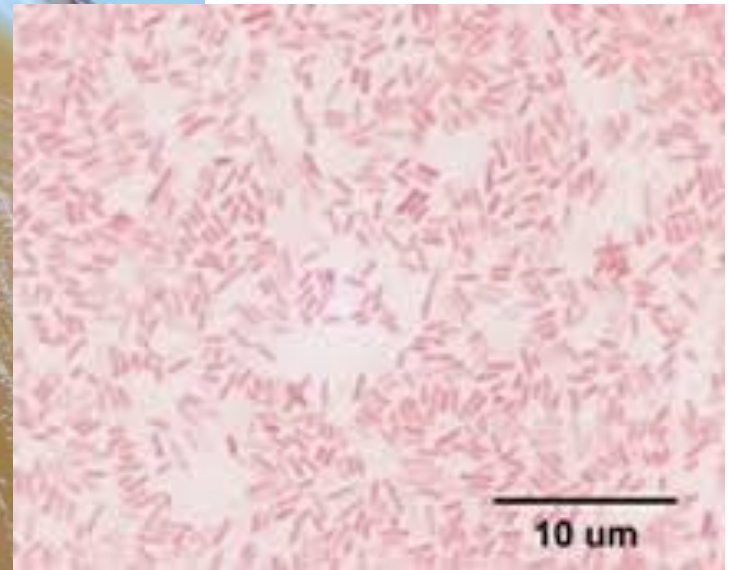


Enterobacteriaceae



Enterobacteriaceae

- Najrozsiahlejšia, najheterogénnejšia skupina medicínsky dôležitých baktérií
- Množstvo rôznych rodov a druhov (95% medicínsky významných patrí do 25 druhov) – rozdelenie na základe DNA homológie, biochemických vlastností, sérologických reakcií, ATB citlivostí
- Modelové druhy v mikrobiológii – *E. coli*
- *Enteron* = črevo
- Bežne prítomné v prírode (pôda, voda, rastliny) súčasť normálnej mikrocenózy čreva. Obligátne patogénne (*Yersinia pestis*, *Salmonella Typhi*), podmiennečne patogénne (*Klebsiella*, *E. coli*)
- Prenos zo zvierat (salmonelly), od človeka - nosiča (*S. typhi*), endogénna infekcia (*E.coli*)

Enterobacteriaceae - najvýznamnejšie rody

- *Escherichia*
- *Salmonella*
- *Shigella*
- *Yersinia*
- *Proteus*
- *Citrobacter*
- *Enterobacter*
- *Erwinia*
- *Hafnia*
- *Klebsiella*
- *Morganella*
- *Kluyvera*
- *Edwardsiella*
- *Pantoea*
- *Raoultella*
- *Serratia*
- *Yokenella*
- a viac

Fyziológia a štruktúra

- G- paličky, obvykle pohyblivé (bičíky), nesporulujúce, fakultatívne anaeróbne, nenáročné nutričné požiadavky, biochemicky aktívne, kataláza +, oxidáza -, cytochromoxidáza COX - = dif. diagnostika od ostatných
G – paličiek, veľkosť d(2-3um) š(0,5-0,8um)
- Skvasovanie laktózy + alebo -, rezistencia na žlčové soli, prítomnosť púzdra - dif.dg v rámci *Enterobacteriaceae*

3 skupiny antigénov:

- - somatický O antigén,
- - púzdrový K antigén,
- - bičíkový H antigén.

O - antigén

- Telový
- Súčasť vonk. polysacharidového reťazca na vonk. membráne
- Termostabilný – aj po varení
- Označovanie (O157, O112 a pod.)
- najdôležitejší antigén b. steny, termostabilný, LPS, zložený z 3 súčastí - O polysachrid, kórový polysacharid a lipid A - s **endotoxínovou** aktivitou

H - antigén

- Bičíkový
- Je to polymerizovaná bielkovina – flagelín
- U pohyblivých s peritrichálnym umiestnením
- Termolabilný
- podlieha antigénnym zmenám
- *E. coli* O157:H7

K - antigén

- Púzdrový (kapsulárny)
- Faktory virulencie
- termolabilný, skrížene reagujúci s protilátkami proti iným baktériám. U Salmonella typhi sa nazýva Vi antigén.
- Označovanie (K88, K99 a pod.)

Frosmanov antigén

- Vyskytuje sa v bunkovej stene niektorých salmonel a shigel
- Je to glykolipid vyvolávajúci tvorbu heterofilných protilátok
- Heterofilné protilátky – nešpecifické, rýchlo miznú zo séra, nevhodné na diagnostiku

Patogenita Enterobaktérií

- Ostrovy patogenity - genetické úseky v chromozóme, 10-200 kbáz schopné presúvať sa z virulentných do avirulentných druhov
- Možnosť nájsť viacero typov gen. úsekov v jednom druhu
- Existuje aj plazmidová virulencia – F a R plazmidy
- Spoločný znak – LPS vonkajšej membrány – časťou je Lipid A – endotoxín
- Fimbrie – faktory adhezivity viažuce sa na štruktúry hostiteľských buniek
- Púzdro – antifagocytárne vlast., bráni vstupu ATB, adhezívna funkcia

Infekcie spôsobené Enterobaktériami

1. GIT - Salmonella, Shigella, Yersinia, E.coli -
dismikróbia
2. Infekcie močových ciest - E. coli, Proteus,
Providencia, Klebsiella

Menej bežné infekcie:

1. Infekcie dýchacích ciest - Klebsiella, Enterobacter,
E. coli
2. Septikémia - E. coli, Klebsiella, Enterobacter
3. CNS - E. coli

Family Enterobacteriaceae

Primary Pathogens

Organisms capable of causing disease in anyone

Shigella

Salmonella

Yersinia

Escherichia coli

Klebsiella pneumoniae

Opportunistic Pathogens

Organisms that can only cause disease under certain conditions or in certain hosts

Providencia

Morganella

Proteus

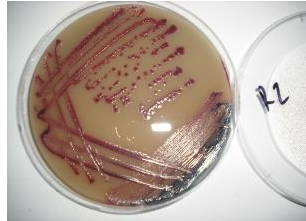
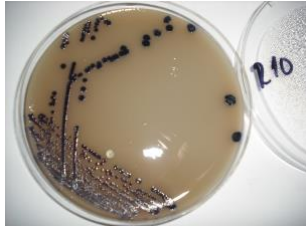
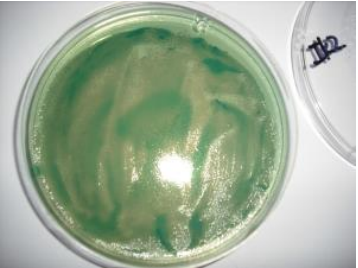
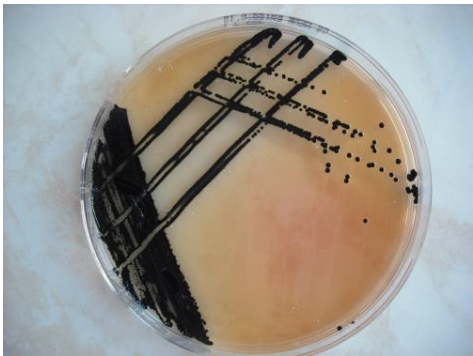
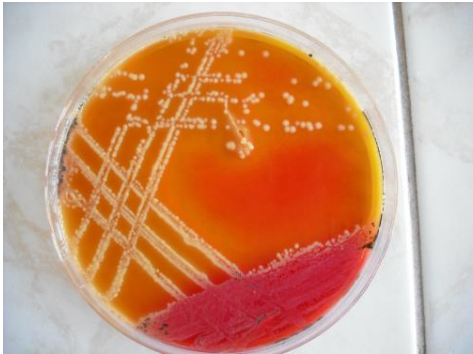
Serratia

Enterobacter

Laboratórna diagnostika

- rastú dobre na neselektívnych médiách
- Prekryv selektívnych pôd s biochemickými testami
- Selektívne média Endova pôda, MacConkey agar,
- Biochemická identifikácia – Hajnov test (TSI), Enterotesty – súbor biochemických testov, VITEK 2,
- Molekulárne – PCR(DNA), Maldi Tof MS(Bielkoviny)
- *Salmonella, Shigella* – SS agar, XLD alebo DC pôda
- Sérodiagnostika – odlíšenie antigénnej štruktúry a vyššej virulencie kmeňov *E. coli*– *Salmonella* - význam epidemiologický,
- Súčasťou je aj antibiotická rezistencia u patogénov – prítomnosť beta-laktamáz (ESBL)

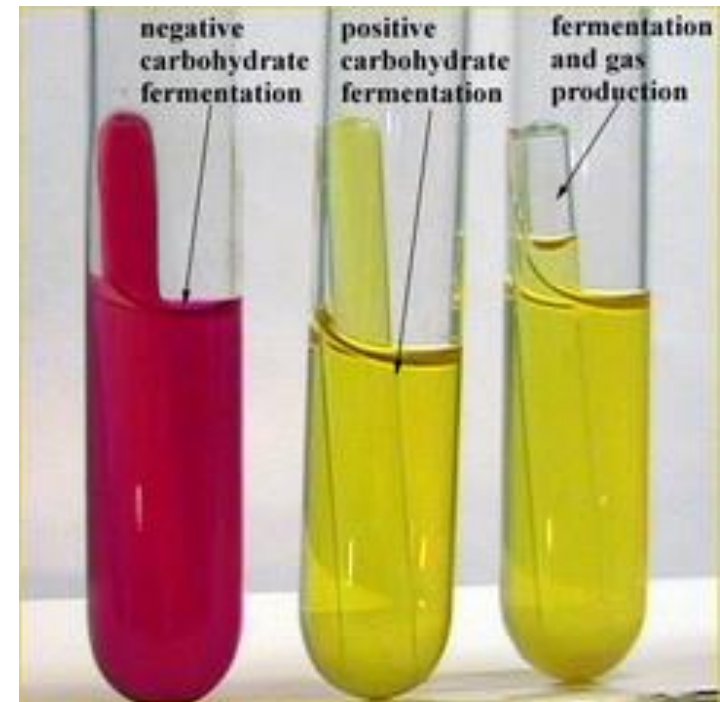
Diagnostika



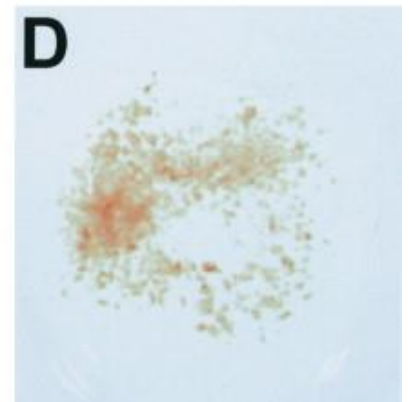
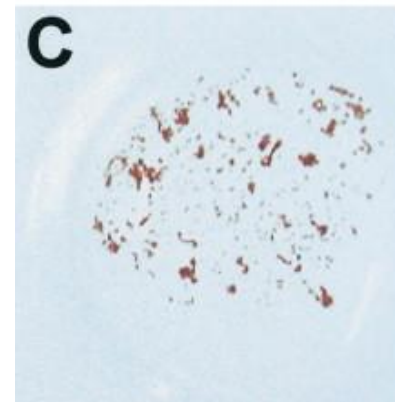
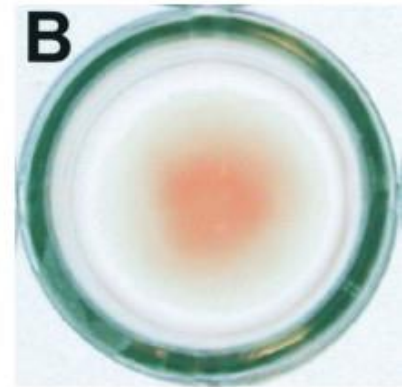
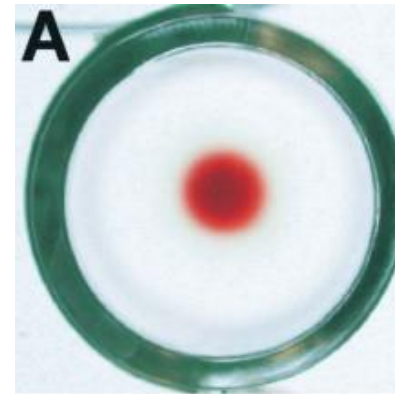
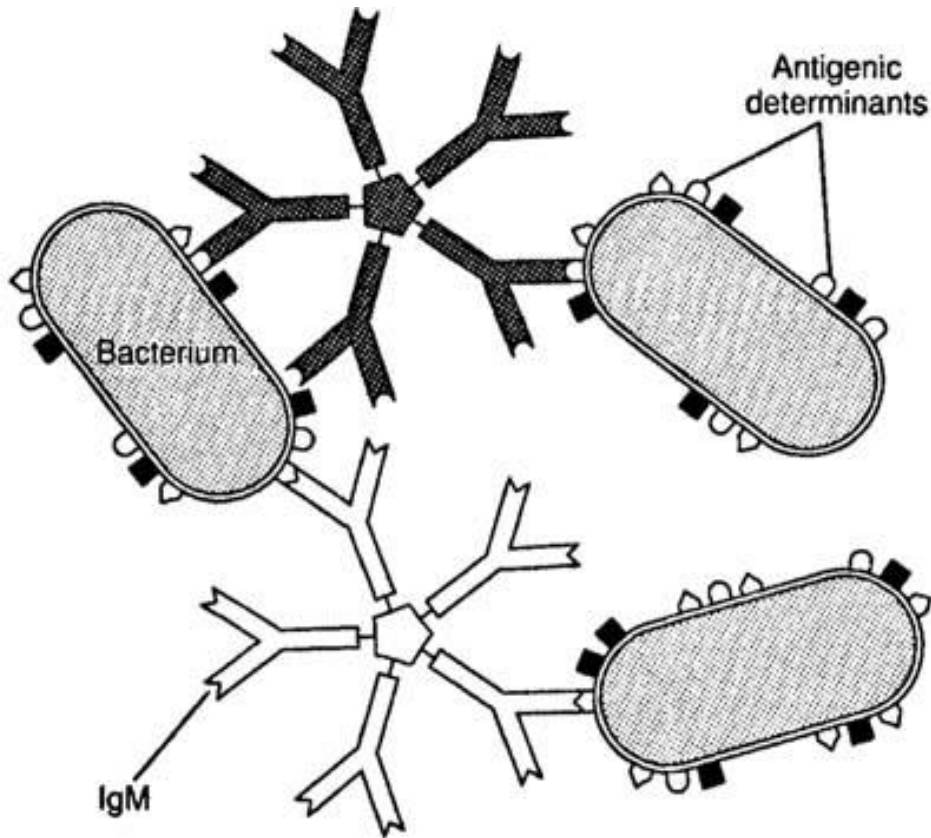
Diagnostika



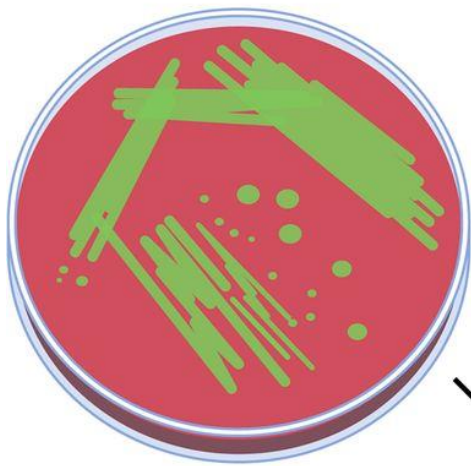
Figure 5-68



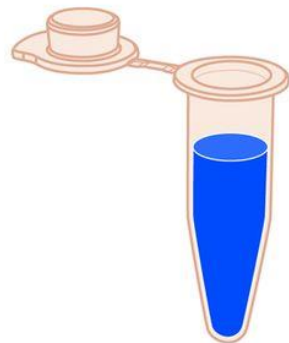
Diagnostika - serotypizácia



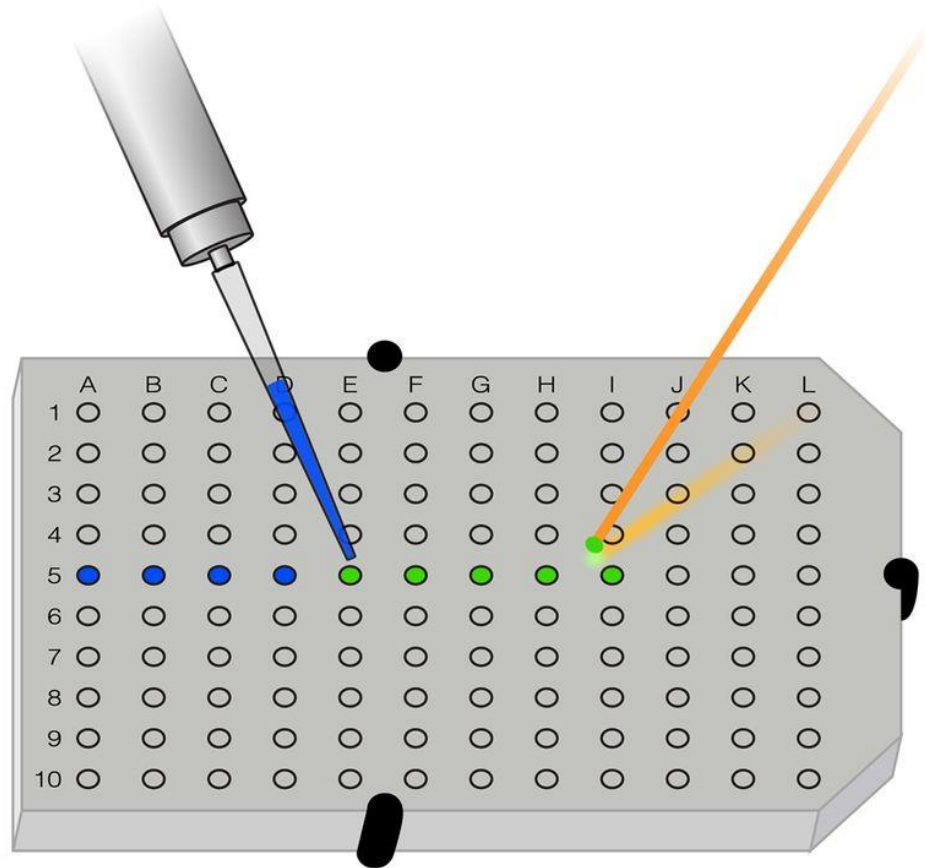
Diagnostika - MALDI TOF MS



① Sample culture

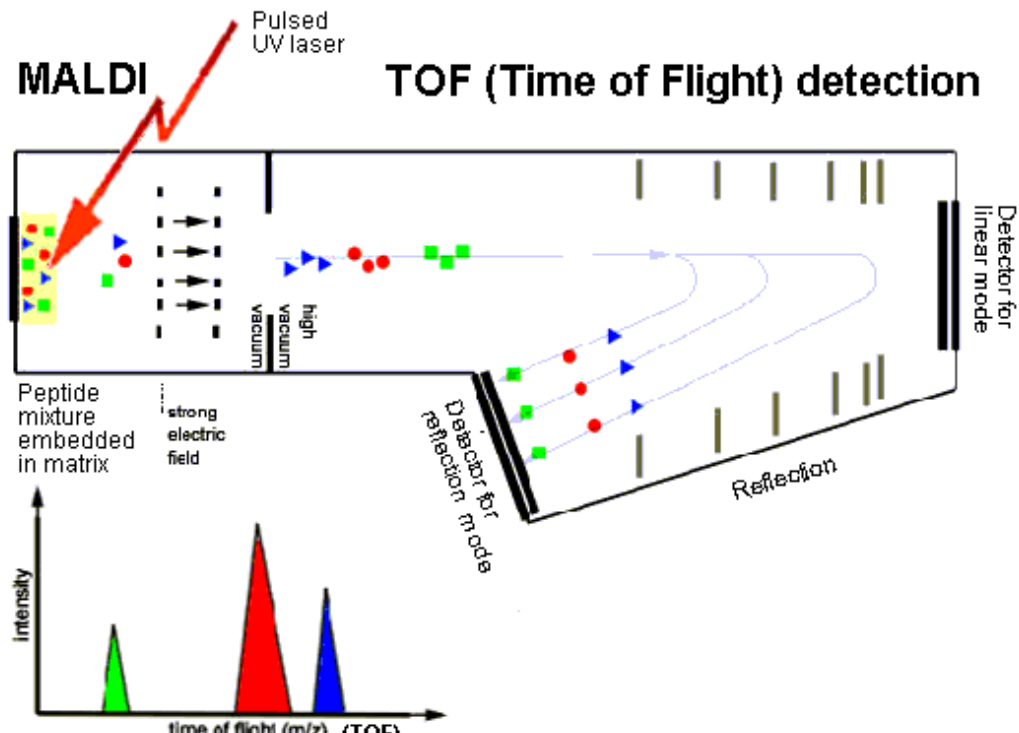
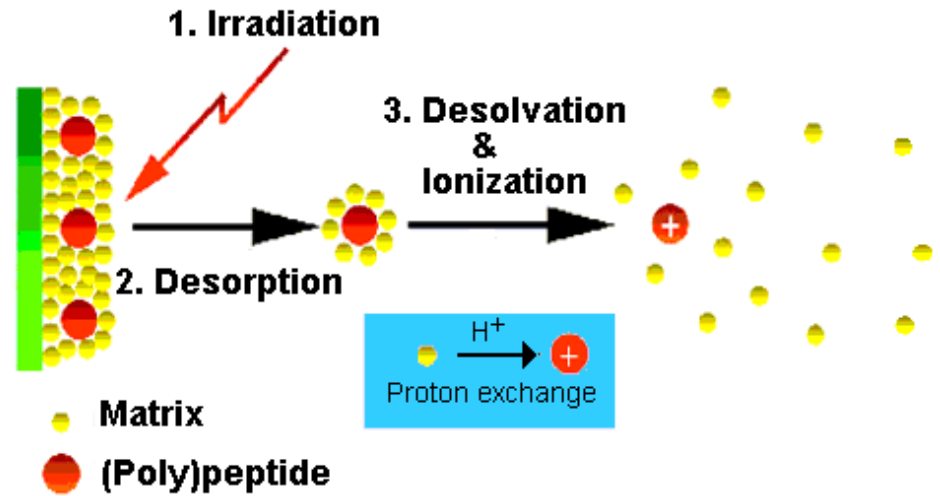
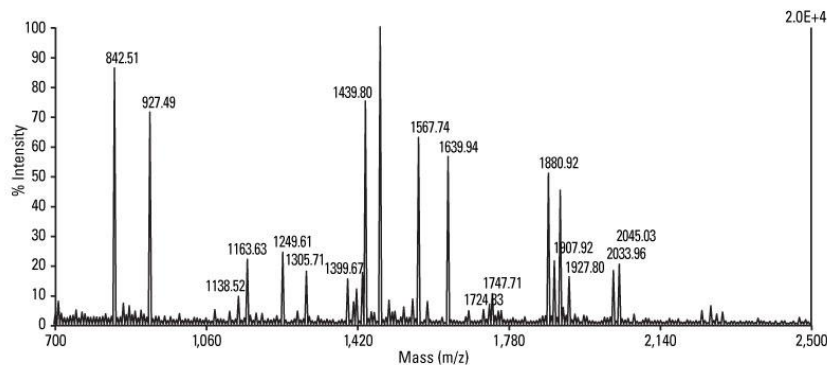


② Matrix



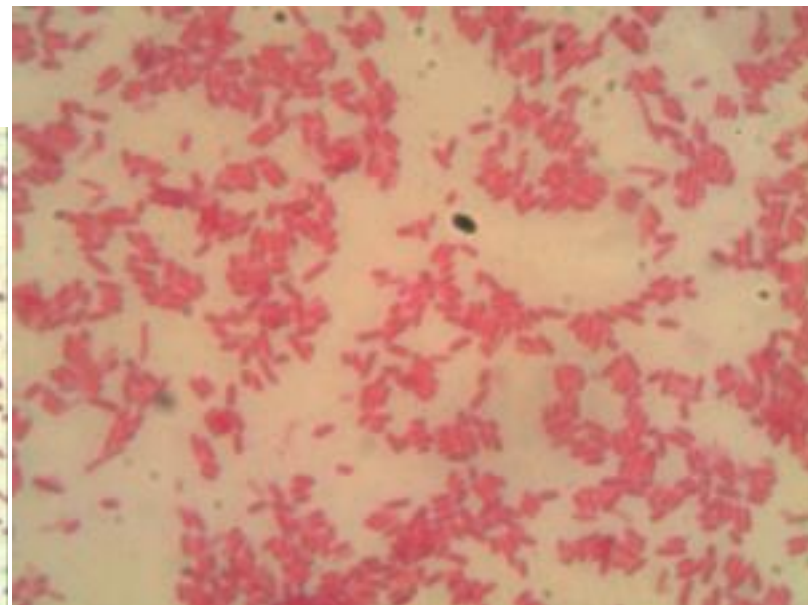
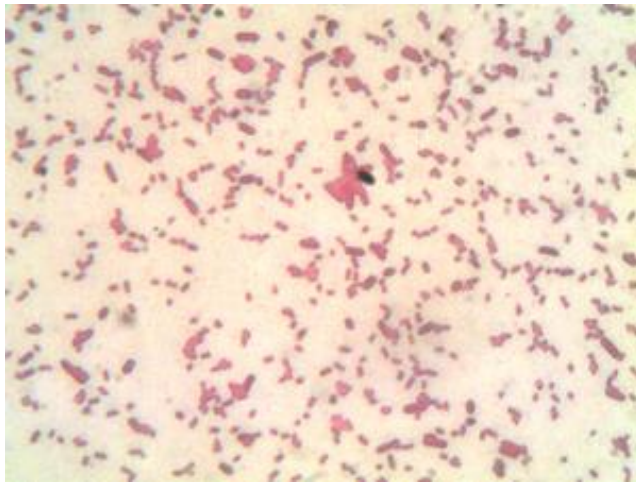
③ MALDI-TOF/MS sample plate

Diagnostika MALDI TOF MS



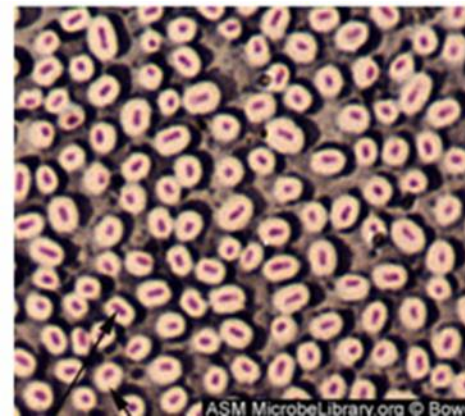
Mikroskopia Enterobaktérií

- Nedá sa uplatniť – druhy nerozlíšiteľné
- Paličky (tyčinky) – G -, Gramovo farbenie – ružové
- Pohyblivosť – všetky pohyblivé okrem Klebsiella, Shigella a Yersinia pestis, prípadne atypické kmene iných druhov
- Púzdra



Burriho metóda na dôkaz púzdiar

- Na podložnom sklíčku sa urobí suspenzia vyšetrovanej kolónie a destilovanej vody
- K suspenzii sa pridá kvapka tušu a urobí sa tenký náter
- Preparát sa nechá uschnúť a fixuje sa teplom
- Potom sa dofarbí kryštálovou violetou, veľmi opatrne opláčne vodou, nechá okvapkať a prezerá pod imerziou



Púzdra

- Extracelulárne štruktúry obaľujúce baktérie, pevne priliehajúce k b. stene
- Polysacharidové (len *B. anthracis* – polypeptidové)
- Nástroj patogenity – antifagocytárne vlastnosti, bráni vstupu antibiotík, má funkciu adhezínov
- Niektoré baktérie sú vo forme opúzdrených aj neopúzdrených kmeňov (*Haemofilus influenzae*) – opúzdrené sú virulentnejšie
- Púzdro sa môže v starých kolóniách strácať, alebo ho neopúzdrené kmene môžu získať transdukciou z opúzdrených

Kultivácia

- *E. coli* na Krvnom agare – šedavé kolónie bez hemolýzy
- *E. coli* na Endovej pôde – vypuklé kolónie s kovovým rastom
- *K. pneumoniae* na McC – lesklé mukózne ťahavé kolónie
- *K. pneumoniae* na Endovej pôde – ružové kolónie bez lesku
- *Proteus mirabilis* – plazivý rast, Raussov fenomén – koncentrický rast od jedinej kolónie



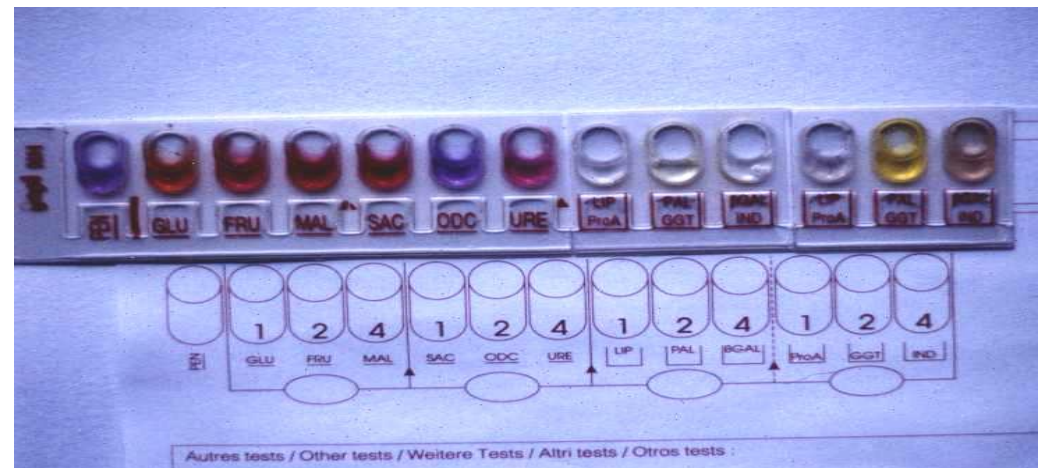
Kultivácia G- paličiek - *Salmonella*, *Shigella*, *E.coli*

- Kultivácia - *Salmonella*, *Shigella*, *E.coli*
- krvnom agare - G - palička, šedavé kolónie neodlíšiteľné,
- na McC agare - *E.coli* laktózu skvasuje - ružové kolónie, *Salmonella* laktózu neskvasuje - žlté,
- SS agar, XLD agar - priesvitné s tvorbou sirovodíka, *Shigella* - laktózu neskvasuje, bez sirovodíka,
- na DC - dezoxycholátovom agare - selektívna pôda - rastie *Salmonella* (laktóza negat. so sírovodíkom) a *Shigella* (laktóza negat. bez sírovodíka). *E. coli* nerastie

Testy na skúmanie biochemických a metabolických aktivít baktérie

Mikrometodiky, Automatizácia, Číselné kódy – MikroLaTesty, API, BBL Crystal

Súbor biochemických testov usporiadaných za sebou tak, aby umožňovali číselnú identifikáciu podľa pravdepodobnosti. Pri pozitívnom teste sa mu prideli číslo podľa lokalizácie v triplete. Sčítaním jednotlivých hodnôt sa dosiahne štvorciferná kombinácia, ktorá zodpovedá identifikovanému mikroorganizmu uvedenému v zozname.



ENTEROtest 24
INTERPRETATION OF REACTIONS

Column	Test	Code	Reaction	
			positive	negative
Row 1				
H	Indole	IND	red, pink	yellowish
G	Hydrogen sulphide	H₂S	black, dark grey	colourless, pale grey
F	Lysine	LYS	blue, blue-to-green	green, yellow-to-green
E	Ornithine	ORN	blue, blue-to-green	green, yellow-to-green
D	Urease	URE	red, red-to-orange	yellow, pale orange
C	Arginine	ARG	blue, blue-to-violet	green, green-to-blue
B	Simmons citrate	SCI	blue, blue-to-green	yellow, yellow-to-green
A	Malonate	MAL	blue, blue-to-green	yellow, yellow-to-green
Row 2				
H	Phenylalanine	PHE	dark green, green	yellow, yellow-to-brown
G	β-Galactosidase	ONP	yellow, yellowish	colourless
F	Inositol	INO	yellow, yellow-to-green	green
E	Adonitol	ADO	yellow, yellow-to-green	green
D	Cellobiose	CEL	yellow, yellow-to-green	green
C	Sucrose	SUC	yellow, yellow-to-green	green
B	Trehalose	TRE	yellow, yellow-to-green	green
A	Mannitol	MAN	yellow, yellow-to-green	green
Row 3				
H	Acetoin	VPT	red, pink	colourless, pale pink
G	Esculin	ESL	black, dark brown	colourless, pale brown
F	Sorbitol	SOR	yellow, yellow-to-green	green
E	Rhamnose	RHA	yellow, yellow-to-green	green
D	Melibiose	MLB	yellow, yellow-to-green	green
C	Raffinose	RAF	yellow, yellow-to-green	green
B	Dulcitol	DUL	yellow, yellow-to-green	green
A	Glucose	GLU	yellow, yellow-to-green	green

Biochemické vlastnosti - Enterotest 24

Row	H	G	F	E	D	C	B	A
Serratia marcescens CCM 303								
1	IND	H ₂ S	LYS	ORN	URE	ARG	SCI	MAL
	-	-	+	+	-	-	+	-
2	PHE	ONP	INO	ADO	CEL	SUC	TRE	MAN
	-	+	s	+	-	+	+	+
3	VPT	ESL	SOR	RHA	MLB	RAF	DUL	GLU
	+	+	+	-	-	-	-	+
Proteus vulgaris CCM 1799								
1	IND	H ₂ S	LYS	ORN	URE	ARG	SCI	MAL
	+	+	-	-	+	-	-	-
2	PHE	ONP	INO	ADO	CEL	SUC	TRE	MAN
	+	-	-	-	-	+	w	-
3	VPT	ESL	SOR	RHA	MLB	RAF	DUL	GLU
	-	-	-	+	-	-	-	+
Salmonella enteritidis CCM 4420								
1	IND	H ₂ S	LYS	ORN	URE	ARG	SCI	MAL
	-	+	+	+	-	+	w	-
2	PHE	ONP	INO	ADO	CEL	SUC	TRE	MAN
	-	-	-	-	-	-	+	+
3	VPT	ESL	SOR	RHA	MLB	RAF	DUL	GLU
	-	-	+	+	+	-	+	+
Enterobacter cloacae CCM 1903								
1	IND	H ₂ S	LYS	ORN	URE	ARG	SCI	MAL
	-	-	-	+	-	+	+	+
2	PHE	ONP	INO	ADO	CEL	SUC	TRE	MAN
	-	+	+	-	+	+	+	+
3	VPT	ESL	SOR	RHA	MLB	RAF	DUL	GLU
	+	-	+	+	+	+	-	+

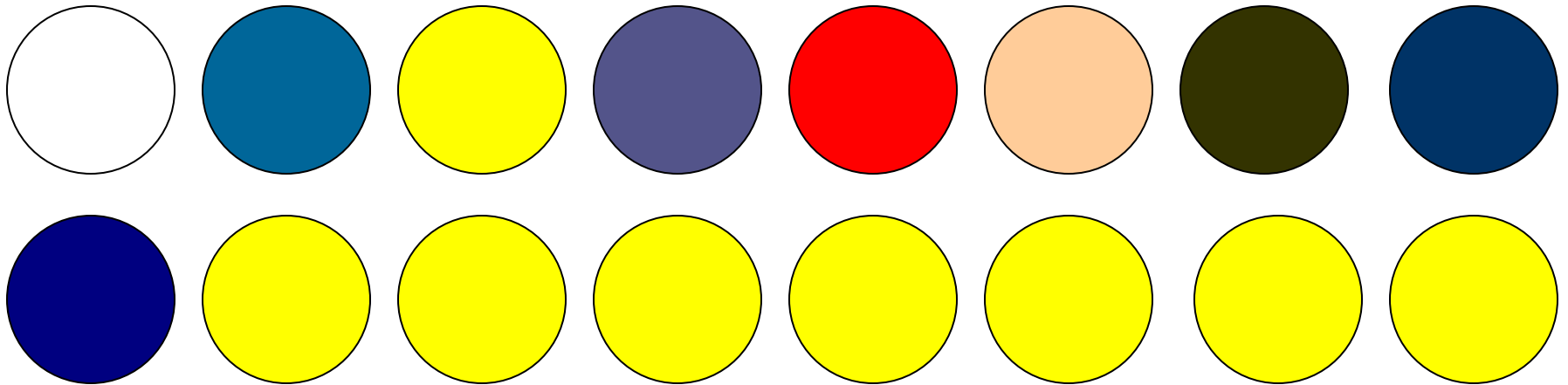
Explanations: + = positive reaction - = negative reaction w = weak reaction

MikroLaTest

Identifikácia *Klebsiella pneumoniae* – Enterotest

+ /- + - - +- + +

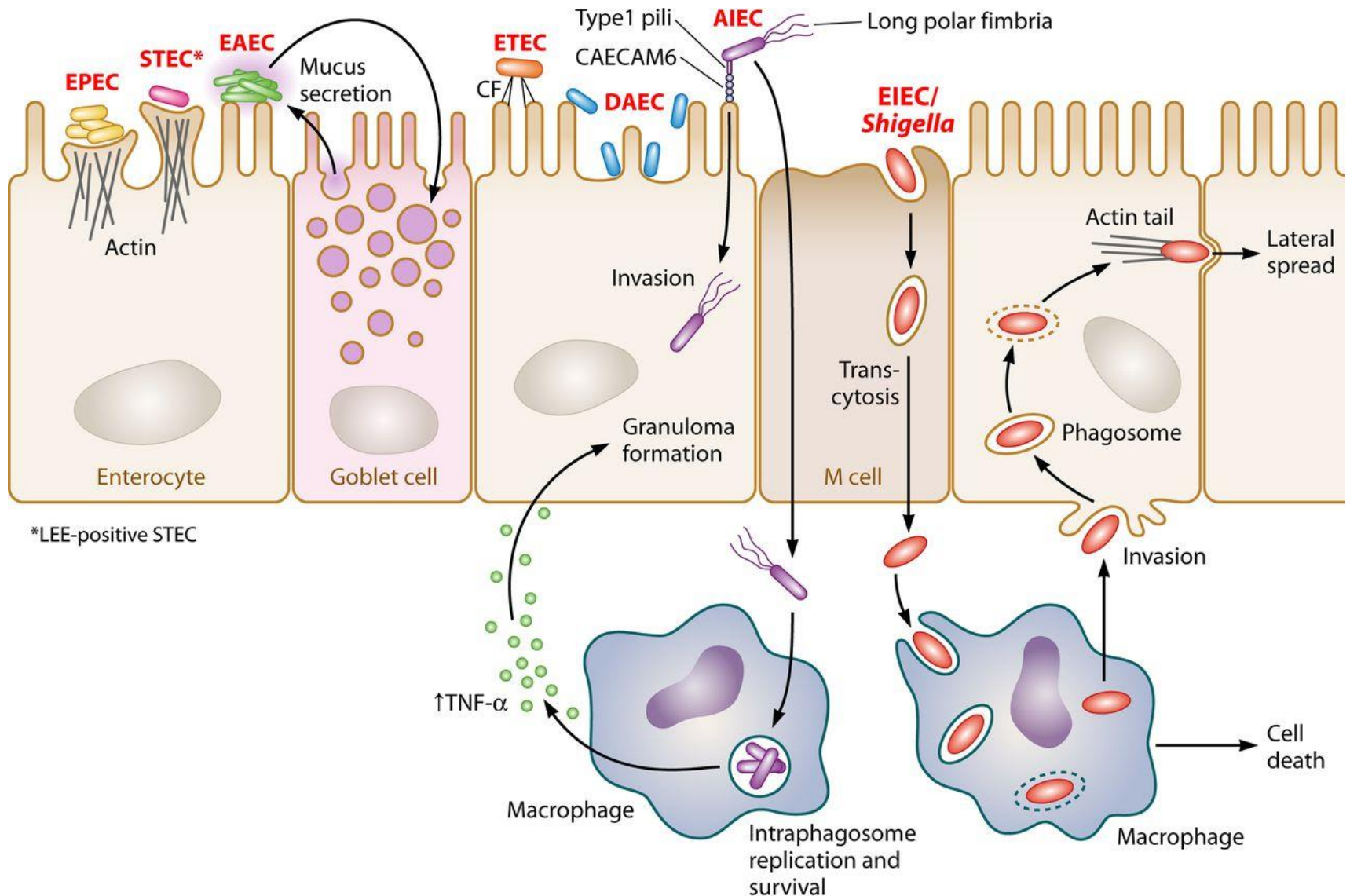
+ + + + + + + + /+



E. coli

- Názov po objaviteľovi Theodor von Escherich
- Vlajková loď mikrobiológie (konjugácia dôkaz, GMO – inzulín a intreféron, gény kodujúce antigény – vakcíny...)
- Pohyblivá peritrichá, G -, palička, nesporulujúca, gen. doba 20 min., biochem. aktívna – štiepi glu, lakt, tvorba plynu a indolu, neštiepi močovinu
- Antigénne štruktúry – O, H, K
- Bežná súčasť mikrocenózy čreva – komezál, čiastočne saprofyt, tiež jako symbiont – potláča rast iných pomocou kolicínov
- Produkcia vitamínu K – prospech
- Potenciálny patogén – v čreve len v prítomnosti špecifických antigénov, mimo stále (Urinárny trakt)
- GIT – EPEC, ETEC, STEC, EIEC, EHEC, VTEC
- Ochorenia: IGIT, IUT, menej často IDT, ICNS

E. Coli - adherencia kmeňov



Salmonella

- Okolo 2000 sérotypov, rôzne názvy podľa miesta izolácie
- Nové poznatky: 2 druhy (*S. enterica*) a niekoľko podskupín
- Označovanie podľa sérotypov – *S. enterica* spp. *enterica*
serovar Typhi – skr. *Salmonella* Typhi

Primárne antropogénne – *S. Typhi* a *S. Paratyphi* A, B, C

- Ochorenie - brušný týfus a paratýfus
- Antigény – O, H typ d, Vi – antigén
- Prestup do krvi – sepsa, horúčka, bolesti hlavy
- Bacilonosiči – môžu až do konca života

Primárne zoopatogénne – *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*

- viac odolné voči vonkajšiemu prostrediu a Se
- Pohyblivé, produkcia H₂S, XLD, SS, MAL
- Ochorenie – hnačky bez krvi, septikémia – jedine u detí a oslabených ľudí

Salmonella Typhi a Paratyphi

- Brušný týfus – *S. Typhi* – cez GIT - v GIT bez komplikácií – cez stenu čreva do limfatických uzlín – neskôr do krvi - sepsa, horúčka, bolesti hlavy – vylučovanie močou, hemokultúra – teploty (1-2 týždne) – salmonelly v žlčníku (bacilonosičstvo) – znova črevo – bunková imunita zabraňuje opätovnému prenikaniu do krvi – zápal, hemoragia, perforácia čreva – neleičený týfus (20 % úmrtnosť)
- Paratýfus – *S. Paratyphi* – miernejšie príznaky,
- Dôkaz – hemokultúry, moč, kostná dreň – priamo
- Dôkaz – nepriamy – Widalova reakcia – antigény
- Nedostatočná hygiena, vodné zdroje
- Prípad týfusovej Mary – USA – kuchárka

Yersinia

- Najnebezpečnejší rod Enterobacteriaceae – mor – *Y. pestis*
- Najviac úmrtí na svete – už 3000 rokov
- Morfológia rovnaká ako Enterobaktérie – nepohyblivé

Bubonický mor – uštipnutie Blchou morovou

- Zväčšené limfatické uzliny, smrť už do štyroch dní

Plúcna forma moru – ďalšia fáza bubonického moru alebo po vdýchnutí yersínií

- Krvavé sputum, smrť do 2 až 3 dní od príznakov

Septická forma moru – vzácna, šírenie krvou, horúčka, sfarbená koža do purpurova, respiračné zlyhanie, smrť už v deň prvých príznakov

- Neliečený mor (30-75 % úmrtnosť)
- Liečený znižuje iba o 5-10 %

Yersinia enterocolitica a pseudotuberculosis

- Enterokolitída v chladnejších oblastiach, najväčšia metabolická aktivita baktérie pri 22°C , infekcia z potravín, hnačka, bolesti brucha, kŕče, teplota. Chronické postihnutie - terminálne ileum, zdurené mesenterické uzliny, imituje appendicitídu. Extraintestinálne prejavy - artritída, hepatitída, osteomyelitída - dôkaz sérologicky aglutináciou
- krvou prenosná bakterémia a endotoxický šok (krvné konzervy - chladené 3 týždne)

Shigella

- 4 druhy - *Sh. dysenteriae*, *Sh. flexneri*, *Sh. boydii*, *Sh. sonnei* a 38 sérotypov
- Dyzentéria (šigelóza) - vodnaté hnačka s prímiesou krvi, ochorenie často epidemické, kontaminovanými rukami. Prežíva vo vode až 6 mesiacov. Malá infekčná dávka - asi 100 baktérií. Ochorenie tenkého čreva, najskôr bez invázie epitelu. Produkcia enterotoxínu - invázia mukózy, deštrukcia sliznice a tvorba vredov - hnis a krv v stolici
- Dg. Na základe biochemických vlastností (charakteristický zápach, netvorí plyn, laktózu neskvasuje)., odlíšenie druhov - sklíčkovou aglutináciou

Klebsiella

- Opúzdrená – mukózny vzhľad kolónií, zvýšená virulencia, nepohyblivá
- *Klebsiella pneumoniae* – pneumónia u pacientov, ktorí nie sú schopný vykašľávaním vyčistiť aspiráty z ústnej dutiny. Nekrotické deštrukcie alveolárnych priestorov. Sangvinolentné sútum. Infekcie rán, mäkkých tkanív a močového traktu
- *K. rhinoscleromatis* - skleróm
- *K. ozaenae* – atrofické ochorenie nosovej sliznice

Ostatné *Enterobacteriaceae*

- G-, okrem *Klebsiella* bičíkaté – pohyblivé, niektoré opúzdrené, virulencia závisí často na prítomnosti pili – prichytenie – testovanie hemaglutináciou
- Koliformné baktérie – *E.coli*, *Klebsiella*, *Serratia* *Citrobacter* a *Proteus*, *Providencia*- oportunistické patogény
- Enterálne infekcie – pri porušení eubiózy a premnožení
- Nozokomiálne infekcie – močového traktu, chirurgických rán, krvi a pľúc.
- Infekcie v komunite – močové, infekcie pri močových kameňoch....
- U imunokompromitovaných , po ATB, iné ochorenie, katetrizácia, starší ľudia, novorodenci

Enterobacter, Citrobacter, Serratia, Providencia, Morganella Proteus

U imunokompromitovaných, nozokomiálne infekcie, rezistentné kmene – prenos R plazmidom v nemocničnom prostredí (ARO). Vstup kontaminovaným katetrami

Proteus

- Pohyblivá G- baktéria, Raussov fenomén
- *P. mirabilis* – infekcie močového traktu, produkujú ureázu (rozklad urey – močoviny, zmena pH, alkalinizácia, podpora tvorby kamienkov a toxicita pre epitel
- *Proteus vulgaris*,