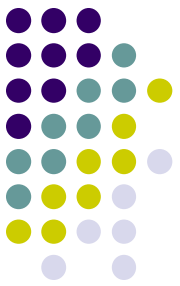


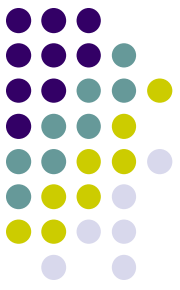
Enterobakterie

P04





- Které jsou klinicky významné G+ koky?
Stafylokoky, streptokoky, enterokoky
- A které klinicky významné G+ tyčinky?
Např. listerie, koryneformní tyčinky, bacily
- Jak odlišíme od ostatních koků stafylokoky?
Pozitivní katalázou a růstem na 10 % NaCl
- Jak rozlišíme streptokoky od enterokoků?
Streptokoky nerostou na SB ani na ŽE půdě.
Pomoci nám může i PYR test



- Jak můžeme navzájem rozlišit enterokoky?

Arabinosovým testem, případně EnCOCCUS

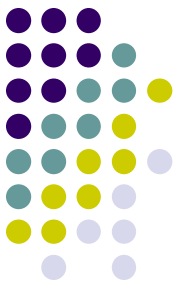
- Co jsou to MRSA a VRE a proč nás zajímají?

Jsou to multirezistentní epid. závažné kmeny

- Jak poznáme listerie?

Rostou i při nízkých teplotách, vysokých

koncentracích NaCl, lze využít chromog. půdy



- Mohou být korynebakteria běžnou flórou?

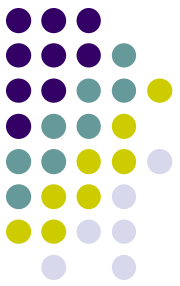
Ano. Jsou jednou z nejběžnějších součástí běžné mikroflóry kůže (vedle stafylokoků)

- Klinicky významné druhy rodu *Bacillus*?

B. anthracis ,*B. cereus*

- V čem nám naopak rod *Bacillus* pomáhá?

Využíváme je při kontrole sterilizátorů



Rod *Enterobacteriaceae*

- Gramnegativní tyčinky, většinou pohyblivé (až na *Shigella*, *Klebsiella* a *Y. pestis*)
- Oxidáza negativní, (kataláza +)
- Biochemicky značně aktivní (záleží na patogenitě)
- Komenzálové, saprofyté či patogeny střevní i mimostřevní (obligátní i oportunní patogeny)



Primární patogeny z řad enterobakterií

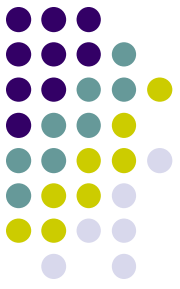
- *Enterobacteriaceae* je klinicky nejdůležitější čeleď gramnegativních tyčinek
- Nejhorší patogeny způsobují celkové infekce:
 - *Yersinia pestis* (mor)
 - antropopatogenní serovary salmonel (serovary Typhi, Paratyphi A, Paratyphi B a Paratyphi C – břišní tyfus)
- Závažné jsou ale i obligátní patogeny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

Podmíněně patogenní enterobakterie



- *Escherichia*
- *Klebsiella*
- *Proteus*
- *Serratia*
- *Enterobacter*
- Atd.

Yersinia pestis



- Původce moru
- Přenašečem je blecha morová (*Xenopsylla cheopsis*), zdrojem jsou krysy, potkani, popřípadě jiní hlodavci
- Tři formy onemocnění:
 - Dýmějový (bubonický) m.
 - Plicní forma
 - Septická forma

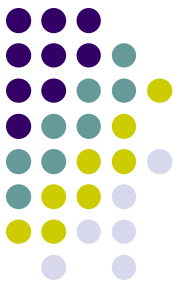
Další druhy – *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis*
- onemocnění zažívacího traktu



Mor (*Yersinia pestis*)



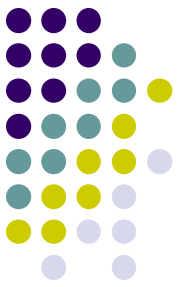
Zoopatogení salmonely



- Patří mezi nejběžnější původce bakteriálních střevních nákaz (tzv. salmonelózy)
- Sérovary **Enteritidis**, Typhimurium, Infantis atd.
- Fekálně- orální infekce— kontaminované potraviny
- Rezervoárem infekce— různí obratlovci



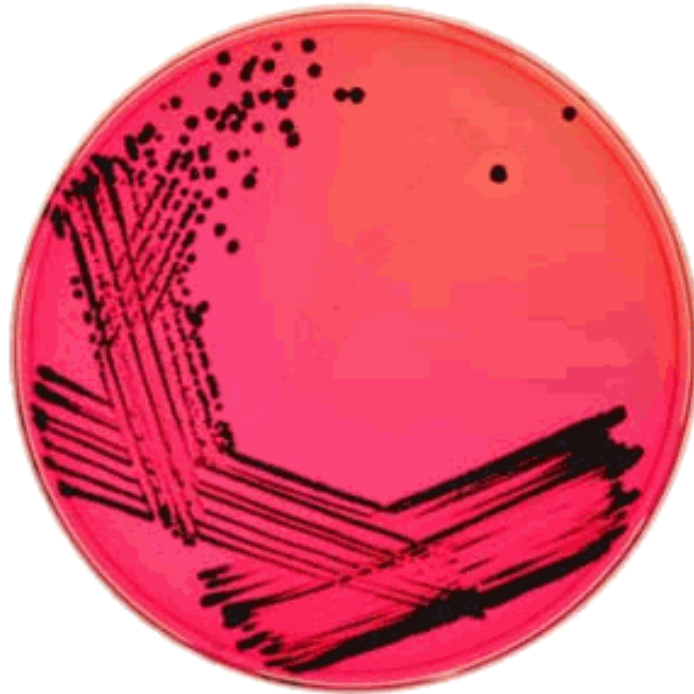
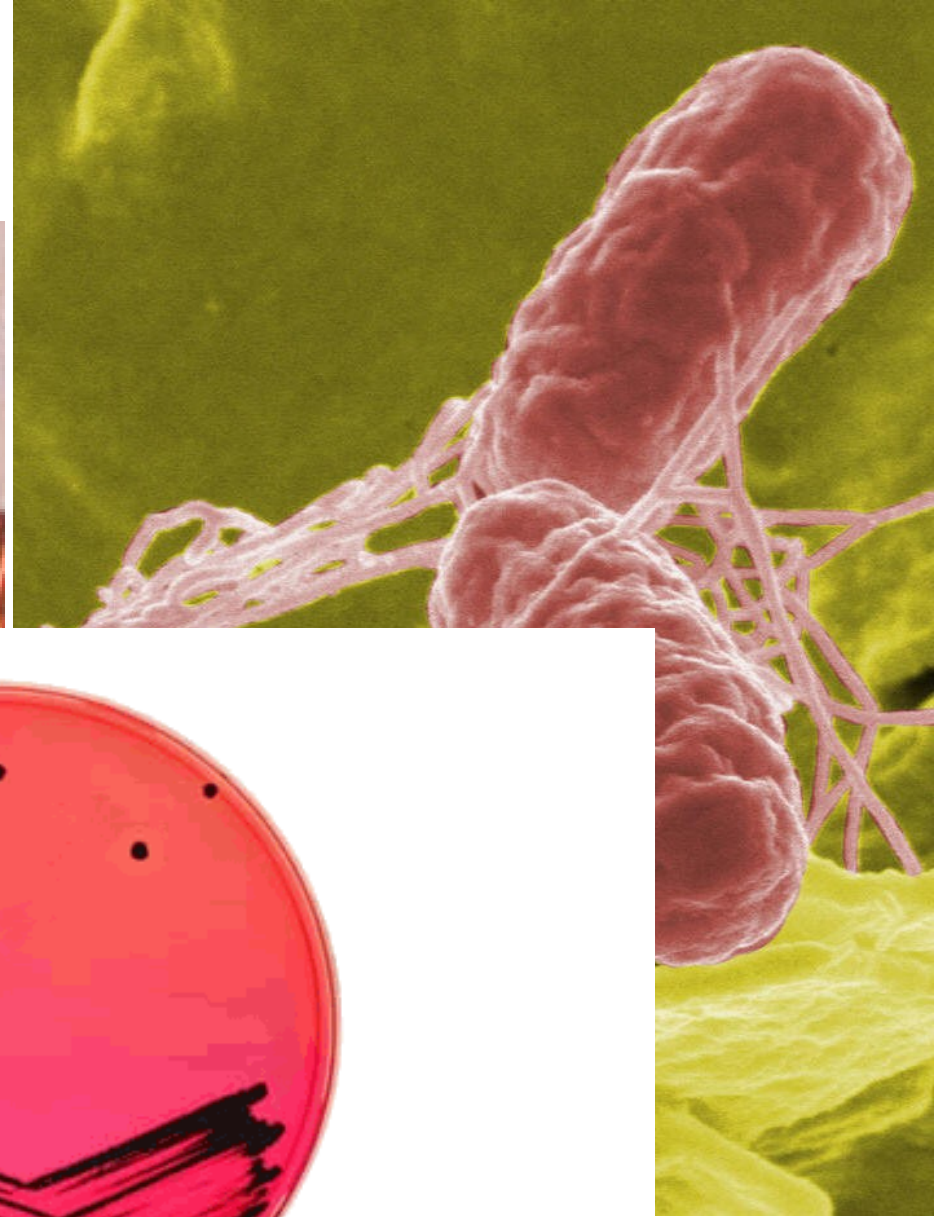
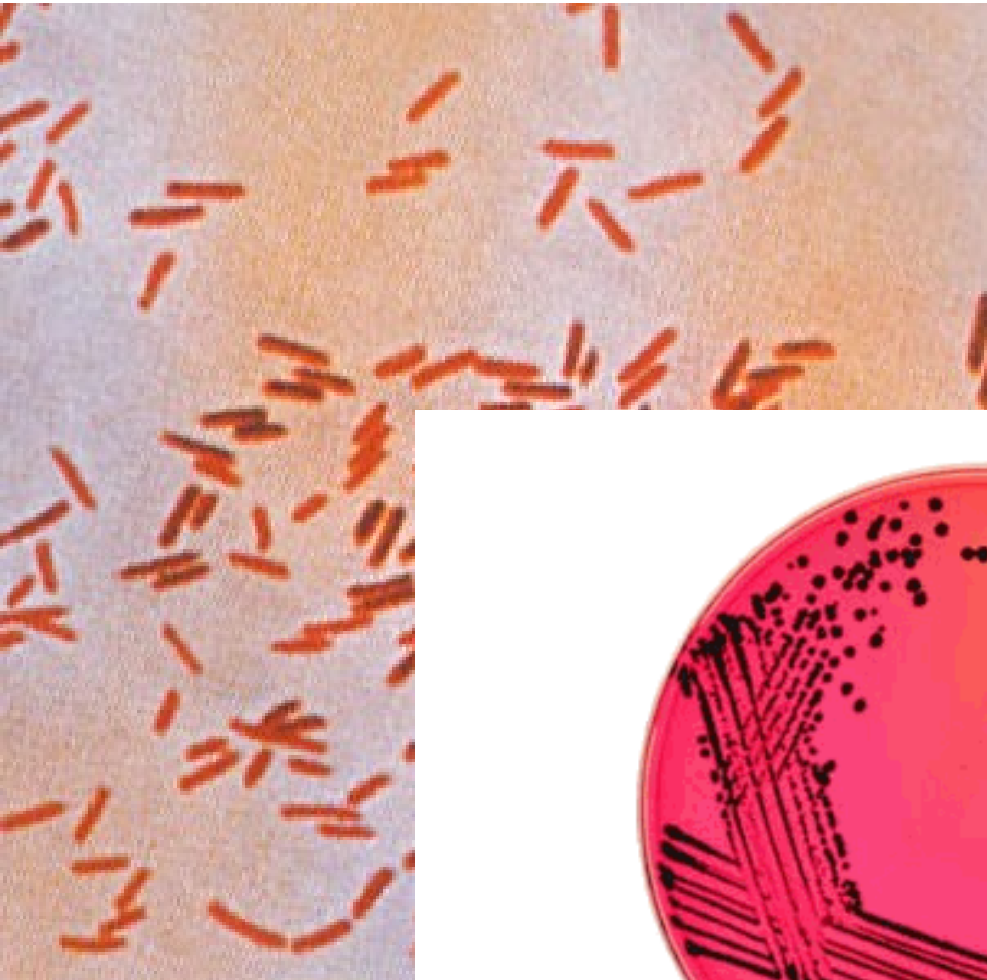
Antropopatogenní serovary

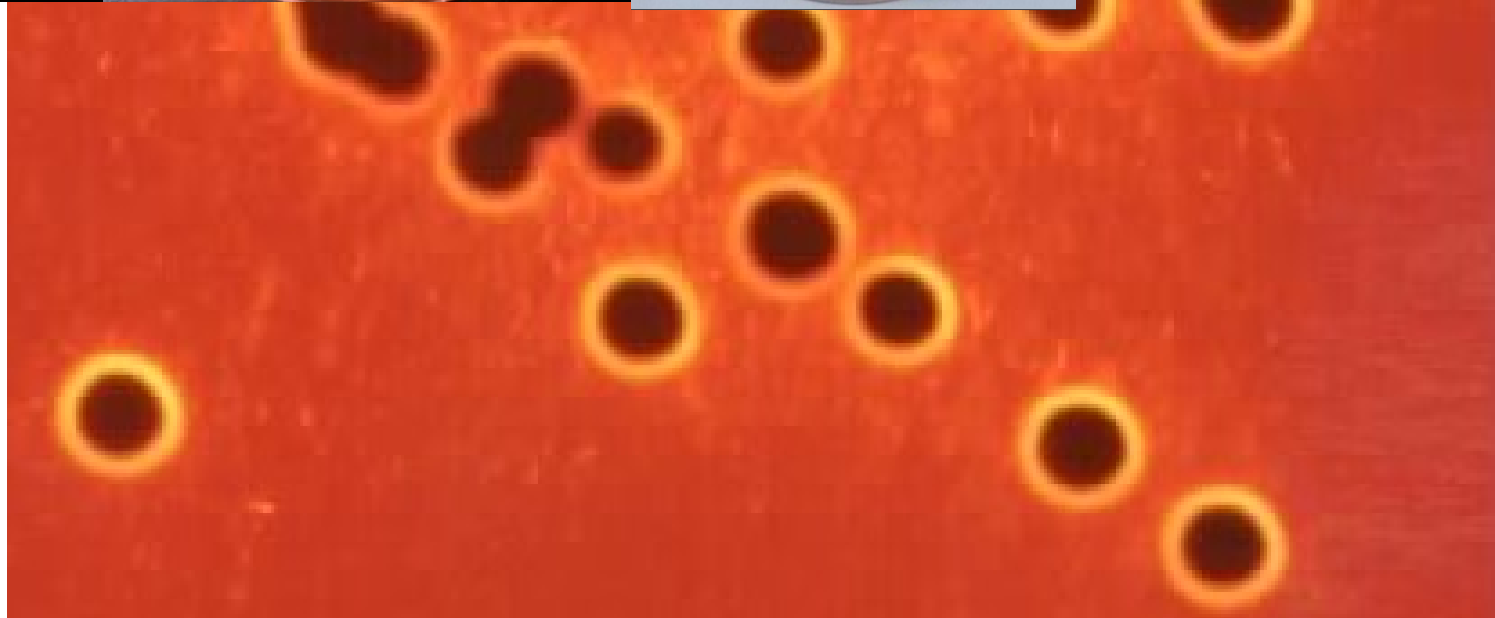
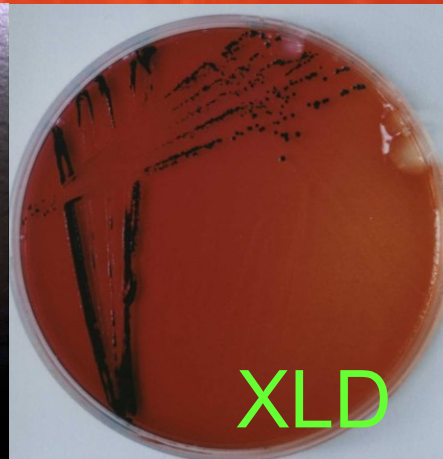


- Sérotypy Typhi, Paratyphi
- Septická onemocnění- původci **břišního tyfu** (popř. paratyfů)
- Vstupní branou infekce je trávicí trakt, zdrojem nákazy je jen člověk
- Příznaky- vysoká horečka a bolest hlavy (hlavnička)

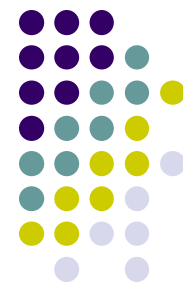


Salmonella



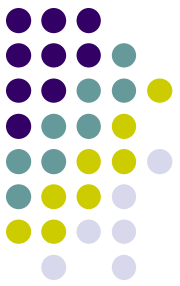


Poznámka k salmonelám a shigelám

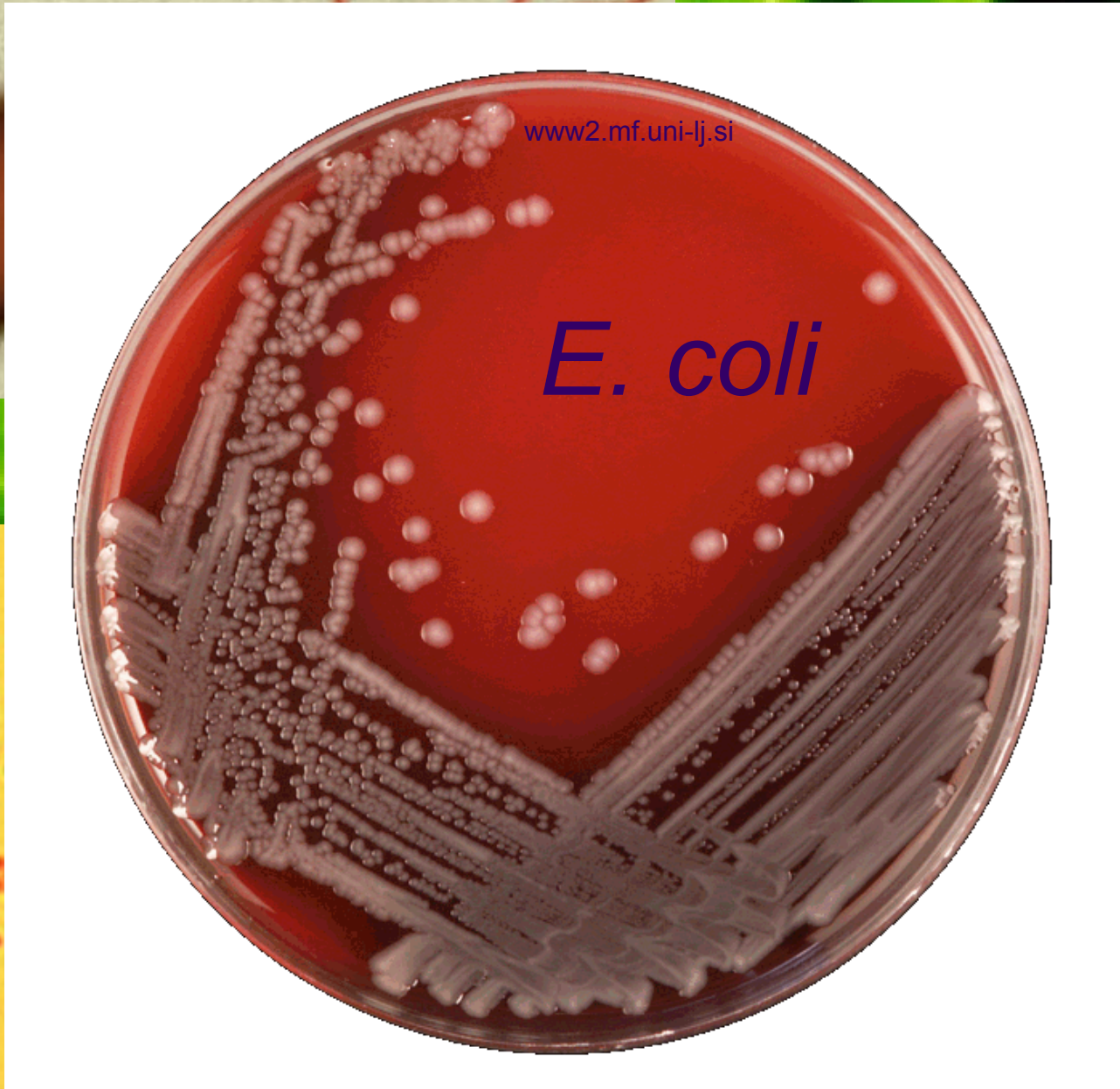


- To, že mezi střevními patogeny jsou rozdíly, ukazuje příklad salmonel a shigel.
- **Salmonely** potřebují vysokou infekční dávku. Musí se tedy pomnožit v nějaké potravíně. Infekce jsou téměř výhradně z potravin.
- **Shigelám (původci tzv. bacilárních úplavic= nemoc špinavých rukou)** naproti tomu stačí malá infekční dávka (asi 100 bakterií), takže se snadno přenesou špinavýma rukama, klikou od záchodu nebo kontaminovanou vodou.

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)- především u novorozenců
 - **ETEC** (enterotoxické EC)- cestovatelské průjmy
 - **EIEC** (enteroinvazivní EC)
 - **STEC** (shiga-like toxigenní EC)- hemolyticko-uremický syndrom
 - **UPEC** (uropatogenní EC)- mimo střevo
- Extraintestinální (močové, septická onemocnění, infekce ran) a intestinální infekce (průjmy)



www2.mf.uni-lj.si

E. coli

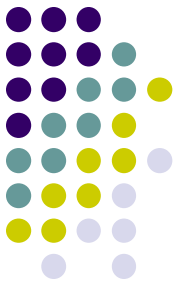
Escherichie



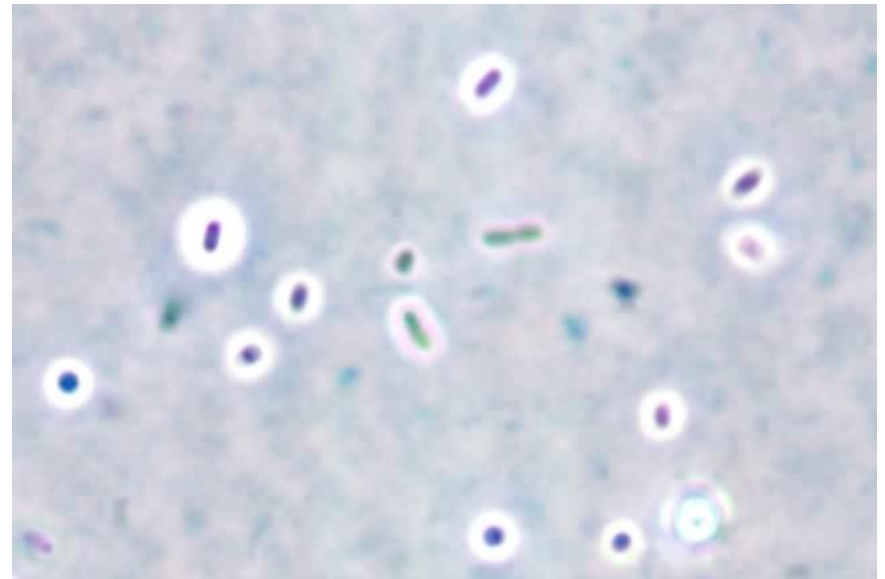
Pokud escherichie
na KA hemolyzuj
(a to je dost
často), uvede se
to případně do
výsledku, ale
nehodnotí se to
jako zvláštní
diagnostický
znak



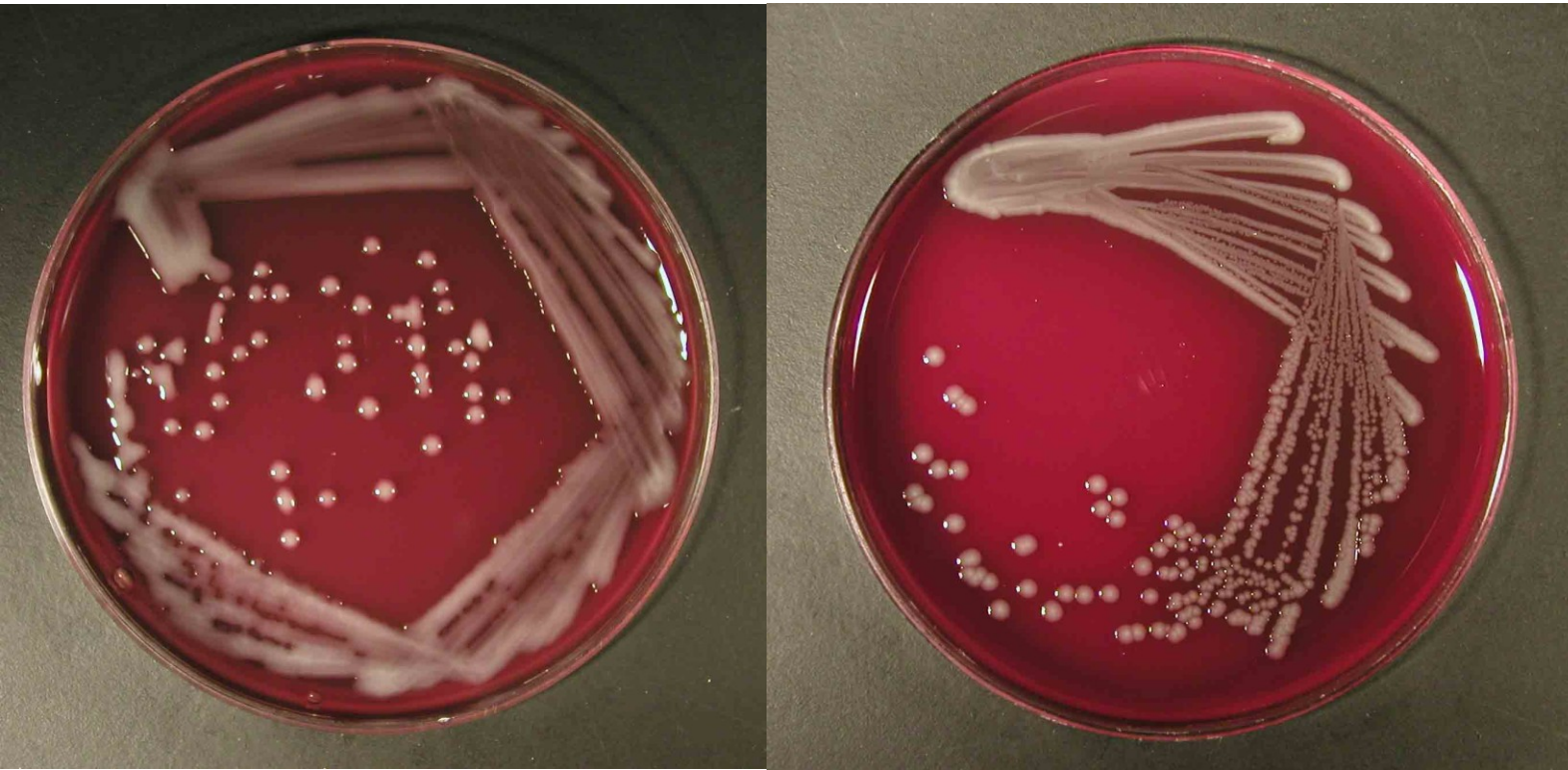
Rod *Klebsiella*



- G- opouzdřené bakterie
- Nejvýznamnějším druhem je *K. pneumoniae*
- Významné nozokomiální patogeny
 - infekce močových cest
 - bronchopneumonie



Klebsiely a escherichie



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

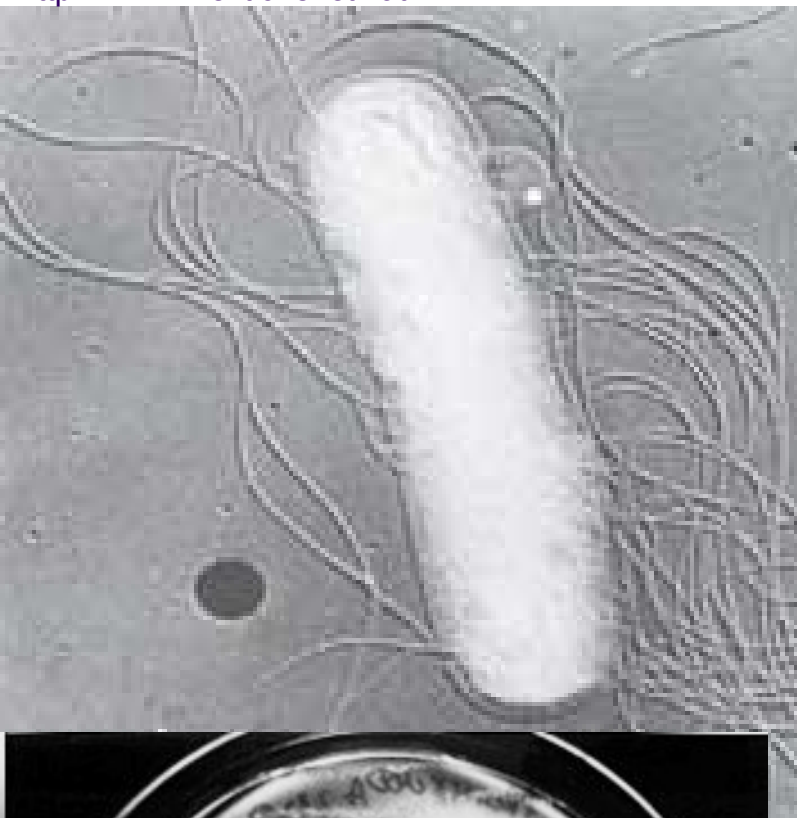
... i když zrovna tohle *E. coli* je taky poměrně bílé a hlenovité 😊

Proteus

(*P. mirabilis*, *P. vulgaris*)

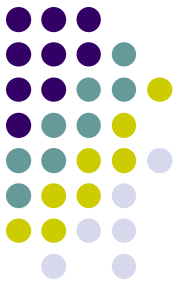
- Původci močových infekcí
- Pro protey je typické, že nerostou jen v místě inokulace, ale šíří se po povrchu agaru do stran (plazivý růst, Raussův fenomén, také fenomén příbojové vlny)





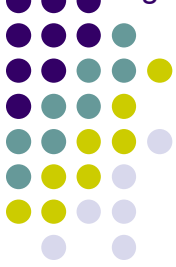
Proteus

Přehled enterobaktérií



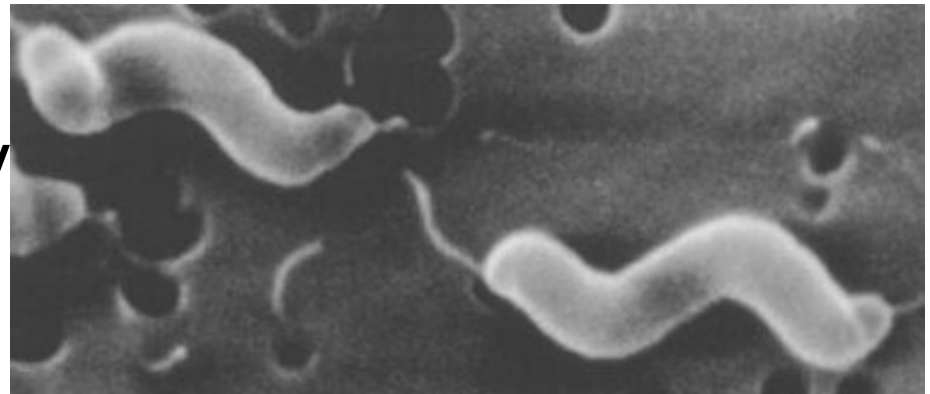
Patogenita	Příklady
Systemová	<i>Y. pestis</i> , AP** salmonely
Střevní	ZP* salmonely, shigely, yersinie
Potenciální	<i>E. coli</i> , Klebsiely, enterobaktery, protey, providencie, morganely, citrobaktery, serracie a jiné
Téměř nulová	Mnoho druhů, například <i>Pragia fontium</i> a <i>Budvicia aquatica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

*zoopatogenení **antropopatogenní



Campylobacter jejuni

- gramnegativní zahnutá tyčinka vyžadující speciální kultivaci
- Nepatří mezi enterobakterie, ale kamylobakterióza je svým průběhem a závažností srovnatelná se salmonelózou
- **Počet případů** u nás je v posledních letech přibližně stejný jako v případě salmonelózy

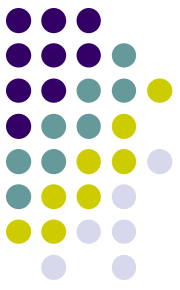




Helicobacter pylori

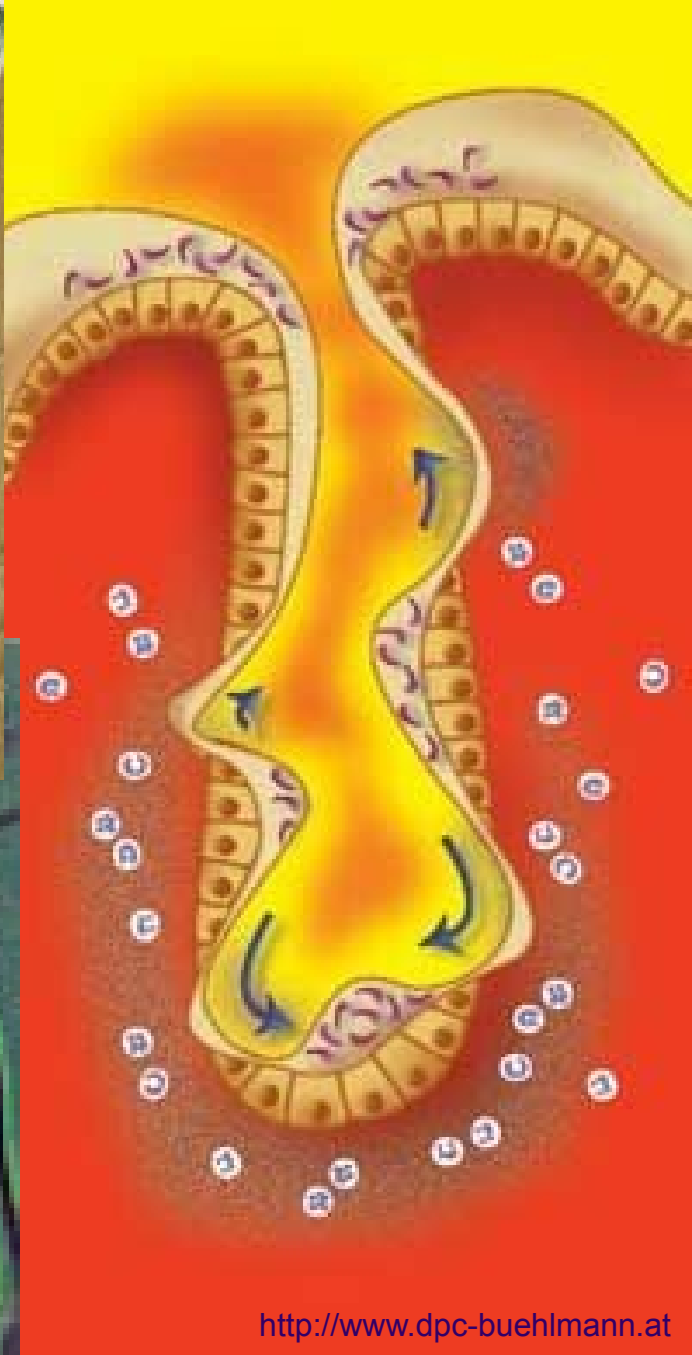
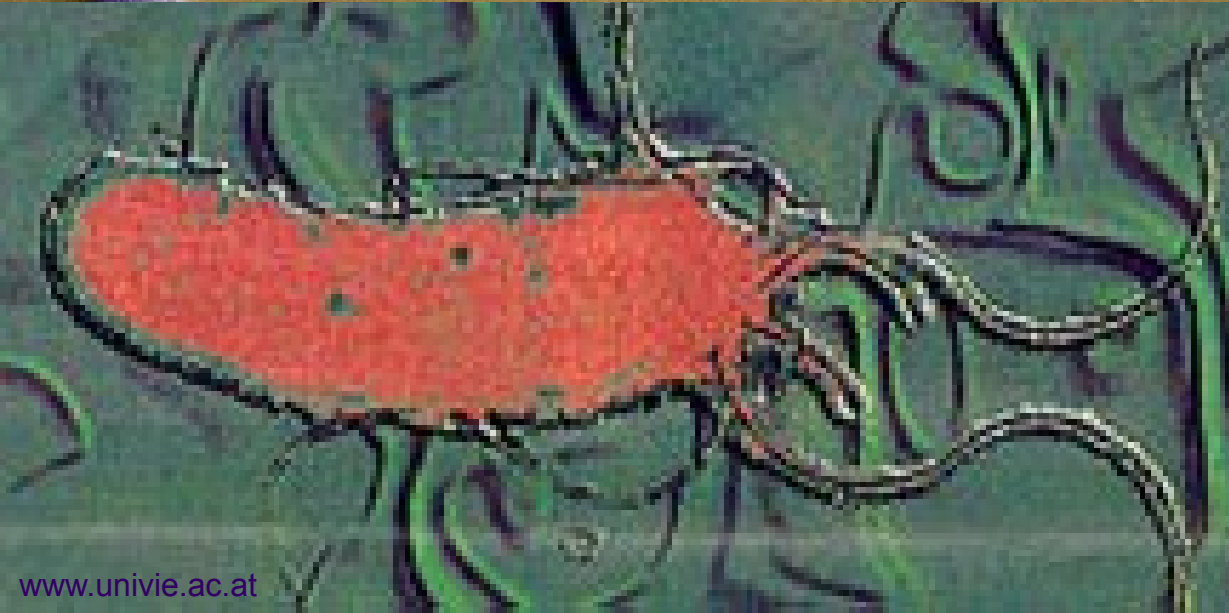
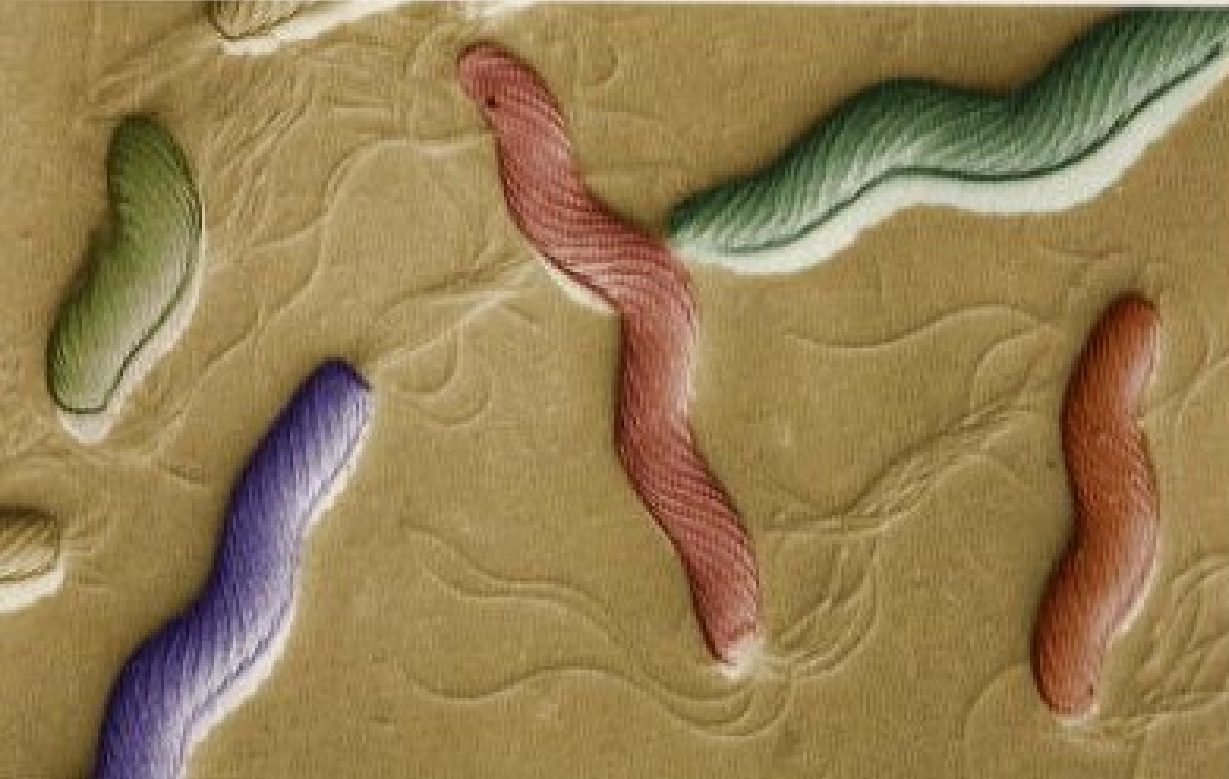
- Peptické (tedy gastrické či duodenální) vředy jsou onemocněním, které vzniká souhrou více příčin. Takovým onemocněním říkáme obvykle multifaktoriální.
- Dodnes se nejen mezi praktickými lékaři, ale i mezi specialisty liší názory na podíl bakterie *Helicobacter pylori* na vředové onemocnění. Jisto je,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

Jak přežívá v extrémně nepříznivém prostředí žaludku?

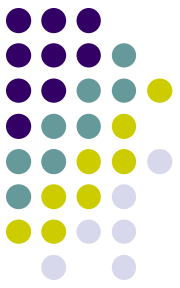


- Upravuje si své mikroprostředí – alkalizuje si ho tím, štěpí močovinu (silná ureázová aktivita)
- Močovina se rozštěpí na kyselý oxid uhličitý, který vyprchá, a zásaditý amoniak, který zůstane a alkalizuje prostředí
- Štěpení močoviny probíhá podle reakce:





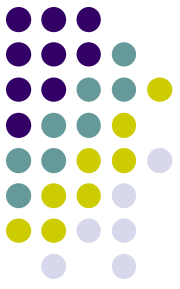
Vibrionaceae



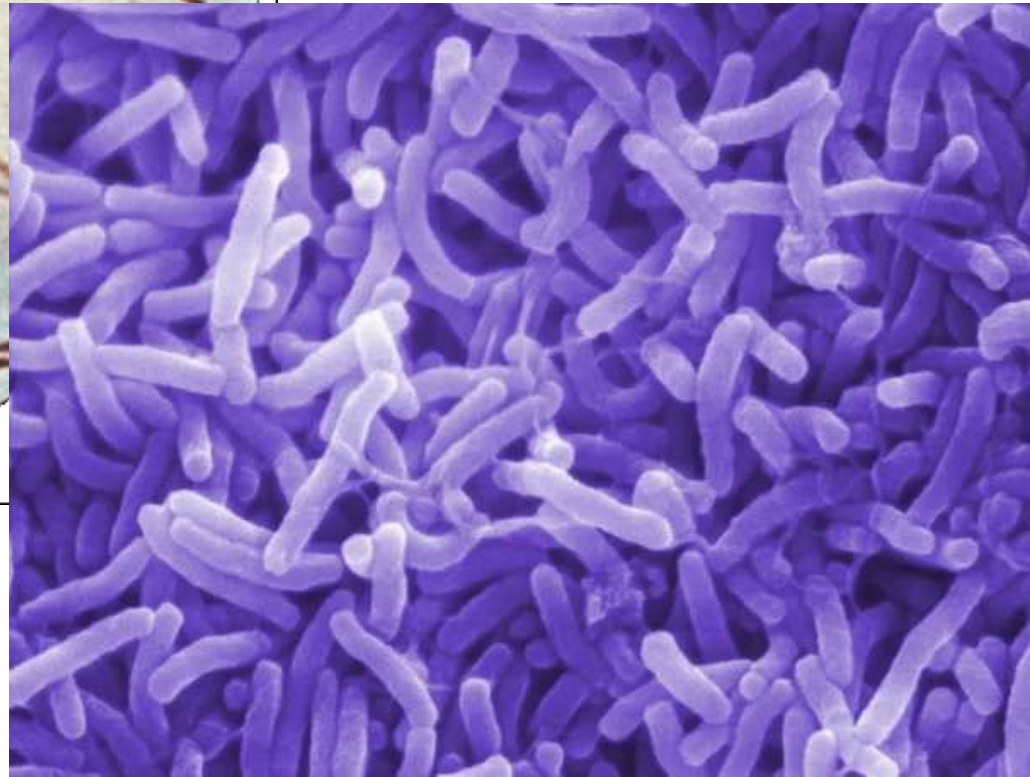
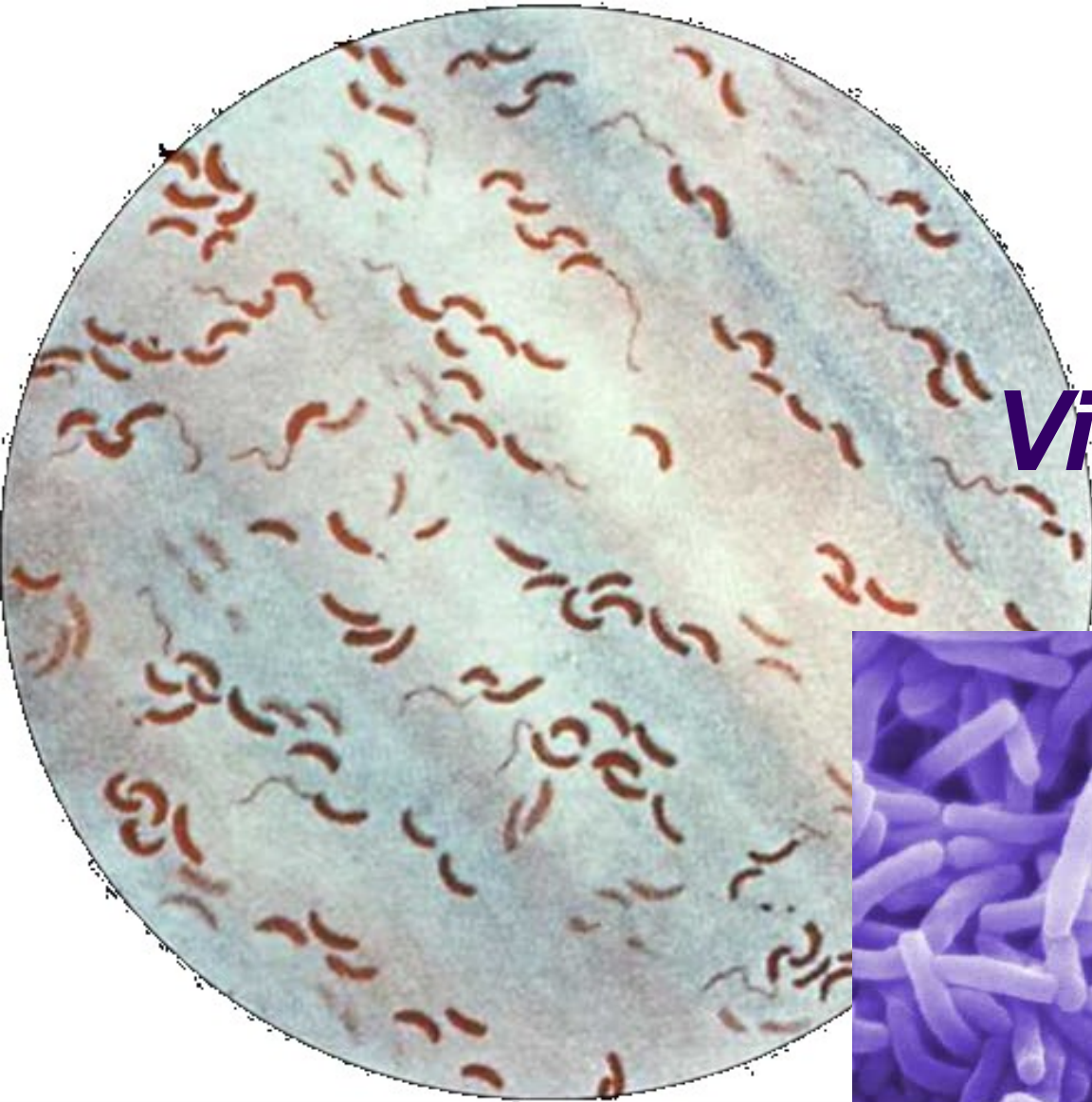
- ***Vibria*** jsou G- krátké většinou zakřivené tyčinky, pohyblivé a oxidáza pozitivní
- Vyskytují se ve vodním prostředí teplých oblastí
- ***Vibrio cholerae*** způsobuje **cholera**, těžké průjemové onemocnění v tropech a subtropích
- **Jiní členové rodu *Vibrio*** mohou způsobovat také průjmy, ale i infekce ran. Tato tzv. „halofilní vibria“, preferují zvýšené koncentrace NaCl
- ***Aeromonas***, druhý významný rod, také způsobuje ranné infekce, například při přípravě jídel z ryb a plodů moře.

Vibrio cholerae



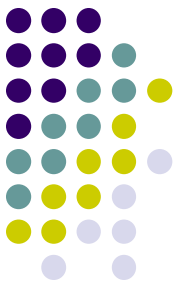


Vibrio cholerae



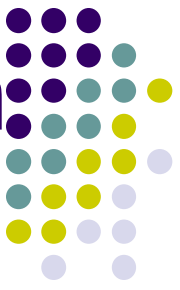
<http://bepast.org>

Enterobakterie – metody



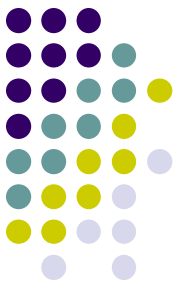
- Přímé metody
 - Mikroskopie – v praxi má malý význam, protože je jich mnoho a v mikroskopu jsou všechny stejné. Nicméně v praktiku ji použijeme
 - Kultivace – používá se mnoho různých půd
 - Biochemická identifikace – velmi důležitá
 - Antigenní analýza – salmonely, shigely, EPEC
- Nepřímé metody (protilátky)
 - Widalova reakce u tyfu, protilátky proti yersiniím

Odlišení od ostatních podezřelých (diferenciální diagnostika)



- Gramovo barvení odliší gramnegativní tyčinky od ostatních bakterií
- Endova půda: 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

Rozlišení enterobakterií navzájem



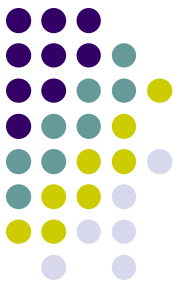
- **Endova půda podruhé:** orientační rozlišení obligátních patogenů (většinou L-) a potenciálních patogenů (zpravidla L+)
- **Spousta dalších půd:** XLD, MAL a další na salmonely, CIN na yersinie aj.
- **Biochemické testy:** Hajnova půda, test MIU, Švejcárova plotna, ENTEROtesty aj.
- **Antigenní analýza**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

Úkol 1: Barvení kultur podle Grama



- Obarvěte podle Grama osm podezřelých kmenů (pro zopakování: natřít, nechat uschnout, fixovat plamenem, poté barvit: Gram 30 s, Lugol 30 s, alkohol 15 s, voda, safranin 60 s, voda, osušit, imerzní obj.)
- Jeden z kmenů nebude G– tyčinka. Pro porovnání si ještě ve druhém úkolu popíšete jeho kolonie (pro srovnání s ostatními), další úkoly už s ním ale dělat nebudete.

Úkol 2: Kultivace



- Popište kolonie všech kmenů na KA a Endově půdě. Zvláště si všimněte toho, že některé z nich jsou laktóza negativní a jiné laktóza pozitivní



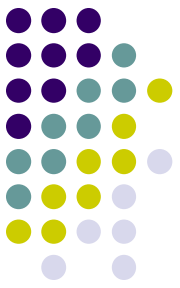
Úkoly 3 (a, b): Gramnegativní tyčinky - rozlišení



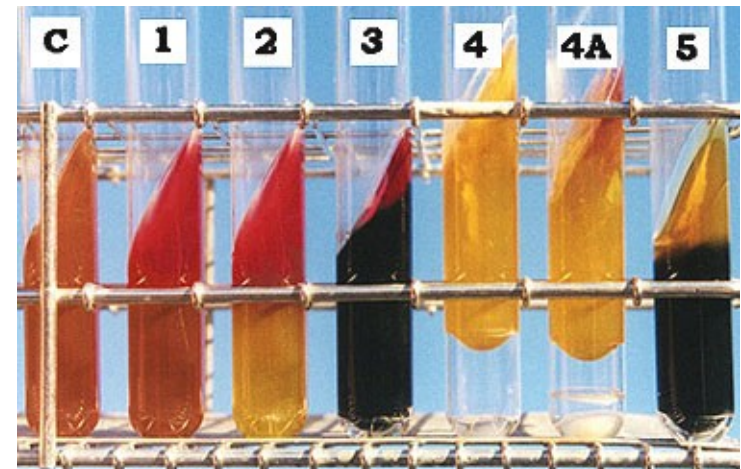
Pozor, oxidáza jen demonstračně na bočním stole!

- Úkoly proved'te dle protokolu. Pamatujte:
- Enterobakterie jsou oxidáza negativní (s výjimkou rodu *Plesiomonas*, který k nim byl nedávno přiřazen) a vždy štěpí glukózu
- *Vibria* a aeromonády také štěpí glukózu, ale jsou vždy oxidáza pozitivní
- Gramnegativní nefermentující bakterie (mohou to být tyčinky, ale i kokotyčinky či koky) nikdy neštěpí glukózu. Oxidázu mohou mít pozitivní i negativní

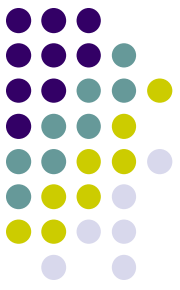
Úkol 3a- Hajnova půda



- Barva spodní části půdy beze změny: bakterie nefermentuje glukózu (rozdíl tzv. G- nefermentující tyčky × enterobakterie)
- Spodní část **zčerná** – tvorba H_2S
- Půda potrhaná, s bublinkami – tvorba plynu z glukózy
- Dolní část **žlutá**, horní **červená** – bakterie fermentuje glukózu, ale ne laktózu
- Půda celá **žlutá** – fermentuje i laktózu



Úkol 4a – kultivační diagnostika enterobakterií



- Na půdě XLD
 - salmonely mají bledé kolonie s černým středem (trochu jako malininkaté volské oko s černým žlutkem)
 - jiné bakterie buď nerostou vůbec, nebo rostou málo a v koloniích jiné morfologie
- Na půdě MAL to vypadá podobně, ale některé barvy či velikosti kolonií se mohou lišit od výsledku na XLD
- Na půdě CIN by yersinie rostly v drobných, tmavě růžových koloniích. Pokud tam nic neroste, znamená to, že žádný z vašich kmenů není *Yersinia*.



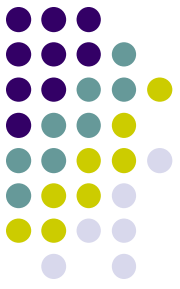
Salmonela na MAL agaru

Úkol 4b – biochemické testování enterobakterií



- Pro biochemické testování enterobakterií používáme různé testy. V Česku používáme nejčastěji EnteroTest 16 a EnteroTest 24. My dnes použijeme první z nich
- První reakce je ONPG test (zkumavka s činidlem na stripu, jako VPT ve StaphyTestu a StreptoTestu). První řada panelu odpovídá 2. až 9. reakci, druhá řada je 10. až 17. reakce.

Úkol 5 – antigenní analýza



- Uvědomte si, že 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)

**zpravidla je to u dětí do dvou let*

Úkol 5a: aglutinace *E. coli*



- V současnosti detekujeme 12 serovarů EPEC
- **Je-li pozitivní nonavalentní sérum (I, II, III)**
 - pokračujeme trivalentními séry (I, II a III)
 - je-li jedno z nich pozitivní, pokračujeme příslušnými monovalentními séry
- **Je-li pozitivní trivalentní sérum IV**, pokračujeme s monovalentními séry patřícími do skupiny IV.
- **Chápejte: existují stovky serovarů *E. coli*. Zkrátka, výsledek „*E. coli*, EPEC vyloučena“ znamená „je to jeden z těch zbylých asi 200“**

5b Aglutinace salmonel

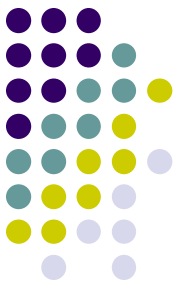


- Při aglutinaci kterékoli pohyblivé enterobakterie hodnotíme dva typy antigenů: tělové, tzv. O antigeny, a bičíkové, tzv. H antigeny (výjimečně i kapsulární K antigeny).
- Tak i každá salmonela má svou specifickou antigenní strukturu. Například salmonela serovaru Enteritidis disponuje tělovými antigeny (O) **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.**

Úkol 6 – testy antibiotické citlivosti



- Antibiotická citlivost se zásadně neurčuje u kmenů ze stolice. (*U bakteriálních průjmů většinou podání antibiotik paradoxně prodlužuje dobu vylučování patogena ze střeva; spíše než antibiotika se tedy užívá dieta a v rekonvalescenci probiotika.*)
- Určuje se tedy zpravidla u kmenů z moče, proto i antibiotika zahrnují léky používané k léčbě močových infekcí (např. furantoin)



Ještě k testům citlivosti

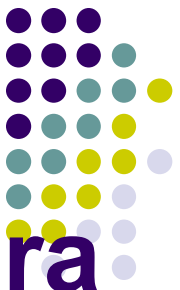
- V našem případě testujme tři kmeny, které jsme určili jako *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp. a *Proteus mirabilis*. Kmen salmonely netestujeme, přestože je patogenem.
- Použijeme sady G1. Je to základní sada, kromě ní existuje rozšířená sada G2 a další G3; pro močové infekce se používá zvláštní úprava G1, zvaná GNTM (močový test)

Tabulka zón citlivosti – test G1 (základní)



Antibiotikum	Zkratka	Referenční zóna
Ampicilin (rozšíř. penic.)	AMP	17 mm
Cefalotin (CS 1 gen)	KF	18 mm
Doxycyklin (tetracyklin)	DO	16 mm
Cefuroxim (CS 2 gen)	CXM	23 mm
Ciprofloxacin (chinol 3G)	CIP	21 mm
Ko-trimoxazol (směs)	SXT	16 mm
Kyselina oxolinová*(ch1G)	OA	19 mm

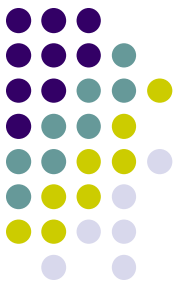
**alternativně norfloxacin (NOR)*



Úkol 7: Diagnostika kamylobaktera

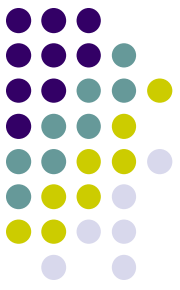
- **Kamylobaktera** si s předchozími bakteriemi nespletete. Neroste na běžných půdách, navíc jde o zahnutou tyčinku
- Prohlédněte si **kultivační výsledky** kultivace kamylobaktera a zapište popis do protokolu
- Prohlédněte si také **oxidázový test** (provede jej učitel demonstračně na bočním stole)

Několik poznámek k diagnostice kampylobakterů



- Kampylobaktery vyžadují v zásadě čtyři věci:
 - Svoji černou půdu –říkáme jí běžně „půda pro kampylobaktery“
 - 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

Úkol 8: Ureázový test v diagnostice helikobaktera



- *Helicobacter* také neroste na běžných půdách. Potřebuje asi pět dní na své speciální půdě, než je viditelný růst.
- Velice typické je štěpení močoviny. Na rozdíl od jiných biochemických testů v mikrobiologii zde můžeme pracovat přímo se vzorkem (žaludeční tkání) a nikoli s kmenem. V úkolu 8 uvidíte rozdíl mezi pozitivním a negativním výsledkem.

AstraZeneca  Hut-Test®

Patient: *EISHANN*

Datum/Date: 2005-09-09

Corpus Antrum

Befund/Result:

neg:	pos:
	

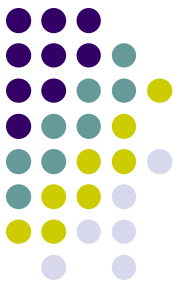
Ch.-B./Lot: FJ2809A1

verw. bis/Exp.: 09-2005



Rychlý ureázový test

Ureázový dechový test



- Pacientovi se podá těžkým izotopem uhlíku (^{13}C) nebo radioaktivním izotopem (^{14}C) 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**

Diagnostika čeledi *Vibrionaceae*



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

Úkol 9: diagnostika *Vibrionaceae*



- V **mikroskopii**, *Vibrio* je zahnutá tyčinka (podívejte se na obrázek na další obrazovce a zakreslete)
- Pro **kultivaci** používáme půdu TCŽS (pevnou půdu) a alkalickou peptonovou vodu (tekutá půda)
- Pro **biochemickou identifikaci** používáme týž Enterotest 16 jako pro enterobakterie, ale musíme použít jinou matici (v kódové knize či v počítači)
- **Antigenní analýzou** odhalíme dva hlavní serovary *Vibrio cholerae*: O1 a O139.
- **Detailnější diagnostika uvnitř serovaru O1** (na biotypy Classic a El Tor) vyžaduje další biochemické testování

Vibrio sp.

