

576.851.47/.49:616.39-008.6:616.34-036.22-078

NÁLEZ ENTEROBAKTEROVÉ TOXIKÓZY V RÁMCI ŠIRŠÍ DIAGNOSTIKY STŘEVNÍCH EPIDEMIÍ

Plk. MUDr. Richard KAHLICH, DrSc., MUDr. Antonín PALEČEK, CSc.,
MUDr. Bohuslav KORYCH, CSc., plk. MUDr. Vladislav SEDMIDUBSKÝ,
MUDr. Alexandra JELÍNKOVÁ, RNDr. Miloš NEKVASIL, plk. MUDr. Oldřich SVOBODA
Vojenský ústav hygieny, epidemiologie a mikrobiologie Praha
(náčelník: plk. MUDr. Vladimír KOTLÁŘ, CSc.)
Ústav pro lékařskou mikrobiologii a imunologii UK Praha
(přednosta: doc. MUDr. Ctirad John, CSc.)
Psychiatrické oddělení ÚVN Praha
(náčelník: plk. MUDr. O. Svoboda)

V posledních letech dochází k patrným objektivním změnám v etiologické struktuře hromadných střevních infekcí a intoxikací. Zaměření na klasické salmonely, shigely a toxigenní stafylokoky již zdaleka nestačí. Stále naléhavěji je obviňována řada mikroorganismů ze skupiny tzv. podmíněných patogenů (oportunistů). V popředí stojí biologicky aktivní kmeny *E. coli* (dysentériiformní, enterotoxigenní, dyspeptické), kterým jsme věnovali samostatné sdělení (9). V úvahu připadají i další species čeledi *Enterobacteriaceae* včetně *Yersinia enterocolitica*, dále anaerobní *Clostridium perfringens*, *Campylobacter jejuni*, *Bacillus cereus*, rotaviry a některé enteropatogenní nekultivovatelné viry, parazit *Giardia intestinalis* a další. Přistupuje závažná skutečnost, že zůstává v podmínkách

ČSLA až 40 % epidemií etiologicky nevyjasněno.

Z uvedeného vyplývá naléhavý požadavek získat podklady pro představu o skutečné frekvenci dosud běžně nediagnostikovaných původců, a to především v hromadných onemocněních, která vždy představují u vojsk závažnou mimořádnou událost. Úkol byl koncepčně i organizačně metodicky důkladně připraven (8) a řešení se ujal široký tým pracovníků VÚHEM a terénních zařízení hygienicko-epidemiologické služby ČSLA za spoluúčasti některých civilních pracovišť.

Hlavním cílem tohoto sdělení je ilustrovat nové přístupy k soudobé epidemiologii střevních nákaz na hromadném onemocnění, jehož neobvyklá etiologie mohla být objasněna jen

díky uplatnění širší diagnostiky náročné na dobrou spolupráci klinika, epidemiologa a mikrobiologů.

Materiál a metody

Hromadné onemocnění popsané ve výsledcích postihlo současně několik oddělení ÚVN zásobovaných ze společné kuchyně. Podrobnější analýzu jsme provedli na psychiatrickém oddělení, kde měl výskyt hromadnější charakter.

Vzorky stolice byly zaslány jednak na běžných DC tamponech, sami jsme navíc získali od posledních 11 nemocných objemnější vzorek nativní stolice s užitím papírové fólie dle vlastního návrhu [Voj. zdrav. Listy 51, 1982, č. 4]. Ten umožnil obohatit rutinní bakteriologické postupy o zaměření na *Clostridium perfringens* (kvantitativní určení), *Campylobacter jejuni*, *Giardia intestinalis*, enteropatogenní viry a na výskyt leukocytů ve stolici.

Bakteriologické vyšetření jsme zaměřili na širší okruh agens s hlavním zaměřením na mikroorganismy nejčastěji spojené s obrazem afebrilní enterokolitidy. Po účasti klasických i podmíněných patogenů z čeledi *Enterobacteriaceae* jsme pátrali na běžných kultivačních půdách a podezřelé kolonie jsme podrobovali určování na pestré řadě. Pro event. záchyt enterotoxigenního stafylokoky jsme očkovali materiál na selektivní Chapmanův agar. Pro záchyt *Bacillus cereus* byl na plotny s krevním agarem kladen disk s Polymyxinem B. Anaerobní kultivace [13] byla provedena pouze u vzorků nativní stolice a některých podezřelých po-travin.

Zvláštní pozornost jsme věnovali laktóza-pozitivním kmenům *E. coli*. Kmenová individua jsme se snažili diferencovat hlavně dle odlišného zkvašování salicinu, dulcitu a sacharózy do 8 různých „biotypů“ označovaných kódem 0–7 [9]. Dále jsme se pokoušeli určovat sérotyp. Prevalující kmeny byly podrobeny vyšetření na enterotoxigenitu.

Navíc byly použity speciální postupy pro záchyt *Yersinia enterocolitica* [1] a *Campylobacter jejuni* [11].

S využitím zkušeností publikovaných Harri-sem [7] jsme mikroskopicky hledali leukocyty ve vzorcích nativní stolice barvených podle Giemsky.

U vybraných kmenů *E. coli* a enterobakterů jsme pátrali po enterotoxigenitě s využitím známých zvířecích modelů. Na produkci termolabilního toxinu jsme usuzovali z hromadění tekutiny v luminu izolované klíčky králíčího je-juna [3] po vpravení lyzáty 20hodinové kultury, na přítomnost termostabilního toxinu pak z obdobného jevu po vpravení supernatantu stejné kultury do žaludku sajících myšek [6].

Virologické vyšetření bylo zaměřeno dvojím směrem. Rekonvalescentní séra byla vyšetřena nepřímou imunofluorescenční metodou na přítomnost protilátek vůči rotavirům na systému buněk infikovaných bovinním kmenem Rotavi-

ru Lincoln [dr. B. Korych]. Průkaz nekultivovatelných enteropatogenních virů byl veden technikou imunoelktronové mikrobiologie s pozorováním imunokomplexů. Metodiky byly obdobné jako při studiu virové hepatitidy v roce 1979 [2]. Preparáty pro vyhledávání cyst *Giardia intestinalis* byly zhotoveny nezkrácenou Faustovou flotační metodou [5].

Výsledky

Popis epidemie. V časovém úseku od 18 do 6 h následujícího dne onemocnělo 30 z počtu 71 pacientů [tab. 1]. V popředí klinického

Tab. 1

Přírůstek nemocných v čase

Absol. čas v h	Počet hodin od oběda*)	Nové případy	Přírůstek nem. kumulativně	
18—20	7	4	4	13,3 %
20—22	9	4	8	26,6 %
22—24	11	11	19	63,3 %
0—3	13,5	8	27	90 %
3—6	16,5	3	30	100 %

*) Střední interval mezi 12 h a hodinou registrace nemocných dané skupiny

obrazu byl průjem bez krve a hlenu s průměrným počtem asi 5 stolic provázených křečemi v břiše. Nikdo nezvracel ani neměl teplotu. Šlo o syndrom afebrilní enteritidy s rychlou rekonvalescencí.

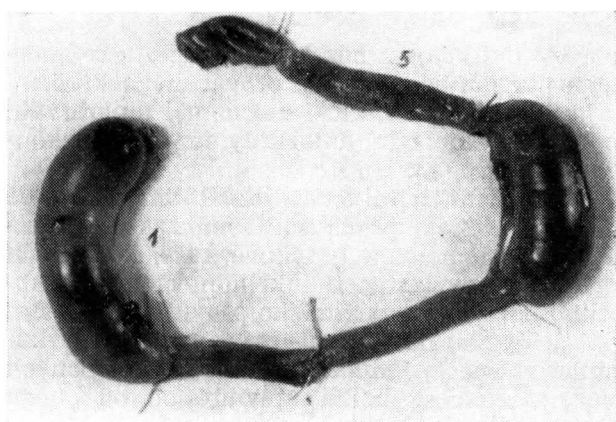
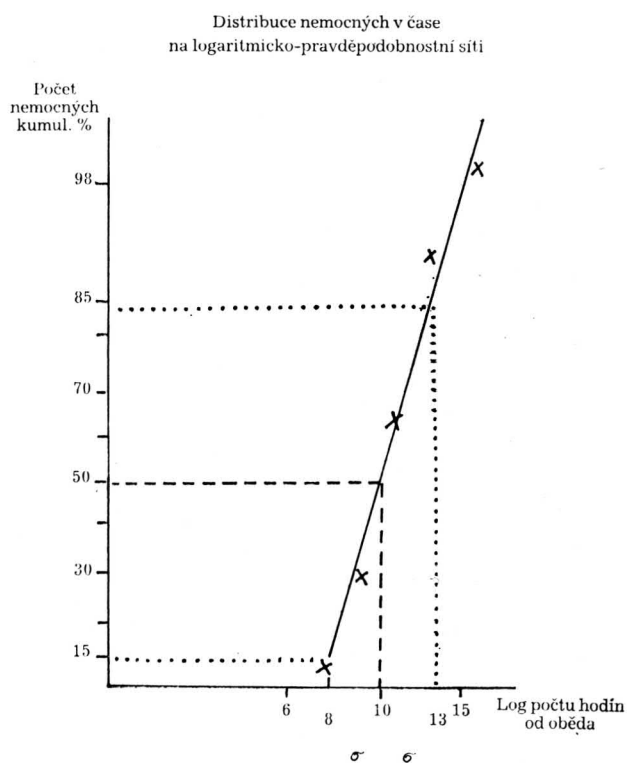
Explozivní charakter a úzká variační šíře 12 hodin nás především vedla k hypotéze o uplatnění polední hrachové kaše, která byla pro chuťové vlastnosti inkriminována též subjektivně. Na logaritmicko-pravděpodobnostní síti [15] jsou na ose *y* (graf 1) naneseny kumulativní počty jednotlivých skupin nemocných a na ose *x* log hodin uplynulých od oběda (údaje na tab. 1).

Výrazné normální rozložení souboru jednoznačně svědčilo pro simultánní alimentární ná-kazu s odhadem průměrné inkubační doby $10 \pm 2,5$ hodiny. Nedostatek aberancí koncových průsečíků od nejlepší přímky vyloučilo uplatnění kontaktního mechanismu přenosu v úvodu i po spontánním vyhasnutí epidemie.

Pozn. Vzorky inkriminované hrachové kaše se pro bakteriologický rozbor nezachovaly, syrový hrách a koření i vuřty obsahovaly pouze sporulující mikroby. Vyšetření kuchyňského personálu a prostředí provedené s jednodenním zpožděním přineslo negativní výsledky.

Komplexní bakteriologické vyšetření [viz metody]. U všech 30 pacientů jsme vyloučili všechny známé kandidáty na původce toxikóz, tj. především salmonely, shigely, toxigenní stafylokoky, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, enterokoky a dále i jiné méně pravděpodobné bakterie [*Yersinia*, *Campylobacter*

Graf 1



Obr. 1. Lyzát *Enterobacter cloacae* (č. kmene 270)
v izolovaných kličkách králíčího jejunu

1. Lyzát nativní
2. L. povařený (15 min)
3. L. opracovaný sérem králíka očkovaného autologním kmenem č. 270
4. L. opracovaný sérem neočkovaného králíka
5. L. opracovaný sérem králíka očkovaného heterologním enterobakterem č. 277

apod.). Pokud jde o zaměření na enterotoxigenní *E. coli* kvasící urychleně laktózu, nebyly na půdě Endo rozeznány žádné odlišné morfotypy. Ve 20 primokulturách byl vyšetřen biotyp u celkového počtu 80 náhodně vybraných kolonií. Predominoval kód „6“, sérologicky netypovatelné kmeny tohoto biotypu nebyly však toxigenní v králíčím ani v myším modelu.

U 19 z počtu 30 vyšetřených pacientů (63,3 procenta) byl na krevním agar, půdě Endo a

DC nápadný bohatý nález morfologicky výrazných laktóza-pozitivních kolonií mukoidního charakteru. Na pestré řadě byly identifikovány jako *Enterobacter cloacae* s následující charakteristikou: Laktóza +, glukóza a tvorba plynu +, manitol +, pohyblivost +, sirovodík + (ev. ±), urea-, KCN +, indol +, Simons citrát +, želatina +. Taxonomické zařazení bylo potvrzeno v Národní referenční laboratoři (dr. E. Aldová).

Dále jsme provedli srovnání záchytnosti enterobakterů ve velké sestavě 450 zdravých lidí vyšetřovaných na bacilonosičství. *E. aerogenes* a *E. cloacae* dohromady jsme našli jen u 17 osob, tj. u 3,8 %. Rozdíl oproti 63,3 % v sestavě našich nemocných je tedy statisticky vysoce významný ($p < 0,01$).

Tři kmeny od nemocných byly podrobně vyšetřeny ve 3 opakovaných pokusech s užitím izolované kličky králíčího jejunu. Živé kultury i buněčné lyzáty zbavené živých bakterií gentamycinem byly vesměs pozitivní. Enterotoxin byl spolehlivě inaktivován pouze při užití varu po dobu 15 min. Byl neutralizovatelný sérem králíka očkovaného buněčným lyzátem autologního i heterologního kmene (foto). Test na produkci termostabilního toxinu v modelu sající myši byl opakovaně negativní.

Virologické vyšetření zaměřené na event. účast rotavirů (7 rekonvalescentních sér) a dále na nekultivovatelné viry (11 stolic a 11 rekonvalescentních sér) bylo ve všech případech negativní. Při parazitologickém pátrání nebyly nalezeny cysty *Giardia intestinalis*.

V žádné z 11 nativních stolic jsme nenalezli leukocyty. Rekonvalescentní séra odebraná po 3 týdnech neaglutinovala dle očekávání suspenzi enterobaktera na sklíčku ani v rourkách.

Diskuse

K etiologické úloze nalezeného enterobaktera (*E. cloacae*).

Ani zjištění enterotoxigenní aktivity nemohlo samo o sobě rozptýlit určité rozpaky nad etiologickou úlohou *Enterobacter cloacae*, i když byl nalezen v časové souvislosti s převládáním u vysokého podílu souvlastí a přeměňování u jejich primokultuře. Významné ovšem je, že byl u zdravých jen v mizivém procentu.

Rozhodující podporu vidíme v komplexnosti užitých metod, které byly u nás pro účely širší diagnostiky postupně rozpracovány (10). Vedle jiných známých původců toxikóz bylo možno vyloučit enterotoxigenní *E. coli* a to dokonce i převládající příslušníky laktóza-pozitivního porostu, který se běžně posuzuje jako kmenzální flóra („negativní nález“). Díky pochopení virologů byl získán cenný negativní výsledek, pokud jde o rotaviry a nekultivovatelné virové původce klinicky podobných lidských infekcí. Vyloučena byla i účast *Giardia intestinalis*, která byla v posledních letech přistižena jako etiologické agens hromadné afebrilní enterokolitidy (4, 12, 14, 16).

Bez zajímavosti není ani nepřítomnost leukocytů ve stolici našich nemocných. Sami jsme viděli ve shodě s literaturou pozitivní nálezy u nemocných dyzentérií a invazivními kmeny *E. coli* (9, 10). V epidemii u jednoho útvaru jsme našli leukocytózu ve stolici většiny pacientů. Dovolila již dva dny před získáním konečného bakteriologického výsledku pojmout oprávněně podezření, že je původcem salmoneliformního klinicko-epidemiologického syndromu ve skutečnosti *Shigella sonnei*.

Pokud jde o povahu toxinu produkovaného etiologickým *Enterobacter cloacae*, zaujaly především vysoké nároky na tepelné zneškodnění aktivity. Obvykle stačí 60 °C po dobu 30 min. Pokusy zorientovat se v event. příbuznosti s analogickým toxinem *E. coli* ztroskotaly na technických obtížích a hlavně na nevyhovující reprodukovatelnosti neutralizačních pokusů.

Inkubační doba asi 10 hodin, vyplývající z našeho rozboru, přibližně odpovídá době, která byla potřebná k dilataci izolované králičí kličky infikované suspenzí našeho enterobaktera. Vidíme v tom další podpůrný argument pro jeho etiologickou roli v popsané epidemii.

Jestliže jsme našli v literatuře zmínku o etiologickém uplatnění toxigenních enterobakterů při sporadických průjmech u etiopských dětí (17), představuje naše pozorování první nález epidemické enterobakterové toxikózy u dospělých při uplatnění komplexní mikrobiologické diagnostiky včetně virologické a parazitologické.

K perspektivám ve výzkumu soudobé epidemiologie střevních nákaz

Prezentovaná nozokomiální epidemie enterobakterové toxikózy je dalším příspěvkem k dlouhodobému výzkumu soudobé epidemiologie střevních nákaz a navazuje na naše dřívější sdělení o uplatnění biologicky aktivních kmenů *E. coli* ve vojenských epidemiích (9). Šlo jednak o dva enteroinvazivní kmeny sérotypu 0124 — původce dyzentériiformních hromadných onemocnění a dále o enterotoxikózy s výsoce pravděpodobnou účastí toxigenního *E. coli*, kvasícího rychle laktózu a sérologicky nety-povatelného. V jedné další epidemii jsme našli původce v anaerobním *Clostridium perfringens*, které vyvolalo obraz afebrilní enterokolitidy. Druhý den již nebyl původce ve stolici nemocných prokazatelný.

Ukazuje se, že koncepce širšího zaměření na podmíněné patogeny s možným epidemickým uplatněním je užitečná a při odpovídajícím podstatném rozšíření laboratorní báze zcela reálná. Lepší orientace v etiologické struktuře epidemií bude ovšem možná jen za předpokladu, že se uskuteční pravidelná a cílevědomá týmová spolupráce kliniků, epidemiologů a mikrobiologů. Musí být rozvinuta již v samém počátku epidemie, což předpokládá i výrazné zlepšení včasné signalizace z terénu. Pro získání uceleného obrazu uplatňujeme širší diagnos-

tiku též při vyšetřování sporadických střevních infekcí, avšak pouze pro smluvní pracoviště. Další zájemce vítáme.

Lze očekávat, že pětiletý výzkum založený na sjednocujících organizačně metodických směrnicích přinese užitečné informace o účasti „nových“ agens, která zatím často unikají v přežívajících laboratorních stereotypech zaměřených na klasické salmonely a shigely. Lze očekávat všeobecnou využitelnost výsledků nejen pro hlubší vědecký přístup, ale vbrzku i pro racionální represivní i profylaktickou činnost.

Souhrn

Při uplatnění nové koncepce širší diagnostiky byla zachycena explozivní nozokomiální epidemie s obrazem afebrilní enteritidy, kterou vyvolal po 10hodinové průměrné inkubaci *Enterobacter cloacae* produkující termolabilní enterotoxin. Kmen byl nalezen u 63,3 % pacientů, zatímco byly v nezávislé sestavě zdravých zachyceny různé enterobaktery pouze u 4 % osob. Komplexní bakteriologické vyšetření neodhalilo další agens, vyloučena byla i účast enteropatogenních virů a *Giardia intestinalis*. Zdůrazňuje se týmový přístup k výzkumu soudobé epidemiologie střevních nákaz, který daleko překračuje přežívající stereotyp salmonela-shigela a opírá se o významně rozšířenou laboratorní bázi.

Literatura

1. Aldová, E.: Bull. čs. Spol. Mikrobiol. ČSAV, 19, 1978, č. 4, s. 11.
2. Benda, R. - Jelínková, A. - Vodák, M. a další: Čas. Lék. čes., 119, 1980, s. 563.
3. De, S. N.: J. Path. Bacteriol., 71, 1956, s. 201.
4. Dykes, A. C. - Juránek, R. A. - Lorenz, D. D. a další: Ann. Intern. Med., 92, 1980, s. 165.
5. Faust, E. C. - Sawitz, W. - Tobie, J. a další: J. Parasitol., 25, 1939, s. 241.
6. Gianella, R. A.: Infect. Immun., 14, 1976, s. 95.
7. Harris, J. C. - Dupont, H. L. - Hornick, R. B.: Ann. Intern. Med., 76, 1972, s. 697.
8. Kahlich, R. - Caha, J.: Inf. zpravodaj VLIS, 19, 1978, s. 51.
9. Kahlich, R. - Nemec, A. - Caha, J. a další: Voj. zdrav. Listy, 51, 1982, č. 3, s. 108.
10. Kahlich, R. - Nemec, A. - Caha, J. a další: Studium metodických předpokladů pro širší diagnostiku střevních nákaz. Závěrečná zpráva o výzkumném úkolu, Praha, 1980.
11. Kahlich, R. - Paleček, A. - Paroubek, M. a další: Bull. Čs. Spol. Mikrobiol., ČSAV, 22, 1981, č. 6, s. 7.
12. Lopez, C. E. - Dykes, A. C. - Juránek, R. A. a další: Am. J. Epidemiol. 112, 1980, s. 495.
13. Neubauer, M.: Střevní onemocnění člověka vyvolaná *Clostridium perfringens*, 1. vydání, Praha 1974.
14. Osterholm, M. T.: N. Engl. J. Med., 304, 1981, s. 24.
15. Sartwell, P. E.: Am. J. Epidemiol. 83, 1966, s. 204.
16. Shaw, P. K. - Brodsky, R. E. - Lyman, D. O. a další: Ann. Intern. Med., 87, 1977, s. 426.
17. Wadström, T. - Aust-Kettis, A. - Hapte, D.: Arch. Dis. Child., 51, 1976, s. 865.

Klíčová slova: Enterobakterové toxikózy; Diagnostika; Střevní epidemie.