

Původci infekcí gastrointestinálního traktu

Doc. MUDr. Martina Bielaszewska, Ph.D.

**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

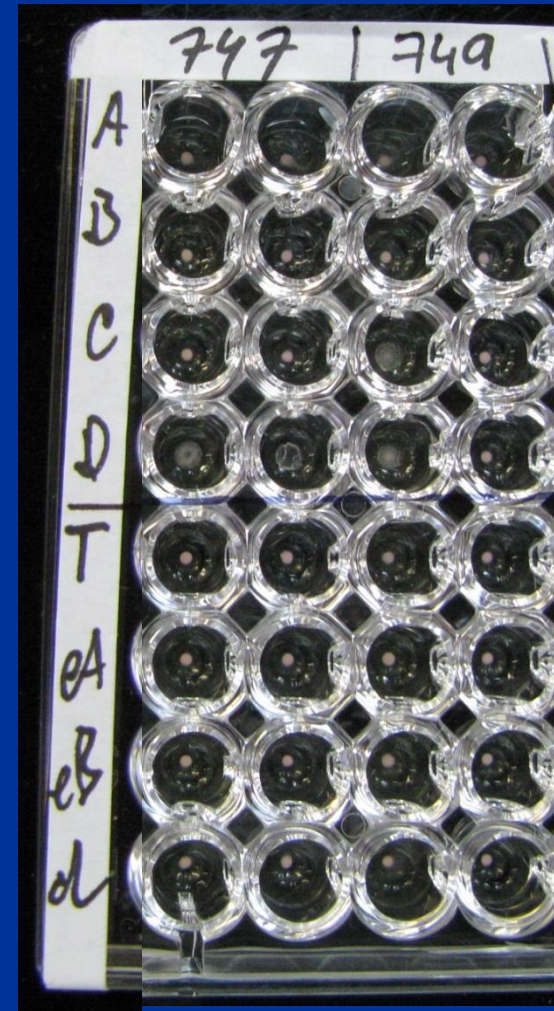
sety RPLA (Denka Seiken)

Citlivost je cca 0.5 ng toxinu / ml

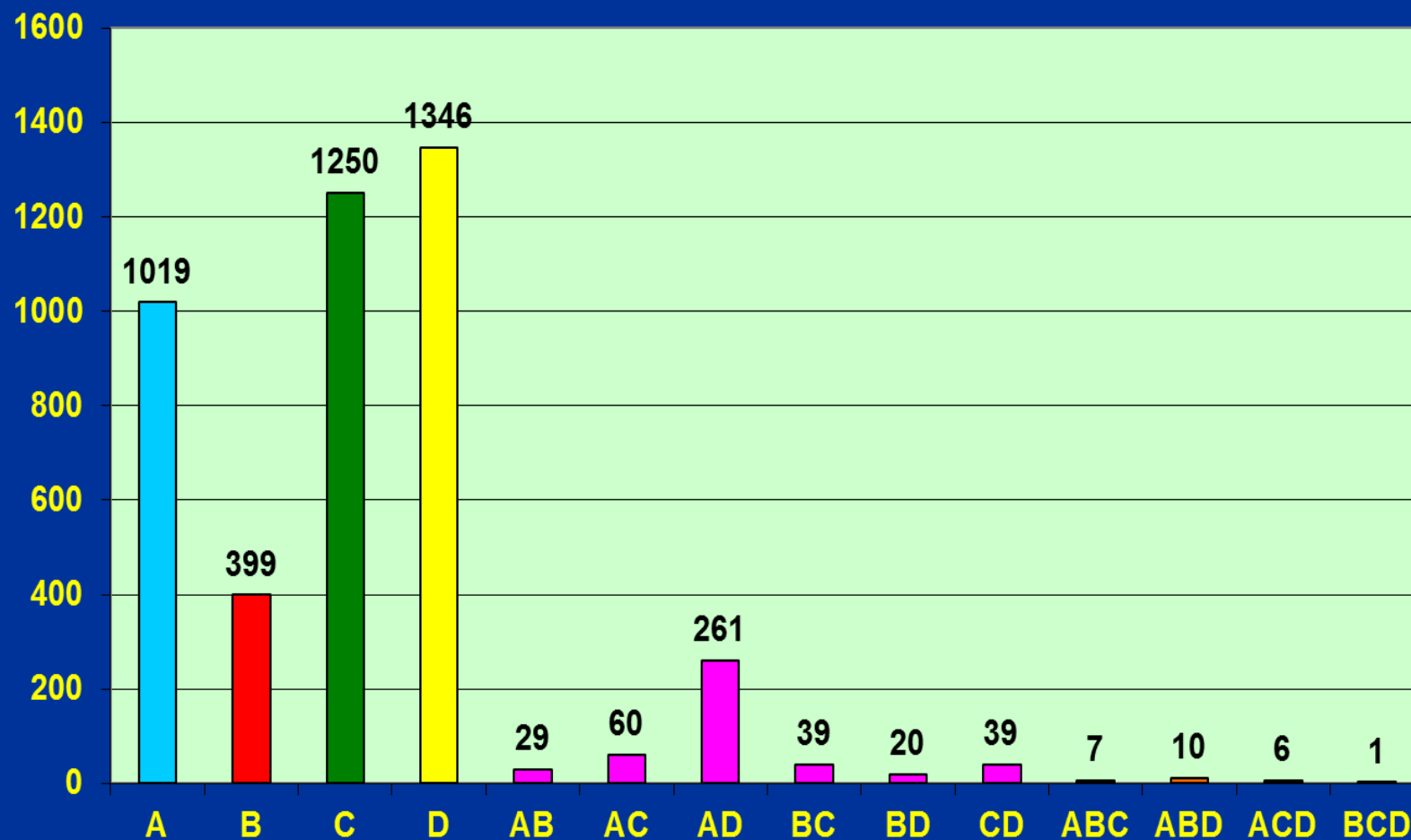
Sledují se enterotoxiny A - D(E)

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

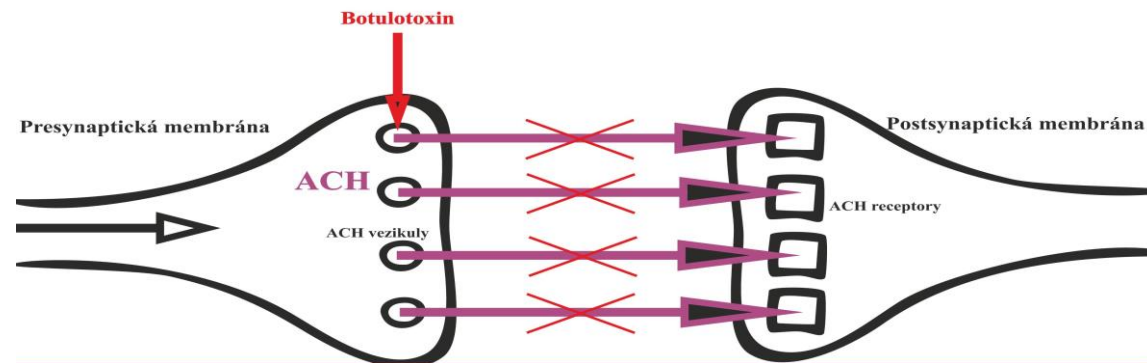
Na rozdíl od ostatních alimentárních intoxikací závažné, systémové, život ohrožující onemocnění!

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*)



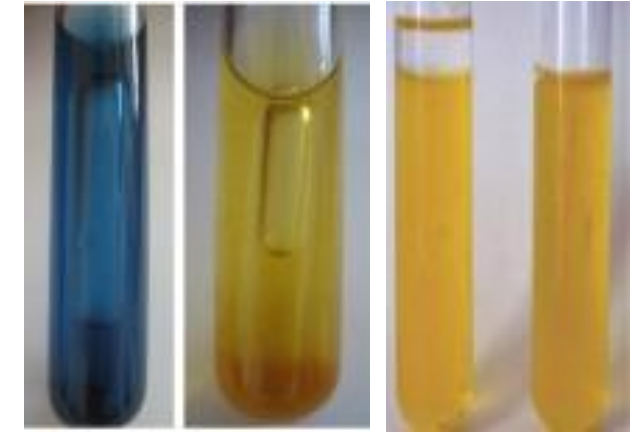
Mikrobiologická diagnostika infekcí GIT

➤ 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)



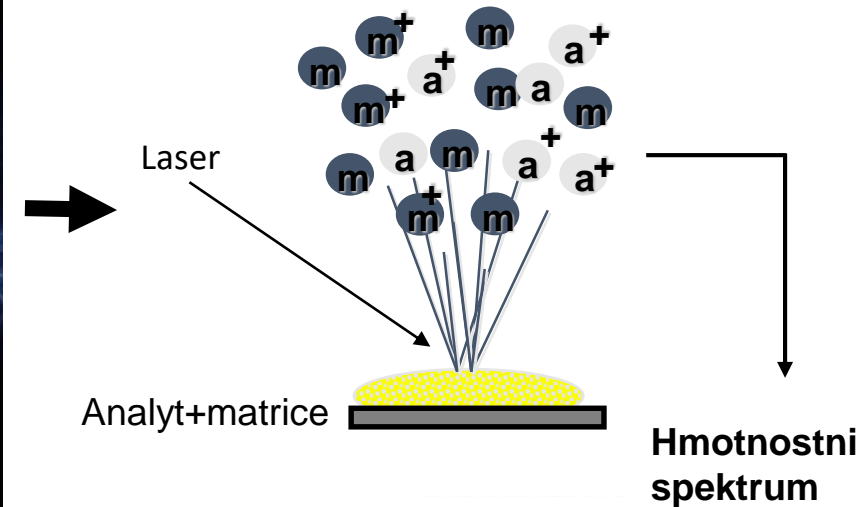
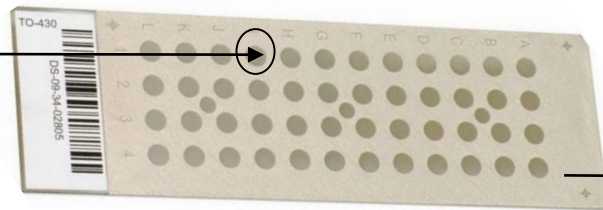
API system (Biomerieux)

Mikrobiologická diagnostika infekcí GIT

➤ Identifikace patogena

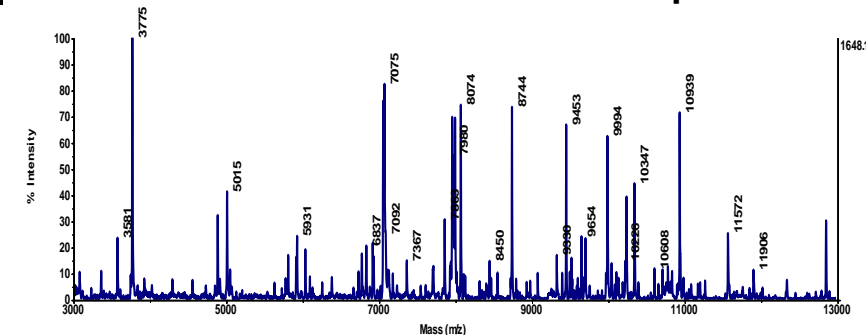
- **2) MALDI-TOF** (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry) = **hmotnostní spektrometrie** – identifikace bakterií dle hmotnostního spektra proteinů

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

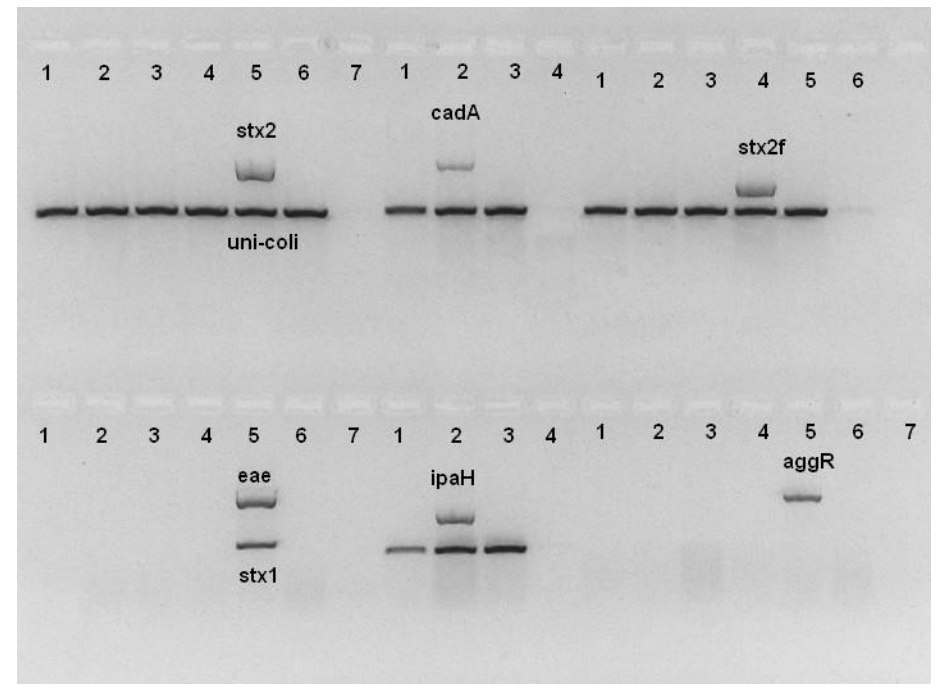
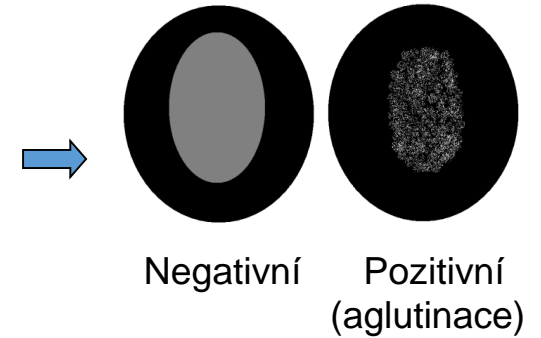
- diskové metody
- mikrodiluční metody



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

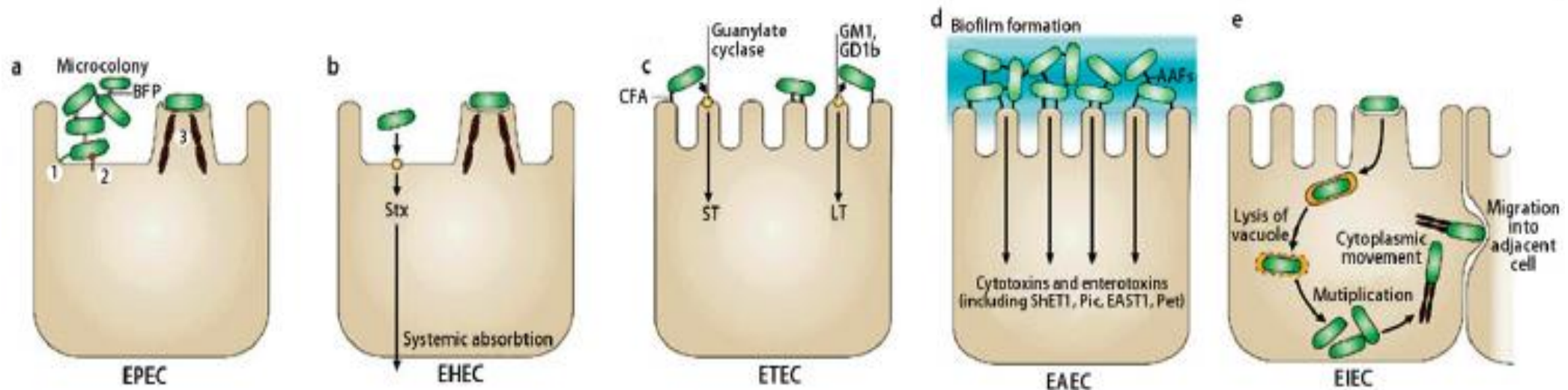
⇒ Smísit na podložní destičce
nebo podložním sklíčku

⇒ Promíchat kolébavým
pohybem 1 min



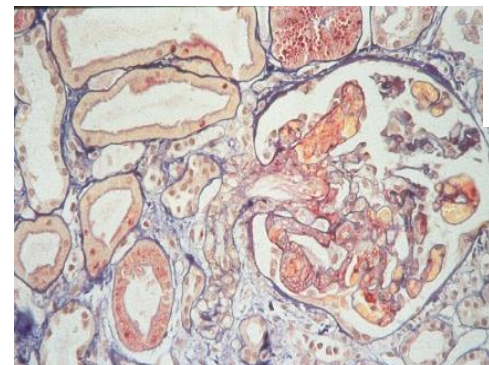
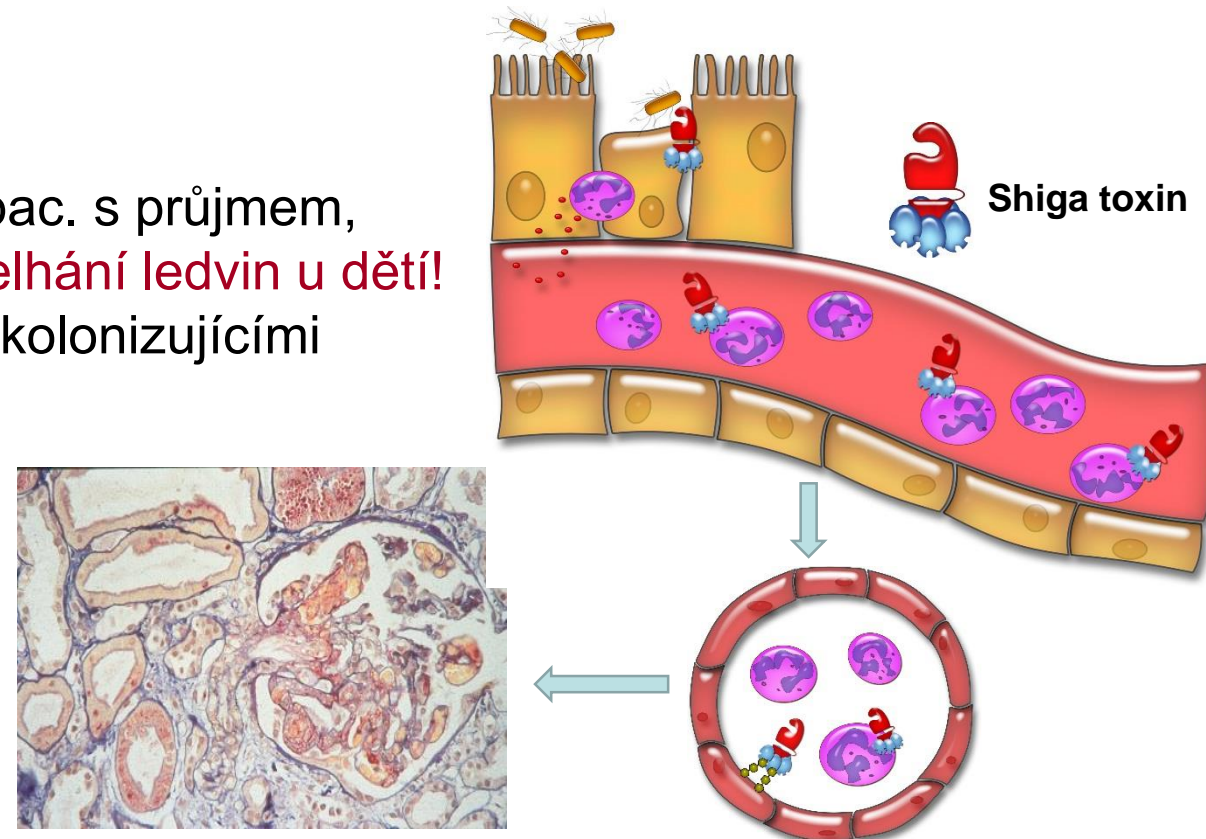
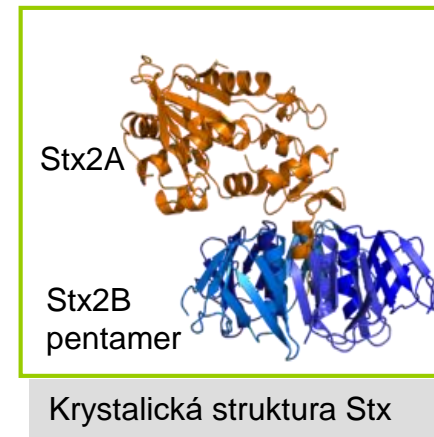
Patotypy diarhogenních *E. coli*

- 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)

- **Nezávažnější 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)
 - **2 hlavní typy Stx: Stx1, Stx2 – AB₅ toxiny**
=> **Stx2 hlavní vyvolavatel 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 10⁹/l)

▪ Akutní renální selhání

- zvýšený sérový kreatinin a urea

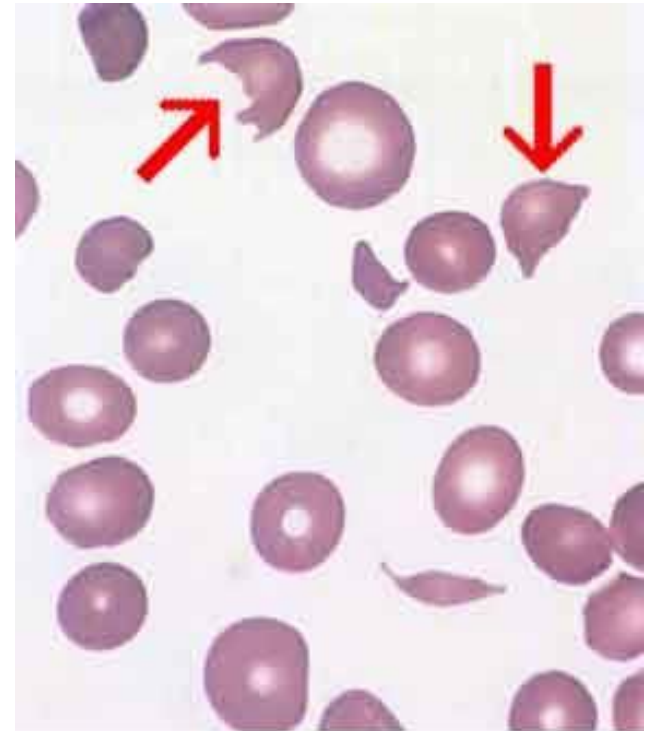
➤ Smrtnost akutního onemocnění 1 - 3%

➤ 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

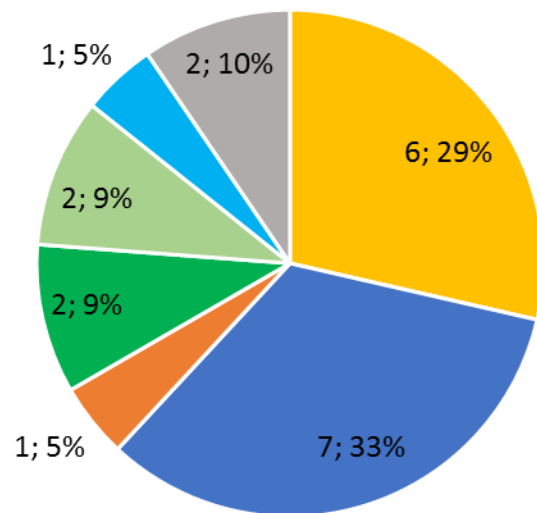
Robbins Pathologic Basis Of Disease: 6th Edition, 1999.
Fig. 14-17 p. 621.

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

➤ „Top five“ (EHEC)

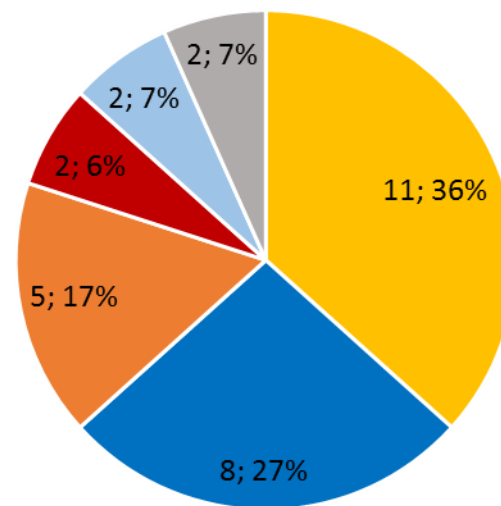
- O157:H7/H⁻
- O26:H11/H⁻
- O103:H2
- O111:H8/H⁻
- O145:H28/H⁻

Rok 2016



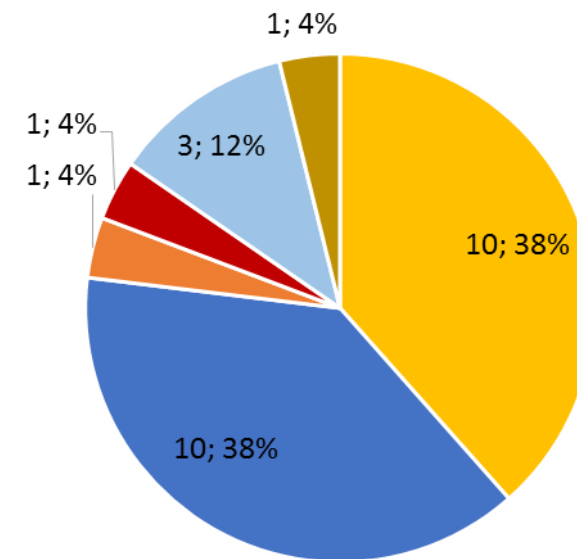
■ O157:H7 ■ O26:H11 ■ O103:H2
■ O55:H7 ■ O55:HNT ■ O8:H9
■ ONT:HNT

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!)

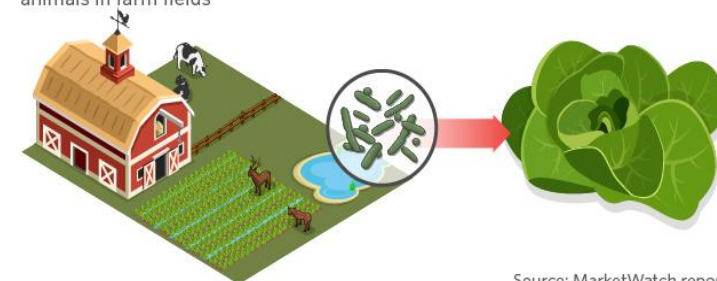
How E. coli bacteria spreads
FROM MEAT
E. coli can contaminate meat during slaughter, processing or preparation



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

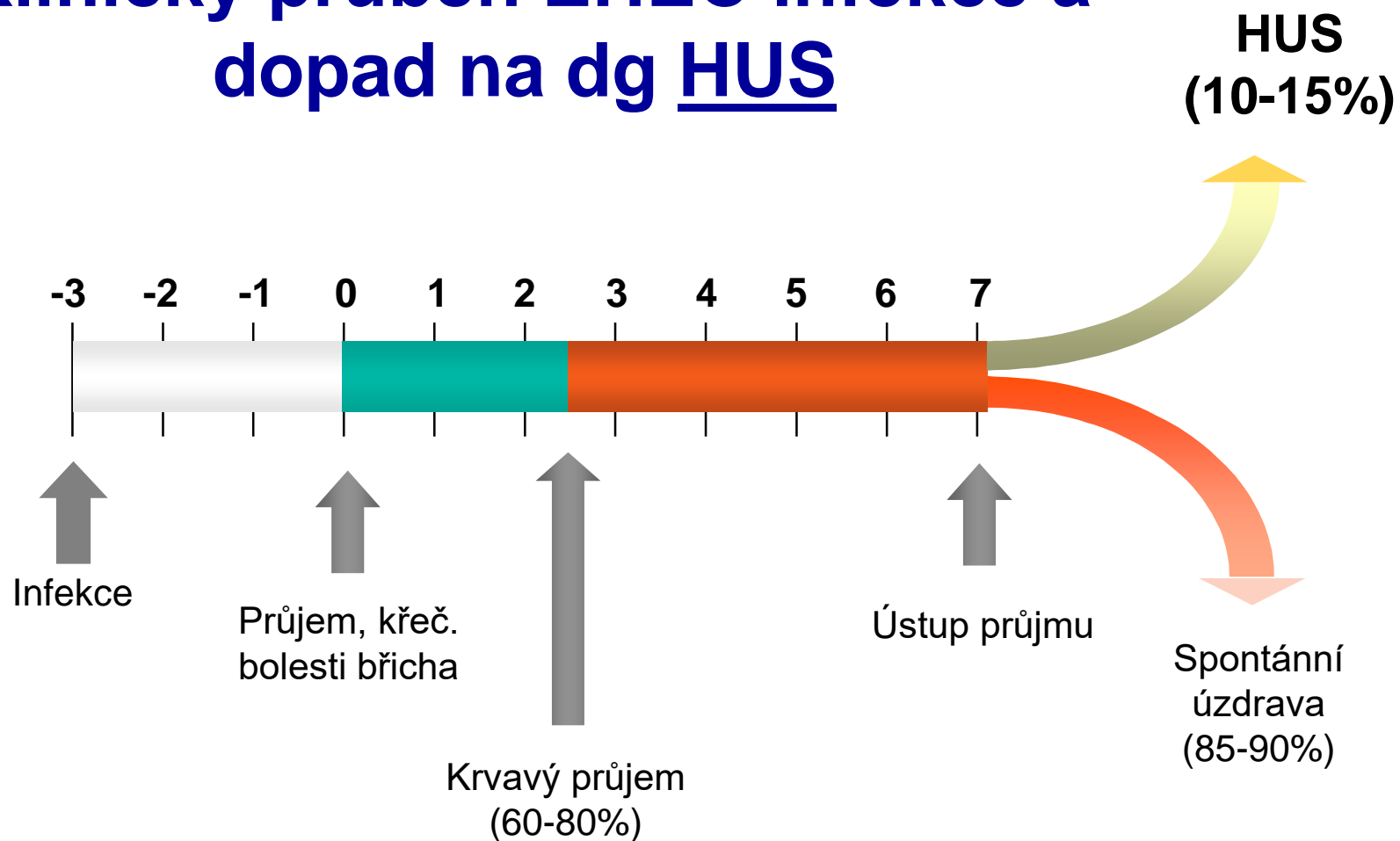


FROM PRODUCE
Animal feces can contaminate crops through groundwater or errant animals in farm fields



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)

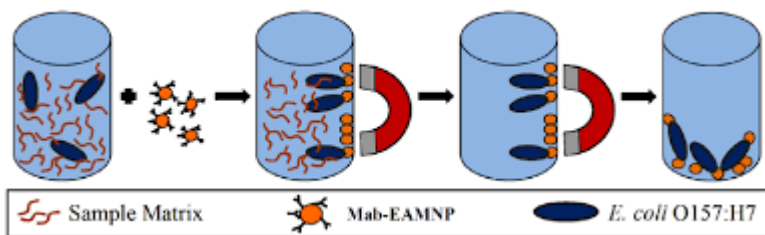
Materiál: Stolice (vzorek stolice, ne rekt. výtěr)



Pomnožení (Hajna bujon bez/s Novobiocinem)



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



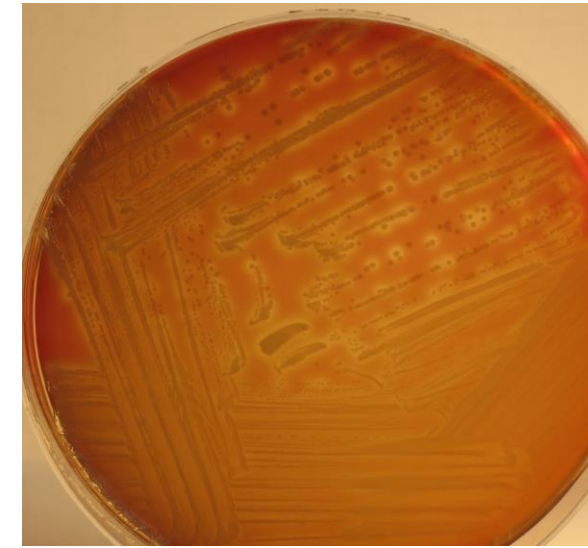
Kultivace po IMS na:

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



SMAC, CT-SMAC

O157:H7 bezbarve
Ostatní "top five" růžové

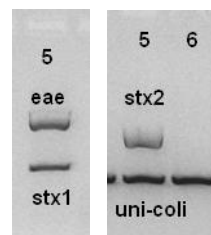


Enterohemolysinový agar

Všechny "top five"
enteroemolytický fenotyp
= neúplná hemolýza



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



PCR STEC

*stx*₁
*stx*₂
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)

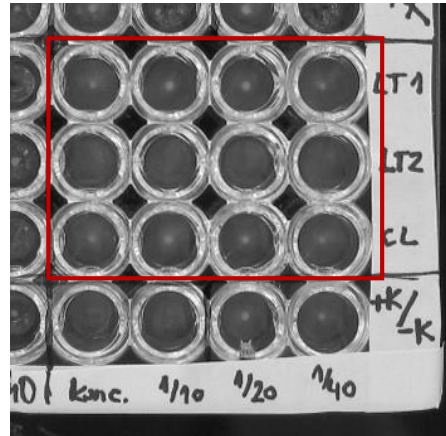
Provedení:

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![®] 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)

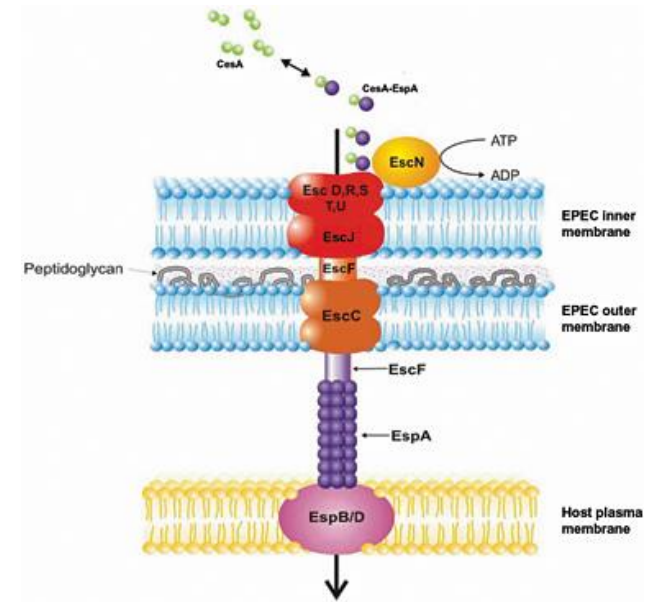
➤ Faktory virulence:

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

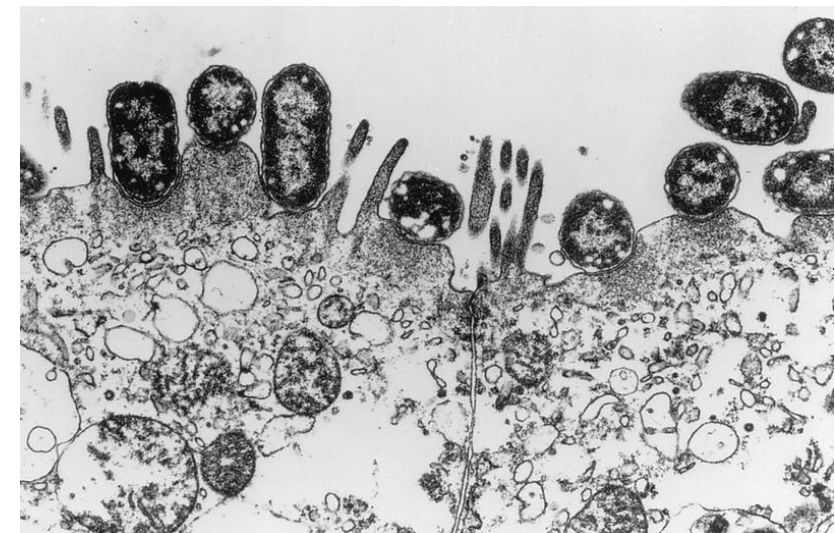
➤ Patogeneze

- 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!

Enterotoxigenní *E. coli* (ETEC)

➤ Faktory virulence:

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

➤ Patogeneze

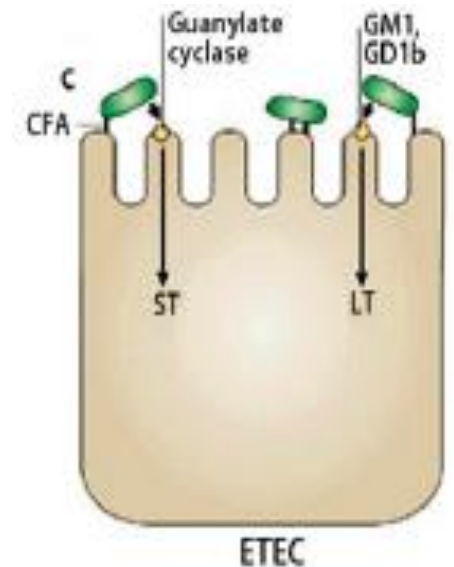
- Adherence bakterií k epitelu tenkého střeva => kolonizace (bez morfol. poškození!)
- Produkce LT a/nebo STa

➤ LT (podobný cholerovému toxinu, AB₅ toxin)
=> aktivace adenylcyklázy => zvýšení cAMP

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

⇒ Porucha transportu iontů (Na⁺,K⁺) => zvýšená sekrece H₂O z buněk

⇒ **vodnatý průjem**



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)

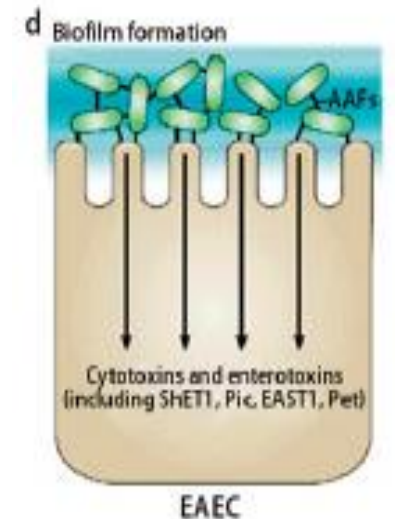
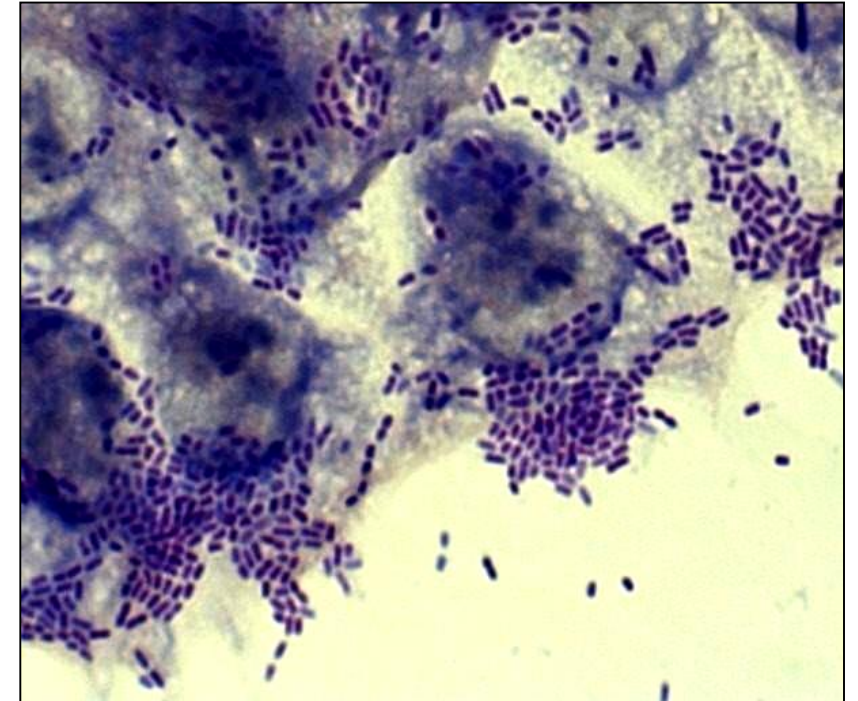
➤ Faktory virulence:

- 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

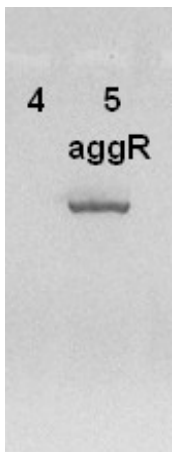
=> **Chronický průjem a malnutrice**



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



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 > 10⁶ bakterií)

➤ Léčba

- Rehydratace
- Antibiotika (dle nutnosti)

Enteroinvazivní *E. coli* (EIEC)

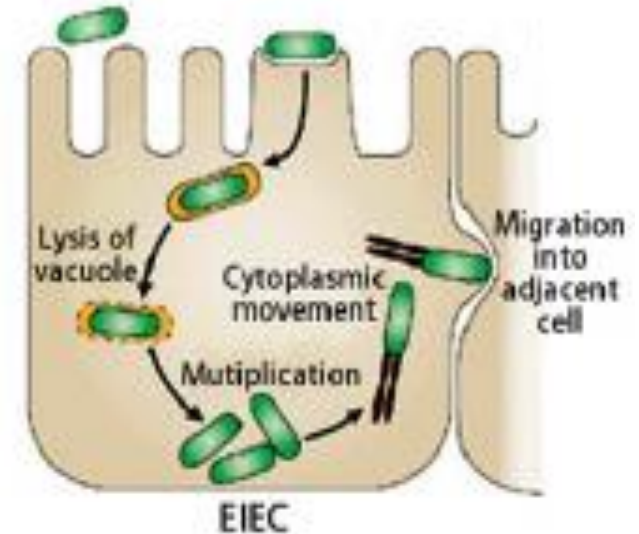
➤ Faktory virulence:

- 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 bakterií z buňky do buňky
=> destrukce epitelu => slizniční léze
=> zánětlivá infiltrace sliznice

- **Průjem s příměsí hlenu, krve, hnisu**
(leukocyty mikroskopicky)



Enteroinvazivní *E. coli* (EIEC)

Mikrobiologická diagnostika

➤ **Materiál:** rektální výtěr

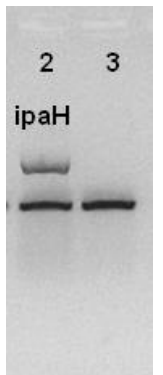
➤ **Kultivace**

- 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 antigenní 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



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

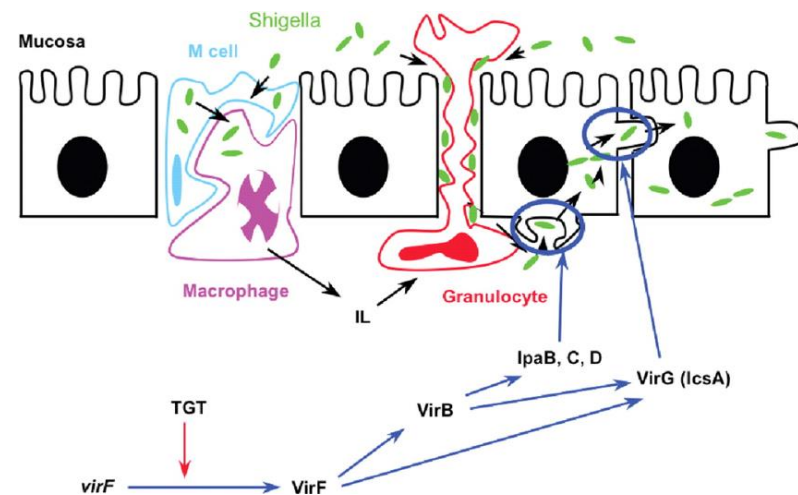
➤ Zdroj infekce a přenos

- 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!)

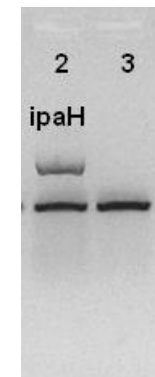
➤ Kultivace

- 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!

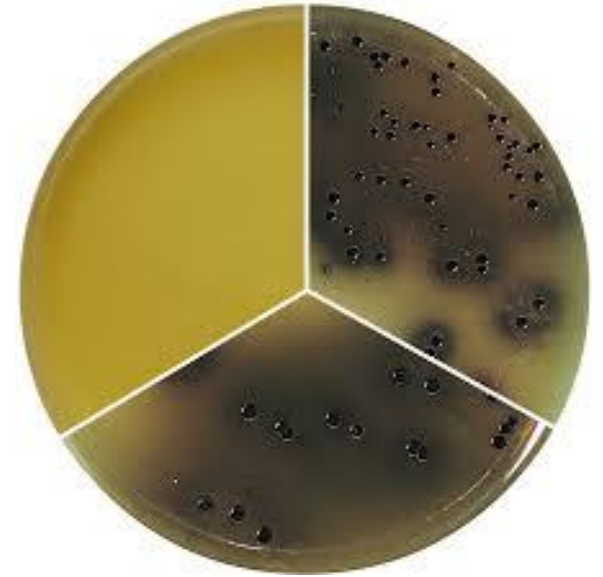
▪ Extraintestinální komplikace

- 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 H₂S)
- + 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: střevní 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 H₂S)
- 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

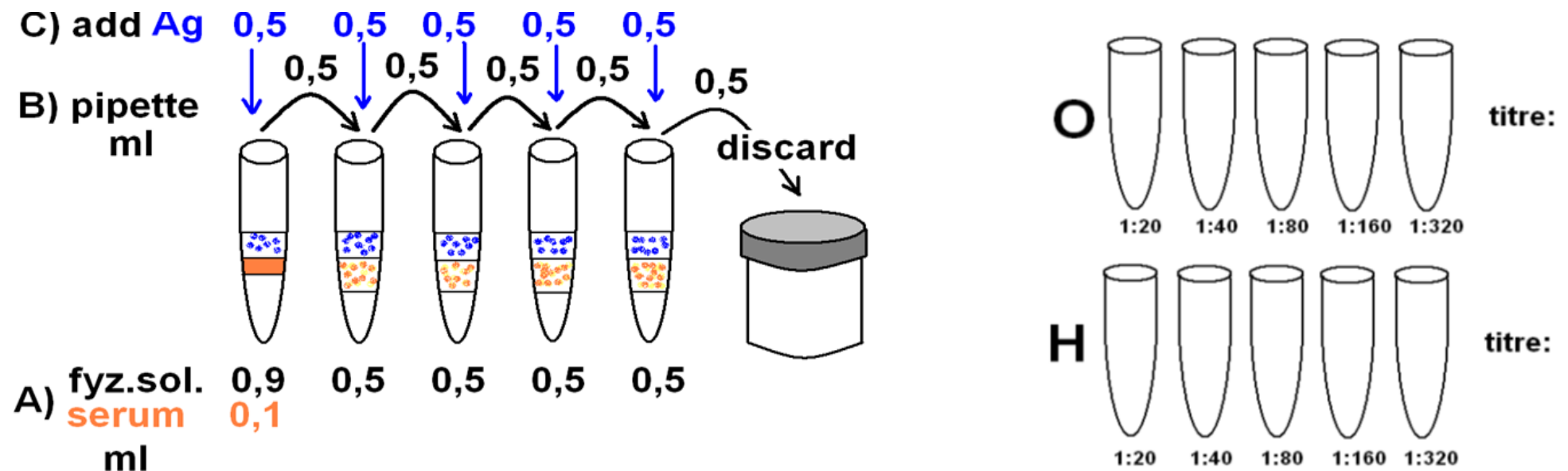
= aglutinační průkaz protilátek proti antigenům S. Typhi

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 séroskupiny 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 10^4 - 10^6 (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 Peyerových plaků)

=> invaze do submukózy

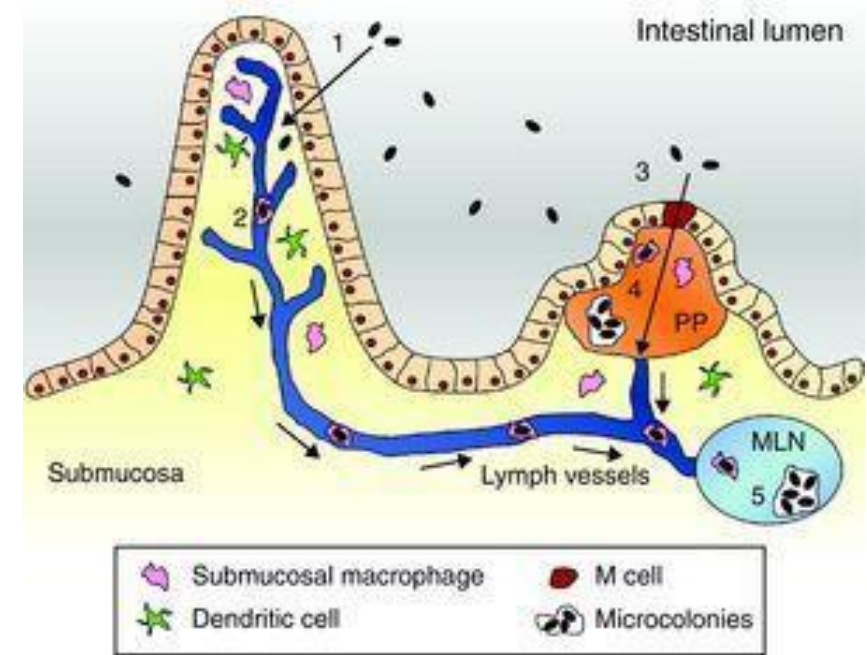
=> v submukóze fagocytóza makrofágy => transport do lymf. cév
a mezent. lymf. uzlin => množení => lymfadenopatie

=> Proliferace v Peyer. placích – slizniční ulcerace

V klinice symptomatologie rezultující

- z poškození mezenteriálních 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

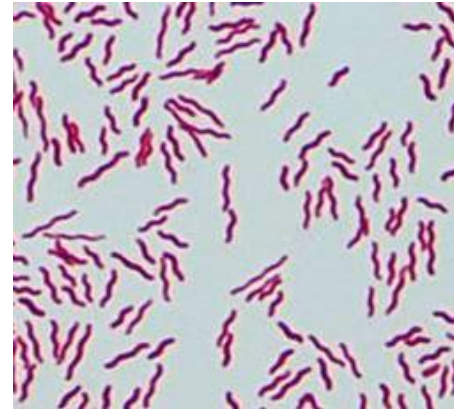
➤ **Celosvětový výskyt – nejčastější původce průjmů u dětí i dospělých v rozvinutých zemích!**

➤ **Zdroj infekce**

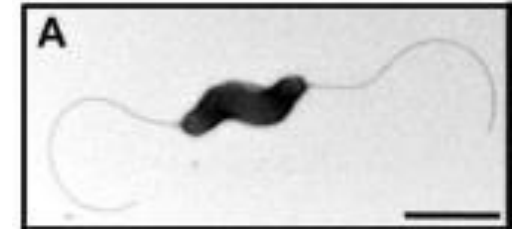
- Drůbež (kuřata), skot a jejich produkty (vejce, maso, mléko) => zoonóza

➤ **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



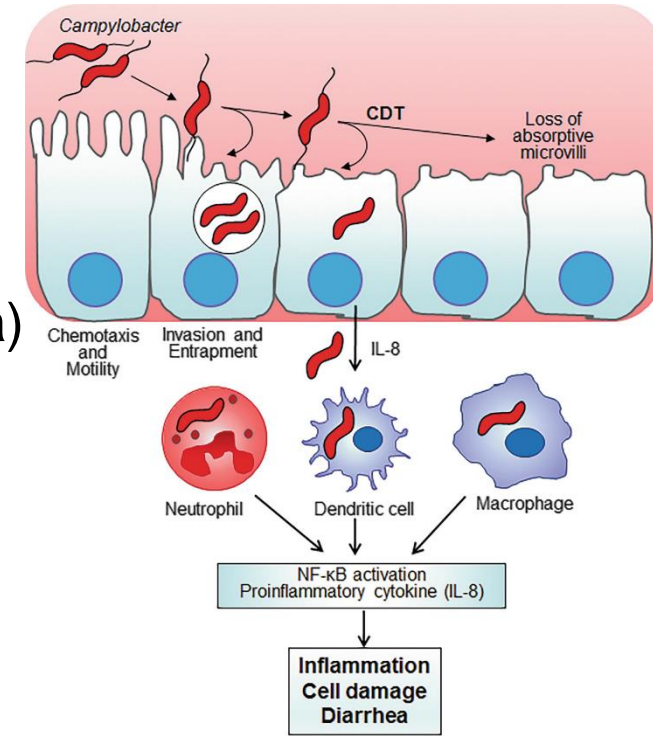
C. jejuni EM
Balaban, Hendrixson
PLoS Path. 2011

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 O₂) => inkubace v atmosféře s 5 % O₂, 10 % CO₂, 85 % N₂
=> 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)**

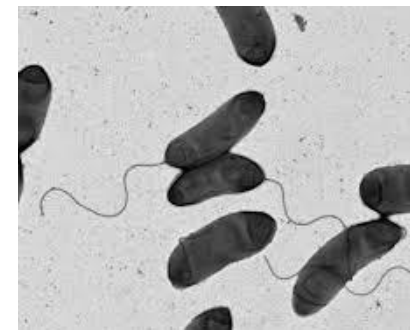
➤ Původci cholery *V. cholerae*, druhy O1 (biotypy klasický a El Tor) a O139

➤ 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

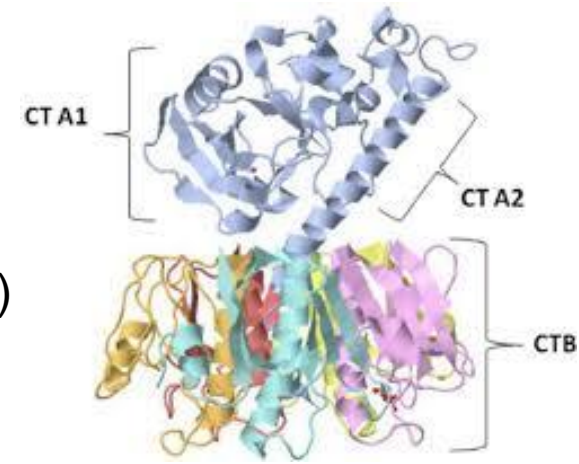


Sack et al., Lancet, 2004, 363:223

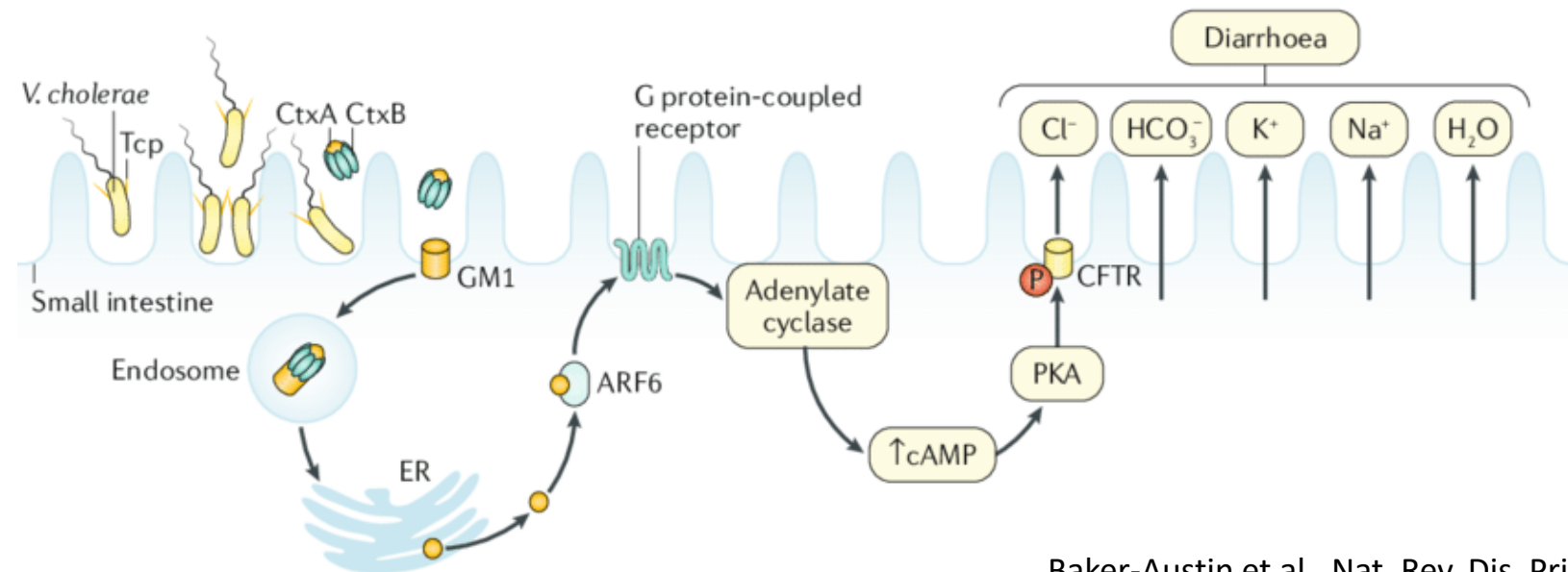
Vibrio cholerae

➤ Patogeneze (podobná ETEC)

- Neinvazivní patogen => onemocnění vyvolané toxinem (cholerový toxin, cholergen)
 - AB₅ 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!**

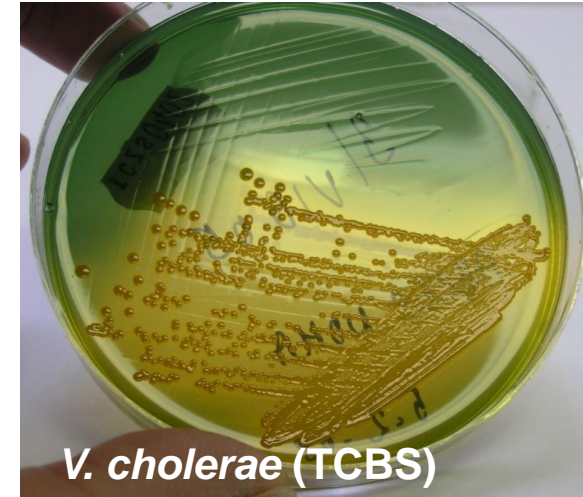
➤ **Kultivace:**

- 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)

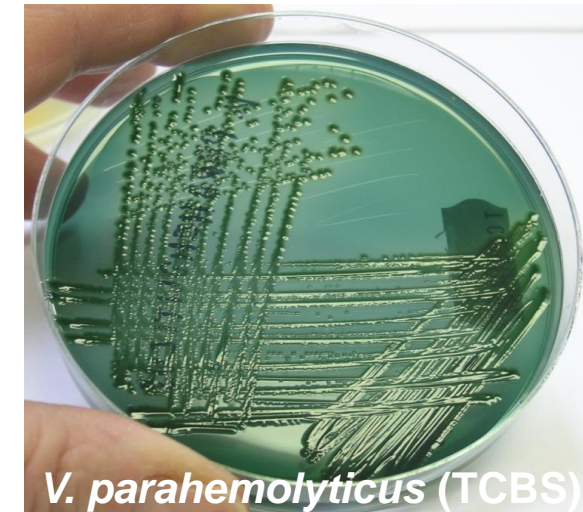
⇒ suspektní kmeny se zasílají do NRL pro *E. coli* a shigely (SZÚ Praha)

➤ **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

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

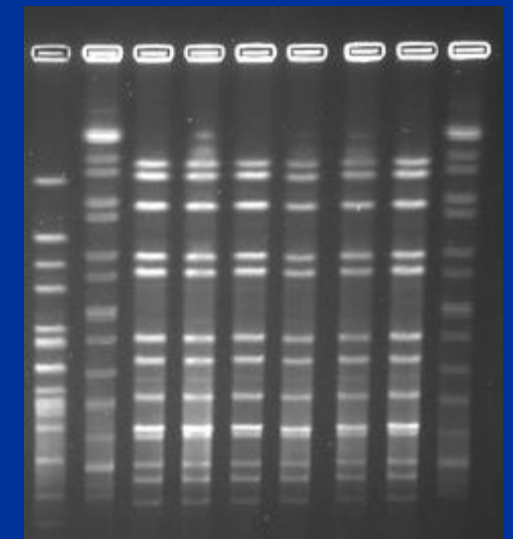
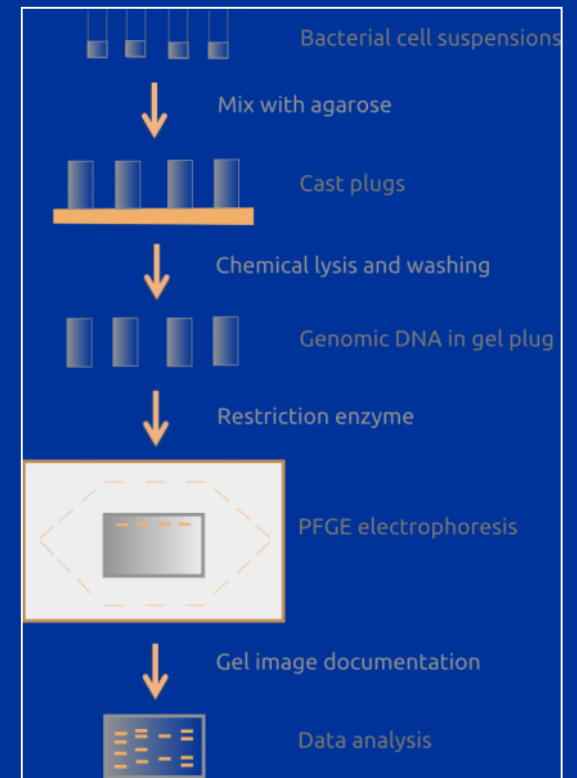
5 kmenů ze stěrů rukou personálu - **4** pozitivní na EnA

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**



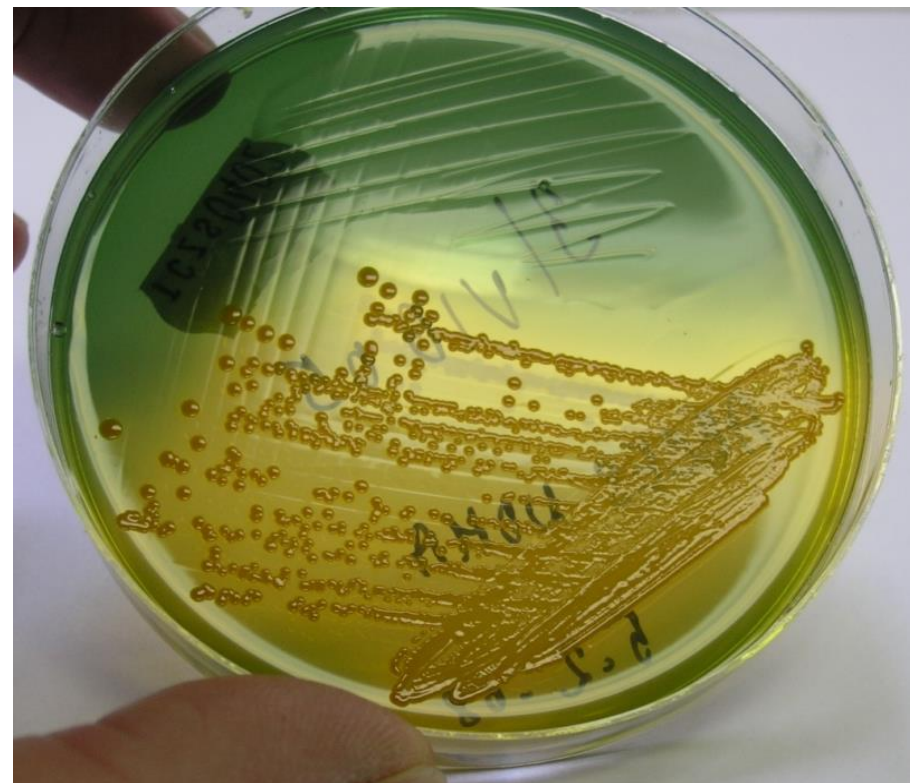
Zdroj: NRL pro stafylokoky, SZÚ Praha, RNDr. Petr Petráš;
PFGE gel převzat z <http://bacterio.iph.fgov.be/images/PFGE.jpg/view>

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

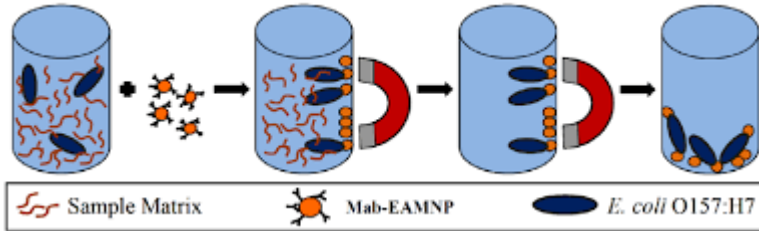
Stolice



Pomnožení (Hajna bujon bez/s Novobiocinem)

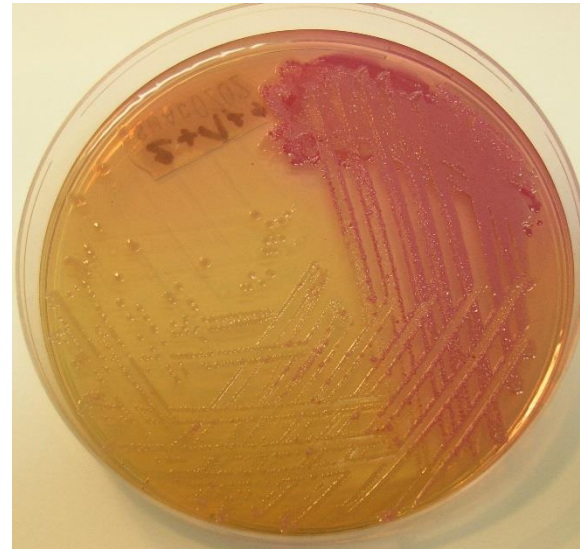


Imunomagnetická separace (IMS) „top five“
(O26, O103, O111, O145, O157)
=> Selektivní koncentrace „top five“ STEC



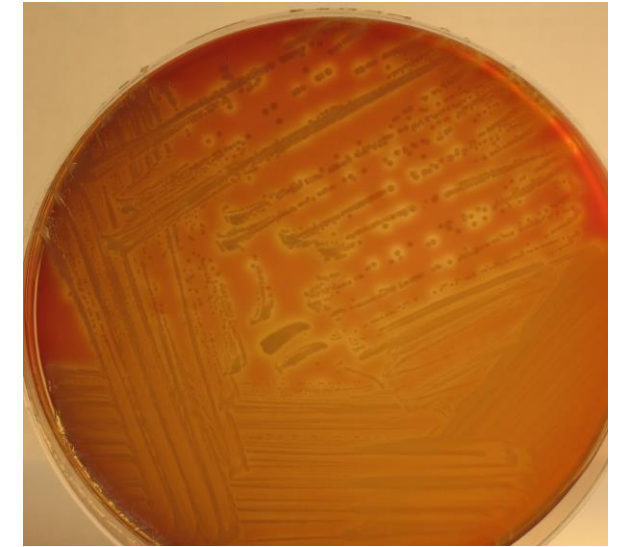
Kultivace po IMS na:

- 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

stx₁-
stx₂+
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)

Viry jako původci GIT

➤ Nejčastější původci

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

➤ Výskyt u dětí i dospělých

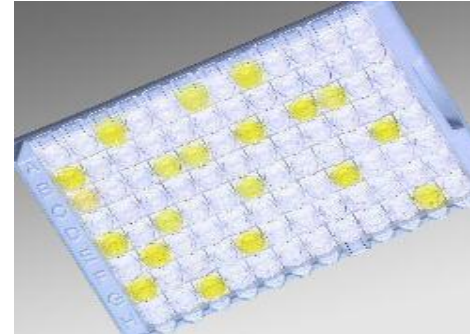
U dětí zavažnější => rychlá dehydratace

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

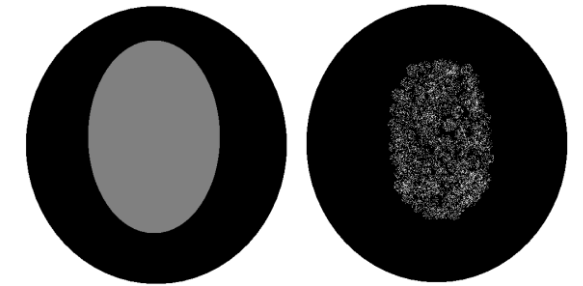
➤ Léčba: Rehydratace

➤ Virologické vyšetření stolice

1) Imunoeseje - průkaz virového antigenu ve stolici



ELISA



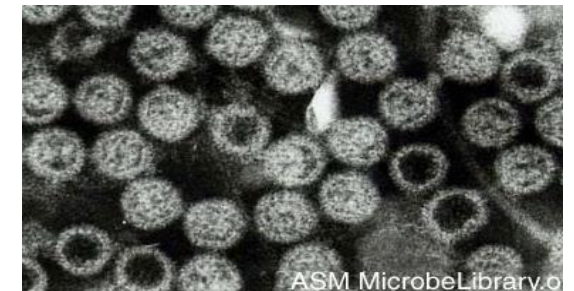
Latexova aglutinace



Imunochromatografie

2) Elektronová mikroskopie

- průkaz viru



3) PCR - průkaz virové DNA ve stolici