

616.34-022.7-073

PŘÍSPĚVEK K ZJEDNODUŠENÍ IDENTIFIKACE STŘEVNÍCH PATOGENŮ

Podplukovník MUDr. Richard KAHLICH, VÚHEM Praha, major MUDr. Jiří FARNÍK, HEO Plzeň

Značný podíl ambulantních forem onemocnění a velký počet klinicky němých nosičů, které jsme pozorovali ve vojenských kolektivech především během epidemií soudobé bacilární úplavice (3), vyžadují široké užití laboratorní depistáže jako prostředku k eliminaci zdrojů nákazy nekontrolovatelných klinickou metodou. Bez depistáže není mnohdy možné stanovení epidemiologické prognózy ani konečné vyjádření o likvidaci ohniska epidemie.

Při takových akcích, kdy je často nutné odbírat stovky vzorků během dne, dochází k značnému zatížení laboratoře především během izolačních a identifikačních postupů. Kromě toho se ovšem nároky na počet izolací zvyšují ještě pro další okolnosti. Zavedení dezoxycholátové půdy do běžné diagnostiky přineslo kromě zvýšené záchytnosti shigel a salmonel současně nutnost izolovat vzhledem k obtížné diferencovatelnosti laktóza negativních kolonií větší počet kolonií z primokultury. Zkušenost, že některé typy salmonel rostou na této půdě v koloniích s černým středem, připomínajících protea, nutí též ke zvýšenému počtu izolací, bez něhož se ovšem neobejdeme ani při odečítání z Endovy půdy.

Snaha po zjednodušení a urychlení celého vyšetřovacího postupu vede již po léta k pokusům vyloučit nepatogenní kmeny ještě před stadiem konečné identifikace, předběžně zúžit počet podezřelých materiálů a poskytnout terénu co nejdříve negativní výsledky.

Kromě podobných snah na stupni primokultivace (univerzální diagnostické půdy, předběžná aglutinace podezřelých kolonií, metody založe-

né na průkazu antigenu bez izolace čisté kultury apod.) jsou v mnohých laboratořích současně se zakládáním subkultury očkované v omezeném počtu půdy indikující základní biochemické vlastnosti, při čemž volba kombinace je ovlivněna různými představami autorů o diagnostickém významu jednotlivých ukazatelů.

Sami jsme při řešení úkolu — vypracovat pro terénní laboratoře zjednodušený a záchytný postup pro diagnostiku enterálních infekcí a intoxikací — našli možnost zjednodušení ve zkrácené izolační řadě, tj. ve dvojkumavkové kombinaci diagnostických půd bez užití urey. Protože nám vlastní tříletá praxe potvrdila diagnostické a ekonomické přednosti zvoleného postupu, dovolujeme si o něm podat stručné sdělení.

Metodika a výsledky

S ohledem na záchytnost obligátních i relativních patogenů, majících praktický význam, jsme usilovali o kombinaci minimálního počtu takových jednoduchých půd, které by dovolily spolehlivě znázornit tvorbu sirovodíku, kvašení laktózy a glukózy včetně tvorby plynu, kvašení manitolu a pohyblivost kmene jako diagnostické ukazatele, které jsme pokládali za podstatné.

Těmto požadavkům nejlépe vyhovovala zkrácená pestrá řada, skládající se z originální Kliglerovy půdy a z modifikované půdy podle Rappaporta s obsahem 0,4 % agaru a 0,3 % manitolu, bez použití urey. Podezřelou kolonii očkujeme nejprve na půdu Endovu, což je nezbytné pro posouzení vzhledu a čistoty kultury, a dále touž kličkou krátkým vpichem na půdu s manitem

Tab. 1

Rozlišovací možnosti dané biochemickými znaky zkrácené izolační řady (typické případy).

	Pohyblivost	Manit	Sirovodík	Glukóza (pevná půda)	Plyn v glukóze (pevná půda)	Laktóza (pevná půda)
Shigelly manit posit.	—	+	—	+	—	—
Shigelly manit negat.	—	—	—	+	—	—
Salmonelly	+	+	+	+	+	—
Salmonella typhosa	—	+	slabě +	+	—	—
Arizona, Citrobacter	+	+	+	+	+	+
Proteus	+	—	+	+	+	—
Proteus rettgeri	+	opož. +	—	+	+	opož. +
E. alcalescens dispar	—	+	—	+	—	opož. +
Providentia	+	+	—	+	+	—
Pseudomonas	+	—	—	+	—	—
E. coli	+	+	—	+	+	+

a hlubokým vpichem na půdu Klieglerovu. Z dolních partií šikmé plochy Klieglerovy půdy bereme materiál ke sklíčkové aglutinaci; vyšší vrstva půdy v těchto místech a nižší obsah agaru proti ostatním půdám tvoří dobré předpoklady pro vývoj bičíkových antigenů u salmonel. Tuto dvojici doplňujeme při konečné identifikaci na klasickou pestrá řadu. Odlišení obligátních i relativních patogenů je velmi názorné (tab. 1). Je třeba počítat se slabou tvorbou sirovodíku u Salmonella typhi abdominalis (tmavý prstenec na povrchu Klieglerovy půdy) nebo s H₂S negativními variantami, které se mohou jevit jako shigely.

Několik metodických poznámek: U obou půd záleží na tuhosti agaru, takže koncentraci je třeba volit individuálně podle druhu agaru. Optimální konzistence manitové půdy je rosol, který při položení zkumavky nevytéká, ale při zatřepání se otřásá. Z dobře připravené půdy uniká i vznikající plyn; bublinky plynu v okolí vpichu svědčí o tom, že půda je příliš tuhá. V takovém případě se mohou málo pohyblivé kmeny jevit jako nepohyblivé, což vede k zbytečné manipulaci s řadou kmenů pro podezření z příslušnosti k shigelám. Na příliš tuhé Klieglerově půdě nelze zase odečíst s jistotou tvorbu plynu, což má podobné důsledky.

Pro ilustraci ekonomičnosti uvedeného postupu předkládáme několik čísel vybraných z laboratorních protokolů.

a) Depistáž během epidemie bacilární dyzentérie:

Primokultivace	Izolace	Nezbytné pestré řady	Izolované patogeny
757	165	14	10

b) Epidemiologická vyšetřování v letech 1960 a 1961:

Primokultivace	Izolace	Nezbytné pestré řady	Izolované patogeny
11 340	4135	1103	714

Ze vzájemných vztahů mezi jednotlivými výkony vyplývá poměrně vysoký počet izolací vzhledem k primokultivacím a poměrně malý počet dlouhých pestrých řad vzhledem k počtu izolovaných patogenů. Většina „nadbytečných“ pestrých řad jde na vrub některých citrobacterů, které je možno od salmonel odlišit teprve speciálními testy.

Abychom si ověřili předpoklad, že omezení počtu diagnostických ukazatelů nepůjde na úkor zachytivosti obligátních i relativních patogenů, určovali jsme všechny kmeny touto metodou vyřazené dále na dlouhé biochemické řadě. Z více než 1800 kmenů vyřazených na základě zkrácené izolační řady nebyl při další identifikaci zjištěn žádný patogen. Metodika je spolehlivě zachytná pro všechny obligátní a většinu relativních patogenů (arizony, citrobactery, E. alcalescens dispar, pseudomonas, proteus); únik je možný v případě některých rettgerel a providencií, které jsou ovšem předmětem zájmu jen výjimečně.

Diskuse

Podobných systémů byla již navržena celá řada, avšak ne všechny jsou sestaveny s maximální účelností. Většina nám známých metodik, jejichž účelem je vyloučení nepatogenních kmenů před stadiem konečné identifikace, počítá s užitím urey jako základním testem vyloučení rodu Proteus. Tak např. Seeliger (10) se zmiňuje o užívání Klieglerovy půdy uzpůsobené pro detekci indolu a ureázy, Sedlák (9) doporučuje pro zkrácené vyšetřování epidemií kombinaci půd Hajnyho a Christensenovy. Roland a Bourbonová (7) užívají dokonce dvouetapového postupu; nejprve zakládají izolace na půdě s ureou, po 6 hodinách podrobují ureonegativní kolonie další identifikaci na Klieglerově půdě a agar s manitolem. Sami jsme nezařadili ureu vzhledem k malé užitečnosti, neboť naprostou většinu proteů lze vyloučit pro neschopnost kvasit manitol při současné produkci sirovodíku. Řada kmenů kromě toho na sebe upozorní plazivým růstem na Endově půdě a typickým zápachem. Skutečnost, že mohou některé kmeny Proteus rettgeri, kvasící urychleně manit a současně tvořící sirovodík, proniknout do stadia konečné identifikace, nás zatěžuje minimálně ve srovnání s postupy, které obligátně užívají půdy s ureou jako zvlášť-

ního člena řady. Užití samotné Rappaportovy půdy (6) je spojeno s nebezpečím úniku salmonel, citrobacterů a arizon. Rovněž užívání samotné Klieglerovy půdy [Swierk Eva (11)].

Jiné postupy jsou pak zbytečně složité, náročné na přípravu a manipulaci, čímž zrazují původní účel a umožňují diagnostické chyby tím spíše, dávají-li přednost zařazení méně podstatných znaků (indol, sacharóza) před zjištěním pohyblivosti. Sem patří systém Braunův-Silbersteinův (1), půda Ginčevova (2), Knoxova (5), Švejcárova-Šterzlova (12) a další. Nedostatek představy o pohyblivosti kmene vede k průtahům před odesláním negativních výsledků a k řadě zbytečných manipulací s kmeny anaerogenními a — pokud myslíme na *Sh. flexneri* 6 — i s kmeny aerogenními. Včasné určení nebo vyloučení shigel má velký význam zejména v podmínkách vojenských kolektivů, kde záleží na rychlé likvidaci zdrojů nákazy.

Závěr

Zkrácená izolační řada (kombinace orig. Klieglerovy půdy a modifikované půdy Rappaportovy s manitolem) zakládána ve stadiu subkultury zjednodušuje vzhledem ke snížené náročnosti na čas i materiál celý postup při diagnostice enterálních patogenů. Znázorňuje podstatné biochemické vlastnosti obligátních i relativních střevních patogenů, přičemž zdůrazňuje na rozdíl od jiných metodik pohyblivost kmene a kvašení manitolu před užíváním půd s ureou. Včasná identifikace patogenů a včasné vyloučení bezvýznam-

ných mikrobů z další identifikace urychluje odesílání pozitivních i negativních výsledků. Z hlediska potřeb terénních epidemiologů je to zvlášť významné v případě shigel, kdy jde o včasnou izolaci zdrojů nákazy.

Třileté zkušenosti s uvedeným postupem nás opravňují k tomu, abychom jej doporučili vzhledem k velkým úsporám času a materiálu zvláště pro ty případy, kdy laborator stojí před úkolem zvládnout velká kvanta materiálu, a dále jako stálou metodiku pro terénní laboratoře, jejichž práce je podmíněna jednoduchou, spolehlivou a záchytnou metodou.

Souhrn

Je popsán a vyhodnocen zjednodušený postup při izolaci obligátních i relativních střevních patogenů, který je vhodný vzhledem ke spolehlivosti, úspornosti a dobré záchytnosti zvláště pro vyšetřování velkého počtu osob během epidemií střevních nálezů a dále jako stálá metoda pro terénní laboratoře.

Písemnictví

1. Braun, Silberstein, cit. podle Christensen P.: Zblt. Bakt. Orig. 1950, 156:358.
2. Ginčev, I. C.: Zblt. Bakt. Orig. 1957, 167:591.
3. Kahlich, R.: Voj. zdrav. listy 1959, 28, 5:219.
4. Habs, H.: Bacter. Taschenbuch 36 Aufl.: 188.
5. Knox, R.: J. Path. Bakt. 1949, 61:343.
6. Rappaport, F. Slark, G.: Amer. J. Clin. Path. 1953, 9:948.
7. Roland, F. Bourbon, D.: Ann. de Inst. Past 1949, 76:346.
8. Sedláček, J.: Enterobacteriaceae. SZN, Praha 1955.
9. Sedláček, J.: ČsEMI 1958, 7, 2:106.
10. Seeliger, H.: Die Laboratoriumdiagnostik der Bakterienruhr, 71, Lipsko 1953.
11. Swierk, E.: Przeg. epid. 1958, 12, 2:131.
12. Švejcár, J. Šterzl, J.: Č L Č 1951, 90:767.
13. Winkle, S.: Mikrobiol. u. Seroldiagnostik 2. Aufl.: 33 Stuttgart.