



Zdravotně  
sociální fakulta  
Faculty of Health  
and Social Studies

Jihočeská univerzita  
v Českých Budějovicích  
University of South Bohemia  
in České Budějovice

**Epidemiologie a patogeneze *Escherichia coli***

## **BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Studijní program:

**ZDRAVOTNÍ LABORANT**

**Autor práce:** Hubková Petra DiS.

**Vedoucí práce:** RNDr. Fajfrlík Karel

České Budějovice 2016

## Epidemiologie a patogeneze *Escherichia coli*

### Abstrakt

*Escherichia coli* je jedním z nejdůležitějších zástupců střevní mikroflóry. Podílí se na správném průběhu trávicích procesů ve střevě a vzniká tak prospěšná spolupráce mezi mikroorganismem a makroorganismem. Některé kmeny ale mohou být i patogenní.

Náplní mé bakalářské práce je hlouběji se seznámit s bakterií *E. coli*, počínaje charakteristikou, patogenitou a patogenezí, laboratorní diagnostikou a konče klinickým obrazem onemocnění a terapií. Z epidemiologického hlediska se patogenní *E. coli* vyskytuje spíše sporadicky, ale v rozvojových zemích může narůstat až v endemii a to zejména z důvodu nedodržování hygieny. Popisovány jsou rezervoáry, cesty přenosu a nejznámější kauzy výskytu *E. coli*.

V praktické části se zaměřuji na výskyt *E. coli* u nedonošených dětí, novorozenců a u dětí do 3 let, které jsou vyšetřovány s diagnózou průjmového onemocnění. V období od ledna 2015 do prosince 2015 bylo vyšetřeno 1518 stolic od dětí od 0 - 3 let, přičemž 25 stolic bylo pozitivních na přítomnost dyspeptického kmene *E. coli*, který je původcem průjmu. U 725 stolic byla prokázána jiná nepatologická i patologická flóra a u 768 stolic byl zjištěný nedyspeptický kmen *E. coli*, který není původcem průjmového onemocnění. Všech 1518 vzorků stolic bylo určeno klasickými metodami identifikace, jako jsou kultivace a biochemické testy (ENTEROtest, pestrá řada cukrů). K určení konkrétního sérotypu (O antigenu) *E. coli* byla provedena sérotypizace (antigenní analýza kmene) vyšetřovaného bakteriálního kmene metodou sklíčkové aglutinace. Na základě prokazaného sérotypu *E. coli* byly výsledky statisticky zpracovány a vyhodnoceny za účelem o jaký kmen *E. coli* se jedná.

**Klíčová slova:** *E. coli*, patogeneze, průjmové onemocnění, sérotypizace

## **Epidemiology and pathogenesis of *Escherichia coli***

### **Abstract**

*Escherichia coli* is one of the most important representatives of intestinal microflora. It contributes to the proper course of digestive processes in the gut, creating a beneficial cooperation between microorganism and macroorganism. But some strains may be pathogenic.

The scope of my thesis is to get deeply acquainted with the *E. coli* bacteria, beginning with characteristics, pathogenicity and pathogenesis, laboratory diagnostics and ending with the clinical picture of the disease and therapy. From an epidemiological perspective, pathogenic *E. coli* appears rather sporadically, but in developing countries can grow up into endemics, especially because of the lack of hygiene. Described are reservoirs, transmission routes and the most famous cases of *E. coli* occurrence.

In the practical part, I focus on the incidence of *E. coli* in preterm infants, newborns and children up to 3 years old, which are examined with a diarrheal disease diagnosis. During the period from January 2015 to December 2015, 1518 stools from children aged 0 – 3 years were examined, whereas 25 stools were positive for dyspeptic strains of *E. coli*, which is the originator of diarrhea. Different non-pathological and pathological flora was proven in 725 stools and non-dyspeptic strain of *E. coli* was ascertained in 768 stools, which is not the originator of diarrhea. All 1518 stools were examined using classical methods of identification, such as cultivation and biochemical tests (ENTEROtest, a wide range of sugars). To determine the specific serotype (O antigen) of *E. coli*, serotyping (antigenic analysis of strain) was performed on examined bacterial strain using slide agglutination method. On the basis of proven *E. coli* serotype, results were statistically analyzed and evaluated in order to determine the strain of *E. coli*.

**Keywords:** *E. coli*, pathogenesis, diarrheal disease, serotyping

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci s názvem Epidemiologie a patogeze *Escherichia coli* jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to – v nezkrácené podobě – v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných fakultou – elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne

.....

## **Poděkování**

Děkuji RNDr. Karlu Fajfrlíkovi za cenné rady, podněty a připomínky při zpracování bakalářské práce. Dále děkuji zaměstnancům Mikrobiologického ústavu LF a FN v Plzni za pomoc získávání údajů potřebných pro bakalářskou práci.

## **OBSAH:**

<b>1. ÚVOD</b> .....	<b>8</b>
<b>2. OBECNÁ BAKTERIOLOGIE</b> .....	<b>9</b>
<b>2.1 Taxonomie bakterií</b> .....	<b>9</b>
2.1.1 Klasifikace bakterií .....	9
2.1.2 Identifikace bakterií .....	9
2.1.3 Nomenklatura bakterií (názvosloví) .....	9
<b>2.2 Skladba bakteriální buňky</b> .....	<b>10</b>
2.2.1 Buněčný obal .....	10
2.2.2 Cytoplazma a její složky .....	11
2.2.3 Povrchové struktury bakterie .....	13
<b>2.3 Bakterie a prostředí</b> .....	<b>14</b>
2.3.1 Vztah k hostiteli .....	14
2.3.2 Vztah ke kyslíku .....	15
2.3.3 Vztah k teplotě .....	15
<b>2.4 Morfologie bakterií</b> .....	<b>15</b>
2.4.1 Velikost .....	15
2.4.2 Tvar a uspořádání .....	16
2.4.3 Barvení a mikroskopie .....	17
<b>2.5 Fyziologie bakterií</b> .....	<b>18</b>
2.5.1 Růst a množení bakterií .....	19
2.5.1.1 Regulace růstu bakterií .....	20
2.5.1.2 Vnější faktory ovlivňující růst a množení bakterií .....	20
2.5.2 Výživa a metabolismus bakterií .....	21
2.5.2.1 Energie .....	21
2.5.2.2 Minerální výživa .....	23
<b>3. ESCHERICHIA COLI</b> .....	<b>25</b>
<b>3.1 Charakteristika</b> .....	<b>25</b>
3.1.1 Morfologické vlastnosti .....	25
3.1.2 Biochemické vlastnosti .....	26
3.1.3 Antigenní vlastnosti .....	26
<b>3.2 Patogenita a patogeneze</b> .....	<b>27</b>
3.2.1 Patogenní kmeny působící ve střevě – intestinální .....	28
3.2.1.1 Enteropatogenní kmeny <i>Escherichia coli</i> (EPEC) .....	28
3.2.1.2 Enterotoxigenní kmeny <i>Escherichia coli</i> (ETEC) .....	29
3.2.1.3 Enterohemoragické kmeny <i>Escherichia coli</i> (EHEC) .....	30
3.2.1.4 Enteroinvazivní kmeny <i>Escherichia coli</i> (EIEC) .....	32
3.2.1.5 Enteroagregativní kmeny <i>Escherichia coli</i> (EAEC, EAaggEC) .....	32
3.2.1.6 Difuzně adherentní kmeny <i>Escherichia coli</i> (DAEC) .....	33
3.2.2 Patogenní kmeny působící mimo střevo – extraintestinální .....	34
3.2.2.1 Uropatogenní kmeny <i>Escherichia coli</i> (UPEC) .....	34
3.2.2.2 Septické kmeny <i>Escherichia coli</i> (MENE, SEPEC) .....	34
<b>3.3 Laboratorní diagnostika</b> .....	<b>35</b>
3.3.1 Barvení a mikroskopie .....	35

3.3.2 Kultivace .....	35
3.3.3 Biochemické testy .....	36
3.3.3.1 Krátká řada cukrů .....	38
3.3.3.2 Enterotest .....	38
3.3.4 Antigenní analýza .....	38
3.3.5 MALDI TOF hmotnostní spektrofotometrie .....	40
3.3.6 Stanovení citlivosti na antibiotika .....	40
3.3.6.1 Diskový difúzní test .....	40
3.3.6.2 Diluční mikrometoda .....	41
3.3.6.3 Etest .....	41
<b>3.4 Klinický obraz onemocnění a terapie .....</b>	<b>42</b>
<b>3.5 Využití <i>Escherichia coli</i> .....</b>	<b>42</b>
3.5.1 <i>Escherichia coli</i> Nissle 1917 .....	42
<b>4. EPIDEMIOLOGIE <i>ESCHERICHIA COLI</i> .....</b>	<b>43</b>
<b>4.1 Rezervoáry.....</b>	<b>43</b>
<b>4.2 Způsoby přenosu a cesta šíření infekce .....</b>	<b>44</b>
<b>4.3 Nejznámější kauzy .....</b>	<b>45</b>
<b>4.4 Česká Republika .....</b>	<b>47</b>
<b>5. CÍLE BAKALÁŘSKÉ PRÁCE .....</b>	<b>48</b>
<b>6. METODIKA .....</b>	<b>49</b>
<b>6.1 Odběr, transport a uchování vzorku .....</b>	<b>49</b>
<b>6.2 Kultivace stolice .....</b>	<b>49</b>
6.2.1 Kultivační media pro diagnostiku <i>E. coli</i> .....	49
6.2.1.1 Pracovní postup a hodnocení .....	50
<b>6.3 Biochemické určení <i>E. coli</i> .....</b>	<b>50</b>
6.3.1 ENTEROtest 24 .....	51
6.3.1.1 Pracovní postup a hodnocení .....	51
6.3.2 Pestrá řada cukrů .....	52
6.3.2.1 Pracovní postup a hodnocení .....	52
<b>6.4 Antigenní analýza kmene = sérotypizace <i>E. coli</i> .....</b>	<b>53</b>
6.4.1 Pracovní postup a hodnocení.....	54
<b>7. VÝSLEDKY .....</b>	<b>55</b>
<b>8. DISKUZE .....</b>	<b>59</b>
<b>9. ZÁVĚR .....</b>	<b>60</b>
<b>10. SEZNAM ZDROJŮ LITERATURY .....</b>	<b>61</b>
<b>11. PŘÍLOHY .....</b>	<b>65</b>
<b>12. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....</b>	<b>70</b>

## 1. ÚVOD

*Escherichia coli* byla poprvé objevena v roce 1885 rakouským bakteriologem Theodorem von Escherichem, který ji izoloval z výkalů novorozenců, kteří trpěli průjmem a gastroenteritidou. Mnoho let byla *Escherichia coli* považována za neškodného komenzála v tlustém střevě lidí a teplotokrevných živočichů. V roce 1935 se zjistilo, že může být i původcem průjmového onemocnění.

Tato bakterie sloužila jako modelový mikroorganismus, u kterého byla prokázána replikace DNA a bakteriální konjugace. Některé druhy *Escherichia coli* nezpůsobují onemocnění, jiné jsou ve střevě prospěšné vzhledem k produkci některých vitamínů a to zejména vitamínu K. Působí také jako určitá bariéra pro ostatní mikroorganismy při jejich boji o živiny a kyslík.

*Escherichia coli* se řadí mezi podmíněně patogenní mikroorganismy, při jejím přemnožení může vyvolat dané onemocnění. Pokud jí najdeme mimo zažívací trakt je vždy patogenní. Existují dva typy onemocnění způsobené patogenní *E. coli*:

- Extraintestinální – zejména onemocnění močových cest, infekce ran, hnisavé procesy, septická onemocnění
- Intestinální - infekční průjmová onemocnění

V zažívacím traktu nalézáme tzv. patogenní kmeny *Escherichia coli*, které dělíme do těchto skupin: enterotoxigenní (ETEC), enteropatogenní (EPEC), enterohemoragické (EHEC), enteroinvazivní (EIEC). Infekce patogenními kmeny *Escherichia coli* se šíří převážně fekálně orální cestou nebo kontaminovanou vodou a potravinami. Zdrojem nákazy může být také nemocné zvíře a tedy potravinové suroviny z něj vyrobené.

V České Republice nejčastěji *E. coli* vyvolává onemocnění močových cest a dále pak novorozenecké průjmy, na které jsem se v mé bakalářské práci nejvíce zaměřila. U dětí do 3 let při diagnóze průjmového onemocnění a u nedonošených dětí se vždy vyšetřují sérotypy *E. coli*.



## 2. OBECNÁ BAKTERIOLOGIE

### 2.1 *Taxonomie bakterií*

Taxonomie bakterií zahrnuje jejich klasifikaci (třídění), identifikaci a nomenklaturu.

#### 2.1.1 Klasifikace bakterií

Bakterie se třídí do skupin, tzv. taxonů, dle jejich podobnosti (metabolismus, genetické znaky, morfologie buněk a kolonií).

Základní taxony v bakteriologii: kmen - třída - řád - čeleď - rod – druh (Votava a kol., 2001).

V bakteriologii je důležité definovat druh (species), což je množina bakteriálních kmenů, které mají stejné vlastnosti, ale liší se od kmene jiné skupiny. Kmen je pak tedy populace pocházející z jediné mikrobiální buňky.

V mikrobiologii je také významné poddruhové třídění: biovar (specifické biochemické vlastnosti), serovar (antigenní vlastnosti), genovar (složení nukleových kyselin) a fagovar (je hostitelem určitého bakteriofága) (Votava a kol., 2001).

Bakterie se určují a třídí podle jejich morfologických vlastností, ale také dle genetických, metabolických, molekulárních a ekologických znaků.

#### 2.1.2 Identifikace bakterií

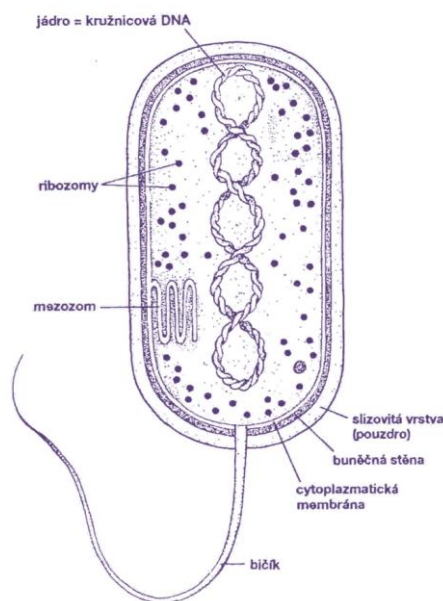
Identifikace (určování) znamená přiřazení nově izolovaného kmene do známého již pojmenovaného taxonu na základě shodných klasifikačních znaků.

#### 2.1.3 Nomenklatura bakterií (názvosloví)

U bakterií se využívá k jejich pojmenování binominální nomenklatury. Názvy bakterií se skládají z dvouslovných latinských jmen, kdy první jméno označujeme jako rodové (s velkým počátečním písmenem) a druhé jméno jako druhové (s malým počátečním písmenem) (Rosypal, 1994).

## 2.2 Skladba bakteriální buňky

Prokaryotické mikroorganismy jsou jednobuněčné organismy, jejichž základní skladbu tvoří buněčný obal a vnitřní struktury buňky.



Obr. 1: Ilustrační obrázek bakteriální buňky

### 2.2.1 Buněčný obal

#### *Buněčná stěna*

Většina bakteriální buněk je obalena pevnou, elastickou blanou, která buňce poskytuje ochranu a udržování stálého tvaru. Některé mikroorganismy buněčnou stěnu nemají, např. mykoplasmata. Peptidoglykan patří k hlavní stavební složce buněčné stěny bakterií a je tvořen směsí polymerů, což jsou dva pravidelně se střídající cukry, kyselina N-acetylmuramová a N-acetylglukosamin. Buněčná stěna je propustná pro nízkomolekulární, vysokomolekulární látky a také pro soli. Dle struktury buněčné stěny rozlišujeme grampozitivní a gramnegativní bakterie (Votava a kol., 2001).

Grampozitivní bakterie mají jednoduchou buněčnou stěnu tvořenou silnou, pevnou vrstvou peptidoglykanu a kyselinu teichoovou.

U gramnegativních bakterií je naopak buněčná stěna slabší, ale má složitější strukturu. Obsahuje malé množství peptidoglykanu, ale bez kys. Teichoové (Rosypal, 1994). Na vrstvu peptidoglykanu se připojuje vnější vrstva, která je tvořena fosfolipidy, proteiny a lipopolysacharidy.

Bakterie mohou ztratit buněčnou stěnu vlivem agens poškozujících buněčnou stěnu (lysozym, penicilin) nazýváme je pak jako L-formy bakterií (dle Listerova ústavu v Londýně). Tato L-forma jim pomáhá přežít vliv těchto činitelů. Porušením (odstraněním) bakteriální stěny například lysozymem dojde k bakteriální lýze a vzniknou tak okrouhlé protoplasty, které postrádají buněčnou stěnu a nejsou schopny regenerace (vznik z gram pozitivních bakterií). Nebo vzniknou sféroplasty (z gramnegativních bakterií) na jejichž povrchu zůstanou zbytky buněčné stěny a jsou schopny se dělit (Rosypal, 1994). Protoplasty i sférocyty přežívají jen ve stabilním hypertonicím prostředí.

#### *Cytoplazmatická membrána*

Cytoplazmatická membrána je pro buňku nezbytná, tvoří rozhraní mezi vnějším a vnitřním prostředím bakteriální buňky. Je tvořena fosfolipidovou dvojvrstvou, v níž jsou ponořeny různé bílkoviny. Podílí se na regulaci transportu látek mezi buňkou a prostředím, je polopropustná. Uplatňuje se v respiračních pochodech, v sekreci látek z cytoplazmy do vnějšího prostředí (extracelulární enzymy) a v syntéze některých složek. Vchlípenina cytoplazmatické membrány do cytoplazmy se nazývá mezozom, který obsahuje důležité enzymy pro výměnu plynů anaerobních bakterií (Rosypal, 1994).

#### 2.2.2 Cytoplazma a její složky

Cytoplazma je koloidní roztok obklopený cytoplazmatickou membránou. Vyplňuje vnitřní prostor bakteriální buňky a jsou v ní uloženy nerozpustné složky např. nukleoid, ribozomy a zásobní granula. V cytoplazmě probíhají základní životní pochody, obsahuje více než 50 % všech proteinů buňky a většina z nich má enzymatickou funkci.

### *Nukleoid*

Bakteriální jádro není obklopeno jadernou membránou. Skládá se z bakteriální molekuly DNA (deoxyribonukleová kyselina), většinou cirkulární, která plní funkci chromosomu. Jsou zde uloženy geny, které se při dělení buňky přepisují v nezměněné formě do buněk dceřiných, kde tak určují jejich znaky a vlastnosti.

### *Ribozomy*

Ribozomy jsou drobná tělíska buď v cytoplazmě, nebo přisedlé k membráně, na kterých probíhá proteosyntéza dle matrice mRNA. Skládají se ze dvou třetin z ribozomální rRNA a zbytek jsou různé proteiny. Tvořeny jsou dvěma podjednotkami:

- velká podjednotka 50S - tvořena asi 30 proteiny
- malá podjednotka 30S - tvořena asi 20 proteiny

Tyto podjednotky mají několik vazebných míst, kde se váže tRNA a elongační, uvolňovací a iniciační faktory potřebné k translaci bílkovin (Votava a kol., 2001).

### *Plazmidy*

Tyto malé kruhové molekuly DNA se vyskytují jen u některých bakterií v cytoplazmě, jsou schopny replikace. Obsahují geny, které doplňují genetickou výbavu bakterie, což má výhody při adaptaci na změny prostředí.

### *Buněčné inkluze*

V cytoplazmě se vyskytují v podobě granul jako zásobní látky. Patří sem polysacharidy (glykogen), tukové látky, kyselina polybetahydroxymáselná a např. i granula síry (Rosypal, 1994).

### 2.2.3 Povrchové struktury bakterie

#### *Bakteriální pouzdro (kapsula)*

Tvoří povrch většiny bakterií včetně patogenních, nemá zvláštní význam, ale může zvyšovat odolnost některých bakterií vůči např. makrofágům. Pouzdro je tvořeno polysacharidy nebo polypeptidy. Může vylučovat také sliz do prostředí (slizové pouzdro).

#### *Bičiky (flagella)*

Mnoho bakterií má bičiky, které umožňují jejich pohyb. Bičík se skládá z jednoduché bílkovinné podjednotky – flagelinu, který vyvolává natahování a stahování bičíku. Dochází k rotaci bičků připomínající pohyb lodního šroubu. Bakterie mohou mít přítomen jeden bičík nebo několik bičků, toto obrvení je jeden z taxonomických znaků bakterií.

Dělí se dle počtu bičků na buňce na monotrichální (jeden bičík na jednom konci), amfitrichální (bičiky na obou koncích), lofotrichální (více bičků na jednom konci) a peritrichální (bičiky po celé buňce) (Votava a kol., 2001).

#### *Fimbrie (pilusy)*

Na povrchu některých gramnegativních bakterií můžeme najít tenká proteinová vlákna. Jsou kratší než bičiky a nejsou orgánem pohybu. Mají význam pro patogenitu bakterií.

#### *Spory a sporulace*

Ze zdravotnicky významných rodů má schopnost tvořit spory aerobní *Bacillus* a anaerobní *Clostridium* (Votava a kol., 2001). Za nepříznivých podmínek mikroorganismus přechází do klidového stadia bakteriální spory, kde je omezena látková výměna a jsou zastaveny i enzymatické reakce.

Endospory vznikají uvnitř mateřské buňky, jsou vysoce odolné vůči zevním vlivům (působení chemických látek, vyschnutí, vysoké teploty-termorezistence) a mohou tak přežít i staletí. Klíčení je proces přeměny endospory na vegetativní buňku.

## **2.3 Bakterie a prostředí**

### 2.3.1 Vztah k hostiteli

Bakterie a její vliv na lidský organismus:

Komenzalizmus - bakterie nemají nepříznivý vliv

- *Symbióza* = mikroorganismus a makroorganismus si navzájem prospívají, osidlují kůži a sliznice člověka (bakterie tvoří ochranu povrchu sliznic před patogeny, ale naproti tomu získávají živiny z lidského těla – *Escherichia coli*).
- *Saprotitismus* = mikroorganismus a makroorganismus žijí vedle sebe bez vzájemného poškozování, mikrob se živí organickými zbytky makroorganismu.

Parazitismus - bakterie hostitele poškozují, využívají živin makroorganismu, ale metabolismem a produkcí různých toxinů a enzymů poškozují organismus a značíme je jako *patogenní*.

Mikroorganismy, které poškozují makroorganismus jen tehdy, když dojde ke snížení funkce imunitního systému nebo při poškození přirozených obranných mechanismů nazýváme *oportunně patogenní* (podmíněně). Jsou jimi často původci nozokomiálních infekcí v nemocnicích.

**Patogenita** = schopnost mikroorganismu vyvolat onemocnění

**Virulence** = míra patogenity, daná:

1. Invazivitou = schopnost mikroba vniknout do tkáně hostitele, množit se a poškozovat ho
2. Toxigenitou = produkce toxických látek (endotoxiny, exotoxiny)

### 2.3.2 Vztah ke kyslíku

Podle závislosti na kyslíku bakterie dělíme:

- *Aerobní* (striktně aerobní) = bez kyslíku nemohou žít, potřebují ho k růstu a množení
- *Anaerobní* (striktně anaerobní) = tyto bakterie kyslík nevyžadují, je pro ně dokonce i toxický
- *Fakultativně anaerobní* (fakultativně aerobní) = bakterie rostou za přítomnosti i nepřítomnosti kyslíku
- *Mikroaerofilní* = růst bakterií při zvýšené tenzi CO<sub>2</sub>

### 2.3.3 Vztah k teplotě

Bakterie rostou a přežívají při určité teplotě, dělíme je do 3 základních skupin:

- Psychofilní = bakterie žijící při nízkých teplotách pod 20°C (v oceánech, hluboké jezera, studené prameny), většinou jsou nepatogenní
- Mezofilní = bakterie, které rostou při teplotě 20-40°C, většina patogenních bakterií
- Termofilní = bakterie vyžadující pro svůj růst a život teplotu vyšší než 40°C (v horkých pramenech, v kompostu)

## 2.4 Morfologie bakterií

### 2.4.1 Velikost

Bakterie jsou okem neviditelné mikroorganismy a jejich velikost se udává v mikrometrech (µm). Nejmenší bakterie má velikost 0,2-0,5 µm, řadíme sem například *mykoplasmata*, *chlamydie* a *rickettsie* (Votava a kol., 2001). A naopak největší bakterie mohou dosahovat délky až 60 µm, jsou to například *spirochety*.

Bakterie patogenní pro člověka mají velikost kolem 1 až 3  $\mu\text{m}$ , příkladem mohou být kulovité bakterie – *Stafylokoky*.

#### 2.4.2 Tvar a uspořádání

##### ***Kulovitý tvar bakterií***

Kulovité bakterie se označují jako koky. Jestliže vytvářejí shluky, dále je pak dělíme:

- ✓ diplokoky – 2 buňky
- ✓ tetrakoky – 4 buňky
- ✓ streptokoky – buňky ve tvaru řetízku
- ✓ stafylokoky – buňky ve tvaru hrozna
- ✓ sarciny – balíčkovitý tvar buněk

##### ***Tyčinkovitý tvar bakterií (tyčinky)***

Zástupci tyčinkovitého tvaru mohou opět tvořit formace. Tvoří pak diplobakterie (dvě buňky), streptobakterie (buňky v řetízcích) a pak tzv. palisádové bakterie (palisádové uspořádání) (Rosypal, 1994). Mohou mít bičíky či brvy.

##### ***Zakřivený tvar bakterií (rohličkovitý)***

Tento tvar bakterií nevytváří kolonie. Dělí se na *vibria* (lehce zakřivené tyčinky), spirily (lehce zvlněné tyčinky) a *spirochety* (tyčinky šroubovitého tvaru).

##### ***Vláknitý tvar bakterií***

Bakterie v podobě tenkého vlákna.

##### ***Větvený tvar bakterií***

Bakterie vytvářejí úplné větvení nebo alespoň náznak větvení.(viz. Příloha č.1)



### 2.4.3 Barvení a mikroskopie

Bakteriální buňky mají schopnost na sebe vázat některá barviva. Obarvené bakterie specifickým barvivem můžeme pozorovat a vyhodnotit pod mikroskopem. Nejpoužívanější barvení v mikrobiologické laboratoři, které slouží ke klasifikaci bakterií je **barvení dle Grama**.

Podstata tohoto barvení spočívá v propustnosti (permeabilitě) buněčných stěn u bakterií. Rozlišujeme tak grampozitivní (modré) a gramnegativní (červené) bakterie, ale i tzv. gramlabilní bakterie (Votava a kol., 2000).

Pokud je barven preparát dle Grama je nutné provést nejdříve fixaci, nejčastěji plamenem, aby došlo ke stabilizaci preparátu, ale i k usmrcení buněk. Poté se převrství preparát krystalovou violetí, která dodá bakteriálním buňkám tmavomodré až modrofialové zbarvení (Votava a kol., 2000). Pak se nanese Lugolův roztok, který vytvoří komplex barviva s jodem a následuje odbarvení pomocí alkoholu (96%). Poslední krok je dobarvení karbolfuchsinem (Votava a kol., 2000).

*Grampozitivní bakterie* mají vysoký obsah peptidoglykanů v buněčné stěně a chybí jim vnější membrána, proto při barvení nedochází k vyplavení komplexu krystalové violeti a Lugolova roztoku. Pod mikroskopem se jeví modře až černě.

G + koky: *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*

G + tyčinky: *Corynebacterium*, *Clostridium*, *Bacillus*

*Gramnegativní bakterie* mají buněčnou stěnu tvořenou liposacharidy a tím dochází k vyplavení komplexu alkoholem a k odbarvení. Karbolfuchsin dobarví bakterie a výsledné obarvení je červené.

G – koky: *Neisseria*

G – tyčinky: *E. coli*, *Campylobacter*, *Salmonella*

G – kokobacily: *Haemophilus influenzae*, *Bordetella pertussis*

*Gramlabilní bakterie* jsou nepravidelně obarvené, pod mikroskopem je vidíme jako grampozitivní i gramnegativní. Příčinou této nepravidelnosti může být stáří buněčné kultury nebo špatné kultivační podmínky.

Velký význam má Gramovo barvení u izolovaných kmenů *E. coli*, které se běžně nevyskytují např. v moči, krvi, punktátu, hnisu. Bezvýznamné Gramovo barvení *E. coli* je u vyšetření stolice, jelikož všechny enterobakterie mají uniformní vzhled silných gramnegativních tyčinek a identifikace tohoto druhu by byla obtížná (Bednář, 2009).

Existují bakterie, které na Gramovo barvení nereagují. Konkrétně se jedná o *mykobakterie* (původce tuberkulózy) a některé aktinomycety, označujeme je jako acidorezistentní. K průkazu těchto acidorezistentních bakterií se používá **Ziehl-Neelsenovo barvení** (Votava a kol., 2000).

Principem barvení je schopnost acidorezistentních bakterií přijímat horká barviva (karbolfuchsin). Po obarvení vzdorují odbarvení kyselým alkoholem a nakonec se dobarví methylenovou modří nebo 1% malachitovou zelení. Po výsledném barvení se acidorezistentní bakterie jeví červeně až růžově a pozadí preparátu je modré nebo zelené, podle toho jakou barvou byl preparát dobarven (Votava a kol., 2000).

Další bakteriologické barvicí metody, které diagnostikují jednotlivé skupiny mikrobů: barvení dle Giemsy (cytologické barvení), průkaz pouzder (dle Burriho), spor a bičíků.

## **2.5 Fyziologie bakterií**

Za uměle vytvořených podmínek se sledují životní funkce bakterií. Základními životními funkcemi bakterií jsou růst, reprodukce a metabolismus.

### 2.5.1 Růst a množení bakterií

Pokud se bakterie nachází v optimálních podmínkách má tendenci růst a množit se za určitých biochemických a fyzikálních pochodů, které označujeme jako růstový cyklus bakterií.

Její tělo se zvětšuje (hmotnost, objem) a při dosažení určité velikosti dochází k *příčnému dělení*, kdy z jedné buňky mateřské vzniknou dvě buňky dceřinné.

Doba od vzniku mateřské buňky do rozdělení na dvě dceřinné se nazývá *generační doba*. Pokud růst a dělení probíhá delší dobu, vznikne z jedné mateřské buňky populace buněk.

Za vhodných podmínek dochází k dělení bakterií geometrickou řadou a každá generační doba představuje zdvojnásobení počtu buněk. Jestliže chceme znázornit počet (koncentraci) buněk v závislosti na čase slouží nám k tomu tzv. ***růstová křivka bakterií***.

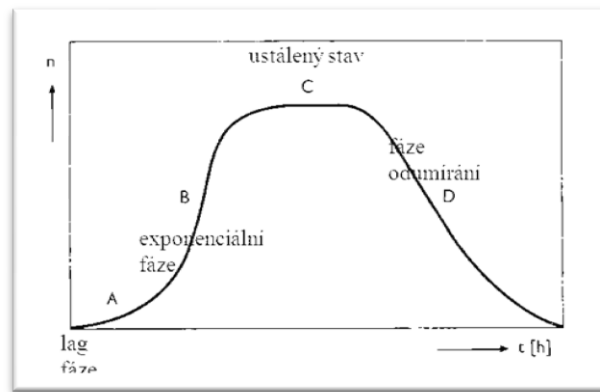
Rozlišujeme zde čtyři na sebe navazující fáze růstu:

1. lag fáze (klidová fáze) – v této fázi se buňky nemnoží, adaptují se na prostředí, syntetizují enzymy a zvětšují svůj objem. Délka této fáze závisí na velikosti a stáří inokula. Na konci lag fáze je krátké období, kdy se buňky začínají dělit s pomalu narůstající rychlostí.

2. logaritmická (exponenciální) fáze – vyznačuje se maximální rychlostí buněčného dělení bakteriálních buněk, rychlost dělení je konstantní a provází ho aktivní metabolismus s ubýváním živin, přibýváním metabolických zplodin a dochází tak ke změně pH prostředí. Tato fáze končí zpomalením růstu buněk.

3. stacionární fáze – buňky se téměř nedělí, toto období se vyznačuje ustálením rovnováhy mezi buněčným růstem, dělením a smrtí buněk.

4. fáze odumírání – buňky umírají, někdy může dojít k tzv. autolýze, to znamená, že některé bakterie se doslova rozpouštějí (*pneumokok*).



**Obr. 2:** Ilustrační obrázek růstové křivky bakterií

### 2.5.1.1 Regulace růstu bakterií

Aby bakterie rostly a množily se je důležité množství, složení živin a teplota prostředí, ve kterém se nacházejí. Růst je také řízen intracelulárně, za pomoci enzymatických procesů. Existuje zde tzv. uzavřený a otevřený systém. Uzavřený systém znamená omezený přísun živin do buňky a naopak otevřený systém neustále dodává živiny do buňky a současně odvádí metabolity z ven z buňky.

### 2.5.1.2 Vnější faktory ovlivňující růst a množení bakterií

#### Fyzikální faktory

**Vlhkost** – bakterie jsou většinou hydrofilní, to znamená, že ke svému životu potřebují vodu. Pokud dojde ke snížení množství vody pod optimum, prodlužuje se tak generační doba a dokonce může dojít ke smrti buňky vyschnutím.

Mezi nejvíce citlivé bakterie na nedostatek vody patří gramnegativní bakterie (*Neisserie*). Odolnější k vyschnutí jsou zejména grampozitivní, acidorezistentní bakterie a bakteriální spory.

**Teplota** – různé bakterie plní své životní funkce za odlišných teplot. Minimální, optimální (35-37°C) a maximální teplota.

**Záření** – ionizační a ultrafialové způsobuje poškození buněčných struktur bakterie.

**Osmotický tlak** – prostředí, kde mikroorganismy žijí, bývá většinou hypotonické (koncentrace rozpuštěných látek je nižší než v cytoplazmě buňky) pokud se však dostanou do vysoce hypertonického prostředí (zvýšení osmotického tlaku), dochází k plazmolýze, ztrátě vody, ke smrštění cytoplazmy. Hypertonické prostředí znemožňuje buňkám přijímat živiny a vodu, tím dochází k zastavení množení a časem i k uhynutí buňky.

**Hydrostatický tlak** – bakterie během svého života jsou vystaveny změnám hydrostatického tlaku. Vyšší tlak za normální teploty způsobuje zpomalení pohybu, zastavení růstu, změny v metabolismu buňky a může vést až ke smrti.

#### Chemické faktory

**pH prostředí** – vhodná koncentrace vodíkových iontů je cílem k úspěšnému růstu bakterií, většina bakterií nejlépe roste v neutrálním prostředí, které se pohybuje kolem pH 7, avšak mezní hodnoty pH prostředí jsou v rozmezí pH 4-10.

### 2.5.2 Výživa a metabolismus bakterií

Mikroorganismy musí přijímat z vnějšího prostředí mnohé látky nebo energii, aby dokázaly přežít.

#### 2.5.2.1 Energie

Energie důležitá pro udržení stálosti buňky a pro všechny životní funkce probíhající uvnitř buňky, energii získá mikroorganismus z organických látek, ale i z mnoha anorganických látek a je schopný přepínat svůj metabolismus dle dané situace mezi několika typy. Bakterie mohou získat energii těmito základními způsoby:

1. Energetický metabolismus = katabolický metabolismus fermentace (kvašení) = rozklad energeticky bohatších látek na energeticky chudší látky, pro získání energie potřebuje organismus pro fermentaci přijímat jen jednu látku.

Nejznámější je fermentace sacharidů za vzniku produktů jako je např. laktát nebo ethanol, ale existují i mikroorganismy, které fermentují aminokyseliny, puriny a jiné další látky (Kaprálek, 1986).

**Respirace** (dýchání) = získávání energie oxidací jedné látky jinou látkou, redukčním činidlem může být jakákoliv organická látka (lipid, sacharid, aminokyselina) a hlavním oxidačním činidlem je kyslík => aerobní respirace, pokud mikroorganismus využívá jiné oxidovadlo např. dusitany, sírany, oxid uhličitý, mluvíme pak o tzv. anaerobní respiraci (Kaprálek, 1986).

**Fototrofie** = organismus získává energii v podobě světelných kvant (fotonů), příkladem může být fotosyntéza, kde se využije světelná energie k syntéze organických látek.

Mikroorganismy získávající energii z organických látek (kvašení a respirace) se nazývají organotrofní. Mikroorganismy využívající k získání energie látky anorganické se nazývají lithotrofní.

2. **Biosyntéza** = anabolický metabolismus. Hlavní funkcí tohoto metabolismu je syntéza makromolekul (DNA, RNA, bílkovin), zapotřebí jsou zde živiny ve formě uhlikatých zbytků a zdroje vodíku (redukující síly) :

**zdroje uhlíku** – uhlík je základní stavební prvek všech organických látek a každý organismus má potřebu ho přijímat v určité formě, aby si vytvořil organické látky, tvořící jeho tělo. Mikroorganismy využívají řadu zdrojů uhlíku pro tvorbu vlastních složitých organických látek, dělíme je do dvou skupin:

- autotrofní bakterie - u těchto bakterií je zdrojem uhlíku  $\text{CO}_2$  (oxid uhličitý), k tvorbě stavebních látek potřebují energii, kterou získávají buď ze slunečního světla => fotoautotrofní bakterie nebo oxidací anorganických látek vzdušným kyslíkem => chemoautotrofní bakterie.

- heterotrofní bakterie - využívají jako zdroj uhlíku organické látky většinou bílkoviny, sacharidy, soli organických kyselin, lipidy. Těchto bakterií je většina, jsou buď fotoheterotrofní (vyžívají sluneční světlo) nebo chemoheterotrofní (oxidace organických látek).

**zdroje dusíku** – dusík je nejdůležitější biogenní prvek a jeho dostatečný příjem je nutný pro život, vyskytuje se v molekulách aminokyselin, bílkovin, nukleových kyselin. Bakterie mohou využívat jako zdroj dusíku různé sloučeniny:

- organický dusík – snadný zdroj dusíku, využívají téměř všechny bakterie
- amonné ionty – mikroorganismus je snadno využije a zabuduje do svých stavebních látek
- dusičnany a dusitany – jen některé mikroorganismy dokážou tento zdroj dusíku využít (aktinomycety)
- plynný dusík – schopno využít jen malé množství bakterií, k zabudování nutno dodat velké množství energie
- močovina – fyziologický zdroj dusíku, využívají ho jen bakterie, které jsou schopny tvořit enzym ureázu (urobakterie) (Rosypal, 1994).

#### 2.5.2.2 Minerální výživa

Patří sem prvky řazené buď přímo do sloučenin buňky, nebo hrají úlohu katalyzátorů biochemických reakcí. *Kyslík* a *vodík* jsou prvky, jejichž zdrojem je voda a jsou součástí většiny organických a anorganických sloučenin. Ovlivňují metabolismus buňky a účastní se neutralizačních pochodů. Dalším prvkem je *síra*, jejímž zdrojem jsou minerální soli kyseliny sírové a využívá se k syntéze aminokyselin a bílkovin obsahující síru. Dále pak *fosfor*, který je hlavní složkou nukleových kyselin, koenzymů, fosfolipidů. Zdrojem fosforu jsou soli kyseliny fosforečné.

Bakterie mohou vyžadovat ještě také tzv. stopové prvky a další minerální látky (draslík, hořčík, železo, vápník), které se pak uplatňují při sporulaci, biosyntéze bílkovin a také jako aktivátory enzymatických reakcí.

**Produkce enzymů** – většina bakterií je schopna produkovat různé enzymy, jejichž detekce nám napomáhá určit, o jaký druh bakterie se jedná.

*oxidační enzymy:*

kataláza = enzym štěpící peroxid vodíku

oxidáza = enzym, který se účastní oxidačních pochodů

*proteolytické enzymy* – působí toxicky nebo se podílí na rozklad bílkovin

koaguláza = tento enzym sráží krevní plazmu

(přeměna fibrinogenu na fibrin)

- kolagenóza – ruší vlákna kolagenu
- protéza – rozkládá bílkoviny

hemolyziny = těmito enzymy je porušována membrána erytrocytů

- alfa-hemolyziny = částečná hemolýza
- beta-hemolyziny = úplná hemolýza

neurotoxiny = enzymy, které způsobují poruchy a funkce nervové soustavy

- tetanospazmin
- botulotoxin
- enterotoxin
- difterický toxin

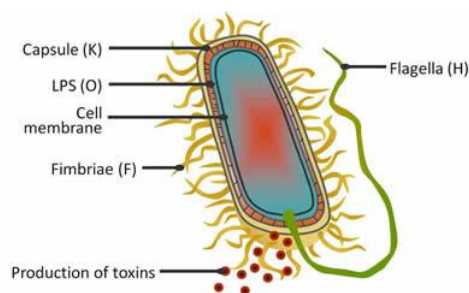


### 3. *ESCHERICHIA COLI*

#### 3.1 Charakteristika

Z taxonomického hlediska řadíme bakterii *Escherichia coli* do domény *Bacteria*, mezi bakterie s buněčnou stěnou gramnegativního typu, do kmene *Proteobacteria*, třídy *Gammaproteobacteria*, řádu *Enterobacteriales*, čeledi *Enterobacteriaceae*, rodu *Escherichia* a druhu *Escherichia coli* (Sedláček, 2007). Dříve také nazývaná *Bacteria coli*. Rakouský lékař a bakteriolog Theodor von Escherichia v roce 1885 poprvé izoloval tuto bakterii a tak byl odvozen její dnešní název *Escherichia coli* (Votava a kol., 2003).

Do rodu *Escherichia* patří také ještě i další druhy jako například *Escherichia vulneris*, *Escherichia hermannii*, *Escherichia albertii*, avšak tyto druhy se vyskytují u člověka jen výjimečně (Schindler 2010, Votava a kol. 2003, Votava 2000 ).



**Obr. 3:** Bakterie *E. coli* převzato z <http://www.ecl-lab.com/en/ecoli/index.asp>

#### 3.1.1 Morfologické vlastnosti

Bakterie *E. coli* je gramnegativní pohyblivá tyčka, která má zaoblené konce, někdy může mít tvar kokobacilu nebo také vláknitou formu. Průměrná délka této bakterie činí 2-3  $\mu\text{m}$  a šířka je kolem 0,6  $\mu\text{m}$  (Bednář, 2009). Pohybuje se prostřednictvím bičků nebo fimbrií, které jsou umístěny peritrichozně na povrchu buňky. Některé *E. coli* jsou nepohyblivé a některé mohou tvořit pouzdra (viz. Příloha č.2) (Zahradnický, 1987).

### 3.1.2 Biochemické vlastnosti

*Escherichia coli* se zařazuje dle vztahu ke kyslíku mezi fakultativně anaerobní a společným znakem těchto fakultativně anaerobních bakterií je zkvašování glukózy. Dále pak štěpí laktózu, za aerobních podmínek tvoří indol a neštěpí močovinu. Produktem kvašení sacharidů je především kyselina mléčná, v menším množství pak kyselina mravenčí a octová (Votava a kol., 2003).

Některé kmeny se mohou chovat atypicky, mají opožděnou sacharolytickou aktivitu a tím se jeví na půdách s laktózou jako laktózanegativní.

### 3.1.3 Antigenní vlastnosti

Antigenní struktura odpovídá OHK systému (Votava a kol., 2003). Všechny kmeny *Escherichia coli* mají somatický O, kapsulární K a bičíkový H antigen (pokud jsou obrvené).

*Antigenní komplex vázaný na stěnu bakteriální buňky:*

O antigen (tělový, somatický) – v zevní vrstvě buněčné stěny, termostabilní, význam v metabolismu a dělení bakterií, známo 167 typových O antigenů

- obsahuje 60 % polysacharidu, 20-30 % lipidu a 4 % hexoaminu
- mozaiková struktura, která je nositelem endotoxinu
- terminálními skupinami a pořadím opakujících se podjednotek polysacharidového řetězce je dána imunologická specifita O antigenů
- O aglutinace pomocí specifické anti-O protilátky bývá neroztřepatelná a má zrnitý vzhled
- odolnost k zředěným kyselinám a alkoholu

K antigen (pouzderňý, kapsulární) – na povrchu buňky, významná role v rezistenci vůči fagocytóze a baktericidním účinkům protilátek, také nazývány „blokuující antigeny“. Většinou se jedná o polysacharidy.

- K aglutinace je pomalá s nízkými titry, má vzhled ve formě tenké blanky

- K antigen se u *E.coli* vyskytuje ve 3 typech:

1. termolabilní – L
2. termostabilní – A
3. antigen B – rozdílné chování vůči teplu

(vyvolání tvorby protilátek = termolabilní, vazba protilátky = termostabilní)

*Antigenní komplex vázaný na bakteriální bičíky:*

H antigen (bičíkový, flagelární) – termolabilní, vázaný na bičíky, proteinové povahy, známo asi 90 typů H antigenů

- H aglutinace pomocí anti H specifické protilátky, má vločkovitý vzhled a je roztřepatelná

Kmeny *E. coli* mohou být rozlišovány mezi sebou sérotypizací na základě těchto antigenních komplexů (Ryšková, 2000).

### **3.2 Patogenita a patogeneze**

Za normálních okolností patří *Escherichia coli* mezi součást běžné mikroflóry člověka. Radíme jí mezi komenzály, částečně saprofyty a také je symbiontem. Produkuje tzv. koliciny, které svým působením znemožňují průnik patogenů do těla a pro některé jiné bakterie mohou být až toxické. Pro organismus je *E. coli* prospěšná a podílí se na tvorbě vitamínu K. Jedná se o podmíněného patogena, může tedy vyvolat onemocnění. Mimo střevo je *E. coli* vždy patogenní a ve střevě jen tehdy, když má kmen ve své genetické výbavě tzv. virulentní faktory (Goering, Hazel, Mark A Zuckerman a Chiodini, Julák 2016).

Tyto patogenní kmeny dělíme do dvou skupin: intestinální (průjmové) a extraintestinální (močové cesty, sepse, infekce ran, hnisavé procesy) (Příloha č. 4).

### 3.2.1 Patogenní kmeny působící ve střevě – **intestinální**

#### 3.2.1.1 Enteropatogenní kmeny *Escherichia coli* (EPEC)

Kmeny EPEC nejčastěji vyvolávají novorozenecké a kojenecké průjmy, při nichž dochází k dehydrataci organismu (Votava a kol., 2003). Přenos fekálně-orální cestou a rezervoárem jsou nemocné děti a dospělí s asymptomatickými příznaky nemoci. Ve vyspělých zemích se vyskytují zřídka, ale stálým problémem jsou v rozvojových zemích z důvodu nedodržování hygieny. Tyto kmeny netvoří enterotoxiny.

Mechanismem tohoto onemocnění je snížená absorpční schopnost střevních epiteliálních buněk, což je dáno těsnou vazbou (adhezí) bakterie k membráně enterocyту a tím dojde k vymizení mikrokřků – tvoří se tzv. „attaching-effacing“ léze (A/E léze) a narušení cytoskeletu střevní sliznice (Jerse, YU, Tall, Kaper 1990).

Tvorba A/E léze:

1 - adherence EPEC k epitelu střeva kódovaná plazmidem EAF (adherentní faktor EPEC) a následná adherence pomocí BFP fimbrie (bundle-forming pilus), tvorba shluků a svazků mezi sebou (Kaper, O'Brien, 1998).

2 – narušení mikrokřků a vylučování faktorů virulence sekrečním systémem III (systém užívaný střevními bakteriemi, zodpovídá za sekreci a translokaci proteinů Esp – EspA, EspB a EspD) a následná translokace Tir receptoru z bakterie do hostitelské buňky, pak dochází k intimní adherenci pomocí proteinu intiminu (váže se na receptor Tir) (Donnenberg, Kaper, Finlay, 1997).

3 – kaskáda signálních transdukci => aktivace proteinkinázy (PKC), zvýšení inozitoltrifosfátu (IP3) a intracelulární hladiny Ca<sup>2+</sup>, tyto transdukce vedou k vylučování chloridů z enterocytů => průjmu (Lukáš, 2003).

Také jsou tyto kmeny nazývány jako EAEC (enteroadherentní *E.coli*) z důvodu adheze ke střevní sliznici. Mezi nejznámější antigeny těchto kmenů patří O55, O111, O126 a O86, přičemž význam mají nejvíce sérotypy O55 a O111. Sérotypizace slouží jako hlavní identifikace těchto kmenů (Příloha č. 5).

### 3.2.1.2 Enterotoxigenní kmeny *Escherichia coli* (ETEC)

Enterotoxigenní kmeny způsobují průjmy u dětí i dospělých většinou bez horeček. Nejvíce se tyto kmeny endemicky vyskytují v rozvojových zemích převážně v teplých až tropických oblastech, do Evropy se dostanou jako tzv. cestovatelské průjmy, kdy se vrací cestovatelé z určitých zemí. Zdroj infekce je kontaminovaná voda a potraviny. ETEC může probíhat i asymptomaticky, kdy hostitel neustále vylučuje tyto bakterie ve stolici bez příznaků nemoci. Pokud ETEC vstoupí do trávicího ústrojí, dochází k osidlování tenkého střeva tímto kmenem pomocí kolonizačních (proteinových) fimbrií, které jsou nezbytné pro adhezi ke střevní stěně a k vylučování enterotoxinů.

Genetická informace pro tvorbu enterotoxinů je vázaná na plazmidech (Bednář, 2009). ETEC produkují tyto dva enterotoxiny:

**1. Teplně labilní toxin (LT)** – termolabilní, imunogenní, vysokomolekulární toxin, který se podobá enterotoxinu způsobujícímu cholera (choleragen). Mechanismus účinku těchto toxinů je překonat slizniční bariéru střeva, toxin napomáhá vyloučení tekutiny, která se podílí na porušení střevní sliznice. Toto narušení střevní sliznice vede k vazbě patogenů k enterocytům. Termolabilní toxiny se skládají z podjednotky A a pěti podjednotek B (Fukuta, Magnani, Twiddy, Holmes, Ginsburg, 1988).

LT-I – oligomerní toxin, který se dělí dále do dvou skupin LTp a LTh

Na membránu enterocytu se naváže LT-I, dojde k pohlcení endocytózou a k translokaci pomocí Golgiho komplexu. Podjednotka A způsobí aktivaci enzymu na epitelových buňkách střeva tzv. adenylát-cyklázy, která zvýší hladinu cyklického AMP (cAMP), zatímco podjednotka B se váže k receptoru GM-1 (glykosfingolipid) (Fukuta, Magnani, Twiddy, Holmes, Ginsburg, 1988). Výsledkem těchto reakcí je vylučování chloridových iontů ze střevních klků a inhibice absorpce chloridu sodného, tyto změny koncentrací iontů vedou k průjmu.

LT-II – enterotoxin s dvěma antigenními variantami LT-IIa a LT-IIb, mechanismus působení se podobá mechanismu LT-I. U lidských kmenů ETEC se LT-II vyskytuje jen zřídka, spíše je typický pro zvířecí ETEC (Fukuta, Magnani, Twiddy, Holmes, Ginsburg, 1988; Mainil, 2013; Qadri, Svennerholm, Faruque, Sack, 2005).

2. Tepelně stabilní toxin (ST) – termostabilní, nízkomolekulární toxin s nízkou imunogeností. Existují dvě třídy termostabilních toxinů:

STa – protein s 18-19 aminokyselinami, který aktivuje enzym guanylát-cyklázu C na epitelových buňkách střevní sliznice, zvyšuje tak hladinu cAMP, stimuluje sekreci chloridových iontů a inhibuje absorpci chloridu sodného, tímto dochází k vylučování tekutin do střeva a následně k průjmu. Jsou známy dvě formy tohoto toxinu – STp a STh vyskytující se u lidských ETEC.

STb – protein tvořený 48 aminokyselinami, který poškozuje klky střeva a dochází až k atrofii, vyvolává sekreci hydrogenuhličitanů ze střeva (Kaper, O'Brien, 1998). Výskyt STb je hlavně u zvířecích ETEC, avšak byly popsány i u lidských ETEC.

**Kolonizační faktory** se vyskytují u většiny kmenů ETEC, patří sem antigeny na povrchu buňky (CS), afimbriální struktury nebo kolonizační antigeny fimbrií (CFA), které jsou základními antigeny pro kolonizaci střev a vyvolující ETEC (Příloha č. 5).

### 3.2.1.3 Enterohemoragické kmeny *Escherichia coli* (EHEC, STEC, VTEC)

Skupiny těchto kmenů mají několik synonymních označení: enterohemoragické = EHEC, **Shigatoxigenní** = STEC, verotoxigenní = VTEC. EHEC jsou vyvolavateli krvavých průjmů většinou v dětském věku a nejen v rozvojových zemích, ale i ve vyspělých zemích. Zdroj nákazy bývá nejčastěji infikované hovězí maso, tepelně málo zpracované (Bednář, 2009). EHEC patří mezi nejzávažnější, stačí minimální infekční dávka k vyvolání onemocnění. Mechanismus působení EHEC kmenů je podobný jako u EPEC, ale k adhezi dochází převážně v tlustém střevě. Produkují toxiny podobný shigela toxinům (shigalike toxin), nazývané taky jako verotoxin, které mají dva antigenní typy avšak se stejným mechanismem toxicity (Mainil, 2013; Tzschoppe, Martin, Beutin, 2012)

- Shigatoxin (Stx) – produkce shigelatoxinu patří mezi hlavní faktor virulence u kmenů EHEC. Jsou známy dva cytotoxiny označované jako Stx1 a Stx2, jejich produkce je vázána na bakteriofága.

Stx1 – toxin obtížně odlišitelný od shigelového toxinu, až 99% shoda v sekvenci aminokyselin. Dvě formy tohoto toxinu – Stx1c a Stx1d vyskytující se u zvířat (jeleni, kozy), u lidí vyvolávají nemoci s asymptomatickým průběhem.

Stx2 – vysoká toxicita než u Stx1, rozdělen do 4 skupin dle sekvencí aminokyselin: Stx 2G1 – Stx 2G4, z toho nejvíce patogenní Stx 2G1, toxin produkovaný nejběžnějším serotypem patřící mezi EHEC - O157:H7

- Enterohemolyzin – tento toxin produkuje většina kmenů a serotypů EHEC (O157, O26, O103), napadá hostitelské buňky a v jejich buněčné stěně tvoří póry, kterými zabíjí hostitelskou buňku. Na plazmidu jsou geny pro enterohemolyzin.

Nejčastěji izolovaným sérotypem je O157:H7, vyskytuje se ve střevním traktu dobytka, ale bylo identifikováno přes 200 kmenů, např. O26:H11, O103:H2, O111:NM a O113:H21 (Tzschoppe, Martin, Beutin, 2012) (Příloha č. 5).

### ***Sérotyp O157:H7***

Infekce tímto sérotypem jsou nejvíce hlášeny v USA, pochází zejména z kontaminovaného hovězího masa, neupravené vody nebo špatně upraveného mléka. *E.coli* O157:H7 kolonizuje u zdravých zvířat rektální sliznici (prasata, ovce), pro něž je nepatogenní. Tento sérotyp způsobuje hemoragické kolitidy (křeče v oblasti břicha, krev v moči), které se mohou vyvinout až v hemolyticko-uremický syndrom (HUS), ten může vést až k ledvinovému selhání a slepotě. Infekce je vysoce nakažlivá a nejvíce ohrožení jsou malé děti a starší lidé, u nich dochází k rozvoji závažných příznaků infekce. V České republice se studium *E. coli* O157:H7 řadí mezi priority bezpečnosti potravin, jsou vytvořena opatření k zamezení přežívání těchto kmenů (pasterizace, ozařování, vakcinace dobytka).

EHEC jsou původcem těchto onemocnění:

Hemoragická kolitida – příznaky nemoci jsou silné bolesti břicha, zvracení, krev ve stolici

Hemolyticko-uremický syndrom (HUS) – projevy onemocnění jsou krvavý průjem, akutní neuropatie, selhání ledvin, trombocytopenie a hemolytická anemie (Kaper, O'Brien, 1998)

Trombotická trombocytopenická purpura – symptomy jako u hemolyticko-uremického syndromu, avšak s horečkou a způsobuje poškození centrální nervové soustavy.

EHEC kmeny se diagnostikují izolací vzorku ze stolice, biochemickou analýzou (neštěpí sorbitol), sérotypizací a genetickou metodou PCR.

#### 3.2.1.4 Enteroinvazivní kmeny *Escherichia coli* (EIEC)

Enteroinvazivní kmeny jsou intracelulárním patogenem, pronikají do buněk a tam se pomnoží. Podobají se mechanismem patogenity shigelám. Jsou původcem bacilární dysentérie, kdy projevem nemoci je horečka, vodnatý průjem s krví, který se těžko odlišuje od průjmu vyvolaným shigelou. Geny pro EIEC jsou uloženy v plazmidu. Zdrojem nákazy bývá většinou kontaminovaná voda a potrava. Sérotyp O124 patří mezi nejběžnější. EIEC produkují cytotoxiny a enterotoxiny (Nataro, Kaper, 1998; Fasano, Kay, Russell, Maneval JR, Levin, 1990).

Diagnostiku EIEC většinou zahrnuje kultivace, sérotypizace, biochemické testy a PCR, možná je také sérologie (Příloha č. 5).

#### 3.2.1.5 Enteroagregativní kmeny *Escherichia coli* (EAEC, EAaggEC)

EAEC jsou původci přetrvávajících mukózních vodnatých průjmů se zvýšenou teplotou u dětí i dospělých především v rozvojových zemích, ale mohou vyvolat i cestovatelské průjmy.



Mechanismus působení spočívá v agregativní adhezenci EAEC k povrchu enterocytů v tlustém i tenkém střevě, to znamená adheze bakterií připomínající skládané cihly na sobě, které tvoří sloupce. Dochází ke zvýšené sekreci sliznice za vzniku biofilmu tvořeného hlenem a bakteriemi, které naruší střevní buňky.

Hlavním faktorem virulence byl objeven gen *aggR*, který reguluje fimbrální biogenezi. Popsány byly i další virulenní faktory mezi které patří fimbrální, afimbrální adheziny, enterotoxin EAST1 a také Shigella enterotoxin 1 (ShET1).

EAST1 – termostabilní enterotoxin tvořený 38 aminokyselinami produkovaný kmeny EAEC, ale také kmeny EPEC, EHEC a ETEC.

Nejvhodnější identifikací kmenů EAEC v současné době se považuje multiplex PCR a také sérotypizace (Příloha č. 5).

#### ***Sérotyp O104:H4***

Vzácný sérotyp, který by měl patřit do EHEC, jelikož produkuje shigatoxin, ale nemá adhezenční faktory intimin a hemolysin. Ovšem tento kmen nese také gen pro agregativní adhezenční fimbrie a měl by tedy patřit do EAEC (EAggEC).

Agregativní adhezenční fimbrie umožňují tomuto sérotypu intenzivní adhezenci na buňky střevní sliznice a posléze průnik shigatoxinu do buňky. Jedná se tedy o kombinaci EHEC a EAggEC kmenů, kdy *E. coli* O104:H4 převzala do svého genomu informaci o produkci Shigatoxinu (Stx2). Tento toxin (Stx2) se nachází na bakteriofágu a je tak snadno přenositelný. Proto kombinace těchto virulentních faktorů má za následek závažný průběh infekce a vysokou infekčnost hlavně u dospělých.

#### **3.2.1.6 Difuzně adherentní kmeny *Escherichia coli* (DAEC)**

DAEC jsou také příčinou dětských průjmů, které bývají vodnaté bez výskytu krve. Na povrchu střeva dochází k difuzní adhezenci kmenů DAEC k enterocytům, které se prodlužují do prstencovitých útvarů obepínající buňku (Kaper, O'Brien, 1998). Obsahují tzv. alfa operony, které kódují adhezenci za pomoci afimbrálních adhezínů. O této skupině kmenů není zjištěno příliš informací.

Další skupiny kmenů druhu *Escherichia coli* se objevují až v posledních letech, například *nekrotoxigenní E. coli (NTEC)*, *hemolytické kmeny E. coli (DHEC)* spojené s průjmy. U zvířat jsou většinou izolovány tzv. *buňky odděluující E. coli (CDEC)* (Levine, 1987).

### 3.2.2 Patogenní kmeny působící mimo střevo - **extraintestinální**

#### 3.2.2.1 Uropatogenní kmeny *Escherichia coli* (UPEC)

Nejčastější původce infekce močového ústrojí. Specifické faktory virulence těchto kmenů jsou adheziny, které se vážou na epitelie močových cest. Pokud jde o infekce ambulantní provozu, tvoří UPEC 80 % izolátů, ale jde-li o nemocniční infekce je záchyt těchto kmenů nižší z důvodu jiných převládajících enterobakterií způsobující nozokomiální infekce (Votava a kol., 2003).

#### 3.2.2.2 Septické kmeny *Escherichia coli* (MENEK,SEPEC)

Tyto kmeny jsou původcem meningitid u novorozenců nebo také sepse. Vyskytují se u lidí i zvířat. Faktory virulence jsou podobné jako u UPEC. Septické kmeny se chrání před imunitním systémem tvorbou kapsule, proto přežívají delší dobu v krevním séru (Kaper, O'Brien, 1998). Pomocí S-fimbriálních adhezínů přilnou k epiteliálním a endoteliálním buňkám a překonají tak tkáňové bariéry.

Ostatní kmeny *Escherichia coli* působící mimo střevo jsou původci infekcí ran, dýchacích infekcí, sepsí a to zejména u hospitalizovaných pacientů se sníženou obranyschopností organismu.

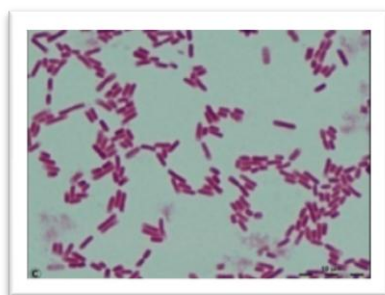
### 3.3 Laboratorní diagnostika

*Escherichia coli* je nejčastěji nalézána enterobakterie v klinickém materiálu. Způsobuje infekce dolních cest dýchacích, infekce ran, infekce močových cest (nejčastější) a u oslabených jedinců může vyvolat i sepsi. Také může být původcem meningitid u novorozenců.

K vyšetření se zasílá moč, stolice, výtěry z hnisavých ran, výtěry z rekta, krev na serologické vyšetření, likvor, punktáty, hemokultury. Laboratorní diagnostika *Escherichia coli* spočívá především v **přímém průkazu** agens.

#### 3.3.1 Barvení a mikroskopie

Pokud vyšetřujeme přítomnost *E. coli* ve stolici tak barvení dle Grama nemá význam, jelikož všechny enterobakterie se v mikroskopu jeví jako silné červené gramnegativní tyčinky. Gramovo barvení *E. coli* má význam při vyšetřování jiného druhu klinického materiálu (moč, likvor), kde se za normálních okolností *E. coli* nevyskytuje.



**Obr. 4:** Ilustrační obrázek Gramovo barvení *E. coli*

#### 3.3.2 Kultivace

Kultivace = pomnožení mikroorganismu v umělém prostředí, které musí splňovat vhodné podmínky pro jejich růst a metabolismus. Cílem kultivace je vypěstování tzv. čisté kultury, což znamená množina bakterií stejného druhu, bez příměsi jiných bakterií. Čistou kulturu používáme pro další diagnostické postupy – mikroskopie, biochemické testy, antigenní testy, ale také ke stanovení citlivosti bakteriálních kmenů na antibiotika.

Doba kultivace je závislá na rychlosti množení dané bakterie, může to být několik hodin, ale také i několik týdnů.

*Escherichia coli* roste při 37°C (teplotní rozmezí 7-46°C) na základních kultivačních půdách (krevní agar) a typicky na půdách s laktózou a p říslušným indikátorem za tvorby kyseliny (selektivnědiagnostické půdy). Patří sem zejména Endovo půda a MacConkeyho půda s 1 % sorbitolu (zkvašuje laktózu, roste v červených koloniích, ostatní jsou bezbarvé), ale i další půdy jako jsou MAL a XLD agar (Votava a kol., 2000).

Používá se i selektivní pomnožovací půda (selenitová tekutá půda), z které se následující den provádí vyočkování opět na selektivnědiagnostické pevné půdy (Bednář, 2009). Inkubační doba růstu na krevním agaru je v rozmezí 18-24 hodin. Kolonie jsou lehce vypouklé, hladké, lesklé a šedavě zbarvené. Některé kmeny mohou vykazovat hemolýzu.



**Obr. 5:** *E. coli* na krevním agaru  
(Ústav mikrobiologie FN Plzeň)



**Obr. 6:** *E. coli* na Endově agaru  
(Ústav mikrobiologie FN Plzeň)

### 3.3.3 Biochemické testy

Biochemická diferenciací slouží k identifikaci fenotypových vlastností zachyceného kmene. Biochemické charakteristiky jsou fermentace sacharidů (glukózy), redukce nitrátů na nitrity a negativní oxidázová a většinou pozitivní katalázová reakce (Melter a spol, 2014; Votava, 2010).

### Nejužívanější biochemické testy

- Tvorba sirovodíku – na Hajnyho půdě s železnatou solí. Půda se naočkuje vpichem, pokud bakterie tvoří sirovodík, vznikne černé zbarvení a to reakcí s trojmocným železem (Votava a kol., 2003).
- Fermentace sacharidů (viz Příloha č.2) – glukózy (GLU), laktózy (KAC), sacharózy (SUC), trehalózy (TRE), mannitolu (MAN), inositolu (INO) a dalších cukrů a alkoholu (Votava a kol., 2000).
  - zkvašením glukózy vznikne kyselý produkt a dojde tak ke změně barvy indikátoru pH v půdě => žluté zbarvení (Votava a kol., 2000).
- Dekarboxylace aminokyselin – ornitinu (ORN), lysinu (LYS), argininu (ARG)
  - odštěpením oxidu uhličitého z aminokyseliny vzniká amin, výsledné zbarvení fialové nebo tmavě modré (Salmonely) často se užívají při diagnostice enterobakterií (Votava a kol., 2000).
- Štěpení urey (URE) – u bakterií produkující ureázu, která štěpí močovinu, obvykle červené zbarvení (Proteus)
- Tvorba indolu (IND) - průkaz v číré tekuté půdě (Hottigerův bujón), detekce pomocí Kovácsova činidla, tryptofan se štěpí na indol, vznik červeného zbarvení (viz Příloha č. 3) (Votava a kol., 2000).
  - typická pozitivní reakce pro *Escherichia coli*
- Simmonsův citrát (SCI) – určitý druh bakterií je schopen místo cukru využívat citrát, šikmý agar zelené barvy v případě positivity zmodrá (*Citrobacter*)
- Cytochromoxidázový test (OXI) – průkaz oxidázové aktivity, papírový proužek napuštěný vhodným reagens, který se přiloží přímo na kolonii, do 2 minut se vyhodnotí zbarvení proužku, pozitivita znamená modré zbarvení (*Neisseria*) (Votava a kol., 2000).
- Redukce dusičnanů (NIT) – žlutá tekutá půda, při pozitivitě zčervená (*Stafylokoky*)

### 3.3.3.1 Krátká řada cukrů

Pestrá řada zkumavek s jednotlivými půdami, které se barevně odlišují. Dnes je tato metoda zastaralá, nahrazena komerčními soupravami různých firem.

### 3.3.3.2 Enterotest

Tyto testy slouží k bližší identifikaci významných *enterobakterií*. V podstatě se jedná o mikrotitrační destičku s 8 řadami po 12 jamkách, každá z jamek obsahuje jinou půdu v suchém stavu (Votava a kol., 2000). Pomocí mikrotitrační destičky lze testovat 8 kmenů. K tomuto stanovení je zapotřebí čistá kultura testovaného agens, ze které se připraví suspenze o určité hustotě a rozkape do jamek. Do některých jamek je nutné přidat parafinový olej kvůli anaerobnímu prostředí, které některé testy vyžadují.

Destička se vloží do sáčku, aby se zabránilo jejímu vyschnutí, a dáme ji inkubovat při 37°C na 18-24 hodin (Votava a kol., 2000).

Po inkubaci se přidá do některých jamek výrobcem předepsané činidlo a odečte se vzniklé zbarvení reakce. Výsledné zbarvení hodnotíme dle přiložené tabulky nebo na počítači.

Komerčně vyráběné sety jsou ENTEROtest I, pro podrobnější identifikaci se využívá ENTEROtest II. Dále pak pro dokonalejší určení slouží ENTEROtest 16, ENTEROtest 21, tyto testy mají větší počet testů. Pro potravináře slouží ENTEROtest Rapid, doba inkubace tohoto testu činí pouze 4 hodiny, ale zase je méně přesný.

Existuje další řada různých testů, které se v praxi využívají, podle toho, který druh bakterie identifikujeme.

### 3.3.4 Antigenní analýza

Abychom mohli prokázat přítomnost antigenu, musíme mít k dispozici známou protilátku, kterou získáme imunizací zvířete (polyklonální protilátky) nebo technologií buněčných hybridomů (monoklonální protilátky) (Votava a kol., 2000).

- Aglutinace na nosičích (latexová aglutinace) - reakce korpuskulárního antigenu s protilátkou za vzniku komplexu antigen-protilátka => aglutinace (shlukování). Sérotypizace se provádí za pomoci komerčně vyráběných sér.
  - latexová částice slouží jako nosič protilátky k důkazu antigenu
  - latexová suspenze se promíchá s kapkou vyšetřovaného vzorku na skle nebo na speciální papírové kartičce. Směs se kývavým pohybem (kolébání) promíchá několik minut a pouhým okem se sleduje vytvoření aglutinace, která se projeví tvorbou viditelných shluků (aglutinátů). K reakci je nutné provést negativní, pozitivní kontrolu a kontrolu nespecifické aglutinace.
  
- ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) - enzymová imunoanalýza, kde složka (Ag, Ab) dané reakce je značená enzymem, aby reakce byla dobře viditelná, přidá se vhodný substrát, který se rozloží účinkem enzymu na barevný produkt.
- Imunofluorescence (IMF) – universální pro průkaz protilátek proti všem agens je *nepřímá IMF*. Principem této sérologické reakce je označení jedné složky reakce fluorescenčním barvivem, výsledek reakce se vyhodnotí ve fluorescenčním mikroskopu (Votava a kol., 2000). Metoda se nedá automatizovat.
- DNA sonda, PCR (polymerázová řetězová reakce) – tyto testy slouží k podrobnějšímu studiu kmenů některých bakterií. Principem analýzy je zmnožení hledané DNA a opakování těchto cyklů → zahřátí DNA a rozložení na jednotlivá izolovaná vlákna → ochlazení + primery → Taq polymeráza + prodloužení řetězce a tvorba kopie DNA. Termocykler tyto cykly opakuje a zmnoženou (amplifikovanou) DNA lze prokázat elektroforézou s následným obarvením ethidiumbromidem nebo pomocí DNA sondy (Votava a kol., 2000).

### 3.3.5 MALDI TOF hmotnostní spektrofotometrie

Jednoduchá, rychlá a přesná metoda pracující na principu tzv. měkké ionizace. MALDI TOF hmotnostní spektrofotometrií identifikujeme aerobní, anaerobní bakterie, kvasinky, mykobakterie, ale také nám umožňuje detekovat mechanismy antibiotické rezistence bakterií.

Analyzují se hmotnostní spektra proteinů (bakterie) a glykoproteinů (houby) specifické pro určitý kmen poté se pak získané hmotnostní spektrum vyhodnotí (srovná) s referenční databází spekter (Hrabák, Chudáčková, Walková, 2013).

### 3.3.6 Stanovení citlivosti na antibiotika

#### 3.3.6.1 Diskový difúzní test

Nejužívanější metoda kvalitativního stanovení citlivosti bakterií, pomocí níž zjistíme citlivost kmene ke konkrétnímu antibiotiku.

Připraví se inokulum testovacího kmene bakterie o správné hustotě. Pro rychle rostoucí bakterie se užívá Mueller-Hintonův agar (*enterobakterie*) a pro některé náročnější bakterie je nutné přidat k Mueller-Hintonova agaru 5% beraní erythrocyty.

Na agar se nalije inokulum vyšetřovaného kmene, zbytek se odsaje a naočkované plotny se nechají zaschnout. Poté se kladou antibiotické disky na plotnu a to pomocí sterilní jehly nebo dispensorem s předem daným rozstupem disků. Plotny se umístí do termostatu (35-37°C) dnem vzhůru na 24 hodin. Druhý den se může odečítat velikost inhibičních zón pomocí posuvného měřítka. Každé antibiotikum má stanovenou minimální velikost inhibiční zóny, podle které je mikroorganismus ohodnocen jako citlivý pro testované antibiotikum.





**Obr. 7:** Diskový difuzní test  
(Ústav mikrobiologie FN Plzeň)

### 3.3.6.2 Diluční mikrometoda

Tato metoda patří mezi kvantitativní testy stanovení citlivosti na antibiotika. Jedná se o test v jamkách mikrotitračních destiček, které obsahují antibiotikum o určité koncentraci rozpuštěné v bujONU. Přidá se standardní inokulum vyšetřovaného kmene (jeden kmen na jednu destičku) a destička se vloží inkubovat při 37°C do termostatu.

Po 16-72 hodinách inkubace (dle druhu mikroba) se hodnotí zákal v jamce nebo sediment na dně jamky. První jamka bez zákalu či sedimentu znamená, že mikrob neroste.

Určí se *minimální inhibiční koncentrace* (MIC) v mg/l daného antibiotika pro vyšetřovaný kmen, což je taková nejnižší koncentrace daného antibiotika, která je schopna vyšetřovaný kmen bakterie zastavit v růstu.

V současnosti představuje tato metoda nejpřesnější, nejdostupnější a nejlevnější postup, který se v laboratořích využívá pro stanovení citlivosti.

### 3.3.6.3 Etest

Tato metoda kombinuje principy diskového difúzního testu a dilučních metod, jedná se o plastikovaný kalibrovaný proužek napuštěný různou koncentrací antibiotik a se stupnicí ředění geometrickou řadou. Test se provádí na agaru se suspenzí vyšetřovaného kmene. Přiloží se proužek a vloží se inkubovat do termostatu.

Po inkubaci se hodnotí inhibiční zóna růstu kolem proužku. MIC se odečítá v místě, kde elipsa inhibice protíná okraj proužku pomocí stupnice ředění antibiotika.

### 3.4 Klinický obraz onemocnění a terapie

Patogenní *Escherichia coli* vyvolává dva druhy onemocnění. *Extraintestinální* onemocnění způsobuje infekce mimo intestinální trakt, jsou to například záněty močových cest, hnisavé procesy, infekce ran a sepse.

*Intestinální* onemocnění se týká hlavně infekcí intestinálního traktu provázené průjmy, na kterých se podílí patogenní kmeny *E. coli*.

*Klinické projevy* onemocnění jsou ve většině případů vodnaté průjmy, zvracení, horečka, rychlý úbytek na váze a následná dehydratace. Je to nakažlivé onemocnění, které se šíří v kolektivu malých dětí (i kojenců), oslabených jedinců a u starých lidí.

*Terapie* u extraintestinálních infekcí spočívá hlavně v antibiotické léčbě, u intestinálních onemocnění se klade důraz i na dehydrataci (Bednář, 2009). Citlivost *E. coli* na antibiotika je dobrá kromě benzylpenicilinu, avšak počet rezistentních kmenů stoupá.

### 3.5 Využití *Escherichia coli*

*E. coli* jako součást přirozené mikroflóry u člověka i u zvířat se stala nejprobádanější bakterií, která má využití v různých oborech jako jsou biotechnologie, molekulární biologie, imunologie. Pomocí geneticky modifikované *E. coli* získané rekombinantní metodou se vyrábí insulin. Rekombinantní *E. coli* má také schopnost syntetizovat textilní barvivo indigo, dále pak slouží k přípravě lidských hormonů (růstový hormon). ***E. coli* je hlavním signálem fekálního znečištění vody!!!**

#### 3.5.1 *Escherichia coli* Nissle 1917

Nepatogenní kmen *Escherichia coli* Nissle 1917 objeven roku 1917 Alfredem Nisslem, který má probiotické účinky. Nemá žádné virulenční faktory a neprodukuje žádné enterotoxiny nebo cytotoxiny. Tento kmen je nejlépe popsán z probiotických bakterií a podrobil se několika testům. Citlivost vykazuje ke všem antibiotikům využívaných proti gramnegativním bakteriím (*enterobakteriím*).

Provedena byla molekulárně genetická typizace DNA, PCR analýza plazmidů a serotypizace. Serotyp O6:K5:H1.

Dále proběhla biochemická typizace membránových lipidů a lipopolysacharidů. Z prověřených testů nakonec splňuje všechny požadavky na bezpečnost, podávat se může i ve vysokých dávkách, jelikož nebyly zjištěny žádné patogenní vlastnosti vůči hostiteli. V klinické praxi se používá lyofilizovaná forma (Lukáš, 2003).

Chromozomy *Nissle 1917* nesou geny pro produkci mikrocinů, které potlačují růst dalších enterobakterií, což je základní předpoklad probiotik.

Kmeny *E. coli Nissle 1917* se využívají k léčbě zánětlivých střevních onemocnění, trávicích potíží, dále se pak podílejí na léčbě ulcerózní kolitidy a Crohnovy nemoci.

U novorozenců zabraňuje osidlování střev patogenními kmeny a napomáhá tak k rozvoji střevního imunitního systému (SZÚ, Praha 2008).

Velmi vzácně se mohou objevit vedlejší nežádoucí účinky těchto probiotických kmenů (nadměrné nadýmání), které jsou vyvolány vysokou dávkou probatika, po snížení dávky tyto příznaky vymizí.

## **4. EPIDEMIOLOGIE *ESCHERICHIA COLI***

Onemocnění *Escherichia coli* má většinou sporadický výskyt, ale za určitých okolností může vypuknout až v epidemii. Epidemický výskyt se týká zejména enterohemoragických kmenů *E. coli* (EHEC). Původcem zdroje nákazy může být člověk i zvíře.

### **4.1 Rezervoáry**

Hlavním rezervoárem *Escherichia coli* je střevní trakt zvířat, mezi asymptomatické nositele patří zejména skot dále pak ovce, kozy. Sporadický výskyt bakterie nacházíme u hospodářských zvířat a divoké zvěře (koně, jeleni, kachny, králíci). *E. coli* je poměrně odolná, přežívá v půdě několik měsíců, ve vodě týdny a to i při nižších teplotách.

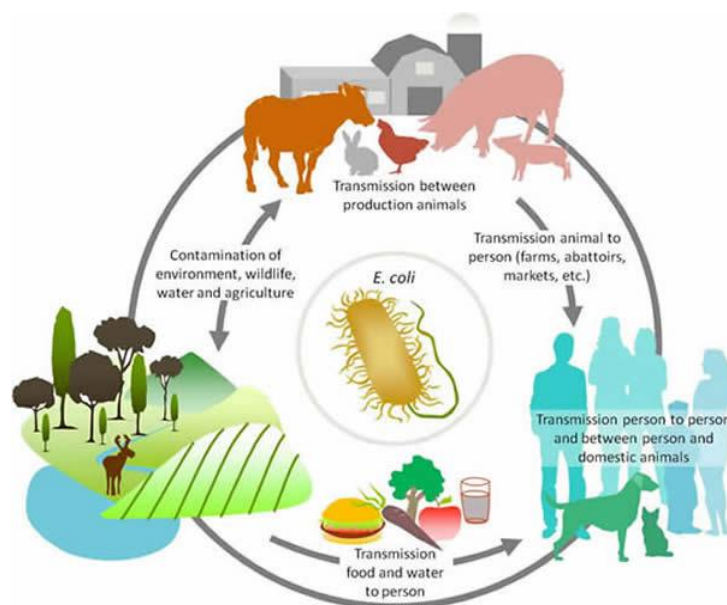
#### 4.2 Způsoby přenosu a cesta šíření infekce

Člověk se infikuje buď přímým, nebo mnohem častěji nepřímým kontaktem. Způsob přenosu *E. coli* je fekálně orální cestou, z čehož vyplývá, že mikroorganismus se vylučuje stolicí a do hostitele vstupuje nejčastěji zažívacím ústrojím. Šíření nemoci je důsledkem špatných hygienických podmínek.

Příčina nákazy u člověka je kontaminace potravin (maso, mléko) při porážce nebo dojení zvířete. Kontaminace zeleniny a ovoce v důsledku hnojení zvířecími výkaly. Znečištění pitných zdrojů vodou spláchnou z polí hnojených kravskou mrvou při silných deštích, čímž *E. coli* slouží jako indikátor znečištění vody fekáliemi (Gopfertová, Pazdiora, Dáňová, 2013).

Dalším důsledkem je nedostatečně tepelně zpracované potraviny, maso a mléčné výrobky. Nejde o typickou zoonózu, přenos infekce z člověka na člověka bývá většinou u přenašečů s asymptomatickými příznaky nebo v rodinách se sníženými hygienickými návyky, ale také u nemocničního personálu. Infekce se šíří i mezi domácími zvířaty na farmách (Zahradnický, 1987).

Cesty přenosu *E. coli* jsou velice rozmanité, neznají žádné geografické hranice, což má za následek zavlečení infekce kamkoliv a kdykoliv. Riziko infekčnosti je vysoké.



Obr. 8: Cesty vstupu *E. coli* do organismu převzato z <http://www.ecl.lab.com/en/ecoli/index.asp>

### **4.3 Nejznámější kauzy**

#### *Spojené státy americké 1993*

Leden 1993 ve Spojených státech onemocnělo hemoragickou kolitidou nad 500 lidí. Epidemie byla vyvolána enterohemoragickým kmenem *E. coli*, sérotyp O157:H7. Střevní infekce byla způsobena požitím nedostatečně tepelně upravených hamburgerů z hovězího masa kontaminovaných *E. coli* O157:H7. Epidemie si vyžádala čtyři dětské životy.

#### *Japonsko 1996*

Japonsko zažilo taktéž v červenci roku 1996 obrovskou epidemii vyvolanou sérotypem O157:H7. Zdrojem nákazy byly ředkvičky, které byly ve velkém počtu pěstovány pro školní jídelny. Infikováno bylo více než 9000 lidí a z toho 12 lidí zemřelo.

#### *Spojené státy americké 2002*

Srpnová epidemie roku 2002 v USA, kdy došlo k nákaze návštěvníků dobytčí farmy opět kmenem EHEC, sérotypem O157:H7. Většina návštěvníků se nakazilo přímým stykem s infikovanými telaty na farmě. Některé však „zachránilo“ mytí rukou, což nevýznamně snížilo riziko přenosu.

#### *Severní Amerika 2006*

V roce 2006 v Americe vypukla epidemie vyvolaná enterohemoragickým kmenem *E. coli*, sérotyp O157:H6 izolovaného ze špenátu. Výskyt byl v 26 amerických státech, 199 lidí infikováno, tři lidé na infekci zemřeli a 31 obyvatel utrpělo selhání ledvin nazývané HUS (hemolyticko-uremický syndrom) (Gordis, 2009, Pennington, 2014).

Z počátku se spekulovalo, že kmen pocházel ze závlahové vody kontaminované výkaly dobytka a konečný verdikt byl, že zdrojem nákazy byl špenát z ranče Augus. Ranč pronajala pozemky pěstiteli špenátu.

Kontaminace špenátu byla zřejmě ze zavlažovací studny, která byla poblíž povrchových vodních cest, pak také přítomnost divokých prasat.

Tyto dvě formy kontaminace nebyly definitivní, spíše šlo o potenciálně rizikové faktory prostředí. Nevylučovalo se také šíření infekce v důsledku špatné dopravy a špatného zpracování špenátu (omytí).

### Německo 2011

V květnu 2011 v Severním Německu vypukla epidemie, která postihovala nemoci trávicích cest. Jednalo se zejména o hemoragickou kolitidu a hemolyticko-uremický syndrom (HUS) vyvolaný shigatoxigenními kmeny *Escherichia coli* (STEC, EHEC), sérotyp O104:H4. Později však bylo zjištěno, že tento virulentní kmen je kombinací enteroagregativních kmenů EAaggEC a enterohemoragických kmenů *E. coli* (EHEC). Kombinace vlastností tohoto kmene O104:H4 spočívala ve virulentních faktorech, což znamená, že EHEC mívá hemolysin a intim, ale tento kmen vlastnil jiné faktory.

Epidemie měla i další zvláštnosti týkající se hemolyticko-uremického syndromu, který většinou postihuje malé děti nebo starší obyvatele se sníženou imunitou tentokrát, ale onemocněli spíše lidé středního věku a zejména ženy (Frank, Werber, Cramer a kol, 2011).

A jaký byl zdroj nákazy?! Spekulovalo se o španělských okurkách, které pak byly nakonec vyloučeny, ale největší podezření padlo na naklíčené fazole z jedné farmy. Ovšem nález *E. coli* ve fazolích byl negativní, což se očekávalo s ohledem na opožděné vyšetření. K závěru nakonec dospěl Evropský úřad pro bezpečnost potravin, který dále pátral po zdroji a usnesl se, že příčinou epidemie byla pravděpodobně potravina z Egypta, u nás známá jako pískavice (semeno rostliny *Trigonella foenum-graecum*), která zřejmě kontaminovala fazole (Frank, Werber, Cramer a kol, 2011).

Zaznamenáno bylo 4055 postižených, z toho 885 s těžkým průběhem nemoci (HUS) a 50 případů úmrtí.

#### 4.4 Česká Republika

V České Republice nepropukla žádná epidemie vyvolaná patogenními kmeny *E. coli*. Dle publikací Státního zdravotnického ústavu v Praze byl zaznamenán jeden importovaný případ *E. coli* O104:H4 v souvislosti s velkou německou epidemií 2011.

Jednalo se o americkou turistku, která se vrátila ze severního Německa a v Praze jí hospitalizovali s příznaky průjmu s příměsí krve, dehydratovanou a celkově vyčerpanou (hemoragická kolitida). Pacientce na infekčním oddělení prokázali ve stolici epidemický kmen *E. coli* O104:H4, zdrojem infekce byly saláty z čerstvé zeleniny, které turistka opakovaně konzumovala (SZÚ, Praha 2011).

V srpnu 2007 v České Republice byly evidovány dva případy HUS, jednalo se o dívku (3 roky) s 21 denní anurií, kde byla zapotřebí i dialyzační terapie, původcem infekce byla *E. coli* O157:H7. Druhý případ hospitalizace na infekční klinice byl 8 měsíční chlapec se 7 denní anurií a následnou dialyzační terapií, ovšem zde se jednalo o jiný sérotyp *E. coli* a to O111:NM (EHEC) (SZÚ, Praha 2008).

Další z těžkých případů HUS, kde byla původcem *E. coli* O26:H11, která se prokázala ve stolici teprve 2 leté dívky, která po týdenní intenzivní péči lékařů podlehlá infekci (SZÚ, Praha 2009).

## **5. CÍLE BAKALÁŘSKÉ PRÁCE**

Cílem bakalářské práce je charakterizovat přítomnost a působení *E. coli* ve střevní mikroflóře člověka, ale i mimo ní. Seznámit se s patogenními kmeny působícími ve střevě i mimo střevo se zaměřením na jejich vlastnosti a virulenci.

Na mikrobiologickém pracovišti laboratorně vyšetřit stolice od dětí ve věku 0-3 let s průjmovým onemocněním za účelem určit nejčastěji vyšetřovaný sérotyp a kmen *E. coli* u těchto nemocných.

Vlastní výsledky zkompletovat z laboratorního systému pracoviště za celý rok 2015.



## 6. METODIKA

Vyšetření stolice je nedílnou součástí diagnostiky u onemocnění gastrointestinálního traktu, jedná se o metodu první volby hlavně u průjemových onemocnění.

### 6.1 Odběr, transport a uchování vzorku

Vzorky stolice na bakteriologické kultivační vyšetření odebíráme sterilním tamponem na tyčince z umělé hmoty. Tampon zavedeme do konečníku 2-3 cm hluboko a rotačním pohybem odebereme vzorek tak, aby na výtěrce byla patrná stolice. Poté tampon zasuneme do transportní půdy s aktivním uhlím dle Amiese (černé barvy), aby vzorek nevyschnul.

Vzorek neprodleně transportujeme do laboratoře. Vzorek lze zpracovat do 24 hodin po odběru. Transport a uchování vzorku probíhá při pokojové teplotě (max. 20 °C), popř. v chladničkové (4 °C).

### 6.2 Kultivace stolice

#### 6.2.1 Kultivační media pro diagnostiku *E. coli*

Krevní agar - nejpoužívanější pevná půda s beranými erytrocyty, slouží pro zachycení grampozitivních i gramnegativních bakterií. Některé bakterie mohou tvořit hemolýzu.

Endova půda - pevná půda, na které rostou všechny gramnegativní tyčinky. Obsahuje laktózu a červené barvivo fuchsin, má růžovou barvu.

XLD půda – selektivní diagnostická pevná půda pro záchyt hlavních střevních patogenů (salmonel), obsahuje xylózu, laktózu, lyzin a desoxycholát, má červenou barvu.

Campylobacterová půda - pevná půda, která slouží k zachycení campylobactera při průjemových onemocnění. Obsahuje antibiotika inhibující růst ostatních bakterií.

Selenitová půda - tekutá pomnožovací půda růžovo-oranžové barvy, slouží k pomnožení patogenních gramnegativních tyčinek.

### 6.2.1.1 Pracovní postup a hodnocení

**1. den:** Výtěr z rekta naočkujeme tzv. křížovým roztěrem na předem popsanou a označenou Petriho misku s krevním agarem, Endovu půdu, XLD agarem a na kampylobakterovou půdu. Krevní agar, Endovu a XLD půdu vložíme do termostatu na 18 – 24 hodin při 37°C. Půdu na průkaz *Campylobacter* dáme do termostatu na 48 hod při 42°C, inkubace probíhá v mikroaerofilním prostředí. Tyto pevné živné půdy vkládáme do termostatu dnem nahoru, aby nedocházelo během inkubace ke kondenzaci vody na spodní straně víček Petriho misky (Votava a kol., 2000). Na závěr ponoříme výtěrovku do tekuté pomnožovací selenitové půdy a vložíme do termostatu na 18 - 24 hodin při 37°C.

**2. den:** Po 24 hodinové inkubaci prohlížíme a odečítáme primokultivaci na krevním agaru, Endově agaru a na půdě XLD. Také vyočkujeme ze selenitového bujonu pomnožené bakterie na pevné půdy – Endův agar a XLD agar, které necháme inkubovat v termostatu při 37°C po dobu 24 hodin.

**3. den:** Po 48 hodinách prohlížíme a odečítáme pomnožení na Endově půdě, XLD agaru a kampylobakterové půdě.

Celkové hodnocení kultivace se provádí po 48 hodinách. *E. coli* na krevním agaru roste v šedavě zbarvených lehce vypouklých koloniích, u některých patogenních kmenů může vykazovat úplnou hemolýzu. *E. coli* štěpí laktózu a proto na Endově půdě roste v tmavočervených (purpurových) kovově lesklých koloniích, pokud není ve vzorku přítomna, kolonie zůstanou světlé. Na červené XLD půdě tvoří *E. coli* žluté kolonie.

### 6.3 Biochemické určení *E. coli*

Abychom získali bližší určení bakterie, musíme připravit tzv. čistou kulturu bakterií, pomocí níž přesně zařadíme mikroba do rodu a druhu popřípadě určíme jeho sérotyp. Čistá kultura je homogenní populace bakterií jednoho rodu a druhu získaná primokultivací (Votava a kol., 2000).

Z primokultivace odebereme bakteriologickou kličkou konkrétní kmen, který chceme stanovit a naočkujeme ho na dané kultivační médium, necháme inkubovat v termostatu 24 hodin při 37°C.

K vzájemnému rozlišení střevních bakterií (v rámci čeledi *Enterobacteriaceae*) slouží biochemické testy, které blíže určí daného mikroba. V praxi se využívá 8 – 24 testů.

### 6.3.1 ENTEROtest 24

Diagnostická komerčně vyráběná souprava určena pro definitivní identifikaci střevních bakterií. Obsahuje 24 biochemických testů dělených v mikrotitrační destičce, kde jsou výrobcem připraveny různé půdy v suchém stavu.

#### 6.3.1.1 Pracovní postup a hodnocení

Ve zkumavce s 3 ml fyziologického roztoku si připravíme suspenzi z čisté 24 hodinové kultury testovaného kmene. Důkladně homogenizujeme a vzniklý zákal srovnáme s McFarlandovo zákalovou stupnicí, aby odpovídal 1. stupni. Mikrotitrační destičku vyjmeme z obalu a dle počtu testovaných kmenů odejmeme příslušný počet řad destiček – 1 kmen = 3 řady => trojstrip. Uvolníme ochranou hliníkovou fólií a do všech jamek inokulujeme 100 µl připravené bakteriální suspenze. Do jamek H, G, F, E, D, C (testy IND, H<sub>2</sub>S, LYS, ORN, URE, ARG) prvního řádku stripu přikápneme 2 kapky sterilního parafínového oleje. Trojstrip překryjeme hliníkovou fólií a víčkem a inkubujeme v termostatu 24 hodin při 37°C.

Po 24 hodinové inkubace vyjmeme destičku a přidáme činidla:

řada 1, jamka H (test indol) – 2 kapky činidla IND

řada 3, jamka H (test acetoin) – 1 kapka činidla VPT I a VPT II

Destičku necháme inkubovat 30 minut při teplotě 37°C. Po 30 minutách inkubace ještě zakapeme činidlem PHE jamku H v 2. řadě (test fenylalanin), kde ihned odečteme výsledek testu, protože pozitivní reakce do 2 minut po přikápnutí činidla mizí.

Dle barevné srovnávací stupnice ENTEROtest 24 odečteme pozitivní a negativní reakce ostatních testů. Poté výsledky zaznamenáme do programu do počítače a pomocí Diagnostického seznamu v počítači určíme testovaného mikroba (viz. Příloha č. 3).

Tab. 1: Biochemické reakce Enterotestu 24

Řádek								
1	IND	H <sub>2</sub> S	LYS	ORN	URE	ARG	SCI	MAL
	Indol (1)	sirovodík (1)	Lysin (1)	Ornithin (1)	Ureaza (1)	Arginin (1)	Simmonsův citrát (1)	Malonát (1)
	+	-	+	+	-	-	-	-
2	PHE	ONP	INO	ADO	CEL	SUC	TRE	MAN
	fenylalanin (2)	β-Galaktosidaza (2)	Inositol (2)	Adonitol (2)	Cellobiosa (2)	Sacharóza (2)	Trehalóza (2)	Mannitol (2)
		+	-	-	-	+	+	+
3	VPT	ESL	SOR	RHA	MLB	RAF	DUL	GLU
	Acetoin (4)	Esculin (4)	Sorbitol (4)	Rhamnoza (4)	Melibioza (4)	Raffinóza (4)	Dulcitol (4)	Glukóza (4)
	-	-	+	+	+	+	-	+

### 6.3.2 Pestrá (krátká) řada cukrů

Na základě biochemických vlastností jednotlivých rodů střevních bakterií používáme k jejich identifikaci metodu krátké řady cukrů. Biochemické reakce probíhají v řadě zkumavek, ve kterých jsou jednotlivé kultivační půdy.

#### 6.3.2.1 Pracovní postup a hodnocení

Připravíme si zkumavky s těmito kultivačními půdami:

- roztok glukózy s bromthymolovou modří – principem reakce je změna pH při zkvašování cukrů
  - pozitivní výsledek – žluté zbarvení
  - negativní výsledek – zelenomodré zbarvení
- Hajnyho půda (indikátor citrát železitanoamonný) – červený šikmý agar, detekuje tvorbu sirovodíku
  - pozitivní výsledek – černé zbarvení
  - negativní výsledek – červené zbarvení

3. půda s močovinou – tvorba ureázy, u bakterií produkujících ureázu, která rozkládá močovinu v půdě
  - pozitivní výsledek – modré zbarvení
  - negativní výsledek – zelené, žluté zbarvení
4. Hottingerův bujón (obsahuje tryptofan) a Kovácsovo činidlo – štěpením tryptofanu vzniká indol, přidáme Kovácsovo činidlo a vznikne při pozitivitě červené zbarvení, typická reakce pro *E. coli* (Votava a kol., 2000)
  - pozitivní výsledek – červené zbarvení (prsteneček)
  - negativní výsledek – žlutý zbarvení
5. Simmonsův citrát (půda s citrátem sodným a bromthylovou modří) – šikmý agar zelené barvy, dochází zde k uvolnění amoniaku a to vede k alkalizaci prostředí a změně zbarvení půdy
  - pozitivní výsledek – modré zbarvení
  - negativní výsledek – zelené, žluté zbarvení

Do všech těchto kultivačních půd naočkujeme testovanou čistou bakteriální kulturu a necháme inkubovat v termostatu 24 hodin při 37°C. Druhý den odečítáme barevné změny ve zkumavkách a určujeme název bakterie.

*E. coli* byla pozitivní v těchto reakcích – zkvašování glukózy(1), tvorba indolu(4).

#### **6.4 Antigenní analýza kmene = sérotypizace *E. coli***

Vykultivované podezřelé kolonie *E. coli* mohou obsahovat antigen, který reaguje se specifickou protilátkou. Určíme tak antigenní strukturu izolovaného bakteriálního kmene za pomoci komerčně vyráběných specifických antisér.

##### *Princip testu*

Pokud kmen *E. coli* obsahuje antigen zahrnutý v testovacím séru, dojde k navázání antigenu se specifickou protilátkou za vzniku komplexu antigen x protilátka. Výsledkem reakce je jasně viditelná aglutinace vyšetřovaného kmene.

#### 6.4.1 Pracovní postup a hodnocení

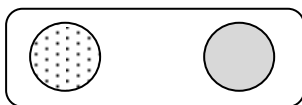
Jedná se o metodu prováděnou na sklíčku (sklíčková aglutinace). Připravíme si bakteriologickou kličku, podložní sklo, fyziologický roztok a známá komerčně vyráběná antiséra:

- trivalentní polysérum – zahrnuje sérotypy O114, O124, O14
- nonavalentní polysérum – zahrnuje sérotypy O111, O55, O26, O86, O119, O127, O125, O 126, O128
- monovalentní séra - O114, O124, O142, O111, O55, O26, O86, O119, O127, O125, O 126, O128

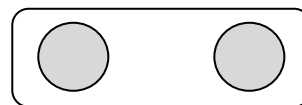
Na dvě podložní sklíčka dáme kapku fyziologického roztoku, do kterého přemístíme bakteriologickou kličkou malé množství vyšetřované čisté bakteriální kultury z Petriho misky. Suspenzi promícháme, přidáme kapku trivalentního antiséra a na druhé sklíčko kapku nonavalentního séra a mírným naklápěním vše promícháme. Aglutinace je viditelná a odečítá se pouhým okem. V případě positivity jednoho z polyvalentních sér pracujeme s jednotlivými séry zahrnutými v daném pozitivním polyvalentním séru. Pracovní postup je stejný jako v předchozích větách. Pozitivní reakce (aglutinace) s jednotlivými antiséry vypovídá o konkrétním sérotypu *E. coli* ve vzorku.

Hodnocení sklíčkové aglutinace:

*pozitivní výsledek*



*negativní výsledek*



## 7. VÝSLEDKY

Za rok 2015 (období leden až prosinec) bylo na bakteriologickém oddělení FN Plzeň celkem vyšetřeno 1518 stolic od dětí ve věku 0-3 roky s diagnózou průjmového onemocnění. Klinický materiál byl zaslán z různých oddělení - praktický dětský lékař, Infekční klinika, Dětská klinika (kojenci) a neonatologie (neonatologická jednotka intenzivní péče, oddělení novorozenců a neonatologická poradna). Stolice zaslání z neonatologie nebyly vyšetřeny pouze s diagnózou průjem, ale u těchto předčasně narozených dětí nebo dětí bezprostředně po porodu je sledováno střevní osídlení. Jedná se o rizikovou skupinu dětí (zvýšená náchylnost k infekcím, snížená obranyschopnost organismu), kdy známé osídlení střevní sliznice umožní včas zareagovat, děje-li se něco s novorozencem. V případě positivity patogenních *E. coli* jsou ihned provedena epidemiologická opatření.

Oddělení jsem si rozdělila do dvou skupin:

**skupina 1** (Praktický dětský lékař, Infekční klinika, Dětská klinika)

**skupina 2** (Neonatologie)

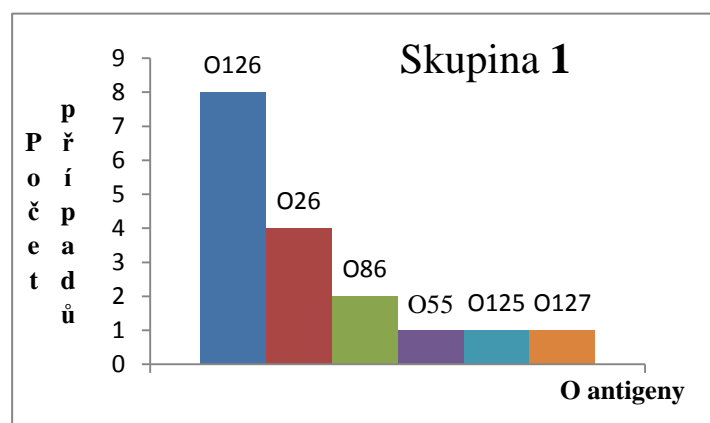
Skupina 1 – celkem vyšetřeno 710 stolic od dětských pacientů, jak chlapců, tak dívek. Z toho bylo prokázáno 550 nedyspeptických *E. coli* (nejsou původci průjmu) a 17 dyspeptických *E. coli* (Tab.2). U 143 vyšetřovaných stolic byla přítomna jiná nepatogenní i patogenní flóra (*Salmonella species*, *Campylobacter species*), která však neobsahovala *E. coli*.

Tab. 2: Přehled vyšetřených patogenních *E. coli* u skupiny 1

SKUPINA 1		Pozitivní výsledky <i>E. coli</i>			2015
Počet	Rok narození	Pohlaví	Serotyp <i>E. coli</i> (O-antigen)	Kmen <i>E. coli</i>	Oddělení
1.	2014	Chlapec	O126	EPEC	Dětský lékař
2.	2014	Chlapec	O126	EPEC	Dětský lékař
3.	2013	Dívka	O86	EPEC	Infekční
4.	2014	Chlapec	O26	EHEC	Dětská klinika
5.	2014	Chlapec	O126	EPEC	Dětský lékař
6.	2014	Chlapec	O126	EPEC	Dětská klinika
7.	2014	Chlapec	O26	EHEC	Infekční
8.	2014	Chlapec	O126	EPEC	Infekční
9.	2013	Chlapec	O55	EPEC	Infekční
10.	2013	Dívka	O126	EPEC	Infekční
11.	2012	Chlapec	O126	EPEC	Dětská klinika
12.	2015	Dívka	O125	EPEC	Dětská klinika
13.	2014	Chlapec	O26	EHEC	Infekční
14.	2014	Dívka	O126	EPEC	Dětská klinika
15.	2014	Chlapec	O26	EHEC	Dětský lékař
16.	2014	Chlapec	O86	EPEC	Infekční
17.	2015	Chlapec	O127	EPEC	Dětská klinika

Z tabulky 1 vyplývá, že u skupiny 1 byl nejčastěji prokázán antigen O126 v 8 případech, který patří mezi enteropatogenní *E. coli*. Ve 4 případech byl otypizován antigen O26, který se řadí mezi enterohemoragické *E. coli*. U 2 případů byl výskyt antigenu O86 a v jednom případě se prokázal antigen O55, O125, O127, tyto antigeny patří mezi enteropatogenní *E. coli* (Graf 1).

Graf 1: Četnost O antigenů *E. coli* u skupiny 1





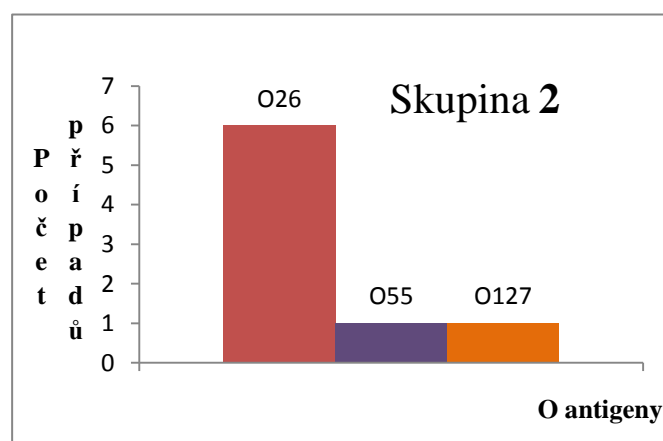
Skupina 2 – celkem bylo vyšetřeno 808 stolic od předčasně či normálně narozených dětí (chlapci + dívky). Počet nedyspeptických kmenů *E. coli* byl 218 a dyspeptických kmenů bylo 8 (Tab.3). U 582 stolic byla prokázána jiná střevní flóra.

Tab. 3: Přehled vyšetřených patogenních *E. coli* u skupiny 2

SKUPINA 2		Pozitivní výsledky <i>E. coli</i>			2015
Počet	Rok narození	Pohlaví	Serotyp <i>E. coli</i> (O-antigen)	Kmen <i>E. coli</i>	Oddělení
1.	2015	Dívka	O127	EPEC	Neonatologie
2.	2015	Chlapec	O55	EPEC	Neonatologie
3.	2015	Chlapec	O26	EHEC	Neonatologie
4.	2015	Dívka	O26	EHEC	Neonatologie
5.	2015	Chlapec	O26	EHEC	Neonatologie
6.	2015	Dívka	O26	EHEC	Neonatologie
7.	2015	Chlapec	O26	EHEC	Neonatologie
8.	2015	Chlapec	O26	EHEC	Neonatologie

Tabulka 2 ukazuje, že u skupiny 2 je nejpočetněji zastoupen antigen O26 a to v 6 případech. Antigen O26 patří mezi enterohemoragické *E. coli*. V 1 případě byl výskyt antigenu O55 a O127 (Graf 2).

Graf 2: Četnost O antigenů *E. coli* u skupiny 2

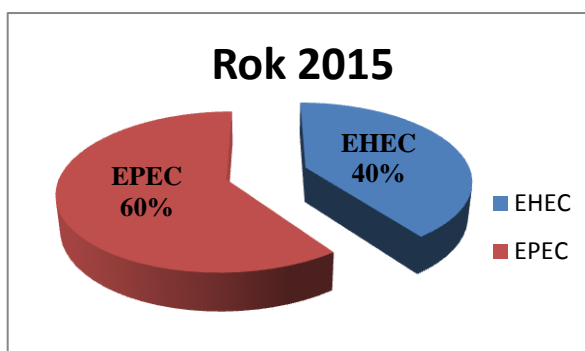


U skupiny **1** bylo otypizováno 13 enteropatogenních kmenů *E. coli* a 4 kmeny enterohemoragické *E. coli*. Skupina **2** měla výsledky odlišné, zde byl výskyt 2 enteropatogenních kmenů a 6 enterohemoragických kmenů.

Enteropatogenní kmeny *E. coli* vyvolávají průjmy s nejasnou patogenezí zejména u kojenců a novorozenců. Enterohemoragické kmeny *E. coli* jsou původci krvavých průjmů v důsledku poškození střevní sliznice (enterocytů) toxiny, jsou nebezpečné a mohou vést k rozvoji hemolyticko-uremického syndromu (HUS).

Celkově tedy bylo z obou skupin (**1,2**) otypizováno 15 EPEC a 10 EHEC (Graf 3), což je velmi vyrovnaný výskyt těchto patogenních kmenů *E. coli*.

Graf 3: Výskyt EPEC a EHEC za rok 2015



## 8. DISKUZE

Většinou je bakterie *Escherichia coli* nedílnou a neškodnou součástí střevní mikroflóry člověka a teplokrevných zvířat. Avšak některé patogenní kmeny *E. coli* jsou vysoce infekční a způsobují akutní onemocnění zejména u novorozenců a u malých dětí do 5. roku života.

Patogenní kmeny jsou zejména problémem v rozvojových zemích, kde nejsou dobré hygienické podmínky a úprava potravin a vody ke konzumaci není ideální. V těchto oblastech bývá vysoká úmrtnost novorozenců a malých dětí z důvodu průjmového onemocnění s následnou dehydratací a to zejména patogenními kmeny EPEC. Enteropatogenní kmeny *E. coli* se vyskytují v rozvinutých zemích jen zřídka. Velkým problémem jsou taktéž patogenní kmeny EHEC, který mají závažnější průběh onemocnění a mohou vést až k nevratnému poškození organismu v důsledku rozvoje hemolyticko-uremického syndromu (HUS). Enterohemoragické kmeny *E. coli* jsou původci krvavých průjmů, produkují toxiny a jejich výskyt bývá i ve vyspělých zemích.

Jsou tedy i u nás v České Republice ohroženi novorozenci a malé děti patogenními kmeny *E. coli*?! Za období leden až prosinec 2015 se zjistilo, že u většiny dětí ve věku 6 měsíců až 3 roky byl prokázán enteropatogenní kmen *E. coli* (EPEC), čímž tento kmen odpovídá právě výskytu EPEC u těchto skupin dětí jako jsou novorozenci a kojenci. U EPEC kmenů je zdrojem nákazy většinou nemocné dítě nebo dospělí, proto se zde klade velký důraz na osobní hygienu a hygienu prostředí.

U předčasně narozených dětí z neonatologického oddělení byl prokázán výskyt EHEC kmenů a to u 6 případů z celkového počtu 8. Což je velká většina, co mohlo být zde příčinou krvavého průjmového onemocnění?! Jejich snížená imunita s následnou zvýšenou náchylností k infekcím. Zdrojem nákazy mohou být zejména potraviny živočišného původu, jako jsou například: maso, mléko, dětská prášková výživa, voda. Proto je nutno u každého předčasně narozeného dítěte sledovat a znát střevní osídlení z důvodu včasné diagnostiky infekce, jelikož tato skupina dětí patří do nejvíce rizikové.

Z výsledků je zřejmé, že výskyt enteropatogenních (EPEC) a enterohemoragických (EHEC) kmenů *E. coli* u dětí do 3 let věku není problémem jen v rozvojových zemích, ale i v zemích vyspělých jako je Česká Republika.

## 9. ZÁVĚR

Již krátce po narození dochází k osidlování střevního traktu dítěte různými mikroorganismy, jedním z nich je *Escherichia coli*. Tato bakterie může být pro člověka pomocníkem, ale také nepřítelem. Pomáhá nám jako probiotikum. Nepřítelem se stává při narušení přirozené bakteriální flóry, nebo pokud se dostane do míst, kam nepatří zde, pak způsobí za daných podmínek onemocnění.

*Escherichia coli* nepatří mezi nejčastější původce průjmového onemocnění. Celkem za rok 2015 bylo vyšetřeno 1518 stolic od malých dětí ve věku 0-3 roky. Z celkového množství bylo zachyceno 25 patogenních kmenů způsobujících průjem u předčasně narozených dětí, novorozenců a kojenců (EPEC – 15 případů, EHEC – 10 případů). Nedyspeptický kmen *E. coli*, který není původcem průjmu byl prokázán u 768 stolic. U 725 stolic byla prokázána přítomnost jiné nepatogenní i patogenní flóry (*Salmonella species*, *Campylobacter species*).

Základem úspěšné prevence proti těmto infekcím u malých dětí je, že zejména rodič by měl dbát na kvalitu pokrmů, jejich důkladné tepelné zpracování a nakonec i dodržování osobní hygieny sebe samého, ale také své ratolesti.

## 10. SEZNAM ZDROJŮ LITERATURY

1. BEDNÁŘ, Marek. *Lékařská mikrobiologie*. 1. vyd. Praha: Nakladatelství Triton, 2009. Bakteriologie, Virologie, Parazitologie. ISBN: 978-80-9028-966-5
2. DONNENBERG M., KAPER J., FINLAY B. (1997) Interactions between enteropathogenic *Escherichia coli* and host epithelial cells. *Trends. Microbiol.* 5: 109-114.
3. FASANO A., KAY B.A. , RUSSELL R.G. ,MANEVAL D.R. JR, LEVIN M.M. (1990) Enterotoxin and cytotoxin production by enteroinvasive *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 58: 3717-3723.
4. FRANK, C; WERBER, D; CRAMER, JP; ET AL. (October 26, 2011). "Epidemic profile of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 outbreak in Germany.". *New England Journal of Medicine* 365: 1771–1780
5. FUKUTA S., MAGNANI J.L., TWIDDY E.M., HOLMES R.K., GINSBURG V. (1988) Comparison of the carbohydrate-binding specificities of cholera toxin and *Escherichia coli* heat-labile enterotoxins LTh-I, LT-IIa, and LT-IIb. *Infect. Immun.* 56: 1748-1753.
6. GOERING, Richard V, Hazel M DOCKRELL, Mark A ZUCKERMAN a Peter L CHIODINI, JULÁK, Jaroslav (ed.). *Mimsova lékařská mikrobiologie*. 5. vydání. Překlad Jan Bobek, Renáta Čermáková, Karel Holada, Zora Mělková, Tibor Moško, Jan Novák, Ludmila Prokešová, Jiřina Suchanová. Praha: Stanislav Juhaňák - Triton, 2016. ISBN 978-80-7387-928-0.
7. GÖPFERTO VÁ, Dana, Petr PAZDIORA a Jana DÁŇOVÁ. *Epidemiologie: obecná a speciální epidemiologie infekčních nemocí*. 2., přeprac. vyd. Praha: Karolinum, 2013. ISBN 978-80-246-2223-1.
8. GÖPFERTO VÁ, Dana. *Mikrobiologie, imunologie, epidemiologie, hygiena: pro střední a vyšší odborné zdravotnické školy*. 3. dopl. vyd. Praha: Triton, 2002. Gymnázium. ISBN 80-725-4223-0.
9. GORDIS, Leon. *Epidemiology*. 4th ed. Philadelphia: Elsevier/Saunders, c2009. ISBN 978-1-4160-4002-6.

10. HRABÁK J., CHUDÁČKOVÁ E., WALKOVÁ R. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight (maldi-tof) mass spectrometry for detection Clin.Microbiol.Rev. 26:103-14, 2013.
11. <http://www.szu.cz/publikace/zpravy-centra-epidemiologie-a-mikrobiologie/cislo-8-srpen-2007> . Zprávy centra epidemiologie a mikrobiologie (SZÚ, Praha) 2008; 16(8)
12. [http://www.szu.cz/uploads/documents/CeM/NRLs/ecoli/publikace/Aktualita\\_Z\\_CEM\\_5\\_2011.pdf?highlightWords=escherichia+coli](http://www.szu.cz/uploads/documents/CeM/NRLs/ecoli/publikace/Aktualita_Z_CEM_5_2011.pdf?highlightWords=escherichia+coli). Zprávy centra epidemiologie a mikrobiologie (SZÚ, Praha) 2011; 20(5)
13. [http://www.szu.cz/uploads/documents/CeM/NRLs/ecoli/publikace/HUS\\_E.coli\\_O26\\_death.pdf?highlightWords=escherichia+coli](http://www.szu.cz/uploads/documents/CeM/NRLs/ecoli/publikace/HUS_E.coli_O26_death.pdf?highlightWords=escherichia+coli). Zprávy epidemiologie a mikrobiologie (SZÚ, Praha) 2009; 18(6)
14. JERSE A.E. ,YU J., TALL B.D., KAPER J.B. (1990) A genetic locus of enteropathogenic Escherichia coli necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87: 7839-7843.
15. KAPER, J. B., O'BRIEN, A. D. (1998): Escherichia coli O157:H7 and other Shiga Toxin-producing E. coli strains, ASM Press Washington, D.C.
16. KAPRÁLEK, František. *Fyziologie bakterií: celostátní vysokoškolská učebnice pro studenty přírodověd. fakulty, skupiny oborů 15 Biologické vědy*. 1.vyd. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1986. Učebnice pro vysoké školy (Státní pedagogické nakladatelství). ISBN 80-725-4223-0
17. LEVINE M.M. (1987) Escherichia coli that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. J. Infect. Dis. 155: 377-389.
18. LUKÁŠ M. (2003) *Escherichia coli* (*Escherichia coli* kmen Nissle 1917, sérotyp O6:K5:H1) jako probiotikum v klinické praxi. *Remedia*. 4
19. MAINIL J. (2013) Escherichia coli virulence factors. Vet. Immunol. Immunopathol. 152: 2-12.

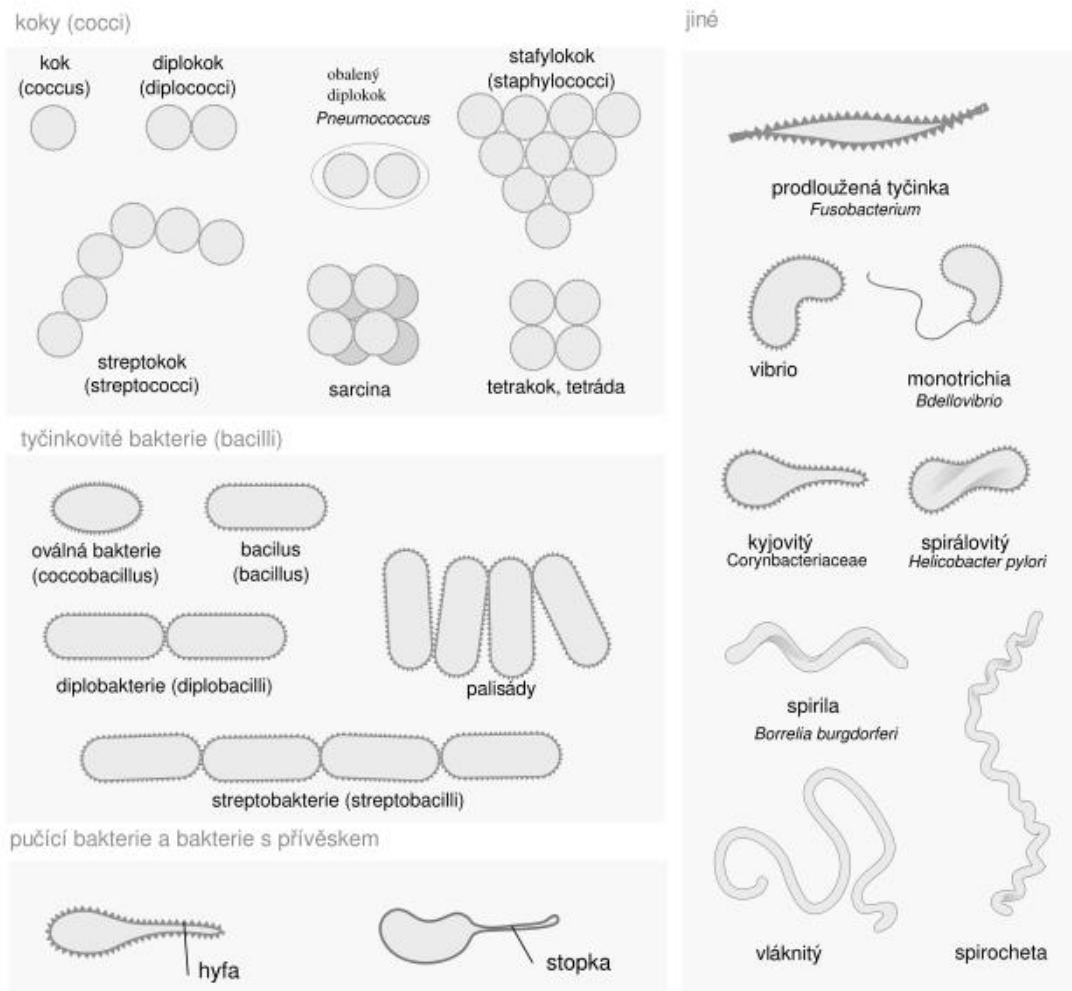
20. MALDI Biotyper 3.0 uživatelský manuál Bruker Daltonics GmbH ©copyright, 2011
21. MELTER, Oto a Annika MALMGREN. *Principy a praktika lékařské mikrobiologie*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2014. Učební texty Univerzity Karlovy v Praze. ISBN 978-80-246-2414-3.
22. NATARO J.P. , KAPER J.B.(1998) Diarrheagenic Escherichia coli. Clin. Microbiol. Rev. 11: 142-201.  
of antibiotic resistance mechanisms: from research to routine diagnosis.
23. PENNINGTON, Thomas Hugh. E. coli O157 outbreaks in the United Kingdom: past, present, and future. *Infection and drug resistance*, 2014, 7: 211-222.
24. QADRI F., SVENNERHOLM A.M., FARUQUE A.S.G., SACK R.B. (2005) Enterotoxigenic Escherichia coli in developing countries: Epidemiology, microbiology, clinical features, treatment, and prevention. Clin. Microbiol. Rev. 18: 465-483
25. ROSYPAL, Stanislav. *Bakteriologie a virologie: učební texty pro bakalářské studium*. 1. vyd. Praha: Scientia, 1994. Gymnázium. ISBN 80-85827-16-6.
26. RYŠKOVÁ, Olga. *Základy lékařské mikrobiologie a imunologie: učební texty pro bakalářské studium*. 1. vyd. Praha: Nakladatelství Karolinum, 2000. Učební texty Univerzity Karlovy v Praze. ISBN 80-246-0135-4.
27. SEDLÁČEK, Ivo. *Taxonomie prokaryot*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2007. ISBN 978-80-210-4207-0.
28. SCHINDLER, Jiří. *Mikrobiologie: pro studenty zdravotnických oborů*. 1. vyd. Praha: Grada, 2010. ISBN 978-80-247-3170-4.
29. TZSCHOPPE M., MARTIN A., BEUTIN L. (2012) A rapid procedure for the detection and isolation of enterohaemorrhagic Escherichia coli (EHEC) serogroup O26, O103, O111, O118, O121, O145 and O157 strains and the aggregative EHEC O104:H4 strain from ready-to-eat vegetables. Int. J. Food Microbiol. 152: 19-30. Učebnice pro střední zdravotnické školy (Avicenum)
30. VOTAVA, Miroslav a Petr ONDROVČÍK. *Vybrané kapitoly z klinické mikrobiologie*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2000. ISBN 80-210-1805-4.

31. VOTAVA, Miroslav. *Lékařská mikrobiologie II: přehled vyšetřovacích metod v lékařské mikrobiologii*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2000. Učebnice pro vysoké školy (Státní pedagogické nakladatelství). ISBN 80-210-2272-8.
32. VOTAVA, Miroslav. *Lékařská mikrobiologie obecná*. Brno: Neptun, 2001. ISBN 80-902896-2-2.
33. VOTAVA, Miroslav. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun, 2003. ISBN 80-902896-6-5.
34. VOTAVA, Miroslav. *Lékařská mikrobiologie: vyšetřovací metody*. Brno: Neptun, 2010. ISBN 978-80-86850-04-7.
35. ZAHRADNICKÝ, Jiří. *Mikrobiologie a epidemiologie: učební text pro stř. zdravot. školy, stud. obor zdravotní laborant*. 1. vyd. Praha: Avicenum, 1987.



# 11. PŘÍLOHY

## Příloha č. 1 - tvary bakterií



[http://viry-bakterie.wz.cz/649px-Bacterial\\_morphology\\_diagram\\_cs.svg.png](http://viry-bakterie.wz.cz/649px-Bacterial_morphology_diagram_cs.svg.png)

## Příloha č. 2



*E. coli* ve fluorescenčním mikroskopu převzato z:

<http://www.testtargettreat.com/en/home/rapid-diagnostic-tests/e-coli-verotoxigenic-escherichia-coli.html>

## Příloha č.3

Enterotest 24 + šablona (plastové víčko se stupnicí) + barevná srovnávací stupnice



	H	G	F	E	D	C	B	A
1	IND	GLU	LYS	ORN	URE	ARG	SCY	MAI
	+	pink	black	blue	blue	orange	blue	blue
2	PHI	ONP	IND	ADO	CEL	SUC	TRI	MAN
	+	black	yellow	yellow	yellow	yellow	yellow	yellow
3	VPT	ESL	3DE	FHA	MEB	RA2	DLU	GLU
	+	red	black	yellow	yellow	yellow	yellow	yellow
	-	white	white	green	green	green	green	green



#### **Příloha č. 4**

##### Známé patotypy *E. coli*

<b>EPEC</b>	enteropatogenní <i>E. coli</i>
<b>EHEC</b>	enterohemoragická <i>E. coli</i> VTEC, STEC (verotoxigenní, shigatoxigenní)
<b>ETEC</b>	enterotoxigenní <i>E. coli</i>
<b>EAEC</b>	enteroadherentní <i>E. coli</i> EAaggEC
<b>DAEC</b>	difuzně adherentní <i>E. coli</i>
<b>EIEC</b>	enteroinvazivní <i>E. coli</i>
<b>UPEC</b>	uropatogenní <i>E. coli</i>
<b>NMEC</b>	<i>E. coli</i> způsobující neonatální meningitidy MNEC, MENEK, SEPEC
<b>AIEC</b>	adherentní invazivní <i>E. coli</i>
<b>CDEC</b>	"cell-detaching" <i>E. coli</i>
<b>EAHEC</b>	enteroagregativní-hemoragická <i>E. coli</i>
<b>APEC</b>	ptačí <i>E. coli</i> ("avian pathogenic")
<b>NTEC</b>	nekrotoxigenní <i>E. coli</i>

## Příloha č. 5

### Sérotypy typické pro ETEC

O antigeny	H antigeny
O6	H16
O8	H9
O11	H27
O15	H11
O20	NM
O25	H42, NM
O27	H7
O78	H11, H12
O128	H7
O148	H28
O149	H10
O159	H20
O173	NM

### Sérotypy typické pro EPEC

O antigeny	H antigeny
O55	H6, NM
O86	H34, NM
O111	H2, H12, NM
O119	H6, NM
O125ac	H21
O126	H27, NM
O127	H6, NM
O128	H2, H12
O142	H6

### Sérotypy typické pro EHEC

O antigeny	H antigeny
O26	H1, H32, NM
O55	H7
O111	H8, NM
O113	H21
O117	H14
O157	H7
O103	H2
O145	H28
O118	H16
O121	H19

### Sérotypy typické pro EAEC

O antigeny	H antigeny
O3	H2
O15	H18
O44	H18
O86	NM
O77	H18
O104	H4
O111	H21
O127	H2
Oa	H10

### Sérotypy typické pro EIEC

<b>O antigeny</b>	<b>H antigeny</b>
O28ac	NM
O29	NM
O112ac	NM
O124	H30,NM
O136	NM
O143	NM
O144	NM
O152	NM
O159	H2,NM
O164	NM
O167	H4,H5,NM

Upraveno podle publikace Nataro a Kaper (1998).

Vysvětlivky: NM („nonmotile“) = bakterie nesyntetizuje bičík a nevlastní H antigen; ac = antigenní varianta, Oa = antigen prozatím nepopsaný konvenčními metodami

## 12. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EPEC	enteropatogenní <i>E. coli</i>
ETEC	enterotoxigenní <i>E. coli</i>
EIEC	enteroinvazivní <i>E. coli</i>
EHEC	enterohemoragická <i>E. coli</i>
EAggEC	enteroagregativní <i>E. coli</i>
UPEC	uropatogenní <i>E. coli</i>
MENEC	<i>E. coli</i> způsobující meningitidy
SEPEC	<i>E. coli</i> způsobující septikémie
APEC	aviární patogenní <i>E. coli</i>
O	somatický antigen
K	kapsulární antigen
H	bičíkovitý antigen
DNA	deoxyribonukleová kyselina
RNA	ribonukleová kyselina
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
PCR	molekulární metoda
Stx	Shiga toxin
LT (I,II)	tepelně nestabilní toxin
ST (a,b)	tepelně stabilní toxin
VT	verotoxin
HUS	hemorhagický syndrom
O157:H7, O104:H4 , O157:H6, O111:NM, O26:H11, O103:H2, O113:H21	sérotyp <i>E. coli</i>
CO <sub>2</sub>	oxid uhličitý
Ca <sup>2</sup>	vápník
A/E léze	attaching-effacing –vymizení mikroklků