



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Studies

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

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Zdravotně sociální fakulta
Katedra laboratorních metod a informačních systémů

Bakalářská práce

Využitelnost hmotnostní spektrometrie (MALDI - TOF) v identifikaci salmonel a odlišení od jiných bakterií z čeledi Enterobacteriaceae. Určování a výskyt sérovarů *Salmonella* Enteritidis v materiálu synlab czech s.r.o.

Vypracovala: Zuzana Wimmerová

Vedoucí bakalářské práce: MUDr. Radim Kramář, CSc.

2014

Abstrakt

Jako téma mé bakalářské práce jsem si vybrala diagnostiku a výskyt rodu *Salmonella*. Rod *Salmonella* je poměrně častá příčina průjmových onemocnění, které se u nás velmi často vyskytuje. Toto téma jsem si vybrala proto, že diagnostika salmonel je velmi náročná z důvodu možnosti záměny s jinými bakteriemi z čeledi *Enterobacteriaceae* a dále je velmi složitá, protože existuje velké množství sérotypů salmonel.

Chtěla jsem porovnat metody, které se využívají k diagnostice salmonel a zjistit, která metoda je pro laboratoře nejvýhodnější z hlediska časového, finančního, ale také která metoda je nejvíce přesná. Líbila se mi při rozhodování tématu také rozmanitost možnosti diagnostiky.

Má bakalářská práce je rozdělená do dvou větších úseků. První úsek se zabývá literární rešerší, týkající se rodu *Salmonella*. Nejprve jsem v teoretické části popsala bakteriální buňku, která je důležitá z toho důvodu, protože pomocí složení buněčné stěny můžeme rozlišit grampozitivní a gramnegativní bakterie, a tím vyloučit při mikroskopii grampozitivní bakterie. Pomocí tohoto údaje můžeme určit užší okruh bakterií, což nám usnadní identifikaci. Dále jsem se zabývala Kauffmann - Whiteovým schématem, podle něhož rozlišujeme jednotlivé sérotypy rodu *Salmonella*. Toto schéma je velmi důležité z hlediska diagnostiky a zařazení určovaného sérotypu. Dále následuje rozdělení rodu *Salmonella* dle typu infekce. Zabývala jsem se antropoprogenními salmonelami a zooprogenními salmonelami a uvedla jsem významná onemocnění, která jsou způsobena rodem *Salmonella*. Poté jsem ve své práci řešila výskyt salmonel, způsob šíření atd. V poslední kapitole jsem se zmínila o léčbě salmonelóz, uvedla jsem jednoduchý nástin známých antibiotik a léků, které se používají na léčbu salmonelóz. Uvedla jsem, také velmi známý lék Endiaron, který je vhodný pro léčbu salmonelóz a nemá žádné vedlejší účinky.

V druhém úseku mé bakalářské práce se věnuji metodice, což je kapitola, která shrnuje postup, jenž se využívá při stanovování salmonel. Zde uvádím všechny části

laboratorního výzkumu, od preanalytické části, jako například odběr a transport. Poté se věnuji laboratorní části a postanalytické části. Nejrozsáhlejší je laboratorní část, která obsahuje diagnostiku od kultivace, metody založené na biochemických vlastnostech a metodou MALDI TOF. Dále jsem zmínila sklíčkovou aglutinaci a latexovou aglutinaci. Cílem mé práce bylo porovnat metodu MALDI TOF s jinými biochemickými metodami při určování rodu *Salmonella*. Nejlepší řešení v diagnostice salmonel je podle mého názoru přístroj MALDI TOF, který je nejrychlejší metodou v porovnání se biochemickou řadou API 20E a identifikace pomocí biochemického klínu.

Dalším cílem mé práce bylo zjistit výskyt rodu *Salmonella* ve všech ročních obdobích. Zjistila jsem, že nejvíce vyskytujícím se sérotypem je *Salmonella* Enteritidis, poté *Salmonella* Typhimurium a v těsné blízkosti za ní *Salmonella* Montevideo. *Salmonella* Enteritidis se v materiálu Synlab czech s. r. o. se objevila celkem 601krát. *Salmonella* Typhimurium se vyskytla v materiálu Synlab czech s.r.o. celkem 31krát a *Salmonella* Montevideo byla čítána 13krát. Celkově jsem za rok 2013 napočítala 701 kmenů. Zde jsem sledovala také „exotičtější“ sérotypy, které sem byly dovezeny podle mého názoru z turistických destinací s nižší hygienickou úrovní.

Nejvyšší výskyt byl zaznamenán na podzim (září, říjen, listopad) – 268 kmenů. Druhý nejčastější výskyt byl pozorován v letních měsících (červen - srpen), kdy bylo diagnostikováno celkem 224 salmonel. V zimě bylo 124 kmenů a na jaře 105 kmenů. Nejvyšší výskyt salmonel byl překvapivě v měsíci září, kdy bylo zachyceno 128 kmenů. Nejméně záchyťů bylo zjištěno v měsíci březnu, kdy bylo nalezeno 24 kmenů.

Klíčová slova: Salmonelóza, biochemická řada, hmotnostní spektrometrie

Abstract

The aim of my bachelor thesis, are diagnostics and presence of genus *Salmonella*. *Salmonella* is a relatively common cause of diarrheal disease, which occurs in our country very often. Reason to choose this topic? Diagnostics of salmonella is very difficult because of the possibility of confusion with other bacteria of *Enterobacteriaceae* family and large number of *Salmonella* serotypes.

I wanted to compare the methods that are used to diagnose *Salmonella* and detect the best method for laboratories in term of time, financial, but also which method is the most accurate. The variety of diagnostic possibilities were also one of the key elements in decision making.

This bachelor thesis is divided into two major sections. The first section deals with the literary searches related to the genus *Salmonella*. In the theoretical part I described prokaryotic cell. That is difficult because according to cell membrane we differentiate gram positive and gram negative bacterium. It will facilitate the identification of bacterium. Then I dealt with Kauffmann - White`s scheme, by which are distinguish the different serotypes of the genus *Salmonella*. This scheme is very important in terms of diagnosis and classification of serotype. After that follows dividing of the genus *Salmonella* according the infection types. I dealt with genus *Salmonella*, which can infect humans and animals. I mentioned about salmonella's disease. Thereafter was solved incidence of genus *Salmonella*, way of spreading, etc. In the last chapter was mentioned the treatment of salmonellosis. I introduced a simple listing of known antibiotics and drugs used to treat salmonella. I also noted known medicament Endiaron, which is convenient and has no side effects.

The second part is dedicated to methodology, summarizing the procedure to be used by determination of salmonella. Here are present all parts of the laboratory research, beginning pre-analytical parts, such as the collection and transport. Then follow the laboratory and post laboratory part. The largest part is the laboratory part, in

which are cultivation, biochemical method. There is something about MALDI TOFF and biochemical characterization.

The aim of this work was to compare the method MALDI TOFF with other biochemics methods at determination the genus *Salmonella*. The best solution in diagnosis of salmonella is in my opinion a device MALDI TOFF, which is the fastest method in comparison with the slide agglutination and number of biochemics API 20E and biochemical wedge.

The next aim of my work was to find out occurrence of genus *Salmonella* in a all seasons. I have found out, that's the most by found serotype is *Salmonella* Enteritidis, next is *Salmonella* Montevideo, and then close behind *Salmonella* Typhimurium. *Salmonella* Enteritidis appeared in material synlab czech,s.r.o. 601 times total. *Salmonella* Typhimurium appeared in material synlab czech,s.r.o. 31 times total and *Salmonella* Montevideo 13 times. Overall I computed 701 tribes for year 2013. Also I also looked at the "exotic" serotypes that were imported here in my opinion from a tourist's destinations with lower levels of hygiene. The highest incidence was in the fall (September, October, November) - 268 tribes. The second most frequent occurrence was in sommer months (June - August). In this cases was diagnosed 224 salmonella in total. In the winter there were 124 genus and in spring there were 105. The most frequent occurrence was surpisingly in September - in total 128. The less result was measured in March with count of 24 genuses.

Key words: Salmonellosis, biochemical range, mass spectrometry

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracoval(a) samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

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

V Českých Budějovicích dne 11.8.2014

.....

(jméno a příjmení)

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala svému vedoucímu práce panu MUDr. Radimu Kramářovi za ochotu, cenné rady a připomínky při psaní mé bakalářské práce. Také bych ráda poděkovala paní Burdové za ochotu, se kterou mě naučila určovat salmonely v laboratorní praxi. Dále bych chtěla poděkovat mé rodině a mému příteli za podporu při studiu.

Obsah

0	Úvod	9
1	Teoretická část	11
	1.1 Klasifikace salmonel	11
	1.1.1 Kauffmann- Whiteovo schéma	11
	1.2 Historie klasifikace salmonel	11
	1.3 Struktura buňky salmonel	13
	1.3.1 Morfologie	13
	1.4 Mikrobiální antigeny	16
	1.4.1 H – antigeny	16
	1.4.2 O- antigeny	16
	1.4.3 Vi – antigeny	16
	1.5 Metabolismus salmonel	17
	1.6 Epidemiologie	18
	1.6.1 Výskyt	18
	1.6.2 Onemocnění způsobené bakterií rodu <i>Salmonella</i>	18
	1.6.3 Patogenita a patogeneze primárně zoonotických salmonel	21
	1.7 Léčba salmonel	21
	1.7.1 Léčba primárně zoonotických salmonel	21
	1.7.2 Léčba primárně antropozoonotických salmonel	21
	1.7.3 Prevence	25
	1.8 Názvosloví a psaní názvů salmonel	25
2	Hypotéza a metodika	27
	2.1 Identifikace salmonel	27
	2.1.1 Prelaboratorní část	27
	2.1.2 Laboratorní část	28
	2.1.3 Postlaboratorní část	41
3	Výsledky	43
	3.1 Výskyt rodu salmonela ve všech ročních obdobích	43

	3.2 Porovnání metody MALDI TOF a diagnostiky dle biochemických znaků 47	
4	Diskuze	49
	4.1 Porovnání výskytu salmonel v materiálu Synlab czech s.r.o. a počtu hlášených onemocnění.....	49
	4.2 Porovnání metod k určení salmonel či sérotypizaci salmonel.....	51
5	Závěr.....	53
6	Literární zdroje	55

Seznam zkratek

ADH	Arginin
AIN	Amoxicillin
AMP	Ampicillin
CMP	Chloramfenikol
DCA	Deoxycholát citrátová půda
EA	Endův agar
ERY	Erytromycin
H ₂ S	Sirovodík
IBK	Izolační izolační biochemický klín
LDC	Lysin
MALDI TOF	Matrix assisted laser desorptionionization – time to flight mass spektrometry
MH	Muller- Hintonův agar
NAL	Kyselina nalixidová
ODC	Ornitin
OFL	O floxacin
TET	Tetracykline
URE	Urea

0 Úvod

Salmonella Enteritidis patří do čeledi *Enterobacteriaceae*, což jsou střevní bakterie, jak už název napovídá. *Salmonella* Enteritidis je jednou z nejčastějších příčin průjmových onemocnění. Způsobuje onemocnění zvané salmonelóza, které je způsobené nedostatečně tepelně zpracovanými masnými výrobky a vejci. Salmonelóza může probíhat i bez klinických příznaků, to znamená inaparentně, neboli skrytě.

Laboratorní nález salmonel se musí hlásit na epidemiologické oddělení Krajské hygienické stanice, kde se pracovníci snaží vypátrat zdroj infekce a zjistit příčiny vzniku nákazy.

Samostatnou kapitolou je *Salmonella* Typhi, která je příčinou vzniku břišního tyfu, což je velmi závažné střevní onemocnění. Břišní tyfus se vyskytuje nejen v hygienicky málo vyspělých státech, ale může se šířit v epidemiích (v tzv. vlnách) po živelných pohromách, kdy se může dostat do pitné vody apod. V České republice byla naposledy ve větší epidemii ve 2. světové válce a od té doby se u nás vyskytuje raritně.

Diagnostika salmonel probíhá v mikrobiologických laboratořích, kde se zjišťuje její sérotyp. K určení salmonel je nutná kultivace na kultivačních půdách, které jsou specifické pro střevní bakterie (např. Deoxycholát citrátová půda, Endova půda). Na kultivační půdě po kultivaci nalezneme také přirozenou střevní flóru, což je například známá *Escherichia coli*. Na kultivační půdě DCA roste salmonela jako kolonie s černým středem, stejně jako citrobakter.

Při průjmových onemocnění, odebereme vzorek z rekta a poté diagnostikujeme etiologické agens. Nejdříve musíme zjistit, zda zjišťovaný mikrob je salmonela. To zjistíme např. metodou MALDI TOF. Byl sestaven už dříve, ale do určité doby nebyl vymyšlený software, který by tento náročný přístroj zvládal. Je to nákladná investice, ale ušetří mnoho práce a jeho provoz je téměř finančně nenáročný. K léčbě salmonelózy obvykle v nekomplikovaných případech postačuje rehydratace. Většinou nebývá nutné přistoupit k antibiotické léčbě, postačí např. Endiaron či aktivní uhlí.

Po diagnostice rodu *Salmonella* je nutné tento fakt nahlásit na epidemiologii, aby se zamezilo dalšímu šíření tohoto onemocnění a je vhodné najít počáteční zdroj infekce.

1 Teoretická část

1.1 Klasifikace salmonel

Kvůli velkému počtu salmonel se muselo vytvořit schéma, které by umožnilo snadnější orientaci při bližším určení salmonel.(14) Salmonely se dělí dle rozdílů v metabolismu na šest poddruhů (subspecies). Dále se salmonely dělí dle antigenní struktury. Salmonely jsou zapsány dle antigenní struktury v Kauffmann- Whiteově schématu. V Kauffmann- Whiteově schématu jsou rozděleny do skupin A- E. Do skupiny A patří *Salmonella* Paratyphi A, do skupiny B řadíme *Salmonella* Paratyphi B a Newport. *Salmonella* Typhi a Enteritidis patří do skupiny D a *Salmonella* Anatum je zástupce skupiny E. (38) V České republice se nejvíce vyskytuje *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Infantis, *Salmonella* Agona. (6) V České republice bylo zatím diagnostikováno jen několik set salmonel. (22)

Rod *Salmonella* patří do čeledi *Enterobacteriaceae*. Tato čeleď má několik rodů. Patří sem například bakterie rodu *Shigella*, *Yersinia*, *Escherichia*, *Citrobacter*, *Klebsiella*. (2)

1.1.1 Kauffmann- Whiteovo schéma

Kauffmann – Whiteovo schéma sestavil německý mikrobiolog Fritz Kauffmann. Toto schéma se neustále doplňuje a upravuje. Do roku 2007 čítá toto schéma 2579 sérotypů salmonel. Jedná se o obecně platný dokument, který umožňuje stanovení antigenní formule a zařazení kmene. Nově ho označujeme jako White - Kauffmann – Le Minor. Na aktualizaci tohoto schématu se podílí mnoho bakteriologů. (4)

1.2 Historie klasifikace salmonel

Kauffmann – Whiteovo schéma bylo poprvé sestaveno Kauffmannem v roce 1934 a již tehdy obsahovalo 44 sérotypů. Během svého života rozšířil Kauffmann schéma až na 958 sérotypů. Po jeho smrti se schématu ujala Pasteurova instituce

v Paříži, což bylo od roku 1965 až do roku 1989. V Pasteurově institutu se klasifikací zabýval L. Le Minor, který navýšil počet sérovarů na číslo 2267. Poté se podílel také v Pasteurově institutu na zvětšení schématu M. Y. Popoff. To trvalo do roku 2003. Od roku 2003 až do roku 2007 se klasifikací zabývali P. A. D. Grimont a F. X. Weill.

V současné době jsou nové sérotypy ověřovány a schvalovány laboratoří v Hamburku (Institut für Hygiene und Umwelt) a v Atlantě (Centres for Disease Control) a spolupracují s WHO Collaborating center. Nové poznatky se týkají exprimace přídatných O faktorů, R fáze bičkových antigenů. (4) V roce 2007 proběhla revize dokumentu a počet exprimujících sérotypů byl 2579. Toto navýšení bylo způsobeno hlavně podruhy *Salmonella Enteritidis*, ale např. u *Salmonella Borgori* je zastoupen pouhými 22 sérotypy. (6)

1.3 Struktura buňky salmonel

1.3.1 Morfologie

Salmonela je stavbou bakteriální, prokaryotická buňka, což znamená, že neobsahuje jádro jako takové. Je starší než buňka eukaryotická (9), také je menší a jednodušší. Velikost této buňky měříme v μm . Prokaryotické buňky jsou až na výjimky pozorovatelné běžným mikroskopem.(2) Bakteriální buňka je cytologicky defektní, což znamená, že nemá orgány. Mezi prokaryota patří eubakterie a archebakterie. (8)

1.3.1.1 Cytoplazma

Cytoplazma je součástí buňky, která vyplňuje její vnitřní prostor. (9) Cytoplazma je koloidní roztok. V tomto roztoku jsou obsaženy globulární bílkoviny, ribonukleové kyseliny, aminokyseliny, soli organických kyselin, produkty látkové výměny, vitamíny atd. (10) Obsahuje více než 50 % proteinů buňky. Je ohraničená buněčnou membránou. V cytoplazmě je uložený nukleoid, inkluzní tělíska, vakuoly a granula. (2)

1.3.1.2 Cytoplazmatická membrána

Cytoplazmatická membrána obklopuje povrch cytoplazmy. Je silná asi 8 nm. (9) Cytoplazmatická membrána se skládá z dvojité vazby fosfolipidů a do ní jsou vnořeny bílkoviny. (10) Tyto bílkoviny jsou významné při transportu živin do bakteriální buňky, dále se podílí na respiračních pochodech, syntéze buněčné stěny a slizové vrstvy. (2) Tyto bílkoviny jsou k cytoplazmatické membráně poutány různými silami, jako např. elektrostatickými. Rozdílná je i velikost těchto sil. (9)

1.3.1.3 Nukleoid

Nukleoid je bakteriální jádro, které zaujímá asi 10 % objemu buňky. Obsahuje genetickou informaci buňky. (9) Nukleoid není ohraničený membránou jako buněčné jádro.(10) Je to dvouvláknová DNA, která je stočená do dvoušroubovice. (2) Tato molekula DNA představuje chromozom. (10) V mikroskopu se jeví jako světlá oblast, kterou obklopuje cytoplazma. (9) Toto jádro se nedělí mitoticky. (10)

1.3.1.4 Ribozomy

Ribozomy jako první pozoroval Claude.(5) Ribozomy jsou orgány podílející se na tvorbě bílkovin. (10) Jsou menší než u eukaryotických buněk. (2) Ribozomy se skládají ze dvou podjednotek 50S a 30S, které se navzájem spojují v jednu podjednotku 70S. (5)

1.3.1.5 Buněčná stěna

Buněčná stěna udržuje skelet buňky.(9) Je tuhá, rigidní a silná. Ochraňuje cytoplazmatickou membránu proti vnějšímu okolí.(2) Vyskytuje se nad cytoplazmatickou membránou buňky. (9) Odolává vysokému nitrobuněčnému tlaku.(2), Na rozdíl od cytoplazmatické membrány je propustná pro soli. (10) Dle složení buněčné stěny se rozdělují bakterie na grampozitivní a na gramnegativní.(12)

1.3.1.6 Gramnegativní buněčná stěna

Salmonely jsou gramnegativní bakterie. Gramnegativní buněčná stěna je tenká a složitá. Je složená ze zevní membrány, která obsahuje fosfolipidy, lipopolysacharidy a proteiny. (2) Pod zevní membránou je uložen peptidoglykan. (9) V zevní vrstvě brání membrána při barvení prostupu krystalové violeti, poté dojde k odbarvení acetonem a proto se v postupu Gramově barvení musí dobarvit buňka fuchsinem. Poté se buňka jeví jako červená. (13)

Opakem gramnegativní buněčné stěny je grampozitivní buněčná stěna, která se u salmonel nevyskytuje. Grampozitivní buněčná stěna váže komplex jódu a krystalové violeti, který je zde vázán i po opláchnutí acetonem.

1.3.1.7 Vakuoly, inkluze, granula

Vakuoly, inkluze a granula jsou orgány, které tvoří zásobárnu energie a živin pro buňku. Známé jsou například zásobárny glykogenu a polyfosfátů.

1.3.1.8 Bičíky

Bičíky se nachází jen u některých bakterií. Jsou bílkovinné povahy.(2) Jsou orgánem pohybu. (9) Mohou být různě rozložené po povrchu, což je také významné

v diagnostice bakterií. Vlákno bičíku se skládá z opakujících se bílkovin flagelinu, jehož vlákno je druhově specifické. (2,9) Bičík se skládá z kolínka a bazálního tělíska, který ukotvuje bičík v plazmatické membráně. (2)

1.3.1.9 Plasmidy

Nemusí být vždy přítomné v bakteriální buňce. Jsou to malé cirkulární molekuly DNA. Je to přídatná genetická informace, která se samostatně replikuje. Obsahují R-faktory (resistance factors) tzv. R-plasmidy. Tento faktor nese geny pro tvorbu enzymů schopných rozkládat nebo modifikovat antibiotika.(2)

1.4 Mikrobiální antigeny

Mikrobiální antigeny jsou většinou velmi složité struktury. Stimulují aktivaci T – lymfocytů v imunitním systému. Mohou to být molekuly bílkovin, polysacharidy, lipidy a nukleové kyseliny. Bakteriální antigeny mohou být povrchové, které můžeme rozdělit na bičíkové antigeny, fimbriální, bílkovinné a například sacharidové. (2)

Tato struktura je tvořená O a H – antigeny. *Salmonella* Typhi je vybavena O-antigeny typů 9,12 a H antigenem typu d. (2) Salmonely, které nalezneme u lidí a zvířat, mají podobné antigeny a mají společné biochemické vlastnosti. (9)

Pomocí mikrobiálních antigenů se zjišťuje sérotyp bakterie, jde o nepřímý průkaz.

1.4.1 H – antigeny

Jedná se o flagelární bičíkový antigen. (9) Jsou označovány podle německého slova der Hauch, což znamená dech. A je tak nazýván, protože tvořil povlak na diagnostických půdách, který připomínal zadýchané sklo. (2) Testujeme je pomocí sklíčkové aglutinace. (1) H – antigeny jsou tvořené polymerizovanou bílkovinou flagelinem. Bičíkové antigeny salmonel se vyskytují ve dvou fázích. První fáze je typická pro salmonely a druhá fáze je společná pro více druhů bakterií.

1.4.2 O- antigeny

Je to somatický, tělový, antigen. (9) Jsou to specifické části polysacharidového řetězce, které se nachází v buněčné stěně. Jejich název má opět původ v němčině. Měl znamenat ohne Hauch. Tento antigen „přežije“ i vaření. (2)

1.4.3 Vi – antigeny

Jedná se o povrchový antigen. Je to tzv. kapsulární antigen. Tomuto antigenu se také říká pouzderný, což je antigen sacharidový. Je důležitým faktorem virulence. Tyto antigeny chrání bakterie před imunitním systémem hostitele, přesněji před bakteriolytickým účinkem komplementu. Tento antigen se vyskytuje také u *E. coli*, kde je nazýván K- antigenem. (2) Je to teplotně labilní povrchový antigen. (36) Tento antigen je charakteristický pro sérovary *S. Typhi*, *S. Dublin* a *S.Hirschfeldii*.(40)

1.5 Metabolismus salmonel

Bakterie z čeledi *Enterobacteriaceae* jsou schopné metabolizovat v aerobním a mikroaerofilním prostředí. Salmonely fermentují glukózu, maltózu a mannitol a sorbitol. Na izolační půdě můžeme pozorovat tvorbu sirovodíku.(2,9). Nehydrolyzují močovinu. (9) Nefermentují laktózu. (30) Test indol, oxidáza mají negativní. Znalost biochemických vlastností salmonel dopomáhá k určování bakterií v mikrobiologických laboratořích.

Tabulka č. 1 Směrodatné biochemické testy nejdůležitějších enterobakteriáci

	Glukóza	Laktóza	Sacharóza	Manitol	Urea	Sirovodík	Indol
Salmonella Typhi	+	-	-	+	-	+	-
Většina ost.salmonel	+	-	-	+	-	+	+
Escherichia coli	+	+	+/-	+	-	-	+
Klebsiela pneumoniae	+	+	+	+	+	-	+/-
Enterobakter cloacae	+	+	+	+	+/-	-	-
Proteus mirabilis	+	-	?	-	+	+	-
Morganella morgani	+	-	-	-	+	-	+

zdroj : Zahradnický

1.6 Epidemiologie

1.6.1 Výskyt

Salmonely se mohou vyskytovat jak u člověka (antropopatogenní salmonely), tak u zvířat. (2,9) Těmto salmonelám se říká zoopatogenní. Samozřejmě, že člověk může dostat infekci od salmonely zoopatogenní. Zoopatogenní salmonely společně s kampylobakterem jsou nejběžnějším původcem bakteriálních střevních nákaz.(2) Salmonely se vyskytují například u drůbeže, můžeme je najít v drůbežím masu, ve vejcích, v odpadních vodách, půdě.(9) Salmonel přibývá v letních měsících v průběhu grilovacích sezón, protože při grilování se maso špatně tepelně zpracuje a tím nedojde ke zničení bakterie. Salmonelu usmrtí 10 – 12 minut trvající var, ale při kratší tepelné úpravě salmonely přežijí. Vejce může být kontaminované buď uvnitř, nebo na povrchu skořápky. Někdy se setkáváme s kontaminací u jiných potravin. Známa je například epidemie z rybiho masa na Hodonínsku, řidčeji byly salmonely nalezeny v čokoládových tyčinkách, dovezeném koření aj. (22)

Břišní tyfus se vyskytuje v rozvojových zemích se sníženou hygienickou úrovní. Zde dochází ke kontaminaci vodních zdrojů. (2)

1.6.2 Onemocnění způsobené bakterií rodu *Salmonella*

Salmonelové infekce jsou rozdělené do dvou skupin, které se odlišují dle patogenity, způsobu přenosu a klinického obrazu. Do první skupiny patří břišní tyfus a paratyfus a do druhé skupiny patří ostatní salmonelové infekce.

Jak již bylo zmíněno výše, *Salmonella* Typhi, Paratyphi A, Paratyphi B, Paratyphi C jsou nositelé závažného onemocnění břišního tyfu. Onemocnění způsobené salmonelami ostatních sérotypů se nazývá salmonelóza. (3) Je to onemocnění, které patří mezi alimentární nákazy a je rozšířené i ve vyspělých zemích. (19)

Salmonelóza

Salmonelózy jsou infekce, které jsou vyvolané zoopatogenními sérovary salmonel.

K nákaze dochází perorální cestou, to znamená požitím tepelně špatně zpracované potravy např. vejci či masem. Salmonely vnikají do trávicího traktu hostitele a pomnožují se v tenkém střevě. (24)

Přenos interpersonální je výjimečný. K onemocnění salmonelou je zapotřebí větší množství bakterií. Výjimkou jsou novorozenci, u kterých stačí menší dávka bakterií. Novorozenci se mohou nakazit fekálně orální cestou, od rodičů.(22)

Salmonely mohou vyvolat hned několik forem infekce. Nejčastější formou infekce je gastroenteritická forma. Ta je pro salmonelózy nejtypičtější. Má různou intenzitu příznaků, které jsou závislé, jak na vnímavosti pacienta, tak na infekční dávce. Po 8 – 10 po požití kontaminované potravy, dojde ke zvýšení teploty až na 39°C, dále ke křečovým bolestem břicha a zvracení. Stolice je zpočátku četná kašovitá a poté se mění na vodnatou, zelené barvy s často příměsí krve. Pacienta je ohrožen zejména dehydratací a iontovou dysbalancí. (24)

Salmonelóza společně s kampylobakteriózou patří mezi nejčastější střevní infekce způsobené bakteriemi v České republice. Například v roce 2009 tvořily až jednu třetinu hlášených průjmových onemocnění. (22)

Salmonely jsou nejčastěji gastroenteritické, ale mohou může být identifikována také v moči, hemokultuře, absesu a jiných lokalit.

Břišní tyfus

Břišní tyfus způsobuje *Salmonella* Typhi. Břišní tyfus je akutní infekční onemocnění postihující člověka. Typickým příznakem je horečnatý stav, který trvá 2 -3 dny. Lehčí onemocnění se nazývá paratyfus. Břišní tyfus se šíří při špatných hygienických podmínkách, většinou z kontaminované vody. Ve světě provází břišní tyfus živelné pohromy jako například povodně, zemětřesení. V České republice byl

zaznamenán ve druhé světové válce. Inkubační doba u břišního tyfu trvá obvykle 7—24 dní. Vnímavost u osob je různá. Je závislá na složení žaludečních šťáv, protože salmonely ničí nízké pH. (20)

V České republice se *Salmonella* Typhi vyskytuje velmi zřídka, ale většinou je sem zanášena z tropů a subtropů, Jihovýchodní Asie, Afriky či Latinské Ameriky. (22)

Salmonella Typhi způsobuje horečnaté onemocnění, kdy průjem není hlavním příznakem. Jako vehikula nákazy slouží kontaminovaná potrava, syrová zelenina, kontaminovaná voda.

V počátečním stádiu infekce můžeme pozorovat bakteriémii, kterou můžeme diagnostikovat pomocí hemokultivace, kdy odebíráme během 24 hodin až 4 vzorky krve. K určení můžeme použít také Widalovu reakci, kde určíme protilátky v séru. Můžeme také pozorovat snížený počet leukocytů. Břišní tyfus je třetí nejčastější příčinou horečnatých průjmových onemocnění u cestovatelů. (27)

Paratyfus

Paratyfus je infekční onemocnění vyvolané bakterií *Salmonella* Paratyphi. Existují její tři sérotypy: *Salmonella* Paratyphi A, Paratyphi B a Paratyphi C. Paratyfus je onemocnění velmi podobné břišnímu tyfu, avšak má mírnější průběh. V určitých oblastech jsou známé epidemie paratyfu (Asie, Afrika ...). Infekci charakterizuje horečka, bolest hlavy a břicha. Inkubační doba paratyfu je obvykle 12 dní. (37)

1.6.3 Patogenita a patogeneze primárně zoopatogenních salmonel

U těchto nálezů se jedná o klasickou střevní infekci. Inkubační doba je kratší než u antropopatogenních salmonel, což je 12 hodin až 5 dní. Příznakem těchto nálezů jsou průjemy. Dále při této infekci můžeme pozorovat horečku a občas zvracení. Bakterie se ve střevě vážou na mikroklky střeva.(3) Zoopatogenní salmonelou je například *S. Enteritidis* a *S. Typhimurium*.

1.7 Léčba salmonel

Léčba salmonelózy je závislá na formě onemocnění. U asymptomatické salmonelózy se neléčí, salmonelová gastroenteritida se léčí rehydratací a dietou, dále také jinými léky - protiprůjmovými (probiotiky, antibiotika, Endiaron ...). Při onemocnění je důležité dbát na správnou hydrataci, protože dochází k velkým ztrátám vody při průjmech a zvracení. Je doporučeno vypít 3-4 litry tekutin denně, vhodné jsou neslazené čaje, či čistá voda. Léčba trvá obvykle 5 – 7 dní, závisí na průběhu onemocnění. Systémová onemocnění vyžadují delší léčbu. Jedná se o 10 – 14 dní, může ale také trvat několik týdnů až měsíc. (22)

1.7.1 Léčba primárně zoopatogenních salmonel

Zde se nedoporučuje užívání antibiotik, ale je třeba zamezení další kontaminace, jako například vynechání koupání ve veřejných koupalištích apod. Důležitou složkou této léčby je strava, která je bohatá na složky střevní mikroflóry (probiotika, prebiotika). (3)

1.7.2 Léčba primárně antropopatogenních salmonel

Antropopatogenní salmonely se léčí často antibiotickou léčbou. Účinná antibiotika jsou například ampicilin, amoxicillin, kotrimoxazol, ofloxacin. Na komplikovanější případy se používá antibiotikum zvané chloramfenikol. (3)

Léčba salmonelózy je závislá na formě onemocnění, u asymptomatické salmonelózy se neléčí, salmonelová gastroenteritida se léčí rehydratací a dietou, dále také jinými léky - protiprůjmovými (probiotiky, antibiotiky apod.). Při onemocnění je důležité dbát na správnou hydrataci, protože dochází k velkým ztrátám vody při průjmech, zvracení. Je doporučeno vypít 3-4 litry tekutin denně, vhodné jsou neslazené čaje, či čistá voda. Léčba trvá obvykle 5 – 7 dní, závisí na průběhu onemocnění. Systémová onemocnění vyžadují delší léčbu, to se jedná o 10 – 14 dní, může ale také trvat několik týdnů až měsíc. (22)

1.7.2.1 Antibiotika

Antibiotika jsou látky, které jsou schopné inhibovat růst bakterií. Máme různé druhy antibiotik. Mohou být buď bakteriostatické, které úplně inhibují růst bakterií, nebo jsou bakteriocidní, které úplně usmrtí bakterie. (20) Jen 1 % známých antibiotik je klinicky použitelné. (18)

Poprvé popsal antibiotika americký mikrobiolog S. A. Waksman. Dále upřesnili pojem antibiotika H. Zahner a W. K. Mass. (19)

Antibiotika jsou produkována hlavně jinými bakteriemi, plísněmi a aktinomycetami. Antibiotika jsou považována za sekundární produkty metabolismu bakterií. Jednotlivá antibiotika působí na každou bakterii jiným způsobem. Buď potlačují tvorbu buněčné stěny, nebo zabraňují syntéze bílkovin, nebo způsobují inhibici syntézy nukleových kyselin. (20) Antibiotika se podávají většinou perorálně. (22)

U běžných bakteriálních onemocnění se antibiotika běžně nepodávají. Hlavní indikace k podání antibiotik je v případě, že bakterie pronikly ze střevního lumen do dalších orgánů, či se bakterie dostane do krevního řečiště, nebo bakterie vytvoří pyogenní ložisko v orgánu či tkáni. (24)

Kotrimoxazol (SXT)

Kotrimoxazol je chemoterapikum, které se využívá nejen pro léčbu gastroenteritidy. (42)

Ciprofloxacin (CIP)

Antibiotikum, patřící do skupiny chinolonů. Léčí se jím těžké gastroenteritidy.
(2)

Ampicilin (AMP)

Penicilinové, bakteriocidní, širokospektré antibiotikum. Působí prostřednictvím blokace syntézy buněčné stěny. Působí dobře také na kmeny hemolytických streptokoků, gonokoků apod. Do 24 hodin je vyloučen močí pomocí tubulární sekrece. Indikací k léčbě je citlivost na ampicilin. Používá se k léčbě tyfu a paratyfu, pokud nelze používat fluorochinolony, kotrimoxazol a chloramfenikol. U salmonelových onemocnění se používá po šesti hodinách po 6 – 8 g. Je kontraindikován při alergiích na penicilin. (36)

Chloramfenikol

Chloramfenikol je širokospektré antibiotikum. Je to škodlivé antibiotikum. Nepoužívá se jako lék první volby. Používá se k léčbě například břišního tyfu. (42)

Endiaron

Jako na ostatní průjemová onemocnění můžeme použít lék, zvaný Endiaron. Endiaron je volně prodejný lék. Podává se perorální cestou. Léčivou látkou Endiaronu je Cloroxinum (250mg) v jedné potahované tabletě. Další pomocnou látkou je monohydrátlaktózy.

Využívá se tam, kde je známé infekční agens. Je určen pro děti a dospělé nad 40 kilogramů. Obvyklá dávka je třikrát denně. Doba podání léku je závislá na klinickém obrazu pacienta. Obvykle je to 2 – 3 dny v závislosti na normalizaci stolice. Aplikuje se po jídle s dostatečným zapitím tekutinou. Tento lék se nedoporučuje podávat v době těhotenství a kojení. Tato léčivá látka má bakteriostatické a fungistatické vlastnosti. Do

spektra účinnosti jsou zahrnuté streptokoky, stafylokoky, shigely, giardie a trichomonády. Neovlivňuje přirozenou bakteriální flóru. (31)

Rezistence salmonel je k aminopenicilinům, fluorochinolonům a kotrimoxazolu nízká.
(42)

1.7.3 Prevence

Základem prevence salmonelóz jsou opatření hygienická, která by měla probíhat soustavně a důkladně. Jsou to opatření při ustálení a podmínkách chovu chovných zvířat, hlavně drůbeže. Sleduje se i nezávaznost jejich krmiv a vody. Měla by probíhat dezinfekce v chovatelských a potravinářských objektech, aby se zamezilo průniku nákaz. Prevence spočívá také vyhnutí se pití užitkové či jinak kontaminované vody v rozvojových zemích. Dále zamezení konzumace tepelně nezpracovaných či málo zpracovaných potravin. Při dovolené v rozvojových zemích je doporučováno pít balenou vodu. Dále jako prevenci můžeme uvažovat zamezení styku s infikovanými osobami, což nemusí být vždy známé.

1.7.3.1 Očkování

K doporučeným očkováním patří očkování proti břišnímu tyfu. Očkování je důležité na cestě do zahraničí (do tropů či subtropů). Je důležité dbát na dlouhý časový předstih. Jedná o až o šest měsíců předem. Cestování je rizikové, protože zde může dojít k infekci. Do rozvojových zemí je vhodné rutinní očkování. K infekci dochází prostřednictvím kontaminované vody. V zemích s nízkou hygienickou úrovní se břišní tyfus vyskytuje často. V České republice jsou dostupné vakcíny Typherix, TyphimVi. Je možné jimi očkovat již děti od dvou let. Ochrana vakcíny začíná účinkovat již za 14 dní. Vhodné je přeočkování po 3 letech.(23)

1.8 Názvosloví a psaní názvů salmonel

Psaní názvů bakterií patří mezi hlavní prostředky komunikace mezi vědci, lékaři apod. (17) Názvy ostatních bakterií se píše v textu kurzívou. Rodový název velkým písmenem a druhový název malým počátečním písmenem. Jako příklad můžeme uvést např. *Escherichia coli*.

U salmonel se většinou setkává mnoho typů psaní. Rozlišujeme species, subspecies, subgenera, skupiny, podskupiny a sérotypy (sérovary). Salmonely rozdělujeme na dva druhy *Salmonella enterica* subsp. *enterica* a *Salmonella bongori*.

Tyto dva druhy se píší stejně jako u ostatních bakterií. Avšak sérotypy píšeme rodový název kurzívou (*Salmonella*) a sérovar klasickým písmem s prvním písmenem velkým (*Salmonella* Typhi). Kdežto subspecies se píší také kurzívou a s malým počátečním písmenem. Jako příklad mohu uvést *Salmonella enterica*, subsp. *enterica*, sérovar Typhi.

2 Hypotéza a metodika

Domnívám se, že nejvyšší výskyt rodu *Salmonella* bude v letních měsících (červen, červenec a srpen). Dle mé hypotézy, je to díky tomu, že v letních měsících probíhá grilovací sezóna, která může vyvolat vlnu epidemie salmonelóz. Při grilování dochází k nedostatečnému tepelnému zpracování drůbežního masa, které vede k tomu, že se neusmrtí bakterie a mají možnost proniknout do hostitele.

Podle mého názoru, při porovnání metod MALDI TOF a jiných biochemických metod (biochemická řada, izolační biochemický klín), je časově výhodnější metoda MALDI – TOF. Myslím si, že metoda MALDI TOF je přesnější metoda k určení bakterie rodu salmonela, protože při sklíčkové aglutinaci může dojít k přehlédnutí aglutinace. Dále si myslím, že metoda MALDI TOF je komfortnější z hlediska náročnosti.

2.1 Identifikace salmonel

Při identifikaci salmonel je nutné použití vysoce specifických a citlivých laboratorních metod. Existuje mnoho postupů při diagnostice salmonel. Standardy při určování salmonel jsou dané v dokumentu ISO 6579. (25)

2.1.1 Prelaboratorní část

Do prelaboratorní části diagnostiky mikroorganismů zahrnujeme přípravu pacienta na odběr, a také samotný odběr. Odběr by měl probíhat dle zásad odběrů. Odběrové zkumavky se musí řádně označit jménem a rodným číslem pacienta. Dále, prelaboratorní část zahrnuje transport vzorku.

U salmonel se odebírá nejčastěji vzorek z rektu, salmonelu lze diagnostikovat také z moči, hnisu a například krve. Odběr z rektu se provádí odběrovým tamponem, který se zasune do rektu, cca 5 cm. Poté se odběrový tampon vloží do transportní půdy.

Transportní půdy simulují přirozené prostředí bakterií (2). Dále se dá určit infekce salmonel, z krve a moči při akutní bakteriémii. Stolice však nemusí být pozitivní (3). Lékař, či odběrová sestra označí vzorek jménem a vyplní žádanku dle jejich požadavku na vyšetření, řádně se vyplní jméno, příjmení, diagnóza, rodné číslo, datum a čas odběru. Pokud pacient užívá antibiotika, tak se uvede název antibiotik. Také se označí požadované vyšetření. V případě salmonel, je to buď výtěr z rekta (komplexní kultivace včetně cílené kultivace na kampylobaktera), nebo v případě podezření na salmonelu se zaškrtně „*cílená kultivace Salmonella*“.

Takto připravený vzorek se přepraví co nejrychleji do mikrobiologické laboratoře. Zde se materiál přijme společně se žádankou na mikrobiologické vyšetření. Označí se číslem laboratoře a dále putuje laboratoří jako číslo, či kód. V některých biochemických laboratořích se zavádí čárové kódy, které usnadňují práci s přístroji. V mikrobiologii se spíše používá číslování manuální. Musíme označit číslem odběrovou zkumavku a žádanku. Poté následuje laboratorní část.

Při odběru, transportu a laboratorním výzkumu se musí dbát na to, aby nebyl vzorek kontaminován nebo nedošlo k jeho záměně.

U tyfoidní formy infekce, odebíráme pacientovi hemokulturu, salmonelu je možné dále prokázat z hemokultury, hnisu z abscesu, moči a jiných lokalit (22).

2.1.2 Laboratorní část

Po doručení vzorku do laboratoře laborantky rozřídí vzorky dle materiálu. Je velmi důležité, aby nedošlo k záměně pacienta. Vzorek i žádanka se označí stejným číslem, či čárovým kódem. Po označení vzorku a žádanky, se vzorek inokuluje na kultivační půdy.

Průkaz salmonel můžeme rozdělit na přímý a nepřímý průkaz. Při přímém průkazu pracuje s bakterií jako takovou. Do přímého průkazu patří mikroskopie (v případě salmonel je „nic neříkající“), dále sem patří kultivace, a diagnostika pomocí

biochemických znaků. Pomocí přímého průkazu se zjistí bakterie, například v případě salmonel, že jde o *Salmonella enterica*.

Při nepřímém průkazu pracujeme například s antigeny (sklíčková aglutinace), nebo s chemickým složením (PCR, Widalova reakce)

2.1.2.1 Přímý průkaz

Kultivace

Kultivace je metoda přímého průkazu. Kultivace vždy předchází další diagnostice.

Salmonely kultivujeme na selektivně diagnostické, což je v případě salmonel Endův agar (EA) či velmi podobná půda Mac Conkey. Na selektivně diagnostické půdy se očkují vzorky, u kterých předpokládáme výskyt daného patogena ve směsi s přirozenou mikroflórou. Nežádoucí mikroby potlačí a vyselektuje hledané.

Dále se kultivují vzorky na selektivní půdy, kterou je v případě salmonel Deoxycholát citrátová půda (DCA). Na těchto půdách se potlačí růst nežádoucích mikrobů. Kultivujeme na ně vzorky, kde předpokládáme výskyt daného patogena.

Kultivační půdy musí splňovat podmínky pro růst bakterií.

Endova půda

Endova půda je půda světle růžové barvy, na které nerostou grampozitivní bakterie. Endova půda slouží ke kultivaci bakterií čeledi *Enterobacteriaceae*. Tato půda je citlivá na světlo, proto je vhodné ji skladovat ve tmě. Obsahuje také laktózu. Indikátorem jejího kvašení je fuchsin, který je odbarvený siřičitanem sodným. Je-li laktóza kvašena, mění se barva světle růžová do temně fialové barvy vlivem změny pH. Bakterie, které kvasí laktózu, mají tmavě fialově zabarvené kolonie. Bakterie, které nezkvašují laktózu, mají kolonie růžové.



Obr. 1: Vyrostlá kolonie *Salmonella* Enteritidis na Endově agaru. Na pravé straně jsou vyrostlé kolonie s černým středem. Na levé straně je jiný vzorek s běžnou střevní flórou, zde vyrostl kmen *Escherichia coli*, která je na obrázku růžová.

Deoxycholát citrátová půda (DCA)

Půda, která slouží k zachycení střevních bakterií, jako je například salmonela, shigela, citrobakter. Jednou z důležitých složek této půdy je laktóza. Dále tato půda obsahuje lyzin a sacharózu. Shigely, citrobakter a salmonely na této půdě rostou jako kolonie s černým středem.



Obr. 2: Vyrostlá kolonie *Salmonella* Enteritidis na Deoxycholát citrátové půdě.

Vzorek se inokuluje k jedné straně Petriho misky označené kultivační půdy. Inokulum zaplňuje zhruba 1/3 kultivační půdy. Poté se inokulum rozizoluje. Při izolaci je nutné, aby na půdě vyrostly jednotlivé čisté kolonie. Takto rozizolované plotny se uloží na cca 24 hodin do termostatu, kde je stálá teplota 37 °C, která zajišťuje vhodné podmínky pro růst bakterií. Druhý den ráno doktor mikrobiologie kultivační půdy „přečte“. Doktor rozhodne o dalším postupu při určení.

Selenitová pomnožovací půda

Selenitová pomnožovací půda je tekutá půda, která slouží k pomnožení bakterií. Tím pádem se získá větší počet kmenů. Do selenitové pomnožovací půdy se vkládá odběrový tampón, který se v této půdě nechá v termostatu při 37°C po dobu cca 18 hodin. Druhý den se inokuluje pomocí sterilní kličky na DCA. Poté se inokulum rozizoluje a opět nechá v termostatu po dobu 18 hodin v 37°C.



Obr. 3: Selenitová pomnožka

Pokud na DCA nebo EA vyroste kolonie s černým středem, je možné, že se jedná o salmonelu. Dále se kolonie s černým středem využívají pro další metody, které jsou zmíněné níže. Stejně jako salmonela, roste jako kolonie s černým středem i *Citrobacter freundii*.

Diagnostika pomocí biochemických vlastností

Abychom mohli odlišit salmonelu od jiných mikrobů, můžeme využít jejich biochemických vlastností. Bakterie se odlišují v rozdílech v jejich metabolismu. Jednotlivé biochemické znaky jsou uvedené v tabulce č. 1. Abychom zjistili tyto biochemické vlastnosti můžeme použít například izolační biochemický klín, pomocí jehož zjistíme až osm znaků. Z biochemického klínu můžeme zjistit fermentaci cukrů (laktóza, sacharóza, manitol apod.), a také například produkci sirovodíku. Také se v některých laboratořích používá zkumavková biochemická řada nebo komerčně vyrobená biochemická řada..

Izolační izolační biochemický klín a postup izolace

Čistě vyrostlé kolonie můžeme izolovat. Na izolaci se používají tzv. izolační půdy neboli izolační izolační biochemický klín (IBK). Izolační biochemický klín je vhodný pro předběžnou a rychlou identifikaci bakterií a umožňuje kontrolu čistoty kmene. Předběžná identifikace je na základě osmi biochemických znaků. Izolační biochemický klín se skládá ze dvou kultivačních pūd, z biochemického klínu a z Endova agaru. Na biochemickém klíně můžeme určit až osm biochemických znaků. Mezi tyto znaky patří tvorba H₂S, štěpení laktózy, mannitolu, sacharózy.

Na izolační biochemický klín inokulujeme kličkou čistou kolonii, kde středem biochemického klínu a středem Endova agaru vytvoříme inokulum. Poté pod úhlem 90° rozizolujeme inokulum do stran. Do biochemického klínu uděláme kličkou tři vpichy na pravé straně a tři vpichy na levé straně. Doprostřed mezi vpichy se položí sterilní sklíčko. Na inokulum se pinzetou položí sacharóza a mannitol. Takto připravený izolační biochemický klín, se nechá opět na 24 hodin inkubovat v termostatu při 37°C. Druhý den opět doktor odečte plotnu, dle biochemických znaků určí užší okruh bakterií.



Obr. 4: Izolační půda. Izolační půda s klínem, na kterém je umístěno sklíčko, pod kterým vzniká sulfid vodíku. Nahoře uprostřed půdy vidíme sacharózu, jež salmonela nerozkládá a pod ní mannitol, který fermentuje.

Pomocí biochemických znaků se určí o jaký rod bakterie se jedná. V případě salmonely jsme tedy zjistili, že jde o rod *Salmonella enterica*. K určení *Salmonella enterica* se využívá také metoda MALDI TOF či biochemická řada.

Biochemická řada

Biochemická řada se využívá pro zjištění biochemických vlastností. V laboratoři Synlab Č.B. s.r.o. se používají tyto řady značky Api 20E.

Api 20E (Biomérieux)

Fenotypická řada Api 20E se využívá k určování *Enterobacteriaceae* a jiných gramnegativních bakterií. Obsahuje 25 malých biochemických testů. Tato metoda je rychlá a jednoduchá, ale je to jeden z dražších testů. K identifikaci využijeme kmeny, které odebereme z neselektivních půd. K testování pomocí této řady je nutné přikoupit další reagentie, které se k sadě nedodávají. Jako například parafinový olej.

Nejdříve je nutné provést oxidační test, což je test k určení enzymů, které jsou prokazatelné u aerobních bakterií. U čeledi *Enterobacteriaceae* je negativní.

Připravíme si inkubační box a do jamek se vpraví 5 ml destilované vody, tím se vytvoří vlhká komůrka. Dále se napíše číslo vzorku, aby nedošlo k záměně pacienta. Poté se vyjme testovací proužek z obalu a vloží se do inkubátoru. Poté se připraví inokulum připraví se 5 ml fyziologické roztoku. Poté se nabere kolonie z izolační plotny, vhodné je využít mladé kolonie 18 – 24 hodin. Poté emulgujeme po dosažení homogenní bakteriální suspenze. Poté pipetou plníme jamky po 100μl, nesmíme mít ve špičce bublinky. Strip se nakloní dopředu a hrotem pipety ho naplníme. Pro testy ADH, LDC, ODC, H₂S, URE, vytvoříme anaerobní prostředí pomocí dvou kapek parafinového oleje. Fenotypická řada se odečítá po 24 hodinách. Pomocí výsledkového listu, kde jsou barevně odlišené pozitivní a negativní reakce, odečítáme řadu. Pozitivní reakce vždy označíme do výsledkové tabulky jako + a negativní reakce se označí jako -. Výsledková tabulka je rozdělena vždy po třech a u každé reakce je uvedeno číslo. Čísla, kde jsou pozitivní reakce sečteme a pod tyto tři reakce napíšeme tento součet. Tímto získáme sedm čísel, která se zadají do Apiwebu. Apiweb dle těchto čísel vyhodnotí kmen bakterie a procentuální shodu s vyhodnoceným kmenem.



Obř. 5: Fenotypická řada; *Salmonella* Enteritidis (nahore) a *Salmonella* Montevideo (dole).

Hmotnostní spektrometrie MALDI- TOF

Metoda MALDI TOF nefunguje na podobném principu jako metody zmíněné výše. Ale MALDI TOF funguje na identifikaci jednotlivých buněčných proteinů, které jsou pro dané bakterie typické.

Zkratka MALDI- TOF znamená matrix assisted laser desorption/ionization – time to flight mass spektrometry.(14) Spektrometr byl vyvinut pro zlepšení výkonu a zjednodušení práce v mikrobiologických laboratořích. (28)

Existuje několik typů hmotnostních spektrometrů: kvadrupólový hmotnostní spektrometr (quadrupole mass spectrometer), spektrometr s časem doletu (time off light mass spectrometer) a „dvojčočkový“ hmotnostní spektrometr (double focusing mass spectrometer). (21)

Pořízení tohoto přístroje je velmi nákladné, ale jeho provoz je levný. MALDI – TOF určí pouze původce onemocnění. Hmotnostní spektrometrie je velmi citlivá metoda. (18)

Údržba tohoto přístroje je prováděna vyškolenými a certifikovanými pracovníky. Přístroj splňuje požadavky DIN EN ISO 9001:2000. (28)

Princip metody MALDI TOF je založen na ozáření vzorku vykrytalizovaného s matrix na destičce pomocí pulzního laseru. Matrix napomáhá ochraně vzorku před rozpadem a pomáhá k odpaření a ionizaci molekul. Hmotnostní spektrometr měří rychlost průletu jednotlivých iontů, které jsou závislé na jejich efektivních hmotnostech.

Maldi biotyper je hmotnostní spektrofotometr, který bakterie určuje pomocí jedinečných proteinů, které jsou obsaženy v bakteriálních buňkách. Tyto proteiny slouží jako vzory, které jsou specifické pro určité mikroorganismy.(28)

Materiál a pomůcky

K práci s MALDI TOF potřebujeme čistou kulturu stanovované bakterie (16), kovovou destičku, matrix, automatickou pipetu a párátka.

Postup práce s MALDI TOF

Základem práce s MALDI, je mít kultivační půdu s čistou kolonií. Poté si připravíme tabulku s označenými políčky, která napodobuje destičku, na kterou budeme vzorek nanášet. Nejprve naneseme čistou kolonii do označeného místa. Poté automatickou pipetou naneseme matrix, která je určena pro MALDI. Párátkem promícháme tuto směs matrix a čisté kolonie. Vložíme destičku do místa pro ni určené. Přístroj připravíme pro práci. Zadáme čísla vzorků, které se přiřadí k výsledku.

Počítačový software umožňuje vytisknout výsledky přímo z programu.



Obr. 6: MALDI TOF. Přístroj Microflex firmy Bruker. Je vysoký zhruba 1 m. Dole můžeme vidět stříbrné víčko, pod které uložíme destičku s materiálem.

2.1.2.2 Nepřímý průkaz

Pomocí antigenní struktury se rozlišují jednotlivé sérotypy salmonel. Jedná se o nepřímý průkaz, protože se pracuje s antigeny.

Skličková aglutinace

Skličková aglutinace je metoda založená na reakci protilátka a antigen, kde dojde ke vzniku aglutinátu, který se dá rozeznat pouhým okem. Ke skličkové aglutinaci se používají v mikrobiologických laboratořích komerční specifická antiséra (anti- O a anti-H), která obsahují specifické protilátky proti salmonelovým antigenům. Po smíchání tohoto antiséra se salmonelovým antigenem, dojde k jasné aglutinaci tohoto kmene.

Skličková metoda se provádí na sklíčku. Z půdy odebereme čistou kolonii kmene sterilní kličkou, na sklíčko si kápneme jednu kapku antiséra, do kterého vmícháme odebranou kolonii. Poté sklíčko naklááme tam a zpět nad tmavým pozadím, aby byla dobře odlišitelná aglutinace. Aglutinace se musí objevit maximálně do jedné minuty.(36)



Obr. 7: Komerční monovalentní séra s antiséry proti salmonelám. Vlevo se nachází antiserum s O specifickou protilátkou, druhé s modrým víčkem je GM sérum s tzv. bičíkovou specifickou protilátkou.

Díky velkému množství sérotypů salmonel v laboratořích určujeme v ČR jen některé typy salmonel - jen ty nejčastější. Ostatní se k „dourčení“ posílají do referenčních laboratoří.

O séra slouží k identifikaci O skupiny. Nejprve se používají polyvalentní séra a poté monovalentní séra. Polyvalentní O séra se využívají k určení sérotypu a monovalentní O séra se využívají pro určení antigenního složení. (36)

Antiséra například O: 1 je salmonela skupiny A. Skupina B určují séra O:4,5. skupina C O: 6,7,8, skupina D O:9. (36)

Polyvalentní O séra se využívají k sérotypizaci. 98% salmonel vykazuje O antigen. Antiséra musí být použité v logickém pořadí, nejdříve polyvalentní antiséra, poté skupinově specifická, monovalentní atd. (41)

Latexová aglutinace

Latexová aglutinace je metoda, která se provádí na stejném principu jako sklíčková aglutinace. Reaguje zde protilátka s antigenem. Latexová aglutinace je kvalitativní test. Dle latexové aglutinace nemůžeme určit sérotyp, ale pouze můžeme rozdělit salmonely dle skupin.

Wellcolex Colour Salmonella (Remel)

Wellcolex je komerční sada, která slouží k rychlé identifikaci salmonel. Obsahuje dvě latexová činidla, pozitivní a negativní kontrolu, míchací tyčinky a reakční kartičky. K tomuto testu jsou potřebné čisté kultury salmonel, které jsou vypěstované v tekutých půdách či v pevných kultivačních půdách. Reakční činidla jsou směsi suspenzí červených, modrých a zelených latexových částic, které jsou potažené protilátkou. Jsou namířeny proti určitým sérotypům salmonel. Po setkání s antigenem dojde k aglutinaci, díky latexovým částicím dojde ke vzniku barevných aglutinátů.

Nejdříve ve sterilním fyziologickém roztoku (0,85 % roztok NaCl) emulzifikujeme 1 – 2 kultury. Pečlivě promícháme lahvičky s latexovým činidlem. Označíme si reakční kartičky čísly pacientů. Poté na kartičku kápneme vždy po jedné kapce činidla, k těmto kapkám kápneme kapátkem po jedné kapce emulze s kulturou. Poté míchátkem promícháme. Po chvilce kývním kartičkou odečteme výsledek. Pozitivní reakci sledujeme změnou pozadí a aglutinací. Při negativní reakci nedojde k aglutinaci s žádným sérem. (39)

2.1.3 Postlaboratorní část

Při zjištění výskytu salmonel ve vzorku je nutné tuto skutečnost hlásit na epidemiologii, aby nedošlo k epidemii salmonelózy a také hlavně proto, aby se zamezilo

dalšímu šíření epidemie. Při hlášení se oznamuje jméno pacienta, rodné číslo a dále také jeho doktor.

3 Výsledky

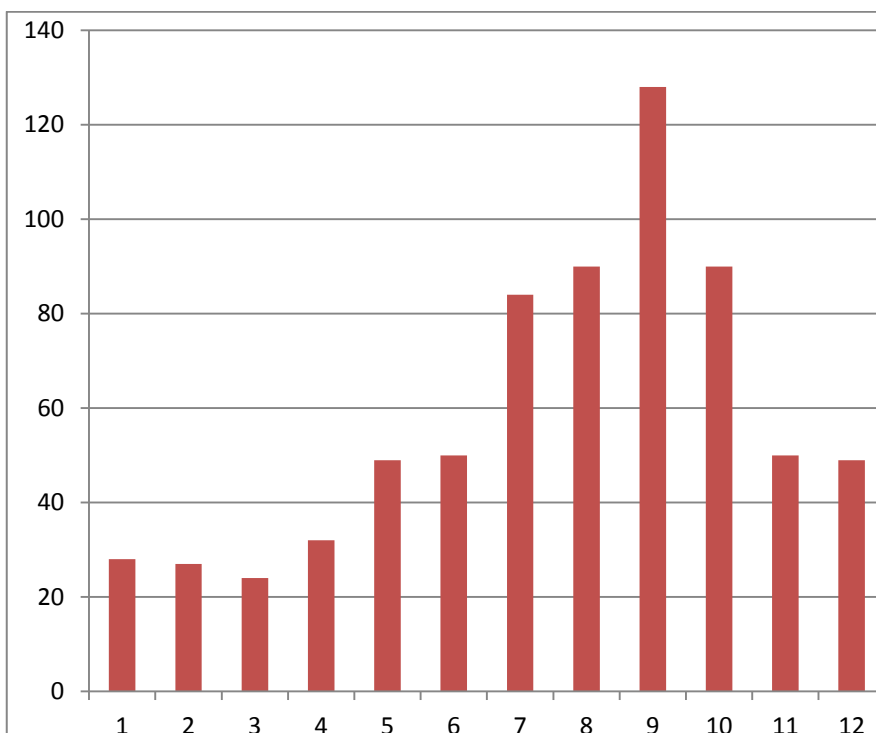
V průběhu roku 2013 jsem docházela do laboratoře synlab czech s.r.o., kde jsem si několikrát vyzkoušela postup při diagnostice salmonel. Snažila jsem se zjišťovat rychlost diagnostiky u metod MALDI TOF, biochemických řad a izolačního biochemického klínu. Dále jsem si vypisovala výsledky diagnostik z LIS (laboratorní informační systém), ze kterých jsem získala data, dle kterých jsem počítala zastoupení sérovarů *Salmonella* a jejich výskyt ve všech ročních obdobích. Z těchto dat jsem poté vytvořila tabulky a grafy.

3.1 Výskyt rodu salmonela ve všech ročních obdobích

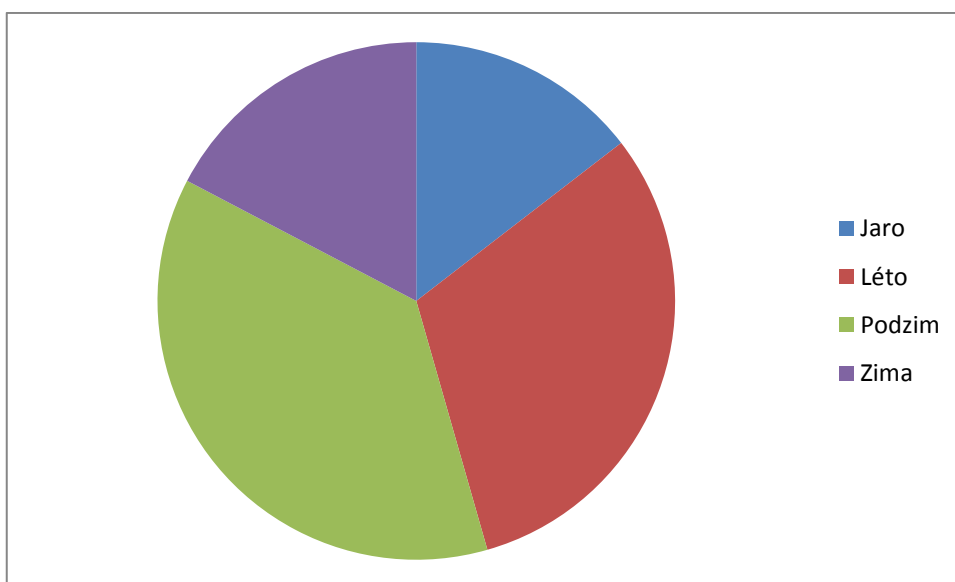
Při porovnání výskytu rodu *Salmonella* jsem zjistila, že bakterie rodu *Salmonella* se nejvíce vyskytuje v materiálu Synlab czech s.r.o v měsících říjen a září, což popírá mou hypotézu, že nejvyšší výskyt této bakterie, je v letních měsících v období grilovacích sezon.

V pozorovaném roce 2013 se nejvíce vyskytovala *Salmonella* Enteritidis, za tento rok bylo určeno 601 kmenů *Salmonella* Enteritidis v materiálu laboratoře synlab. Druhá v pořadí z hlediska výskytu se nejvíce objevovala *Salmonella* Typhimurium, které bylo za rok 2013 zpozorováno 31 kmenů. Třetí v pořadí s nejvyšším výskytem byla *Salmonella* Montevideo, která byla za rok 2013 napočítána 13krát.

Při pozorování výskytu *Salmonella* Enteritidis, jsem zjistila, že se nejvíce vyskytovala v měsíci září a to v počtu 111 kmenů. Dále se nejvíce tato salmonela diagnostikovala v měsíci srpen, což bylo v počtu 82 kmenů. V měsíci červenci byl zjištěn třetí nejvyšší výskyt a to v počtu 79 kmenů. V ročních obdobích se nejvíce vyskytovala *Salmonella* Enteritidis na podzim. Následně se nejvíce vyskytovala v létě, zimě a nejméně salmonel se vyskytovalo na jaře



Graf 1 : Výskyt rodu *Salmonella* v jednotlivých měsících. Na tomto grafu můžeme pozorovat převahu podzimních a letních měsíců v počtu diagnostikovaných salmonel.



Graf 2: Výskyt salmonel v jednotlivých ročních obdobích

Tabulka 2: Výskyt sérovarů rodu *Salmonella*. V tabulce můžeme vidět výskyt rodu salmonela ve všech měsících za rok 2013

	I.	II.	III.	IV.	V.	VI.	VII.	VIII.	IX.	X.	XI.	XII.	za rok
Agona		2											2
Anecho								1					1
Chester				1									1
Coel									4	1			5
Derby		3											3
Enteritidis	24	17	18	30	37	45	79	82	111	67	43	48	601
III.B										3			3
Infantilis		1			1								2
Java						2							2
Kentucky										2	3		5
Montevideo								2	7	4			13
Newport					5								5
Ohio										1			1
Skupina B	1		1		1			2		4	1		10
Skupina C1		1	1				2			1			5
Skupina D								1					1
Sp.		1	3		1								5
Stanley										3	1		4
Typhimurium	3	1	1	1	4	3	3	2	6	4	2	1	31
Virchow		1											1
Celkový počet v měsíci	28	27	24	32	49	50	84	90	128	90	50	49	701

Tabulka 3: Výskyt salmonel v jednotlivých ročních obdobích

Roční období	Počet salmonel	Procent
Jaro	105	15%
Léto	224	31%
Podzim	268	37%
Zima	125	17%

Pozorovala jsem i „exotičtější sérovary“, jako byly *Salmonella* Agona, Chester, Coel, Derbi, Infantilis, Java, Kentucky, Newport, Ohio, Standley. Virchow a dále salmonely skupin B, C1, D. Tyto sérovary sem mohly být zavlečeny z nějaké země s nižší hygienickou úrovní, protože se v České republice téměř nevyskytují. Tyto exotické druhy se musely určit v referenční laboratoři, protože v mikrobiologické laboratoři synlab czech s.r.o. nebylo dostatečných prostředků k jejich určení, například vhodná séra, neidentifikoval je ani přístroj MALDI TOF. Například *S. Anecho* se za rok 2013 vyskytla pouze jednou. Proto si myslím, že jde o zatažení bakterie z jiných koutů světa. *Salmonella* Agona v materiálu synlab czech s. r. o. byla diagnostikována dvakrát, ale domnívám se, že mohlo jít o stejného pacienta, který šel na opakované vyšetření.

Nejvíce se vyskytovala *Salmonella* Enteritidis. Byla v naprosté většině nad ostatními sérotypy. Poté jsem pozorovala nejvyšší výskyt *Salmonella* Typhimurium a Montevideo. V grafu č. 3 jsem uvedla jednu část grafu jako „ostatní“, to jsou salmonely, které se vyskytovaly pouze jednou a tím tedy patří mezi exotičtější druhy.

„Exotické“ salmonely jako *Salmonella* Coeln a Kentucky byly diagnostikovány pouze u jednoho pacienta a to dvakrát (při první diagnostice a při kontrole). *Salmonella* Agona byla diagnostikována u dvou pacientů opakovaně.

3.2 Porovnání metody MALDI TOF a diagnostiky dle biochemických znaků

Každá laboratoř používá k diagnostice salmonel různé postupy. Tyto postupy jsou standardní pro danou laboratoř a jsou závislé na zkušenostech a vybavenosti laboratoře.

Metoda MALDI TOFF je odlišná metoda od metod, pomocí nichž se diagnostikují biochemické vlastnosti dané bakterie a tím i samotná bakterie. Metoda MALDI TOF identifikuje bakterii na základě jejích jedinečných proteinových struktur. Kdežto metody, založené na diagnostice bakterií, pomocí biochemických vlastností je založená na znalostech těchto daných vlastností. U metod založených na biochemických vlastnostech je nutná jejich znalost odečítajícího. Například odečítající dle svých zkušeností ví, že salmonela štěpí glukózy a mannitol, že tvoří sirovodík, dále například že neštěpí ureu (tyto biochemické vlastnosti jsou uvedené v tabulce č.1) U biochemických řad, které jsou komerčně vyráběny, není nutná znalost těchto vlastností, jelikož se biochemické řady odečítají podle webového programu. Který po zadání výsledných reakcí (+/-) identifikuje bakterii.

Metoda MALDI TOF je poměrně drahá záležitost. Má vysokou pořizovací cenu a vysoké ceny za servis analyzátoru. Kvůli tomuto faktu si ho nemůžeme příliš laboratoří dovolit. Jeho provoz je téměř finančně nenáročný. K diagnostice na MALDI TOF se používá ocelová destička, která se používá stále. Metoda MALDI TOF je velmi rychlá metoda. Ušetříme až jeden den času, na rozdíl například od biochemického klínu, který musíme 24 hodin inkubovat při teplotě 37°C. MALDI TOF je schopný určit až 96 vzorků najednou, což také je časově výhodné. MALDI TOF má také jednoduchý software, který „vyhodí“ výsledky v přehledné tabulce.

Identifikace pomocí biochemického klínu je metoda, která vyžaduje znalost odečítajícího biochemických vlastností bakterií. Po rozočkování bakterie na izolační biochemický klín („izolačku“) se musí tato půda ještě nechat v termostatu inkubovat po dobu 18 hodin v termostatu. Tudiž to trvá nejméně o jeden den delší dobu než

identifikace pomocí MALDI TOF. Biochemické plotny jsou poměrně levnou záležitostí. Tato plotna stojí kolem 20 korun.

Diagnostika pomocí biochemických řad je poměrně drahá metoda. Jedna řada stojí až stovky korun. Časově je poměrně náročná, protože se také musí inkubovat po dobu 18 hodin při 37°C. Je ovšem uživatelsky méně náročná. Výsledné reakce (+/-) se uvedou do webového programu, který nám umožní vytisknout výsledek v přehledné formě.

4 Diskuze

4.1 Porovnání výskytu salmonel v materiálu Synlab czech s.r.o. a počtu hlášených onemocnění

Nemoci, způsobené salmonelami jsou infekční onemocnění, která je nutné hlásit na epidemiologii. Hlášení na epidemiologii je důležité kvůli zabránění dalšímu šíření onemocnění. Salmonelóza je velmi infekční onemocnění, proto je nutné zabránit jejímu dalšímu šíření. Díky nutnosti hlášení salmonel na epidemiologii, je také možné sledovat výskyt onemocnění způsobené bakterií rodu *Salmonella*. EPIDAT vydává každý rok počet hlášených onemocnění. Kromě salmonelóz, břišního tyfu, nebo paratyfu A nebo B sleduje také jiné infekční nemoci, jako jsou například shigelózy, kampylobakterií atd. Na webových stránkách Epidatu je možné dohledat informace o výskytu infekčních onemocnění například z roku 2004.

EPIDAT je program, který slouží k zajištění povinného hlášení, evidence a analýzy výskytu infekčních nemocí v České republice.

V materiálu Synlab czech s.r.o v roce 2013 se nevyskytla žádná diagnóza břišního tyfu, paratyfu A a B. Kdežto v EPIDATu nebyl hlášen břišní tyfus. Paratyfus A byl diagnostikován dvakrát a paratyfus B jednou.

Od roku 2004 do roku 2013 se výskyt salmonel snižuje. Například v roce 2004 bylo hlášeno 30724 salmonel a v roce 2013 bylo diagnostikováno 10280 salmonel. V roce 2007 se počet hlášených salmonel oproti předchozímu roku rapidně zvýšil.

V roce 2013 bylo dle EPIDATu na 100 000 obyvatel bylo hlášeno 97,8 salmonel.

Dle tabulky č. 4 můžeme pozorovat mírné snížení výskytu salmonel v roce 2010 a 2011. V roce 2009 bylo diagnostikováno 10805 salmonel a poté počet hlášených salmonel klesl na 8622 v roce 2010 a od roku 2011, kdy bylo hlášeno 8752 salmonelóz, jejich výskyt roste. A v roce 2013 vzrostl na počet 10820.

Tabulka č.5 Počet hlášených salmonelóz za období 2009-2013

Rok	počet hlášených salmonelóz
2009	10805
2010	8622
2011	8752
2012	10507
2013	10820

Zdroj : EPIDAT

Diagnostikované kmeny v Synlab czech s.r.o. byly hlášeny na epidemiologii. Tato data byla sdělena také EPIDATu, tudíž z celkového počtu hlášených kmenů: 10 280 bylo 701 salmonel diagnostikováno v laboratoři Synlab czech s.r.o. Synlab tedy diagnostikoval celkem 6,8% kmenů z celkového počtu diagnostikovaných kmenů. Musíme také vzít v úvahu to, že počet salmonel diagnostikovaných v Synlabu a následně hlášených je méně, jelikož mohlo jít také o opakované nálezy, které se již na epidemiologii nehlásí.

V červnu roku 2013 bylo dle EPIDATu hlášeno 2995 salmonelóz. V materiálu Synlab czech s.r.o. bylo diagnostikováno v červnu roku 2013 50 kmenů salmonel. Počet salmonel (50 kmenů) je z celkového počtu hlášených onemocnění přibližně 1,7 % .

Relativně, tudíž na 100 000 obyvatel, bylo hlášeno celkem 97,8 salmonelóz.

4.2 Porovnání metod k určení salmonel či sérotypizaci salmonel

Metody k identifikaci salmonel jsou odlišné metody. Jsou odlišné ve finanční náročnosti, v časové náročnosti ale také v principech stanovení (MALDI TOF/ diagnostika pomocí biochemických znaků)

Hmotnostní spektrometr je velmi finančně náročná záležitost. Jeho pořizovací cena se pohybuje okolo 150 000 – 850 000 dolarů, což je v přepočtu cca od 3,15 milionů korun do cca 17,5 milionů korun. Hmotnostní spektrometr má sice vysokou pořizovací cenu, ale náklady na jeho provoz jsou minimální. K diagnostice pomocí MALDI TOF se používá pouze ocelová destička, která se používá opakovaně. Dále k použití MALDI TOF se používá matrix, což není finančně náročné. Také jsou drahé pravidelné údržby vyškolenými pracovníky. Diagnostika jedné série vzorků trvá v řádech desítek minut. Během této doby se určí téměř sto vzorků.

K diagnostice rodu *Salmonella* se využívá také již zmíněný izolační biochemický klín. Pomocí biochemického klínu můžeme určit až osm biochemických znaků, podle nichž odlišíme *Salmonellu* od jiných bakterií. (*Citrobacter*, *Yersinia*, *Shigella*, *Escherichia coli*)

Při této diagnostice je důležitá znalost odečítacího biochemických znaků. Tato metoda je velmi levná. Jeden izolační biochemický klín stojí kolem dvaceti korun. Dále se k určení musí použít po jednom cukru – sacharóza a mannitol a dále také jedno sterilní nařezané sklíčko. Můžeme tedy říct, že jedno určení stojí přes dvacet korun, což je v porovnání s ostatními metodami výhodné.

Dále k diagnostice salmonel se využívá již zmíněná fenotypická řada, v laboratoři Synlab czech s.r.o API 20E. Komerční sada API 20E stojí, dle ceníku Biomeriúx, přibližně 7000 korun. Tato sada obsahuje 25 řad. Což vychází přibližně na řadu 280 korun. API řada je poměrně časově náročná metoda, protože se řada musí nechat ještě inkubovat 18 hodin v termostatu při teplotě 37°C.

4.3 Diagnostika salmonel dnes a dříve

Mikrobiologie, jako každá věda, se rozvíjí a neustále se objevují metody, které usnadňují práci, čas a finance laboratořím, laborantů, doktorům. Je snaha objevit metody, kde se nebude využívat tolik manuální práce, ale spíše se budou používat přístroje. Dříve šlo spíše o subjektivní hodnocení, závislé například na zkušenostech odečítajícího.

V dřívějších dobách se hodně využívala mikroskopie, což je poměrně levná metoda, ale na druhou stranu moc k přesnému stanovení nepomůže. Pomůže rozlišit grampozitivní a gramnegativní bakterie.

Také hodně záležel na kultivaci. Zkušený odečítající odečítal plotny nejen vizuálně (barva, tvar kolonie), ale také pomocí například čichu. (u salmonel je známá produkce sirovodíku, který je cítit.)

Dříve se používaly (v některých laboratořích stále ještě používají) zkumavkové řsdy. Ty jsou na stejném principu jako biochemické řady, ale biochemické řady jsou méně náročné na přípravu, odečítají se pomocí webového programu a jsou ve zmenšené podobě.

Také už se pomalu, ale jistě opouští od izolačního biochemického klínu, protože je poměrně manuálně náročný a hlavně se musí nechat inkubovat nejméně 18 hodin.

Po nástupu MALDI TOF se stalo subjektivní hodnocení objektivním. MALDI TOF má úplně jiný princip diagnostiky. Dříve se pozorovaly spíše biochemické vlastnosti, ale pomocí MALDI TOF se diagnostikuje na základě stavby buňky, na základě jejich stavby proteinů. Ovšem i výsledky určení pomocí MALDI TOF musí být kontrolovány.

Myslím, že MALDI TOF bude využívat stále více a více laboratoří, které tím ušetří práci a čas při diagnostice.

5 Závěr

Salmonella Enteritidis může způsobovat velmi závažná onemocnění, ale na druhou stranu se dá velmi dobře léčit. Ať už pomocí antibiotik nebo pomocí klasické léčby průjmů (Endiaron, aktivní uhlí apod.). Vhodné je, co nejrychleji zastavit proces šíření této infekce a hlavně vyhledat možné zdroje nákazy.

Celkem bylo izolováno 701 salmonel za rok 2013 v laboratoři synlab czech s.r.o, to bylo 21 sérotypů salmonel. Nejvyšší výskyt čítala *Salmonella* Enteritidis, které bylo celkem 601 kmenů. Dále bylo nejvíce *Salmonella* Typhimurium a Montevideo. Předpokládala jsem, že nejvyšší výskyt salmonel bude v létě, uvažovala jsem tak na základě toho, že v letních měsících je grilovací sezóna, tudíž nedojde k dostatečnému tepelnému zpracování masných výrobků, které nezabije bakterie. Dále jsme tak usuzovala na základě toho, že v letních měsících jezdí lidé na exotické dovolené, kde je možnost nákazy z kontaminované vody. Má hypotéza nebyla potvrzena, protože nejvyšší výskyt rodu *Salmonella* byl v měsíci září a ten byl 128 kmenů, oproti tomu například v srpnu bylo identifikováno celkem 90 salmonel, což bylo také v měsíci říjnu. Tudíž nejvíce salmonel bylo diagnostikováno na podzim, což neodpovídá mé hypotéze.

Pozorovala jsem i exotičtější sérotypy salmonel. Jako příklad bych uvedla *Salmonella* Anecho, Agona a jiné, které sem byly pravděpodobně zavlečeny z nějakých turistických destinací s nízkou hygienickou úrovní, protože u nás nejsou známé.

Jako nejlepší řešení při diagnostice rodu *Salmonella* se mi jeví metoda MALDI TOF, usuzuji tak na základě přesnosti, rychlosti a finančních nákladů spojených s diagnostikou. Další výhodnou metodou je diagnostika dle biochemických vlastností pomocí biochemického klínu. Tato metoda je také rychlá, levná a uživatelsky nenáročná. Podle mého názoru by měli laboratoře použít alespoň dvě metody (MALDI TOF a izolační izolační biochemický klín), aby nemohlo dojít k nepřesným výsledkům nebo k chybám ve vyšetření. Pokud by šlo jen o ověření toho, co bylo zřejmé z kultivace, to že se jedná například o *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, bych doporučovala použít metodu MALDI TOF, protože si myslím, že v tu chvíli je to

nejrychlejší možné řešení, které se nabízí. Pro zjištění sérotypu se nabízí skličková aglutinace či latexová aglutinace.

6 Literární zdroje

1. Manual of clinical microbiology. 6th ed. Editor Patrick R Murray. Washington: ASM Press, 1995. ISBN 15-558-1086-1.
2. VOTAVA, Miroslav. Lékařská mikrobiologie obecná. 2.vydání : Neptun, 2005, 1482 s. ISBN 80-868-5000-5.
3. VOTAVA, Miroslav. Lékařská mikrobiologie speciální. 2.vydání. Brno: Neptun, 2003, 351 s. ISBN 80-902-8966-5.
4. Patrick A.D.Grimon. Antigenic formulae of the Salmonella serovars; 9.th edition. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella; Paris, 2007
5. BERGER, Josef. Buněčná a molekulární biologie: [učebnice biologie pro gymnázia a střední odborné školy]. Vyd. 1. Editor Patrick R Murray. Havlíčkův Brod: Tobiáš, 1996, 495 s. ISBN 80-858-0842-0.
6. Dědičová D, Karpíšková K. Nová revize Kauffmannova –Whiteova schématu pro identifikace Salmonel. Zprávy EM (SZÚ), 18(3)2009
7. MARTIN J. WILLIAM; Prevalence of Serotypes of Salmonella; Appl. Microbiol. 1969;17 (1):111
8. Boekema EJ, Scheffers DJ, van Bezouwen LS, Bolhuis H, Folea IM. Focus on membranedifferentiation and membranedomains in the prokaryotic cell.
9. BEDNÁŘ, Marek. Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie. 1. vyd. Editor Patrick R Murray. Praha: Marvil, 1996, 167 s. ISBN 80-858-0842-0.
10. ROSYPAL, Stanislav. Obecná mikrobiologie: Biologie bakterií. II. díl. 1. vyd. Editor Patrick R Murray. Praha: SNTL, 1972, 558 s. ISBN 80-858-0842-0.
11. PODSTATOVÁ, Hana. Obecná mikrobiologie: učebnice pro zdravotnické školy a bakalářské studium. 1. vyd. Editor Patrick R Murray. Olomouc: Epava, 2001, 283 s. ISBN 80-862-9707-1.
12. LANSING M. PRESCOTT, Lansing M.John P. Microbiology. 6. ed. Boston, Mass: McGraw-Hill Higher Education, 2005. ISBN 00-711-1217-0.

13. EAMOS [online]. [cit. 2014-04-03]. Dostupné z: 35.
http://www.eamos.cz/amos/kvz/externi/kvz_444/mikrobiologie.htm
14. Dieckmann R, Malorny. Rapid Screening of Epidemiologically Important *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Serovars by Whole –Cell Matrix – Assisted Laser Desorption Ionization of Flight Mass Spectrometry. *Applied and Environmental Microbiology*. 4136: 4146. 2011
15. Park S.H., Kang D.H. Development of an Improved Selective and Differential Medium for Isolation of *Salmonella* spp. *American Society for microbiology. journal of clinical microbiology* 5: 2012.
16. SCHARFEN, Josef. Diferenciální diagnostika v klinické mikrobiologii. 1. vyd. Praha: František Skopec - Nucleus HK, 2013. Mikrobiologie. ISBN 978-808-7009-321.
17. Brener F.W. , Villar R.G., Angulo F.J., Tauxe R., Swanminathan B. *Journal of Clinical microbiology*. 30: 2000; 9780321536115 ISBN
18. PODSTATOVÁ, Renata. Hygiena a epidemiologie pro ambulantní praxi. Praha: Jesenius, 2010, 141 s. ISBN 978-807-3452-124.
19. KLABAN, Miroslav. Ilustrovaný mikrobiologický slovník: učebnice pro zdravotnické školy a bakalářské studium. 1. vyd. Editor Patrick R Murray. Praha: Galén, 2005, 654 s. ISBN 80-726-2341-9
20. GÖPFERTO VÁ, Dana, Mikrobiologie, imunologie, epidemiologie: pro střední a vyšší odborné zdravotnické školy. Vyd. 1. Editor Patrick R Murray. V Praze: Triton, 1997, 654 s. ISBN 80-858-7548-9.
21. SKOOG, Douglas A, F HOLLER a Stanley R CROUCH. Principles of instrumental analysis. 6th ed. /. Belmont, CA: Thomson Brooks/Cole, xv, 1039 p. ISBN 04-950-1201-7.
22. Ambrožová H. Salmonelózy a kampylobakteriόzy. *Lékařské listy*: 2010
23. Mandřáková Z. Exotické infekce a možnosti jejich prevence očkováním. *Lékařské listy*: 2013
24. BENEŠ. Infekční lékařství. Praha: Gallen, 2009

25. Rene S. Hendriksen. Global Salm - Surv, A global Salmonella surveillance and laboratory support project of the World Health Organization, Laboratory Protocols, Level Training Course; Kits for identification of Enterobacteriaceae Using API. Kits for identification of Enterobacteriaceae Using ApI; 4th edition, 2003
26. Laughlin R.C., Knodler A.L., Barhoumi R., Payne H. R., Wu J., Gomez G., Pugh R., Baumler A.J., Steele – Mortimer O., Garry A. Spatial Segregation of Virulence Gene Expression during Acute Enteric Infection with Salmonella enterica serovar Typhimurium. M Bio 5(1): 2014
27. VANIŠTA, J. Importované nákazy břišním tyfem a paratyfem. Inertní medicína pro praxi. 10:2005
28. Stránky firmy Bruker [online]. [cit. 2014-04-03]. Dostupné z: <http://www.bruker.com/products/mass-spectrometry-and-separations.html>
29. KREJSEK, J. Klinická imunologie. 1. vyd. Hradec Králové: NUCLEUS HK, 2004. ISBN 80-862-2550-X. 869- 875
30. SÁBO. Vybrané kapitoly z mikrobiologie. Trnava, 1997. ISBN 8085665956.
31. Státní ústav pro kontrolu léčiv [online]. [cit. 2014-04-03]. Dostupné z: <http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0202924&tab=text>
32. Infekční nemoci 2011, Zdravotnická statistika, ústav zdravotnických informací a statistiky ČR. Praha 2
33. Táborská J. Infekční průjmová onemocnění. Inertní medicína pro praxi 9:2005
34. Infekční nemoci v České republice v letech 2010–2012, Úzis, Praha 2013
35. Státní zdravotní ústav [online]. [cit. 2014-04-03]. Dostupné z: 35. http://www.szu.cz/uploads/documents/CeM/Zpravy_EM/22_2013/07_cervenec/233_vyskyt.pdf
36. Stránky firmy biorad [online]. [cit. 2014-04-03]. Dostupné z: 35. http://www.biorad.com/webroot/web/pdf/inserts/CDG/cs/59021_2011_08_CZ.pdf

37. *Med muni* [online]. [cit. 2014-04-03]. Dostupné z: 35.
<http://www.med.muni.cz/salmonel/tyfus.htm>
38. Zahradnický, J.: Mikrobiologie a epidemiologie. 1. vydání. Praha, Avicenum, 1987.
39. Remel [online]. [cit. 2014-08-03]. Dostupné z: www.remel.cz
40. *Hmotnostní spektrometrie* [online]. [cit. 2014-08-03]. Dostupné z:
<http://lem.ocol.cz/cs/info/hmotnostni-spektrometrie>
41. *Kultivační metody* [online]. [cit. 2014-08-03]. Dostupné z:
http://biomikro.vscht.cz/vyuka/mzp/2014-03-14_Kultivacni_metody.pdf
42. JINDRÁK, V. Antibiotická politika a prevence infekcí v nemocnici, Mladá fronta a.s., Praha : 2014