

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Zdravotně sociální fakulta

**Nejčastější bakteriální původci střevních onemocnění
u dospělých lidí v České republice**

bakalářská práce

Autor práce: Kristýna Kopecká, DiS.
Studijní program: Specializace ve zdravotnictví
Studijní obor: Zdravotní laborant

Vedoucí práce: RNDr. Alena Veselská

Datum odevzdání práce: 3.5. 2013

Abstrakt

Bakalářská práce, kterou jsem zpracovala, je zaměřena na téma nejčastější bakteriální původci střevních onemocnění u dospělých lidí v České republice. Ve své práci jsem se zaměřila na bakteriální střevní patogeny rodu *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, *Campylobacter*.

V teoretické části práce se zabývám charakteristikou vybraných střevních bakteriálních patogenů a jejich mikrobiologickou diagnostikou. V dnešní době jde vývoj dopředu, objevují se různé moderní metody a přístroje, které diagnostiku zkvalitňují a zrychlují. V mé práci se však zabývám pouze metodami, které se používají rutinně v klinických mikrobiologických laboratořích. Mezi tyto metody patří kultivační průkaz mikrobů, biochemické dourčování, provádění testů citlivosti. Standardním postupem je kultivační průkaz. Biochemické testy se používají k identifikaci mikrobů. Antigenní analýza slouží k bližšímu dourčení bakterií. Nedílnou součástí je stanovení citlivosti na antibiotika, které jsou důležité pro správnou léčbu.

V praktické části popisuji laboratorní diagnostiku bakteriálních střevních patogenů z výtěru stolice, kterou používají v akreditované Soukromé mikrobiologické laboratoři RNDr. Aleny Veselské v Ústí nad Labem, a kterou jsem sama prováděla během své praxe na pracovišti. Ve výsledcích pak shrnuji výsledky z laboratoře za období říjen 2012 až březen 2013. Pozitivní výsledky porovnávám s daty získané z Epidatu ze Státního zdravotního ústavu v Praze uvedené ve zprávě Centra epidemiologie a mikrobiologie. Dále jsem zpracovala nálezy střevních patogenů za období roku 2003 do roku 2012 jak byly zveřejněny ve zprávách CEM SZÚ v Praze. Z výsledků vyplývá, že nejčastějším hlášeným bakteriálním střevním patogenem od roku 2003 až 2006 v České republice byla *Salmonella*. Následuje mikrob rodu *Campylobacter*. Situace se změnila v roce 2007, kdy rod *Campylobacter* se v počtu záchyťů v České republice dostal na první místo. Oproti dvěma jmenovaným bakteriím se nálezy shigel objevují poměrně sporadicky.

Abstract

My bachelor thesis focuses on the most frequent bacterial causes of intestinal diseases in adults in the Czech Republic. I deal with bacterial intestinal pathogens of *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, *Campylobacter* genus.

The theoretical part characterises the selected intestinal bacterial pathogens and their microbial diagnostics. In the present time of progress various new and modern methods and instruments keep appearing to accelerate and improve diagnostics. But I focus exclusively on methods used as a routine in clinical microbiological laboratories. These methods include cultivation of microbes, biochemical specification and sensitivity tests. The proof by cultivation is a standard procedure. Biochemical tests are used for microbe identification. Antigen analysis is used for further specification of bacteria. Specification of sensitivity to antibiotics for correct therapy is an integral part of this method.

The practical part describes laboratory diagnostics of bacterial intestinal pathogens from stool swab used by the accredited microbial laboratory of RNDr. Alena Veselská in Ústí nad Labem, which I performed in practice while on scholarship there. The results summarise laboratory results from the period October 2012 to March 2013. positive results are compared to the data obtained from Epidate of the National Healthcare Institute in Prague included in the report of the Epidemiology and Microbiology Centre. I have further processed finds of intestinal pathogens in the period 2003 to 2012 published in CEM reports. The results show that the most frequently reported bacterial intestinal pathogen in the Czech Republic in the period 2003 to 2006 was *Salmonella*, followed by *Campylobacter*. Situation changed in 2007, when diagnosed *Campylobacter* moved to the top rank in the Czech Republic. In contrast to the two abovementioned bacteria finds of *Shigella* are relatively scarce.

Prohlášení

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

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to – v nezkrácené podobě – v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných 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 3. 5. 2013

.....

(jméno a příjmení)

Poděkování

Děkuji paní RNDr. Aleně Veselské, za odborné vedení bakalářské práce, za cenné rady a materiálové podklady k práci. Dále bych chtěla poděkovat laborantce Radce Sýkorové za vedení v praktické části a materiálové podklady.

Obsah

Úvod	10
1 Současný stav	11
1.1 Normální a patologická střevní flóra u člověka	11
1.2 Vyvolavatelé infekčních průjmů v České republice	13
1.2.1 Čeleď Enterobacteriaceae	13
1.2.1.1 Rod Salmonella	14
1.2.1.2 Rod Shigella	16
1.2.1.3 Rod Yersinia	18
1.2.2 Rod Campylobacter	20
1.3 Odběr a transport materiálu	22
1.3.1 Odběr materiálu	22
1.3.2 Transport materiálu do laboratoře	22
1.3.2.1 Transportní půdy	22
1.4 Laboratorní diagnostika	24
1.4.1 Mikroskopie	24
1.4.2 Kultivace	24
1.4.2.1 Kultivační půdy	25
1.4.2.1.1 Půdy diagnostické	25
1.4.2.1.2 Půdy selektivní	25
1.4.2.1.2.1 Základní selektivní půdy vhodné pro kultivaci bakteriálních střevních patogenů	26
1.4.2.1.3 Půdy selektivně diagnostické	27

1.4.2.1.3.1	Základní selektivně diagnostické půdy vhodné pro kultivaci bakteriálních střevních patogenů.....	27
1.4.2.1.4	Půdy k antibiotickým zkouškám.....	30
1.4.3	Biochemické testy	31
1.4.3.1	Štěpení sacharidů.....	31
1.4.3.2	Změny substrátů	32
1.4.3.2.1	Redukce nitrátů	32
1.4.3.2.2	Dekarboxylace aminokyselin.....	33
1.4.3.2.3	Štěpení močoviny.....	33
1.4.3.2.4	Hydrolyza hippurátu.....	33
1.4.3.3	Tvorba typických látek	34
1.4.3.3.1	Tvorba sirovodíku.....	34
1.4.3.4	Schopnost využívat některé látky	34
1.4.3.4.1	Citrát sodný	34
1.4.3.5	Průkaz aktivity enzymů	35
1.4.3.5.1	C8-esterasa	35
1.4.3.5.2	Oxidasa.....	35
1.4.3.5.3	Katalasa	35
1.4.3.5.4	Acetáttesteráza.....	36
1.4.3.5.5	ONPG-test	36
1.4.3.6	Kombinované diagnostické půdy.....	37
1.4.3.6.1	Půda Rappaportova-Vassiliadisova	37
1.4.3.6.2	Biochemický klín.....	37
1.4.3.6.3	Hajnova půda.....	38
1.4.3.6.4	Půda MIU	39

1.4.3.6.5 Půda MIL	39
1.4.3.6.6 Půdy k průkazu dekarboxylace lysinu a tvorby sirovodíku	40
1.4.3.7 Komerčně vyráběné biochemické testy.....	40
1.4.3.7.1 ENTEROtest.....	41
1.4.3.7.2 Api test	42
1.4.4 Antigenní analýza	43
1.4.4.1 Dourčení rodu Salmonella	43
1.4.4.2 Dourčení rodu Shigella.....	44
1.4.4.3 Dourčení rodu Yersinia	44
1.4.5 Stanovení citlivosti na antibiotika.....	45
1.4.5.1 Půdy ke stanovení citlivosti na antibiotika	45
1.4.5.2 Testy ke stanovení citlivosti na antibiotika	45
1.4.5.2.1 Kvalitativní testy.....	45
1.4.5.2.2 Kvantitativní testy.....	46
1.4.5.2.2.1 Agarová diluční metoda.....	47
1.4.5.2.2.2 Diluční mikrometoda.....	47
1.4.5.2.3 Kombinované testy	47
1.4.6 Další metody	49
1.4.6.1 Widalova reakce.....	49
2 Cíl práce.....	50
3 Metodika	51
3.1 Zpracování materiálu	51
3.1.1 Další postup při podezření na rod Salmonella	52
3.1.1.1 Biochemické testy	52

3.1.1.2 Aglutinační analýza.....	53
3.1.1.3 Stanovení citlivosti na antibiotika.....	54
3.1.2 Další postup při podezření na rod Shigella	54
3.1.2.1 Biochemické testy	54
3.1.2.2 Aglutinační analýza.....	54
3.1.2.3 Stanovení citlivosti na antibiotika	55
3.1.3 Další postup při podezření na rod Yersinia.....	55
3.1.3.1 Biochemické testy	55
3.1.3.2 Aglutinační analýza.....	55
3.1.3.3 Stanovení citlivosti na antibiotika.....	56
3.1.4 Další postup při podezření na rod Campylobacter	56
3.1.4.1 Biochemické testy	56
3.1.4.2 Preparát.....	57
4 Výsledky.....	58
5 Diskuze.....	65
6 Závěr	69
7 Seznam informačních zdrojů	71

Úvod

Bakalářská práce, kterou jsem zpracovala, je zaměřena na téma nejčastější bakteriální původci střevních onemocnění u dospělých lidí v České republice. Ve své práci jsem se zaměřila na bakteriální střevní patogeny rodu *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, *Campylobacter*.

Uvedená problematika se řeší již dlouhá léta, přesto jde o stále aktuální oblast a v současné době se o uvedené téma začíná zajímat i laická veřejnost. Z uvedeného důvodu jsem si toto téma vybrala. Stále velmi důležitou otázkou je, jak zajistit dostatečnou prevenci proti těmto střevním patogenům, jelikož úprava vody, bezpečnost potravin a hygienické podmínky nejsou stále zcela dostačující. Do zmiňované prevence, lze mimo jiné zařadit podání probiotik. Probiotika jsou definována jako živé mikrobiální doplňky stravy, které příznivě ovlivňují funkci střevní mikroflóry.

V teoretické části práce se zabývám charakteristikou vybraných střevních bakteriálních patogenů a jejich mikrobiologickou diagnostikou. V dnešní době jde vývoj dopředu, objevují se různé moderní metody a přístroje, které diagnostiku zkvalitňují a zrychlují. V mé práci se však zabývám pouze metodami, které se používají rutinně v klinických mikrobiologických laboratořích. Mezi tyto metody patří kultivační průkaz mikrobů, biochemické dourčování, provádění testů citlivosti. Standardním postupem je kultivační průkaz. Biochemické testy se používají k identifikaci mikrobů. Antigenní analýza slouží k bližšímu dourčení bakterií. Nedílnou součástí je stanovení citlivosti na antibiotika, které jsou důležité pro správnou léčbu.

V praktické části popisuji laboratorní diagnostiku bakteriálních střevních patogenů z výtěru stolice, kterou používají v akreditované Soukromé mikrobiologické laboratoři RNDr. Aleny Veselské v Ústí nad Labem, a kterou jsem sama prováděla během své praxe na pracovišti. Ve výsledcích pak shrnuji výsledky z laboratoře za období říjen 2012 až březen 2013. Pozitivní výsledky porovnávám s daty získané z Epidatu ze Státního zdravotního ústavu v Praze uvedené ve zprávě Centra epidemiologie a mikrobiologie. Dále jsem zpracovala nálezy střevních patogenů za období roku 2003 do roku 2012 jak byly zveřejněny ve zprávách CEM SZÚ v Praze.

1 Současný stav

1.1 Normální a patologická střevní flóra u člověka

Za normální střevní flóru tj. fyziologickou střevní flóru jsou označovány bakterie, které se žijí na střevní sliznici člověka, aniž by působili patologické potíže. Jedná se o bakterie aerobní a anaerobní. Některé z bakterií jsou nezbytné pro správnou činnost střevní sliznice. Například *Escherichia coli*, Nepřítomnost těchto bakterií může způsobit potíže charakteru nadýmání, bolesti břicha a průjem. Mezi další střevní aerobní bakterie patří enterokoky, klebsiely, enterobakter, mezi anaerobní bakterie *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Peptostreptococcus*. Vedle bakterií na sliznici střeva jsou přítomny kvasinky hlavně *Candida albicans* a dále i prvoci jako *Endolimax nana*, *Trichomonas hominis*, *Entamoeba coli* a *Iodamoeba butschlii* (23).

Střevní flóra je pro svého nositele prospěšná několika způsoby:

- syntéza vitamínů – bakterie v tlustém střevě, produkují vitamín K, který je důležitý pro správnou srážlivost krve
- zábrana kolonizace patogeny – bakterie normální flóry tvoří na sliznici střeva tzv. biofilm
- inhibice nebo letální účinek na ostatní bakterie – bakterie, které normálně osidlují střevní sliznici, mohou působit na patogeny antagonisticky svými bakteriociny, jako jsou bílkoviny, které mají specifický letální účinek či bakteriální metabolity s nespecifickým antimikrobním účinkem
- stimulace imunitního systému – ve střevě bakteriální flóra působí na proliferaci lymfatické tkáně, které antigenně stimulují rozvoj nespecifických protilátek (18, 5)

Však do střeva se mohou dostat bakterie, které jsou patogenní zejména bakterie rodu *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, *Campylobacter*, *Clostridium*, *Vibrio cholerae* a *Aeromonas*.

Na ochraně střevní sliznice proti patogenům se podílí mechanismus, který má za úkol odlučování poškozených epiteliálních buněk, dále se na ochraně podílí tvorba hlenu pohárkovými buňkami krypt. Ve sliznici jsou přítomny i buňky produkující antibakteriální peptidy zvané cryptidiny. Současné působení žaludečních kyselin, žlučových solí, odlupování epitelů a poměrně rychlé pasáže střevní tekutiny je tenké střevo osídleno bakteriemi jen relativně málo. Naproti tomu tlusté střevo je minimálně z poloviny osídleno mikroby. Ochranu tlustého střeva zajišťuje normální střevní flóra, která se z 99% skládá z anaerobních mikrobů.

Normální střevní flóra soutěží s patogeny především o místo k přichycení na sliznici. K vybití normální střevní flóry dochází podáváním antibiotik, především širokospektrých (23).

Ale i normální střevní flóra se může stát potencionálním zdrojem endogenní infekce. Zde hraje důležitou roli stav organismu, hlavně oslabení imunity (18).

1.2 Vyvolavatelé infekčních průjmů v České republice

Salmonella serotyp

- Enteritidis (více než 80%)
- Thyphimurium (méně než 10%)
- Infantis (cca 2%)
- Hadar, Agona, Saintpaul, Virchow, Newport, Montevideo a jiné

Escherichia coli

- enterotoxigenní
- enteropatogenní
- enterohemoragické
- enteroinvasivní

Campylobacter jejuni, *Shigella sonnei*, *Shigella flexneri*, *Shigella boydii*, *Yersinia enterocolitica*, *Pseudomonas aeruginosa* (výskyt u novorozenců), *Clostridium difficile* (výskyt hlavně v nemocnicích), *Aeromonas sp.*, *Vibrio cholerae* (23)

V práci jsem se zaměřila na diagnostiku nejčastějších bakteriálních původců střevních onemocnění u dospělých lidí v České republice. Konkrétně na rody *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, které patří do čeledi *Enterobacteriaceae* a na rod *Campylobacter*.

1.2.1 Čeleď *Enterobacteriaceae*

Enterobakterie jsou rozšířeny po celém světě a některé z nich jsou patogenní nejen pro člověka, ale i zvířata, hmyz a rostliny. Jedná se o gramnegativní, nesporulující fakultativně anaerobní tyčky, které se pohybují pomocí bičíků. Jsou většinou růstově nenáročné. Rostou na jednoduchých kultivačních půdách. Biochemicky jsou většinou velice aktivní. Ze sacharidů tvoří kyseliny a často i plyn

při fermentaci, tvoří katalázu. Bakterie patogenní pro člověka jsou rody *Salmonella*, *Shigella* a *Yersinia* (1).

1.2.1.1 Rod *Salmonella*

Obecná charakteristika

Bakterie rodu *Salmonella* patří k nejčastějším patogenům střevních potíží nejen v naší populaci. Proto je snaha vyvinout co nejpřesnější klasifikaci. Salmonely jsou střevními patogeny jak u lidí, tak u zvířat. Nachází se v odpadcích, vodách, půdě a potravinách, které mohou být infikovány přímo (maso, vejce) nebo druhotně, kdy dojde ke kontaminaci potravin při manipulaci s nimi.

V rámci rodu *Salmonella* se vyskytuje velké množství salmonel. K jejich identifikaci se používá Kaufmann-White schéma. V našich podmínkách se vyskytuje nejčastěji *Salmonella Enteritidis* následuje *Salmonella Typhimurium*, *Salmonella Infantis*, *Salmonella Hadar* a *Salmonella Kottbus*. Ostatní salmonely se vyskytují sporadicky.

Morfologie

Bakterie jsou pohyblivé gramnegativní tyčky se zaoblenými konci. Jsou 2 až 3 µm dlouhé a 0,5 až 0,8 µm široké. Bičíky mají umístěny peritrichózně.

Biochemické vlastnosti

Salmonely fermentují glukosu, maltosu, manitol a sorbitol s tvorbou plynu a kyseliny, většina salmonel tvoří sirovodík, neprodukuje indol, nedesaminuje fenylalanin a nehydrolyzuje močovinu.

Antigenní struktura

Antigeny navázané v buněčné stěně jsou značeny jako O-antigeny (somatický antigen) a v bičících H-antigeny (flagelární). Povrchové polysacharidové antigeny překrývají somatické antigeny a někdy brání jejich aglutinaci.

Laboratorní diagnostika

Salmonely jsou fakultativně anaerobní bakterie, které rostou na základních kultivačních půdách. Však na těchto půdách nemohou být rozeznány od ostatních enerobakterií, proto je vhodnější použít pro záchyt selektivní a selektivně diagnostické půdy. Rodové dourčení se provádí podle biochemických vlastností a druhové dourčení na základě sérotypizace (1).

Patogenita

U většiny případů jde o klasickou střevní infekci bez komplikací. Inkubační doba se pohybuje v rozmezí 12 hodin až 5 dnů, nejčastěji však 24 až 48 hodinami. K infekci je nutná poměrně vysoká infekční dávka. Důležitý je zdravotní stav a věk jedince (23).

Onemocnění u člověka

Zdrojem infekce bývá maso a hlavně vejce. Vehikulem nemusí být jen potraviny obsahující infikované vejce, ale i nevaječné jídla, která byla kontaminována sekundárně. Přenos z člověka na člověka je velice vzácný.

Charakteristické pro onemocnění jsou průjmy s velkým množstvím stolice bez přítomnosti krve. Průjmy mohou být doprovázeny zvracením a horečkou. U malých dětí, starých osob a u oslabených jedinců může dojít, až k salmonelové sepsi, která může být smrtelná. Mezi další komplikace patří metastatická infekce kloubních protéz, aterosklerotických plátů či hnisavá artritida nebo meningitida (1).

Léčba

Zásadně se nedoporučuje léčba antibiotiky, která sice může zkrátit dobu klinických příznaků na jedné straně, ale na druhé salmonely pronikají hlouběji do střevní sliznice eventuelně se dostávají výše do zažívacího traktu a tak se zpomalí jejich vylučování. Vhodnější je klid, hodně tekutin a podpora střevní flóry probiotiky (23).

Prevence

Dostatečná hygiena a správně tepelně upravené pokrmy.

1.2.1.2 Rod *Shigella*

Obecná charakteristika

Shigely tvoří skupinu bakterií, které u člověka způsobují tak zvanou bacilární dysenterii což je přímo název pro infekční onemocnění střeva (1).

Rod se dělí do 4 podskupin, které jsou děleny podle antigenních a biochemických vlastností. Podskupiny jsou značeny velkým písmem. Podskupina A nese název *Shigella dysenteriae*, podskupina B je značena jako *Shigella flexneri*, název podskupiny C je *Shigella boydii* a podskupina D se nazývá *Shigella sonnei*.

Morfologie

Shigely jsou nepohyblivé gramnegativní tyčky (23).

Biochemické vlastnosti

„Shigely tvoří kyseliny z glukosy bez tvorby plynu, netvoří sirovodík, nehydrolyzují močovinu, neutilizují citrát jako zdroj uhlíku.“¹

¹ BEDNÁŘ M, Lékařská mikrobiologie s. 270

Charakteristické pro podskupinu A je, že nefermentuje manitol, zatím co podskupina B manitol většinou fermentuje, podskupina C manitol zkvašuje a podskupina D může opožděně zkvašovat laktosu (23).

Antigenní struktura

Podskupina A 12 sérotypů, a každý z nich má jeden hlavní antigen. Shigely patřící do podskupiny B mají komplexní antigenní strukturu. Podskupina B obsahuje 6 hlavních sérotypů, kdy každý specifický antigen. Sérotypy jsou dále děleny do subsérotypů. Podskupina C se skládá z 18 sérotypů. Podskupina D má pouze jeden sérotyp a je rozdělena do fáze S a fáze R (23).

Laboratorní diagnostika

Jde o bakterie kultivačně náročnější a pro záchyt jsou vhodné selektivně diagnostické půdy. Identifikace se provádí podle biochemických vlastností a aglutinačních testů (1).

Patogenita

Shigely jsou primárně patogenní pro člověka a primáty. Vyvolávají již zmíněnou bacilární dysenterii. Nejtěžší průběh infekce způsobuje *Shigella dysenteriae* sérotyp 1. Bakterie pronikne do buněk sliznice tlustého střeva a intercelulárně se začne pomnožovat a to má za následek vředy a nekrózu takto napadených buněk. Ve stolici může být přítomný hlen, hnis a krev. Shigely většinou nepronikají do submukózy, nezpůsobují bakteriémii a systémové onemocnění (23).

Onemocnění u člověka

Zdrojem infekce je kontaminovaná potrava a špatná hygiena. Přenos se děje fekálně orální cestou. Jde o tak zvanou typickou nemoc špinavých rukou. Ačkoliv se jedná o bakterii citlivou k vnějším vlivům, k vypuknutí onemocnění stačí jen velmi nízká dávka. Epidemie jsou typické u hromadného ubytování lidí, jako jsou ubytovny, dětské tábory, azylové domy (1, 23).

Léčba

Základem je doplňování tekutin. Lze podat Endiaron či kotrimoxazol, výjimečně fluorochinolony. Terapii je vhodné doplnit probiotiky. Antibiotika ovlivní zdravotní stav pouze v prvních dnech onemocnění (23).

Prevence

Dostatečná hygiena rukou (1).

1.2.1.3 Rod *Yersinia*

Obecná charakteristika

Yersinie je častý parazit u zvířat, zejména hlodavců. Zdrojem pro člověka je infikované maso či kontaminovaná voda, jedná se tedy o alimentární nákazu. Vyloučená není ani profesionální infekce.

Morfologie

Gramnegativní tyčky, které jsou pohyblivé jen při nízkých teplotách (25°C).

Biochemické vlastnosti

Pro yersinii je typické, že štěpí močovinu, obsahuje enzym β -galaktozidásu, má schopnost desaminace ornithinu, štěpí sacharosu, sorbitol, mannitol a trelosu.

Antigenní struktura

Sérotypizace se provádí podle O antigenu a tak rozeznáváme *Yersinia enterocolitica* O3 a O9.

Laboratorní diagnostika

Důležitý je o pět kultivační průkaz, vhodné je použít selektivní půdy a dodržet kultivační teplotu nezbytnou pro záchyt yersinii (25°C). Identifikace se provádí pomocí

biochemických testů a průkazem O antigenu. Diagnosu lze potvrdit průkazem protilátek proti O antigenům (1).

Patogenita

„Virulence je vázaná na genetickou informaci v chromozomu a plazminech. Virulence značně kolísá. Významně se v patogenitě uplatňuje membránový protein. Virulence je dána invasivitou a průnikem do buněk. Má velkou afinitu k lymfatické tkáni. Alimentární infekcí se Yersinia dostává do terminálního ilea a do apendixu, proniká do buněk a do lymfatické tkáně. Množí se v makrofázích a vyvolávají tvorbu granulomů. Výjimečně vzniká nekróza a vředy. U lidí se sníženou imunitou může vzniknout bakteriémie s rozsevem infekce. Nevirulentní kmeny jsou rychle vyloučeny bez průniku do buněk.“²

Onemocnění u člověka

Přenáší se fekálně orální cestou, kdy nejčastějším zdrojem infekce je infikované vepřové maso. Klinický obraz je vzhledem k věku různý. U dětí školního věku jsou časté bolesti břicha v oblasti pravé jámě kyčelní, což často vede k rozhodnutí provést apendektomii. U dospělých jsou přítomny především příznaky infekce trávicího traktu a průjmy. Po akutní fázi se mohou vyskytnout artritidy. Infekce je provázena tvorbou protilátek, které jsou namířené proti somatickému antigenu.

Léčba

Při léčbě většinou antibiotika nejsou potřeba. Pokud je však nutné antibiotika podat, vhodné jsou fluorochinolony, cefalosporiny třetí generace a tetracykliny.

Prevence

Předejít nákaze se dá dostatečnou hygienou a správnou tepelnou úpravou pokrmů (1)

² BEDNÁŘ M, Lékařská mikrobiologie s. 273

1.2.2 Rod *Campylobacter*

Obecná charakteristika

Skupina *Campylobacter* patří mezi bakterie dříve označované mikroaerofilní vibria. *Campylobakter* vyvolává onemocnění u lidí i u zvířat.

Morfologie

Jde o spirální tenkou gramnegativní tyčku (křídla ptáků). Při nevhodných podmínkách přechází do kokovitých útvarů. Jde o pohyblivé bakterie s polárně umístěnými bičíky. Tvar a pohyblivost usnadňuje bakteriím průnik hlenovou vrstvou (1).

Biochemické vlastnosti

Identifikačním znakem je velmi rychle vyvíjející se oxidázová a katalázová reakce. *Campylobakter* nefermentuje sacharidy.

Campylobacter jejuni má schopnost tvořit hydrolýzu hippurátu, což se používá k rozpoznání od jiných *Campylobacter*ů. K odlišení se také využívá citlivosti ke kyselině nalidixové a rezistence k cefalotinu (26).

Antigenní struktura

Rozlišuje se až 112 sérotypů.

Laboratorní diagnostika

Pro záchyt *Campylobaktera* je potřeba použít transportní půdu a při zpracování vzorku použít speciální kultivační půdy, dodržet mikroaerofilní prostředí a teplotu 42 až 43°C. Pro záchyt ze stolice je potřeba použít plotny s přidanými antibiotiky, které inhibují růst ostatní flóry zejména enterobakterie. Kultivační průkaz je nutno ověřit mikroskopicky a biochemicky.

Patogenita

Zdrojem pro člověka je požití infikovaného nedostatečně tepelně upraveného kuřecího masa. Dalším dnes rozšiřujícím zdrojem nákazy je infikované mléko.

Campylobacter jejuni se pomnoží v tenkém střevě a následně proniká do střevního epitelu. Ve stolici je přítomnost erytrocytů a leukocytů. Infekční onemocnění nemusí být lokalizováno jen na tenké střevo, bakterie se mohou dostat do krevního oběhu.

Onemocnění u člověka

Projeví se krvavým průjmem provázeným horečkou, bolestí hlavy, bolestmi břicha.

Léčba

Průjmový stav přetrvává 5 až 7 dní. U zdravých lidí ustoupí i bez podání antibiotik. U septických příznaků je potřeba léčba antibiotiky.

Prevence

Předejít nákaze se dá dostatečnou hygienou a správnou tepelnou úpravou pokrmů (1).

1.3 Odběr a transport materiálu

1.3.1 Odběr materiálu

Odběr stolice na bakteriologické vyšetření se provádí pomocí tamponu, který je na tyčce z umělé hmoty. Vlastní odběr se provádí zavedením tamponu do konečníku 1 až 2 cm hluboko. Tampon se následně vloží do transportní půdy. Je potřeba dát pozor, aby tampon byl zasunut v mediu celý, aby vzorek nevyschl (26).

Každý vzorek musí být dostatečně označen a zasílán do laboratoře s řádně vyplněnou žádankou (objednávku laboratorního vyšetření).

1.3.2 Transport materiálu do laboratoře

Odebraný vzorek musí být se žádankou co nejrychleji dopraven do laboratoře, aby nedošlo k znehodnocení vzorku. Během špatného transportu může dojít k uhynutí citlivých mikrobů nebo naopak může dojít k přemnožení mikroorganismů, které jsou součástí normální flóry. Proto je potřeba pro transport vzorku vždy zvolit vhodnou transportní půdu a vhodné transportní prostředí (24).

1.3.2.1 Transportní půdy

Úkolem transportních půd je udržet mikroby během přepravy do laboratoře živé a uchovat ve vzorku stejný počet bakterií nebo alespoň stejný poměr, v jakém se vyskytovaly v místě odběru (24).

Dnes jsou transportní soupravy vyráběny komerčně. Nejčastější komerční soupravou je AMIES. Souprava je sterilní a je tedy na jedno použití.

Obrázek č. 1: Transportní půda



Zdroj: <http://www.veselska.cz/>

Půda AMIES

Půda AMIES představuje modifikaci transportního média Stuart. Půda však prošla několika změnami. Glycerofosfát je nahrazen anorganickým fosfátem, což potlačuje přemnožení koliformních bakterií. Chlorid draselný, hořečnatý a soli chloridu vápenatého slouží pro dobrou propustnost bakteriální stěny a tím se zajistí delší životnost mikrobů. Jako pufrační systém slouží fosforečnany (21).

Caryové-Blairovo transportní médium

Toto transportní médium má poměrně vysoké pH (8,4), díky tomu dochází k zabránění destrukci buněk, které je způsobené tvorbou kyseliny. Transportní médium Caryové-Blairovo se používá k transportu gramnegativních a anaerobních mikrobů. Médium je tedy vhodné pro transport stěrů z konečníku (24).

1.4 Laboratorní diagnostika

1.4.1 Mikroskopie

Pro mikroskopickou identifikaci střevních bakteriálních patogenů se používá nejčastěji diagnostické barvení dle Grama. Barvení je vhodné pro zjištění vlastností bakterií, jako je velikost, tvar a uspořádání.

Grampozitivní mikroby jsou zbarveny krystalovou violetí tmavě fialově až modročerně. Gramnegativní bakterie jsou obarveny růžově až červeně. Gramlabilní mikroorganismy mají přechodné zbarvení nebo jsou částečně tmavě fialové a částečně růžové (8).

Pro zpracování stolice má mikroskopie doplňující uplatnění.

1.4.2 Kultivace

V dnešní době je mnoho možností jak laboratorně stanovit bakteriální střevní patogeny, přesto je stále kultivace bakterií základní metodou (4).

Aby bylo dosaženo růstu bakterií in vitro, je nutné zajistit celou řadu podmínek. K těmto podmínkám patří dostatek energie, živin, vody je potřeba zajistit po celou dobu kultivace vhodnou teplotu, vhodné složení atmosféry, optimální pH, vhodný osmotický tlak a to po celou dobu kultivace. Tyto podmínky se dají zajistit použitím vhodných kultivačních půd, které se po inokulaci inkubují při potřebné teplotě a v optimální atmosféře. Cílem kultivačních půd je nahradit bakteriím jejich původní přirozené prostředí (24).

1.4.2.1 Kultivační půdy

Kultivační půdy se od sebe liší složením, konzistencí a účelem, ke kterému je půda určena. Kultivační půdy se podle účelu dělí na půdy základní, půdy obohacené, půdy diagnostické, půdy selektivní, půdy selektivně diagnostické, půdy ke stanovení citlivosti na antibiotika.

Jelikož se jedná o velké množství půd, budu se v této práci zabývat pouze půdami, které jsou potřebné k průkazu a diagnostice eventuelně k testu citlivosti výše uvedených bakterií.

1.4.2.1.1 Půdy diagnostické

Na diagnostických půdách se určují některé vlastnosti zkoumaných kmenů pomocí biochemických vlastností. Na základě toho se určí druh nebo alespoň určitá skupina bakterií.

Půdy diagnostické obecně obsahují substrát a indikátor pH na který bakterie při růstu působí. To se projeví zbarvením bakterie při jejím růstu.

Pro lepší přehled budou diagnostické půdy vhodné pro bakteriální střevní patogeny zahrnuty u biochemických testů.

1.4.2.1.2 Půdy selektivní

Za selektivní půdy jsou označovány media, na kterých rostou jen některé mikroby, a naopak růst nežádoucích zárodků je potlačen. Proto je potřeba zvolit vhodnou selektivní půdu, aby vyrostli jen ty bakterie, o které je zájem.

1.4.2.1.2.1 Základní selektivní půdy vhodné pro kultivaci bakteriálních střevních patogenů

Půda selenitová

Selenitová půda je půda pomnožovací (půda tekutá). Živným základem půdy je pepton. Selenit inhibuje během prvních 6 až 12 hodin inkubace kolimorfni bakterie. Salmonely většinou nejsou ovlivněny, takže se mohou množit ihned po naočkování. Selenitová půda nepotlačuje růst proteů a pseudomonád. K udržení optimálního pH během kultivace se do půd přidává laktosa nebo manitol. Selenitová půda se rozplňuje do zkumavek po 10 až 15 ml, protože při nižší tensi kyslíku se účinek půdy zvyšuje. Před použitím nesmí půda obsahovat červený precipitát redukovaného selenu.

Selenitová půda má několik variant, místo laktosy je manitou s přídavkem brilantní zeleně nebo cystinem. Díky cystinu se snižuje toxicita seleničitanu pro salmonely, proto se selenitová půda s cystinem doporučuje pro záchyt salmonel v rekonvalescenci, kdy jsou salmonely přítomny ve stolici jen v malém množství.

Po kultivaci se selenitová půda vyočkuje na pevné půdy.

Médium dle Karmaliho

Ke kultivaci mikrobů rodu *Campylobacter* se využívá základních směsí pro krevní nebo takzvaný čokoládový agar, kdy je použit kvasniční extrakt, proteosový pepton, játrový pepton s příměsí lyzované koňské krve.

Existují i půdy bez příměsí krve. U těchto půd je důležitou složkou aktivní uhlí a pyruvát sodný. Aktivní uhlí slouží k odstraňování toxických metabolitů a pyruvát má za úkol zvyšovat toleranci kmenů proti toxickému účinku kyslíku. Někdy se přidá i metabisulfid sodný a síran železitý. Obě tyto látky mají stejný účinek jako aktivní uhlí a pyruvát.

Pro lepší záchyt *kampylobacteria* je potřeba nejprve odstranit střevní flóru, kdy se k tomu to účelu používají antibiotické suplementy. Jedním z nich je například kultivace při 42°C v mikroaerobním prostředí.

1.4.2.1.3 Půdy selektivně diagnostické

Půdy bývají většinou tuhé. Na tyto půdy se očkují vzorky, v nichž předpokládáme přítomnost hledaného patogena ve směsi s velkým množstvím původní většinou nepatogenní flóry.

Obecné složení selektivně diagnostických půd je agarový základ, živiny, inhibitory nežádoucích patogenů, vhodný substrát a indikátor jeho změn.

1.4.2.1.3.1 Základní selektivně diagnostické půdy vhodné pro kultivaci bakteriálních střevních patogenů

Endova půda

Půda se používá v klinické mikrobiologii pro záchyt enterobakterií a jiných gramnegativních nefermentujících tyček ze stolice a dalších klinických vzorků.

V Endově půdě je přidán inhibitor pro grampozitivní bakterie. Jako inhibitor slouží bazický fuchsin, který je také použit jako indikátor.

Při vyšetřování stolice jsou důležité bakterie, které neštěpí laktosu. Na Endově půdě rostou v bezbarvých průsvitných koloniích a jsou dobře vidět na narůžovělé půdě. V takové podobě rostou salmonely, shigely, morganely, providencie, citrobaktery a escherichie. Yersinie na Endově půdě rostou v menších koloniích.

Endova půda má přesto značné nevýhody. Není tak citlivá a selektivní jako modernější půdy, které se používají pro záchyt patogenů ze stolice. Kromě toho v přítomnosti protea ve vzorku, který má plazivý růst přeroste ostatní bakterie.

Půda MacConkeyho

Dříve byla MacConkeyho půda používána na kultivaci střevních bakterií ze stolice. Dnes má tato půda několik různých modifikací s využitím pro různé vzorky.

MacCkonkeho půda se řadí mezi půdy méně až středně selektivní. Na této půdě rostou převážně enterobakterie. Inhibován je hlavně růst grampozitivních bakterií, kdy koncentrace žlučových solí hraje důležitou roli v selektivitě půdy.

MacCkonkeho půda v základních variantách obsahuje laktosu a díky tomu je možnost na této půdě rozlišit gramnegativní bakterie štěpící a neštěpící laktosu. Bakterie štěpící laktosu rostou na MacCkonkeho půdě v růžových až červených koloniích a kolem nich se často vyskytují bělavý až narůžovělý precipitát. Barevná změna je dána reakcí, kdy při fragmentaci laktosy vznikají kyseliny ze žlučových solí a následně dochází k barevné změně a k poklesu pH. Kmeny, které neštěpí laktosu, posouvají pH na alkalickou stranu a kolonie těchto bakterií jsou bezbarvé a průhledné. Zároveň dochází k inhibici precipitátu, který vzniká díky okolním laktosopozitivním bakteriím. Kolonie u bakterií neštěpící laktosu jsou obklopeny zónou čiré půdy, pokud tedy nárůst bakterií štěpící laktosu není masivní.

SS-agar

Salmonella-Shigella agar tedy SS-agar je určena jak je již patrné z názvu pro záchyt salmonel a shigel z klinických vzorků.

Jako inhibitor grampozitivních bakterií, zde slouží žlučové sole, brilantní zeleň a citrát sodný. Substráty jsou laktosa a thiosulfát. Pro zjištění štěpení laktosy se používá neutrální červená a pro zjištění tvorby sirovodíku je využit citrát železitý.

Kolonie salmonel rostou na SS-agaru jako bezbarvé s černým středem. Shigela roste v bezbarvých koloniích.

Půda deoxycholát-citratová

Deoxycholát-citratová půda je značně selektivní a používá se k průkazu střevních patogenů. Na této půdě dochází k inhibici růstu všech grampozitivních patogenů a také většiny kmenů koliformních bakterií. Jako inhibitor se používá vyšší koncentrace deoxycholátu sodného. Je však nutné brát v úvahu, že některé bakterie i když mají potlačený růst, zůstávají živé a proto pro další testování mikrobů je potřeba vzít čistou kolonii.

Na deoxycholát-citrátové půdě je také možno testovat štěpení glukosy a tvorba sirovodíku. Mikroby neštěpící laktosu, své okolí alkalizují a proto rostou jako bezbarvé kolonie a někdy je přítomné nažloutlé okolí v oblasti kolonií.

K indikaci tvorby sirovodíku se používá citrát železitý nebo také citrát železitoamonný. Bakterie, které tvoří sirovodík od středu tmavnou až černají. Intenzita černého zbarvení závisí množství vytvořeného sirovodíku.

Půda CIN

CIN je zkratka pro 3 selektivní činidla - cefsulodin, Irgasan (antiseptikum příbuzné hexachlorofenu) a neomycin. Půda CIN slouží k izolaci *Yersinia enterocolitica* ze stolice. Jako další selektivní látky jsou použity deoxycholát sodný a krystalová violet.

Diagnostická složka je manitol a pro indikaci jeho štěpení se používá neutrální červeň. Inkubační optimum je 32°C. Kolonie *Yersinia enterocolitica* rostou s červeným středem a průsvitným okrajem. Je však brát v úvahu, že podobě mohou růst i jiné bakterie štěpící manitol a proto je nutné biochemické dourčení.

Půda XLD

Půda XLD je zkratka pro xylosa-lysin-deoxycholátovou půdu, která slouží k izolaci salmonel a shigel. Půda obsahuje kvasničný extrakt.

Jako inhibitor grampozitivních bakterií je zde použit deoxycholát sodný. Dochází i k částečnému potlačení růstu protea. Půda je bohatá na substráty, obsahuje laktosu, sacharosu, xylosu, lysin a thiosulfát sodný. Jako indikátor pH je použita fenolová červeň a jako indikátor sirovodíku je využit citrát železitoamonný.

Obdobou půdy XLD je půda XLD 4, která slouží hlavně k zachycení netyfových salmonel. Jako selekční činidlo je použita sodná sůl, která potlačuje růst grampozitivních bakterií a růst protea. Pro dobrý růst salmonel je využito proteosového peptonu a kvasničného extraktu. Kolonie salmonel díky tvorbě sirovodíku od středu černají. Ostatní bakterie rostou jako žluté kolonie se žlutým okolím.

Střevní agar Hektoen

Agar Hektoen se využívá k izolaci salmonel a shigel ze vzorků stolice. Jako výživný základ se používá pepton a kvasničný extrakt.

Jako substráty zde slouží laktosa, sacharosa a salicin. Tvorba sirovodíku je rozeznávána pomocí citrátu železitoamonného. Jako indikátor štěpení sacharidů je využita směs bromthymolové modři a kyselého fuchsinu.

Salmonely a shigely na agaru rostou v modrozelených koloniích. Salmonely mají k tomu černý střed kolonií. Koliiformní bakterie štěpící cukry v této půdě rostou v lososových až oranžových koloniích a někdy je přítomna zóna s vysráženými žlučovými solemi.

Chromogenní a fluorogenní média

Chromogeny jsou barevné molekuly navázané na substrátech například na glukose či laktose. Chromogen je sám o sobě bezbarvý. Specifický enzym, který je přítomen v bakteriální buňce, rozruší vazbu mezi částmi molekuly. Bakterie bere chromogen za substrát, absorbuje ho a specifickým enzymem ho rozštěpí na dvě části. Odštěpený barevný chromofor je nerozpustný a dochází k jeho hromadění v bakteriální buňce. Výsledkem ukládání chromoformu je růst bakterií v typicky zbarvených koloniích. Například Salmonela a shigela rostou v bílých koloniích (24).

1.4.2.1.4 Půdy k antibiotickým zkouškám

Více o půdách, které se používají ke stanovení citlivosti na antibiotika, popíšu u kapitoly 1.4.5 Stanovení citlivosti na antibiotika.

1.4.3 Biochemické testy

K biochemickému určení bakterií je potřeba použít dostatečné a správně namířené biochemické testy. Tyto testy umožňují vzájemné rozlišení mikrobů.

Biochemické testy se provádí z čisté kultury. Pokud pro test je potřeba bakteriální suspenze, bakterie se suspendují ve fyziologickém roztoku a vytvoří se suspenze o předem dané hustotě. Zákal se měří dle McFarlandovi stupnice. Výsledné reakce jsou odečitatelné okem.

Dříve se běžně půdy na biochemické testy připravovaly do zkumavek. Dnes se již k celé řadě testů používají komerčně vyráběné soupravy, které vyrábí různé firmy. U komerčních souprav se testy provádějí v mikrotitračních destičkách nebo speciálních „kapsičkách“. Půdy a chemikálie jsou u těchto testů v suchém stavu. K vyhodnocení výsledků se používá program v počítači. Jednotlivé výsledky se zapisují do diagnostického softwaru a ten pak vyhodnotí, o kterou bakterii se jedná i s procenty pravděpodobnosti správného určení. Výslednou bakterii lze také určit podle pomoci tabulky, která je dodaná s komerční soupravou (24).

1.4.3.1 Štěpení sacharidů

K identifikaci bakterií se používají zcela běžně jednoduché fermentační testy. Testy jsou založeny na fermentaci různých cukrů, jako je glukosa, manitol, xylosa, laktosa a sacharosa (6).

K diagnostice štěpení cukrů se používají takzvané cukerné půdy. Pro základ cukrových půd je použita peptonová voda, která se složena z peptonu a neobsahuje kvasitelné složky jako je například enzymatický kaseinový hydrolyzát nebo proteosový pepton. Půdy obsahují i pufrovací složku.

Půdy obsahují 0,5% nebo 1% potřebného sacharidu a indikátor pH. Pokud naočkované bakterie štěpí příslušný sacharid, dojde k tvorbě organických kyselin a tím pH půdy klesne a půda změní barvu. Jako indikátor pH jsou použity látky s barevným

přechodem blízkým k neutrálnímu bodu. Nejčastěji je použita bromthymolová modř, fenolová červeň, bromkresolový purpur nebo kyselý fuchsin s louhem, je však potřeba volit indikátor podle hledaných bakterií.

Nejčastěji se používají půdy ve zkumavkách, kdy horní část zkumavky zaujímá šikmo ztuhlou půdu. Aby půdy nevysychaly, uzavírají se zkumavky nejčastěji roličkou buničité vaty.

1.4.3.2 Změny substrátů

1.4.3.2.1 Redukce nitrátů

Schopnost redukovat nitráty na nitrity je charakteristické pro všechny enterobakterie a proto se této vlastnosti využívá při jejich identifikaci.

K redukci nitrátů je potřeba použít peptonovou vodu s 0,1% dusičnanem draselným. Jako indikátor je použito Griessovo činidlo na nitráty. Přidá se kapka α -naftylaminu a kyseliny sulfanilové. Při reakci nitrátů s kyselinou sulfanilovou vzniká diazoniová sůl, která reaguje s α -naftylaminem za vzniku rudého diazobarviva. Pokud zbarvení není přítomné, nelze zcela jistě říci, že k redukci nitrátů nedošlo. Může se stát, že vzniklé nitráty byly dále redukovány na hydroxylamin nebo dokonce až dusík a amoniak. V tomto případě k zjištění přítomnosti nitrátů slouží práškový zinek. Pokud jsou dusičnany v půdě přítomny, zinek je zredukuje na dusitany a to se projeví červeným zbarvením. Pokud se červené zbarvení po přidání zinku neobjeví, redukce nitrátů je považována za pozitivní.

Tento test se využívá u některých kombinovaných diagnostických půd.

1.4.3.2.2 Dekarboxylace aminokyselin

Dekarboxylace aminokyselin se používá pro diagnostiku enterobakterií. K zjišťování schopnosti bakterií dekarboxylovat aminokyseliny se nejčastěji používá lysin, ornitin či arginin. Po naočkování půd zkoumaným kmenem se převrší půda sterilním parafinovým olejem. Pokud dojde k dekarboxylaci aminokyselin, dojde ke vzniku aminů a pH půdy, které bylo původně nízké, se zvýší. Jestliže jako indikátor byl použit bromkresolový pufr dekarboxylace se projeví purpurovým zbarvením při negativním výsledku je zbarvení žluté.

1.4.3.2.3 Štěpení močoviny

Štěpení močoviny se využívá při identifikaci (mimo jiné) některých yersinií. K detekci se používá buď tekutá nebo pevná půda. Základ tekuté půdy je pufovací peptonová voda s glukosou. Substrátem je močovina a indikátorem je fenolová červeň. Při hydrolyze jedné molekuly močoviny vznikne jedna molekula oxidu uhličitého a dvě molekuly amoniaku. Tím dojde ke zvýšení pH půdy a k jejímu zčervenání. Pozitivní reakce je viditelná do 24 hodin (24).

1.4.3.2.4 Hydrolýza hippurátu

Hydrolýza hippurátu se používá k identifikaci *Campylobacter jejuni*. Půda obsahuje jednoprocenní hippurát sodný. *Campylobacter jejuni* hippurát sodný rozštěpí na benzoát sodný a glycin. Přidá se ninhydrin a u glycinu dojde k oxidativní deaminaci α -aninoskupiny na aldehyd a vzniku oxidu uhličitého, hydridantinu a čpavku. Se zbylým ninhydridem a hydridantinem reaguje amoniak. Výsledkem této reakce je modrofialový až purpurově zbarvený komplex.

V dnešní době se používá komerční souprava nazývaná HIPPURÁTtest. Souprava obsahuje testovací proužky, které jsou nasycené hippurátem sodným. Proužek se vloží do bakteriální suspenze a po 24 hodinové inkubaci při 37°C se nakapou 4 kapky ninhydrinového činidla, které je také součástí soupravy a po 5 až 10 minutách se odečítá výsledek.

1.4.3.3 Tvorba typických látek

1.4.3.3.1 Tvorba sirovodíku

Tvorba sirovodíku je typická pro salmonely. K detekci sirovodíku se používá celá řada půd. Rozdíl mezi půdami je v substrátu, indikátoru a citlivosti.

Octan olovnatý, který je použit jako indikátor je pro některé bakterie toxický, proto se přidává až po inkubaci. Pokud je výsledek pozitivní, půda ztmavne až zčerná. Méně toxický indikátor je citrát železitý nebo citrát železitoamonný. Může se tedy přidat přímo do půdy. V pozitivním případě vzniká siřník železitý a půda rychle zčerná. Tento indikátor se využívá u kombinovaných diagnostických půd.

1.4.3.4 Schopnost využívat některé látky

1.4.3.4.1 Citrát sodný

Tento test slouží pro diagnostiku salmonel ve vzorku. K tomuto testu slouží půda zvaná Simmonův citrát. Jako indikátor je použita bromthymolová modř, jako zdroj dusíku slouží dihydrofosforečnan sodnoamonný a jako zdroj uhlíku citrát sodný. Pokud dojde k využití citrátu sodného výsledkem je alkalizace půdy a to se projeví změnou barvy ze zelené na modrou.

Půda se nalévá do úzkých zkumavek a nechá se ztuhnout v šikmé poloze.

1.4.3.5 Průkaz aktivity enzymů

1.4.3.5.1 C8-esterasa

Aktivita enzymu C8-esterasy je typické pro rod *Salmonella*. Test k průkazu C8-esterasy se nazývá MUCAP-test. Test je rychlý a vysoce citlivý. Jako substrát je použit 4-methylumbelliferylkaprylát a při jeho hydrolýze vzniká 4-methylumbelliferon, který je pod UV-zářením vykazuje modrou fluorescenci.

Dnes jsou na trhu diagnostické proužky.

1.4.3.5.2 Oxidasa

Test se používá mimo jiné k rychlému průkazu enterobakterií a kampylobakterů.

K průkazu oxidasy je potřeba čistá kolonie zkoumaného mikroba, která se nanese na papírek, který je nasycený substrátem. Substrát je směs N,N-dimethyl-1,4-fenylendiaminu a α -naftolu. U pozitivního výsledku dojde k modrému zbarvení papírku.

1.4.3.5.3 Katalasa

Katalasa se používá k průkazu kampylobakterů a enterobakterií. K průkazu katalasy se využívá 3% peroxidu vodíku. Na podložní sklíčko se nakápne peroxid vodíku a přidá se kolonie zkoumaného kmene. Katalasa rozštěpí peroxid vodíku na vodu a kyslík a to se projeví vznikem bublinek (24).

Obrázek č.2: Tvorba katalasy

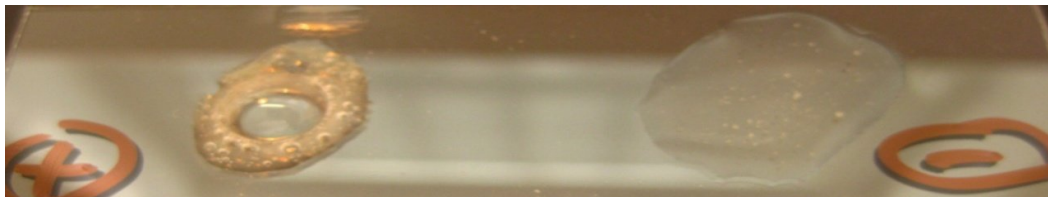


Foto: Radka Sýkorová

1.4.3.5.4 Acetáttesteráza

Aktivita acetáttesterázy je charakteristické pro rod *Campylobacter*. Jde o rychlý test, který je také nazýván jako indoxylacetátový test. Substrát je indoxylacetát a acetáttesteráza z něho uvolňuje volné indoxylové skupiny. Ty pak reagují s kyslíkem a výsledkem je vznik modrozelené barvy.

1.4.3.5.5 ONPG-test

ONPG-test se využívá pro průkaz β -galaktosidasy. Ten se používá, co se týče této práce k identifikaci *Yersinia enterocolitica*.

β -galaktosidasa štěpí glukosu, laktosu, galaktosu. Substrátem pro enzym je chromogenní ONPG (o-nitrofenyl- β -D-galaktopyranosid). Bakteriální enzym štěpí ONPG za vzniku žlutého o-nitrofenolu. Z kolonií se připraví suspenze ve fyziologickém roztoku a přidá se proužek nasycený ONPG a nechá se inkubovat při 35°C a po 2h se odečítá výsledek. Pozitivita je viditelná již po 10 minutách a projeví se zežloutnutím bakteriální suspenze.

1.4.3.6 Kombinované diagnostické půdy

Kombinované diagnostické půdy slouží ke sledování několika biochemických reakcí najednou. Těchto půd je několik a je třeba zvolit půdu podle hledaného patogena.

1.4.3.6.1 Půda Rappaportova-Vassiliadisova

Tato půda obsahuje malachitovou zeleň a chlorid hořečnatý. Zde je využito schopnosti salmonel přežít i při vyšším osmotickém tlaku a zároveň odolávají inhibičním účinkům malachitové zeleně. Tato půda byla různě modifikována pro lepší růst salmonel.

1.4.3.6.2 Biochemický klín

Biochemický klín také jinak Švejcárova půda se používá pro izolaci a předběžnou identifikaci běžných střevních patogenů. Biochemický klín je diagnostická půda, která se šikmo vylévá na Petriho misku a nechá se ztuhnout v podobě klínu a přidá se Endova půda. Biochemický klín obsahuje pepton, živný agarový základ z masového extraktu a enzymatický kaseinový hydrolyzát. Jako substrát jsou použity glukosa, urea a thiosulfát. Indikátorem je bromthymolová modř a octan olovnatý. Zkoumané bakterie se na klín naočkují masivně a udělá se několik vpichů. Na Endovu půdu se naočkují bakterie doprostřed půdy kolmo ke klínu v podobě 1 cm širokého pruhu a rozočkuje se po stranách od pruhu. Na klín se přidá sklíčko o velikosti jedenkrát 1 cm. Na Endovu půdu na masivně naočkovanou část se přidají tablety se sacharosou a manitolem.

Bakterie, které štěpí ureu, vytvářejí amoniak a to vede k alkalickému pH. To způsobí barevnou změnu klínu. Klín původně zelené barvy se zbarví do modra. Bakterie, které fermentují glukosu, změni barvu klínu do žluta. Vytvořený oxid uhličitý

je viditelný jako bublinky pod skličkem. Bakterie produkující sirovodík rostou černě minimálně v místě vpichu. Na Endově půdě je možno odečíst zda došlo k štěpení laktosy, sacharosy nebo manilou. Pokud ke štěpení došlo, kolonie kolem tablet rostou červeně.

1.4.3.6.3 Hajnova půda

Hajnova půda se používá k rozlišení salmonel a shigel od ostatních enterobakterií. Rozlišení bakterií spočívá ve schopnosti štěpit sacharidy a tvořit sirovodík.

Půda obsahuje pepton, kaseinový hydrolyzát v živném základu. Jako substráty jsou použity glukosa, laktosa a sacharosa. Indikátorem jejich štěpení je fenolová červeň. Indikátorem pro tvorbu oxidu uhličitého je přítomnost bublinek v agarovém gelu. Pro zjištění tvorby sirovodíku slouží jako indikátor tiosulfát sodný a indikátorem je citrát železitoamonný. Půda se připravuje do zkumavek a nalévá se tak, aby spodní část tvořila plný sloupec a horní část zaujímal šikmo ztuhlá půda. Zkoumaná bakterie se očkuje masivně a přidá se vpich do půdy.

Salmonely, které štěpí glukosu, produkují malé množství kyseliny. Malé množství protože v půdě je glukosy málo. Více kyseliny tvoří ve spodní části půdy, kde je méně kyslíku, než v části šikmé. Při této reakci se původní rumělková barva půdy mění na žlutou. Bakterie, které rostou na povrchu šikmé části půdy, oxidativně dekarboxylují pepton a díky tomu vznikají alkalické produkty, které neutralizují kyseliny nacházející se v šikmé části. Výsledkem této reakce je zčervenání šikmé části půdy, protože v pH v této části je alkalické a spodní sloupec je kyselý tedy zbarvení půdy je žluté. Bakterie štěpící zároveň glukosu i laktosu či sacharosu vytváří při této reakci velké množství kyseliny, tedy nemůže dojít k alkalizaci a to se projeví žlutým zbarvením půdy. Tvorba oxidu uhličitého se projeví přítomností bublinek v agaru nebo až jeho potrháním. Pokud narostou bakterie, které celou půdu alkalizují výsledkem je karmínově červená barva. Pokud se vytvoří sirovodík redukcí thiosulfátu dojde k reakci s ionty železa a vznikne

černý sulfid železitý. Thiosulfát je redukován v kyselém prostředí, a proto zčerná jen plný sloupec.

1.4.3.6.4 Půda MIU

Půda MIU celým názvem motility-indole-urea je polotuhá půda sloužící k průkazu štěpení urey. Ve spojení s Hajnovou půdou nám dá předběžnou diferenciaci enterobakterií.

Obsahuje enzymatický kaseinový hydrolyzát jako zdroj tryptofanu. Půda se nalévá do zkumavek a očkuje se vpichem do středu půdy. Motilita (pohyb) mikroba je viditelný jako zákal mimo vpich. Pokud bakterie štěpí ureu, dojde k alkalizaci půdy a ta se zbarví do růžova až červená. K průkazu tvorby indolu se přidá Kovácsovo reagens. U pozitivního výsledku dojde na rozhraní reagens a půdy k vytvoření červeného prstence.

1.4.3.6.5 Půda MIL

MIL je zkratka pro motility-indole-lysine. Půda slouží k identifikaci enterobakterií podle pohyblivosti, tvorby indolu, lysindekarboxylasy a lysindeaminasy. Pohyb se projeví zákalem mimo vpich a při tvorbě indolu po přidání Kovácsovo reagens vznikne červený prstenec. Močovina je u této půdy nahrazena lysinem a její indikátor je bromkresolpurpur. Deaminace lysinu se projeví asi povrchovým jednocentimetrovým červenohnědým zabarvením půdy. Dekarboxylace se projeví zbarvením celé půdy do purpurova. Pokud enterobakterie lysin neštěpí, dojde ke kvašení glukosy a to se projeví zbarvením půdy do žluta.

Obdobou je půda MIO (motility-indole-ornithine). Na této půdě lze zjišťovat pohyblivost, tvorbu ornithindekarboxylasy a indolu.

1.4.3.6.6 Půdy k průkazu dekarboxylace lysinu a tvorby sirovodíku

Tyto půdy se používají pro zachycení enterobakterií. Na půdu obsahující lysin a sole železa se doporučuje naočkovat všechny podezřelé černé kolonie. Půda je šikmo nalitá a obsahuje zmíněný 1% lysin, glukosu, citrát želežitoamonný, thiosulfát a bromkreselový purpur. Očkuje se po šikmé ploše a vpichem.

I tyto půdy reagují na kyselé prostředí zežloutnutím, hlavně v plném sloupci, kde dochází ke kvašení glukosy. Bakterie, které lysin oxidativně desaminují, tvoří kyselinu α -ketokarboxylovou, která následně reaguje se solemi železa a s kyslíkem na povrchu média. Výsledkem této reakce je červenohnědé zbarvení šikmé části půdy. K průkazu tvorby sirovodíku slouží thiosulfát sodný a citrát železitoamonný, což se projeví zčernáním půdy.

Moderní modifikací této půdy je polotuhé LDS-médium dle Costina. Rozdíl od předchozí půdy je ve větším množství thiosulfátu a bromkresolového purpuru a je přidáno dvojmocné železo ve formě síranu železnatamonného. Dalším rozdílem je nízké pH 5,6. Půda se nalévá do zkumavek jako 5 cm vysoký sloupec. Očkuje se vpichem, který je veden až ke dnu zkumavky a převrství se parafinovým olejem.

Vzhledem k nízkému pH rostou na této půdě enterobakterie pomalu. Lysin je dekarboxylován lysinpozitivními kmeny na zásaditý kadaverin a tím se půda neutralizuje. Zvýší se pH a tím dojde ke zlepšení podmínek pro růst bakterií a půda se zbarví ze žluté do fialova. Enterobakterie jsou však lysinnegativní bakteri, pH se tedy nemění a půda zůstává žlutá. Při tvorbě sirovodíku vzniká černé zbarvení v místě vpichu (24).

1.4.3.7 Komerčně vyráběné biochemické testy

Dnes se již zcela běžně používají komerčně vyráběné soupravy určené k biochemickým testům.

1.4.3.7.1 ENTEROtest

Souprava ENTEROtest je vyráběna firmou Lachema. Test je určen pro rutinní identifikaci důležitých mikrobů z čeledi *Enterobacteriaceae*. Testy se provádějí v jamkách mikrotitrační destičky. Jamky obsahují dehydratovaná diagnostická media, ke kterým se přidá připravená bakteriální suspenze z čistých bakteriálních kolonií. Po inkubaci (24h/37°C) je potřeba některé jamky zakápnout činidly. Identifikaci je možné doplnit o další testy, které jsou dodávány ve formě diagnostických proužků. Diagnostické proužky nejsou dodávány s ENTEROtestem.

Při odečítání se odečítající orientuje podle barevné škály nebo podle tabulky s interpretovanými reakcemi. Výšle reakce se zapisují do formuláře. Vyhodnocení výsledků se provádí pomocí diagnostického seznamu nebo identifikačního programu TNW (7).

Obrázek č. 3: Barevná škála pro vyhodnocení ENTEROtestu 16

ENTEROtest 16

Barevná škála / Farebná stupnica / Colour scale / Цветная шкала / Porównawcza skala barw / Színskála / Farbskala / Escala de colores

1	H H ₂ S	G LYS	F IND	E ORN	D URE	C PHE	B ESL	A SCI
(+)								
(-)								

2	H MAL	G INO	F ADO	E CEL	D SUC	C SOR	B TRE	A MAN
(+)								
(-)								

	OXItest
(+)	
(-)	

	ONPtest
(+)	
(-)	

MIKROTEST®

BLUE POINT OF QUALITY

Zdroj: Soukromá mikrobiologická laboratoř RNDr. Aleny Veselské v Ústí nad Labem

1.4.3.7.2 Api test

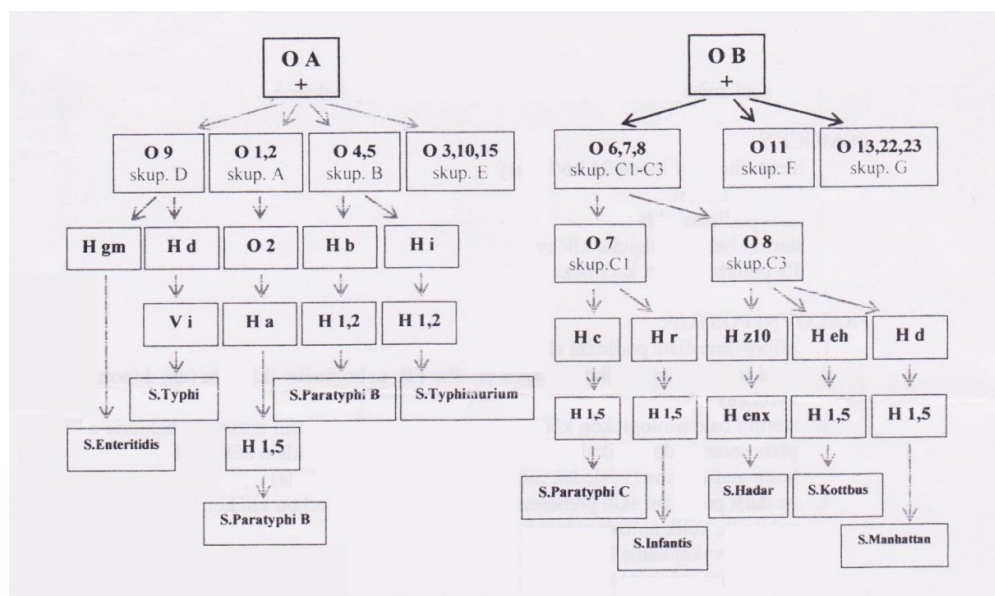
Souprava je vyráběna firmou Biomerieux. Test funguje na stejném principu jako ENTEROtest. Rozdíl je, že reakce neprobíhají v jamkách, ale v tak zvaných kapsičkách (14).

1.4.4 Antigenní analýza

Antigenní analýza je metoda serologická, která slouží k bližšímu určení sérotypu nebo druhu bakterie. Jedná se o přímý průkaz bakterií pomocí specifických antisér. K testu je potřeba čistá bakteriální suspenze (čisté kolonie resuspendované ve fyziologickém roztoku). Bakteriální suspenze se kápne na podložní sklíčko a přidá se potřebné antisérum. Pokud antigen bakterie reaguje s antisérem, výsledkem je viditelná aglutinace. Antiséra by měla být použita v logickém pořadí (viz. schéma) (16).

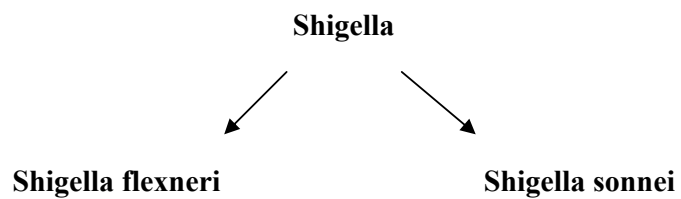
1.4.4.1 Dourčení rodu *Salmonella*

Obrázek č. 4: Schéma pro dourčení rodu *Salmonella*

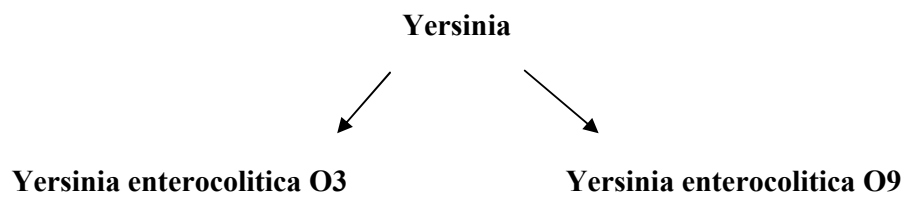


Zdroj: Soukromá mikrobiologická laboratoř RNDr. Aleny Veselské v Ústí nad Labem

1.4.4.2 Dourčení rodu Shigella



1.4.4.3 Dourčení rodu Yersinia



1.4.5 Stanovení citlivosti na antibiotika

Antibiotické zkoušky slouží k zjištění citlivosti bakterií k určitým antibiotickým látkám a také ke stanovení účinnosti antimikrobiálních látek k vyšetřovanému mikrobu, což je důležité pro léčbu antibiotiky.

1.4.5.1 Půdy ke stanovení citlivosti na antibiotika

Ke stanovení citlivosti na antibiotika existuje několik půd. Například DST-agar, Sensitest agar, Iso-Sensitest agar však nejpoužívanější je Muellerův-Hintonové agar.

Muellerův-Hintonové agar

MH-agar se dnes používá jako běžná půda k testování citlivosti na antibiotika. Půda obsahuje agar, hovězí infúzi, kyselý kaseinový hydrolyzát a škrob, který se přidává jako ochrana proti toxickým látkám. K testování růstově náročnějších bakterií je možnost přidat do půdy příměs koňské krve.

Dnes se při výrobě již standardně do půdy přidává určité množství Ca^{2+} , Mg^{2+} , tymidinu a thyminu pro lepší difúzní schopnost agaru a lepší reprodukovatelnost výsledků (24).

1.4.5.2 Testy ke stanovení citlivosti na antibiotika

Důležitou součástí laboratorních testů je stanovení citlivosti bakterií na antibiotika (10).

1.4.5.2.1 Kvalitativní testy

U kvalitativních testů se zcela rutině používá tak zvaný diskový difúzní test. Antibiotické disky musí mít přesně stanovenou koncentraci antimikrobiální látky, aby bylo možné přesně určit, zda bakterie je k dané látce citlivá nebo rezistentní (26).

„Výběr a sestavy disků pro jednotlivé druhy či skupiny bakterií jsou doporučovány a aktualizovány Pracovní skupinou pro monitorování rezistence při Národní referenční laboratoři pro antibiotika, sestavující vesměs z vedoucích pracovníků antibiotických středisek z celé České republiky.“³

Při přípravě inokula je potřeba dbát na správnou hustotu, která by měla odpovídat stupnici 0,5 až 1 zákalového standardu dle McFarlanda. K vytvoření suspenze se používá fyziologický roztok.

Očkování lze provést dvěma způsoby. Přelití plotny suspenzí a následné odstranění přebytečné suspenze nebo roztěr bakteriální suspenze v několika směrech pomocí sterilního vatového tamponu. Po zaschnutí plotny se nanáší maximálně 6 disků o velikosti 90 mm. Difúze antibiotik do agarů začíná ihned, proto se disky nesmí již přemísťovat.

Petriho misky se pokládají dnem vzhůru, aby případná kondenzovaná voda nezhodnotila výsledky. Inkubuje se 24 hodin při 37°C. Po inkubaci se změří inhibiční zóna (optimální inhibiční zóna je dána výrobcem) a podle toho se určí, zda je mikrob k danému antibiotiku citlivý nebo rezistentní.

1.4.5.2.2 Kvantitativní testy

Do kvantitativních testů pro stanovení citlivosti na antibiotika patří agarová diluční metoda a diluční mikrometoda.

Pomocí dilučních metod se zjišťuje minimální inhibiční koncentrace (MIC) daného antibiotika pro vyšetřovaný kmen. MIC se uvádí v mg/l nebo v µg/ml. Jedná se o nejnižší koncentraci antimikrobiální látky, která je ještě schopna zastavit růst bakterie testovaného kmene.

³ VOTAVA M. Lékařská mikrobiologie II. s. 74

U tohoto testu je možné testovat 12 až 14 koncentrací každého antibiotika. Standardní půdou je Mueller-Hintonův agar nebo bujon. Bakteriální suspenze o předem dané hustotě dle McFarlanda se připravuje ve fyziologickém roztoku.

1.4.5.2.1 Agarová diluční metoda

Agarová diluční metoda se provádí na agarových půdách, které obsahují určité koncentrace antimikrobiálních látek. Plotny se očkují standardním inokulem vyšetřovaného kmene. Po inkubaci se hodnotí nejmenší koncentrace antibiotika, která ještě dovede potlačit růst testovaného kmene. Na jednu plotnu je možné naočkovat 16 až 20 kmenů.

1.4.5.2.2 Diluční mikrometoda

Diluční mikrometoda se provádí v jamkách mikrotitrační destičky. Jamky obsahují Mueller-Hintonův bujon a antibakteriální látky o určitých koncentracích. Do jamek se naočkuje inokulum o předem uvedené hustotě. Nechá se inkubovat 16 až 72 hodin (dle testovaného mikroba) v termostatu.

Mikrotitrační diluční metoda je i přes některé své nedostatky v současné době nejpřesnější pro rutinní stanovení citlivosti na antibiotika.

1.4.5.2.3 Kombinované testy

U kombinovaných testů se využívá principů difúzního testu a dilučních metod. Jde o komerčně vyráběný test zvaný Etest.

Jde o plastický proužek, který je asi 5 cm dlouhý a 5 mm široký. Je jedné straně se nachází antimikrobiální látka v různých koncentracích a na druhé straně stupnice

odpovídající koncentracím daného antibiotika. Na proužku se obvykle nachází 15 různých koncentrací. Proužek se položí na naočkovanou plotnu, tak aby antibiotika byly v kontaktu s půdou. Po inkubaci se hodnotí elipsa inhibovaného růstu kolem proužku. Hodnotí se ta koncentrace, kde elipsa inhibice protíná okraj proužku (26).

1.4.6 Další metody

Další možností průkazu bakteriálních střevních patogenů je stanovení protilátek z krve pacienta. Serologické metody jsou rychlejší než kultivace, přesto bylo zjištěno, že vyšetření protilátek není zcela spolehlivé. K vytvoření protilátek dochází až odstupem času zatím co kultivační metodou se přítomnost patogena dá prokázat ihned (12). Používanou metodou pro stanovení protilátek proti některým bakteriálním střevním patogenům je Widalova reakce.

1.4.6.1 Widalova reakce

Widalova reakce je metoda určená pro průkaz protilátek. Metoda se používá při břišním tyfu, paratyfu a jiných salmonelózách. Také se používá při detekci specifických protilátek proti *Yersinia enterocolitica*. Pokud je v séru přítomna protilátka proti antigenům dané bakterie dojde k reakci mezi antigenem a protilátkou, to se projeví aglutinací. Cílem této metody je determinovat titr séra, ve kterém je stále ještě jasně viditelná aglutinace. Test je nutné opakovat po několika dnech, aby se zachytila případná dynamika tvorby protilátek. Test se provádí buď ve zkumavce nebo v jamkách mikrotitrační destičky.

U salmonel se v séru pacienta vyšetřují protilátky proti tělovým a bičíkovým antigenům. Podle použitých diagnostických antigenů se rozděluje aglutinace na O a H (O-antigen je tělový antigen a H-antigen je bičíkový). U yersinií se používají antigeny sérovaru O3, O5, O6 nebo O9 (16, 28).

2 Cíl práce

Pro moji bakalářskou práci jsem si zvolila cíle:

- osvojení literatury o bakteriálních původcích střevních obtíží u dospělých lidí v České republice
- zpracování výtěrů z konečníku pomocí kultivačních průkazů a následné použití biochemických testů
- využití metod pro přímý průkaz antigenů
- stanovení citlivosti na antibiotika
- zpracování a vyhodnocení výsledků
- diskuze výsledků práce ve srovnání s literárními údaji

3 Metodika

Svou práci jsem dělala v Soukromé mikrobiologické laboratoři RNDr. Aleny Veselské v Ústí nad Labem (SML). Laboratoř je akreditovaná. Osvědčení o akreditaci vydal Český institut pro akreditaci, o.p.s. na základě posouzení splnění akreditačních požadavků podle ČSN EN 15189:2007.

Materiál je do laboratoře svážen od lékařů praktických, dětských i specializovaných z Ústí nad Labem, Teplic a Děčína. Pro moji práci jsem použila výtěry z konečníků. Při práci jsem postupovala podle standardních postupů Soukromé mikrobiologické laboratoře RNDr. Aleny Veselské.

Příchozí materiál by měl být řádně označen a žádanka vyplněna potřebnými údaji (jméno, příjmení, rodné číslo, zdravotní pojišťovna, diagnóza, datum odběru, požadavky, lékař). Během práce je potřeba vše důkladně číslovat, aby nedošlo k záměně vzorků. Průběžné i konečné výsledky se zapisují do počítače. Konečný tištěný výsledek je odeslán lékaři.

3.1 Zpracování materiálu

- ke zpracování výtěru z konečníku jsme použila kultivační půdy:
 - MacConkey půda
 - Salmonella-Shigella agar
 - půda CIN
 - médium dle Karmaliho
- tampónem (výtěr z konečníku) jsem inokulovala připravené půdy, které jsem následně rozočkovala
- tampón jsem zalomila do pomnožovací selenitové půdy

- půdy jsem nechala inkubovat
 - MacConkey půda - 24h/37 °C
 - Salmonella-Shigella agar - 48h/37°C
 - půda CIN - 48h při laboratorní teplotě
 - médium dle Karmaliho - 48h/42 °C, při snížené tenzi kyslíku
 - Selenitová půda - 24h/37 °C

- po inkubaci jsem selenitovou půdu rozočkovala na URI a nechala inkubovat 24h/37 °C

URI select aga je kultivační půda určená pro izolaci a předběžnou identifikaci bakterií spojovaných s infekcí močového traktu (22). V soukromé laboratoři se však URI agar osvědčil i při kultivaci bakteriálních střevních patogenů. Proto se tato půda v laboratoři rutině používá při izolaci střevních mikrobů.

- po inkubaci kultivačních půd jsem podezřelé kolonie izolovala na URI a nechala inkubovat 24h/37 °C (odečet provádí vysokoškolský pracovník)

3.1.1 Další postup při podezření na rod Salmonella

K další práci je potřeba čistých kolonií, pokud jsem čisté kolonie neměla, musela jsem znovu provést izolaci na URI.

3.1.1.1 Biochemické testy

- k biochemickým testům jsem použila komerční soupravu ENTEROtest 16 od firmy Lachema

- ve fyziologickém roztoku jsem si připravila bakteriální suspenzi odpovídající 1. stupni McFarlandovy zákalové stupnice
- suspenzi jsem důkladně homogenizovala
- připravila jsem příslušný počet stripů z ENTEROtestu 16 (k jednomu testu jsou potřeba 2 stripy, tedy 16 jamek)
- do každé jamky jsem nepipetovala 0,1 ml bakteriální suspenze
- k testům na sirovodík, lysin, indol, ornithin, ureasa jsme přidala 2 kapky sterilního parafinového oleje
- destičku se stripy jsem zavřela víčkem a vložila do sáčku, aby nedošlo k vyschnutí inokula
- do zbytku suspenze ve zkumavce jsem vložila diagnostický proužek pro detekci hydrolýzy (ONPtest)
- ENTEROtest i zkumavku s ONPtestem jsem dala inkubovat na 24h/37°C
- po inkubaci jsem přidala po jedné kapce činidla pro indol a činidlo pro fenylalanin
- hodnocení ENTEROtestu provádí vysokoškolák podle diagnostického seznamu nebo identifikačního programu TNW

3.1.1.2 Aglutinační analýza

- na podložní sklíčko jsem nakapala bakteriální suspenzi připravenou ve fyziologickém roztoku a vedle antisérum
- suspenzi a antisérum jsem smíchala bakteriologickou kličkou
- kývavými pohyby sklíčkem jsem pozorovala případný vznik aglutinace
- antiséra jsem kapala podle schématu (viz výše)
- tuto práci jinak v SML provádí vysokoškolák

3.1.1.3 Stanovení citlivosti na antibiotika

- připravila jsem si ve fyziologickém roztoku bakteriální suspenzi odpovídající 0,5 stupni McFarlandovy zákalové stupnice
- sterilním tampónem jsem suspenzi masivně a ve 3 směrech naočkovala na Muellerův-Hintonové agar
- nechala jsem plotnu zaschnout a narazila dané antibiotika
- plotnu jsem dala inkubovat na 24h/37°C
- citlivost na antibiotika odečítá vysokoškolák na přístroji Visor

3.1.2 Další postup při podezření na rod *Shigella*

K další práci je potřeba čistých kolonií, pokud jsem čisté kolonie neměla, musela jsem znovu provést izolaci na URI.

3.1.2.1 Biochemické testy

- k biochemickým testům jsem použila komerční soupravu ENTEROtest 16 od firmy Lachema
- postup viz výše

3.1.2.2 Aglutinační analýza

- postup viz výše
- antiséra jsem kapala podle výše uvedeného schématu

- tuto práci jinak v SML provádí vysokoškolák

3.1.2.3 Stanovení citlivosti na antibiotika

- postup viz výše
- citlivost na antibiotika odečítá vysokoškolák

3.1.3 Další postup při podezření na rod *Yersinia*

K další práci je potřeba čistých kolonií, pokud jsem čisté kolonie neměla, musela jsem znovu provést izolaci na URI.

3.1.3.1 Biochemické testy

- k biochemickým testům jsem použila komerční soupravu ENTEROtest 16 od firmy Lachema
- postup viz výše

3.1.3.2 Aglutinační analýza

- postup viz výše
- antiséra jsem kapala podle výše uvedeného schématu
- tuto práci jinak v SML provádí vysokoškolák

3.1.3.3 Stanovení citlivosti na antibiotika

- postup viz výše
- citlivost na antibiotika odečítá vysokoškolák

3.1.4 Další postup při podezření na rod *Campylobacter*

3.1.4.1 Biochemické testy

- test na katalázu
 - na podložní sklíčko jsem nakápla kapku 3% peroxidu vodíku a přidala čistou kolonii
 - pozitivní výsledek – přítomnost bublinek
- test na oxidázu
 - zkoumanou kolonii jsem obtiskla na testovací proužek od firmy Lachema
 - pozitivní výsledek - zmodrání proužku
- test na hydrolýzu hippurátu
 - použila jsem komerční test nazývaný HIPPURÁTtest, test obsahuje testovací proužek
 - ve fyziologickém roztoku jsem si připravila bakteriální suspenzi odpovídající 2. stupni McFarlandovy zákalové stupnice
 - testovací proužek jsem vložila do zkumavky (testovací část proužku musí být celá ponořená v suspenzi) a dala inkubovat na 24h/37°C
 - po inkubaci jsem do zkumavky přidala 4 kapky ninhydrinového činidla (součást komerční soupravy)
 - pozitivní výsledek – modrý až modrofialový prstenec

3.1.4.2 Preparát

- na podložní sklíčko jsem kápala kapku fyziologického roztoku a přidala potřebné množství zkoumané bakterie
- bakteriální suspenzi jsem nechala na sklíčku uschnout a následně fixovala preparát protažením podložního skla plamenem kahanu
- preparát jsem obarvila dle Grama
 - krystalová violet – 20 sekund
 - Lugolův roztok – 20 sekund
 - oplach vodou
 - odbarvení alkoholem – 20 až 30 sekund
 - oplach vodou
 - dobarvení zředěným karbolfuchsinem
 - 30 až 60 sekund
 - oplach vodou
- preparát jsem prohlídla v mikroskopu při zvětšení 1000x za použití imerze (odečítá vysokoškolák)

4 Výsledky

Zpracování výtěrů z konečníku v Soukromé mikrobiologické laboratoři RNDr. Aleny Veselské v Ústí nad Labem (SML) jsem sledovala za období říjen 2012 až březen 2013. V daném období bylo zpracováno celkem 761 výtěrů dospělých osoby. U pozitivních nálezů jsem se zaměřila na bakterie rodu *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, *Campylobacter*. Po každém měsíci jsem vyhodnotila počet záchytů těchto bakterií. Výsledky jsem srovnala s výsledky SML za období duben 2012 až září 2012. Také jsem pracovala s počty pozitivních nálezů v Ústeckém kraji a v České republice. Tyto hodnoty jsem získala ze zpráv Centra epidemiologie a mikrobiologie Státního zdravotního ústavu v Praze (CEM SZÚ v Praze). Srovnala jsem i počty pozitivních nálezů v České republice od roku 2003 až 2012.

Tabulka č. 1: Počet záchytů u dospělých osob za období říjen 2012 až březen 2013 v SML

říjen-březen	Celkem
Salmonella Enteritidis	3
Salmonella sk. C3	1
Shigella flexneri	1
Yersinia enterocolitica O3	1
Campylobacter jejuni	15

Zdroj: vlastní

Poznámka: V tabulce č. 1 jsou bakterie rozděleny podle úplné identifikace.

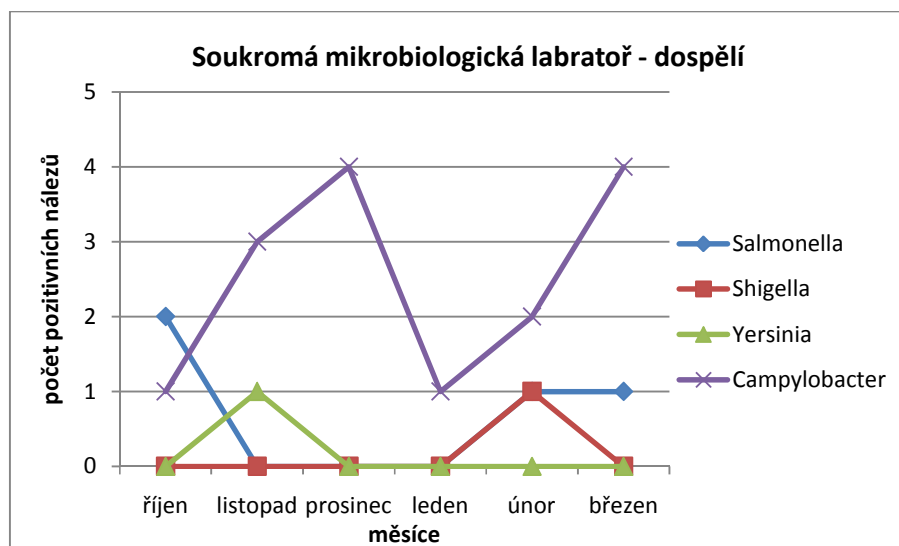
Tabulka č. 2: Počet záchytů u dospělých osob za období říjen 2012 až březen 2013 v SML

SML	říjen	listopad	prosinec	leden	únor	březen
Salmonella	2	0	0	0	1	1
Shigella	0	0	0	0	1	0
Yersinia	0	1	0	0	0	0
Campylobacter	1	3	4	1	2	4

Zdroj: vlastní

Poznámka: Rozdělení bakterií podle rodu.

Graf č. 1: Počet záchytů u dospělých osob za období říjen 2012 až březen 2013 v SML

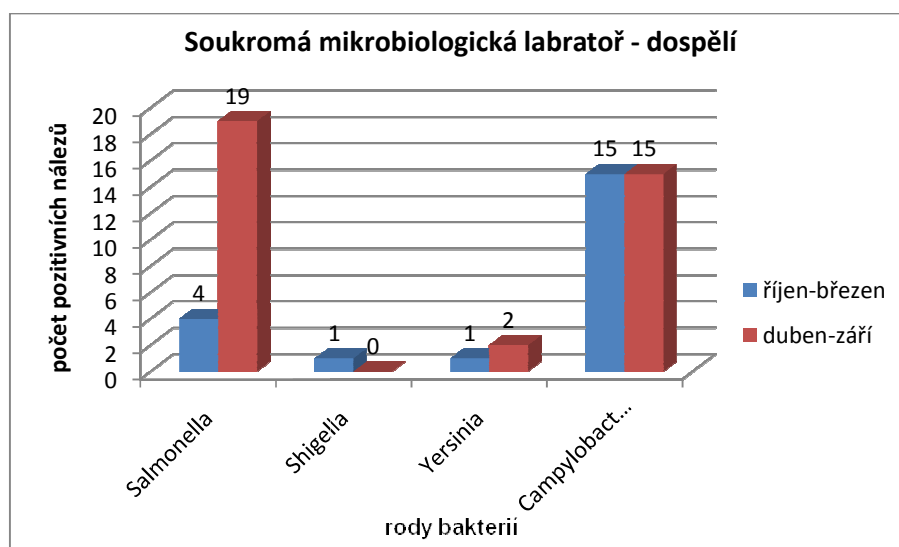


Tabulka č. 3: Počet záchytů u dospělých osob za období říjen 2012 až březen 2013 a duben 2012 až září 2012 v SML

celkem	říjen-březen	duben-září
Salmonella	4	19
Shigella	1	0
Yersinia	1	2
Campylobacter	15	15

Zdroj: Soukromá mikrobiologická laboratoř RNDr. Aleny Veselské v Ústí nad Labem

Graf č. 2: Počet záchytů u dospělých osob za období říjen 2012 až březen 2013 a duben 2012 až září 2012 v SML



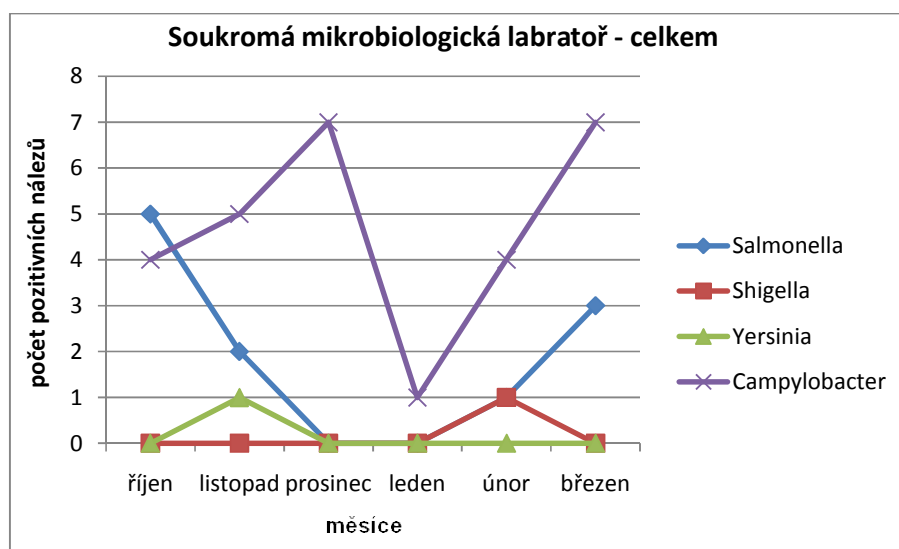
Tabulka č. 4: Celkový počet záchytů za období říjen 2012 až březen 2013 v SML

SML	říjen	listopad	prosinec	leden	únor	březen	celkem
Salmonella	5	2	0	0	1	3	11
Shigella	0	0	0	0	1	0	1
Yersinia	0	1	0	0	0	0	1
Campylobacter	4	5	7	1	4	7	28

Zdroj: Soukromá mikrobiologická laboratoř RNDr. Aleny Veselské v Ústí nad Labem

Poznámka: Jelikož SZÚ zveřejňuje výsledky celkové (bez rozdělení věku) provedla jsem pro přesnější srovnání celkový souhrn záchytů v SML.

Graf č. 3: Celkový počet záchytů za období říjen 2012 až březen 2013 v SML



Tabulka č. 5: Celkový počet záchytů za období říjen 2012 až únor 2013 v Ústeckém kraji

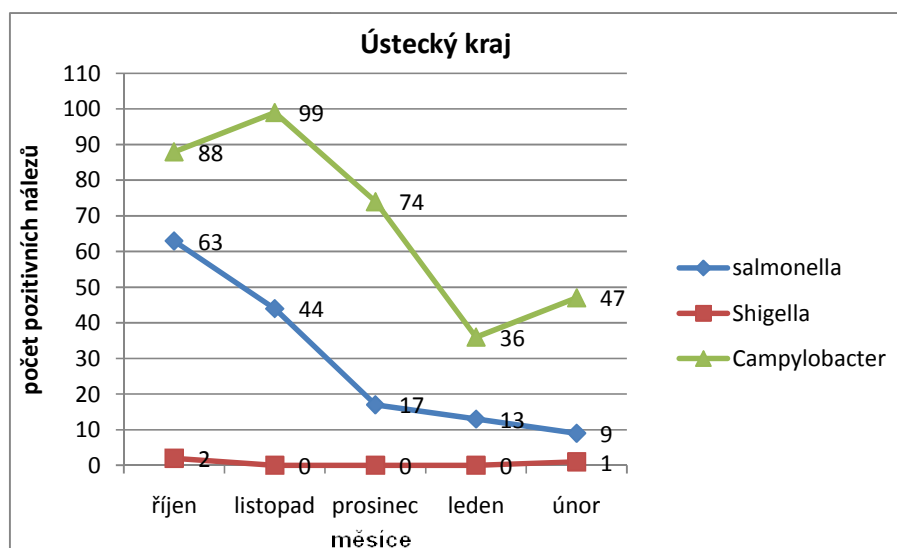
Ústecký kraj	říjen	listopad	prosinec	leden	únor	celkem
salmonella	63	44	17	13	9	146
Shigella	2	0	0	0	1	3
Campylobacter	88	99	74	36	47	344

Zdroj: Zprávy Centra epidemiologie a mikrobiologie Státního zdravotního ústavu v Praze.

Poznámka: Ve zprávě CEM SZÚ v Praze nebyly bakterie rodu *Yersinia* zvlášť uvedeny, ale byly zařazeny do ostatních střevních infekcí proto, jsem s těmi to daty již dále nepracovala.

Porovnávala jsem pouze údaje k datům za období říjen 2012 až únor 2013. Za období březen 2013, v době zpracování bakalářské práce, nebyly vydány výsledky CEM SZÚ v Praze.

Graf č. 4: Celkový počet záchytů za období říjen 2012 až únor 2013 v Ústeckém kraji

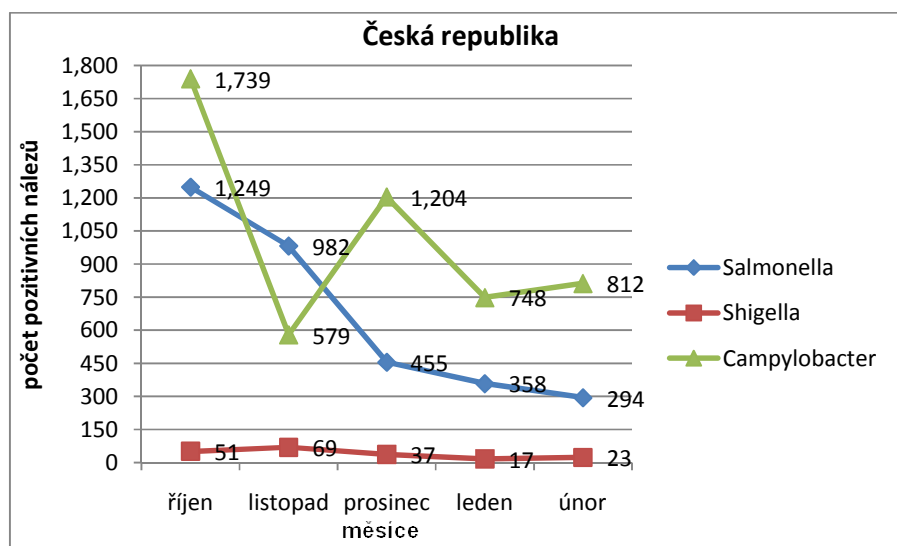


Tabulka č. 6: Celkový počet záchytů za období říjen 2012 až únor 2013 v České republice

ČR	říjen	listopad	prosinec	leden	únor	celkem
Salmonella	1 249	982	455	358	294	3 338
Shigella	51	69	37	17	23	197
Campylobacter	1 739	579	1 204	748	812	5 082

Zdroj: Zprávy Centra epidemiologie a mikrobiologie Státního zdravotního ústavu v Praze

Graf č. 5: Celkový počet záchytů za období říjen 2012 až únor 2013 v České republice

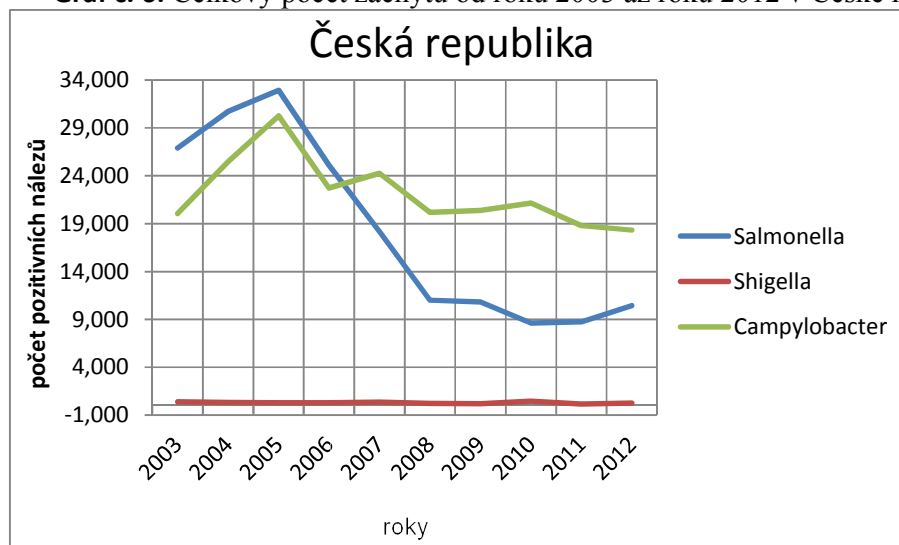


Tabulka č. 7: Celkový počet záchytů od roku 2003 až roku 2012 v České republice

ČR	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012
Salmonella	26 899	30 724	32 927	25 102	18 204	11 009	10 805	8 622	8 752	10 445
Shigella	381	325	278	289	349	229	178	450	164	264
Campylobacter	20 063	25 492	30 268	22 713	24 254	20 175	20 371	21 164	18 811	18 334

Zdroj: Zprávy Centra epidemiologie a mikrobiologie Státního zdravotního ústavu v Praze

Graf č. 6: Celkový počet záchytů od roku 2003 až roku 2012 v České republice



5 Diskuze

Ve své práci jsem se zabývala nejčastěji se vyskytujícími bakteriálními původci střevních obtíží u dospělých lidí v České republice. Konkrétně se jedná o rody *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia* a *Campylobacter*. Sledovala jsem počty záchytů těchto bakterií za období říjen 2012 až březen 2013 v Soukromé mikrobiologické laboratoři RNDr. Aleny Veselské v Ústí nad Labem (SML). Během tohoto období bylo v SML zpracováno 761 výtěrů z konečníku a z toho bylo 21 vzorků pozitivních na bakterie mnou sledované. Pracovala jsem s výsledky z laboratoře, kde není tolik materiálu jako je třeba v krajských nemocnicích. Výsledky sledovaného období jsem porovnávala s výsledky z předešlých měsíců duben 2012 až září 2012 získané v SML.

Zaznamenala jsem počet sledovaných bakterií podle druhového zařazení. Dále jsem však pracovala s počty bakterií, které jsem rozdělila jen podle rodového označení. Při zpracování výsledků výskytů ze zpráv CEM SZÚ v Praze mnou sledovaných bakterií v Ústeckém kraji a České republice jsem uvedla výsledky, kde v počtu pozitivních nálezů jsou zahrnuty jak dospělé osoby tak i děti, jelikož uváděné údaje nejsou rozlišeny dle věku populace. Výsledky, které jsem čerpala ze zpráv CEM SZÚ v Praze pro svou práci byly uvedeny jen podle rodu bakterií.

V tabulce č. 1 jsou uvedeny počty pozitivních nálezů v SML za období říjen 2012 až březen 2013. Bakterie jsou rozděleny do druhů. Největší četnost výskytu za dané období je u skupiny bakterie *Campylobacter jejuni*, tj. celkem 15 výskytů. Druhý nejčetnější výskyt bakterie v počtu 3 je *Salmonella Enteritidis*. Ostatní sledované výskyty bakterií jsou se shodným počtem výskytů ve sledovaném období, tj. po jednom výskytu. Jmenovitě se jedná o výskyty bakterií *Salmonella* sk.C3, *Shigella flexneri*, *Yersinia enterocolitica* O3.

V tabulce č. 2 je uvedeno rozdělení podle rodů bakterií u dospělých osob ve sledovaném období. Nejčetnější výskyt bakterií je zaznamenán u rodu *Campylobacter* a to v počtu 15 výskytů. Druhý identifikovaným rodem je *Salmonella* v počtu výskytů 4. Další v pořadí jsou rody *Shigella* a *Yersinia* s celkově shodným počtem výskytu, tj. po jednom výskytu v daném období. Pokud vyhodnotím počty

pozitivních nálezů ve sledovaném období, tak nejvíce pozitivních záchytů je v měsíci březnu 2013 a to v počtu 5 bez rozlišení rodu bakterie. S ohledem na rod patogenní bakterie je nejčastější výskyt bakterií rodu *Campylobacter* a to v prosinci 2012 a březnu 2013 se shodným počtem 4. Z uváděných výsledků dále plyne, že nejméně vyskytující se střevním patogenem ve sledovaném období byla shigela a yersinie v počtu výskytnů 1.

Při porovnávání dvou období (tabulka č. 3) říjen 2012 až březen 2013 proti období duben 2012 až září 2012, je nejčastější výskyt v SML bakterií rodu *Salmonella* v počtu výskytnů 19 v období duben až září 2012. Jde tedy o značný rozdíl v počtu záchytů při porovnání obou období. Bakterie rodu *Campylobacter* mají v obou sledovaných období shodný počet výskytnů. Nejmenší četnost výskytnů je zaznamenán u bakterií rodu *Shigella* ve sledovaném období.

Větší počet nákaz v letních měsících je dán především tím, že potraviny (maso, vejce, potraviny vejce obsahující) jsou špatně uchovávány. Teplota pro bezpečné uchování těchto potravin je 2 až 8°C, což zřejmě nebývá v teplých dnech dodržováno. Proto dojde k pomnožení bakterií v potravinách. Člověk pozře potřebnou dávku bakterií k vyvolání onemocnění. Dalším důvodem je grilování v letních měsících. Grilováním není vždy maso dostatečně tepelně upraveno. Dalším rizikem je snížená hygiena v letních měsících, lidé se pochybují více venku. Také se využívá více rychlého občerstvení, kde opět nemusí být potraviny dobře uchovány a zpracovány.

Porovnala jsem, zda pořadí bakterií podle záchytu v SML souhlasí se záchytem v Ústeckém kraji a České republice. Pro úplné srovnání jsem musela dále pracovat s celkovými počty pozitivních nálezů mnou řešených bakterií (dospělí i děti) (tabulka č. 4), jelikož SZÚ v Praze zveřejňuje celkové výsledky bez rozdílu věku. Nejpočetnější záchyt v SML v období říjen 2012 až březen 2013 byl rodu *Campylobacter* v počtu 28 nálezů. Rod *Salmonella* byl zachycen za dané období jedenákrát a rod *Shigella* a *Yersinia* jen jednou.

V tabulce č.5 je uvedeno porovnání celkově zachycených salmonel, shigel a kampylobakterů za období říjen 2012 až únor 2013 v Ústeckém kraji. Ve zprávě CEM SZÚ v Praze nebyly bakterie rodu *Yersinia* zvlášť uvedeny, ale byly zařazeny

do ostatních střevních infekcí proto, jsem s těmi to daty již dále nepracovala. Porovnávala jsem pouze údaje k datům za období říjen 2012 až únor 2013. Za období březen 2013, v době zpracování bakalářské práce, nebyly vydány výsledky ve zprávě CEM SZÚ v Praze. Nejčtenější výskyt jsem zaznamenala u bakterií rodu *Campylobacter*. Nejnížší výskyt je zaznamenán u bakterií rodu *Shigella*.

V rámci České republiky je výskyt bakterií rodu *Salmonella*, *Shigella* a *Campylobacter* za období říjen 2012 až únor 2013 uveden v tabulce č.6. Z porovnávaných výsledků je zřejmé, že největší výskyt je zaznamenán u bakterií rodu *Campylobacter* a nejnižší výskyt u bakterií rodu *Shigella*.

Z výsledků vyplývá shoda v pořadí pozitivních nálezů a to jak v SML, v Ústeckém kraji i v rámci celé České republiky. Nejčastější zachycenou bakterií jsou bakterie rodu *Campylobacter*. Na druhém místě je rod *Salmonella*. Rod *Shigella* se oproti dvěma jmenovaným patogenům objevuje poměrně sporadicky.

V tabulce č.7 jsem uvedla shrnutí v rámci České republiky za období let 2003 až 2012. Ve sledovaném období jsem opět porovnávala četnost výskytů u bakterií rodu *Salmonella*, *Shigella* a *Campylobacter*. Z výsledků vyplývá, že nejčastějším hlášeným bakteriálním střevním patogenem od roku 2003 až 2006 v České republice byl rod *Salmonella*. Následuje mikrob rodu *Campylobacter*. Situace se změnila v roce 2007, kdy rod *Campylobacter* se v počtu záchytů v České republice dostal na první místo. Když porovnáme výsledky od roku 2003 až 2012, tak nejvíce evidovaných pozitivních nálezů bylo v roce 2005 a to jak u bakterií rodu *Salmonella* tak rodu *Campylobacter*. V letech 2006 až 2010 u bakterií rodu *Salmonella* jsem zaznamenala klesající trend výskytu, ale od roku 2011 nastal opět trend vzrůstající. Pokud jde o bakterie rodu *Shigella* nejméně pozitivních nálezů bylo v roce 2011 a naopak nejvyšší v roce 2003 z toho vyplývá, že záchyt bakterií rodu *Shigella* má klesající tendenci.

Jak jsem již zmínila, od roku 2007 se v počtu záchytů na první místo dostal rod *Campylobacter* před rod *Salmonella*. Pravděpodobně je dáno tím, že mezi laickou veřejností se čím dál tím více dostává pojem salmonelóza. Lidé si tak dávají větší pozor na rizikové potraviny, hlavně na ty vaječné. Dodržují více jejich vhodné uchovávání a zpracování. Zatím co pojem kampylobakter není u laické veřejnosti tak známý a lidem

nedochází, že špatně zpracované kuřecí maso je možným zdrojem bakterií rodu *Campylobacter*. Pravděpodobně konzumace kuřecího masa vzrůstá. Větší záchyt rodu *Campylobacter* může být také dán tím, že došlo ke zlepšení jeho diagnostiky.

Ve své práci popisují možnosti diagnostiky bakteriálních střevních patogenů jak jsem se s nimi seznámila v citované literatuře a dále popisují zpracování stolice na bakteriální patogeny tak jak jsou prováděny v SML, kde jsem prováděla svou praxi.

V současné době je k dispozici celá řada moderních metod, které diagnostiku zlepšují, zrychlují či usnadňují. Například přístroj VITEK 2 od firmy bioMérieux práci jednoznačně urychluje a zlehčuje. Jedná se o integrovaný systém, který umožňuje přípravu vzorků, naočkování identifikačních karet, jejich inkubaci a vyhodnocení. Přístroj VITEK 2 je vhodný pro rychlou a přesnou identifikaci bakterií. Přístroj také umí otestovat citlivost na antibiotika. Výhodou je i načtení výsledků do počítače (13). Za zmínění stojí také přístroj Maldi Biotyper od firmy Bruker Daltonics sloužící k identifikaci mikroorganismů. Metody jsou založeny na principu hmotnostní spektrometrie. Výsledkem jmenované metody je úplné určení bakterie eventuelně provedení testu citlivosti. Identifikace probíhá na bázi srovnání charakteristických ribozomálních proteinů vyšetřovaného mikroba s referenčními spektry uloženými v databázi softwaru (20). Další metodou ne však běžně používanou pro diagnostiku bakteriálních střevních patogenů je metoda PCR (polymerase chain reaction) (15). Metoda pracuje na molekulární úrovni. Je tedy možno získat velmi přesné informace o zkoumaných bakteriích.

Celosvětovou otázkou je jak nákazy snížit na minimum, jelikož stávající prevence není zcela účinná a terapie je drahá. Snad by alespoň částečně pomohla větší informovanost veřejnosti. Veřejnost by se mohla informovat o této problematice například skrze letáčky, které by byli dostupné například v čekárnách lékařů. Možná by byla v tomto případě radikálním řešením účinná vakcinace. Však tato oblast je stále ve fázi výzkumu (17).

6 Závěr

Téma nejčastější bakteriální původci střevních onemocnění je již dlouhá léta řešenou problematikou, kterou se zabývá celá řada odborníků. Vznikají stále nové a lepší postupy, metody a přístroje pro laboratorní diagnostiku střevních bakteriálních patogenů. Důležitou součástí této problematiky je prevence, která stále není plně dostačující.

Během zpracovávání své bakalářské práce jsem si rozšířila své znalosti o bakteriálních původcích zodpovědných za infekční střevní onemocnění, to jak po stránce teoretické tak praktické. Poznala jsem, že výsledek se odvíjí již od správně provedeného odběru, rychlého transportu do laboratoře, následně správného zpracování a nutnosti dodržení kultivačních podmínek, teplot, doby inkubace nezbytné pro jednotlivé bakterie. Důležitý je především zodpovědný přístup ke každému vzorku a dodržení všech podmínek při práci s ním. Seznámila jsem se s metodami, které se rutinně používají v Soukromé mikrobiologické laboratoři RNDr. Aleny Veselské v Ústí nad Labem při zpracování výtěrů stolice. Během sledovaného období (říjen 2012 až březen 2013) bylo v SML zpracováno 761 výtěrů z konečníku. Z uvedeného počtu výtěrů vyšlo 21 vzorků pozitivních na bakterie mnou sledované. Výsledky z SML jsem porovnávala s výsledky ze zpráv CEM SZÚ v Praze co se týče pořadí záchytů patogenů. Shodně vyšlo, že nejčastější záchyt je u bakterií rodu *Campylobacter* a to jak v SML, Ústeckém kraji tak v České republice. Při zpracování dat získaných ze zpráv CEM SZÚ v Praze jsem zjistila, že od roku 2003 do roku 2006 byl nejčastějším bakteriálním střevním patogenem v České republice rod *Salmonella*. V pořadí druhém se nacházel mikrob rodu *Campylobacter*. Avšak od roku 2007 rod *Campylobacter* se v počtu záchytů v České republice dostal na první místo. Oproti dvěma jmenovaným bakteriím se nálezy shigel objevují poměrně sporadicky.

Při své praxi v SML jsem se také dozvěděla o potřebných formalitách při zachycení citovaných mikrobů. Všechny bakterie, kterými jsem se zabývala ve své práci, podléhají hlášení na Hygienickou stanici na epidemiologické oddělení a ošetřujícímu lékaři. O hlášení je vždy veden zápis v elektronické i písemné podobě. Pokud se nepodařilo

vykultivovaný kmen přesně identifikovat, je odeslán do mikrobiologické laboratoře Státního zdravotního ústavu v Praze. O zaslání mikroba na dourčení je také nutné vést záznam.

7 Seznam informačních zdrojů

1. BEDNÁŘ M, SOUČEK A, VÁVRA J. Lékařská speciální mikrobiologie a parazitologie. Praha: Triton, 1994. ISBN 80-901521-4-7.
2. BEDNÁŘ M, et al. Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie 1. vydání. Praha: Marvil, 1996. ISBN 80-238-0297-6.
3. Centers for Disease Control and Prevention. Preliminary FoodNet Data on the incidence of infection with pathogens transmitted commonly through food-10 states. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 58: 333-337, 2008
4. CUNNINGHAM SA, SLOAN LM, NYRE LM, VETTER EA, MANDREKAR J, PATEL R. Three-hour molecular detection of *Campylobacter*, *Salmonella*, *Yersinia*, and *Shigella* species in feces with accuracy as high as that of culture. J Clin Microbiol. 48: 2929-33, 2010
5. DÍTĚ P. Gastroenterologie. Brno: Masarykova univerzita, 2000. ISBN 80-210-2379-1.
6. DUERDEN B. The identification of gram-negative anaerobic bacilli isolated from clinical infections. J Hyg. 84: 301-313, 1980
7. ENTEROtest 16. [online]. [cit. 2013-04-25]. Dostupné z: <https://www.erbalachema.com/attachments/ENTEROtest%2016-CZ+SK+EN+RU+PL.pdf>
8. Gramovo barvení. [online]. [cit. 2013-04-25]. Dostupné z: <http://labmet.zshk.cz/vyuka/Gramovo-barveni.aspx>

9. HÜTT P, SHCHEPETOVA J, LÕIVUKENE K, KULLISAAR T, MIKELSAAR M. Antagonistic activity of probiotic lactobacilli and bifidobacteria against entero- and uropathogens. *J Appl Microbiol.* 100: 1324-1332, 2006
10. CHEN J, SUN XT, ZENG Z, YU YY. *Campylobacter* enteritis in adult patients with acute diarrhea from 2005 to 2009 in Beijing, China. *Chin Med J.* 124: 1508-1512, 2011
11. Infekce trávicího traktu. [online]. [cit. 2013-04-25]. Dostupné z: <http://old.lf3.cuni.cz/mikrobiologie/horsta/pdf/git.pdf>
12. KEDDY KH, SOOKA A, LETSOALO ME, HOYLAND G, CHAIGNAT CL, MORRISSEY AB, CRUMP JA. Sensitivity and specificity of typhoid fever rapid antibody tests for laboratory diagnosis at two sub-Saharan African sites. *Bull World Health Organ.* 89:640-647, 2011
13. O'HARA, C. M. Manual and automated instrumentation for identification of Enterobacteriaceae and other aerobic gram-negative bacilli. *Clinical Microbiology Reviews*, 147-162, 2005
14. O'HARA, C. M., RHODEN, D. L., MILLER, J. M. Reevaluation of the API 20E identification system versus conventional biochemical for identification of members of the family Enterobacteriaceae: a New look at an old product. *Journal of Clinical Microbiology*, 123-125, 1992
15. O'LEARY J, CORCORAN D, LUCEY B. Comparison of the EntericBio multiplex PCR system with routine culture for detection of bacterial enteric pathogens. *J Clin Microbiol.* 47: 3449-3453, 2009

16. Praktika. [online]. [cit. 2013-04-26]. Dostupné z:
<http://www.lf2.cuni.cz/info2lf/ustavy/ulm/praktika.htm>
17. SHARON M. TENNANT, JIN-YUAN WANG, JAMES E. GALEN,
RAPHAEL SIMON, MARCELA F. Pasetti, orit gat, and myron m. levine.
Engineering and Preclinical Evaluation of Attenuated Nontyphoidal Salmonella
Strains Serving as Live Oral Vaccines and as Reagent Strains. *Infect Immun.* 79:
4175–4185, 2011
18. SCHINDLER J. Mikrobiologie pro studenty zdravotnických oborů. Praha:
Grada, 2010. ISBN 978-80-247-3170-4.
19. STÁTNÍ ZDRAVOTNÍ ÚSTAV V PRAZE. Manuál prevence v lékařské praxi:
IV. základy prevence infekčních onemocnění. Praha: Fortuna, 1996. ISBN 80-
7168-400-7.
20. The Best Technology from the Market Leader in MALDI-TOF. [online].
[cit. 2013-04-25]. Dostupné z:
[http://www.bruker.com/products/mass-spectrometry-and-separations/maldi-
biotyper/technical-details.html](http://www.bruker.com/products/mass-spectrometry-and-separations/maldi-biotyper/technical-details.html)
21. TRANSPORT MEDIUM, AMIES W/O CHARCOAL. [online]. [cit. 2013-04-
26]. Dostupné z:
[http://www.titanmedia.in/images/upload/td/TM%20456_TRANSPORT%20ME
DIUM%20AMIES%20WITHOUT%20CHARCOAL%20TM%20456.pdf](http://www.titanmedia.in/images/upload/td/TM%20456_TRANSPORT%20MEDIUM%20AMIES%20WITHOUT%20CHARCOAL%20TM%20456.pdf)
22. URI select agar. [online]. [cit. 2013-04-26]. Dostupné z:
<http://www.labmediaservis.cz/kultivacni-media/uri-select-agar>

23. VOTAVA, M. et al. Lékařská mikrobiologie speciální. Dotisk 2006. Brno: Neptun, 2003.. ISBN 80-902896-6-5
24. VOTAVA, M. Kultivační půdy v lékařské mikrobiologii. 1. vydání. Brno: Hortus, 1999.. ISBN 80-238-5058-X
25. VOTAVA, M. Lékařská mikrobiologie obecná. 2. přepracované vydání. Brno: Neptun, 2005.. ISBN 80-86850-00-5
26. VOTAVA M, OBDRŽÁLEK V, ONDROVČÍK P, RŮŽIČKA F, ZAHRADNÍČEK O, WOZNICOVÁ V. Lékařská mikrobiologie II.: Přehled vyšetřovacích metod v lékařské mikrobiologii. Brno: Vydavatelství MU, 2000. ISBN 80-210-2272-8.
27. VOTAVA, M., ONDROVČÍK, P. Vybrané kapitoly z klinické mikrobiologie. 1. vydání. Brno: Masarykova univerzita v Brně, 1998. ISBN 80-210-1805-4.
28. *Yersinia enterocolitica* O testovací antigeny pro Widalovu reakci. [online]. [cit. 2013-04-25]. Dostupné z:
http://lm.biovendor.cz/download.php?file=S:%5CBIOVENDOR%20BVLM%20DATAB%20C1ZE%5CSIFIN%5CN%E1vody%20CZ%5CCZ%20Y.enterocolitica-O%20Test%20Antigeny.pdf&_full_path=1
29. ZAHRADNICKÝ J, et al. Mikrobiologie a epidemiologie. 1. vydání. Praha: Avicenum, 1987
30. Zprávy Centra epidemiologie a mikrobiologie. Praha: Nakladatelství zdravotnické a vědecké literatury, 2012,2013. ISSN 1804 – 8668.