

**Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
katedra biologických a lékařských věd**

**BIOCHEMICKÁ IDENTIFIKACE ENTEROBAKTERIÍ –
VÝVOJ A POROVNÁNÍ METODIK**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor práce: Martina Červenková

Vedoucí práce: Mgr. Marcela Vejsová, Ph.D.

Praha, 2010

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.

V Praze dne 28. dubna 2010

.....
Martina Červenková

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala především Mgr. Marcele Vejsové, Ph.D. za cenné rady a připomínky při vedení mé bakalářské práce, dále MUDr. prim. Janě Janečkové a Mgr. Michalu Boháčovi, Ph. D. za poskytnutí odborných příspěvků a MUDr. Martině Čurdové za všestrannou pomoc. Zároveň děkuji své rodině a přátelům za jejich trpělivost a podporu.

SEZNAM ZKRATEK

ATB	antibiotikum
CIN	půda pro kultivaci yersinií
CLED	kombinovaná diagnostická půda
DC	deoxycholát-citrátová půda
DNA	deoxyribonukleová kyselina
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EP	Endova půda
EHEC	enterohemolytická <i>Escherichia coli</i>
EIEC	enteroinvazivní <i>Escherichia coli</i>
EPEC	enteropatogenní <i>Escherichia coli</i>
ET	ENTEROtest – diagnostická souprava
ETEC	enterotoxigenní <i>Escherichia coli</i>
H₂S	sirovodík
ID	identifikace
KA	krevní agar
LIS	laboratorní informační systém
MAL	půda k záchytu salmonel
MALDI-TOF	<i>angl.</i> Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight
MC	MacConkeyho agar
MIC	minimální inhibiční citlivost
MLCB	selektivní půda pro salmonely
ONPG	test k průkazu enzymu β-galaktozidázy
spp.	<i>lat.</i> species = druh
ssp.	<i>lat.</i> subspecies = poddruh
S. typhi	<i>Salmonella Typhi</i>
SS-agar	<i>Salmonella-Shigella</i> agar
TP GN	transportní půda pro gramnegativní střevní patogeny
VP-test	Vogesův-Proskauerův test na průkaz acetoinu
WB	Wilsonova-Blairova půda pro <i>Salmonella Typhi</i>
XLD	xylóza-lyzin-deoxycholátový agar

SOUHRN

Autor: Martina Červenková

Název: Biochemická identifikace enterobakterií-vývoj a porovnání metodik

Bakalářská práce

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Studijní obor: zdravotní laborant

Cíl práce: Cílem práce je popis a průběžné porovnávání nejdůležitějších biochemických metodik sloužících k diagnostice enterobakterií. Důraz je kladen především na vývoj a pokrok mikrobiologie.

Hlavní poznatky: Biochemické testy došly ve svém vývoji postupně k automatizaci. Předností automatických systémů je manuální zjednodušení, urychlení analýzy, zvýšení citlivosti a přesnosti, malé nároky na množství a přípravu vzorku. Mezi hlavní nevýhody patří zatím neúplná databáze mikroorganismů a neschopnost vyšetření citlivosti na antibiotika.

Závěr: I přes velký rozvoj molekulárně biologických metod mají biochemické testy stále své významné místo v identifikaci enterobakterií.

ABSTRACT

Autor: Martina Červenková

Title: Biochemical identification of *Enterobacteriaceae* – development and comparison of methods.

Bachelor's thesis

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Course of study: medical laboratory technician

Objective of the thesis: The topic of the thesis is to describe and simultaneously compare the most important biochemical methods used for diagnosis of *Enterobacteriaceae*. The emphasis is put mainly on the development and progress in the field of microbiology.

Key findings: Biochemical tests are now performed mainly automatically. The advantages of the automated form of diagnosis are simplicity, speed, increased sensitivity and accuracy, and a reduced need for sample quantity. The main disadvantages are incomplete database of microorganisms and the inability to test sensitivity to all antibiotics.

Conclusion: Despite the far reaching development of molecular biological methods, biochemical tests still have an important role in the identification of *Enterobacteriaceae*.

OBSAH

SOUHRN	5
ABSTRACT.....	6
OBSAH	7
1 ÚVOD.....	9
2 HISTORIE.....	10
3 OBECNÁ CHARAKTERISTIKA ENTEROBAKTERIÍ	11
3.1 OBECNÉ VLASTNOSTI ENTEROBAKTERIÍ	11
3.1.1 <i>Morfologie</i>	11
3.1.2 <i>Fyziologické a kultivační vlastnosti</i>	11
3.1.3 <i>Biochemické vlastnosti</i>	12
3.1.4 <i>Antigenní struktura</i>	12
3.2 KLINICKÝ VÝZNAM	12
3.3 EPIDEMIOLOGIE.....	13
4 NEJVÝZNAMNĚJŠÍ ZÁSTUPCI.....	14
4.1 ROD SALMONELLA	14
4.2 ROD SHIGELLA	15
4.3 ROD YERSINIA	15
4.4 ROD ESCHERICHIA	16
4.5 OSTATNÍ DŮLEŽITÉ RODY	17
5 LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA ENTEROBAKTERIÍ	19
5.1 SPECIFIKA ODBĚRU, TRANSPORTU A UCHOVÁVÁNÍ VZORKŮ	19
5.2 KULTIVACE	20
5.2.1 <i>Kultivační půdy</i>	20
5.2.1.1 Endova půda	21
5.2.1.2 Půda MacConkeyho	21
5.2.1.3 Půda deoxycholát-citrátová.....	21
5.2.1.4 Půda XLD	22
5.2.1.5 Agar Hektoen	22
5.2.1.6 SS-agar.....	23
5.2.1.7 Půda CIN	23
5.2.1.8 Půda MLCB.....	23
5.2.1.9 Wilsonova-Blairova půda	24
5.2.1.10 Půda MAL.....	24
5.2.1.11 Chromogenní půdy.....	25
5.2.1.12 Půda selenitová	25
5.3 SÉROLOGICKÉ METODY	26
6 BLIŽŠÍ URČENÍ ENTEROBAKTERIÍ BIOCHEMICKÝMI TESTY	27
6.1 ZKUMAVKOVÉ TESTY	27
6.1.1 <i>Štěpení cukrů</i>	27
6.1.2 <i>Dekarboxylace aminokyselin</i>	28
6.1.3 <i>Redukce dusičnanů na dusitany</i>	28
6.1.4 <i>Tvorba indolu</i>	28
6.1.5 <i>Štěpení močoviny</i>	29
6.1.6 <i>Utilizace citrátu dle Simonse</i>	29
6.1.7 <i>Průkaz β-galaktosidázy</i>	30
6.1.8 <i>Průkaz tvorby acetylmethylkarbinolu (acetoinu)</i>	30
6.1.9 <i>Tvorba sirovodíku</i>	30
6.2 OSTATNÍ TESTY	31
6.2.1 <i>Cytochromoxidázový test</i>	31
6.2.2 <i>Určení pohyblivosti</i>	31
6.3 KOMBINOVANÉ DIAGNOSTICKÉ PŮDY	32
6.3.1 <i>Půda CLED</i>	32

6.3.2	<i>Hajnova půda</i>	32
6.3.3	<i>Biochemický klín</i>	33
6.4	MIKROMETODY	35
6.4.1	<i>ENTEROtest</i>	35
6.4.2	<i>MiniAPI systém</i>	36
6.5	VITEK2.....	37
7	TRENDY V DIAGNOSTICE ENTEROBAKTERIÍ	40
7.1	MALDI BIOTYPER	40
8	DISKUSE	43
9	ZÁVĚR	45
10	SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK	46
11	SEZNAM LITERATURY	47

1 ÚVOD

Mikrobiologie je nepostradatelnou součástí medicíny. Tento vědní obor se velmi významně podílí na diagnostice a léčbě mnoha různých onemocnění. Během svého vývoje nám poskytla mikrobiologie návod, jak původce nemoci identifikovat a stanovit odpovídající léčbu.

Důležitým postupem při léčbě onemocnění je správný odběr biologického materiálu, jeho uchování a vytvoření vhodných podmínek pro kultivaci mikroorganismů. Nedílnou součástí léčby je správná identifikace původců onemocnění, jež je založena převážně na testování biochemických vlastností bakteriálních kmenů. Tyto vlastnosti jsou pro jednotlivé patogeny typické.

Jednou z nejvýznamnějších bakteriálních čeledí je *Enterobacteriaceae*. Tyto mikroorganismy jsou součástí běžné mikrobiální flóry. Při poruše rovnováhy se však mohou velkou měrou podílet i na patogenních procesech v lidském organismu.

Tato bakalářská práce je zaměřena na jednotlivé biochemické vyšetřovací postupy sloužící k diagnostice nejvýznamnějších zástupců zmíněné skupiny mikroorganismů a popisuje jejich vývoj od počátku mikrobiologie až po současné trendy.

Výsledné porovnání jednotlivých metod by mělo poukázat na velký pokrok mikrobiologie, zejména v oblasti výpočetní techniky či moderních molekulárních metod.

2 HISTORIE

Louis Pasteur (1822–1895); francouzský chemik – vypracoval mikrobiologickou laboratorní techniku, objevil tekuté kultivační půdy (bujon). Užíval bujon připravený z kvasnic (Zahradnický et al., 1987).

Robert Koch (1843–1910); německý lékař – zasloužil se především o rozvoj lékařské mikrobiologie; užíval komorovou vodu z očí jatečního dobytka; do lékařské praxe zavedl želatinové pevné kultivační půdy vyrobené z extraktu z hovězího masa zpevněného želatinou, na nichž izoloval čisté kultury; významným způsobem přispěl mimo jiné k rozvoji celé bakteriologické diagnostiky (Zahradnický et al., 1987).

K nejprudšímu rozvoji mikrobiologie došlo v posledních dvou desetiletích 19. století, a to ve spojitosti s rozvojem fyziky a chemie, přírodních věd a chemického průmyslu. Byly vypracovány základní laboratorní postupy.

Roku 1880 německý bakteriolog **Walther Hesse** na radu své manželky **Fanny Hesseové** odstranil hlavní nevýhodu želatiny – její zkapalňování při teplotě vyšší než 25 °C nebo vlivem některých bakteriálních enzymů a nahradil ji agarem (polysacharid z mořských řas, jenž se rozpouští při 90 °C a tuhne při 35–40 °C), (Votava, 2005).

V roce 1887 **Richard Petri**, německý bakteriolog, zavedl skleněné misky s plochým víčkem (nyní z polystyrenu), do nichž se vylévají agarové kultivační půdy. Dodnes se užívá název „Petriho misky“ (Votava, 1999).

Koch používal jako živný základ pro pěstování bakterií masový extrakt, jenž je chudý na živiny, proto roku 1884 **Frederick Löffler**, spolu s **Klebsem**, vylepšil extrakt přidávkem peptonu a NaCl a vytvořil tak základní tekutou bakteriologickou půdu, tzv. živný bujon (Votava, 1999).

Kolem začátku první světové války se objevily první komerčně připravované sušené kultivační půdy.

3 OBECNÁ CHARAKTERISTIKA ENTEROBAKTERIÍ

3.1 *Obecné vlastnosti enterobakterií*

Enterobakterie se taxonomicky řadí do čeledi *Enterobacteriaceae*. Jsou považovány za jednu z nejdůležitějších čeledí gramnegativních tyčinek. Vyskytují se především ve střevním traktu člověka a jiných obratlovců. Mají však velký význam i pro jiná odvětví mikrobiologie, zejména druh *Escherichia coli* (*E. coli*) je vděčným modelovým objektem (Votava et al., 2003).

3.1.1 Morfologie

Čeď *Enterobacteriaceae* zahrnuje gramnegativní, nesporulující, peritrichózně obrvené tyčinky, dlouhé 2 až 4 μm a tlusté 0,5 až 1,5 μm , vyskytující se hlavně v zažívacím traktu člověka a zvířat. Většina disponuje schopností pohybu. Mezi nepohyblivé patří zejména klebsiely, šigely a *Yersinia pestis*.

3.1.2 Fyziologické a kultivační vlastnosti

Enterobakterie se řadí mezi fakultativní anaeroby, což znamená, že jsou schopny růst za aerobních i anaerobních podmínek. Jsou kultivačně nenáročné, dají se velmi snadno pěstovat na běžných živných půdách a v širokém teplotním rozmezí. Ničí je běžné dezinfekční prostředky i krátkodobé zahřátí na 70 °C (pasterizace).

Jednotliví původci mají různou odolnost vůči vnějším vlivům. Ta je dána jejich výskytem v organismu. Někteří mají větší afinitu ke střevu (*Enterobacter*), jiní se nachází velmi často i mimo střevo (*Klebsiella*) a další žijí spíše mimo střevo (*Serratia*). Právě střevní bakterie můžeme vykultivovat i z vnějšího prostředí, ale zde je považujeme za indikátor fekálního znečištění (Votava et al., 2003).

Ke kultivaci střevních mikroorganismů se využívají živné půdy obohacené o žlučové soli a krystalovou violet. Tyto látky působí jako inhibitory na většinu mikroorganismů, kromě zástupců čeledi *Enterobacteriaceae*.

Jednotlivé rody se navzájem odlišují četnými biochemickými vlastnostmi.

3.1.3 Biochemické vlastnosti

Enterobakterie se vyznačují negativním oxidázovým testem a ve většině případů tvorbou katalázy. Redukují nitráty na nitrity a rychle fermentují glukózu, při níž se může tvořit plyn. Těto vlastnosti je využíváno k odlišení od skupiny tzv. „nefermentujících tyčinek“, které glukózu a většinou ani jiné cukry nefermentují.

Všechny střevní tyčinky jsou rezistentní ke žlučovým solím, čehož je využito při kultivaci.

3.1.4 Antigenní struktura

Enterobakterie mají tři základní typy antigenů: O, H a K.

O-antigeny, zvané též jako tělové, jsou součástí lipopolysacharidové vnější membrány. Vyznačují se termostabilitou. Jednotlivé antigenní typy se značí čísly (např. O55, O111 apod.), (Votava et al., 2003).

H-antigeny jsou bičkové antigeny tvořené bílkovinou flagelinem. Jsou termolabilní. Najdeme je pouze u pohyblivých bakterií. Značí se malými písmeny (např. m).

K-antigeny jsou polysacharidové antigeny pouzdra. Jsou významným faktorem virulence, pro diagnostiku téměř nevýznamné.

3.2 Klinický význam

Enterobakterie, jak již napovídá sám název, osidlují převážně střevní trakt obratlovců. Působí zde jako komenzálové, saprofyté nebo symbionti (*Escherichia coli* produkuje tzv. koliciny, které jsou pro některé bakterie toxické a vitamin K). Jsou tedy součástí prospěšné běžné střevní mikroflóry. Za určitých podmínek, kdy dojde k narušení rovnováhy v poměru jednotlivých kmenů, však mohou působit jako patogeny.

Mimo střevní trakt jsou enterobakterie patogenní vždy. Vzhledem k anatomii lidského těla působí nejčastěji infekce v urogenitálním traktu, ale mohou být zavlečeny do různých částí těla. Zvláště u hospitalizovaných pacientů osidlují i dýchací cesty, rány, pohybový aparát (Votava et al., 2003).

Velice závažné jsou i septické stavy a meningitidy způsobené enterobakteriemi, jež jsou časté zejména u novorozenců, kojenců a starých lidí.

3.3 Epidemiologie

Většina enterobakterií se přenáší fekálně-orální cestou. Některé potravinami (salmonely), jiné jako „nemoc špinavých rukou“ (úplavice), u některých nelze vyloučit ani přenos vzduchem (*E. coli*). Závažné infekce jsou převážně endogenního původu.

Velmi významným epidemiologickým hlediskem je patogenita mikrobů, což je vlastnost vystihující schopnost vyvolat onemocnění a jeho šíření v populaci. Dle tohoto kritéria dělíme mikroorganismy na obligátně patogenní, jež vyvolají onemocnění téměř vždy (*Salmonella Typhi*), nepatogenní, jež onemocnění nevyvolávají (*Escherichia coli*) a podmíněně patogenní vyvolají onemocnění jen za určitých podmínek. Mezi tyto podmínky patří například snížení imunity vedoucí k nežádoucímu pomnožení mikroba.

Významným rozlišovacím znakem mezi obligátními a ostatními patogeny je schopnost štěpit laktózu. Salmonely, šigely a yersinie laktózu neštěpí. Této vlastnosti je využíváno při kultivaci.

Salmonely způsobují převážně enteritidy, šigely dyzenterie a patogenní kmeny *E. coli* průjmy. Mimo zažívací trakt však způsobují velmi závažné infekce ran, urogenitálního traktu, dýchacích cest, meningitidy nebo sepse.

Vzhledem k omezenému rozsahu této práce se budu dále úžeji zabývat pouze vybranými zejména obligátně patogenními mikroorganismy, které považuji za jedny z nejrozšířenějších původců onemocnění člověka.

4 NEJVÝZNAMNĚJŠÍ ZÁSTUPCI

V této kapitole bych velice ráda zmínila nejdůležitější a nejčastější zástupce čeledi *Enterobacteriaceae* s jejich základními biochemickými znaky, podle kterých je blíže identifikujeme a typické infekce, které vyvolávají.

4.1 Rod *Salmonella*

Salmonely rostou na agarových půdách ve 2 až 3 mm velkých hladkých koloniích. Snášejí přítomnost žlučových solí a brilantové zeleně, čehož se využívá v selektivně diagnostických půdách, jako jsou deoxycholát-citrátová půda (DC) nebo půda Wilsonova-Blairova (WB). Štěpí glukózu s tvorbou plynu (vyjma *S. typhi*), neštěpí laktózu, netvoří indol, nehydrolyzují ureu a většinou produkují sirovodík (H_2S).

Mezi nejdůležitější druh významný pro člověka patří *Salmonella enterica* (ssp. *enterica*). Existuje přes 2400 sérotypů (www.safe-poultry.com), (Přecechtěl et al., 1990). Tyto bakterie působí onemocnění zvané salmonelóza, což je gastroenteritida provázená velmi častými průjmy. Zdrojem je zvíře (kachní vejce, drůbeží maso) a člověk. Cestou přenosu jsou nejčastěji špatně tepelně opracované potraviny.

Salmonella Typhi (zkrácený název pro *Salmonella enterica* ssp. *enterica* sérovar Typhi) způsobuje akutní onemocnění postihující pouze člověka – Typhus abdominalis (břišní tyfus). Onemocnění se projevuje pozvolným vzestupem tělesné teploty až k horečce, která přetrvává 2 až 3 týdny. Kontinuální bakteriémie vede až k celkové sepsi. Zdrojem nemoci je nemocný člověk nebo bacilonosič (člověk mající v sobě a vylučující choroboplodné zárodky, ale bez projevů onemocnění), přenos probíhá kontaminovanou vodou nebo potravinami (Buchta et al., 2000).

Vzácně mohou salmonely působit osteomyelitidy a artritidy u dětí, při těžkých invazivních onemocnění napadají např. i kostní dřev. Jsou původci alimentárních nemocničních nákaz v důsledku požití kontaminované potravy, vody či mléka (Votava, Ondrovčík, 1998).

Diagnostika salmonel se vzhledem k někdy obtížnému záchytu opírá i o nepřímý průkaz v podobě Widalovy reakce, kdy aglutinujeme sérum s různými tělovými a bičíkovými antigeny.

4.2 *Rod Shigella*

Shigella roste v 1 až 2 mm velkých, spíše plochých koloniích páchnoucích po spermatu. Je nejméně biochemicky aktivní ze všech enterobakterií. Neštěpí laktózu, glukózu štěpí bez plynu (vyjma sérotyp *S. flexneri* 6), netvoří H₂S ani ureázu. Šigely jsou velmi citlivé k vyschnutí, vlivem kyselých metabolitů koliformních enterobakterií se velmi rychle inaktivují. Proto je velmi důležitý odběr do transportního média nebo na DC-tampon. Selektivně diagnostickou půdou je DC. Po biochemické identifikaci je nutná sérotypizace na sklíčku (Přecechtěl et al., 1990; Lhotová, Dědičová, 2000).

Nejčastějšími původci jsou *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii* a *S. sonnei*. Způsobují vysoce nakažlivé střevní onemocnění zvané bacilární dyzentérie neboli úplavici. Onemocnění se přezdívá „nemoc špinavých rukou“ díky fekálně-orální cestě přenosu. Zdrojem je nemocný člověk. Projevy jsou: neodolatelné nutkání na stolicí, průjmy, vodnatá stolice s příměsí hlenu, event. krve (Buchta et al., 2000).

Šigely mohou být původci explozivních nemocničních epidemií v dětských domovech, kojeneckých ústavech, psychiatrických léčebnách, domovech důchodců nebo léčebnách dlouhodobě nemocných (Votava, Ondrovčík, 1998).

4.3 *Rod Yersinia*

Yersinie patří jako další do skupiny obligátních patogenů. Je to krátká, ovoidní, gramnegativní tyčinka, značně pleomorfní (tvarově pestrá). Je nepohyblivá (vyjma *Y. pseudotuberculosis*) a nesporuluje. Roste ve velmi drobných zrnitých koloniích 0,1 až 0,2 mm velkých s vyvýšeným středem. Není kultivačně náročná, roste v rozmezí teplot od -2 °C do 45 °C (Přecechtěl et al., 1990).

Biochemicky štěpí cukry bez produkce plynu, netvoří oxidázu, redukuje nitráty a produkuje katalázu (obzvláště u *Y. pseudotuberculosis* je reakce silná a rychlá). Ke kultivaci se používá selektivně diagnostická půda CIN. Biochemický průkaz je nutno potvrdit aglutinací a fagotypizací. Provádí se rovněž stanovení protilátek pasivní hemaglutinací (Přecechtěl et al., 1990).

Nejdůležitějšími zástupci rodu jsou *Yersinia pestis*, původce moru, která je právem považována za nejzávažnější enterobaktérii, dále *Yersinia enterocolitica* a *Yersinia pseudotuberculosis*. Poslední dvě jsou původci střevního onemocnění.

Y. enterocolitica mnohdy invazivně postihuje celou střevní stěnu a díky šíření do mezenteriálních uzlin často imituje apendicitidu. Mimo jiné stojí na prvním místě u septických artritid dospělých (Votava et al., 2003).

4.4 Rod *Escherichia*

Escherichia jsou pohyblivé tyčinky, vytvářející 2 až 3mm velké, mírně vypouklé, lesklé kolonie. Na Endově půdě (EP) mají specifický zlatý lesk, na krevním agaru (KA) rostou některé kmeny (zejména způsobující uroinfekce) s hemolýzou. Většina kvasí laktózu, ale existují i kmeny opožděně kvasící laktózu nebo nekvasící vůbec (Přecechtěl et al., 1990).

Nejdůležitějším zástupcem je *Escherichia coli*, která je součástí běžné mikrobiální flóry ve střevě člověka. V případě zavlečení *E. coli* do jiných částí organismu však může dojít k mnoha různým infekcím, až k velmi závažným sepsím (velmi častý záchyt z hemokultur). Patří k nejčastějším patogenům izolovaným při urogenitálních infekcích (70–80 %), z výtěrů z ran, u osteomyelitid, u poporodních septických stavů pocházejících z matčiny střevní, případně vaginální mikroflóry, u novorozeneckých sepsí a meningitid. V neposlední řadě je nejčastějším původcem nozokomiálních nákaz (Votava, Ondrovčík, 1998).

Je-li kmen *E. coli* vybaven specifickými faktory virulence, je patogenní i ve střevě. Jedná se například o enteropatogenní *E. coli* (EPEC), enterotoxigenní *E. coli* (ETEC), enteroinvazivní *E. coli* (EIEC) a enterohemolytickou *E. coli*

(EHEC). Jednotlivé typy se od sebe odlišují antigenní analýzou aglutinací na sklíčku (Lhotová, Dědičová, 2000).

EPEC způsobuje dyspepsie a průjmy u novorozenců a kojenců. Nejznámější antigenní typy, které rozlišíme sérotypizací, jsou: O55, O111, O126, O86 a další.

EIEC působí bacilární dyzentérii starších dětí a dospělých. Nejběžnějším sérotypem je O124.

ETEC je původcem tzv. cestovatelských průjmů. Jedná se o onemocnění podobné choleře.

EHEC je nejzávažnější. Je původcem hemoragické kolitidy, která přechází v systémovou infekci zvanou hemolyticko-uremický syndrom. Nejběžnějším sérotypem je O157:H7 (Votava et al., 2003).

Escherichia coli je také velmi důležitým modelovým organismem v genovém inženýrství. V přírodě je pokládána za indikátor fekálního znečištění vody (Bednář et al., 1996).

4.5 Ostatní důležité rody

Mezi ostatní důležité rody, které pokládám za nutné zmínit, patří *Klebsiella* (*K. pneumoniae*, *K. ozaenae*, *K. rhinoscleromatis*, *K. oxytoca*) způsobující nejčastěji infekce močových cest, u vnímavých osob také život ohrožující sepse, pneumonie s abscesem a jiné těžké stavy vzdorující antibiotické (ATB) terapii (Votava, Ondrovčik 1998). *K. oxytoca* tvoří indol. U všech klebsiel je významná absence pohybu a ureázová aktivita (Votava et al., 2003).

Rod *Proteus* (*P. mirabilis*, *P. vulgaris*) se vyznačuje plazivým růstem na většině tuhých půd (Raussův fenomén). Zásadním testem k odlišení od ostatních enterobakterií je test deaminace fenylalaninu. Tvoří ureázu, plyn z glukózy a H₂S. Pozitivní tvorba indolu odlišuje *P. vulgaris* od *P. mirabilis* (Přecechtěl et al., 1990). Působí zejména močové infekce, chronické otitidy, infekce ran, osteomyelitidy a u malých dětí a kojenců rovněž průjmy (Votava, Ondrovčik, 1998).

Rod *Citrobacter* (*C. freundii*, *C. koseri*) se vyznačuje biochemickou podobností se salmonelami. Může tvořit sirovodík, většinou je laktózapozitivní, vždy má pozitivní test ONPG na rozdíl od salmonel (Dědičová, Lhotová, 2000).

Citrobakter je podmíněným patogenem ve střevě a způsobuje rovněž močové infekce. Některé kmeny jsou multirezistentní k ATB, díky čemuž patří mezi nozokomiální nákazy (Votava, Ondrovčík, 1998).

5 LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA ENTEROBAKTERIÍ

Nejpodstatnější částí identifikace mikroorganismů je bezesporu správný odběr biologického materiálu, jeho transport do laboratoře, uchovávání a posléze zpracování. Pouze dodržením těchto zásad dojdeme k zachycení patologického agens, které následně testujeme.

Laboratorní diagnostika enterobakterií se opírá především o přímý průkaz (kultivace), ale u některých infekcí i o nepřímý, kdy hledáme protilátky v séru nemocných, rekonvalescentů či bacilonosičů.

Velice důležitým krokem vedoucím k úspěšné diagnostice je úzký kontakt klinika s mikrobiologem. Můžeme tak usuzovat na konkrétního patogena i díky důležitým informacím o klinických příznacích u pacienta, druhu biologického materiálu nebo citlivosti na antibiotika.

5.1 *Specifika odběru, transportu a uchovávání vzorků*

Nejčastějším biologickým materiálem k záchytu enterobakterií bývá výtěr z konečníku (event. stolice), moč, duodenální šťáva, krev, likvor, kloubní punktát, hnis.

Odběr materiálu se řídí obecnými zásadami, jako je volba druhu materiálu z místa právě probíhajícího infekčního procesu, správná technika odběru zamezující kontaminaci nežádoucí flórou, odběr dostatečného množství (zejména v případě hemokultur) a správný čas. Ten je důležitý například u infekcí způsobených kmenem *S. Typhi*, kdy v různých fázích onemocnění lze původce prokázat v různých druzích materiálu.

Výtěry na tamponech je nutno provádět do transportních medií, jejichž součástí je thioglykolát sodný, fosfátový pufr a další soli zaručující přežití a zamezující nežádoucímu pomnožení mikrobů a vyschnutí. Zejména šigely jsou velice choulostivé, proto je vhodné použít tampon s deoxycholátem či aktivním uhlím, jež mají detoxikační účinek. Za nejvhodnější transportní médium pro záchyt střevních patogenů je považováno Caryové-Blairovo médium. Salmonely a šigely v něm vydrží i 7 týdnů. Dalším vhodným médiem pro všechny druhy výtěrů je Amiesovo transportní médium s aktivním uhlím. K průkazu střevních patogenů lze rovněž použít výtěr zanořený do polotuhé transportní půdy zvané TP GN, která eliminuje grampozitivní flóru (Votava, 1999).

Veškerý materiál by měl být do laboratoře dopraven okamžitě, zvláště jedná-li se o závažný materiál jako je likvor nebo krev. Moč by měla být zpracována do dvou hodin od odběru z důvodu rychlého pomnožení bakterií. Není-li možno vzorek ihned doručit nebo zpracovat, uchovává se v ledničce.

5.2 Kultivace

Po příjmu biologického materiálu do laboratoře se provádí kultivační vyšetření. Jedná se o roztěr vzorku na jednotlivé agarové pevné kultivační půdy a pomnožení v selektivně pomnožovacím médiu. Kultivační půdy se volí dle typu materiálu s přihlédnutím k předpokládanému výskytu specifických patogenů. V případě zpracování stolice volíme jednu půdu pro záchyt gramnegativních mikrobů, jednu selektivní pro záchyt salmonel a šigel a selektivně pomnožovací půdu pro salmonely. Další půdy volíme dle okolností. Při podezření na yersinie přidáme selektivní půdu pro jejich záchyt, u malých dětí přidáváme půdy pro izolaci enteropatogenní *Escherichia coli* sérotyp O157:H7 (EPEC).

Abychom zajistili růst a množení požadovaných patogenů, musíme zabezpečit vhodné kultivační podmínky. Jedná se především o dostatek vody živin a zdrojů energie, optimální teplotu, pH, sterilitu apod. Kultivace probíhá standardně 18–24 hodin při 37 °C, v případě některých specifických kultivací, například u yersinií, se podmínky liší (Zahradnický et al., 1987).

5.2.1 Kultivační půdy

Jak jsem již zmínila, výběr kultivačních médií je velmi významným krokem vedoucím k identifikaci patogenů. Základy k této z části biochemické metodice byly položeny již v 19. století (Zahradnický et al., 1987; Votava, 2005). Pro svou pracovní i finanční nenáročnost se používá dodnes.

Na jednotlivých kultivačních půdách můžeme hodnotit velikost, vzhled a další vlastnosti izolovaných kolonií, které jsou pro určité mikrobi charakteristické a na základě těchto vlastností je předběžně identifikovat.

V případě enterobakterií volíme ke kultivaci selektivně diagnostické půdy. Jejich selektivita je dána potlačením růstu ostatních mikroorganismů a k diagnostice vede průkaz některých vlastností mikrobů. Jedná se většinou o biochemické vlastnosti, podmíněné přítomností či tvorbou určitých enzymů.

5.2.1.1 Endova půda

Za základní půdu selektivní pro gramnegativní bakterie je považována půda Endova. Selektivita je v ní dána obsahem bazického fuchsinu (odbarveného siřičitanem) a diagnostickou složku zajišťuje substrát laktóza. Dle zbarvení kolonií zde můžeme rozlišit laktózapozitivní a laktózanegativní mikrobi. Vzhledem k toxicitě a nízké stabilitě fuchsinu a neméně podstatné nevýhodě v podobě plazivého růstu protea byla tato půda postupně nahrazena půdou MacConkeyho (Votava, 1999).

5.2.1.2 Půda MacConkeyho

Tato půda se vyznačuje střední selektivitou. Rostou na ní převážně enterobakterie, ostatní choulostivé kmeny jsou potlačeny účinkem obsažených žlučových solí. Diagnostická složka je zajištěna opět laktózou. Indikátorem štěpení je neutrální červeň. Laktózapozitivní kmeny rostou na agaru v růžových až červených koloniích, obligátní patogeny v bezbarvých, průhledných koloniích. Výhodou MacConkeyho (MC) půdy je neplazivý růst protea.

Nahradíme-li laktózu sorbitolem, získáme vysoce selektivně diagnostickou půdu pro záchyt EPEC O157:H7. Tyto kmeny rostou na půdě jako sorbitolnegativní v bezbarvých koloniích (Votava, 1999).

5.2.1.3 Půda deoxycholát-citrátová

Deoxycholát-citrátová půda (DC) je vysoce selektivní médium pro průkaz střevních patogenů. Pomocí vyšší koncentrace deoxycholátu sodného a citrátu sodného je zamezeno růstu všem grampozitivním mikrobům, ale i většině

koliformních bakterií (příbuzným druhu *E. coli*). Zcela neomezeně zde rostou salmonely a šigely.

Diagnostickým rysem je opět štěpení laktózy. Indikátorem je neutrální červeň, proto odolnější kmeny *E. coli*, které zde výjimečně vyrostou, tvoří růžové kolonie. Laktóza negativní kolonie jsou bezbarvé (např. *Shigella flexneri*).

Mnohem podstatnější je však průkaz tvorby sirovodíku, což se díky indikátoru citrátu železitému či železitoamonnému projeví černým zabarvením kolonií. Tuto schopnost mají například salmonely, proteus, citrobakter a další.

5.2.1.4 Půda XLD

Agar XLD (xylóza-lyzin-deoxycholátový) je selektivně diagnostickou půdou vhodnou pro záchyt salmonel a zejména šigel. Selektivita je opět zajištěna pomocí deoxycholátu sodného, který potlačuje růst grampozitivních mikrobů. Půda obsahuje řadu substrátů, jejichž štěpením dochází k identifikaci mnoha enterobakterií. Xylózu štěpí většina enterobakterií vyjma šigel, providencie a edwardsiely. Salmonely dekarboxylují lyzin, čímž zvyšují pH a vlivem indikátorové fenolové červeně tak rostou stejně jako šigely v červených koloniích. Od šigel se však odlišují tvorbou sirovodíku, který se projeví černým středem kolonie. Dalším substrátem v půdě je laktóza a sacharóza, jejichž štěpením dochází ke snižování pH a následné žluté barvě kolonií, například u escherichií, klebsiel, enterobakterů nebo citrobakterů (Votava, 1999).

5.2.1.5 Agar Hektoen

Jedná se rovněž o selektivně diagnostickou půdu určenou k izolaci salmonel a šigel ze vzorků stolice. Díky svému složení je však cenově podstatně dražší. Obsahuje vysoký podíl peptonu a kvasničného extraktu kvůli zamezení inhibici zejména šigel žlučovými solemi. Jako substráty jsou použity laktóza, sacharóza a salicin. Tvorba sirovodíku je podpořena tiosulfátem sodným a indikována citrátem železitoamonným. Indikátory štěpení cukrů jsou

bromthymolová modř a kyselý fuchsin. Tato směs je oproti jiným indikátorům v půdách na průkaz střevních patogenů méně toxická

Salmonely na půdách Hektoen rostou v modrozelených koloniích s černým středem, šigely v zelených, vlhkých, vyvýšených. Koliformní mikrobi zde rostou lososově až oranžově (Votava, 1999).

5.2.1.6 SS-agar

SS-agar (*Salmonella-Shigella* agar) je selektivně diagnostickou půdou pro salmonely a šigely. Obsahuje malé množství žlučových solí k potlačení růstu koliformních bakterií a brilantní zeleň jako inhibitor grampozitivních mikrobů. Indikátorem štěpení laktózy je neutrální červeň a tvorby sirovodíku citrát železitý.

Salmonely zde rostou v bezbarvých koloniích s černým středem, šigely bezbarvě. Odolné koliformní bakterie jsou zbarveny do červena.

5.2.1.7 Půda CIN

Půda CIN (cefsulodin-Irgasan-neomycin) je selektivně diagnostická půda sloužící k izolaci *Yersinia enterocolitica*. K selekci yersinií slouží kromě tří zmíněných látek ještě deoxycholát sodný a krystalová violet. Diagnostickou složkou půdy je mannitol, jehož štěpení je zviditelněno neutrální červení.

Yersinie se vyznačují růstem i při nižších teplotách, proto se kultivují při 32 °C. Kolonie mají podobu tzv. „býčího oka“, tedy s průhledným okrajem a červeným středem. Vzhledem k podobnému růstu i jiných mikrobů je nutno vždy provést biochemické, event. sérologické dourčení (Votava, 1999).

5.2.1.8 Půda MLCB

Půda MLCB (mannitol-lysine-crystal violet-brilliant green), označovaná také jako mannitol-lyzinový agar se používá k selektivní izolaci salmonel. Její selektivita není vysoká. Vzhledem k obsahu brilantní zeleně a krystalové violeti

je potlačen růst grampozitivních mikrobů, ale bohužel i současně *Salmonella* Typhi a *Salmonella* Paratyphi.

Pomocí thiosulfátu sodného, jehož indikátorem je citrát železitoamonný, můžeme diagnostikovat tvorbu sirovodíku. Salmonely tvořící H₂S vyrůstají na MLCB ve velkých fialově purpurových koloniích s černým středem. Salmonely netvořící sirovodík zde rostou v bledých nebo fialově šedých koloniích. Případné kontaminanty rostou bezbarvě.

5.2.1.9 Wilsonova-Blairova půda

Půda Wilsonova-Blairova (WB) patří mezi selektivně diagnostické půdy k izolaci salmonel z různých vzorků infekčního materiálu. Nejvhodnější je pro záchyt *Salmonella* Typhi (*S. Typhi*). Pro ostatní salmonely jsou vhodnější půdy DC, XLD nebo MAL. Vlivem brilantní zeleně, siřičitanu sodného a čerstvě vysráženého sirníku vizmutitého dochází k inhibici nejen grampozitivních mikrobů, ale i koliformních tyčinek a většiny šigel.

Salmonely zde rostou v lesklých černých koloniích díky vzniku sirníků železa a vizmutu. *S. Typhi* má vzhled tzv. „králičího oka“, tedy kolonie jsou lesklé, černé, s úzkým bezbarvým okrajem a kovovým leskem okolí.

Problémem WB půdy je její nestabilita a obtížná příprava (Votava, 1999).

5.2.1.10 Půda MAL

Půda MAL (mannitol-arabinóza-laktózosový agar) je relativně chudé médium sloužící k záchytu salmonel. Selektivitu zajišťuje opět deoxycholát sodný, substráty jsou kromě již zmíněných v názvu ještě lyzin a tiosulfát sodný. Jako indikátory se používají fenolová červeň a citrát železitoamonný.

Salmonely využívají nejdříve mannitol a arabinózu a poté dekarboxylují lyzin, čímž se médium alkalizuje. Díky tvorbě sirovodíku zde vyrůstají v černých koloniích. Proteové se na této půdě neplazí. Toto médium se doporučuje použít až k vyočkování pomnoženého vzorku.

5.2.1.11 Chromogenní půdy

Mezi modernější kultivační půdy se řadí tzv. chromogenní půdy. Jsou to kultivační média obsahující jeden či více chromogenů, což je barevná molekula navázaná na substrát. Mikrob po rozštěpení substrátu chromogen uvolní a kumuluje jej ve svém organismu. Výsledkem je růst mikroba ve specificky zbarvených koloniích. Tato výhoda je však také vyvážena vyšší cenou média (Votava, 1999). Nicméně v porovnání s náklady běžných biochemických testů prováděných samostatně bylo prokázáno, že výsledná cena vyšetření je naopak výrazně nižší, a to až o 70 % (Ohkus, 2000).

Příkladem chromogenní půdy je *Rambachův agar* užívaný jako selektivně diagnostická půda k zachytu netyfových salmonel (Dědičová, Lhotová, 2000). Obsahuje dva substráty: propylenglykolu a substrát pro β -galaktosidázu. Salmonely zde vyrůstají v nápadně červených koloniích vzniklých indikátorem zachyceným snížením pH díky štěpení propylenglykolu. Koliformní kolonie tvořící β -galaktosidázu rostou modře. Fialově se prokáže *Citrobacter freundii*, neboť je schopen štěpení obou substrátů. *Proteus* spp., *Pseudomonas* spp., *Shigella* spp. a další mikrobi neštěpící ani jeden substrát, rostou bezbarvě.

K bakteriologickému vyšetření především močí se velmi často používají chromagary CPS ID 2 (bioMérieux 43 211) obsahující žlučové soli pro selektivitu gramnegativních bakterií a enterokoků a dva chromogenní substráty. Prvním je substrát pro detekci β -glukuronidázy a uvolňuje se růžovočervené barvivo. Druhý detekuje glukosidázu s uvolněním modré barvy. Má-li mikrob první enzym, roste růžově (*E. coli*), má-li druhý, roste modře (enterokoky). V případě vlastnění obou enzymů, roste modrozeleně až purpurově (*Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Serratia* spp.). Díky mnoha kombinacím skýtají zmíněné půdy mnohem více diagnostických možností (Votava, 1999).

5.2.1.12 Půda selenitová

Selenitová půda (selenit) je pomnožovací tekutá půda selektivní pro salmonely (zejm. *S. Typhi*) a některé šigely. Obsahuje seleničitan sodný, který v prvních 6 až 12 hodinách inkubace inhibuje růst zejména koliformních bakterií. Později, po redukci selenitu, se zvýší pH a koliformní mikrobi se

začnou pomnožovat. Nevýhodou je nepotlačení růstu proteů a pseudomonád (Votava, 2005).

5.3 Sérologické metody

V případě diagnostiky salmonel, šigel, escherichií, citrobakterů, proteů a dalších gramnegativních tyčinek není možné určení izolované kultury pouze pomocí biochemických testů či testováním jejich metabolismu. Provádí se tzv. zpětná aglutinace na sklíčku. Jedná se o přesnější identifikaci zjišťováním antigenní struktury izolovaného mikroba. K suspenzi bakteriální kultury ve fyziologickém roztoku se přidávají specifická antiséra (anti-O, anti-H, anti-K apod.), a to tak, že nejdříve použijeme polyvalentní antisérum obsahující protilátky proti více antigenním determinantám, které obsahuje spektrum monovalentních sér. V případě positivity pokračujeme v testování s příslušnými monovalentními séry z daného spektra.

6 BLIŽŠÍ URČENÍ ENTEROBAKTERIÍ BIOCHEMICKÝMI TESTY

Po zdárném vykultivování patogena jej můžeme podrobit celé řadě biochemických testů, které nám napoví spoustu důležitých informací nutných k identifikaci. Vycházíme z čisté kultury bakterií, získané primokultivací. Kolonií neznámého kmene naočkujeme řadu diagnostických půd a po vhodné inkubaci, obvykle 18–24 hodin při 37 °C, odečítáme změny způsobené růstem mikroba. Tento charakter identifikace jsem již zmínila v kapitole kultivačních půd, na nichž můžeme spoustu biochemických vlastností bakterií zaznamenat.

Testovací půdy jsou obvykle vylité ve zkumavkách a pro jejich barevnost se nazývají „pestrou řadou“. Postupem času a vývojem mikrobiologických technik již máme k dispozici řadu diagnostických setů určených k identifikaci specifických skupin mikroorganismů. Tyto jsou vyráběny velkou spoustou českých i zahraničních firem. Těmito metodikami se hodlám blíže zabývat v následujících kapitolách.

Pro velkou spoustu existujících biochemických testů uvádím pouze přehled nejvýznamnějších a v praxi nejpoužívanějších.

6.1 Zkumavkové testy

6.1.1 Štěpení cukrů

K nejdůležitějším diagnostickým testům k identifikaci enterobakterií patří fermentace sacharidů. Nejčastěji užívanými cukry jsou glukóza, laktóza, sacharóza a manitol. Základem tekuté půdy je peptonová voda připravená z enzymatického kaseinového hydrolyzátu, tzv. *Hottingerův bujón*. Kromě přidaného cukru obsahuje také indikátor změny pH, nejčastěji bromthymolovou modř, fenolovou červeň nebo bromkresolový purpur.

Při kvašení obsažených cukrů mikroben vznikají organické kyseliny měnící pH, což se projeví právě změnou barvy půdy. Uvolňuje-li současně mikrob plyn (CO₂, H₂), můžeme jej současně detekovat zachycením v malé zkumavce, vložené do média dnem vzhůru, nazývané Durhamova plynovka.

Výsledky fermentace těchto cukrů u vybraných bakteriálních druhů jsou zaznamenány v tabulce 1.

6.1.2 Dekarboxylace aminokyselin

Detekce dekarboxyláz aminokyselin se využívá zejména k biochemické diagnostice klebsiel, enterobakterů, citrobakterů nebo salmonel. Používáme k tomu tekutou půdu dle *Moellera* s obsahem příslušné aminokyseliny a s upraveným pH na hodnotu 6. Po naočkování se půda převrství sterilním minerálním olejem.

Při dekarboxylaci aminokyselin (lyzin, ornitin, arginin) působením enzymů některých bakterií dochází k uvolnění CO_2 a aminu, čímž dojde ke zvýšení pH. Tuto biochemickou změnu ozřejmíme příslušným indikátorem (např. bromkresolový purpur). Výsledné zbarvení v pozitivním případě bývá fialové, v negativním žluté.

6.1.3 Redukce dusičnanů na dusitany

Schopnost redukovat dusičnany (nitráty) je vlastností všech enterobakterií. Provádí se v peptonové vodě s 0,1 % KNO_3 . Indikátorem je *Griessovo činidlo* na nitrity s kyselinou sulfanilovou a α -naftylaminem. V pozitivním případě dojde červenému zbarvení. Nedojde-li k reakci, musíme ozřejmit přidáním zinkového prachu. Po zčervenání můžeme potvrdit negativní reakci. Test bývá součástí některých kombinovaných půd (Votava, 1999, <http://fvl.vfu.cz>).

6.1.4 Tvorba indolu

Některé mikroorganismy rozkládají aminokyselinu tryptofan působením enzymu tryptofanázy za vzniku indolu. Test se provádí v Hottingerově bujónu s přidaným tryptofanem chudým na sacharidy, které kyselou reakcí při zkvašování narušují tvorbu indolu. Po přidání Kovácsova nebo stabilnějšího Ehrlichova činidla (paradimethylaminobenzaldehyd) k narostlé 24 hodinové kultuře dojde v pozitivním případě k vytvoření sytě červeného prstence na rozhraní kultury a činidla. Pozitivní reakce bývá u druhů *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella oxytoca*.



Obrázek 1 Tvorba indolu Foto: Věra Kaválková

6.1.5 Štěpení močoviny

Štěpení močoviny (urey) nastává u bakterií produkujících enzym ureázu. Tento enzym produkují zejména rody *Proteus*, *Morganella*, *Providencia*.

Nejcitlivější metodikou je metoda dle *Christensena*. Jedná se o tuhou půdu ztuhnutou v šikmé poloze (tzv. šikmý agar), kde je substrátem urea a indikátorem fenolová červeň. Hydrolýzou močoviny se uvolní amoniak, což zvýší pH půdy. Reakce se projeví zčervenáním.

6.1.6 Utilizace citrátu dle Simonse

Některé bakterie jsou schopny místo cukru využívat jako zdroj uhlíku citrát sodný. K diagnostice této vlastnosti slouží půda zvaná *Simmonsův citrát*. Obsahuje citrát sodný jako zdroj uhlíku, dihydrofosforečnan amonný jako zdroj dusíku, agar a bromthymolovou modř jako indikátor. Šikmý agar zelené barvy v pozitivním případě zmodrá. Využívá se k odlišení enterobakterů, citrobakterů, klebsiel nebo většiny salmonel (kromě *S. typhi*) od escherichií, šigel a yersinií.

6.1.7 Průkaz β -galaktozidázy

Průkaz β -galaktozidázy se provádí tzv. ONPG-testem (*o*-nitrofenyl- β -D-galaktopyranosid). β -galaktozidáza je enzym, který štěpí laktózu na galaktózu a glukózu. V našem případě je enzymem ONPG hydrolyzovaný stejným způsobem jako laktóza a výsledným produktem *o*-nitrofenol. V diagnostice používáme komerčně vyráběné proužky napuštěné substrátem, které ponoříme do husté suspenze bakteriálního kmene na 2 hodiny při 35 °C. Za pozitivní výsledek je považováno zežloutnutí suspenze a je typické pro rod *Citrobacter* a *Escherichia*. Negativní test v podobě bezbarvé suspenze značí přítomnost např. salmonel nebo *Shigella flexneri*.

6.1.8 Průkaz tvorby acetylmethylkarbinolu (acetoinu)

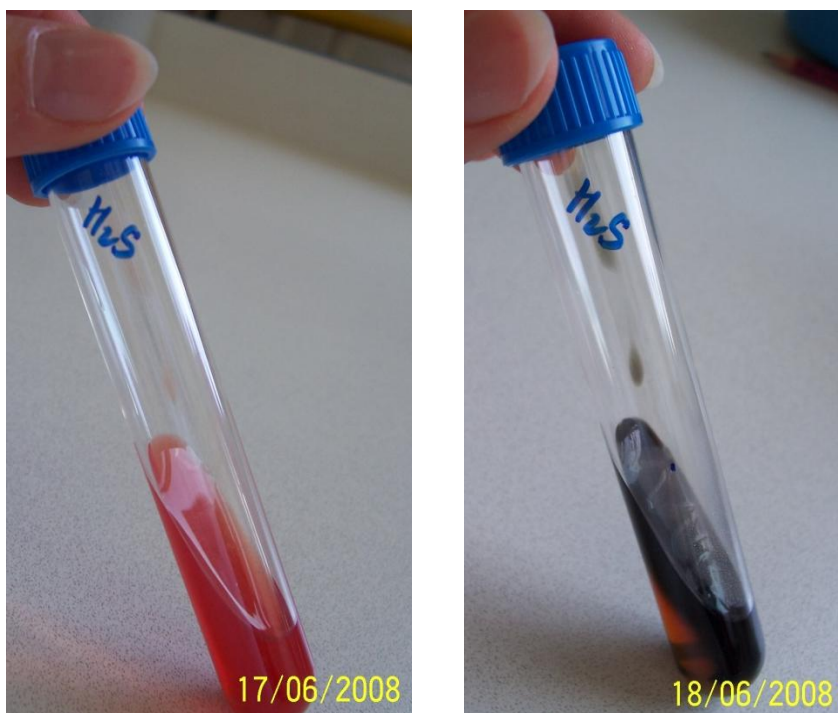
Acetoin vytvářejí dekarboxylací a kondenzací kyseliny pyrohroznové příslušníci rodů *Klebsiella* a *Enterobacter*. Tímto je odlišíme od rodu *Escherichia*.

Test na průkaz acetoinu se nazývá Vogesův-Proskauerův (VP-test). K mediu s peptonem a glukózou se po 24 hodinové inkubaci s naočkovanou kulturou přikápnou Barritovo činidlo obsahující α -naftol a roztok KOH. Za pozitivní se pokládá postupný vznik červenofialového fosforeskujícího prstence na rozhraní kultury a přidaných činidel.

Pro rychlý průkaz byly vyvinuty diagnostické proužky s pyruvátem sodným, který se vloží do testovací suspenze mikroba a po 24 hodinové kultivaci se zakápnou oběma činidly.

6.1.9 Tvorba sirovodíku

K průkazu tvorby sirovodíku (H_2S) slouží řada metod v tekutých i tuhých půdách (viz. kapitola 6.3). Půdy obecně sestávají z agaru a 1 % octanu olovnatého nebo z peptonového agaru s citrátem železitoamonným či z peptonového agaru s přidaným octanem olovnatým. Očkují se vpichem. V pozitivním případě, například u salmonel, dojde díky indikátoru ke zčernání vpichu.



Obrázek 2 Tvorba sirovodíku Foto: Věra Kaválková

6.2 Ostatní testy

6.2.1 Cytochromoxidázový test

Průkazem aktivity cytochromoxidázy (oxidázy) rozlišíme enterobakterie od pseudomonád, aeromonád či plesiomonád. Mnoho výrobců poskytuje k rychlé diferenciaci diagnostické proužky nasycené substrátem (směs N,N-dimethyl-1,4-fenylendiaminu a α -naftolu). Diagnostickým proužkem provedeme otisk kolonie a po velmi krátké době můžeme odečíst v pozitivním případě modrofialové zbarvení.

6.2.2 Určení pohyblivosti

Tento test sice nepatří mezi biochemické testy, nicméně bývá součástí mnoha kombinovaných půd. Zjištěný výsledek je důležitý například při záchytu pohyblivých salmonel.

Test pohyblivosti se provádí na půdách s nízkou koncentrací agaru (kolem 0,5 %). Mezi známé metody patří plotnová metoda dle *Garda*, kdy se testovaná kultura kápne doprostřed vysušené nízkoprocentní agarové půdy. Pohyblivé

kmeny rostou po inkubaci plazivým způsobem. V případě zkumavkové metody se očkuje vpichem asi do poloviny agaru. Pohyblivé kmeny prorůstají difúzně do média. Třetí metodikou je rourková metoda dle *Hajny*, kde 0,2 % agar se naplní do rourky tvaru písmena U a očkuje se vpichem do označeného raménka (asi 1 cm). V pozitivním případě dojde k prorůstání mikroba dále až do druhého raménka rourky.

6.3 Kombinované diagnostické půdy

6.3.1 Půda CLED

CLED (z angl. Cystine-lactose-electrolyte deficient agar) je velmi vhodnou půdou pro vyšetření vzorků moče. Důvodem je nízký obsah elektrolytů, který zamezuje plazivému růstu protea. Půda obsahuje mimo jiné laktózu, L-cystin a bromthymolovou modř jako indikátor. Roste na ní spousta významných bakterií nalézajících se v moči při patologickém procesu, enterobakterie nevyjímaje. Příkladem je *E. coli* v žlutých neprůhledných koloniích, *Klebsiella* spp. v mukózních žlutých až bělavých koloniích, *Proteus* spp. v drobných průsvitných modrých koloniích, *Salmonella* spp. v plochých modrých koloniích.

Půda se vyrábí i v podobě rychlých testů, oblíbených u řady ambulantních lékařů. Jedná se o set obsahující půdu nalitou na tyčince, která se přímo vloží do odběrové nádobky s močí. Moč se poté vylije a půda v odběrové nádobce se může ihned kultivovat. Za 24 hodin máme tedy k dispozici narostlé kolonie, které již můžeme předběžně identifikovat i odečíst jejich kvantitu.

6.3.2 Hajnova půda

Agar podle *Hajny* je kombinovanou diagnostickou půdou k záchytu střevních patogenů. Je srovnatelná s půdou TSIA (Triple Sugar Iron Agar) používanou ve světě, liší se pouze nepatrně v poměrech obsažených látek (Votava, 1999).

Substráty jsou glukóza, laktóza a sacharóza, indikátorem jejich štěpení fenolová červeň. Fermentuje-li bakterie pouze glukózu, dojde k žlutému zabarvení spodní části půdy vlivem částečného okyselení, šikmá plocha

zůstane červená – tzv. „červený praporek“. Štěpí-li mikrob ještě alespoň jeden ze zmíněných cukrů (laktózu či sacharózu), celá půda zežloutne. Indikátorem tvorby plynu je přítomnost agarového gelu, který je vylitý ve zkumavce z části jako šikmý agar. Při tvorbě CO₂ dojde k jeho potrhání. Pro tvorbu sirovodíku je přítomen tiosulfát sodný a indikátor citrát železitoamonný. Půda se očkuje současně roztěrem po šikmé ploše a vpichem. Zčernání vpichu značí tvorbu H₂S.

6.3.3 Biochemický klín

Biochemický klín (Švejcarova půda) je kombinovaná diagnostická půda nahrazující několik zkumavkových testů. Na Petriho misce je do 1/3 šikmo vylitá půda obsahující jako substrát glukózu, ureu a tiosulfát sodný. Indikátory jsou bromthymolová modř a octan olovnatý. Bakterie štěpící ureu produkcí amoniaku zvýší pH a tím změní zelený klín do modra. Fermentace glukózy se projeví žlutým zbarvením klínu

Na zbytku misky je vylita Endova půda, kde lze odečíst štěpení laktózy. Půda se očkuje speciálním způsobem (Votava, 1999). Na část plotny, kde je vylita Endova půda se přidává tableta mannitolu a sacharózy. Jejich štěpení se projeví červeným dvorcem kolem tablet. Na klínu se provádí několik vpichů, jež po zčernání signalizují produkci sirovodíku, a klade se zde krycí sklíčko, pod nímž můžeme odečíst tvorbu plynu.

Švejcarova plotna slouží především k izolaci a rychlé předběžné identifikaci běžných střevních patogenů. Její hlavní výhodou je kontrola čistoty naočkovaného kmene.

Jednotlivé biochemické testy u vybraných bakteriálních rodů jsou shrnuty v tabulce 1.

Tabulka 1 Přehled nejdůležitějších biochemických testů u vybraných zástupců čeledi *Enterobacteriaceae*

	Glukóza	Laktóza	Sacharóza	Manitol	Urea	H ₂ S
<i>Escherichia coli</i>	+ (p)	+	+, —	+	—	—
<i>Citrobacter freundii</i>	+ (p)	+, —	—, +	+	— (+)	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+ (p)	+	+	+	+	—
<i>Enterobacter cloacae</i>	+ (p)	+	+	+	+, —	—
<i>Proteus mirabilis</i>	+ (p)	—	r	—	+	+
<i>Proteus vulgaris</i>	+ (p); +	—	+	—	+	+
<i>Morganella morganii</i>	+ (p); +	—	—	—	+	—
<i>Salmonella typhi</i>	+	—	—	+	—	+
Většina ostatních salmonel	+ (p)	—	—	+	—	+
<i>Shigella</i>	+	—	—	+, —	—	—
<i>Serratia</i>	+ (p); +	—	+	+	r	—
<i>Yersinia enterocolitica</i>	+	— (+)	+	+	+	—

+ (p) – fermentace s tvorbou plynu

+ – fermentace bez tvorby plynu

— – negativní reakce

r – různé výsledky



Obrázek 3 Biochemický klín (vlevo laktóza pozitivní, vpravo laktóza negativní kmen) Foto: Martina Červenková

6.4 Mikrometody

Vývojem mikrobiologie došlo k vytvoření mnoha diagnostických souprav obsahujících miniaturizované biochemické testy. Mikrotesty bývají většinou uspořádány v plastových mikrodestičkách. Jamky těchto destiček obsahují dehydratovaná diagnostická média s příslušnými substráty. Očkuje se předepsanou suspenzí bakteriálního kmene a po 18 až 24 hodinové inkubaci odčítá a vyhodnocuje převedením na číselný kód, podle něhož najdeme odpovídající výsledek v identifikačním registru nebo pomocí počítačové techniky.

Cílem těchto diagnostických souprav je především urychlení vyšetřovacího postupu, standardizace a snadná proveditelnost.

V současné době existuje na trhu nepřeborné množství diagnostických systémů distribuovaných spoustou firem, které se neustále inovují a doplňují.

6.4.1 ENTEROtest

Ve většině mikrobiologických laboratoří našel své místo ENTEROtest (ET), (firma PLIVA – Lachema Diagnostika, Česká Republika). Jedná se o soupravu testů určenou pro identifikaci nejvýznamnějších druhů z čeledi *Enterobacteriaceae*. Test je vyráběn ve dvou modifikacích pro 16 a 24 biochemických testů (ENTEROtest 16 a ENTEROtest 24) s výsledkem za 24 hodin a inovovaný ENTERO-Rapid 24 s 24 testy s možností vyhodnocení již za 4 hodiny.

Dehydratovaná diagnostická média v jamkách jsou řazena ve dvou (ET 16) nebo třech (ET 24, ENTERO-Rapid 24) po sobě následujících řadách, které jsou ve formě jednotlivých stripů umísťovány do mikrotitrační destičky. Kromě rychlosti, jednoduchosti v provedení a cenové dostupnosti, je další výhodou dělená mikrotitrační destička umožňující použití pouze počtu stripů odpovídající počtu vyšetřovaných kmenů. Souprava je určena pro 40 provedení (www.lachema.com).

Po inkubaci je nutno některé testy zakápnout činidly, které souprava obsahuje a odečíst reakci v časovém odstupu dle návodu. Jednotlivé reakce vyhodnocujeme dle výsledného zbarvení buď manuálně (viz. obrázek4) nebo

s pomocí automatického readru. Identifikaci provádíme podle přiložené tabulky s přihlédnutím k výsledným reakcím u kontrolních kmenů. K tomuto účelu byl vyvinut numerický identifikační seznam, který značně standardizuje vyšetřovací postup a je vhodný zejména k interpretaci většího množství testů (Schindler, 1988). V moderním provedení lze identifikaci provést v počítačovém programu, čímž dosáhneme vysoké efektivity a spolehlivosti v mikrobiologické praxi.

1		H	G	F	E	D	C	B	A
		IND	H ₂ S	LYS	ORN	URE	ARG	SCI	MAL
	⊕	● ●	● ●	● ●	● ●	● ●	●	● ●	● ●
⊖	●	○	● ●	● ●	● ●	● ●	●	● ●	
2		H	G	F	E	D	C	B	A
		PHE	ONP	INO	ADO	CEL	SUC	TRE	MAN
	⊕	● ●	●	●	●	●	●	●	●
⊖	●	○	● ●	● ●	● ●	● ●	● ●	● ●	
3		H	G	F	E	D	C	B	A
		VPT	ESL	SOR	RHA	MLB	RAF	DLU	GLU
	⊕	● ●	● ●	●	●	●	●	●	●
⊖	○	○	● ●	● ●	● ●	● ●	● ●	● ●	

Obrázek 4 ENTEROtest 24

Zdroj: <http://www.molbio.upol.cz/stranky/vyuka/MB/9.pdf>

6.4.2 MiniAPI systém

Ve Francii byl firmou bioMérieux vyvinut přístroj sloužící k identifikaci řady bakteriálních kmenů i kvasinek a v neposlední řadě i k odečtu citlivostí na ATB. Jedná se o systém kombinující biochemické testy a rozsáhlou databázi uloženou v softwaru přístroje, která je pravidelně aktualizována.

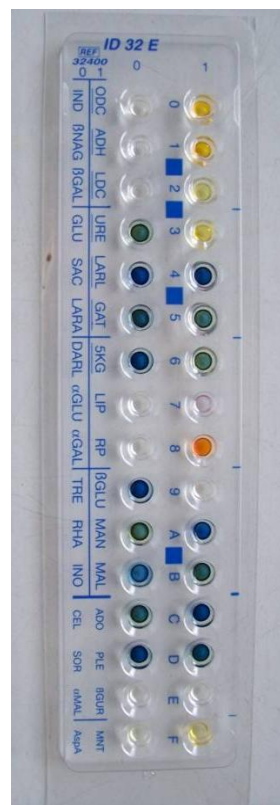
V případě identifikace enterobakterií se používají stripky API 20E pro 20 testů a nověji ID 32E a rapid ID 32E obsahující v jamkách celkem 32 optimalizovaných biochemických testů. Po inokulaci bakteriální suspenzí dle příslušného postupu se kmen inkubuje zpravidla 18 až 24 hodin při 37 °C (v případě rychlého testu – rapid ID 32E pouze 4 hodiny) a poté odečítá pomocí fotometru nebo manuálním zadáním výsledků přímo do přístroje.

Výsledky porovnané s databází přístroje je možné i přímo vytisknout na integrované tiskárně (www.biomerieux-diagnostics.com).

Přístroj byl vyvinut ve spolupráci s laboratořemi v mnoha státech a je celosvětově uznáván pro svoji spolehlivost, rychlost a jednoduchost. Přesto v porovnání s konvenčními biochemickými metodami nevyniká vysokou přesností (O'hara et al., 1992).



Obrázek 5 MiniApi - BioMérieux
Foto: Martina Červenková



Obrázek 6 Identifikační strip
Foto: Martina Červenková

6.5 VITEK2

Přístroj VITEK2 (firma bioMérieux, Francie) je integrovaný systém kombinující přípravu vzorků, naočkování identifikačních (ID) karet pro vyšetření, jejich inkubaci a čtení. Systém slouží k rychlé a přesné identifikaci mikroorganismů s rozšířením o testování citlivostí k ATB.

VITEK2 sestává z diagnostických karet specifických pro skupiny mikroorganismů a z karet s obsahem odpovídajících antibiotických sad. Každá karta sestává z 64 jamek obsahujících identifikační substráty nebo antimikrobiální látky. K inokulaci karet dochází uvnitř přístroje a vzorek je v nich plně uzavřen, tudíž nedochází k tvorbě aerosolu a osobní kontaminaci.

Součástí sestavy je malá datastanice určená pro sběr informací o jednotlivých vzorcích a vyšetření. Tyto informace jsou přenášeny do přístroje. Identifikace karet probíhá pomocí čárových kódů. Obsahují rovněž důležitá data, jako jsou šarže, expirace nebo číslo série.

Přístroj po vložení předepsané suspenze vzorku spolu s kartou pro ID a kartou pro testování ATB sám vzorek naředí, inokuluje kartu pomocí vakua, inkubuje a nakonec kolorimetricky změří. Pro každou antimikrobiální látku zároveň stanoví minimální inhibiční citlivost (MIC).

Po ukončení identifikace se získaná data načtou do počítače, který je napojen na laboratorní informační systém (LIS). Výsledky přiřazené k příslušným pacientům zadaným v počítači je však nutno validovat zkušeným mikrobiologem. Zvláště v případě ATB citlivostí u jednotlivých bakteriálních kmenů je zapotřebí znalosti mikrobiologické problematiky.

Tato technologie je špičkou v biochemické identifikaci bakterií u nás i ve světě. Poskytuje větší automatizaci při současné vyšší bezpečnosti. Odpadá opakovaná manuální práce jako u ostatních mikrometod. Neocenitelnou výhodou je významná úspora času i materiálu při současné identifikaci kmene a jeho citlivosti k ATB z jednoho vzorku. Vzhledem k potřebné době kultivace bakterií v běžných biochemických testech, která činí 18–24 hod, je konečný výsledek u VITEK2 za 8 hodin neocenitelnou předností (O'hara, 2005). A v neposlední řadě je potřeba zmínit snížení odpadu až o 80 % oproti ostatním mikrotitračním metodám (www.biomerieux-usa.com).



Obrázek 7 ID karta v bakteriální suspenzi + ATB karta
Foto: Martina Červenková



Obrázek 8 VITEK2 datastanice Foto: Martina Červenková



Obrázek 9 VITEK2 bioMérieux s kapacitou 60 pozic Foto: Věra Kaválková

7 TRENDY V DIAGNOSTICE ENTEROBAKTERIÍ

V současné době zaznamenávají rozvoj metody molekulární biologie, jako jsou: Polymerázová řetězová reakce (PCR), Pulzní gelová elektroforéza (PFGE), DNA sondy. Jejich provedení je však možné pouze ve speciálně vybavených laboratořích, proto je nelze rutinně provádět (Lhotová, Dědičová, 2000).

Převratným objevem se stal vývoj nové technologie využití hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF (angl. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight). Na našem trhu se vyskytuje již dva roky výrobek MALDI Biotyper firmy Bruker Daltonics, Německo (www.bdal.cz).

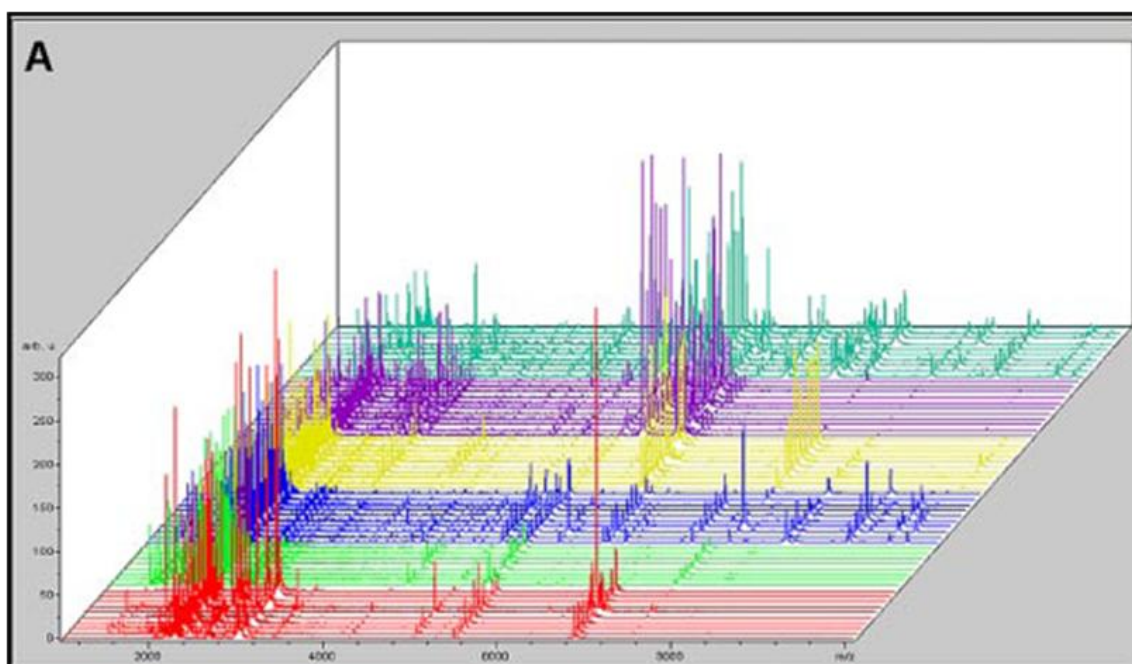
7.1 MALDI Biotyper



Obrázek 10 MALDI Biotyper Bruker Daltonics
zdroj: Bruker Daltonics — brožura

Maldi Biotyper je systém nové generace pro identifikaci mikroorganismů pracující na principu hmotnostní spektrometrie. Rodová i druhová identifikace bakterií probíhá na bázi srovnání MALDI-TOF spektra charakteristických ribozomálních proteinů vyšetřovaného mikroba s referenčními spektry uloženými v otevřené databázi softwaru. Tato databáze obsahuje většinu klinicky významných bakteriálních a mykotických kmenů a je přístupná neustálému rozšiřování o nové druhy a poddruhy. Přitom získání výsledku trvá jen pár minut (www.bdal.com).

Přístroj sestává hmotnostního spektrometru, ocelové MALDI destičky a softwaru. Destička má na svém povrchu 96 terčků, každý slouží pro jeden vzorek. Zkoumaná kolonie mikroba se na terčik rozetře v tenkém filmu a po zaschnutí překryje 1 μ l MALDI Matrice obsahující α -kyano-4-hydroxyskořicovou kyselinu. Po zaschnutí se destička vloží do přístroje, kde dojde pomocí laseru k ionizaci a za vysokého vakua k separaci iontů vzorku podle poměru hmotnosti a náboje (m/z). Výsledné spektrum je srovnáno s databází a vyhodnoceno.



Obrázek 11 MALDI-TOF hmotnostní spektra 57 izolátů obsahující šest patogenních druhů bakterií: červeně *S. aureus*, zeleně *Streptococcus* skupiny B, modře *E. coli*, žlutě *K. pneumoniae*, fialově *Salmonella* sérotyp B, indigo *P. aeruginosa* (m/z 1800–9000).

Zdroj: <http://www.mcponline.org/content/7/2/448.full>

Předností systému je robustnost, velmi snadná příprava vzorku, rychlost, vysoká přesnost a reprodukovatelnost a v neposlední řadě také nízké náklady na spotřební materiál a vzorek.

V porovnání s moderními biochemickými metodami není k identifikaci potřeba žádných vstupních testů či informací o vzorku. Všechny jsou zpracovány stejným způsobem (www.bdal.com).

Neocenitelnou vlastností metody je rozlišení i zanedbatelných množství bakteriálních druhů ve směsi, což naznačuje, že pomocí hmotnostní spektrometrie dojdeme k rychlému a přesnému výsledku daleko dříve než u klasických metod (www.mcponline.org).



Obrázek 12 Ocelová MALDI destička

Zdroj: Bruker Daltonics – brožura

8 DISKUSE

Základním stavebním kamenem identifikace mikroorganismů jsou biochemické testy, a to od počátků mikrobiologie až dodnes. Postupný rozvoj chemie, fyziky a ostatních vědních disciplín se nevyhnul ani mikrobiologii. Původní jednoduché a prosté biochemické testy byly postupně zdokonalovány a to ve smyslu manuálního zjednodušení, zvýšení citlivosti a specifčnosti a především urychlení konečného výsledku. I do tohoto vědního oboru se zavedl termín „Správná laboratorní praxe“, jejímž cílem je prostřednictvím ucelených a jednotných pracovních postupů dojít ke kvalitnímu a správnému výsledku.

Především kulturační techniky se zachovaly dodnes. Kvalifikované posouzení vzorku z klinického hlediska a jeho následné naočkování na příslušný počet vhodných kulturačních půd vede k cílenému záchytu hledaného infekčního agens.

Ostatní biochemické testy se postupem času miniaturizovaly do mikrotitračních destiček typu enterotestů. Výhodou bylo především vyšetření většího množství vzorků s minimální spotřebou reagensů a také zavedením počítačové techniky, která umožnila automatizaci vyhodnocení výsledků. Zjednodušení také přinesl reader – zařízení pro odečet vzniklých biochemických reakcí.

V roce 1986 vstoupila na trh firma bioMérieux – Francie s výrobkem MiniAPI. Výhodou oproti enterotestům byla lepší přesnost a reprodukovatelnost výsledků pomocí vytvořené databáze umístěné v softwaru přístroje a především testy antibiotické citlivosti (www.bioMérieux.com).

O dva roky později tatáž firma představila přístroj VITEK1, předchůdce dnešního VITEK2. Ten vyniká daleko vyšší automatizací a rovněž bezpečností díky minimálnímu kontaktu pracovníka s biologickým materiálem. Kromě diagnostiky umí přístroj vyšetřit citlivost dourčeného mikroba k ATB, a to v jednom kroku. Odpadá tedy nárok na množství materiálu. Velkou předností VITEK2 je počítačové propojení s LIS. Výsledek identifikace i ATB citlivosti se přenese do elektronické průvodky. Nezanedbatelná je i ekologická stránka vzhledem k velmi nízkému odpadu.

Tento systém je uznávaný po celém světě a je součástí velkých klinických laboratoří, které jej využívají v rutinním provozu.

V posledních letech zaznamenaly velký rozvoj molekulárně biologické metody. V rutinní mikrobiologické praxi se jedná zejména o hmotnostní spektrometrii, jmenovitě přístroj Biotyper firmy Bruker Daltonics – Německo. Tento přístroj je úspěšně využíván ve stále větším počtu klinických laboratoří. Principem je diagnostika bakterií na základě rozboru ribozomální DNA. Identifikace je díky své přesnosti a jedinečnosti přirovnávána výrobcem k otisku prstu (www.bdal.com).

Oproti biochemickým testům má tato vyšetřovací metoda výhody zejména v jednoduchosti přípravy vzorku, kdy stačí pouze velmi malé množství 24 hodinové bakteriální kultury. Analýza může být provedena dokonce i ze směsi. V jednom kroku dochází k vysokému rozlišení mikroorganismů až do úrovně druhu. Diferencuje bakterie, kvasinky i plísně bez speciálních nároků na přípravu vzorku. Vedle velmi přesných výsledků je nejdůležitější předností především rychlost.

Byla provedena řada výzkumů, které srovnávají biochemické testy s metodou hmotnostní spektrometrie. Ve výsledku trvá identifikace 1 vzorku včetně přípravy celkem 11 minut. 96 vzorků (celá destička) je vyšetřeno za 1 hodinu 40 minut (Eigner et al., 2008). V případě biochemických testů jde spíše o dny.

Na 18. Evropské konferenci klinické mikrobiologie a infekčních nemocí (ECCMID), která se konala v roce 2008 v Barceloně, byla přednesena studie porovnání klasických biochemických testů (API bioMérieux) s MALDI-TOF hmotnostní spektrometrií. Jako referenční metoda byla použita PCR. V případě enterobakterií došlo v 98 % ke shodným výsledkům v obou testech, v 1 % byla MALDI identifikace přesnější a v 1 % dopadla hůře oproti biochemickým testům. Jako hlavní výhody MALDI Biotyperu byly předneseny nízké provozní náklady, rychlá identifikace, snadná manipulace, malé množství potřebného vzorku. Mezi nevýhody patří vysoká pořizovací cena, zatím nekompletní databáze (zejména grampozitivní rody), chybějící vyšetření ATB citlivostí a neschopnost vyšetření z přímého materiálu. Z těchto důvodů jsou biochemické techniky stále důležitou součástí kompletní mikrobiologické diagnostiky (Schubert et al., 2008).

9 ZÁVĚR

Od počátků mikrobiologie, které se datují zhruba na polovinu 19. století, prodělal tento krásný a důležitý medicínský obor velkého pokroku. Základní biochemické metodiky byly postupně zautomatizovány. Velký důraz byl během vývoje kladen zejména na bezpečnost, reprodukovatelnost, přesnost, citlivost a rychlost. Rovněž manuální nenáročnost a malé zatížení ekologie biologickým i ostatním odpadem patří mezi obrovské výhody. Velkým pokrokem je bezesporu výpočetní technika, bez níž si už žádný obor vůbec nedovedeme představit.

V současné době se do popředí mikrobiologických technik velmi ostře dostává hmotnostní spektrometrie, která je bezesporu průlomem v jednoduché, rychlé a přesné identifikaci. Biochemické metody však mají i přes dokonalost moderních vyšetřovacích metod stále své pevné místo v mikrobiologické diagnostice.

10 SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK

Obrázek 1 Tvorba indolu.....	29
Obrázek 2 Tvorba sirovodíku	31
Tabulka 1 Přehled nejdůležitějších biochemických testů u vybraných zástupců čeledi <i>Enterobacteriaceae</i>	34
Obrázek 3 Biochemický klín	34
Obrázek 4 ENTEROtest 24	36
Obrázek 5 MiniApi - BioMérieux	37
Obrázek 6 Identifikační strip Api ID 32E	37
Obrázek 7 ID karta v bakteriální suspenzi + ATB karta	38
Obrázek 8 VITEK2 datastanice	39
Obrázek 9 VITEK2 bioMérieux s kapacitou 60 pozic	39
Obrázek 10 MALDI Biotyper Bruker Daltonics	40
Obrázek 11 MALDI-TOF hmotnostní spektra.....	41
Obrázek 12 Ocelová MALDI destička.....	42

11 SEZNAM LITERATURY

BEDNÁŘ, M., FRAŇKOVÁ, V., SCHINDLER, J., SOUČEK, A., VÁVRA, J. *Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie*. 1. vydání. Praha: Marvil, 1996. 558 s. ISBN 80–238-0297–6

BUCHTA, V., JÍLEK, P., HORÁČEK, J., HORÁK, V. *Základy mikrobiologie a parazitologie pro farmaceuty*. Dotisk 1. vydání. Praha: Karolinum, 2000. 192 s. ISBN 80–7184-565–5

DĚDIČOVÁ, D., LHOTOVÁ, H. *Využití identifikačních souprav v diagnostice střevních patogenů čeledi Enterobacteriaceae. II. Rod Salmonella a Citrobacter*. *Klinická mikrobiologie (Remedia)*, 2000, roč. 4, č. 5, s. 158–161

EIGNER, U., HENDEL, A., WILD, U., WILD, F., HOLFELDER, M., FAHR, A. -M. *Rapid identification of clinical relevant bacterial isolates using the Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry in routine clinical laboratory*. Limbach Laboratory Heidelberg. 18th ECCMID, Barcelona, Spain, 19–22 April 2008

Dostupné z: Bruker Daltonics-poster

LHOTOVÁ, H., DĚDIČOVÁ, D. *Využití identifikačních souprav v diagnostice střevních patogenů čeledi Enterobacteriaceae. I. Rod Escherichia a Shigella*. *Klinická mikrobiologie (Remedia)*, 2000, roč. 4, č. 5, s. 155–157

O'HARA, C. M., RHODEN, D. L., MILLER, J. M. *Reevaluation of the API 20E identification systém versus conventional biochemical for identification of members of the family Enterobacteriaceae: a New look at an old product*. *Journal of Clinical Microbiology*, 1992, vol. 30, No. 1, p. 123–125

O'HARA, C. M. *Manual and automated instrumentation for identification of Enterobacteriaceae and other aerobic gram-negative bacilli*. *Clinical Microbiology Reviews*, 2005, vol. 18, No. 1, p. 147–162

OHKUSU, K. *Cost-effective and rapid presumptive identification of gram-negative bacilli in routine urine, pus, and stool cultures: evaluation of the use of CHROMagar orientation medium in conjunction with simple biochemical tests.* Journal of Clinical Microbiology, 2000, vol. 38, No. 12, p. 4586–4592

PŘECECHTĚL, F. et al. *Lékařská mikrobiologie. 1. vydání.* Brno: Masarykova univerzita v Brně, 1990. 330 s. ISBN 80–210-0143–7

SEN-YUNG H., CHIAO-LI T., YUN-SHIEN L., AN-JING K., CHIEN-FENG S., YEN-HSIU L., JEN-KUN Ch. *Highly efficient classification and identification of human pathogenic bacteria by MALDI-TOF MS.* Molecular & Cellular Proteomics 7.2, 2008, p. 448–456.

Dostupné z: <http://www.mcponline.org/content/7/2/448.full>

SCHINDLER, J. *Numerická diagnostika bakterií čeledi enterobacteriaceae. 1. Vydání.* Praha: Avicenum, 1988. 204 s.

SCHUBERT, S., BUTTERICH, N., HEINDL, C., WEINERT, K. *Novel MALDI-TOF MS based differentiation of bacteria from clinical samples-alternative for biochemical test systems ?* Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene and Medizinische Mikrobiologie, Munich, Germany. 18th ECCMID, Barcelona, Spain, 19–22 April 2008

Dostupné z: Bruker Daltonics-poster

VOTAVA, M., ONDROVČÍK, P. *Vybrané kapitoly z klinické mikrobiologie.*

1. vydání. Brno: Masarykova univerzita v Brně, 1998. 90 s. ISBN 80–210-1805–4

VOTAVA, M. *Kultivační půdy v lékařské mikrobiologii. 1. vydání.* Brno: Hortus, 1999. 407 s. ISBN 80–238-5058X

VOTAVA, M. et al. *Lékařská mikrobiologie speciální. Dotisk 2006.* Brno: Neptun, 2003. 495 s. ISBN 80–902896-6–5

VOTAVA, M. *Lékařská mikrobiologie obecná*. 2. přepracované vydání. Brno: Neptun, 2005. 351 s. ISBN 80–86850-00–5

ZAHRADNICKÝ, J. et al. *Mikrobiologie a epidemiologie*. 1. vydání. Praha: Avicenum, 1987. 624 s. textu, 54 přílohy

[online]. Dostupné z:

http://www.bdal.com/uploads/media/MALDI_Biotyper-08.2008-eBook.pdf

[citováno 2010–04-21]

[online]. Dostupné z:

http://www.bdal.com/uploads/media/MALDI_Biotyper-Flyer-2-eBook.pdf

[citováno 2010–04-21]

[online]. Dostupné z:

http://www.biomerieux-diagnostics.com/servlet/srt/bio/clinical-diagnostics/dynPage?open=CNL_CLN_PRD&doc=CNL_PRD_CPL_G_PRD_CLN_8&pubparams.sform=1&lang=en. [citováno 2010–04-16]

[online]. Dostupné z:

http://www.biomerieux-usa.com/servlet/srt/bio/usa/dynPage?doc=USA_PRD_LST_G_PRD_USA_4.

[citováno 2010–04-18]

[online]. Dostupné z:

http://fvl.vfu.cz/sekce_ustavy/mikrobiologie/mikrobiologie_pro_farmaceuty/praktikum.html. [citováno 2010–01-26]

[online]. Dostupné z:

<http://www.lachema.com/produkty-a-reseni/mikrobiologie/25-pripravky-mikro-latest.html>. [citováno 2010–03-20]

[online]. Dostupné z:

<http://www.molbio.upol.cz/stranky/vyuka/MB/9.pdf>.

[citováno 2010–02-02]

[online]. Dostupné z:

<http://www.safe-poultry.com/serotypes-properties.asp>

[citováno 2010–04-27]