

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZDRAVOTNĚ SOCIÁLNÍ FAKULTA

Původci střevních infekcí u dětí a jejich kultivace, diagnostika

Bakalářská práce

Autor práce: Jana Petrová

Vedoucí práce: MUDr. Radim Kramář, CSc.

7.5.2009

Abstract

The thesis **Causers of intestinal infections in children and their cultivaton, diagnostics** deals with intestinal infections in children including cultivation and diagnostics of pathogens. The attention was focused on children population in the age up to 15 years. The practical part was carried out and the data was gained in the laboratory of Laboma, microbiology laboratory Ltd. The biological material was the smear from the rectum of an infected child.

In the theoretical part the attention was paid to the most frequent intestinal agens. From the bacterial agens these are the representatives from the tribe *Enterobacteriaceae*. Beside intestinal these patogens cause also some other diseases. That is why the thesis is focused on the species *Salmonella enterica*, *Shigella sp.*, *Escherichia coli* a *Yersinia enterocolitica*. Rotaviruses and adenoviruses belong among the mentioned viral pathogens.

The objective of the thesis was the evaluation of the operating sequence from the reason of the fastest and the most accurate findings of etiological agens of a particular sick condition- in this case it is a diarrhoeal disease. Further it is the statistical data evaluation from the point of occurrence of intestinal pathogens (bacteria and viruses) in children in the year of 2008.

During the identification of all agens I used the available diagnostic methods carried out in routine microbiology practice. In bacterial invaders they were: cultivation, isolation, serotypization, and final bio chemical identification (bio chemical row). In viral invaders they were: the determination of antigen in the stool on the basis of commercially produced tests.

In biological material I proved the most of mentioned bacteria and viruses. I found out that for the replacement detection of bacteria *Salmonella enterica* serotype Enteritidis it is not possible to rely only on isolation and serotypization. The determination of fenotypical characteristics using bio chemical row is authoritative and designating.

I evaluated the occurrence of the most agents in target population statistically. From the graph it is evident that in bacteria *Salmonella enterica* serotype Enteritidis dramatically prevails.

The result of the study is the fact that if the microorganism is to be correctly identified it is necessary to proceed according to the most suitable available diagnostic methods, by which means the risk of agents replacement is eliminated.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma **Původci střevních infekcí u dětí a jejich kultivace, diagnostika** 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 Zdravotně sociální fakultou elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích, 7. 5. 2009

Podpis studenta:

Poděkování:

Na tomto místě bych chtěla poděkovat především panu doktoru Kramářovi, který mi velmi ochotně pomáhal s celou prací, poskytoval odborné materiály a předával cenné rady a zkušenosti. Dále patří dík laboratoři LABOMA, mikrobiologická laboratoř s.r.o., respektive jejím milým a ochotným pracovníkům za vstřícnost a trpělivost. Na neposledním místě děkuji škole, za možnost vzdělání a seberealizace.

Obsah:

Úvod.....	8
1. Současný stav.....	9
1.1 Střevní infekce virové etiologie u dětí.....	9
1.1.1 <i>Rotavirus</i>	9
1.1.2 Adenoviry.....	11
1.1.3 Ostatní střevní virové agens u dětí.....	13
1.1.3.1 Caliciviry.....	13
1.1.3.2 Astroviry.....	13
1.2 Střevní infekce bakteriální etiologie u dětí.....	14
1.2.1 <i>Salmonella</i>	15
1.2.2 <i>Shigella</i>	16
1.2.3 <i>Escherichia</i>	18
1.2.4 <i>Yersinia</i>	20
2. Cíl práce a hypotézy.....	22
2.1 Cíl práce.....	22
2.2 Předpokládané hypotézy.....	23
3. Metodika.....	24
3.1 Úvod do diagnostiky.....	24
3.2 Charakteristika souboru.....	24
3.3 Identifikace virových agens.....	25
3.4 Identifikace bakteriálních agens.....	26
3.4.1 Souhrn kultivačních půd pro <i>Enterobacteriaceae</i>	26
3.4.2 Algoritmus zpracování biologického materiálu.....	28
3.4.3 Identifikace rodu <i>Salmonella</i>	31
3.4.4 Identifikace rodu <i>Escherichia</i>	33
3.4.5 Identifikace rodů <i>Yersinia</i> , <i>Shigella</i>	34
4. Výsledky.....	35
4.1 Výsledky identifikace jednotlivých agens.....	35

4.1.1	Agens virového původu.....	35
4.1.2	Agens bakteriálního původu.....	35
4.2	Problematika záměny bakterií.....	37
4.3	Statistické vyhodnocení nasbíraných dat.....	37
4.3.1	Výskyt rotavirů a adenovirů u dětí.....	37
4.3.2	Výskyt bakterie <i>Salmonella enterica</i> serotyp Enteritidis u dětí.....	38
4.3.3	Ostatní statistická vyhodnocení.....	39
5.	Diskuze.....	41
6.	Závěr.....	44
7.	Klíčová slova.....	45
8.	Seznam použitých zdrojů.....	46
9.	Přílohy.....	49
9.1	Fotografie.....	49
9.2	Tabulky.....	52
9.3	Použité zkratky.....	55

Úvod:

Infekce střevními patogeny jsou jedním z nejčastějších onemocnění ve světě. Postihují nejen dospělé, ale z velké části i děti. V rozvojových zemích mohou za vysokou dětskou morbiditu a mortalitu. Jejich výskyt je významným epidemiologickým problémem. Proto bývá záležitost střevních infekcí poměrně diskutované téma.

Původci těchto infekcí mohou být bakterie, viry, paraziti aj. Protože je však téma parazitárních infekcí velmi obsáhlé a přesahovalo by rámec této práce, budou zde zmíněny jen střevní patogeny bakteriální a virové etiologie. Mezi ty významnější patří z bakteriálních původců nejčastěji zástupci z čeledi *Enterobacteriaceae*- salmonely, shigely, enteropatogenní *E. coli* či *Yersinia enterocolitica*, z virových pak rotaviry a adenoviry.

Problémem v identifikaci je zvolení nejlepšího diagnostického postupu, zejména s ohledem na vhodnost dané metody. To se také stává jedním z hlavních důvodů, proč mě dané téma zaujalo. Správnou volbou vyšetřovacího postupu můžeme eliminovat zdoluhavé metody v mikrobiologické laboratoři, a tím urychlit další kroky lékařské péče o pacienta napadeného střevními patogeny.

Některé bakterie jsou si svými biochemickými vlastnostmi či antigenní strukturou velmi podobné. Tento fakt znamená, že při nedodržení správného vyšetřovacího postupu nebo přeskočení určitého kroku identifikace může dojít ke komplikacím, nejčastěji záměně agens.

Dnešní laboratorní průkazy, mezi které patří kultivace, biochemická identifikace a jiné metody, jsou na velmi dobré úrovni. I přesto moderní identifikační prostředky nejsou dostačující, pokud není dodržen odpovídající vyšetřovací postup. Z toho důvodu je znalost mikroorganismů a způsobu jejich identifikace nepostradatelná.

1. Současný stav

1.1 Střevní infekce virové etiologie u dětí

Nejčastějšími původci průjmových onemocnění u dětí jsou viry. Jejich výskyt se mění v závislosti na věku, imunitním stavu hostitele, ročním období apod. Podle statistik jsou nejfrekventovanějšími původci dětských abakteriálních gastroenteritid rotaviry, adenoviry, caliciviry a astroviry. Viry většinou přímo poškozují střevní klky enterocytů a snižují resorpční plochu nebo produkují enterotoxin. Inkubační doba se pohybuje od 4 do 48 hodin. Nejpostiženější věkovou skupinou u všech zmiňovaných virových agens jsou děti mezi 1. až 5. rokem života. (2, 23)

1.1.1 Rotavirus

Rod *Rotavirus* patří do čeledi *Reoviridae* (Respiratory, Enteric, Orphan viruses). Je to nejčastější střevní virus, způsobující akutní gastroenteritidy u dětí. *Rotavirus* je zodpovědný také za časté nozokomiální infekce v dětském věku. Často dochází ke vzniku nových antigenních typů a zároveň k šíření zvířecích rotavirů do lidské populace. Rotaviry mají ze všech střevních infekcí způsobených viry nejzávažnější průběh. V současnosti procházejí velmi zřetelným vývojem. (12, 28)

Morfologie, genom a antigenní struktura. Název rotaviru vznikl podle jeho morfologického vzhledu v elektronovém mikroskopu (lat. rota, kolo), obr. č. 1. Kompletní zralá částice měří 75 nm. V některých zdrojích se vyskytuje tvrzení, že dospělá částice viru má dvojitou kapsidu, většina odborné literatury však uvádí, že je obklopena trojitou kapsidou o kubické symetrii. *Rotavirus* patří mezi viry neobalené, obsahující genetickou informaci ve formě lineární, dvouvláknové RNA, která se skládá z 11 segmentů. Každý tento segment kóduje alespoň jeden strukturální nebo nestrukturální protein. Ve výběžcích virionu se nachází důležitý protein VP4, odpovídající mj. za přilnutí viru na specifický receptor. V zevní vrstvě kapsidy je

typově specifický glykoprotein VP7. Skupinově a podskupinově specifickým antigenem je protein VP6, uložený ve střední vrstvě kapsidy.

Podle struktury proteinu VP6 se rotaviry antigeně člení na šest serologických skupin A až F. Podle antigenního složení VP4 a VP7 se rozeznává ke dvaceti serotypům P a G. Lidské rotaviry nalézáme jen ve skupinách A, B a C. Nejčastějším původcem humánních infekcí je skupina A. (1,10)

Patogenita a patogeneze. Rotaviry jsou nejvíce patogenní pro malé děti. Přesto, že v některých případech může infekce probíhat inaparentně z důvodu možné přítomnosti protilátek, většina rotavirů způsobují závažné průjmy s rizikem vzniku dehydratace. Ta je u dětí velmi nebezpečná a může končit smrtí. (28)

Viry napadají zralé epiteliální buňky vrcholků klků v horních dvou třetinách tenkého střeva, zejména v duodenu a proximální části jejunu. Receptorem virů je betagalaktosidasa. Porucha její funkce hraje v patogenezi onemocnění významnou roli. Cukerná složka potravy zůstává nerozštěpena a dostává se do tlustého střeva. V tlustém střevě začnou být disacharidy štěpeny bakteriemi. Vzniká plyn, který rozepíná střevo a dochází k poruše resorpce vody. Výsledkem je průjem a případná dehydratace.

V patogenezi rotavirové infekce se kromě invazivity viru významně uplatňuje také enterotoxin NSP4. V posledním desetiletí byly prováděny také výzkumy na myších modelech. Zjišťováním mechanismů patogeneze můžeme přispět nejen k lepšímu porozumění virů, ale především k vypracování účinné léčby. (24, 28, 29)

Epidemiologie. Rotavirus je nejčastějším původcem virových gastroenteritid kojenců a malých dětí. Inkubační doba je přibližně 2 dny, přenos se děje cestou fekálně orální. Virus je ve stolici přítomen 7 až 10 dnů. U primární infekce stačí pouze 10 rotavirových částic k vyvolání příznaků nemoci. Ve stolici akutně nemocných dětí jsou rotaviry přítomny ve vysoké koncentraci. V prvních čtyřech dnech onemocnění je to až 10^9 - 10^{11} virových partikulí v 1 ml stolice. Běžná infekční dávka je přibližně 0.001 ml filtrátu stolice. (24, 28)

Celosvětově převládají 4 serotypy rotavirů, jejichž prevalence je různá podle geografické oblasti. Nejčastěji se vyskytuje serotyp 1 skupiny A rotavirů. Byl zjištěn až u 53% všech rotavirových infekcí na světě. Infekce se v podmínkách mírného

podnebního pásma objevují celoročně, maximum výskytu je především v zimě a prvních jarních měsících. U novorozenců a kojenců většinou infekce probíhá latentně, asymptomaticky. Předpokládá se, že příčinou lehce nebo bezpříznakových nákaz u novorozenců jsou látky obsažené v kolostru a mateřském mléce. Nejvyšší riziko pro závažný průběh mají děti ve věku 4 měsíců až 3 let. Odhaduje se, že celosvětově asi 600 tisíc dětí ročně na rotavirovou infekci umírá. Většina z nich je v posledních letech opakovaně, s rostoucí frekvencí, hlášena z rozvojových zemí. K epidemickému šíření dochází také v porodnicích a zařízeních pro nedonošené děti. U rotavirových infekcí je třeba počítat s možností zavlečení nových kmenů ze zahraničí, proti kterým v populaci nejsou protilátky. Tyto kmeny mohou vážně ohrozit novorozence již v prvních dnech života.(24, 29)

Nejdůležitějším krokem léčby je rehydratace a obnovení acidobazické rovnováhy. Pro prevenci byla vyvinuta účinná vakcína, byla však zakázána, protože u některých dětí po očkování došlo k akutní neprůchodnosti střeva a v několika případech byla tato komplikace smrtelná.(30)

1.1.2. Adenoviry

Mezi další významné viry, způsobující střevní infekce u dětí patří adenoviry. Čeleď *Adenoviridae* se dělí do čtyř rodů. Lidské a zvířecí adenoviry patří do rodu *Mastadenovirus* (řecky mastos, prs). Adenoviry postihují především sliznice, mohou také perzistovat v lymfatické tkáni. U malých dětí způsobují zejména akutní rhinofaryngitidu, z hlediska střevních infekcí se podílejí na dětských gastroenteritidách. (28)

Morfologie a antigenní struktura. Velikost adenovirů je zhruba 80 nm. Stejně jako rotaviry patří mezi neobalené viry s kubickou symetrií kapsidy. Kapsida viru je tvořena kulovitými proteinovými podjednotkami- kapsomerami. Skládá se z 240 hexonů a 12 vrcholových pentonů. Celý tento komplex pak dává virionové částici tvar dokonale pravidelného dvacetistěnu, obsahující množství antigenů, obr. č. 2.

Dosud je známo 47 serotypů adenovirů patogenních pro člověka. Původně byly děleny podle onkogenity pro novorozené křečky a schopnosti aglutinovat krysí a opičí erythrocyty. Dnes se dělí na sedm poddruhů A až F podle homologie nukleotidových sekvencí. Antigeny adenovirů se uplatňují v různých typech stanovení, například imunofluorescenci či neutralizační reakci. (28)

Patogenita a patogeneze. Z hlediska střevních infekcí jsou patogenní pouze dva typy adenovirů, typ 40 a 41. Průjmem se projevuje zhruba polovina infekcí vyvolaných těmito typy. Postihují malé děti do 4 let věku. (26, 28)

Adenoviry významně ovlivňují imunitní mechanismy hostitele. Příznaky akutní adenovirové infekce vyplývají z rozpadu řady buněk nakažených virem a ze zánětlivé reakce na toto poškození. Uplatňuje se schopnost adenovirů syntetizovat během svého množení proteiny, které potlačují buněčnou odpověď na interferony α a β . Dále mají viry schopnost zasahovat do regulací apoptózy, která je indukovaná cestami TNF α a Apo/Fas. Mohou tedy zamezit nebo oddálit smrt hostitelské buňky. Adenoviry využívají pro vstup do hostitelské buňky povrchové molekuly, resp. adhezivní molekuly. Receptorem pro vstup je integrinový heterodimer $\alpha_2\beta_1$ (VLA-2). (19, 28)

Epidemiologie. U střevních infekcí se adenoviry šíří fekálně orální cestou, inkubační doba je 2 až 5 dnů. Jsou druhým nejčastějším virovým agens odpovědným za akutní gastroenteritidu. Ta se vyskytuje nejen u menších dětí, ale i u kojenců. Adenoviry se přenáší zejména v dětských kolektivech kontaminovanými předměty. Virový průjem je velmi často sezónní a probíhá epidemicky. Během akutního stadia choroby se vylučují velká množství virů, které jsou zodpovědné za rozšiřování epidemie. Existují zprávy, že k maximálnímu vylučování virů do stolice u pacientů s akutní gastroenteritidou dochází 3. až 13. den poté, co se objeví symptomy. Adenoviry vyžadují poměrně dlouhou dobu hospitalizace dětí. Jistou možností je tak šíření nozokomiálních nálezů nejen na ostatní pacienty dětského věku, ale i na osoby imunitně oslabené. (2, 7)

1.1.3 Ostatní střevní virové agens u dětí

Dalšími původci virových průjmů u dětí jsou caliciviry či astroviry. Tyto agens se vyskytují epidemicky, často bezpříznakově. Někdy vyžadují hospitalizaci, ale většinou jde o mírně probíhající infekci. Vzhledem k tomu, že se v běžné laboratorní praxi nediodnostikují, budou zde popsány pouze stručně.

1.1.3.1 Caliciviry

Čeľad *Caliciviridae* zahrnuje čtyři rody, z nichž patogenní pro člověka je pouze *Norovirus* a *Sapovirus*. Oba rody způsobují akutní gastroenteritidu v dětském věku. Onemocnění trvá 1 až 4 dny, inkubační doba je 1 až 2 dny. *Norovirus* (často označován také jako Norwalk virus) je poměrně odolný patogen, vektorem infekce je voda. Vyskytuje se tedy v nedostatečně upravené pitné vodě či koupalištích. Caliciviry podobné viru Norwalk (Norwalk-like viruses) jsou vysoce infekční a vyvolávají epidemické průjmy ve všech věkových skupinách. *Sapovirus* je patogen zejména malých dětí do 5 let věku. U novorozenců působí bezpříznakové infekce, u kojenců a starších dětí celkem mírně probíhající akutní gastroenteritidy. (28)

1.1.3.2 Astroviry

Čeľad *Astroviridae* obsahuje jediný rod patogenní pro člověka, tj. *Mamastrovirus*. Podobně jako caliciviry jsou odolné vůči extrémním hodnotám pH apod. Jsou běžnými původci průjmů, zvláště u dětí do 5 let. U starších dětí lze pozorovat také mimostřevní příznaky, jako je bolest hlavy či zvýšená teplota. Infekce je častější v zimních měsících, mnohdy inaparentní. (28)

1.2 Střevní infekce bakteriální etiologie u dětí

Bakteriální agens jsou z hlediska výskytu střevních onemocnění méně časté než viry. I přesto mohou vyvolávat závažné infekce pacientů dětského věku. Bakterie působí přímo invazivně ve sliznici (enteroinvazivní) nebo vytváří enterotoxin (enterotoxické). Kvůli poměrně široké škále bakterií, které mohou u dětí vyvolat střevní infekci se v práci budu věnovat pouze několika častým a významným bakteriím z čeledi *Enterobacteriaceae*. Jsou jimi salmonely, shigely, enteropatogenní *E. coli* a *Yersinia enterocolitica*. (23, 28)

Enterobakterie jsou gramnegativní nesporulující tyčky, dlouhé kolem 2 až 3 μm a široké 0,5 až 0,8 μm . Patří mezi fakultativně anaerobní mikroorganismy, většina disponuje schopností pohybu. Z pohledu klinické mikrobiologie jsou *Enterobacteriaceae* nejdůležitější čeledí gramnegativních tyček. Morfologicky se od sebe liší jen málo, což snižuje význam mikroskopie v diagnostice. Jsou saprofyty i patogeny nejen pro člověka, ale i pro živočichy a rostliny. Enterobakterie fermentují cukry, jsou katalasa pozitivní, oxidasa negativní a redukují nitráty. (14, 28)

Jsou známy tři resp. čtyři typy antigenů. O-antigen je lipopolysacharidový komplex, přítomný v buněčné stěně bakterie (vnější polysacharidový řetězec LPS). Tento antigen se využívá především pro identifikaci, je druhově a typově specifický. Jednotlivé antigenní typy se zpravidla značí čísla (například O55, O111). H-antigen je tvořen polymerizovanou bílkovinou flagelinem a nazývá se také antigen bičíkový, je tedy přítomný pouze u enterobakterií pohyblivých. Je termolabilní a stejně jako O-antigen se používá k identifikaci. K-antigen je kapsulární antigen pouzdra, tvoří ho kyselé polysacharidy a někdy může tento antigen maskovat ostatní Ag. Je relativně málo významný pro diagnostiku. Specifickým antigenem je Vi antigen (mikropouzdro) významný především u druhu *Salmonella Typhi*. (14, 23, 28)

Enterobakterie disponují různými faktory virulence. Jsou jimi např. LPS, adhezivní faktory (fimbrie), exotoxiny (cytotoxiny, enterotoxiny), IC přežívání či rezistence k ATB. Pro diferenciaci se používají především jejich biochemické vlastnosti. Rostou na většině běžných kultivačních půd. Růstové optimum je 37°C. (8)

1.2.1 *Salmonella*

Rod *Salmonella* se skládá ze dvou druhů. *Salmonella enterica*, který se dále dělí do 6 poddruhů a *Salmonella bongori*. Během desetiletí byly popisovány nové sérovary, které byly označovány jako druhy podle jiných taxonomických kritérií nežli dnes. Názvy častěji se vyskytujících sérovarů salmonel jsou však dnes již zažitá a důležitá pro etiologii a epidemiologii. Bylo by nerealistické je zavrhnout a nahradit antigenní formulí, která je pro označení sérovarů jinak běžná. Proto jsou tato označení ponechána, avšak graficky odlišena, např. *Salmonella enterica* subspecies *enterica* sérovar Typhi byla zkrácena na *Salmonella* Typhi. V dnešní době existuje více než 2000 sérovarů, z toho 1435 těchto sérovarů náleží do druhu *Salmonella enterica*.

V souvislosti s nejčastějšími a nejvýznamnějšími střevními salmonelami u dětí budou v této práci popsány primárně zoopatogenní salmonely, tedy druh *Salmonella enterica*. (18, 28)

Morfologie, biochemické vlastnosti. Stejně jako ostatní enterobakterie je *Salmonella enterica* nesporulující gramnegativní tyčka dlouhá 2 až 3 μm , široká 0,5 až 0,8 μm . Vzhledem k tomu, že se svou morfologií nijak neliší do ostatních gramnegativních tyček, její diagnostika je z hlediska mikroskopie nepřesná. *Salmonella enterica* je pohyblivá.

Salmonely mají charakteristické biochemické vlastnosti. Neštěpí laktosu a sacharosu, štěpí mannitol, využívají citrát, produkují sirovodík a jsou indol negativní. Na selektivně diagnostických půdách (McConeky, Endova půda) rostou v bezbarvých koloniích, na DC agaru navíc s černým středem. Glukosu štěpí za tvorby plynu. (28)

Patogenita a patogeneze. Nejrozšířenější alimentární infekce v ČR je salmonelóza, vyvolaná nejčastěji serotypem *Salmonella* Enteritidis (O:9, H:gm). Pro onemocnění jsou charakteristické průjemy bez přítomnosti krve ve stolici a zvracení. Téměř vždy je přítomna horečka. U malých dětí hrozí salmonelová seps, která bývá smrtelná. Jsou možné i další komplikace, např. meningitida. K infekci je nutná poměrně vysoká infekční dávka. Většinou se uvádí 10^5 až 10^8 bakterií, záleží na stavu hostitele. U dětí a starších osob je infekční dávka podstatně nižší.

Bakterie se váží na mikrovili sliznice střeva, zejména kyčelníku pomocí specifických adhesinů na bakteriálním povrchu. Adhesiny se váží na receptory obsahující mannosu. Dochází k degeneraci mikrovilů a salmonely mohou pronikat do buněk. (22, 28)

Epidemiologie. Inkubační doba salmonelových onemocnění je 12 hodin až 5 dnů, nejčastěji však 24 až 48 hodin. *Salmonella enterica* se přenáší fekálně-orální cestou. Přenos většinou vyžaduje potravinu jako vehikulum. Zdrojem infekce bývá drůbež, zejména vodní. Nebezpečná jsou kontaminovaná vejce a nedostatečně tepelně upravené drůbeží maso. Teplota zpracování drůbežního masa neměla klesnout pod 75 °C. Onemocnění trvá přibližně 7 dní, u dětí je často nutná hospitalizace vzhledem k hrozcím komplikacím.

Mnohdy bývají salmonely vylučovány hostitelem i po odeznění symptomů. Salmonely se vyskytují často sezónně. Zvýšený výskyt bývá pozorován spíše v letních měsících. Epidemiologické studie v různých částech světa prokázaly, že např. v afrických zemích bývá vyšší počet dětí nakažených salmonelózou během či po deštivém období. Globální studium patogeneze salmonel má významný vliv na epidemiologii, prevenci a terapii. (15, 28)

1.2.2 *Shigella*

Rod *Shigella* se řadí stejně jako rod *Salmonella* do čeledi *Enterobacteriaceae*. Je výhradně lidským patogenem. Existují čtyři druhy- *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Shigella boydii* a *Shigella dysenteriae*. Druhé určení shigel je dáno typizací pomocí O-antigenů. Shigely způsobují střevní onemocnění zvané shigelóza či bacilární dysenterie, vyskytující se především u dětí. Nejčastějším původcem onemocnění je z 90% *Shigella sonnei*. (22, 28)

Morfologie, biochemické vlastnosti. Shigely jsou gramnegativní, nepohyblivé tyčky. Většina morfologických znaků je shodná s ostatními zástupci z čeledi *Enterobacteriaceae*.

Biochemicky jsou shigely málo aktivní. Těžko se odlišují od některých kmenů *Escherichia coli*. Štěpí glukózu bez tvorby plynu, netvoří sirovodík, nehydrolyzují močovinu, neutilizují citrát jako zdroj uhlíku. (21, 28)

Patogenita a patogeneze. Onemocnění, které způsobuje *Shigella* je známé pod pojmem shigelóza. Vyznačuje se četnými vodnatými průjmy a tenesmy, tedy frekventní neovladatelná nucení na stolici. Ta často obsahuje hlen a hnis, vzhledem k časté ulceraci střeva může být přítomna krev. Mnohdy se může vyskytovat také horečka, slabost a křeče v břiše. Vzhledem k tomu, že shigely většinou nepronikají do submukózy, nevzniká bakteriémie ani systémové onemocnění. Záchyt z krve je spíše výjimečný. Patogenitu je možno testovat na buněčných kulturách nebo na morčecí konjunktivě, kde vyvolává hnisavou keratokonjunktivitidu. (21, 28)

Hlavním mechanismem patogenního působení je průnik do buněk sliznice tlustého střeva, intracelulární množení v těchto buňkách a jejich poškození za vzniku nekrosy a vředu. Při invazi využívají invaziny Ipa, které se váží na integrity na povrchu M-buněk Peyerových plaků. (28)

Výlučně u kmenů *Shigella dysenteriae* se uplatňuje tzv. shiga toxin. Jde o termostabilní enterotoxin, který má účinky enterotoxické, neurotoxické a cytotoxické. Shiga toxin patří do stejné skupiny toxinů jako je cholery toxin nebo toxiny tvořené enterotoxickými kmeny *E. coli*. Tyto toxiny mají dvě podjednotky. Oligomer B, tvořený pěti identickými subjednotkami, který se naváže na receptor v membráně napadené buňky. Enzymaticky aktivní podjednotka A pronikne do buňky a ovlivní její metabolismus. B podjednotka Stx se váže na glykolipidový receptor v buněčné membráně, podjednotka A inhibuje syntézu bílkovin buňkou, kterou tak činí neschopnou života. Stx se váže na epitel střevní sliznice a ničí ho. Proniká i do oběhu, kde nachází odpovídající receptory v ledvinách a v endotelu kapilár. Možnou terapií se proto jeví blokování receptorů pro Stx. (13, 22)

Epidemiologie. Zdrojem infekce je nemocný nebo rekonvalescent, inkubační doba je 3 až 7 dnů. Stejně jako u salmonel se shigely přenášejí fekálně-orální cestou. Infekční dávka je poměrně nízká, asi 100 bakterií. U dětí je nejčastějším druhem *Shigella sonnei*, nejnebezpečnějším *Shigella dysenterie*, která se však vyskytuje nejméně, většinou jako

import z tropů a zemí jihovýchodní Asie. Shigely jsou výhradně lidským patogenem, proto je onemocnění čistě lidskou infekcí bez zvířecích rezervoárů. K přenosu dochází alimentární cestou přes kontaminované potraviny a vodu. Jako mechanický faktor přenosu se mohou uplatňovat mouchy. Jedná se o typickou nemoc špinavých rukou. Rizikovým prostředím u dětí jsou školky, letní tábory, sociální ústavy či ostatní dětská zařízení. Pro objasnění epidemiologické souvislosti je využívána významná metodika zvaná kolicinotypizace. Vychází z toho, že některé kmeny *Shigella sonnei* produkují exoproteiny antibiotické povahy, tzv. koliciny.

V posledních letech došlo k významnému poklesu incidence onemocnění, v rozvojových zemích jsou shigely stále významným patogenem. (4, 5, 22)

1.2.3 *Escherichia*

Druh *Escherichia coli* je považován za jeden z nejznámějších. Přesto, že existují i ostatní druhy v tomto rodu, pro medicínu má největší význam právě *E. coli*. Je to fakultativně anaerobní bakterie z čeledi *Enterobacteriaceae*. Přítomnost bakterie *Escherichia coli* ve střevě je nezbytným předpokladem pro správné fungování trávicích procesů, je tedy významnou součástí střevní mikroflóry. Je komenzálem, částečně saprofytem a také symbiontem.

E. coli má velké uplatnění nejen v mikrobiologii. Je využívána jako modelový organismus důležitý např. v genetice. Jakožto pomocná složka se uplatňuje také při výrobě inzulínu. (28)

V dnešní době je známo poměrně velké množství serotypů. Podle patogenních vlastností (O-antigeny) se pak bakterie dělí na jednotlivé kmeny (patovary)- enteropatogenní, enterotoxigenní, enteroinvazivní, enterohemoragické, v poslední době dosti popisovaný kmen enteroagregativní a zatím málo prozkoumaný kmen difúzně adherentní. U dětí se nejčastěji vyskytuje EPEC, proto bude práce zaměřená na tento kmen. Charakteristika kmenů je uvedena v příloze, tabulka č. 1, obr. č. 5. (26)

Morfologie, biochemické vlastnosti *E. coli* je gramnegativní, nesporulující, pohyblivá tyčka se zaoblenými konci. Biochemicky je to průměrně aktivní enterobakterie. Štěpí glukosu a laktosu za tvorby plynu. Tvoří indol, neštěpí močovinu.

Patogenita a patogeneze. *E. coli* je podmíněně patogenní bakterie. U dětí může dojít k závažným střevním infekcím. Následkem průjmů dochází k poměrně rychlé dehydrataci a v některých případech dochází ke smrti dítěte. Kmen EPEC napadá malé děti nejčastěji do 1 roku. Infekce se projevuje vodnatým průjmem bez příměsi krve, často s horečkou. (17)

Ve střevě je patogenní jen tehdy, když je kmen vybaven specifickými faktory virulence. Kmen EPEC disponuje takovými faktory, které vedou ke vzniku novorozeneckých průjmů. Enteropatogenní *E. coli* netvoří enterotoxiny. V patogenezi se obvykle uplatňuje adheze na sliznici tenkého střeva (vazba na enterocyty) a následné rozpouštění mikrokloků. Tím dojde k alteraci epiteliálního povrchu, destrukci kartáčového lemu a omezení absorpce živin, elektrolytů a vody. (1,28)

Epidemiologie. Zdrojem infekce bývá nemocný člověk, často se symptomatickou formou onemocnění. Nákaza se šíří fekálně orální cestou. Protože je *E. coli* poměrně odolná, je možný i přenos kontaktem. Inkubační doba u enteropatogenních kmenů *E. coli* je 9 až 12 hodin. Za ideálních podmínek dosahuje její generační doba 20 minut. Období nakažlivosti trvá po celou dobu vylučování patogenů ze stolice. Nejčastěji bývají postiženi děti do 1 roku věku, které jsou na EPEC poměrně vnímavé. Proto jsou důležitá mj. i preventivní, protiepidemiologická opatření, avšak vzhledem k ubikvitárnímu výskytu příslušných kmenů je obtížné odhalit zdroj nákazy. (4, 26, 28)

Kmeny EPEC jsou závažnou nozokomiální nákazou, zejména na neonatologických jednotkách, kde zdrojem infekce novorozence bývá matka. V terapii má rozhodující význam rehydratace. Důležitým ochranným faktorem je také kojení. U malých dětí se podávají perorálně aminoglykosidová antibiotika, u větších je lékem volby nejčastěji gentamicin. (1, 26, 28)

1.2.4 *Yersinia*

Rod *Yersinia* spadá do čeledi *Enterobacteriaceae*. Přesto, že existuje kolem 10 druhů této bakterie, pro střevní infekce je důležitý druh *Yersinia enterocolitica*. Je obligátně patogenní, způsobuje onemocnění zvané enterocolitida. *Yersinia* má vysokou afinitu k lymfatické tkáni, což se projevuje u případných komplikací. Nejčastěji se vyskytující serotyp v Evropě je O:3, který je také nejvíce vyšetřovaný a má tedy největší význam pro diagnostiku. (26, 28)

Morfologie, biochemické vlastnosti. *Yersinia enterocolitica* je drobná, rovná gramnegativní tyčka. Pohybuje se pomocí bičků, maximálně však do teploty kolem 25°C. Při vyšších teplotách se bakterie stává nepohyblivou. (17)

Z hlediska základních biochemických vlastností je *Yersinia* jen málo odlišitelná od ostatních bakterií z čeledi *Enterobacteriaceae*. Je laktosa negativní, netvoří plyn. Velmi charakteristické je pro ní však štěpení močoviny. (17, 28)

Patogenita a patogeneze. *Yersinia enterocolitica* většinou vyvolává lehké střevní onemocnění, které klinickým obrazem často připomíná zánět slepého střeva (pseudoapendicitida). U školních dětí jsou velmi typické bolesti břicha s horečkou, průjem nemusí být přítomný vždy. Protože je bakterie značně lymfotropní, často se může vyskytnout také zánět mezenterálních lymfatických uzlin. Někdy dochází ke komplikacím, např. zánět kloubů. (28)

Yersinia má ostrov vysoké patogenity. V patogenezi onemocnění se uplatňují různé faktory virulence, odlišné pro každý druh. Chromosomálně kódované faktory virulence pro druh *Yersinia enterocolitica* jsou Inv a Ail. Oba tyto faktory patří mezi adhesiny a umožňují transport bakterie přes epiteliální bariéru hostitele. Velmi významný je také membránový protein, který je součástí Yops, tzn. proteinů vnější membrány. (17, 28)

Epidemiologie. Bakterie se přenáší fekálně orální cestou stejně jako ostatní střevní patogeny. Inkubační doba se pohybuje od 4 do 7 dnů. Rezervoárem infekce je kromě člověka také prase domácí, zdrojem je tedy nejčastěji vepřové maso. Často může být zdrojem také voda či dokonce nedostatečně tepelně zpracované ovocné šťávy. U těžších

forem onemocnění bývají postiženy děti starší 5 let a adolescenti. Nemoc trvá přibližně 4 týdny, u dospělých se doba rekonvalescence pohybuje kolem 1 až 2 týdnů. Vědci dospěli k závěru, že se v posledních několika letech zvýšila prevalence onemocnění způsobená touto bakterií. V prevenci infekce jsou proto nezbytná přísná hygienická opatření. (9, 17)

Morfologie bakterie pod světelným mikroskopem a vzhled kolonií po jednodenní kultivaci jsou uvedeny v příloze, obrázek č. 3, 4.

2. Cíl práce a hypotézy

2.1 Cíl práce

Přestože moderní medicína nabízí dnes již velmi kvalitní metody k diagnostice střevních infekcí, nejdůležitější je vybrat metodu nejvíce vhodnou, citlivou a efektivní.

Problémem v určování střevních infekcí u dětí (ale i u dospělých) je správná volba identifikace. Zkušenosti a znalosti jednotlivých patogenů i metod jsou pro určení průjmových onemocnění u dětí nepostradatelné. Nevhodně zvolený postup znamená výrazné zpomalení identifikace, což je zejména u dětí riskantní. Může také dojít k mnohem závažnějšímu problému, tzn. záměně agens.

Cílem práce je provedení identifikace zmiňovaných patogenů a následné zjištění vhodnosti vyšetřovacího postupu s ohledem na rychlost identifikace a vhodnost užívaných metod. Dále pak statistické vyhodnocení výskytu střevních patogenů u dětí. Protože se práce týká různých střevních agens včetně méně častých v loňském roce (tj. 2008), bude zde shrnut výskyt těch častěji se vyskytujících.

Vhodným modelem pro posouzení, zda je vyšetřovací postup správně zvolený a efektivní, se jeví bakterie *Salmonella enterica* serovar Enteritidis, bude jí tedy věnována větší pozornost.

Zmiňovaná problematika, respektive dílčí součásti celkového cíle práce lze shrnout do tří bodů:

- 1) provedení identifikace zmiňovaných patogenů
- 2) určení nejvhodnějšího vyšetřovacího postupu při identifikaci bakterie *Salmonella enterica* serotyp Enteritidis a zaměření se na postup práce při záměně agens (*Salmonella* x *Citrobacter*)
- 3) statistické vyhodnocení a částečné porovnání získaných dat

2.2 Předpokládané hypotézy

I dobře známou agens (např. salmonely nebo shigely) lze při nevhodném identifikačním postupu zaměnit s jinými rody bakterií. Tento problém vzniká většinou z důvodu snahy o co nejrychlejší určení patogena.

Serotypy rodu *Salmonella* je možné při opomenutí správného pořadí vyšetření chybně stanovit. Z hlediska fenotypických a antigenních vlastností je *Salmonella* dosti podobná rodu *Citrobacter*. Při identifikaci hrozí riziko záměny bakterií a to již po prvotní kultivaci. Opomenutí či přeskočení následujícího pracovního postupu znamená nesprávnou identifikaci, proto se musí případný výskyt chyby (záměny) co nejdříve odhalit. Z toho důvodu byly stanoveny následující hypotézy, resp. výzkumné otázky.

- 1) Pokud je po primární kultivaci *Salmonella enterica* chybně považována za rod *Citrobacter*, lze odhalit tento fakt již po izolaci či serotypizaci?
- 2) Je pro odhalení záměny bakterií nutné provést až konečné určení biochemickou řadou (poslední krok identifikace)?

3. Metodika

3.1 Úvod do diagnostiky

V této části práce se budu zabývat základními postupy identifikace střevních patogenů u dětí. Tyto postupy jsou běžné v rutinní laboratorní praxi. Výsledky často nebývají od začátku jednoznačné, proto je za potřebí využívat všech dostupných metod ke spolehlivému určení o jaké mikrobiální agens se jedná. Mezi ně patří kultivace a ostatní diagnostické metody.

Střevní virové patogeny se nejlépe diagnostikují na základě složitých metod, jako je elektronová mikroskopie. Nejsou však většinou mikrobiologických laboratoří dostupné technicky ani ekonomicky. Proto se využívají jiné, základní metody, které zaručují spolehlivou identifikaci.

Bakteriální původci gastroenteritid se diagnostikují na základě několika metod. První z nich je kultivace, považovaná za základ identifikace. Dále jsou zjišťovány fenotypické (biochemické) vlastnosti bakterií tzv. biochemickou řadou. Poslední metodou je serotypizace, čili určení serotypu.

V práci popíšu základní diagnostiku všech zmiňovaných patogenů včetně algoritmu zpracování biologického materiálu. Vzhledem k dostačujícímu množství dat pro statistické hodnocení a také osobní zainteresovanosti se budu podrobně věnovat určování bakterie *Salmonella enterica*.

3.2 Charakteristika souboru

Data pro zpracování jsem získala výhradně z databáze laboratoře LABOMA, mikrobiologická laboratoř s.r.o, která je velmi ochotně poskytla. Veškeré informace jsou podrobeny povinné mlčenlivosti a proto zmiňovány anonymně. Téma bakalářské práce se věnuje pacientům dětského věku, cílová populace se tedy vztahuje na děti do 15 let. Tento věk byl stanovený dohodou s lékaři. Při statistickém hodnocení jsem použila informace vztahující se na jednotlivé pacienty, kontrolní vyšetření nejsou

zahrnuta. Údaje o výskytu zmiňovaných patogenů u dětí jsou sledovány za celý rok 2008, tzn. v období od ledna do prosince 2008.

3.3 Identifikace virových agens

Pro běžnou identifikaci rotavirů a adenovirů se rutinně provádí určení antigenu ve stolici. V dnešní době si mikrobiologické laboratoře objednávají jednoduché a finančně dostupné diagnostické testy pro průkaz těchto virů. Jedním z nich je test VIKIA® Rota-Adeno vyráběný firmou bioMérieux.

Jedná se o rychlý test pro kvalitativní dvojistou detekci rotaviru a adenoviru v lidské stolici. Je založený na imunochromatografické technice. Imunologické techniky se používají poměrně často. Důvodem je obtížná až nemožná buněčná kultivace rotavirů a adenovirů. Rychlá diagnóza infekčního agens umožňuje vyloučení neodpovídající antibiotické léčby a rychlou izolaci infikovaného pacienta.

Princip. VIKIA Rota-Adeno je kvalitativní test založený na asociaci monoklonálních protilátek specifických pro rotavirus resp. adenovirus. Test využívá imunologických reakcí prováděných na testovacím stripu prostřednictvím migrace.

Složení. Souprava obsahuje chromatografickou membránu, na níž je v testovací oblasti fixována monoklonální protilátka proti rotaviru, resp. adenoviru (oblasti označované jako R resp. A) a v kontrolní oblasti (označené jako C) je fixována polyklonální protilátka proti myšimu IgG.

Testovací strip je impregnovaný konjugátem, skládajícím se ze směsi monoklonálních protilátek proti rotaviru kondenzovaných na modře obarvené polystyrenové mikrosféry a monoklonálních protilátek proti adenoviru na červeně obarvené polystyrenové mikrosféry.

Pracovní postup. Diagnostický test je výhodný zejména kvůli jeho jednoduchému použití. Veškerá práce prakticky spočívala v tom, že jsem soupravu připravila na testování a vzorek jsem přidala do jamky určené pro vzorek. Ten je získaný odběrem 1 až 2 ml (g) stolice, kterou jsem smíchala s dilučním pufrem (fosfátový pufř o pH 7,2 + 0,9 g/l azidu sodného). Vzorek pak kapilárními silami migroval podél membrány.

Vyhodnocení. Komplexy antigen-protilátka migrují podél membrány a naváží se na protilátky proti rotaviru resp. adenoviru, přičemž vytvoří komplexy zviditelněné modrou, resp. červenou linií v oblastech testovací linie membrány. Jestliže se tedy objeví modrá linie v testovací oblasti R, vzorek je pozitivní na rotaviry, červená linie v oblasti A označuje pozitivitu na adenoviry. Může také docházet k vytvoření obou linií, v tomto případě je vzorek pozitivní na rotavirus i adenovirus. Jako procedurální kontrola slouží zbarvená linie, která se vždy objeví v oblasti kontrolní linie C, pokud byl test proveden správně. (7)

Jak již bylo zmíněno, pro diagnostiku rotavirů a adenovirů se využívá také ne vždy dostupná elektronová mikroskopie. Rotaviry mají poměrně specifický vzhled a proto jsou snadno morfologicky rozpoznatelné.

Pro určení střevních virových infekcí je průkaz antigenu ve stolici nemocného plně vyhovující a využívaný jak u dětí, tak u dospělých. Relativní citlivost testu je 97,6%, relativní specifická téměř 100%. (7)

3.4 Identifikace bakteriálních agens

U bakterií je vždy prvním krokem diagnostiky kultivace na diagnostických a selektivně-diagnostických půdách. Další volba identifikace se liší podle druhu bakterií a názoru mikrobiologa. Dnes jsou již zažité zvolené postupy, podle kterých se laboratoře řídí. V práci bude popsána kultivace a diagnostika bakterií rodů *Shigella*, *Yersinia*, *Escherichia* a podrobněji *Salmonella*. (28)

3.4.1 Souhrn použitých kultivačních půd pro *Enterobacteriaceae*

V diagnostice enterobakterií má kromě biochemické identifikace zásadní význam kultivace. Protože jsou enterobakterie fakultativně anaerobní, rostou na většině běžných mikrobiologických půd aerobně i anaerobně. Pokud se v praxi jedná o podezření na střevní infekci způsobenou bakteriemi, primárně se očkuje na standardní

škálu kultivačních půd pro střevní patogeny. Těmi jsou půda McConkey, DC půda, Endova půda a pomnožovací tekutá půda Selenitová.

Záměrem této práce však není konkretizování jednotlivých součástí diagnostiky, např. kultivačních půd nebo jednotlivých fází práce se vzorkem, např. odběr materiálu, budu je proto zmiňovat pouze obecněji.

McConkeyho půda. Tato kultivační půda existuje v rozmanitých variantách. Výběr vhodné varianty je podmíněný tím, za jakým účelem chceme půdu použít. Je méně až středně selektivní, rostou na ní některé gramnegativní bakterie, zejména bakterie z čeledi *Enterobacteriaceae*. Považuje se také za diagnostickou, protože obsahuje laktosu a dovoluje tedy rozlišovat gramnegativní bakterie na laktosu štěpící (pozitivní) a neštěpící (negativní).

Deoxycholát-citrátová půda (DC). Půda patří také mezi selektivně diagnostické a je značně selektivní pro průkaz střevních patogenů. Zcela neomezeně na ní rostou obligátní patogeny z rodů *Salmonella* a *Shigella*. V laboratořích se velmi často používá modifikovaná DC půda dle Hynese. Zde je růst nežádoucích mikroorganismů potlačen vyšší (0,5%) koncentrací deoxycholátu sodného. Na DC půdě lze detekovat produkci sirovodíku a štěpení, respektive absenci štěpení laktosy. Kolonie narostlé na této půdě lze následně určovat biochemicky i aglutinačně. Nevýhodou je citlivost půdy na vyšší teploty. Naopak výhodou je snadná rozpoznatelnost kolonií salmonel, které mají na DC půdě černý střed.

Endova půda. Selektivně diagnostická půda Endova se využívá k záchytu a předběžné diagnostice enterobakterií. Rostou na ní jen gramnegativní bakterie. Pro potlačení ostatních mikrobů se přidávají inhibitory růstu. Stejně jako na předešlých půdách i na Endově lze diagnostikovat bakterie neštěpící laktosu. Tato půda má řadu nevýhod, např. je třeba ji chránit před světlem, tzn. skladovat v temnu. Dalším nedostatkem je případný plazivý růst bakterie *Proteus*, který by znehodnotil jakoukoli snahu o izolaci suspektních kolonií. Některé laboratoře ji nezařazují do základní volby půd pro střevní bakterie.

Selenit. Tekutá půda Selenit se využívá zejména pro kultivaci střevních patogenů. Během prvních 6 až 12 hodin inkubace Selenit inhibuje koliformní bakterie (např. *Escherichia*), které se začnou množit až po zvýšení pH půdy. Salmonely většinou nejsou nijak ovlivněny, takže se začínají množit ihned po naočkování. Kvůli udržení optimálního pH půda obsahuje laktosu nebo mannitol, jejichž štěpení brání alkalizaci média. Selenitová půda existuje v mnoha variantách, pro záchyt salmonel je vhodný Selenit s cystinem. Nejpozději po 18 hodinách se musí selenitová půda vyočkovat na vhodné selektivně diagnostické půdy. Nevýhodou je, že půda nepotlačuje množení nežádoucích bakterií, např. proteů či pseudomonád. (27)

3.4.2 Algoritmus zpracování biologického materiálu

Bakterie z čeledi *Enterobacteriaceae* se považují za patogeny osidlující převážně střevo, proto bývá biologickým materiálem výhradně výtěr z recta nemocného dítěte. Do laboratoře musí být dodán v co nejkratším časovém intervalu mezi odběrem, tzn. nejpozději do 24 hodin, nejlépe však do 2 hodin po odběru. (25)

Výtěr je dodáván v podobě výtěrového tampónu, zanořeného do transportní půdy, např. Amies či Stuart. Tyto půdy jsou schopné udržet vlhkost, působí tedy proti vyschnutí a znehodnocení vzorku. Mají vhodné pH, jsou izotonické a pro bakterie nemají žádnou výživovou hodnotu (jsou nestravitelné). Postup zpracování výtěru je stejný pro všechny jmenované bakterie.

V této kapitole budou zmíněny hlavní body identifikace. Algoritmus zpracování biologického materiálu se ve většině mikrobiologických laboratoří shoduje. Jeho základní schéma je přiloženo v této kapitole.

1. Kultivace. Biologický materiál je očkovan na dohodnuté kultivační půdy pro střevní patogeny. Očkuje se na půdu McConkey, DC a Endovu půdu. Pokud ošetřující lékař dle klinických příznaků sám nevyloučí možnost infekce kapnofilní bakterií *Campylobacter*, je nutné tampón naočkovat také na speciální půdu pro tuto bakterii. Vzhledem k tomu, že se téměř vždy jedná o gramnegativní tyčky morfologicky blíže neurčené, preparát se

při zpracování stolice u těchto bakterií nedělá. Výjimku opět tvoří *Campylobacter jejuni*, který má v mikroskopu typický vzhled jemně zahnuté gramnegativní tyčky, avšak ani zde se neprovádí mikroskopie stolice, ale vykultivovaného kmene. Naposledy se tampón zanoří do tekuté pomnožovací půdy Selenit. Při opačném postupu by pomnožovací půda znehodnotila vzorek na následně naočkovaných půdách. (28)

Po naočkování se půdy vloží do termostatu a kultivují 24 hodin při teplotě 37 °C v normální atmosféře.

2. Izolace. Kolonie je nutné izolovat do čisté kultury. Pro tyto účely je výhodná půda Švejcárova, která umožňuje určit řadu fenotypických vlastností. Je určena k izolaci podezřelých kolonií a k rychlé předběžné identifikaci střevních mikrobů. Celkem lze z půdy hodnotit 7 biochemických znaků, spolu s hodnocením vzhledu a pachu můžeme některé mikroby také přímo určit.

Isolační plotna se skládá ze šikmě vylitého biochemického klínu a Endovy půdy. Na biochemický klín se pokládá sterilní sklíčko pro posouzení, zda bakterie produkují plyn (CO₂) a provede se několik vpichů pro důkaz tvorby sirovodíku. Na Endovu půdu se aplikují tablety indikující štěpení sacharosy a mannitolu. Po 24 hodinové kultivaci se isolační plotny hodnotí.

Změna barvy původně zeleného klínu na modrou znamená, že daná bakterie štěpí ureu. Bakterie produkující sirovodík způsobují zčernání půdy klínu v místě vpichů. Pokud se celý klín zbarví dožluta, znamená to, že bakterie fermentují glukosu a mohou tvořit plyn, který se zachycuje v podobě bublinek pod sklíčkem. Zčervenání zóny kolem příslušných tablet indikuje štěpení sacharosy a mannitolu. Štěpení laktosy se projeví růstem tmavých červených kolonií na Endově půdě.

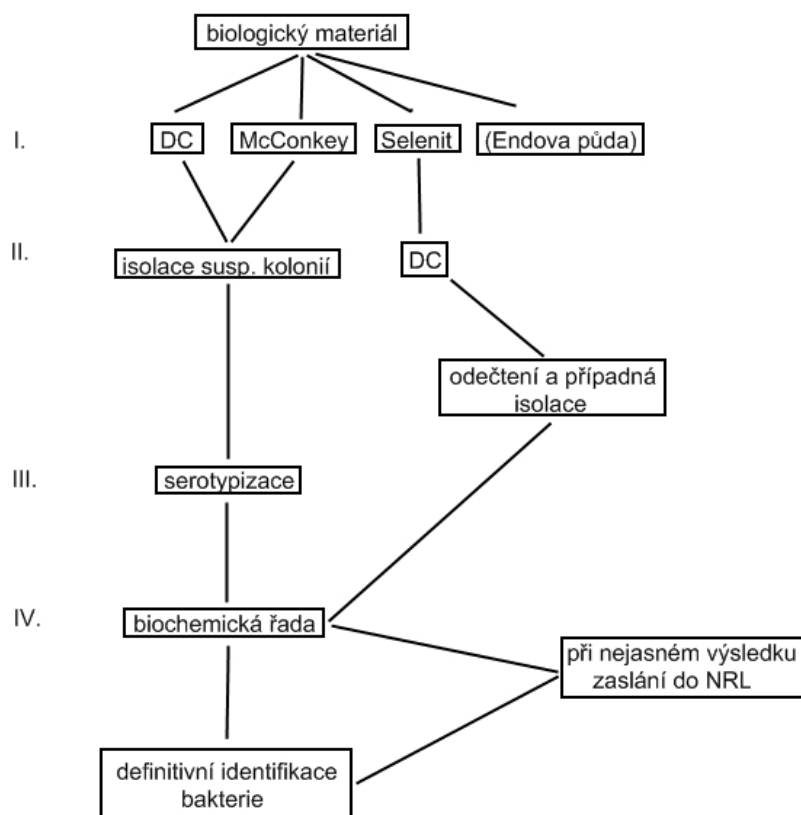
V případě velmi typického obrazu na DC půdě lze provést ihned následující krok, tzn. serotypizaci.

Souhrn biochemických vlastností typických pro zmiňované bakterie je uveden v příloze, tabulka č. 3.

3. Serotypizace. Z charakteristických izolačních půd přichází na řadu serotypizace, která je prováděna zpravidla vždy po fenotypické identifikaci. Patří ke klasickým a neopomenutelným metodám určování agens. Po předběžném určení patogena se suspektní kolonie aglutinují. To umožňuje jednak ujištění správné identifikace, ale především stanovení serotypu (druhové zařazení bakterií). Základním principem této metody je aglutinace antigenních částic, které se vyskytují na povrchu bakterií s příslušnými antiséry. Protože však někdy bývají antigeny bakterií podobné až shodné, je fenotypické (biochemické) určení směrodatné. (11)

4. Určení fenotypických vlastností. Zjištění fenotypických (biochemických) vlastností je směrodatné pro druhovou identifikaci. Pomocí tzv. biochemické řady dochází k velmi jednoznačnému určení fenotypických vlastností bakterií. Dnes již existuje řada komerčně vyráběných testů, které disponují výhodami jako je jednoduchost, rychlost a poměrně značná citlivost. Jedním z nich je test API 20 E, který bude podrobně zmíněn v kapitole o identifikaci salmonel. Zjištění biochemických vlastností bývá definitivní, tzn. identifikuje agens.

Schéma č.1 Algoritmus zpracování biologického materiálu (výtěr z recta)



3.4.3 Identifikace rodu *Salmonella*

Protože jsou salmonely nebezpečným patogenem zejména pro velmi malé děti, je důležitá jejich včasná a především správná identifikace, tzn. druhové zařazení včetně určení serotypu.

Četnost i různorodost druhů *Salmonella enterica* svědčí o nebezpečnosti bakterie, proto byla při identifikaci velmi důležitá volba vyšetřovacích metod.

Po kultivaci jsem suspektní kolonie naočkovala na isolační plotnu. Přestože byly tímto krokem základní biochemické vlastnosti známy, biochemickou řadou jsem se prakticky ujistovala ve svém tvrzení. Komerčně vyráběné testy, dodávané do

mikrobiologických laboratoří jsou velmi praktické a umožňují spolehlivou identifikaci. Pro příklad bude uveden jeden z nich, test API 20 E firmy bioMérieux.

API 20 E je standardizovaný systém k identifikaci *Enterobacteriaceae* a dalších nenáročných gramnegativních tyčků. Využívá 21 miniaturizovaných biochemických testů, každý test obsahuje reagentie používané k určení metabolických vlastností bakterií a také k identifikaci rodu a druhu střevních bakterií z čeledi *Enterobacteriaceae*. Součástí systému je i databáze a identifikační tabulky, pomocí kterých se zjišťuje o jaký mikroorganismus se jedná. (3, 6)

Princip. API 20 E sestává z 20 mikrozkušavek obsahujících dehydratované substráty. Tyto testy se inokulují bakteriální suspenzí, která rekonstruuje média. Během inkubace produkuje metabolismus barevné změny, které jsou buď spontánní nebo se zviditelní přidáním činidel. Reakce se hodnotí podle odečítací tabulky. Identifikace se získá porovnáním s přehledem profilů nebo pomocí identifikačního softwaru. (6)

Složení. Testovací proužek je složen ze 20 mikrozkušavek, každá je určena pro jeden biochemický test. Součástí celého systému jsou inkubační boxy a výsledkové tabulky pro konečnou identifikaci. (6)

Pracovní postup. Pro přípravu testovacího proužku bylo nutné přidat do jednotlivých jamek (mikrozkušavek) destilovanou nebo demineralizovanou vodu, čímž se rehydratovaly suché reagentie a vytvořila se vlhká atmosféra. K získání bakteriální suspenze jsem použila čistou kulturu zkoumaného patogena (18 až 24 hodin starou) a smíchala ji s 0,85% roztokem NaCl. Nakonec jsem vytvořenou suspenzi pipetou nanášela do jednotlivých jamek. Pro některé testy (ADH, LDC, ODC, H₂S a URE) bylo zapotřebí vytvořit anaerobní prostředí, kterého jsem docílila zalitím suspenze minerálním olejem. Celý test byl kultivuje 18 až 24 hodin v normální atmosféře při teplotě 37°C. (3, 6)

Vyhodnocení. Po jednodenní inkubaci se jednotlivé testy projeví změnou barvy, někdy na základě rozdílu pH, jindy testy obsahují konečné metabolické produkty, prokazatelné až po přidání dalších činidel. (3)

Ve výsledkové tabulce se testy rozdělí do skupin po 3, přičemž každé se přidělí hodnota 1, 2 nebo 4. Sčítáním hodnot odpovídajících pozitivním reakcím v každé

skupině se pro 20 testů získá sedmimístné číslo profilu. Pomocí tohoto profilu dochází k identifikaci bakterie. (6)

Souhrn všech používaných testů v systému API 20 E je uveden v příloze, tabulka č. 2.

Následovala serotypizace, tzn. aglutinace na sklíčku. Suspektní kolonie jsem aglutinovala nejdříve s polyvalentním antisérem. Díky této reakci jsem pojala podezření, že se jedná o salmonelu. Dále následovala aglutinace s monovalentními antiséry. Z praktického hlediska se vybírají taková antiséra, která identifikují nejčastěji se vyskytující serotypy. Protože se z 96% všech salmonel jedná o serotyp Enteritidis, nejprve jsem aglutinovala s antiséry O:9 a H:gm. (28)

3.4.4 Identifikace rodu *Escherichia*

Algoritmus identifikace bakterie *Escherichia coli* se nepatrně liší od ostatních zmiňovaných střevních bakterií. Stále se však využívají všechny zmiňované metody.

V běžné laboratorní praxi *E. coli* diagnostikuje dostupnými metodami, ve světě existuje několik laboratoří, specializující se na určování kmenů EPEC. Jejich laboratorní identifikace zahrnuje zejména určení virulentních faktorů enteropatogenní *E. coli*, zvláště pak adhesinů. Důvodem je neschopnost komerčně vyráběných testů identifikovat EPEC právě na základě faktorů virulence. Mezi používané metody patří kultivace na tkáňových kulturách, imunologické stanovení či DNA analýza. (19)

Pro rutinní diagnostiku však tyto metody nejsou nutné, proto se využívají dostupné a naprosto postačující vyšetřovací postupy.

Někdy se mohou kmeny *E. coli* chovat atypicky z důvodu jejich opožděné sacharolytické aktivity. Této problematice bude věnována pozornost v kapitole 5.

Často je již po kultivaci zřejmé, o jakou bakterii se jedná. Přesto musí pro ujištění následovat další metody identifikace. Protože však byly kolonie z DC půdy velmi typické, nejprve jsem provedla serotypizaci. Aglutinovala jsem s polyvalentním antisérem pro zjištění, zda se může jednat o EPEC. Tuto tezi jsem si ověřila

v následujícím kroku fenotypicky, kultivací na Švejcarově půdě. Někdy s polyvalentním antisérem aglutinuje i rod *Citrobacter*. Z tohoto důvodu jsem provedla aglutinaci s monovalentními antiséry, pomocí kterých jsem určovala serotyp, resp. kmen *E. coli*. Nejčastějšími serotypy pro enteropatogenní *E. coli* jsou O:26, O:55, O:86, O:111, O:119, O:125, O:126, O:127, O:128. Positivní reakce na daný serotyp identifikuje bakterii a není proto nutné provádět jakékoli další diagnostické postupy. Nevýhodou serotypizace je problematika spontánní aglutinace, která bude podrobněji zmíněna v kapitole 5. (17)

Pro ověření identifikace jsem provedla izolaci a zjistila tak biochemické vlastnosti. Identifikace bakterie na základě biochemické řady se nelišila od ostatních zmiňovaných bakteriálních agens.

3.4.5 Identifikace rodů *Yersinia*, *Shigella*

Vyšetřovací postupy rodů *Yersinia* a *Shigella* jsou totožné s postupy ostatních zmiňovaných bakterií. Uplatňuje se kultivace, izolace, serotypizace a identifikace biochemickou řadou. Protože se však v minulém roce v laboratoři LABOMA, mikrobiologická laboratoř s.r.o. tyto rody u dětí nevyskytly, jejich průkaz nebyl proveden.

4. Výsledky

Jednotlivé části jsou rozděleny do kapitol. Výsledky se týkají kvalitativního i kvantitativního výzkumu a jsou diskutovány v kapitole 5.

4.1 Výsledky identifikace jednotlivých agens

4.1.1 Agens virového původu

Rotaviry, adenoviry. Provedením identifikace virových patogenů jsem prokázala přítomnost rotavirů ve stolici. Vzorek tvořil se specifickými protilátkami komplex antigen-protilátka, pozitivní reakce se projevila zmodráním příslušného pole. Adenoviry byly neprokázány.

4.1.2 Agens bakteriálního původu

Salmonella. Testovaný kmen měl po kultivaci na selektivních půdách (McConkey, DC) vlastnosti typické pro salmonelu, tzn. bakterie vyrůstaly v průhledných koloniích, které navíc měly na DC agaru černý střed. Po izolaci na Švejcarově půdě kultura vyrůstala typickým způsobem pro salmonelu. To jsem posléze ověřila na testu API 20 E. Pozitivní reakce byla na následující testy.

ADH	přítomnost arginindihydrolasy
LDC	přítomnost lysindekarboxylasy
ODC	přítomnost ornitindekarboxylasy
CIT	využívání citrátu
H ₂ S	produkce sirovodíku
GLU	štěpení glukosy
MAN	štěpení mannitolu
SOR	štěpení sorbitolu

RHA	štěpení rhamnosy
MEL	štěpení melibiosy
ARA	štěpení arabinosy
NO ₂	produkce oxidu dusičitého

Testy na indol, močovinu, sacharosu a oxidasu byly negativní. Při následné serotypizaci byla pozitivní reakce s polyvalentním antisérem, dále pak s monovalentním antisérem O:9, H:gm. Tímto jsem prokázala, že se jedná o bakterii *Salmonella enterica* serotyp Enteritidis.

Escherichia. Na selektivních půdách rostly testované kolonie *E. coli* ve tmavočervených, laktosa pozitivních koloniích. Následně provedená serotypizace prokázala pozitivitu na polyvalentní antisérum, dále na monovalentní antisérum O:126. Bakterie tak byla zařazena do kmene EPEC, serotyp O:126. Pro ověření, zda se skutečně jedná o enteropatogenní *E. coli* byla provedena izolace. Na Švejcarově půdě měla bakterie typický kovově zlatý lesk a vykazovala biochemické vlastnosti odpovídající *E. coli*.

laktosa	sacharosa	mannitol	glukosa	plyn	sirovodík	močovina
pos.	pos.	pos.	pos.	tvořen	neg.	neg.

Určení fenotypických vlastností biochemickou řadou taktéž potvrdilo domněnku, že se jedná o zmiňovanou bakterii.

Délka celého identifikačního procesu od přijetí biologického materiálu po definitivní určení agens trvala u bakteriálních původců 3 dny, u virových 1 den. Rychlejší způsob identifikace nebyl zjištěn.

4.2 Problematika záměny bakterií

Po jednodenní kultivaci rostly suspektní kolonie (*Salmonella*) na DC a McConkey agaru v průhledných koloniích s černým středem na DC. Na Švejcarově plotně bakterie vykazovala následující biochemické znaky.

laktosa	sacharosa	mannitol	glukosa	plyn	sirovodík	močovina
neg.	neg.	pos.	pos.	tvořen	pos.	neg.

Provedená aglutinace prokázala pozitivitu O:9, H- antigen nebyl prokázán. Biochemickou řadou bylo zjištěno, že se nejedná o rod *Salmonella*, nýbrž o rod *Citrobacter*.

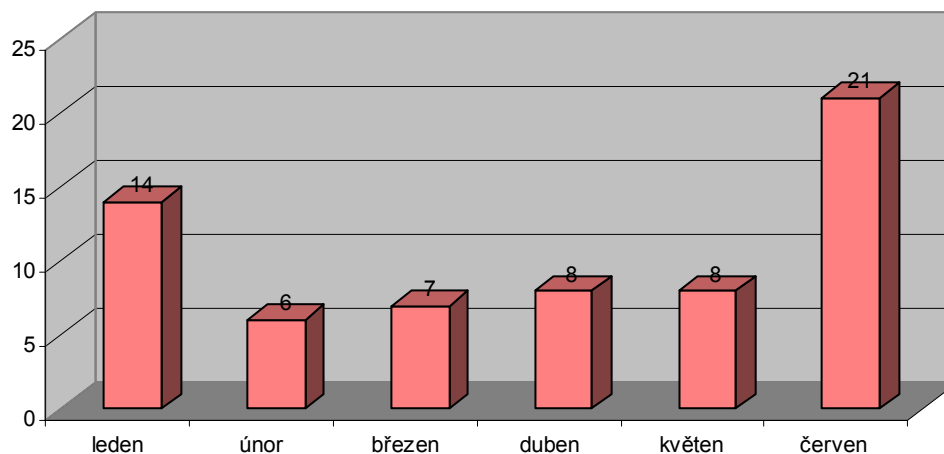
4.3 Statistické vyhodnocení nasbíraných dat

4.3.1 Výskyt rotavirů a adenovirů u dětí

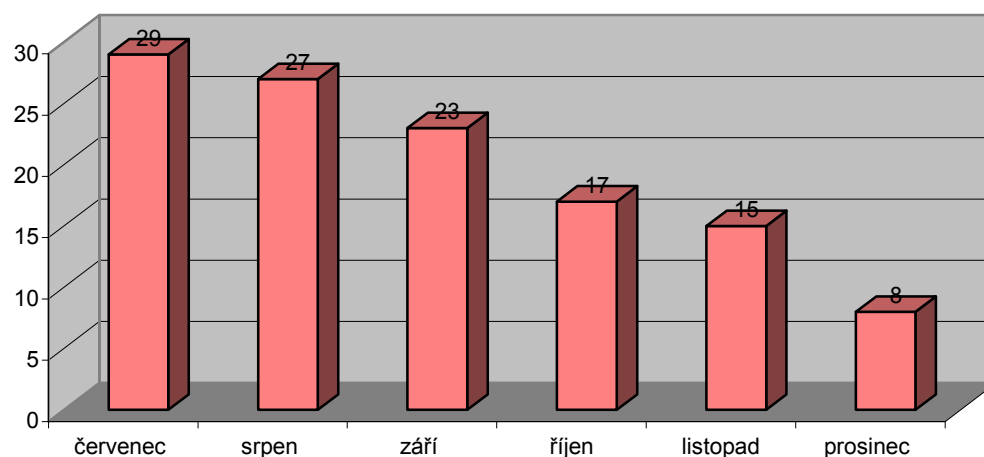
V laboratoři LABOMA, mikrobiologická laboratoř s.r.o. byl v roce 2008 počet dětí infikovaných rotaviry 4. Infekci adenoviry prodělalo 1 dítě.

4.3.2 Výskyt bakterie *Salmonella enterica* serotyp Enteritidis u dětí

Graf 1. Výskyt *Salmonella* Enteritidis za první pololetí roku 2008



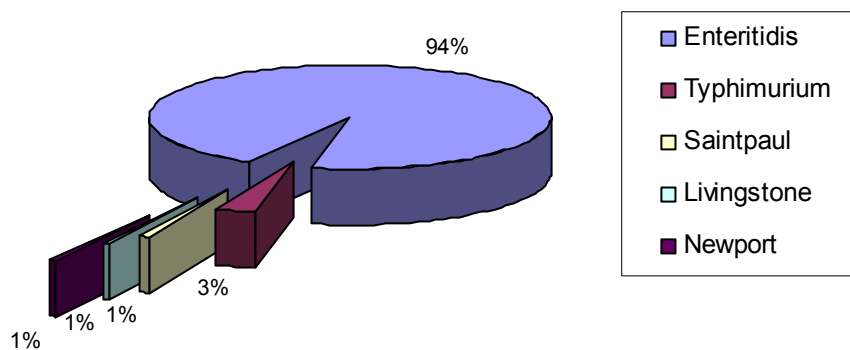
Graf 2. Výskyt *Salmonella* Enteritidis za druhé pololetí roku 2008



Z grafů vyplývá, že nejvyšší počet případů onemocnění dětí bakterií *Salmonella* Enteritidis v laboratoři LABOMA, mikrobiologická laboratoř s.r.o. byl prokázán v červenci 2008 v počtu 29 případů ze 183 (15,85%). Výskyt se vztahuje k jednotlivým pacientům.

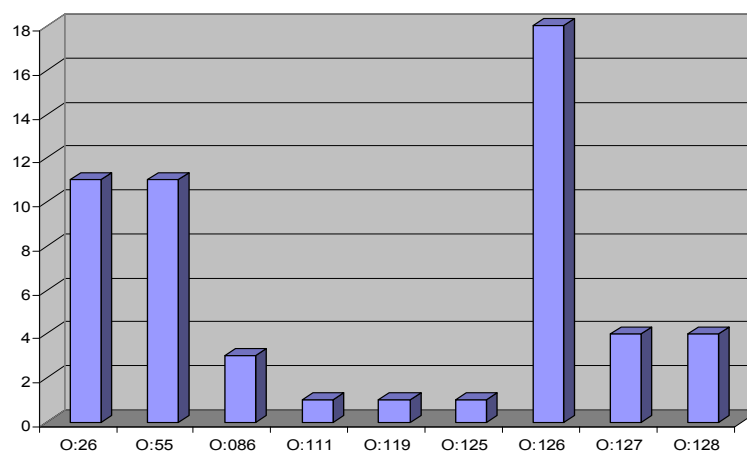
4.3.3 Ostatní statistická vyhodnocení

Graf 3. Zastoupení serotypů *Salmonella enterica* v biologickém materiálu



Údaje z grafu naznačují, že v loňském roce, tj. 2008 byl v laboratoři LABOMA, mikrobiologická laboratoř s.r.o. u dětí nejčastěji zjištěn serotyp Enteritidis, následovaly serotypy Typhimurium a ostatní.

Graf 4. Výskyt jednotlivých serotypů EPEC v roce 2008



V laboratoři LABOMA, mikrobiologická laboratoř s.r.o. se v roce 2008 u dětí nejčastěji vyskytoval serotyp O:126 v počtu 18 z 54 (33,3%). Následovaly serotypy O:26 a O:55.

5. Diskuze

Průkaz virových agens (rotaviry, adenoviry) pomocí zmiňovaného testu je velmi pohodlný a poměrně rychlý způsob identifikace. Jak již bylo konstatováno v kapitole č. 3, průkaz virů elektronovým mikroskopem by byl vhodnější. Tento způsob se však v rutinní mikrobiologické praxi neprovádí, zejména kvůli jeho finanční náročnosti. Průkaz antigenu ve stolici se zatím zdá být postačující.

Překvapivým výsledkem se jeví počet dětí infikovaných rotaviry a adenoviry v roce 2008. Pokud je pravdivé tvrzení, že jsou střevní virové infekce u dětí častější než bakteriální, předpokládalo by se, že jejich počet bude vyšší. Nicméně tato teze se nepotvrdila. Důvodem je nepravděpodobněji skutečnost, že ambulantní dětské lékaři myslí na zmiňované viry méně často než lékaři v lůžkových zařízeních, jistým důvodem může být také vyšší cena vyšetření. Laboratoř LABOMA, mikrobiologická laboratoř s.r.o. zpracovává biologický materiál výhradně od ambulantních lékařů a je tedy logické, že počet vyžádaných vyšetření na průkaz rotavirů a adenovirů je nižší.

V případě identifikace *E.coli* je pracovní postup mírně odlišný od ostatních bakterií. Protože se již na primárních půdách jeví kolonie jako *E. coli*, je možné ihned provést aglutinaci na sklíčku a prokázat tak rod, druh i serotyp. I když je tento postup v laboratoři běžný, nesmí se zapomínat provést i ostatní kroky identifikace, tzn. izolace a určení biochemických vlastností řadou.

Problémem v určování bakterie *Escherichia coli* může být její možná opožděná sacharolytická aktivita. Opožděně zkvašující kmeny se mohou na některých kultivačních půdách jevit jako laktosa negativní, což v praxi může znamenat prodloužení identifikace, v horším případě riziko záměny bakterií. Z tohoto důvodu je velmi důležité mít možnost zpětně nahlédnout do primárních ploten a posoudit, zda se skutečně jedná o opožděně zkvašující mikroby.

Dalším tématem, kterým se tato práce zabývala, je záměna bakterií *Salmonella* a *Citrobacter*. Z výsledku identifikace vyplývá, že ne vždy je po primární kultivaci, izolaci a serotypizaci jasné, o jakou bakterii se jedná. Pokud bychom se spokojili s výsledky těchto metod a neověřili si své tvrzení určením biochemických vlastností

např. testem API 20 E, mohlo by dojít k záměně agens. Důsledky tohoto pochybení by zvláště u dětí mohly vést k mnoha zdravotním komplikacím, v nejhorším případě ke smrti.

Rod *Citrobacter* patří mezi laktosa pozitivní bakterie. Některé kmeny však vykazují opožděnou sacharolytickou aktivitu podobně jako *E.coli*. Na kultivačních půdách se proto mohou velmi snadno zaměnit s laktosa negativní salmonelou, což byl i uvedený modelový příklad. Dalším krokem, který může způsobit pochybení, je serotypizace. Salmonely jsou svojí antigenní skladbou velmi podobné rodu *Citrobacter*. To se také potvrdilo pozitivitou na vyšetřovaný O:9 antigen. Navíc ne vždy je aglutinace na sklíčku přesná a spolehlivá. Někdy může docházet ke spontánní aglutinaci, tzn. falešně pozitivnímu výsledku. Tento jev lze jednoduše odhalit rozmícháním suspenze téže bakterie ve fyziologickém roztoku. Ve chvíli, kdy bakterie aglutinuje i v tomto prostředí, je zjevné, že se jedná právě o spontánní aglutinaci. Provedení tohoto jednoduchého testu by mělo být součástí každého jednotlivého vyšetření a s touto problematikou by se mělo stále počítat.

Teprve v poslední fázi identifikace vyšetření odhalilo, že se nejedná o původně myšlenou *Salmonellu*. Biochemické určení testem API 20 E tedy bylo směrodatné a určující. Možným způsobem odlišení těchto dvou bakterií je také test ONPG či PYR-test, jehož pozitivní reakce svědčí pro rod *Citrobacter*, u salmonel je výsledek negativní.

Bohužel k dispozici nebyl celkový počet případů, kdy byly zaměněny rody *Salmonella* a *Citrobacter* v roce 2008, proto tato problematika není statisticky zpracována..

Problém se vyskytl při statistickém vyhodnocení jednotlivých agens. Přestože původní myšlenkou práce bylo zmínit nejčastější patogeny (bakteriální a virové), již po předběžném zhodnocení výskytu za rok 2008 bylo jasné, že se u dětí *Shigella sp.* a *Yersinia enterocolitica* nevyskytovaly v příliš hojném počtu. Podobně tomu bylo i u již diskutovaných virů. Proto bylo statistické vyhodnocení vztaženo pouze na bakterie *Salmonella enterica* a *Escherichia coli*, resp. EPEC.

Dlouhodobé tvrzení, že je *Salmonella enterica* serotyp Enteritidis nejčastějším serotypem, bylo v roce 2008 potvrzeno SZÚ. Přestože se studie (16) zabývala pacienty

všech věkových kategorií od ledna do srpna 2008, vyplývající údaje mohou být porovnatelné s výsledky výskytu téže bakterie v laboratoři LABOMA, mikrobiologická laboratoř s.r.o. za stejné časové období. I zde byl potvrzen nejčastější výskyt serotypu Enteritidis.

Některé kmeny bakterií mají takové antigenní složení, které není zcela běžné. Příkladem může být často zmiňovaná *Salmonella*, u níž je počet serotypů velmi obsáhlý. Protože vybavení běžných mikrobiologických laboratoří nedisponuje všemi dostupnými diagnostickými prostředky, což je z praktického a ekonomického hlediska poměrně logické, některé méně časté serotypy bakterií se posílají do specializovanějších laboratoří na podrobnější analýzu. Jednou z těchto laboratoří a naprosto zásadní je NRL, kam přicházejí zpravidla již izolované kmeny na bližší typizaci z celé ČR. (10)

Pokud by však měl výskyt méně častých serotypů stoupající charakter, jak je tomu naznačeno právě u studie SZÚ na salmonelách, vyplatilo by se mikrobiologickým laboratořím pořídit odpovídající diagnostika pro jejich identifikaci. Nicméně tato myšlenka je v tuto chvíli předčasná, záleží na následujících několika letech, jakým směrem se situace bude vyvíjet.

Zmiňovaná délka identifikace jednotlivých agens je považovaná za standardní. Pouze v případě, že by byl výsledek vyšetření např. po izolaci velmi jasný, lze některé kroky vynechat a tím celou délku identifikace zkrátit. Vynechané metody se však přesto musí provést, aby se mikrobiolog ujistil ve svém tvrzení. Někdy lze také pro potřeby kliniků předběžný výsledek sdělit již za 2 dny, nikdy však nelze uzavírat vyšetření za 24 hodin.

Co se týče grafu č. 3 (zastoupení serotypů *Salmonella enterica* v biologickém materiálu) považuji za důležité poznamenat, že menšinové serotypy, tj. Saintpaul, Livingstone a Newport, nebyly určeny v laboratoři LABOMA, mikrobiologická laboratoř s.r.o., nýbrž v NRL. Důvodem je absence příslušných antisér, která se většině laboratoří nevyplatí pořizovat a to právě z důvodu menšího výskytu těchto serotypů.

6. Závěr

Cílem této práce bylo identifikovat zmíněné patogeny a zaměřit se na použité vyšetřovací metody. Dále bylo záměrem poukázat na problematiku záměny agens, konkrétně rodů *Salmonella* a *Citrobacter*.

Z bakteriálních původců byly diagnostikovány pouze rody *Salmonella* a *Escherichia*. Myslím si, že v tomto smyslu došlo z mé strany k pochybení a nedostatečnému předběžnému zhodnocení vybraných agens. Domněnka, že nejčastější střevní bakteriální agens u dětí jsou salmonely a enteropatogenní *E. coli* byla správná, nicméně u zbývajících bakterií mohl být výběr zaměřen na některé jiné patogeny.

Stanovené hypotézy, resp. výzkumné otázky byly následující:

- 1) Pokud je po primární kultivaci *Salmonella enterica* chybně považována za rod *Citrobacter*, lze odhalit tento fakt již po izolaci či serotypizaci?
- 2) Je pro odhalení záměny bakterií nutné provést až konečné určení biochemickou řadou (poslední krok identifikace)?

Ze zkoumané problematiky vyplývá, že ani po izolaci a serotypizaci nebylo stoprocentně jasné, o jakou bakterii se jedná. Teprve po určení fenotypických vlastností bakterie vyšlo najevo, že suspektní kolonie nejsou salmonely, nýbrž *Citrobacter*.

Z tohoto důvodu jsou odpovědi na výzkumné otázky tyto:

- 1) Ne, po samotné izolaci a serotypizaci nelze odhalit případná záměna bakterií.
- 2) Ano, provedením biochemické řady lze s jistotou potvrdit, zda se jedná o myšlenou bakterii či nikoliv.

Určení biochemických, resp. fenotypických vlastností bakterií je jedním z nejdůležitějších kroků identifikace, což je z výsledků práce evidentní. Přestože jsou dnešní diagnostické metody na velmi dobré úrovni, důležitější než samotná metoda je její vhodné využití.

Statistické hodnocení bylo provedeno jen částečně a to především z důvodu již zmiňovaného, tzn. nesprávného výběru nejčastějších patogenů. Ze zpracovaných údajů lze komentovat zejména fakt, že stále platí tvrzení o nejčastějším serotypu všech salmonel, tzn. *Salmonella* Enteritidis. Výskyt této bakterie byl nejvyšší v červenci 2008.

7. Klíčová slova

identifikace- identification

Enterobacteriaceae

střevní infekce- intestinal infections

Salmonella Enteritidis

salmonelóza- salmonellosis

8. Seznam použitých zdrojů

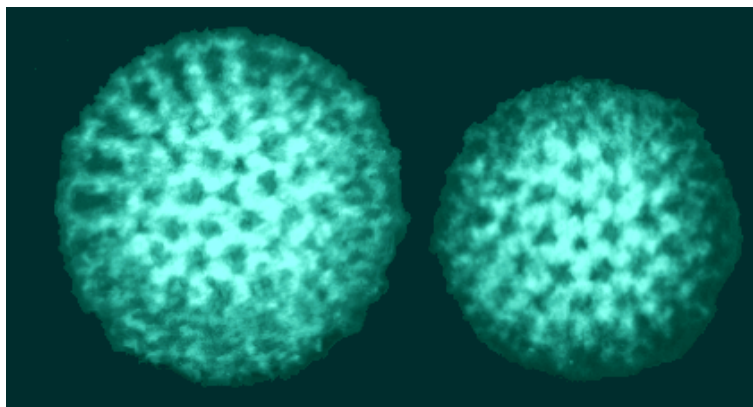
1. *Akutní průjemové onemocnění* [online]. 24.3.2009, [cit. 2009-3-29]. Dostupné z <<http://www.zdravcentra.cz/cps/rde/xchg/zc/xsl/3498.html>>
2. AMBROŽOVÁ, H. SCHRAMLOVÁ, J. Virové gastroenteritidy u dětí. *Klinická mikrobiologie a infekční lékařství*. Praha: 2005, roč. 11, č. 3, s. 83-91. ISSN 1211-264X
3. API-20E Bacterial Identification Test Strip [online], [cit. 2009-4-12]. Dostupné z <http://bacteriology.suite101.com/article.cfm/api20e_bacterial_id_test_strip>
4. *Bacilární úplavice* [online]. 24.3.2009, [cit. 2009-3-28]. Dostupné z <http://www.zdravcentra.cz/cps/rde/xchg/zc/xsl/3141_714.html>
5. *Bezpečnost potravin. Shigelóza* [online], [cit. 2009-2-12]. Dostupné z <<http://www.agronavigator.cz/az/vis.aspx?id=76725>>
6. BioMérieux SA. API 20 E. Lyon: 2006. 07584F
7. BioMérieux SA. VIKIA Rota-Adeno. Lyon: 2003. 12424B
8. *Čeled' Enterobacteriaceae* [online]. 2.2004, [cit. 2009-3-25]. Dostupné z <<http://www.cbox.cz/radim.kramar/enterobacteriaceae.htm>>
9. de BOER, E. et al. Prevalence of human pathogenic *Yersinia enterocolitica* in pigs. *Houten*: 2008, roč. 133, č. 22, s. 938-941. ISSN 0040-7453
10. DĚDIČOVÁ, D. Kmeny salmonel identifikované v NRL pro salmonely v průběhu roku 2003. *Zprávy z centra epidemiologie a mikrobiologie*. Praha: 2004, roč. 13, č. 8, s. 344-348. ISSN 1211-7358
11. DĚDIČOVÁ, D. PIHÁVKOVÁ, H. MAŠKOVÁ, J. Salmonely identifikované v NRL pro salmonely v letech 2005 až 2006. *Zprávy z centra epidemiologie a mikrobiologie*. Praha: 2007, roč. 16, č. 10, 11, s. 490-493. ISSN 1211-7358
12. *Diarrhoea Viruses* [online], [cit. 2008-12-12]. Dostupné z <<http://www.mcb.uct.ac.za/cann/335/Diarrhoea.html>>
13. DONNELLY, J.J. RAPPUOLI, R. Blocking bacterial enterotoxins. *Nature Medicine*. New York: 2000, roč. 6, č. 3, s. 257-258. ISSN 1546-170X

14. *Enterobacteriaceae (Hanovcová I.)* [online], [cit. 2009-3-30]. Dostupné z <<http://www.lfhk.cuni.cz/klinmikrob/vyuka/enterobact.htm>>
15. GORDON, M.A. et al. Epidemics of invasive *Salmonella enterica* serovar enteritidis and *S. enterica* Serovar typhimurium infection associated with multidrug resistance among adults and children in Malawi. *Clinical Infectious Diseases*. Chicago: 2008, roč. 46, č. 7, s. 963-9. ISSN 1058-4838
16. KARPÍŠKOVÁ, R. DĚDIČOVÁ, D. Výskyt a charakteristika salmonel ve vybraných lokalitách České republiky- porovnání epidemiologických a laboratorních dat. *Epidemiologie, mikrobiologie, imunologie*. Praha: 2009, roč. 58, č. 1, s. 31-35. ISSN 1210-7913
17. MURRAY, R. et al. *Manual of Clinical Microbiology*. 8. vyd. Washington: ASM Press, 2003, 2113 s. ISBN 1-55581-255-4
18. POPOFF, M.Y. LeMINOR, L. *Acta hygienica, epidemiologica et microbiologica*. Státní zdravotní ústav. Praha: 1998, příloha 3., 146 s. ISSN 0862-5956
19. *Protivirová imunita II. Specifická buněčná imunita, mechanismy virové interference s imunitním systémem* [online], [cit. 2009-3-9]. Dostupné z <www.tigis.cz/alergie/ALERG401/06.htm>
20. *Rotavirus* [online], [cit. 2009-3-16]. Dostupné z <<http://www.lfhk.cuni.cz/klinmikrob/vyuka/git/rotavirus.htm>>
21. *Shigella dysenteriae* [online], [cit. 2009-2-12]. Dostupné z <http://www.biotox.cz/toxikon/bakterie/bakterie/shigella_dysenteriae.php>
22. *Shigella sp.* [online], [cit. 2009-3-16]. Dostupné z <<http://www.lfhk.cuni.cz/klinmikrob/vyuka/git/shigella.htm>>
23. STOŽICKÝ, František. PIZINGEROVÁ, Kateřina. *Základy dětského lékařství*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2006, 359 s. ISBN 80-246-1067-1
24. TÁBORSKÁ, Jana. PAZDIORA, Petr. Rotavirus jako nejčastější původce průjmů u dětí. *Pediatric pro praxi*. Olomouc: 2005, roč. 9, č. 3, s. 135-140. ISSN 1213-0494

25. *Ústav klinické mikrobiologie* [online], [cit. 2009-4-26]. Dostupné z
<<http://www.lfhk.cuni.cz/klinmikrob/czstart.htm>>
26. VELEMÍNSKÝ, Miloš. ŠVIHOVEC, Petr jr. VELEMÍNSKÝ, Miloš jr. et al.
Infekce plodu a novorozence. 1. vyd. Praha: Triton, 2005, 414 s. ISBN 80-7254-614-7
27. VOTAVA, M. Kultivační půdy v lékařské mikrobiologii. 1. vyd. Brno: Hortus, 1999, 404 s. ISBN 80-238-5058X
28. VOTAVA, M. et al. Lékařská mikrobiologie speciální. 1. vyd. Brno: Neptun, 2003, 495 s. ISBN 80-902896-6-5
29. WICKELGREN, I. How Rotavirus Causes Diarrhoea. *Science*. Washington: 2000, roč. 287, č. 5452, s. 409-411. ISSN 0036-8075
30. WIDDOWSON, M.A. Emerging group-A rotavirus and a nosocomial outbreak of diarrhoea. *The Lancet*. London, New York: 2000, roč. 356, č. 9236, s. 1161-1162. ISSN 1474-547X

9. Přílohy

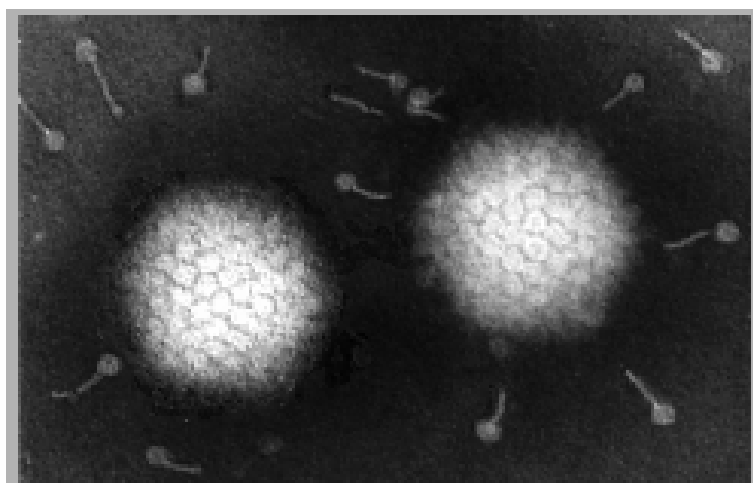
9.1 Fotodokumentace



Obrázek č. 1

Rotavirus. Snímek z elektronového mikroskopu

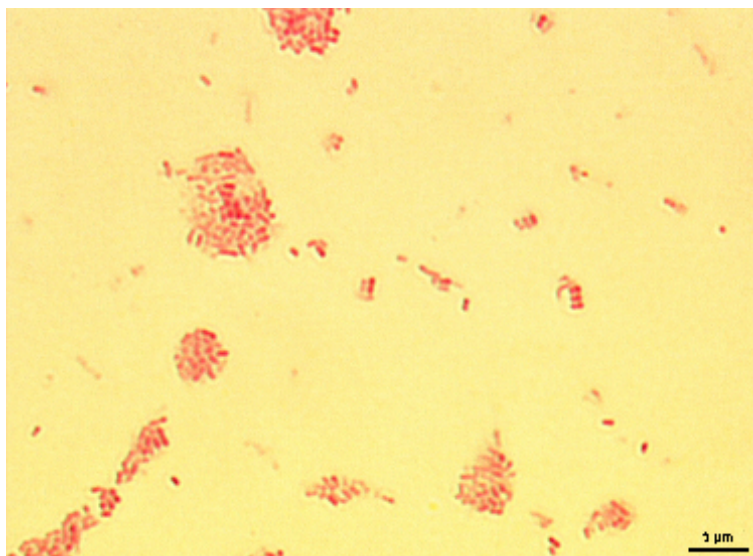
Zdroj: Lékařská fakulta UK v Hradci Králové



Obrázek č. 2

Adenovirus. Snímek z elektronového mikroskopu

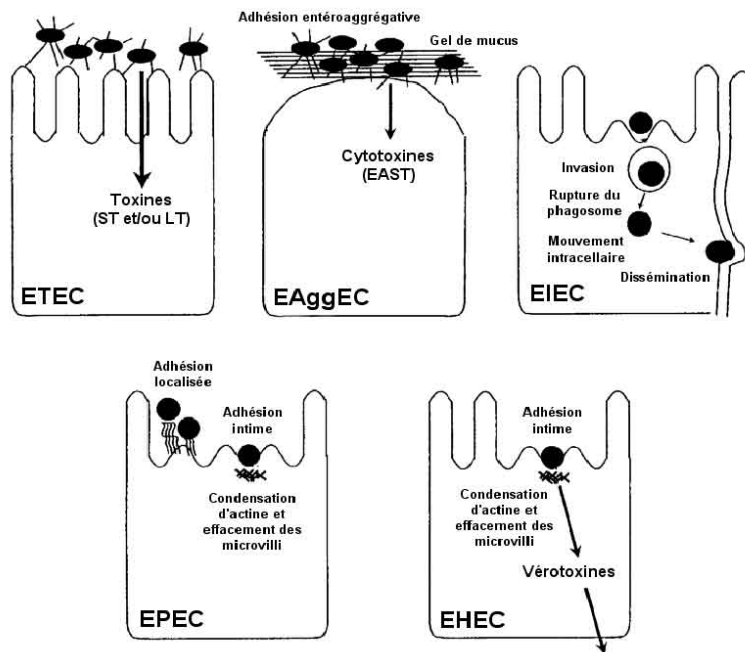
Zdroj: Lékařská fakulta UK v Hradci Králové



Obrázek č. 3
Yersinia enterocolitica. Mikroskopie
Zdroj: VŠCHT



Obrázek č. 4
Yersinia enterocolitica. Kolonie bakterie
Zdroj: Wikipedia



Obrázek č. 5
 Kmeny (pathovary) *Escherichia coli*
 Zdroj: Wikipedia

9.2 Tabulky

ZKRATKA	NÁZEV	ONEMOCNĚNÍ	PRODUKCE ENTEROTOXINU
EPEC	enteropatogenní <i>Escherichia coli</i>	novorozenecké průjmy	ne
ETEC	enterotoxigenní <i>Escherichia coli</i>	průjmy dětí i dospělých	ST- tepelně stabilní toxin LT- tepelně labilní toxin
EIEC	enteroinvazivní <i>Escherichia coli</i>	průjmy (onemocnění podobné bacilární dysenterii)	cytotoxin
EHEC	enterohemoragická <i>Escherichia coli</i>	hemoragická kolitida	shiga-like toxin (STEC) Verotoxin (VTEC)
EAggEC	enteroagaregativní <i>Escherichia coli</i>	cestovatelské průjmy	cytotoxin
DAEC	difuzně adherentní <i>Escherichia coli</i>	málo časté vodnaté průjmy u dětí	-

Tabulka č. 1

Charakteristika kmenů *Escherichia coli*

Zdroj: Lékařská fakulta UK v Hradci Králové

TEST	AKTIVNÍ SLOŽKA	NEGATIVNÍ REAKCE	POSITIVNÍ REAKCE
ONPG	2-nitrofenyl- β D-galaktopyranosid	bezbarvá	Žlutá
ADH	L-arginin	žlutá	červená/oranžová
LDC	L-lysin	žlutá	červená/oranžová
ODC	L-ornithin	žlutá	červená/oranžová
CIT	citrát sodný	světle zelená/žlutá	modrozelená/modrá
H ₂ S	thiosíran sodný	bezbarvá/šedavá	černá usazenina/tenká čára
URE	močovina	žlutá	červená/oranžová
TDA	L-tryptofan (1)	žlutá	červenohnědá
IND	L-tryptofan (2)	bezbarvá světle zelená/žlutá	růžová
VP	Pyruvát sodný	bezbarvá	růžová/červená
GEL	želatina (hovězí původ)	bez difuze	difuze černého pigmentu
GLU	D-glukosa	modrá/modrozelená	žlutá/šedavožlutá
MAN	D-mannitol	modrá/modrozelená	žlutá
INO	inositol	modrá/modrozelená	žlutá
SOR	D-sorbitol	modrá/modrozelená	žlutá
RHA	L-rhamnosa	modrá/modrozelená	žlutá
SAC	D-sukrosa	modrá/modrozelená	žlutá
MEL	D-melibiosa	modrá/modrozelená	žlutá
AMY	amygdalin	modrá/modrozelená	žlutá
ARA	L-arabinosa	modrá/modrozelená	žlutá

L-tryptofan (1)- množství 0,38 mg

L-tryptofan (2)- množství 0,19 mg

Tabulka č. 2

Odečítací tabulka API 20 E

Zdroj: bioMérieux SA.

	<i>Salmonella</i>	<i>Shigella</i>	<i>Escherichia</i>	<i>Yersinia</i>
štěpení laktosy	-	-	+	-
štěpení sacharosy	-	-	+	-
štěpení mannitolu	+	+	+	+
štěpení glukosy	+	+	+	+
produkce plynu	+	-	+	-
produkce sirovodíku	+	-	-	-
štěpení močoviny	-	-	-	+

Tabulka č. 3

Biochemické vlastnosti střevních bakterií

Zdroj: vlastní výzkum

9.3 Použité zkratky

Ag	antigen
IC	intracelulární
ATB	antibiotikum
HUS	hemolyticko-uremický syndrom
ICT	imunochromatografická technika
NRL	Národní referenční laboratoř
Stx	shiga toxin
ČR	Česká republika
EPEC	enteropatogenní <i>Escherichia coli</i>
DC	deoxycholát-citrátový agar (půda)
LPS	lipopolysacharid
Yop (Yersinia outer membrane proteins)	proteiny vnější membrány
Inv	invasin
SZÚ	Státní zdravotní ústav
Ail (attachment- invasion locus)	lokus pro vazbu a invazi

