



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Sciences

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

**Problematika kultivačního vyšetření stolice –
bakteriologie**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Studijní program:

SPECIALIZACE VE ZDRAVOTNICTVÍ

Autor: Lukáš Kavalec

Vedoucí práce: MVDr. Zuzana Lapáčková

České Budějovice 2019

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci s názvem „*Problematika kultivačního vyšetření stolice – bakteriologie*“ jsem vypracoval samostatně pouze s použitím pramenů v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské/diplomové práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích 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 bakalářské práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé bakalářské práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 3. 5. 2019

.....

Lukáš Kavalec

Poděkování

Rád bych poděkoval především paní MVDr. Zuzaně Lapáčkové za cenné rady, čas a snahu při vypracovávání mé bakalářské práce, dále poděkování patří mé rodině a přátelům, kteří mě podporovali nejen během vypracovávání této práce, ale v průběhu celého studia na vysoké škole.

Problematika kultivačního vyšetření stolice – bakteriologie

Abstrakt

Průjmová onemocnění jsou celosvětovým problémem. V rozvojových zemích, kde je nízký hygienický standart a omezená dostupnost lékařské péče, je velká část mortality zapříčiněna právě průjmy, ve vyspělých zemích dochází k úmrtí méně často. V našich podmínkách mezi nejčastější infekce patří salmonelózy způsobené bakteriemi rodu *Salmonella*, kampylobakterií jejichž původci jsou bakterie rodu *Campylobacter* a dále enterotoxikózy, což jsou otravy z potravin. Gastroenteritidy mohou být způsobované také viry např. střední adenoviry, kaliciviry a astroviry. Parazitární gastroenteritidy jsou problémem výhradně rozvojových zemích v tropických oblastech.

V teoretické části mé bakalářské práce jsem zpracoval obecnou charakteristiku průjmu a popis nejčastějších původců bakteriálních gastroenteritid a možnosti jejich diagnostiky. Praktickou část jsem zpracovával v laboratoři mikrobiologie Synlab v Českých Budějovicích, kde jsem prováděl identifikaci bakteriálních původců infekčních průjmů z výtěrů z rekta pomocí kultivace na vhodných mediích, přesné dourčení bylo provedeno pomocí biochemických testů, MALDI-TOF a aglutinačních testů k přesné sérotypizaci kmenů.

Ze získaných dat a dat laboratoře jsem vypracoval statistiku porovnávající výsledky laboratoře s výsledky v celé České republice.

Cílem mé práce bylo seznámit se s problematikou infekčních gastroenteritid, vypracovat odbornou rešerši na dané téma, popsat a osvojit si metody přímého průkazu bakterií, rutinně využívaných v mikrobiologické diagnostice průjmů – především kultivaci a statisticky srovnat výsledky laboratoře s celou Českou republikou.

Klíčová slova: rod *Salmonella*; rod *Campylobacter*; laboratorní diagnostika; četnost výskytu

The Problematics of Cultivated Examination of Stool – Bacteriology

Abstract

Diarrheal diseases are a global problem. In developing countries, where there is a low hygienic standard and limited availability of medical care, a large proportion of mortality is caused by diarrhea, in developed countries deaths are less frequent. In our conditions the most common infections are salmonellosis caused by the bacteria of genus *Salmonella*, campylobacteriosis caused by *Campylobacter* bacteria, and Enterotoxicoeses, which are food poisonings. Gastroenteritis can also be caused by viruses such as moderate adenoviruses, kaliciviruses and astroviruses. Parasitic gastroenteritis is a problem solely for developing countries in tropical areas.

In the theoretical part of my bachelor thesis I elaborate the general characteristics of diarrhea and the description and possibilities of diagnostics of the most frequent agents of bacterial gastroenteritis.

The practical part was processed in the laboratory of the microbiology Synlab in České Budějovice, where I carried out an identification of bacterial agents of infectious diarrhea from rectal swabs by cultivation on suitable media, accurate determination was performed by biochemical tests, MALDI-TOF and agglutination tests for accurate serotyping of strains.

From the obtained data and data from the laboratory I elaborated a statistic comparing the laboratory results with the results in the whole Czech Republic.

The aim of my thesis was to acquaint myself with the problematics of infectious gastroenteritis, to elaborate a specialized research on the topic, to describe and acquire methods of direct detection of bacteria routinely used in microbiological diagnosis of diarrhea – especially cultivation and statistically compare laboratory results with the whole Czech Republic.

Key words: genus *Salmonella*; genus *Campylobacter*; laboratory diagnostics; frequency of incidence

Obsah

1	Úvod	8
2	Teoretická část	9
2.1	Průjmové onemocnění	9
2.1.1	Rozdělení průjmu podle příčiny vzniku:	9
2.1.2	Terapie průjmu	9
2.1.3	Diagnostika průjmu	10
2.2	Původci:	10
2.2.1	Rod <i>Campylobacter</i>	10
2.2.2	Rod <i>Salmonella</i>	12
2.2.3	Rod <i>Shigella</i>	14
2.2.4	Rod <i>Yersinia</i>	16
2.2.5	Rod <i>Escherichia</i>	18
3	Metodika:	21
3.1	Odběr materiálu	21
3.2	Příjem vzorku do laboratoře	21
3.3	Použitá kultivační média:	22
3.3.1	Amiesovo médium	22
3.3.2	Krevní agar	22
3.3.3	Biochemický klín s Endovou půdou	23
3.3.4	McConkey agar	24
3.3.5	Deoxycholát citrát agar – DC agar – SS agar	25
3.3.6	Karmali agar – <i>Campylobacter</i> agar	25
3.3.7	Selenitový bujón	26
3.4	Postup:	26
3.4.1	Zpracování primokultury	26
3.4.2	Odečítání primokultury a vyočkování pomnožovací půdy	27
3.4.3	Identifikace suspektních kolonií	28
3.4.4	Zpracování výsledků	33
4	Výsledky	34
4.1	Výskyt bakteriálních střevních infekcí v říjnu 2018	35
4.2	Výskyt bakteriálních gastroenteritid v průběhu roku 2017	35

4.3	Výskyt zjištěných bakteriálních patogenů v Synlabu ČB v roce 2017	36
4.4	% zastoupení infekcí v říjnu 2018 v Synlabu ČB a celé ČR.....	37
4.5	Porovnání četnosti patogenů za měsíc říjen 2017 a 2018 v Synlabu ČB.....	38
4.6	Porovnání četností C. jejuni a S. Enteritidis během roku 2017 v Synlabu ČB	39
4.7	Vývoj četností salmonelóz a kampylobakterióz za posledních 5 let v celé ČR	40
5	Diskuze	41
6	Závěr.....	43
7	Použitá literatura.....	44
8	Seznam zkratk.....	46

1 Úvod

Průjmová onemocnění patří v České republice mezi nejčastější infekční onemocnění hned za infekcemi dýchacích cest. V České republice je ročně hlášeno okolo 30000 případů, přičemž se nejedná o všechny případy těchto onemocnění, protože lidé s lehčími průběhy často nenavštíví svého lékaře, a nemoc přečkají. V našich podmínkách se nejedná o smrtelná onemocnění. Na životě ohrožují pouze malé děti a starší osoby, tyto skupiny obecně hůře snášejí dehydrataci, která je pro ně velkým problémem.

Mezi původce průjmu se řadí především obligátní patogeny z rodů *Salmonella*, *Campylobacter*, *Yersinia* a *Shigella*, zástupci oportunních patogenů jsou patogenní kmeny *Escherichia coli*. Infekční gastroenteritidy mohou být i virového původu, zástupci původců jsou střevní adenoviry, kaliciviry atd. Parazitární průjmy jsou doménou téměř výhradně rozvojových zemí, ve vyspělých zemích se s nimi setkáváme zcela výjimečně (jedná se většinou o infekce získané při cestách do zemí s nízkým hygienickým standardem).

2 Teoretická část

2.1 Průjmové onemocnění

Průjem (diarrhoea) je hlavním příznakem střevních infekcí (enteroinfekcí). Je definován na základě změn frekvence, konzistence, množství a charakteru stolice. Aby byla stolice definována jako průjem musí docházet k vyprazdňování minimálně 3krát denně řídké stolice nebo jednou denně řídké stolice s hlenem, hnisem nebo krví. Podle délky trvání se průjem rozděluje na akutní (max 14 dní), protahovaný (15-30 dní) a chronický (více než 30 dní). Mezi další příznaky střevních infekcí patří zvracení, bolesti břicha, zvýšená teplota až horečka, žízeň, slabost a další. (Rozsypal, 2015)

2.1.1 Rozdělení průjmu podle příčiny vzniku:

- Sekreční – z důvodu poruchy transportních mechanismů pro ionty ve střevě
- Osmotický – z důvodu zvýšeného obsahu osmoticky aktivních látek ve střevě, řadí se sem látky nevstřebatelné i ty, které už vstřebat nebylo možné v důsledku překročení jejich kapacity resorpce
- Motorický – daný zvýšenou pohyblivostí střev (peristaltikou), kterou reguluje především vegetativní nervový systém
- Zánětlivý – vzniklý při zánětu střevní sliznice, při které dochází ke snížení absorpce vody, elektrolytů spolu s tvorbou zánětlivého sekretu (Rozsypal, 2015)

2.1.2 Terapie průjmu

Hlavní cestou terapie je dostatečná rehydratace vodou obohacenou o dostatečné množství základních iontů a následná brzká realimentace. V případě lehké až střední dehydratace se tekutiny doplňují většinou perorálně, intravenózní rehydratace se nasazuje až v případě těžké dehydratace se ztrátou hmotnosti nad 10 %. (Beneš, 2009; Lukáš a Žák, 2014)

2.1.2.1 Antibiotická léčba

Antibiotika (ATB) se běžně při léčbě akutních gastroenteritid nepoužívají, pouze s výjimkou 3 skupin indikací:

- U střevních infekcí se septickým průběhem, u imunodeficitních pacientů, komplikacích a lokalizovaných projevech onemocnění.

- Při invazi mikrobů do lymfatických uzlin, vnitřních orgánů nebo bakteriémii, příkladem je salmonelózová sepse, meningitida, tyfus atd.
- Poslední indikací jsou důvody epidemiologické, kdy jsou ATB podávána ke zkrácení doby vylučování patogenů stolicí (především u onemocnění cholery a shigelózy) ve snaze zastavit šíření těchto onemocnění v populaci. (Beneš, 2009)

2.1.3 Diagnostika průjmu

Průjmová diagnostika je založená na klinických projevech a průkazu patogenu. Původce infekčního průjmu může být identifikován pomocí přímé metody, mezi které patří světelná mikroskopie, kultivace, průkaz antigenu, průkaz DNA, RNA a další. Nepřímý průkaz pomocí sérologie se běžně nepoužívá, protože většina onemocnění má akutní průběh a probíhá pouze na sliznicích – tudíž nejsou vhodné podmínky k tvorbě sérových protilátek. Vyšetřování sérových protilátek se provádí při podezření na extraintestinální infekce např. salmonelózu nebo yersiniózu. K vyšetření se většinou používá výtěr z rektu, vzorek stolice (na vyšetření virologické a parazitologické) nebo odebraná krev. (Beneš, 2009; Votava, 2010)

2.2 Původci:

Skupina mikroorganismů způsobující průjmové onemocnění je velice rozmanitá, řadí se sem bakterie, viry i někteří parazité. Mezi nejdůležitější patří právě bakterie, které se dají rozdělit na obligátní a oportunní patogeny. Obligátní původci způsobí onemocnění u každého jedince i když je zcela zdravý (rod: *Campylobacter*, *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*), opakem jsou oportunní zástupci (např. některé kmeny *Escherichia coli*), kteří se většinou vyskytují v trávicím ústrojí běžně, ale onemocnění vyvolají jen za určitých podmínek např. u imunokompromitovaných pacientů, po užívání antibiotik atd. (Schindler, 2014) Mezi původce virového původu se řadí rotaviry, kaliciviry, střevní adenoviry a astroviry. (Táborská, 2013) zástupcem parazitárního patogenu je např. *Entamoeba histolytica*. (Schindler, 2014)

2.2.1 Rod *Campylobacter*

Do tohoto rodu se zahrnují mikroaerofilní a kapnofilní bakterie nalézané v zažívacím traktu teplokrevných zvířat i člověka. (Votava, 2003) Dříve byla tato skupina označována jako mikroaerofilní vibria, tyto bakterie byly známy jako původci potratů u hovězího a vepřového dobytka. Jako samostatný rod byly uznány až po zvládnutí

kultivace a prokázání jako patogenů u člověka. Kampylobaktery obecně vyvolávají střevní infekce u člověka, potraty u domácích zvířat. (Bednář, 1996)

Rod *Campylobacter* se skládá z 18 druhů, z čehož 11 může vyvolat onemocnění u člověka. (Beneš, 2009) V přírodě jsou velmi rozšířeny, většina je uzpůsobena na střevní trakt teplokrevných živočichů. *C. jejuni* a *C. lari* se převážně vyskytují v trávícím traktu ptáků, u prasat je to *C. coli*. (Ketley a Konkel, 2005) Z hlediska patogenity pro člověka jsou nejdůležitějšími právě *C. jejuni* a *C. coli* získané z těchto rezervoárů. (Bednář, 1996)

2.2.1.1 Morfologie

Kampylobaktery jsou štíhlé, zakřivené až spirálovité gramnegativní tyčinky. (Votava, 2003) Za nepříznivých podmínek mohou přecházet do kokovitěho tvaru. Mají polárně umístěný bičík umožňující pohyb. Jejich tvar umožňuje snadnější průnik hlenem ke sliznici. (Bednář, 1996)

2.2.1.2 Antigenní struktura

Podle povrchových antigenů, mezi které patří lipopolysacharidový a proteinový (na cytoplazmatické membráně) a dále flagelární (bičíkový), který je nejvíce využíván k typizaci. Celkem lze rozeznat více než 100 sérotypů. (Bednář, 1996)

2.2.1.3 Patogenita a patogeneze

Kmeny schopné vyvolat akutní infekci, projevující se průjmem, mohou produkovat cytotoxiny nebo enterotoxiny podobné choleroému toxinu. Infekce nastává požitím infikované potravy, vody nebo kontaktem s nakaženými zvířaty. Kampylobaktery se množí v tenkém střevě a pronikají do epitelu, kde se vyvolávají zánět. Ve stolici je poté možné prokázat přítomnost erytrocytů a leukocytů. Infekce může být lokalizována ve střevě, nebo může dojít k propuknutí systémového horečnatému onemocnění způsobeného průnikem patogenu do krevního řečiště. Onemocnění je provázeno silnými bolestmi břicha, průjmem, někdy s příměsí krve a bolestmi hlavy. (Bednář, 1996)

2.2.1.4 Laboratorní diagnostika

Z laboratorní diagnostiky se nejčastěji používá přímé stanovení, protože průkaz protilátek není vždy spolehlivý. Mikroskopie se používá jen k předběžné diagnóze (např. u podezření na apendicitidu). Pozoruje se nativní preparát, kde se hodnotí morfologie a pohyblivost nebo barvený preparát. Mikroskopie však nenahrazuje

kultivaci, která je při diagnostice nejdůležitější. K úspěšné kultivaci se používají speciální izolační půdy a specifické podmínky k odstínění doprovodné mikroflóry. Jako kultivační média se používá např. agar dle Karmaliho. Kultivace se provádí za zvýšené teploty 42–43 °C (napodobuje se teplota uvnitř těla ptáků, kteří mají vyšší teplotu než lidé), za zvýšené koncentrace CO₂, sníženého O₂ a trvá 48 hodin. Kolonie jsou typicky ploché, mléčné barvy a lehce rozplývavé. (Greenwood et al., 1999)

2.2.2 Rod *Salmonella*

Tento rod zahrnuje bakterie, z čeledi *Enterobacteriaceae*, které vyvolávají onemocnění lidí a zvířat a mají společné biochemické vlastnosti a společné antigeny. (Bednář, 1996)

Salmonely se člení do několika sérotypů, které byly až do nedávna považovány za jednotlivé druhy. Dle genetického stanovení bylo zjištěno, že rod *Salmonella* čítá pouze jeden druh, a to *Salmonella enterica*. Běžně se vyskytující sérotypy jsou označovány podle původních druhových jmen např. *Salmonella enterica* Enteritidis se zkráceně označuje jako *Salmonella* Enteritidis. (Bednář, 1996) Salmonely jsou primárními enteropatogeny divokých i domestikovaných zvířat a člověka. (Bell a Kyriakides, 2008) Mohou se vyskytovat v odpadcích, vodě a půdě. Potraviny mohou být infikovány primárně (bakterie infikovala zvíře, které bylo použito jako surovina pro potravinářskou výrobu – maso, vejce), nebo být přítomny druhotně. (Bednář, 1996)

Některé sérotypy jsou úzce adaptována na druh hostitele např. *S. Typhi* a *S. Paratyphi* na člověka, *S. Gallinarum* na drůbež, naopak jiné sérovary specifického hostitele nemají např. *S. Typhimurium*. Salmonely je možné dále rozdělit na salmonely primárně antropopagenní a primárně zoopatogenní. (Bednář, 1996)

2.2.2.1 Morfologie

Jsou to gramnegativní, fakultativně anaerobní, krátké tyčinky pohybující se pomocí bičíku. (Mahmoud, 2012)

2.2.2.2 Antigenní struktura

Antigenní struktura je pro identifikaci salmonel velmi důležitá. Pár biochemických testů a stanovení několik antigenů stačí k zařazení bakterie do salmonel. Přesné určení vyžaduje detailnější antigenní analýzu. (Greenwood et al., 1999)

Salmonely mají dva soubory antigenů, které jsou pomocí sérologie snadno prokazatelné a využívají se k přesné identifikaci. Rozlišují se O-antigeny a H-antigeny. O-antigeny – somatické jsou termostabilní polysacharidy lipopolysacharidu buněčné stěny. H-antigeny – bičíkové jsou strukturní proteiny bičíků. (Greenwood et al., 1999)

2.2.2.3 Primárně antropatogenní salmonely

Do této skupiny se řadí salmonelové sérovary *Salmonella* Typhi a *Salmonella* Paratyphi A, B a C. Jsou to bakterie primárně patogenní pro člověka a způsobují závažná onemocnění – břišní tyfus, resp. paratyfus. (Votava, 2003)

2.2.2.4 Primárně zoopatogenní salmonely

Tyto salmonely jsou izolovatelné z různých živočišných druhů, u člověka jsou původci bakteriálních střevních infekcí. Spolu s rodem *Campylobacter* patří k nejběžnějším původcům bakteriálních střevních nákaz u nás. Do této skupiny patří sérovary *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium a další. (Votava, 2003)

2.2.2.5 Patogenita

Patogenita je u rodu *Salmonella* velmi rozličná, rozdíly jsou způsobené jednak daným sérovarem a také na stavu nakažené osoby, kdy u imunodeficitních dochází k těžšímu průběhu, stejně tak i dětí a starších lidí. Patogenita je trojího typu. (Bednář, 1996)

Jedna skupina způsobuje septická onemocnění jako je břišní tyfus, jehož původcem je *Salmonella* Typhi. Do této skupiny se dále řadí salmonely, které vyvolávají onemocnění podobná břišnímu tyfu – paratyfy. (Bednář, 1996)

Druhou skupinu tvoří salmonely způsobující lokální hnisavé onemocnění kloubů, meningů, nazývají se salmonelózy s lokální manifestací. Patří sem např. *Salmonella* Dublin nebo *Salmonella* Cholerasuis. (Bednář, 1996)

Poslední skupinou jsou především zoopatogenní sérovary salmonel (především *Salmonella* Thyphimurium) způsobující gastroenteritickou formu salmonelózy. (Bednář, 1996)

2.2.2.6 Faktory patogenity

Nejdůležitějším faktorem patogenity je O-antigen respektive jeho postranní řetězec, ten funguje jako blokátor fagocytózy a brání aktivaci komplementové kaskády alternativní

cestou. Lze si to představit jako oddálení imunitní reakce, která probíhá dále od buňky a je tím je v bezpečí. (Bednář, 1996)

Další faktory jsou např. povrchové proteiny, díky kterým mají tyto bakterie umožněný průnik do eukaryotické buňky, a také schopnost produkce cytotoxinů a enterotoxinů. (Bednář, 1996)

2.2.2.7 Laboratorní diagnostika

Diagnostika stejně jako patogenita závisí na sérotypu salmonely. Salmonely způsobující tyfus se diagnostikují jinak než salmonely způsobující gastroenteritidy. Postupy se tedy určují podle typu onemocnění. (Votava, 2003)

Salmonelóзовé sepse (tyfus, paratyfus) a salmonelózy s lokální manifestací lze vyšetřit z krve pomocí hemokultivace, dalším materiálem může být hnis z infikované tkáně, identifikace z moči a stolice může v tomto případě potvrdit pouze nosičství nikoli infekci. (Greenwood et al., 1999) Pro nepřímou diagnostiku se používá aglutinační metoda Widalova reakce, při které se stanovují protilátky proti H- a O-antigenům z patientského séra. (Votava, 2010)

U gastroenteritidy je zkoumaným materiálem je stolice, která se kultivuje na selektivně diagnostických půdách, a dále se identifikuje dle biochemických vlastností. (Greenwood et al., 1999) Salmonelu lze rozeznat už na Endově agaru, kde roste jako laktóza negativní bledá kolonie. Pro identifikaci salmonel se používají speciální diagnostická média jako deoxycholát-citrátový agar (DC agar), XLD nebo MAL. (Votava, 2010) K pomnožení se dále používá selenitový bujón, který inhibuje růst doprovodné mikroflóry a podporuje růst vybraných druhů bakterií jako jsou salmonely a shigely, které by jinak mohly přerůst jinými druhy. Po pomnožení se naočkují na pevnou diagnostickou půdu. Podezřelé kolonie se dále testují pomocí sklíčkové aglutinace pomocí různých antisér proti bičíkovým antigenům a tím se zjistí jejich přesný sérotyp. (Votava, 2003)

2.2.3 Rod *Shigella*

Je to skupina fakultativně intracelulárních bakterií vyvolávající bacilární dysentérii – úplavici. Byla objevena a popsána japonským mikrobiologem jménem Shiga, podle kterého také dostala jméno. (Sureshbabu, 2018) Svými vlastnostmi jsou velmi podobné rodu *Escherichia*. (Bednář, 1996)

2.2.3.1 Morfologie

Shigely jsou typickými gramnegativními bakteriemi z čeledi *Enterobacteriaceae*, pouze s rozdílem, že oproti ostatním jsou nepohyblivé a jsou nejvíce choulostivé vůči zevním vlivům. (Votava, 2003)

2.2.3.2 Rozdělení

Shigely se rozdělují do 4 skupin A, B, C a D podle antigenních a biochemických vlastností. Každá ze skupin zahrnuje jeden druh shigely s několika sérotypy. (Bednář, 1996)

- 1) Skupina A nese název *Shigella dysenteriae* a má 12 sérotypů. Typickou vlastností je neschopnost fermentovat mannitol.
- 2) Skupina B se označuje *Shigella flexneri*, má 6 sérotypů a většinou mannitol fermentuje.
- 3) Skupina C mannitol fermentuje, nazývá se *Shigella boydii* a od skupiny B se liší antigenní strukturou.
- 4) Skupina D má jediný sérotyp *Shigella sonnei* a může opožděně fermentovat laktózu. (Bednář, 1996)

2.2.3.3 Patogenita

Shigely jsou původci průjmového onemocnění známého jako shigelóza nebo bacilární úplavice. Průjem může být s příměsí krve nebo bez ní. Jsou to výhradně lidské patogeny, popř. mohou napadat vyšší primáty. Zástupci rodu *Shigella* jsou hlavními původci tzv. cestovatelských průjmů v zemích s nižším hygienickým standardem. Nejčastějším druhem v rozvojových zemích je *Shigella dysenteriae* a *Shigella flexnerii*. Ve vyspělých zemích je to častěji *Shigella sonnei*. (Engelkirk a Duben-Engelkirk, 2008)

2.2.3.4 Faktory patogenity

Jedním z faktorů patogenity jsou povrchové proteiny, které napomáhají adhezi a průniku do epiteliální buňky. V té se intracelulárně množí a tuto buňku poškozují a způsobují nekrózu a vznik vředu. Jiné povrchové proteiny napomáhají procházet z jedné buňky do další. V buňkách hostitele se vyhýbají imunitním mechanismům hostitele, především fagocytóze leukocyty. (Engelkirk a Duben-Engelkirk, 2008)

Dalším faktorem je produkce několika toxinů, tím nejdůležitějším je shigatoxin (neurotoxin a enterotoxin) produkovaný především *S. dysenteriae* sérotyp I. Shigatoxin je příčinou vzniku tzv. hemolyticko-uremického syndromu (HUS). (Bartlett et al. 2010)

2.2.3.5 Laboratorní diagnostika

Diagnostika probíhá především přímým průkazem shigel ve stolici pomocí kultivace na selektivních půdách. (Bednář, 1996) Na kultivaci navazuje dourčení přesného druhu, popř. sérotypu aglutinačními zkouškami pomocí specifických antisér. (Engelkirk a Duben-Engelkirk, 2008) Nepřímě stanovení pomocí průkazu protilátek se neprovádí. (Bednář, 1996)

2.2.4 Rod *Yersinia*

Rod *Yersinia* je skupina bakterií, která byla sestavena především z druhů odlišených z rodu *Pateurella*. Přestože jsou si yersinie a ostatní enterobakterie velice podobné mají rozdílnou morfologii, enterobakterie jsou ve většině případů tyčinky, kdežto yersinie jsou drobného kokobacilárního tvaru a mají nižší růstovou rychlost. (Bednář, 1996)

2.2.4.1 *Yersinia pestis*

Tato bakterie je původcem moru, který v dřívějších dobách způsoboval epidemie až pandemie. V dnešní době se vyskytuje pouze v malých endemických oblastech v tropech. Přenos z rezervoáru – často krysy, které žijí u lidských obydlí, na člověka je pomocí vektoru – blechy morové (*Xenopsylla cheopis* Rothschild). (Bednář, 1996)

2.2.4.1.1 Morfologie

Jedná se o krátkou kokobacilární, nepohyblivou, opouzdřenou a polárně se barvící bakterii (na koncích se barví lépe než uprostřed – patrné zejména u barvení dle Giemsky). (Bednář, 1996; Votava, 2003)

2.2.4.1.2 Patogenita

Projev nemoci je vázán na druh brány vstupu do hostitele.

- Dýmějový (bubonický) mor je způsoben štípnutím blechy morové. Hlavními příznaky jsou zvětšené regionální lymfatické uzliny (bubony). Bez léčby nastává smrt do 4 dnů od nákazy.

- Plicní forma je způsobena buď přímým vdechnutím prachu nebo kapénky obsahující yersinie nebo jako sekundární komplikace bubonické formy. Při neléčení nastává smrt 2–3 dny po nákaze.
- Septická forma je nejvzácnější, k přenosu dochází z krve nemocného do krevního oběhu někoho jiného. Jedná se o formu, během které dochází ke smrti týž den od prvních příznaků. Projevuje se vysokou horečkou, kůže má purpurovou barvu následkem selhávání dýchání. (Votava, 2003)

Následkem léčby je procento úmrtí sníženo z 30–95 % (závisí na formě) na 5–10 %. (Votava, 2003)

2.2.4.1.3 Diagnostika

Diagnostika je založena především na přímém průkazu bakterie. Vyšetření se provádí ze sputa a aspirátů z bubonů pomocí mikroskopie nebo kultivace. Dalším způsobem je využití průkazu kapsulárního antigenu F1 pomocí imunofluorescence. (Votava, 2003) Genetická diagnostika dnes umožňuje i průkaz pomocí např. PCR nebo fluorescenční *in situ* hybridizace. (Rao et al., 2006)

2.2.4.2 *Yersinia enterocolitica*

Původně nazývaná *Bacterium enterocoliticum*, (Bottone, 1997), v přírodě hojně rozšířená především jako patogen hlodavců. Morfologickými a růstovými vlastnostmi se velmi podobá *Yersinii pseudotuberculosis*, liší se však antigenně a biochemicky. Tato bakterie má velice složitou antigenní strukturu. Má 34 různých O-antigenů a 19 H-antigenů. V Evropě se nejčastěji setkáváme se sérotypy O3 a O9. (Bednář, 1996; Greenwood et al., 1999)

2.2.4.2.1 Patogenita

K nákaze dochází většinou skrze infikovanou potravu nebo vodu. (Carniel a Hinnebusch, 2012) Infekce se projevuje lehkou či těžkou formou gastroenteritidou, u starších nebo oslabených lidí může vyvolat až sepsi. Sekundárními komplikacemi jsou polyartritida, meningitida atd. Příznaky mohou přetrvávat i několik týdnů. (Greenwood et al., 1999) Virulence je zakódována v genetické informaci v DNA a plasmidech, dále závisí na teplotě, neboť povrchové antigeny (faktor virulence) jsou exprimovány při teplotě okolo 37 °C. Např. při teplotě 25 °C exprimovány nejsou – bakterie se musí nejprve adaptovat na nové prostředí. (Bottone, 1997) Nevirulentní kmeny jsou vyloučeny z těla bez průniku do buněk. (Bednář, 1996)

2.2.4.2.2 Laboratorní diagnostika

Založena především na průkazu ze stolice, uzlin a apendixu. Po kultivaci na speciálních mediích (např. agar CIN). Dourčení pomocí biochemických metod. Z nepřímých metod se používá aglutinační (sérologické) vyšetření O-antigenů. (Votava, 2003)

2.2.4.3 *Yersinia pseudotuberculosis*

Je běžným patogenem hlodavců, ptáků a sudokopytníků, u lidí způsobuje gastroenteritidu někdy s těžkými komplikacemi. Morfologicky se jedná o pleomorfní tyčky (podle teploty koky až vlákna), při nižších teplotách jsou pohyblivé. (Bednář, 1996; Greenwood et al., 1999)

2.2.4.3.1 Patogenita

Patogenita je velice podobná jako u *Yersinie enterocolitica*, způsobuje poškození trávicího traktu (akutní i chronická apendicitis, poškození mezenterálních uzlin), dále mezi symptomy patří horečka, bolest břicha, zvracení; u vysoce virulentních kmenů dochází až k septickému stavu podobnému moru. (Bednář, 1996; Marone, 2007)

2.2.4.3.2 Laboratorní diagnostika

Stanovení velice podobné jako u *Yersinie enterocolitica*. (viz. 2.2.4.2 Laboratorní diagnostika)

2.2.4.4 Další zástupci

Do rodu *Yersinia* dále řadíme *Y. intermedia*, *Y. frederiksenii*, *Y. aldovae*. U těchto bakterií zatím není známý význam pro člověka, ale bývají přítomny ve stolici při průjmových onemocněních. (Votava, 2003)

2.2.5 Rod *Escherichia*

Nejdůležitějším zástupcem tohoto rodu je *Escherichia coli*, jež byla poprvé identifikována německým bakteriologem Theodorem Escherichem, ze stolice dětí, které trpěly enteritidou. (Manning a Babcock, 2010) Morfologicky se jedná o gramnegativní tyčinky pohybující se pomocí bičků. Za běžných okolností jsou to běžní aerobní komenzálové tlustého střeva. Dle antigenní struktury se dělí na více než 240 sérotypů. (Beneš, 2009)

2.2.5.1 Patogenita

Jedná se o oportunní patogeny vyvolávající onemocnění jen za určitých podmínek. Průjmová onemocnění vyvolaná těmito bakteriemi jsou rozšířená po celém světě s nejvyšším výskytem v rozvojových zemích. Kmeny schopné vyvolat průjmy se nazývají dyspeptické *E. coli*. Hlavním faktorem patogenity je schopnost adheze k epitelu střeva pomocí fimbrií. Ke kolonizaci dochází již v terminálním ileu – místě, které je za fyziologických podmínek téměř sterilní. (Beneš, 2009)

2.2.5.2 Rozdělení

Patogenní *E. coli* se dělí do několika skupin dle mechanismů, které způsobují rozvoj onemocnění. Mezi faktory patogenity patří produkce toxinů, schopnost adherence k epitelu apod., dle těchto vlastností se *E. coli* dělí do několika skupin popsaných níže. (Beneš, 2009)

2.2.5.2.1 Enterotoxigenní *E. coli* (ETEC)

Jejich patogenita spočívá v tvorbě enterotoxinů, které jsou svým účinkem a strukturou podobné choleroému toxinu. Jsou nejčastějšími původci cestovatelských průjmů (v nejužším slova smyslu). (Beneš, 2009)

2.2.5.2.2 Enteroinvazivní *E. coli* (EIEC)

Tato skupina napadá na rozdíl od ostatních až enterocyty tlustého střeva a k nim nejen adherují, ale pronikají do nich a tam se množí. Tento mechanismus a projevy jsou stejné jako u shigelóz. (Beneš, 2009)

2.2.5.2.3 Shiga-toxin produkující *E. coli* (STEC) – verotoxigenní *E. coli* (VTEC)

Tuto skupinu charakterizuje typická produkce toxinu podobného nebo identického s toxinem produkovaným *Shigellou dysenteriae* sérotypem I. Tento toxin poškozuje proteosyntetický aparát enterocytů i jiných buněk. Onemocnění postihuje především děti, ojediněle i seniory. (Beneš, 2009)

2.2.5.2.4 Enterohemoragické *E. coli* (EHEC)

Tyto *E. coli* jsou podmnožinou předchozí skupiny, tvoří shiga-like toxin, ale také poškozují enterocyty takovým mechanismem, který odstraní kartáčový lem na enterocytech – závažnější průběh onemocnění. (Beneš, 2009) Onemocnění se projevuje vodnatým průjmem s velkou příměsí krve, hrozí rozvoj hemolyticko-uremického

syndromu (HUS), při kterém dochází ke vzniku mikroangiopatií, hemolytické anémie, poškození ledvin, mozku a dalších orgánů. (Beneš, 2009; AWWA Staff, 2011)

2.2.5.2.5 Enteropatogenní *E. coli* (EPEC)

Mají schopnost adherovat v tenké vrstvě na enterocyty a poškozovat kartáčový lem, ale neprodukují shigatoxin. Způsobují infekce u nejmenších dětí (do 6 měsíců), mohou vyvolat epidemie na novorozeneckých odděleních. Infekce se projevuje zvracením, horečkou, průjmy střídajícími se se žlutozelenou stolicí. Dochází k rychlé dehydrataci, která je u malých dětí velice závažná. (Beneš, 2009)

2.2.5.2.6 Enteroadherující *E. coli* (EAEC) – enteroagregující *E. coli* (EAggEC)

Tyto kmeny tvoří heterogenní skupinu bakterií, které se váží na enterocyty a poškozují je ale jiným způsobem než předešlé skupiny. Vyskytují se především v rozvojových zemích a postihují děti i dospělé osoby. (Beneš, 2009)

2.2.5.3 *Další infekce způsobené E. coli*

Kromě infekčních průjmů může docházet k dalším infekcím způsobených *E. coli*, a to v tom případě, že se dostane z tlustého střeva do jiné části lidského těla. Mezi nejběžnější patří infekce močových cest, žlučových cest, jiné břišní infekce nebo bakteriémie a sepse. Tyto infekce jsou způsobeny jinými sérovary než těmi, které způsobují infekční průjmová onemocnění. (Beneš, 2009)

3 Metodika:

Praktickou část své práce jsem prováděl v laboratoři mikrobiologie Synlab v Českých Budějovicích (dále jen Synlab ČB) během října 2018.

3.1 Odběr materiálu

Jako materiál pro vyšetření bakteriálních původců průjmu se používají výtěry z rektu. Vzorky od pacientů jsou odebírány v ambulancích nebo na odděleních pomocí sterilních vatových tamponů, ty se po výtěru konečníku ponoří do zkumavky s transportním médiem (Amiesovo médium). Zkumavka musí být označena jménem a příjmením pacienta. Ke každému vzorku musí být přiložena žádanka s informacemi o pacientovi – jméno, příjmení, rodné číslo, pojišťovna, diagnóza, razítko lékaře a jeho IČZ, datum a čas odběru, terapie. Dále musí být v žádance označen druh materiálu a požadované vyšetření. (Laboratorní příručka)

3.2 Příjem vzorku do laboratoře

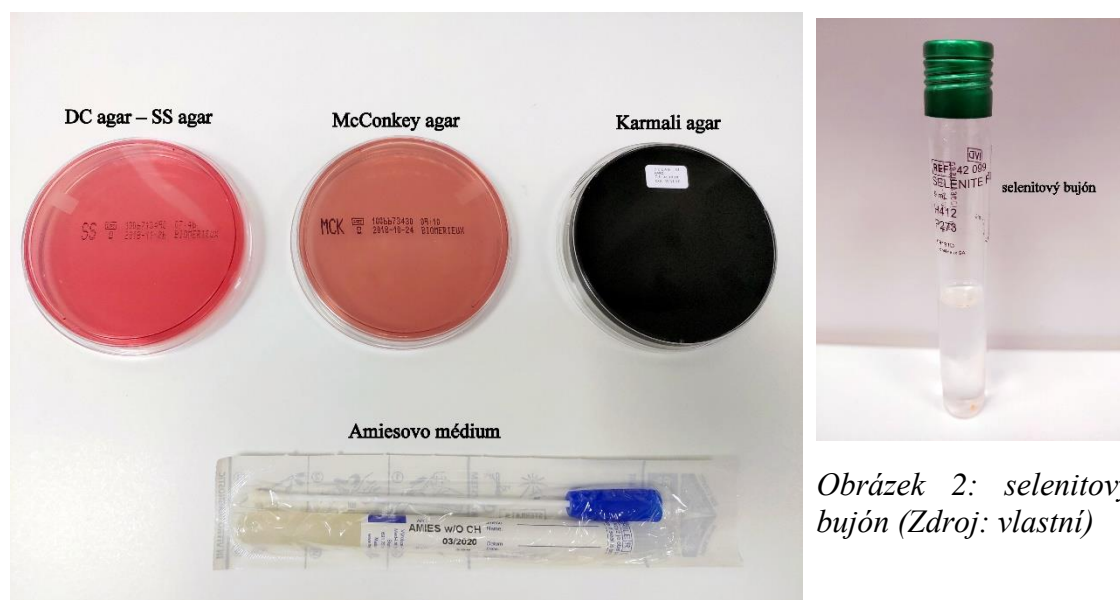
Ještě před samotným zpracováním vzorků je zapotřebí je přijmout, tato práce se provádí ve speciální místnosti k tomu určené. Pracovníci kontrolují informace na žádankách a zkumavkách, stav vzorku, zdali není poškozena zkumavka atd. Chyby při vyplnění žádanky nebo vzorku mohou být důvodem k odmítnutí vzorku ke zpracování. Při nesrovnalostech nebo chybějících informacích je možné po telefonické domluvě doplnit informace pracovníky laboratoře, nebo je požadované dodání nové žádanky nebo materiálu. (Laboratorní příručka)

Po kontrole je vzorek zadán do laboratorního informačního systému (LIS), spolu s informacemi o pacientovi a požadavky na vyšetření, poté je vzorek přenesen do dané laboratoře, kde se dále zpracovává. (Laboratorní příručka)

Detailní popisy postupu pro odběr, transport, zpracování a vyhodnocení výsledků jsou uvedeny v laboratorní příručce každé laboratoře.

3.3 Použitá kultivační média:

Při diagnostice infekčních průjmů používáme pevná kultivační média (krevní agar, McConkey agar, SS agar, Karmali agar a Biochemický klín s Endovou půdou) z tekutých půd používáme selenitový bujón a k transportu užíváme Amiesovo médium. Použitá kultivační média jsou dodávána komerčně připravena k použití.



Obrázek 1: pevná kultivační média (Zdroj: vlastní)

3.3.1 Amiesovo médium

Jedná se o transportní půdu, která zajišťuje, že mikroorganismy přežijí transport od pacienta až ke zpracování v laboratoři. Je k dostání ve dvou modifikacích, kdy jedna je obohacena aktivním uhlím, které absorbuje produkty metabolismu mikrobů, které by pro ně mohly být toxické (důležité především u bakterií rodu *Neisseria*). Druhá se skládá z 1 % agaru, anorganických solí a thioglykolátu sodného a aktivní uhlí neobsahuje.

3.3.2 Krevní agar

Jedná se o nejběžněji používanou půdu v klinické mikrobiologii. Vyrábí se přidavkem 5–10 % sterilní defibrinované ovčí krve k agarovému základu, dále se může obohacovat peptony, škrobem atd. (Tabulka 1)

Kromě toho, že na něm vyrostou téměř všechny klinicky důležité patogeny, je velice používaným proto, že umožňuje sledovat hemolytické vlastnosti kultivovaných mikroorganismů.

Hemolýza jako jeden z diagnostických znaků při určování kmene se projevuje pod nebo v okolí růstu kolonie. Je způsobena rozpadem erytrocytů pomocí hemolyzinů, které narušují jejich buněčnou membránu.

Hemolýza se rozděluje na úplnou a neúplnou, každá z nich je specifická pro určité kmeny bakterií. Úplná hemolýza je způsobena úplným rozpadem erytrocytů a samotného hemoglobinu, při tom dochází k odbarvení a projasnění agaru. Tento typ je také označován jako β -hemolýza. Neúplná hemolýza jinak označována jako viridace nebo také α -hemolýza se projevuje neúplným rozpadem erytrocytů, tím pádem nedochází k odbarvení agaru, ale pouze změně barvy na zelenou z důvodu změny hemoglobinu na verdoglobin. Pomocí druhu hemolýzy se např. streptokoky rozdělují na skupinu β -hemolytických streptokoků (*S. agalactiae*, *S. pyogenes*) a α -hemolytických streptokoků (*S. pneumoniae*, *S. mutans*). (Melter a Malmgren, 2014)

Tabulka 1: Složení krevního agaru

Teoretické složení krevního agaru g/l destilované vody	
Směs peptonů	23,0
Škrob	1,0
Chlorid sodný	5,0
Agar	10,0
Beraní krev	50,0 ml
Výsledné pH	7,3 ± 0,2

(Zdroj: Atlas a Snyder, 2006)

3.3.3 Biochemický klín s Endovou půdou

Biochemický klín s Endovou půdou, také nazýván Švejcarova plotna, je kombinované diagnostické médium, které se používá k rychlé a předběžné identifikaci čeledi *Enterobacteriaceae*. Umožňuje kontrolu čistoty kmene.

Na biochemickém klínu (Tabulka 2) urea-pozitivní bakterie štěpí přítomnou močovinu a vytváří amoniak, následkem této reakce dochází ke zvýšení pH, což vyvolává změnu barvy původně zeleného klínu na modrou. Mikroorganismy, které kvasí glukózu, vytváří kyseliny, a tak mění barvu zeleného klínu na žlutou, současně vytvářený plyn (CO₂) se zachycuje v podobě bublinek pod sklíčkem, které se pokládá na půdu po inokulaci. Mikroorganismy produkující sirovodík vyvolávají zčernání nárůstu především v místě vpichu při inokulaci. Na Endově půdě se pozoruje štěpení laktózy,

štěpení mannitolu a sacharózy se projevuje zčervenáním nárůstu kolem mannitolového a sacharózového disku, ty se aplikují na Endovu půdu po jeho inokulaci. (Obrázek 4)

Tabulka 2: Složení Biochemického klínu s Endovou půdou

Teoretické složení Biochemického klínu s Endovou půdou g/l destilované vody			
Biochemický klín		Endova půda	
Hovězí extrakt	4,0	Hovězí extrakt	8,6
Peptony	12,0	Pepton	10
NaCl	5,0	NaCl	5
Urea	6,0	Laktóza	10
Glukóza	6,0	Sířičitan sodný	1,4
Bromtymolová modř	0,1	Bazický fuchsin	4 ml
Thiosíran sodný	2,0	Agar	12
Octan olovnatý	0,8	Výsledné pH	7,4 ± 0,2
Agar	13,0		
Výsledné pH	6,8 ± 0,2		

(Zdroj: WWW.biovendor.cz)

3.3.4 McConkey agar

McConkey agar je selektivní a diagnostická půda, používá pro kultivaci, izolaci a diferenciaci gramnegativních bakterií, zejména *Enterobacteriaceae*. Selektivita tohoto média je založena na účincích žlučových solí (inhibice mimostřevních bakterií) a krystalové violeti (inhibice grampozitivních koků) (Tabulka 3). Diferenciace *Enterobacteriaceae* je založena na jejich schopnosti fermentovat laktózu. Fermentace laktózy způsobuje okyselení, které vede k tvorbě načervenalých kolonií. Bakterie, které laktózu nefermentují rostou v bezbarvých koloniích.

Tabulka 3: Složení McConkey agaru

Teoretické složení McConkey agaru g/l destilované vody	
Bakteriologické peptony	20,0
Trypton	2,0
Žlučové soli	1,5
Chlorid sodný	5,0
Laktóza	10,0
Neutrální červeň	0,03
Krystalová violet	0,001
Agar	15,0
Výsledné pH	7,1 ± 0,2

(Zdroj: WWW.biovendor.cz)

3.3.5 Deoxycholát citrát agar – DC agar – SS agar

Deoxycholát citrát agar je selektivní médium pro rody *Salmonella*, *Shigella* z klinických i neklinických vzorků. Selektivita DC agaru je způsobena přidáním citrátu a deoxycholátu sodného (Tabulka 4), který inhibuje grampozitivní bakterie. Diferenciace Enterobakterií je dána obsahem laktózy v půdě. Organismy štěpící laktózu rostou v koloniích červené barvy. Některé kmeny *Salmonella* a *Proteus* (produkující H₂S) tvoří kolonie se šedými až černými středy.

Tabulka 4: Složení SS agaru

Teoretické složení SS agaru g/l destilované vody	
Bakteriologický pepton	5,0
Masový extrakt	5,0
Citrát sodný	8,5
Thiosíran sodný	5,4
Citrát železitý	1,0
Deoxycholát sodný	5,0
Laktóza	10,0
Neutrální červeň	0,02
Agar	15,0
Výsledné pH	7,3 ± 0,2

(Zdroj: WWW.Biovendor.cz)

3.3.6 Karmali agar – Campylobacter agar

Karmali agar – Campylobacter agar je kultivační médium, které se používá pro selektivní izolaci *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* a termofilních kampylobakterů z potravin a klinických i neklinických vzorků.

V Campylobacter agaru je beraní krev nahrazena aktivním uhlím, pyruvát sodným a síranem železnatým (Tabulka 5). Tyto zmíněné podporují růst *Campylobacter species*, protože zvyšují toleranci kmenů vůči toxickému účinku kyslíku. Cefoperazon – cefalosporinové ATB) zvyšuje selektivitu půdy a inhibuje kontaminanty (gramnegativní enterobakterie a některé grampozitivní druhy bakterií). Amfotericin B potlačuje růst mikromycet, které mohou růst při 37 °C. Mezi další selektivní vlastnosti při kultivaci kampylobakterů patří teplota během inkubace: 42 °C (potlačuje růst většiny normálních bakterií) dále mikroaerofilní a kapnofilní prostředí během inkubace.

Tabulka 5: Složení agaru Karmali

Teoretické složení agaru Karmali g/l destilované vody	
Živný bujon č.2	25,0
Enzymatický kaseinový hydrolyzát	3,0
Bakteriologické aktivní uhlí	4,0
Deoxycholát sodný	1,0
Pyruvát sodný	0,3
Síran železnatý	0,3
Cefoperazon	0,03
Amfotericin B	0,01
Agar	12,0
Výsledné pH	7,4 ± 0,3

(Zdroj: WWW.biovendor.cz)

3.3.7 Selenitový bujón

Selenitový bujón je selektivní pomnožovací médium obohacené aminokyselinou cysteinem, tato aminokyselina podporuje růst rodu *Salmonella* a některých kmenů *Shigella*, které mohou být přítomné v limitovaném množství, proto je vhodné je před vlastní kultivací nechat pomnožit. Významnou složkou tohoto média je příměs seleničitanu sodného, který inhibuje množení grampozitivních a některých gramnegativních bakterií, čímž mohou salmonely a shigelly snadněji růst. Po většinou jednodenním pomnožení se vzorek naočkuje na klasické pevné kultivační médium. (Tabulka 1 Tabulka 6)

Tabulka 6: Složení selenitového bujónu

Teoretické složení selenitového bujónu g/l destilované vody	
Fosforečnan sodný	10
Laktóza	4
L-cysteine	0,01
Směs peptonů	5
Seleničitan sodný	4
Výsledné pH: 7,0 ± 0,2	7,0 ± 0,2

(Zdroj: WWW.biovendor.cz)

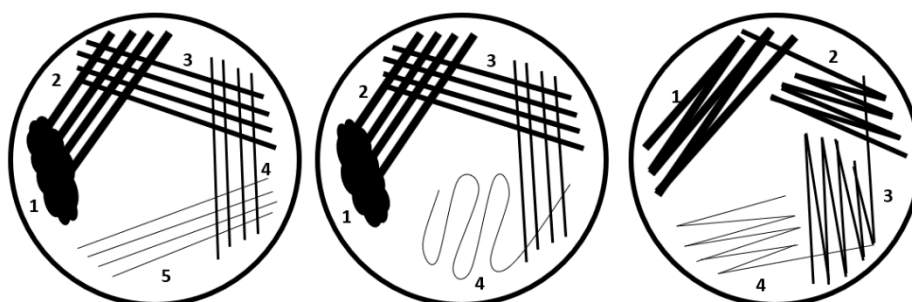
3.4 Postup:

3.4.1 Zpracování primokultury

Výtěrový tampon od pacienta vyjmeme ze zkumavky s transportní půdou a naočkujeme ho na McConkey agar, SS agar a agar Karmali. Rozočkujeme křížovým roztěrem

sterilní plastovou bakteriologickou kličkou tak, abychom dosáhli toho, že v poslední části agaru bude kultura tak rozetřená, aby vyrůstala v jednotlivých koloniích vzniklých z jediné buňky.

Křížový roztěr lze provést různými způsoby a každý pracovník mikrobiologie preferuje některý z nich (Obrázek 3).



Obrázek 3: několik možností křížového roztěru na pevných půdách (Zdroj: vlastní)

Tampon ponoříme a zalomíme do selenitové pomnožovací půdy a uzavřeme víčkem.

Agar Karmali vložíme do nádoby Anaerojar s vyvíječem (zajistí mikroaerofilní a kapnofilní prostředí) a dáme ho do termostatu při teplotě 42 °C na 48 hodin.

McConkey agar, SS agar a selenitovou půdu kultivujeme v termostatu 24 hodin (do druhého dne) při teplotě 37 °C.

3.4.2 Odečítání primokultury a vyočkování pomnožovací půdy

Primokultury odečítáme po 24 hodinách. Všechny průběžné výsledky zadáváme do laboratorního informačního systému. Ve střevě se běžně vyskytuje velké množství aerobních i anaerobních bakterií proto se při aerobní kultivaci nejčastěji zachytí gramnegativní tyčky – *Escherichia coli*, *Enterobacter sp.*, *Klebsiella sp.*, *Pseudomonas aeruginosa* a další.

Salmonely vyrůstají na SS agaru jako bílé kolonie s černým středem, což je způsobeno tvorbou sirovodíku, na McConkey agaru je pozorujeme jako laktóza negativní světlé kolonie.

Shigely vyrůstají na SS agaru jako průsvitné kolonie, na McConkey agaru jako světlé laktóza negativní kolonie.

Yersinie tvoří na McConkey agaru drobné laktóza negativní kolonie.

Druhý den také provedeme rozočkování ze selenitové půdy na SS agar.

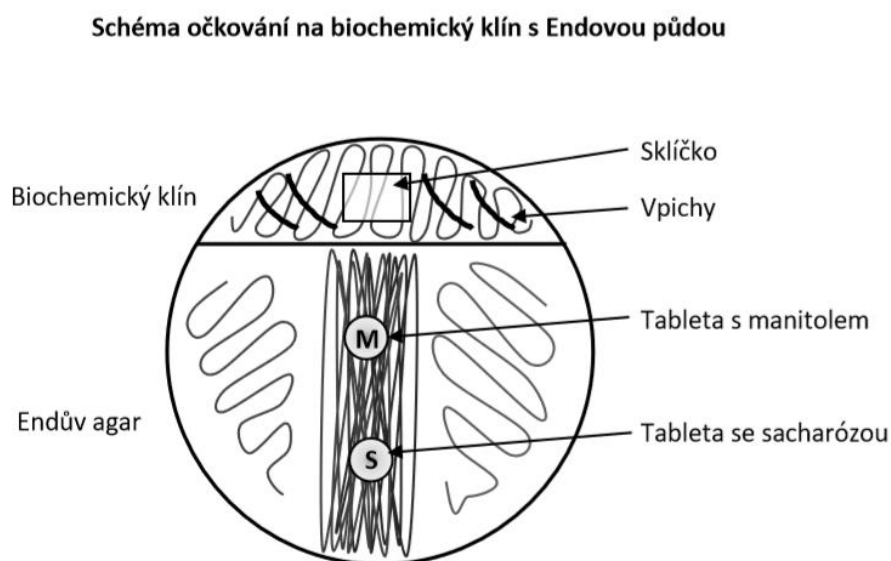
Po 48 hodinách odečítáme agar Karmali, na kterém *Campylobacter sp.* vyrůstá ve formě drobných, vodnatých, hnědavých koloniích.

3.4.3 Identifikace suspektních kolonií

3.4.3.1 Izolační biochemický klín

Podezřelé kolonie izolujeme z pevných půd na biochemický klín – sterilní bakteriální kličkou vybíráme suspektní kolonii a naočkujeme ji na biochemický klín, pak kolmo na Endův agar a provedeme na něm rozočkování. Klín několikrát propíchneme kličkou a překryjeme krycím sklíčkem. Na část inokula, které je na Endově agaru, naklademe disky se sacharózou a mannitolem. (Obrázek 4)

Necháme inkubovat při 37 °C do druhého dne.



Obrázek 4: Schéma očkování na biochemický klín s Endovou půdou (zdroj: vlastní)

3.4.3.2 Biochemické testy

Biochemické testy slouží k identifikaci bakterií podle jejich biochemické aktivity, která je pro danou bakterii typická. Tato metoda je v dnešní době částečně nahrazována modernějšími způsoby identifikace např. použitím přístroje MALDI TOF MS (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry), ale stále má

využití, i když pouze v menším měřítku. Nevýhodou těchto testů je jejich pracnost, spotřeba většího množství čisté kultury a doba kultivace.

3.4.3.2.1 Princip

API 20 E je biochemický test pro určování bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* popř. nenáročné gramnegativní tyčky. Zahrnuje 20 mikrozkušavek obsahujících dehydratované substráty pro dané reakce. (Obrázek 5) Tyto testy se inokulují připravenou bakteriální suspenzí, která nahrazuje médium. Během inkubace dochází v důsledku metabolismu bakterií k barevným změnám, které se projeví buď ihned nebo až po přidání dalšího činidla. Reakce se odečítají podle odečítací tabulky, kdy se identifikace provede porovnáním s přehledem profilů nebo pomocí identifikačního programu apiwebTM.

Tento biochemický test obsahuje tyto substráty: o-nitrofenyl- β -galaktopyranosid – ONPG, arginin dihydrolázu – ADH, lysindekarboxylázu – LDC, ornithin dekarboxylázu – ODC, citrát – CIT, sulfan – H₂S, ureu – URE, tryptofan deaminázu – TDA, indol – IND, Voges-Proskauerův test – VP, želatinu – GEL, glukózu – GLU, mannóza – MAN, inositol – INO, sorbitol – SOR, rhamnózu – RHA, sacharózu – SAC, melibiózu – MEL, amygdalin – AMY, arabinózu – ARA



Obrázek 5: nepoužitý testovací proužek (Zdroj: vlastní)

3.4.3.2.2 Příprava testovacího proužku

Připravíme si inkubační box (misku a víčko) a jamky misky naplníme asi 5 ml destilované vody nebo deionizované vody (důležité je, aby se z vody neuvolňovaly plyny, které by ovlivňovaly probíhající reakce), čímž vytvoříme vlhkou atmosféru.

Na plošku v prodloužené části misky zaznamenáme číslo vzorku.

3.4.3.2.3 Příprava inokula

Do sterilní zkumavky Pasteurovou pipetou napipetujeme 5 ml sterilního fyziologického roztoku chloridu sodného.

Sterilní bakteriální kličkou odebíráme jednotlivé kolonie z izolační plotny a přidáváme je do zkumavky s fyziologickým roztokem. Důležité je, abychom odebrali správné kolonie a nevytvořili směs bakterií, čímž by se test znehodnotil a nedošlo bychom ke správnému výsledku. Obsah zkumavky řádně zhomogenizujeme na vortexu.

3.4.3.2.4 Inokulace testovacího proužku

Sterilní pipetou nanášíme bakteriální suspenzi do zkumavek stripu tak, aby ve zkumavce nevznikaly bubliny.

Zkumavky určené pro testy CIT, VP a GEL naplníme jak mikrozkušavku, tak i jamku.

U ostatních testů naplníme pouze mikrozkušavky.

U zkumavek pro testy ADH, LDC, ODC, H₂S a URE vytvoříme anaerobní prostředí – zalitím minerálním olejem.

Strip uzavřeme do inkubačního boxu a necháme inkubovat v inkubátoru při 36 °C 18–24 hodin.

3.4.3.2.5 Odečítání a interpretace:

Druhý den po době inkubace odečítáme výsledky pomocí odečítací tabulky nebo pomocí internetového programu apiwebTM, pozitivní reakce zapíšeme jako „+“ a negativní jako „-“.

Některé testy se odečítají ihned a některé vyžadují ještě přidání dalších činidel:

- Test TDA: Přidáme 1 kapku činidla TDA. Pokud dojde ke změně barvy na červenohnědou zapíšeme jako pozitivní reakci.
- Test VP: Přidáme 1 kapku činidel VP1 a VP2. Čekáme alespoň 10 minut. Změna barvy na růžovou nebo červenou je považována za pozitivní reakci.
- Test IND: Přidáme 1 kapku činidla JAMES. Pokud dojde v celé jamce ke změně barvy na růžovou zapíšeme do výsledkové tabulky jako pozitivní reakci. Tento test provádíme jako poslední, protože plyny uvolňované při této reakci, by mohly negativně reagovat s ostatními testy v proužku.

Samotnou identifikaci patogenu provedeme odečtem výsledné kombinace „+“ a „-“, pomocí tabulky nebo to za nás udělá program apiwebTM.



Obrázek 6: Biochemický test API 20 E - *E. coli* (Zdroj: vlastní)

3.4.3.3 MALDI TOF MS

3.4.3.3.1 Princip

Hmotnostní spektrofotometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem – MALDI TOF MS (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry). Jedná se o metodu, pomocí které lze stanovit molekulové hmotnosti biopolymerů jako jsou peptidy, bílkoviny, sacharidy, nukleotidy, nukleové kyseliny a další. (Shan a Gharbia, 2017)

V mikrobiologické laboratoři se přístroj používá k měření času letu ribosomálních proteinů uvolněných z mikroorganismu evakuovanou trubicí od zásahu laserem po jejich přiletu do detektoru. Tato doba letu se pomocí kalibračních konstant přepočítá na hmotnost jednotlivých proteinů. Získává se tím hmotnostní spektrum části látek uvnitř buňky. Každý rod, druh a kmen má své charakteristické spektrum. Získaná spektra se porovnávají s databází a na základě podobnosti je mikroorganismus identifikován.

3.4.3.3.2 Vzorke ke stanovení

Standardně by se ke stanovení měla použít kolonie narostlá na kultivačním médiu Columbia krevním agaru s 5 % ovčí krve, nicméně lze použít i kultury z jiných médií, ale musí se počítat s možným lehkým rozdílným výsledkem. Dalším předpokladem je použití čerstvého materiálu, pokud možno narostlého přes noc, v případě klasicky rostoucích bakterií; u dlouho rostoucích bakterií se používají několikadenní kultury. Nejdůležitější zásadou je však použití čisté kultury, a ne směsi více druhů nebo kmenů, v tomto případě by výsledky byly nepravdivé.

3.4.3.3.3 Postup měření

Připravíme si destičku, matici (α -kyano-4-hydroxyskořicová) a BBS (kalibrátor – přesně definovaná *Escherichia coli*). Jako každý analyzátor i tento je třeba před používáním kalibrovat, k tomu účelu se používá BBS kalibrátor.

Vzorky nanese na destičku (do přesně definovaných míst) a necháme je uschnout. Naneseme matici a opět necháme uschnout. Nejprve spustíme kontrolní program a vložíme destičku se vzorkem do hmotnostního spektrofotometru. Spustíme samotný program, do něj zadáme údaje o vzorku, zkontrolujeme nastavení úlohy a spustíme identifikaci.

V případě nedostupnosti MALDI TOF lze k rodové identifikaci kampylobakterů použít mikroskopický obarvený preparát dle Grama – průkaz dle specifické morfologie.

3.4.3.4 Sérotypizace – aglutinační reakce

Aglutinační testy je možné provést s různými druhy bakterií (salmonely, yersinie, shigely atd.), pokud máme příslušná antiséra. My v laboratoři používáme hlavně aglutinaci salmonel k určení jejich sérotypu.

3.4.3.5 Aglutinace salmonel

Tento postup je založen na reakci dané Salmonely (jejího antigenu) se specifickým antisérem (protilátkou) za vzniku aglutinátu. Každý sérotyp salmonel je definován antisérem, se kterým reaguje a způsobuje aglutinaci. Nejdříve se salmonela zařadí do skupiny A–D podle tělových Antigenů, potom se v rámci skupiny dourčí pomocí bičíkových antigenů.

3.4.3.5.1 Postup

Na sterilní podložní skličko nakapeme séra tak, aby nedošlo k jejich smíchání. Do kapek vmícháme bakteriologickou kličkou odebranou kolonii z Petriho misky a zhomogenizujeme ji. Pokaždé používáme čistou kličku, aby nedošlo ke smíchání různých kapek sér. Skličko vezmeme do ruky a kývavým pohybem nakláníme tak, aby se kapka dále promíchávala. Proti světlu hodnotíme, jestli došlo k aglutinaci nebo ne.

Nejčastěji vyskytující se salmonelou je *Salmonella* Enteritidis tudíž aglutinaci začneme O (tělovým) antisérem 9, pak H (bičíkové) antisérum gm. Pokud se nejedná u *Salmonellu* Enteritidis a nedojde k aglutinaci, pokračujeme zkoušením dalších antisér,

dokud k aglutinaci nedojde. Pokud se jedná o salmonelu, na jejíž určení sérotypu nemáme antiséra, zasíláme tento vzorek do Národní referenční laboratoře (NRL).

3.4.4 Zpracování výsledků

Získané výsledky zapíšeme do LIS, popř. do sešitu epidemiologických hlášení. Výsledky jsou zasílány žádajícímu lékaři v elektronické a tištěné formě.

Zjištění původci kampylobakterióz, salmonelóz, shigelóz a yersinióz, jakožto nemoci přenášených potravinami a vodou, podléhají povinnému hlášení orgánu ochrany veřejného zdraví (Krajské hygienické stanice) dle vyhlášky č. 473/2008 Sb., o systému epidemiologické bdělosti pro vybrané infekce. Z této databáze sbíraných dat Státní zdravotnický ústav (SZÚ) provádí celoroční i průběžnou statistiku infekčních onemocnění včetně infekčních průjmů.

4 Výsledky

Z laboratorního informačního systému a sešitu epidemiologických hlášení jsem získal informace o četnostech jednotlivých bakteriálních původců průjmu za rok 2017 a měsíc říjen v roce 2018, ve kterém jsem prováděl praktickou část, této bakalářské práce (Tabulka 7).

Tabulka 7: Výsledky Synlab ČB za rok 2017 a říjen 2018

patogen		<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>S. Enteritidis</i>	<i>S. Typhimurium</i>	<i>S. Infantis</i>	patogenní <i>E. coli</i>	<i>Y. enterocolitica</i>	další salmonely	celkem
2017	leden	16	1	10	0	0	0	1	0	28
	únor	20	2	8	0	0	0	1	0	31
	březen	16	2	5	0	0	1	1	0	25
	duben	13	0	17	0	1	0	0	3	34
	květen	32	8	10	3	0	0	2	4	59
	červen	44	6	20	1	0	0	1	3	75
	červenec	48	5	19	0	4	0	1	2	79
	srpen	75	4	46	4	3	0	0	12	144
	září	47	2	55	1	0	8	1	10	124
	říjen	51	3	54	7	0	1	0	2	118
	listopad	41	3	24	0	0	4	2	2	76
	prosinec	30	4	27	2	0	1	1	7	72
	celkem	433	40	295	18	8	15	11	45	865
2018	říjen	41	14	33	0	0	9	1	1	100

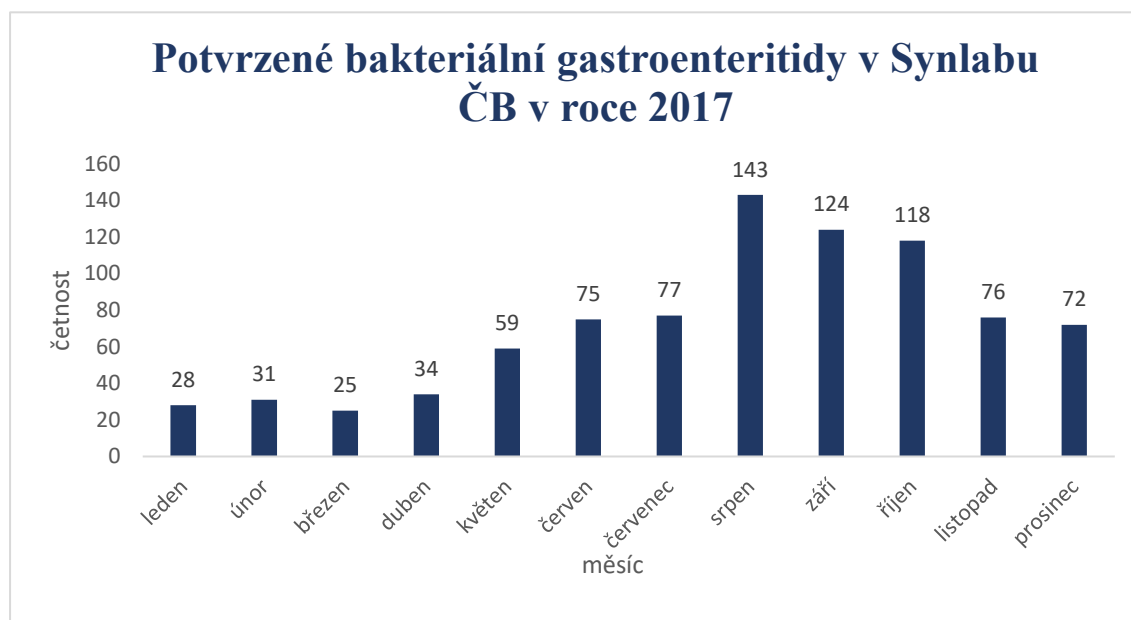
(Zdroj: vlastní přepracování dat z LISu Synlab ČB)

V tabulce jsou vedené údaje o četnostech patogenů, prokázaných v Synlabu ČB během roku 2017 a v říjnu 2018. Méně časté sérotypy salmonel jsem pro přehlednost zahrnul do skupiny „další salmonely“. Z těchto údajů a údajů získaných z webových stránek Státního zdravotního ústavu jsem zpracoval statistiku výskytu nejdůležitějších infekčních gastroenteritid a jejich původců, vývoje četností během roku a během několika let. Dále jsem zpracoval porovnání výsledků Synlabu ČB s celorepublikovými výsledky.

4.1 Výskyt bakteriálních střevních infekcí v říjnu 2018

Za měsíc říjen v roce 2018 se v laboratoři Synlab v Českých Budějovicích (dále jen Synlab ČB) vyšetřilo 676 vzorků výtěrů z rektu, z tohoto množství se bakteriální původci potvrdili ve 100 případech, což odpovídá 14,8 %. V celém roce 2017 bylo provedeno 6200 vyšetření vzorků výtěrů z rektu, z tohoto množství se bakteriální původci potvrdili v 865 případech což je 14 % z celkového počtu vyšetřování. Lze tedy říci, že měsíc říjen 2018 nebyl nijak výjimečný, co se četnosti bakteriálních infekcí týče a lze ho považovat za průměrný vzhledem k celoročnímu průměru.

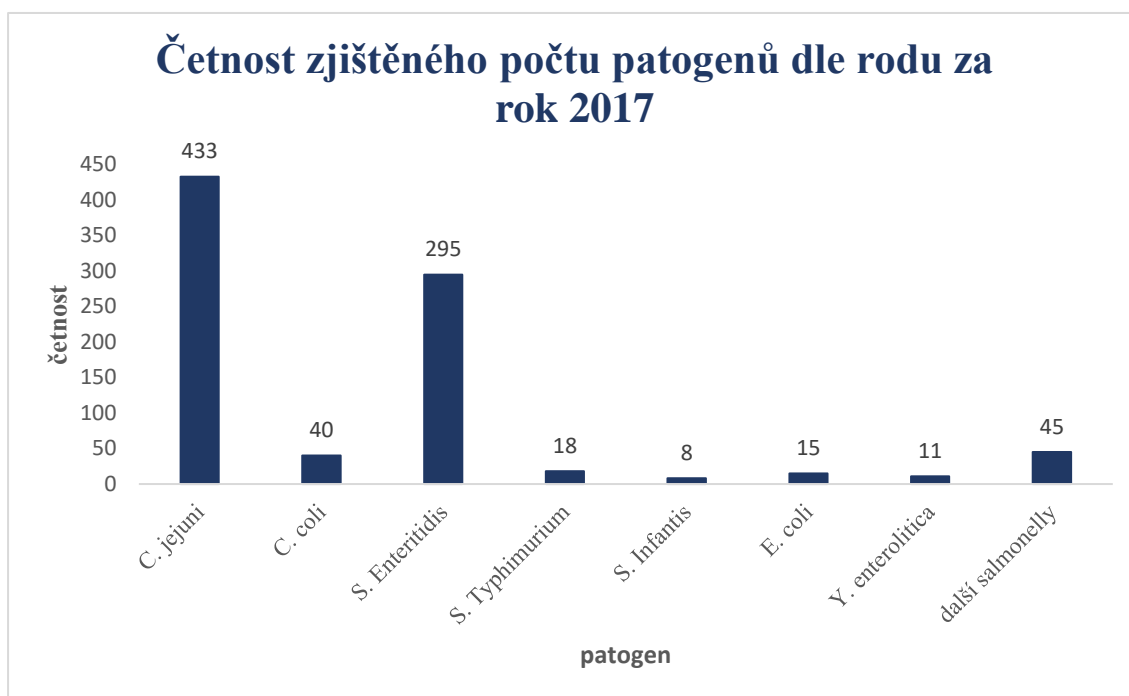
4.2 Výskyt bakteriálních gastroenteritid v průběhu roku 2017



Obrázek 7: četnost potvrzených bakteriálních gastroenteritid v laboratoři Synlab ČB v roce 2017 (Zdroj: vlastní přepracování dat z LISu Synlab ČB)

Z grafu (Obrázek 7) vyplývá, že množství případů gastroenteritid se během roku mění a největší výskyt je v letních měsících, kdy bývá nejvyšší teplota a bakterie mají lepší podmínky se množit. Nejvyšší výskyt byl zaznamenán v srpnu, kdy četnost byla 143 případů.

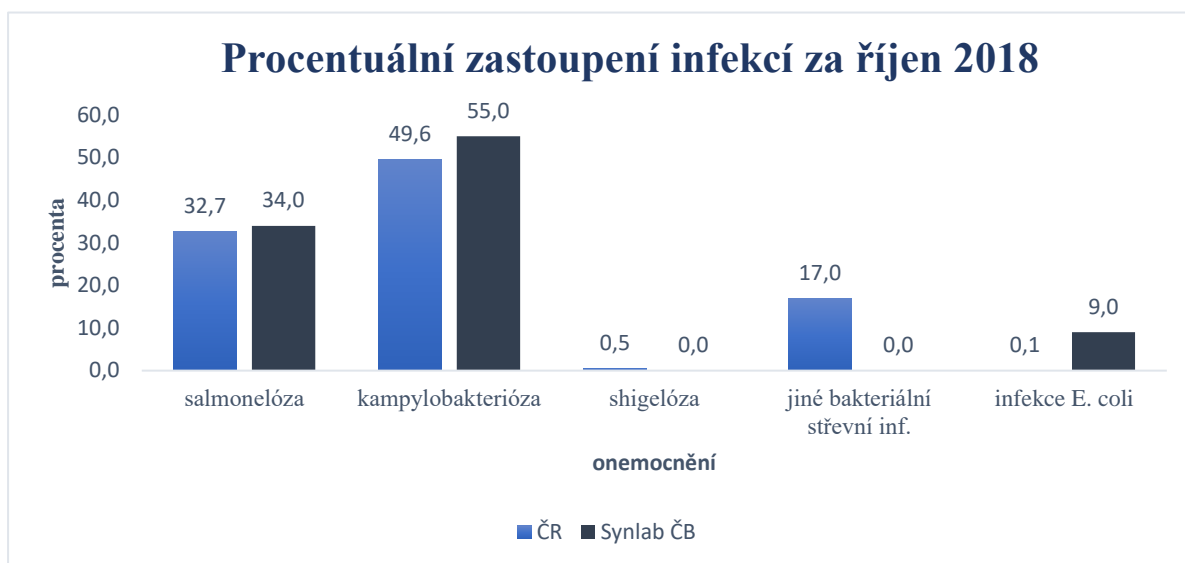
4.3 Výskyt zjištěných bakteriálních patogenů v Synlabu ČB v roce 2017



Obrázek 8: četnost patogenů v Synlabu ČB za rok 2017 (Zdroj: vlastní přepracování dat z LISu Synlab ČB)

V grafu (Obrázek 8) jsou uvedené počty identifikovaných bakteriálních patogenů v Synlabu ČB za celý rok 2017. Z údajů vychází fakt, že nejčastějším patogenem byl *Campylobacter jejuni*, který byl identifikován téměř v polovině případů infekčních průjmů (50,1 %), v pořadí na druhém místě byla *Salmonella* Enteritidis, která byla potvrzena téměř ve třetině pozitivních výsledků (34,1 %).

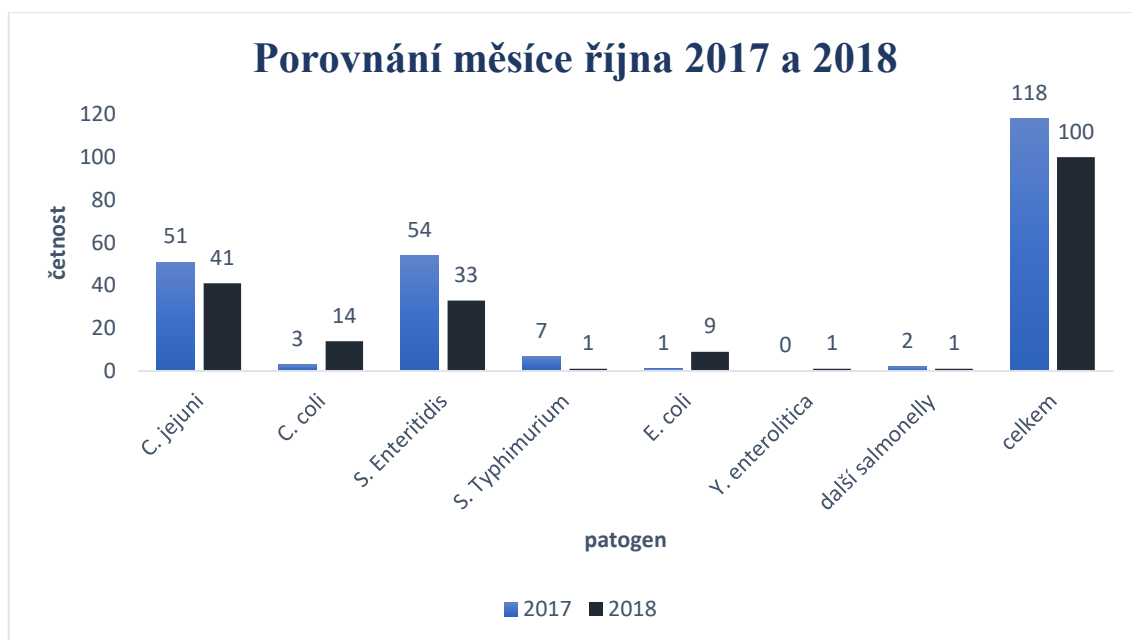
4.4 % zastoupení infekcí v říjnu 2018 v Synlabu ČB a celé ČR



Obrázek 9: porovnání četnostních procent zastoupení identifikovaných bakteriálních patogenů za říjen 2018 mezi Synlabem ČB a celou ČR (Zdroj: <http://www.szu.cz>, vlastní zpracování dat z LISu Synlab ČB)

Z grafu (Obrázek 9) vyplývá, že výsledky získané během října poměrově odpovídají množství případů v celé ČR, s tím že salmonelóz bylo v Synlabu ČB stanoveno jen o 2,3 % více než v celé ČR a kampylobakterióz o 5,4 % více. Shigelózy se v celé ČR pohybovaly okolo 1 % v Synlabu ČB nebyl žádný případ detekován. Největší rozdíl byl ve zjištění dalších bakteriálních střevních infekcí, kdy byl rozdíl 17 % ve prospěch ČR, v Synlabu ČB jiní bakteriální původci průjmu stanoveni nebyli. Opak nastal u stanovení patogenních *E. coli*, kdy v Synlabu ČB se stanovilo 9 %, celkově v ČR to bylo pouze 0,1 %.

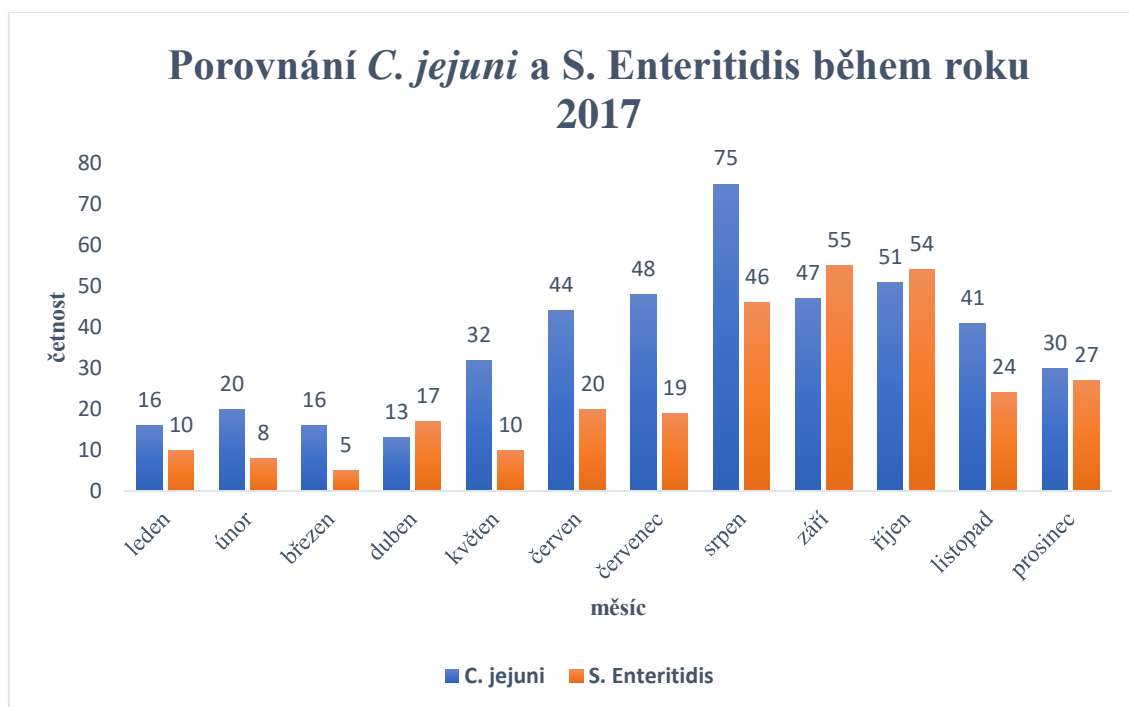
4.5 Porovnání četnosti patogenů za měsíc říjen 2017 a 2018 v Synlabu ČB



Obrázek 10: Porovnání četnosti identifikovaných patogenů za měsíc říjen 2017 a 2018 v Synlabu ČB (Zdroj: vlastní přepracování dat z LISu Synlab ČB)

Z grafu (Obrázek 10) vyplývá, že v roce 2018 bylo v měsíci říjnu identifikováno o 18 patogenů méně než v roce 2017. Lze říci, že v roce 2018 bylo u většiny bakterií (*C. jejuni*, *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, další salmonely) zaznamenáno méně případů než v roce 2017 největší rozdíl u *S. Enteritidis*, u které bylo identifikováno o 21 případů méně. Naopak vzrostl počet případů *C. coli*, patogenních *E. coli* a *Y. enterocolitica*, největší rozdíl byl u *C. coli*, kdy byl nárůst 11 případů.

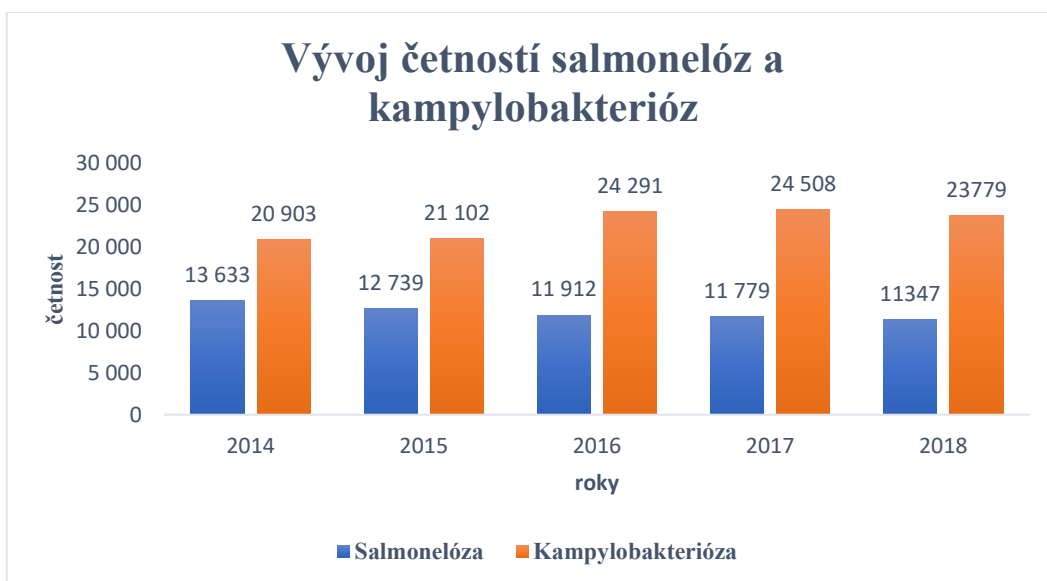
4.6 Porovnání četností *C. jejuni* a *S. Enteritidis* během roku 2017 v Synlabu ČB



Obrázek 11: porovnání četností *C. jejuni* a *S. Enteritidis* během roku 2017 v Synlabu ČB (Zdroj: vlastní přepracování dat z LISu Synlab ČB)

V grafu (Obrázek 11) lze vidět, jak se incidence obou bakterií mění během roku, s teplejším obdobím četnosti narůstají a nejvyššího počtu nabývají v letních měsících, kdy *C. jejuni* měl v roce 2017 nejvyšší počet v srpnu a *S. Enteritidis* v září. V ostatních měsících je incidence nižší.

4.7 Vývoj četností salmonelóz a kampylobakterióz za posledních 5 let v celé ČR



Obrázek 12: vývoj četností salmonelóz a kampylobakterióz za posledních 5 let v celé ČR (Zdroj: <http://www.szu.cz>)

Z grafu (Obrázek 12) vyplývá, že incidence salmonelóz se každým rokem snižuje, zatímco četnost kampylobakterióz má během posledních 5 let proměnlivě vzrůstající trend.

5 Diskuze

V praktické části jsem se zabýval průkazem bakteriálních patogenů, způsobujících gastroenteritidy ze vzorků výtěrů z rektu od pacientů trpících těmito obtížemi.

Z výsledků vyplývá, že jsme během října stanovili 100 případů bakteriálního průjmu z celkového počtu 676 zkoumaných vzorků výtěrů z rektu (tedy 14,8 %). Pokud pomineme, že do statistiky nejsou započítáni viroví původci průjmů, lze říci, že se tím potvrzuje fakt, že ne každý průjem je způsoben mikrobiálním agens, ale může se jednat pouze o projevy změn stravování nebo nesnášenlivost určité potraviny.

V případech bakteriálních infekčních gastroenteritid jsme potvrdili dominanci dvou rodů bakterií – rod *Campylobacter* a rod *Salmonella*, způsobujících kampylobakteriózy a salmonelózy. V nejvyšších četnostech se vyskytoval *Campylobacter jejuni* a to vzhledem k celému roku 2017 i za většinu jednotlivých měsíců, kromě měsíců dubna, září a října 2017, kdy měly převahu bakterie *Salmonella* Enteritidis. Nejvyšší počty infekcí byly v roce 2017 během letních měsíců, kdy za teplého počasí měly bakterie lepší podmínky pro množení v infikovaných potravinách a lidé se více vystavovali rizikovým aktivitám jako např. grilování nebo cestování do exotických krajín.

Z dlouhodobého pohledu (5 let) na vývoj četností kampylobakterióz a salmonelóz potvrzujeme následující fakta. Salmonelózy pomalým tempem klesají (každoročně o několik set případů), ale stále je to druhé nejčastější střevní onemocnění u nás. Kampylobakteriózy naopak neustále proměnlivým trendem rostou, od roku 2014 do roku 2018 vzrostl počet těchto infekcí o téměř 3 tisíce případů za rok.

Pro diagnostiku zavedenou v praxi nevychází z mé práce žádné možnosti vylepšení, pouze pokračování v dodržování správných laboratorních postupů a udržování preciznosti práce jako doposud.

Jediné vylepšení, které připadá v úvahu se netýká diagnostiky, ale prevence chování samotného obyvatelstva. Jedinci by měli neustále myslet na možné riziko nákazy, ať už se jedná o rizika během aktivit jako je grilování, při němž dochází k častým nákazám kvůli špatně upravenému masu a dalších potravin nebo o cestování do exotických zemí a s nimi spojených rizik infekcí, mezi které patří i gastroenteritidy. Samozřejmě pokud se člověk nakazí např. během epidemie salmonelózy, která proběhla na jaře letošního roku 2019 z důvodu dovozu infikovaného masa, nelze to dávat za vinu samotnému

postiženému, pokud to tedy nebyl on, kdo nedodržel správný technologický postup tepelné úpravy.

6 Závěr

Cílem mé práce bylo vypracování rešerše, ve které jsem zpracoval obecnou charakteristiku průjmu a popis s možnostmi diagnostiky nejčastějších původců bakteriálních gastroenteritid.

V rámci praktické části jsem si osvojil metody přímého průkazu bakterií rutinně využívaných v mikrobiologické diagnostice, a to především kultivaci a další identifikační metody, jako byly biochemické testy, aglutinační reakce a okrajově metoda MALDI TOF.

Vzhledem k významu ochrany veřejného zdraví a prevence alimentárních onemocnění, tento postup je a bude aktuální. Data, získaná tímto procesem, jsou významnými informacemi pro potřeby nejen epidemiologické, ale také pro odvětví zpracování a výroby potravin a zemědělství.

Naše získaná data ze statistického hlediska odpovídají, s mírnými odchylkami, celorepublikovému průměru. Detailní informace jsou v kapitole Diskuze.

7 Použitá literatura

1. AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION STAFF, 2011. *Waterborne pathogens*. 2nd ed. American Water Works Association. ISBN 9781613000250.
2. ATLAS, R., M. a SNYDER, J., W., 2006. *Handbook of media for clinical microbiology*. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press. ISBN 084933795X.
3. BARTLETT, J., G., AUWAERTER P., G., PHAM P., A., 2010. *The Johns Hopkins ABX guide: diagnosis and treatment of infectious diseases*. 2nd ed. Sudbury, MA: Jones and Bartlett Publishers. Johns Hopkins POC-IT (Point of care information technology). ISBN 0763781088.
4. BEDNÁŘ, M., 1996. *Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie*. Praha: Marvil. ISBN 9788023802979.
5. BELL, C. a KYRIAKIDES, A., 2008. *Salmonella: a practical approach to the organism and its control in foods*. Malden, Mass.: John Wiley. ISBN 9780470999448.
6. BENEŠ, J., c2009. *Infekční lékařství*. Praha: Galén. ISBN 978-80-7262-644-1.
7. *BioVendor: Webové stránky výrobce kultivačních půd BioVendor* [online], [cit. 2019-04-30]. Dostupné z: <https://www.biovendor.cz/kultivacni-pudy/c-178/>
8. BOTTONI, E. J., 1997. *Yersinia enterocolitica: The Charisma Continues*. *CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS*. **10**(2), 257–276.
9. CARNIEL, E. a HINNEBUSCH B. J., 2012. *Yersinia: systems biology and control*. Norfolk, UK: Caister Academic Press. ISBN 9781908230058.
10. ENGELKIRK, P. G. a DUBEN-ENGELKIRK J., L., c2008. *Laboratory diagnosis of infectious diseases: essentials of diagnostic microbiology*. Baltimore: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins. ISBN 0781797012.
11. GREENWOOD, D., PEUTHERER, J., F., SLACK R., C., B., 1999. *Lékařská mikrobiologie: přehled infekčních onemocnění: patogeneze, imunita, laboratorní diagnostika a epidemiologie*. Vyd. 1., čes. Praha: Grada. ISBN 80-7169-365-0.
12. KETLEY, J. M. a KONKEL M. E., c2005. *Campylobacter: molecular and cellular biology*. Wymondham, UK: Horizon Bioscience. ISBN 9781904933052.
13. Kolektiv pracovníků SZÚ, *Výskyt vybraných hlášených infekcí v České republice, říjen 2018* [online].2018, [cit. 2019-04-14]. Dostupné z: <http://www.szu.cz/publikace/data/2018/vyskyt-vybranych-hlasenych-infekci-v-ceske-republice-rijen>
14. Kolektiv pracovníků SZÚ, *Výskyt vybraných infekcí v České republice hlášených v letech 2009-2018* [online].2019, [cit. 2019-04-14]. Dostupné z: <http://www.szu.cz/publikace/data/2018/vyskyt-vybranych-infekci-v-ceske-republice-hlasenych-v>
15. Laboratorní informační systém a sešit epidemiologických hlášení laboratoře mikrobiologie Synlab České Budějovice
16. LABORATOŘ SYNLAB ČESKÉ BUDĚJOVICE SEKCE MIKROBIOLOGIE, *Laboratorní příručka* [online]. [cit. 2019-04-28]. Dostupné z:

https://www.synlab.cz/media/editor/files/Laboratorni%20prirucky/CB_mikrobiologie/VD.%C4%8Cbv_mik%2002%20laboratorn%C3%AD%20p%C5%99%C3%ADru%C4%8Dka.pdf

17. LUKÁŠ, K. a ŽÁK A., 2014. *Chorobné znaky a příznaky: diferenciální diagnostika*. Praha: Grada. ISBN 9788024750675.
18. MAHMOUD, B. S. M., 2012. *Salmonella - A Dangerous Foodborne Pathogen* [online]. InTech [cit. 2019-04-20]. DOI: 10.5772/1308. ISBN 978-953-307-782-6. Dostupné z: <https://www.intechopen.com/books/salmonella-a-dangerous-foodborne-pathogen>
19. MANNING, S. D., a BABCOCK, H., c2010. *Escherichia coli infections*. 2nd ed. New York: Chelsea House. ISBN 1604132531.
20. MARONE, G., 2007. *Superantigens and superallergens*. 1st ed. Basel, Switzerland: Karger. ISBN 9783805582667.
21. MELTER, O. a MALMGREN, A., 2014. *Principy a praktika lékařské mikrobiologie*. Praha: Karolinum. ISBN 978-80-246-2414-3.
22. MORABITO, S., c2014. *Pathogenic Escherichia coli: molecular and cellular microbiology*. Norfolk, UK: Caister Academic Press. ISBN 9781908230997.
23. RAO, J., R., FLEMING, C., C. a MOORE J., E., 2006. *Molecular diagnostics: Current technology and applications*. 1st ed., United Kingdom: Horizon Bioscience. ISBN 978-1-904933-19-9.
24. ROZSYPAL, H., 2015. *Základy infekčního lékařství*. V Praze: Univerzita Karlova, nakladatelství Karolinum. ISBN 978-80-246-2932-2.
25. SHAH, H. N. a GHARBIA, S. 2017. *MALDI-TOF and tandem MS for clinical microbiology*. Chichester, West Sussex: John Wiley. ISBN 9781118960257.
26. SCHINDLER, J., 2014. *Mikrobiologie: pro studenty zdravotnických oborů*. 2., dopl. a přeprac. vyd. Praha: Grada. Sestra (Grada). ISBN 978-80-247-4771-2.
27. SURESHBABU, J., 2018. *Shigella Infection* [online]. [cit. 2019-04-28]. Dostupné z: <https://emedicine.medscape.com/article/968773-overview>
28. TÁBORSKÁ, Jana, 2013. *Virové gastroenteritidy, léčba*. *Interní medicína*. **15**(1), 11-14.
29. VOTAVA, M., 2003. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun. ISBN 80-902896-6-5.
30. VOTAVA, M., 2005. *Lékařská mikrobiologie obecná*. 2. přeprac. vyd. Brno: Neptun. ISBN 80-86850-00-5.
31. VOTAVA, M., c2010. *Lékařská mikrobiologie - vyšetřovací metody*. Brno: Neptun. ISBN 9788086850047.
32. Vyhláška č. 473/2008 Sb., o systému epidemiologické bdělosti pro vybrané infekce, 2008. In: *Sbírka zákonů České republiky*. částka 151, s. 8010-43.

8 Seznam zkratek

ADH – arginin dihydroláza

AMY – amyláza

ARA – arabinóza

ATB – antibiotika

CIT –citrát

GEL – želatina

GLU – glukóza

H₂S – sulfan

HUS – hemolyticko-uremický syndrom

IND – indol

INO – inositol

LDC – lysin dekarboxyláza

LIS – laboratorní informační systém

MALDI TOF MS – angl..Matrix Assisted Laser Description/Ionization Time of Flight
Mass Spectrometry

MAN – mannitol

MEL – melibióza

ODC – ornithin dekarboxyláza

ONPG – o-nitrofenyl-β-galaktopyranosid – k průkazu β-galaktooxidázy

RHA – rhamnóza

SAC – sacharóza

SOR – sorbitol

SZÚ – Státní zdravotnický ústav

TDA – tryptofan deamináza

URE – urea

VP – Voges-Proskauerův test