

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2012

Vladimíra Burdová

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



Streptokokové infekce urogenitálního traktu žen

Bakalářská práce

Vladimíra Burdová

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie
Forma studia: Prezenční

Olomouc 2012

Vedoucí práce: RNDr. Pavla Válová

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma Streptokokové infekce urogenitálního traktu vypracovala samostatně pod vedením RNDr. Pavly Válové a uvedla v ní všechny použité zdroje.

V Olomouci dne

.....
Vladimíra Burdová

SOUHRN

Ve své bakalářské práci na téma „Streptokokové infekce urogenitálního traktu žen“ jsem se zaměřila hlavně na výskyt *Streptococcus agalactiae* v pochvě žen. Tato bakterie i v dnešní době způsobuje v oblasti gynekologie a porodnictví velké komplikace. I přes to, že kolonizace pochvy bývá většinou asymptomatická, u novorozenců a pacientů se sníženou imunitou může způsobit závažná onemocnění. Velká pozornost nálezů *Streptococcus agalactiae* v pochvě je věnována těhotným ženám, jelikož může způsobit záněty plodových obalů, sepsi, dokonce potrat nebo předčasný porod. Kolonizovaná matka může také během porodu infikovat novorozence, u kterého mohou poté nastat vážné poporodní sepse končící až smrtí. Má studie vychází z výsledků získaných z nálezů *Streptococcus agalactiae* v gynekologickém materiálu standardními laboratorními metodami, které jsem měla možnost si vyzkoušet v Laboratořích Mikrochem a.s. v Olomouci. Z výsledků vyplývá, že těhotné pacientky jsou daleko častější kolonizovanou skupinou než netěhotné pacientky a proto důraz na preventivní screening během těhotenství je opodstatněný. Nejběžnější kolonizovanou skupinu tvořily těhotné i netěhotné pacientky ve věku 25–35 let. *Streptococcus agalactiae* byl častěji izolován společně s dalšími druhy bakterií a kvasinek, než jako samotný patogen.

SUMMARY

In my bachelor thesis "Streptococcal urogenital tract infections in female" I focused mainly on occurrence of the *Streptococcus agalactiae* in female vagina. The bacteria cause harmful effects upon gynaecology and obstetrics even nowadays. Despite of fact that the colonization of a vagina is mainly asymptomatic it can cause serious diseases in a newborns, seniors and patients with weak immunity. A lot of attention is paid to discovery of *Streptococcus agalactiae* within the vagina of a pregnant female. This could cause inflammation of fetus tunic, sepsis, premature birth or even abortion. Colonized mother can infect the newborn during the birth, causing it parturient sepsis which can lead to death. My study is based upon the results obtained by direct laboratory methods that lead me to discovery of *Streptococcus agalactiae* in gynaecological material. I had an opportunity to carry out the research in Laboratoře Mikrochem a. s. in Olomouc. The results imply that the group of pregnant patients is much more colonised than the group of non-pregnant ones. This fact stresses the importance of preventive screening during the pregnancy. The most common colonised group is represented in females of age 25-35 years. *Streptococcus agalactiae* used to be isolated more often with other types of bacteria and yeasts rather than pathogen itself

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych ráda poděkovala RNDr. Pavle Válové, RNDr. Renatě Fialové, Ph.D., a MUDr. Lence Titzové za vedení a odbornou pomoc při zpracování bakalářské práce. Dále děkuji své rodině za velkou podporu a pomoc při studiu.

OBSAH

1	ÚVOD	8
2	CÍL PRÁCE	10
3	TEORETICKÁ ČÁST	11
3.1	Fyziologie poševního prostředí	11
3.1.1	Poševní ekosystém	11
3.1.2	Poševní mikroflóra	12
3.1.3	Infekce pochvy	13
3.2	Čeleď Streptococcaceae	14
3.2.1	Rod Streptococcus	14
3.2.2	Významní zástupci rodu <i>Streptococcus</i>	15
3.2.2.1	<i>Streptococcus pyogenes</i>	15
3.2.2.2	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	15
3.2.2.3	<i>Streptococcus agalactiae</i>	16
3.2.2.3.1	Základní charakteristika	16
3.2.2.3.2	Epidemiologie	17
3.2.2.3.3	Klinické projevy <i>Streptococcus agalactiae</i>	18
3.2.2.3.4	Antibiotická léčba <i>Streptococcus agalactiae</i>	22
3.2.2.3.5	Screening <i>Streptococcus agalactiae</i> v těhotenství	22
3.2.2.3.6	Intrapartální antibiotická profylaxe	23
3.2.2.3.7	Streptokokové autovakcíny	25
3.3	Obecné schéma průkazu mikroorganismů	27
4	PRAKTICKÁ ČÁST	29
4.1	Materiál a metodika	29
4.1.1	Charakteristika vyšetřovaného materiálu	29
4.1.2	Odběr materiálu	30
4.1.3	Způsob očkování a kultivace	30
4.1.4	Odečítání	31
4.1.5	Mikroskopické hodnocení	32
4.1.6	Identifikační testy	32
5	VÝSLEDKY	36
5.1	Frekvence výskytu <i>Streptococcus agalactiae</i> v populaci žen	37
5.2	Distribuce nálezu <i>Streptococcus agalactiae</i> ve věkových kategoriích žen	38
5.3	Výskyt <i>Streptococcus agalactiae</i> s jinými druhy bakterií a kvasinek	39
6	DISKUZE	40
7	ZÁVĚR	42
8	SEZNAM LITERATURY	43
9	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	48
10	PŘÍLOHA	49

1 ÚVOD

Téma své bakalářské práce „Streptokokové infekce urogenitálního traktu žen“ jsem si zvolila, jelikož je mi blízké nejen z pozice ženy, ale hlavně také z pohledu budoucí matky. Studie totiž odhalily, že streptokokové infekce mohou způsobovat vážná onemocnění a až smrt novorozenců.

Svět mikroorganismu je obsáhlý a obklopuje člověka na každém kroku a tak infekcím nepodléhá jen tělo novorozence, ale provází celý lidský život. Původci infekcí v lidském těle jsou viry, bakterie, plísně nebo prvoky, které mohou kolonizovat celé tělo. Nejčastějšími místy kolonizace streptokoky je kůže, sliznice krku, plíce, trávicí a dosti často také urogenitální trakt. Do oblasti pochvy se mohou streptokoky šířit z trávicího traktu, který je považován za primární ložisko. Kolonizace může být občasná, přechodná nebo trvalá. U dospělých, zejména se sníženou imunitou, způsobují kožní a podkožní infekce, poruchy ledvin, zápal plic, meningitidu, záněty urogenitálního traktu až bakteriémií.

Rod *Streptococcus* zahrnuje grampozitivní fakultativně anaerobní katalasa negativní koky. V humánní medicíně je důležité dělení na β -hemolytické streptokoky, mezi které patří hlavně *Streptococcus pyogenes* a *Streptococcus agalactiae*, a non- β -hemolytické streptokoky zahrnující například *Streptococcus pneumoniae*. V urogenitálním traktu se nejčastěji vyskytuje *Streptococcus agalactiae*, který největší problém způsobuje v těhotenství. V anglické literatuře bývá označován jako GBS, což značí *group B streptococci*.

U těhotných žen může probíhat infekce streptokokem B bez příznaků. Infekce se tak může z pochvy rozšířit nahoru porodními cestami a způsobit nitroděložní infekci, zánět plodových obalů, endometria a také předčasný porod.

Při porodu dochází v 40–60 % k vertikálnímu přenosu *Streptococcus agalactiae* z matky na dítě. Proto je hlavní příčinou mortality (5–20 %) a morbidit u novorozenců. Mezi nejčastější onemocnění novorozenců patří bakteriémie, pneumonie, meningitida a septický šok, které se mohou projevit během prvních hodin a dní po narození. Nejvíce jsou ohroženi na životech novorozenci předčasně narození, kteří v krvi nemají ještě dostatek protilátek. Preventivní opatření zahrnují prenatální screening v 35.–37. týdnu těhotenství. Pokud je výsledek vyšetření pozitivní nebo není k dispozici, zavádí se před a během porodu antibiotická profylaxe. Samotná léčba streptokoků z poševních výtěrů může být obtížná, jelikož se u nich

vyskytuje poměrně velká rezistence vůči řadě antibiotik, jako jsou například erytromycin a klindamycin. V terapii se proto doporučuje užívání antibiotik z řady penicilinů a cefalosporinů.

V praktické části bakalářské práce jsou zahrnuty bakteriologické metody k laboratornímu průkazu *Streptococcus agalactiae*, které používají Laboratoře Mikrochem a.s. v Olomouci. Tyto metody jsem měla možnost si vyzkoušet a ze statistických údajů 3 737 vzorků jsem hodnotila nález *Streptococcus agalactiae* u žen v závislosti na věku, těhotenství a společném výskytu s dalšími patogeny.

2 CÍL PRÁCE

Cílem teoretické části mé bakalářské práce bylo vypracovat literární rešerši o původci infekcí urogenitálního traktu žen *Streptococcus agalactiae*, jeho léčbě a přenosu z kolonizované těhotné ženy na dítě.

Cílem praktické části bylo seznámit se s metodami přímého průkazu *Streptococcus agalactiae* z gynekologického materiálu a zároveň vyhodnotit nález *Streptococcus agalactiae* v pochvě v závislosti na věku, těhotenství a výskytu společně s dalšími patogeny.

3 TEORETICKÁ ČÁST

Poševní prostředí je velmi citlivé a přirozeně je organizováno tak, aby bylo chráněno před exogenními mikroorganismy. V případě jakéhokoliv narušení cizorodým mikrobenem se zastoupení původní mikroflóry pochvy může změnit natolik, že dojde k vyvolání patogenních procesů jako například chronických zánětů. Proto je důležité věnovat velkou pozornost zachování přirozené mikroflóry pochvy a jestliže k narušení dojde, dbát na identifikaci patogenů a následnou vhodnou léčbu.

3.1 Fyziologie poševního prostředí

Poševní prostředí lze považovat za určitý typ ekosystému (Mašata *et al.*, 2004).

3.1.1 Poševní ekosystém

Poševní ekosystém se skládá z poševní sliznice, ve které probíhají chemické a fyziologické interakce mezi kolonizující flórou a sliznicí, mikrobiální flóry a komplexních interakcí jak mezi hostitelem a mikroorganismy, tak mezi samotnými organismy mezi sebou. Navíc zde dochází i k interakci s exogenními organismy (Mašata *et al.*, 2004).

Poševní sliznice tvoří nejen neutrální půdu pro širokou škálu mikroorganismů, ale sama je jimi ovlivňována (Mašata *et al.*, 2004). Je složena z vícevrstevného dlaždicového epitelu, jehož tloušťka a odlupování povrchové vrstvy je pod vlivem estrogenu, na kterém je závislá přítomnost laktobacilů (Čihák *et al.*, 2002).

Epitel pochvy funguje pro mikroorganismy jako zdroj živin. Hlavní živinou je škrob uložený uvnitř buněk pochvy. Ten je degradován a použit pro růst bakterií. Dalšími složkami živin jsou odloučené části poševního epitelu, stopové prvky, vitamíny, esenciální látky, ale také železo, které je důležitou složkou enzymů zvyšujících schopnost mikroorganismů vyvolat infekci. Složení a hustotu mikroflóry ovlivňuje také pH a oxidoredukční potenciál, který je v pochvě nízký a upřednostňuje ho hlavně anaerobní bakterie. Hodnota pH v pochvě se u žen v reprodukčním věku pohybuje v rozmezí 3,8–4,5. Kyselé pH pochvy zajišťuje rovnováhu poševního ekosystému, protože není vhodné pro některé druhy mikroorganismů (Mašata *et al.*, 2004).

3.1.2 Poševní mikroflóra

Složení poševní mikroflóry je dynamické. Je ovlivňováno nejen věkem, první menstruací, délkou menstruačního cyklu, těhotenstvím, průběhem porodu, infekcemi, ale i frekvencí pohlavního styku, počtem sexuálních partnerů a různými praktikami a zvyky (Schwebke *et al.*, 1999; Clarke *et al.*, 2002; Eschenbach *et al.*, 2000; Ness *et al.*, 2002; Burton et Reid, 2002). Mikroorganismy vyskytující se běžně v pochvě mají důležitou roli v prevenci proti kolonizaci nežádoucími organismy, které jsou odpovědné za záněty pochvy, kvasinkové infekce, sexuálně přenosné nemoci a infekce močových cest (Gupta *et al.*, 1998; Sobel, 1999; Donders *et al.*, 2000; van de Wijgert *et al.*, 2000). Abnormální složení poševní mikroflóry a infekce dolního genitálního traktu jsou spojeny se zvýšeným rizikem infekce HIV (Sewankambo *et al.*, 1997). Díky tomuto poznatku vědci usuzují, že normální mikrobiální ekosystém může hrát klíčovou roli při snížení pravděpodobnosti získání a přenosu HIV (Hillier, 1998; Schwebke, 2001).

Dřívější studie hovořily o tom, že pochva zdravé ženy je osídlena pouze laktobacily. Dnes však víme, že je kolonizována i jinými druhy bakterií, např. *Escherichia coli*, *Gardnerella vaginalis*, *Staphylococcus epidermidis*, α -, β -hemolytickými streptokoky (Mašata *et al.*, 2004) (Tab 1). Laktobacily nemusí být přítomny v dominantním počtu, jsou ale velmi důležité při udržování normálního poševního ekosystému. Produkují kyselinu mléčnou, peroxid vodíku a jiné antimikrobiální látky, které zabraňují přemnožení patogenů (Hillier, 1998).

Tab. 1: Frekvence výskytu mikroorganismů v pochvě zdravé ženy
Zdroj: Mašata et al., 2004

Typ bakterie	Mikroorganismus	Izolované bakterie [%]
Aerobní bakterie	<i>Lactobacillus</i>	17–97
	<i>Diphtheroides</i>	18–83
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	7–67
	<i>Staphylococcus aureus</i>	0–12
	α -hemolytické streptokoky	2–53
	β -hemolytické streptokoky	0–93
	Nehemolytické streptokoky	4–37
	Enterokoky	4–44
	<i>Escherichia coli</i>	0–28
	<i>Gardnerella vaginalis</i>	40–43
	<i>Mycoplasma hominis</i>	15–72
	<i>Ureaplasma urealyticum</i>	40–95
Anaerobní bakterie	<i>Latobacillus</i>	11–72
	<i>Bacteroides fragilis</i>	0–20
	<i>Bacteroides sp.</i>	0–50
	<i>Fusobacterium sp.</i>	0–18
	<i>Peptostreptococcus sp.</i>	12–40
	<i>Veillonella sp.</i>	0–17
	<i>Clostridium sp.</i>	0–17
	<i>Bifidobacterium sp.</i>	0–32
	<i>Eubacterium sp.</i>	0–36

3.1.3 Infekce pochvy

Nejčastějším onemocněním ženského pohlavního traktu jsou vulvovaginální infekce. Postihují většinou zároveň pochvu i vnější ženské pohlavní orgány. Klinicky se tyto infekce projevují výtokem, svěděním nebo pálením zevních rodidel (Mašata et al., 2004). Infekce vzniká narušením normální mikroflóry a následnou kolonizací patogeny. Mezi infekční onemocnění se zařazuje vulvovaginální kandidóza, bakteriální vaginóza, trichomoniáza (Anderson et al., 2004). Podle původce dělíme onemocnění na bakteriální, virové, plísňové a parazitární (Mašata et al., 2004).

3.2 Čeleď Streptococcaceae

Do čeledi *Streptococcaceae* patří lékařsky významné rody bakterií *Streptococcus*, *Enterococcus*. V poslední době ale nabývají na medicínské důležitosti také další rody z této čeledi jako například *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Alloiococcus* a *Helcococcus*. Příslušníci této čeledi jsou katalasa negativní, protože nedokáží tvořit hem skládající se z železa a porfyriu. Jmenované rody jsou mezi sebou odlišné obsahem guaninu, cytosinu, biochemickými vlastnostmi, ale také tvarem a uspořádáním koků (Votava *et al.*, 2003).

3.2.1 Rod Streptococcus

Streptokoky jsou fakultativně anaerobní, grampozitivní, katalasa negativní koky (Schleifer *et al.*, 1987, cit Kubota *et al.*, 2010). Jsou schopni se řadit do dvojic až řetězků. Vyskytují se u člověka, ale také u zvířat. Nejčastějšími místy kolonizace je kůže, sliznice krku, plíce, trávicí a urogenitální trakt.

První klasifikace dělila streptokoky na α -, β - a γ - hemolytické a byla založena na sledování typu hemolýzy při růstu na krevním agaru. Dnes se užívá spíše rozdělení streptokoků na β -hemolytické a non- β -hemolytické (Beneš, 2009). Skupina β -hemolytických se dělí na streptokoky s úplnou hemolýzou, která se projevuje odbarvením a projasněním pŕdy v okolí hemolytické kolonie, a s neúplnou hemolýzou, kde k projasnění pŕdy nedochází. Do non- β -hemolytické skupiny patří γ -hemolytické streptokoky, u kterých se hemolýza nevyskytuje a α -hemolytické streptokoky, nazývané také viridující, které přeměňují krevní barvivo na zelený verdoglobín.

Rod streptokoků lze také třídit dle Lancefieldové. Toto třídění je založeno na antigenních vlastnostech pouzderného polysacharidu C. Je-li u streptokoků polysacharid C přítomen, potom tyto streptokoky dělíme do skupin označených písmeny A–Z. Ovšem pneumokokům a některým streptokokům tento polysacharid chybí, takže nemohou být tímto způsobem klasifikováni. I přes tento fakt se třídění streptokoků dle Lancefieldové používá (Lancefield, 1933; Votava *et al.*, 2003).

Streptokoky způsobují angínu, faryngitidy až pneumonie, hnisavé kožní infekce, spálu, poporodní sepse, infekční endokarditidu a mnohá další onemocnění (Lobovská, 2001). Už v roce 1879 Louis Pasteur označil streptokoky za původce poporodních sepsí (Shet *et Ferrieri*, 2004).

3.2.2 Významní zástupci rodu *Streptococcus*

Zástupci rodu *Streptococcus* kolonizují různé části těla. Já jsem se zaměřila na významné zástupce vyskytující se v pochvě. Mezi ně patří *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae* a *Streptococcus agalactiae*, který je blíže popsán v kapitole 3.2.2.3.

3.2.2.1 *Streptococcus pyogenes*

Streptococcus pyogenes patří u člověka mezi nejpatogennější druhy z rodu *Streptococcus*. Tvoří kulaté nebo lehce ovoidní koky, které se spojují do dvojic či řetízků. Patří mezi β -hemolytické streptokoky a dle dělení Lancefieldové tvoří skupinu A. V anglické literatuře bývá označován zkratkou GAS, *group A streptococci* (Votava *et al.*, 2003; Beneš, 2009). Hlavními faktory virulence jsou protein M a pouzdro z kyseliny hyaluronové. Působí totiž antifagocytárně a adhezenčně (Bisno *et al.*, 2003). Kyselina hyaluronová je téměř neimunogenní, protože se u savců běžně vyskytuje v pojivové tkáni, a tak ji bakteriální imunitní systém předpokládá za tělu vlastní (Votava *et al.*, 2003).

GAS se šíří přímým i nepřímým kontaktem a kapénkovou infekcí (Beneš, 2009). V 19. a na začátku 20. století byly poporodní GAS infekce hlavní příčinou mortality a morbidit u matek v šestinedělí. Avšak díky moderním terapeutickým postupům tyto komplikace téměř vymizely (Mašata *et al.*, 2004). Přesto je GAS celosvětově stále významným patogenem s vysokou mortalitou a morbiditou. Je příčinou i široké škály onemocnění, časté jsou například tonzilitida, faryngitida, spála, nekrotizující fascitida nebo streptokokový syndrom toxického šoku, který je vyvolaný GAS toxiny (Stevens, 1992; Beneš, 2009).

3.2.2.2 *Streptococcus pneumoniae*

Streptococcus pneumoniae patří mezi další významné lidské patogeny, kolonizace zvířat se vyskytuje jen vzácně. Do rodu *Streptococcus* byl zařazen v roce 1974 na základě genetické příbuznosti se streptokoky.

Pneumokok, jak bývá *Streptococcus pneumoniae* označován, je non- β -hemolytický kok ovoidního tvaru, s tendencí sdružování do dvojic (Votava *et al.*, 2003; Beneš, 2009). Nejdůležitějším faktorem virulence je u pneumokoků jejich polysacharidové pouzdro. Na základě antigenní struktury pouzdra můžeme u *Streptococcus pneumoniae* rozlišit 90 sérotypů. Jeho schopnost vyvolat imunitní odpověď je využívána při vakcinaci (Bentley *et al.*, 2006).

Pneumokok se přenáší z člověka na člověka kapénkovou infekcí při kašli a kýchání (Beneš, 2009). Pneumokokové infekce mohou postihnout člověka v každém věku, ale skupinu s největším rizikem onemocnění tvoří děti mladší než 2 roky a dospělí starší 65 let. Mezi velmi závažná invazivní pneumokoková onemocnění patří pneumonie (zápal plic), meningitidy a bakteriémie. Pneumokok je také významným původcem slizničních infekcí, jako je zánět středního ucha a vedlejších dutin nosních (Cartwright, 2002). Ve výjimečných případech může vyvolat u žen infekci v malé pánvi (Votava *et al.*, 2003).

3.2.2.3 *Streptococcus agalactiae*

Mezi nejvýznamnější zástupce rodu *Streptococcus* kolonizující pochvu patří *Streptococcus agalactiae*. Přítomnost této bakterie v pochvě může způsobovat velké komplikace hlavně v těhotenství, proto je jí v oblasti gynekologie a porodnictví věnována velká pozornost.

3.2.2.3.1 Základní charakteristika

Druh *Streptococcus agalactiae* (Obr. 1) byl poprvé izolován Lancefieldovou a Harem z vaginálních kultur žen po porodu, které nejevily žádné příznaky infekce (Beneš, 2009). V anglické literatuře bývá označován jako „group B streptococci“ (GBS), jelikož náleží do skupiny β -hemolytických streptokoků skupiny B dle Lancefieldové. Termín *agalactiae* je odvozen od stavu, který vyvolávají zvířecí kmeny u krav. U napadených krav dochází k mastitidě spojené se ztrátou tvorby mléka (Votava *et al.*, 2003). Do roku 1937 byl *Streptococcus agalactiae* považován za neškodného příživníka živícího se zbytky potravy hostitele, takzvaného komenzála. Poté Fry nahlásil 7 případů poporodních horeček a 3 úmrtí asociované s výskytem GBS a označil jej za původce puerperální sepse (Shet *et Ferrieri*, 2004).

Obr. 1: *Streptococcus agalactiae* snímáný rastrovacím elektronovým mikroskopem (<http://www.sciencephoto.com/media/13015/enlarge>)



GBS tvoří dlouhé řetězky, které v tekutých mediích vypadají, jako by byly složeny ze dvojic koků. Patří mezi patogeny lidí i zvířat, ovšem zvířecí kmeny nevyvolávají u člověka žádné infekce.

GBS obsahuje kromě skupinově specifického antigenu B také typově specifické polysacharidové antigeny. Díky antigenním vlastnostem můžeme streptokoky skupiny B dělit dále dle sérotypu I až VIII (Votava *et al.*, 2003; Beneš, 2009). Pro člověka jsou nejdůležitější sérotypy Ia, III a V, které jsou spojené s neonatálními nemocemi (Zaleznik *et al.*, 2000). Zatím jediným známým faktorem virulence je pouzdro obsahující kyselinu N-acetylneuraminovou (sialovou), která brzdí aktivaci fagocytózy (Votava *et al.*, 2003).

3.2.2.3.2 Epidemiologie

Nejčastějším místem výskytu *Streptococcus agalactiae* je gastrointestinální a urogenitální trakt. Primárním ložiskem je ovšem trakt gastrointestinální. Kolonizace v ústech a hltanu je nízká, avšak u homosexuálů může být častější (Dillon *et al.*,

1982; Beneš, 2009). Míra kolonizace GBS v pochvě a rektu u žen závisí na věku, geografické poloze, ve které žena žije, a etnickém původu (Phares *et al.*, 2008). Častěji jsou kolonizovány ženy ve věku 22–30 let (Meyn *et al.*, 2009). U žen černé barvy kůže se GBS vyskytuje v pochvě s daleko větší frekvencí než u žen barvy kůže bílé. Možným vysvětlením je, že černošky jsou častěji kolonizovány GBS v rektu než bílé ženy a tím pádem se zvyšuje riziko kolonizace také pochvy (Phares *et al.*, 2008). Zvýšení pravděpodobnosti výskytu GBS v rektu a později i pochvě je ovlivněno také užíváním marihuany, protože narkotické látky v ní obsažené mění charakter trávicího traktu, včetně sekrece žaludku a jeho vyprazdňování. Proto může marihuana změnit mikroflóru gastrointestinálního traktu způsobem, který zvyšuje kolonizaci GBS v rektu (Meyn *et al.*, 2009; Massa *et al.*, 2005).

Rizikovými faktory pro kolonizaci GBS pochvy je nedostatečná hygiena, prodělané kvasinkové infekce a pohlavní styk (Manning *et al.*, 2004). Role pohlavního styku je podložena faktem, že až 91 % mužských partnerů žen, které jsou pozitivní na GBS, jsou kolonizováni stejnými kmeny nebo sérotypy streptokoků. Sexuální aktivita může přenášet GBS z mužů na ženy, a měnit tak poševní mikroflóru. Díky tomu může dojít ke zvýšení perzistence GBS a zvýšenému přenosu mikroorganismů z hráze a rekta do pochvy (Meyn *et al.*, 2009).

Streptococcus agalactiae se vyskytuje i u 10–40 % zdravých žen v urogenitálním traktu. Poševní kolonizace je častější u žen s nitroděložní antikoncepcí. GBS kolonizují často pochvu asymptomaticky. Infekce se projevuje spíše u jedinců se sníženou imunitou, diabetem a s poruchami ledvin (Barcaite *et al.*, 2008; Beneš, 2009; Lobovská, 2001). Kolonizace může být občasná, přechodná nebo trvalá (Stupak *et al.*, 2010). Těhotné ženy pozitivní na GBS mají zvýšené riziko předčasného porodu a perinatálního přenosu na novorozence. *Streptococcus agalactiae* je hlavní příčinou novorozeneckých infekcí (Schuchat, 2000).

3.2.2.3.3 Klinické projevy *Streptococcus agalactiae*

U netěhotných žen se GBS vyskytuje v 10–30 % (Leclair *et al.*, 2010). U dospělých rozvíjí lokální infekce jako je cystitida, pyelonefritida, osteomyelitida, artritida, endokarditida. Nejzávažnější je primární sepse, která může mít až v 50 % fatální průběh (Votava *et al.*, 2003; Beneš, 2009). Skupinu s nejvyšším rizikem úmrtí

na invazivní GBS onemocnění tvoří dospělí starší 65 let (Zangwill *et al.*, 1992, cit. Schrag *et al.*, 2000).

Většina studií stále nedokáže zhodnotit, zda GBS patří mezi hlavní patogeny, jako je *Gardnerella vaginalis*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, způsobující běžné vaginální infekce a zánětlivé vaginitidy (Leclair *et al.*, 2010; Srinivasan *et al.*, 2008). Ale například Maniatis *et al.*, 1996 ve své studii označil přímo GBS za patogena způsobujícího tato onemocnění. U žen s vaginální infekcí pozitivních na GBS byla totiž tato bakterie u 87 % žen izolována jako jediný patogen. U zbylých 13 % žen byla diagnostikována společně s *Gardnerella vaginalis*, *Candida albicans* nebo *Trichomonas species* (Maniatis *et al.*, 2006). Jiná data ovšem naznačují, že se zánětlivými nemocemi pochvy se kolonizace streptokoky v pochvě zvyšuje. Existuje hypotéza, že kolonizace GBS je výsledkem celé řady událostí, které vedou k narušení ochranného kyselého poševního prostředí a ke ztrátě dominantního druhu *Lactobacillus*. Výskyt GBS je tedy pravděpodobně spíše ukazatel narušení normálního ekosystému pochvy než hlavní příčina vaginitid (Leclair *et al.*, 2010).

U těhotných žen může infekce způsobená *Streptococcus agalactiae* probíhat bez symptomů a objevovat se přerušovaně v kterékoli fázi těhotenství. Až ve 30 % případů způsobuje GBS v těhotenství infekci močových cest. Bakterie se dostávají do pochvy ze střevního traktu. Někdy se mohou porodními cestami dostat až do děložní dutiny, projít neporušenými plodovými obaly a způsobit jejich zánět, endometritidu, sepsi, dokonce i potrat, předčasný porod a rychle postupující neonatální infekci. Může následovat i smrt novorozence a matky (Mašata *et al.*, 2004; Beneš, 2009).

Streptococcus agalactiae se vyskytuje u 4–40 % těhotných žen, konkrétně v České republice se kolonizace GBS vyskytuje u 29 % těhotných žen (Hickman *et al.*, 1999; Motlová *et al.*, 2004; Sharmila *et al.*, 2010). Míra kolonizace GBS u žen s rizikovým těhotenstvím je vyšší než u žen s normálním průběhem těhotenstvím (Strus *et al.*, 2009; Brimil *et al.*, 2006). To může souviset s častějšími návštěvami u lékaře, zvýšenému množství různých léčebných procedur a terapeutických režimů v důsledku komplikovaného těhotenství. Tento argument je podporován vyšší frekvencí kolonizace rezistentními kmeny bakterií u matky i novorozence, které jsou typické pro nemocniční prostředí (Strus *et al.*, 2009).

Identifikace GBS kolonizace u matky v průběhu těhotenství je velmi důležitá pro přijetí preventivních opatření, jako například intrapartální antibiotická profylaxe novorozeneckých nemocí (Baker *et Barrett*, 1973). Léčba antibiotiky během gravidity se nedoporučuje. Přeléčení infekce v těhotenství nesnižuje riziko onemocnění novorozence, jelikož až 70 % žen je i přes léčbu opět rekolonizováno (Měchurová *et al.*, 2011).

Od 70. let minulého století je *Streptococcus agalactiae* považován za hlavního původce perinatální mortality a morbiditu u novorozenců (Francoisi *et al.*, 1973), kteří se nakazí obvykle při porodu od kolonizované matky. GBS kolonizují kůži a sliznici novorozenců (Sharmila *et al.*, 2011). Vertikální přenos z matky na dítě se pohybuje v rozmezí 40–60 %. Následná infekce novorozenců se projevuje u 1–3 % (Melin, 2008). Čím více je matka kolonizována GBS, tím větší je pravděpodobnost přenosu nákazy na novorozence a stoupá riziko, že infekce se u dítěte bude projevovat časně (Anthony *et Okada*, 1977; Beneš, 2009). Úmrtnost novorozenců na následky infekce je od 5 % do 20 % (Měchurová *et al.*, 2011). Za první světové války byla úmrtnost dětí na streptokokové infekce poměrně vyšší. Od padesátých let tento počet výrazně poklesl díky užívání antibiotik (Lobovská, 2001). Avšak děti, které přežijí silné infekce, trpí často vývojovými vadami, včetně mentální retardace a ztrátou sluchu a zraku (Schrag *et al.*, 2000).

Je obecně známo, že novorozenec získává mikroflóru, včetně GBS, aspirací infikované plodové vody, vertikálním přenosem z porodního kanálu GBS pozitivní matky a později se dítě může také infikovat z nemocničního prostředí.

Zajímavé je, jak snadno se může GBS přenést z matky na dítě. Studie odhalily, že pravděpodobnost přenosu GBS z matky na dítě i při porodu císařským řezem není tak vzácná, jak se předpokládalo (Rotimi *et al.*, 1985; Strus *et al.*, 2009). Většina dětí narozených císařským řezem ještě před odtokem plodové vody, byla infikována stejným kmenem GBS jako jejich matky. Horizontální přenos GBS z nemocničního prostředí na novorozence byl mnohokrát popsán. Novorozenci zdravých matek ležících na stejném oddělení byli infikováni totožnými nozokomiálními kmeny GBS. Stejný výsledek se nacházel u novorozenců, kteří leželi na různých odděleních, ale ve stejné budově (Strus *et al.*, 2009).

Onemocnění novorozenců jsou dvojího typu: časná a pozdní (Beneš, 2009).

a) Časná forma onemocnění *Streptococcus agalactiae*

Vyskytuje se u 2–3 na 1000 živě narozených dětí. Infekce vzniká v průběhu porodu ještě *in utero* nebo až při průchodu plodu porodními cestami. Předchází jí obvykle předčasný odtok plodové vody více než 12 hodin před porodem, předčasný porod, protražovaný a instrumentální porod nebo horečka matky v průběhu porodu. Jsou to infekce, které se projevují u novorozenců během prvních 6 dní jejich života (Lobovská, 2001; Měchurová *et al.*, 2011; Mašata *et al.*, 2004; Beneš, 2009). Infekce nejčastěji začíná už během prvních 12–24 hodin života (Melin, 2008). První projevy onemocnění jsou náhlé. Novorozenec je promodralý, hypotonický, zvrací, má sníženou chuť k příjmu mateřského mléka, abnormální teplotu a mnohdy i žloutenku. Zároveň se u něj může projevit tachykardie a poruchy dýchání. Tyto projevy mohou být následkem bakteriémie, pneumonie, meningitidy nebo septického šoku v důsledku invaze GBS. Úmrtnost novorozenců se moderními léčebnými postupy snížila na 5–10 %. Nejvíce jsou ohroženy děti předčasně narozené a s nízkou porodní váhou (Mašata *et al.*, 2004; Beneš, 2009).

b) Pozdní forma onemocnění *Streptococcus agalactiae*

Pozdní infekce se projevují u 0,5 z 1 000 narozených dětí (Mašata *et al.*, 2004). Dostávají se obvykle do konce prvního měsíce novorozence (Melin, 2008). Dítě je infikováno vertikálním přenosem od kolonizované matky nebo horizontálně z nemocničního prostředí (Strus *et al.*, 2009). Infekce jsou většinou orgánově lokalizované a sdružené s okulární bakteriemi. Nejčastěji probíhá jako hnisavá meningitida, která se nedá klinicky odlišit od meningitid způsobených jinými bakteriemi. Dalším projevem jsou sepse, infekční záněty mízních uzlin, kostní a kloubní infekce (Beneš, 2009). U novorozenců s pozdní infekcí byl ve dvou třetinách izolován *Streptococcus agalactiae* sérotypu III. U komplikovaných meningitid byl sérotyp III prokázán dokonce v 90 % případů. Schopnost vyvolat infekci také souvisí s typem specifického polysacharidového pouzdra a s tvorbou neuroaminidázy, která štěpí kyselinu sialovou a jejímž výsledkem je poškození endotelu (Penka *et al.*, 2009; Mašata *et al.*, 2004). Dalším faktorem je hladina protilátek u matky. Jestliže má matka nízkou hladinu protilátek proti polysacharidu GBS typu III, existuje daleko vyšší riziko infekce u novorozence. Je prokázáno že

vysoká hladina antipolysacharidových IgG protilátek má ochranný účinek. U velké části matek, jejichž děti prodělali GBS sepsi, můžeme detekovat špatnou IgG protilátkovou odpověď na antigen bakteriálního polysacharidu (Baker *et al.*, 1976; Mašata *et al.*, 2004). Sérologické vyšetření ovšem není v praxi moc běžné.

Základními kroky ve zvládnutí GBS infekcí je kultivační průkaz kolonizace a následná profylaktická antibiotická léčba (Mašata *et al.*, 2004).

3.2.2.3.4 Antibiotická léčba *Streptococcus agalactiae*

Penicilin byl prvním lékem používaným k léčbě a profylaxi infekcí způsobených skupinou streptokoků B. Streptokokové také po dlouhou dobu zůstávali plně citliví (Sadowy *et al.*, 2010). V Japonsku byly hlášeny jedny z prvních případů snížené citlivosti na penicilin některých GBS kmenů (Kimura *et al.*, 2008). I když je penicilin upřednostňovaným lékem na streptokokové infekce, až 10 % pacientů je na něj alergických. U takových to alergiků se přiklání k alternativním antibiotikům (Warrington *et al.*, 2011; Borchardt *et al.*, 2006). Mezi takové patří cefalosporin a vankomycin. Od roku 1996 je hlášena zvyšující se rezistence GBS na některá antibiotika makrolidy - erythromycin a linkosamidy - klindamycin, s čímž by se při dané terapii mělo počítat. Rezistence na erythromycin od 12 % do 29 %, u klindamycinu je to 6 % až 21 %. Nejvyšší riziko rezistence na erythromycin a klindamycin je zaznamenán u lidí ve věku 18–49 let s invazivním GBS onemocněním (Borchardt *et al.*, 2006). Největší rezistence GBS je však pozorována u tetracyklinu. Činí až 91,2 % (Sadowy *et al.*, 2010).

Užívání antibiotik k odstranění GBS z pochvy má smysl jen tehdy, když není kolonizováno rektum. Antibiotická léčba není účinná na vymýcení GBS kolonizace v rektu a tak po léčbě antibiotiky dochází k opětné rekolonizaci pochvy GBS z rekta (Meyn *et al.*, 2009).

3.2.2.3.5 Screening *Streptococcus agalactiae* v těhotenství

Vysoký počet invazivních infekcí u rodiček a novorozenců, vyvolaných *Streptococcus agalactiae*, vzbudil velkou pozornost a obavy (Schrag *et al.*, 2000). Proto v USA, jako v první zemi, vydalo Centrum pro kontrolu a prevenci nemocí

(Centers for Disease Control and Prevention – CDC) ve spolupráci s příslušnými odbornými organizacemi v roce 1996 doporučená preventivní opatření pro snížení přenosu GBS z matky na dítě a následných poporodních infekcí (CDC, 1996). Zavedení screeningu byl první krok. Preventivnímu kultivačnímu odběru by měly být podrobeny všechny těhotné ženy (Měchurová *et al.*, 2011). Výjimku tvoří těhotné ženy, které již dříve porodily děti, u kterých se projevila časná forma onemocnění. V takovém případě není screening nezbytně nutný (CDC, 1996). Vzhledem k tomu, že kolonizace GBS může být přechodná a během těhotenství může měnit svůj charakter, je důležité správné načasování odběru kultivačních vzorků. Ideální je odběr 5 týdnů před porodem. CDC stanovila doporučený screening mezi 35. až 37. týdnem těhotenství (CDC, 2010). Odběr kultivačních vzorků je založen na stěru z postranních stěn dolní třetiny pochvy. Kombinovaný odběr z pochvy i z rekta není doporučován, jelikož odběr materiálu z rekta není přínosem pro screening. Získaný materiál je vyšetřován kultivačně. Výsledky ze standardního kultivačního vyšetření bývají obvykle k dispozici do 48 hodin. Toto vyšetření se upřednostňuje před užitím tzv. rychlých diagnostických metod, jako je např. PCR. Ta totiž často disponuje vyšším rizikem falešně negativních výsledků, a tak bývá využívána pouze v časové tísni.

S výsledky by měla být žena obeznámena zdravotnickým personálem a zároveň by jí měly být doporučeny další nevhodnější kroky s přihlédnutím na výsledky vyšetření (CDC, 2010). Je-li výsledek kultivačního vyšetření pozitivní, těhotná žena se celkově ani lokálně nepřeléčuje, jelikož až 70 % žen je po léčbě rekolonizováno. Antibiotika se aplikují až během porodu při nástupu děložních kontrakcí nebo po odtoku plodové vody. V případě negativního kultivačního výsledku se intrapartální antibiotická profylaxe neprovádí (Měchurová *et al.*, 2011).

3.2.2.3.6 Intrapartální antibiotická profylaxe

Centrum pro kontrolu a prevenci nemocí doporučilo kromě screeningu v těhotenství také zavedení antibiotické profylaxe během porodu. Účinnost intrapartální profylaxe u dětí, jejichž matkám byla po dobu porodu podávána antibiotika, je 86–89% (CDC, 2010). Antibiotika se aplikují, jestliže je kultivační odběr v 35.–37. týdnu těhotenství pozitivní, ale také v případě, že kultivační vyšetření

nebylo provedeno nebo jeho výsledek není k dispozici a u rodičky je přítomen jeden z těchto rizikových faktorů:

- Předčasný porod před 37. týdnem těhotenství
- Předčasný odtok plodové vody více jak 12 hodin před porodem
- Zvýšená teplota matky na 38 °C
- Dřívější porod dítěte s časnou formou onemocnění
- Pozitivní kultivační odběr GBS kdykoli v průběhu těhotenství

(Měchurová *et al.*, 2011; CDC, 2010)

Ideální je zahájení antibiotické léčby intravenózně 4 hodiny před porodem. S blížícím se časem porodu dramaticky narůstá nebezpečí kolonizace plodu. Při odtoku plodové vody u ženy s GBS v termínu porodu se antibiotika podávají hned po příjmu na porodní sál. Následné vyvolání porodu se děje dle doporučení o indukci porodu. V případě elektivních císařských řezů, kdy nedošlo k protržení blan a nástupu děložní aktivity není důvod aplikace antibiotik.

Doporučená intravenózní intrapartální léčba:

- Antibiotikem první volby je penicilin G v infuzi. Iniacce je 5 mil. IU, následně 2,5 mil. IU po 4 hodinách. Pokud žena neporodí do 8 hodin od iniciální dávky je doporučeno prodloužit interval podání na 2,5 mil. IU každých 6 hodin do porodu plodu.
- Ampicilin se v současné době, pro zvyšující nárůst rezistence časných novorozeneckých infekcí, nedoporučuje. Je vyhrazen spíše pro léčbu symptomatických infekcí.
- U pacientek s možností alergické reakce na penicilinová antibiotika se podávají cefalosporiny I. generace intravenózně. Konkrétně cefazolin 2 g v infuzi, dále 1 g po 8 hodinách do porodu.
- Pacientkám s vysokým rizikem alergické reakce na penicilinová antibiotika se aplikuje linkosamid klindamycin 600 mg v infuzi po 8 hodinách do porodu, nebo makrolid erythromycin 500 mg v infuzi po 6 hodinách.
- Vankomycin se podává v případě, že těhotná žena má vysoké riziko anafylaxe a byla u ní prokázána rezistence k výše zmiňovaným antibiotikům.
- Sepse, způsobená streptokoky skupiny B, se léčí dvojkombinací antibiotik. Ampicilin 1 g v infuzi po 6 hodinách a gentamycin 240 mg v infuzi po 24

hodinách. Je-li žena alergická na penicilinová antibiotika podává se místo ampicilinu antibiotikum klindamycin 600 mg v infuzi po 8 hodinách.

Antibiotická léčba se ukončuje s porodem plodu. V léčbě se doporučuje pokračovat jen u matek s jasným klinickým nálezem infekce (Měchurová *et al.*, 2011).

Riziko přenosu GBS z matky na dítě roste se zvyšující se hustotou kolonizace pochvy matky. U dětí narozených těžce kolonizovaným matkám je pravděpodobnost, že budou také kolonizovány a projeví se u nich GBS poporodní infekce, mnohem vyšší než u dětí lehce kolonizovaných matek (Anthony *et Okada*, 1977). V současné době je doporučováno podávat antibiotickou profylaxi během porodu všem těhotným ženám, u nichž byl během těhotenství detekován GBS (CDC, 2010). Ale nadměrné užívání antibiotik může vést ke vzniku odolnějších a virulentnějších druhů patogenů, těžkých alergických reakcí a narušení mikroflóry lidského organismu. Proto by se v budoucnu mělo užívání antibiotik omezit. Návrhem pro omezení užívání je posuzování léčby podle hustoty kolonizace. Lehce kolonizovaným matkám by antibiotická profylaxe podávána nebyla, kvůli menšímu riziku přenosu GBS na dítě, těžce kolonizovaným naopak ano (van der Mee-Marquet *et al*, 2006).

3.2.2.3.7 Streptokokové autovakcíny

GBS vakcíny, které by snižovaly počet vaginálně kolonizovaných žen, jsou v současné době studovány a vyvíjeny. Izolace polysacharidových antigenů GBS a následná imunizace by mohla snížit kolonizaci u žen a také riziko přenosu GBS z matky na dítě. Avšak díky výskytu odlišných polysacharidových antigenů je vývoj takovýchto vakcín komplikován, a tak v současné době neexistuje na trhu žádná univerzální registrovaná GBS vakcína (CDC, 2010).

V České republice se při léčbě chronických a často opakujících GBS infekcí, obtížně léčitelných antibiotiky a chemoterapeutiky, využívá léčba autovakcínami. Autovakcíny jsou v podstatě očkovací látky dělané na míru. Připravují se z vypěstovaných mikroorganismů, které byly opakovaně izolovány od pacienta. Doba přípravy autovakcíny trvá jeden měsíc a z toho se 17 dní mikroorganismus sterilizuje. Vakcína tedy poté obsahuje mrtvé mikroby, na které po vpravení do těla reaguje organismus imunitní odpovědí, která zamezuje projevům choroby (Rutová, 2006; Látalová, 2012).

Vakcíny se v perorální kapkové podobě užívají po dobu jednoho roku dle dávkovacího schématu doporučeného laboratoří, která autovakcínu připravovala (Tab. 2). Doporučené dávkování je 10 kapek ráno nalačno (Látalová, 2012).

Tab. 2: Očkovací kalendář

Dny	1. měsíc	2. měsíc	3. měsíc	4. měsíc	5. měsíc	6. měsíc	7. měsíc	8. měsíc	9. měsíc	10. měsíc	11. měsíc	12. měsíc
1	■	■			■							
2	■	■			■			■				
3		■			■			■			■	
4			■		■			■			■	
5			■		■			■			■	
6			■					■			■	
7			■								■	
8			■								■	
9		■										
10	■	■										
11	■	■										
12	■	■										
13	■	■										
14	■		■									
15			■									
16			■									
17			■			■						
18			■			■			■			
19						■			■			■
20	■					■			■			■
21	■					■			■			■
22	■					■			■			■
23	■											■
24	■											
25												
26												
27												
28												
29												
30	■											
31	■											

■ - Den aplikace kapkové perorální GBS autovakcíny

3.3 Obecné schéma průkazu mikroorganismů

Přímý průkaz

Přímý průkaz slouží k nálezmu mikroorganismu ve vyšetřovaném vzorku. K základním vyšetřovacím metodám patří kultivace na vhodném médiu, mikroskopie a identifikační testy (Votava *et al.*, 2005).

- a) **Kultivace na půdách** – nejběžněji používanou metodou izolace bakterií z vyšetřovaného materiálu je jejich kultivace na vhodných půdách. Kultivace je proces pomnožování mikroorganismů v umělém prostředí, které odpovídá podmínkám důležitým pro jejich růst a metabolismus (pH, výživa, teplota, kyslík případně oxid uhličitý) (Göpfertová, 1999, Votava *et al.*, 2005).

Odečítáním narostlých kolonií na kultivačních půdách se určí skupina bakterií dle morfologie kolonií, růstu na půdách v Petriho misce, atmosféře a teplotě kultivace:

- GRAM negativní tyčky
- GRAM pozitivní tyčky
- GRAM negativní koky
- GRAM pozitivní koky
- Anaerobní bakterie
- Kvasinky

- b) **Mikroskopické vyšetření** – slouží pro předběžné zařazení neznámého kmene mikroorganismu do skupiny. Mikroskopické vyšetření se nejběžněji děje na barveném preparátu. Pozoruje se při něm tvar, velikost a uspořádání mikrobů. Nejčastěji se používá barvení dle Grama, které je levné, rychlé a může se díky němu získat přehled o tom v jakém počtu se patogen ve vzorku vyskytuje, jakou má velikost, tvar a uspořádání mezi sebou. Tímto barvením se také rozliší dvě skupiny mikrobů dle rozdílů ve stavbě buněčné stěny. Po obarvení krystalovou violetí a působením jodem se v buňce vytvoří komplex, který je nerozpustný ve vodě, avšak částečně rozpustný v alkoholu, který se používá pro odbarvení. U gramnegativních bakterií dochází po odbarvení k vyplavení komplexu violet-jod ven z buňky. Grampozitivní bakterie však mají méně propustnou stěnu, odbarvením alkoholu odolávají. Po dobarvení safraninem nebo karbofuchsinem jsou grampozitivní bakterie

zbarvené modrofialově a gramnegativní bakterie vykazují zbarvení červené (Greenwood *et al.*, 1999; Votava *et al.*, 2005).

- c) Identifikační testy** – slouží k dalšímu dourčení mikroorganismů ve vyšetřovaném vzorku. Patří mezi ně například průkaz antigenů latexovou aglutinací, průkaz bakteriálního toxinu a mnoho dalších (Votava *et al.*, 2005).

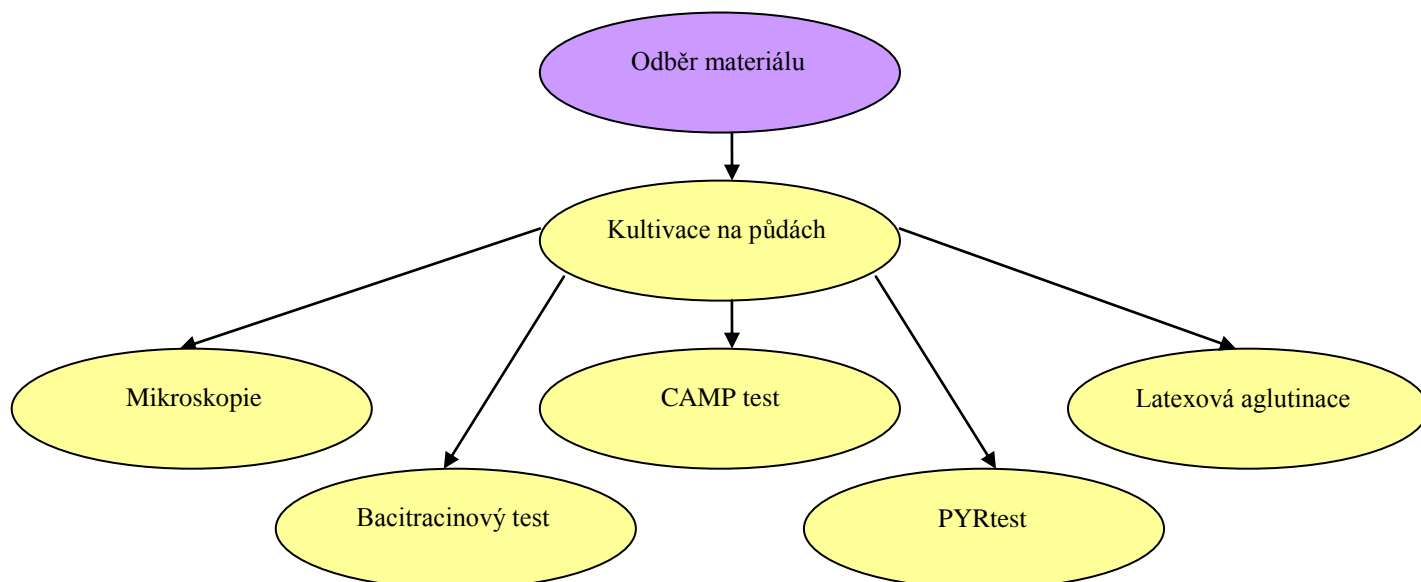
Nepřímý průkaz

Není založen na růstu mikroorganismu, ale na průkazu původce infekční choroby podle nálezu stop, které v organismu pacienta zanechal. Nejčastěji se jedná o průkaz specifických protilátek ve vzorku pomocí metod aglutinace, ELISA nebo Western blot (Beneš, 2009).

4 PRAKTICKÁ ČÁST

V praktické části bakalářské práce jsem se zaměřila na přímý průkaz druhu *Streptococcus agalactiae* ve vaginálních stěrech.

Obr. 2: Schéma postupu identifikace *Streptococcus agalactiae*



Provedl lékař	Mé zpracování
---------------	---------------

4.1 Materiál a metodika

4.1.1 Charakteristika vyšetřovaného materiálu

Materiál zahrnoval celkem 3 737 vzorků výtěrů pochvy, zaslaných na kultivační bakteriologické vyšetření do Laboratoří Mikrochem a.s., pobočky Olomouc v období leden–říjen 2011.

Streptococcus agalactiae byl diagnostikován laboratorními metodami používanými v Laboratořích Mikrochem a.s. Olomouc, které jsou podrobněji popsány

níže. Sama jsem tyto laboratorní metody použila při zpracování asi 100 poševních výtěrů.

4.1.2 Odběr materiálu

Odběr vzorků byl proveden lékařem v ordinaci. Stěr se odebírá odběrovými tampony z postranních stěn dolní třetiny pochvy. Vzorek musí být označen jménem pacientky, datem odběru a přikládá se k němu průvodní list se jménem, příjmením, adresou, rodným číslem a zdravotní pojišťovnou pacientky. Na průvodním listu také musí být zaznačen druh vyšetřovaného materiálu, datum odběru, jméno a adresa lékaře, předpokládaná diagnóza a požadované vyšetření. Materiál uchovaný v transportním médiu by měl být dopraven do laboratoře v co nejkratší dobu a ještě v den odběru zpracován. Měl by být také uchováván v chladu.

4.1.3 Způsob očkování a kultivace

Primární očkování se provádí na čtyři kultivační půdy.

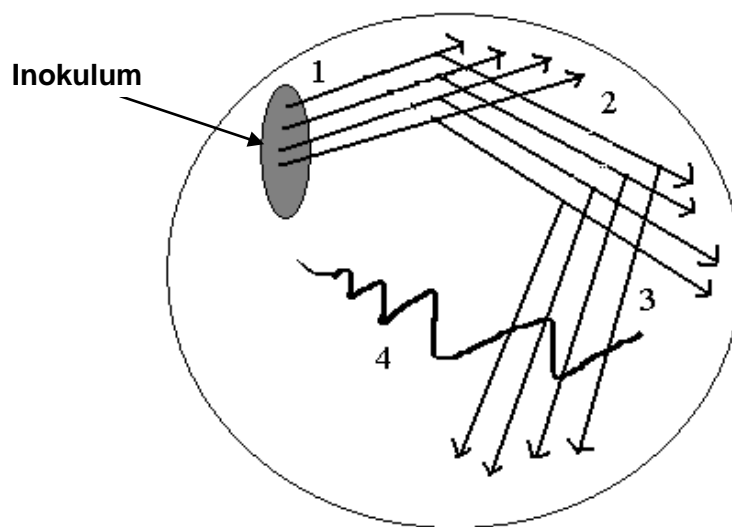
Kultivační půdy:

- Krevní agar - půda určená primárně ke kultivaci náročnějších bakterií (koky, tyčky)
 - Čokoládový agar - selektivní a bohatá půda pro kultivaci *Neisseria* a *Haemophilus*
 - Sabouraudův agar – půda určená pro kultivaci kvasinek
 - Krevní agar s kolistinem – půda s inhibicí růstu gramnegativních tyček
- (Votava *et al.*, 2005)

Všechny čtyři kultivační půdy jsem naočkovala otáčivým pohybem tamponu se vzorkem, na Obr. 3 označeno jako inokulum. Poté jsem sterilní bakteriologickou kličkou provedla křížový roztěr vzorku (Obr. 3). Na krevní agar jsem naočkovala také kmen *Staphylococcus aureus* ve tvaru čáry přes rozočkovaný vzorek. Kultivace vzorku na krevním agaru probíhala 16–24 hodin, při teplotě 36±1 °C v termostatu s CO₂ a 16–24 hodin při teplotě 36±1 °C v termostatu s normální atmosférou.

Sabouraudův agar se vzorkem byl kultivován 40–48 hodin při teplotě 36 ± 1 °C v termostatu s normální atmosférou a vzorky na čokoládovém a krevním agaru s kolistinem byly kultivovány 40–48 hodin při teplotě 36 ± 1 °C v termostatu s CO₂.

Obr. 3: Schéma provedení křížového roztěru



4.1.4 Odečítání

Po 48 hodinách se provedlo první vyhodnocení. Na půdách byl hodnocen růst suspektních kolonií semikvantitativně. Jedním křížkem (+) se hodnotí nárůst kolonií v oblasti inokula a prvních očkovacích čar. Dva křížky značí nárůst kolonií na druhých nanesených očkovacích čarách a tři křížky na třetích nanesených očkovacích čarách. Čtyři křížky značí nárůst kolonií až do koncových čar. Podezřelé kolonie narostlé na krevním agaru se poté znovu izolovaly, provádělo se mikroskopické vyšetření a biochemické testy.

4.1.5 Mikroskopické hodnocení

Barvení dle Grama

Z kolonií vyrostlých na krevním agaru jsem vybrala jednu, kterou jsem sterilní bakteriologickou kličkou přenesla a rozetřela v kapce fyziologického roztoku na mikroskopickém podložním skle. Kulturu jsem nechala zaschnout a fixovala nad plamenem lihového kahanu. Poté jsem vzorek barvila 20 s krystalovou violetí. Přebytečné barvivo jsem opláchla vodou a na preparát přidala kapku Lugolova roztoku (roztok jodu a jodidu draselného ve vodě) na 20 s. Znovu jsem opláchla a 30 s nechala odbarvovat ethanolem. Po opláchnutí vodou jsem preparát dobarvovala karbofuchsinem po dobu 60 s a opět opláchla vodou. Preparát jsem osušila, zakápla imerzním olejem a bez krycího skla jsem pozorovala pod mikroskopem při zvětšení 1 000x (Votava *et al.*, 2005).

4.1.6 Identifikační testy

Bacitracinový test

Slouží k odlišení β -hemolytických streptokoků skupiny A (*Streptococcus pyogenes*) od ostatních β -hemolytických skupin streptokoků (hlavně *Streptococcus agalactiae*). Je založen na vysoké citlivosti *Streptococcus pyogenes* k nízkým koncentracím antibiotika bacitracinu. Výsledkem difúzního diskového testu je tvorba inhibiční zóny kolem disku s antibiotikem, na rozdíl od jiných β -hemolytických streptokoků, které jsou k dané nízké koncentraci rezistentní.

Sterilní bakteriologickou kličkou jsem odebrala několik kolonií, naočkovala na krevní agar a sterilní jehlou jsem položila disk s bacitracinem (ITEST BACITRACIN S, 0,04 j.). Kultivace probíhala 24 hodin při teplotě 36 ± 1 °C v atmosféře CO₂. Vyhodnocení je založeno na měření průměru vzniklé inhibiční zóny.

- **Pozitivní vyhodnocení** – jestliže má inhibiční zóna průměr větší nebo roven 10 mm, jedná se o *Streptococcus pyogenes*.
- **Negativní vyhodnocení** – rostou-li kolonie v blízkosti disku, jedná se o ostatní β -hemolytické streptokoky. Jejich bližší zařazení do sérologických skupin se provádí pomocí latexové aglutinace.

(ITEST plus s.r.o., 2005)

CAMP test

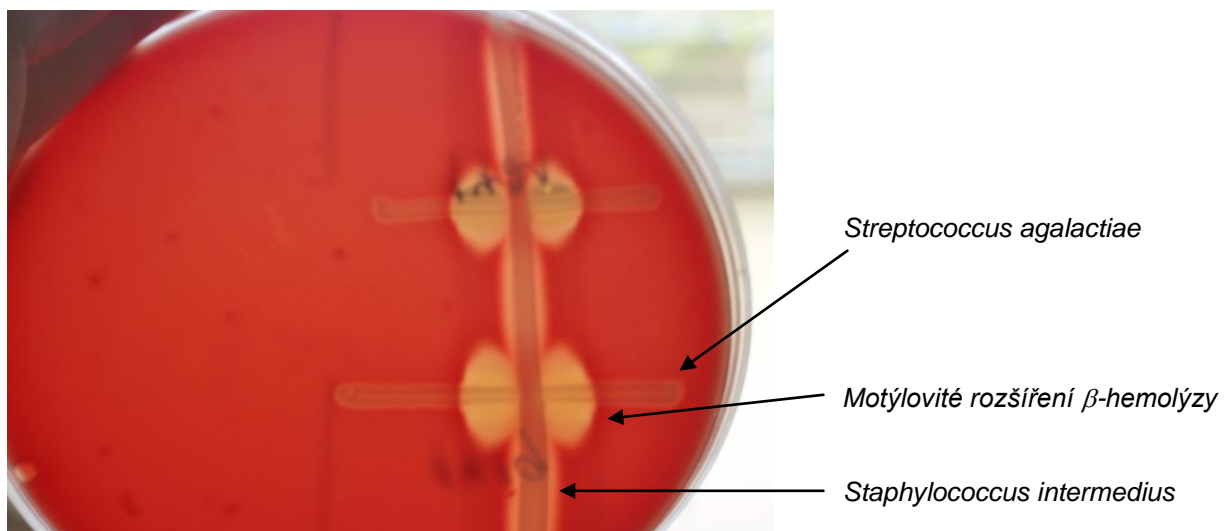
Streptococcus agalactiae vykazuje na krevním agaru neúplnou hemolýzu. V prostředí s kmenem *Staphylococcus intermedius*, produkujícím β -hemolysin, který narušuje membránu erytrocytů, dochází v přítomnosti *Streptococcus agalactiae* k rozpadu těchto erytrocytů a k zvýraznění neúplné hemolýzy.

Na krevní agar jsem sterilní bakteriologickou kličkou naočkovala testovaný kmen streptokoka ve formě čáry. Kolmo k němu jsem naočkovala, také čarou, kmen *Staphylococcus intermedius* (4210). Kultivace probíhala do druhého dne při teplotě 36 ± 1 °C. Vyhodnocení je založené na rozšíření hemolýzy v místě styku obou bakterií.

- **Pozitivní vyhodnocení** – dojde-li k motýlovitému rozšíření β -hemolýzy v místě styku obou mikrobů, jedná se o *Streptococcus agalactiae* (Obr. 4).
- **Negativní vyhodnocení** – jestliže k rozšíření zóny hemolýzy nedojde, jedná se o ostatní β -hemolytické streptokoky, které se pomocí latexové aglutinace zařadí do sérologických skupin.

(Koukalová et al., 2011)

Obr. 4: CAMP test: ukázka motýlovitého rozšíření β -hemolýzy (vlastní zdroj)



PYR test

Tento test slouží k rychlému a snadnému odlišení β -hemolytické skupiny A streptokoků od ostatních β -hemolytických skupin. Principem je detekce aktivity

pyrrolidonylpeptidázy, kterou z β -hemolytických streptokoků produkuje pouze *Streptococcus pyogenes*.

Na PYR test se používá komerčně vyrobený set ITEST PYR test, jehož složkou je speciální proužek na odběr bakteriálního nárůstu přímo z krevního agaru. Po odběru a inkubaci 1–2 min při laboratorní teplotě jsem preparát zakápla druhou složkou PYR testu, činidlem. Po 1–5 min jsem hodnotila změnu zbarvení.

- **Pozitivní vyhodnocení** – dojde-li k červenému zbarvení, jedná se o *Streptococcus pyogenes*
- **Negativní vyhodnocení** – jestliže nedojde ke změně zbarvení, případně se preparát zbarví dožluta, jedná se o jiné β -hemolytické streptokoky (ITEST plus s.r.o., 2005)

Latexová aglutinace

Tato metoda se používá k jednoduchému, přesnému a rychlému určení sérologických skupin A, B, C, F a G β -hemolytických streptokoků. Skupinové určení β -hemolytických streptokoků je důležité pro etiologickou diagnózu onemocnění a následnou antibiotickou léčbu. Princip je založen na reakci antigenů specifických pro danou skupinu streptokoků se specifickými protilátkami navázanými na latexových částicích. Výsledkem reakce antigenů s protilátkami je jasně viditelná aglutinace příslušné latexové suspenze, tj. tvorba okem viditelných zrníček, mezi nimiž je tekutina projasněna.

Před použitím komerčního setu ITEST STREPTO GROUP jsem všechny jeho složky nechala temperovat na laboratorní teplotu. Do extrakční zkumavky jsem dala jednu kapku Činidla I a nechala v ní resuspendovat asi 5 kolonií testovaného β -hemolytického streptokoka, který narostl na krevním agaru. Přidala jsem jednu kapku Činidla II (roztok zežloutl), extrakt jsem poté protřepala a 3–5 min inkubovala při laboratorní teplotě. Podle změny barvy na růžovou až fialovou jsem přidala jednu až dvě kapky Činidla III. Pasteurovou pipetou jsem na pět černých ploch kartičky přiložené k setu nakápla po jedné kapce extraktu. Vedle kapek extraktu jsem přidala po jedné kapce dobře promíchané latexové suspenze anti A, anti B, anti C, anti F a anti G. Kapky tekutin jsem na jednotlivých černých plochách smíchávala vždy novou sterilní tyčinkou, aby nedošlo ke zkreslení testu. Poté jsem kartičkou kolébala

ze strany na stranu po dobu jedné minuty a dávala pozor, aby nedošlo ke smíchání sousedních vzorků, jinak by se test musel opakovat.

- **Pozitivní vyhodnocení** – objeví-li se zřetelná aglutinace extraktu do jedné minuty pouze u jedné z pěti latexových suspenzí. Jestliže se objeví pozitivní reakce u dvou či více latexových suspenzí musí se test opakovat.
- **Negativní vyhodnocení** – nedojde-li k tvorbě aglutinace s žádnou z pěti použitých latexových suspenzí, testovaný kmen nepatří k β -hemolytickým streptokokům skupin A, B, C, F nebo G.

(ITEST plus s.r.o., 2005)

5 VÝSLEDKY

Zabývala jsem se přímým průkazem *Streptococcus agalactiae* izolovaného z gynekologického materiálu. *Streptococcus agalactiae* vykazoval růst na krevním agaru. Kolonie jsou malé vypouklé obklopené zónou neúplné β -hemolýzy. Po barvení dle Grama jsem pod mikroskopem pozorovala *Streptococcus agalactiae* jako modrofialové koky uspořádané do řetízků. Při bacitracinovém testu, rostly kolonie *Streptococcus agalactiae* v blízkosti disku s antibiotikem a při CAMP testu vykazovaly motýlovité rozšíření β -hemolýzy v místě styku se *Staphylococcus aureus*. V případě PYR testu kolonie *Streptococcus agalactiae* po přidání činidla neměnily barvu, jelikož neprodukuje pyrrolidonylpeptidázu. Latexovou aglutinací byl *Streptococcus agalactiae* definitivně identifikován a přiřazen do sérologické skupiny B.

V rámci praktické části práce byla provedena analýza výsledků kultivace celkem 3737 vaginálních stěrů zaslaných na vyšetření v období leden–říjen 2011 do Laboratoří Mikrochem, a.s. Výsledky studie jsou rozděleny do skupin podle věkové kategorie pacientek, gravidity (těhotné/netěhotné) a nálezu *Streptococcus agalactiae* s jiným druhem bakterií a kvasinek.

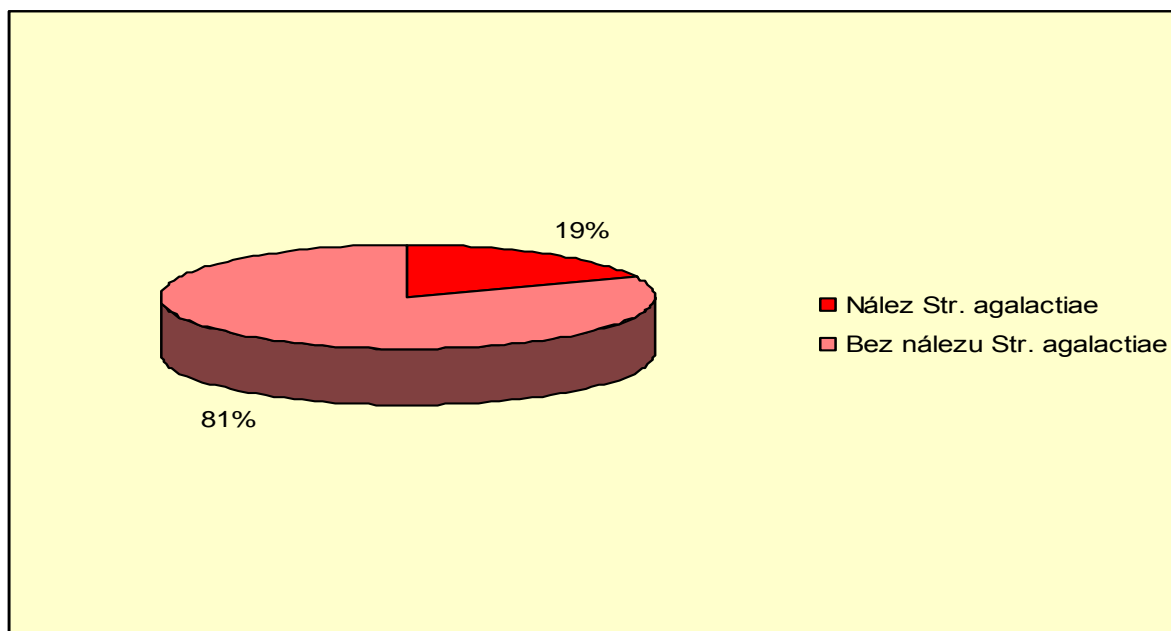
5.1 Frekvence výskytu *Streptococcus agalactiae* v populaci žen

Z celkového počtu 3 737 vyšetřovaných žen byl *Streptococcus agalactiae* izolován z gynekologického materiálu od 708 pacientek (19 %). U těhotných pacientek se *Streptococcus agalactiae* vyskytoval u 63 (32 %). Ve vyšetřeném souboru bylo zjištěno celkem 645 netěhotných žen s nálezem *S. agalactiae* (18%) (Tab. 3, Obr. 5).

Tab. 3: Nález *Streptococcus agalactiae* v pochvě těhotných a netěhotných pacientek

Pacientky	Vyšetřeno	Nález <i>Str. agalactiae</i>	Bez nálezu <i>Str. agalactiae</i>
Těhotné	198	63 (32 %)	135 (68 %)
Netěhotné	3 539	645 (18 %)	2 894 (82 %)
Celkem	3 737	708 (19 %)	3 029 (81 %)

Obr. 5: Procentuální nález *Streptococcus agalactiae* v pochvě vyšetřených žen



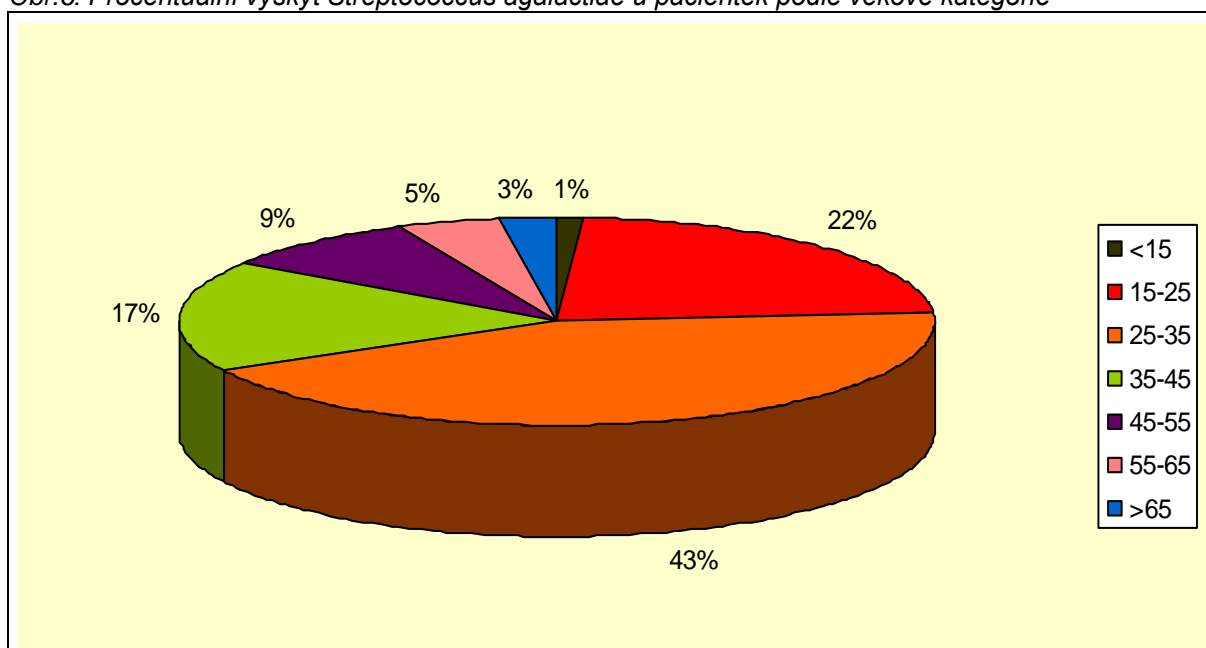
5.2 Distribuce nálezů *Streptococcus agalactiae* ve věkových kategoriích žen

Z celkového počtu 708 pacientek, u kterých byl prokázán *Streptococcus agalactiae*, jsou nejčastější kolonizovanou skupinou ženy ve věku 25–35 let, kde nález dosahuje 43 %. Nejméně byly kolonizovány pacientky mladší 15 let, které tvořily pouze 1 % kolonizovaných (Tab. 4, Obr. 6).

Tab. 4: Počet a věk pacientek se *Streptococcus agalactiae*

Věk pacientek	<15	15-25	25-35	35-45	45-55	55-65	>65	Celkový počet
Počet nálezů	8	159	309	121	61	32	18	708

Obr.6: Procentuální výskyt *Streptococcus agalactiae* u pacientek podle věkové kategorie



5.3 Výskyt *Streptococcus agalactiae* s jinými druhy bakterií a kvasinek

Streptococcus agalactiae byl izolován a identifikován u 708 pacientek (19 %) z celkového počtu 3 737 pacientek. Z toho v 306 případech (43 %) byl izolován jako samotný mikrob a v 402 případech (57 %) byl diagnostikován alespoň s jedním z těchto mikroorganismů – *Enterococcus sp.*, *Escherichia coli*, *Gardnerella vaginalis*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* (Tab. 5).

Tab. 5: Výskyt *Streptococcus agalactiae* společně s jinými druhy bakterií a kvasinek

Výsledek vyšetření	Počet pacientek
Nález <i>Str. agalactiae</i>	306
Nález <i>Str. agalactiae</i> s jinými druhy bakterií a kvasinek	402
Bez nálezu <i>Str. agalactiae</i>	3 029
Celkem pacientek	3 737

6 DISKUZE

Streptococcus agalactiae způsobuje i v dnešní době velké problémy v oblasti gynekologie a porodnictví. Jeho výskyt v pochvě je až u 40 % žen a léčba bývá komplikovaná, jelikož až 70 % žen je po léčbě antibiotiky opět nekolonizováno (Hickman *et al.*, 1999; Měchýřová *et al.*, 2011). I když kolonizace bývá většinou asymptomatická, u novorozenců a pacientů se sníženou imunitou, diabetem a s poruchami ledvin může vyvolat až invazivní onemocnění končící smrtí (Barcaite *et al.*, 2008; Beneš, 2009). U těhotných žen je detekce této bakterie velmi důležitá, jelikož je možno intrapartální antibiotickou profylaxí zabránit přenosu *Streptococcus agalactiae* z matky na dítě a předejít tak poporodním streptokokovým infekcím novorozenců (CDC, 1996).

Z výsledků zpracovaného souboru dat za období leden–říjen 2011, poskytnutých Laboratořemi Mikrochem a.s. v Olomouci, a z mých výsledků vyplývá, že z celkového souboru 3 737 pacientek bylo 19 % vaginálně kolonizováno *Streptococcus agalactiae*. Tato hodnota odpovídá obecně známému výskytu této bakterie u 4–40 % žen, dokonce patří spíše k nižšímu průměru (Hickman *et al.*, 1999; Leclair *et al.*, 2010; Sharmila *et al.*, 2010).

Nejčastěji kolonizovanou věkovou skupinou byly pacientky ve věku 25–35 let. Tento výsledek z části odpovídá hodnotám uvedeným v literatuře, které popisují nejčastější kolonizace u žen ve věku 22–30 let. Důvodem zvýšené kolonizace této skupiny může být velmi častá sexuální aktivita s různými partnery, která je pro věkovou kategorii 25–35 charakteristická (Meyn *et al.*, 2009).

Kolonizace netěhotných žen byla 18 % z celkového počtu 3 539 netěhotných pacientek a odpovídá průměrným hodnotám výskytu *Streptococcus agalactiae* v literatuře (Leclair *et al.*, 2010).

Streptococcus agalactiae byl ve sledovaném souboru diagnostikován u 32 % těhotných pacientek. Tento výsledek je o 3 % vyšší, než hodnoty uváděné ve studii Motlová *et al.* (2004), která zaznamenala kolonizaci pochvy u 29 % těhotných žen v České republice. Výsledky uváděné v bakalářské práci však více odpovídají celosvětovým hodnotám uváděným v literatuře (Hickman *et al.*, 1999). Těhotné pacientky byly o 14 % více kolonizovány než netěhotné, což poukazuje na důležitost doporučeného screeningu v 35.–37. týdnu těhotenství. Včasná detekce přispívá ke snížení rizika nákazy novorozence od matky a následných poporodních infekcí (CDC,

1996). CDC (1996) doporučuje intrapartální antibiotickou profylaxi u všech kolonizovaných pacientek. Ovšem studie van der Mee-Marquet *et al.* (2006) popisuje zvýšený počet rezistentních druhů bakterií u matek a novorozenců po porodu, vlivem nadměrného užívání antibiotik a doporučuje zvážit aplikaci antibiotik během porodu, podle míry kolonizace pochvy. Děti narozené méně kolonizovaným matkám, mají totiž daleko menší pravděpodobnost nákazy *Streptococcus agalactiae*, než děti těžce kolonizovaných matek. S přihlédnutím k oběma těmto studiím se domnívám, že aplikace antibiotik je přínosem, avšak za podmínek, kdy bude provedena důkladná individuální analýza, která by rozhodla zda aplikovat antibiotika, či ne.

Jako samotný patogen byl *Streptococcus agalactiae* diagnostikován u 43 % pacientek, ale s ostatními bakteriemi a kvasinkami byl diagnostikován u 57 % pacientek. To by mohlo vypovídat o narušování vaginální mikroflóry více patogeny najednou a potvrzovat hypotézu, že *Streptococcus agalactiae* nepatří mezi hlavní patogeny způsobující vaginální infekce a zánětlivé vaginitidy (*Gardnerella vaginalis*, *Candida albicans* či *Escherichia coli*), ale je spíše ukazatelem narušení normální mikroflóry pochvy (Leclair *et al.*, 2010). Mé zjištěné výsledky mohou potvrzovat závěry studie Maniatis *et al.* (1996), které označily *Streptococcus agalactiae* za patogena způsobujícího vaginální infekce, stejně tak výsledky studie Leclair *et al.* (2010), které tuto bakterii považují spíše za ukazatele narušení poševního ekosystému. Z důvodu nedostatečného zastoupení zkoumaných vzorků shromážděných mou osobou ve spolupráci s Laboratořemi Mikrochem a.s. v Olomouci, za pozorovací období leden–říjen 2011 však nelze potvrdit ani vyvrátit jednu z výše uvedených studií.

7 ZÁVĚR

Má studie dokazuje, že počet kolonizovaných těhotných i netěhotných pacientek *Streptococcus agalactiae* v pochvě je poměrně častý a sledování výskytu této bakterie je stále aktuální.

Shrnutí výsledků:

1. Z celkového počtu 3 737 žen se *Streptococcus agalactiae* vyskytoval u 19 % pacientek těhotných i netěhotných. Tato hodnota patří spíše k nižšímu průměru výskytu uváděného v literatuře.
2. Nejčastěji kolonizovanou věkovou skupinou byly ženy ve věku 25–35 let.
3. Nález *Streptococcus agalactiae* u 18 % netěhotných pacientek odpovídá celosvětovému výskytu této bakterie v pochvě žen.
4. Těhotné pacientky byly kolonizovány z 32 %. Vyšší nález *Streptococcus agalactiae* u těhotných pacientek poukazuje na důležitost doporučeného screeningu během těhotenství a následné případné aplikaci antibiotik během porodu, pro snížení rizika nákazy novorozence.
5. *Streptococcus agalactiae* se v pochvě vyskytoval častěji s jinými druhy bakterií a kvasinek, jako je *Enterococcus species*, *Escherichia coli*, *Gardnerella vaginalis*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, než samostatně.

Z výše uvedených výsledků vyplývá, že by se mělo dbát na včasnou identifikaci *Streptococcus agalactiae* a vybrat vhodnou antibiotickou léčbu, aby se zabránilo fatálním onemocněním.

8 SEZNAM LITERATURY

Anderson, M.R., Klink, K., Cohrssen, A. (2004): Evaluation of vaginal complaints. *Journal of the American Medical Association* 241: 1368–1379.

Anthony, B. F., Okada, D. M. (1977): The emergence of group B streptococci in infections of the newborn infant. *Annual Review of medicine* 28: 355–369.

Baker, C. J., Barrett, F. F. (1973): Transmission of group B streptococci among parturient women and their neonates. *Journal of Pediatrics* 83: 919–925.

Baker, C. J., Kasper, D. L. (1973): Correlation of maternal antibody deficiency with susceptibility to neonatal group B streptococcal infection. *New England Journal of Medicine* 294: 753–756.

Barcaite, E., Bartusevicius, A., Tameliene, R., Kliucinskas, M., Maleckiene, L., Nadisauskiene, R. (2008): Prevalence of maternal group B streptococcal colonisation on European countries. *Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica* 87 (3): 260–271.

Beneš, J. (2009): *Infekční lékařství*, pp.14–18, 203–208, Galén, Praha.

Bentley, S., Aanensen, D., Mavroidi, A., Saunders, D., Rabinowitsch, E., et al. (2006): Genetic analysis of the capsular biosynthetic locus from all 90 pneumococcal serotypes. *PLoS Genet* 2: e31.

Bisno, A. L., Brito, M. O., Collins, C. M. (2004): Molecular basis of group A streptococcal virulence. *Lancet Infectious Diseases* 3: 191–200.

Borchardt, S. M., DeBusscher, J. H., Tallman, P. A., Manning, S. D., Marrs, C. F., Kurzykowski, T. A., Foxman, B. (2006): Frequency of antimicrobial resistance among invasive and colonizing group B streptococcal isolates. *BMC Infectious Diseases* 6: 57.

Brimil, N., Barthell, E., Heindrichs, U., Kuhn, M., Lutticken, R., Spellerberg, B. (2006): Epidemiology of *Streptococcus agalactiae* colonization in Germany. *Journal of Medical Microbiology* 296: 39–44.

Buton, J. P., Reid, G. (2002): Evaluation of the bacterial vaginal flora of 20 postmenopausal women by direct (nugent score) and molecular (polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis) techniques. *Journal of Infectious Diseases* 186: 1770–1780.

Clarke, J. G., Peipert, J. F., Hillier, S. L., Heber, W., Boardman, L., Moench, T. R., Mayer, K. (2002): Microflora changes with the use of a vaginal microbicide. *Sexually Transmitted Diseases* 29: 288–293.

Čihák, R., Grim, M. (2002): *Anatomie 2*, pp. 367–368, Grada, Praha.

Cartwright, K. (2002) Pneumococcal disease in Western Europe: Burden of disease, antibiotic resistance and management. *European Journal of Pediatrics* 161: 188–195.

Center for Disease Control and prevention (CDC) (1996): Prevention of perinatal group B streptococcal disease: a public health perspective. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 45: 1–24.

Center for Disease Control and prevention (CDC) (2010): **Prevention of Perinatal Group B Streptococcal Disease**. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 59(RR10): 1–32.

Donders, G. G., Bosmans, E., Dekkersmaecker, A., Verecken, A., Bulck, B. V. & Spitz, B. (2000): Pathogenesis of abnormal vaginal bacterial flora. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 182: 872–878.

Dillon, H. C., Jr, Gray, E., Pass, M.A., Gray, B. M. (1982): Anorectal and vaginal carriage of group B streptococci during pregnancy. *Journal of Infectious Diseases* 145: 794–799.

Eschenbach, D. A., Thwin, S. S., Patton, D. L., Hooton, T. M., Stapleton, A. E., Agnew, K., Winter, C., Meier, A., Stamm, W. E. (2000): Influence of the normal menstrual cycle on vaginal tissue, discharge, and microflora. *Clinical Infectious Diseases* 30: 901–907.

Gupta, K., Stapleton, A. E., Hooton, T. M. (1998): Inverse association of H₂O₂-producing lactobacilli and vaginal E. coli colonization in women with recurrent urinary tract infections. *Journal of Infectious Diseases* 178: 446–450.

Hickman, M. E., Rench, M. A., Ferrieri, P., Baker, C. J. (1999) Changing epidemiology of group B streptococcal colonization. *Pediatrics* 104: 203–209.

ITEST plus s.r.o., ITEST BACITRACIN S. Příbalový leták.

ITEST plus s.r.o., ITEST PYR test. Příbalový leták.

ITEST plus s.r.o., ITEST STREPTO GROUP. Příbalový leták.

Kimura, K., Suzuki, S., Wachino, J., Kurokawa, H., Yamane, K., Shibata, N., Nagano, N., Kato, H., Shibavama, K., Arakawa, Y. (2008): First molecular characterization of group B streptococci with reduced penicillin susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother* 52: 2890–2897.

Koukalová, D., Kolář, M., Vágnerová, I., Hejnar, P., Hamal, P., Bardoň, J., Došlík, V., Horák, V., Kohnová, I., Libečková, Y., Sauer, P., Slepíčková, S. (2011): Praktická cvičení z lékařské mikrobiologie II, pp. 13–15, Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc.

Kubota, H., Tsuji, H., Matsuda, K., Kurakawa, T., Asahara, T., Nomoto, K. (2010): Detection of human intestinal catalase-negative, gram-positive cocci by rRNA-

targeted reverse transcription-PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 76 (16): 5440–5451.

Lancefield, R. C. (1933): A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. *Journal of Experimental Medicine* 57 (4): 571–595.

Látalová, H. (2012): Osobní sdělení.

Leclair, C.M., Hard, A.E, Goetsch, M.F., Carpentier, H., Jensen, J.T. (2010): Group B streptococcus: Prevalence in a nonobstetric population. *Journal of Lower Genital Tract Disease* 14(3): 162–166.

Lobovská, A. (2001): *Infekční nemoci*, pp. 77–83, Karolinum, Praha 2001.

Macgowan, A. P., Terry, P. B. (1987): Streptococcus milleri and second trimester abortion. *Journal of Clinical Pathology* 40: 292–293.

Maniatis, N., Palermos, J., Kantzanou, M., Maniatis, N. A., Christodoulou, C., Legakis, N. J. (1996): Streptococcus agalactiae: a vaginal pathogen? *Journal of Medical Microbiology* 44: 199–202.

Manning, S. D., Neighbors, K., Tallman, P. A., Gillespie, B., Marrs, C. F., Borchardt S. M., Baker, J. C, Pearlman, M. D., Forman, B. (2004): Prevalence of group B streptococcus colonization and potential for transmission by casual contact in healthy young men and women. *Clinical Infectious Diseases* 39: 380–8.

Massa, F., Storr, M., Lutz, B. (2005): The endocannabinoid system in the physiology and pathophysiology of the gastrointestinal tract. *Journal of Molecular Medicine* 83: 944–54.

Mašata, J., Jedličková, A., Řezáčová, J., Martan, A., Halaška, M. (2004): Infekce v gynekologii a porodnictví, pp. 23–33, 214–217, Maxdorf, Praha.

Meyn, L. A., Krohn, M. A., Hillier, S. L. (2009): Rectal Colonization by Group B *Streptococcus* as a Predictor of Vaginal Colonization. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 201(1): 76.e1–7.

Melin, P. (2008): Group B Streptococcal disease in the Newborn – maternal Screening Methods and Antimicrobial Prophylaxis. *European Journal of Obstetrics and Gynecology* 3: 58–62.

Měchurová, A., Vlk, R., Unzeitig, V. (2011): Diagnostika a léčba streptokoků skupiny B v těhotenství a za porodu - doporučený postup. *Česká Gynekologie* 76 (1): 8–9.

Motlova J., Strakova L., Urbaskova P., Sak P., Sever T. (2004): Vaginal & rectal carriage of Streptococcus agalactiae in the Czech Republic: incidence, serotypes distribution & susceptibility to antibiotics. *Indian Journal of Medical Research* 119: 84–87.

Ness, R. B., Hillier, S. L., Richter, H. E., Soper, D. E., Stamm, C., McGregor, J., Bass, D. C., Sweet, R. L. & Rice, P. (2002): Douching in relation to bacterial vaginosis, lactobacilli, and facultative bacteria in the vagina. *Obstetrics and Gynecology* 100: 765.

Penka, M., Buliková, A., Matyšková, M., Novotný, J., Kořístek, Z., Bourková, L., Zavřelová, J., Čech, Z., Snopková, S. (2009): *Neonkologická hematologie*, pp. 169, Grada, Praha.

Phares, C. R., Lynfield, R., Farley, M. M., Mohle-Boetani, J., Harrison, L. H., Petit, S., Craig, A. S., Schaffner, W., Zansky, S. M., Gershman, K., Stefonek, K. R., Albanese, B. A., Zell, E. R., Schuchat, A., Schrag, S. J. (2008): Epidemiology of invasive group B streptococcal disease in the United States, 1999–2005. *Journal of the American Medical Association* 299: 2056–2065.

Rotimi, V. O., Olowe, S. A. & Ahmed, I. (1985): The development of bacterial flora of premature neonates. *Journal of Hygiene* 94: 309–318.

Rutová, J. (2006) [online]: Autovakcíny.

Dostupné z <<http://www.zuova.cz/informace/cmpi/zpravodajmpi200602.pdf>>

[cit datum: 26.3.2012]

Sadowy, E., Matynia, B., Hryniewicz, W. (2010): Population structure, virulence factors and resistance determinants of invasive, non-invasive and colonizing *Streptococcus agalactiae* in Poland. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 65(9): 1907–1914.

Sewankambo, N., Gray, R. H., Wawer, M. J., Paxton, L., McNaim, D., Wabwire-Mangen, F., Serwadda, D., Li, C., Kiwanuka, N., Hillier, S. L., Rabe, L., Gaydos, C. A., Quinn, T. C., Konde-Lule, J. (1997): HIV-1 infection associated with abnormal vaginal flora morphology and bacterial vaginosis. *Lancet* 350: 546–550.

Sharmila, V., Joseph, N. M., Arun Babu, T., Chaturvedula, L., Sistla, S. (2011): Genital tract group B streptococcal colonization in pregnant women: a South Indian perspective. *Journal of Infection in Developing Countries* 5(8): 592–595.

Shet, A., Ferrieri, P. (2004): Neonatal & maternal group B streptococcal infections: A comprehensive review. *Indian Journal of Medical Research* 120: 141–150.

Schrag, S. J., Zywicki, S., Farley, M. M., Reingold, A. L., Harrison, L. H., Lefkowitz, L. B., Hadler, J. L., Danila, R., Cieslak, P. R., Schuchat, A. (2000): Group B streptococcal disease in the era of intrapartum antibiotic prophylaxis. *New England Journal of Medicine* 342(1): 15–20.

Schuchat, A. (2000): Neonatal group B streptococcal disease: screening and prevention. *New England Journal of Medicine* 343: 209–210.

Schwebke, J. R., Richey, C. M. & Weiss, H. L. (1999): Correlation of behaviors with microbiological changes in vaginal flora. *Journal of Infectious Diseases* 180: 1632–1636.

Sobel, J. D. (1999): Is there a protective role for vaginal flora? *Current Infectious Disease Reports* 1: 379–383.

Srinivasan, S., Fredricks, D. N. (2008): The human vaginal bacterial biota and bacterial vaginosis. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*: 750479.

Stevens, D.L. (1992): Invasive group A *Streptococcus* infections. *Clinical Infectious Diseases* 14:2–13.

Strus, M., Pawlik, D., Brzychczy-Włoch, M., Gosiewski, T., Rytlewski, K., Lauterbach, R., Heczko, P. B. (2009): Group B streptococcus colonization of pregnant women and their children observed on obstetric and neonatal wards of the University Hospital in Krakow, Poland. *Journal of Medical Microbiology* 58(Pt 2): 228–233.

van der Mee-Marquet, N., Jouannet, C., Domelier, A. S., Arnaut, L., Lartigue, M. F., Quentin, R. (2009): Genetic diversity of *Streptococcus agalactiae* strains and density of vaginal carriage. *Journal of Medical Microbiology* 58 (2): 169–173.

van De Wijgert, J. H., Mason, P. R., Gwanzura, L., Mbizvo, M. T., Chirenje, Z. M., Iliff, V., Shiboski, S. & Padian, N. S. (2000): Intravaginal practices, vaginal flora disturbances, and acquisition of sexually transmitted diseases in Zimbabwean women. *Journal of Infectious Diseases* 181: 587–594.

Votava a kol., (2003): *Lékařská mikrobiologie speciální*, pp. 110–125 , Neptun, Brno.

Votava (2005): *Lékařská mikrobiologie obecná*, pp. 295–307, Neptun, Brno.

Warrington, R., Silviu-Dan F. (2011): Drug allergy. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology* 7(1):S10.

Zaleznik, D. F., Reich, M. A., Hillier, S., Krohn, M. A., Platt, R., Lee, M. L., Flores, A. E., Ferrieri, P., Baker, C. J. (2000): Invasive disease due to group B *Streptococcus* in pregnant women and neonates from diverse population groups. *Clinical Infectious Diseases* 30: 276–81.

9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

CDC	Center for Disease Control and prevention
GAS	group A streptococci
GBS	group B streptococci
HIV	virus lidské imunitní nedostatečnosti
IU	mezinárodní jednotka

10 PŘÍLOHA

Použité přístroje

Mikroskop	Olympus světelný mikroskop CX 41
Termostat s normální atmosférou	Sanyo, MIR 262
Termostat s CO ₂	Sanyo, MCO-20A/C

Použité chemikálie, roztoky a komerční sety

Ethanol- aceton (Dr. Kulich Pharma), ethanol denaturovaný benzinem (Fargon)

Fyziologický roztok- NaCl (Lach:ner), deionizovaná voda

Imerzní olej (MEDIOPTA)

Karbofuchsin- bazický fuchsin (HIMEDIA), fenol (Lach:ner), lihobenzín (FARGON a.s. Olomouc)

Krystalová violet (Lach:ner)

Lugolův roztok- jod (Lach:ner), jodid draselný (Lach:ner), deionizovaná voda