

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZDRAVOTNĚ SOCIÁLNÍ FAKULTA

Detekce původců průjmů u dětí

Bakalářská práce

Autor práce: Jolana Štěpančíková

Vedoucí práce: prof. MUDr. Miloš Velemínský, CSc., dr.h.c

Datum odevzdání: 19. 8. 2011

Abstract

The detection of diarrhoea origin in children belongs nowadays to a standard examination. The generators cause gastroenteritis. Mainly infants, but also young children suffer from intestine diseases. This disorder causes feverish conditions, vomiting, watery diarrhoea, sickness and inappetence.

The aim of the thesis is to prove bacteriological and viral pathogens on the basis of cultivation.

There is an outline of the most commonly occurring pathogens in the theoretical part. Bacterial diarrhoea in children is caused by *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter*, *Escherichia coli*, *Yersiniae* and *Enterobacteria*, whereas viral diarrhoea is caused mostly by the following viruses: *Rotavirus*, *Adenovirus*, *Astrovirus* and *Calicivirus*.

The practical part was performed in the period of October, November, and December 2010 and in January and February 2011 in the Laboma Laboratory, Ltd., now Sylab, Ltd. The thesis aims at children patients till the age of 6. This age was suggested by prof. MUDr. Miloš Velemínský, CSc., dr.h.c., head of the thesis. Child's swab rectal is used for bacteriological examination, after the transport to the laboratory it is inoculated on a selectively identifying medium and after a 24-hour cultivation, bacteria or virus identification follows. Consequently, enteric bacteria isolation is carried out, through which a pure cultivation is obtained. In order to specify exactly *Escherichia coli*, perhaps even its stems, it is necessary to perform serotype to obtain the indicated type and to find out whether it applies to a pathogenic or non-pathogenic bacteria. However, for a virological examination a child's stool sample is needed. *Rotavirus* and *Adenovirus* are detected through the VIKIA® Rota – Adeno test. This is a qualitative test based on the association of monoclonal antidotes. The test uses the immunological reaction on the testing stripe with help of migration.

After 100 randomly chosen samples from children – patients were processed, it was proven that acute gastroenteritis is mainly of viral origin.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma **Detekce původců průjmů u dětí** vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č.111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě/v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Zdravotně sociální fakultou elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích

Podpis studenta

Poděkování:

Především bych chtěla poděkovat panu prof. MUDr. Milošovi Velemínskému, CSc., dr.h.c za jeho trpělivost, ochotu a poskytnutí odborných rad. Dále bych chtěla poděkovat mikrobiologické laboratoři LABOMA (Synlab) s.r.o. respektive panu doktorovi Kramářovi za ochotu, vstřícnost a předání odborných zkušeností při praktické části bakalářské práce.

Obsah

Úvod.....	8
1. Historie.....	9
2. Současný stav.....	12
2.1 Bakteriální střevní infekce u dětí.....	12
2.1.1 Enterobakterie	12
2.1.2 Rod <i>Salmonella</i>	13
2.1.3 Rod <i>Shigella</i>	14
2.1.4 Rod <i>Escherichia</i>	15
2.1.5 Rod <i>Yersinia</i>	16
2.1.6 Rod <i>Campylobacter</i>	17
2.2 Virové střevní infekce u dětí.....	18
2.2.1 Rod <i>Rotavirus</i>	19
2.2.2 Rod <i>Adenovirus</i>	20
2.2.3 Rod <i>Calicivirus</i>	21
2.2.4 Rod <i>Astrovirus</i>	21
3. Cíl práce	22
3.1 Cíl práce.....	22
4. Metodika.....	23
4.1 Úvod do metodiky.....	23
4.2 Charakteristika souboru.....	23
4.3 Preanalytická část.....	24
4.3.1 Odběr biologického materiálu.....	24
4.3.2 Transport vzorků.....	24
4.3.3 Odběrové soupravy.....	25
4.3.4 Žádanky o vyšetření biologického materiálu.....	25
4.4 Analytická část.....	25
4.4.1 Identifikace střevních virů u dětí.....	25
4.4.2 Identifikace střevních bakterií u dětí.....	27

4.4.2.1 Kultivační půdy pro střevní patogeny.....	27
4.4.2.1.1 Transportní půda.....	28
4.4.2.1.2 MacConkeyho medium.....	29
4.4.2.1.3 Selenitový bujón.....	29
4.4.2.1.4 Deoxycholátový agar.....	29
4.4.2.1.5 Karmali agar.....	29
4.4.2.1.6 Barvení dle Grama (<i>C. jejuni</i>).....	30
4.4.2.1.7 Švejcarova půda.....	30
4.4.2.2 Kultivace.....	31
4.4.2.3 Izolace.....	31
4.4.2.4 Serotypizace.....	32
4.5 Postanalytická část.....	33
5. Výsledky.....	34
5.1 Výsledky identifikace virů u dětí.....	34
5.1.1 Výsledky identifikace rotavirů a adenovirů.....	34
5.1.2 Identifikace kalicivirů a astrovirů.....	34
5.2 Výsledky identifikace bakterií.....	34
5.2.1 <i>Escherichia coli</i>	34
5.2.2 <i>Campylobacter jejuni</i>	35
5.2.3 <i>Salmonella enteritidis</i>	35
5.2.4 <i>Shigella</i> a <i>Yersinia</i>	36
5.2.5 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	36
5.2.6 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	36
5.2.7 <i>Enterobacter cloacae</i>	36
5.2.8 <i>Proteus</i>	37
5.3 Tabulky a grafy – statistické vyhodnocení.....	38
5.3.1 Tabulky – zjištěné bakterie z odebraných vzorků.....	38
5.3.2 Graf – zjištěné bakterie z odebraných vzorků.....	39
5.3.3 Tabulky – zjištěné viry z odebraných vzorků.....	40
5.3.4 Graf – zjištěné viry z odebraných vzorků.....	41

6. Diskuze	42
7. Závěr	44
8. Seznam použitých zdrojů	45
9. Klíčová slova	49
10. Přílohy	50
10.1 Fotografie.....	50

Úvod

Průjmovým onemocněním trpí hlavně kojenci, malé děti, ale i dospělí jedinci. Toto onemocnění není vždy způsobeno infekcí (bakteriemi, viry, parazity), ale může se jednat i o neinfekční zánětlivé onemocnění stěny střevní, poruchy látkové výměny, o dietní chybu, potravinové alergie a mnoho dalších neinfekčních zánětlivých onemocnění. Příčinou mohou být také horečnaté stavy, zvracení a u dětí především růst zoubků nebo nedostatečná vstřebavost vody, zvýšené uvolňování vody do střeva, ale i nadměrný pohyb střevních kliček. Akutní průjem trvá dva týdny při správné léčbě a u dětí je nejčastěji vyskytující se. Zato průjem chronický trvá déle než dva týdny. (Gregora 2005)

Střevní onemocnění je jedna z hlavních příčin nemocí a zároveň způsobuje úmrtí ve světě (Nweze 2010).

Bakteriální průjmy způsobují zejména patogeny, kterými u dětí jsou *Salmonella*, ale také *Shigella*, *Escherichia coli*, *Yersinia* a *Campylobacter*. Virové onemocnění způsobují u dětí nejčastěji *Rotavirus*, ale podílejí se i *Adenovirus*, *Astrovirus* a nakonec i *Calicivirus*.

U dětí se často vyskytuje akutní gastroenteritida. Studie prokázala, že rotaviry u dětí jsou nejvíce převládající, poté jsou noroviry, dále adenoviry a nakonec astroviry. (Nakanishi et al. 2009)

Hlavním cílem zpracování této práce je podat přehled o současné problematice virové a bakteriální diagnostiky střevních infekcí u dětí s užším zaměřením na odběr biologického materiálu a především na zpracování metodiky z hlediska zdravotního laboranta. Kultivačně prokázat patogeny, které vyvolávají střevní infekční onemocnění. Po zpracování a naočkování biologického materiálu na tekuté a tuhé půdy nechám vzorky dostatečně kultivovat a zároveň za přítomnosti lékaře vyhodnotím analýzu vzorku, kde dojde k potvrzení či vyloučení patogena. Zaměřím se především na preanalytickou, analytickou a postanalytickou fázi.

V následujících kapitolách podám podrobnější informace o této často vyskytující se problematice.

1. Historie

Homo sapiens (biologický druh) se vždy rozhlížel po přírodě, která nás obklopuje. V posledních 500 letech začal přírodu přírodovědecky poznávat a zároveň ji také rozumět (Galilei *1564, Kepler *1571, Kopernik *1473 a mnoho dalších). Netušili, že existuje kromě viditelného světa (živočichů a rostlin) i svět živých organismů, které jsou neviditelné lidským okem. Dále nevěděli, že organismy jsou příčinou řady nemocí včetně mnoha epidemií. (Bednář a kolektiv 1996)

Infekční choroby byly známy už ve starověku a provázely lidstvo od samého počátku. V minulosti to souviselo s obtížnější hygienou a nedostatečnou výživou. Infekční onemocnění probíhala v epidemiích, až vznikla pandemie a ta způsobovala smrt mnoha lidí. Mezi nejznámější epidemie patří pravé neštovice, mor, cholera, břišní tyfus a mnoho dalších infekcí. (Ryšková 2007)

Před 300 léty svět mikroorganismů objevil holandský obchodník – amatér Antoni van Leeuwenhoek (*1632). Jeho velkým zájmem bylo broušení čoček, kterými prohlížel rozmanité tekutiny. Publikoval svá pozorování v časopise, která byla vydaná „Royal Society of London” a v osmnáctém dopise v roce 1676 popsal bakterie. Před tím již popsal a objevil „animalculu” - tedy kvasinky a prvoky, ale i spermie a erytrocyty (červené krvinky). Poznání mnoha dalších mikroorganismů bylo podmíněno vyvinutím složeného mikroskopu a tak Linné (*1707) v roce 1767 všechny mikroorganismy zařadil do třídy Chaos. (Bednář a kolektiv 1996)

Leeuwenhoek v roce 1676 byl první, kdo pozoroval mikroorganismy. Mikroby pozoroval v tělních tekutinách pod mikroskopem při zvětšení 100 - 270x. Dále následoval prudký rozvoj v oboru mikrobiologie. (Ryšková 2007)

Louis Pasteur (1822 - 1895) byl experimentátor, přírodovědec, debatér, objevovatel vědeckých pravd a zároveň bojovníkem za jejich prosazení. Zúčastnil se sporu, který se zabýval samoplozením červů a jiných organismů viditelných okem. Samoplození červů však vyloučil Francesco Redi (*1626). Roku 1776 Lazaro Spalanzani prokázal experimentálně, že vývar z masa a mnoha dalších snadno se kazících tekutin se ani nekazí, ani nezakalí a nelze v nich nalézt mikroorganismy, pokud

byly uzavřeny víčkem a následně povařeny. Na základě tohoto poznatku se stal vynálezcem výroby konzerv a sterilizace. Louis Pasteur přichází s baňkami s „labutím hrdlem“, které udržely tekutinu sterilní, i když byly vůči vzduchu otevřeny. Princip „labutí hrdlo“ dodnes zůstal zachován v podobě Petriho misek v mikrobiologických laboratořích. Příčinou zachování sterility je gravitace, která nedovolí zárodkům v úzkém prostoru cestu vzhůru. Dalším sporem, při kterém byl Pasteur přítomen, byl spor o příčině kvašení. Roku 1830 Schwann a jiní rozeznali mikroskopem v sedimentu mikroorganismy kvasící tekutiny a právě je označili jako příčinu kvašení. Justus Liebig, nejslavnější chemik, kvašení považoval za neživý proces - proces chemický a stál si tak za názorem, že Schwannovo pozorování bylo po delší dobu zapomenuto. V roce 1857 Pasteur ukázal, že jsou typy kvašení spojeny s mikroorganismy a díky tomuto potřel názor Liebigův a prosadil tak názor svůj, a to, že proces kvašení není možný bez živých organismů. (Bednář a kolektiv 1996)

Pasteurovi se též podařilo kultivovat bakterie v tekutých výživných půdách. Popsal bacil anthraxu, pasteurely a pneumokoky. A také poprvé použil a připravil vakcínu proti vzteklině. (Ryšková 2007)

Roku 1546 Fracastorius z Verony ve své knize „De Contagione“ po studiích epidemií mnoha nemocí uzavírá, že se tyto nemoci šíří pomocí „seminaria“ přenášených z jedné osoby na osobu druhou – nákaza přímo, a to prostřednictvím různých předmětů. William Harwey, té doby slavný lékař, se držel názoru Galenova a názoru Hippokratova, kteří považovali za původce epidemií „miasmas“ (jedovaté výpary vznikající na základě konjukce planet). Ignác Semmelwls (*1818) se nemohl smířit s vysokou úmrtností rodiček a také s vysokou nemocností mnoha lidí. V roce 1847 vyslovil názor, že příčinou jakékoli infekce rodiček jsou lékaři, kteří nemají dostatečně čisté ruce a nemoc přenášejí rukama. Proto navrhl časté mytí rukou vodou obsahující chlór a to proto, aby ruce byly neustále čisté při kontaktu s pacienty. Robert Koch (1843 - 1910) venkovský lékař, který choval laboratorní zvířata, také vlastnil mikroskop a byl vybaven různými chemikáliemi a laboratorním sklem, se zaměřil na pozorování anthraxu a tyčinek v krvi, které zkoumal u nemocných zvířat. Jejich existenci potvrdil Davain v roce 1850. (Bednář a kolektiv 1996)

Robert Koch barvil mikroskopické preparáty, používal kultivaci mikrobů na agarových půdách a na půdách želatinových. Zároveň popsal i některé serologické metody. Dále objevil původce TBC (tuberkulózy) v roce 1882 a také objevil příčiny cholery (*Vibrio cholerae*). Zabýval se patogenitou mikroorganismů a interpretací laboratorních nálezů tzv. Kochovy postuláty. (Ryšková 2007)

Dle Kochových postulátů musí infekční agens být přítomen u každého onemocnění. Lze ho izolovat a také kultivovat a je reálné inokulací jím vyvolat příslušné onemocnění u pokusného zvířete a z pokusného zvířete ho lze zpětně vykultivovat a následně určit. (Vokurka a kolektiv 2009)

J. Löffler roku 1884 objevil původce záškrtu. O šest let později se zdařilo A. Behringovi připravit antioxin, který se tak mohl používat v jeho léčbě. (Ryšková 2007)

K rozvoji bakteriologie významně přispěl i dánský mikrobiolog Christian Gram svou metodou Gramovo barvení bakterií používanou dodnes. Rozlišujeme dva typy bakterií: grampozitivní barví se modře a gramnegativní barví se červeně. Mnoho dalších mikrobiologů se podílelo na různých objevech bakterií, na vývoji a zároveň na prohloubení znalostí v oboru bakteriologie. (Bednář a kolektiv 1996)

2. Současný stav

2.1 Bakteriální střevní infekce u dětí

Bakteriální onemocnění je méně časté než onemocnění virového původu. Bakteriologické vyšetření patří mezi standardní postupy.

Mezi bakteriální patogeny patří *Salmonella*, *Shigella*, enteropatogenní *Escherichia coli*, které jsou původci průjmového onemocnění u lidí (Mieta et al. 2010).

Střevní bakterie a viry jsou detekovány standardními metodami (Bodhidatta et al. 2007).

2.1.1 Enterobakterie

Čeď *Enterobacteriaceae* patří mezi nejdůležitější čeď gramnegativních tyčinek. Jak už z názvu vyplývá, je střevo životním prostředím enterobakterií, a to jak střevo člověka, tak i jiných obratlovců. Enterobakterie jsou tedy patogenní pro člověka a zvířata. Čeď zahrnuje gramnegativní fakultativně anaerobní nesporulující tyčkovité bakterie, které jsou většinou pohyblivé pomocí bičků. Rostou na kultivačních půdách, mají fermentativní a respiratorní metabolismus. Z cukrů tvoří kyseliny a také i plyny. Netvoří oxidázu zato katalázu ano. Rody a druhy enterobakterií jsou biochemicky charakterizovány. (Bednář a kolektiv 1996)

Morfologie: Enterobakterie jsou gramnegativní tyčky se zaoblenými konci, které jsou dlouhé 2 - 3 μm, tlusté 0,5 - 0,8 μm a mají schopnost se pohybovat. Mezi nepohyblivé bakterie patří *Klebsiella*, *Shigella* a *Yersinia pestis*. Některé druhy mají schopnost tvořit pouzdra. Mikroby jsou poměrně kultivačně nenáročné. (Votava a kolektiv 2003)

Biochemické vlastnosti: Kataláza pozitivní, oxidáza negativní a biochemicky jsou aktivní. Druhy parazitické (*Shigella*, *Salmonella*) jsou méně aktivní a saprofytické jsou aktivnější. Některé enterobakterie mají schopnost vázat molekulární dusík. (Votava a kolektiv 2003)

Kultivace: Rostou na kultivačních půdách, za přístupu vzduchu a bez růstových přísad. Růstové optimum je 37°C. Rostou v rozmezí od 18 - 42°C. Na půdách tvoří hladké kolonie v průměru 3 - 5 mm. (Bednář a kolektiv 1996)

Biochemická diference: Enterobakterie velmi málo produkují exoenzymy (lipázy, proteinázy). Výsledky se vyhodnocují pomocí numerických metod. (Bednář a kolektiv 1996)

Antigenní struktura enterobakterií má tři typy antigenů O, H a K. O - antigeny neboli antigeny tělové, které jsou specifické části polysacharidového řetězce. Jde o endotoxin uvolňovaný z bakterií poškozením. Jsou termostabilní a jednotlivé typy se značí čísly (O55, O111 atd). H - antigeny neboli antigeny bičíkové, které jsou tvořeny polymerizovanou bílkovinou, se vyskytují pouze u pohyblivých enterobakterií, vybavených bičíky. Uchovává se účinkem formalinu. Antigeny se označují malými písmeny (například m). Pokud je definovaná tzv. druhá fáze, označuje se čísly (1 až 12). K - antigeny polysacharidové jsou především kapsulární antigenní pouzdra. Uplatňují se jako faktory virulence. Přítomnost pouzdra může maskovat ostatní antigeny. K - antigeny polypeptidické kolonizují sliznice a uplatňují se pouze u některých kmenů *Escherichia coli* (K88, K99). Forssmanův antigen se nachází v buněčné stěně některých shigel a salmonel. Je glykolipid, který vyvolává tvorbu protilátek. (Votava a kolektiv 2003)

Laboratorní diagnostika: Na selektivně diagnostické půdy a to zejména na Endovu půdu a Deoxycholát citrátovou půdu. Pak se izoláty dělí na laktózu pozitivní a negativní. Laktózu negativní mají salmonely, shigely. Určují se pomocí tzv. biochemických řad. Laktózu pozitivní má *Escherichia coli*. (Kramář 2007)

2.1.2 Rod *Salmonella*

Rod *Salmonella enterica* se člení na 7 subspecies, z nichž patogenní pro člověka patří do I. subspecies. Ostatní (II - VII) zahrnují parazity a také parazity studenokrevných. Salmonely jsou pro člověka a zvířata primárními střevními patogeny. Nachází se ve vodě, na odpadcích a v půdách. Ve vodě mohou přežívat měsíce i léta.

Potraviny se mohou infikovat přímo (maso, vejce) nebo druhotně. Salmonely jsou pohyblivé gramnegativní tyčky. Rostou na selektivních a selektivně diagnostických půdách. Glukózu, manitol a maltózu salmonely fermentují, tvoří kyselinu sírovou, ale indol neprodukují. Jedná se tedy o fakultativně intracelulární parazity. Některé salmonely vyvolávají onemocnění septická, kde prototypem je *Salmonella typhi*, která jako jediná vyvolává břišní tyfus a vstupní branou infekce je trávicí trakt. Nejdříve se vyskytuje v krvi a po třech týdnech až ve stolici. Tyfus se léčí antibiotiky. (Bednář a kolektiv 1996)

Další ze skupiny salmonel je *Salmonella paratyphi*, která u nás převažuje. Projevuje se horečkami, bolestí hlavy, pocity obluzenosti a většinou chybí průjem. Především jsou postiženy mízní uzliny střeva a při neléčeném tyfu může dojít až k proděravění střeva. Tyfové salmonely se vyskytují i ve žlučových cestách, žlučníku, případně také v ledvinách. (Kramář 2007)

Vyvolavatelem břišního tyfu je *Salmonella enterica - typhi*. Zdrojem nákazy je nemocný člověk, ale častěji bacilonosič. Nákaza hrozí kontaminovanou vodou. Za poslední dobu se rozmohly epidemie salmonelóz, které jsou vyvolané *Salmonella Enteritidis* většinou infikované slepičími vejci a kuřaty. U gastroenteritid není nutno léčit antibiotiky. Antibiotiky se léčí extraintestinální formy onemocnění. Salmonely se identifikují pomocí kultivačního vyšetření na selektivně diagnostických půdách a identifikují se podle biochemických vlastností. Nezbytná je i serotypizace. (Bednář a kolektiv 1996)

Břišní tyfus a paratyfy jsou horečnatá onemocnění, vyvolaná salmonelami, přenášená vodou a potravinami. Paratyfy mají zpravidla lehčí klinický obraz než tyfus. (Stříteský 2001)

2.1.3 Rod *Shigella*

Shigely z enterobakterií jsou nejchoulostivější a patří mezi bakterie nepohyblivé. Jsou málo aktivní, netvoří plyn při štěpení glukózy, laktóza je negativní, lyzin je také negativní. Druhy se určují podle antigenní struktury sklíčkovou aglutinací. Lze je

pomocí O - antigenů typizovat. Jsou čtyři typy shigel a to *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Shigella dysenteriae* a *Shigella boydii*. Rozlišují se velmi špatně. Shigela je patogen pouze čistě lidský a tudíž nemá žádného zvířecího rezervoára. Je původcem bacilární úplavice, při které stolice často obsahuje hlen, hnis a někdy i krev. Má schopnost se do buňky tlustého střeva indikovat, zároveň se intracelulárně množí. Díky tomu jsou buňky poškozeny za vzniku vředu nebo nekrózy. *Shigella dysenteriae* má enterotoxické, cytotoxické a neurotoxické účinky. Prokazují se kultivací, antigenní analýzou a biochemickým průkazem. (Votava a kolektiv 2003)

Zdrojem nákazy je nemocný člověk a k nákaze stačí velmi malé množství bakterií, které se obvykle přenášejí znečištěnou potravou, vodou, ale také „špinavými rukama“. (Vokurka 1994)

2.1.4 Rod *Escherichia*

Escherichia patří mezi nejčastěji izolované enterobakterie v klinickém materiálu. Je také součástí běžné střevní flóry člověka i ostatních obratlovců. Typickým druhem je *Escherichia coli* (obr. 18). Nové druhy především *Escherichia fergusonii*, *Escherichia hermanni*, *Escherichia vulneris* a *Escherichia blattae* se neidentifikují, protože jejich význam nebyl dosud pro člověka určen. *Escherichia coli* je nejčastěji vyskytující se druh. Je komensál v tlustém střevě. Dostává se do vody fekálním znečištěním a dělí se na serotypy. Tělních O - antigenů je 167 a K, H - antigeny se také k nim váží a tak vzniká 240 serotypů. *Escherichia coli* způsobuje dva typy onemocnění, a to extraintestinální (infekce ran, hnisavé procesy, močové cesty) a v intestinálním traktu způsobuje infekce provázené průjmy. Enteropatogenní kmeny *Escherichia coli* jsou čtyř typů a nazývají se enteropatogenní *Escherichia coli* (EPEC). Postihuje hlavně novorozence a vyvolává u nich průjem. Dále enterotoxigenní *Escherichia coli* (ETEC) způsobuje cestovatelské průjmy. ETEC produkuje dva typy enterotoxinů. Prvním typem je termolabilní enterotoxin (TL) a typem druhým (TS) termostabilní enterotoxin. Enteroinvazivní *Escherichia coli* (EIEC) způsobuje onemocnění podobné dysenterii a posledním typem je enterohemoragická *Escherichia coli* (EHEC). Vyskytuje se

v tlustém střevě, postihuje ledviny a jsou producenty toxinu a verotoxinu. *Escherichia coli* je citlivá na řadu antibiotik. (Bednář a kolektiv 1996)

Enteropatogenní *Escherichia coli* je střevní patogen, který vyvolává průjemové onemocnění u dětí (Gomez et al. 2010).

Escherichia coli se kultivuje na půdách. Roste na Endově půdě v červených koloniích a na Deoxycholátu v růžových koloniích (obr.-19). Štěpí laktózu a glukózu za tvorby plynu, neštěpí močovinu a tvoří indol. Je rezistentní k ampicilinu.

2.1.5 Rod *Yersiniae*

Především jsou patogenní jak pro člověka, tak pro zvířata. Mezi druhy *Yersiniae* se řadí *Yersiniae pestis*, *Yersiniae pseudotuberculosis* a *Yersiniae enterocolitica*. Dále *Yersiniae intermedia*, *Yersiniae frederiksenii* a poslední *Yersiniae aldovae*. Nejznámějším patogenem je *Yersiniae pestis*, která je původcem moru a způsobovala smrtící epidemie. Klinické formy jsou lymfatické, septické a plicní. U forem septických a lymfatických jsou zdrojem divoká zvířata a přenos je zprostředkován morovou blechou. U formy plicní je přenos interhumánní. Mor se dělí na lesní a městský. Lesním rezervoárem jsou divoká zvířata a zdrojem městského moru jsou krysy a potkani. (Kramář 2007)

Yersiniae jsou gramnegativní tyčinky a barví se Gramovo barvením. *Yersiniae pestis* je na kultivaci nenáročná a roste při teplotě od 0 - 40°C. Růstové optimum je 30°C. Jedná se o nepohyblivou tyčku, která je citlivá na tetracyklin, chinolomy, chloramfenikol a mnoha dalších antibiotik. *Yersiniae pseudotuberculosis* je parazit a zároveň také patogen pro ptáky, sudokopytníky a hlodavce. Člověk se nakazí ve zcela výjimečném případě. Kultivace probíhá na selektivních půdách. *Yersiniae enterocolitica* je rozšířena v přírodě především jako parazit zvířat a to hlavně hlodavců. Vyskytuje se v infikovaném mase, ale může i kontaminovat vodu. Jedná se o gramnegativní tyčku, která je při nižších teplotách pohyblivá. U nás se nejčastěji pro serotypizaci izoluje serotyp O3, ojediněle O9. Infekce u dětí se projevuje průjmy a horečkou po požití

mastných výrobků, které jsou připraveny z infikovaného masa vepřů. K léčbě se podávají antibiotika, kterými nejčastěji jsou tetracykliny. (Bednář a kolektiv 1996)

Na celém světě ročně na průjmy umírá zhruba 1,8 miliónů dětí a mnoho dalších miliónů trpí průjmovým onemocněním. (Finkbeiner et al. 2008)

2.1.6 Rod *Campylobacter*

Jedná se o štíhlou zahnutou gramnegativní tyčinku. Pro růst potřebuje půdy s přítomností krve, obohacené o aminokyseliny a i vitamíny. Na půdách s přítomností krve nehemolyzuje, neštěpí žádné cukry. Je citlivý k vysokým teplotám a k vyschnutí. Tvoří kolonie hnědé barvy, plazí se na půdách a zároveň vytváří souvislý povlak. (Přecechtěl a kolektiv 1988)

Roste při teplotě 42 – 43°C. Tvoří katalázu a oxidázu. Patogenní *Campylobacter* produkuje enterotoxin a cytotoxin. Nachází se v přírodě i ve střevním traktu teplokrevných zvířat. (Bednář a kolektiv 1996)

Campylobacter vyžaduje speciální kultivace a odběr. Léčí se antibiotiky. Při léčbě je též důležitá dieta a rehydratace. (Ryšková 2007)

Kampylobakterů je více druhů a to *C. jejuni*, *C. lari*, *C. sputorum*, *C. upsaliensis*, *C. rectus*, *C. mucosus*, *C. fetus*, *C. hyointestinalis* a *C. curvus*. Mezi nejvýznamnější patogen patří *C. jejuni*. Rezervoárem infekce jsou kuřata, krůty, syrové mléko a kontaminovaná voda. (Votava a kolektiv 2000)

Campylobacter jejuni je bakterie, která vyvolává průjmové infekce a to především u dětí. Zpočátku se projeví horečkou a pak následuje vodnatý průjem, ve kterém se nachází velmi často krev. (Ryšková 2007)

Kampylobakter roste na speciálních kultivačních půdách a vyžaduje mikroaerofilní prostředí (snížení kyslíku, zvýšení oxidu uhličitého a také dostatečnou vlhkost). Tvoří katalázu a oxidázu. Mnoho se jich nachází v přírodě, většina je ve střevním traktu teplokrevných zvířat. *Campylobacter jejuni* a *Campylobacter lari* se nachází především u drůbeže a *Campylobacter coli* u prasat. *Campylobacter jejuni* a *coli* vyvolává u dětí a dospělých akutní střevní infekce. Infekce nastane požitím

infikované vody či potravy, ale také infikovanými zvířaty. *C. jejuni* se nachází a množí v tenkém střevě. Migruje do střevního epitelu, kde způsobuje zánět a ve stolici se nachází leukocyty a i erytrocyty. Pokud patogen pronikne do krevního oběhu, tak nastane systémové horečnaté onemocnění, poté bolest břicha, průjmy, bolesti hlavy doprovázené horečkou. Toto onemocnění trvá 5 - 7 dní. *C. jejuni* se při teplotě pod 37°C nemnoží, ale několik týdnů přežívá ve vlhkém prostředí při 4°C. Infekce u člověka je způsobena špatně upravenou tepelnou potravou. Je citlivý na tato antibiotika: makrolidy, tetracykliny a chloramfenikol. (Bednář a kolektiv 1996)

Ze stolice lze prokázat přítomnost kampylobakterů z 60% latexovou aglutinací. Pro laboratorní nepřímou diagnostiku se dá použít zejména metoda ELISA. (Bednář a kolektiv 1996)

2.2 Virové střevní infekce u dětí

Virové průjmy jsou hlavní příčinou dětského onemocnění. Důležitou roli při všech dětských průjmech hrají viry, které se vyšetřují mikroskopicky, ale také pomocí specifických testů (EIA). (Liu et al. 2006)

Rotaviry způsobují středně těžké až těžké akutní průjmy u dětí do 5 let. Rotaviry se vyskytují na podzim a v zimě. Rotavirové vakcíny umožňují snížení tohoto onemocnění. (O’Ryan et al. 2010)

Ke zjištění virů slouží elektronický mikroskop a metody PCR, EIA a aglutinace pro detekci rotavirů ve vzorcích (Marshall et al. 2003).

Původci nákazy jsou tedy adenoviry, rotaviry, astroviry a kaliciviry. Nákaza se šíří především přímým kontaktem mezi dětmi a dospělými jedinci. Často vyskytující se infekce jsou v dětských kolektivech a v kojeneckém ústavu. Rychlé šíření těchto infekcí napomáhá nedůsledná osobní hygiena.

2.2.1 Rod *Rotavirus*

Jsou velké 66 - 68 nm. Jejich zevní kapsida je glykoproteinová a je především nositelkou hemaglutinačních vlastností a typově specifických antigenů. Zato kapsida vnitřní obsahuje specifický antigen skupinově. Rotaviry jsou termorezistentní, vzdorují účinku éteru a nízkého pH. Rotaviry jsou rozděleny do pěti skupin (A - E) a také do dvou podskupin I a II. Ty jsou určovány antigenní povahou proteinů (bílkovin) vnitřní kapsidy. Druhy rotavirů jsou označovány podle hostitele, např. lidské, hovězí, opičí a psí. Lidskými rotaviry mohou být infikována hlavně selata, telata a také opice. Přenos infekce ze zvířete na člověka patří k výjimkám. Lidské rotaviry byly nejdříve považovány za nekultivovatelné *in vitro*. Později se ukázalo, že infekce buněčných kultur lidskými rotaviry je založena na přítomnosti trypsinu. Rotaviry se množí v lidském střevě, ale i v diploidních buňkách lidské embryonální ledviny. Způsobují střevní infekce a přenos infekce je především kontaminovanými předměty. Inkubace je 48 hodin. Je to virus, který se množí v povrchní vrstvě buněk sliznice tenkého střeva. Toto vede ke změnám permeability buněčných membrán, ke ztrátě iontů a také i sekreci vody. Virus ve stolici se vyloučí 3 - 5. den tohoto onemocnění. Nejvíce jsou postiženy děti od 6 měsíců do 2 let. U těchto dětí to z 40% vyvolávají rotaviry. (Bednář a kolektiv 1996)

Rotavirové infekce jsou nejčastější příčinou hospitalizace dětí a to především v jarních měsících. Rotaviry způsobují gastroenteritidy. (Oldak et al. 2009)

S akutní gastroenteritidou byly hospitalizovány v nemocnici děti do pěti let. Po odběru vzorku analýza prokázala několik enteropatogenů. Výsledky zdůrazňují, že lidské viry jsou patogenní a způsobují těžké akutní průjmy. (Gutierrez et al. 2010)

U starších dětí ale i u dospělých dochází k infekci inaparentní. Infekce se nejčastěji šíří v porodnicích, dětských ústavech a v kojeneckém oddělení. K detekci virů ve stolici lze použít elektronmikroskopické vyšetření nebo se viry stanoví pomocí metody ELISA. Nejčastěji se provádí průkaz aglutinací latexových partikulí, které jsou pokryty specifickými anti - rotavirovými protilátkami (test Rotalex). Lze provést

očkování dětí. Vakcína však poskytne ochranu pouze proti některým serotypům. (Bednář a kolektiv 1996)

U novorozenců a dětí byly provedeny analýzy pro rotaviry a adenoviry pomocí ELISA testů (Tran et al. 2010).

2.2.2 Rod *Adenovirus*

Jsou to neobalené viry s průměrem 70 - 90 nm, množí se v jádře buňky. Kapsida má kubickou symetrii, která je založena z 252 kapsomér: hexony tvořící stěny a pentony tvoří vrcholy pravidelného dvacetistěnu. Pentony obsahují vlákna. Vlákna vyběhají z pentonů a mají paličkovité zakončení. Polypeptid tvoří paličku a je nástrojem adsorbce virionů a také nositelem typové specifičnosti. Adenoviry se replikují v jádře a tvoří inkluze. Jsou rezistentní vůči fyzikálním, chemickým vlivům a při teplotě 20°C vydrží několik týdnů. Adenoviry jsou inaktivovány teplem. Lidské adenoviry se dělí podle fyzikálně - chemických vlastností do 6 podrodů (A - F). Mají hexonový antigen. Pentony jsou nositelem druhové specifičnosti a obsahují dvě antigenní složky. Toxická báze a vlákno obsahují specifické antigeny. Lidské adenoviry se dělí do 41 sérotypů. Infekce vyvolává také záněty dýchacích cest, spojivek a někdy také infekce urogenitálu. Typy 40 - 41 způsobují gastroenteritidy u dětí a jsou obtížné na kultivaci. Infekce se šíří kapénkově, kontaminovanými předměty především vodou. V odpadních vodách a povrchových vodách adenoviry dlouho přetrvávají. Nejdříve se vir množí nejčastěji v epitelální buňce spojivky, nosohltanu a ve střevech. Množení viru způsobuje destrukci buněk. Primární infekce způsobují velmi těžký průběh a postihují děti od 6. měsíce do 6 - 7 let, u kterých adenoviry vyvolávají z 10% zejména respirační onemocnění. V některých případech toto onemocnění vyžaduje hospitalizaci. Adenoviry mohou přetrvávat v organismu, a to v lymfoidních tkáních nebo ledvinách bez klinických příznaků. Inkubační doba je 5 - 8 dní. Adenoviry jsou velmi běžné. Vyskytují se po celý rok, nejvíce na začátku léta a v zimě. Onemocnění u dětí vyvolává infekce typu 1 - 6. Adenoviry typu 40 - 41 se zpracovávají přímým průkazem, protože

se nedají kultivovat in vitro. Nejčastěji se používá latexová aglutinace. (Bednář a kolektiv 1996)

2.2.3 Rod *Calicivirus*

Jedná se o viry, které jsou neobalené. Jsou rezistentní k chemickým i fyzikálním vlivům. Kapsidu kubické symetrie s kališkovitými prohlubeninami na vrcholech tvoří 32 kapsomér. Kaliciviry jsou velké od 27 - 40 nm. Genom tvoří RNA, má pozitivní polaritu a je infekční v izolovaném stavu. Lidské kaliciviry u malých dětí vyvolávají zvracení a průjemy. Jsou přítomny ve stolici dětí, které mají střevní onemocnění. Infekce se šíří znečištěnou vodou a potravinami a také orofekálním přenosem. (Bednář a kolektiv 1996)

2.2.4 Rod *Astrovirus*

Viry skupiny Norwalk neboli *Norovirus* se od lidských kalicivirů liší a to zejména organizací genomu, způsobem replikace, velikostí a nakonec i biologickými vlastnostmi, proto jsou řazeny do čeledi astroviry. Postihují děti školního věku a dospělé jedince. Onemocnění batolat a kojenců je vzácné. Infekce se šíří přenosem orofekálním, nejčastější je rodinný výskyt. Lze je identifikovat i ve zvracích nemocných osob. Viry se množí v tenkém střevě a jsou vylučovány stolicí. Příznaky tohoto onemocnění se projevují horečkou, zvracením, průjmem, zánětem hrdla. Viry se dají prokázat metodou RIA, ELISA a imunoadherencí. (Bednář a kolektiv 1996)

3. Cíl práce

3.1 Cíl práce

Cílem bakalářské práce bylo vyšetřit 50 dětských vzorků z recta a 50 dětských vzorků stolic, ve kterých budu eventuálně detekovat přítomnost virů a bakterií způsobujících infekční průjemové onemocnění.

4. Metodika

4.1 Úvod do metodiky

V této praktické části bakalářské práce jsem se věnovala především identifikaci střevních patogenů dětských pacientů.

Střevní infekce bakteriálního původu jsem identifikovala pomocí lékáře kultivací, izolací a serotypizací. Bakteriologické vyšetření patří mezi standardní diagnostické postupy. V laboratoři je důležité využít všech dostupných metod k přesnému určení patogena.

Pro střevní infekce virového původu jsem použila základní metody, které jsou v laboratoři dostupné. Dále jsem byla přítomna při určování patogenů mikrobiologickým lékařem. Viry se také dají identifikovat elektronovou mikroskopií, jak už bylo zmíněno v teoretické části. Tato metoda není však dostupná ve všech laboratořích. Není k dispozici ani v laboratoři Laboma (Synlab) s.r.o. v Českých Budějovicích, kde jsem praktickou část prováděla.

V metodice jsem se nejvíce zabývala zpracováním biologického materiálu, základní diagnostikou vzorků a nakonec jsem provedla statistické vyhodnocení nejčastěji se vyskytujících bakteriálních a virových střevních patogenů.

4.2 Charakteristika souboru

Výsledky pro zpracování bakalářské práce jsem získala z databáze mikrobiologické laboratoře LABOMA, nyní laboratoře Synlab s.r.o. v Českých Budějovicích. Výsledky jsou anonymního původu, protože zdravotnictví je podrobena lékařskému tajemství.

Bakalářská práce se týká dětských pacientů do 6 let. Tento věk byl určen mým vedoucím bakalářské práce. Vzorky dětských pacientů jsem získala z období října, listopadu, prosince roku 2010 a dále pak ledna a února roku 2011.

4.3 Preanalytická část

4.3.1 Odběr biologického materiálu (výtěr z recta a odběr stolice)

Vzorky pro mikrobiologickou diagnostiku většinou odebírají zdravotní sestry, ale část vzorků odebírá i lékař. Odběr vzorku musí být proveden ve správnou dobu ze správného místa, vzorek musí být ve sterilní soupravě (obr.-3). Materiál musí být označen jménem, rodným číslem pacienta a hodinou odběru vzorku. To proto, aby nedošlo k záměně vzorku. Odebraný biologický materiál je nutno doručit do laboratoře a zpracovat co nejdříve nebo jej alespoň konzervovat. Výtěry z recta je nutno zasílat v transportních půdách, aby nedošlo ke znehodnocení vzorku např. vyschnutím. (Votava a kolektiv 2000)

Výtěr z dětského recta na bakteriologické vyšetření se odebírá tamponem na tyčince z umělé hmoty. Tampon se do konečníku zavede hluboko 1 – 2 cm. Tampon se po odběru zasune do transportní půdy, aby nedošlo k vyschnutí vzorku. Výtěr se nejlépe odebere u klečícího dětského pacienta opřeného o ruce. (Votava a kolektiv 2000)

Na virologické vyšetření je potřeba vzorek stolice. Odebere se stolice o velikosti lískového oříšku do sterilní zkumavky (obr.-25) a transportem se vzorky odvezou do laboratoře, kde dojde k vyšetření stolice. (Votava a kolektiv 2000)

4.3.2 Transport vzorků

Z pracovišť jsou řidičem jednotlivé vzorky, které jsou v transportním boxu, převezeny automobilem do laboratoře (obr.-2). Tento automobil slouží pouze pro transport biologického materiálu. Pokud je materiál odebrán v době, kdy laboratoř není dostupná (v noci), tak se bakterie uchovávají při pokojové teplotě, krev se chladí, ale séra se musí zmrazit. Pokud se vzorky posílají poštou, musí se pečlivě zabalit, aby nedošlo k poškození či znehodnocení vzorku. Balíček se musí řádně označit nápisem, z kterého vyplývá, že se jedná o infekční materiál. (Votava a kolektiv 2000)

4.3.3 Odběrové soupravy

Dříve se pro odběr používaly sterilní skleněné zkumavky. Postupem času byly tyto skleněné zkumavky nahrazeny komerčně vyráběnými sterilními soupravami, které jsou z umělé hmoty a jsou jednorázové. (Votava a kolektiv 2000)

4.3.4 Žádanky o vyšetření biologického materiálu

Používají se univerzální žádanky, které jsou vydané Všeobecnou zdravotní pojišťovnou nebo se používají žádanky upravené podle místních potřeb (obr.-1). Obě žádanky musí obsahovat tyto údaje: kód pojišťovny, identifikační číslo zdravotníka, jméno pacienta, rodné číslo, datum odběru, odbornost lékaře, základní diagnózu, název a číslo oddělení nebo zdravotního střediska, požadované vyšetření a materiál, dosavadní léčba antibiotiky a nakonec razítko a podpis lékaře. (Votava a kolektiv 2000)

4.4 Analytická část

4.4.1 Identifikace střevních virů u dětí

Pro identifikaci rotavirů a adenovirů se nejčastěji používá test, který se jmenuje VIKIA ® Rota – Adeno test (obr.-26). V laboratoři LABOMA (Synlab) s.r.o tento test používají. Test si objednávají u firmy bioMérieux. Jedná se o velmi rychlý jednorázový test pro kvalitativní dvojitou detekci virů v lidské stolici. Rota – Adeno test je založen na imunochromatografické technice.

Nejčastějšími viry jsou rotaviry a druhými nejčastějšími agens jsou adenoviry, které způsobují akutní gastroenteritidy u malých dětí. Virové průjmy jsou velmi často sezónního původu. Během akutního onemocnění se vylučuje velké množství virů, které způsobují epidemii.

Buněčná kultivace těchto dvou virů je velmi obtížná, proto se používají imunologické techniky. Díky rychlému testu je i rychlá diagnóza infekčního agens,

kteřá umožňuje vyloučení antibiotické léčby a zároveň umožní velmi rychlou izolaci infikovaného dítěte.

Principem testu: VIKIA ® Rota – Adeno je test kvalitativní a je založený na asociaci monoklonálních protilátek, které jsou specifické pro rotaviry a pro adenoviry. Test Rota – Adeno využívá imunologických reakcí na testovacím stripu pomocí migrace.

Složení testu: Test je složen z plastové hmoty. Test obsahuje chromatografickou membránu, na niž jsou fixovány v testovací oblasti monoklonální protilátky proti rotaviru (v testovacím okénku oblast „R“) a monoklonální protilátky proti adenoviru (v testovacím okénku oblast „A“) a nakonec v kontrolní oblasti je polyklonální protilátka proti myššímu IgG (v testovacím okénku oblast „C“).

Podmínky pro skladování testu: Test se nesmí zmrazit a použít po datu expirace. Test se skladuje a uchovává při teplotě 4 až 30 °C.

Pracovní postup: Test Rota – Adeno je pro určení virů velmi výhodný, jednoduchý a citlivý. Veškerá manipulace s testem spočívala v tom, že jsem test vyndala z chladicího boxu a přinesla do laboratoře. Před použitím jsem test vyjmula z obalu a chvíli jsem ho nechala ohřát na pokojovou teplotu (obr.-27). Ze setu jsem také vyndala lahvičku s pufrem označenou R2 (pufr fosfátový o pH 7,2 + 0,9 g/l azidu sodného), (obr.-28). Z lahvičky jsem odšroubovala a vyjmula aplikační tyčinku potřebnou k nabrání vzorku stolice. Pomocí aplikační tyčinky z lahvičky R2 jsem odebrala 50 mg stolice (odpovídá ¼ velikosti hrášku). Vzorek stolice jsem vložila do lahvičky R2, která obsahovala diluční pufr. Poté jsem lahvičku R2 uzavřela víčkem, zašroubovala a po důkladném protřepání jsem ji na chvíli obrátila dnem vzhůru a držela ji ve svislé poloze. Zanedlouho jsem do jamky označené písmenem „S“ nakapala 2 – 4 kapky naředěného vzorku a čekala jsem, než se objevil v kontrolní linii „C“ případně linii „R“ nebo linii „A“ zbarvený proužek. V přítomnosti lékaře jsem odečetla výsledek po 10 minutách po aplikaci vzorku.

Vyhodnocení testu: Komplexy antigenů – protilátek migrovaly podél membrány a navázaly se na protilátky proti adenoviru nebo rotaviru, přičemž se vytvořily komplexy, které byly modré nebo červené.

Pro pozitivní výsledek se objevily dvě nebo tři oddělené linie: jedna v kontrolní oblasti „C“, jedna nebo dvě v testovací oblasti (modrá v „R“ nebo červená v oblasti „A“). Jestliže se objevila modrá linie v testovací oblasti „R“, tak byl vzorek pozitivní na rotaviry. Pokud se objevila červená linie v testovací oblasti „A“, tak byl vzorek pozitivní na adenoviry. Pokud se objevily obě linie, modrá v testovací oblasti „R“ a červená v testovací oblasti „A“, tak byl vzorek pozitivní na rotaviry a adenoviry.

Pro negativní výsledek se v kontrolní oblasti „C“ objevila jedna zabarvená linie a v testovací oblasti „A“ a „R“ se neobjevila žádná barevná linie (obr.-29).

Jestliže byl počet virových částic ve vzorku příliš nízký, mohly se tak získat falešně negativní výsledky. Pokud bylo množství stolice příliš velké, mohly se získat falešně negativní nebo neinterpretovatelné výsledky.

Intenzita modré a červené barvy v oblastech testovací linie se mohla lišit v závislosti na koncentraci rotaviru a adenoviru přítomných ve vzorku. (Příbalový leták ze setu VIKIA® Rota – Adeno testu dodávaný do Labomy firmou bioMérieux)

Zpracovala jsem 50 vzorků stolice na virologické vyšetření. Pozitivní a negativní výsledky všech testů jsem popsala v tabulce ve výsledcích této práce.

4.4.2 Identifikace střevních bakterií u dětí

Kultivace je jedna z nejdůležitějších diagnostických metod přímého průkazu bakterií. Na kultivačních půdách rostou také plísně a kvasinky. Význam kultivace spočívá k přímému průkazu bakterií v klinickém materiálu. Kultivací zjistíme, zda se jedná o jeden druh, více druhů nebo rodů bakterií.

4.4.2.1 Kultivační půdy pro střevní patogeny

Střevní bakterie se nejdříve identifikují ze selektivně diagnostických půd (obr.-5). Další krok identifikace záleží na mikrobiologickém lékaři v LABOMĚ.

Kultivační půdy se dělí podle původu (používaly se dříve), podle složení (v mikrobiologii se používají půdy komplexní), dále se dělí podle konzistence, zde patří

tekuté, pevné a polotuhé půdy. Tekuté půdy slouží především k pomnožení bakterií. Bakterie v této půdě vytváří zákal, sediment nebo blanku na povrchu. Z tekutých půd nelze získat čistou kulturu, která je nutná pro bližší určení mikroba. Pevné půdy se užívají k diagnostice velmi častěji. Růst se na plotně projeví tvorbou kolonií. Lze také zjistit, zda se jedná o jeden druh nebo více druhů bakterií. Popřípadě můžeme získat čistou kulturu pro další určení. Polotuhé půdy se používají k růstu na kultivaci náročných bakterií. Poté se půdy dělí podle funkce na půdy základní (masopeptonový bujón), diagnostické (krevní agar), selektivní (krevní agar s 10% NaCl), selektivně diagnostické (Endova půda), pomnožovací půda (selenit), transportní půdy (Amiesova a Stuartova půda) a nakonec půdy se sníženým redox – potenciálem (pro aerobní bakterie a fakultativně anaerobní bakterie). (Votava a kolektiv 2000)

4.4.2.1.1 Transportní půda

Hlavní funkcí transportní půdy je udržet mikroby během transportu do laboratoře životaschopné a uchovat je ve stejném množství, v jakém se nacházeli v místě odběru (v dětském rectu). Transportní půda se nachází buď v umělohmotné nebo skleněné zkumavce. Tyto půdy nemají žádné živiny. Po výtěru se tampon zanoří do transportní půdy, půda se popíše jménem a rodným číslem dětského pacienta a se žádankou se vzorek zašle do laboratoře. Nyní se nejvíce používá půda Amiesova a druhou nejčastěji používanou půdou je půda Stuartova. Transportní půdy jsou do ordinace a laboratoře dodány komerčně. (Votava a kolektiv 2000)

Při zpracování výtěru z dětského recta se v laboratoři LABOMA (Synlab) používají na očkování tyto plotny: MacConkeyho medium (mekkonky), Deoxycholátový agar (déchko), Selenitový bujón (selenit), Karmali agar (pro kultivaci *Campylobacter jejuni*) a nakonec Švejcarova půda (izolační půda).

4.4.2.1.2 MacConkeyho medium (mekkonky)

Jedná se o selektivní půdu, která je podobná Endově půdě jak vzhledem, tak i funkcí (obr.-6). Tato půda obsahuje žlučové soli, krystalvioleť, neutrální červeň a laktózu. Obsahuje mnohem méně toxických složek než půda Endova. Růst grampozitivních bakterií je na půdě potlačen. Laktóza - pozitivní kmeny vytvářejí růžové kolonie, kolem kterých může být dvorec růžového precipitátu. *Proteus* se na půdě neplazí. (Votava a kolektiv 2000)

4.4.2.1.3 Selenitový bujón (selenit)

Bujón má růžovo – oranžovou barvu. Je důležitý pro selektivní pomnožení např. salmonel a růst jiných bakterií je částečně potlačen nebo úplně (obr.-7). Bujón se inkubuje 24 hodin a po 24 hodinách kultivace se rozočkuje na Deoxycholátový agar a nechá se opět kultivovat 24 – 48 hodin. Nejčastěji se používá pro záchyt střevních patogenů u dětí a dospělých. (Votava a kolektiv 2000)

4.4.2.1.4 Deoxycholátový agar (děčko)

Tato půda je selektivně diagnostická a používá se pro diagnostiku střevních patogenů (obr.-6). Bakterie na ní narostlé se dají velmi snadno identifikovat. Půda má nahnědlou barvu a obsahuje laktózu a deoxycholát. Salmonely na ní tvoří černé kolonie, shigely světlé kolonie a ostatní enterobakterie kolonie růžové. Deoxycholátový agar se odečítá za 24 – 48 hodin.

4.4.2.1.5 Karmali agar

Pro kultivaci na *Campylobacter jejuni*. Kultivuje se při 42 °C po dobu 48 hodin v atmosféře v anaerostu s vyvíječem – Campygen (obr.-13). Plotna má černou

barvu (obr.-14). Z podezřelých kolonií na Karmali agaru zhotovíme mikroskopický preparát, který se barví dle Grama. Půda obsahuje aktivní uhlí, hemin a škrob.

4.4.2.1.6 Barvení dle Grama (*Campylobacter jejuni*)

Na podložní sklíčko kroužkovým pohybem jsem nanasla vzorek (výtěr z dětského recta) o velikosti desetikoruny a dále jsem preparát fixovala plamenem. Po fixaci jsem preparát dala do vodorovné polohy. Po dobu jedné minuty jsem ho barvila nejdříve roztokem Krystalové violeti a následně Lugolovým roztokem také po dobu jedné minuty. Barviva jsem spláchla acetonem. Dále jsem preparáty dobarvila Karbolfuchsinem, opláchla je vodou, osušila a následně jsem je prohlížela v mikroskopu při imerzním zvětšení (1000x).

Gramovo barvení je velmi jednoduchá laboratorní metoda, která využívá anilinové barvy (Göpfertová a kol. 2002).

V mikroskopu můžeme pozorovat modrofialové bakterie, které se označují Grampozitivní (obvykle se jedná o koky). Druhá skupina mikrobů má růžovočervenou barvu a označují se za Gramnegativní (enterobakterie, *Vibrio*). (Podstatová 2001)

4.4.2.1.7 Švejcarova půda

Skládá se z Endovy půdy a z biochemického klínu, který pokrývá 1/3 Petriho misky (obr.-8). Na plotně lze vidět štěpení glukózy, laktózy, sacharózy, manitolu, urey a tvorbu kyseliny sírové. Půda se používá pro identifikaci střevních patogenů. (Votava 2005)

Na Švejcarovu plotnu se po naočkování nanáší sklíčko, sacharóza a manitol (obr.-9).

4.4.2.2 Kultivace

Nejprve jsem kultivační půdy popsala čísly. Číslo bylo totožné se vzorkem a také se žádankou. Petriho misky jsem popsala na dně ploten z důvodů, aby nedošlo k proházení více více ploten a nezaměnil se materiál. Výtěr z dětského recta jsem naočkovala přímo výtěrovým tamponem na jednotlivé kultivační půdy. Tamponem jsem nejprve udělala inokulum, které jsem následně rozočkovala bakteriologickou kličkou (obr.-4). Tamponem jsem nanesla inokulum na tyto selektivně diagnostické plotny: MacConkeyho medium, Deoxycholátový agar, Karmali agar (pouze pro kultivaci *Campylobacter jejuni*) a nakonec jsem výtěrovku ponořila do Selenitového bujónu. MacConkeyho půdu, Deoxycholátovou půdu a Selenitový bujón jsem dala do termostatu inkubovat při 37 °C po dobu 24 hodin (obr.-11).

Po naočkování bakterií na půdy jsem nechala patogeny pomnožit při teplotě 37°C, kterou umožňoval termostát (obr.-12). (Kaprálek 1999)

Po 24 hodinách jsem selenit bakteriologickou kličkou naočkovala na Deoxycholátovou půdu a tu jsem společně s lékařem odečetla po 24 hodinách. Zato Karmali agar na kultivaci *Campylobacter jejuni* se inkuboval v termostatu při 42 °C po dobu 48 hodin ve zvláštní atmosféře v anaerostatu s vyvíječem – Campygen. Z podezřelých kolonií na Karmali agaru jsem zhotovila mikroskopický preparát, který jsem barvila barvením dle Grama a poté jsem preparát hodnotila mikroskopicky s lékařem.

MacConkeyho medium a Deoxycholátový agar jsem s lékařem odečetla po 24 hodinách a Karmali agar jsem odečetla po 48 hodinách. Veškeré výsledky lékař zaevidoval do počítače.

4.4.2.3 Izolace

Pro přesnou identifikaci střevních patogenů jsem naizolovala gramnegativní tyčky do čisté kultury bakteriologickou kličkou (obr.-10). Očkování jsem provedla na izolační půdy neboli Švejcarovy plotny, které pro kultivaci patogena

poskytovaly fenotypické znaky, které postačily pro identifikaci střevních bakterií. Výhoda Švejcárovy půdy byla ta, že bylo vidět, zda byla kultura čistá nebo nikoli. Švejcárova plotna je složena z Endovy půdy a šikmo je nalita půda barvy modrozelené, která se označuje jako biochemický klín. Izolaci jsem provedla tímto způsobem: bakteriologickou kličkou jsem přenesla ze směsné kultury z pevné půdy určité kolonie na Švejcárovu půdu a následně jsem je rozočkovala. Půdu jsem nejprve popsala číslem a poté jsem masivně naočkovala prostředek plotny a klín. Do klínu jsem provedla několik vpichů (5 – 6) a nakonec jsem zprostředka Endovy půdy rozočkovala zbylé dvě části ve tvaru hádka. Na klín jsem pinzetou položila sterilní sklíčko, na Endovu půdu tabletu sacharózy (doprostřed) a manitol pod sacharózu. Izolačky jsem dala inkubovat po dobu 24 hodin. Druhý den jsem se zúčastnila vyhodnocení výsledků s lékařem, které lékař zadal do počítače a elektronickou poštou je zaslal dětskému ošetřujícímu lékaři.

Pokud biochemický klín zežloutl, tak bakterie štěpila glukózu. Když se okolo tablety vytvořil červený dvorec, tak došlo ke štěpení sacharózy, manitolu nebo obou cukrů. Tvorba sirovodíku se projevila zčernáním biochemického klínu. Bublínky pod sklíčkem znamenaly přítomnost plynu. Pokud Endova půda zčernala, došlo ke štěpení laktózy. Při tvorbě ureázy vznikl silný amoniakální zápach biochemického klínu a zároveň klín zmodral.

Cílem izolace je vždy získat čistou kulturu v oddělených koloniích. S čistou kulturou lze provádět identifikaci mikrobů např. použitím biochemických testů. (Klaban 1999)

4.4.2.4 Serotypizace

Po kultivaci izolačních ploten jsem dále provedla serotypizaci bakterií, podle které jsem zjistila, zda se jedná o patogenní bakterii nebo o běžnou střevní flóru v případě *Escherichia coli*. Tato metoda se běžně v laboratoři používá.

Principem serotypizace je aglutinace antigenních částic na podložním sklíčku. Antigenní částice se nachází na povrchu patogena a s danými séry (antiséry) vznikne nebo naopak nevznikne aglutinace.

Z izolačních ploten jsem bakteriologickou kličkou vyjmula bakterie (*Escherichia coli*), které jsem nanesla na podložní sklíčko s příslušnými typy sér. K dispozici je řada antisér, např. O:26, O:55, O:86, O:111, O:119, O:124, O:125, O:126, O:127 a O:128 (obr.-17). Důkladně jsem bakterie s jednotlivými séry promíchala a po chvíli jsem s laborantkou výsledek odečetla. Serotypizace umožňuje přesnou identifikaci patogena respektive přesné určení druhu patogena. Pokud se vyskytne velmi podobná až shodná bakterie, následuje biochemické dourčení různými séry (obr.-16). V mém případě byla identifikace bakterií vždy jednoznačná po provedené serotypizaci.

Serotypizaci u *Salmonella enteritidis* jsem prováděla stejným způsobem jako u *Escherichia coli*. K serotypizaci jsem používala dvě séra a to Monovalent O:9 a Monovalent H:g, m (obr.-15). Pokud tyto dvě séra vyjdou pozitivní, jedná se o patogena *Salmonella enteritidis*.

4.5 Postanalytická část

V této fázi vyhodnotí mikrobiologický lékař výsledky vzorků a elektronickou cestou je zašle dětskému lékaři, který v případě pozitivního výsledku zahájí příslušnou léčbu.

5. Výsledky

5.1 Výsledky identifikace virů u dětí

5.1.1 Výsledky identifikace rotavirů a adenovirů

Manuálním vyšetřením jsem pro identifikaci virových patogenů z dětské stolice pomocí VIKIA® Rota – Adeno testu prokázala přítomnost rotavirů, ale také přítomnost adenovirů. Z 50-ti virologicky vyšetřených vzorků dětských pacientů jsem prokázala 9 vzorků pozitivních na rotaviry a pouze 2 vzorky pozitivní na adenoviry.

5.1.2 Identifikace kalicivirů a astrovirů

Průkaz těchto dvou virů v dětské stolici jsem neprokázala v laboratoři Laboma s.r.o. nyní Synlab s.r.o., protože se kaliciviry a astroviry po dobu mého zpracování vzorků nevyskytly.

5.2 Výsledky identifikace bakterií

Identifikace střevních patogenů bakteriálního původu jsem stanovila pomocí kultivace na selektivně diagnostických půdách. Zejména na půdách MacConkey medium, Deoxycholátový agar, selenit a na *Campylobacter* pomocí speciální půdy Karmali agar. Po kultivaci jsem následně udělala izolace na Švejcarově půdě, poté jsem provedla serotypizace.

5.2.1 *Escherichia coli*

Po kultivaci jsem kolonie *Escherichia coli* nanasla na Švejcarovu plotnu pro získání čisté kultury. Na izolační půdě byly pozitivní glukóza, laktóza, sacharóza, manitol, plyn a negativní byl sirovodík. Po izolaci jsem provedla serotypizace

Escherichia coli. Serotypizace po dobu mého vlastního zpracování vyšla vždy negativní, tudíž jsem z výsledků odvodila, že *Escherichia coli* se neprokázala jako enteropatogenní a byla pokaždé běžnou střevní mikroflórou u dětí.

Enteropatogenní *Escherichia coli* vyvolává průjmy novorozenců a kojenců. Nejběžnějšími serotypy jsou O:26, O:55, O:111, O:126. Náchylné k těmto infekcím jsou nedonošené děti a novorozenci s vývojovými vadami. Přenos na novorozeně bývá obvykle kontaminovanými dudlíky, savičky, rukama personálu a jinými předměty. (Votava, Ondrovčík 2000)

Z 50-ti zpracovaných vzorků jsem prokázala 48 vzorků pozitivních a 2 vzorky negativní na *Escherichia coli*. Serotypizace vždy vyšla negativní, a proto se jednalo o běžnou střevní flóru. U dvou vzorků jsem neprokázala přítomnost *Escherichia coli*. Z toho jsem usoudila, že byl výtěr u dvou případů špatně odebrán.

5.2.2 *Campylobacter jejuni*

Po 48 hodinové kultivaci při teplotě 42 °C na Karmali agaru, kdy lékař odečetl výsledek, jsem zhotovila preparát, který jsem barvila barvením dle Grama (obr.-24). Po obarvení a přečtení preparátu lékařem pod mikroskopem jsem měla též možnost si preparát prohlédnout. Zjistila jsem, že z 50-ti vzorků pro bakteriologické vyšetření byl pouze jeden vzorek pozitivní na *Campylobacter jejuni*. *C. jejuni* způsobuje střevní onemocnění u dětí.

5.2.3 *Salmonella enteritidis*

Zpracovala jsem ji stejným způsobem jako *Escherichia coli*. Po kultivaci jsem provedla izolaci salmonely, poté serotypizaci pomocí sklíčkové aglutinace. Na izolační půdě byly glukóza, manitol a sirovodík pozitivní a sacharóza s laktózou negativní (obr.-20). Vyhodnotila jsem, že z 50-ti vzorků byly jen 4 vzorky pozitivní. Jednalo se o patogena.

5.2.4 *Shigella a Yersiniae*

Přítomnost dvou střevních patogenů *Shigella* a *Yersiniae* jsem v mikrobiologické laboratoři Laboma nyní Synlab s.r.o. neprokázala, jelikož po dobu mého zpracování vzorků se tyto patogeny u dětí nevyskytly.

5.2.5 *Pseudomonas aeruginosa*

Z kultivace 50 vzorků pro bakteriologickou identifikaci jsem zjistila 4 vzorky pozitivní na *Pseudomonas aeruginosa* (obr.-21). Tato bakterie nezpůsobuje u dětí průjemové onemocnění.

Pseudomonas aeruginosa z 10 – 11% vyvolává nozokomiální nákazy. Bakterie je rezistentní k řadě dezinfekčních přípravků (Septonex) a i řadě antimikrobiálních látek. (Votava, Ondrovčík 2000)

5.2.6 *Klebsiella pneumoniae*

Z kultivace vyplynulo, že byl jeden vzorek pozitivní na *Klebsiella pneumoniae* (obr.-23). Jedná se o bakterii, která nevyvolává průjemové onemocnění u dětí.

Klebsiella pneumoniae je závažným původcem nemocničních infekcí. Infekce se šíří pomocí ventilátorů, inhalátorů, anesteziologických přístrojů atd. (Votava, Ondrovčík 2000)

5.2.7 *Enterobacter cloacae*

Po kultivaci jsem prokázala pouze jeden pozitivní vzorek. *Enterobacter* je běžnou střevní flórou, tudíž se nejedná o patogena.

5.2.8 *Proteus*

Identifikovala jsem jeden vzorek, který byl pozitivní na *Proteus* (obr.-22).

Patří do infekcí nozokomiálních nákaz. U malých dětí a u kojenců bývá častou příčinou střevního onemocnění. (Votava, Ondrovčík 2000)

5.3 Tabulky a grafy – statistické vyhodnocení

5.3.1 Tabulky – zjištěné bakterie z odebraných vzorků

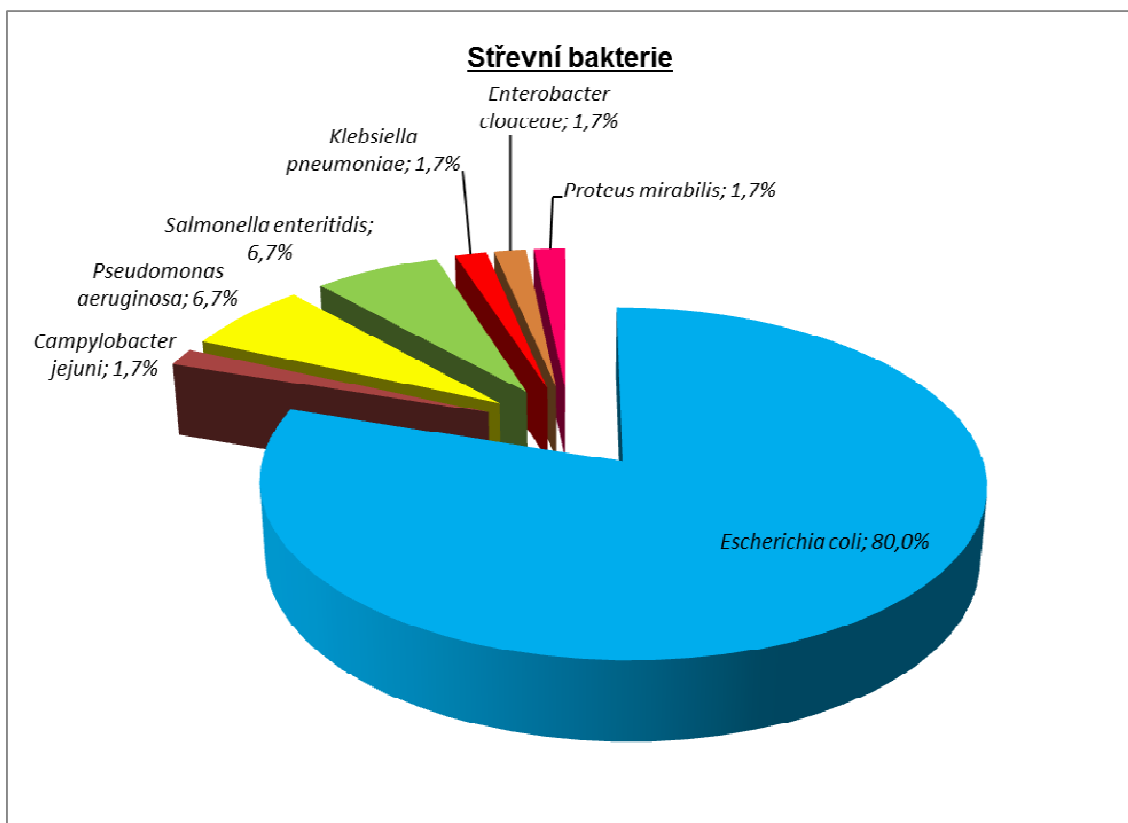
Číslo vzorku	<i>Escherichia coli</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Salmonella enteritidis</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
1	+	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
2	+	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
3	+	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
4	+	neg.	+	neg.	neg.	neg.	neg.
5	+	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
6	+	neg.	+	neg.	neg.	neg.	neg.
7	+	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
8	+	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
9	+	neg.	+	neg.	neg.	neg.	neg.
10	+	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
11	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
12	+	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
13	+	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
14	+	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
15	+	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
16	+	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
17	+	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
18	+	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
19	+	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
20	+	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
21	+	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
22	+	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
23	neg.	neg.	neg.	+	neg.	neg.	neg.
24	+	neg.	neg.	neg.	+	neg.	neg.
25	+	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
26	+	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
27	+	+	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
28	+	neg.	neg.	+	neg.	neg.	neg.
29	+	neg.	neg.	neg.	neg.	+	neg.
30	+	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
31	+	neg.	+	neg.	neg.	neg.	neg.
32	+	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
33	+	neg.	neg.	+	neg.	neg.	neg.
34	+	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
35	+	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
36	+	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
37	+	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
38	+	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
39	+	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
40	+	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
41	+	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
42	+	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
43	+	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
44	+	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
45	+	neg.	neg.	+	neg.	neg.	neg.
46	+	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	+
47	+	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
48	+	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
49	+	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
50	+	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.

Střevní bakterie	počet bakterií	% vzorků (z 50)	% ze všech záchytů
<i>Escherichia coli</i>	48	96%	80,0%
<i>Campylobacter jejuni</i>	1	2%	1,7%
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4	8%	6,7%
<i>Salmonella enteritidis</i>	4	8%	6,7%
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	2%	1,7%
<i>Enterobacter cloacae</i>	1	2%	1,7%
<i>Proteus mirabilis</i>	1	2%	1,7%
Součet	60		100%

Zpracovala jsem 50 vzorků na bakteriologické vyšetření, kde jsem prokázala 48 vzorků pozitivních na *Escherichia coli*, 1 vzorek pozitivní na *Campylobacter jejuni*, 4 pozitivní vzorky na *Pseudomonas aeruginosa* a *Salmonella enteritidis*, 1 pozitivní vzorek na *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* a *Proteus mirabilis*.

Rutině jsem vyšetřila 50 vzorků z dětského recta, kde jsem celkem prokázala 60 pozitivních bakterií, které jsou tedy 100% ze všech záchytů, tudíž je 80% pozitivních na *Escherichia coli*; 1,7% pozitivních na *Campylobacter jejuni*; 6,7% pozitivních na *Pseudomonas aeruginosa* a *Salmonella enteritidis*; 1,7% pozitivních na *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* a také *Proteus mirabilis*. (znázorněno v tabulce Střevní bakterie)

5.3.2 Graf - zjištěné bakterie z odebraných vzorků



Zdroj: vlastní graf

Graf s výskytem střevních bakterií u dětských pacientů do 6 let z období října, listopadu a prosince roku 2010, ledna a února roku 2011 ukázal, že se nejvíce vyskytovala *Escherichia coli* 80%, která nebyla enteropatogenní, a tudíž byla pouze běžnou střevní flórou. Druhou nejčastěji vyskytující se bakterií je *Salmonella enteritidis* 6,7%. Je patogenem a způsobuje střevní onemocnění. Dále *Pseudomonas aeruginosa* 6,7%. Ta způsobuje nozokomiální nákazy a není tak vyvolavatelem střevního onemocnění. *Klebsiella pneumoniae* 1,7% také způsobuje nozokomiální nákazy. *Enterobacter cloacae* 1,7% je běžnou střevní flórou ve střevě. *Proteus mirabilis* 1,7% způsobuje u kojenců a dětí střevní onemocnění. Poslední bakterií je *Campylobacter jejuni* 1,7%, který je patogenem a způsobuje onemocnění.

5.3.3 Tabulky – zjištěné viry z odebraných vzorků

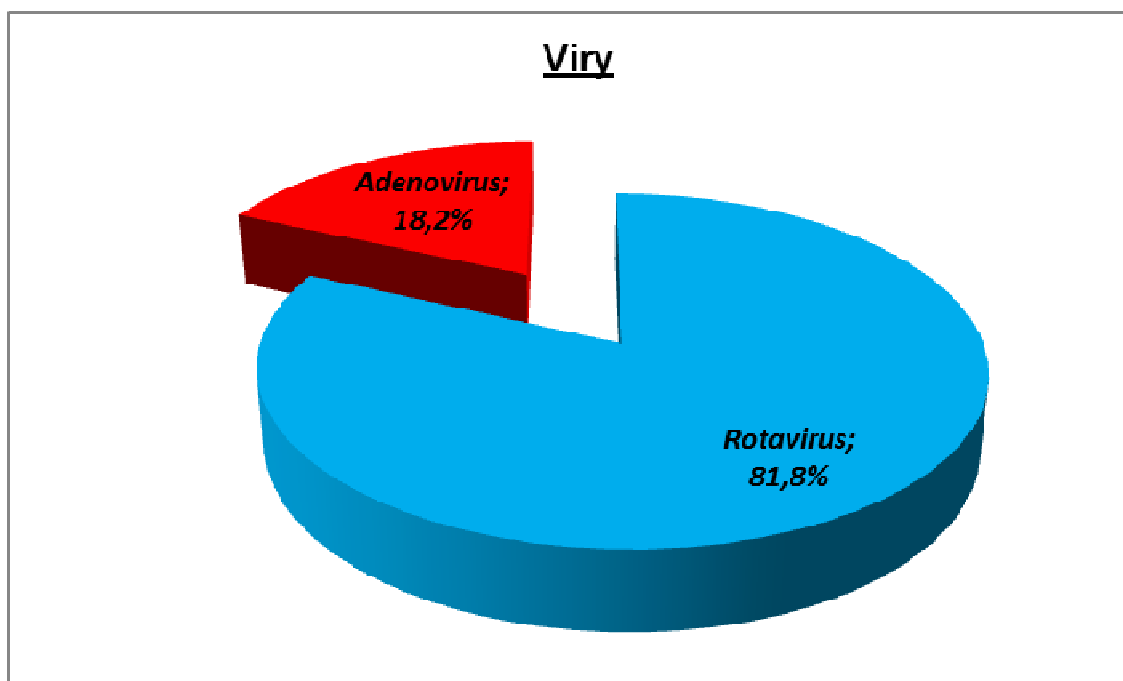
Číslo vzorku	Rotavirus	Adenovirus
1	+	neg.
2	neg.	+
3	neg.	neg.
4	neg.	neg.
5	neg.	neg.
6	neg.	neg.
7	neg.	neg.
8	neg.	neg.
9	+	neg.
10	neg.	neg.
11	neg.	neg.
12	neg.	neg.
13	neg.	neg.
14	neg.	neg.
15	neg.	neg.
16	+	neg.
17	neg.	neg.
18	neg.	neg.
19	neg.	neg.
20	neg.	neg.
21	neg.	neg.
22	neg.	neg.
23	+	neg.
24	neg.	neg.
25	neg.	neg.
26	neg.	neg.
27	neg.	neg.
28	neg.	neg.
29	neg.	neg.
30	neg.	neg.
31	neg.	neg.
32	neg.	neg.
33	+	neg.
34	neg.	neg.
35	+	neg.
36	neg.	neg.
37	+	neg.
38	+	neg.
39	neg.	neg.
40	neg.	neg.
41	neg.	neg.
42	neg.	neg.
43	neg.	neg.
44	neg.	neg.
45	neg.	neg.
46	neg.	neg.
47	neg.	neg.
48	neg.	neg.
49	neg.	+
50	+	neg.

Viry	počet vzorků	% vzorků (z 50)	% ze všech záchytů
Rotavirus	9	18%	81,8%
Adenovirus	2	4%	18,2%
Součet	11		100%

Z 50-ti vzorků dětské stolice, které jsem vyšetřila, je celkem 9 vzorků pozitivních na rotaviry a pouze 2 vzorky pozitivní na adenoviry.

Z 50-ti vyšetřených vzorků mohu konstatovat, že je celkem 11 vzorků pozitivních na viry. 11 vzorků je tedy 100% ze všech záchytů, tudíž je 81,8% pozitivních na rotaviry a 18,2% pozitivních na adenoviry. (znázorněno v tabulce Viry)

5.3.4 Graf - zjištěné viry z odebraných vzorků



Zdroj: vlastní graf

Graf s výskytem střevních virů u dětských pacientů do 6 let z období října, listopadu, prosince roku 2010, ledna a února roku 2011 vypovídá, že se v dětské stolici vyskytovaly více rotaviry a to z 81,8%. Adenoviry jsou zastoupené pouze 18,2%. Tyto viry způsobují u dětí gastroenteritidy.

6. Diskuze

Původci akutních průjmů u dětí jsou bakterie, a to zejména enteropatogenní *Escherichia coli*, *Salmonella*, ale také viry především *Rotavirus* a *Adenovirus*. U kojenců rozlišujeme průjmy bez dalších příznaků nebo průjmy doprovázeny zvracením a teplotou. Může dojít až k dehydrataci dítěte. Terapie tohoto onemocnění se řeší dietou. U kojenců se podávají rýžové a mrkvové odvary. U větších dětí se podávají ovocná pyré, nesladké minerální vody, ale také vývar z masa. Ve výjimečných případech se diagnostikují antibiotika nebo chemoterapeutika. V dětském věku se můžeme setkat i s průjmy chronického typu. Příčinou chronických průjmů může být porucha absorpce živin, alergická reakce (alergie na bílkovinu kravského mléka, nesnášenlivost mouky). Alergie se u dětí projeví v druhé polovině roku tím, že dítě začíná trpět opakovanými průjmy. Terapie chronického průjmu se léčí dietou. (Velemínský 1999)

Při odběru vzorku je velmi důležité, aby dětský lékař nebo zdravotní sestra dbal/a na preanalytickou fázi, zejména na vlastní odběr biologického materiálu, protože nesprávným odběrem vzorku může dojít ke zkreslenému výsledku. Dále je důležité správné popsání vzorku, uchování vzorku a jeho transport do laboratoře.

Mohu konstatovat, že statistické vyhodnocení bakterií z období října, listopadu, prosince roku 2010, ledna a února roku 2011 v mikrobiologické laboratoři Laboma (Synlab) s.r.o. v Českých Budějovicích, znázorňuje největší výskyt *Salmonella enteritidis*, která způsobuje střevní onemocnění a je patogenem. Dalším patogenem je *Campylobacter jejuni* vyvolávající střevní onemocnění. *Proteus mirabilis* je příčinou průjmu především u kojenců a malých dětí. V mém případě se vždy prokázala *Escherichia coli* za běžnou střevní flóru. Neprokázala se za enteropatogenní.

Z celkového počtu rutinně vyšetřovaných 50-ti vzorků výtěrů z dětského recta jsem u dvou vzorků neprokázala přítomnost bakterie *Escherichia coli*, a proto se domnívám, že v těchto případech byly vzorky špatně odebrány.

Ke stanovení virů slouží především elektronový mikroskop, který detekuje viry ve vzorku. Tento mikroskop není k dispozici v každé laboratoři. Je také nedostupný

v laboratoři Laboma (Synlab) s.r.o., a proto zde na rychlé stanovení virů ze stolice používají spolehlivý, citlivý a nenáročný VIKIA ® Rota – Adeno test.

Statistické vyhodnocení u virů znázorňuje, že děti byly infikovány častěji na rotaviry a méně na adenoviry. Z 50-ti vyšetřených vzorků z dětských stolic jsem prokázala 9 vzorků pozitivních na rotaviry a pouze 2 vzorky pozitivní na adenoviry.

Z mého statistického vyhodnocení vyplývá, že u dětí je častější výskyt střevního onemocnění virového původu než původu bakteriálního. Děti byly více infikované viry, zejména rotaviry, které způsobují gastroenteritidy. Rotaviry a adenoviry jsou sezónního původu a vyskytují se na podzim a v zimě.

V grafu 5.3.2 a 5.3.4 jsem přehledně znázornila procentuální zastoupení jednotlivých rodů bakterií a také virů.

7. Závěr

V současné době patří ke standardnímu vyšetření detekce původců střevního infekčního onemocnění u kojenců a malých dětí. Původci tohoto onemocnění způsobují těžké gastroenteritidy doprovázené zvracením, horečkou, nevolností, ale také nechutenstvím.

Cílem mé bakalářské práce bylo manuálně vyšetřit 50 dětských vzorků výtěrů z recta, 50 dětských vzorků stolic a detekovat z nich přítomnost virů nebo bakterií způsobujících infekční průjemové onemocnění. Závěrem mohu konstatovat, že zpracováním 50-ti vyšetřovaných vzorků mikrobiologicky a 50-ti vyšetřovaných vzorků virologicky jsem se naučila postup vyšetření tohoto biologického materiálu.

V preanalytické fázi po odběru vzorku je nutné dbát na správné uchování vzorku a jeho transport do mikrobiologické laboratoře, aby nedošlo k falešně pozitivním nebo naopak falešně negativním výsledkům.

Z bakteriálního původu byl nejvíce detekován Rod *Escherichia coli* 80%. Neprokázala se za enteropatogenní, tudíž byla pouze běžnou střevní flórou v dětském střevě. V biologickém materiálu byly detekovány patogeny Rodu *Proteus mirabilis* 1,7%, *Salmonella enteritidis* 6,7% a *Campylobacter jejuni* 1,7%. Ve vzorcích byly také prokázány bakterie, které jsou součástí běžné střevní flóry u dětí, a to zejména *Enterobacter cloacae* 1,7%, *Klebsiella pneumoniae* 1,7% a *Pseudomonas aeruginosa* 6,7%.

Z virového původu byly diagnostikovány rotaviry 81,8% a adenoviry 18,2%. Rod *Rotavirus* byl detekován častěji než Rod *Adenovirus*.

Je velmi důležité dbát na dodržování osobní hygieny rukou dětí i dospělých jedinců, jídla a saviček pro kojence, aby se tomuto onemocnění včas dalo zabránit.

Po zpracování jednotlivých vzorků dětských pacientů bylo prokázáno, že akutní infekční střevní onemocnění u dětí je převážně virového původu.

8. Seznam použitých zdrojů

- 1) Bednář, M., Fraňková, V., Schindler, J., Souček, A., Vávra, J. *Lékařská mikrobiologie, bakteriologie, virologie, parazitologie*. 1. vyd. Praha: Marvil, 1996, 17-20, 261-262, 264-265, 267-273, 284-285, 416-419, 438-439, 440-441. ISBN 80-238-0297-6
- 2) Bodhidatta, L., et al. *Rotavirus disease in young children from Hanoi, Vietman*. PEDIATRIC INFECTIOUS DISEASE JOURNAL: 2007, volume 26, issue 4, p 325-328. ISSN 0891-3668
- 3) Finkbeiner, SR., et al. *Metagenomic analysis of human diarrhea: Viral detection and discovery*. PLOS PATHOGENS: 2008, volume 4, issue 2. ISSN 1553-7366
- 4) Gomez-Duarte, OG., et al. *Detection of Escherichia coli Enteropathogens by Multiplex Polymerase Chain Reaction from Childrens Diarrheal stools in Two Caribbean-Colombian Cities*. FOODBORNE PATHOGENS AND DISEASE: 2010, volume 7, issue 2, p 199-206. ISSN 1535-3141
- 5) Göpfertová, D., Janovská, D., Dohnal, K., Melicherčíková, V., *Mikrobiologie, imunologie, epidemiologie a hygiena*. 3. vyd. Praha: Triton, 2002, 24. ISBN 80-7254-223-0
- 6) Gregora, M. *Očkování a infekční nemoci dětí*. 1. vyd. Praha: Grada, 2005, 75. ISBN 80-247-1126-5
- 7) Gutierrez-Escolano, AL., et al. *Human Caliciviruses detected in Mexican Children Admitted to Hospital During 1998-2000, With Severe Acute Gastroenteritis Not Due to Other Enteropathogens*. JOURNAL OF MEDICAL VIROLOGY: 2010, volume 82, issue 4, p 632-637. ISSN 0146-6615

- 8) Kaprálek, F. *Mikrobiologické praktikum*. 1.vyd. Univerzita Karlova: Karolinum, 1999, 21. ISBN 80-7184-927-8
- 9) Klaban, V., *Svět mikrobů, Malý mikrobiologický slovník*. 1. vyd. Hradec Králové: GAUDEAMUS, 1999, 133. ISBN 80-7041-639-4
- 10) Kramář, R. *Lékařská mikrobiologie*. 1. vyd. České Budějovice: Jihočeská univerzita, 2007, 34-37. ISBN 978-80-7394-021-8
- 11) Liu, CY., et al. *Identification of viral agents associated with diarrhea in young children during a winter season in Beijing, China*. JOURNAL OF CLINICAL VIROLOGY: 2006, volume 35, issue 1, p 69-72. ISSN 1386-6532
- 12) Marshall, J., et al. *Rotavirus detection and characterisation in outbreaks of gastroenteritis in aged-care facilities*. JOURNAL OF CLINICAL VIROLOGY: 2003, volume 28, issue 3, p 331-340. ISSN 1386-6532
- 13) Mieta, SIK., et al. *Optimisation of methods for the collection and detection of bacterial pathogens from diarrhoeal human faecal samples using a novel stool collection kit*. WATER SA: 2010, volume 36, issue 2, p 159-166. ISSN 0378-4738
- 14) Nakanishi, K., et al. *Detection of enteric viruses in rectal swabs from children with acute gastroenteritis attending the pediatric outpatient clinics in Sapporo, Japan*. JOURNAL OF CLINICAL VIROLOGY: 2009, volume 46, issue 1, p 94-97. ISSN 1386-6532

- 15) Nweze, EI. *Aetiology of Diarrhoea and Virulence Properties of Diarrhoeagenic Escherichia coli among Patients and Healthy Subjects in Southeast Nigeria*. JOURNAL OF HEALTH POPULATION AND NUTRITION: 2010, volume 28, issue 3, p 245-252. ISSN 1606-0997
- 16) Oldak, E., et al. *NOROVIRUS and ROTAVIRUS-two major causative agents of sporadic viral gastroenteritis in hospitalized Polish children*. ADVANCES IN MEDICAL SCIENCE: 2009, volume 54, issue 2, p 183-186. ISSN 1896-1126
- 17) O’Ryan, ML., et al. *Prospective Characterization of Norovirus Compared With Rotavirus Acute Diarrhea Episodes in Chilean Children*. PEDIATRIC INFECTIOUS DISEASE JOURNAL: 2010, volume 29, issue 9, p 855-859. ISSN 0891-3668
- 18) Podstatová, H., *Mikrobiologie – Epidemiologie – Hygiena*. 1. vyd. Olomouc: EPAVA, 2001, 27. ISBN 80-86297-07-1
- 19) Přecechtěl, F. a kolektiv. *Lékařská mikrobiologie*. 1. vyd. Masarykova univerzita v Brně, 1988, 125. ISBN 80-210-0143-7
- 20) Příbalový leták ze setu VIKIA® Rota – Adeno testu dodávaný do Labomy (Synlab) s.r.o. firmou bioMérieux
- 21) Ryšková, O. *Základy lékařské mikrobiologie a imunologie*. 1. vyd. Univerzita Karlova: Karolinum, 2007, 7-8, 103. ISBN 978-80-246-0135-9
- 22) Stříteský, J. *Patologie*. 1. vyd. Olomouc: EPAVA, 2001, 233. ISBN 80-86297-06-3

- 23) Tran, A., et al. *Prevalence of Rotavirus, Adenovirus, Norovirus, and Astrovirus Infections and Coinfections among Hospitalized Children in Northern France*. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY: 2010, volume 48, issue 5, p 1943-1946. ISSN 0095-1137
- 24) Velemínský, M. a kol. *Vybrané kapitoly z pediatrie*. 2.vyd. České Budějovice: Jihočeská univerzita Zdravotně sociální fakulta, 1999, 89-90. ISBN 80-7040-357-8
- 25) Vokurka, M. *Praktický slovník medicíny*. Praha: MAXDORF, 1994, 298. ISBN 80-85800-06-3
- 26) Vokurka, M., Hugo, J. a kolektiv. *Velký lékařský slovník*. 9. vyd. Praha: MAXDORF, 2009, 537. ISBN 978-80-7345-202-5
- 27) Votava, M., *Lékařská mikrobiologie obecná*. 2. vyd. Brno: Neptun, 2005, 69. ISBN 80-86850-00-5
- 28) Votava, M. a kol. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun, 2003, 53-54, 63. ISBN 80-902896-6-5
- 29) Votava, M. a kolektiv. *Lékařská mikrobiologie II*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2000, 49-53, 117-118, 141, 227. ISBN 80-210-2272-8
- 30) Votava, M., Ondrovčík, P. *Vybrané kapitoly z klinické mikrobiologie*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2000, 84-86. ISBN 80-210-1805-4

9. Klíčová slova

Děti

Enterobakterie

Identifikace patogenu

Kultivační půdy

Průjmové onemocnění

Serotypizace

Střevní patogeny

Virové patogeny

10. Přílohy

10.1 Fotografie

Rodné číslo: _____ / _____		<small>LABOMA</small> FUTURELAB <small>precision all the way</small>		CÍSLO ŽADANKY <small>(vyplní laborator)</small>
Příjmení: _____		LABOMA s. r. o. Mikrobiologická laboratoř U tří lvů 4, 370 01 České Budějovice Tel./fax: 386 355 034, zelená linka: 800 100 714 www.laboma.cz PRACOVNÍ DOBA ODBĚROVÝCH MÍSTNOSTÍ: Zeleznická poliklinika Po - Pá 6.00 - 9.30 <small>/3. patro/</small> Sídliště Máj, M. Chlajna 1 Po - Pá 7.00 - 8.30 <small>/přízemí MUDr. Dvořák/</small> Poliklinika U tří lvů 4 Po - Pá 7.00 - 10.00 <small>/3. patro/</small>		
Jméno: _____				
Diagnóza: _____	Pojišťovna: _____			
Datum: _____	Čas: _____			
Razítko a podpis lékaře: _____				
JE PACIENT LÉČEN ATB? ANO / NE NÁZEV: _____				
BAKTERIOLOGIE		PARAZITOLOGIE		
<i>Odebraný materiál:</i>		<i>Odebraný materiál:</i>		
krk	moč	stolice		
nos	pochva /nitroděložní tělísko	rectum		
ucho	uretra	pochva		
oko	hnis	<i>Požadovaná vyšetření:</i>		
sputum	rána	stolice základní		
rectum (základní)	punktát	stolice nadstavbová		
rectum (základní vyšetření + Campylobacter jejuni)		otisk na roupy		
stolice na Heliobacter pylori - antigen		kultivační vyšetření na trichomonády		
<i>Požadovaná vyšetření:</i>		MOP (mikrobiální obraz poševní)		
<i>základní</i>		<i>speciální</i>		
mikroskopie		vyšetření na svrab		
kultivace aerobní		<i>Jiná vyšetření:</i>		
kultivace anaerobní		SEROLOGIE		
citlivost na ATB		anti Toxoplazma		
ATB kvantitativně (MIC)		Tularémie/ Listerie		
		anti Borrelia		
		anti HSV		
		anti CMV		
		IM test /Paul-Bunnell/		
<i>Jiná vyšetření:</i>		anti EBV (EBNAIgG, VCAIgG, VCAIgM)		
MYKOLOGIE		Klíšková encefalitida (KE)		
<i>Odebraný materiál:</i>		anti - KE (kontrola očkování) IgG		
kůže	vousy	anti HAV (hepatitida typu A)		
vlasys	nehty	HBsAg/anti HBsAg		
<i>Požadovaná vyšetření:</i>		HBeAg/anti HBeAg		
mikroskopie		anti HBe total		
kultivace na kvasinky		anti HBeIgM		
citlivost na antimykotika kvalitativně		anti HCV		
<i>Jiná vyšetření:</i>		HIV 1,2		
VIROLOGIE		TPHA (vyšetření na lues)/RRR		
stolice na rotaviry		Bordetella pertussis a parapertussis (párová séra)		
stolice na adenoviry		anti Helicobacter pylori IgG		
<i>Jiná vyšetření:</i>		Chlamydia pneumoniae - IgA, IgG		
		anti HHV6		
		anti Mycoplasma pneumoniae IgM, IgG		

Obr. 1 Žádanka mikrobiologické laboratoře Laboma (Synlab) s.r.o. v Č. Budějovicích

Zdroj: vlastní foto



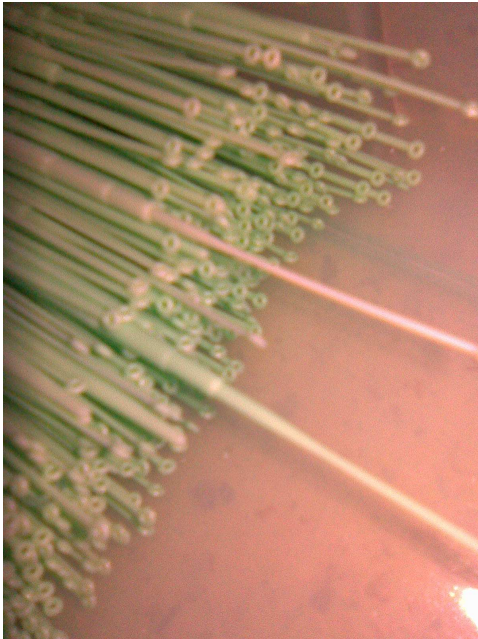
Obr. 2 Biologický materiál v transportním boxu

Zdroj: vlastní foto



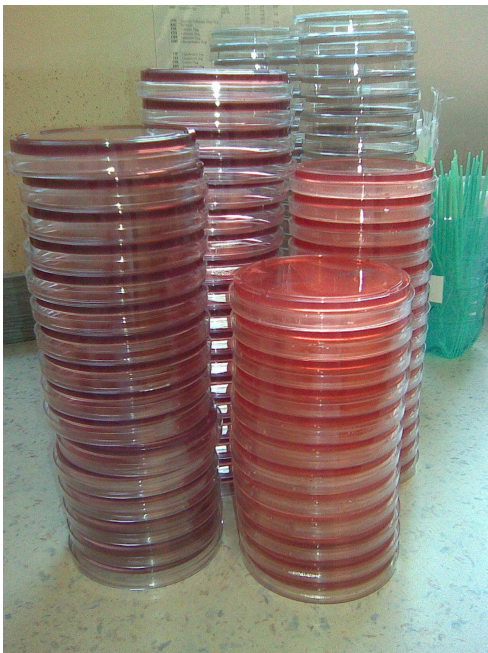
Obr. 3 Biologický materiál se žádankou

Zdroj: vlastní foto



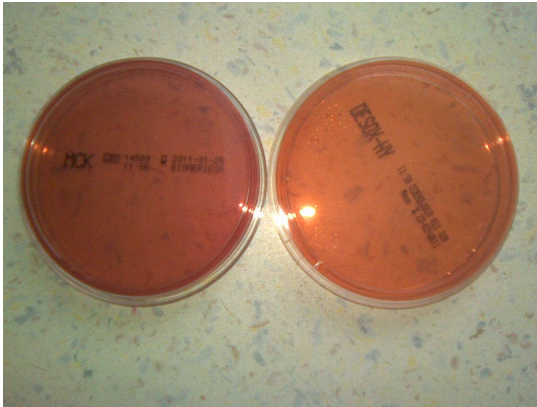
Obr. 4 Jednorázové umělohmotné bakteriologické kličky

Zdroj: vlastní foto



Obr. 5 Kultivační půdy pro zpracování bakteriologického materiálu

Zdroj: vlastní foto



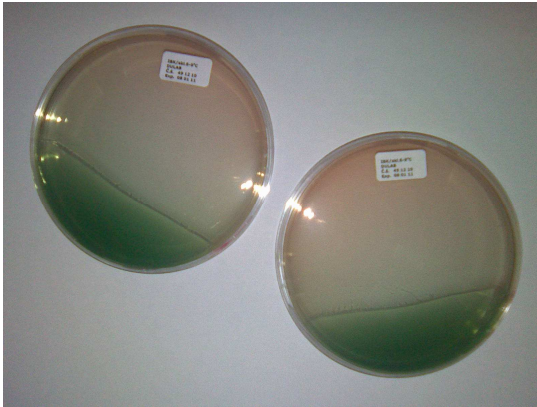
Obr. 6 Kultivační půdy: vlevo MacConkeyho medium, vpravo Deoxycholátový agar

Zdroj: vlastní foto



Obr. 7 Selenit – v levé zkumavce se prokázala *Salmonella* a v pravé se neprokázala *Salmonella*

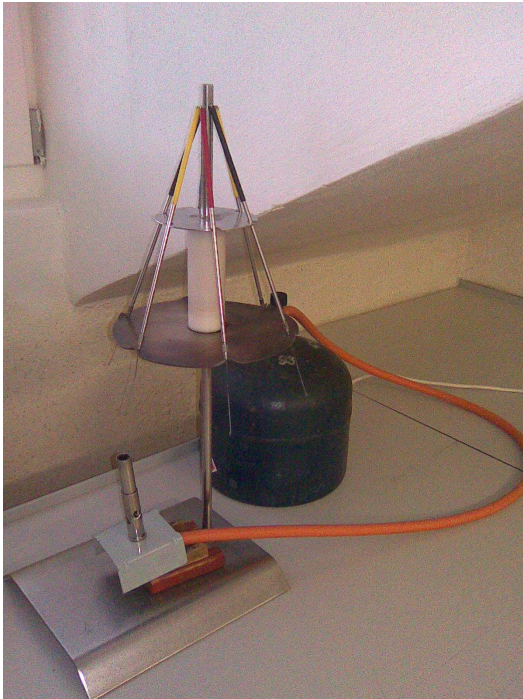
Zdroj: vlastní foto



Obr. 8 Švejcárova pŕda „izolačka”
Zdroj: vlastní foto



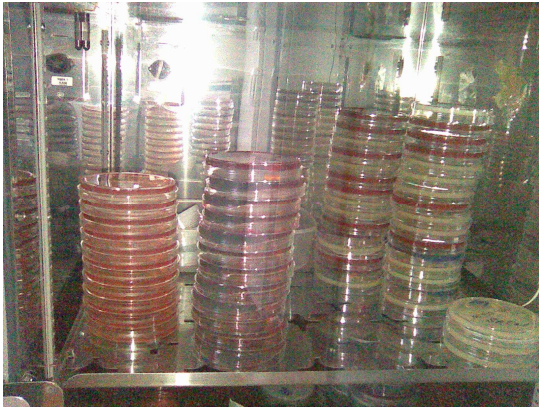
Obr. 9 Sterilní sklíčka a sacharóza s manitolem
Zdroj: vlastní foto



Obr. 10 Kolotoč neboli bakteriologické kličky a kahan
Zdroj: vlastní foto



Obr. 11 Termostaty na kultivační půdy
Zdroj: vlastní foto



Obr. 12 Kultivační půdy v termostatu při teplotě 37°C
Zdroj: vlastní foto



Obr. 13 Nádoba k uchování Karmali agaru ve zvláštní atmosféře v anaerostatu s vyvíječem – Campygen. Pro kultivaci *C. jejuni*.
Zdroj: vlastní foto



Obr. 14 Karmali agar v nádobě
Zdroj: vlastní foto



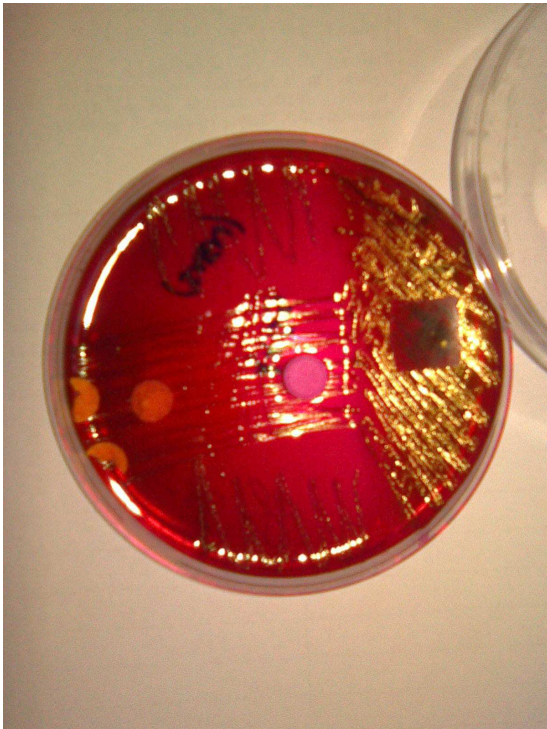
Obr. 15 Séra na *Salmonella enteritidis*. Lahvička s modrým uzávěrem je sérum Monovalent O:9. Lahvička s červeným uzávěrem je sérum Monovalent H:g,m
Zdroj: vlastní foto



Obr. 16 Séra na biochemické dourčení bakterií
Zdroj: vlastní foto



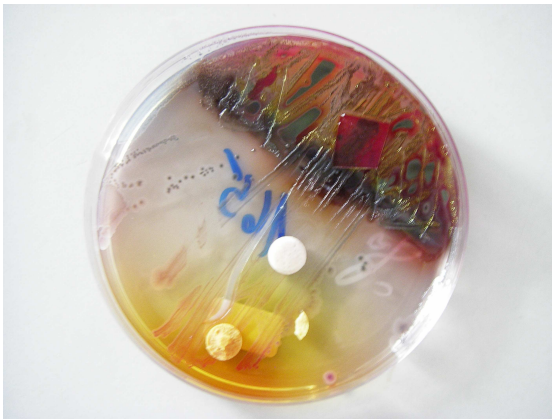
Obr. 17 Jednotlivá séra k serotypizaci *E. coli*. Monovalent O:26, O:55, O:86, O:111, O:119, O:124, O:125, O:126, O:127 a O:128
Zdroj: vlastní foto



Obr. 18 Rod *Escherichia coli*
Zdroj: vlastní foto



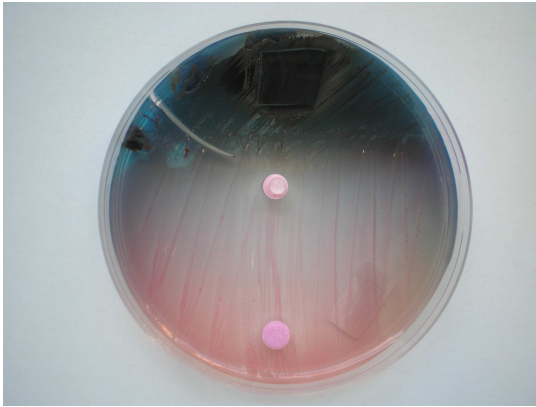
Obr. 19 *Escherichia coli* na MCK agaru
Zdroj: vlastní foto



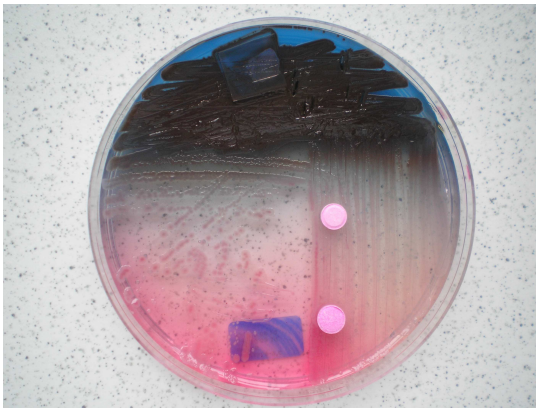
Obr. 20 *Salmonella enteritidis* na Švejcárově plotně
Zdroj: vlastní foto



Obr. 21 *Pseudomonas aeruginosa* na Švejcárově plotně
Zdroj: vlastní foto



Obr. 22 *Proteus* na Švejcarově plotně
Zdroj: vlastní foto



Obr. 23 *Klebsiella pneumoniae* na Švejcarově plotně
Zdroj: vlastní foto



Obr. 24 *Campylobacter jejuni* – mikroskopický preparát
Zdroj: <http://www.archive.microbelibrary.org>



Obr. 25 Zkumavka na vzorek stolice
Zdroj: vlastní foto



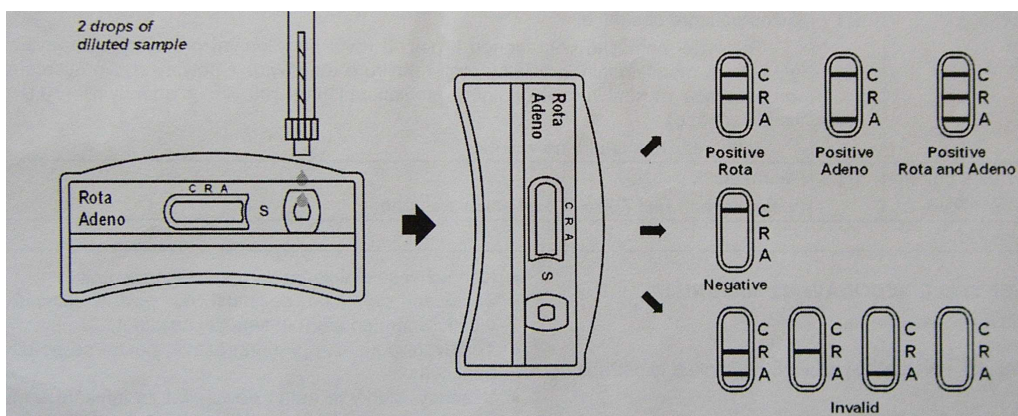
Obr. 26 Set VIKIA® Rota – Adeno testu
Zdroj: vlastní foto



Obr. 27 Vyjmutý test z obalu VIKIA® Rota – Adeno testu
Zdroj: vlastní foto



Obr. 28 Fosfátové pufrý značené R2 o pH 7,2 + 0,9 g/l azidu sodného. Jsou součástí VIKIA® Rota – Adeno testu
Zdroj: vlastní foto



Obr. 29 Znárodněné výsledky testu VIKIA ® Rota – Adeno testu

Zdroj: Příbalový leták ze setu VIKIA ® Rota – Adeno testu dodávaný do Labomy firmou bioMérieux

