P04

Diagnostika enterobakterií a bakteriálních původců gastrointestinálních infekcí

Osnova

- čeleď *Enterobacteriaceae*
- rod *Campylobacter,* rod *Helicobacter*
- čeleď *Vibrionaceae*
- úkoly

Čeleď *Enterobacteriaceae*

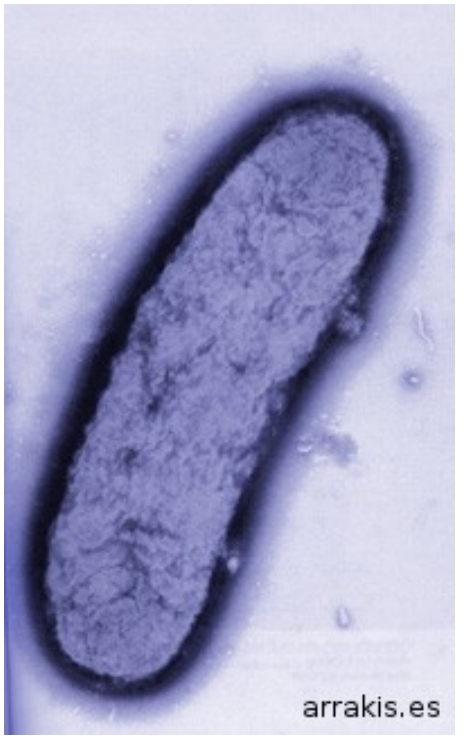
- **G- tyčky**, **většinou pohyblivé** (kromě shigel, klebsiel a *Y. pestis*),
- **OXI-** (KAT+), **biochemicky značně aktivní**
- komenzálové, saprofyté, patogeny střevní i mimostřevní (obligátní i oportunní patogeny)
- **klinicky nejdůležitější čeleď G- tyček**

Čeleď *Enterobacteriaceae:* patogeny

- způsobující **celkové (systémové) infekce**:
  - ***Yersinia pestis*** (mor)
  - **antropopatogenní serovary salmonel** (sérovary Typhi, Paratyphi A, B a C – břišní tyfus)
- obligátní patogeny způsobující zpravidla **střevní infekce**:
  - **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**



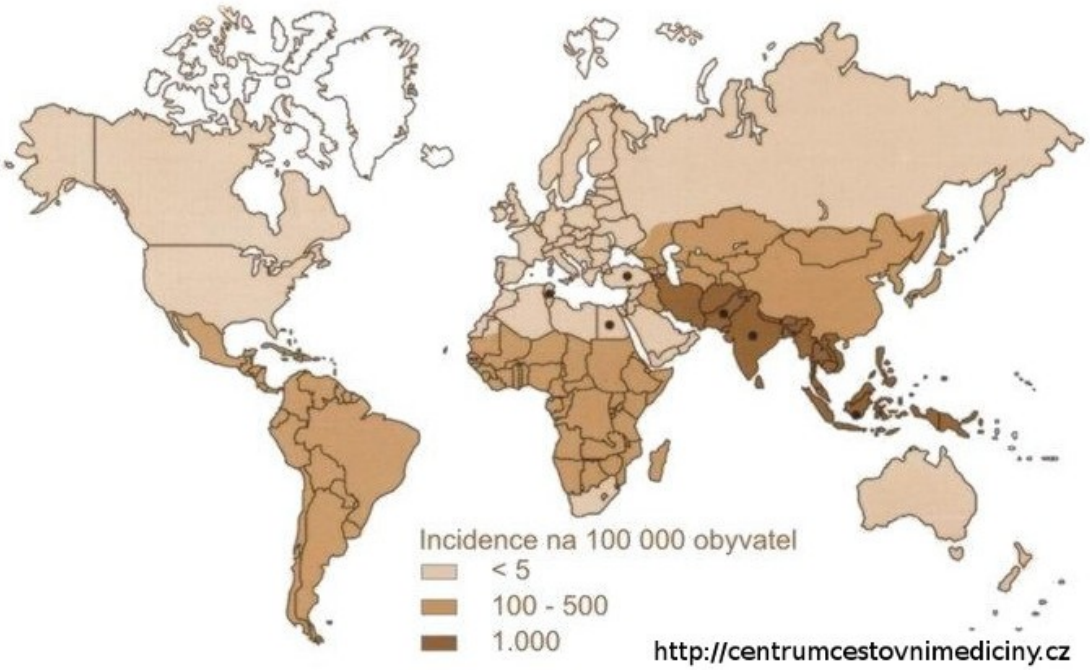
Dýmějový (bubonický) mor

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 potravině
- ***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)

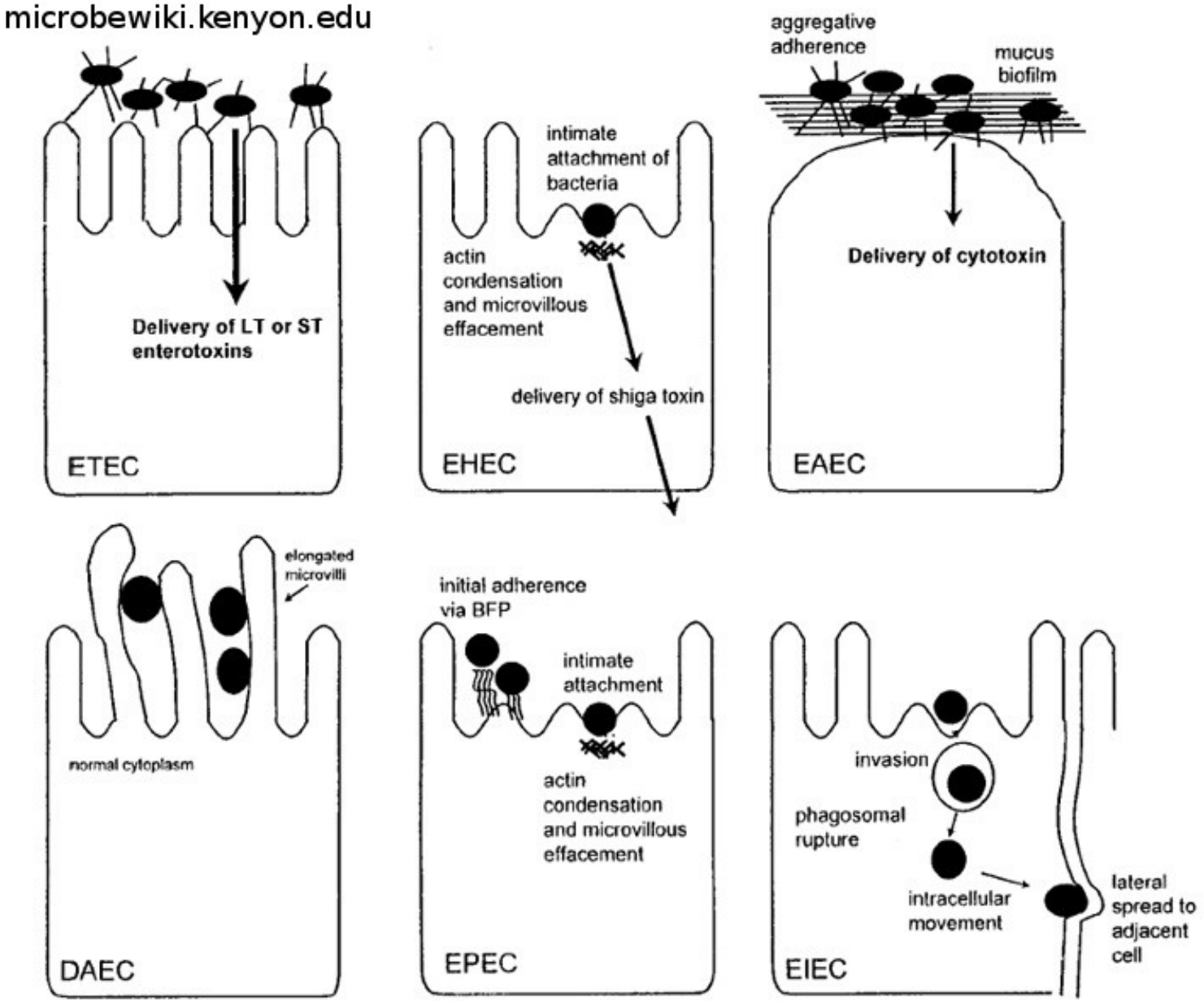
Escherichia coli

- **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)

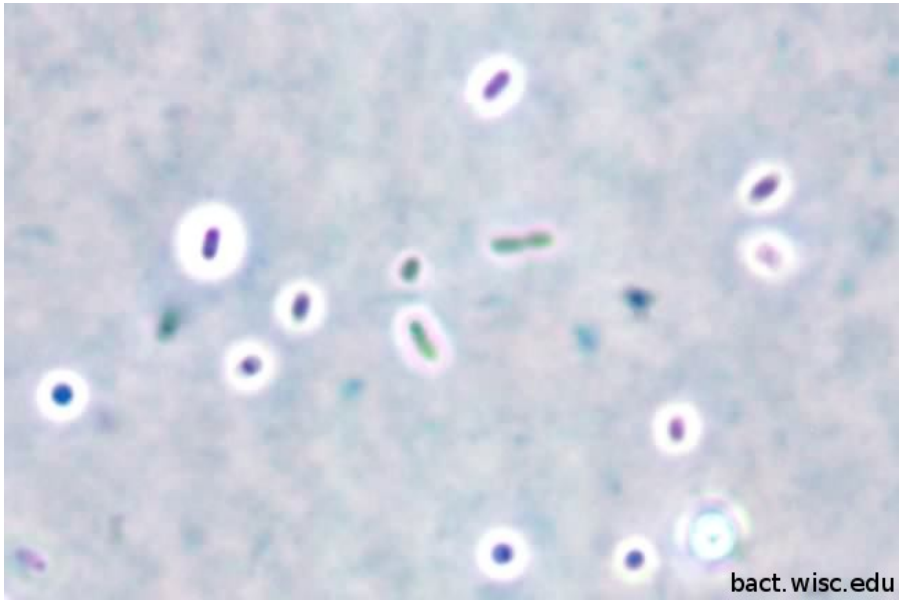
- **patogeny ve střevě:**
  - **EAEC** (enteroagregativní EC) – cestovatelské průjmy
  - **DAEC** (difúzně-adherentní EC) – cestovatelské vodnaté průjmy se zvracením
- **patogeny mimo střevo:**
  - **UPEC** (uropatogenní EC)
  - kmeny způsobující respirační infekce, sepse, infekce ran, novorozenecké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

Escherichia coli (3)



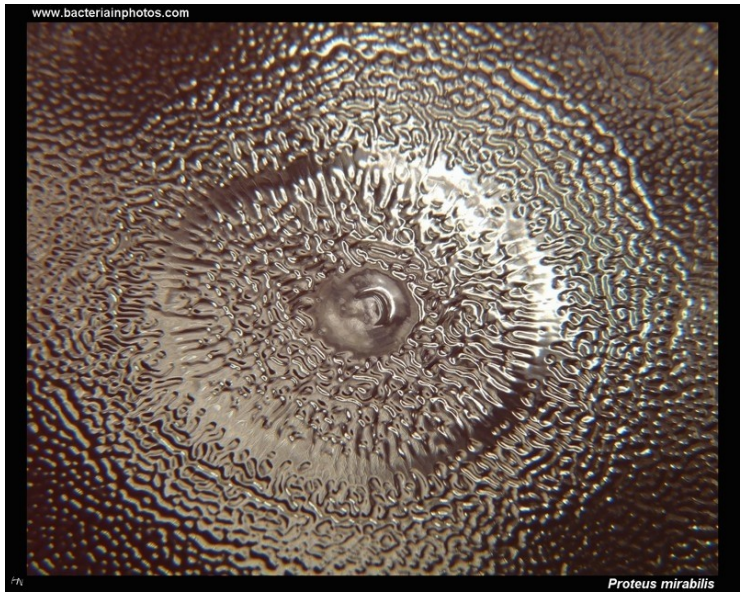
Rod *Klebsiella*

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



Rod *Proteus*

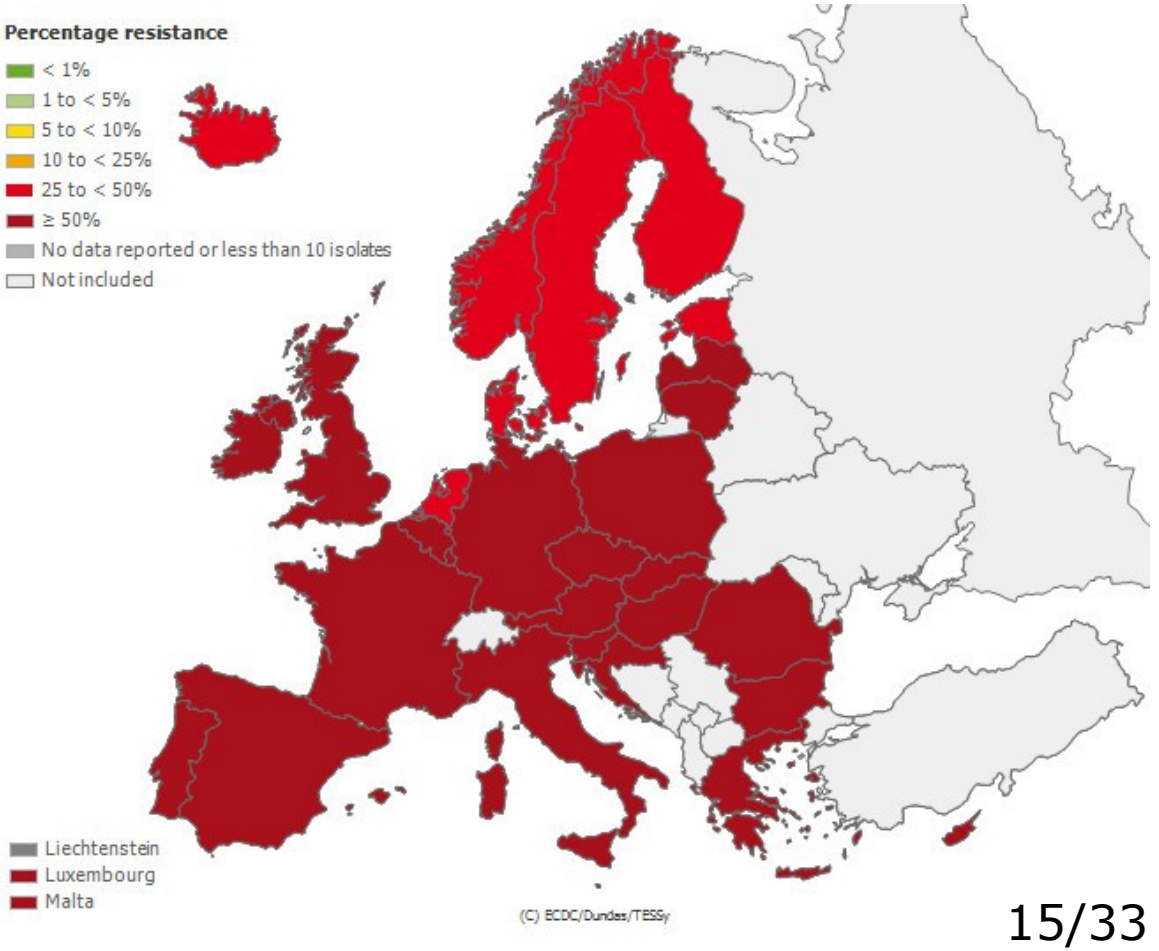
- *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*
- **původci močových infekcí**
- typický je **plazivý růst** (tj. neroste jen v místě inokulace, ale šíří se po povrchu agaru do stran), tzv. Raussův fenomén či fenomén příbojové vlny



Multirezistentní enterobakterie

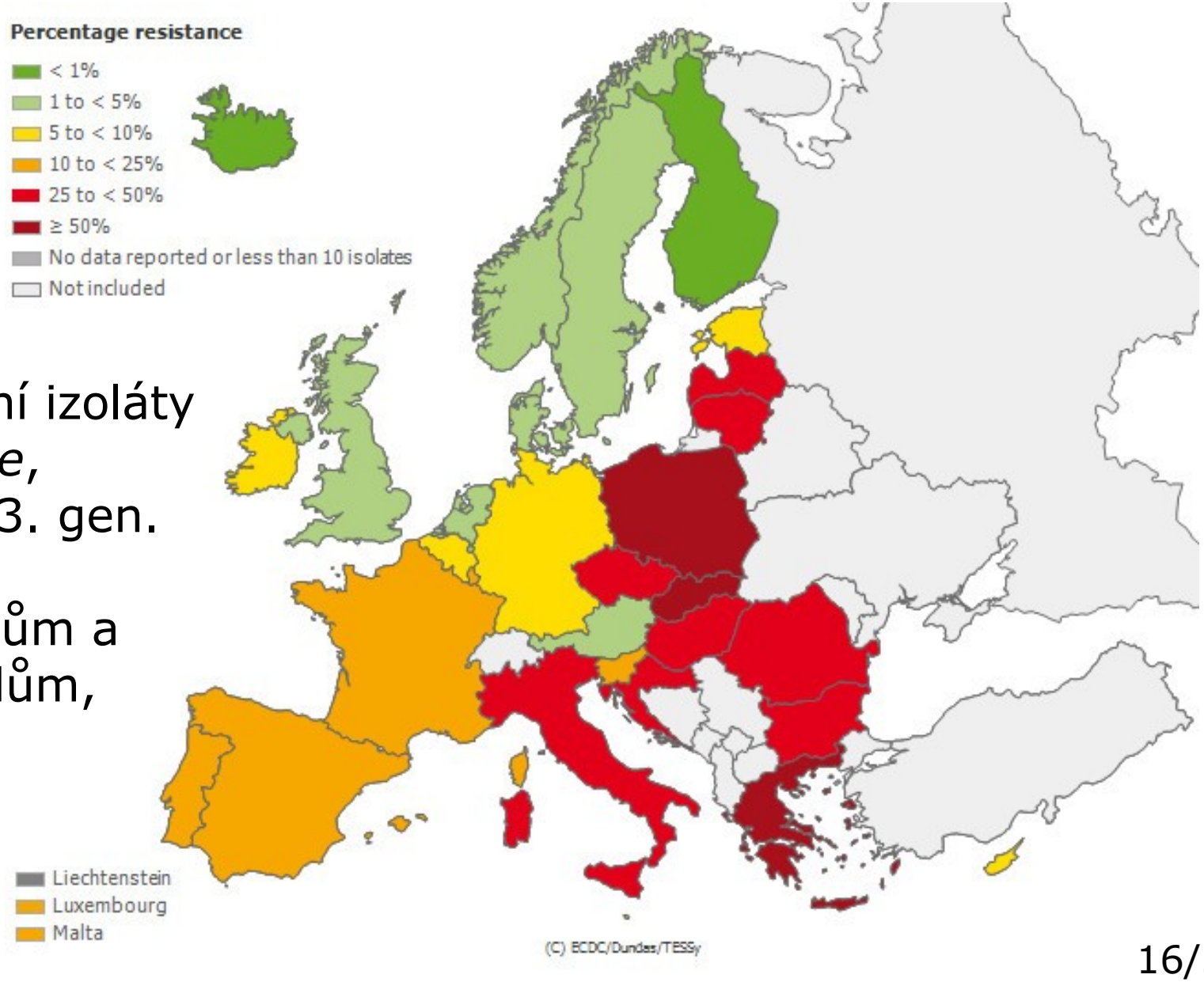
- **rezistence na větší množství antibiotik**
- častí producenti širokospektrých betalaktamáz typu **ESBL** popř. **ampC**

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

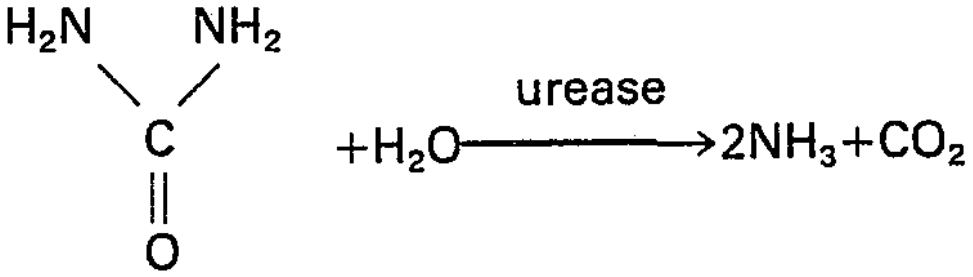


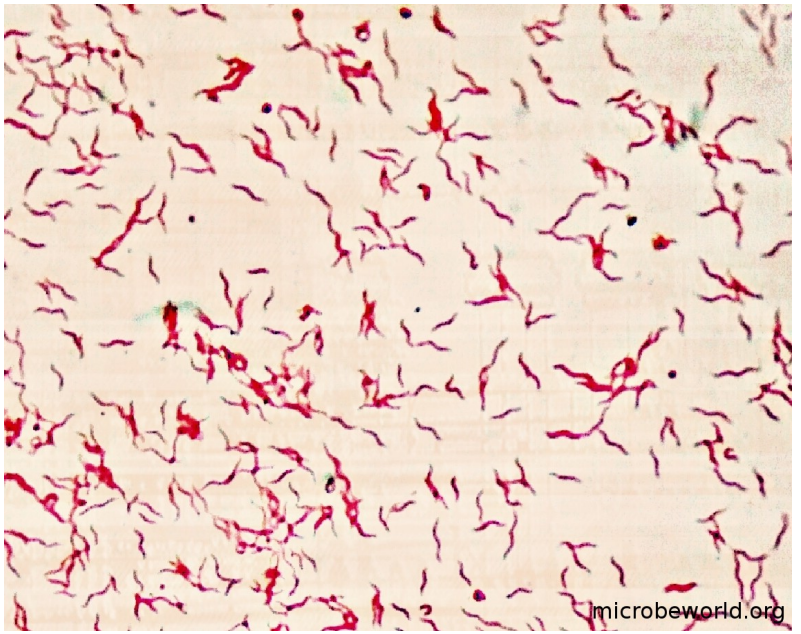
Campylobacter jejuni

- **G- zahnutá tyčka** (nepatří mezi enterobakterie), OXI+
- **kampylobakterióza** - 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 CO_2
  - 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)





Čeleď: *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 (vetšinou 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

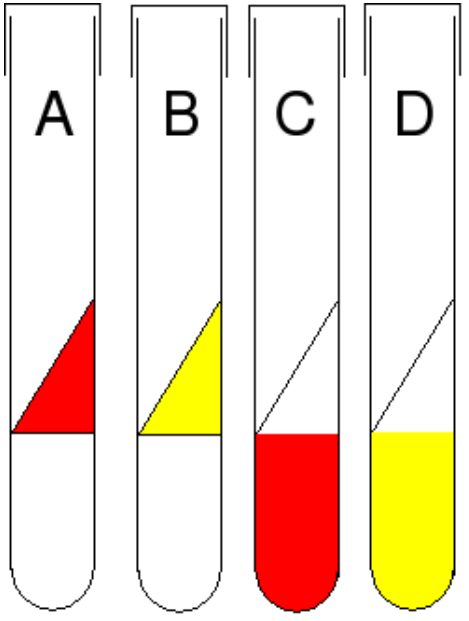
- popište **kolonie na KA a ENDO**
- na KA můžete vidět hemolýzu, není ale důležitá pro diagnostiku
- nezapomeňte že **L+ kmeny mají** nejen **červené** (též růžovočervené nebo kovový lesk) **kolonie, ale i okolní půdu** (jinak je to jen pigment)
- kmeny, které **nerostou ani na jedné z půd** a morfologicky 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**, obyčejně 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. kampylobakterů

- **speciální kultivace**:
  - **černá „půda pro kampylobaktery“** (CCDA - charcoal-cefoperazone-deoxycholate agar); neroste na KA a ENDO
  - **teplota 42 °C**
  - **zvýšená tenze CO_2**
  - **prodloužená kultivace na 48 hod**
- **OXI+** (typicky opožděná pozitivita)

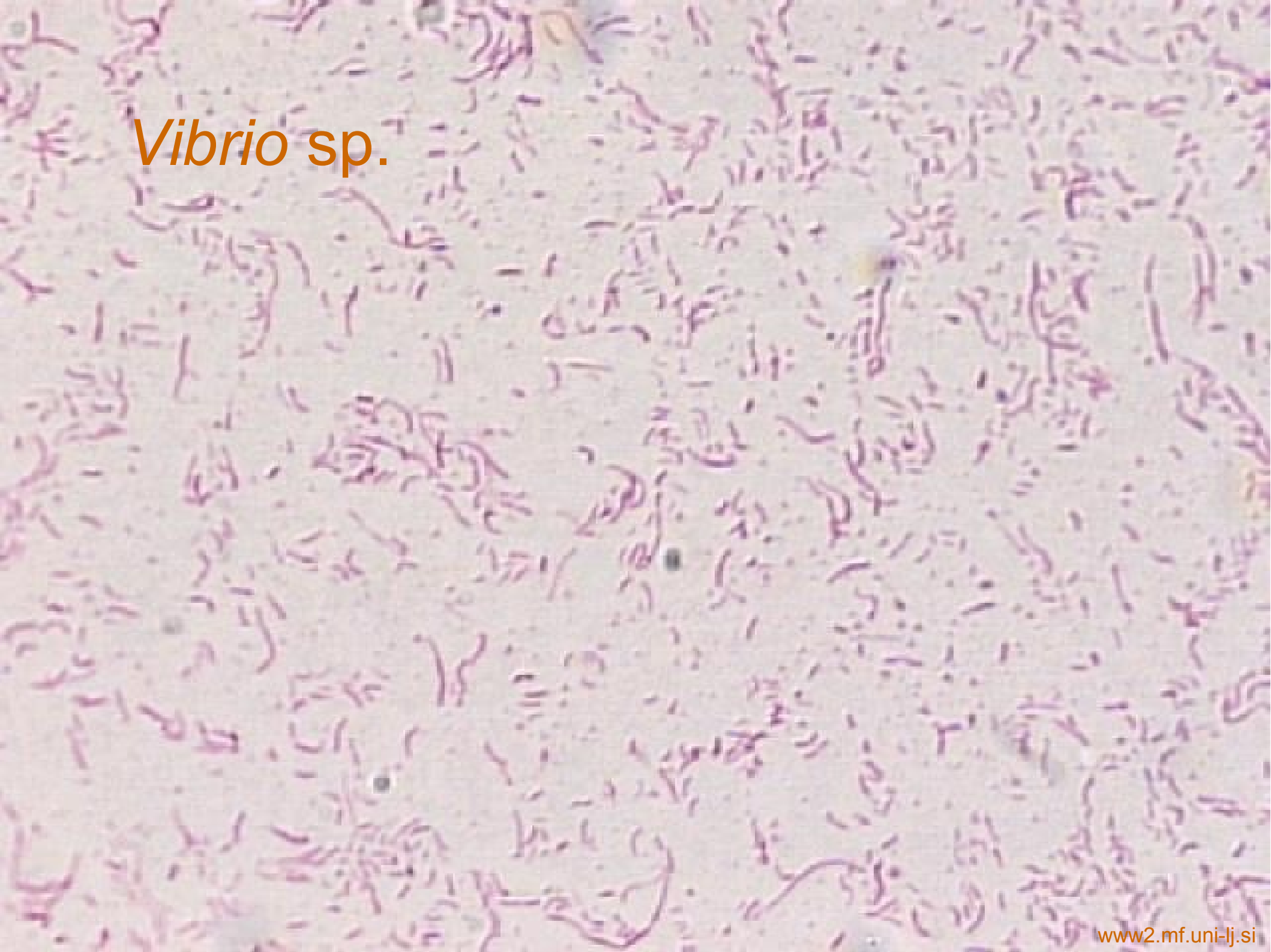
Úkol 8: Ureázový test v diagnostice helikobakterů

- helikobakterky 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

clsdiagnostics.com

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**)



www2.mf.uni-lj.si

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