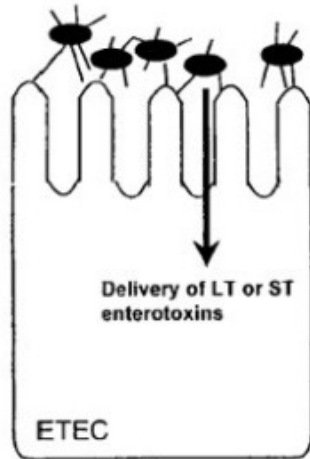
- **UPEC** (uropatogenní EC)
- kmeny způsobující respirační infekce, sepse, infekce ran, novorozenecké meningitidy...

- ▶ Epidemie v Německu 2011 (EAEC O104:H4, která získala geny pro shiga toxin od STEC horizontálním přenosem).



# Escherichia coli (3)

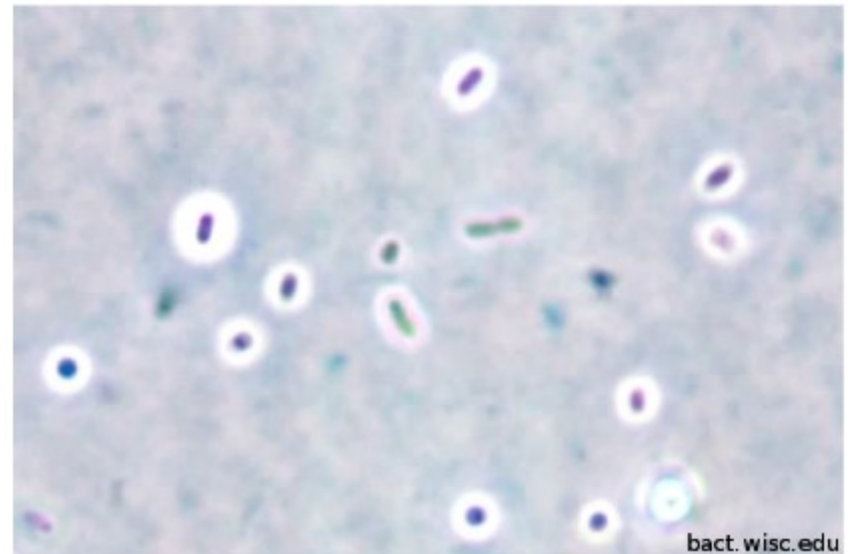
microbewiki.kenyon.edu



# Rod *Klebsiella*

---

- ▶ Bakterie s pouzdrém.
- ▶ *Klebsiella pneumoniae*, *K. oxytoca*, *K. ozaenae*
- ▶ Časté nozokomiální patogeny, způsobují infekce močových cest, pneumonie, *až sepsa*



# Rod *Proteus*

---

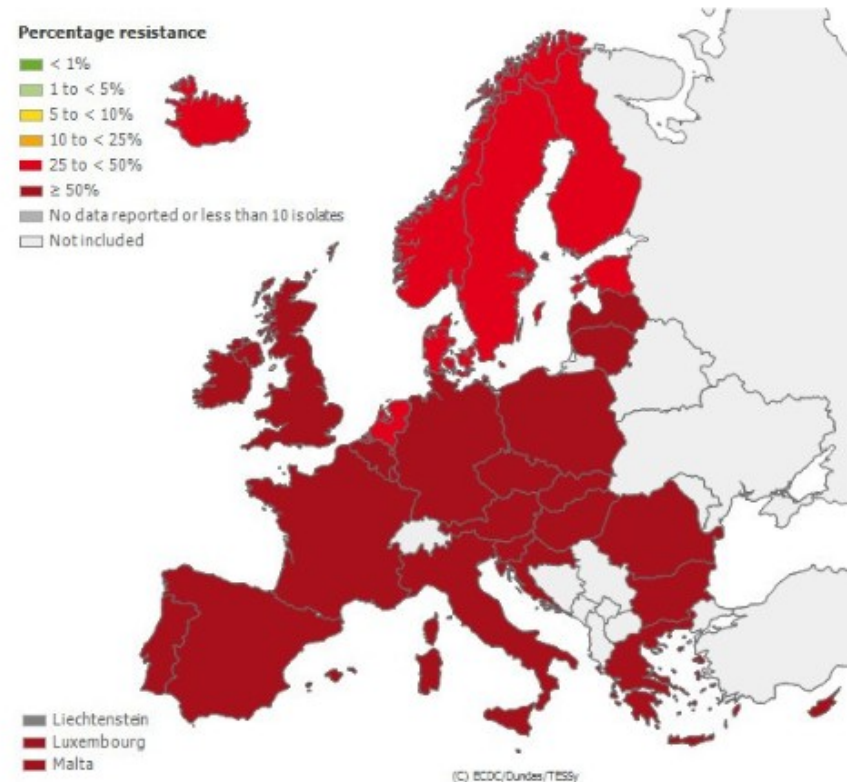
- ▶ *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*
- ▶ Původci močových infekcí
- ▶ Charakteristický je **plazivý růst** (neroste jen v místě inokulace, ale šíří se po povrchu agaru do stran), tzv. **Raussův fenomén** či **fenomén příbojové vlny**.



# Multirezistentní enterobakterie (1)

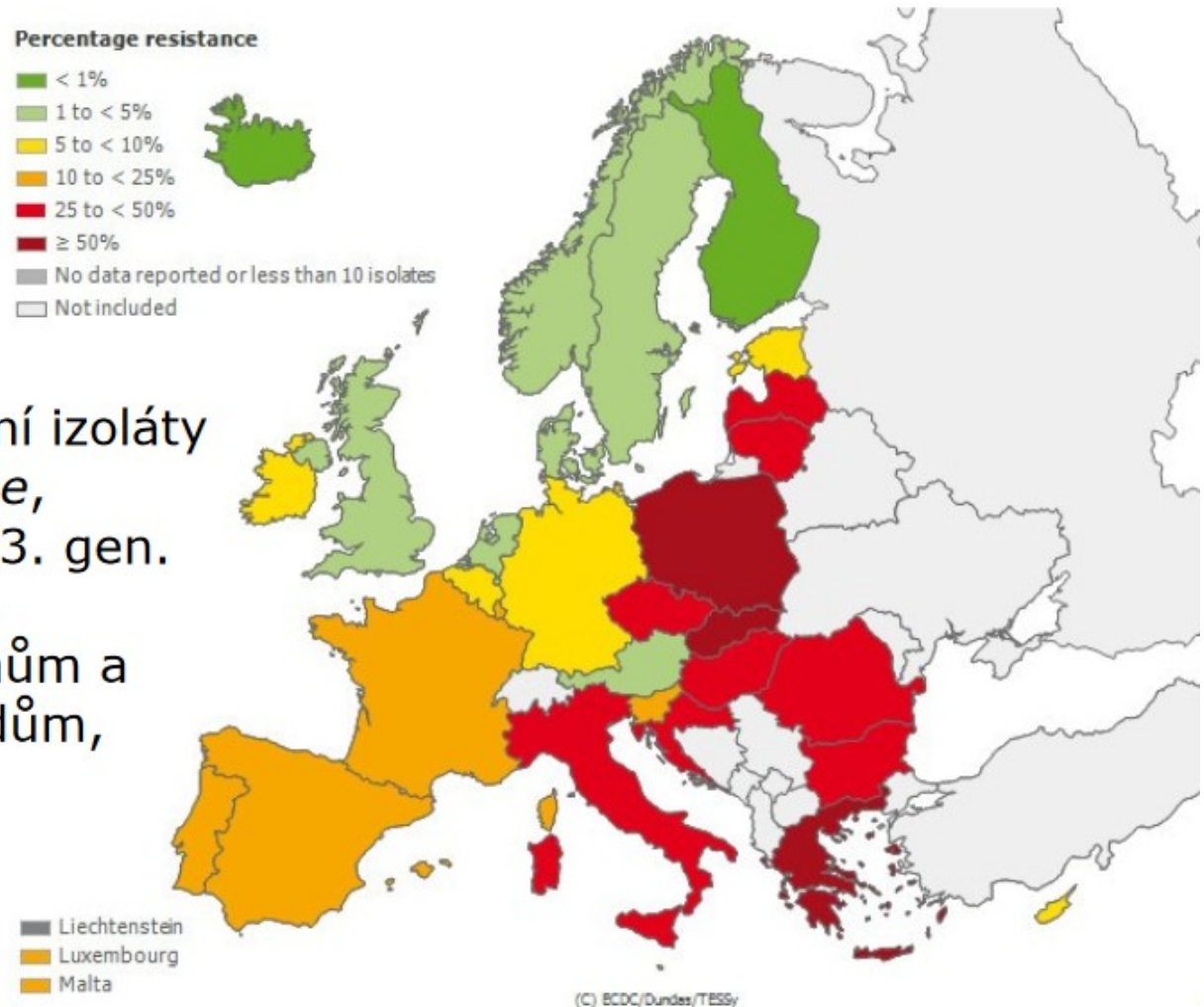
- ▶ Rezistence na větší množství antibiotik.
- ▶ Častí producenti širokospektrých betalaktamáz typu ESBL popř. ampC.

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



# Multirezistentní enterobakterie (1)

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





# *Campylobacter jejuni*

---

- ▶ Nepatří mezi enterobakterie.
  - ▶ G- zahnutá tyčinka, oxidáza pozitivní
  - ▶ **Onemocnění:** kampylobakterióza – průběh a závažnost onemocnění srovnatelná se salmonelózou (většinou bez zvracení)
  - ▶ **Přenos:** fekálně-orální (kontaminované potraviny – především drůbeží maso)
  - ▶ **Speciální typ kultivace** (úkol č.7):
    - černá „půda pro kampylobaktery“ (**CCDA – charcoal-cefoperazone-deoxycholate agar**)
    - neroste na KA a ENDO
    - teplota 42 °C
    - zvýšená tenze CO<sub>2</sub>
    - prodloužená kultivace po dobu 48 hodin
- 



# Odběr stolice v mikrobiologii

---

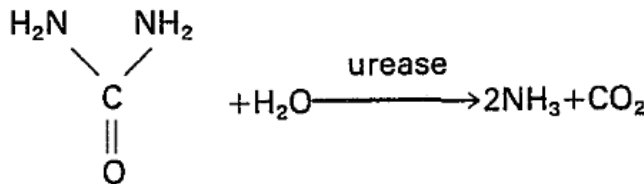
- ▶ **Parazitologie a virologie:** kusová stolice
- ▶ **Bakteriologie:** může být i kusová stolice, ale lepší je tampon zanořený do transportního média (nejlépe Amiesova půda)
- ▶ Pozn. odběrová nádobka na odběr stolice jako jediná nemusí být sterilní



# *Helicobacter pylori*

---

- ▶ Nepatří mezi enterobakterie.
- ▶ G- zahnutá (spirálovitá) tyčinka.
- ▶ V žaludku si mohutnou ureázovou aktivitou upravuje mikroprostředí (využití pro diagnostiku). Močovina je štěpena na oxid uhličitý, který vyprchá, a zásaditý čpavek → ten alkalizuje prostředí
- ▶ Podílí se na gastroduodenálních vředů.
- ▶ Kultivuje se na speciální půdě po dobu 5 dní.



# Čeď *Vibrionaceae*

---

- ▶ G- krátké zakřivené tyčinky, pohyblivé.
  - ▶ Oxidáza pozitivní.
  - ▶ **Výskyt:** ve vodě v teplých oblastech.
  - ▶ ***Vibrio cholerae*** – cholera (=těžké průjmové onemocnění, zvracení).
  - ▶ Sérotypy: O1, O139.
  - ▶ **Halofilní vibria:**
    - *Vibrio parahaemolyticus* (gastroenteritis, krvavé průjmy)
    - *Vibrio vulnificus* (infekce ran, sepse)
  - ▶ **Rod *Aeromonas*:** infekce ran (typicky při manipulaci s rybami a plody moře)
- 



# Diferenciální diagnostika

---

- ▶ **Gramovo barvení:** G- tyčinky
- ▶ **Endova půda:** z klinicky významných rostou enterobakterie, *Vibrionaceae* a G- nefermentující tyčky (=nefermentují glukózu, viz. 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

---

- ▶ **Endova půda:** možné orientační rozlišení obligátních patogenů (většinou laktóza negativní) a potenciálních patogenů (většinou laktóza pozitivní)
- ▶ **Další půdy:**
  - **XLD** (salmonely černé středy kolonií, shigely růžové, ostatní enterobakterie žluté, G+ bakterie jsou inhibovány)
  - **MAL, Deoxycholát-citrátový (DC) agar** (obě půdy podobné XLD, určené pro enterobakterie)
  - **CIN** pro yersinie (tmavě růžové drobné kolonie)
- ▶ **Biochemické testy** (Hajna, MIU, ENTEROtesty aj.)
- ▶ **Antigenní analýza** (zpravidla sklíčková aglutinace)



# Štěpení laktózy na Endově půdě

---



# Úkol č. 1 – Gramovo barvení

---

- ▶ Obarvěte podle Grama osm podezřelých kmenů (pro zopakování: natřít → nechat uschnout → fixovat plamenem → poté barvit: Gram 30 s → Lugol 20-30 s → **opláchnout vodou** → alkohol 15-20 s → opláchnout vodou → safranin 60 → opláchnout vodou → **osušit filtračním papírem (nedrhnout buničinou ani ničím jiným!)** → imerzní objektiv - olej)
- ▶ **Nebarvěte kmen N – již je pro Vás obarven.**
- ▶ Jeden z kmenů bude G+, výsledek si poznamenejte, dále už s ním ale nebudeme pracovat.





# Úkol č. 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 příštím cvičení.



# Úkol č. 3 – Diagnostika tyčinek rostoucích na ENDO

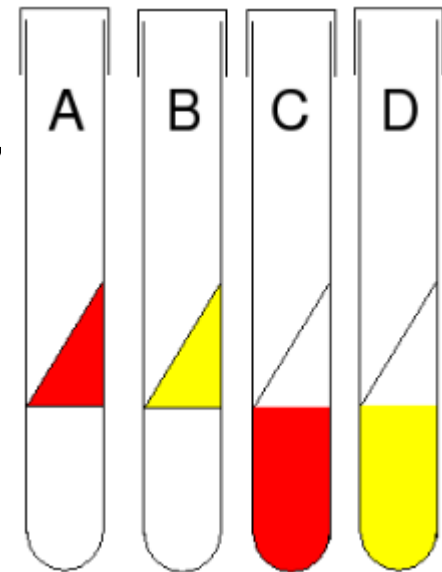
---

- ▶ **3a: Hajnova půda:** 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
- ▶ **3b: Oxidáza:** k odlišení vibrií (oxidáza pozitivní) a enterobakterií (oxidáza negativní). GNFB mohou být oxidáza pozitivní i negativní. Demonstračně na bočním stole!



# Úkol č. 3 – Diagnostika tyčinek rostoucích na ENDO – Hajnova půda

- ▶ Hajnova půda (Kligler's Iron Agar, KIA) – očkování vpichem a následně hádkem
  - štěpení laktózy (A = negativní, B = pozitiv)
  - štěpení glukózy (C = negativní, D = pozitiv)
  - produkce  $H_2S$  (pozitivní = zčernání půdy)
  - tvorba plynu (pozitivní = potrhaná půda, bublinky, půda vysunutá nahoru)



# Úkol č. 4 – Další kultivační a biochemické testy

---

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



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



# Úkol č. 5 – Antigenní analýza

---

- ▶ **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
- ▶ **5b: určení sérovaru salmonely** (sklíčková aglutinace se dvěma séry, obě musí být pozitivní; *Salmonella* Enteritidis pozitivní tělový antigen 9, bičíkový g, m)



# Úkol č. 6 – Testy 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).
- ▶ ATB citlivost se určuje u kmenů z moče – spektrum testovaných ATB zahrnuje i léky používané při léčbě močových infekcí (např. nitrofurantoin).



# Úkol č. 7 – Dg. kamylobakterů

---

## ▶ Speciální typ kultivace:

- černá „půda pro kamylobaktery“ (**CCDA – charcoal-cefoperazone-deoxycholate agar**)
- neroste na KA a ENDO
- teplota 42 °C
- zvýšená tenze CO<sub>2</sub>
- prodloužená kultivace po dobu 48 hodin



## ▶ Oxidáza pozitivní (typicky opožděná pozitivita)

---



# Úkol č. 8 – Ureázový test v dg. 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))
- ▶ Pozitivní = červená
- ▶ Negativní = žlutá



clsdiagnostics.com

- ▶ Provedení: pacientovi se podá těžkým izotopem uhlíku nebo radioaktivním izotopem uhlíku značený močovina → u zdravého jedince je vyloučena močovina stolicí, u pacienta s přítomností helikobaktera se štěpí močovina už v žaludku a značený CO<sub>2</sub> se projeví ve vydechaném vzduchu).



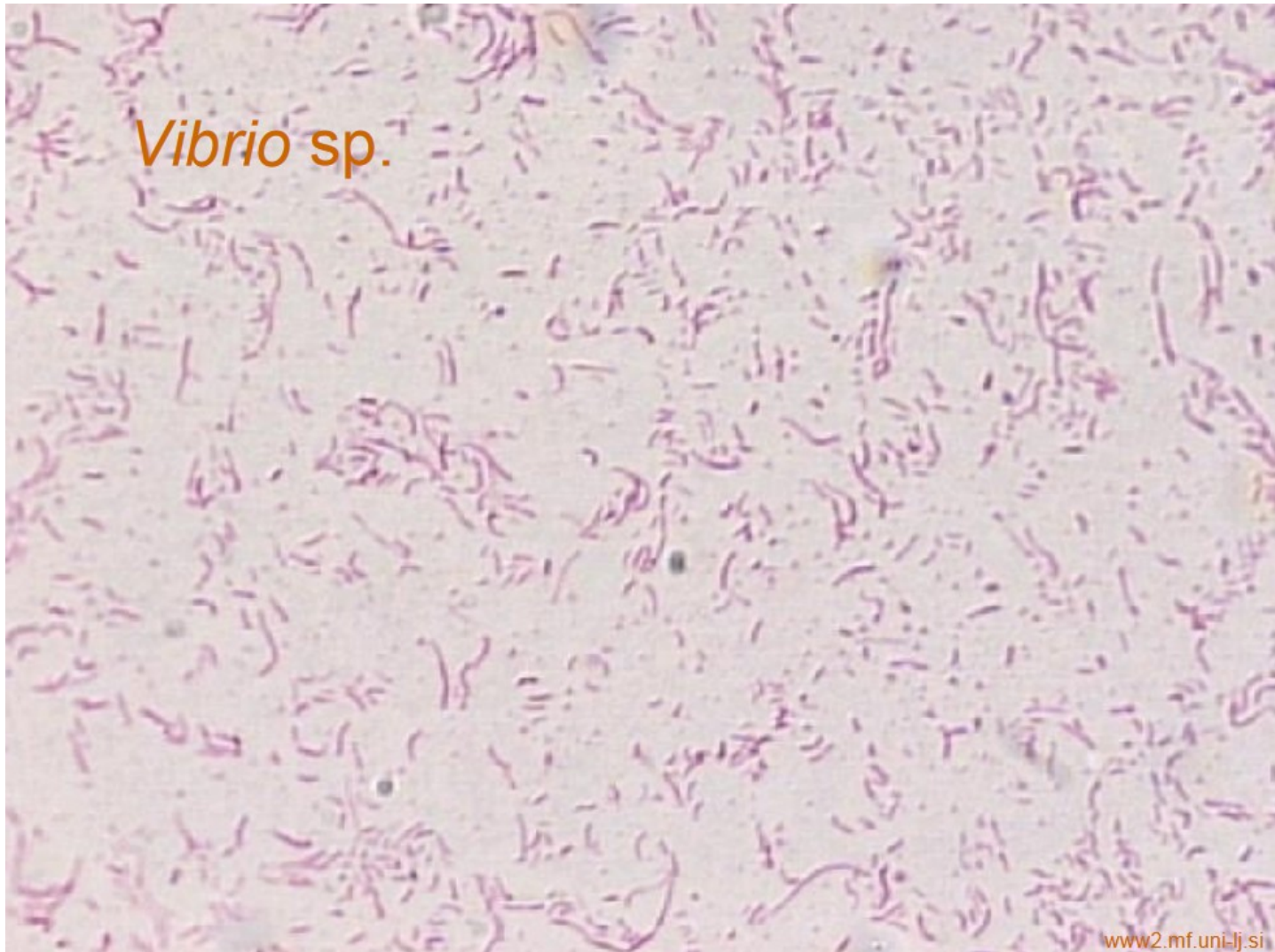
# Úkol č. 9 – Dg. Čeledi *Vibrionaceae*

---

- ▶ Mikroskopicky zahnutá tyčka
- ▶ **Kultivace:**
  - pomnoží se v alkalické peptonové vodě
  - pevná půda: TCŽS (thiosíran-citrát-žluč-sacharóza)
- ▶ **Biochemická identifikace:** sada ENTEROtest 16, ale s jinou maticí-
- ▶ **Antigenní analýza:** sérovary O1 a O139
- ▶ Další biochemické testování sérovaru O1 (biovary Classic a El Tor)



# Úkol č. 9 – Dg. Čeledi *Vibrionaceae*



# Po tomto cvičení byste měli znát:

---

- ▶ Popsat nejdůležitější zástupce čeledí *Enterobacteriaceae* a *Vibrionaceae* a rodů *Campylobacter* a *Helicobacter* včetně diagnostických postupů, které vedou k úspěšné identifikaci.
- ▶ Jmenovat klinicky nejdůležitější sérovary salmonel, escherichií a vibrií.

