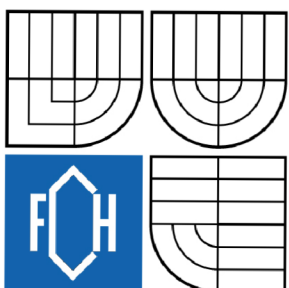


VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

SALMONELOVÉ INFEKCE, JEJICH ZDROJ A DIAGNOSTIKA

INFECTION OF SALMONELOSIS, THEIR SOURCE AND DIAGNOSIS.

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

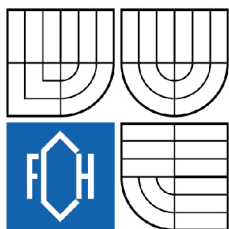
MARTIN VALKUS

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Mgr. DANA VRÁNOVÁ, Ph.D.

BRNO 2009



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce: **FCH-BAK0203/2007** Akademický rok: **2008/2009**
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Student(ka): **Martin Valkus**
Studijní program: Chemie a technologie potravin (B2901)
Studijní obor: Biotechnologie (2810R001)
Vedoucí bakalářské práce: **Mgr. Dana Vránová, Ph.D.**
Konzultanti bakalářské práce:

Název bakalářské práce:

Salmonelové infekce, jejich zdroj a diagnostika

Zadání bakalářské práce:

1. Vypracování literární rešerše na zadané téma.
2. Výběr metod pro experimentální část a jejich aplikace
3. Zpracování výsledků a jejich zhodnocení.

Termín odevzdání bakalářské práce: 29.5.2009

Bakalářská práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu bakalářské práce. Toto zadání je přílohou bakalářské práce.

Martin Valkus
Student(ka)

Mgr. Dana Vránová, Ph.D.
Vedoucí práce

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.12.2008

doc. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce se zabývá salmonelovými infekcemi, jejich zdroji, prevencí a diagnostikou. Teoretická část zahrnuje základní seznámení s rodem *Salmonella*, jeho morfologií. Popisuje patogenezi, klinické projevy vzniklé infekce, léčbu a dietní doporučení. Rozebírá zdroje salmonelózy. Statisticky zpracovává počet případů infekcí na území ČR. Věnuje se prevenci vzniku infekcí na školách, informovanosti obyvatelstva a klimatickým vlivům.

V experimentální části byla optimalizovaná metoda identifikace Enterobakterií úpravou pH připravovaného média MIU.

ABSTRACT

This bachelor's thesis deals with infection of salmonellosis, its source, prevention and diagnosis. Theoretical part includes general information about *Salmonella* species and its morphology. It describes pathogenesis, source of infection, clinical symptoms, treatment and diet recommendations. It analyzes statistics of number of infection occurrences in Czech Republic. It also deals with prevention of infection origin on schools, population foreknowledge and climatic effects.

Experimental part of this thesis contains description of optimization procedure of identification Enterobacteriaceae by adjusting of pH of prepared medium MIU.

KLÍČOVÁ SLOVA

Salmonelové infekce, prevence, výskyt, zdroje infekce, kultivace, diagnostika

KEYWORDS

Infection of salmonellosis, prevention, incidence, source of infection, cultivation, diagnosis

VALKUS, M. Salmonelové infekce, jejich zdroj a diagnostika. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2009. 41 s. Vedoucí bakalářské práce Mgr. Dana Vránová, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně a že všechny použité zdroje literární jsem správně a úplně citoval. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....
Podpis studenta

Poděkování:

Děkuji také Mgr. D. Vránové, Ph.D., za přátelský přístup a pomoc během realizace mé bakalářské práce.

OBSAH

1. ÚVOD.....	7
2. TEORETICKÁ ČÁST.....	8
2.1 Obecná charakteristika.....	8
2.1.1 Morfologie.....	8
2.1.1.1 Rod Salmonella.....	9
2.1.2 Hostitelé.....	9
2.1.2.1 Sérotypy u zvířat.....	10
2.1.2.2 Zdroje nález u zvířat.....	10
2.2 Patogeneze.....	10
2.2.1 Propuknutí infekce.....	11
2.2.2 Postup infekce.....	11
2.2.3 Klinické projevy.....	12
2.2.3.1 Tyfus a paratyfus.....	12
2.2.3.2 Gastroenteritida a alimentární infekce.....	12
2.2.3.3 Bakteriémie a metastatické onemocnění.....	12
2.2.3.4 Dlouhodobý nosičský stav.....	12
2.2.4 Produkce endotoxinu.....	13
2.3 Zdroje infekce.....	14
2.4 Léčba salmonelózy.....	15
2.4.1 Šetřící dieta a rehydratace organismu.....	15
2.5 Hodnocení počtu případů infekcí způsobené salmonelami na území ČR.....	16
2.5.1. Prevence.....	17
2.5.1.1 Prevence ve zdravotnictví.....	17
2.5.1.2 Prevence v mateřských školách.....	17
2.5.1.3 Prevence v základních školách.....	17
2.5.1.4 Vliv médií.....	18
2.5.1.5 Obchodní řetězce a výrobci potravin.....	18
2.5.1.6 Počasí.....	19
2.6 Diagnostika a průkaz rodu Salmonella.....	21
2.6.1 Průkaz z potravin.....	21
2.6.1.1 Příprava živných půd.....	21
2.6.1.2 Sterilizace.....	22
2.6.1.3 Finální příprava a rozlévání.....	22
2.6.1.4 Příčiny neuspokojivých výsledků.....	23
2.6.1.5 Předpomnožení a pomnožení přítomných bakterií.....	23
2.6.1.7 Potvrzení (Konfirmace) bakterií rodu Salmonella.....	24
2.6.2 Klinický materiál.....	28
2.6.2.1 Odběr materiálu.....	28
2.6.2.2 Transport materiálu.....	28
2.6.2.3 Příjem materiálu.....	29
2.6.2.4 Kultivace.....	29
2.6.2.5 Identifikace a vyšetření citlivostí na ATB.....	29
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	30
3.1 Chemikálie, přístroje, pomůcky.....	30

3.1.1 Chemikálie	30
3.1.2 Přístroje a pomůcky	30
3.1.3 Připravené roztoky	30
3.2 Příprava MIU	30
4. VÝSLEDKY A DISKUZE	32
4.1 Výsledek.....	32
4.1.1 Salmonella Enteritidis	32
4.1.2 Shigella sonnei	33
4.1.3 Escherichia coli	33
4.1.4 Klebsiela pneumoniae	34
4.1.5 Proteus mirabilis.....	34
4.1.6 Hodnocení	35
5. ZÁVĚR.....	36
6. POUŽITÉ ZDROJE	38
7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	41

1. ÚVOD

Salmonelové infekce jsou na celém světě hlavní příčinou alimentárních infekcí. Nejčastější příčinou vzniku infekce jsou špatné hygienické návyky, požívání nedostatečně tepelně zpracované potravy, salátů z vajec nebo majonézy, aj. Proto se objevují jako lokální epidemie např. ve školních jídelnách a jiných stravovacích provozech nebo také v rodinném kruhu po společném jídle, kdy nejčastějším kontaminantem bývá tatarská omáčka, majonéza, žloutkové krémy, aj.

Počet případů výskytu salmonelových infekcí v ČR v posledních letech klesá. To může být zapříčiněno lepší informovaností obyvatel, zavádění preventivních programů na školách, šíření zpráv o nalezení zkažených potravin v supermarketech nebo mohou mít vliv klimatické změny. Lidé díky tomu začínají být obezřetnější ke svému zdraví a dávají si pozor na to, jaké potraviny si kupují nebo konzumují.

Salmonelové infekce postihují všechny věkové kategorie. Ovšem u dětí a osob v důchodovém věku jsou klinické projevy více nebezpečné z důvodu rychlejší dehydratace a oslabení imunitního systému.

Léčba salmonelózy je zdlouhavá a musí se dodržovat přísná šetrící dieta a časté pití rehydratačních nápojů. Nedoporučuje se léčba antibiotiky. Proto se většinou léčí klinické projevy.

Velmi důležité je rychlé stanovení diagnózy, na kterém se z velké míry podílejí laboratoře klinické mikrobiologie. Ty musí vzorky rychle zpracovat a provést kultivace a nezbytné biochemické testy. Taktéž zdravotní personál, který musí zajistit správný odběr vzorku a rychlou dopravu do laboratoře, pokud si samotné laboratoře tento svaz materiálu nezajišťují samy. Je totiž nezbytné, aby byl takto odebraný vzorek co nejrychleji od odběru zpracován.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Obecná charakteristika

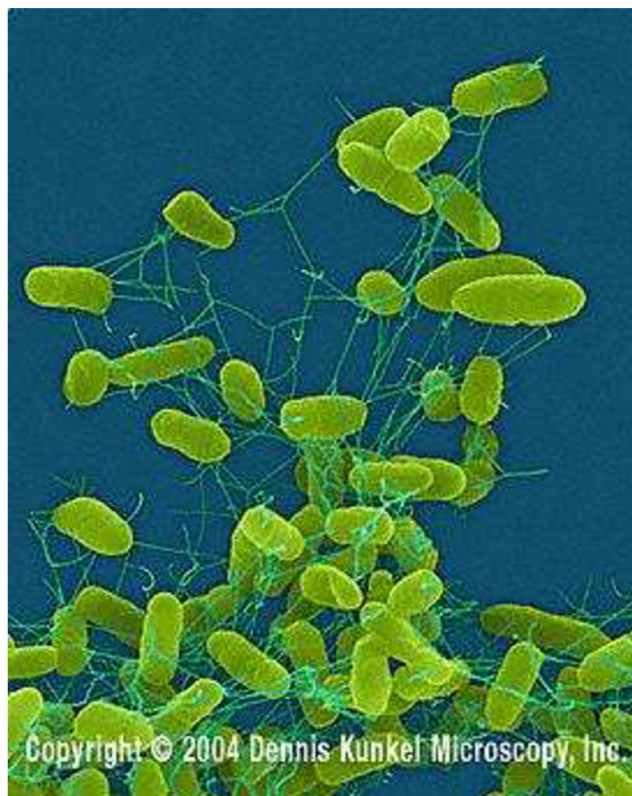
Rod *Salmonella*, patřící do čeledi *Enterobacteriaceae*, zahrnuje bakterie vyvolávající alimentární infekce lidí a zvířat. Mají společné biochemické vlastnosti a společné antigeny. Rozčlenění tohoto rodu bylo opakovaně revidováno. Genetickou analýzou se zjistilo, že obsahuje jediný genetický druh (genospecies) *Salmonella enterica*, který se dále dělí na sedm poddruhů (subspecies). Pro člověka je patogenní pouze poddruh I, označovaný jako subspecies I. Ostatní poddruhy zahrnují patogeny studenokrevných živočichů. [1]

Bakterii salmonely objevil roku 1885 doktor Theobald Smith z ústavu veterinární mikrobiologie D. E. Salmona. [2]

2.1.1 Morfologie

Enterobakterie (čeleď *Enterobacteriaceae*) jsou nejdůležitější čeledí gramnegativních, fakultativně anaerobních, nesporulujících tyčinek. Dlouhé jsou kolem 2 až 3 μm a tlusté 0,5 až 0,8 μm . Enterobakterie jsou navzájem velmi podobné a od jiných gramnegativních tyčinek se také mnoho neliší, proto je význam morfologie v diagnostice zanedbatelný. [2]

Do čeledi Enterobakterií patří rody: *Citrobacter*, *Escherichia*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Pantoea*, *Proteus*, *Morganella*, *Providentia*, *Salmonella*, *Shigella* a *Yersinia*. [3]



Obr. 1: Bakterie *Salmonella* Enteritidis, zvětšeno 2750x [17]

2.1.1.1 Rod *Salmonella*

Rod *Salmonella* je z čeledi Enterobakterií nejpočetnějším rodem. Zahrnuje přes 2500 sérotypů uspořádaných v Kaufmann-Whiteově schématu:

Tab.1: Rozdělení vybraných druhů salmonel podle Kauffmann-Whiteova schématu [1, 25]

Skupina	Sérotyp
A	<i>Salmonella Paratyphi A</i>
B	<i>Salmonella Paratyphi B</i>
	<i>Salmonella typhimurium</i>
C	<i>Salmonella cholera-suis</i>
	<i>Salmonella Paratyphi C</i>
D	<i>Salmonella Typhi</i>
	<i>Salmonella Enteritidis</i>
	<i>Salmonella gallinarum-pulorum</i>
E	<i>Salmonella anatum</i>

Oficiální název salmonely, která se na našem území nejčastěji vyskytuje je *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sérovar Enteritidis, což je pro popis nepraktické, a proto se doporučuje, aby se v praxi používaly názvy sérovarů místo druhového jména - *Salmonella Enteritidis*. [3]

Salmonely se často nacházejí ve vodě, v odpadcích nebo půdě. Při vhodných podmínkách (např. ve vodě) přežívají měsíce i roky. Potravinu mohou být infikovány:

- přímým způsobem – potraviny připravené z infikovaného zvířete (maso) nebo jeho produktů (vejce);
- druhotně - pozdější kontaminací. [1]

2.1.2 Hostitelé

V přírodě jsou salmonely hojně rozšířeny. Izolovány byly z much, švábů, blech, klíšťat a samozřejmě ze střev všech obratlovců. U zvířat probíhá infekce z větší části bez symptomů. Výjimečně se může projevit jako gastroenteritida, která se zanedlouho sama vyhojí. Salmonely mají široké spektrum hostitelů a lze je izolovat z mnoha živočišných druhů.

Některé kmeny, tzv. sérotypy mají omezený počet druhů, které mohou osídlit a vyvolávají odlišné spektrum onemocnění (adaptace na hostitele). Např. *Salmonella Typhi* a *Salmonella Paratyphi A, B a C* jsou na člověku adaptovány a primárně se z něj izolují, kdežto u zvířat je nalezneme jen velmi málo (*Salmonella Paratyphi B* však bývá izolována z drůbeže, prasat nebo dobytka). [5]

2.1.2.1 Sérotypy u zvířat

Tab.2: Příklad sérotypu salmonel adaptovaných na zvířecí hostitele. [5]

Sérotyp	Zvíře
<i>Salmonella cholerae-suis</i>	prase
<i>Salmonella dublin</i>	dobytek
<i>Salmonella gallinarum-pullorum</i>	drůbež
<i>Salmonella Enteritidis</i>	drůbež, dobytek
<i>Salmonella abortus-equi</i>	kůň
<i>Salmonella abortus-ovis</i>	ovce
<i>Salmonella typhimurium</i>	dobytek, holubi

Sérotypy salmonel uvedené v tab. 2 způsobují svou morbiditou a mortalitou velké ekonomické ztráty chovatelům, protože si imunitní systém těchto zvířat, i přes velkou produkci superoxidů a oxidu dusnatého, nedokáže s touto infekcí poradit. Všechny navíc mohou způsobit onemocnění i člověka.

Zbylé sérotypy salmonel nemají zvláštní preferenci. Velkou roli hraje okamžitá a lokální rozšíření mezi domácími zvířaty a následná kontaminace potravin a pomnožení. Ve vyspělých zemích se jedná o malé lokální infekce úzkého rozsahu sérotypů. [5, 22]

2.1.2.2 Zdroje nálezů u zvířat

Zvířata se mezi sebou mohou nakazit při společném ustájení prostřednictvím výkalů a moči. Touto cestou se nejčastěji nakazí mláďata ustájená s dospělými jedinci. Dále se mohou nakazit z kontaminovaného steliva nebo krmiva. Krmiva jsou kontaminována primárně nebo sekundárně:

- primárně - v případě, že je krmivo vyrobeno z kontaminovaných zvířat;
- sekundárně - např. masokostní moučka kontaminována během přepravy nebo uskladnění (např. volně žijícími ptáky a hlodavci).

Další možností nákazy je voda z rybníků a povrchových toků, které jsou kontaminovány odpadními vodami. [8]

2.2 Patogeneze

Ke vzniku infekce způsobené salmonelou je zapotřebí dostat do trávicího traktu bakterie v dostatečném počtu, aby překonaly obranné mechanismy organismu např. kyselá reakce v žaludku, kde dochází k částečnému trávení potravy a úpravě přijaté stravy k dalšímu trávení v tenkém střevě. Žaludeční šťávy mísí s potravou intenzivní peristaltika. Žlázy, které jsou lokalizovány v těle žaludku, dokáží vyprodukovat 2-3 l žaludečních šťáv. Jejich produkce podléhá nervovým a hormonálním regulacím.

Jednou ze složek žaludečních šťáv je kyselina chlorovodíková (HCl), která v žaludku vytváří velmi nízké pH (cca kolem 1,5). Toto nízké pH chrání vitamíny B a C, aktivuje pepsinogen,

umožňuje vstřebávání vápníku a železa, narušuje strukturu proteinů a usmrcuje bakterie a kvasinky.

Pokud salmonela překoná toto kyselé prostředí, usídí se v tenkém střevě. [5]

2.2.1 Propuknutí infekce

K propuknutí infekce dojde tehdy, když se salmonely dostanou do jícnu. Toto tvrzení potvrdily pokusy, při kterých se lidé neinfikovali, pokud suspenzi kmenů salmonel různých sérotypů jen kloktali, ale nepolkli.

Odborníci nejsou jednotného názoru, jaká je infekční dávka salmonel, tzn. dávka potřebná k tomu, aby se infekce rozvinula. Rozvoj infekce po expozici salmonelou je dán určitou pravděpodobností. Infekční dávku ovlivňuje mnoho faktorů: [5]

- Sérotypy obsahují kmeny s různou virulencí. U kmenů, které nejsou adaptovány na hostitele, je virulenci nesnadné prokázat.
- Čím více patogenů pronikne do organismu, tím je pravděpodobnost infekce větší.
- Záleží také na vehikulu infekce. Bakterie v kapalině (nápojích a vodě) žaludkem projdou rychleji a kyselina chlorovodíková je neinaktivuje.
- Podávání antacid (tj. látek snižujících kyselost v žaludku) snižuje infekční dávku.
- Velkou roli hraje vnímavost osob. Vnímavější osobou je patogen většinou eliminován bez následku.
- Úspěšnost izolace je závislá na věku hostitele. U dětí mladších jednoho roku je izolace salmonel z vzorku stolice vyšší, stejně jako i u ostatních střevních patogenů. To je dáno faktem, že jsou děti mnohem častěji mikrobiologicky testovány.

2.2.2 Postup infekce

Jakmile se salmonely usídí v tenkém střevě, začnou se množit. K mikroklkům sliznice tenkého střeva přilnou pomocí adhezinů. Adheziny se vážou na manózu, která je obsažena ve specifických receptorech na povrchu epitele, kde vytváří drobné trhlinky, ve kterých se množí.

Dále se salmonely pomnožují v makrofázích Peyerových platů a pronikají do submukózy a pak do regionálních lymfatických uzlin. [5]

2.2.3 Klinické projevy

Klinické projevy salmonelové infekce se začínají objevovat až po průniku tenkým stěvem. Čtyři hlavní syndromy mají typickou diagnostiku a terapii: [5]

- tyfus a paratyfus;
- gastroenteritida a alimentární infekce;
- bakteriémie a metastatické onemocnění;
- dlouhodobý nosičský stav.

U pacientů s oslabeným imunitním systémem se může vyskytnout SBP. [23]

2.2.3.1 Tyfus a paratyfus

Jsou způsobeny nejčastěji *Salmonellou Typhi* nebo *Salmonellou Paratyphi A, B a C*. Není ovšem vyloučeno, že v některých případech je může způsobit i jiný sérotyp. Po průniku do lymfatických cest se po pomnožení dostanou do krevního oběhu. V 7-10 dnech infikují játra, žlučník, slezinu, ledviny a kostní dřeň. Poté salmonely pronikají zpět do krve a ze žlučníku do tenkého střeva, vzniká nekróza a tyfové vředy. Pokud nejsou léčeny, může úmrtnost dosáhnout až 20%. [5]

2.2.3.2 Gastroenteritida a alimentární infekce

Nejčastěji se salmonela projevuje průjmem (symptomy jsou různé od pár řídkých stolic až po četné zelené vodnaté stolice), bolestí hlavy, malátností, nauzeou a zvracením.

Těžký průběh je velmi častý u mladistvých a starých lidí, nebo lidí trpících jiným onemocněním či dokonce chronickým onemocněním, jejichž imunitní systém je oslaben. [5]

2.2.3.3 Bakteriémie a metastatické onemocnění

Jedná se o vzácnou komplikaci, která je základním znakem tyfu, ale může se vyskytovat i u jiných salmonelových infekcí. K metastatickým (sekundárním) onemocněním jsou náchylné osoby s poškozenými chlopněmi, kloubními protézami a implantáty, nebo osoby trpící srpkovitou anémií. Významný je výskyt artritid, které vyvolává relativně malá dávka *Salmonelly Enteritidis*. [5, 27]

2.2.3.4 Dlouhodobý nosičský stav

Bakterie salmonely se za několik dní až měsíců samy vyloučí stolicí.

Chroničtí nosiči vylučují bakterie rok i déle. Pět procent lidí po břišním tyfu a paratyfu se stávají často doživotními nosiči. U osob do 20 let je to 1% pacientů, u osob nad 50 let je to 10% pacientů a u žen všech věkových kategorií je 2x více než mužů. [5]

2.2.4 Produkce endotoxinu

Endotoxiny jsou lipopolysacharidy (LPS), které se uvolňují při rozpadu buněčných stěn gramnegativních mikroorganismů. Nelze je neutralizovat antitoxiny, protože nemají specifickou tkáňovou účinnost, a taktéž je není možné převést na toxoidy. Lipopolysacharidy se zařazují mezi velmi termostabilní molekuly. Skládají se z hydrofobní části (lipid) a kovalentně vázané hydrofilní části (polysacharid nebo oligosacharid). U salmonelových bakterií je jeho struktura velmi dobře prostudovaná a lze je extrahovat pomocí HPCP metody.[10, 26]

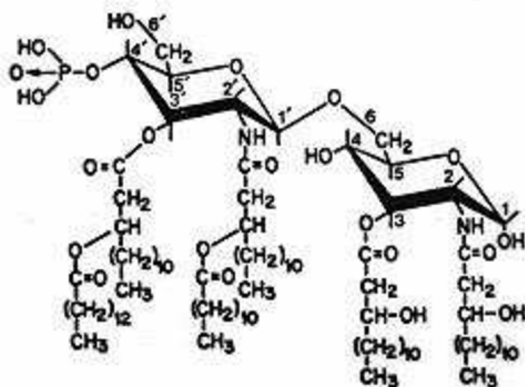
Endotoxiny působí především na:

- monocyty-makrofágy - monocyt je druh bílé krvinky (leukocyt), velký cca 12-20 μ m. Cirkuluje v krvi a tvoří 2-8% všech leukocytů. Po pár dnech cirkulace v krvi opouští krevní řečiště a mění se na makrofág. Monocyto-makrofágový systém má významnou úlohu v imunitě (např. fagocytóza);
- neutrofilů – jedná se o druh leukocytu. Podílí se na obraně proti bakteriální infekci, má schopnost pohlcovat cizorodý materiál. V krvi tvoří 50-70% leukocytů. V krvi jeho počet stoupá při infekcích a bakteriálních zánětech;
- endoteliální buňky – jedná se o membrány nebo monovrstvy buněk, které se nacházejí v krevních cévách, srdci, lymfatických cestách, povrchu míchy a mozku, přední komory očí, plicích, močovém měchýři, aj. [11]

Vliv endotoxinů na organismus jako celek je charakterizován následovně[12]:

- pyrogenní reakce – vyvolávají horečku;
- akutní zánětlivá reakce – aktivace krevních bílkovin (komplementů), které se podílejí na imunitních a alergických reakcích (ničení bakterií nebo uvolňování histaminu), s následnou cytolýzou (rozpadem buněk);
- mediátorová bouře – nekontrolovatelné uvolnění cytokinů (látky bílkovinné povahy produkované buňkami a sloužící k jejich vzájemnému ovlivňování a předávání informací);
- endotoxinový šok – jedná se o výsledek velkého množství endotoxinu, který nárazově zaplaví organismus a může vést k DIC – *diseminované intravaskulární koagulaci*, což je charakterizováno vznikem mnohočetných trombů v cévách mnoha orgánů a současně silným krvácením.

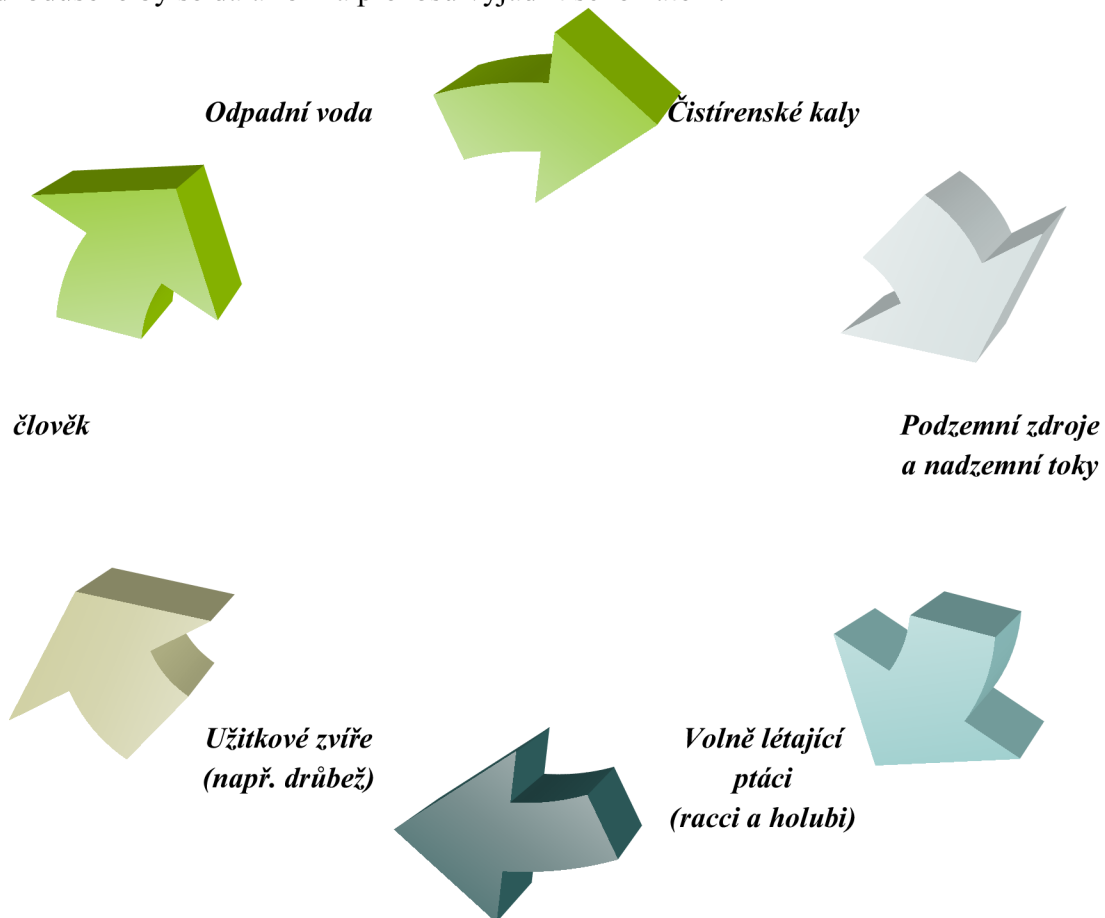
Je zřejmé, že endotoxiny vzniklé rozpadem symbiotických gramnegativních mikroorganismů organismu neškodí, ale uskutečňují fyziologické imunoregulační pochody. [10]



Obr. 2: Strukturální vzorec LPS *Salmonelly Typhimurium* [13]

2.3 Zdroje infekce

Zjednodušeně by se dala forma přenosu vyjádřit schématem:



Salmonely jsou velmi odolné bakterie, které ve vlhkém prostředí vydrží až několik měsíců (ve sladké vodě 2-41 dnů, slané 24-32 dnů a v kapkách vody 85-200 dnů a zmražené měsíce). Pro člověka jsou zdrojem nákazy savci a ptáci. Vzhledem k tomu, že salmonely ničí, krom běžných dezinfekčních prostředků a kyselého prostředí, i teploty nad 70°C. Člověk se může nakazit požitím nedostatečně tepelně zpracované potravy, jako jsou např.:

- pokrmy z vajec (pomazánky, majonézy);
- cukrářské výrobky (zmrzliny);
- nedostatečně tepelně zpracované maso (grilovaná kuřata, salámy, sekaná).

Mezi lidmi dochází k přenosu zcela výjimečně, protože k propuknutí infekce je nezbytná vysoká dávka bakterií. [6]

Salmonella Enteritidis byla izolována i z ovoce (a to jak ze slupky, tak z dužiny).

V ojedinělých případech může být zdrojem nákazy např. plaz. V roce 2001 propukla infekce salmonelózy v Novém městě na Moravě u tří novorozenců, dvou rodiček a jedné zdravotní sestry. Bylo zjištěno, že zdrojem bakterie salmonely byla vodní želva, kterou chovala jedna z rodiček.

V Norsku na přelomu roků 2003/2004 se vyskytla infekce u červených lišek, které se nakazily ulovením nakažených vrabců. [2, 21, 24]

2.4 Léčba salmonelózy

Jednou z nejrizikovějších skupin této infekce jsou děti, a to v batolecím, předškolním i mladším školním věku. Důvodem jsou četné vodnaté stolice, které způsobují odvodnění organismu (dehydrataci) a velkou ztrátu minerálů. Základem léčby je šetřící dieta spojená s doplňováním tekutin a minerálů. Antibiotika se běžně nepoužívají. U salmonelózy s průjmem (gastroenteritidou) podávání antibiotik může dobu klinických příznaků zkrátit, ale naopak prodlužuje tzv. dlouhodobý nosičský stav. Výjimku tvoří malí kojenci, kde hrozí velmi často bakteriémie. [6]

2.4.1 Šetřící dieta a rehydratace organismu

Nejvhodnější pro vyrovnání ztráty vody a minerálů jsou tzv. rehydratační roztoky, které se dají koupit v lékárně v prášku rozpustném ve vodě. Další možností je provizorní výroba v domácím prostředí. [7]

- Na 1 litr pitné a převařené vody přidat 1 polévkovou lžičku mořské soli a 7 lžic cukru. Tohoto roztoku by měl dospělý člověk vypít asi půl litru za hodinu a dítě čtvrt litru za hodinu.
- Pomerančový čaj – do 250 ml slabého černého čaje (šálek čaje nechat luhovat 1 minutu) přidat 50 ml čerstvě vymačkané pomerančové šťávy (popř. koupeného 100% pomerančového džusu), špetku kuchyňské soli a čajovou lžičku hroznového cukru.
- Bylinkový čaj – ostružinové listy, šalvěj.
- Borůvky – miska neslazených čerstvých borůvek nebo borůvek nasušených a před konzumací namočených ve vodě.
- Některé minerální vody.
- Nemastný a osolený masový či zeleninový vývar.

V prvních dnech se mají podávat nemastné a neslazené potraviny, např. slané tyčinky, suchary nebo starší preclíky. V následujících dnech, kdy už je stolice méně častá a tužší podávají se osolené vařené brambory, rozvařená rýže, bezvaječné těstoviny, strouhaná jablka, rozmačkané banány nebo borůvky (miska neslazených čerstvých borůvek nebo borůvek nasušených a před konzumací namočených ve vodě). Dále se doporučuje podávání potravin obsahujících složky střevní mikroflóry (probiotika) a substráty, na kterých se může tato flóra pomnožovat (prebiotika). Nejčastěji se používají přípravky s laktulózou, účinné jsou ale i bílé jogurty a kysané zelí.

Kojencům lékař doporučí nejvhodnější dietní přípravek. [7]

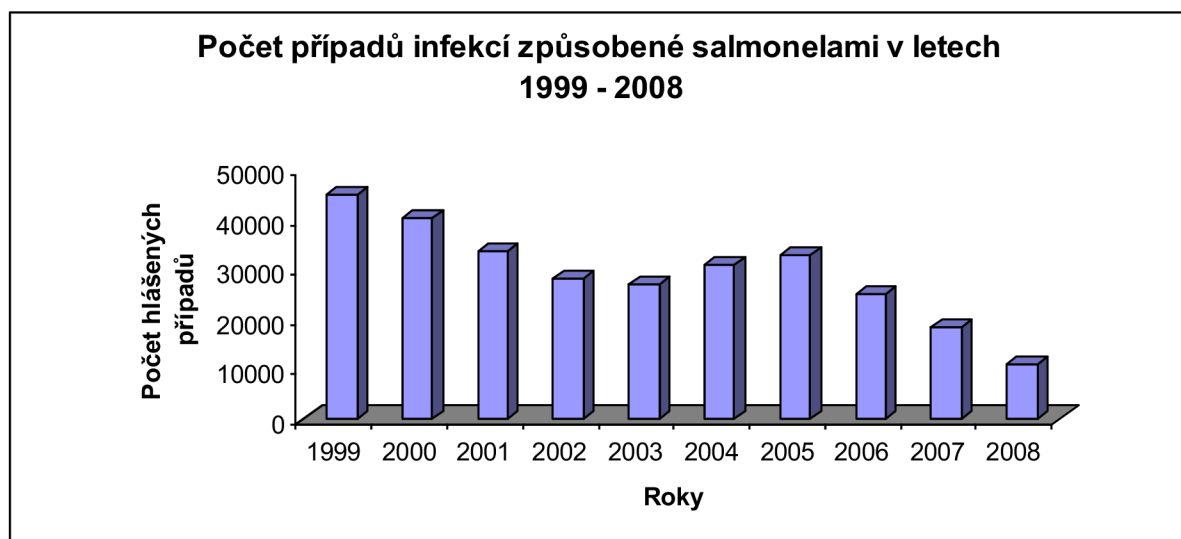
2.5 Hodnocení počtu případů infekcí způsobené salmonelami na území ČR

Počet případů infekcí způsobené rodem *Salmonella* v České republice od roku 1999 do roku 2008 podle Státního zdravotního ústavu je uveden v tab.3 a pro lepší přehled v grafu 1:

Tab.3: Počet případů infekcí způsobených salmonelami na území ČR [9]

Rok	Počet případů infekcí způsobených salmonelami
1999	44845
2000	40233
2001	33594
2002	27964
2003	26899
2004	30724
2005	32927
2006	25102
2007	18204
2008	11009

Graf 1: Grafické zpracování počtu případů infekcí způsobených salmonelami v letech 1999 až 2008



Počet případů infekcí způsobených salmonelami klesl na území České republiky od roku 1999 až do roku 2008 o více než 33 tisíc. Pokles může být způsoben několika možnostmi.

2.5.1. Prevence

Jako první se nám nabízí samozřejmě postupné zlepšování lékařské péče hlavně v oblasti prevence infekčních chorob mezi obyvatelstvem. Do této oblasti patří také prevence, která je prováděna v mateřských i základních školách. K velkému posunu vpřed v prevenci v rámci školských zařízení, došlo spolu se zavedením Rámcových vzdělávacích programů do škol, tak jak bylo předesláno v Národním programu rozvoje vzdělávání v České republice (tzv. Bílá kniha) a v novém Školském zákoně (Zákon 561/2004 Sb. V aktuálním znění, o předškolním, základním, středním, vyšším odborném a jiném vzdělávání). Rámcové vzdělávací programy se v současné době zpracovávají i pro oblast středoškolského vzdělávání. [18]

2.5.1.1 Prevence ve zdravotnictví

Zlepšování lékařské péče v oblasti prevence infekčních chorob mezi obyvatelstvem zejména formou informačních brožur či letáků, které jsou nejčastěji distribuovány mezi pacienty v čekárnách a ordinacích obvodních a odborných lékařů. Tvorbou a výrobou těchto materiálů se zabývají zejména zdravotní pojišťovny, které touto cestou usilují o dobrou informovanost svých klientů, a současně o snižování nemocnosti, a tím o snižování svých výdajů.

2.5.1.2 Prevence v mateřských školách

V mateřských školách je zaveden Rámcový vzdělávací program od 1. září 2007. Prevenci nejen infekčních nemocí se Rámcový vzdělávací program věnuje v rámci vzdělávací oblasti „Dítě a jeho tělo“. Cílem této oblasti je mimo jiné seznámit děti se svým tělem, pojmem zdraví, hygiena, stolování, dále je naučit sebeobslužným činnostem v oblasti osobní hygieny, vytváření zdravých životních návyků. Výuka se věnuje také prevenci nemocí, nezdravých návyků a závislostí.

2.5.1.3 Prevence v základních školách

Na základních školách je taktéž Rámcový vzdělávací program zaveden od 1. září 2007. Na takzvaných pilotních školách však běžel již o rok dříve. Prevencí infekčních chorob se zabývá vzdělávací oblast „Člověk a zdraví“, konkrétně pak v části Výchova ke zdraví. Výuka dětí navazuje na témata probíraná v rámci předškolního vzdělávání. V rámci Výchovy ke zdraví je mimo jiné důraz kladen na tyto podkapitoly:

- „Zdravý způsob života a péče o zdraví“ - výživa a zdraví, tělesná a duševní hygiena, režim dne, ochrana před přenosnými i nepřenositelnými chorobami, chronickým onemocněním a úrazy (bezpečné způsoby chování, zdravotní preventivní a lékařská péče, odpovědné chování v situacích úrazu a život ohrožujících stavů);
- „Hodnota a podpora zdraví“ - celkové pojetí člověka ve zdraví a nemoci, podpora zdraví a její formy (prevence a intervence, působení na změnu kvality prostředí a chování jedince, odpovědnost jedince za zdraví), podpora zdraví v komunitě (programy podpory zdraví).

Součástí vzdělávací oblasti „Člověk a zdraví“ je také Tělesná výchova, ve které je kladen důraz i na posilování imunity. Stejným systémem jsou vzdělávány také děti a mládež v mateřských a základních školách pro děti se speciálními vzdělávacími potřebami. [18]

2.5.1.4 Vliv médií

Důležitým prvkem (pozitivním i negativním) ve vztahu k preventivním opatřením proti salmonelovým infekcím, který nesmíme opomenout, jsou média (televize, rozhlas a v neposlední řadě denní tisk a časopisy). Média mnohdy dokáží způsobit mezi lidmi paniku a ti pak začínají měnit své chování a vše vnímají pouze podle toho, jak jim to daná média sdělí. V posledních pár letech se vyskytlo několik afér v různých řetězcích supermarketů a hypermarketů, které prodávaly zkažené maso (mělo zelenou barvu, a bylo tedy zdravotně závadné), kontaminované produkty obsahující majonézu a vejce, a potraviny po expiraci. O těchto produktech a potravinách, jež se neměly dostat na pult a ke konzumentovi, začala informovat média, která to zveličila a mnoho lidí dostalo strach a u kupovaných produktů kontrolovalo zda:

- mají narušený obal;
- mají odpovídající vzhled;
- mají dostatečnou dobu spotřeby;
- jsou dostatečně vychlazeny.

Mnoho lidí změnilo díky médiím svůj názor a stali se mnohem pečlivější a opatrnější, alespoň co se týče kupování potravin a následného zpracování před konzumací. Samozřejmě to poškodilo řetězce supermarketů a hypermarketů.

2.5.1.5 Obchodní řetězce a výrobci potravin

Na základě informací z obchodního řetězce se díky této situaci supermarketů a hypermarketů ještě více a důkladněji snaží o dodržování přesně stanovených ISO norem, zákonů, vyhlášek a principů správné hygienické praxe. Stávají se náročnějšími zákazníky výrobců potravin, kteří musejí dodržovat legislativu podle zákona č.110/1997 Sb., Zákon o potravinách a tabákových výrobcích, ve znění pozdějších předpisů a příslušných vyhlášek. Podle vyhlášky Ministerstva zemědělství č.147/1998 Sb. v aktuálním znění musejí mít výrobci potravin od 1. ledna 2000 zaveden systém HACCP. Tento systém kritických bodů ve výrobním procesu zajišťuje preventivní a systematický přístup k brzké identifikaci rizik a k zamezení jejich vzniku. Jednoduše lze tedy říci, že systém HACCP slouží k ovládní biologických, chemických nebo fyzikálních činitelů, které působí na potravinu, během celého výrobního procesu, a mohou porušit její závadnost.

Obchodní řetězce a výrobci potravin si dodržování těchto systémů, zákonů a vyhlášek kontrolují interními a externími audity. Externí kontroly provádí Krajská hygienická stanice. [19, 29]

2.5.1.6 Počasí

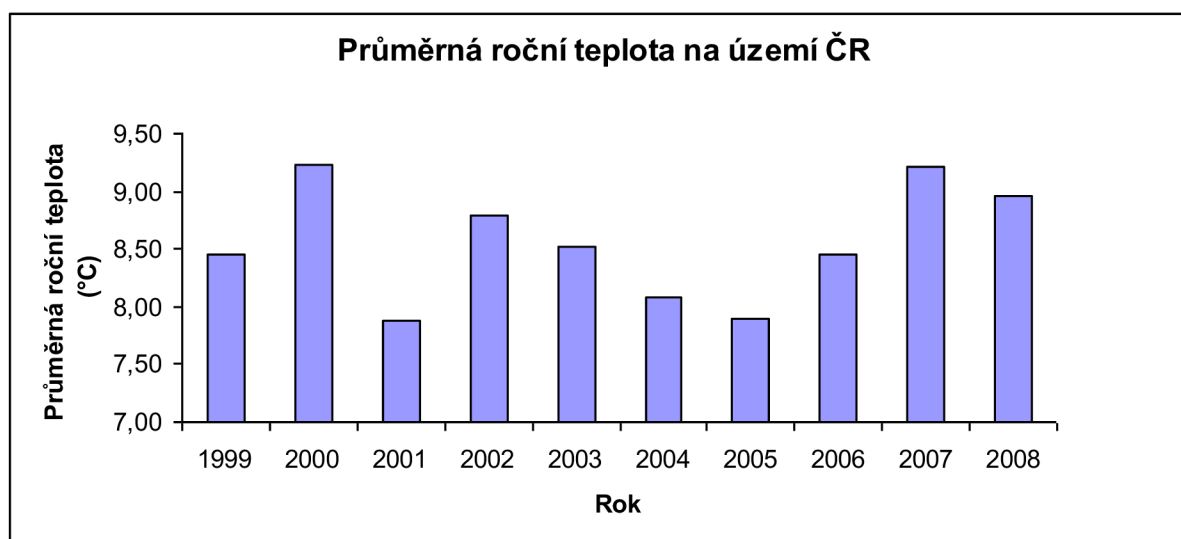
Pro rozšíření salmonelové infekce musíme vzít v úvahu i průměrné roční teploty, protože čím je vyšší teplota, tím rychleji se bakterie salmonely v potravinách pomnoží, zvyšuje se jejich množství (zvyšuje se infekční dávka), a tedy pravděpodobnost vzniku infekce. Toto riziko roste např. při přenášení potravin z obchodů do domácnosti, kdy se chlazená potravina během přepravy ohřeje.

Průměrné roční teploty, které jsou počítány z 22 meteorologických stanic na území ČR, byly použity z dostupných údajů na internetových stránkách Státního meteorologického ústavu ČR. Tyto teploty byly zapsány do tabulky (Tab.4) a pro lepší přehlednost také v grafu (Graf 2).

Tab.4: Průměrné roční teploty na území ČR v letech 1999 až 2008 [14]

Rok	Průměrná roční teplota
1999	8,45
2000	9,22
2001	7,88
2002	8,79
2003	8,52
2004	8,09
2005	7,89
2006	8,45
2007	9,22
2008	8,96

Graf 2: Grafické zpracování průměrných teplot na území ČR v letech 1999 až 2008



Po porovnání grafu (Graf 1. zpracování počtu případů infekcí způsobené salmonelami v letech 1999 až 2008) s grafem (Graf 2. Grafické zpracování průměrných teplot na území ČR v letech 1999 až 2008) je zřejmé, že vliv teplot během roku nemá výrazný vliv na výskyt salmonelových infekcí v běžné populaci. Můžeme naopak pozorovat opačný efekt. V letech, ve kterých se výskyt infekcí zvyšoval, průměrná teplota klesala a naopak v letech, ve kterých se výskyt infekcí snižoval, průměrná teplota rostla. Nejintenzivněji v posledních třech sledovaných letech (2006 až 2008).

2.6 Diagnostika a průkaz rodu *Salmonella*

Hlavním rezervoárem bakterií rodu *Salmonella* je střevní trakt zvířat i člověka. Zástupci přežívají dlouhou dobu i v půdě a ve vodě, proto mají vhodné podmínky pro šíření povrchovými vodami. Salmonely jsou odolné vůči nízkým teplotám, které je neničí, ale pouze zpomalí jejich metabolismus. Rostou v rozmezí +5 až 47 °C a pH od 4,0 do 9,0. Při teplotách nad 70 °C nejsou salmonely schopné přežít. Roli hraje i aktivita vody. Pokud ji snížíme pod 0,95, zabráníme tím jejich množení. [15]

2.6.1 Průkaz z potravin

Při průkazu salmonel se postupuje čtyřmi po sobě jdoucími kroky [15]:

- předpomnožení v neselektivní tekuté půdě (tlumivá peptonová voda);
- pomnožení v selektivních tekutých půdách (půda podle Rappaporta a Vassiliadise se sójou a půda podle Müllera a Kaufmanna s tetrathionem a novobiocinem);
- vyočkování na pevné půdy a hledání podezřelých kolonií. Povinná je půda XLD – (xylóza, lyzin a deoxycholan) nebo ji adekvátní půda např. půda s brilantní zelení nebo Rambachův agar;
- potvrzení pomocí biochemických a sérologických testů.

2.6.1.1 Příprava živných půd

Nejprve se odváží příslušné množství dehydratované půdy do vhodné reagenční nádoby a zalije se požadovaným množstvím deionizované vody. Při tomto postupu je důležité dbát na to, aby se nerozpuštěné zbytky dehydratované půdy nenalepily na zvlhčené stěny nádoby, což může vést k nepřesným výsledkům.

Půdy, které neobsahují agar, se musí dostatečně protřepat ještě před sterilizací v autoklávu. Dehydratované půdy mají tendenci při nedostatečném roztřepání přilnout na dno nádoby ve formě sirupovitého útvaru, což má za následek karamelizaci přítomných sacharidů, nežádoucí změnu pH, a jiné nežádoucí změny v půdě.

Půdy, které obsahují agar, se musí nechat nejprve nabobtnat ve studené deionizované vodě. Pro většinu agarů je dostatečná doba bobtnání přibližně 30 minut. Pokud není agar dostatečně nabobtnaný, může se okolo zrn nerozpuštěného agaru vytvořit tenká vrstva rozpuštěného agaru, která působí jako izolace proti proniknutí vody a tepla, takže se agar ani při dlouhodobější sterilizaci v autoklávu nerozpustí. To může mít ve finále vliv např. na tuhost agaru a zákal.

Reagenční nádoba na přípravu agarové půdy by měla být 2,5-krát větší než je konečný objem připravované půdy. Umožní to dokonalé promísení. [15]

2.6.1.2 Sterilizace

Podmínky sterilizace jsou specifické jednotlivě pro každou živnou půdu (je uvedeno v popisu na obalu dehydratovaného substrátu nebo v přibaleném letáku). Všeobecně se na sterilizaci používá teplota 115°C po dobu 20 minut a nebo 120°C po dobu 15 minut. Při frakcionované sterilizaci se využívá proudící páry, tj. při teplotě 100°C, opakovaně 2 až 3 dny po sobě vždy po 1 hodině. Zbytečné tepelné zatěžování půdy (neúměrné zvyšování teploty nebo prodlužování času sterilizace) může poškodit peptidické a polypeptidické zdroje aminodusíku, přítomné sacharidy, vitamíny a v neposlední řadě přítomné indikátory, což se projeví ztrátou kvality půdy.

Půdy, které se nesmí autoklávat, se rozvaří ve vodní lázni, kde se udržují po dobu 30-ti minut ve varu a po promíchání dalších 20 minut. Doporučuje se používat sterilní reagenční nádobu, sterilní deionizovanou vodu a navážku provádět nerezovou lžící vydezinfikovanou v 70% ethanolu a opálenou nad kahanem. [15]

2.6.1.3 Finální příprava a rozlévání

Některé půdy se dodávají jako pouhé základy, ke kterým je zapotřebí přidat další složky při přípravě. Těmto složkám se říká suplementy (inhibitory růstu, obohacovadla, aj.). Tyto suplementy se do půdy přidávají až po sterilizaci a zásadně až po ochlazení půdy na 45 až 50 °C. Po tomto ochlazení a přidání všech suplementů se půda vylévá do připravených sterilních nádob:

- zásobních nádob – po sterilizaci lze některé půdy ve větším množství uchovávat v zásobních nádobách v menších objemech při teplotě 4 °C, následně podle potřeby rozpustit ve vodní lázni (50°C) a po rozlití do Petriho misek nebo po rozplnění do zkumavek lze použít k dalšímu zpracování;
- petriho misky – půda se do nich rozlévá při ochlazení na 50 °C jsou připraveny k okamžitému použití a na kratší dobu je lze uchovávat při 4 °C;
- zkumavky – po ochlazení na 50 °C se půda rozplní do bakteriologických zkumavek, uloží se většinou v šikmé poloze a nechají se ztuhnout. [15]

2.6.1.4 Příčiny neuspokojivých výsledků

Příčin neuspokojivých výsledku při kultivacích je hned několik:

- Nesprávná hodnota pH – optimální hodnota pH je udávána při každé půdě. Použití nevhodné vody na rehydrataci, nedostatečné promíchání a nabobtnání, přehřátí půdy (a tím zhoršení pufrčních schopností půdy) a znečištěné reagenční nádoby nebo laboratorní pomůcky mohou tuto optimální hodnotu pH narušit.
- Neúplné rozpuštění – v některých půdách, zejména v základech pro krevní agary, může vzniknout sediment, který ale není překážkou k dalšímu použití. Pokud půda, která má být čirá, není po sterilizaci úplně rozpuštěná, pak je nevyhovující, a nelze ji použít k následné kultivaci. To může být způsobeno nedokonalým nabobtnáním agarů, použitím nevhodné nádoby nebo přehřátím půdy.
- Přehřátí půdy – může způsobit zhoršení pufrčních schopností půdy a tím změnu pH, což může v konečném důsledku vést k vypadnutí nerozpustných složek. Dále zhoršuje růstové vlastnosti půdy a ovlivňuje čírost půdy. Přehřátí agarové půdy vede k hydrolyze agarů, a tím ke ztrátě gelifikační schopnosti. Zvláště citlivé jsou půdy obsahující sacharidy.
- Násobně opakované rozechřívání půd.
- Dlouhé uchovávání živných půd ve zkumavkách a Petriho miskách.
- Nesprávné přidání suplementů při přípravě. [15]

2.6.1.5 Předpomnožení a pomnožení přítomných bakterií

Odběrové místo na vzorku potravin dezinfikujeme 70 % etanolem. Odvážíme přibližně 25 g vzorku do předem popsanych sterilních nádob. Tuto navážku zalijeme pomocí sterilní odměrné nádoby 225 ml tlumivé peptonové vody vytemperovanou na laboratorní teplotu. Pokud vzorky obsahují větší množství tuku, tak necháme peptonovou vodu vytemperovat na 45 °C a přidáme Tween 80 (1g/l média). Tyto nádoby pak uzavřeme pomocí svorky a inkubujeme v termostatu při 37 °C po dobu 16 až 20 hodin.

Poté 0,1 ml kultury z peptonové vody přeneseme pomocí automatické pipety a sterilní špičky do 10 ml tekuté půdy Rappaport Vassiliadis a inkubujeme v termostatu při 41,5 °C po dobu 24 hodin a poté naočkujeme na XLD a BGA agar. Tyto Petriho misky vložíme dnem vzhůru do termostatu a inkubujeme při 37 °C po dobu 24 až 48 hodin.

Kolonie bakterií rodu *Salmonella* rostou na půdě XLD červeně s černým středem. Tato půda obsahuje ve svém složení indikátor fenolová červeň, který se díky zkvašování xylózy, laktózy a sacharózy zbarví do žluta (bakterie salmonely nezksvašuje ani jedno a proto zbarvení půdy zůstává červené). Tvorbu sirovodíku indikuje síran železito-amonný. Ten se sirovodíkem redukuje na sulfid železnatý, který se zbarví do černa (ve středu kolonií). [15]

2.6.1.7 Potvrzení (Konfirmace) bakterií rodu *Salmonella*

Jedná se potvrzení salmonelových bakterií pomocí vhodných biochemických a sérologických testů.

Tab.5.: Biochemické testy odlišující salmonely od ostatních enterobakterií [5]

Mikrob	pohyb	plyn z glukózy	okyselení laktózy	Ureáza	Utilizace citrátu	Tvorba H ₂ S	Tvorba indolu
<i>Salmonella</i> Typhi	+	-	-	-	-	+	-
<i>Salmonella</i> spp.	+	+	-	-	+	+	-
<i>Shigella</i> spp.	-	-	-	-	-	-	V
<i>Escherichia coli</i>	+	+	+	-	-	-	+
<i>Citrobacter</i> spp.	+	+	+	-	+	V	V
<i>Klebsiella</i> spp.	-	+	+	+	+	-	V
<i>Proteus</i> spp.	+	V	-	+	V	V	V

+ (pozitivní reakce)

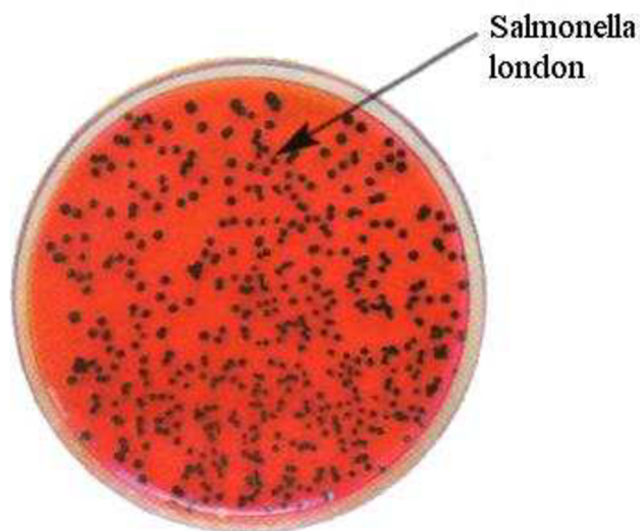
- (negativní reakce)

V (variabilní reakce)

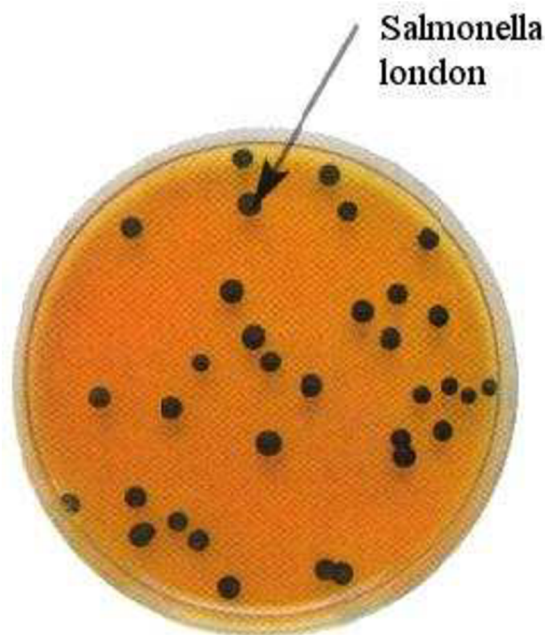
- Pohyb – nefermentující bakterie je možné v některých polotuhých médiích testovat na pohyblivost (k tomuto účelu můžeme použít MIU – pohyb, indol, ureáza). Čistou kulturu očkujeme do média ve zkumavce, vpichem až na dno. Poté uložíme zkumavku na 24 hodin do termostatu, a sledujeme, zda se bakterie pomnožila pouze v oblasti vpichu nebo v celém objemu média. To se projeví zákalem.
- Plyn z glukózy – bakterie rodu *Salmonella* není schopná štěpit sacharózu a laktózu a je schopna štěpit glukózu a mannitol. Štěpením se uvolňuje CO₂, který tvoří mezi dvěma vrstvami MIU a agaru podle Hajna vrstvu bublinek (média se v některých případech rozdělí).
- Okyselení laktózy – nejčastěji se realizuje v tzv. *oxidačně-fermentačním bazálním médiu dle Hugh a Leifsona*, které obsahuje pepton a laktózu v poměru 2:1. Salmonelly jsou laktóza negativní. Výjimku tvoří *Salmonelly* izolované z mořských plodů na rybích trzích a přístavech v Indii, kde byly 2 % z pozitivních nálezů laktóza pozitivní. [28]
- Ureáza – štěpení močoviny nastává u bakterií, které produkují ureázu (enzym štěpící močovinu). Pozitivní reakce se vyskytují např. u *Klebsielly* nebo *Protea* a projevuje se obvykle červeným zbarvením.
- Utilizace citrátu – některé bakterie mohou využívat místo cukru citrát. Toto bylo popsáno roku 1923 Koserem. Test byl původně prováděn v tekutém médiu obsahujícím citrát sodný, fosfát draselný, fosfát sodno-amonný a sulfát hořečnatý. Po inkubaci se posuzoval nárůst. Následně metodu zdokonalil Simmons. Ten přidal do

média agar a indikátor (bromthymolovou modř). Tato tmavě zelená tuhá půda se rozplňuje do menších zkumavek a ušikmuje v úhlu přibližně 30°. Inokulum se očkuje kličkou po povrchu půdy a inkubuje se v termostatu při 37 °C po dobu 24 hodin. Pozitivní reakce je indikovaná výrazně modrým zbarvením.

- Tvorba H₂S – jde o významný určující znak, protože jen několik málo druhů zástupců enterobakterií má schopnost produkovat sirovodík. Jako zdroj síry se často využívá thiosulfát sodný a indikátorem vzniklého sirovodíku je pak citrát železitý nebo také citrát železito-amonný. Použít lze např. agar podle Hajna, média KIA (Kligler iron agar) nebo TSI (triple sugar iron agar). Přítomnost sirovodíku lze pozorovat i na půdách selektivně-diagnostických např. MAL (Manitol – Arabinózo – Laktózový agar – obr. 3), DCA (Deoxycholát – citrátový agar- obr. 4) nebo XLD (Xylóza – Lysin – Deoxycholátový agar – obr. 5)

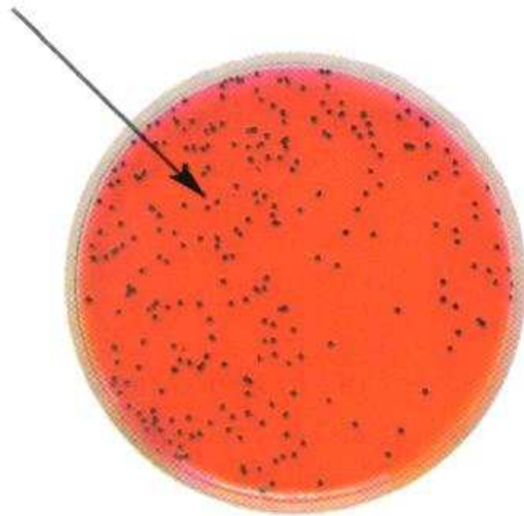


Obr. 3: Růst *Salmonelly london* na MAL [16]



Obr. 4: Růst *Salmonelly london* na DCA [16]

Salmonella
enteritidis



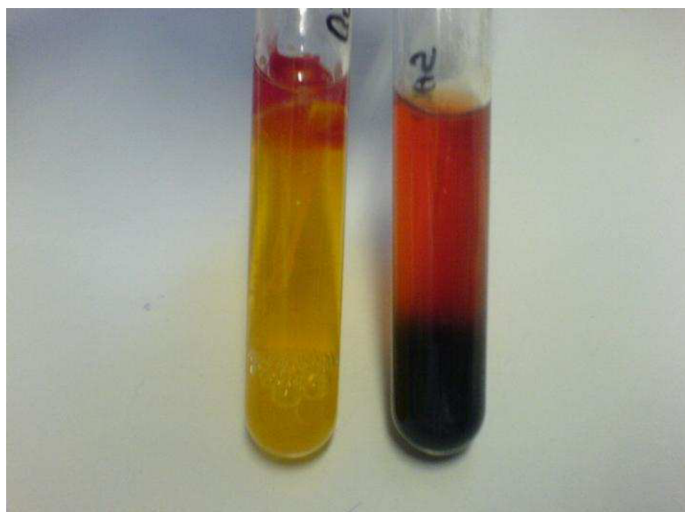
Obr. 5: Růst *Salmonella* *Enteritidis* na XLD [16]

Vhodným médiem je agar podle Hajna. Tuto půdu je vhodné kombinovat ve zkumavce s MIU (v tomto polotuhém médiu můžeme sledovat pohyb, hydrolyzu močoviny (ureáza test) a tvorbu indolu.

Na obr. 6 je připravena tato kombinaci a naočkována *Salmonella* *Enteritidis* a *Escherichia coli*.

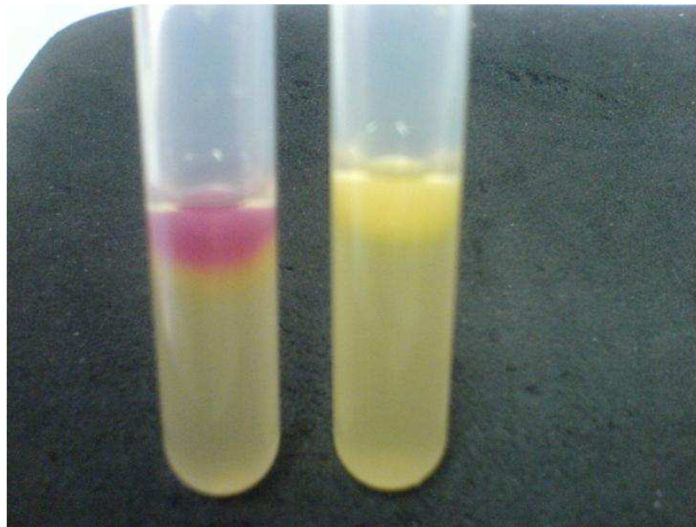
Vlevo se nachází zkumavka naočkováná *Escherichia coli*. Je dobře patrné, že okyseluje laktózu (žluté zbarvení), nehydrolyzuje močovinu, je pohyblivá, tvoří indol a kvasí glukózu. Na rozhraní MIU a agaru podle Hajna jsou patrné bublinky vzduchu – tvorba plynu.

Vpravo se nachází zkumavka naočkováná *Salmonella* *Enteritidis*. Je dobře patrné, že neokyseluje laktózu (barva beze změny), nehydrolyzuje močovinu, netvoří indol. Lze vidět zákal v celém objemu média – je pohyblivá a ve spodní části, kde se nachází agar podle Hajna, je velmi dobře patrná tvorba sirovodíku.



Obr. 6: Kombinace agaru podle Hajna a MIU

- Tvorba indolu – U nefermentujících bakterií má značný diagnostický význam, protože pozitivní reakce je pouze u malého počtu druhů. Test se provádí v 0,5 ml živného bujónu obohaceného tryptofanem. Z důvodu produkce malého množství indolu některými nefermentujícími bakteriemi je pro lepší pozorování vhodné extrahovat indol pomocí xylenu nebo chloroformu, eventuálně protřepání s kapkou parafínu. Po přidání kapky Ehrlichova nebo Kováčova činidla se u pozitivní reakce vytvoří na rozhraní obou kapalin červený prstenec.
- Na obr. 7 byl proveden test na tvorbu indolu u *Escherichia coli* a *Salmonelly* Enteritidis. V levé zkumavce je pozitivní reakce *Escherichie coli* a v pravé zkumavce negativní reakce *Salmonelly* Enteritidis.



Obr. 7: Pozitivní a negativní reakce indolu

2.6.2 Klinický materiál

Postup při stanovení salmonely je znázorněn na jednoduchém schématu [5]:



2.6.2.1 Odběr materiálu

Odběr vzorku by měl být proveden co nejdříve od projevu prvních klinických symptomů. Pro transport se využívá odběrová souprava s transportní půdou. Tato souprava obsahuje:

- sterilní tampón na tyčince, který je zabalený ve sterilním obalu;
- transportní půdu ve zkumavce (nejčastěji se jedná o transportní půdu dle Stuarda, Amiese nebo Carryové – Blaira).

Odběr se provádí opatrným zavedením tampónu za řitní svěrač. Opatrnou rotací se setře sliznice konečníku. Správný odběr se pozná podle zřetelné stolice na povrchu tamponů. Tampon se zanoří hluboko do zkumavky z transportní půdou a nádobka se uzavře. [5]

2.6.2.2 Transport materiálu

Transport takto odebraného vzorku se provádí při pokojové teplotě (max. 20°C) nebo při teplotě chladničkové (4°C) a musí být ke zpracování do laboratoře dopraven co nejdříve po odběru, aby se zabránilo pomnožení jinými kontaminanty, které by mohly přerůst zkoumaný patogen, a tím zakrýt jeho přítomnost. [5, 20]

2.6.2.3 Příjem materiálu

Základním požadavkem dobré laboratorní praxe je pečlivá dokumentace. Lékař na žádance o vyšetření musí uvést co nejvíce informací o vzorku. Následně laborant při přijetí vzorku porovná údaje na odběrové soupravě s údaji na žádance o vyšetření a zanesení je do počítače. Při této činnosti přiřadí vzorku zvláštní číslo, které zapíše na žádanku a odběrovou nádobku. Toto číslo se přiřazuje jako prevence záměny vzorků a tím vydání nesprávného výsledku, které mohou mít pro odpovědného pracovníka dalekosáhlé následky, a to jak pro pacienta, tak z hlediska soudního. [5]

2.6.2.4 Kultivace

Odběrová souprava se všemi řádně vyplněnými údaji je přesunuta z příjmu materiálu do bakteriologické laboratoře k dalšímu zpracování. Kultivace je obdobná té, která je popsána v kapitole 2.6.1.7 *Potvrzení (Konfirmace) bakterií rodu Salmonella*.

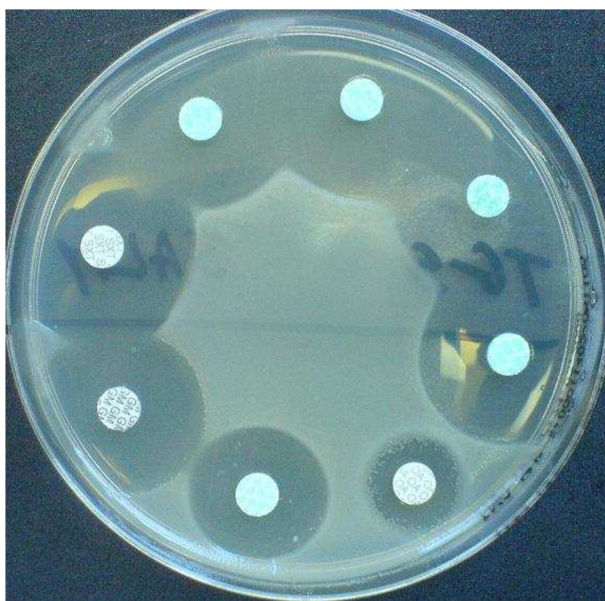
2.6.2.5 Identifikace a vyšetření citlivosti na ATB

Identifikovat podrobně každého mikroba izolovaného v laboratoři je nepotřebné a navíc neekonomické. K tomu, aby se výsledek dostal do rukou lékaře co nejrychleji z důvodu ovlivnění průběhu léčby, se využívá zkrácených postupů vyšetření. Laboratoře používají jednoduché a neúplné metody podle požadavků lékaře.

Typizace se provádí z epidemiologických důvodů v centrálních referenčních laboratořích.

Vyšetření citlivosti na ATB je spojeno s následnou kultivací, proto toto vyšetření trvá dalších 24 hodin. Pacienti s akutními příznaky jsou léčeni dříve, než lékař obdrží zprávu z klinické laboratoře. Výsledek poté jen potvrzuje, zda byla zvolena správná terapie. [5]

Na obr. 8 je stanovení citlivosti na ATB. Měří se zóny kolem ATB disku.



Obr. 8: Stanovení citlivosti na ATB, rod *Salmonella*

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Chemikálie, přístroje, pomůcky

3.1.1 Chemikálie

Enzymatický kaseinový hydrolyzát (IMUNA Pharm a.s., SR), yeast extrakt (IMUNA Pharm a.s., SR), Glukóza (Merk, Německo), K_2HPO_4 (Merk, Německo), Agar (IMUNA Pharm a.s., SR), UREA (Dr. Kulich Pharma, s.r.o., ČR)

3.1.2 Přístroje a pomůcky

Analytické váhy Kern PLT 2500-2M (VAMONT, ČR), parní sterilizátor PS - 121 V (Chirana, ČR), magnetická míchačka s ohřevem RCT IKAMAG (A&D, Japonsko), laboratorní pH metr Orion 2 Star (Merci, ČR), magnetická míchadla, Erlenmayerové baňky, odměrný válec, alobal, sterilní gáza, zkumavky PS 10 ml (DispoLab, ČR) se zátkou, skleněná pipeta, Petriho misky

3.1.3 Připravené roztoky

Pro přípravu média byl připraven 40 % roztok urey připravený smísením 40 g urey se 100 ml sterilní deionizované vody. Vzniklý roztok byl zmrazen 6 dnů před použitím.

Pro úpravu pH média byly připraveny čerstvé roztoky HCl a NaOH o koncentracích (1, 2, 5 a 10 %) pro přesnější úpravu pH.

Jako indikátor byl použit 1 % roztok fenolové červeně, který byl připraven jako zásobní roztok 15 dní před přípravou média.

3.2 Příprava MIU

75 g Enzymatického kaseinového hydrolyzátu, 10 g yeast extraktu, 5 g glukózy, 10 g K_2HPO_4 a 7,5 g agaru bylo naváženo do 5 litrové Erlenmayerovy baňky a zalito 3 litry deionizované vody. Roztok se promíchal a nechal ustát. Poté byl doplněn na objem 5 litrů a bylo vloženo magnetické míchadlo. Roztok byl míchán jednu hodinu při 550 ot./min. Po jedné hodině bylo zapnuto topné zařízení a nastavena teplota na 100 °C a otáčky sníženy na 400 ot./min a mícháno do dokonalého rozpuštění všech chemikálií (1 hodinu a 20 minut).

Po dokonalém rozpuštění bylo přidáno 25 ml roztoku fenolové červeně. Ten byl odebrán ze zásobního roztoku sterilní skleněnou pipetou. Topné těleso magnetické míchačky bylo vypnuto a otáčky zvýšeny na 550 ot./min. Roztok se dále promíchal 20 minut.

Takto připravené médium bylo odměřeno po 200 mililitrech do jedenácti 500 mililitrových Erlenmayerových baněk, které byly jednotlivě označeny číslicemi viz. Tab. 6. a vloženo magnetické míchadlo.

Tab. 6: Požadované a konečné pH a jeho změny během přípravy

Erlenmayerova baňka č.:	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.
pH požadované	6,00	6,20	6,40	6,60	6,80	7,00	7,20	7,40	7,60	7,80	8,00
pH před sterilizací	6,02	6,21	6,42	6,61	6,81	7,01	7,20	7,42	7,61	7,82	8,01
pH po sterilizaci	5,96	6,15	6,38	6,57	6,76	6,95	7,16	7,37	7,58	7,79	7,98
pH konečné	6,01	6,19	6,41	6,59	6,81	7,01	7,20	7,39	7,61	7,80	8,01

V takto rozdělených roztocích byla upravená pH na hodnoty uvedené v Tab. 6. Po úpravě pH byla hrdla Erlenmayerových baněk uzavřena alobalem a sterilizována v parním sterilizátoru 20 minut při 121 °C. Poté ochlazená na 50 °C, umístěna na magnetickou míchačku se zapnutým ohřevem z důvodu udržení teploty nad 45 °C, přidáno 16 ml 40 % roztoku urey a překontrolována hodnota pH viz. Tab. 6.

Kontrola pH byla provedena mimo celkový obsah vzorku média, aby nedošlo k jeho kontaminaci. Vzorek média byl odpipetován sterilní skleněnou pipetou na Petriho misku a hodnota pH byla změřena po ochlazení na pokojovou teplotu a následně upravena. Tento postup se opakoval vždy několikrát do konečné hodnoty pH viz. Tab. 6.

Vyhovující médium bylo rozplněno do 22 zkumavek tak, aby sloupec média měl minimálně 5 cm. Zkumavky byly pevně uzavřeny a popsány číslicí dle dané Erlenmayerovy baňky.

Ze všech jedenácti sad vzorku, byly dvě zkumavky odloženy jako srovnávací a zbylé byly naočkovány *Salmonellou* Enteritidis, *Shigelou sonnei*, *Eschericia coli*, *Klebsiellou pneumoniae* a *Proteem mirabilis*. Všechny tyto zkumavky byly umístěny do termostatu a kultivovány 16 hodin při 37 °C.

4. VÝSLEDKY A DISKUZE

Je možné odlišit rod *Salmonella* od ostatních rodů čeledi *Enterobacteriaceae* a to kultivací a biochemickými testy. Ke kultivacím se užívají půdy selektivně diagnostické, např.:

- XLD
- MAL
- DCA
- Endova půda
- Agar podle Hajna
- Bizmut – sulfitový agar
- TSI

Příklad biochemických testů k detekci salmonel např.:

- Ureázový test
- Stuartův ureázový bujón
- Indolový test
- oxidačně-fermentačním bazálním médiu dle Hughha a Leifsona
- ONPG test

Jednou z možností stanovení rodu *Salmonella* je užití kombinovaného média MIU, ve kterém je kombinován ureázový a indolový test. Protože se jedná o polotuhé médium, je možné určovat pohyb bakterií. Pohyb bakterií je velmi citlivý na hodnotu pH připraveného média. Cílem experimentální části bylo stanovit optimální hodnotu pH při kultivaci *Salmonelly* *Enteritidis* v polotuhém médiu MIU a dokonalému odlišení od ostatních rodů čeledi *Enterobacteriaceae*.

4.1 Výsledek

Po 16 hodinách kultivace v termostatu bylo provedeno pozorování a test na tvorbu indolu.

4.1.1 *Salmonella* Enteritidis

Tab. 7: Pozorování pohybu, tvorby ureázy a indolu u *Salmonelly* *Enteritidis*

Označení	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.
Erlenmayerovy baňky	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.
Pohyb	-	+/-	+	+/-	+	+	+	+/-	+/-	+/-	+/-
Indol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Urea	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pozitivní výsledek	+										
Negativní výsledek	-										
Nerozhodný výsledek	+/-										

Po kultivaci se pH média lehce snížilo zkvašením glukózy. To bylo pozorovatelné, v porovnání se srovnávacím vzorkem, změnou barvy indikátoru do žluté oblasti. V médiu byly patrné větší bubliny vzduchu – důkaz tvorby plynu zkvašováním glukózy. Tvorba ureázy byla u všech vzorků negativní. Pohyb byl velmi dobře patrný v rozmezí pH 6,8 – 7,2. Po zakapání, protřepání s parafinovým olejem a přidáním malého množství Ehrlichova činidla byla reakce na tvorbu indolu negativní.

4.1.2 *Shigella sonnei*

Tab. 8: Pozorování pohybu, tvorby ureázy a indolu u *Shigelly sonnei*

Označení	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.
Erlenmayerovy baňky	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.
Pohyb	+/-	+/-	+/-	-	+/-	-	-	-	-	+/-	+/-
Indol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Urea	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pozitivní výsledek	+										
Negativní výsledek	-										
Nerozhodný výsledek	+/-										

Po kultivaci se pH média snížilo zkvašením glukózy. To bylo pozorovatelné, v porovnání se srovnávacím vzorkem, změnou barvy indikátoru do žluté oblasti. Tvorba ureázy byla u všech vzorků negativní. Bakterie *Shigelly* nevykazuje pohyb, což bylo dobře patrné v rozmezí pH 7,0 – 7,6. Po zakapání, protřepání s parafinovým olejem a přidáním malého množství Ehrlichova činidla byla reakce na tvorbu indolu negativní.

4.1.3 *Escherichia coli*

Tab. 9: Pozorování pohybu, tvorby ureázy a indolu u *Escherichia coli*

Označení	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.
Erlenmayerovy baňky	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.
Pohyb	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Indol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Urea	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pozitivní výsledek	+										
Negativní výsledek	-										
Nerozhodný výsledek	+/-										

U *Escherichie coli* nebyla zaznamenána žádná odchylka a ve všech vzorcích byl stejný výsledek. Byl dobře pozorovatelný pohyb. Po zakapání parafínem a přidání Ehrlichova činidla

byla reakce na tvorbu indolu výrazně pozitivní. Tvorba ureázy byla u všech vzorků negativní. V médiu, ve kterém byla patrná změna pH – zkvašování glukózy, se nacházelo množství bublinek – tvorba plynu z glukózy.

4.1.4 *Klebsiela pneumoniae*

Tab. 10: Pozorování pohybu, tvorby ureázy a indolu u *Klebsiely pneumoniae*

Označení	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.
Erlenmayerovy baňky	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.
Pohyb	+/-	+/-	-	-	-	-	-	+/-	+/-	-	+/-
Indol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Urea	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
Pozitivní výsledek	+										
Negativní výsledek	-										
Nerozhodný výsledek	+/-										
Variabilní výsledek	V										

U *Klebsiely pneumoniae* byla tvorba ureázy negativní. Ovšem po opětovném ponechání v termostatu bez zátek se po hodině a půl barva indikátoru od horní části média postupně měnila ve fialovočervenou – pozitivní reakce tvorby ureázy.

Klebsiela pneumoniae není pohyblivá. To bylo dobře pozorovatelné v rozmezí pH 6,4 – 7,2. Tvorba indolu byla negativní.

4.1.5 *Proteus mirabilis*

Tab. 11: Pozorování pohybu, tvorby ureázy a indolu u *Protea mirabilis*

Označení	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.
Erlenmayerovy baňky	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.
Pohyb	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Indol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Urea	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Pozitivní výsledek	+										
Negativní výsledek	-										
Nerozhodný výsledek	+/-										

U *Protea mirabilis* nebyla zaznamenána žádná odchylka a ve všech vzorcích byl stejný výsledek. Pohyb dobře patrný, tvorba indolu negativní a tvorba ureázy velmi výrazně pozitivní – fialovočervené zbarvení indikátoru.

4.1.6 Hodnocení

Tab. 11: Rozlišení testovaných rodů čeledi *Enterobacteriaceae* u média MIU

Bakterie	Pohyb	Indol	Urea
<i>Salmonella</i> Enteritidis	+	-	-
<i>Shigella sonnei</i>	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	+	+	-
<i>Klebsiela pneumoniae</i>	-	-	+
<i>Proteus mirabilis</i>	+	-	+
Pozitivní výsledek	+		
Negativní výsledek	-		

Tab. 12: Srovnání optimálních hodnot pH jednotlivých bakterií u média MIU ,

Bakterie	Optimální hodnota pH		
	Pohyb	Indol	Urea
<i>Salmonella</i> Enteritidis	6,8-7,2	6,0-8,0	6,0-8,0
<i>Shigella sonnei</i>	7,0-7,6	6,0-8,0	6,0-8,0
<i>Escherichia coli</i>	6,0-8,0	6,0-8,0	6,0-8,0
<i>Klebsiela pneumoniae</i>	6,4-7,2	6,0-8,0	6,0-8,0
<i>Proteus mirabilis</i>	6,0-8,0	6,0-8,0	6,0-8,0

Tvorba indolu a ureázy byla ve všech zkoumaných vzorcích v celé řadě pH až na *Klebsiela pneumoniae* (viz. kap. 4.1.4 *Klebsiela pneumoniae*) bez větších odchylek.

Pohyb byl na změnu pH nejvíce citlivý u *Salmonella* Enteritidis, *Shigella sonnei* a *Klebsiela pneumoniae*. Optimální hodnota pH byla stanovena v rozmezí 7,0 – 7,2 (viz. Tab. 12) při konečné úpravě média před rozplněním do zkumavek.

Rozlišení jednotlivých rodů čeledi *Enterobacteriaceae* je zpracováno v Tab. 11.

5. ZÁVĚR

V teoretické části byla zhodnocena obecná charakteristika bakterií rodu *Salmonella*, jeho patogeneze, zdroje, léčba a šetřící dieta pro nemocné.

- Mezi nejrizikovější skupiny salmonelových infekcí patří děti a občané důchodového věku. Výskyt epidemií je lokalizován nejčastěji na školní jídelny, stravovací provozy a prodejny salátů, mléčných výrobků a masa.
- Byly popsány klinické příznaky, průběh nemoci a rozebrány možnosti léčby dodržováním šetřící diety a doplňováním dostatečného množství tekutin. Byly navrženy i nejvhodnější potraviny a rehydratační roztoky, které si člověk nemusí kupovat v lékárně, ale může si je připravit doma ze surovin, které mu jsou k dispozici.
- Byly zpracovány data Státního zdravotního ústavu ČR o výskytu salmonelových infekcí u obyvatelstva v letech 1999 – 2008 a byly diskutovány důvody poklesu těchto případů. V diskuzi byl rozebrán vliv prevence na snižování počtu případů infekce zlepšováním lékařské péče, informovanosti obyvatelstva a zaváděním Rámcových vzdělávacích programů do škol dle Zákona 561/2004 Sb. v platném znění.
- Byl rozebrán vliv médií a na základě informací z obchodního řetězce zavádění preventivních opatření k zamezení výskytu kontaminovaných potravin na pultech prodejen.
- Byly zpracovány údaje o průměrných ročních teplotách z 22 meteorologických stanic na území ČR v letech 1999-2008 z dostupných údajů Českého meteorologického ústavu .

Základem pro snižování počtu případů je prevence, informovanost v maximální míře, dodržování správných hygienických návyků, požívat dostatečně tepelně zpracovanou potravu.

- Byla rozebrána problematika diagnostiky a průkazu rodu *Salmonella* z potravin a klinického materiálu. Jsou uvedeny příklady a nejčastější možnosti kultivací. Následně byl rozebrán příklad zpracování klinického materiálu od vypsání žádanky a správného odběru až po vyhodnocení a stanovení citlivosti.
- Byly popsány jednotlivé biochemické testy určení bakterií rodu *Salmonella*.

V experimentální části byl proveden pokus o stanovení optimální hodnoty pH média MIU určeného ke kultivaci enterobakterií. Původně bylo médium připravované v rozmezí pH 7,4 – 7,6 při konečné úpravě. Tvorba indolu a ureázy byla přesná a dostatečně patrná. Naopak pohyb byl nepřesný a v mnoha případech špatně určen nebo byl výsledek nerozhodný.

Tímto pokusem bylo zjištěno, že pH připravovaného média není vhodné a je potřeba ho upravit. Optimální hodnota pH byla stanovena na 7,0 – 7,2 při konečné úpravě.

Došlo k úpravě postupu přípravy média a chybné určení pohybu enterobakterií se snížilo na minimum.

6. POUŽITÉ ZDROJE

1. BEDNÁŘ, Marek a spol. Lékařská mikrobiologie. Marvil 1996. s. 261-270.
2. VOTAVA, Miroslav a kolektiv, Lékařská mikrobiologie speciální, Neptun 2003. s. 53-62. ISBN 80-902896-6-5
3. VOTAVA, Miroslav a kolektiv, Lékařská mikrobiologie II., Přehled vyšetřovacích metod v lékařské mikrobiologii, MU – lékařská fakulta, Brno 2000, s.154-165. ISBN 80-210-2272-8.
4. ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology. Academia 2002. s. 260-263. ISBN 80-200-1024-6.
5. GREENWOOD, David a kolektiv. Lékařská mikrobiologie – Přehled infekčních onemocnění:patogeneze, imunita, laboratorní diagnostika a epidemiologie. GRADA Publishing 1999. ISBN 80-7169-365-0.
6. GREGORA, Martin. Očkování a infekce nemoci dětí, Grada Publishing, a.s, 2005, s. 80-82.
7. Dr. KEUDEL, Helmut. Nemoci dětského věku, Gräfe und Unzer Verlag GmbH, München, 1997, s. 93-94.
8. SEDLÁK, Kamil a Tomšíková, Markéta, Nebezpečné infekce zvířat a člověka. Nakladatelství Scientia, spol. s.r.o., 2006, s. 20-27, 94-103.
9. Oficiální stránky Státního zdravotního ústavu, Infekce v ČR – EPIDAT, dostupné z: <<http://www.szu.cz/data/vybrane-infekcni-nemoci-v-cr-v-letech-1998-2007-absolutne>> [cit. 22.4.2009].
10. ZBOŘIL, Vladimír a kolektiv, Mikroflóra Trávicího traktu, Grada 2005, s.46-48. ISBN 80-247-0584-2.
11. VOKURKA, Martin a spol., Velký lékařský slovník, MAXDORF 2004. ISBN 80-7345-037-2.
12. LOCHMANNOVÁ, J. a Lochmann, O., Antiinfekční terapie v gastroenterologii, Triton 2001, s. 17-22.
13. TODAR, Kenneth, Ph.D.,[online].2008 [cit. 23.4.2009]
Dostupné z: <<http://www.textbookofbacteriology.net/endotoxin.html>>.

14. Oficiální stránky Českého meteorologického ústavu – obor klimatologie. [cit. 19.4.2009]. Dostupné z: <<http://www.chmi.cz/meteo/ok/infklim.html>>.
15. BURDYCHOVÁ, Radka. Sládková, Pavla. Mikrobiologická analýza potravin, MZLU v Brně, 2007, s. 134-138. ISBN 978-80-7375-116-4.
16. Katalog firmy Imuna Pharm, a.s. (Katalog živných půd) pro rok 2004.
17. Information of *Salmonella* spp. Denis Kundel Microscopy, Inc., 2004 [cit. 14.5.2009], Dostupné z: <<http://www.phidias.us/phinfo/topicSearchResult.php?showall=1&pathogenID%5B%5D=32>>.
18. Oficiální stránky Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy. [cit. 20.4.2009]. Dostupné z: <<http://www.msmt.cz/dokumenty/novy-skolsky-zakon>>.
19. Oficiální stránky Krajské hygienické stanice Moravskoslezského kraje [cit. 25.4.2009]. Dostupné z: <<http://www.khsova.cz/01/index.php>>.
20. Laboratorní příručka LLM s.r.o. Třinec a Frydek Místek, [cit. 16.5.2009] Dostupné z: <<http://www.llm.cz/index.php?id=235>>.
21. REZENDE, Ana Carolina, de CASTRO, M. Fernanda P.M., PORTO, Ernani, UCHINA, Cristiane. A., BENATO, Eliane, PANTEADO, Ana L. Occurrence of *Salmonella* spp. in persimmon fruit and growth of *Salmonella* Enteritidis on the peel and in the pulp of this fruit. Food control [online], 2008, vol. 20, no. 11 [cit. 15.5.2009], s. 1025-1029. Dostupný z: <<http://www.sciencedirect.com/>>.
22. BABU, Uma, WIESENFELD, Paddy, GAINES, Dennis, RAYBOURNE, Richard B. Effect of long chain fatty acids on *Salmonella* killing, superoxide and nitric oxide production by chicken macrophages. *International Journal of Food Microbiology* [online], 2008, vol. 132, no. 1 [cit. 15.5.2009], s. 67-72. Dostupný z: <<http://www.sciencedirect.com/>>.
23. RAJAKAR, Harshal, WAI, Chun-Tao, LEE, Kang-Hoe, WONG, Sin-Yew, TAN, Kai-Chan. Spontaneous bacterial peritonitis from *Salmonella*: an unusual bacterium with unusual presentation. *Hepato Int.* [online], 2008, vol. 2, no.3 [17.5.2009] s. 388-389. Dostupné z: <<http://apps.isiknowledge.com/>>, ISSN: 1936-0533.
24. HANDELAND, Kjell, NESSE, Live L., LILLEHAUG, Atle, VIKØREN, Turid, DJØNNE, Berit, BERGSJØ, Bjarne. Natural and experimental *Salmonella* Typhimurium infection in foxes. *Veterinary microbiology* [online], 2008, vol. 132, no. 1-2, [cit. 17.5.2009], s. 129-134. Dostupný z: <<http://www.sciencedirect.com/>>.

25. POPOFF, M. Y., BOCKEMUHL, J., GHEESLING, L. L. Supplement 2002 (no. 46) to the Kauffmann-White scheme. *Research in Microbiology* [online], 2004, vol. 155, no. 7, [cit. 17.5.2009], s. 568-570. Dostupný z: <<http://apps.isiknowledge.com/>>, ISSN: 0923-2508.
26. HOWE, Jörg, ANDRA, Jörg, CONDE, Raquel, IRIARTE, Maite, GARIDEL, Patrick, KOCH, Michel, H. J., GUTSMANN, Thomas, MOIYÓN, Ignacio, BRANDENBURG, Klaus. Thermodynamic Analysis of the Lipopolysaccharide-Dependent Resistance of Gram-Negative Bacteria against Polymyxin B. *Biophysical journal* [online], 2007, vol. 92, no. 8, [cit. 18.5.2009], s. 2796-2805. Dostupný z: <<http://www.sciencedirect.com/>>.
27. LLANA, Mariángeles, Noto, SARNACKI, Sebastián H., GIACOMODONATO, Mónica N., CACCURI, Roberto L., BLANCO, Guillermo A., CERQUETTI, M. Cristina. Sublethal infection with *Salmonella* Enteritidis by natural route induces intestinal and joint inflammation in mice. *Microbes and Infection* [online], 2009, vol. 11, no. 1, [cit. 18.5.2009], s. 74-82. Dostupný z: <<http://www.sciencedirect.com/>>.
28. KUMAR, Rakesh, SURENDRAN, P. K., THAMPURAN, Nirmala. Detection and characterization of virulence factor in lactose positive and lactose negative *Salmonella* serovars isolated from seafood. *Food Control* [online], 2009, vol. 20, no. 4, [cit. 18.5.2009], s. 376-380. Dostupný z: <<http://www.sciencedirect.com/>>.
29. Oficiální stránky CQS – Sdružení pro certifikaci systému řízení jakosti. [cit. 19.5.2009]. Dostupné z: <<http://www.cqs.cz/haccp.php>>.

7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

ATB	Antibiotika
BGA	Brilliant Green Agar
DCA	Deoxycholát-citrátový agar
DIC	Diseminovaná intravaskulární koagulace
H ₂ S	Sirovodík
HACCP	Hazard Analysis Critical Control Points (Analýza rizik a tvorba kritických kontrolních bodů)
HCl	Kyselina chlorovodíková
HPCP	Fenol-chloroform-benzolová extrakce
ISO	International Organization for Standardization
K ₂ HPO ₄	Hydrogenfosforečnan draselný
KIA	Kligler iron agar
LPS	Lipopolysacharid
MAL	Manitol-arabinózo-laktózový agar
MIU	Pohyb-urea-indol médium
NaOH	Hydroxid sodný
PS	Polystyrén
Sb.	Sbírky
SBP	Spontánní bakteriální peritonitida
TSI	Triple sugar iron agar
XLD	Xylóza, lyzin a deoxycholanový agar