



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Sciences

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

Výskyt Streptococcus agalactiae u těhotných žen

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Studijní program:

SPECIALIZACE VE ZDRAVOTNICTVÍ/ZDRAVOTNÍ LABORANT

Autor: Sára Vetchá

Vedoucí práce: Ing. Veronika Čechová

České Budějovice 2022

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci s názvem „*Výskyt Streptococcus agalactiae u těhotných žen*“ jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské, a to v nezkrácené podobě 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 bakalářské práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé bakalářské práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 3.5. 2022

.....

podpis

Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat vedoucí bakalářské práce, Ing. Veronice Čechové, za odborné vedení, cenné rady, podněty a připomínky při jejím zpracování. Dále bych ráda poděkovala ostatním pracovníkům mikrobiologické laboratoře UNILAB s.r.o. v Třebíči za vstřícnost a ochotu. Také bych ráda poděkovala své rodině, která je mi oporou po celou dobu mého studia.

Výskyt *Streptococcus agalactiae* u těhotných žen

Abstrakt

Streptococcus agalactiae je podmíněným komenzálním patogenem u člověka. Přírodním rezervoárem této bakterie je pochva, gastrointestinální trakt a nosohltan. Onemocnění vyvolává pouze při oslabení hostitele, u kterých ale může způsobit i život ohrožující infekce. U žen se *Streptococcus agalactiae* často šíří z trávicího traktu až do oblasti pochvy a porodních cest. Právě v porodních cestách může dojít k přenosu a tím i nakažení novorozence během porodu.

Cílem teoretické části bylo seznámení se s problematikou onemocnění bakterií *Streptococcus agalactiae* a možnostmi její laboratorní diagnostiky. V této práci jsou uvedeny informace o *Streptococcus agalactiae*, možnosti kultivace a diagnostiky používané pro jeho průkaz, vedoucí ke zjištění citlivosti na antibiotika. *Streptococcus agalactiae* je streptokok patřící mezi bakterie, teoretická část je tedy stručně zaměřena i na stavbu bakteriální neboli prokaryotické buňky a obecným informacím o rodu *Streptococcus*.

Hlavním cílem praktické části bylo provedení screeningového kultivačního vyšetření výtěrů z pochvy těhotných žen, v případě positivity sledování rezistence na různá antibiotika a následné zpracování dat vzorků s pozitivním nálezem z gynekologických ambulancí. V laboratoři mi bylo umožněno zpracovat celkem 80 vzorků od žen v 35. – 37. týdnu těhotenství. Provedla jsem screeningové kultivační vyšetření a následně jsem přítomnost *Streptococcus agalactiae* ve vzorku potvrdila nebo vyvrátila pomocí latexové aglutinace nebo CAMP testu.

Z 80 mnou zpracovaných vzorků vyšla pozitivita na bakterii *Streptococcus agalactiae* u 19 těhotných žen, což je z celkového počtu 80 vzorků 23,75 %. Pro průkaz citlivosti na antibiotika u pozitivních vzorků jsem použila metodu diskového difuzního testu. Výsledky výzkumu bakalářské práce mohou sloužit jako informační zdroj.

Klíčová slova

Streptococcus agalactiae; kultivace; diagnostika; antibiotika; antibiotická rezistence; prokaryotická buňka; bakterie

Occurrence of *Streptococcus agalactiae* in pregnant women

Abstract

Streptococcus agalactiae is a human opportunistic commensal pathogen. The natural reservoir of this bacteria is the vagina, gastrointestinal tract, and nasopharynx. It induces a disease only in the compromised hosts, to whom it can cause a life-threatening infection. In the female body, *Streptococcus agalactiae* usually spreads from the gastrointestinal tract to the vaginal and birth canal area. The birth canal is where transmission and the resulting infection of a newborn can happen during delivery.

The goal of the theoretical part was to introduce a matter of the disease caused by *Streptococcus agalactiae* and the possibilities of its laboratory diagnosis. This thesis presents information about *Streptococcus agalactiae* and its cultivation and diagnosis used for obtaining evidence about its presence, leading to antibiotics sensitivity determination. *Streptococcus agalactiae* is a bacteria from the group of streptococcus, hence the bacterial (prokaryotic) cell composition is described, and general information about the group of streptococcus is included.

The main goal of the practical part was to carry out the screening and cultivation examination of the vaginal swab of pregnant women. In case of a positive result, to observe a different antibiotic resistance followed by processing the positive findings of laboratory samples. The laboratory allowed me to process 80 samples from women 35–37 weeks pregnant. I did a screening and cultivation examination and then I confirmed or denied the presence of *Streptococcus agalactiae* in the sample using a latex agglutination or CAMP test.

Out of 80 samples, 19 pregnant women were *Streptococcus agalactiae* positive, presenting 23,75 % of the total. I used a disc diffusion test method to prove an antibiotics sensitivity for positive samples. The results of this bachelor thesis can be used as a source of information.

Keywords:

Streptococcus agalactiae; cultivation; diagnosis; antibiotics; antibiotic resistance; prokaryotic cell; bacteria

Obsah

1	ÚVOD	8
2	TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1	MIKROBIOLOGIE	9
2.1.1	<i>Mikrobiální agens</i>	9
2.2	BAKTERIE	10
2.2.1	<i>Stavba</i>	10
2.2.2	<i>Velikost, tvary a uspořádání</i>	12
2.3	ROD STREPTOCOCCUS	14
2.3.1	<i>Morfologie</i>	14
2.3.2	<i>Rozdělení</i>	14
2.3.2.1	Klasifikace podle změn na krevním agaru	14
2.3.2.2	Klasifikace podle Lancefieldové	15
2.4	STREPTOCOCCUS AGALACTIAE	16
2.4.1	<i>Historie</i>	16
2.4.2	<i>Antigenní struktura</i>	16
2.4.3	<i>Virulence</i>	17
2.4.4	<i>Patogenita</i>	17
2.4.4.1	Časná infekce	18
2.4.4.2	Pozdní infekce	19
2.4.5	<i>Léčba</i>	19
2.4.6	<i>Prevence</i>	19
2.5	BIOLOGICKÝ MATERIÁL ODEBÍRANÝ PRO IZOLACI STREPTOCOCCUS AGALACTIAE	22
2.6	KULTIVACE	23
2.6.1	<i>Půdy používané ke kultivaci Streptococcus agalactiae</i>	23
2.6.2	<i>Selektivní bujóny používané k pomnožení S. agalactiae</i>	24
2.7	DIAGNOSTIKA	25
2.7.1	<i>Mikroskopie</i>	25
2.7.2	<i>CAMP test</i>	26
2.7.3	<i>Latexová aglutinace</i>	26
2.7.4	<i>Hmotnostní spektrometrie</i>	27
2.7.5	<i>PCR</i>	28
2.7.6	<i>Bacitracinový test</i>	28
2.7.7	<i>Biochemické reakce</i>	29
2.7.7.1	PYR test	29
2.7.7.2	Stanovení oxidázové aktivity	29
2.7.7.3	Kataláza	29
2.8	STANOVENÍ CITLIVOSTI S. AGALACTIAE K ANTIBIOTIKŮM	30
2.8.1	<i>Disková difúzní metoda</i>	30
2.8.2	<i>Diluční metoda v bujónu (MIC)</i>	30

2.8.3	<i>Gradientová difuzní metoda v gradientu (E-test)</i>	31
2.9	REZISTENCE NA ANTIBIOTIKA.....	32
3	CÍLE A VÝZKUMNÉ OTÁZKY	33
3.1	CÍLE PRÁCE	33
3.2	VÝZKUMNÉ OTÁZKY	33
4	METODIKA	34
4.1	ODBĚR A TRANSPORT VZORKŮ	34
4.2	PŘÍPRAVA KULTIVAČNÍCH PŮD V LABORATOŘI	35
4.2.1	<i>Brain Heart Infusion agar (BHI agar)</i>	35
4.2.2	<i>Mueller-Hinton agar obohacený 5 % beraní krve (MH agar)</i>	36
4.2.3	<i>Krevní agar se 7 % beraní krve</i>	36
4.3	KULTIVACE	38
4.4	LATEXOVÁ AGLUTINACE.....	40
4.5	MIKROSKOPIE.....	42
4.6	CAMP TEST	45
4.7	INTERFERENCE	47
4.8	STANOVENÍ CITLIVOSTI NA ANTIBIOTIKA.....	48
5	VÝSLEDKY	50
6	DISKUZE	52
7	ZÁVĚR	54
8	POUŽITÁ LITERATURA	56
9	SEZNAM TABULEK, GRAFŮ A OBRÁZKŮ	61
10	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	62

1 Úvod

Bakterie žijí všude kolem nás. Jedná se o jednobuněčné, velmi odolné mikroorganismy, které jsou nejrozšířenějšími organismy na světě. Zdaleka ne všechny vyvolávají onemocnění. S některými žijeme v symbióze a jiné nás mohou ohrozit na životě nebo způsobit vážné zdravotní komplikace. Jednou z velmi závažných komplikací je přenos bakterie *Streptococcus agalactiae* ze zdravé matky na novorozence během porodu. U zdravé ženy se v pochvě mohou vyskytovat nosičské kmeny této bakterie, ale nemusí se u ní projevit žádné klinické příznaky. I přesto je bakterie přenesena na novorozence, kterému může způsobit i život ohrožující infekce. Aby se těmto situacím předešlo, je v současné době každá těhotná žena podrobena screeningu, který probíhá mezi 35. a 37. týdnem těhotenství.

Streptococcus agalactiae, někdy nazývaný jako GBS, je grampozitivní beta-hemolytický streptokok. Je jediným druhem patřící do sérologické skupiny B dle Lancefieldové. Jednotlivé bakteriální buňky jsou opouzdřené, kulatého nebo oválného tvaru vyskytující se v dlouhých řetězcích.

Nejúčinnější léčbou těhotné ženy kolonizované *Streptococcus agalactiae* je podání vhodných antibiotik, které snižují riziko přenosu infekce z matky na dítě. U infekcí vyvolaných *Streptococcus agalactiae* je antibiotikem první volby penicilin. Alternativním antibiotikem může být ampicilin či jiné antibiotikum s minimální možností rezistence. Je však nutné podat antibiotika včas. Důležité tedy je, aby se žena dostala do nemocnice již před začátkem porodu či ihned po odtoku plodové vody. Jestliže by ženě kolonizované *Streptococcus agalactiae* antibiotika podány nebyly, hrozí novorozenci velké nebezpečí v podobě sepsí, pneumonií nebo meningitid. V dnešní době případy invazivních novorozeneckých infekcí postupně klesají. Je to dáno vlivem včasné antibiotické léčby a zvýšeného povědomí o této bakterii.

2 Teoretická část

2.1 Mikrobiologie

Mikrobiologie je věda, zabývající se mikroorganismy, které lze pozorovat pod mikroskopem. Mezi mikroorganismy jsou řazeny bakterie, sinice, kvasinky, prvoci, plísňe a běžně i viry a priony (Votava, 2005).

2.1.1 Mikrobiální agens

Nejznámějšími mikrobiálními agens jsou bakterie. Nemají pravé jádro a označují se jako prokaryota (Votava, 2005). Kvasinky a plísňe patří mezi eukaryota. Plísňe tvoří vlákna, která jsou na hranici viditelnosti okem a kvasinky mají buňky, které jsou asi desetkrát větší, než u bakterií (Votava, 2005). Viry jsou považovány za nejmenší mikroorganismy, které nejsou organizované jako buňky, ale jako částice. Obsahují pouze jeden typ nukleové kyseliny (DNA nebo RNA). Rozmnožují se pouze v živých buňkách a nerostou tedy ani na nejbohatších půdách. Viry nejsou citlivé na antibiotika (Votava, 2010).

2.2 *Bakterie*

Bakterie jsou jednobuněčné organismy, které nemají pravé jádro. Označují se jako prokaryota. Od eukaryotních buněk s pravým jádrem se liší i dalšími znaky, například organizací genového obsahu chromozomů jádra buňky, menšími chromozomy, nemají mitochondrie a v cytoplasmatické membráně se nevyskytují steroly (Votava, 2005).

2.2.1 *Stavba*

Vnitřní struktura prokaryotické buňky je podstatně jednodušší než u buňky rostlinné a živočišné. Kromě rozpustné cytoplasmy má čtyři hlavní struktury. Jsou jimi jádro, ribosomy, cytoplasmatická membrána a buněčná stěna. Buňka je tvořena jedním prostorem, který není rozdělen žádnými membránami (Obrázek 1) (Bednář, 1996).

Bakterie postrádají membránově vázané jádro. Na rozdíl od DNA v eukaryotických buňkách, která se nachází v jádře, DNA v prokaryotických buňkách je izolována v membránově vázané organelle připomínající dlouhou cívku. Bakterie obsahují pouze jeden kruhový, u některých druhů lineární, chromozom, který v sobě skrývá všechny genetické informace. Genetická informace všech buněk sídlí v sekvenci dusíkatých bází v extrémně dlouhých molekulách DNA. Stejně jako u všech organismů obsahuje bakteriální DNA čtyři dusíkaté báze adenin (A), cytosin (C), guanin (G) a thymin (T) (Kadner a Rogers, 2020). Kromě chromozomu, může bakteriální buňka obsahovat i menší genetické elementy, jakými jsou např. plazmidy, které nesou dodatkové informace (Dobiáš, 2003).

Cytoplasma zcela vyplňuje vnitřní prostor prokaryotní buňky. Lze ji považovat za vodný roztok, který je ohraničený cytoplasmatickou membránou. Jsou v ní umístěny nerozpustné složky nukleoid, ribosomy a granula zásobních látek (Bednář, 1996; Votava, 2005). Funkcí cytoplasmy je především vytvořit prostředí pro pohyb molekul a struktur v prostoru, jejich vzájemné vyhledávání a interakce. Cytoplasma obsahuje přes 50 % všech bílkovin buňky. Téměř všechny mají enzymatickou funkci (Bednář, 1996). Ribosomy se skládají z ribosomální RNA a proteinů a jsou místem syntézy bílkovin. Nachází se v cytoplasmě všech buněk, ve stromatu chloroplastů a taktéž v matrix mitochondrií. Ribosomy jsou tvořeny dvěma podjednotkami, 30S a 50S, které se spojují ve funkční jednotku 70S (Nečas, 2000). Rozdíl mezi ribosomy prokaryotní a eukaryotní buňky je hlavně ve velikosti. Prokaryotní

ribozom je o něco menší než eukaryotní (Votava, 2005). Na ribosomu se nachází čtyři specifická místa. Ty jsou velmi důležitá pro translaci. Na jednom místě se váže mRNA a na třech tRNA (Nečas, 2000). Hlavní funkcí ribosomů je tedy vytvářet povrch, kde se mohou setkávat různé molekuly tak, aby se genetická informace, která je nesena mRNA mohla přeložit v primární strukturu proteinu (Kaprálek, 1999).

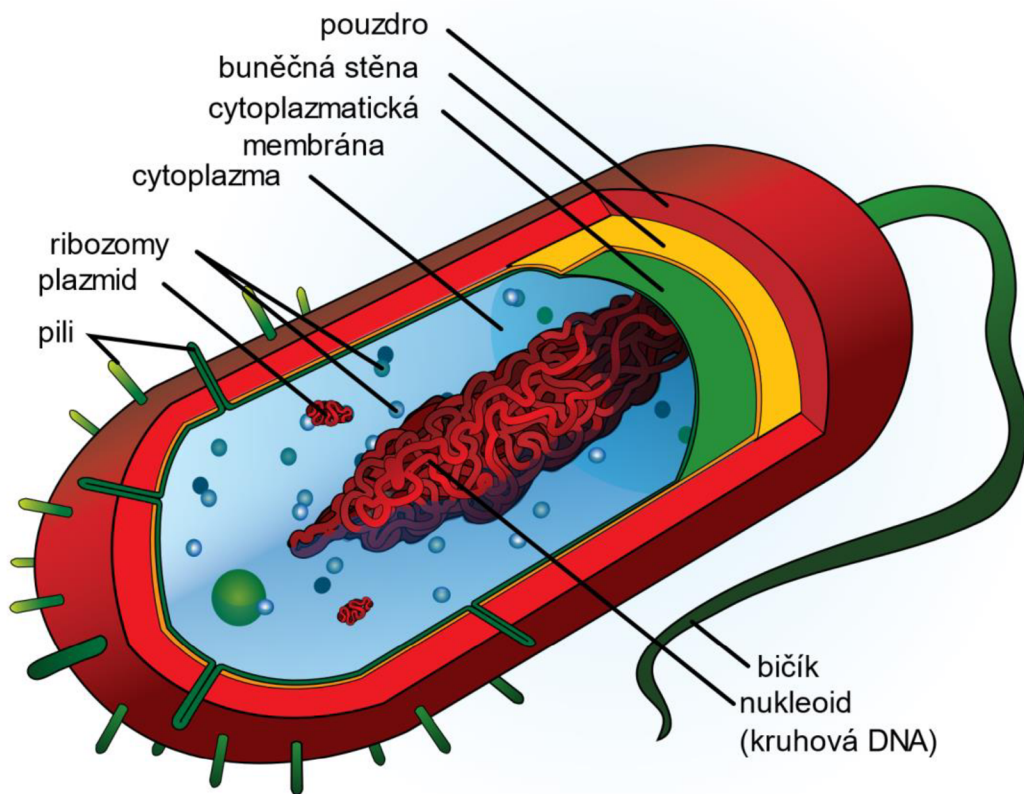
Cytoplasmatická membrána je tekutá membrána, která ohraničuje cytoplasmu. Je složena z dvojité vrstvy fosfolipidů, ve které se nachází různé proteiny (Votava, 2005). Cytoplasmatická membrána je pro buňku velmi důležitá a vykonává řadu důležitých funkcí. Mezi hlavní funkce patří izolace vnitřního vodného prostředí od vnějšího. Dále realizace transportu živin do prokaryotní buňky, respirační pochody, syntéza některých složek a sekrece látek z cytoplasmy do vnějšího prostředí (Votava, 2005; Kaprálek, 1999). V respiračních pochodech cytoplasmatická membrána nahrazuje bakteriím mitochondrie (Votava, 2005). Obecně se dá říci, že cytoplasmatická membrána je struktura, která určuje to, jak se buňka chová jako otevřený systém a která hraje podstatnou roli v proudění energie, látek a informace mezi buňkou a jejím okolím (Nečas, 2000).

Buněčná stěna je pevná vrstva, která chrání cytoplasmatickou membránu bakterií a také i celý obsah prokaryotní buňky (Votava, 2005). Buněčná stěna hraje roli vnější buněčné kostry a dává buňce její tvar. Stěna poskytuje bakterii jak mechanickou, tak i chemickou odolnost. Chrání ji tedy nejen proti zabití, ale také proti záření, vyschnutí nebo nepříznivým osmotickým podmínkám (Kaprálek, 1999). Základem stavby buněčné stěny je peptidoglykan, neboli murein, popřípadě mukopeptid. Peptidoglykan je složen z vrstev řetězců z polysacharidů, které jsou pospojované krátkými peptidy (Votava, 2005).

Nad buněčnou stěnou mohou mít některé bakterie navíc pouzdro, sliz nebo glykogalyx. Pouzdro a sliz mají u buňky ochrannou funkci. Glykogalyx buňce umožňuje specifickou i nespecifickou adheenci na povrchu a okolí. Některé druhy bakterií mohou mít na svém povrchu, kromě slizu, pouzdra nebo glykogalyxu, navíc ještě tzv. bílkovinnou S-vrstvu. S-vrstva tvoří pravidelnou monomolekulární dvourozměrnou mřížku (Kaprálek, 1999).

Dále se u vybraných druhů bakterií vyskytují i další struktury. Jsou to bičíky a pili (též fimbrie). Bičíky jsou dlouhé zvlněné vláknité útvary, které slouží k pohybu. Rozeznáváme na něm tři části – vlákno, kolénko a bazální tělísko. Vlákno je složeno

z opakujících se podjednotek bílkoviny, která se nazývá flagelin. Bazální tělísko se skládá z několika prstenců, které upevňují bičík v cytoplasmatické membráně a bakteriální stěně. Kolénko je tuhé, nachází se na povrchu bakterie a mění směr bičíku vystupujícího z buněčné stěny o 90°. Pili, neboli fimbrie, jsou tenké štětinovité výběžky. Vyskytují se většinou na povrchu gramnegativních bakterií. Usnadňují přichycení bakterií na povrch epitelu v dýchacím, střevním a urogenitálním ústrojí a viditelné jsou pouze elektronovým mikroskopem (Votava, 2005).

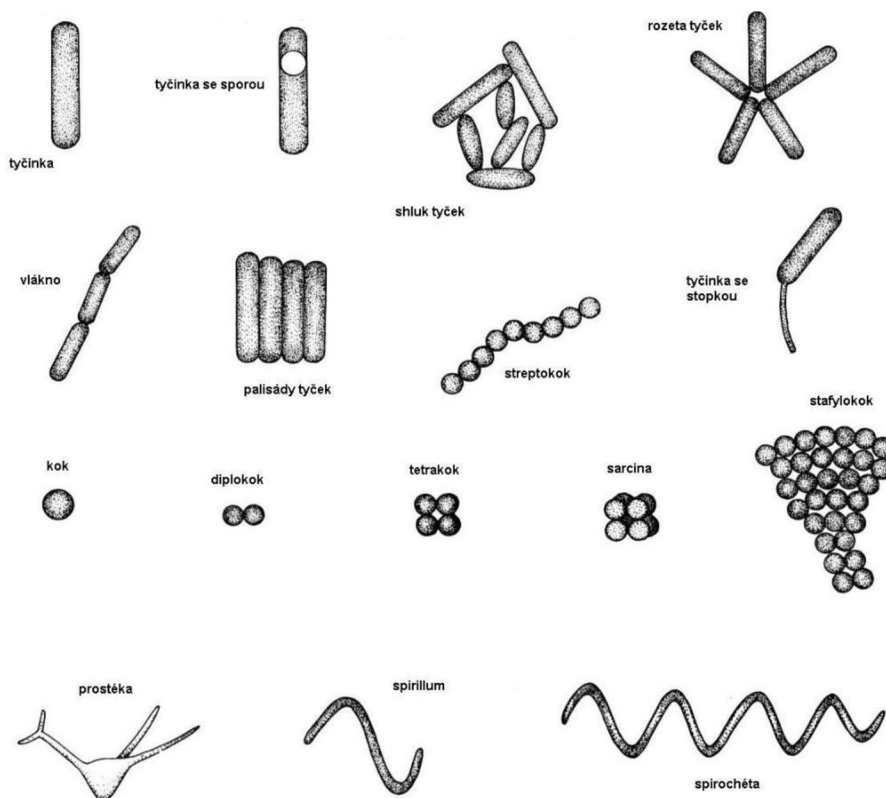


Obrázek 1 – Stavba prokaryotní buňky (Villarreal, 2008).

2.2.2 Velikost, tvary a uspořádání

Buňka bakterií je řádově menší než buňka eukaryotních organismů. Můžeme ji srovnat s velikostí mitochondrie (Kaprálek, 1999). Velikost bakterií se udává v mikrometrech. Nejmenší bakterie jsou stěží viditelné v mikroskopu, a naopak největší bakterie, což jsou nepatogenní spirochety, měří až 60 μm . Většina bakterií, které jsou patogenní pro člověka měří jen kolem 1 až 3 μm (Votava, 2005).

U bakterií se rozlišují dva základní tvary. Jsou buď kulovité (koky) nebo protáhlé (tyčinky). Krátké tyčinky se nazývají kokobacily nebo kokobakterie. Protáhlé tyčinky se označují jako vlákna, prohnuté jako vibria a spirálovitě zahnuté jsou spirochety. Koky ani tyčinky nemusí mít pravidelný tvar. Koky mohou být špičaté nebo zploštělé, tyčinky mohou mít vřetenovitý nebo kyjovitý tvar a některé se mohou dokonce i větvit (Votava, 2005). Koky mohou zůstat jako samostatné buňky nebo se po skončení buněčného dělení pasivně pospojují extracelulárním tmelem v tzv. řetízky (Kaprálek, 1999). Řetízky mohou být přibližně ze 3 až 20 koků. Koky spojené do dvojic se nazývají diplokoky, které jsou typické pro bakterie *Neisseria gonorrhoeae* nebo *Neisseria meningitidis*. Streptokoky jsou řetízky ze 4 a více koků. Dále se koky mohou vyskytovat uspořádané do čtveřic nebo tetrad. Tyto koky mají schopnost dělení se ve dvou rovinách. Stafylokoky jsou uspořádány jako shluky nebo hrozníčky. Dělí se ve zcela nepravidelných prostorových vztazích. Tyčinky jsou většinou uspořádány jednotlivě, případně ve dvojicích (diplobacily) nebo tvoří krátké řetízky (streptobacily). Některé tyčinky se vyskytují v podobě klád. Tomuto uspořádání se říká palisádovitě a vzniká díky schopnosti podélného dělení (Votava, 2005). Různé tvary a typy bakterií jsou vyobrazeny na obrázku (Obrázek 2).



Obrázek 2 – Tvary a typy bakterií (Říhová Ambrožová, 2006).

2.3 Rod *Streptococcus*

2.3.1 Morfologie

Rod *Streptococcus* je z taxonomického hlediska řazen do řádu *Lactobacillales* a čeledi *Streptococcaceae*. V současné době je do tohoto rodu zahrnuto přes 100 druhů streptokokových bakterií (Jorgensen et al., 2015). Bakterie rodu *Streptococcus* jsou řazeny mezi fakultativně anaerobní grampozitivní katalasa negativní koky s buňkami okrouhlého až ovoidního tvaru, které nejsou pohyblivé a netvoří spory (Klaban, 2001; Votava, 2003). Jejich název je tvořen ze dvou slov řeckého původu – *streptos* (řetízek) a *kokkos* (jádro). Po přeložení jejich názvu je již jasné, že jsou to bakterie, které se seskupují do řetízků různé délky (Klaban, 2001). U streptokoků rozlišujeme druhy, které jsou obligátně patogenní a ty, které jsou součástí normální mikroflóry sliznic lidí i zvířat (Votava, 2003).

2.3.2 Rozdělení

2.3.2.1 Klasifikace podle změn na krevním agaru

Streptokoky se rozdělují podle hemolýzy na alfa-hemolytické, beta-hemolytické a gama-hemolytické (Klaban, 2001). Hemolýza vzniká narušením červených krvinek působením hemolyzinů pod narostlou bakteriální kolonií nebo v jejím okolí (Amlerová a Fajfrlík, 2018).

Alfa hemolýza

Alfa hemolýza se projevuje jako zelené zbarvení kolem kolonií alfa-hemolytických neboli viridujících streptokoků, z lat. *viridis* = zelený (Klaban, 2001). Podstatou zbarvení je změna krevního barviva na zelený verdoglobin. Alfa-hemolýza se vyskytuje převážně u *Streptococcus pneumoniae* a u skupiny streptokoků viridujících v dutině ústní (Votava, 2003).

Beta hemolýza

Projevem beta-hemolýzy je odbarvení erytrocytů. Je rozdělována na úplnou nebo neúplnou. Úplná hemolýza nastává, pokud dojde ke kompletnímu odbarvení erytrocytů. Půda je v okolí hemolytické kolonie projasněná. Způsobuje ji *Streptococcus pyogenes* a beta-hemolytické streptokoky skupin C, G a F. Neúplná hemolýza nastává, pokud je

rozpad erytrocytů pouze částečný. K projasnění nedochází a půda zůstává zakalená. Typická je pro *Streptococcus agalactiae* (Votava, 2003).

Gama hemolýza

U gama hemolýzy streptokokové kolonie žádnou hemolýzu neprokazují a vzhled krevního agaru se v podstatě nemění (Klaban, 2001).

2.3.2.2 Klasifikace podle Lancefieldové

Rebecca Lancefield byla na počátku třicátých let průkopnicí v klasifikaci streptokoků. (Sitkiewicz a Hryniewicz, 2010). Tato žena prokázala, že většina patogenních streptokoků má specifické sacharidové antigeny, které umožňují klasifikaci streptokoků do skupin. Tyto streptokokové skupinové antigeny mohou být extrahovány z buněk a jejich přítomnost se může projevat latexovými částicemi, které dříve byly potaženy skupinově specifickými protilátkami. Tyto latexové částice mohou aglutinovat v přítomnosti homologního antigenu. Jestliže je homologní antigen nepřítomný, zůstanou v hladké suspenzi (OXOID CZ s.r.o., 2022). Skupinově specifický polysacharid C je důležitým kritériem pro dělení streptokoků. Tento polysacharid chybí pneumokokům a dalším viridujícím streptokokům. Lékařsky významné streptokoky obsahují antigeny A, B, C, D, F a G (Votava, 2003). Kmeny patřící do těchto séro skupin jsou převážně beta-hemolytické, ale vyskytují se v nich i streptokoky alfa-hemolytické nebo nehemolytické. Příkladem je *Enterococcus* a *Streptococcus bovis*, kteří beta-hemolytičtí nejsou, ale patří do skupiny D. Streptokokové skupiny A, C a G jsou často spojovány s klinickým onemocněním. Naproti tomu streptokoky skupiny B, D a F jsou komenzální, osídlují orální, genitální nebo střevní sliznici a patogenitu vykazují pouze, jestliže se nacházejí mimo jejich přirozené prostředí (Bio-Rad, 2017).

2.4 Streptococcus agalactiae

Streptococcus agalactiae je jediným druhem patřící do skupiny B dle Lancefieldové podle stěnového polysacharidového antigenu (Bednář et al., 1994; Votava, 2003). Jednotlivé bakteriální buňky jsou opouzdřené, kulatého nebo oválného tvaru. Velikost buněk se pohybuje v rozmezí 0,6-1,2 µm a vyskytují se velmi často v dlouhých řetízcích. Kolonie *Streptococcus agalactiae* rostou poměrně dobře v mléce, ve kterém velmi často tvoří až 0,5 % kyseliny mléčné (Klaban, 2001).

Taxonomie *Streptococcus agalactiae*:

doména: *Bacteria*

kmen: *Firmicutes*

třída: *Bacilli*

řád: *Lactobacilles*

čeleď: *Streptococcaceae*

rod: *Streptococcus*

(Sedláček, 2007).

2.4.1 Historie

Streptococcus agalactiae byl poprvé izolován z hovězího dobytka na konci 19. století. Byl označován jako původce bovinní mastitidy vyvolávající zánět mléčné žlázy. Již v minulosti byl znám pod názvem *Streptococcus mastitidis* (Jorgensen et al., 2015). Roku 1935 byl poprvé popsán výskyt *Streptococcus agalactiae* u člověka jako původce puerperální sepse. Za nejčastější příčinu života ohrožující infekce novorozenců je považován až od 70. let 20. století (Roztočil, 2017).

2.4.2 Antigenní struktura

Streptococcus agalactiae obsahuje nejen skupinově specifický stěnový antigen B, ale také typově specifický polysacharidový antigen (CPS), který je nazýván jako pouzderný neboli kapsulární (Dutra et al., 2014). Hlavní funkcí kapsulárního polysacharidu je

zapouzdření *Streptococcus agalactiae*, určuje sérotyp a je primárním faktorem virulence (Furfaro et al., 2018).

Podle typově specifických polysacharidových antigenů značených Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX a proteinových antigenů R, X je možné rozlišit dohromady 10 sérologických typů. Jejich rozpoznání je velmi důležité pro epidemiologii (Bednář, 1996). Epidemiologické určení sérotypů se může odlišovat v rámci určité populace nebo geografické oblasti (Dutra et al., 2014).

Sérotyp III je klinicky významný. U novorozenců způsobuje sepse nebo meningitidy. Dalším důležitým sérotypem u člověka je sérotyp V, neboť je více než polovina kmenů rezistentních k erytromycinu (Votava, 2003).

2.4.3 Virulence

Streptococcus agalactiae má mnoho faktorů virulence, mezi které se řadí povrchové proteiny, toxiny a hydrolytické enzymy (Eskandarian et al., 2015).

Povrchové proteiny fungují většinou jako adhesiny. Patří mezi ně C5a peptidáza (ScpB), protein, který váže laminin (Lmb), α a β -podjednotky C proteinu (Bca a Bac) a Rib proteinu. Adhesiny napomáhají bakteriím se vstupem do hostitelské buňky a podporují její nitrobuněčné přežívání (Eskandarian et al., 2015).

Streptococcus agalactiae vylučuje toxiny zvané beta-hemolysin/cytolysin (cylE), hyaluronidáza (hyle) a faktor CAMP (cfb). Tyto toxiny usnadňují vstup *Streptococcus agalactiae* do hostitelských buněk a podporují jeho intracelulární přežití (Eskandarian et al., 2015).

Velmi významným faktorem virulence je polysacharidové pouzdro. Pouzdro u sérotypu III obsahuje kyselinu N-acetylneuraminovou. Tato kyselina brzdí fagocytózu a aktivaci komplementu alternativní drahou (Votava, 2003).

2.4.4 Patogenita

Streptococcus agalactiae je podmíněným komezální patogenem u člověka. Je součástí normální flóry pochvy a gastrointestinálního traktu, který je přirozeným rezervoárem této bakterie. U citlivých jedinců může způsobit život ohrožující infekce (Yousefi Mashouf et al., 2014).

U kojenců je *Streptococcus agalactiae* nejčastější příčinou osteomyelitid, u starších dětí a dospělých osob je především původcem závažných onemocnění, jako je například cystitida a pyelonefritida. Mezi další infekce vyvolané touto bakterií patří pneumonie, endokarditidy, infekce ran, hnisavé artritidy, osteomyelitidy a zřídka meningitidy. *Streptococcus agalactiae* vzácně způsobuje i faryngitidy, ale jeho podíl na této nemoci není tak významný jako u *Streptococcus pyogenes* (Votava, 2003).

Největší riziko infekce je u těhotných žen. Asi 10-30 % těhotných žen má v pochvě nebo v konečniku pozitivní nález kolonií *Streptococcus agalactiae* a přibližně 50-70 % novorozenců je touto bakterií nakaženo přes porodní cesty během porodu. Kolonizace touto bakterií, vyskytující se na konci těhotenské fáze, je proto rizikovým faktorem pro neonatální infekci. Novorozenecké onemocnění bakterií *Streptococcus agalactiae* je častější než jiná známá onemocnění, jako jsou zarděnky či rozštěp páteře. Vlivem kolonizace může dojít u těhotné ženy k uretritidě (infekce uretrálního traktu), chorioamnionitidě (zánět plodových obalů), endometritidě (zánět sliznice děložní) nebo k bakteriémii (poporodní horečka). Následkem může být předčasný porod, nízká porodní hmotnost novorozence nebo v nejhorších případech jeho úmrtí (Yousefi Mashouf et al., 2014).

Novorozenecká infekce se podle nástupu klinických projevů objevuje ve dvou formách: časná a pozdní (Jorgensen et al., 2015).

2.4.4.1 Časná infekce

Časná forma infekce vzniká během porodu. Při předčasném odtoku plodové vody nebo až při průchodu plodu porodním kanálem. Infekce se projeví během pár hodin, maximálně 6 dní po narození (Votava, 2003). Hlavním rizikovým faktorem je kolonizace urogenitálního nebo gastrointestinálního traktu matky. V tomto případě se jedná o vertikální přenos infekční bakterie (Jorgensen et al., 2015). K nákaze dojde obvykle vdechnutím infikované plodové vody nebo během porodu při průchodu kolonizovanými porodními cestami (Musiorska et al., 2016).

Časná forma má těžší průběh než forma pozdní. Nejčastěji infekce nastává v průběhu 24 hodin života novorozence po porodu. Prvními příznaky infekce jsou změna barvy kůže novorozence na modrou, zvracení a poruchy dýchání, současně u novorozence vzniká seps s křečemi, tachykardií a leukopenií (Roztočil, 2017). Tyto příznaky jsou

následkem bakteriémie, pneumonie, meningitidy nebo septického šoku. Nezralí novorozenci jsou mnohem více ohroženi na životě. Úmrtnost je kolem 5 % (Votava, 2003).

2.4.4.2 Pozdní infekce

Pozdní infekce se objevují většinou až koncem prvního měsíce života dítěte. Dítě se ve více než v polovině případů nakazí až po porodu (Votava, 2003). Infekce je nozokomiálního charakteru. Vzniká horizontálním přenosem z matky prostřednictvím infikovaného mateřského mléka, od ošetřujícího personálu nebo od jiného novorozence (Julák, 2006; Roztočil, 2017). Pozdní infekce se projevuje jako hnisavá meningitida s tonicko-klonickými křečemi, která je doprovázena artritidou nebo osteomyelitidou. Následně může docházet až k trvalému poškození centrální nervové soustavy (Roztočil, 2017).

Pozdní infekce je vyvolaná obvykle serotypem III. Úmrtnost je více než 10 % (Votava, 2003).

2.4.5 Léčba

Lékem první volby, u infekcí vyvolaných *Streptococcus agalactiae*, je antibiotikum penicilin G. Alternativním antibiotikem je ampicilin (El Beitune et al., 2005).

Ženy, u kterých byl zachycen nález *Streptococcus agalactiae* se již během těhotenství neléčí. Léčba před porodem nesnižuje riziko onemocnění novorozence. Až u 70 % žen se i přes léčbu můžou kolonie *Streptococcus agalactiae* znovu vytvořit. Novorozenec může být nakažen. Proto je velmi důležité intravenózní podání antibiotik včas – ihned po odtoku plodové vody nebo po nástupu děložní činnosti (první dávka nejpozději 4 hodiny před porodem). Tímto je možné výrazně snížit riziko přenosu z matky na dítě (Davidková, 2012).

2.4.6 Prevence

K zabránění časnému nástupu onemocnění bakterií *Streptococcus agalactiae* u novorozenců, byly v roce 1996 uvedeny podle CDC (Centers for Disease Control and Prevention) dvě strategie vedoucí k identifikaci matek kolonizovaných tímto streptokokem. První strategie se týkala identifikace důležitých rizikových faktorů matky (rizikové předcházející těhotenství – potrat, předčasný porod). Druhá spočívala

v provedení screeningového kultivačního vaginálního vyšetření získaného od těhotných žen. Výtěr se provádí v období mezi 35. a 37. týdnem těhotenství (El Beitune et al., 2005).

Roku 2002 dalo CDC přednost druhé strategii. Kultivací se zabránilo vzniku 86 % případů časného onemocnění novorozenců. Identifikací rizikových faktorů bylo zabráněno pouze 68,8 % případům (El Beitune et al., 2005).

Záchyt *Streptococcus agalactiae* závisí nejen na době odběru, ale také na místě stěru. Správný stěr se provádí z dolní části pochvy a následně z rekta, kdy je nutné provést stěr za anální sfinkter. Tento způsob je značně významnější než stěr z děložního čípku (Jorgensen et al., 2015).

Výsledek standartního kultivačního vyšetření je znám do 48 hodin a jeho platnost je až 5 týdnů po odběru. Tomuto způsobu vyšetření se dává přednost před užitím tzv. rychlých diagnostických testů s vyšším rizikem falešně negativních výsledků. Rychlé diagnostické testy se používají v případě, kdy potřebujeme znát výsledek co nejdříve. Jestliže je výsledek kultivace screeningu *Streptococcus agalactiae* z pochvy pozitivní, lékař je povinen zaznamenat výsledek do těhotenského průkazu a rovněž o výsledku informovat pacientku. Dále je lékař povinen poučit pacientku o nutnosti příchodu k přijetí na porodní sál již před začátkem porodu či odtoku plodové vody, aby se včas mohla provést intrapartální antibiotická profylaxe v plném rozsahu (Měchurová et al., 2013).

Intrapartální antibiotická profylaxe je další metodou prevence žen kolonizovaných *Streptococcus agalactiae*. Jedná se o léčbu pacientky pomocí antibiotik. Antibiotikem první volby, u infekcí vyvolaných *Streptococcus agalactiae*, je penicilin G. Alternativním antibiotikem je ampicilin. Penicilin je vhodný zejména díky nízké ceně a také malé pravděpodobnosti vzniku rezistence (El Beitune et al., 2005). V počáteční dávce se aplikuje 5 milionů IU intravenózně, poté 2,5 milionů IU každé 4 hodiny do porodu. Jestliže žena neporodí do 8 hodin od první dávky, je doporučeno prodloužení podání penicilinu G 2,5 milionů IU každých 6 hodin do porodu. Při zjištění alergie na penicilin lze u pacientek s nízkým rizikem anafylaxe či nevěrohodnou alergickou anamnézou podat cefalosporiny 1. generace (cefazolin, cefalotin). U pacientek, kterým hrozí vysoké riziko anafylaxe lze intravenózně podat klindamycin nebo erytromycin. Vankomycin je „rezervní antibiotikum“, které je vyhrazeno pro pacientky s vysokým rizikem anafylaxe a prokázanou rezistencí k jiným antibiotikům. *Streptococcus agalactiae* si v České republice zachovávají citlivost především k základnímu penicilinu. Penicilinu by se mělo

i nadále v profylaxi dávat přednost před ampicilinem. Ampicilin je považován za alternativu penicilinu v určení profylaxe *Streptococcus agalactiae* (Měchurová et al., 2013).

Vakcinace je možnost prevence, která je prozatím ve fázi zkoumání (Kwatra et al., 2014). Vakcinace těhotných žen by mohla zabránit časným streptokokovým sepsím u novorozenců, a dále by mohla omezit kolonizaci matek zvýšením transplacentárního přenosu protilátek proti *Streptococcus agalactiae* na plod (Madzivhandila et al., 2011). Pro očkování je velmi důležitá charakterizace rozložení sérotypů *Streptococcus agalactiae* v různých světových regionech. Konjugované vakcíny s GBS kapsulárním proteinem jsou totiž sérotypově specifické (Kwatra et al., 2014). Ve vývoji je vakcinace proti sérotypům Ia, Ib, II, III a V (tyto kmeny jsou nejčastější příčinou streptokokových infekcí u dětí i dospělých) (Eskandarian et al., 2015).

2.5 Biologický materiál odebíraný pro izolaci *Streptococcus agalactiae*

Všechny těhotné ženy by měly podstoupit screening na přítomnost streptokokové infekce mezi 35. až 37. týdnem těhotenství. Výjimku mají pouze ženy se *Streptococcus agalactiae* pozitivní kultivací moče kdykoli v průběhu těhotenství. Kultivační materiál se odebírá pomocí výtěrového tamponu z postranních stěn dolní třetiny pochvy. Vzorky jsou umístěny do transportního média, tzv. Amiesovo médium (Měchurová et al., 2013). V tomto médiu je životnost *Streptococcus agalactiae*, při skladování v pokojové teplotě nebo v lednici do 4 °C, zachována až 48 hodin (Jorgensen et al., 2015).

2.6 Kultivace

Kultivace je nejdůležitější diagnostická metoda, která umožňuje přímý průkaz bakterií. Je považována za zlatý standard pro průkaz *Streptococcus agalactiae* z vaginálního stěru (Hálová, 2015). Cílem kultivace je získání čisté bakteriální kultury. Každá bakterie potřebuje různé podmínky pro její kultivaci. Důležitými podmínkami pro úspěšnou kultivaci je dostatek živin, optimální pH a vlhkost půdy, ideální teplota nebo délka kultivace (Hálová, 2015).

Streptococcus agalactiae je kultivačně náročný. Vyžaduje půdy, které jsou obohacené krví nebo sérem. Nejběžnějším a zároveň nejvhodnějším kultivačním médiem je krevní agar. Optimální teplota pro nárůst kolonií je 36 ± 1 °C po dobu 24 hodin (Jorgensen et al., 2015).

2.6.1 Půdy používané ke kultivaci *Streptococcus agalactiae*

Krevní agar

Na krevním agaru bakterie roste v lesklých šedobílých koloniích, které jsou mazlavé a obklopené úzkou zónou neúplné beta-hemolýzy, která není ostře ohraničená. Kolonie jsou mnohem větší než například u *Streptococcus pyogenes* (Jorgensen et al., 2015; Votava, 2003).

Granada agar

Granada agar je selektivní médium pro screening a přímou identifikaci streptokoků skupiny B (BioMérieux CZ s.r.o, 2022). *Streptococcus agalactiae* na tomto médiu vyrůstá v oranžově pigmentovaných koloniích (El Aila et al., 2010). Je používán pro typy vzorků, jako je například vaginální stěr u těhotných žen, gastrická tekutina novorozenců, nebo moč (BioMérieux CZ s.r.o, 2022). Sérum se kultivuje 18–24 hodin za anaerobních podmínek při teplotě 35 ± 2 °C (El Aila et al., 2010). V případě vysoké kolonizace je bakteriální kultura viditelná již po 4–6 hodinách (Votava et al., 2001).

ChromID Strepto B agar

Při kultivaci se často izoluje více druhů bakterií, používají se selektivní chromogenní půdy. Tyto půdy zabraňují růstu jiným mikroorganismům a dokážeme díky nim odlišit narostlé bakterie podle specifické barvy (El Aila et al., 2010).

ChromID Strepto B agar je selektivní chromogenní médium pro screening streptokoků skupiny B. Detekuje hemolytické a nehemolytické GBS. Je používán pro typy vzorků, jako je například vaginální stěr u těhotných žen, gastrická tekutina novorozenců, nebo moč. Inkubace je 18 až 24 hodin (BioMérieux CZ s.r.o, 2022).

ChromID Strepto B agar má oproti Granada agaru výhodu kultivace při aerobních podmínkách. *Streptococcus agalactiae* na něm vyrůstá v červených koloniích (El Aila et al., 2010).

2.6.2 Selektivní bujóny používané k pomnožení *S. agalactiae*

K pomnožení *Streptococcus agalactiae* se používají selektivní bujóny. Selektivní bujóny zvyšují záchyt *Streptococcus agalactiae* a zároveň zabraňují přerůstání ostatním bakteriím. Často se používá Todd-Hewittův bujón, který je obohacený kyselinou nalidixovou (15 µg/ml) a colistinem (10 µg/ml) nebo kyselinou nalidixovou (15 µg/ml) a gentamicinem (8 µg/ml). Dále se vyrábí pomnožovací média, která jsou komerčně dostupná, např. Trans-Vagův bujón s 5 % defibrinované ovčí krve nebo Lim bujón (Jorgensen et al., 2015).

2.7 Diagnostika

2.7.1 Mikroskopie

Při vyšetření pomocí mikroskopu lze v nativním preparátu obarveném dle Grama pozorovat modrofialové koky v řetízích. V praxi se většinou vyšetření pomocí mikroskopu neprovádí. Používá se hlavně v případě pochybností a nutnosti odlišit *Streptococcus agalactiae* od jiných bakterií (Jakeš, 2009).

Při podezření na přítomnost *Streptococcus agalactiae* se preparát zhotovuje z kultury, která narostla na agarové půdě, z kultury tekuté nebo z klinických vzorků (Hálová, 2015).

Barvení dle Grama

Gramovo barvení umožňuje dělit běžné bakterie na dvě skupiny – grampozitivní, barví se modře a gramnegativní, barví se červeně. Grampozitivní bakterie mají ve stěně tlustou vrstvu peptidoglykanu, která zabrání vymytí modrého barevného komplexu krystalviolet + jód z buňky acetonem. Gramnegativní bakterie mají tenkou vrstvu peptidoglykanu, acetonem se odbarví. Následně se dobarví zředěným karbolfuchsinem, aby byly vidět pod mikroskopem červeně. Objevitel Hans Christian Gram chtěl vyvinout barvení, které v infekčním vzorku barevně odliší všechny přítomné bakterie od napadené tkáně. To se mu nezdařilo (gramnegativní bakterie jsou stejně červené, jako buňky tkáně). Jiní badatelé však jeho barvení začali používat ke třídění bakterií na grampozitivní a gramnegativní. K barvení se využívá několik reagensů – krystalová violet, Lugolův roztok, aceton a karbolfuchsin (Votava, 2010).

2.7.2 *CAMP test*

CAMP test je jednoduchý diagnostický test na průkaz hemolytického synergismu beta-hemolyzinu *Staphylococcus aureus* a CAMP-faktoru *Streptococcus agalactiae*. Použití testu je využitelné u řady vyšetření infekčního biologického materiálu (UNILAB s.r.o., 2013).

Na krevní agar nebo Columbia agar s beraní krví je naočkovaný zkoumaný kmen beta-hemolytického streptokoka a v pravém úhlu následně známý kmen *Stafylococcus aureus*, který produkuje beta-hemolyzin. V místě přiblížení dochází, v případě přítomnosti *Streptococcus agalactiae*, k zesílení hemolýzy motýlovitého tvaru (UNILAB s.r.o., 2013).

Jestliže je intenzita hemolýzy účinkem *Stafylococcus aureus* zesílena, znamená to, že CAMP-test je pozitivní. K tomuto dochází díky tomu, že tzv. CAMP-faktor *Streptococcus agalactiae* se váže na membránu červených krvinek, která je narušená stafylokokovou sfingomielinasou C, což vede k rozpadu červených krvinek. Pozitivitu v CAMP-testu si zachovává i malé procento kmenů, u kterých k hemolýze nedochází. Většina kmenů tvoří za anaerobních podmínek a za přítomnosti škrobu oranžový pigment. Mnoho kmenů roste, jestliže se v jejich přítomnosti vyskytuje žluč, všechny hydrolyzují hippurát sodný a většina je odolná proti bacitracinu. Na rozdíl od enterokoků, PYR test a eskulin jsou negativní. (Votava, 2003).

U beta-hemolytických streptokoků ostatních skupin (A, C, D, F a G), které neprodukují lytický CAMP-faktor, nedochází k zesílení hemolýzy motýlovitého tvaru. Znamená to, že CAMP-test je negativní (UNILAB s.r.o., 2013).

2.7.3 *Latexová aglutinace*

Latexová aglutinace je metoda používaná k identifikaci streptokoků skupin A, B, C, D, F a G (El Beitune et al., 2005). Je to nejčastěji používaná metoda sérotypizace *Streptococcus agalactiae*, která je založená na polyklonálních protilátkách specifických pro 10 uznaných kapsulárních polysacharidů, tj. sérotypů Ia, Ib a II až IX (Yao et al., 2013). Je to velmi spolehlivý test s téměř 100 % citlivostí i specifíčností, jehož inkubace je pouze 10 minut (El Beitune et al., 2005).

Streptococcus agalactiae obsahuje skupinově specifický polysacharid C. Díky tomuto antigenu se řadí do antigenní skupiny B podle Lancefeldové (Votava, 2003).

Identifikace *Streptococcus agalactiae* latexovou aglutinací probíhá za reakce extrahovaného antigenu z buněčné stěny se specifickými protilátkami navázanými na latexové částice. Přítomnost antigenu se projeví tvorbou viditelných shluků. Výhodou této metody je jednoduché a rychlé provedení pomocí komerčně dostupných souprav (Jorgensen et al., 2015).

2.7.4 Hmotnostní spektrometrie

Fenotypová mikrobiální identifikace může být limitující a často časově velmi náročná. Hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF je proto v laboratoři klinické mikrobiologie brána jako rychlá metoda, používající se pro identifikaci široké škály kolonií bakterií. MALDI je zkratka pro matrici, která napomáhá při desorpci a ionizaci vysoce bohatých bakteriálních proteinů prostřednictvím energie z laseru (Jorgensen et al., 2015).

Mikroorganismy identifikované pomocí hmotnostní spektrometrie se izolují rozetřením mikrobiální kultury na agarovou destičku. Použit lze selektivní médium, které zajistí izolaci vybraných mikroorganismů. Vzorek připravený na testování (individuální kolonie z kultivační destičky nebo buněčný extrakt) je přenesen na vybranou pozici na nosiči MALDI (IVD Maldi biotyper, 2011).

Nosič MALDI je vysušen vzduchem a přidán na matrici. Jako matrice se používá kyselina kyanoskořicová. Proteiny z mikroorganismů jsou extrahovány standartním roztokem v matričním roztoku. Mezi extrahovatelné proteiny patří zejména ribozomální proteiny, které mikroorganismy obsahují ve vysokých koncentracích. Poté, co matrice zkrystalizuje a je kompletně vysušená, je nosič MALDI připraven k analýze příslušným přístrojem, například MBT Compass IVD (IVD Maldi biotyper, 2011).

Vzorky jsou analyzovány pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI („matrix assisted laser desorption/ionization“ – matricí podporovaná laserová desorpce/ionizace) TOF („time of flight“ – doba letu). Laser v hmotnostním spektrometru MALDI-TOF ozařuje bod v suché matrici zaostřeným intenzivním zábleskem UV záření, což způsobí rychlé odpaření matrice a proteinů. To vede k uvolnění neporušených kladně nabitých proteinů a peptidů, tzv. „měkká“ ionizační metoda (IVD Maldi biotyper, 2011).

Tyto ionty se na krátké vzdálenosti elektrostaticky urychlují a do průletové trubice přicházejí rychlostí závisící na hmotnosti. Proteiny a peptidy se hmotnostně odlišují, a proto ionty přicházejí do detektoru v různých momentech, tudíž mají různou dobu letu. Hmotnostní spektrometr měří čas mezi pulzním urychlením a příslušným signálem detektoru na úrovni mikrosekund. Rychlost je převáděna na přesnou molekulární hmotnost (IVD Maldi biotyper, 2011).

2.7.5 PCR

PCR neboli polymerázová řetězová reakce je nekultivační metoda pro detekci *Streptococcus agalactiae* (El Beitune et al., 2005).

Principem metody PCR je denaturace dvouvláknové DNA při vysoké teplotě a následná renaturace při zachování pravidel komplementarity bází. Oligonukleotidové sondy sloužící jako primery pro vytvoření nových vláken DNA jsou důležitou součástí PCR (Bartůňková a Paulík, 2011).

Největšími výhodami PCR je její vysoká citlivost, která překračuje 97 %, specifita dosahující téměř 100 % a rychlost provedení přibližně do 45 minut (El Beitune et al., 2005).

Metoda PCR je často používána pro zjištění kolonizace *Streptococcus agalactiae* při porodu. Tato metoda ale nemůže nahradit běžné kultivační metody, které jsou nezbytné ke stanovení citlivosti na antibiotika (Jorgensen et al., 2015).

2.7.6 Bacitracinový test

Bacitracin je polypeptidové antibiotikum. Test se používá pro předpokládanou identifikaci a diferenciaci beta-hemolytických streptokoků skupiny A od jiných beta-hemolytických streptokoků. Používá se také k odlišení druhů stafylokoků od mikrokoků (Aryal, 2022).

Antibiotikum bacitracin inhibuje syntézu bakteriálních buněčných stěn tím, že narušuje syntézu bakterií peptidoglykanem (Aryal, 2022).

Disk impregnovaný malým množstvím bacitracinu (0,04 IU) se umístí na krevní agar, což umožňuje antibiotiku prostupovat do média a zabránit růstu citlivých mikroorganismů. Po inkubaci se naočkované plotny s disky odečítají. Odečítá se velikost vzniklé inhibiční

zóny v okolí bacitracinového disku. Pokud patogen doroste až k okraji disku bez inhibiční zóny, znamená to, že je rezistentní vůči bacitracinu (Aryal, 2022).

2.7.7 Biochemické reakce

2.7.7.1 PYR test

PYR (Pyrrolidonyl Aminopeptidase) test se používá pro detekci pyrrolidonylpeptidázové aktivity charakteristické u *Streptococcus pyogenes* (streptokok skupiny A) (Aryal, 2022).

Principem PYR testu je odlišení *Streptococcus pyogenes* a enterokoků, které jsou pyrrolidonylpeptidáza pozitivní, od *Streptococcus agalactiae*, který je pyrrolidonylpeptidáza negativní. Enzym L-pyrrolidonyl arylamidáza hydrolyzuje substrát L-pyrrolidonyl- β -naftylamidu za vzniku beta-naftylaminu. Substrát je rozpoznávaným enzymem hydrolyzován. Po přidání N, N-methylaminocinnamaldehydového činidla vznikne v místě testované oblasti červená sraženina (Aryal, 2022).

Pozitivita PYR testu se prokáže jasně růžovou nebo třešňově červenou barvou během 1-2 minut. U negativního testu se změna barvy neprojeví (Aryal, 2022).

2.7.7.2 Stanovení oxidázové aktivity

Oxidázový test se používá ke stanovení obsahu enzymu cytochrom oxidázy, který může organismus obsahovat. Enzym katalyzuje transport elektronů mezi donory elektronů v bakteriích a redoxním barvivem tetramethyl-p-fenylendiaminem. Barvivo je redukováno na tmavě fialovou barvu. Oxidáza pozitivní jsou například některé gramnegativní tyčky, *Campylobacter*, *Neisseria* a streptokoky včetně *Streptococcus agalactiae* jsou oxidáza negativní (Aryal, 2022).

2.7.7.3 Kataláza

Tento test detekuje přítomnost katalázy. Kataláza je enzym, který urychluje uvolňování kyslíku z peroxidu vodíku. Tento enzym zprostředkovává rozklad peroxidu vodíku na kyslík a vodu. Přítomnost enzymu v bakteriálním izolátu se projeví bubláním uvolněného kyslíku. Nedostatek katalázy se projevuje nedostatečnou nebo slabou produkcí bublin. Kultura by neměla být starší než 24 hodin. Tento test se používá k odlišení bakterií, které jsou kataláza pozitivní – stafylokoky od bakterií kataláza negativních – streptokoky (Aryal, 2022).

2.8 Stanovení citlivosti *S. agalactiae* k antibiotikům

Citlivost na antibiotika můžeme stanovit několika metodami:

- disková difúzní metoda (inhibiční zóny)
- diluční metoda v bujónu (MIC)
- gradientová difuzní metoda v gradientu (E-test)

(Bednář, 2009).

2.8.1 Disková difúzní metoda

Diskový difúzní test je nejběžnější metodou pro stanovení citlivosti kmene k antibiotiku. Výsledek se vyhodnocuje jako citlivý nebo rezistentní. Záleží na tom, zda je průměr inhibiční zóny kolem disku na tuhé půdě alespoň stejný, nebo naopak menší než stanovená hranice. Jde o kvalitativní metodu (Bednář, 2009).

Na agar je rovnoměrně naočkována suspenze bakterií. Disky se rozmístí a nechají inkubovat 18-24 hodin při 37 °C (Schindler, 2014). Antibiotikum difunduje z disku položeného na povrch naočkované agarové půdy. Bakterie, které jsou přítomné, se množí. Poblíž disku se postupem času v důsledku přílivu antibiotika a podle stupně své citlivosti množství přestávají. Hodnocení probíhá na základě měření velikosti inhibičních zón. Následně se velikost inhibičních zón porovnává s referenčními hodnotami (Bednář, 2009).

Na velikosti zóny má vliv citlivost a rychlost množení kmene, fyzikální vlastnosti antibiotika a půdy nebo tloušťka půdy. Čím se bakterie množí pomaleji, tím je zóna při stejné citlivosti kmene větší. Univerzální hraniční průměry inhibičních zón pro jednotlivá antibiotika nelze stanovit (Bednář, 2009).

2.8.2 Diluční metoda v bujónu (MIC)

Diluční metoda je kvantitativní a je používána ke stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC), nebo minimální baktericidní koncentrace (MBK) (Bednář, 2009).

Antibiotika jsou ředěna geometrickou řadou. Roztok antibiotika o známé koncentraci je postupně ředěn tekutým bujonem do mikrotitračních destiček. Růst bakterie se projeví zákalem a v případě inhibice bakterie antibiotiky zákal zmizí. Jamku, ve které dojde

k zastavení růstu je hodnocena jako MIC (minimální inhibiční koncentrace) (Bednář, 2009).

2.8.3 Gradientová difuzní metoda v gradientu (E-test)

E-test je kvantitativní metoda. Jedná se o proužek porézního papíru s postupnou klesající koncentrací antibiotika (Schindler, 2014). Kolem proužku se po inkubaci vytvoří kapkovitá inhibiční zóna a zkoumá se místo, kde okraj zóny protne okraj proužku. E-test je vynikající předpovědí MIC, ale jeho použití není tak časté kvůli vysoké ceně (Bednář, 2009).

2.9 Rezistence na antibiotika

Antibiotická rezistence je charakterizována jako přizpůsobení se a získání necitlivosti vůči určitému druhu antibiotika. Aby bylo antibiotikum účinné, je nutné, aby proniklo přímo do konkrétní bakteriální buňky, která se ale dokáže bránit různými rezistenčními mechanismy. Mezi mechanismy rezistence řadíme například změnu struktury cílového receptoru, činnost bakteriálních enzymů inhibující nebo destruktivní účinek antibiotika. Dále mohou mít omezenou nebo zcela znemožněnou schopnost proniknutí do bakteriální buňky (Simon a Stille, 1998).

Bakterie se adaptují na prostředí tím, že přetváří svůj genetický profil. Jedná se například o chromozomální mutace, které vznikají samovolně. Chromozomální mutace nejsou podmíněny přítomností antibiotika, na rozdíl od rezistence získané z extrachromozomální plazmidové informace. Nositelem genetické informace, včetně informace o rezistenci na antibiotika, jsou malé molekuly DNA kruhového tvaru vyskytující se v cytoplasmě bakterií, tzv. plazmidy. Ve struktuře plazmidů se vyskytují fragmenty DNA. Ve fragmentech DNA jsou zakódovány i mechanismy rezistence (Simon a Stille, 1998).

Streptococcus agalactiae je citlivý na mnoho druhů antibiotik. Nejvyšší citlivost prokazuje zejména na beta-laktamová antibiotika. Mezi tyto antibiotika se řadí například penicilin a ampicilin ze skupiny penicilinů (El Beitune et al., 2005). V posledních letech, podle CDC, roste rezistence k erytromycinu a klindamycinu (Back et al., 2012).

3 Cíle a výzkumné otázky

3.1 Cíle práce

1. Seznámení se s problematikou onemocnění bakterií *Streptococcus agalactiae* a možnostmi její laboratorní diagnostiky.
2. Provedení screeningového kultivačního vyšetření výtěrů z pochvy těhotných žen, v případě positivity sledování rezistence na různá antibiotika a následné zpracování dat vzorků s pozitivním nálezem z gynekologických ambulancí.

3.2 Výzkumné otázky

1. Jak může pozitivní nález *Streptococcus agalactiae* u těhotné ženy ovlivnit vývoj plodu a následně také vývoj narozeného dítěte?
2. Proti jakým antibiotikům je nejčastěji *Streptococcus agalactiae* rezistentní?

4 Metodika

4.1 Odběr a transport vzorků

Odběr materiálu pro vyšetření přítomnosti *Streptococcus agalactiae* provádí gynekolog pomocí výtěrového tamponu z pochvy a děložního hrdla. Vzorky jsou umístěny do transportního média, Amiesovy půdy, což je médium tuhé konzistence průhledné nebo černé barvy. Amiesova půda černé barvy obsahuje navíc aktivní uhlí. Vzorek je společně se žádankou okamžitě odeslán do mikrobiologické laboratoře UNILAB s.r.o. V laboratoři je ještě tentýž den vzorek zpracován. Výtěr lze před transportem skladovat maximálně 48 hodin při pokojové teplotě.

4.2 Příprava kultivačních půd v laboratoři

Přípravu některých kultivačních půd si laboratoř UNILAB s.r.o. provádí sama. Při přípravě dehydrovaných komerčních půd je důležité dodržet přesný návod od výrobce. Je třeba zdokumentovat všechny významné údaje.

Důležité údaje:

- objem
- pH
- datum přípravy
- druh půdy
- šarže dehydrované půdy
- podmínky sterilizace
- růstové vlastnosti
- sterilita připravených půd
- jméno pracovníka

Při přípravě půd z jednotlivých složek je třeba přesně dodržet recepturu a zaznamenat všechny podrobnosti. Další velmi důležitá informace je úplná identita všech použitých složek neboli číslo šarže. Sterilizace vlhkým teplem je prováděna v autoklávu při $121\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$.

4.2.1 Brain Heart Infusion agar (BHI agar)

BHI agar je lehce nažloutlá tekutá půda. Jde o velmi výživné médium určené k pěstování patogenních mikrobů a přípravě suspenze pro stanovení citlivosti na antibiotika. Je důležité, aby měl agar hodnotu pH mezi 7,2 – 7,6. V laboratoři UNILAB s.r.o. je tato půda připravována zdravotní laborantkou.

Složení BHI agaru:

- telecí mozek, infuze – 7,5 g/l
- hovězí srdce, infuze – 10,0 g/l
- proteosový pepton – 10,0 g/l
- agar – 15,0 g/l
- glukóza – 2,0 g/l

- NaCl – 5,0 g/l
- Na₂HPO₄ – 2,5 g/l

BHI agar je připraven z 52 g základu potřebných surovin, které jsou suspendovány v 1 litru destilované vody. Připravené zkumavky se naplní vzniklou tekutinou a následuje sterilizace v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut.

4.2.2 *Mueller-Hinton agar obohacený 5 % beraní krve (MH agar)*

Mueller-Hinton agar je v laboratoři používán pro zjišťování běžných, rychle rostoucích bakterií, citlivých k antimikrobiálním látkám, metodou diskového difuzního testu. Jedná se o agar červené barvy, polotuhé konzistence. Je důležité, aby měl agar hodnotu pH mezi 7,1 – 7,5. V laboratoři UNILAB s.r.o. je tato půda připravována zdravotní laborantkou.

Složení Mueller-Hinton agaru:

- hovězí maso, infuze – 3,0 g/l
- kyselý kaseinový hydrolyzát – 17,5 g/l
- škrob – 1,5 g/l
- agar – 15,0 g/l
- sterilní beraní krev

Mueller-Hinton agar je v laboratoři připraven z 37 g základu, který se suspenduje v 1 litru destilované vody. Je důležité, aby se všechny složky nechaly rozpustit. Následně probíhá sterilizace v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut. Je nutné nechat směs vychladnout. Až když bude mít agar teplotu 50 °C, může se do něj přidat 5 % sterilní beraní krve a opatrně rozplnit do petriho misek. V případě, že se na povrchu vytvoří vzduchové bubliny, je nutné po agaru přejet plamenem a tím bubliny odstranit.

4.2.3 *Krevní agar se 7 % beraní krve*

Krevní agar je v laboratoři velmi významnou půdou pro průkaz *Streptococcus agalactiae*. Používá se pro získání čisté bakteriální kultury, která je potřebná pro detekci dalšími metodami. Jedná se o agar červené barvy, polotuhé konzistence. Je důležité, aby měl agar hodnotu pH mezi 7,1 – 7,5. V laboratoři UNILAB s.r.o. je tato půda připravována zdravotní laborantkou.

Složení krevního agaru:

- speciální pepton – 23,0 g/l
- škrob – 1,0 g/l
- NaCl – 5,0 g/l
- agar – 10,0 g/l
- sterilní beraní krev

Krevní agar je v laboratoři připraven z 39 g základu, který se suspenduje v 1 litru destilované vody. Je důležité, aby se všechny složky nechaly rozpustit. Následně probíhá sterilizace v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut. Je nutné nechat směs vychladnout. Až když bude mít agar teplotu 50 °C, může se do něj přidat 7 % sterilní beraní krve a opatrně rozplnit do petriho misek. V případě, že se na povrchu vytvoří vzduchové bubliny, je nutné po agaru přejít plamenem a tím bubliny odstranit.

4.3 Kultivace

Přístroje, pomůcky a spotřební materiál:

- kultivační půdy/pomnožovací bujóny
- PC s programem LIS LABINA
- termostat 36 ± 1 °C
- CO₂ termostat 36 ± 1 °C
- chladnička LIEBHERR
- plastový stojánek na vzorky
- automatická pipeta
- sterilní jednorázové plastové pipety
- sterilní jednorázové bakteriální kličky
- sterilní injekční jehly
- špičky na automatickou pipetu
- další zařízení/spotřební materiál dle aktuální potřeby

Vaginální výtěry určené pro průkaz přítomnosti *Streptococcus agalactiae*, které laboratoř přijala, jsou naneseny odběrovým tamponem na krevní agar se 7 % beraní krve. Sterilní bakteriologickou kličkou je biologický materiál rozočkován po části krevního agaru. Následně se přidá čára *Staphylococcus aureus*, na kterou je položen disk bacitracin H. Disk s bacitracinem H slouží k identifikaci hemofilů. Přibližně 1 cm od čáry *Staphylococcus aureus* se umístí disk amikacin 30 µg, který umožňuje selektivní růst streptokoků.

Krevní agar je kultivován 24 hodin při 37 °C v aerobním prostředí se zvýšenou tenzí CO₂. Následně je výtěr zalomen do BHI bujónu a stejně, jako krevní agar, kultivován 24 hodin při 37 °C. Po uplynutí času kultivace je provedeno vyhodnocení vysokoškolským pracovníkem. Na agaru se hodnotí nárůst beta-hemolytických kolonií (Obrázek 3). V případě pozitivního nálezu je kolonie izolována do druhého dne a dále je provedena latexová aglutinace nebo CAMP test. Výsledkem latexové aglutinace je tvorba viditelných shluků s latexovou suspenzí B podle Lancenfieldové. Výsledkem CAMP testu je zesílení hemolýzy motýlovitého tvaru. Jestliže se prokáže pozitivita na *Streptococcus agalactiae*, je stanovena citlivost nebo rezistence na vybraná antibiotika. Citlivost a rezistence se v laboratoři UNILAB s.r.o. stanovuje pomocí diskového

difúzního testu na Mueller-Hintonově agaru s 5 % beraní krve. Kultivační půdy jsou připravovány z komerčních agarových základů.



Obrázek 3 – Narostlá kultura GBS (zdroj vlastní).

4.4 Latexová aglutinace

Diagnostická souprava:

- Oxoid Streptococcal Grouping Reagents

Tato diagnostická souprava obsahuje:

- latexová reagencie skupiny A
- latexová reagencie skupiny B
- latexová reagencie skupiny C
- latexová reagencie skupiny D
- latexová reagencie skupiny F
- latexová reagencie skupiny G
- polyvalentní pozitivní kontrola
- extrakční enzym
- jednorázové reakční destičky

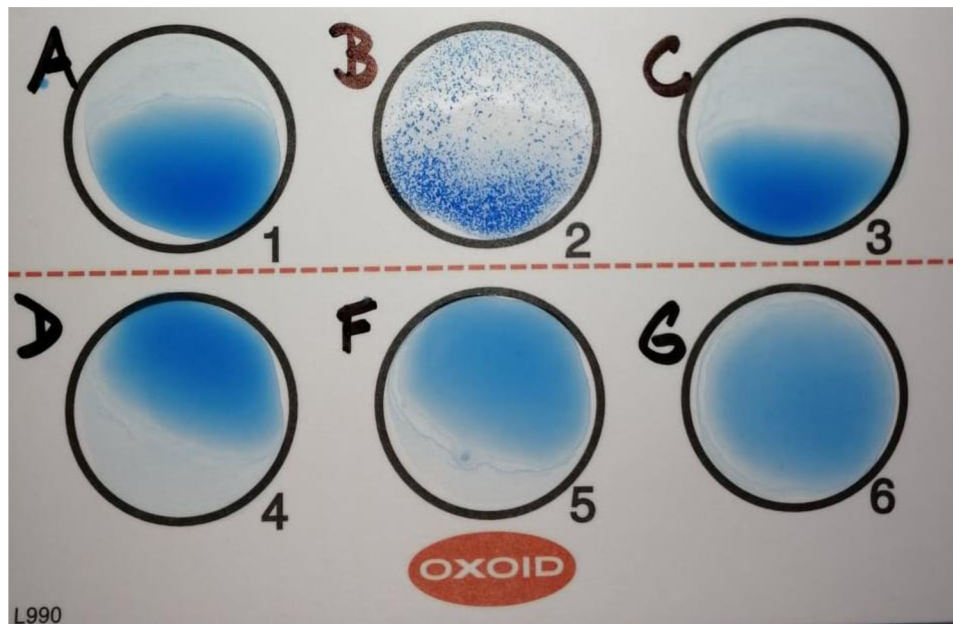
Přístroje a pomůcky:

- krevní agar se 7 % beraní krve
- extrakční činidlo
- PC s programem LABINA
- zkumavky
- sterilní bakteriologické kličky
- míchací tyčinky

K testování pomocí latexové aglutinace lze použít pouze čistá bakteriální kultura beta-hemolytického streptokoka.

Před použitím se nechají všechny reagencie vytemperovat na laboratorní teplotu. Do zkumavky se nakapají 4 kapky extrakčního činidla, do kterých je přidáno 2–5 kolonií čisté kultury testovaného *Streptococcus agalactiae*, který byl izolován na krevním agaru s 7 % beraní krve. Zkumavka je inkubována 15 minut při 37 °C. Po uplynutí času inkubace se na aglutinační kartičku nakape 1 kapka latexové suspenze modré barvy. Latexová suspenze obsahuje protilátky proti jednotlivým skupinám streptokoků (A, B, C, D, F a G). Proti *Streptococcus agalactiae* je použita latexová suspenze s protilátkami proti

streptokokům skupiny B. Roztok činidla a kultury je pomocí sterilní bakteriologické kličky přidán k suspenzi na aglutinační destičce a jsou řádně smíchány míchacími tyčinkami. Aglutinační destičkou je třeba kývat tak, aby došlo k důkladnému promíchání a zároveň je třeba pozorovat, zda dochází k viditelné aglutinaci. Jestliže k aglutinaci dojde, vzorek je pozitivní na *Streptococcus agalactiae* (Obrázek 4). Jestliže nedojde, znamená to, že je vzorek negativní. Výsledek provedené aglutinace hodnotí zdravotní laborantka, která ho zapíše do laboratorního informačního systému LABINA.



Obrázek 4 – Latexová aglutinace, negativní výsledek viditelný u antigenů F, D, C, B a A, pozitivita u antigenu B (*Streptococcus agalactiae*) (zdroj vlastní).

4.5 Mikroskopie

Diagnostické soupravy:

- GRAM – sada roztoků pro barvení mikroskopických preparátů podle Grama od firmy TEST-LINE s.r.o.

Sada roztoků GRAM obsahuje:

- roztok krystalové violeti
- roztok šřavelanu amonného
- lugolův roztok
- roztok karbol-fuchsinu
- neutrální destilovaná voda
- alkoholický roztok acetonu

Přístroje, pomůcky a spotřební materiál:

- PC s programem LABINA
- mikroskop
- plynová pistole na propan-butan
- plastové vaničky s víčkem na barvicí roztoky
- plastové držáky na podložní skla
- imerzní olej v kapací lahvičce
- podložní sklíčka
- zkumavka s fyziologickým roztokem
- sterilní jednorázové bakteriologické kličky
- sterilní vatové tampony

Nejprve proběhne příprava pracovních roztoků. Je připraven roztok krystalové violeti a šřavelanu amonného v poměru 1:4, lugolův roztok v pracovním ředění, alkoholický roztok acetonu s alkoholem v poměru 1:1 a karbol-fuchsin, který je ředěn destilovanou vodou v poměru 1:9.

Preparáty pro průkaz *Streptococcus agalactiae* pomocí mikroskopie se vytváří z vaginálního stěru. Vatový tampon s biologickým materiálem se jemným rolováním nanese přímo na vyznačené místo na podložním sklíčku. Připravený preparát je nutné

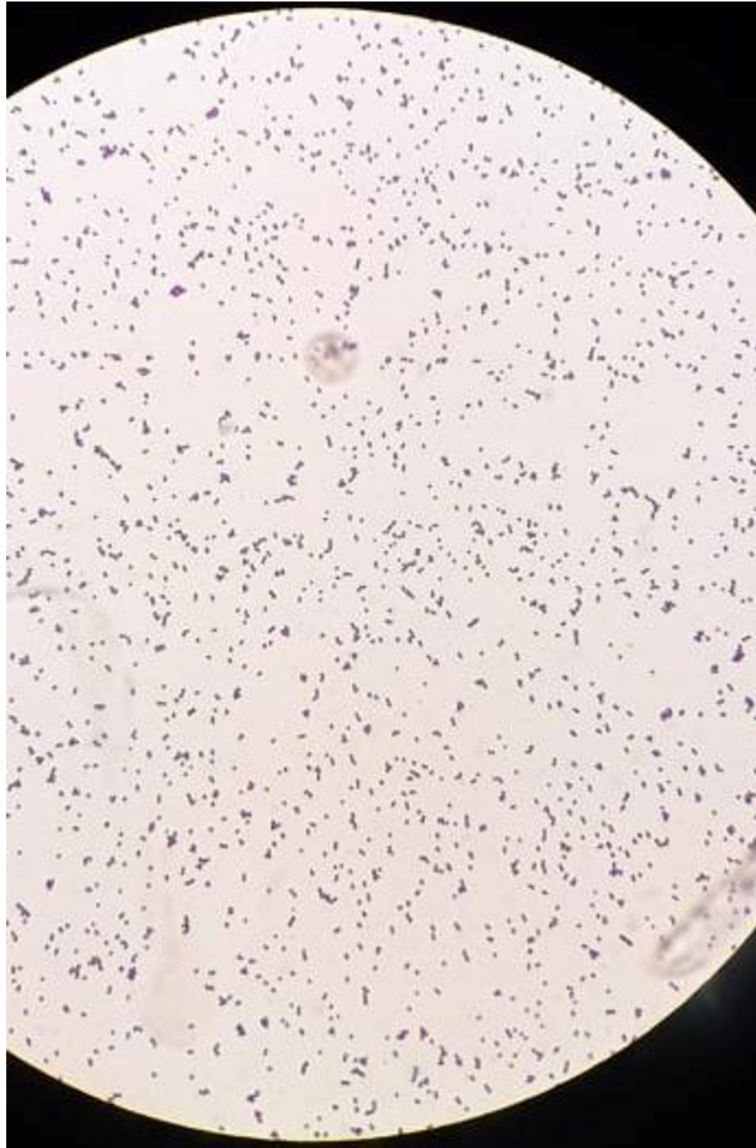
nechat zaschnout a zafixovat nad zapáleným plynovým kahanem. Zafixovaný a vychladlý preparát se společně s ostatními vloží do plastového držáku na podložní skla.

Dalším krokem je provedení barvení dle Grama. Barvení je prováděno postupným ponořováním držáku s preparáty do plastových vaniček s barvicími roztoky. Nejprve se preparáty ponoří do roztoku krystalové violeti a šřavelanu amonného v poměru 1:4 a nechají se 20 sekund působit. Po uplynutí 20 sekund se preparát opláchne destilovanou vodou. Druhým krokem je lugolův roztok, který se nechá působit 20–30 sekund a následně se opláchne destilovanou vodou. Následuje odbarvení alkoholickým roztokem acetonu. Preparáty se roztokem acetonu oplachují tak dlouho, dokud pouští barvivo (asi 20-30 sekund). Jakmile je hotovo, následuje další oplach destilovanou vodou. Posledním krokem je dobarvení karbol-fuchsinem. Karbol-fuchsin se nechá působit přibližně 1 minutu a následně se přebytečné barvivo opláchne. Obarvené preparáty se nechají ve stojánku oschnout. Oschlé preparáty jsou připravené k mikroskopování. Mikroskopuje se za použití imerzního oleje ve zvětšení 10x 100.

Bakterii *Streptococcus agalactiae* je v mikroskopu možné pozorovat, jako grampozitivní koky s buňkami okrouhlého až ovoidního tvaru, které nejsou pohyblivé a netvoří spory. Jednotlivé koky se shlukují do řetízků. Struktura *Streptococcus agalactiae* je znázorněna na obrázku (Obrázek 5).

Mikroskopické zhodnocení preparátu provádí vysokoškolský pracovník v oboru mikrobiologie, který zapíše výsledky do laboratorního informačního systému LABINA k příslušnému vyšetření biologického materiálu.

Správnost výsledků za použití metody mikroskopie může ovlivnit několik faktorů. Je třeba dávat pozor hlavně na dodržení potřebné doby barvení, teploty barvení a správného postupu.



Obrázek 5 – Mikroskopický preparát čisté kultury *Streptococcus agalactiae*

4.6 CAMP test

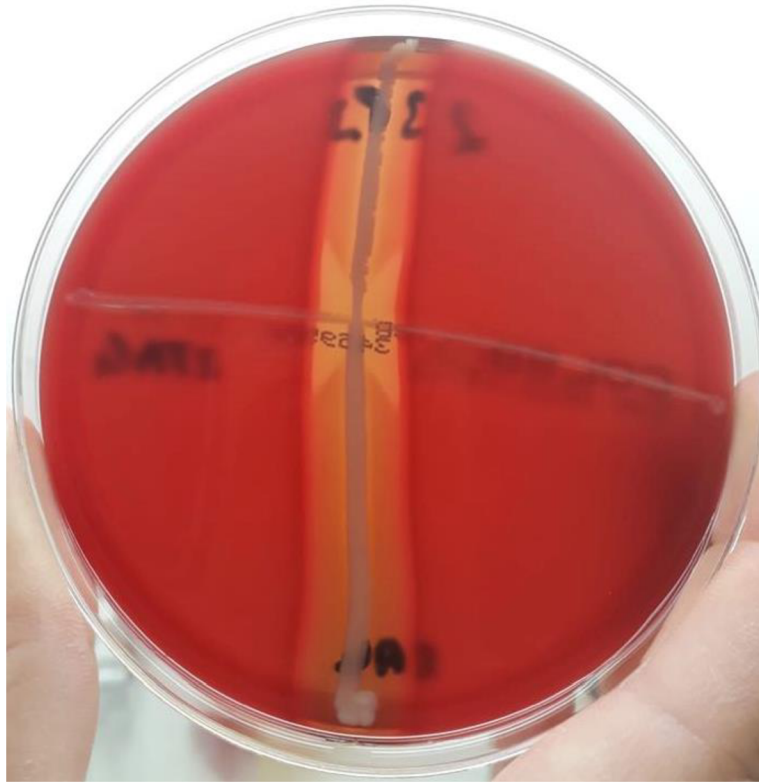
Přístroje a pomůcky:

- krevní agar se 7 % beraní krve
- kultura *Stafylococcus aureus*
- PC s programem LABINA
- CO₂ termostat 36 ± 1 °C
- sterilní jednorázové bakteriologické kličky

Na plotnu s krevním agarem je bakteriologickou kličkou naočkována čára *Stafylococcus aureus*. Kolmo na čáru je směrem od středu další bakteriologickou kličkou naočkována, po obou stranách čáry, kmen beta-hemolytického streptokoka. Je třeba dávat pozor, aby nedošlo ke styku kličky s kulturou a čáry *Stafylococcus aureus*. Takto naočkováná plotna s krevním agarem je inkubována 18–24 hodin při 36 ± 1 °C v CO₂ termostatu. Po ukončení inkubace je výsledek CAMP testu vyhodnocen a posouzen vysokoškolským pracovníkem.

Výsledek CAMP testu je vyhodnocen jako pozitivní, jestliže se hemolytický synergismus stafylokokového beta-hemolyzinu s lytickou látkou (CAMP-faktor), který *Streptococcus agalactiae* produkuje, projeví vytvořením charakteristické hemolýzy motýlovitého tvaru v místě průsečíků obou kolonií (Obrázek 6).

Výsledek CAMP testu je vyhodnocen jako negativní, jestliže testovaný kmen neprodukuje lytický CAMP-faktor a nedochází tedy k vytvoření motýlovité hemolýzy. Kmen nepatří do skupiny streptokoků B a přítomnost *Streptococcus agalactiae* lze tedy vyloučit.



Obrázek 6 – Pozitivní CAMP test (zdroj vlastní).

4.7 Interference

Správnost výsledků může ovlivnit několik faktorů:

- použití neprověřených půd (růstové vlastnosti, kontaminace, prošlá doba expirace)
- nedodržení potřebné doby a teploty inkubace
- nedodržení pracovního postupu
- nedodržení správných zásad odběru a transportu vzorků
- poškozená odběrová souprava nebo souprava s prošlou expirací

4.8 Stanovení citlivosti na antibiotika

Přístroje a pomůcky:

- Mueller-Hinton agar s 5 % beraní krve
- antibiotické disky
- sterilní fyziologický roztok
- Densi-La-Metr

U vzorků, které prokázaly pozitivitu na *Streptococcus agalactiae* byla dále stanovena, diskovou difúzní metodou, citlivost na různé druhy antibiotik. Stanovení probíhá na plotně s Mueller – Hintonovým agarem s 5 % beraní krve. Citlivost jednotlivých kmenů byla testována na penicilin, tetracyklin, erytromycin, klindamycin, sulfamethoxazol/trimethoprim (kotrimoxazol) a nitrofurantoin.

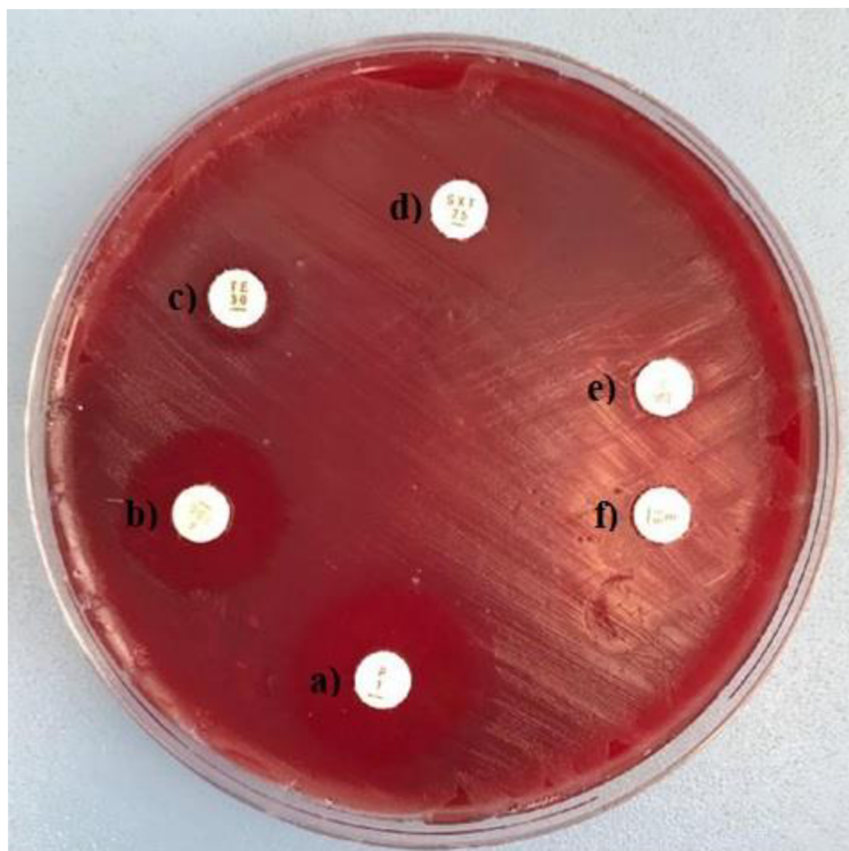
Nejprve je třeba připravit inokulum. Inokulum je připraveno ve sterilním fyziologickém roztoku rozmícháním 3-5 kolonií z čisté bakteriální kultury odebraných čistou bakteriologickou kličkou. Hotové inokulum se nechá 15 minut inkubovat. Během této doby by se měl vytvořit zákal, který je třeba proměřit pomocí Densi-La-Meteru. Je důležité, aby hodnota hustoty inokula odpovídala 0,5 stupni McFarlandovy zákalové stupnice. Po uplynutí 15 minut se inokulum rozočkuje sterilním vatovým tamponem, po celé ploše Mueller-Hintonova agaru s 5 % beraní krve. Plotna s agarem se nechá 15 minut zaschnout a následně se na povrch agaru, pomocí aplikátoru, dávkuje antibiotické disky určité koncentrace – penicilin 1 µg, tetracyklin 30 µg, erytromycin 15 µg, klindamycin 2 µg, sulfamethoxazol/trimethoprim (kotrimoxazol) 25 µg, nitrofurantoin 100 µg.

Je důležité, aby byla celá plocha každého jednotlivého disku v kontaktu s povrchem půdy, proto je třeba každý disk zkontrolovat a případně sterilní injekční jehlou jemně přitisknout na agar. Plotna s agarem a antibiotickými disky je inkubována 24 hodin aerobně v termostatu při 37 °C se zvýšenou tenzí CO₂. Po uplynutí inkubační doby je vysokoškolským pracovníkem změřen průměr inhibičních zón, které se vytvořily kolem antibiotických disků viditelných na obrázku (Obrázek 7). Naměřené hodnoty jsou porovnávány s hodnotami hraničními. Změřením průměrů inhibičních zón vytvořených kolem disků je zjištěno, zda je vyšetřovaný *Streptococcus agalactiae* k příslušnému antibiotiku citlivý nebo naopak rezistentní. Výsledek stanovení citlivosti zapíše laborantka do laboratorního informačního systému LABINA.

Hraniční hodnoty průměru inhibičních zón vytvořených kolem disků:

- Penicilin – 18 mm
- Erytromycin – 21 mm
- Clindamycin – 17 mm
- Kotrimoxazol – 18 mm
- Tetracyklin – 23 mm
- Nitrofurantoin – 15 mm

Bakterie je na antibiotikum citlivá v případě, že průměr inhibiční zóny u konkrétního antibiotika překročí danou hodnotu, např. bakterie je na antibiotikum penicilin citlivá, jestliže laborantka naměří průměr inhibiční zóny 18 mm a více.



Obrázek 7 – Výsledek stanovení citlivosti *S. agalactiae* k penicilinu (a), nitrofurantoinu (b), tetracyklinu (c), kotrimoxazolu (d), klindamycinu (e), Erytromycinu (f) (zdroj vlastní).

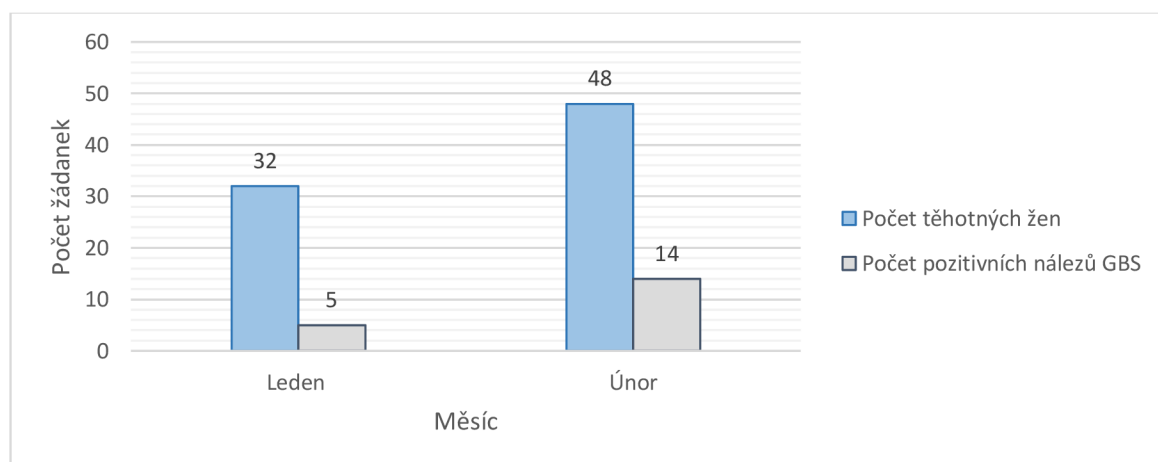
5 Výsledky

Mikrobiologickou laboratoř UNILAB s.r.o. v Třebíči jsem navštěvovala v období od ledna do února letošního roku. Bylo mi umožněno zpracování 80 vzorků získaných vaginálním stěrem u těhotných žen. U odebraných vzorků jsem vyšetřovala pozitivitu nebo negativitu na výskyt *Streptococcus agalactiae*. V případě positivity jsem dále metodou diskového difuzního testu zjišťovala, ke kterému typu antibiotik je *Streptococcus agalactiae* citlivý a ke kterému naopak rezistentní. Vyšetřované vzorky byly odebrány přímo v gynekologických ambulancích Poliklinika Třebíč nebo soukromých gynekologických ordinací v Třebíči. K identifikaci byly použity zejména metody kultivace a následně dourčení latexovou aglutinací, v některých případech probíhalo dourčení positivity vyhodnocením pomocí CAMP testu nebo mikroskopie. Postupy všech metod jsou podrobně popsány v kapitole číslo 4 pod názvem Metodika. Z celkového počtu 80 mnou zpracovaných vyšetřovaných vzorků, v období od ledna do února roku 2022, mělo pozitivní nález *Streptococcus agalactiae* celkem 19 těhotných žen (23,75 %). U zbylých 61 těhotných žen (77,25 %) byla prokázána negativita na výskyt *Streptococcus agalactiae*. Pro přehlednost byly výsledky zapsány do tabulky (Tabulka 1) a byl vytvořen graf (Graf 1).

Tabulka 1 – Výsledky kultivace

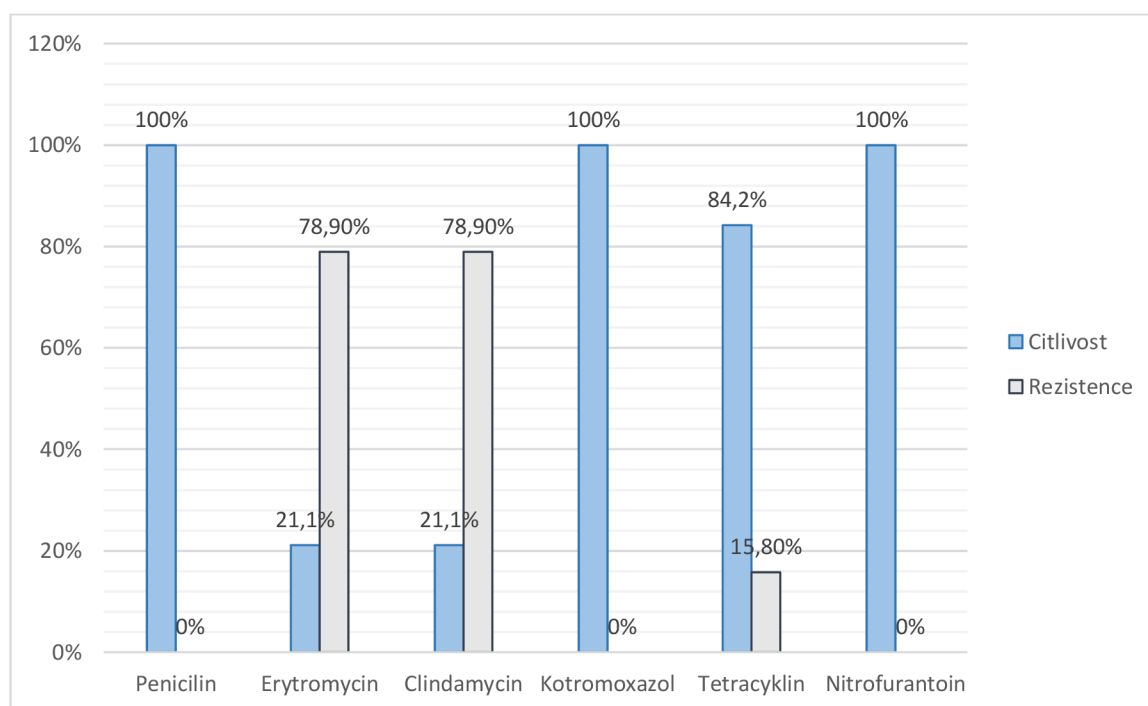
	Leden	Leden (%)	Únor	Únor (%)	Celkem	Celkem (%)
Počet těhotných žen	32		48		80	
Počet pozitivních nálezů GBS	5	15,63 %	14	29,17 %	19	23,75 %

(zdroj vlastní)



Graf 1 – Výsledky kultivace (zdroj vlastní).

Všechny vzorky, u kterých se prokázal pozitivní nález na bakterii *Streptococcus agalactiae*, jsem metodou diskového difuzního testu, který byl podrobněji popsán v kapitole číslo 4 s názvem Metodika, testovala citlivost tohoto streptokoka na vybraná antibiotika – penicilin, erytromycin, clindamycin, kotrimoxazol, tetracyklin a nitrofurantoin. Naměřené hodnoty byly porovnány s klinickými hraničními hodnotami, tzv. breakpointem v laboratorním informačním systému LABINA. Největší rezistence byla pozorována u erytromycinu (78,9 %) a clindamycinu (78,9 %), menší u tetracyklinu (15,8 %). Nulová rezistence, a tudíž stoprocentní citlivost, u mnou kultivovaných vzorků, byla vypočítána u penicilinu (100 %), kotrimoxazolu (100 %) a nitrofurantoinu (100 %). Pro přehlednost byl vytvořen graf (Graf 2).



Graf 2 – Citlivost a rezistence *Streptococcus agalactiae* na vybraná antibiotika (zdroj vlastní).

Při pozitivním nálezu *Streptococcus agalactiae* je třeba léčit těhotnou ženu právě těmi antibiotiky, u kterých se prokázala nejvyšší citlivost. Jestliže vyjde citlivost u penicilinu, tak stejná citlivost platí i pro antibiotika ampicilin, amoxicilin, ampicilin/sulbaktam, cefuroxim, amoxicilin/k. klavulanová, piperacilin. Citlivost na erytromycin je platná i pro azithromycin, clarithromycin nebo roxithromycin a citlivost na tetracyklin platí pro doxycyklin.

6 Diskuze

Cílem mé práce bylo provést screeningové kultivační vyšetření výtěrů z pochvy těhotných žen a v případě pozitivního nálezu sledovat rezistenci na různé druhy antibiotik.

Praktickou část této bakalářské práce jsem měla možnost provádět v mikrobiologické laboratoři UNILAB s.r.o. v Třebíči pod dohledem mé vedoucí práce a ostatních pracovníků laboratoře. Laboratoř jsem navštěvovala v období od ledna do února roku 2022. Bylo mi umožněno zpracování 80 vzorků získaných vaginálním stěrem u těhotných žen, odebraných přímo v gynekologických ambulancích na Poliklinice v Třebíči nebo pocházely ze soukromých gynekologických ordinací v Třebíči. U odebraných vzorků jsem vyšetřovala pozitivitu či negativitu na výskyt *Streptococcus agalactiae*. V případě positivity jsem dále metodou diskového difuzního testu, zjišťovala, ke kterému typu antibiotik je *Streptococcus agalactiae* citlivý a ke kterému naopak rezistentní.

Z celkového počtu 80 vzorků získaných od těhotných žen screeningového kultivačního vyšetření mělo pozitivní nález *Streptococcus agalactiae* celkem 19 těhotných žen, což je 23,75 % z celkového počtu vzorků. U zbylých 61 těhotných žen, tedy 77,25 %, byla prokázána negativita na výskyt tohoto streptokoka. U pozitivních izolátů byla pomocí diskového difuzního testu ověřována citlivost na penicilin 1 µg, tetracyklin 30 µg, erytromycin 15 µg, klindamycin 2 µg, sulfamethoxazol/trimethoprim (kotrimoxazol) 25 µg a nitrofurantoin 100 µg. Všech 19 izolátů bylo citlivých k penicilinu, proto je právem používán jako lék první volby u infekcí vyvolaných *Streptococcus agalactiae*. Dalšími antibiotiky, u kterých mi vyšla 100 % citlivost, jsou kotrimoxazol a nitrofurantoin. Lékař může tedy každé z 19 pozitivních žen podat jedno z těchto tří antibiotik. Míra citlivosti u dalších antibiotik je následovná. K tetracyklinu je citlivých 84,2 % z celkového počtu pozitivních žen. K antibiotiku erytromycin a clindamycin se citlivost prokázala pouze u 21,1 % těhotných žen *Streptococcus agalactiae* pozitivních, rezistence na tyto dvě antibiotika je tedy u mých výsledků nejvyšší.

Podle statistik, které mi byly v laboratoři poskytnuty, je průměrný výskyt žen s pozitivním nálezem *Streptococcus agalactiae* kolem 11 % za rok. Z mého screeningového šetření však vyšlo najevo, že výskyt žen s pozitivním nálezem *Streptococcus agalactiae* je vyšší, oproti datům z laboratoře. Důvodem může být, že jsem nezkoumala vzorky odebrané za celý rok, ale pouze za dva měsíce. Podle české

neonatologické společnosti je počet pozitivních těhotných žen 11-35 % ročně, což odpovídá i mému výsledku. Co se týče antibiotické rezistence, zde se moje data shodují s těmi z laboratoře. Výsledky udávají 100% citlivost na penicilin a největší rezistence u antibiotik tetracyklin, erytromycin a clindamycin. Tyto data se shodují s výsledky mnou vytvořených vzorků.

7 Závěr

Bakterie *Streptococcus agalactiae* je významným patogenem u těhotných žen a novorozenců. Přenos tohoto streptokoka z těhotné ženy na novorozence může mít velmi vážné následky a u nakaženého novorozence může způsobit i život ohrožující infekce. *Streptococcus agalactiae* je považován za nejčastější příčinu novorozenecké mortality a morbidity, a proto je důležité jeho výskyt sledovat. Těhotná žena je v 35. – 37. týdnu těhotenství podrobena screeningu. Jestliže se při screeningu prokáže, že je žena na bakterii *Streptococcus agalactiae* pozitivní, je přeléčena vhodnými antibiotiky v době porodu. Antibiotika snižují riziko časně a pozdní formy streptokokové infekce u novorozence.

Hlavním cílem mé bakalářské práce bylo seznámení se s problematikou onemocnění bakterií *Streptococcus agalactiae*, možnostmi její laboratorní diagnostiky, provedení screeningového kultivačního vyšetření výtěrů z pochvy těhotných žen a zpracování dat vzorků s pozitivním nálezem. V případě, kdy byla při výtěru zjištěna pozitivita, jsem dále sledovala rezistenci na různá antibiotika.

Praktickou část jsem absolvovala v UNILAB s.r.o. v Třebíči. Zde jsem pod dohledem vedoucí práce a dalších zkušených pracovníků prováděla všechny úkony, vedoucí k prokázání positivity na bakterii *Streptococcus agalactiae*. Těmito úkony byly samotný příjem materiálu a příprava kultivačních a diagnostických pěst, provedení kultivace a tím i získání čisté bakteriální kultury. V případě, že se ve vzorku vyskytla kolonie *Streptococcus agalactiae*, zjišťovala jsem dále, zda se opravdu jedná o vyšetřovanou bakterii. Vyzkoušela jsem si CAMP test, latexovou aglutinaci a vytvoření mikroskopického preparátu. V laboratoři UNILAB s.r.o. preferují potvrzení přítomnosti *Streptococcus agalactiae* pomocí latexové aglutinace. Překvapilo mě, kolik úkonů musí laborantka provést k tomu, aby mohla vyhodnotit, že se ve vzorku bakterie opravdu nachází.

Než jsem začala svoji práci psát, domnívala jsem se, že výskyt positivity u těhotných žen na tuto bakterii bude mnohem vyšší. Nicméně důsledky přenosu této bakterie z matky na novorozence během porodu jsou závažné. Proto se provádí povinné screeningové vyšetření těhotných žen a při pozitivním nálezem se zahájí antibiotická léčba během porodu, čímž se přenos na novorozence eliminuje.

Na začátku psaní této bakalářské práce jsem si stanovila dvě výzkumné otázky, na které se mi povedlo získat odpovědi.

Jak může pozitivní nález *Streptococcus agalactiae* u těhotné ženy ovlivnit vývoj plodu a následně také vývoj narozeného dítěte? Následkem pozitivního nálezu *Streptococcus agalactiae* u těhotné ženy může být předčasný porod, nízká porodní hmotnost novorozence nebo v nejhroších případech jeho úmrtí. Dále může být příčinou osteomyelitid, pneumonií, endokarditid, hnisavé artritidy nebo meningitidy.

Proti jakým antibiotikům je nejčastěji *Streptococcus agalactiae* rezistentní? V současnosti představuje rezistence *Streptococcus agalactiae* proti lékům velký problém. Nejčastější míra rezistence u mnou vyšetřovaných vzorků byla pozorována u antibiotik erytromycinu (78,9 %) a clindamycinu (78,9 %), u pár vzorků byla zjištěna i rezistence k tetracyklinu (15,8 %). Provedení citlivosti na antibiotika je velmi důležité. Je nutné každé testované ženě podat antibiotika vhodná přímo pro ni a tím možnost rezistence snížit na minimum.

Při psaní této bakalářské práce jsem došla ke splnění všech stanovených cílů i odpovědím na předem stanovené výzkumné otázky.

8 Použitá literatura

1. AMLEROVÁ, J., FAJFRLÍK, K., 2018. *Mikrobiologie: Výukový materiál*. [online]. Inovace VOV. Praha [cit. 2022-04-13]. Dostupné z: <https://www.vovcr.cz/odz/zdrav/183/page00.html>
2. ARYAL, S., 2022. [online]. Online Microbiology Notes: MicrobiologyInfo.com. [cit. 2022-03-10].
3. BACK, E., O'GRADY, E., BACK, J., 2012. High Rates of Perinatal Group B Streptococcus Clindamycin and Erythromycin Resistance in an Upstate New York Hospital. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [online]. 56(2), 739-742 [cit. 2022-02-24]. DOI: 10.1128/AAC.05794-11. ISSN 0066-4804. Dostupné z: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AAC.05794-11>
4. BARTŮŇKOVÁ, J., PAULÍK, M., 2011. *Vyšetřovací metody v imunologii*. 2., přeprac. a dopl. vyd. Praha: Grada. ISBN 978-802-4735-337.
5. BEDNÁŘ, M., 1996. *Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie*. Praha: Marvil. ISBN 80-238-0297-6.
6. BEDNÁŘ, M., 2009. *Příručka lékařské mikrobiologie pro bakalářské studijní programy* [online]. Praha: Ústav mikrobiologie 3.LF UK [cit. 2022-03-01]. Dostupné z: <http://mikrobiologie.lf3.cuni.cz/mikrobiologie-nova/>
7. BIOMÉRIEUX CZ s.r.o., 2022. *Kultivační média pro perinatální prevenci GBS*. [online]. Biomerieux. Praha [cit. 2022-03-31]. Dostupné z: <https://www.biomerieux.cz/produkty/kultivacni-media-pro-perinatalni-prevenci-gbs>
8. BIO-RAD, 2017. *Pastorex™ Strep: Aglutinační test pro identifikaci streptokoků náležících do skupin A, B, C, D, F, G* [online]. [cit. 2022-04-06].
9. DAVÍDKOVÁ, J., 2012. *Charakterizace citlivosti na antibiotika u poševních kmenů Streptococcus agalactiae*. Brno. Bakalářská práce. Masarykova univerzita. Vedoucí práce MUDr. Ondřej Zahradníček.
10. DOBIÁŠ, L., 2003. *Obecná a speciální mikrobiologie*. 1. vyd. Ostrava: Multex Soft, 218 s.

11. DUTRA, V. et al., 2014. Streptococcus agalactiae in Brazil: serotype distribution, virulence determinants and antimicrobial susceptibility. *BMC Infectious Diseases* [online]. 14(1) [cit. 2022-02-22]. DOI: 10.1186/1471-2334-14-323. ISSN 1471-2334. Dostupné z: <https://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2334-14-323>
12. EL AILA, N. et al., 2010. Comparison of different sampling techniques and of different culture methods for detection of group B streptococcus carriage in pregnant women. *BMC Infectious Diseases* [online]. 10(1) [cit. 2022-02-24]. DOI: 10.1186/1471-2334-10-285. ISSN 1471-2334. Dostupné z: <https://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2334-10-285>
13. EL BEITUNE, P., DUARTE, G., MAFFEI, C., 2005. Colonization by Streptococcus agalactiae during pregnancy: maternal and perinatal prognosis. *Brazilian Journal of Infectious Diseases* [online]. 9(4), 276-282 [cit. 2022-02-14]. DOI: 10.1590/S1413-86702005000400002. ISSN 1413-8670. Dostupné z: <https://doi.org/10.1590/S1413-86702005000400002>
14. ESKANDARIAN, N. et al., 2015. Antimicrobial susceptibility profiles, serotype distribution and virulence determinants among invasive, non-invasive and colonizing Streptococcus agalactiae (group B streptococcus) from Malaysian patients [online]. 34(3), 579-584 [cit. 2022-02-22]. DOI: 10.1007/s10096-014-2265-x. ISSN 0934-9723. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10096-014-2265-x>
15. FURFARO, L., CHANG, B., PAYNE, M., 2018. Perinatal Streptococcus agalactiae Epidemiology and Surveillance Targets. *Clinical Microbiology Reviews* [online]. 31(4) [cit. 2022-02-22]. DOI: 10.1128/CMR.00049-18. ISSN 0893-8512. Dostupné z: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/CMR.00049-18>
16. HÁLOVÁ, E., 2015. *Záchyt Streptococcus agalactiae u těhotných žen a novorozenců*. České Budějovice. Bakalářská práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích. Vedoucí práce MUDr. Petra Dovinová.
17. IVD MALDI BIOTYPER, 2011. *Návod k použití přístroje IVD Maldi biotyper: MBT Compass IVD*. Nemocnice Jihlava.

18. JAKEŠ, J., 2009. *Bakterie III. - Gramovo barvení a imerzní mikroskopie*. [online]. Praktický průvodce mikrosvěttem. [cit. 2022-03-01]. Dostupné z: <http://mikrosvet.mimoni.cz/ulohy/116-bakterie-3-gramovo-barveni-a-imerzni-mikroskopie>
19. JORGENSEN, J. et al., 2015. *Manual of Clinical Microbiology* [online]. Volume 1. Washington, DC, USA: ASM Press [cit. 2022-02-14]. DOI: 10.1128/9781555817381. ISBN 9781683672807. Dostupné z: [https://kaldur.landspitali.is/focal/gaedahandbaekur/gnhsykla.nsf/5e27f2e5a88c898e00256500003c98c2/9db7b974de9fe51500257555003b5d54/\\$FILE/ASM%2011.%C3%BAtg%C3%A1fa.pdf](https://kaldur.landspitali.is/focal/gaedahandbaekur/gnhsykla.nsf/5e27f2e5a88c898e00256500003c98c2/9db7b974de9fe51500257555003b5d54/$FILE/ASM%2011.%C3%BAtg%C3%A1fa.pdf)
20. KADNER, R., ROGERS, K., 2020. Bacteria. *Encyclopedia Britannica* [online]. [cit. 2022-04-18].
21. KAPRÁLEK, F., 1999. *Základy bakteriologie*. 1. vyd. Praha: Karolinum. ISBN 80-7184-811-5.
22. KLABAN, V., 2001. *Svět mikrobů: ilustrovaný lexikon mikrobiologie životního prostředí*. 2. rozš. a přeprac. vyd. Hradec Králové: Gaudeamus. ISBN 80-704-1687-4.
23. KWATRA, G. et al., 2014. Serotype-Specific Acquisition and Loss of Group B Streptococcus Recto-Vaginal Colonization in Late Pregnancy. *PLoS ONE* [online]. 9(6) [cit. 2022-04-07]. DOI: 10.1371/journal.pone.0098778. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0098778>
24. MADZIVHANDILA, M. et al., 2011. Serotype Distribution and Invasive Potential of Group B Streptococcus Isolates Causing Disease in Infants and Colonizing Maternal-Newborn Dyads. *PLOS ONE* [online]. 6(3) [cit. 2022-04-07]. Dostupné z: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0017861>
25. MĚCHUROVÁ, A., VLK, R., UNZEITIG, V., 2013. Doporučený postup při diagnostice a léčbě streptokoků skupiny B v těhotenství a za porodu. *Česká gynekologie* [online]. (78) [cit. 2022-03-31].

26. MUSIORSKA, M., KASPROWICZ, A., BIAŁECKA, A., LENART-BOROŃ, A., 2016. *Antimicrobial resistance and molecular characteristics of Streptococcus agalactiae isolated from women of reproductive age* [online]. *Medycyna Środowiskowa - Environmental Medicine*, 19(4), 27-33 [cit. 2022-02-22]. DOI: 10.19243/2016404. Dostupné z: <https://bibliotekanauki.pl/articles/1035486>
27. NEČAS, O., 2000. *Obecná biologie pro lékařské fakulty*. 3. přepracované vydání, v nakladatelství H & H 1. vydání. Jinočany: H & H. ISBN 80-860-2246-3.
28. OXOID CZ S.R.O., 2022. *Diagnostic Reagents: Streptococcal Grouping Kit*. [online]. Thermo Fisher Scientific. [cit. 2022-04-13]. Dostupné z: http://www.oxoid.com/CZ/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=DR0586&c=CZ&lang=EN
29. ROZTOČIL, A., 2017. *Moderní porodnictví*. 2., přepracované a doplněné vydání. Praha: Grada Publishing. ISBN 978-80-247-5753-7.
30. ŘÍHOVÁ AMBROŽOVÁ, J., 2006. Tvary a typy bakterií. In: *Encyklopedie hydrobiologie* [online]. Praha: VŠCHT Praha [cit. 2022-04-20]. Dostupné z: https://e-learning.vscht.cz/knihy/uid_es-006/hesla/img__d10e642.html
31. SEDLÁČEK, I., 2007. *Taxonomie prokaryot*. Brno: Masarykova univerzita. ISBN 80-210-4207-9.
32. SCHINDLER, J., 2014. *Mikrobiologie: pro studenty zdravotnických oborů*. 2., dopl. a přeprac. vyd. Praha: Grada. Sestra (Grada). ISBN 978-802-4747-712.
33. SIMON, C., STILLE, W., 1998. *Antibiotika v současné lékařské praxi*. Vyd. 1. čes. Praha: Grada. ISBN 80-716-9268-9.
34. SITKIEWICZ, I., HRYNIEWICZ, W., 2010. Pyogenic Streptococci- Danger of Re-emerging Pathogens. *Polish journal of Mikrobiology* [online]. 59(4), 219-226 [cit. 2022-03-01]. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21466038/>
35. UNILAB s.r.o., 2013. *Pracovní materiály laboratoře UNILAB s.r.o.: CAMP test*. Vyd. 3. Třebíč.

36. VILLARREAL, M., 2008. Schéma prokaryotní buňky. In: *WikiSkripta* [online]. Praha: Projekt 1. lékařské fakulty a Univerzity Karlovy [cit. 2022-04-20]. Dostupné z: https://www.wikiskripta.eu/w/Soubor:Average_prokaryote_cell_cs.svg
37. VOTAVA, M., TEJKALOVÁ, M., DRÁBKOVÁ, M., UNZEITIG, V., BRAVENY, I., 2001. Use of GBS Media for Rapid Detection of Group B Streptococci in Vaginal and Rectal Swabs from Women in Labor. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* [online]. 20(2), 0120-0122 [cit. 2022-03-31]. DOI: 10.1007/s100960000446. ISSN 09349723. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s100960000446>
38. VOTAVA, M., 2003. *Lékařská mikrobiologie speciální*. 2. přeprac. vyd. Brno: Neptun. ISBN 80-902-8966-5.
39. VOTAVA, M., 2005. *Lékařská mikrobiologie obecná*. 2. přeprac. vyd. Brno: Neptun. ISBN 80-868-5000-5.
40. VOTAVA, M., 2010. *Lékařská mikrobiologie - vyšetřovací metody*. Brno: Neptun. ISBN 978-808-6850-048.
41. YAO, K. et al., 2013. Capsular Gene Typing of Streptococcus agalactiae Compared to Serotyping by Latex Agglutination. *Journal of Clinical Microbiology* [online]. 51(2), 503-507 [cit. 2022-02-14]. DOI: 10.1128/JCM.02417-12. ISSN 0095-1137. Dostupné z: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JCM.02417-12>
42. YOUSEFI MASHOUF, R., MOUSAVI, S., RABIEE, S., ALIKHANI, M., ARABESTANI, M., 2014. Direct Identification of Streptococcus agalactiae in Vaginal Colonization in Pregnant Women Using Polymerase Chain Reaction. *Journal of Comprehensive Pediatrics* [online]. 5(4) [cit. 2022-02-22]. DOI: 10.17795/compreped-23339. ISSN 2251-8150. Dostupné z: <https://brief.land/jcp/articles/19812.html>

9 Seznam tabulek, grafů a obrázků

Obrázky:

Obrázek 1 – Stavba prokaryotní buňky (Villarreal, 2008)

Obrázek 2 – Tvary a typy bakterií (Říhová Ambrožová, 2006)

Obrázek 3 – Narostlá kultura GBS č. 1 (zdroj vlastní)

Obrázek 4 – Latexová aglutinace, negativní výsledek viditelný u antigenů F, D, C, B a A, pozitivita u antigenu B (*Streptococcus agalactiae*) (zdroj vlastní)

Obrázek 5 – Mikroskopický preparát čisté kultury *Streptococcus agalactiae* (zdroj vlastní)

Obrázek 6 – Pozitivní CAMP test (zdroj vlastní)

Obrázek 7 – Výsledek stanovení citlivosti *S. agalactiae* k penicilinu (a), nitrofurantoinu (b), tetracyklinu (c), kotrimoxazolu (d), klindamycinu (e), Erytromycinu (f) (zdroj vlastní)

Grafy:

Graf 1 – Výsledky kultivace (zdroj vlastní)

Graf 2 – Citlivost a rezistence *Streptococcus agalactiae* na vybraná antibiotika (zdroj vlastní)

Tabulky:

Tabulka 1 – Výsledky kultivace (zdroj vlastní)

10 Seznam použitých zkratek

μm – mikrometr

ATB – antibiotikum

BHI bujón – Brain-Heart Infusion (bujón z mozkosrdcové infúze)

CDC – Centers for Disease Control and Prevention (centrum pro kontrolu a prevenci nemocí)

CO_2 – oxid uhličitý

CPS – kapsulární polysacharid

cylE – cytolysin

DNA – deoxyribonukleová kyselina

GBS – streptokok skupiny B

hylE – hyaluronidáza

IU – International Unit (mezinárodní jednotka)

MALDI-TOF – hmotnostní spektrometrie s asistovanou laserovou desorpcí/ionizací

MH agar – Mueller-Hinton agar

MIC – Diluční metoda v bujónu

NaCl – chlorid sodný

Na_2HPO_4 – hydrogenufosforečnan sodný

PC – počítač

PCR – polymerase chain reaction (polymerázová řetězová reakce)

RNA – ribonukleová kyselina