

# **Původci infekcí gastrointestinálního traktu**

**Doc. MUDr. Martina Bielaszewska, CSc.**

**Národní referenční laboratoř pro *E. coli* a shigely  
Státní zdravotní ústav, Praha**

# Infekce gastrointestinálního traktu (GIT)

## ➤ 2. nejčastější příčina morbidity a mortality v rozvoj. zemích u dětí < 5 let!

WHO+UNICEF:

- ročně globálně 1.7 bilionů případů průjmu u dětí < 5 let => 480,000 úmrtí (dehydratace!)
- vedoucí příčina malnutrice u dětí < 5 let

## ➤ **Klinická manifestace:**

- **Průjem** (vodnatý, evtl. příměs hlenu, krve – dle etiologie), nauzea, zvracení, (horečka)

## ➤ **Zdroje:**

- Zvířata – patogen infikuje primárně zvířata => přenos ze zvířete na člověka => **zoonózy**
- Člověk – člověk jediným hostitelem patogena => pouze mezilidský přenos

## ➤ **Přenos: Fekálně-orální**

- Kontaminované potraviny (masné, mléčné, zelenina, ovoce, cerealie)
- Kontaminovaná voda
- Kontakt s pacientem (nebo asymptomatickým nosičem!) nebo se zvířaty

## ➤ **Původci:**

- Baktérie (a jejich toxiny)
- Viry
- Protozoa

# Alimentární infekce vs. alimentární intoxikace

## Alimentární infekce

Onemocnění vyvolaná **baktériemi**  
=> přítomnost živých bakterií nutná pro vyvolání onemocnění

Baktérie termolabilní (inaktivace varem)

Delší inkubační doba (dny)

Patogen vylučován stolicí  
=> pacient je infekční pro okolí

## Alimentární intoxikace

Onemocnění vyvolaná bakteriálními **toxiny**, které byly v potravě naprodukovány kontaminujícími bakteriemi (přítomnost živých bakterií v době konzumace není nutná!)

Toxiny často termostabilní (odolné k varu)

Krátká inkubační doba (hodiny)

Pacient není infekční => nedochází k mezilidskému přenosu

# Stafylokoková enterotoxikóza

- **Nejčastější alimentární intoxikace**
- **Vznik po požití potravin kontaminovaných kmeny *Staphylococcus aureus* produkujícími enterotoxiny**
  - Potraviny obsahující bílkoviny, cukry, tuky (brambor. salát, sladké krémy, zmrzlina, atd.)
- ***S. aureus* – nosičství u ca 30-40 % populace**
  - nosohltan
  - kůže – zdravá nebo hnisavé infekce vyvolané *S. aureus* (impetigo)
  - z míst kolonizace => kontaminace potravin (nebezpečné zvláště u osob manipulujících s potravinami)
- **Enterotoxiny**
  - Termostabilní (x několikaminutový var)
  - Nízká dávka stačí pro vyvolání enterotoxikózy (1 – 10 µg)
  - 5 typů (A, B, C, D, E) spojeno s lidským onemocněním
- **Inkub. doba: 1 – 6 hod**
- **Klinický obraz**
  - Náhlý začátek – břišní křeče, nauzea, zvracení, průjem, obvykle bez teploty
  - Krátké trvání, úzdrava obvykle během 24 hod.

# Stafylokoková enterotoxikóza

## ➤ Laboratorní diagnostika

- Průkaz enterotoxinu v potravíně
- Průkaz enterotoxinu u izolovaného kmene *S. aureus*  
(*průkaz kmene bez detekce enterotoxinu nestačí k diagnóze!*)
  - RPLA (reverzní pasivní latexová aglutinace)
  - ELISA
- Průkaz génů kódující enterotoxiny u izolovaných kmenů (PCR)

# SLEDOVÁNÍ STAFYLOKOKOVÉ ENTEROTOXIGENITY V NRL pro stafylokoky

1998 - 2018

metodou latexové aglutinace

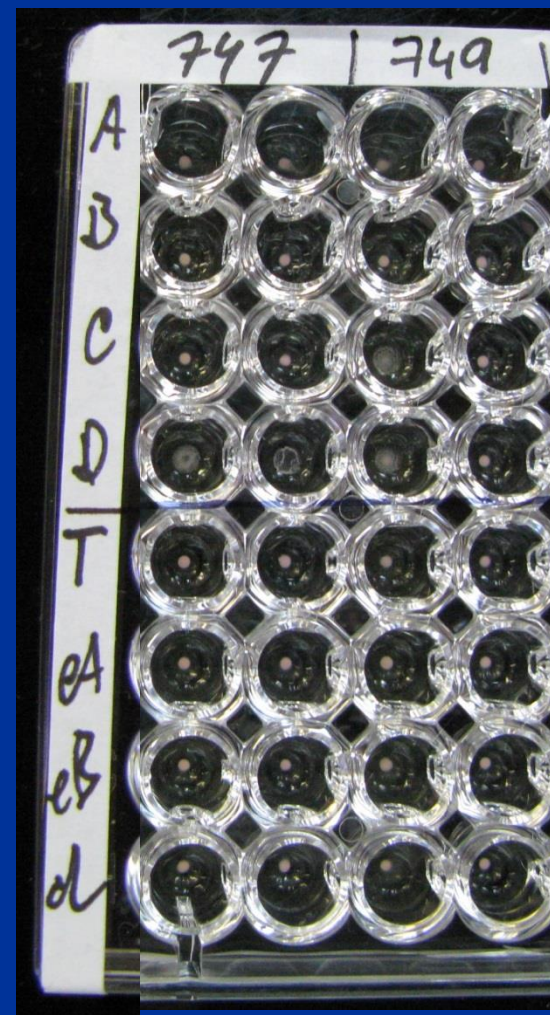
sety RPLA (Denka Seiken)

Citlivost je cca 0.5 ng toxinu / ml

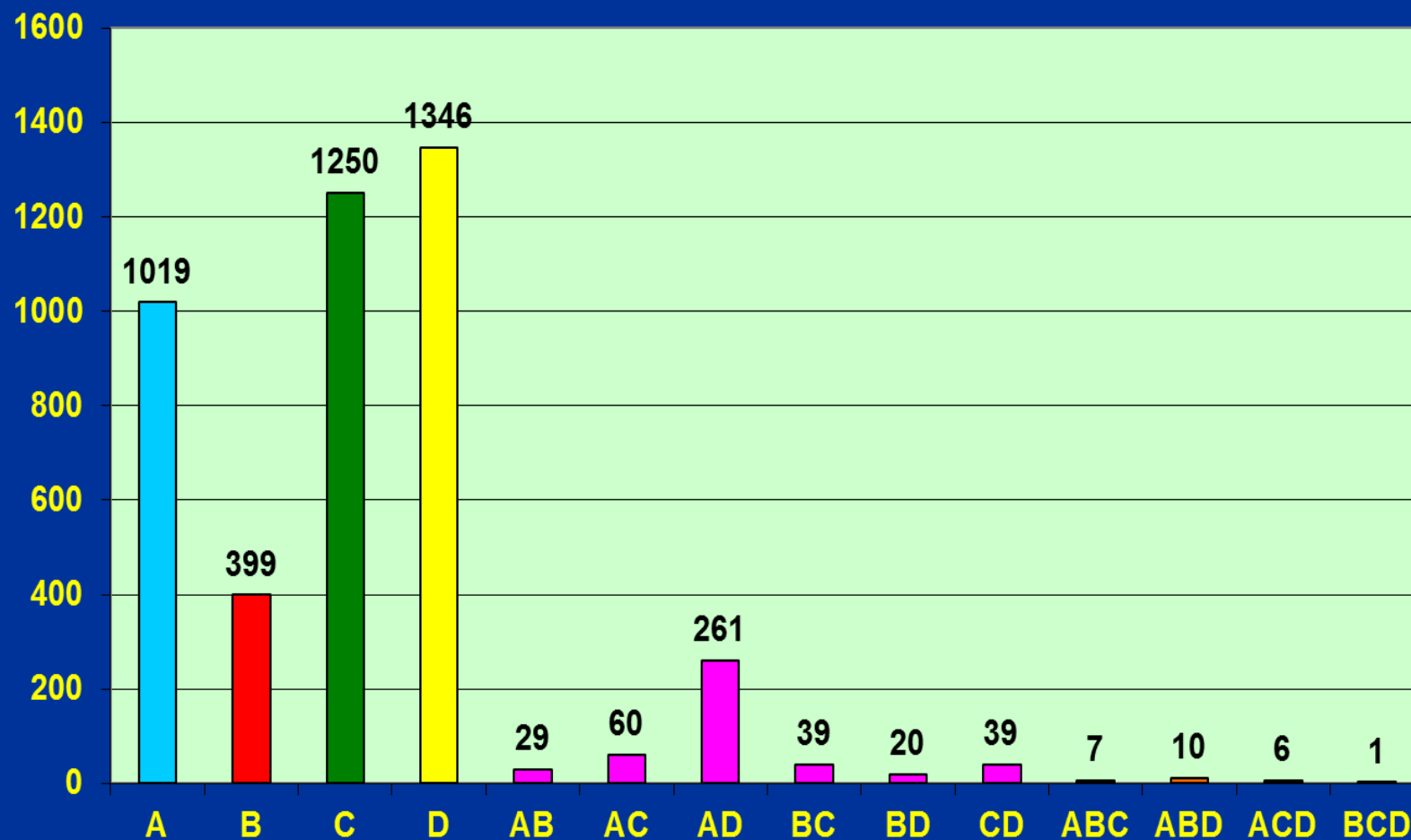
Sledují se enterotoxiny A - D(E)

asi z 10 000 vyšetřovaných

bylo 45 % pozitivních



# POČTY KMENŮ *S. AUREUS* S PRODUKČÍ ENTEROTOXINU A, B, C, D (E) metoda RPLA, přes 10 000 kmenů z let 1998 - 2018



**89.5% 1 typ enterotoxinu**  
**10% 2 typy enterotoxinu**  
**0.5% 3 typy enterotoxinu**

# Botulismus

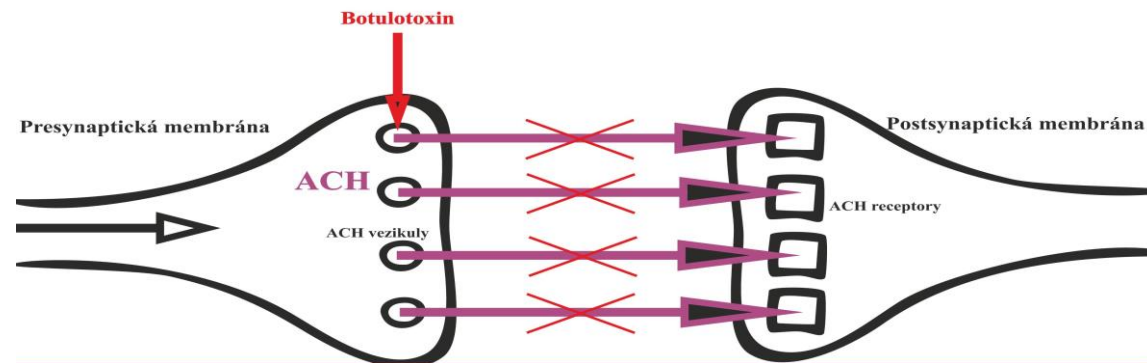
**Na rozdíl od ostatních alimentárních intoxikací závažné, systémové, život ohrožující onemocnění!**

V ČR vzácný, ca. 1 hlášený případ/rok (často žádný)

**Původce: *Clostridium botulinum*** – G+ anaerobní sporující tyčka

- Spóry hojné ve střev. traktu lidí, zvířat, v prostředí (půda, prach, písek) => odtud kontaminace potravin (maso, zelenina)
- V anaerobním prostředí germinace spór a produkce **neurotoxinu (botulotoxin)**  
=> blokuje přenos acetylcholinu na neuromuskulární ploténce  
=> chabé parézy

- Několik antigenních typů botulotoxinu (A-H)
- **typy A, B nejčastějšími původci lid. onemocnění**



- **Zdroj nákazy:** typicky **konzervy** (masové, zeleninové) => konzervovaná potravin kontaminovaná spórami => germinace v anaerob. prostředí konzervy => produkce botulotoxinu



# Botulismus

- **Klin. obraz (příznaky rezultující z chabých paréz):**  
Dvojité vidění (diplopie), polykací obtíže (obrna měkkého patra), snížení/zástava střevní peristaltiky, obrny dýchacích svalů (udušení...)
- **Terapie:**
  - **antitoxické sérum** (směs anti-A+B nebo A+B+C - **co nejdříve!** (neutralizuje pouze nenavázaný toxin)!
  - podpůrná a resuscitační péče (řízená ventilace)
- **Dg:** průkaz botulotoxinu v potravíně (ve stolici) (ELISA)

**Kojenecký botulismus** = zvláštní případ botulismu (vzácný)

- Vzniká **po požití spórami kontaminovaného medu**
  - => germinace spór ve střevě => produkce botulotoxinu *in situ*
  - => absorpce do oběhu
- **Světová zdravotnická organizace (WHO) nedoporučuje podávat med dětem do 1 roku!**  
(deklarováno na balení)

# Alimentární infekce

## ➤ Bakteriální původci:

- ***Enterobacteriaceae***

- různé patotypy *E. coli*
- salmonely
- shigely
- yersinie

- ***Campylobacter jejuni***

- ***Vibrio cholerae***

# Mikrobiologická diagnostika infekcí GIT

## ➤ **Materiál: Stolice**

- rektální výtěr => zasílat v transportním mediu na zvýšení přežití citlivých patogenů (Stuartovo, Amiesovo medium)

- vzorek stolice => ve sterilní odběrové nádobce (2-3 hrášky, tekutá stolice)  
=> detekce virů, parazitů; bakteriologie: pacienti s HUS

## ➤ **Zpracování stolice – bakteriologie**

▪ **Pomnožení – tekuté selektivní půdy** (potlačují normální střevní koliformní floru => podpora růstu patogenů)

▪ **Vyočkování pomnožené kultury na pevné půdy**

- **Základní (univerzální)** – krevní agar (KA) – rostou G+ i G- patogeny; hemolýza!

- **Selektivně-diagnostické** – obsahují inhibitory růstu normální flory (chemikálie, ATB) a indikátorové systémy umožňující předběžně odlišit patogeny od fyziol. flory (laktóza, sacharóza, sorbitol + indikátor fermentace)

=> Inkubace 24 hod při 37°C, normální vzdušná atmosféra (většina fakultativně anaerobní) (výjimky - např. *Campylobacter jejuni*)



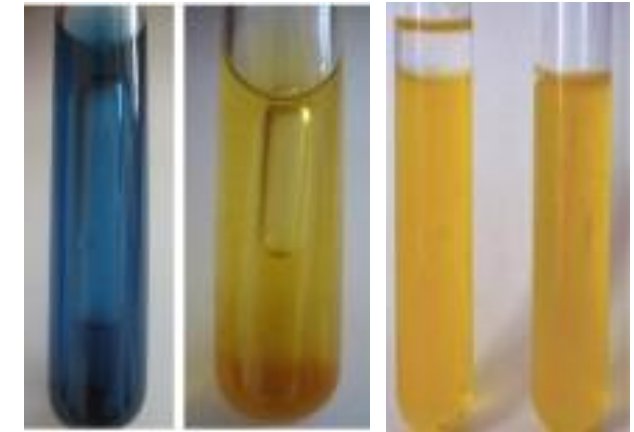
# Mikrobiologická diagnostika infekcí GIT

## ➤ Identifikace patogena

K tomu nutná izolace 1 kolonie => čistá kultura!

- **1) Biochemické testy** – detekce metabolismu patogena  
=> rodově či druhově specifický!

- izolační plotna („klín“) – předběžná metoda
- zkumavkové testy („pestrá řada“)
- minitesty – kity: Enterotest (Lachema), API system (Biomerieux)



Zkumavkové biochemické testy

**Princip:** tekutá či polotuhá půda se substrátem (např. sacharidy, urea, citrát, indol, lysin, atd.) + indikátor  
utilizace substrátu => změna barvy substrátu nebo jiná fenotyp. změna



Enterotest (Lachema)



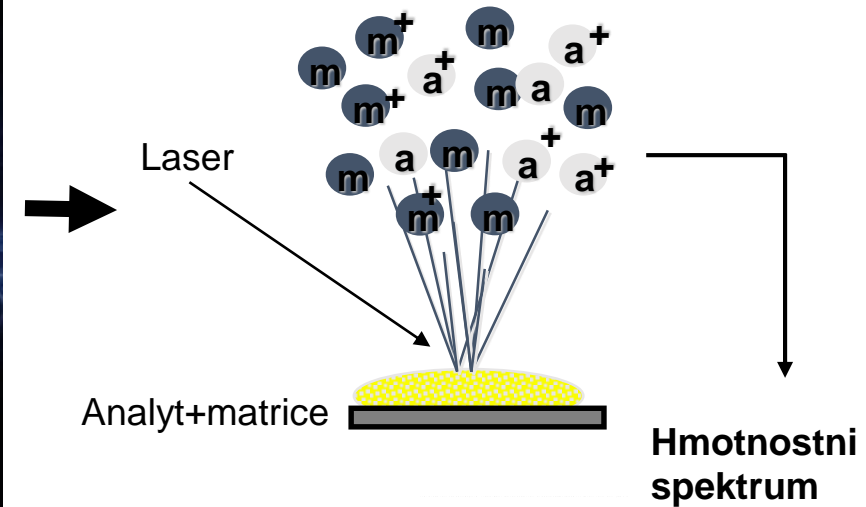
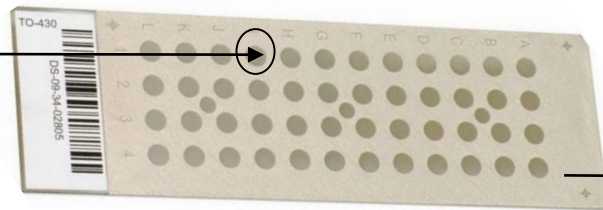
API system (Biomerieux)

# Mikrobiologická diagnostika infekcí GIT

## ➤ Identifikace patogena

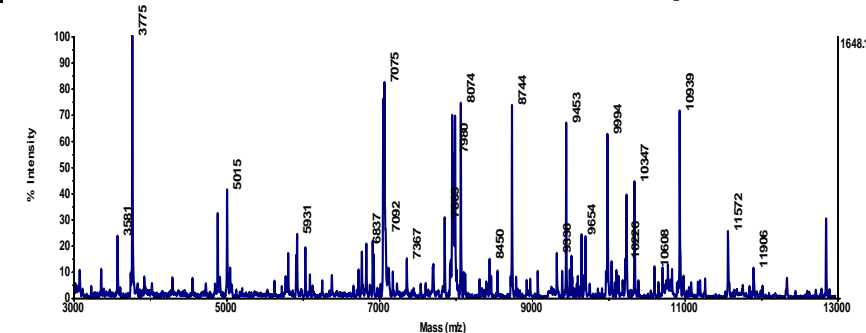
- **2) MALDI-TOF** (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry) = **hmotnostní spektrometrie** – identifikace bakterií dle hmotnostního spektra proteinů

Rychlá a vysoce přesná metoda na určení druhu – testují se kolonie rovnou z primokultury na pevné půdě  
=> výsledek během MINUT => extrémní urychlení dg a tím možnost zahájení cílené terapie!  
Nejvýznamnější pokrok v mikrobiologii za posledních 30 let!



### Provedení:

1. Kolonie (= analyt) + matrix (kys. skořicová) => smíchaní na testovací destičce => usušení
2. Analýza v hmotnostním spektrometru MALDI-TOF  
=> ozáření směsi analytu (kolonie) + matrix laserem  
=> matrix absorbuje energii - její rozklad ionizuje molekuly analytu  
=> pohyb v elektr. poli rychlostí úměrnou hmotnosti  
=> měření doby letu  
=> **hmotnostní spektrum – druhově specifické = molekulární identifikátor druhu**
3. Identifikace analytu (kolonie) automat. porovnáním jeho spektra s databází MALDI-TOF





# Mikrobiologická diagnostika infekcí GIT

## ➤ Identifikace patogena

### ▪ 3) Určení antigenní struktury

- O antigen (somatický)
- H antigen (bičíkový)

⇒ sklíčková aglutinace

### ▪ 4) Určení faktorů virulence

- Genotyp (PCR)
- Fenotyp (napr. průkaz toxinů– komerční kity)

### ▪ 5) Určení citlivosti k antibiotikům

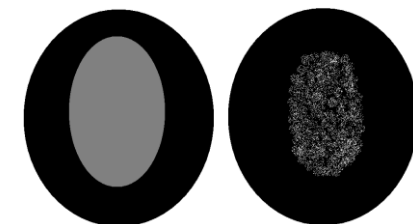
- diskové metody
- mikrodiluční metody



Testovaná kultura  
+ antisérum (anti-O, anti-H Ag)

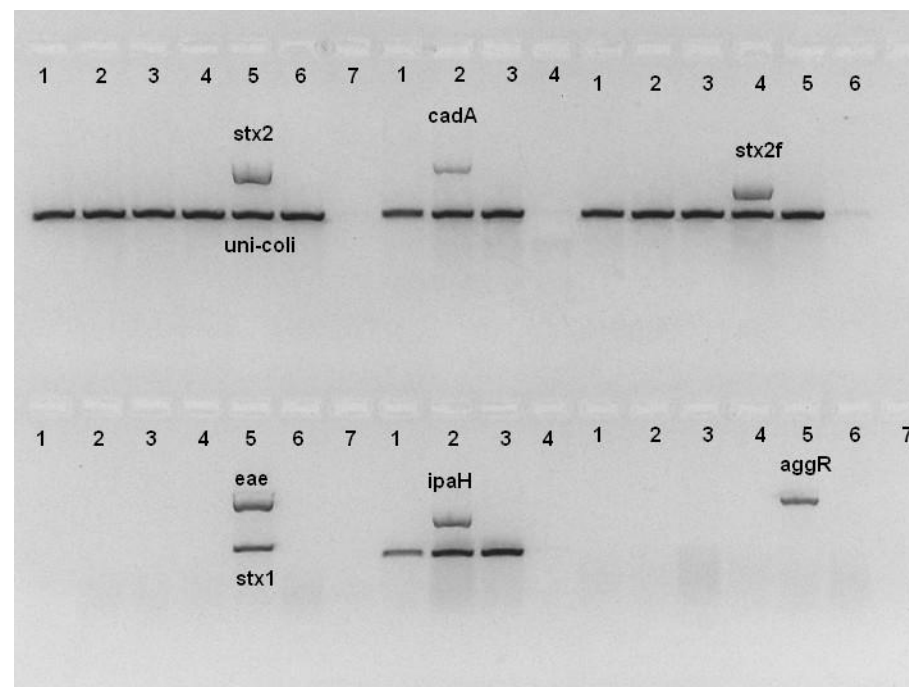
⇒ Smísit na podložní destičce  
nebo podložním sklíčku

⇒ Promíchat kolébavým  
pohybem 1 min



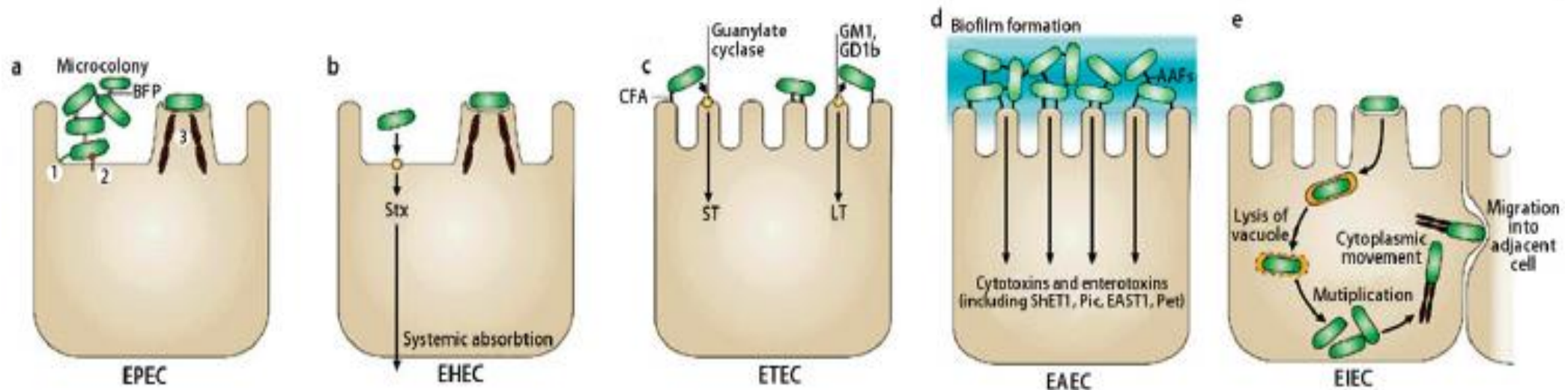
Negativní

Pozitivní  
(aglutinace)



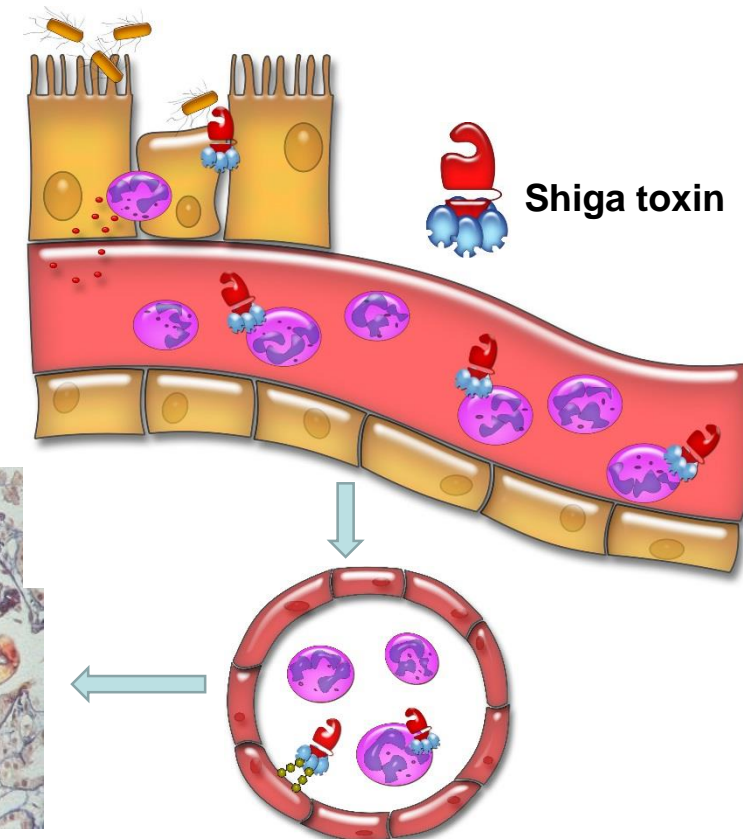
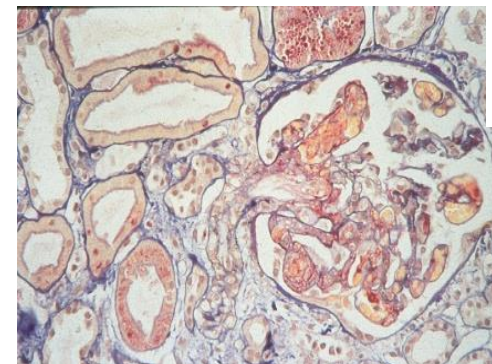
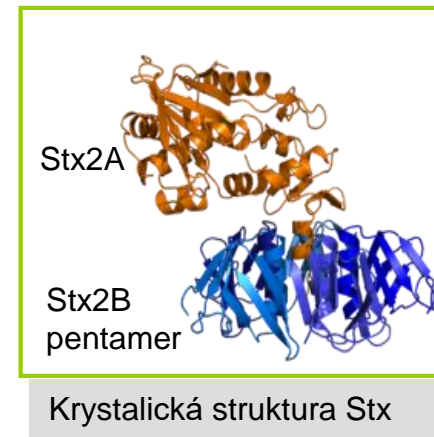
# Patotypy diarhogenních *E. coli*

- Enteropatogenní *E. coli* (EPEC)
  - Shiga toxin-produkující *E. coli* (STEC)  
=> **STEC patogenní pro člověka označovány enterohemoragické *E. coli* (EHEC)**
  - Enterotoxigenní *E. coli* (ETEC)
  - Enteroagregativní *E. coli* (EAEC)
  - Enteroinvazivní *E. coli* (EIEC)
- ❖ Liší se faktory virulence, mechanismem interakce se střevním epitelem, séroskupinami



# Shiga toxin-produkující *Escherichia coli* (STEC)

- **Nejzávažnější skupina diarhogenních *E. coli* – průjem i celkové onemocnění!**
- **Výskyt: celosvětový** (rozvinuté i rozvojové země)
- **Onemocnění**
  - Průjem
  - Krvavý průjem (hemoragická kolitida)
  - Hemolyticko-uremický syndrom (typický, D+ HUS)
- **Typický HUS (D+ HUS)**
  - Systémová komplikace infekce STEC u asi 10 % pac. s průjmem, především děti < 5 let! – **nejčastější příčina akut. selhání ledvin u dětí!**
  - Vyvolán **Shiga toxiny (Stx)** produkovanými STEC kolonizujícími colon => absorpce Stx do oběhu  
=> poškození endotelu glomerulárních kapilár  
=> **glomerulární trombotická mikroangiopatie** (histopatologický podklad HUS)





# HUS klinika a pozdní následky

## ➤ Klinika:

### ▪ Hemolytická anémia

- snížený hemoglobin (< 10 g/l)
- schistocyty v perif. krevním nátěru

### ▪ Thrombocytopenie

- snížený počet trombocytů (< 150 x 10<sup>9</sup>/l)

### ▪ Akutní renální selhání

- zvýšený sérový kreatinin a urea

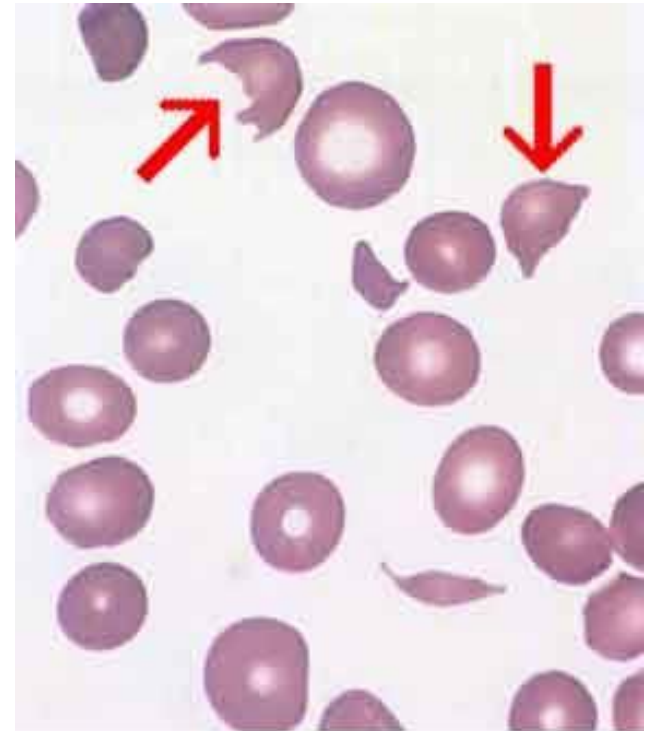
## ➤ Smrtnost akutního onemocnění 1 - 3%

## ➤ Pozdní následky (až u 30% pacientů):

Proteinurie, hypertenze, chron. renální selhání => dialýza, transplantace ledvin

## ➤ Léčba infekcí STEC:

Ve fázi průjmu nepodávat antibiotika – zvyšují produkci Stx a jeho uvolňování z bakterií  
=> zvyšují riziko progresu infekce do HUS!



Schistocytes / Helmet Cells

Robbins Pathologic Basis Of Disease: 6th Edition, 1999.  
Fig. 14-17 p. 621.

# Shiga toxiny

**AB<sub>5</sub> toxiny** = 1 biologicky aktivní A podjednotka (N-glykosidázová aktivita => ribozomy => inhibice proteosyntézy)  
+ pentamer vazných B podjednotek (vazba k receptoru Gb3 na hostitelských buňkách)

- **2 hlavní typy Stx:** Stx1, Stx2

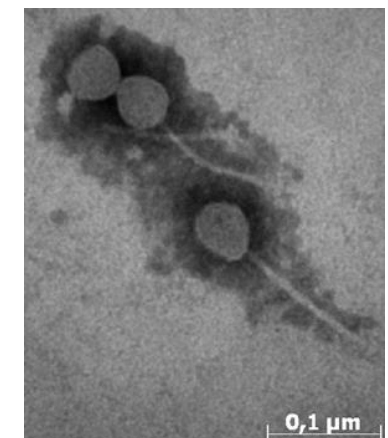
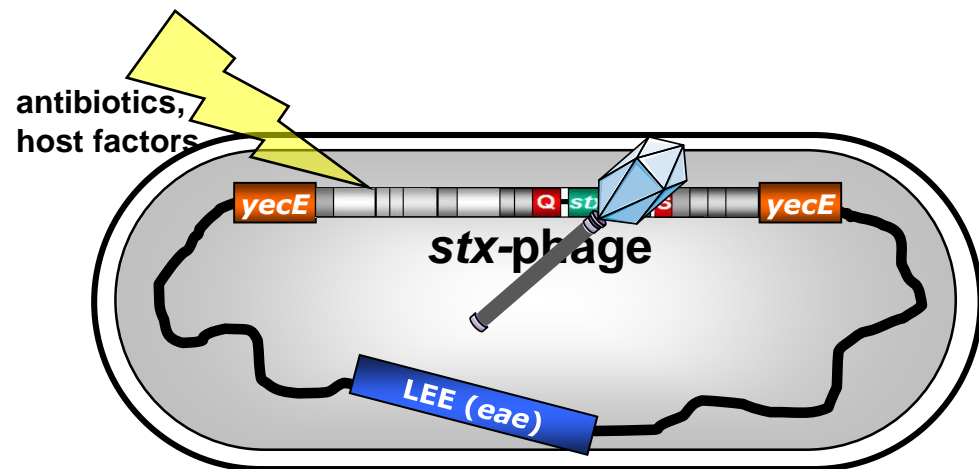
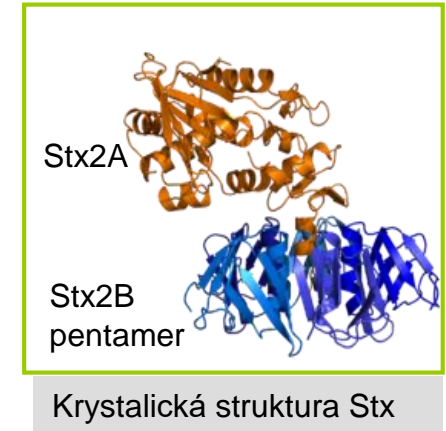
Řada subtypů

Stx1a, Stx1c, Stx1d

Stx2a, Stx2b, **Stx2c**, **Stx2d**, Stx2e, Stx2f

=> **Stx2a, Stx2c, Stx2d hlavní vyvolavatelé HUS**

- **Shiga toxiny kódovány genem *stx* lokalizovaným na temperovaném bakteriofágu**
- Faktory aktivující stresovou odpověď (UV záření, ATB, střevní prostředí) indukují *stx*-fága => přechod z lyzogenního stavu do lytické fáze => produkce Stx



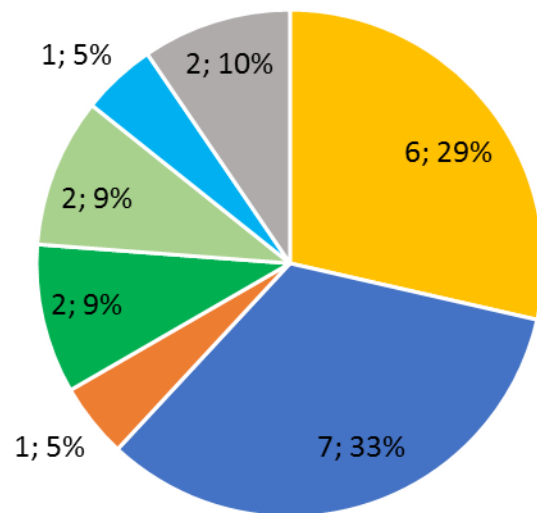
*stx*-bakteriofág

# STEC – nejčastější sérotypy vyvolávající lidská onemocnění (data NRL pro *E. coli* a shigely)

## ➤ „Top five“ (EHEC)

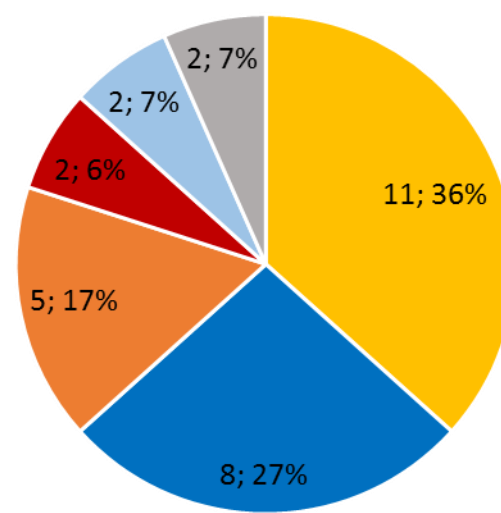
- O157:H7/H<sup>-</sup>
- O26:H11/H<sup>-</sup>
- O103:H2
- O111:H8/H<sup>-</sup>
- O145:H28/H<sup>-</sup>

Rok 2016



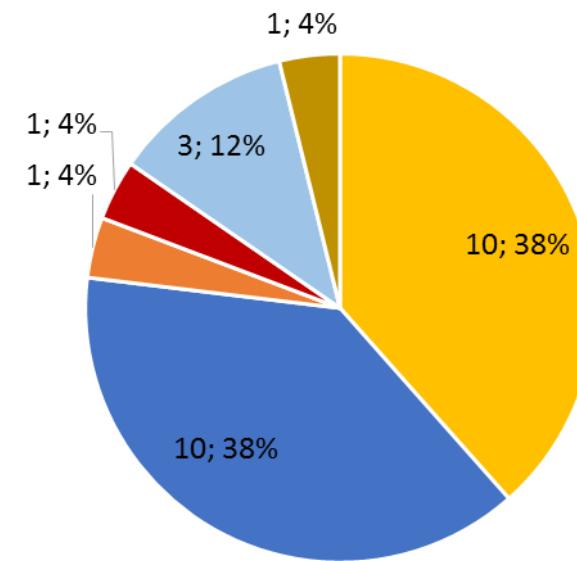
■ O157:H7   ■ O26:H11   ■ O103:H2  
■ O55:H7   ■ O55:HNT   ■ O8:H9  
■ ONT:HNT

Rok 2017



■ O157:H7   ■ O26:H11   ■ O103:H2  
■ O111:H8   ■ O145:H28   ■ ONT

Rok 2018



■ O157:H7   ■ O26:H11   ■ O103:H2  
■ O111:H8   ■ O145:H28   ■ O74:H28

# Epidemiologie STEC infekcí

- **Hlavní rezervoár:** hovězí dobytek (ovce, kozy)
- **Zdroj a přenos:**
  - Kontaminované a nedostatečně tepelně opracované maso (hovězí - hamburgery), nepasterizované mléko
  - Fekálně kontaminované syrové (a nedostatečně omyté) plodiny - zelenina, klíčky, ovoce
  - Fekálně kontaminovaná voda
  - Přímý kontakt se zvířaty (farma, zoo)
  - Přímý kontakt s pacientem či nosičem (nedostatečná hygiena rukou)

**Infekční dávka:** 10-100 bakterií (nízká!)

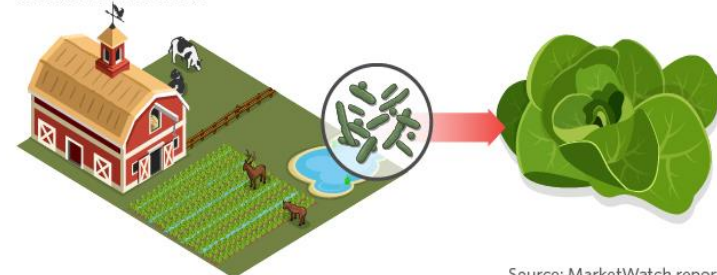
**How E. coli bacteria spreads**  
**FROM MEAT**  
E. coli can contaminate meat during slaughter, processing or preparation



**FROM HUMANS**  
E. coli can spread if hands aren't thoroughly washed between using the restroom and touching food

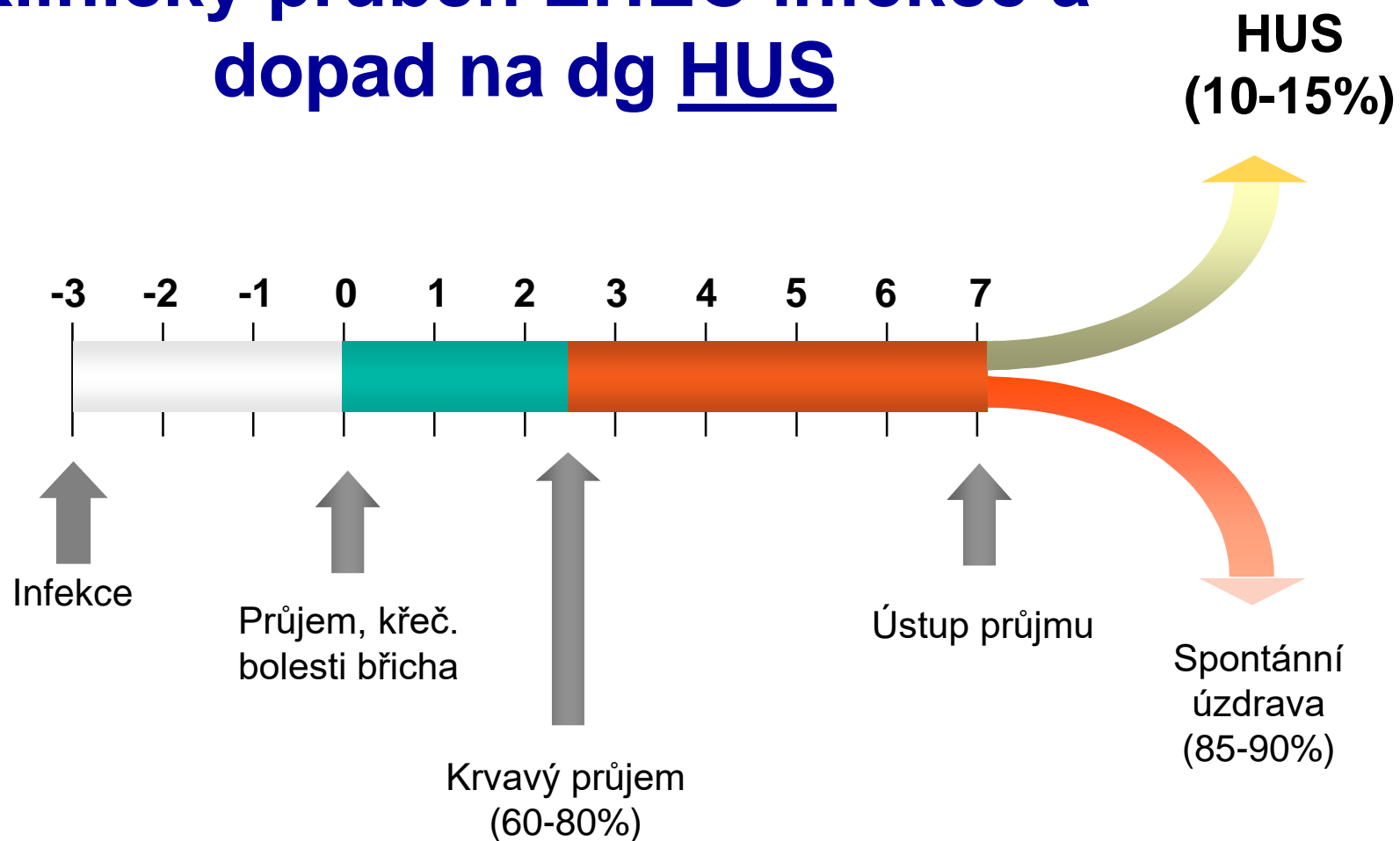


**FROM PRODUCE**  
Animal feces can contaminate crops through groundwater or errant animals in farm fields



Source: MarketWatch reporting

# Klinický průběh EHEC infekce a dopad na dg HUS



Adaptováno z Tarr et al., Lancet, 2005

**Kvantum EHEC  
ve stolici**

Velmi rychlý pokles po začátku průjmu!!!

**Nutné užití vysoce citlivých  
selektivně-dg metod pro  
průkaz a izolaci EHEC!  
(=> specializ. pracoviště)**



# Diagnostika STEC u pacientů s HUS (NRL pro *E. coli* a shigely)

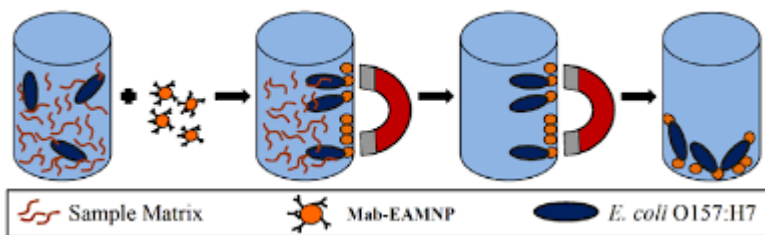
**Materiál: Stolice** (vzorek stolice, ne rekt. výtěr)



**Pomnožení** (Hajna bujon bez/s Novobiocinem)



**Imunomagnetická separace (IMS) „top five“**  
(O26, O103, O111, O145, O157)  
=> **Selektivní koncentrace „top five“ STEC**



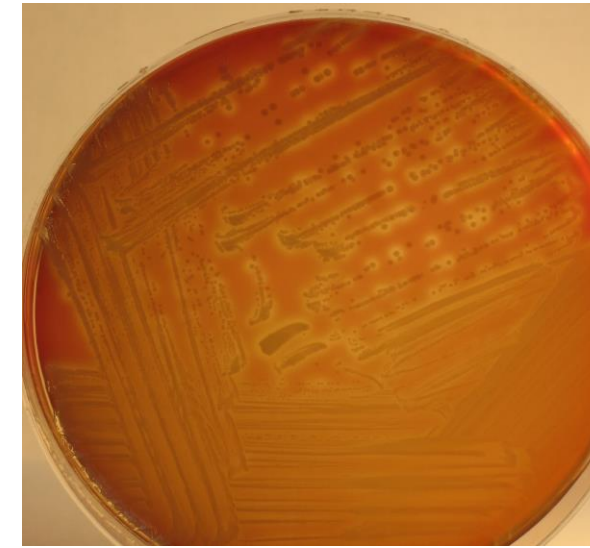
**Kultivace po IMS na:**

- KA
- Sorbitol MacConkey agar (SMAC)
- Cefixim-tellurit (CT)-SMAC
- Enterohemolysinový agar



**SMAC, CT-SMAC**

O157:H7 bezbarve  
Ostatní "top five" růžové

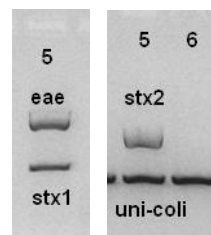


**Enterohemolysinový agar**

Všechny "top five"  
enteroemolytický fenotyp  
= neúplná hemolýza



DNA izolace (susp. kolonie, evtl. směs) => **PCR**



PCR STEC

*stx*<sub>1</sub>  
*stx*<sub>2</sub>  
*eae*  
EHEC-*hlyA*



**stx+**

**Fenotypová charakterizace:**  
**Potvrzení *E. coli*** (bioch., MALDI-TOF)  
**Sérotypizace** (skličk. aglutinace)  
**Produkce Stx** (ELISA, latex aglutinace)

# Průkaz produkce Shiga toxinu u izolátů

## VTEC-RPLA (reverzní pasivní latexová aglutinace)

**Diagnostikum:** latexové částice sensibilizované protilátkou proti Stx1 nebo Stx2  
(latex. částice bez protilátky = negativní kontrola)

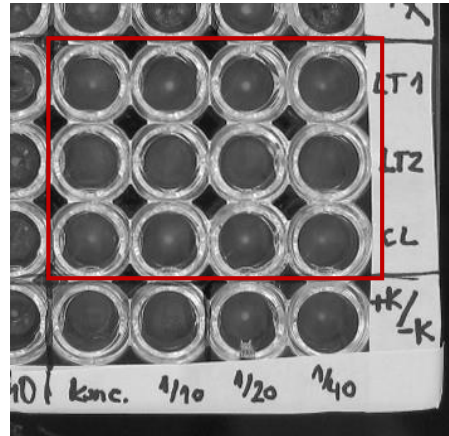
### Provedení:

Supernatant kultury

+ L-anti-Stx1, L-anti-Stx2, L-kontrolní

=> inkubace přes noc

=> odečítání aglutinace latex. částic



Kmen produkuje Stx2  
v titru > 1:40

- Izolace STEC se povinně hlásí do evropského surveillance systému TESSy v ECDC (Evropské centrum pro kontrolu infekčních nemocí - Stockholm) => celoevropská evidence
- **Průkaz infekce STEC u pacienta s HUS je rozhodující pro volbu správného terapeutického postupu** (je odlišný od léčby HUS jiného původu – např. geneticky podmíněného atypického HUS)

# Diagnostika STEC u pacientů s průjmem

Na začátku průjmu vysoké kvantum STEC ve stolici => více Stx => možný průkaz Stx nebo *stx* genů buď přímo ve stolici nebo v pomnožené kultuře

## ➤ Komerční kity na průkaz Stx

### Stx ELISA

- Detekce Stx1+Stx2 společně – nerozlišeny
  - Premier EHEC (Meridian)
  - RidaScreen Verotoxin (R-Biopharm)

### Imunochromatografie

- Detekce Stx1 a Stx2 zvlášť => rozlišují Stx1 a Stx2
  - => klinicky důležité – produkce Stx2 spojena se zvýšeným rizikem rozvoje HUS!
  - ImmunoCard STAT!<sup>®</sup> EHEC (Meridian)

## ➤ Průkaz genů kódujících Stx1 a Stx2 (PCR) – komerční kity

**POZOR:** Pozitivní immunoassay nebo PCR = pouze předběžná detekce STEC infekce => pozitivní vzorky nutno kultivovat => kmeny nutno izolovat a dále charakterizovat (důležité epidemiologicky i klinicky) => NRL pro *E. coli* a shigely





# Enteropatogenní *E. coli* (EPEC)

- **První identifikovaný patotyp diarhogenních *E. coli***  
=> původci rozsáhlých epidemií kojeneckých průjmu v Evropě ve 40. a 50. letech 20. století (těžký průběh, dehydratace, vysoká úmrtnost)
- **Výskyt a onemocnění**
  - Celosvětový - rozvinuté i rozvojové země
  - **Průjmy u dětí do 2 let**, většinou sporadické případy či malé epidemie (děts. kolektivy, nemocnice)
- **Zdroj infekce**
  - Kontaminovaná kojenecká výživa, jiné potraviny, voda
  - Fekálně-orální přenos z člověka na člověka (matka – dítě)
- **Léčba**
  - Rehydratace (náhrada tekutin a iontů perorálně nebo i.v.) – rozhodující terapie u všech průjmu!
  - Antibiotika (pouze u závažného průběhu)

# Enteropatogenní *E. coli* (EPEC)

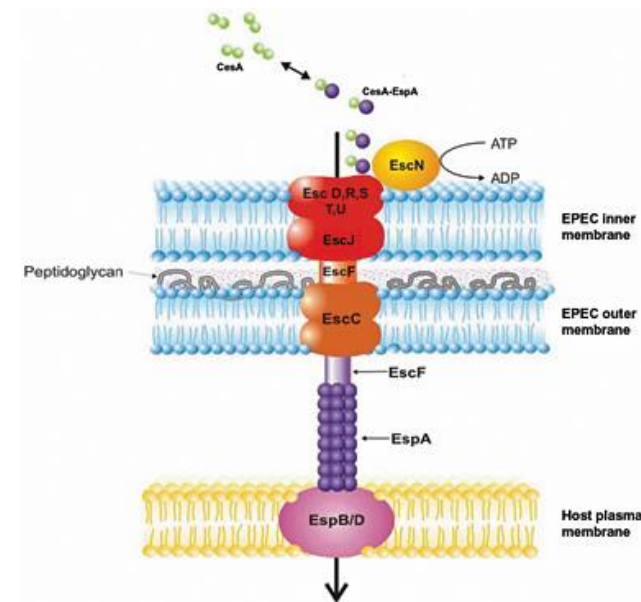
## ➤ Faktory virulence:

- Adheziny: intimin
- Sekreční systém typu 3 (TTSS) injikující do buněk hostitele cytotoxické efektorové proteiny

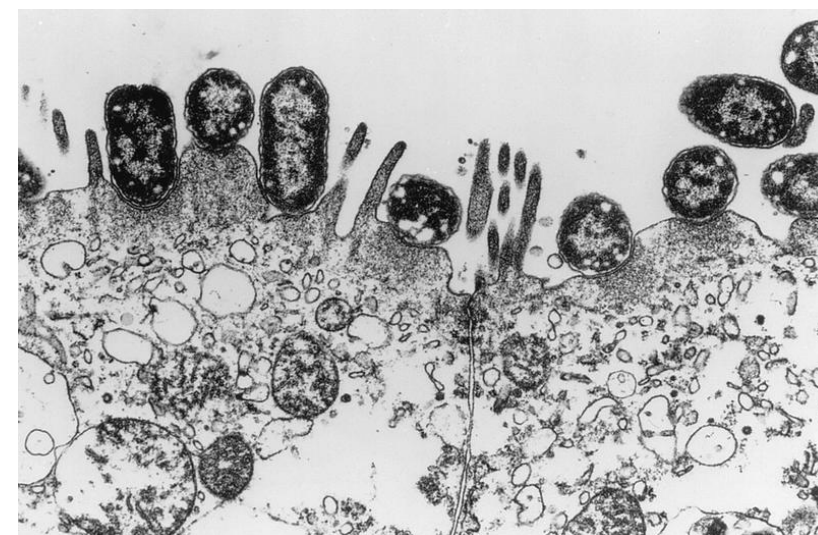
## ➤ Patogeneze

- Těsná adherence EPEC k enterocytům tenkého střeva  
=> reorganizace cytoskeletonu, tvorba pedestalů, k nimž EPEC adherují  
=> poškození až destrukce mikrovlnků  
= “**attaching effacing lesions**“
- „Injekce“ cytotoxických efektor. proteinů do buněk via TTSS

=> **Poškození resorpčního epitelu => vodnatý průjem**



EPEC TTSS. Natalie Strynadka, Howard Hughes Medical Institute



A/E lesions; Nataro and Kaper, 1998

# Enteropatogenní *E. coli* (EPEC)

## Mikrobiologická diagnostika

➤ **Materiál:** rektální výtěr

➤ **Kultivace**

- KA (nehemolytické)
- Endo, MacConkey agar – většinou laktóza-fermentující (růžové kolonie) => nelze odlišit od fyziol. střevní flóry

➤ **Identifikace**

- Screening kolonií EPEC sérotypizací (sklíčková aglutinace)
  - nejčastější séroskupiny O26, O55, O86, O111, O119, O125, O126, O127, O142
  - => **Provádí se povinně u dětí do 2 let!**
- Potvrzení druhu *E. coli*
  - Biochemická identifikace
  - MALDI-TOF
- U susp. kolonií EPEC průkaz *eae* genu kódujícího intimin pomocí PCR (NRL pro *E. coli* a shigely)

# Enterotoxigenní *E. coli* (ETEC)

## ➤ Výskyt a onemocnění

- **Rozvojové země teplého pásma s nízkým hygienickým standardem**

=> hlavní původci **akutních vodnatých průjmů u dětí a dospělých**

(cholera-like disease) - rychlá dehydratace – smrt => vedoucí příčina dětské úmrtnosti  
(podvýživa, špatná dostupnost lék. péče včetně možnosti rehydratace!)

- **Rozvinuté země s vysokým hyg. standardem - importované nákazy**

=> **průjmy cestovatelů (travellers' diarrhea)** – průjmová onemocnění turistů,  
kteří se nakazili při pobytu v oblastech vysokého výskytu ETEC  
- obvykle mírný průběh, neohrožují život

## ➤ Zdroj infekce

- Kontaminovaná voda a potraviny (infekční dávka ca.  $10^9$  bakterií)

## ➤ Léčba

- Rehydratace!

# ETEC

## ➤ Faktory virulence (kódované na plasmidech):

- Enterotoxiny – termolabilní (LT), termostabilní (STa)
- Adheziny (kolonizace tenkého střeva)

## ➤ Patogeneze

- Adherence bakterií k epitelu tenkého střeva a pomnožení => kolonizace (bez morfol. poškození!)
- Produkce LT a/nebo STa

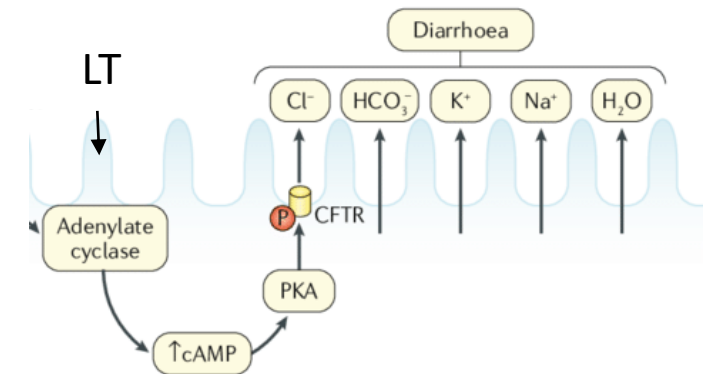
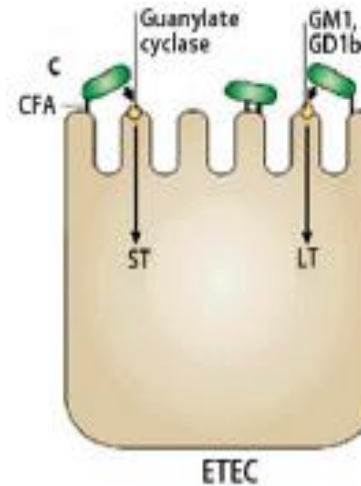
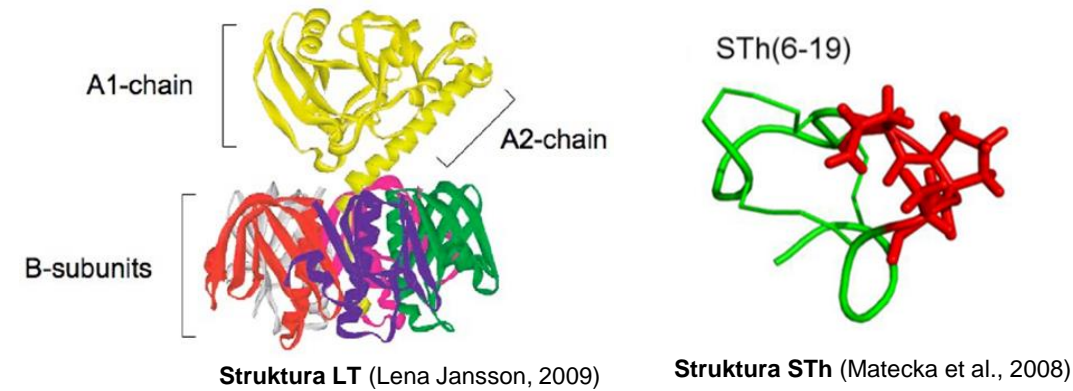
➤ LT (podobný cholerovému toxinu, AB<sub>5</sub> toxin)  
=> aktivace adenylcyklázy => zvýšení cAMP

➤ STa (oligopeptid)  
=> aktivace guanylcyklázy => zvýšení cGMP

⇒ Porucha transportu iontů (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>) =>

⇒ zvýšená sekrece H<sub>2</sub>O z buněk

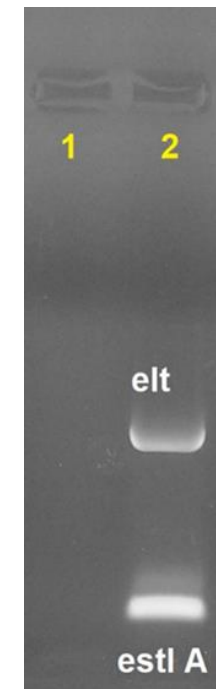
⇒ **vodnatý průjem** (střevní tekutina bez příměsi krve, hlenu, hnisu)



# Enterotoxigenní *E. coli* (EPEC)

## Mikrobiologická diagnostika

- **Materiál:** rektální výtěr
  - **Kultivace**
    - KA (nehemolytické)
    - Endo agar, MacConkey agar => EPEC laktóza-fermentující => nelze odlišit od běžné stř. flóry
  - **Identifikace**
    - Screening EPEC kolonií sérotypizací (sklíčková aglutinace)
      - nejčastější séroskupiny O6, O8, O25, O78, O148, O159, O173
    - Potvrzení druhu *E. coli*
      - Biochemické vlastnosti
      - MALDI-TOF
    - U suspektních kolonií průkaz enterotoxinů
      - LT a STa imunoeseje (ELISA, latex aglutinace)
      - gény kódující LT a STa (PCR)
- => Provádí NRL pro *E. coli* a shigely



# Enteroagregativní *E. coli* (EAEC)

## ➤ Výskyt a onemocnění

- Hlavně rozvojové země s nízkým hygienickým standardem
  - Chronické (persistentní) průjmy u dětí => malnutrice, poruchy růstu, smrt
- I rozvinuté země
  - Akutní a chronické průjmy u imunokompromitovaných osob (HIV pacienti)
  - Průjmy cestovatelů (importované infekce)

## ➤ Zdroj infekce

- Kontaminovaná voda a potraviny
- Mezilidský přenos (infekční dávka  $10^6$  bakterií)

## ➤ Léčba

- Rehydratace
- Antibiotika (nutná u chronických průjmů na eradikaci patogena)



# Enteroagregativní *E. coli* (EAEC)

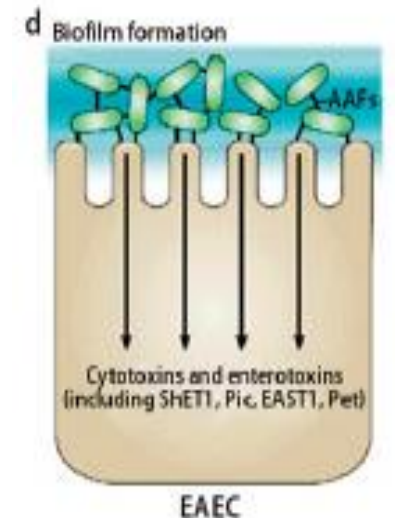
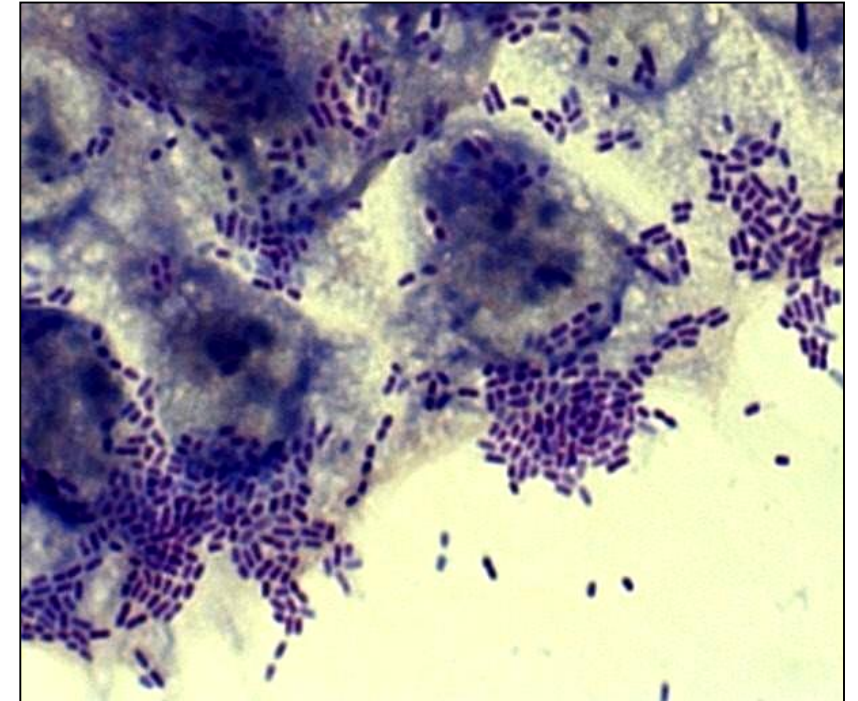
## ➤ Faktory virulence:

- Heterogenní sady faktorů virulence – kmenově specifické
- Společné pro všechny EAEC **agregativní fimbrie (AAF)**  
=> umožňují adhezenci ke střevnímu epitelu i mezi bakteriemi  
=> velké agregáty bakterií na povrchu epitelu

## ➤ Patogeneze

- Aggregativní adherence hlavní patogenetický mechanismus  
=> velká kvanta adherujících bakterií produkují toxiny (enterotoxiny, cytotoxiny, atd.) a další produkty  
=> poškození střevního epitelu => redukce resorpční schopnosti

=> **Chronický průjem a malnutrice**

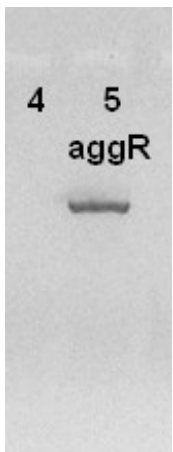




# Enteroagregativní *E. coli* (EAEC)

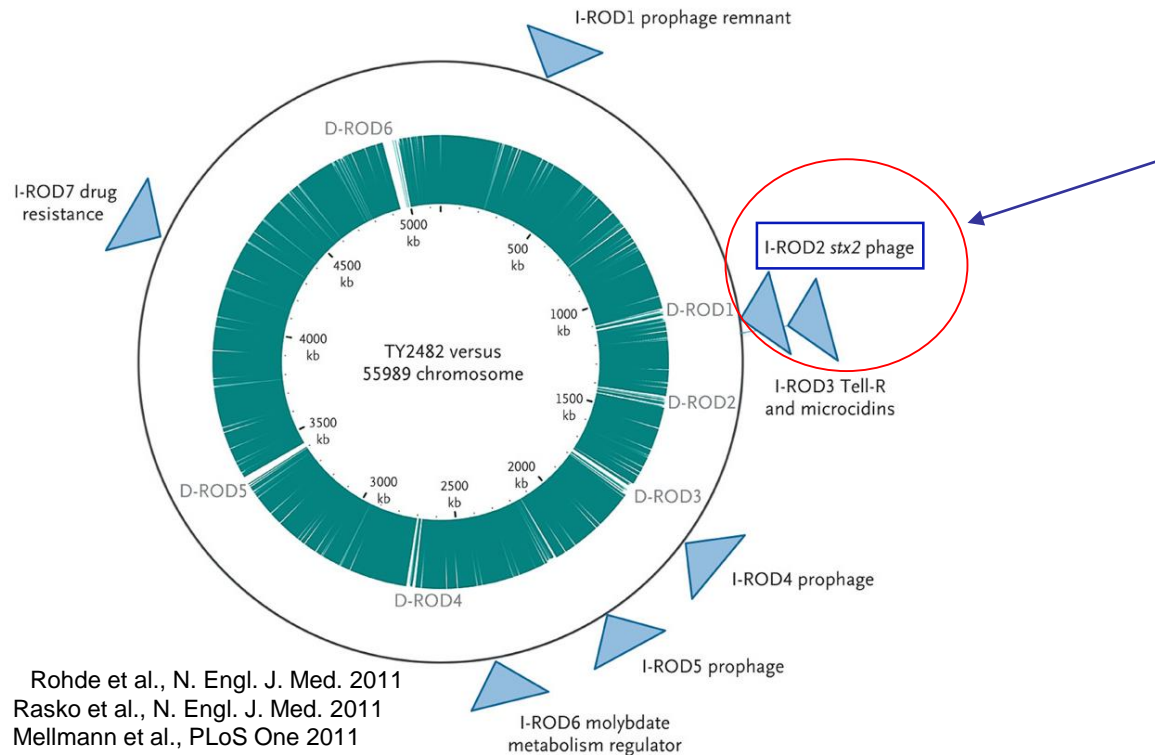
## Mikrobiologická diagnostika

- **Materiál:** rektální výtěr
- **Kultivace**
  - KA (nehemolytické i hemolytické)
  - Endo, MacConkey agar - laktóza-fermentující (růžové kolonie) => nelze odlišit od fyziol. střevní flóry
- **Identifikace**
  - Screening kolonií sérotypizací (sklíčková aglutinace)
    - nejčastější séroskupiny O3, O15, O44, O86, O111, O127
  - Potvrzení druhu *E. coli*
    - biochemické vlastnosti
    - MALDI-TOF
  - U susp. kolonií PCR průkaz *aggR* genu (kóduje transkripční regulátor AggR) = marker EAEC  
=> NRL pro *E. coli* a shigely



# Vznik hybridních patogenů (EHEC/EAEC O104:H4)

**EAEC mohou být lyzogenizovány bakteriofágy nesoucími *stx* geny kódující Stx => vznik hybridů!!!**



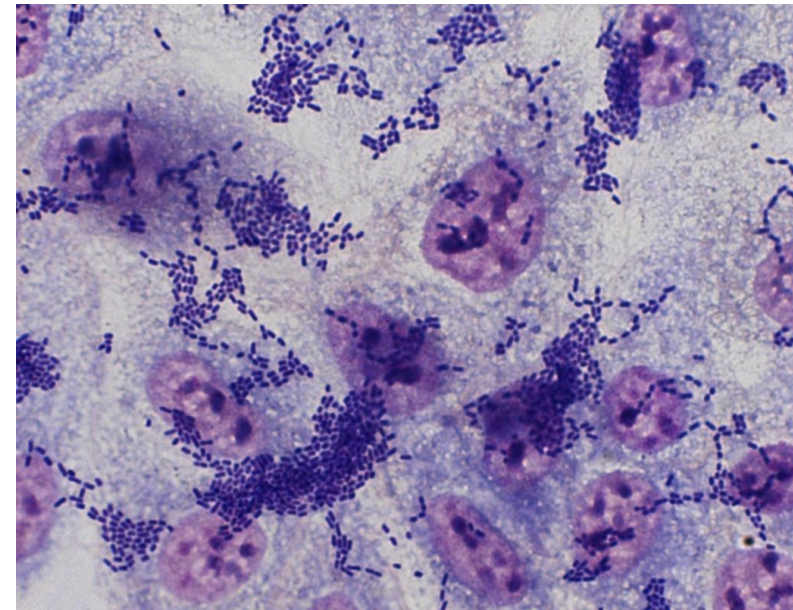
**Celogenomové sekvenování (WGS) O104:H4 epid. kmene (2011):**

- Core (základní) genom typický pro EAEC
- => typické faktory virulence EAEC => schopnost intenzivní adherence ke střevnímu epitelu
- do chromosomu integrován *stx<sub>2</sub>* bakteriofág kódující Stx2

**=> EHEC/EAEC hybrid**

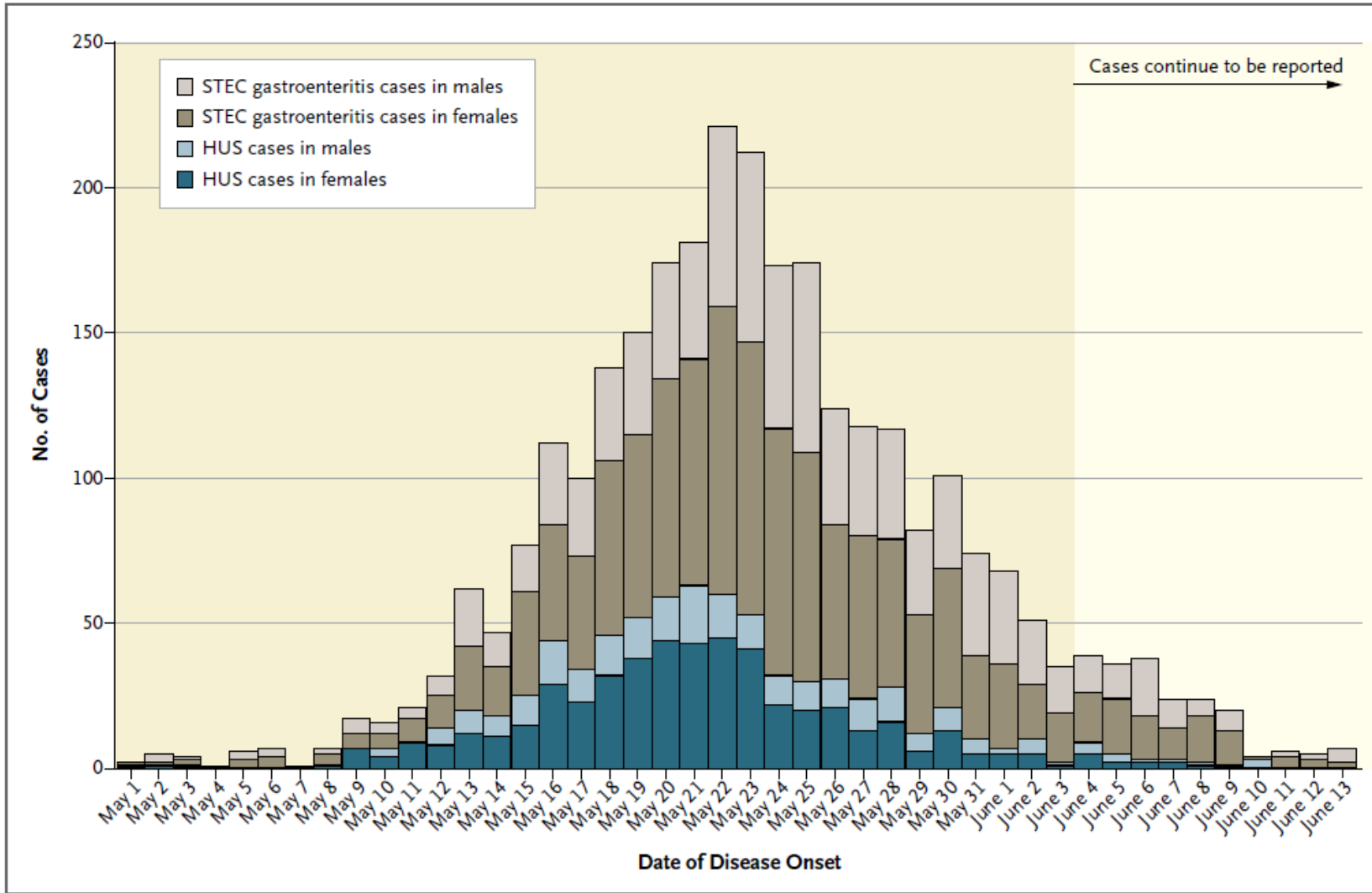
**Hypotéza:** Masivní adherence ke střevní sliznici zvýšila množství Stx2 absorbované do krevního oběhu

**=> Vysoká virulence - progrese infekce do HUS 22%!**



Adherence EHEC/EAEC ke střevním epitelovým buňkám (Bielaszewska et al., 2011)

# Epidemie hybridním kmenem EHEC/EAEC O104:H4, Německo 2011



**Figure 1. Epidemiologic Curve of the Outbreak.**

Shown are the number of cases of the hemolytic-uremic syndrome (HUS) and of Shiga-toxin-producing *E. coli* (STEC) gastroenteritis, according to sex. Only cases with a known date of onset are included here — 748 of 810 cases of the hemolytic-uremic syndrome and 2166 of 2412 cases of Shiga-toxin-producing *E. coli* diarrhea.

**3.842** případů onemocnění  
**2.987** průjem  
**855 HUS (22 %)**  
**54** úmrtí



**Největší a nejzávažnější epidemie HUS v historii!**

**Zdroj:**

**klíčky pískavice řecké seno**  
**- přidávané do salátů**  
(kontaminovaná semena  
dovezena z Egypta)



➤ **1 případ v ČR (US turistka, která konzumovala salát s klíčky v Německu)**

# Enteroinvazivní *E. coli* (EIEC)

## ➤ Onemocnění a výskyt

- **Onemocnění podobné shigelóze** = průjmy s příměsí hlenu a krve, břišní křeče, zvracení, horečka – děti i dospělí
- **Hlavní výskyt rozvojové země teplého pásma s nízkým hyg. standardem**
- Vzácné v rozvinutých zemích mírného pásma

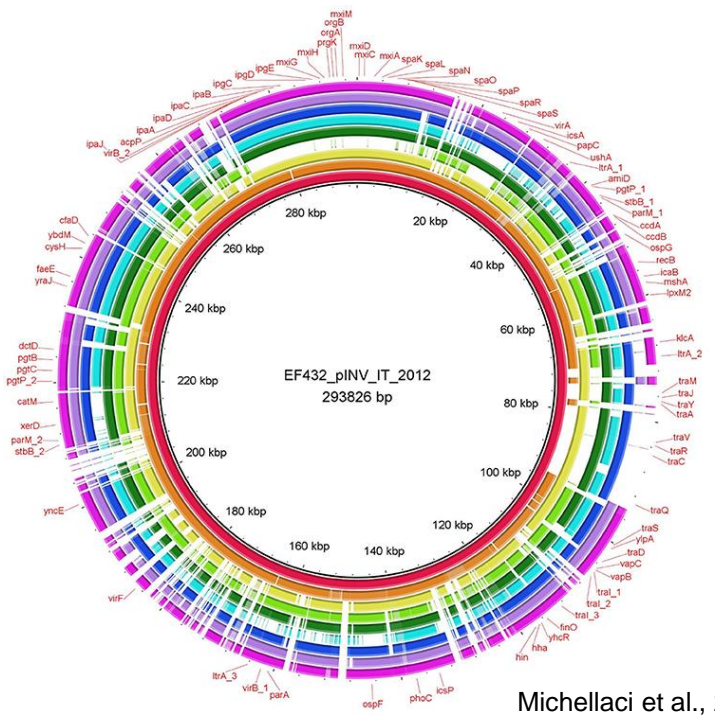
## ➤ Zdroj infekce a přenos

- Zdroj infekce člověk (jediný hostitel EIEC)
- Fekálně-orální přenos z člověka na člověka
- Kontaminovaná voda a potraviny (infekční dávka > 10<sup>6</sup> bakterií)

## ➤ Léčba

- Rehydratace
- Antibiotika (dle nutnosti)

# EIEC



Michellaci et al., 2020

## ➤ Faktory virulence:

- Komplex **invazinů** - proteinů umožňujících invazi do epitelu tlustého
- střeva (kódované na velkém „invazivním“ plasmidu)

## ➤ Patogeneze

- Fakultativně intracelulární patogen

(na rozdíl od ostatních diarhogenních *E. coli*)!

- Invaze do epitelových buněk tlustého střeva hlavní patogenetický mechanismus!

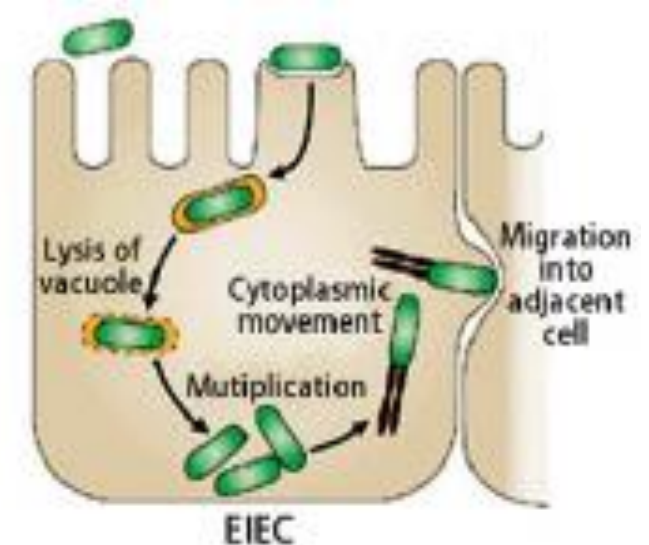
=> intracelulární množení => šíření baktérii z buňky do buňky

=> destrukce epitelu => slizniční léze

=> zánětlivá infiltrace sliznice

- **Průjem s příměsí hlenu, krve, hnisu**

(leukocyty mikroskopicky)





# EIEC

## Mikrobiologická diagnostika

➤ **Materiál:** rektální výtěr

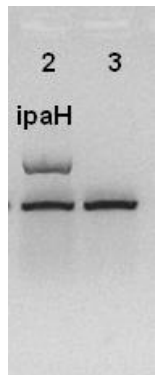
➤ **Kultivace**

- KA (nehemolytické)
- Endo agar, MacConkey agar - laktóza-nefermentující (světlé kolonie)
- => odlišení od fyziol. střevní flóry (laktóza-fermentující růžové kolonie)

➤ **Identifikace**

Obtížně odlišitelné od shigel, s nimiž mají společné genetické, fenotypové a antigení vlastnosti a faktory virulence!

- Biochemické vlastnosti – EIEC bioch. málo aktivni, velmi podobné shigelám – odlišení od shigel pomocí speciálních bioch. testů (lyzin-dekarboxyláza, mukát, acetát)
- MALDI-TOF – běžný postup neodliší EIEC od shigel
- Sérotypizace (sklíčková aglutinace)
  - nejčastější séroskupiny O28, O29, O112, O124, O136, O143, O144, O152, O159, O167
- U susp. kolonií PCR průkaz genů kódujících invaziny (*ipaH* – marker EIEC a shigel)  
=> NRL pro *E. coli* a shigely



# EIEC sérotypy a zkřížené reakce se shigelami

**Table 1.4** O:H serotypes of EIEC and the O antigen identity to *Shigella* O antigens

O group	H antigen	<i>Shigella</i> O antigen
O28ac	H-	<i>S. boydii</i> 13
O29	H-	
O112ac	H-	<i>S. dysenteriae</i> 2 O112ab ~ <i>S. boydii</i>
O115	H-	
O121	H-	<i>S. dysenteriae</i> 7
O124	H-; H7; H30; H32	<i>S. dysenteriae</i> 3
O135	H-	
O136	H-	
O143	H-	<i>S. boydii</i> 8
O144	H-; H25	<i>S. dysenteriae</i> 10
O152	H-	<i>S. dysenteriae</i> 12
O159	H2	
O164	H-	
O167	H-; H4; H5	<i>S. boydii</i> 3
O173	H-	

zdroj: *Pathogenic Escherichia coli*, Caister Academic Press, 2014

# Shigely

**4 druhy:** *Sh. dysenteriae*, *Sh. sonnei*, *Sh. flexneri*, *Sh. boydii*

## ➤ Onemocnění a výskyt

- **Dysenterie (bacilární úplavice, shigelóza):** Náhlý začátek – horečka, zimnice, třesavka, průjem => zprvu vodnatý, později příměs hlenu, krve; břišní křeče (tenezmy)
- **Hlavní výskyt rozvojové země** s nízkým hyg. standardem  
=> Shigelóza významným zdrojem morbidity a mortality, hlavně u dětí
- Nízký výskyt v rozvinutých země mírného pásma, onemocnění probíhá mírněji (dobrá tělesná konstituce populace), většinou importované infekce

## ➤ Zdroj infekce a přenos

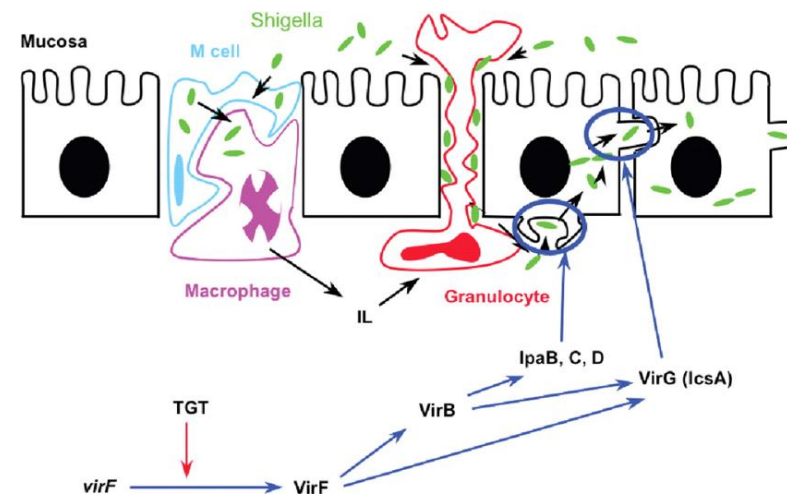
- Zdroj infekce člověk a vyšší primáti (jediní hostitelé shigel)
- Fekálně-orální přenos z člověka na člověka (infekční dávka 10-100 bakterií)
- Kontaminovaná voda a potraviny

## ➤ Léčba

- Rehydratace
- Antibiotika (nutná – shigely mají tendenci perzistovat intracelulárně!)



# Shigely



## ➤ Faktory virulence

- Komplex proteinů umožňujících invazi do epitelu colon (kódované na velkém „invazivním“ plasmidu)
- Toxiny (Shiga toxin – *Sh. dysenteriae*, Shigella enterotoxin 1, 2)

## ➤ Patogeneze

- Invaze do epitelových buněk tlustého střeva hlavní patogenetický mechanismus!
- Fakultativně intracelulární patogény => intracelulární množení => šíření z buňky do buňky => destrukce epitelu => slizniční léze => zánětlivá infiltrace

⇒ **Průjem s příměsí hlenu, krve, hnisu** (leukocyty ve stolici mikroskopicky)

# Shigely

## Mikrobiologická diagnostika

➤ **Odběr:** rektální výtěr (vždy zasílat v transportní půdě - shigely citlivé k zevním vlivům!)

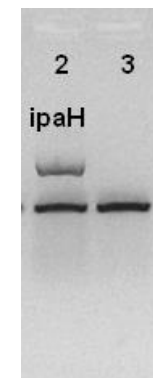
### ➤ Kultivace

- KA (někdy R fáze, nehemolytické)
- Endo/MacConkey agar (světlé laktóza-nefermentující)
- DC agar (selektivní půda pro shigelly) – světlé laktóza-nefermentující

### ➤ Identifikace

Obtížně odlišitelné od EIEC, s nimiž mají společné genetické, fenotypové a antigenní vlastnosti a faktory virulence!

- Biochemické testy – velmi podobné EIEC, možno odlišit speciálními bioch. testy
- MALDI-TOF – nelze odlišit od EIEC
- Sérotypizace (sklíčková aglutinace) na určení druhu a sérotypu
  - *Sh. dysenteriae* - 15 sérotypů
  - *Sh. flexneri* - 6 sérotypů
  - *Sh. boydii* - 20 sérotypů
  - *Sh. sonnei* - 1 sérotyp (2 formy – I smooth, II rough)
- PCR *ipaH* (marker EIEC a shigel)
  - => NRL pro *E. coli* a shigely



# Salmonely

## 2 druhy:

- ***S. enterica***
- ***S. bongori*** (vzácná – onemocnění kojenců a novorozenců)

- ***S. enterica* => 2 skupiny** (podle kliniky, epidemiologie):

### 1) Tyfoidní salmonely - ***S. enterica* serovar Typhi, *S. enterica* serovar Paratyphi A, B, C**

- Onemocnění: Břišní tyfus, paratyfus
- Celková systémová onemocnění (bakteriemie), závažná, život ohrožující
- Jediný hostitel člověk (a vyšší primáti)

### 2) Netyfoidní salmonely (ca. 2600 sérotypů/sérovarů - nejčastější ***S. enterica* serovar Enteritidis, *S. enterica* serovar Typhimurium, *S. enterica* serovar Infantis**)

- Onemocnění „salmonelóza“ (gastroenteritis)
- Průjem, nauzea, zvracení, bolesti břicha, horečka
- Průjem s extraintestinálními komplikacemi (abscesy ve žluč. cestách, kostech, kloubech)  
– imunokompromitované osoby, evtl. malé děti, senioři (*S. enterica* serovar Choleraesuis)
- Zoonózy (rezervoárem a zdrojem infekce pro člověka jsou zvířata)

# Netyfoidní salmonely

## ➤ 2. nejčastější původci průjmů u dětí a dospělých v rozvinutých zemích

### ➤ Zdroj infekce

Zvířata, ptáci (drůbež) a jejich produkty (vejce, maso)

### ➤ Přenos

- Kontaminované potraviny: majonézy, vaječné krémy, zmrzlina – konzumace bez předchozího tepelného opracování!
- Kontaminovaná voda (infekční dávka  $10^6$ - $10^9$  bakterií)  
– často epidemie (školní jídelny, předškolní zařízení, sociální ústavy, hotely, atd.)

### ➤ Inkubační doba: 2-3 dny

### ➤ Patogeneze

Fakultativně intracelulární patogény - invaze do lymfatické tkáně tenkého střeva (Peyerovy plaky) => šíření do střev. epitelových buněk => zánětlivá reakce, porucha transportu iontů a vody => průjem

### ➤ Léčba

#### ▪ Průjmy: Rehydratace!

- Antibiotika NE – nezkracují dobu průjmu ani vylučování salmonel – vylučování spíše prodlužují!

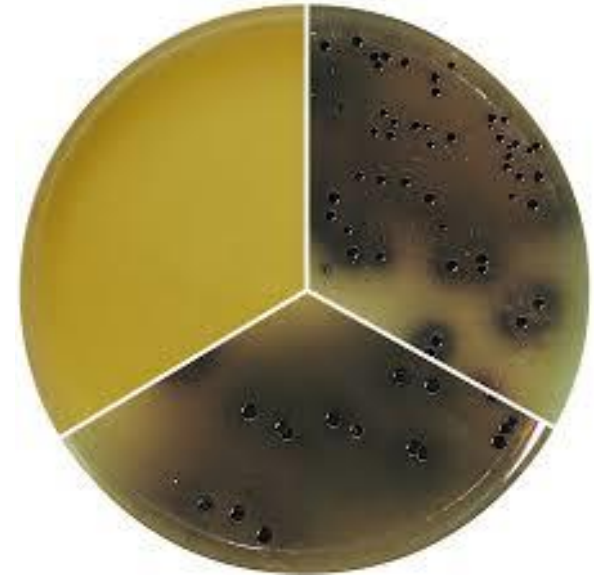
#### ▪ Extraintestinální komplikace

- Antibiotika nutná (dle citlivosti)

# Netyfoidní salmonely

## Mikrobiologická diagnostika

- **Odběr:** rektální výtěr
- **Kultivace**
  - KA (nehemolytické)
  - Endo/MacConkey agar (světlé laktóza-nefermentující kolonie)
  - DC agar (laktóza-nefermentující kolonie s tmavým středem - produkce H<sub>2</sub>S)
- + Selektivní pomnožení v selenitovém bujónu => vyočkování na:
  - ⇒ DC agar
  - ⇒ Bismuth sulfitový agar (Wilson-Blair) – vysoce selektivní (černé kolonie se zrcadlovým leskem)
- **Identifikace**
  - Biochemické testy
  - MALDI-TOF
  - Sérotypizace – sklíčková aglutinace na určení O a H antigenů (schema Kaufmann-White)



# *Salmonella enterica* serovar Typhi

➤ **Onemocnění: břišní tyfus (*Typhus abdominalis*)**

➤ **Zdroj infekce**

Pouze člověk (pacient nebo nosič) – vylučování stolicí

➤ **Přenos**

Potraviny, voda (fekálně kontaminované pacientem nebo nosičem) - infekční dávka  $10^3$ - $10^6$  bakterií

➤ **Inkubační doba:** 1-3 týdny (3-60 dnů)

➤ **Patogeneze**

Invazivní patogén - invaze do lymfatické tkáně tenkého střeva (Peyerovy plaky) - proliferace  
=> invaze do krevního oběhu (bakteriemie) => tvorba bakteriálních ložisek (abscesů) v různých orgánech (játra, slezina, ledviny, střevo, žlučové cesty, kosti)

➤ **Klinika:** V 1. týdnu vysoké horečky (40°C)-febris continua, úporné bolesti hlavy (hlavnička), později exantem, bolesti břicha, průjem nemusí být, spíše zácpa; únava, vyčerpanost, bradykardie  
- řada komplikací (perforace střeva => peritonitis; cholecystitis => nosičství)

➤ **Léčba**

Antibiotika - chloramfenikol (dříve lékem volby) => pro vedl. účinky a narůstající resistenci nahrazen  
- cotrimoxazolem (trimetoprim-sulfametoxazol) a fluorochinony (ciprofloxacin)



# Salmonella enterica serovar Typhi

## Mikrobiologická diagnostika tyfu

### ➤ Odběr materiálu: **záleží na stadiu onemocnění!**

1. týden: krev na hemokulturu (nutno odebrat před zahájením ATB léčby!)  
kostní dřeň (byla-li podána ATB)

Od 2. týdne: stolice, moč, žluč, hnis, atd. (dle lokalizace infekce)

### ➤ Kultivace

- KA (nehemolytické)
- Selektivně-diagnostické půdy
- Endo agar (světlé laktóza-nefermentující kolonie)
- DC agar – laktóza-nefermentující kolonie s tmavým středem (produkce H<sub>2</sub>S)
- Bismuth sulfitový agar (Wilson-Blair) – vysoce selektivní (černé kolonie se zrcadlovým leskem)

### ➤ Identifikace

- Biochemické testy
  - MALDI-TOF
  - Sérotypizace (sklíčk. aglutinace) – O Ag (9,12), H Ag (d), Vi Ag (povrchový)
- => provádí NRL pro salmonely

# Salmonella enterica serovar Typhi

## ➤ Serologická diagnostika břišního tyfu – Widalova reakce

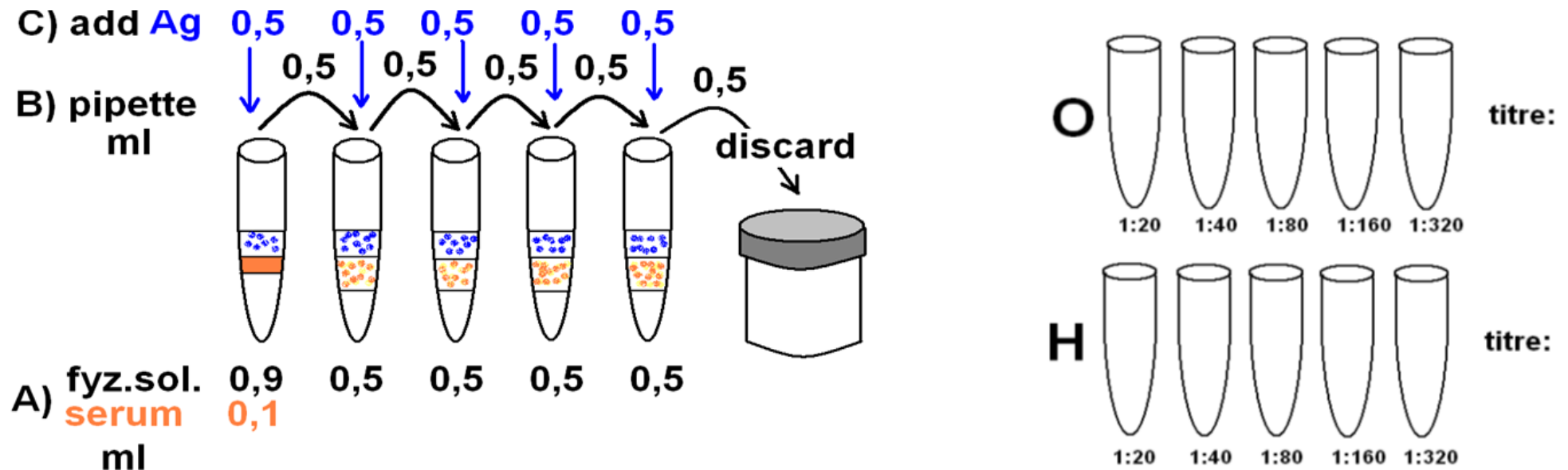
= aglutinační průkaz protilátek proti antigenům S. Typhi

O Ag (typ 9,12), H Ag (typ d) => zvýšené od 2. týdne onemocnění

Vi Ag => zvýšené od 3. týdne onem. – trvalé zvýšení indikátorem nosičství!

- Nutné 2 vzorky séra v rozmezí alespoň 2 týdnů (1. vzorek na zač. onem., 2. vzorek ve 2.-3- týdnu)  
=> pro serologické potvrzení diagnózy nutný alespoň 4-násobný vzestup titru mezi 1. a 2. vzorkem!

Schema provedení:



# *Salmonella enterica* serovar Typhi

## Mikrobiologická diagnostika nosičství S. Typhi

- **Nosičství** – vyvíjí se u 2-5% osob, které prodělaly tyfus
- Lokalizace S. Typhi ve žluč. cestách (často žlučník s cholelitiázou), evtl. moč. cestách  
=> vylučování patogena řadu měsíců, roků až doživotně BEZ klinických příznaků!!!
- **Vysoce nebezpečné z epidemiologického hlediska: Nosiči jsou nejčastějšími zdroji infekce (častější než akutně nemocní pacienti)!**

**=> Všichni pacienti, kteří se uzdravili z akutního onemocnění evidování a sledování na nosičství!**

- Mikrobiologické vyšetření stolice (po podání  $MgSO_4$  - projímadlo), duodenální šťávy, moči
- **Vyloučení z evidence nosičů po 3 opak. negat. odběrech** (1. nejdříve za 14 dnů po skončení ATB terapie, 2. a 3. s odstupy nejméně 1 měsíc)
- **Vylučování > 12 měsíců = chronické nosičství (kontroly 1x ročně, zvláštní hyg. opatření)**

# *Yersinia enterocolitica*

➤ **Výskyt** celosvětový, častější v mírném pásmu; **nejčastěji onemocnění u dětí**

▪ **Malé děti (kojenci, batolata)**

- Akutní průjem – vodnatý, evtl. s příměsí krve, křečovitě bolesti břicha, zvracení, horečka

▪ **Větší děti, dospělí**

- Pseudoapendikulární syndrom (pseudoapendicitis) = zánět mízních uzlin v periapendikulární oblasti, manifestuje se jako akutní apendicitis (bolest v pravé jámě kyčelní)

=> **Nejčastější původci lidských onemocnění séro skupiny O3, O9 (Evropa) a O8 (USA)**

➤ **Zdroj infekce a přenos**

▪ Zdroj infekce zvířata – prasata, dobytek, divoká zvířata (vysoká zvěř, hlodavci), ptáci => zoonóza

▪ Kontaminované potraviny (vepřové maso – nedostatečně tepelně zpracované, nepasterizované mléko) a voda;

▪ Přímý kontakt se zvířaty (manipulace s vepř. kadavery při zabijačce)

=> Infekční dávka  $10^6$ - $10^9$  (roste při 4°C! – možnost pomnožení v potravinách v lednici)

➤ **Léčba**

▪ Rehydratace

▪ Antibiotika (u závažného průběhu)

# Yersinia enterocolitica

## ➤ Patogeneze

Invazivita a afinita k lymfatické tkáni hrají hlavní roli!

=> Pomnožení v terminálním ileu a proximálním colon  
(především M buňky Peyeroých plaků)

=> invaze do submukózy

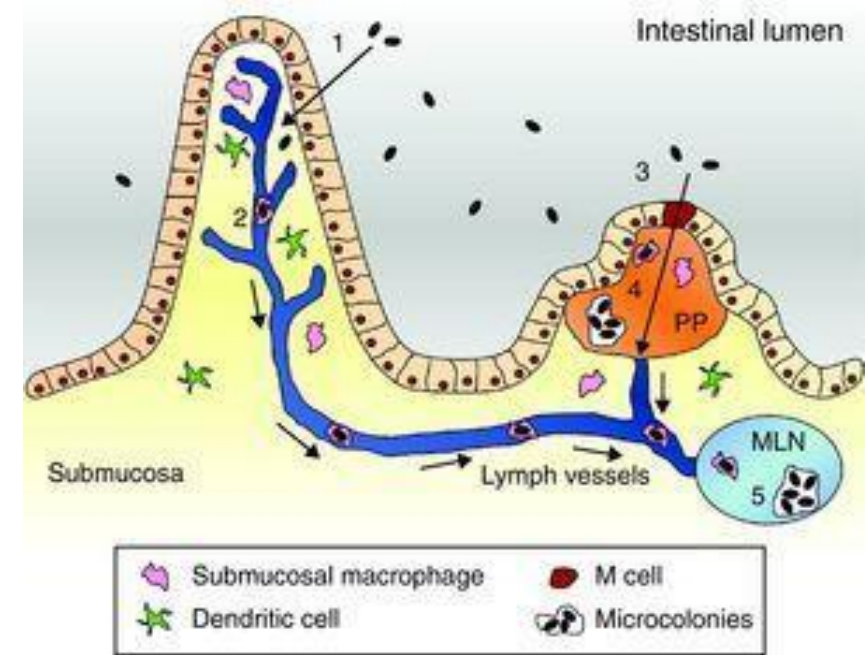
=> v submukóze fagocytóza makrofágy => transport do lymf. cév  
a mezent. lymf. uzlin => množení => lymfadenopatie

=> Proliferace v Peyer. placích – slizniční ulcerace

V klinice symptomatologie rezultující

- z poškození mezenterálních lymfat. uzlin => **pseudoappendikulární syndrom**

- slizničních lézí => **průjem s příměsí krve**



Fàbrega A, Vila J. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2012;30:24-32

# *Yersinia enterocolitica*

## Mikrobiologická diagnostika

- **Odběr:** rektální výtěr
- **Kultivace:**
  - KA (nehemolytické)
  - Selektivně-diagnostické půdy
    - Endo agar - světlé laktóza-nefermentující kolonie
    - DC agar – světlé laktóza-nefermentující kolonie
    - CIN (Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin) agar => vysoce selektivní, kolonie vzhledu „býčího oka“ (bezbarvé s červeným středem)
  - Optimální růst. teplota *Y. enterocolitica* je 25°- 30°C => po 24 inkubace při 37°C kolonie velmi drobné => mohou být přehlédnuty mezi ostatní střevní flórou  
=> DC agar inkubovat dalších 24 hod. při pokoj. teplotě => zvětšení kolonií
  - Zvýšení zachytu: selektivní pomnožení při 4°C => vyočkování na pevné půdy (DC agar)
- **Identifikace:**
  - Biochemické testy
  - MALDI-TOF
  - Sérotypizace (sklíčk. aglutinace) – O3, O9, O8

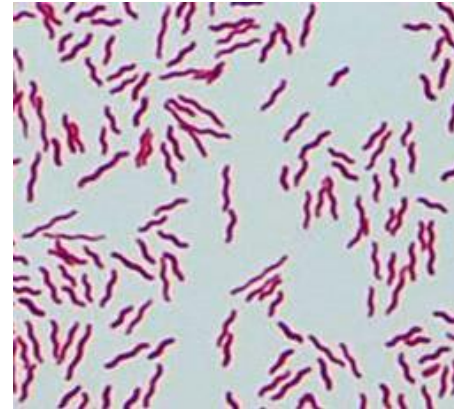


*Y. enterocolitica* na CIN agaru  
www.bacteriainphotos.com

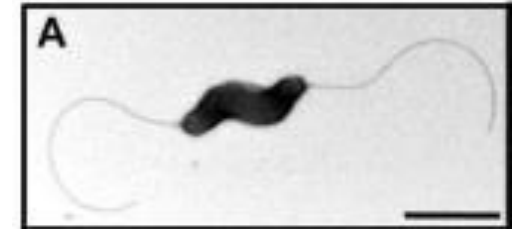


# *Campylobacter jejuni*

- **Patří do čeledi *Campylobacteraceae***
- **Vlastnosti**
  - G-negativní nesporulující tyčka, spirální morfologie, pohyblivá (polární bičíky), mikroaerofilní, termofilní
- **Celosvětový výskyt – nejčastější původce průjmů u dětí i dospělých v rozvinutých zemích!**
- **Zdroj infekce**
  - Drůbež (kuřata), skot a jejich produkty (vejce, maso, mléko) => zoonóza
- **Přenos**
  - Kontaminované potraviny (nedostatečně tepelně opracované – grilovaná kuřata, nepasterizované mléko a sýry, tatarský biftek, majonéza)
  - Přímý kontakt se syrovou drůbeží při kuchyňském zpracování (infekční dávka  $10^2$ - $10^3$  bakterií)



*C. jejuni*  
Gramovo barvení



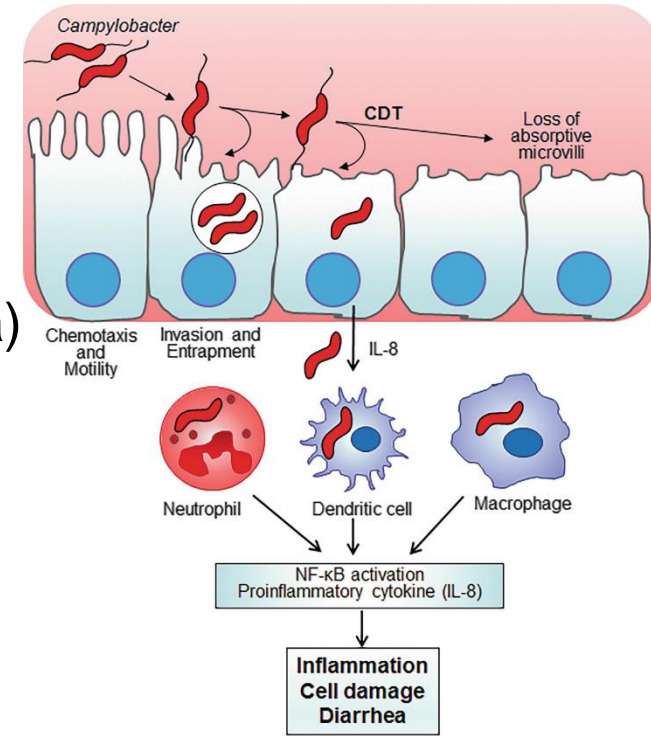
*C. jejuni* EM  
Balaban, Hendrixson  
PLoS Path. 2011

# Campylobacter jejuni

## ➤ Patogeneze

### Invazivita hraje hlavní roli!

- Průnik hlenovou vrstvou sliznice tenkého a tlustého střeva (motilita - flagella)
- Adherence k epitelu => kolonizace
- Invaze do epitelových buněk => proliferace
  - => průnik do submukózy
  - => indukce zánětlivých cytokinů (epit. bb., makrofágy, dendritické bb.)
  - => zánětlivá infiltrace
  - => poškození mikrokřků => porucha resorpce



Bhunja, A.K. Foodborne Microbial Pathogens (Springer, 2018)

## ➤ Klinika

- Průjem s příměsí krve, hlenu a hnisu, horečka
- Syndrom pravé jámy kyčelní - křečovitě bolesti břicha v pravém dolním kvadrantu
  - => simuluje apendicitis

## ➤ Léčba

- Antibiotika nutná u malých dětí, seniorů, imunokompromitovaných (nebezpečí generalizace)
  - makrolidy (erytromycin, azitromycin)

# *Campylobacter jejuni*

## Mikrobiologická diagnostika

➤ **Odběr:** rektální výtěr => zasílání v transportním mediu (Amies+aktivní uhlí) – citlivý k zevním vlivům

***Vyžaduje speciální kult. podmínky - při běžném zpracování vzorků není zachycen!***

### ➤ **Kultivace:**

- Selektivní media - inhibice stř. flóry
- Karmali medium - agar s aktivním uhlím a ATB (vancomycin, cefoperazon)
- Skirrow medium - KA s ATB (vancomycin, trimethoprim, polymyxin B)
- Mikroaerofilní prostředí (snížený obsah O<sub>2</sub>) => inkubace v atmosféře s 5 % O<sub>2</sub>, 10 % CO<sub>2</sub>, 85 % N<sub>2</sub>  
=> komerční kity – např. CampyGen, Anaerocult C
- Termofilní (optimální kultiv. teplota 42°C)
- Růst nejméně 48 hod. – mírně rozplizlé kolonie

### ➤ **Identifikace:**

- Screening pozitivním oxidázovým testem
- MALDI-TOF
- **Rychlá diagnostika** – imunoeseje na průkaz Ag *C. jejuni* ve stolici  
- PCR (součást komerčních kitů)



# Vibrio cholerae

## G- tyčka z čeledi *Vibrionaceae*

### ➤ Onemocnění

- **Cholera** – akutní onemocnění charakterizované **profuzními vodnatými průjmy**  
=> stolice vzhledu „rýžového odvaru“ (vločky hlenu, bez příměsí krve)  
=> velké ztráty vody a elektrolytů => rychlá dehydratace, metabolický rozvrat, hypotenze  
=> bez léčby smrt až u 50% pacientů

### ➤ Výskyt

- **V rozvojových zemích s nízkým hygienickým standardem** (jihových. Asie, Afrika, stř. a již. Amerika, asij. země býv. Sov. Svazu); epidemie, pandemie
- **Ve vyspělých zemích mírného pásma importované případy (vzácné)**

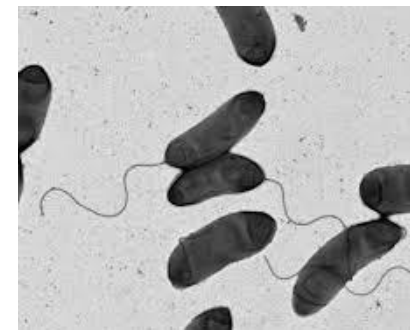
### ➤ Původci cholery *V. cholerae*, druhy O1 (biotypy klasický a El Tor) a O139

### ➤ Zdroj infekce a přenos

- Zdroj infekce člověk (pacient, vylučující rekonvalescent)
- Přenos fekálně kontaminovanou vodou a potravinami (infekční dávka  $10^6$  bakterií)  
=> v endem. oblastech pít jen balenou vodu, touto mýt i ovoce/zeleninu, pozor na led do nápojů!

### ➤ Léčba

- **Rehydratace s náhradou vody a elektrolytů je klíčová a život zachraňující terapie!!!**
- Antibiotika (tetracyklin, cotrimoxazol, fluorochinony)



www.phys.org

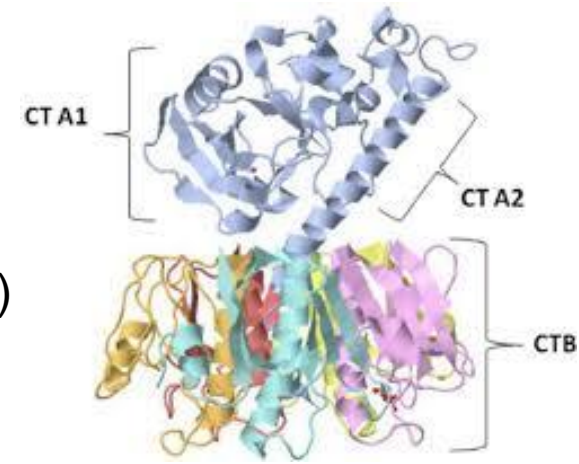


Sack et al., Lancet, 2004, 363:223

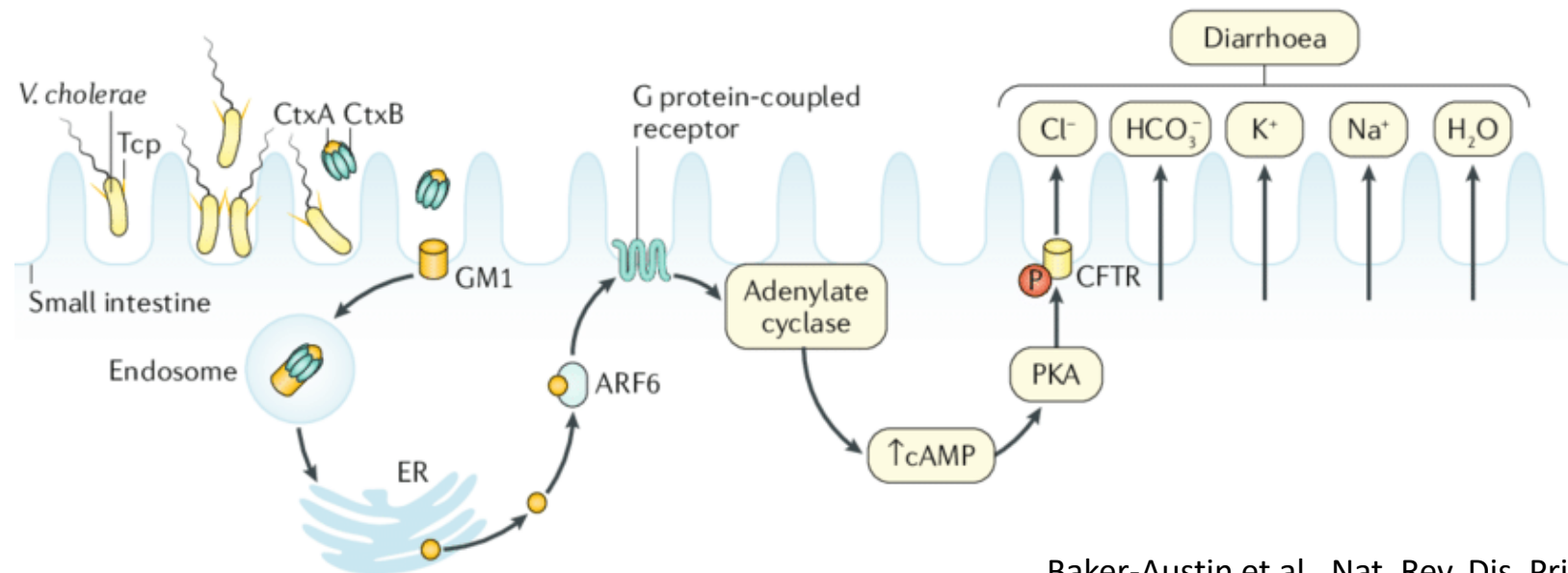
# Vibrio cholerae

## ➤ Patogeneze (podobná ETEC)

- Neinvazivní patogen => onemocnění vyvolané toxinem (cholerový toxin, cholergen)
  - AB<sub>5</sub> toxin (1 A podjednotka - biol. aktivní, 5 B podjednotek - vazné)
- Adherence bakterií k epitelu tenkého střeva (jejunum) => pomnožení (kolonizace)
- Produkce choleragenu (Ctx)
  - B podjednotka se váže na specif. receptor (gangliosid GM1)
  - internalizace Ctx => transport do ER => uvolnění A podjednotky
  - => aktivace adenylcyklázy => zvýšení cAMP
  - => zvýšená sekrece iontů a vody z buněk do střev. lumen
  - => vodnatý průjem



Krystalická struktura cholerového toxinu  
researchgate.net





# Vibrio cholerae

## Mikrobiologická diagnostika

➤ **Materiál:** Stolice (rektální výtěr)

⇒ **Při podezření na cholera nutno informovat mikrobiologickou lab., při běžném zpracování vzorků není *V. cholerae* zachyceno!**

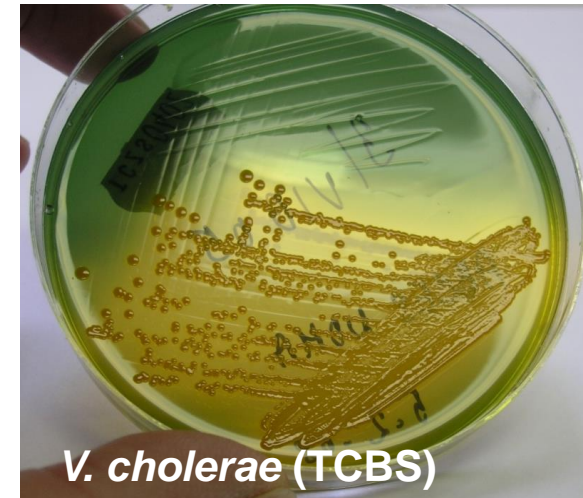
➤ **Kultivace:**

- Selektivní pomnožení v alkalické peptonové vodě (ostatní stř. flora neroste)
- Vyočkování na TCBS (TCŽS) agar (thiosulfate-citrate-bile salts-sucrose)  
⇒ *V. cholerae* roste ve žlutých koloniích (fermentuje sacharózu)

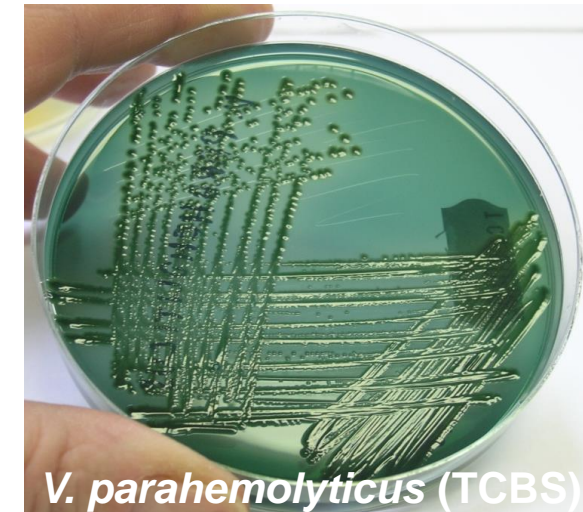
⇒ suspektní kmeny se zasílají do NRL pro *E. coli* a shigely (SZÚ Praha)

➤ **Identifikace:**

- Biochemie
- MALDI-TOF
- Sérotypizace na určení druhu O1 (sérotypy Ogawa a Inaba), O139
- Průkaz produkce cholerového toxinu (latexová aglutinace – kit VET-RPLA (Oxoid) – detekuje i LT)



*V. cholerae* (TCBS)



*V. parahemolyticus* (TCBS)

Fotografie ploten RNDr. Petr Petráš,  
NRL pro stafylokoky, SZÚ Praha



# Viry jako původci GIT

## ➤ Nejčastější původci

- Rotaviry
- Noroviry
- Adenoviry (typ 40, 41)
- Norwalk virus
- Coronaviry

## ➤ Výskyt u dětí i dospělých

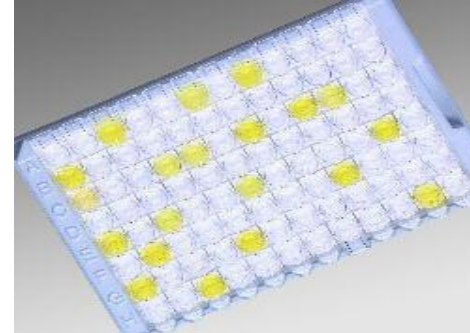
U dětí zavažnější => rychlá dehydratace

- Snadné šíření – fekálně-orální přenos
- Epidemie v kolektivech
  - jesle, školky, školy
  - ústavy sociální péče
  - nemocnice

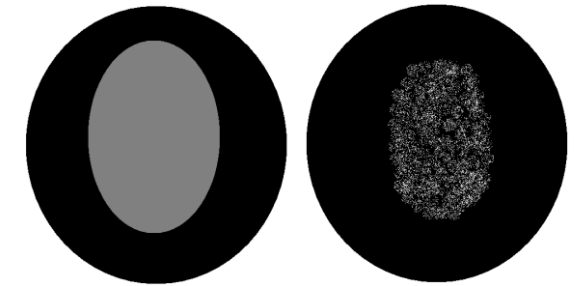
## ➤ Léčba: Rehydratace

## ➤ Virologické vyšetření stolice

### 1) Imunoeseje - průkaz virového antigenu ve stolici



ELISA



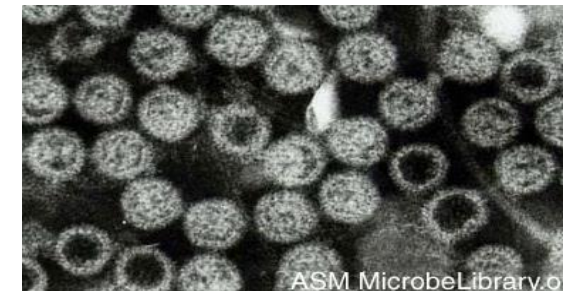
Latexova aglutinace



Imunochromatografie

### 2) Elektronová mikroskopie

- průkaz viru



### 3) PCR - průkaz virové DNA ve stolici

# Kazuistika 1

Na hygienickou stanici v H. Králové bylo v létě 2018 nahlášeno 82 případů onemocnění u lidí, kteří jedli kebab v jedné provozovně s občerstvením

- První den onemocnělo 23 osob (vydáno 170 porcí => „attack rate“ 13,5 %)
- Druhý den onemocnělo 59 osob (vydáno 60 porcí => attack rate 98,3 %)
- Začátek onemocnění: od 1 hod. do několika hod. po konzumaci potravin
- Příznaky: nauzea, zvracení, průjem, bolesti břicha, únava
- 44 pacientů bylo hospitalizováno!

## ➤ Mikrobiologicko-epidemiologické šetření

- Suspektní etiologie?
- Koho/co vyšetřit?
- Metody mikrobiol. vyšetření?



© Can Stock Photo - csp28298493



## „KEBABOVÁ“ epidemie

Laboratorní vyšetření prováděna  
(NRL pro stafylokoky)



Do NRL/St byly zasláno 31 kmenů *S. aureus*,  
které byly podrobeny fenotypové a genotypové typizaci

**15** kmenů od pacientů - **13** pozitivních na Enterotoxin A (EnA)

**8** kmenů z inkriminovaných potravin - **8** pozitivních na EnA

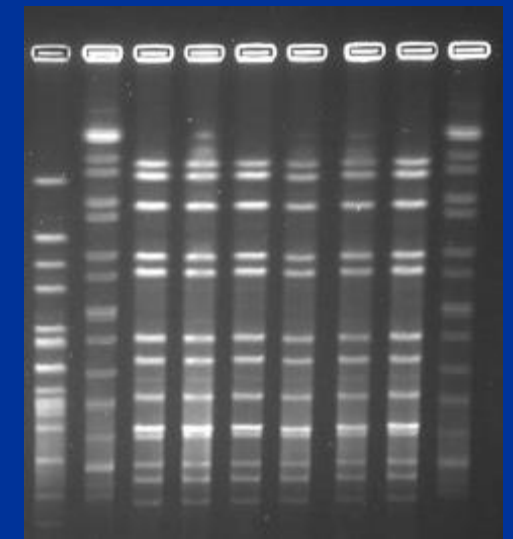
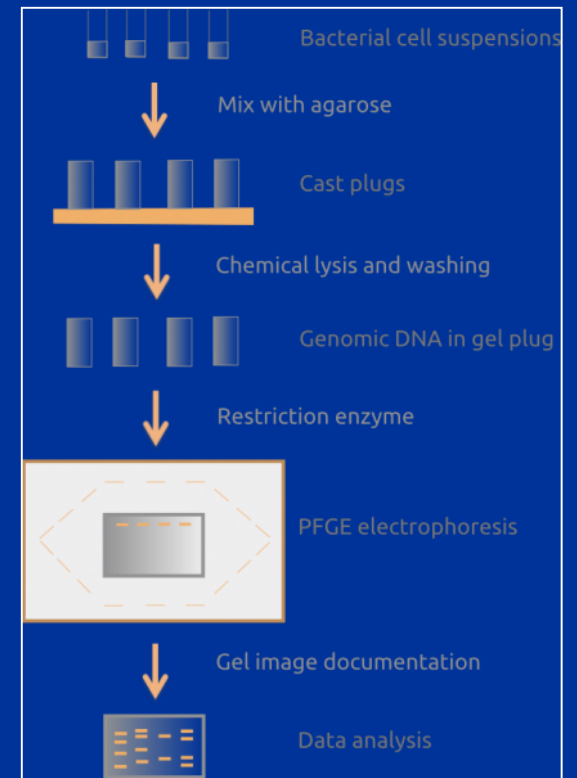
**5** kmenů ze stěrů rukou personálu - **4** pozitivní na EnA

**3** kmeny ze stěrů prostředí provozovny - **3** pozitivní na EnA

# „KEBABOVÁ“ epidemie

Kmeny byly podrobena makrorestrikční analýze pomocí pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)

- **Všechny kmeny pozitivní na enterotoxin A a izolované v souvislosti s epidemií patřily ke stejnému pulzotypu**
  - **Kmeny nepatřící k epidemii (kontroly) měly pulzotyp odlišný**
- **Potvrzeno, že tato epidemie byla způsobena týměž kmenem *S. aureus* s produkcí enterotoxinu A**



Zdroj: NRL pro stafylokoky, SZÚ Praha, RNDr. Petr Petráš;  
PFGE gel prevzat z <http://bacterio.iph.fgov.be/images/PFGE.jpg/view>

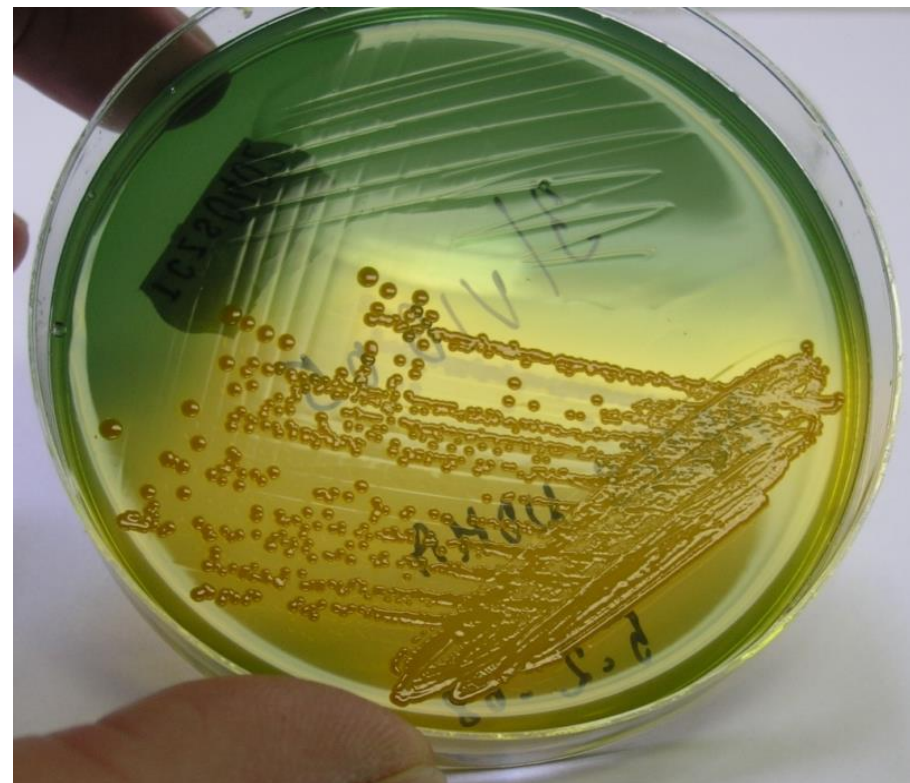
# Kazuistika 2

- Pacientka: žena, 30 let
- 11.5. návrat z 7-měsíčního pracovního pobytu v Zanzibaru (bydlela na ubytovně – dobré hygienické podmínky, vodu převařovala nebo pila balenou, syrové maso nekonzumovala, ovoce a zeleninu dobře omývala pitnou vodou z kohoutku)
- Od 10.5. horečky, bolesti břicha, vodnatý průjem – zvyšující se frekvence stolic, makroskopicky stolice vzhledu šedožluté vody, bez krve
- 12.5. 2018 přijata do Ústřední vojenské nemocnice (ÚVN)
  - Při příjmu unavená, střední stupeň dehydratace, bolesti hlavy, teplota 38.8 °C
  - Průjem přetrvává - udává až 15 stolic denně, stolice objemné, vodnaté, bez krve
  - Odebrána stolice na mikrobiologické vyšetření
  - Zahájena i.v. rehydratace jako první terapeutické opatření na doplnění tekutin a iontů
- **Suspektní etiologie? Metody mikrobiol. vyšetření?**



## Kazuistika 2

- Na mikrobiol. odd. ÚVN byla ze stolice pacientky dne 16.5. 2018 po pomožení v peptonové vodě s následným vyočkováním na TCBS agar vykultivována čistá kultura kmene rostoucího ve žlutých koloniích => susp. *Vibrio cholerae*
- Kmen zaslán do NRL pro *E. coli* a shigely SZÚ Praha pro ověření a další identifikaci
- Zde pomocí bioch. testů, MALDI-TOF a aglutinace identifikováno *Vibrio cholerae* O1, sérovar Ogawa
- Případ uzavřen jako cholera (Dg A00 dle MKN)  
=> Nahlášen na Ministerstvo zdravotnictví





# Kazuistika 3

- Do FN Motol přijat pacient – chlapec, 18 měsíců
- Průjem trvající 6 dnů, v posledních 24 hod. masivní příměs krve ve stolici, křečovitě bolesti břicha, zvracení, afebrilní
- Při příjmu byl vědomí, unavený, bledý, anurický (nemočí), otoky končetin
- Laboratorní hodnoty:
  - Hemoglobin 50 g/l (snížený), v krev. nátěru schistocyty 22% (zvýšené)
  - Trombocyty  $90 \times 10^9/l$  (snížené)
  - Kreatinin 430 mikromol/l, urea 31 mmol/l (zvýšené)
- Vzorek stolice zaslán na mikrobiologické vyšetření do NRL pro *E. coli* a shigely (SZÚ Praha)

# Kazuistika 3-pokrač.

- Důležitá anamnestická data:
- 6 dnů před hospitalizací navštívil s rodiči a 8-letým bratrem mini-ZOO (kozy, ovce, divoká prasata, daňci, jeleni) => obě děti hladily a krmily zvířata
- K obědu celá rodina konzumovala párky v rohlíku (bez možnosti umytí rukou)
- Za 4 dny od návštěvy ZOO obě děti mírné bolesti břicha, průjem (vodnatý bez příměsi krve, 5-7 stolic/den), zvracení, afebrilní  
=> další den návštěva pediatra => dieta, tekutiny perorálně, Smecta  
=> Průjem u staršího dítěte po 2 dnech ustává
- U 18-měs. pacienta během dalších 24 hod => krvavý průjem (6 stolic/den), křečovitě bolesti břicha => znovu pediatr – výrazná bledost, únava dítěte, dotazem u matky suspektní oligurie  
=> doporučuje hospitalizaci
- **Suspektní etiologie? Metody mikrobiol. vyšetření stolice?**

# Mikrobiologické vyšetření stolice pacienta v NRL pro *E. coli* a shigely

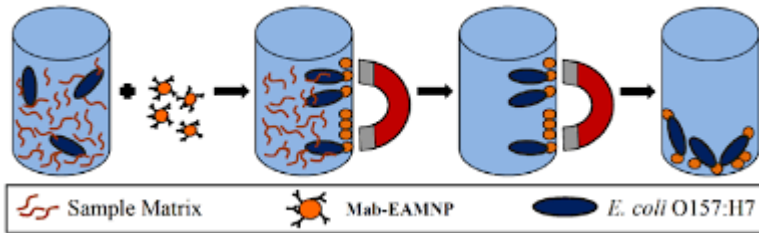
Stolice



Pomnožení (Hajna bujon bez/s Novobiocinem)

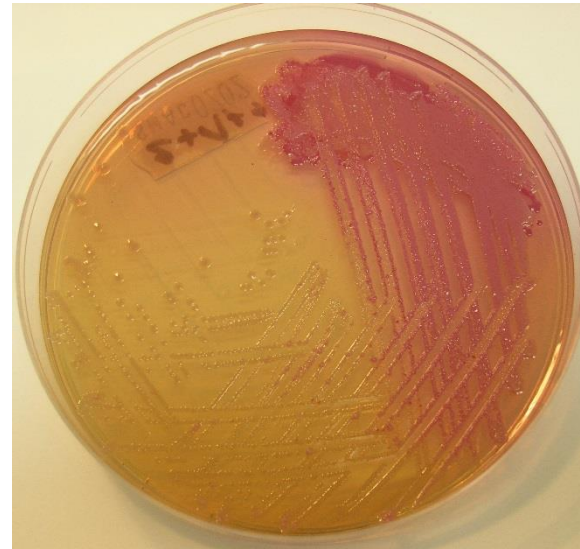


Imunomagnetická separace (IMS) „top five“  
(O26, O103, O111, O145, O157)  
=> Selektivní koncentrace „top five“ STEC



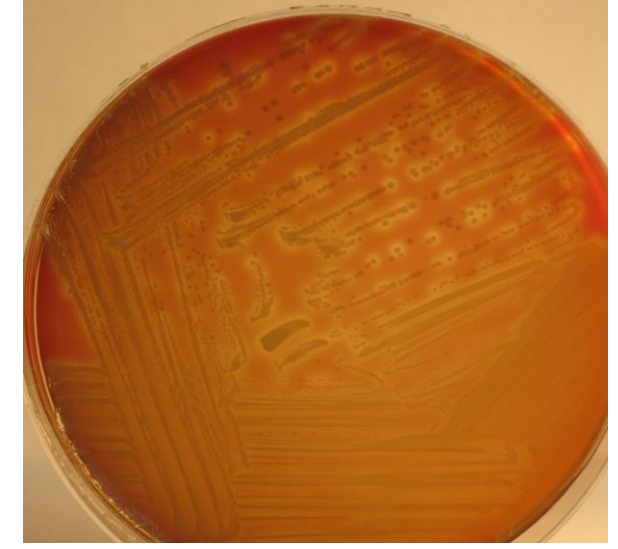
Kultivace po IMS na:

- KA
- Sorbitol MacConkey agar (SMAC)
- CT-SMAC
- Enterohemolysinový agar



**SMAC, CT-SMAC**

O157:H7 bezbarve  
Ostatní "top five" růžové



**Enterohemolysinový agar**

Všechny "top five"  
enteroemolytický fenotyp  
= neúplná hemolýza



Izolována 1 kolonie Sor- (SMAC) a 1 EHEC-Hly+  
=> z nich izolována DNA => PCR

**stx<sub>1</sub>-**  
**stx<sub>2</sub>+**  
**eae+**  
**EHEC-hly+**

**Obě kolonie potvrzeny jako *E. coli***  
(bioch., MALDI-TOF)  
**Sérotypizace (skličk. aglutinace) O157**  
**Produkce Stx2 (latex aglutinace)**

**Závěr:** HUS vyvolaný kmenem STEC O157 produkujícím Stx2 (pod dg MKN D59.3 nahlášen na MZd)