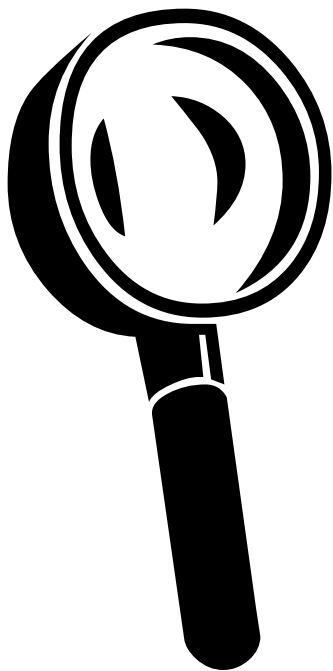


Mikrobiologický ústav uvádí

NA STOPĚ PACHATELE



Díl čtvrtý:

- 1) Desinfekce a sterilizace
- 2) Enterobakterie (a spol.)

Autor prezentace: Ondřej Zahradníček (kontakt: zahradnicek@fnusa.cz). K praktickému cvičení pro Bi7170c

Hlavní obsah

Dekontaminační metody – včetně bonusů

Enterobakterie – hlavní materiál

Bonus k enterobakteriím:
širokospektré betalaktamázy

DEKONTA- MINAČNÍ METODY

Obsah této části prezentace

Pohádka

Mikroby a vnější vlivy

Dekontaminační metody – přehled

Desinfekce

Umývání a desinfekce rukou

Vyšší stupeň desinfekce

Sterilizace

Kontrola účinnosti dekontaminace

Kontrolní otázky

Pohádka

- Byl jednou jeden král, a ten měl tři syny. Protože měl na noze **škaredý hnisavý vřed** a zároveň potřeboval rozhodnout, kdo bude následníkem trůnu, prohlásil, že panovat bude ten **princ, který ho toho škaredého vředu definitivně zbaví.**

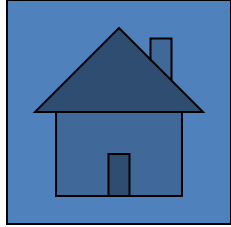
Co udělali první dva princové

- První dal vysterilizovat skalpel. Sterilizoval **dost dlouho**, ale **příliš nízkou teplotou**. Skalpel nebyl dost sterilní, a když princ tatínkovi vřed vyřízl, za několik dní zase zhnisal.
- Druhý dal také vysterilizovat skalpel. Sterilizoval **dost vysokou teplotou**, ale **příliš krátkou dobu** – a vedlo se mu stejně jako bratrovi.

Co udělal třetí princ

- Dal skalpel vysterilizovat na **teplotu, která byla dost vysoká, po dobu, která byla při dané teplotě vhodně dlouhá**. Tak se mu podařilo učinit nástroj skutečně sterilní. Tatínkovi tedy vyřízl vřed, stal se králem, vzal si sexy* princeznu a jestli nezemřel, žije dodnes s tou princeznou ve svém království a má kupu dětí.

Zní to blbě, že? Ale takový už je dnešní svět – muži říkají ženám, že jsou sexy, ačkoli ony by raději slyšely, že jsou krásné 😊



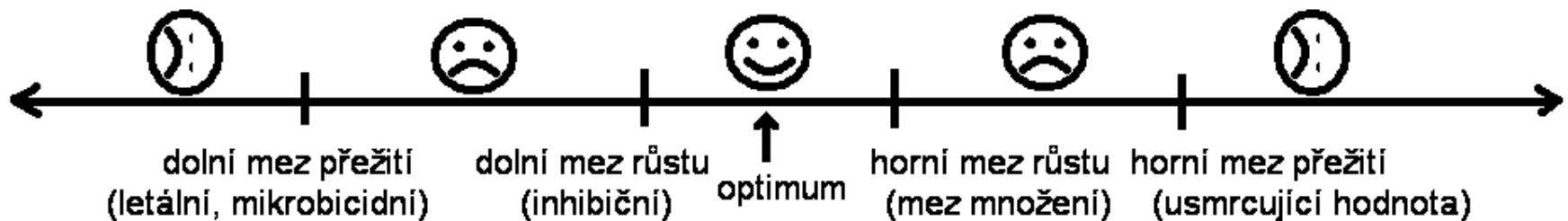
Poučení z naší pohádky

- Pokud se snažíme zahubit mikroby **fyzikálními či chemickými faktory**, musíme **dodržet jejich parametry**.
- Tyto parametry jsou přitom **vzájemně závislé**, tj. hodnota jednoho se mění v závislosti na druhém parametru.
- **Čas** je v naprosté většině případů **jedním z velice významných parametrů**.

Mikroby a vnější vlivy

Mikroby a vnější vlivy I

U dekontaminačních metod je bezpodmínečně nutné dosáhnout takových hodnot působícího fyzikálního či chemického faktoru, aby došlo k **usmrcení mikroba**.



Zajímá nás tedy primárně **mez přežití**, (zpravidla horní mez) **nikoli mez růstu** (ta nás zajímala, když jsme mikroby chtěli kultivovat).

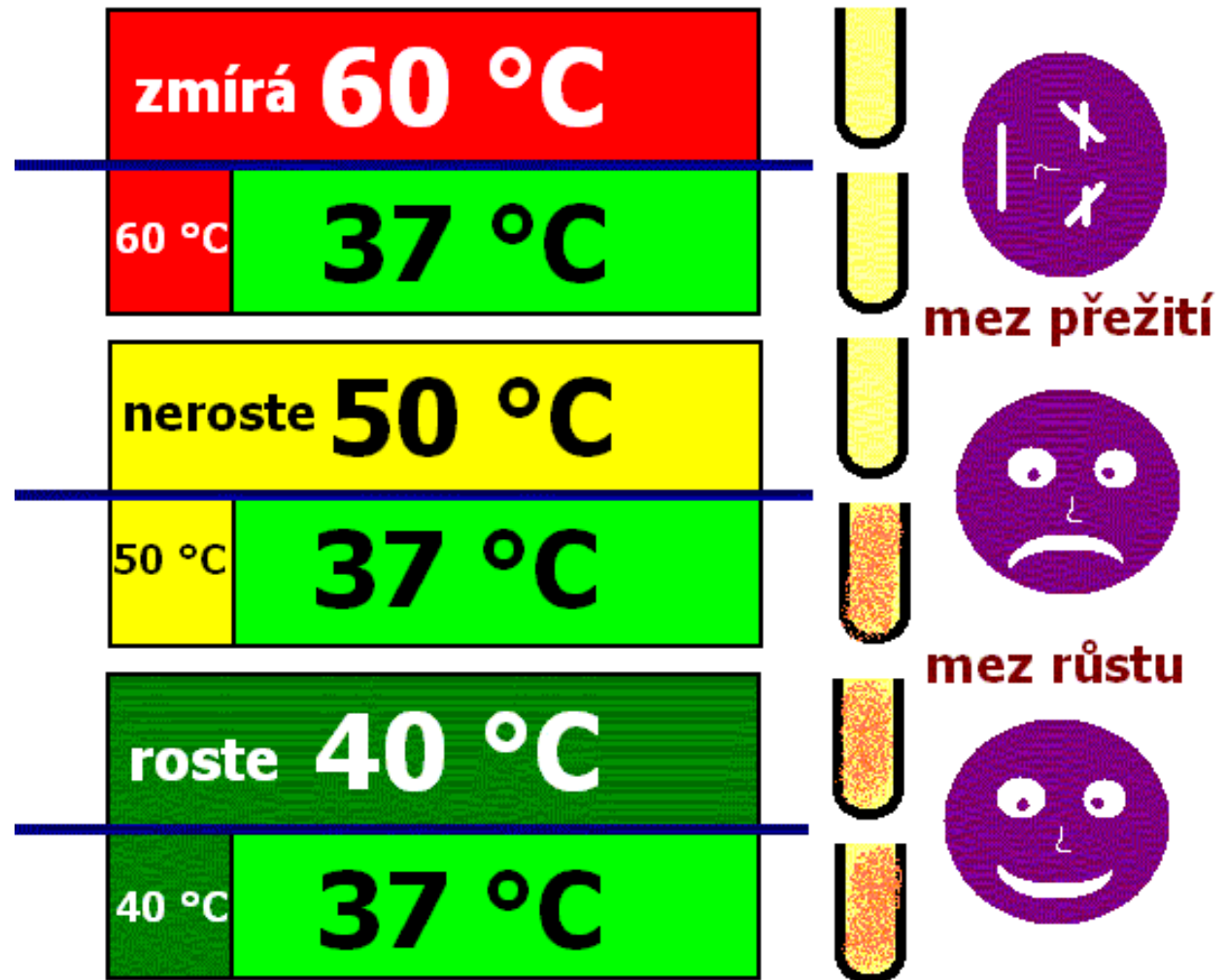
Praktické ověření meze přežití a růstu

- Pokud chceme ověřit **mez přežití** bakterií, musíme je po odstranění testovaných extrémních parametrů přemístit do podmínek růstového optima a nechat je tam dostatečně dlouho (pokud byly jen inhibovány, tak se zvetí).
- V opačném případě bychom ověřili pouze **mez růstu**, nikoli mez přežití (nedali bychom jim šanci se zvetit).

Nad čarou vždy **působíme určitou teplotou 24 h**

Pod čarou jen **4 h**, pak mikroby vrátíme do **teploty optimální**

*Metodologický
rozdíl*



Mikroby a vnější vlivy II

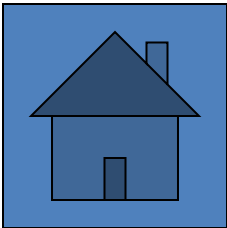
Někdy se účinek faktorů **kombinuje**

Faktor, který se kombinuje vždy, je **čas**

Rezistentní, sporulující bakterie	160 °C	170 °C	180 °C
20 min	přežívá	přežívá	hyne
30 min	přežívá	hyne	hyne
60 min	hyne	hyne	hyne

Faktor, který se vždycky kombinuje s ostatními: čas

- Všimněte si: čím je teplota nižší, tím musí být delší čas, aby bylo dosaženo kýženého sterilizačního účinku. To je zohledněno i ve vyhlášce při stanovení parametrů pro parní a horkovzdušnou sterilizaci.



Dekonta-
minační
metody –
přehled

Dekontaminační metody

- Jsou to **fyzikální** a **chemické** postupy **likvidace mikrobů, hmyzu a hlodavců** mimo organismus. *(Někteří hygienici kladou metody k odstranění hmyzu a hlodavců zvlášť jako tzv. asanační metody)*
- Mezi dekontaminační metody nepatří likvidace mikrobů v organismu, byť lokální (použití antiseptik).

Antiseptikum je lék.

Desinfekční prostředek není lék.

Přehled dekontaminačních metod

(Vyhláška 306/2012)

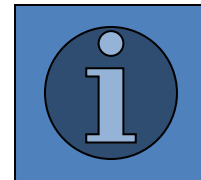
Sterilizace	Zničení všech mikrobů v daném prostředí
Vyšší stupeň desinfekce^a vícestupňová desinfekce	Zničení naprosté většiny mikrobů, některé formy života mohou přežívat (cysty prvoků apod.)
Desinfekce	Zničení patogenních mikrobů (závisí na okolnostech)
<i>Desinsekce</i>	<i>Zničení škodlivého hmyzu</i>
<i>Deratizace</i>	<i>Zničení škodlivých hlodavců</i>

*Materiály v praxi stále pracují se starší vyhláškou číslo 195/2005; rozdíly však nejsou příliš výrazné

Pojmy asepse a antiseptiky

(nejsou ve vyhlášce, ale jsou též důležité)

- **Asepse:** pasivně brání vniknutí infekce do takového prostředí
- **Antiseptiky:** postupy, které aktivně zasahují proti infekci
- Zásady asepse a antiseptiky vnesl
 - do chirurgie lord Joseph Lister
 - do porodnictví Ignaz Semmelweis

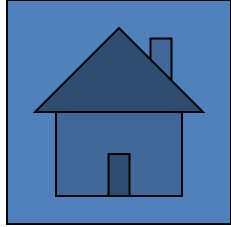


Zásady správné dekontaminace (bez ohledu na typ metody)

- Vybrat **vhodnou sterilizační/desinfekční metodu/prostředek**. „Vhodný“ znamená:
 - **musí bezpečně ničit** (St) všechny organismy, resp. (Df) všechny, které připadají v daném prostředí v úvahu
 - **nesmí ničit** desinfikovaný či sterilizovaný **materiál**
 - musí být **prakticky použitelný**
- Použít **dostatečnou intenzitu** faktoru (teplotu, intenzitu, koncentraci)
- Příslušný faktor musí působit **dostatečně dlouho**

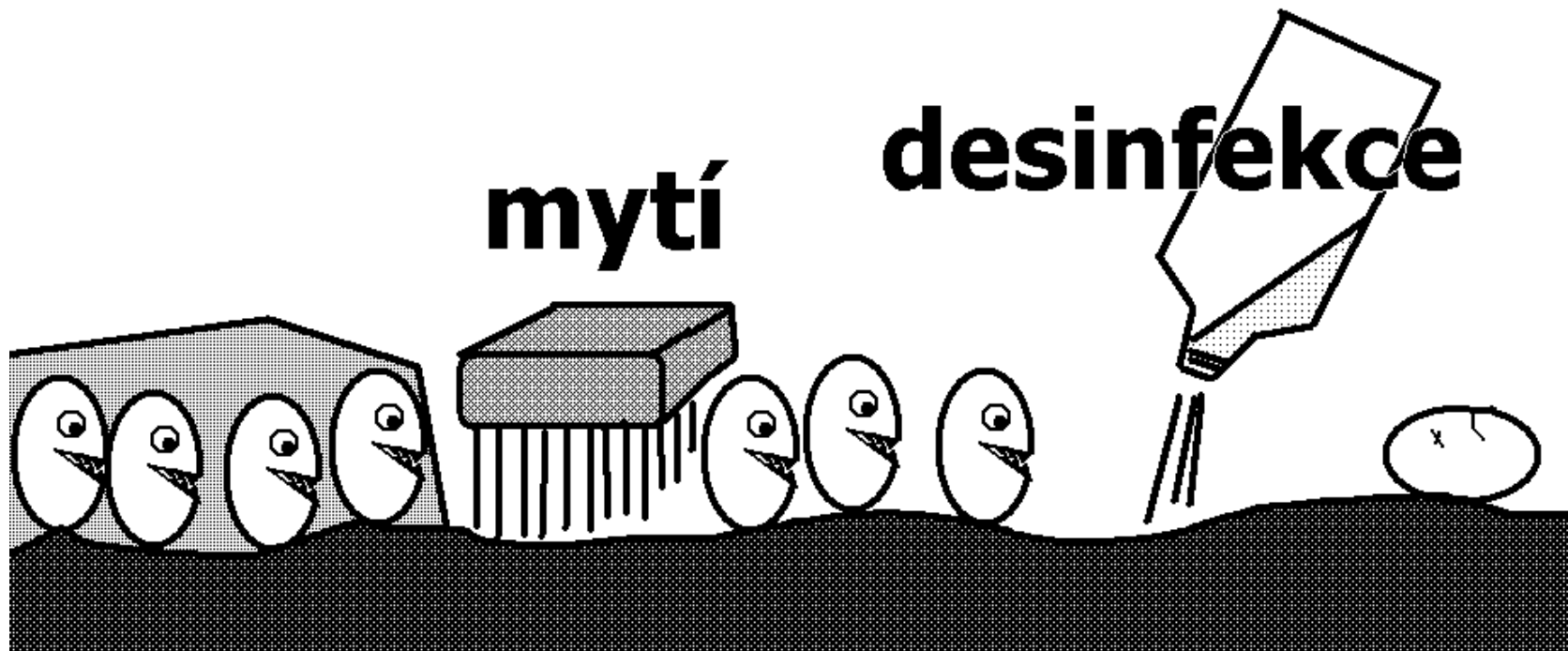
Před a po dekontaminaci

- **Před dekontaminací** je často nutná příprava – mechanické očištění, zajištění, aby dekontaminace správně proběhla. Tyto postupy opět přesně upravuje vyhláška
- **Po dekontaminaci** je v některých případech nutno učinit určité kroky (např. odvětrat zbytek působící chemikálie). Je nutno dbát na pravidla uchování dekontaminovaných předmětů.
- **Uchování dekontaminovaných předmětů** (jak dlouho vydrží sterilní) rovněž upravuje vyhláška



Dekontaminace a čištění

Mechanicky špinavé nástroje je třeba před dekontaminací mechanicky omýt, jinak není dostatečně účinná



Desinfekce

Desinfekce – příklady 1

- **A. FYZIKÁLNÍ METODY**
- 1. Var:
 - a) **za normálního tlaku** – ve zdravotnictví alespoň 30 minut. (Pro kuchyni stačí i méně, ale jídlo se musí provařit – i uvnitř!)
 - b) **v tlakových hrncích** – zkrácení času – ani v tom případě však nejde o sterilizaci!!!
- 2. **Jiné fyzikální metody** – filtrace, žíhání, slunění, UV záření apod.

Desinfekce – příklady 2

- **B. DESINFEKČNÍ PROSTŘEDKY**

- **Oxidační činidla**

- 3. Peroxidy: **kyselina peroctová** (CH_3COOOH , u nás Persteril). Na spory, houby a tuberkulózu; 0,5% roztok = vyšší stupeň desinfekce. Nevýhodou je agresivita, odbarvování textilií a nestabilita roztoků.
- 4. **Peroxid vodíku** (H_2O_2) – podobný, méně agresivní, také ale méně účinný.

Desinfekce – příklady 3

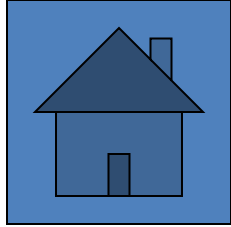
- 5. Halogenové preparáty – chlornany:
 - **chlornan sodný** (NaOCl), u nás Savo
 - **chlornan vápenatý** (Ca(OCl)_2 ; chlorové vápno)
- 6. **Chloramin** (Chloramin B; Chloraminy BM a BS jsou s přísadami).
- 7. **Jodová tinktura** + novější Jodonal B, Jodisol a Betadine, kde je jód vázán v komplexu. U nealergických pacientů by měl mít Jodonal B přednost před Ajatinem

Desinfekce – příklady 4

- 8. Manganistan draselný se již neužívá.
- 9. Formaldehyd – ve směsích
- 10. Kresol (lysol) je účinný, pro zápach a agresivitu se již téměř neužívá.
- 11. Ethylalkohol – ve směsi, sám není příliš účinný; Relativně nejúčinnější je asi 70 % roztok.
- 12. Tenzidy: Orthosan BF 12
- 13. Ajatin – běžný pro desinfekci pokožky.
- 14. Septonex – spíše antiseptikum.
- 15. Anorganické kyseliny a louhy, těžké kovy aj.
- 16. Kombinované přípravky, např. Incidur

Účinnost desinfekce na různé mikroorganismy

- V příručkách a jiných materiálech se zpravidla používá abecední systém:
- A = účinné na (vegetativní) bakterie a kvasinky
- B = účinné na viry
- C = účinné na bakteriální endospory
- T = účinné na tuberkulózní mykobakteria
- M = účinné na atypická mykobakteria
- V = účinné na vláknité houby



Vhodnost k různým účelům

Některé prostředky se hodí jen k něčemu: jsou třeba jen na povrchy, nebo jen na kůži.

Zpravidla desinfekční prostředky dělíme na

- prostředky na nástroje
- prostředky na povrchy
- prostředky na ruce (+ desinfekční mýdla)
- desinfekce potrubí v potravinářství
- desinfekce vhodná pro kuchyně

Umývání a desinfekce rukou

Umývání a desinfekce rukou

Pro ruce platí jiná pravidla než pro povrchy. Zpravidla na rukou nemáte tlustou vrstvu špíny 😊

Současná legislativa používá následující pojmy:

- **Mechanické mytí rukou (MMR)** je běžné mytí mýdlem jako součást osobní hygieny nebo jako krok předcházející CHDR
- **Hygienické mytí rukou (HMR)** používá desinfekční mýdla; je účinnější než MMR, ale méně účinné než HDR
- **Hygienická desinfekce rukou (HDR)** např. alkoholovými prostředky, doporučena ve zdravotnictví
- **Chirurgická desinfekce rukou (CHDR)**

Vizte též [tento odkaz](#)

Jak by měl vypadat zdravotníkův den z hlediska mytí a desinfekce?

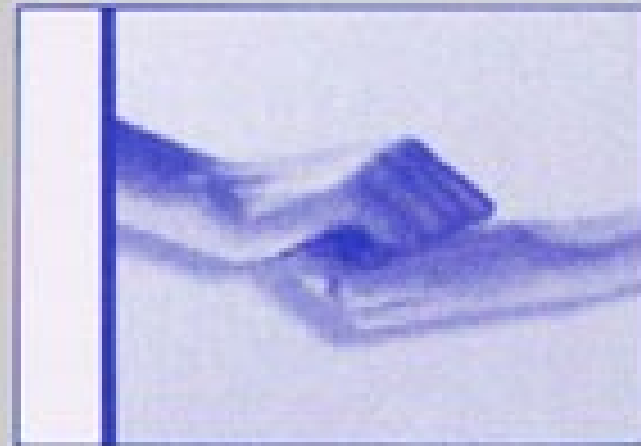
- **Při příchodu do práce** by si měl umýt ruce mýdlem a otřít ručníkem. Poté na suché ruce aplikovat alkoholovou desinfekci
- **Během pracovního dne** používat např. mezi pacienty pouze alkoholovou desinfekci, mytí zařadit jen při pocitu „lepivých rukou“
- **Před cestou domů** ruce zase umýt

Během pracovního dne je tedy doporučeno spíše jen desinfikovat, nikoli umývat ruce, jinak si ruce zničíte, ale mikroby nezničíte

Správný postup při mytí či desinfekci

- **1. krok:** Dlaň proti dlani.
- **2. krok:** Dlaň pravé ruky přes hřbet levé a naopak.
- **3. krok:** Dlaň proti dlani s propletenými prsty.
- **4. krok:** Vnější část prstů proti dlani s „uzamčenými“ prsty.
- **5. krok:** Sevřít pravý palec v levé dlani a vtírat krouživým pohybem a naopak.
- **6. krok:** Krouživé pohyby sevřených konečků prstů pravé ruky v levé dlani a naopak.
- **(7. krok:** Zápěstí levé ruky prsty pravé a naopak.)

Jak si mýt a desinfikovat ruce



1. Dlaň proti dlani



2. Hřbet dlaní druhé ruky

3. Mezi prsty

4. Klouby prstů proti dlani



5. Velmi důležitý palec (krouživým pohybem)



6. Špetka na rýhy v dlani




(7. Zápěstí)

Na která místa se nejčastěji zapomene

Nejčastěji opomíjená místa jsou znázorněna bleděmodře, tmavomodře tak místa rovněž poměrně často opomíjená.

normal microorganisms.

Areas frequently missed during handwashing

-  Most frequently missed
-  Frequently missed
-  Less frequently missed



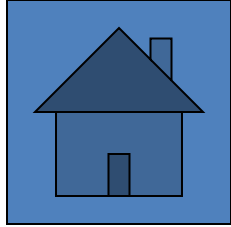
Oblíbená pověra

~~„Když používám rukavice,
nemusím si mýt a
desinfikovat ruce“~~

velmi nebezpečný nesmysl!

Existují systémy, umožňující pod UV zářením zkontrolovat stav desinfekce rukou



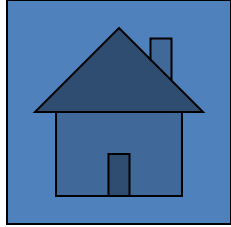


Návyky personálu obecně

- **Důležité od sanitářů až po primáře.**
- **Není vůbec samozřejmostí správná technika **mytí rukou**** – pro nácvik je nejlepší praktické otestování
- **Používání rukavic**, popř. ústenek aj.
- Správná **manipulace s jehlami** po použití
- **Organizace práce** (oddělení „čisté“ a „špinavé“ manipulace místem a/nebo časem na všech úrovních: špinavé a čisté vozíky, vyčlenění místa pro přípravu infuzí a jiného pro manipulaci s biologickým materiálem apod.)

Vyšší stupeň
desinfekce

Vyšší stupeň desinfekce a vícestupňová desinfekce



- „něco mezi sterilizací a desinfekcí“
- na rozdíl od sterilizace **nemusí zničit** například cysty prvoků nebo vajíčka červů.
- glutaraldehyd, Sekusept nebo Persteril
- **koncentrace vždy jsou vyšší** než pro běžnou desinfekci
- k ošetřování **flexibilních endoskopů**, kde nelze použít žádné metody sterilizace.
- „vyšší stupeň“ je o něco účinnější, používá se pro endoskopy umístované do míst normálně sterilních, „vícestupňová“ slouží hlavně pro trávicí trakt

Sterilizace

Sterilizace – příklady I

- 1. **Sterilizace horkou parou pod tlakem** (autoklávování). Pára musí být právě nasycená. Hodí se na předměty ze skla, kovu, keramiky, kameniny, porcelánu, textilu, gumy a některých plastů. Teploty 121–134 °C. (už se nepoužívá dříve povolených 115 °C!)
- 2. **Sterilizace horkým vzduchem** (u přístrojů s nucenou cirkulací vzduchu 180 °C 20 minut nebo 170 °C 30 minut nebo 160 °C hodinu). Hodí se na kovy, sklo, porcelán a kameninu.
- 3. **Sterilizace horkou vodou pod tlakem** – již se v praxi nepoužívá

Sterilizace – příklady II

- 4. **Sterilizace gama zářením:** používá se většinou při průmyslové výrobě, např. rukavic na jedno použití.
- 5. **Plasmová sterilizace** ve vysokofrekvenčním elektromagnetickém poli (moderní metoda)
- 6. **Chemická sterilizace parami formaldehydu nebo ethylenoxidem** (musí být přesně dodržen postup). Používá se tam, kde nelze použít fyzikální metody.

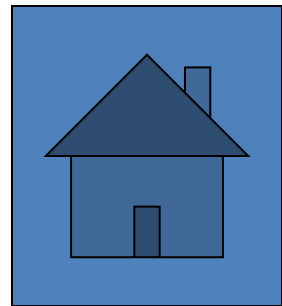
Sterilizace – příklady III

(co není ve vyhlášce)

- 7. **Sterilizace ohněm** se používá prakticky jen u mikrobiologických kliček, protože většinu materiálů silně poškozuje. Spalování se hodí u odpadů.
- 8. **Paskalizace** je sterilizace tlakem, používaná v potravinářství
- 9. **Ostatní metody:** frakcionovaná sterilizace, filtrace roztoků aj. jsou speciální, používají se ve výzkumu, ne v medicíně

Která metoda má být použita

- Vhodnost metody je dána **odolností příslušného materiálu** vůči různé teplotě, vlhkosti, chemikáliím a dalším faktorům
- V každém případě je nutno dodržet parametry **(teplotu v °C, tlak v kPa, dávku záření v Gy)** a vždy samozřejmě také čas!

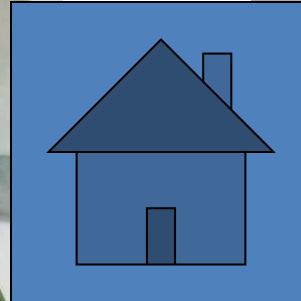


Kontrola
účinnosti
dekonta-
minace

Kontrola, zda byla dekontaminace provedena, a kontrola její účinnosti

- **Orientačně – smyslově** – např. pomocí charakteristického zápachu
- **Stanovení skutečné koncentrace** desinfekčních prostředků (chemicky)
- **Chemická kontrola sterilizace** využívá indikátorů, které při určité teplotě mění vlastnosti (např. zbarvení)
- **Způsob biologický** užívá odolné kmeny rodu *Bacillus*. Ty absolvují celý cyklus a pak se zjišťuje, zda přežily.

Foto O. Z.



K o n e c



Lord Joseph Lister

(* 5. dubna 1827 - † 10. února 1912)

anglický lékař

Lister byl ovlivněn Pasteurovými a Kochovými pracemi o bakteriích. A tak se rozhodl, že se nákaze při operaci musí předejít. Udává se, že první operaci pod antiseptikou provedl Lister v roce 1865. Antiseptiku docílil obvazem nasáklým karbolovou kyselinou. Nedlouho po tom, v roce 1867 na sjezdu anglických lékařů v Dublinu, přednesl Lister sdělení o antiseptice. Zde měl naprostý neúspěch. Lister se však nedal odradit. V témže roce publikoval své názory na zavádění antiseptiky v anglickém lékařském časopise Lancet.

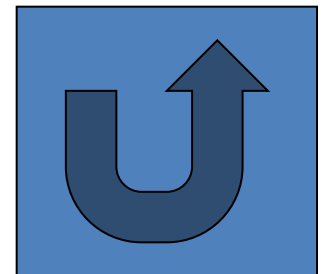
V sedmdesátých letech 19. století už se našli chirurgové, kteří s ním souhlasili a přidávali se k němu. A tak byl v roce 1891 otevřen v Londýně Listerův ústav preventivního lékařství.

Podle Listera se jmenuje bakterie Listeria (viz P03)

http://cs.wikipedia.org/wiki/Joseph_Lister

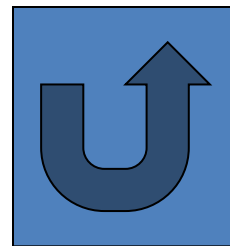


http://cs.wikipedia.org/wiki/Soubor:Joseph_Lister.jpg



Ignaz Fülöp Semmelweis

(1. července 1818 Budín, dnes Budapešť
– 13. srpna 1865 Döbling, dnes Vídeň)
maďarský lékař pracující v porodnictví



Vyslovil teorii, že tzv. horečku omladnic přenáší sami lékaři při vyšetření a rození, a ustanovil hygienické zásady, jak epidemii potlačit. I přes evidentní úspěchy při aplikaci se jeho teorie setkala s prudkým odporem zejména starších kolegů, kteří odmítali připustit, že by za smrtí pacientek mohli stát oni sami. Někteří další jeho kolegové tuto pravdu neunesli – např. profesor Gustaf Michaelis, který jeho postupům uvěřil a úspěšně je zavedl na svém pracovišti, spáchal sebevraždu (mezi ženami, které dříve po porodu u něj zemřely na horečku omladnic, byla i jeho milovaná neteř). K neúspěchům doktora Semmelweise ovšem přispěla i jeho popudlivost a neschopnost a neochota zpracovat svá bezesporu přesná pozorování a experimenty do vědecky přijatelné a publikovatelné podoby. I tak se řadí mezi nejvýznamnější lékaře 19. století a býval nazýván Zachránce matek.

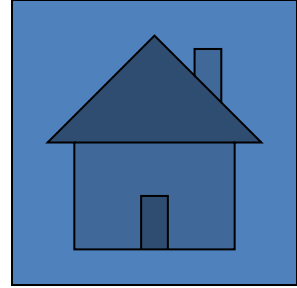
http://cs.wikipedia.org/wiki/Ign%C3%A1c_F%C3%BCl%C3%B6p_Semmelweis



www.answers.com/topic/ignaz-semmelweis
http://upload.wikimedia.org/wikipedia/en/a/ac/Wiener_AKH_zur_Zeit_der_Eroffnung_im_Jahre_1784.jpg



Kontrolní otázky



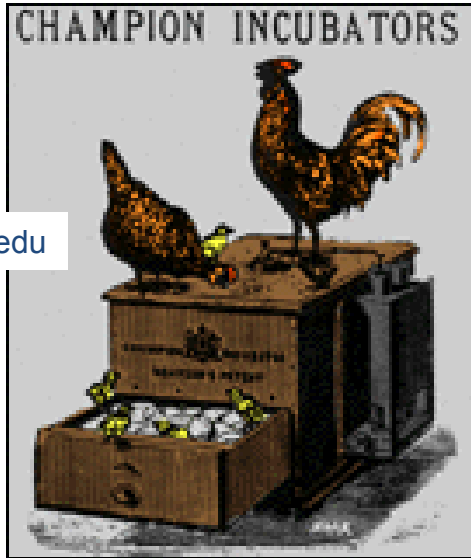
- 1. Jaké časy a teploty jsou předepsány pro horkovzdušnou sterilizaci?
- 2. Existuje desinfekční postup doporučený pro použití na chirurgickém oddělení. Lze tento postup vzít a bez dalšího prověřování použít v tuberkulózní léčebně?
- 3. Proč se dnes postupům např. pro dekontaminaci flexibilních endoskopů říká „vyšší stupeň desinfekce“ a nikoli „chemická sterilizace“ jako dříve?
- 4. Právě proběhl sterilizační cyklus s bioindikátorem. Jaký bude následovat krok, chceme-li ověřit funkci sterilizátoru?
- 5. Jaké jsou předepsané teploty a časy pro autoklávování?
- 6. Jaký je chemický základ účinnosti Betadiny?
- 7. Jaký je vztah mezi desinfekcí a mechanickým čištěním?
- 8. Jak lze uspořádat testování účinnosti desinfekční látky?
- 9. Jak lze provést testování účinnosti sterilizátorů pomocí bioindikátoru?

ZPĚT NA HLAVNÍ OBSAH PREZENTACE

ENTERO-

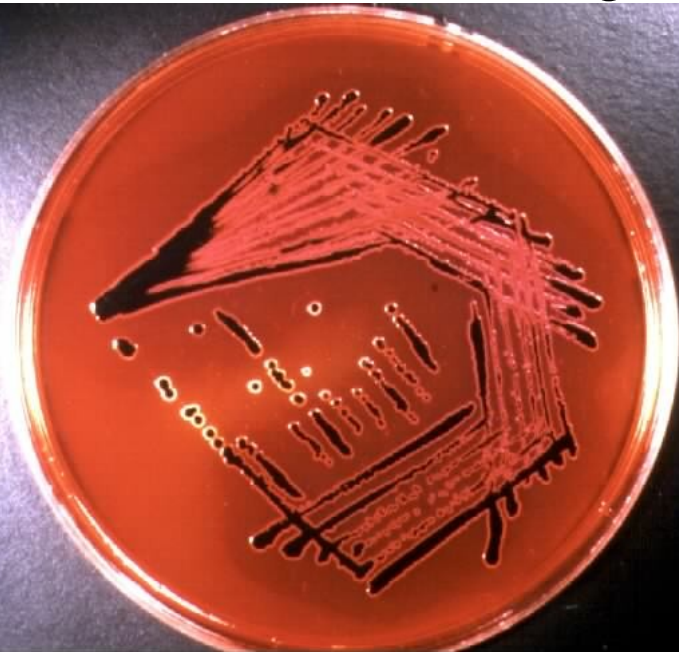
BAKTERIE

Na začátek báseň...



<http://www.uwec.edu>

Salmonella na MAL agaru



Nemůžem vždy slepici
kontrolovat stolici.

Jednou projdem drůbežárnou
a stolici najdem zdárnou.

Přiletí však holub bělý
zanese tam salmonely.

Odnesou pak vejce
pro cukráře – strejce

Cukrář – strýček nevinný
nadělá z ní zmrzliny

Mládež sní ji s důvěrou
a všichni se...

Foto: Mikrobiologický ústav, autor fotografie: prof. MVDr. Boris Skalka, DrSc.

Přehled témat

Klinický popis: Enterobacterales

Campylobacter, Helicobacter, Vibrio, Aeromonas

Obrázky bakterií

Diagnostika enterobakterií

Dg. *Campylobacter, Helicobacter, Vibrio, Aeromonas*

Klinický popis: Enterobacterales

Příběh první

- Slečna Tereza je mlsná. Dnes si po obědě dala krémový zákusek. Odpoledne ji začala zvracet a měla průjem. 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.

Primární patogeny z řad enterobakterií

- *Enterobacterales* je klinicky nejdůležitější řád gramnegativních tyčinek (ale důležitý je i pro ne-klinická odvětví mikrobiologie)
- Řád zahrnuje především čeleď *Enterobacteriaceae*, některé enterobakterie ale budou pravděpodobně přeřezeny do nových čeledí. Pojem „enterobakterie“ se tedy týká řádu *Enterobacterales*
- Nejhorší patogeny způsobují celkové infekce: je to *Yersinia pestis* (způsobuje mor) a tzv. antropopatogenní serovary salmonel (serovary Typhi, Paratyphi A, Paratyphi B a Paratyphi C – způsobují břišní tyfus – onemocnění s vysokými horečkami a bolestí hlavy)
- 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*

Bacilární úplavice (shigelóza) z hlášení KHS JMK za květen 2008

Shigelóza (A03)

- Rodinný výskyt – dítě nar. 2005 z Brna, rómské národnosti. První příznaky 10. 5. **Teplota 38 °C, průjem, zvracení.** Hospitalizace na KDIN FN Brno od 12. 5., kultivačně *Shigella sonnei*.
V epidemické souvislosti hospitalizovány 17.5. a 22. 5. další 3 děti nar. 2003, 2002, 1994. Ve všech případech potvrzena *Shigella sonnei*.

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** naproti tomu stačí malá infekční dávka, takže se snadno přenesou špinavýma rukama, klikou od záchodu nebo kontaminovanou vodou.
- Existují také **klinické rozdíly** (rozdílný charakter průjmu apod.). Například shigelóza má svůj specifický název – **bacilární úplavice/dysenterie** (neplést s amébovou úplavicí)

*Aby to bylo s taxonomií enterobakterií ještě složitější, mnoho současných taxonomů tvrdí, že rod *Shigella* ve skutečnosti neexistuje; shigely nejsou nic jiného, než zvláštní kmeny *Escherichia coli*. Nicméně se z mnoha praktických důvodů stále v praxi chováme tak, jako kdyby shigely existovaly.

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?

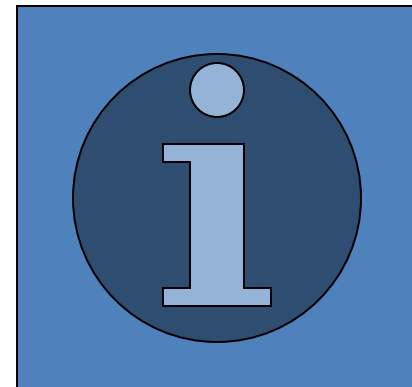
- Viníkem je *Escherichia coli*, respektive její uropatogenní kmen (uropatogenní *E. coli* – UPEC)
- Viníkem by mohla být i kterákoli jiná z podmíněně patogenních enterobakterií (ale i obligátně patogenní kmeny, např. salmonely, se uplatňují)
- *Escherichia coli* je jednou z nejdůležitějších součástí střevní mikroflóry, kde je zdraví prospěšná: produkuje bakteriociny, které nedovolí jiným bakteriím kolonizovat sliznici. *Escherichia coli* dokonce zásobuje tělo vitamíny (zejména E a K).
- *Escherichia coli* byla objevena německo-rakouským profesorem Theodorem Escherichem (zemřel 1911)

Patogenita *Escherichia coli*

- Uvnitř střeva
 - EPEC (enteropatogenní EC)
 - ETEC (enterotoxické EC)
 - EIEC (enteroinvazivní EC)
 - STEC (shiga-toxigenní EC), tato skupina také zahrnuje EHEC – enterohemorhagické *E. coli*)
 - EAggEC (enteroaggregativní *E. coli*)
 - Kombinace (STEC + EAggEC = kmen O:104H:4, který způsobil těžkou epidemií v Německu 2011)
- Mimo střevo
 - UPEC (uropathogenní *E. coli*)
 - Kmeny způsobující respirační infekce
 - Kmeny způsobující sepse, infekce ran atd.

Multirezistentní enterobakterie

- Problémem moderní doby je přítomnost kmenů enterobakterií, které jsou rezistentní na mnoho antibiotik. Mohou to být kmeny různých druhů. Jde zejména o produkci širokospektrých betalaktamáz typu ESBL, případně ampC.



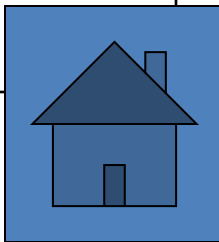
Některé další oportunně patogenní enterobakterie

- *Enterobacter, Klebsiella, Pantoea* – často opouzdřené, mukózní kolonie. Zejména klebsiela je častým původcem nemocničních infekcí (dýchací cesty, cystitidy)
- *Proteus, Providencia, Morganella* – proteolytické kolonie (v diagnostice typický zápach jejich kolonií). Občasní původci infekcí močových cest a dalších infekcí
- *Citrobacter* – biochemicky podobný salmonele, ale má pozitivní ONPG test
- *Hafnia* – primární patogen včel

Přehled enterobaktérií

Příběh	Patogenita	Příklady
–	Systemová	<i>Y. pestis</i> , AP** salmonely
1.	Střevní	ZP* salmonely, shigely, yersinie
2.	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



Klinický popis:

Campylobacter,

Helicobacter, Vibrio a

Aeromonas

Příběh třetí

- 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 průjmové 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. Není nijak blízce příbuzná enterobakteriím, dokonce patří do jiné třídy – epsilonproteobakterie (zatímco enterobakterie jsou gamaproteobakterie). Nicméně je kamylobakteriíóza svým průběhem a závažností srovnatelná se salmonelózou
- Počet případů u nás je v posledních letech výrazně vyšší než počet případů salmonelózy. Je to dáno lepší diagnostikou, ale také úbytkem salmonelózy v důsledku očkování kuřat proti nejběžnějšímu serotypu salmonely (*Salmonella* Enteritidis)

Odbočka, ale pro praxi důležitá: Něco málo o odběru stolice

- Zatímco na parazitologii a virologii je nezbytná kusová stolice, na bakteriologii sice není chybou ji poslat, ale není nutná
- Dříve se posílaly výtěry z řitního kanálu na suchém tampónu, nebo se používaly takzvané rektální rourky (natíraly se glycerinem, aby odběr nebolel – as. Zahradníček to při svých začátcích ještě zažil, děti ve školce to stejně snášely dost špatně)
- Dnes je metodou volby tampon zanořený do transportního média (nejlépe Amiesova). Je to právě především kvůli kampylobakterům

Příběh čtvrtý

- Pan Žáha má problém: pálí ho žáha. Problémů má více, už také zvracel krev a je pravděpodobné, že má peptický vřed.
- 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 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.
- *Helicobacter* patří do třídy Epsilonproteobacteria, řád Campylobacterales, čeleď *Helicobacteraceae*

Jak zločinec přežívá v extrémně nepříznivém prostředí žaludku?

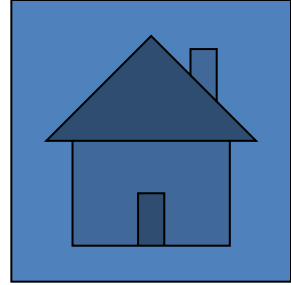
- Upravuje si své mikroprostředí – alkalizuje si ho, štěpě močovinu
- Močovina se rozštěpí na kyselý oxid uhličitý, který vyprchá, a zásaditý čpavek, který zůstane a alkalizuje prostředí
- Štěpení močoviny probíhá podle reakce:



Příběh pátý

- Pan Exot miloval exotickou dovolenou. Byl zvyklý pít **vodu z místních zdrojů**.
- A tak se ani nedivil, že dostal **průjem**.
- Tentokrát to ale bylo horší než obvykle. Průjem byl **silný a vodnatý**.
- **Příjem vody ústy nestačil**. Až infusní doplnění chybějících tekutin mu pomohlo.

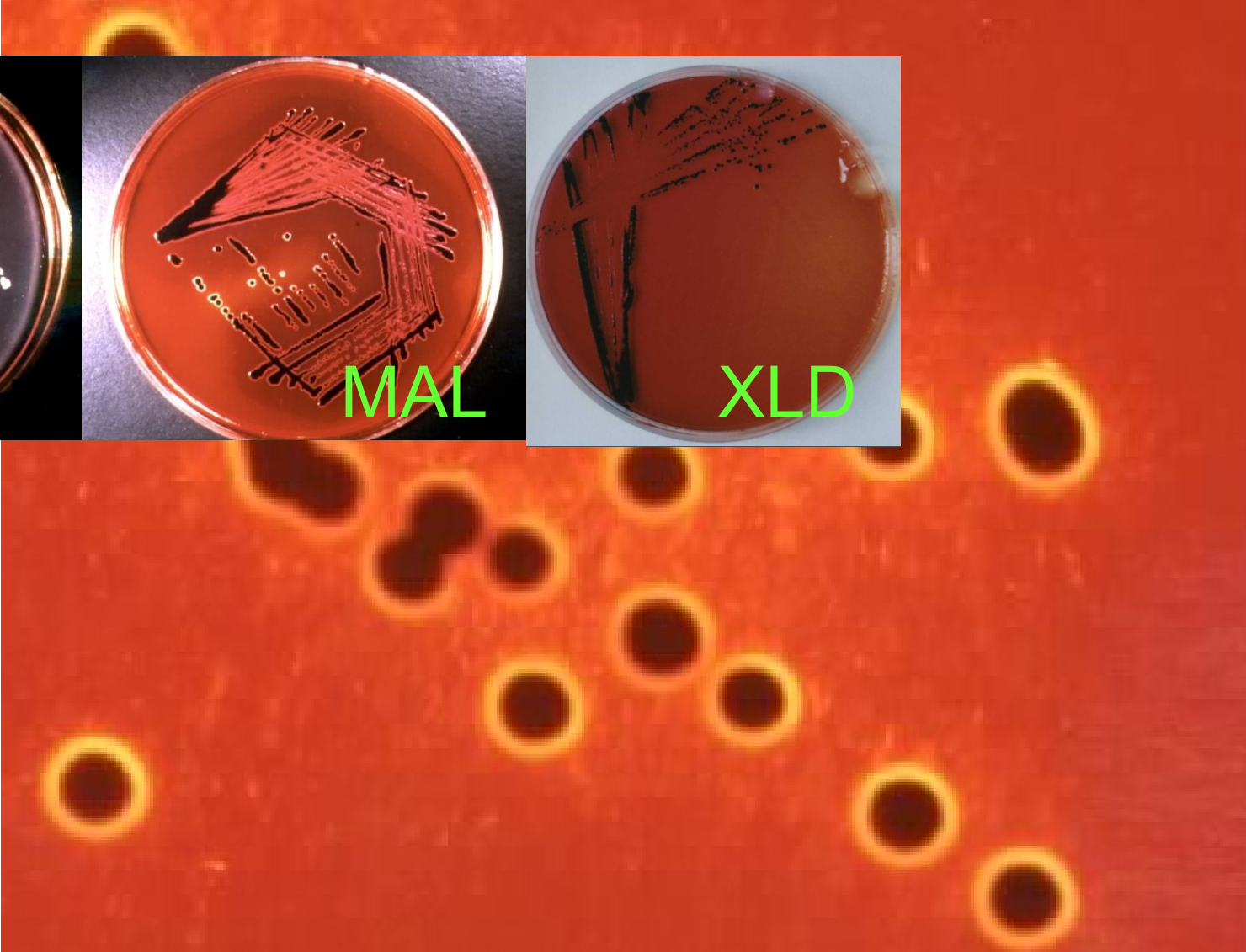
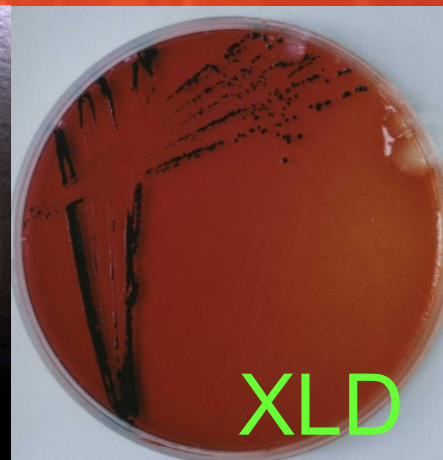
Vibria a aeromonády



- Společně s enterobakteriemi patří mezi gamaproteobakterie, náleží ale do samostatných řádů Vibrionales a Aeromonadales.
- *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* také způsobuje ranné infekce, například při přípravě jídel z ryb a plodů moře.

Obrázky bakterií

Fotografie z databáze zločinců: Salmonela

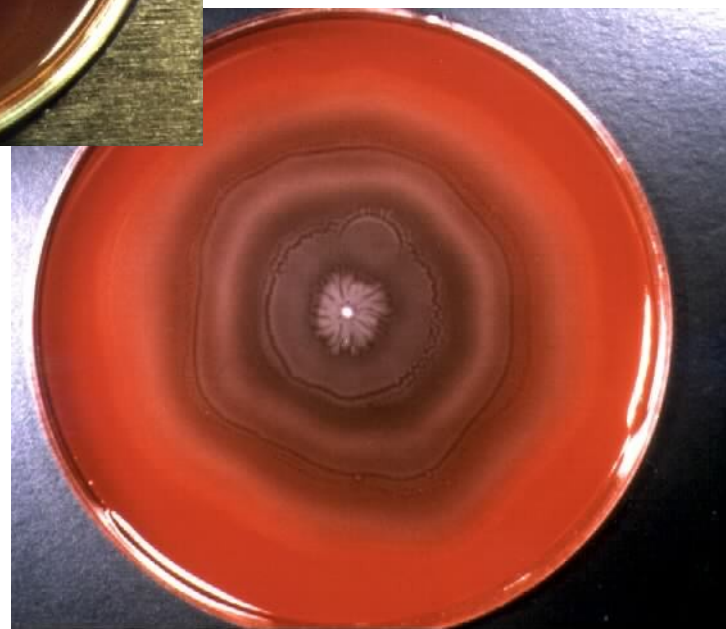


Proteus mirabilis, *P. vulgaris* (dole)

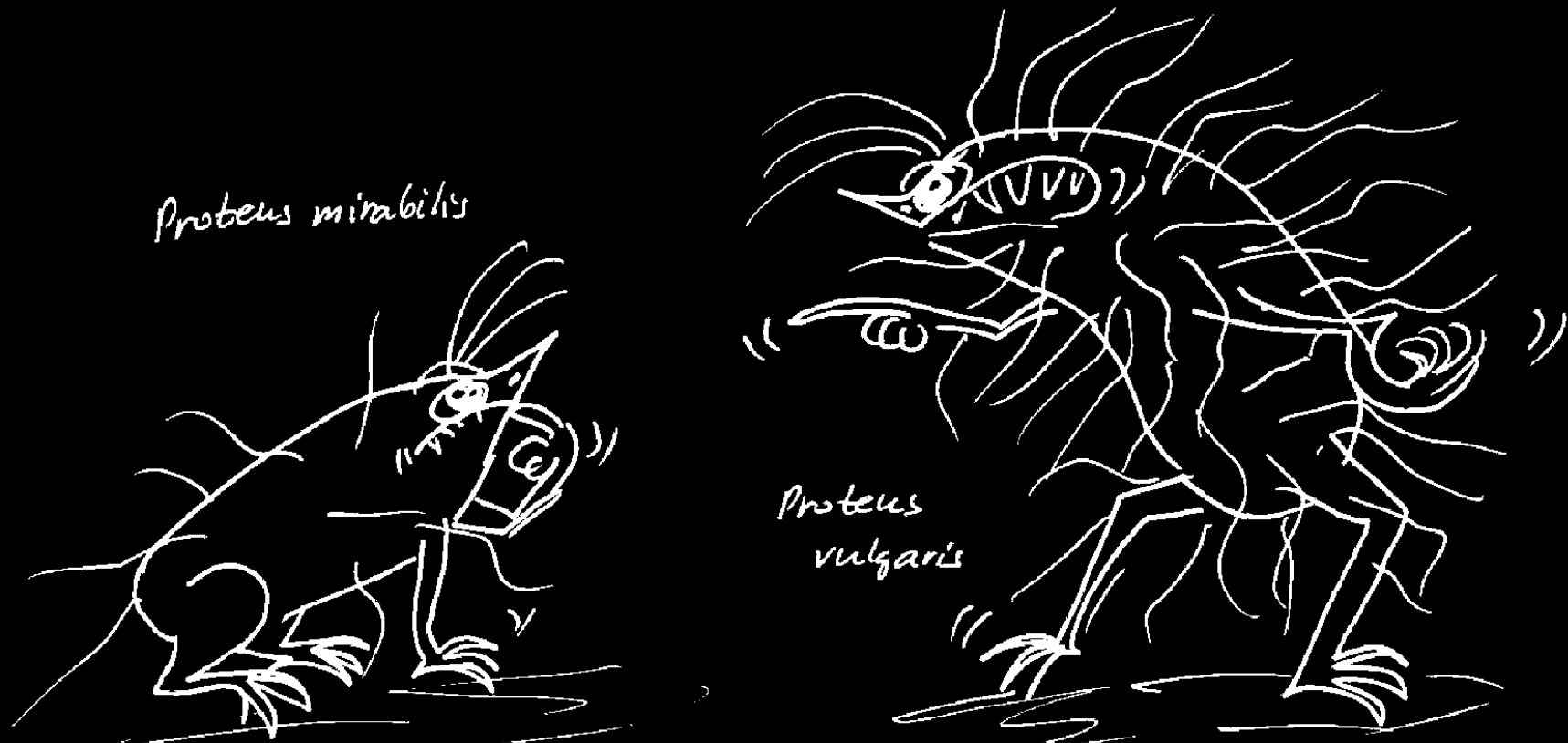


Foto:
Mikrobiologický
ústav

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)



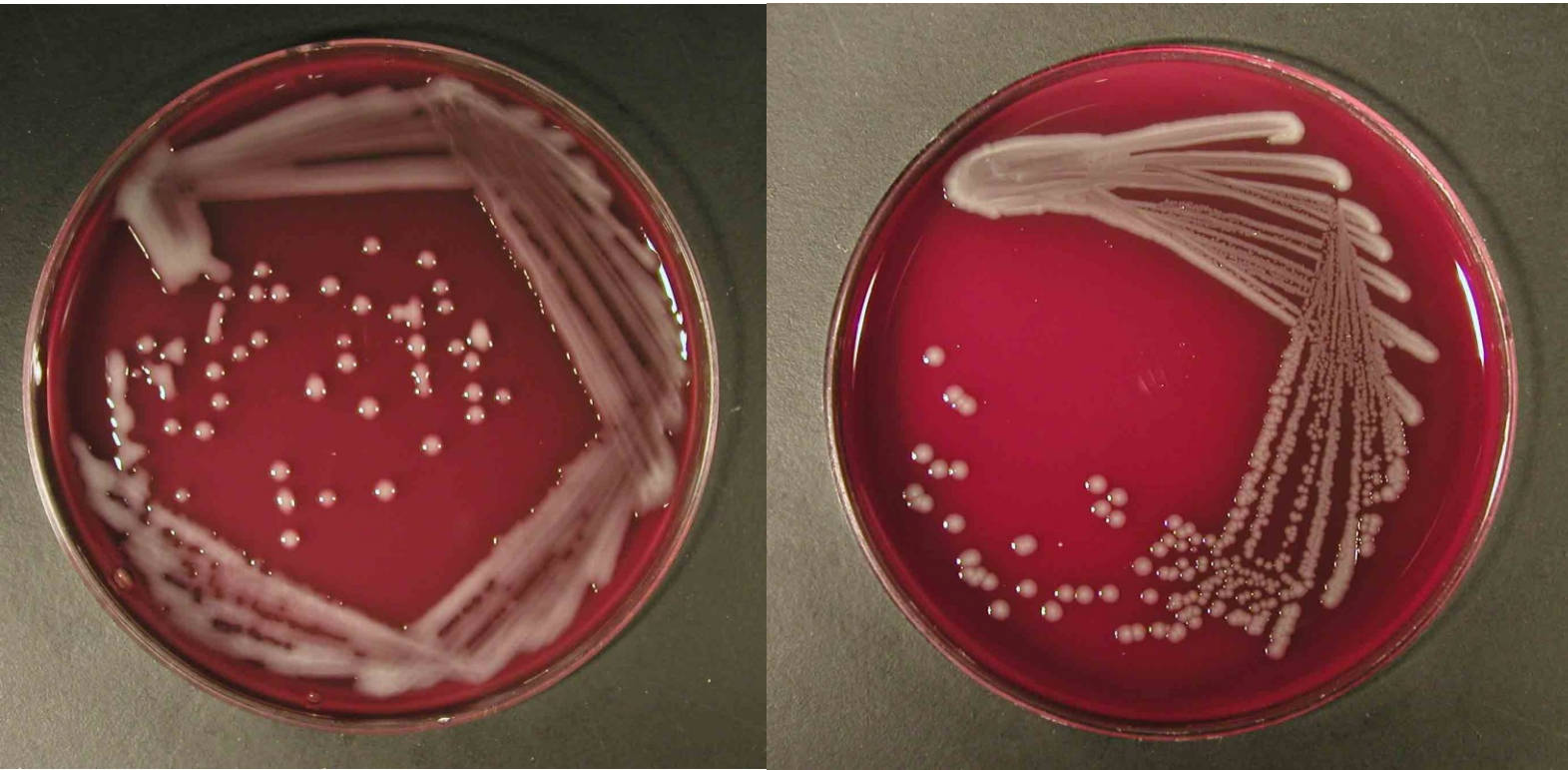
Proteus dle as. Petra Ondrovčíka



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

Klebsiely a escherichie

Foto:
Mikrobiologický
ústav



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

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

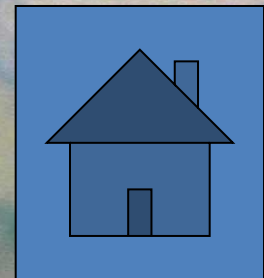
Escherichie



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

Jeden méně známý helikobakter

Helicobacter cinaedi



Diagnostika enterobakterií

Enterobakterie – metody

- Přímé metody
 - Mikroskopie – v praxi má malý význam, protože je jich mnoho a v mikroskopu jsou všechny stejné. Nicméně v praxi 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

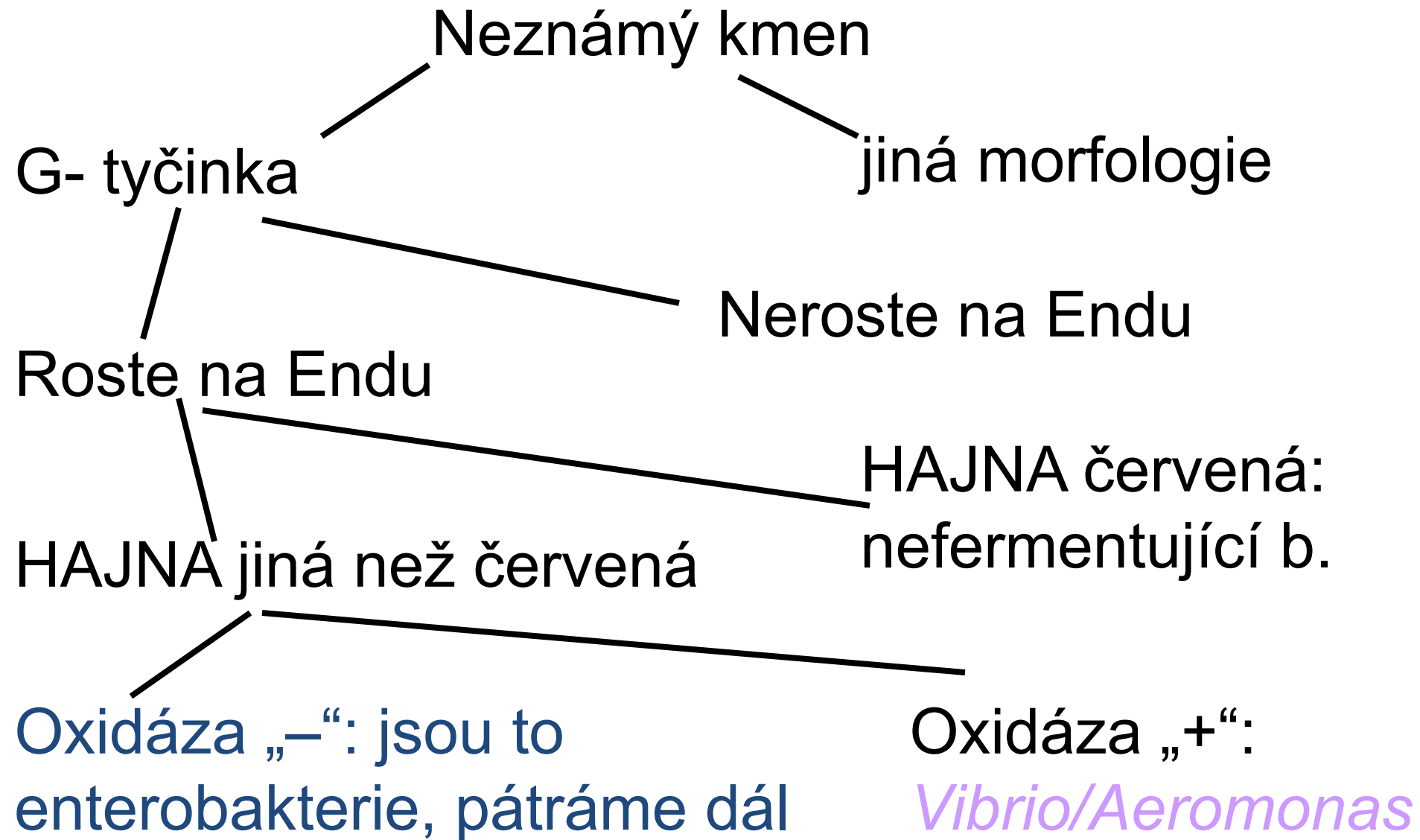
Odlišení od ostatních podezřelých (diferenciální diagnostika)

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

Gramnegativní tyčinky – vzájemné rozlišení skupin rostoucích na Endově agaru

- **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

Diagnostický algoritmus



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, Švejcárova plotna, ENTEROtesty aj.
- Antigenní analýza zpravidla sklíčkovou aglutinací
- *Diagnostika kamylobakterů, helikobakterů a vibrií bude probrána zvlášť.*

Štěpení laktózy

- Laktóza pozitivní bakterie mají na Endově půdě tmavočervené okolí. Laktóza negativní mají okolí bledé.



Kultivační charakteristika některých 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 rostou **yersinie** v drobných, tmavě růžových koloniích.



Salmonela na MAL agaru

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.

**tvar doporučený Ústavem pro jazyk český*

Antigenní analýza

- Antigenní analýza se v diagnostice 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*

Oba případy jsou demonstrovány příklady

Aglutinace *E. coli* na průkaz EPEC

- 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“**

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

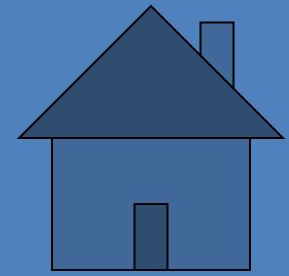
- Antibiotická citlivost se zásadně neurčuje u kmenů ze stolice. *(U bakteriálních průjmů většinou podání antibiotik paradoxně prodlužuje dobu vylučování patogena ze střeva; spíše než antibiotika se tedy užívá dieta a v rekonvalescenci probiotika.)*
- Určuje se tedy zpravidla u kmenů z moče, proto i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

Ještě k citlivosti na antibiotika

- Sestava užívaná v tomto úkolu je takzvaná „GNTM“ sestava, jedna z těch, které se u nás užívají:
 - **Pro jiné než močové infekce** máme G1 (základní sestava s převahou perorálních látek), G2 a G3 (spíše parenterální a širokospektrá antibiotika).
 - **Pro močové infekce** je test upraven: GNTM (základní) a G2M; G3 je stejný jako u jiných než močových infekcí
- Ačkoli obě varianty obsahují při kombinaci všech tří sestav 21 antibiotik, existují producenti betalaktamáz, které jsou citlivé jen na 4–6 z nich. U producentů karbapenemáz je situace ještě horší.*

Tabulka zón citlivosti

– příklad



Antibiotikum	Zkratka	„C“ je (mm)	„R“ je (mm)
Ampicilin (aminopenicilin)	AMP	≥ 14	< 14
Cefazolin (CS 1 gener.)	KF	≥ 15	< 14
Ko-trimoxazol (směs)	SXT	≥ 16	< 13
Nitrofurantoin (nitrofurán)	F	≥ 11	< 11
Tetracyklin (tetracyklin)	TE	≥ 15	< 12
Cefuroxim (CS 2 gener.)	CXM	≥ 18	< 18
Norfloxacin (chinolon)	NOR	≥ 22	< 19

**platí také pro doxycyklin*

Ani S, ani R → intermediární („I“)

Diagnostika rodů

Campylobacter, a

Helicobacter, *Vibrio* a

Aeromonas

Diagnostika kamylobaktera

- **Kamylobaktera** si s předchozími bakteriemi nespletete. Neroste na běžných půdách, navíc jde o zahnutou tyčinku
- Jde o stříbřité kolonie s náznakem plazení jako u protea
- Má pozitivní **oxidázový test**

Několik poznámek k diagnostice kampylobakterů

- Kampylobaktery vyžadují v zásadě čtyři věci:
 - Svoji **černou půdu** – říkáme jí běžně „půda pro kampylobaktery“, název CCDA se příliš nevžil
 - **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

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 tkáně) a nikoli s kmenem. V úkolu 8 uvidíte rozdíl mezi pozitivním a negativním výsledkem.

Ureázový dechový test (anglicky urea breath 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 vibrií a aeromonád

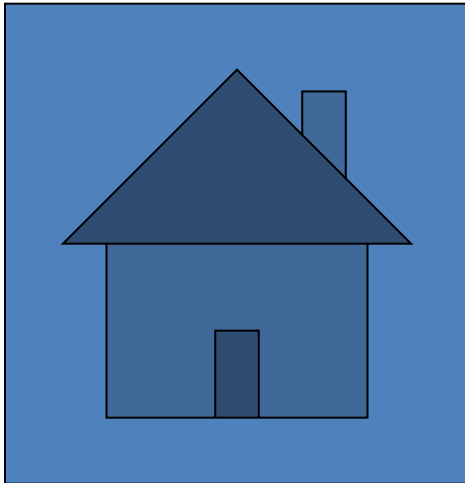
- Provádí se podobně jako u enterobakterií, ale jsou oxidáza pozitivní.
- **Mikroskopicky** jsou vibria pohyblivé, zahnuté tyčinky
- Používá se také **speciálních pŮd**, například alkalická peptonová voda a TCŽS (Thioglykolát, cystein, žlučové soli)
- Používá se MALDI-TOF, popřípadě **obdobných biochemických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

Diferenciální dg. vibrií a aeromonád

- 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

Konec

Foto:
Mikrobiologický
ústav



ZPĚT NA HLAVNÍ OBSAH PREZENTACE

Bonus: Širokospektré betalaktamázy (ESBL)

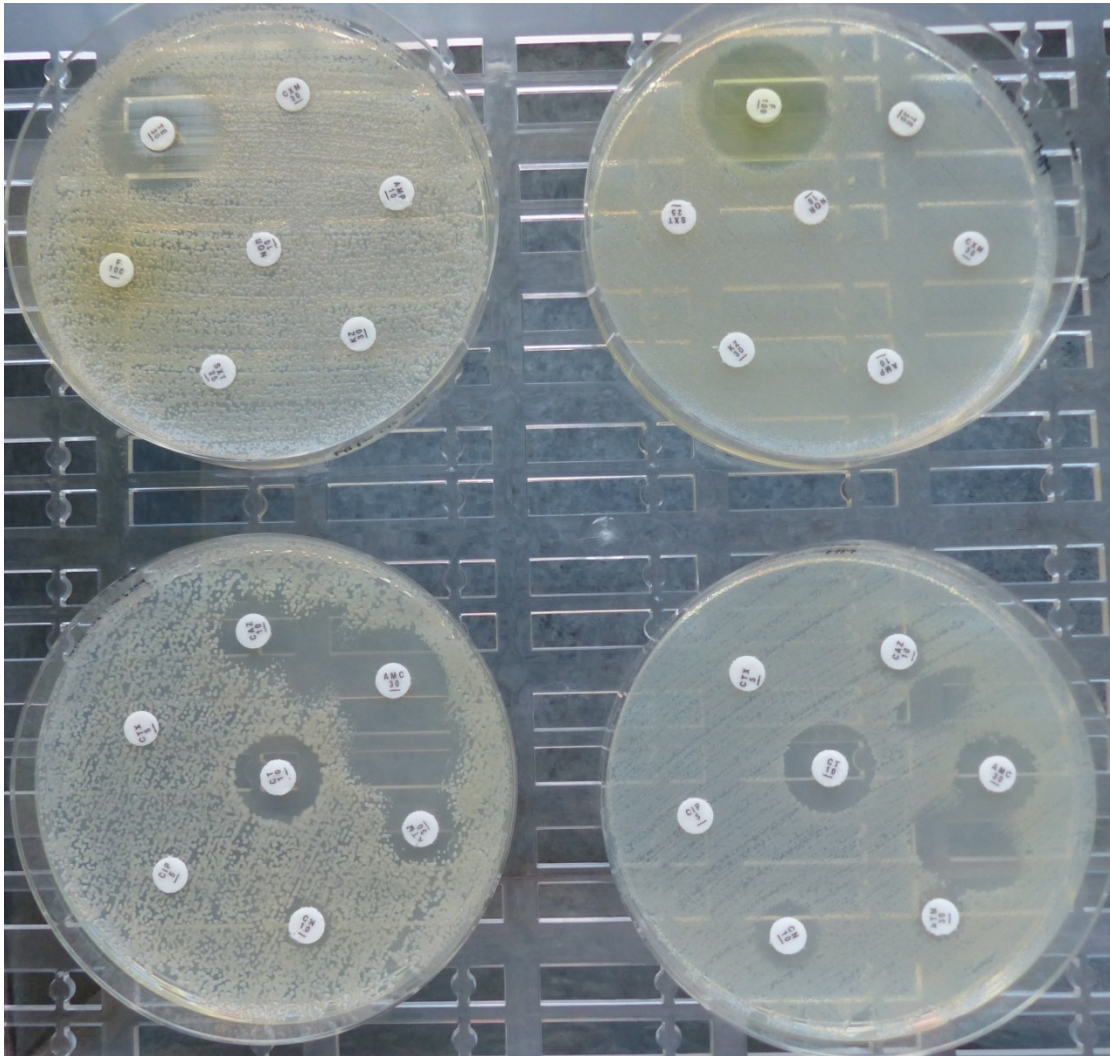
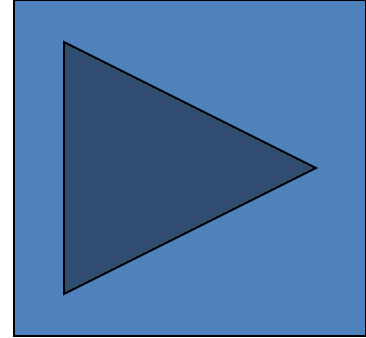
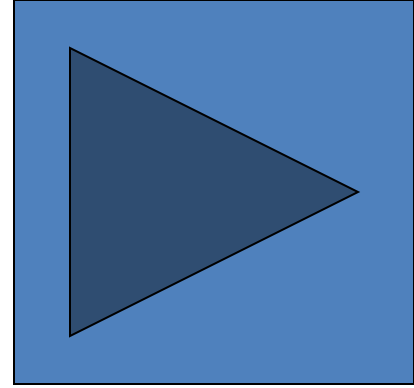


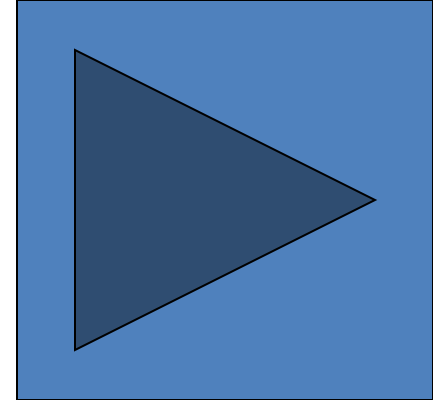
Foto:
Mikrobiologický
ústav

Betalaktamázy TEM, SHV, CTX apod.



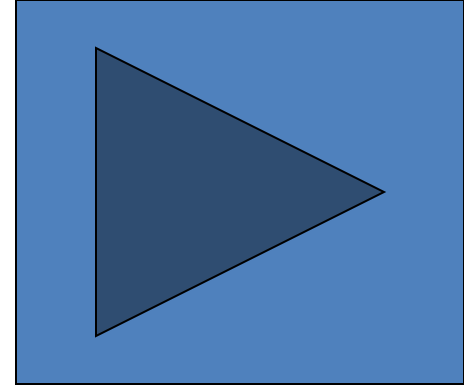
- Vyskytují se především u **enterobakterií**: *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, ale mohou být i u nefermentujících tyčinek
- Existuje jich mnoho typů
- Geny pro ně jsou uloženy v plasmidech, mutace jsou časté, vznikají stále nové varianty
- Z betalaktamů zůstávají citlivé karbapenemy

Metalobetalaktamázy



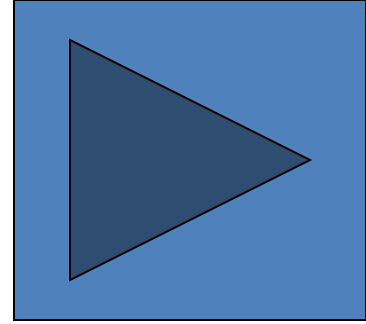
- Vyskytují se u **G- nefermentujících bakterií**, zejména pseudomonád
- Štěpí i karbapenemy
- Zbývají citlivé monobaktamy (aztreonam)
- U enterobakterií se v poslední době vyskytují podobné **karbapenemázy**. V Brně se aktuálně objevily první takové kmeny – jde o kmeny citlivé většinou pouze na kolistin, případně ani na ten (jde-li o serratie, protey či morganely)

Induktory a selektory betalaktamáz



- Tvorba některých betalaktamáz může být **indukována** používáním určitého antibiotika (induktoru). Příkladem induktoru je **ko-amoxicilin**
- Nebezpečnější než induktory jsou však **selektory**: poměrně účinná antibiotika, která vyhubí citlivou část populace, a zůstanou pouze odolné, polyrezistentní kmeny. Příkladem jsou **cefalosporiny třetí generace**. Pokles jejich používání vedl ve všech nemocnicích k poklesu výskytu ESBL pozitivních kmenů.

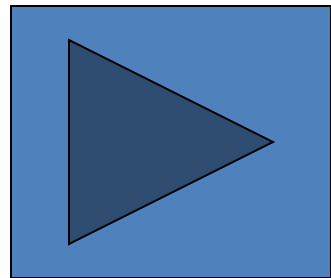
Aktuální situace



- V nemocnici u sv. Anny jsou bohužel **velmi běžné**. Lokálně se jejich **výskyt na určitých klinikách či odděleních daří omezit**, obecně se však stále vyskytují velmi často
- Časté na **urologii, interně, ARK** – často nozokomiální a chronické (lze se pokusit o přípravu autovakcíny)
- Před několika lety byly vzácné, poté nástup ESBL-producentních klebsiel. Nyní již i *E. coli* a řada dalších enterobakterií

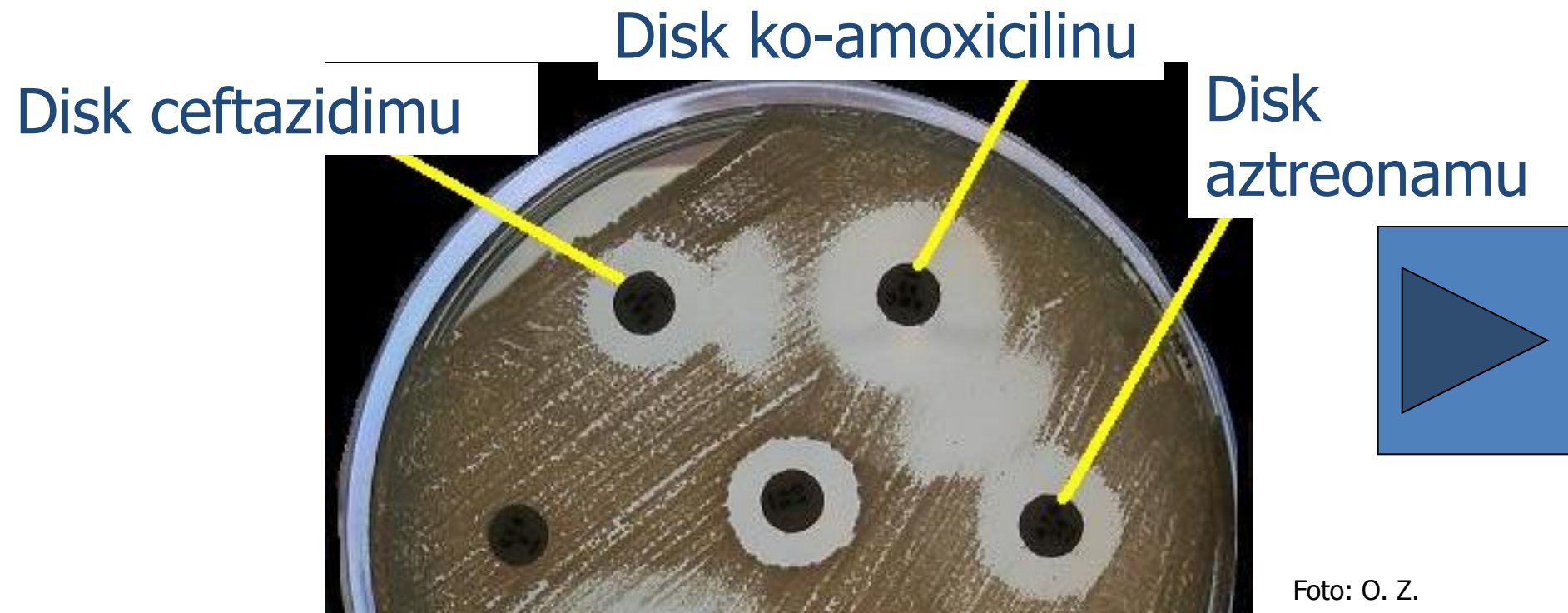
Zjištění produkce ESBL při běžném testování citlivosti mikrodilučním testem

- Testy jsou záměrně uspořádány tak, aby **ko-amoxicilin byl obklopen mohutnými betalaktamovými antibiotiky** (aztreonam, cefotaxim).
- V místě, kam difundoval jak např. aztreonam, tak i kyselina klavulanová z ko-amoxicilinu, vzniká charakteristické **čočkovité projasnění růstu mikroba**.



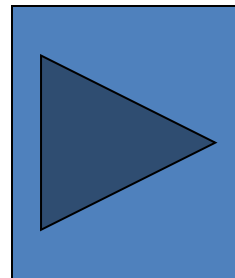
Test dvojité synergie jako součást běžného difusního diskového testu

- Povšimněte si dvou čočkovitých zón kolem disku ko-amoxicilinu (= amoxicilin + klavulanová kyselina)



„ABCD“ test

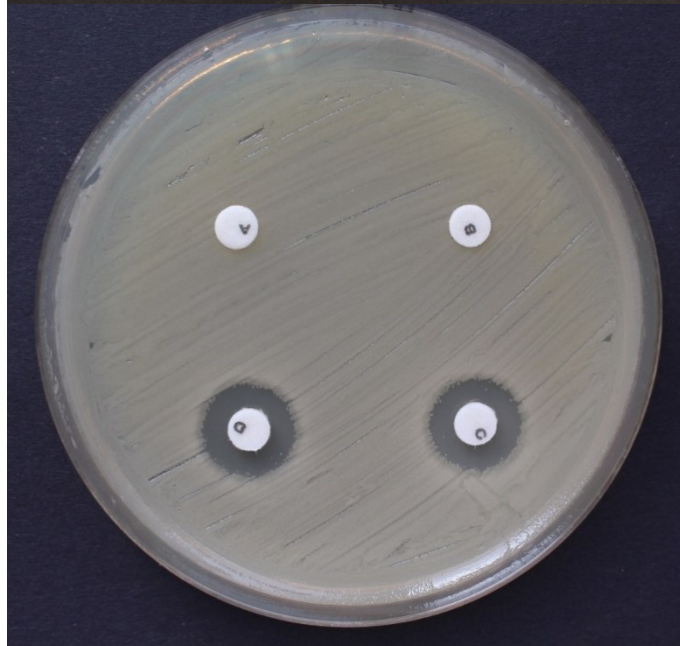
U tohoto testu ověřujeme přítomnost dvou typů betalaktamáz najednou. Rozdíly mezi jednotlivými antibiotiky jsou typické buď pro **betalaktamázu typu ESBL** (1) nebo pro **ampC betalaktamázu konstitutivního typu** (2)



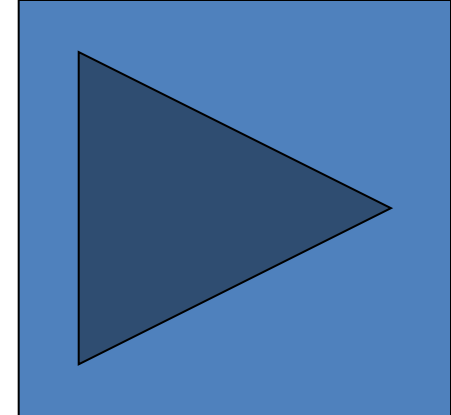
1



2

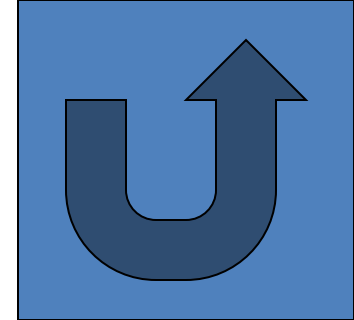


Terapie



- Meropenem, imipenem, ertapenem
- Aminoglykosidy – jsou-li citlivé
- Případně další (chinolony, colistin)
- Cefalosporiny 4. generace či laktamáz se nedoporučují, i když jsou in vitro účinné
- Nedoporučují se ani kombinace s inhibitory betalaktamáz, i když i ty se jeví jako účinné
- Náklady na tuto léčbu jdou do desítek tisíců/den

Prevence



- Obdobná jako v případě MRSA – obecná opatření, vedoucí ke snížení rizika nozokomiálních nákaz
- Cílená léčba neširokospektrými antibiotiky
- Výrazná restrikce používání zejména cefalosporinů III. generace, ale i uvážlivější podávání cefalosporinů II. a I. generace, aminopenicilinů aj.
- Případně screening střevního nosičství (není běžné)

ZPĚT NA HLAVNÍ OBSAH PREZENTACE