



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Studies

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

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Zdravotně sociální fakulta

Katedra laboratorních metod a informačních systémů

Bakalářská práce

***Záchyt *Streptococcus agalactiae* u těhotných žen a
novorozenců***

Vypracovala: Eliška Hálová

Vedoucí bakalářské práce: MUDr. Petra Dovinová

České Budějovice 2015

Abstrakt

S. agalactiae je běžným komenzálem v nosohltanu, pochvě a trávicím traktu. Právě trávicí trakt je považován za velmi pravděpodobný zdroj vaginální kolonizace. Osídlení touto bakterií je v mnoha případech asymptomatické. *S. agalactiae* způsobuje řadu infekčních onemocnění u novorozenců a je vedoucí příčinou neonatální morbidity a mortality. Přenos probíhá vertikálně z kolonizované matky na plod. Potenciálním zdrojem GBS infekcí může být také mateřské mléko. Tento druh přenosu je však velmi ojedinělý. *S. agalactiae* vyvolává infekce nejen u novorozenců, ale také u dospělých, především u osob starších a osob s probíhajícím jiným onemocněním.

V teoretické části jsem se zaměřila na dosavadní poznatky o *S. agalactiae*, na novorozenecké GBS infekce a možnosti jejich prevence. Dále jsem zhodnotila současné možnosti identifikace a diagnostiky *S. agalactiae*, včetně stanovení citlivosti k antibiotikům. Nastínila jsem současnou situaci zvyšující se rezistence *S. agalactiae* k makrolidům a linkosamidům a popsala situaci v několika různých zemích.

Praktickou část jsem prováděla na bakteriologickém oddělení Nemocnice České Budějovice, a.s., kde jsem se zabývala celým procesem identifikace a diagnostiky *S. agalactiae*. Nejprve jsem provedla kultivaci, popřípadě také přípravu preparátu pro mikroskopické hodnocení. Dále jsem identifikovala *S. agalactiae* pomocí CAMP testu, latexové aglutinace nebo metodou hmotnostní spektrometrie MALDI – TOF. U kmenů identifikovaných jako *S. agalactiae* byla provedena citlivost k antibiotikům metodou diskového difuzního testu. Veškeré práce jsem prováděla pod odborným dohledem svého vedoucího bakalářské práce a pracovníků laboratoře podle standardních operačních postupů.

Další část mé práce je věnována výsledkům. Jejich statistickým zpracováním jsem zjistila kolonizaci *S. agalactiae* v populaci těhotných žen. Zaměřila jsem se také na rozložení jednotlivých sérotypů této bakterie u novorozenců. U každého kmene izolovaného od těhotných žen i novorozenců jsem zhodnotila jeho citlivost k penicilinu, ampicilinu, erytromycinu a klindamycinu.

Praxí v laboratoři se ukázalo, že nejčastěji užívanými metodami pro identifikaci *S. agalactiae* jsou CAMP test a hmotnostní spektrometrie MALDI – TOF. Latexová aglutinace se dnes příliš často nevyužívá.

Klíčová slova: *S. agalactiae*, GBS infekce, rezistence k antibiotikům, distribuce sérotypů, kolonizace

Abstract

S. agalactiae are common commensals of the nasopharynx, vagina and gastrointestinal tract. Now digestive tract is considered a very likely source of vaginal colonization. Colonization by the bacteria is in many cases asymptomatic. *S. agalactiae* causes a variety of infections in neonates and is a leading cause of neonatal morbidity and mortality. Transmission takes place vertically from colonized mother to fetus. A potential source of GBS infections may also be mother's milk. This type of transmission is very rare. *S. agalactiae* infection induces not only in neonates but also in adults, particularly in older persons and persons with other ongoing disease.

In the theoretical part, I focused on the current knowledge about *S. agalactiae*, neonatal GBS infections and their prevention options. Then I assess current possibilities of identification and diagnostics of *S. agalactiae*, including the determination of antibiotic susceptibility. I outlined the current situation of the increasing resistance of *S. agalactiae* to macrolides and lincosamides and described the situation in several different countries.

The practical part is performed on bacteriological department Ceske Budejovice Hospital, a.s. where I dealt with the whole process of identification and diagnostics of *S. agalactiae*. Firstly I did cultivate, or also preparing specimens for microscopic evaluation. I also identified *S. agalactiae* using CAMP assay, latex agglutination method or MALDI - TOF. For strains identified as *S. agalactiae* was performed for antibiotic sensitivity by the disc diffusion test. All the work I carried out under the supervision of the head of his thesis and laboratory staff according to standard operating procedures.

Part of my work is devoted to the results. Their statistical processing, I found the colonization by *S. agalactiae* in a population of pregnant women. I also concentrated on the distribution of individual serotypes of this bacterium in newborns. For each strain isolated from pregnant women and infants I assess its sensitivity to penicillin, ampicillin, erythromycin and clindamycin.

The practice in the laboratory showed that the most frequently used methods for identification of *S. agalactiae* are CAMP test and MALDI - TOF mass spectrometry. Latex agglutination today too often used.

Key words: *S. agalactiae*, GBS infection, resistance to antibiotics, the distribution of serotypes, the colonization

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem 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 fakultou – elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne (datum)

.....

(jméno a příjmení)

Poděkování

Tímto bych chtěla velmi poděkovat vedoucí mé bakalářské práce, MUDr. Petře Dovinové, která mi předala spoustu cenných rad a věnovala mnoho času při zpracovávání mé bakalářské práce. Dále bych ráda poděkovala pracovníkům mikrobiologické laboratoře Nemocnice České Budějovice, a.s. za ochotu a vstřícnost. Další poděkování patří mé rodině, která mě při studiu nesmírně podporovala

Obsah

1	Úvod.....	11
2	Teoretická část	12
2.1	Rod <i>Streptococcus</i>	12
2.1.1	Morfologie	12
2.1.2	Klasifikace.....	12
2.2	<i>Streptococcus agalactiae</i>	14
2.2.1	Antigenní struktura.....	14
2.2.2	Virulence	15
2.2.3	Patogenita.....	15
2.2.4	Prevence	18
2.3	Biologický materiál odebíraný pro izolaci <i>S. agalactiae</i>	20
2.4	Diagnostika a identifikace <i>S. agalactiae</i>	21
2.4.1	Kultivace	21
2.4.2	Mikroskopie	22
2.4.3	Biochemické reakce	23
2.4.4	CAMP test.....	24
2.4.5	Latexová aglutinace	24
2.4.6	Hmotnostní spektrometrie (metoda matrix-assisted laser-desorption ionization time-of-flight).....	25
2.5	Stanovení citlivosti <i>S. agalactiae</i> k antibiotikům.....	27
2.5.1	Mueller-Hintonovo medium.....	27
2.6	Rezistence <i>S. agalactiae</i> k antibiotikům	28
2.6.1	Rezistence <i>S. agalactiae</i> ke skupině MLS _B	28
2.6.2	Stav rezistence <i>S. agalactiae</i> k antibiotikům v různých státech.....	31
3	Praktická část	34
3.1	Cíle práce	34
3.2	Hypotéza	34
3.3	Charakteristika sběru dat.....	34

3.4	Odběr a transport vzorků.....	34
3.5	Kultivace	35
3.5.1	Kultivace materiálu pro screening <i>S. agalactiae</i>	35
3.5.2	Kultivace materiálu z urogenitálního traktu.....	35
3.5.3	Teoretické složení jednotlivých kultivačních půd v g/l destilované vody	36
3.6	Mikroskopie	38
3.7	CAMP test.....	39
3.8	Latexová aglutinace	40
3.9	Hmotnostní spektrometrie MALDI – TOF	41
3.10	Stanovení citlivosti.....	43
4	Výsledky	44
4.1	Výskyt a rezistence <i>S. agalactiae</i> u těhotných žen v roce 2014.....	44
4.2	Míra kolonizace <i>S. agalactiae</i> v populaci těhotných žen v roce 2014.....	46
4.3	Výskyt, distribuce sérotypů a rezistence <i>S. agalactiae</i> u novorozenců v roce 2014...	46
5	Diskuse.....	49
6	Závěr	51
7	Seznam informačních zdrojů.....	53

Seznam použitých zkratek

KA	krevní agar
ASLO	anti – streptolysin O
<i>S. agalactiae</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>
GBS	<i>Group B Streptococcus</i>
CAMP test	Cristie, Atkins, Munch-Petersen test
USA	Spojené státy americké
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CNA	Colistin nalidixic acid
THCNA	Todd – Hewitt + colistin nalidixic acid
VCAT	vankomycin, colimycin, amfotericin, trimethoprim
MALDI TOF	Matrix – assisted laser – desorption ionization time of flight
MLS _B	Makrolidy, linkosamidy, streptogramin B
erm	Erytromycin ribosomal methylase
MH agar	Mueller – Hinton agar
NRL	Národní referenční laboratoř
CLI	klindamycin
ERY	erytromycin
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>

1 Úvod

Téma mé bakalářské práce jsem si zvolila, jelikož mě zajímá rozšíření *S. agalactiae* v populaci těhotných žen a novorozenců v Jihočeském kraji. Dále jsem chtěla zhodnotit možnosti diagnostiky a identifikace této bakterie v biologickém materiálu Nemocnice České Budějovice, a.s.

S. agalactiae je beta – hemolytický grampozitivní streptokok, který patří do serologické skupiny B. Tento streptokok je běžným komenzálem v trávicím traktu, nosohltanu mnoha lidí a u žen kolonizuje také pochvu. U novorozenců kolonizovaných od matek však může vyvolat velmi vážná onemocnění. Od roku 1970 je *S. agalactiae* stále vedoucí příčinou neonatální morbidity a mortality, přestože výskyt neonatálních infekcí výrazně poklesl. *S. agalactiae* může také způsobovat infekce u dospělých žen (těhotných i netěhotných) a mužů.

Terapie onemocnění vyvolaných tímto streptokokem spočívá v podávání antibiotik, nejčastěji penicilinu nebo ampicilinu, případně erytromycinu nebo klindamycinu. Preventivně lze snížit výskyt neonatálních infekcí screeningen těhotných žen na *S. agalactiae* mezi 35. a 37. týdnem těhotenství a včasným podáním antibiotik během porodu.

Cílem praktické části mé práce je izolace *S. agalactiae* z biologického materiálu těhotných žen a novorozenců a identifikace této bakterie metodou hmotnostní spektrometrie MALDI – TOF, latexovou aglutinací a CAMP testem. Všechny metody jsou velmi spolehlivé. Nejčastěji používanou metodou je CAMP test, jehož citlivost pro identifikaci *S. agalactiae* činí 98 %. Dalším cílem je u všech bakterií identifikovaných jako *S. agalactiae* zhodnotit stav jejich citlivosti k jednotlivým antibiotikům. Globálně se zvyšuje rezistence *S. agalactiae* především ke klindamycinu a erytromycinu. V této práci se zaměřím na hodnocení citlivosti *S. agalactiae* k penicilinu, ampicilinu, klindamycinu a erytromycinu. Dále se budu zabývat distribucí sérotypů *S. agalactiae* v populaci infikovaných novorozenců.

2 Teoretická část

2.1 Rod *Streptococcus*

2.1.1 Morfologie

Bakterie rodu *Streptococcus* patří do čeledi *Streptococcaceae*. Jedná se o grampozitivní koky vyskytující se v řetězcích. Jednotlivé koky mají okrouhlý až ovoidní tvar. Streptokoky netvoří spóry a nejsou pohyblivé. (7) Jsou fakultativně anaerobní, což znamená, že rostou lépe v přítomnosti kyslíku, ale mohou růst i bez jeho přítomnosti. (3)

2.1.2 Klasifikace

2.1.2.1 Klasifikace odvozená z typu hemolýzy na krevním agaru alfa-hemolytické streptokoky

Tyto streptokoky mají pod koloniemi a v jejich okolí na krevním agaru (KA) nazelenalé zbarvení. Toto zbarvení je způsobené přeměnou červeného hemoglobinu na zelený verdoglobin a někdy je označováno termínem viridace. Proto se také streptokoky této skupiny označují jako viridující. (7)

beta-hemolytické streptokoky

Streptokoky této skupiny úplně rozrušují membránu erytrocytů obsažených v KA. Jejich kolonie jsou obklopené úplnou hemolýzou, což se projevuje jako zóna úplného vyjasnění okolo kolonií. (7) Hemolýza je způsobená rozpustným hemolysinem (u streptokoků nazýván jako streptolysin), který streptokoky produkují. Produkují dva typy streptolysinů. Streptolysin O, což je úplný antigen, který vyvolává tvorbu protilátek (ASLO - antistreptolysin O) a streptolysin S, což je neúplný antigen a tvorbu protilátek nevyvolává.

gama-hemolytické streptokoky

Vzhled KA se v okolí kolonií těchto streptokoků nemění, jelikož nevykazují žádnou hemolýzu. (7)

2.1.2.2 Klasifikace podle Lancefieldové

Beta-hemolytické streptokoky mají ve své buněčné stěně polysacharid C. Podle typu polysacharidového antigenu pak tyto streptokoky dělíme do serologických skupin. Jednotlivé antigeny i skupiny jsou označovány písmenem A-V, přičemž A-G jsou spíše lidské kmeny a H-V spíše zvířecí. (2)

2.2 *Streptococcus agalactiae*

Streptococcus agalactiae je opouzdřený a patří do serologické skupiny B. Tvoří dlouhé řetízky. Jednotlivé koky jsou kulaté nebo oválné o velikosti 0,6 – 1,2 μm . (7) Přestože na KA tvoří drobné kolonie obklopené neúplnou hemolýzou (nejedná se ale o viridaci), řadí se *S. agalactiae* mezi beta – hemolytické streptokoky. Malé procento kmenů nevykazuje na KA žádnou hemolýzu. Kolonie *S. agalactiae* jsou větší než kolonie *Streptococcus pyogenes* a jsou mazlavé. Za anaerobních podmínek může *Streptococcus agalactiae* tvořit žlutý až oranžový pigment. Patří mezi streptokoky pyogenní, což znamená, že vyvolává hnisání. Způsobuje mastitidu u hovězího dobytka a je také původcem velmi závažných onemocnění u člověka, především u novorozenců. (5)

2.2.1 Antigenní struktura

S. agalactiae obsahuje skupinově specifický polysacharidový antigen B. (2) Kromě tohoto antigenu obsahuje ještě další typově specifické, často polysacharidové antigeny, které jsou nazývány jako pouzdrné neboli kapsulární. Tyto antigeny jsou označovány následovně: Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX. (5)

Podle pouzdrných antigenů rozlišujeme 10 sérologických typů, které jsou velmi významné pro epidemiologii. (5) Epidemiologické rozdělení těchto sérotypů se může lišit v závislosti na geografické oblasti, profilu studované populace a zdroji izolovaných bakterií. (9)

U těhotných žen a novorozenců s časným GBS (*Group B Streptococcus*) onemocněním převládají sérotypy Ia, Ib, II, III, a V. (5, 14) Důležitý je sérotyp V, jelikož více než polovina kmenů tohoto sérotypu vykazuje rezistenci k erytromycinu. (2)

2.2.2 Virulence

S. agalactiae má mnoho faktorů virulence. Patří mezi ně povrchové proteiny, toxiny a hydrolytické enzymy.

Povrchové proteiny fungují většinou jako adheziny, což může napomáhat úniku obranným imunitním mechanismům hostitele. Zástupci těchto povrchových proteinů jsou C5a peptidázy, laminin vázající protein a alfa a beta podjednotky proteinu C a Rib proteinu.

S. agalactiae také vylučuje řadu toxinů, například beta-hemolyzin, hyaluronidázu nebo CAMP faktor. Tyto toxiny usnadňují vstup bakterie do hostitelské buňky a podporují její nitrobuněčné přežívání. (35)

2.2.3 Patogenita

S. agalactiae je potenciálně patogenní bakterie. Je to běžný komenzál v nosohltanu, pochvě a gastrointestinálním traktu u 10 – 40 % zdravých dospělých. (6) Gastrointestinální trakt je přirozeným rezervoárem *S. agalactiae* a je pravděpodobným zdrojem vaginální kolonizace. (17) Po celém světě jsou známé asymptomatické kolonizace touto bakterií. (23)

V roce 1920 byl *S. agalactiae* uznán jako původce mastitidy u skotu. (14) V roce 1970 se stal vedoucí příčinou neonatální morbiditidy a mortality v USA, kde případy úmrtí sahaly až k 50 %. (17)

S. agalactiae způsobuje celou řadu infekcí, především novorozenecké sepse, meningitidy, pneumonie, infekce měkkých tkání a močového ústrojí. (15) V posledních desetiletích je také příčinou řady invazivních onemocnění u dospělých jedinců, zejména u starších osob a osob s již probíhajícím onemocněním, jako je například diabetes mellitus. (35)

2.2.3.1 Patogenita u novorozenců

S. agalactiae je stále hlavní příčinou neonatální morbidity a mortality, ačkoliv podle údajů CDC výskyt neonatálních infekcí za posledních 15 let poklesl a to z 1,7 případů/1000 živě narozených dětí na 0,34 - 0,37 případů/1000 živě narozených dětí. (21)

S. agalactiae se přenáší vertikálně z kolonizované matky na plod během porodu. Touto cestou přenosu od kolonizovaných matek se nakazí 30 – 70 % novorozenců. (14) Vaginální kolonizace u těhotných žen se podle CDC pohybuje mezi 10 – 30 % a liší se podle geografických oblastí, etnických skupin a věku. U kolonizovaných žen může tato bakterie způsobit klinické infekce, většina těchto žen ovšem žádné příznaky infekce nemá. 2 – 4 % těhotenství jsou komplikována močovými infekcemi způsobenými *S. agalactiae*. Přítomnost bakteriurie v jakékoliv koncentraci značí silnou vaginální kolonizaci. Těhotným ženám s bakteriurií by se mělo dostat chemoprolaxe a u takových už není nutný screening na *S. agalactiae*. (17) Pokud je v průběhu těhotenství zahájeno přeléčení infekce, riziko onemocnění novorozence se nijak nesnižuje, jelikož až 70 % žen je kolonizováno znovu. Riziko přenosu snižuje až intrapartální podání antibiotik.

Za potenciální zdroj novorozeneckých GBS infekcí je považováno i mateřské mléko. Bylo však zjištěno jen několik málo případů přenosu *S. agalactiae* z mateřského mléka na novorozence.

V roce 2013 probíhala v České republice, konkrétně v Thomayerově nemocnici v Praze, studie, která prokázala výskyt *S. agalactiae* ve dvou z 243 testovaných mateřských mlék. Přestože *S. agalactiae* byl u těchto žen prokázán v mateřském mléce, vaginální výtěry byly GBS negativní. (29)

V závislosti na časovém faktoru rozvoje infekce se u novorozenců rozlišují dvě skupiny onemocnění – časná a pozdní infekce.

Časné infekce

Tyto infekce postihují 1 – 4/1000 novorozenců, kteří se narodili kolonizovaným matkám. U těchto dětí je riziko rozvoje časné infekce 25 krát častější než u dětí, které se narodily nekolonizovaným matkám. (14) Důvodem je hlavně vertikální přenos *S. agalactiae*, který může být příčinou intrauterinní infekce. Bakterie se šíří vzestupně z pochvy a novorozenec může vdechnout kontaminovanou plodovou vodu. (17) Tomuto většinou předchází předčasný odtok plodové vody trvající déle než 18 hodin, protahovaný porod nebo horečka u matky během porodu. Dalšími rizikovými faktory zvyšujícími vznik časného onemocnění novorozenců jsou GBS bakteriurie během těhotenství, porod před 37. týdnem těhotenství, nízké hladiny mateřských protilátek proti kapsulárním antigenům *S. agalactiae*, nízký věk matky, hispánský a afroamerický původ a mateřský diabetes mellitus. Rizikovým faktorem je také předchozí porod dítěte s časnou infekcí vyvolanou *S. agalactiae*. (14)

Infekce se projeví do pátého dne života, přičemž začátek projevů je většinou mezi 20 a 48 hodinami. V klinickém obraze dominuje respirační insuficience s pneumonií, sepse a meningitida. Novorozenec zvrací, má tachykardii, poruchy dýchání, bývá hypotonický a cyanotický. Prognóza je špatná a více jsou ohroženi nezralí novorozenci. Letalita u těchto infekcí je až 60 %. (6)

Pozdní infekce

Četnost výskytu pozdních infekcí je 0,5/1000 živě narozených dětí. Projevují se mezi sedmým dnem a čtvrtým měsícem života. Onemocnění probíhá pod obrazem hnisavé meningitidy a od meningitid způsobených jinými patogeny ji nelze rozlišit. U infekcí s fulminantním počátkem je poškozena centrální nervová soustava a stoupá mortalita.

Dalšími projevy pozdních infekcí jsou hnisavá artritida, osteomyelitida, pleuritida, konjunktivitida a další. (6)

2.2.4 Prevence

V roce 1996 CDC doporučilo dvě strategie identifikace matek kolonizovaných *S. agalactiae*. První strategií byla identifikace mateřských rizikových faktorů a druhou provedení kultivace z rektovaginálního výtěru těhotné ženy odebraného mezi 35. a 37. týdnem těhotenství. V roce 2002 dalo CDC přednost druhé strategii. Toto doporučení vycházelo ze skutečnosti, že kultivací se zabránilo vzniku 86 % případů časného onemocnění novorozenců, kdežto při spolehnutí se pouze na identifikaci rizikových faktorů to bylo jen 68,8 % případů, kterým bylo touto strategií zabráněno. (14)

Screening těhotných žen na kolonizaci *S. agalactiae* se provádí mezi 35. a 37. týdnem těhotenství. Přesnost screeningu závisí právě na provedení výtěru v tomto období a dále také na anatomickém místě stěru. Stěr dolní třetiny pochvy a následně z rekta je podstatně významnější než stěr z děložního čípku. Neméně důležitá je přesnost mikrobiologických metod a zkušenosti laboratoře. (17) Výsledek screeningového vyšetření je znám do 48 hodin a jeho validita je 5 týdnů po odběru. Pokud by byl výsledek pozitivní, lékař tuto skutečnost musí uvést do těhotenského průkazu, včetně citlivosti k antibiotikům a pacientku musí uvědomit o svém stavu. (20)

Další metodou prevence je intrapartální antibiotická profylaxe kolonizovaných žen. Antibiotikem první volby je penicilin. Alternativním antibiotikem je ampicilin. U žen alergických na penicilin a s nízkým rizikem anafylaxe se doporučuje podávat cefalosporiny 1. generace (cefazolin, cefalotin). Pokud hrozí vysoké riziko anafylaxe, jsou vhodnými antibiotiky klindamycin nebo erytromycin. Vankomycin je vyhrazen pro ženy s vysokým rizikem anafylaxe a rezistencí k jiným antibiotikům. (20, 19)

Očkování těhotných žen by mohlo zabránit časným GBS sepsím u novorozenců. Dále by také mohlo zvýšit transplacentární přenos protilátek proti *S. agalactiae* na plod a omezit mateřskou kolonizaci. (11) Důležité je charakterizovat rozložení sérotypů *S. agalactiae* v různých světových regionech, jelikož konjugované vakcíny s GBS kapsulárním proteinem jsou sérotypově specifické. Tato možnost prevence je zatím předmětem zkoumání. (10) Ve vývoji je očkování proti pěti sérotypům (Ia, Ib, II, III a V). Bylo totiž zjištěno, že kmeny *S. agalactiae* nesoucí tyto kapsulární proteiny (kromě sérotypu Ib) jsou nejvýznamnější příčinou GBS infekcí jak u dětí, tak u dospělých. (35)

Další možnost prevence tkví ve využití rychlých testů pro detekci *S. agalactiae* v době prasknutí plodové vody nebo v počátku porodu, pokud by byly dostatečně citlivé a specifické. Tyto testy nabízí výhodu ve zjištění GBS kolonizace u žen bez prenatální péče. (17) Rychlé testy ovšem vykazují vyšší riziko vzniku falešně negativních výsledků, používají se tedy jen v případě časové tísně. (20) Existuje několik testů, které jsou použitelné k rychlé detekci *S. agalactiae*. Většina z nich je založena na principu PCR (polymerázové řetězové reakce). Některé z dalších rychlých testů jsou založeny na přímém průkazu antigenu *S. agalactiae* pomocí metod založených na latexové aglutinaci. Citlivost těchto metod se pohybuje kolem 65 %. (27, 32)

2.3 Biologický materiál odebíraný pro izolaci *S. agalactiae*

Za účelem screeningu *S. agalactiae* se provádí výtěr z pochvy nebo rektovaginální výtěr. (37) Odběr se provádí z postranních stěn dolní třetiny pochvy a posléze z rekta. (17) Po odběru jsou vzorky vloženy do vhodné transportní půdy, například do Amiesovy nebo Stuartovy půdy.

S. agalactiae lze izolovat také ve výtěrech z uretry, stěrech z vulvy, nebo cervixu. Materiál může být do laboratoře zaslán na výtěrových tamponech suchých nebo v transportní půdě. (37)

Mezi další biologické materiály, ze kterých se *S. agalactiae* izoluje, patří moč, likvor, hemokultura, sekret z dolních cest dýchacích, výtěr z ucha, výtěr z dutiny ústní a stěr z axilly. Někdy se *S. agalactiae* izoluje také z pupečnickové krve.

2.4 Diagnostika a identifikace *S. agalactiae*

2.4.1 Kultivace

Kultivace je nejdůležitější diagnostická metoda přímého průkazu bakterií a je považována za zlatý standard pro detekci *S. agalactiae* z rektovaginálního výtěru. Při kultivaci se často izoluje více druhů bakterií. U rektovaginálních a poševních výtěrů je izolace více druhů bakterií velmi pravděpodobná, proto se využívají selektivní půdy, které maximalizují izolaci *S. agalactiae* a zabraňují přerůstání jinými mikroorganismy. Cílem kultivace je získat čistou bakteriální kulturu.

Bakterie mají různé nároky na kultivaci na základě jejich rozdílného metabolismu. Podmínky kultivace zahrnují dostatek živin, vlhkost půdy (na polosuchých půdách rostou bakterie málo, nebo vůbec), optimální pH půdy, kultivační teplotu, atmosféru pro kultivaci a délku kultivace. Průměrná délka kultivace je 48 až 72 hodin.

2.4.1.1 Půdy používané ke kultivaci *S. agalactiae*

Krevní agar

Krevní agar je běžně používaným izolačním médiem pro všechny typy vzorků. Díky přítomnosti ovčí krve lze prokázat hemolytické schopnosti bakterií. Růst bakterií je podporován živinami, které poskytuje směs peptonů a dalšími živinami přispívá i krev. (36)

CNA agar

Jedná se o selektivní médium pro grampozitivní bakterie. CNA agar je krevní agar obohacený o kolistin a kyselinu nalidixovou. Potlačuje růst většiny gramnegativních tyček včetně rodů *Proteus*, *Pseudomonas* a *Klebsiella*. (4)

THCNA (Todd-Hewitt bujon + suplement CNA)

THCNA je selektivní tekutá pomnožovací půda obohacená o kolistin a kyselinu nalidixovou. (37)

2.4.1.2 Půdy používané pro kultivaci dalších mikroorganismů

Sabouraudova půda

Slouží k izolaci kvasinek a vláknitých hub ze vzorků, které obsahují smíšenou bakteriální a mykotickou flóru. Tento agar je často obohacený o antibiotika gentamicin a chloramfenikol, která inhibují růst většiny bakterií. (36)

Čokoládový agar s inhibiční směsí VCAT

Tato půda je selektivní médium pro izolaci patogenních neisserií, ve kterém je přítomna inhibiční směs VCAT (vankomycin, kolimycin, amfotericin, trimethoprim), která inhibuje růst většiny gramnegativních bakterií. (36)

Čokoládový agar s bacitracinem

Tento čokoládový agar se využívá pro izolaci hemofilů. Obsahuje bacitracin, který inhibuje růst většiny grampozitivních i gramnegativních koků. (36)

2.4.2 Mikroskopie

Mikroskopické techniky nám umožňují získat informace o morfologii a uspořádání bakterií, dále také lze zjistit jejich velikost a některé buněčné struktury, jako je pouzdro nebo spóra. Morfologie a způsob obarvení jsou předběžnými kritérii pro zařazení bakterie do správné skupiny.

Mikroskopicky lze vyšetřit přímo infekční materiál nebo kultury mikrobů, které se z infekčního materiálu podařilo kultivačně zachytit. Při podezření na *S. agalactiae* se preparát zhotovuje z kultury narostlé na agarových půdách, tekuté kultury nebo z klinických vzorků. Preparát je nutné před prohlédnutím v mikroskopu ofixovat plamenem nebo metanolem a obarvit. Používá se barvení podle Grama, které poskytuje informace o barvitelnosti, velikosti, tvaru a vzájemném uspořádání jednotlivých buněk. Barvením dle Grama lze rozdělit bakterie na grampozitivní a gramnegativní.

Preparáty se obarví dle Grama buď ručně, nebo v barvicím automatu.

Preparát se nejprve nabarví bazickou krystalovou violetí, která se naváže na kyselé skupiny jak gramnegativních, tak grampozitivních bakterií. Následně je preparát mořen Lugolovým roztokem, což je roztok jódu. Jód se naváže na krystalovou violet a vytvoří

precipitát. Dále se preparát odbarvuje acetonem. Grampozitivní bakterie mají membránu tvořenou silnou vrstvou peptidoglykanu, která obsahuje množství teichoových kyselin. Díky těmto vlastnostem nemá aceton na membránu vliv a buňka si uchovává tmavofialové zabarvení krystalové violeti. Membrána gramnegativních bakterií se skládá z vnitřní vrstvy peptidoglykanu a vnější vrstvy fosfolipidů a polysacharidů. Aceton membránu narušuje a rozpouští komplex jódu a krystalové violeti, která je z buňky vyplavena. Buňka je následně dobarvena karbolfuchsinem, který jí dává červené zbarvení.

U preparátů z klinických vzorků se prohlíží celá plocha preparátu meandrovitě pod imerzním objektivem. Celkové zvětšení mikroskopu je 1 000 x. (37)

2.4.3 Biochemické reakce

Určení biochemických vlastností mikrobů se využívá v případě, že je nelze identifikovat podle morfologie a růstu. Dnes jsou pro tyto účely vyráběny diagnostické soupravy zaměřené na jednotlivé skupiny bakterií. (8)

2.4.3.1 Průkaz přítomnosti pyrolidonylpeptidázy

Tento enzymatický test slouží k průkazu přítomnosti enzymu pyrolidonylpeptidázy. Je používán k odlišení *Streptococcus pyogenes* a enterokoků, které jsou pyrolidonylpeptidáza pozitivní, od *S. agalactiae*, který je pyrolidonylpeptidáza negativní. Substrátem v tomto testu je L – pyrolidonyl – b – naphtylamid. Substrát je detekovaným enzymem hydrolyzován. Přidáním činidla dimethylaminocinnamaldehydu vzniká zčervenání v testované oblasti. (37)

2.4.3.2 Stanovení oxidázové aktivity

Stanovení se využívá k detekci přítomnosti enzymu cytochrom oxidázy. Za přítomnosti kyslíku (atmosférického) dochází k oxidaci ethfenylendiaminu cytochromoxidázou, přičemž vznikne indofelová modř. Oxidáza pozitivní jsou některé gramnegativní tyčky a neisserie. Streptokoky včetně *S. agalactiae* jsou oxidáza negativní. (37)

2.4.3.3 Kataláza

Pokud mikroorganismy produkují enzym katalázu, dokáží jejím účinkem hydrolyzovat peroxid vodíku na vodík a plynný kyslík. Reakce se projevuje bubláním uvolněného kyslíku. Testem lze odlišit stafylokoky, které jsou kataláza pozitivní od streptokoků a enterokoků, které jsou kataláza negativní. (37)

2.4.4 CAMP test

Tato metoda se provádí na krevním agaru. *S. agalactiae* produkuje extracelulární CAMP peptid, který působí synergicky s beta – hemolysinem *Staphylococcus aureus*. Při naočkování těchto dvou bakterií kolmo na sebe dochází k úplné hemolýze charakteristického tvaru (mašličky, motýlí křídla). Jako první se na KA očkuje *S. agalactiae* a následně *Staphylococcus aureus*. Tento test je typický pouze pro *S. agalactiae*.

Pokud se vytvoří nesespecifická hemolýza kolem průsečíku *Staphylococcus aureus* a testované kolonie, označujeme tento jev jako „efekt sirky“. K této hemolýze může docházet u jiných druhů streptokoků.

Citlivost této metody pro identifikaci *S. agalactiae* je 98 %. Pokud by ovšem testovaná kolonie vyšla jako negativní, stále může jít o *S. agalactiae* a je nutné použít další testovací metody. (37)

2.4.5 Latexová aglutinace

Latexová aglutinace je další metodou používanou k typizaci *S. agalactiae*. Její doba inkubace je 10 minut a efektivně identifikuje streptokoky skupin A, B, C, F a G. Je to velmi spolehlivý test s citlivostí a specifíčností téměř 100 %. (14) Antigeny specifické pro jednotlivé skupiny streptokoků jsou chemicky extrahovány z jejich buněčné stěny. Přítomnost antigenu značí aglutinace se specifickými protilátkami navázanými na latexových partikulích. (37)

Latexová aglutinace má svá omezení. Může dojít k selhání určení izolátu, pokud má nedostatečnou nebo nízkou expresi kapsulárního polysacharidu. Také při použití neadekvátního množství reagensů nebo kultury mohou být výsledky falešně pozitivní

nebo negativní. Metoda je tedy vysoce závislá na kvalitě používaných protilátek a na zkušenostech laboratoře. (26)

2.4.6 Hmotnostní spektrometrie (metoda matrix-assisted laser-desorption ionization time-of-flight)

Bakteriální kolonie a matriční roztok, kterým je kyselina kyanoskořicová, jsou aplikovány na nosič, který je ve spektrometru vystaven opakovanému působení laserového paprsku. Krystalová struktura matrice kolonii pevně uchytí. Matrice laserové světlo absorbuje a za vzniku elektrického náboje se spolu se vzorkem odpaří. Ve vakuové trubici se ionty rozdělí podle hmotnosti a doby letu. Detektor následně detekuje jednotlivé ionty (narážejí na něj) přímo ze vzorku. Výsledky jsou zobrazovány ve formě piků v počítačové aplikaci. Výsledná spektra jsou posléze porovnávána s databází spekter různých bakterií a jsou nabídnuty výsledky s procentuální pravděpodobností.

Mezi součásti celého systému patří přípravná stanice, kde se připravují nosiče a jsou zadávána data. Jejich záznam je uložen na paměťovém čipu. Přípravná stanice se skládá z počítače se čtečkou čárových kódů a vlastního přístroje přípravné stanice.

Měřicí stanice slouží k příjmu dat o připravených nosičích a výsledků měření z analyzátoru. Tyto výsledky jsou neupravené odeslány do počítačové aplikace. Měřicí stanice je připojena k analyzátoru.

Další součástí je samotný hmotnostní spektrometr typu MALDI TOF, kde dochází k ionizaci laserem za přítomnosti matrice. Je připojen k měřicí stanici skrze USB port, sériový port nebo port kamery.

Počítačová aplikace sdružuje data z přístrojů, laboratorních operací, analýz a laboratorního informačního systému a řídí práci systému. Dále také vypočítává výsledky identifikace.

K měření je nutné používat mikroorganismy izolované například na krevním agaru. Je nevhodné používat přímo klinické vzorky, smíšené kultury nebo nečerstvé kultury. Aerobní bakterie musí být pro toto stanovení kultivovány 18 – 72 hodin a anaerobní bakterie a houby 48 – 72 hodin.

Hmotnostní spektrometr identifikuje mikroorganismy na základě charakteristiky spekter, která se porovnají s databází spekter již známých kmenů. Posléze je vypočítána procentuální pravděpodobnost, která popisuje míru shody vzorku se spektrem v databázi. Za dokonalou shodu lze považovat výsledek s pravděpodobností 99 %. Správné určení mikroorganismu lze předpokládat při dosažení pravděpodobnosti 60 – 99 %. Pravděpodobnost pod 60 % je nedostačující a vzorek je označen jako neidentifikovatelný. (37, 38)

Pro typizaci *S. agalactiae* se v poslední době využívá několik metod založených na PCR a latexové aglutinaci. (26)

2.5 Stanovení citlivosti *S. agalactiae* k antibiotikům

Pro testování citlivosti *S. agalactiae* k antibiotikům se nejčastěji používá diskový difúzní test. Tento test je nejběžnější kvalitativní metodou užívanou ke stanovení citlivosti bakterií.

Na Mueller-Hintonovo medium přelité suspenzí *S. agalactiae* ve fyziologickém roztoku se pokládají disky napuštěné jednotlivými antibiotiky, která difundují všemi směry. Po inkubaci se hodnotí průměr vytvořených inhibičních zón kolem antibiotických disků, přičemž každý z disků má přesně danou hraniční hodnotu inhibiční zóny. (37) Hraniční průměr inhibiční zóny pro citlivé kmeny u *S. agalactiae* je ≥ 21 pro erytromycin (obsah disku 15 μg), ≥ 17 pro klindamycin (obsah disku 2 μg) a ≥ 18 pro benzylpenicilin (obsah disku 1 J). Hraniční průměr inhibiční zóny pro ampicilin se odvozuje od penicilinu. V případě hodnocení inhibičních zón azitromycinu, claritromycinu a roxitromycinu se citlivost odvozuje od erytromycinu. (38)

2.5.1 Mueller-Hintonovo medium

Mueller-Hintonovo medium je pevná půda určená pro stanovení antimikrobiální citlivosti bakterií. Složení tohoto media musí být standardizováno a musí obsahovat přesně dané koncentrace CaCl_2 , MgCl_2 a ZnCl_2 , aby bylo dosaženo spolehlivých výsledků.

Pro náročnější bakterie se do tohoto media přidává 5 % ovčí nebo koňské krve. (36)

2.6 Rezistence *S. agalactiae* k antibiotikům

S. agalactiae je citlivý na mnoho antibiotik, především na beta-laktamová antibiotika, mezi která se řadí například penicilin a ampicilin ze skupiny penicilinů. (14) Většina studií prokazuje 100% citlivost *S. agalactiae* na penicilin a ampicilin, ale občas jsou hlášeny i ojedinělé případy rezistence. Izoláty se sníženou citlivostí k penicilinu jsou hlášeny už od roku 1994. (35) Penicilin a ampicilin stále spolehlivě zabraňují nástupu časného GBS onemocnění. Podle CDC však roste rezistence k erytromycinu a klindamycinu. (21)

Rezistence k erytromycinu (ze skupiny makrolidů) a klindamycinu (ze skupiny linkosamidů) se během posledního desetiletí zvýšila v důsledku jejich stále častějšího užívání. (35) Zvýšený výskyt rezistence k těmto antibiotikům je hlášen z celého světa. Většina studií hlásí vyšší výskyt rezistence k erytromycinu než ke klindamycinu. CDC proto stále doporučuje klindamycin jako vhodnou alternativu pro ženy s alergií na peniciliny, ovšem pokud byly testovány na citlivost ke klindamycinu.

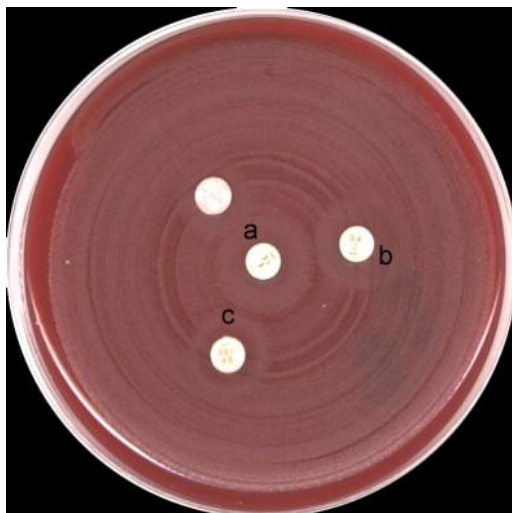
2.6.1 Rezistence *S. agalactiae* ke skupině MLS_B

K antibiotikům ze skupiny MLS_B patří makrolidy, linkosamidy a streptogramin B, které mají velmi podobný účinek na grampozitivní koky.

Rezistence u streptokoků k antibiotikům ze skupiny MLS_B je často řízena geny *erm* (erytromycin ribosomal methylase). Geny *ermA* a *ermB* dokáží inaktivovat antibiotika z této skupiny determinací produkce ribozomální methylázy. Geny *mef* řídí eflux makrolidů a azalidů z buňky (ne však linkosamidů) a jsou méně časté. Pokud je rezistence způsobena methylázou syntetizovanou konstitutivně (gen *ermB*), popisujeme ji jako fenotyp konstitutivní. Pokud je rezistence způsobena methylázou syntetizovanou indukovaně, popisujeme ji jako indukovaný fenotyp (gen *ermA*). V případě, že je rezistence způsobená efluxem, označuje se jako M fenotyp. (18)

2.6.1.1 Konstitutivní fenotyp (*cMLS*)

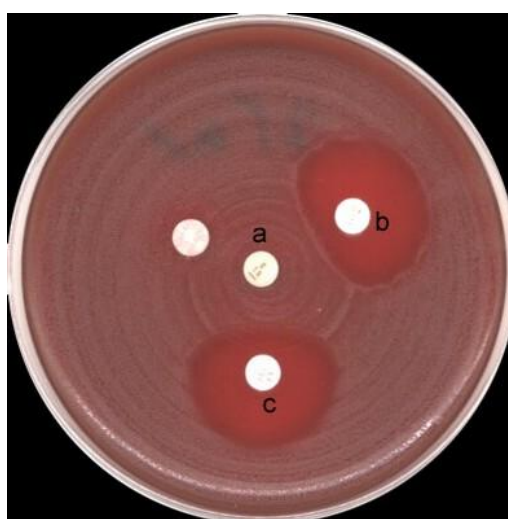
Tento fenotyp je snadné rozpoznat. Inhibiční zóny kolem disků jsou nižší než limit pro citlivé kmeny nebo se nevytvoří vůbec. Jak u erytromycinu tak u klindamycinu jsou tedy v kategorii rezistence. (18, 36, 16)



Obrázek 1: Konstitutivní fenotyp rezistence (18)

2.6.1.2 Indukovaný fenotyp rezistence (*iMLS*)

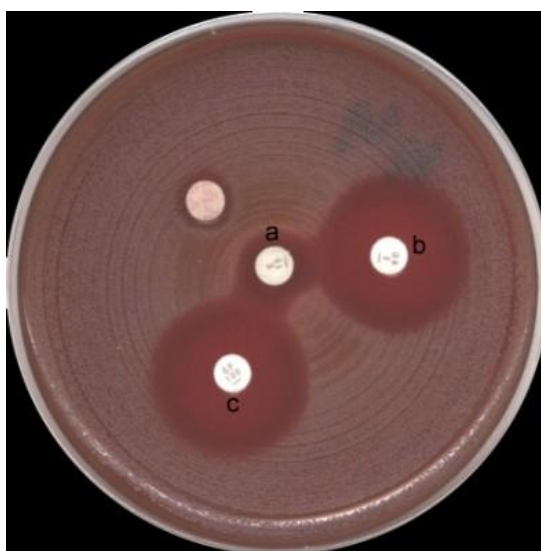
Inhibiční zóna kolem disku s klindamycinem je deformovaná v místě, kde sousedí s diskem erytromycinu, kolem nějž není inhibiční zóna žádná nebo je nižší než limit pro citlivé kmeny. Deformovaná inhibiční zóna je také popisována jako „D“ zóna. Kmen s tímto fenotypem rezistence je k erytromycinu rezistentní a je citlivý ke klindamycinu a streptograminu B. (18, 36, 16)



Obrázek 2: Indukovaný fenotyp rezistence (18)

2.6.1.3 *M* fenotyp (*eflux*)

Inhibiční zóna kolem disku s erytromycinem je menší než limit pro citlivé kmeny a inhibiční zóna kolem disku s klindamycinem je stejná nebo větší než limit pro citlivé kmeny. Takové kmeny jsou rezistentní k erytromycinu a citlivé ke klindamycinu. (18, 36, 16)



Obrázek 3: *M* fenotyp (18)

Na obrázku 1, 2 a 3 je erytromycin označen písmenem a, klindamycin písmenem b a streptogramin B písmenem c. (18)

2.6.2 Stav rezistence *S. agalactiae* k antibiotikům v různých státech

Brazílie

Od roku 2008 jsou v Brazílii hlášeny izoláty se sníženou citlivostí k penicilinu. Pro ženy s alergií na penicilin je zde jako alternativa doporučen erytromycin nebo klindamycin. Od března 2005 do prosince 2009 bylo testováno 434 izolátů *S. agalactiae*. Všechny byly citlivé na ampicilin, levofloxacin, cefotaxim a chloramfenikol. 78 % izolátů bylo rezistentních k tetracyklinu. Byla zjištěna nízká míra rezistence jak k erytromycinu (4,1 %) tak ke klindamycinu (3,0 %). Výsledky byly podobné jiným výsledkům studií prováděných v Brazílii. (9)

Írán

Od května 2010 do října 2010 bylo v Teheránu získáno 115 izolátů *S. agalactiae* ze vzorků moči. Všechny byly testovány na klindamycin, chloramfenikol, erytromycin, penicilin, tetracyklin a linezolid. Všechny izoláty byly citlivé k penicilinu a téměř všechny k linezolidu (99 %). Rezistence k erytromycinu a klindamycinu byla prokázána u 35 % izolátů. K chloramfenikolu bylo rezistentních 45 % a k tetracyklinu 95 % izolovaných kmenů *S. agalactiae*. Výsledky rezistence *S. agalactiae* k erytromycinu a klindamycinu (35 %) z této studie jsou podobné hlášením z Rumunska (31 %), Tuniska (40 %), nižší rezistence pak byla zjištěna v Portugalsku (19 %) a Japonsku (12,8 %).

Další studie probíhala v íránském Araku od září do listopadu 2010. Celkem 186 GBS pozitivních vzorků bylo testována citlivost k penicilinu, ampicilinu, erytromycinu, vankomycinu, cefotaximu a cefazolinu. Všechny izoláty byly citlivé k penicilinu a vankomycinu. Výsledky rezistence k ostatním antibiotikům jsou následovné. Erytromycin (24 % rezistentních kmenů *S. agalactiae*), ampicilin (35 %), cefotaxim (45,8 %) a cefazolin (37,2 %). (15)

Malajsie

Od června 2010 do října 2011 bylo v malajské nemocnici izolováno 103 kmenů *S. agalactiae*. Všechny kmeny ze studie byly citlivé na penicilin, ampicilin, cefuroxim, levofloxacin, vankomycin a chloramfenikol. Většina izolátů (71,8 %) byla rezistentní k tetracyklinu. 23,3 % izolátů bylo rezistentních k erytromycinu a 17,5 % ke klindamycinu. (35)

Spojené státy americké (New York)

Velmi vysoká míra rezistence *S. agalactiae* k erytromycinu a klindamycinu byla zaznamenána v nemocnici v New Yorku. Studie zde probíhala od ledna 2010 do října 2011. Celkem 50,7 % izolovaných kmenů bylo rezistentních k erytromycinu a 38,4 % ke klindamycinu. Při testování fenotypu rezistence 89,5 % izolátů vykazovalo konstitutivní fenotyp rezistence a 10,5 % inducibilní fenotyp rezistence. (21)

Korea

Screening GBS a porodní antibiotická profylaxe zde dosud nebyly schváleny jako standardní postupy prenatální péče. Penicilin je antibiotikem volby pro prevenci neonatálních sepsí vyvolaných *S. agalactiae*. U žen alergických na penicilin je doporučen klindamycin nebo erytromycin. Citlivost k erytromycinu a klindamycinu byla testována u 728 izolátů *S. agalactiae* od 410 žen. Studie probíhala v období od ledna 2006 do prosince 2011. K erytromycinu bylo rezistentních 23 % izolátů a ke klindamycinu 39,5 %. (23)

Polsko

Studie se zabývala výskytem rezistence *S. agalactiae* k antibiotikům v letech 2008 až 2012. Všechny izoláty získané během tohoto období byly citlivé na penicilin, ampicilin a nitrofurantoin. Od roku 2008 do roku 2012 se zvýšila rezistence z 24 % na 29 % u erytromycinu a z 21 % na 25 % u klindamycinu. Studie se zabývala i výskytem fenotypu rezistence u antibiotik ze skupiny MLS_B. Konstitutivní fenotyp rezistence byl

zjištěn u 17 – 21 % izolátů, indukovaný fenotyp rezistence u 0, 5 – 4 % izolátů a M fenotyp u 1 – 4 % izolátů. (24)

3 Praktická část

3.1 Cíle práce

Cílem této práce bylo popsat a osvojit si metody, které se v současnosti využívají k diagnostice a identifikaci *S. agalactiae*. Dalším cílem bylo zaměřit se na záchyt této bakterie u těhotných žen a novorozenců v roce 2014 a vyhodnotit distribuci sérotypů *S. agalactiae* zachycených u infikovaných novorozenců. V této práci jsem se také zabývala zhodnocením stavu rezistence *S. agalactiae* k antibiotikům.

3.2 Hypotéza

Domnívám se, že vaginální kolonizace *S. agalactiae* u těhotných žen vyšetřených v Nemocnici České Budějovice a.s. se bude pohybovat mezi 10 – 30 %. Toto procentuální rozmezí udává CDC v revidovaných pokynech z roku 2010.

3.3 Charakteristika sběru dat

Všechna data použitá pro mou bakalářskou práci, jsem získala v Nemocnici České Budějovice, a.s., v laboratoři mikrobiologie na pracovišti bakteriologie. Data byla získávána pod odborným dohledem vedoucího mé bakalářské práce.

Biologický materiál, který byl použit pro získání výsledků této práce, pocházel z neonatologického a gynekologicko - porodnického oddělení nemocnice v Českých Budějovicích. Sbírala jsem výsledky GBS pozitivních biologických materiálů, z nichž jsem několik sama zpracovávala, abych si dostatečně osvojila postupy při zpracování a testování těchto materiálů.

3.4 Odběr a transport vzorků

Pro získání výsledků mé bakalářské práce byly vyšetřovány následující druhy biologického materiálu. U těhotných žen byly na průkaz *S. agalactiae* zpracovávány rektovaginální výtěry, výtěry z pochvy a stěry z urogenitálu. Ke sledování rozdělení sérotypů *S. agalactiae* u novorozenců byly použity výsledky kultivací ze stěrů zvučkovodu, dutiny ústní a axilly, dále moče a hemokultury.

Všechny biologický materiál byl do laboratoře dodán na odběrových tamponech nebo ve sterilních zkumavkách. Většina odběrových tamponů byla zanořena do

transportního media, čímž byla nejčastěji Amiesova půda, která má polotuhou konzistenci. Tato půda má černou barvu, pokud obsahuje aktivní uhlí. Pokud ho neobsahuje, je bezbarvá. Na identifikaci a diagnostiku *S. agalactiae* však tento rozdíl nemá žádný vliv.

3.5 Kultivace

3.5.1 Kultivace materiálu pro screening *S. agalactiae*

Výtěry určené pro screening *S. agalactiae* (rektovaginální výtěr a výtěr z pochvy) byly vyočkovány na selektivně diagnostické půdy – na CNA agar a THCNA pomnožovací půdu.

CNA agar byl inokulován odběrovým tamponem s biologickým materiálem. Sterilní bakteriologickou kličkou bylo inokulum následně rozočkováno po celé ploše CNA agaru, který se nechal po dobu 18 – 24 – 48 hodin inkubovat při 36 °C v mikroaerofilním prostředí.

Pomnožovací THCNA půda, do které se odběrový tampon zanořil, byla inkubována 18 – 24 hodin při 36 °C v aerobním prostředí. Po inkubaci byla tekutá půda vyočkována na KA, který se nechal 18 – 24 hodin inkubovat při 36 °C v mikroaerofilním prostředí.

3.5.2 Kultivace materiálu z urogenitálního traktu

Biologický materiál z urogenitálního traktu (stěr z vulvy, cervixu nebo výtěr z pochvy, uretry), byl vyočkován jak na základní, tak selektivní a selektivně diagnostické půdy a navíc se zhotovil mikroskopický preparát.

Vzorkem byl naočkován KA, CNA agar, čokoládový agar a Sabouraudova půda. V případě těhotné pacientky se odběrový tampon vytřepal do pomnožovací půdy THCNA. V ostatních případech byl tampon vytřepán do thioglykolátové pomnožovací půdy. Pokud odběrový tampon přišel do laboratoře v transportním médiu, byl navíc inokulován na čokoládový agar s inhibiční směsí VCAT.

Inokula na inokulovaných půdách byla rozočkována bakteriologickou kličkou a preparát obarven dle Grama. Inkubace KA probíhala 18 – 24 – 48 hodin, čokoládového agaru, CNA agaru a čokoládového agaru s VCAT 42 – 48 hodin při 36 °C

v mikroaerofilním prostředí. Tekuté pomnožovací půdy byly inkubovány 18 – 24 hodin, Sabouraudova půda 42 – 48 – 72 hodin při 36 °C v aerobním prostředí.

Po inkubaci byly tekuté pomnožovací půdy vyočkovány na KA a inkubovány 18 – 48 hodin při 36 °C v mikroaerofilním prostředí.

Po inkubaci byly odečteny výsledky kultivace. K identifikaci *S. agalactiae* z narostlých kolonií bylo využito metody mikroskopické, aglutinační, CAMP testu, či hmotnostní spektrometrie. Pokud byl *S. agalactiae* izolován u gravidní ženy nebo u novorozence, byla vždy stanovena citlivost k antibiotikům.

3.5.3 Teoretické složení jednotlivých kultivačních půd v g/l destilované vody

KA

přísada	množství
peptony	18
škrob	1
kvasničný extrakt	5
chlorid sodný	5
agar	10
ovčí krev	5 %

CNA agar

přísada	množství
Bacto Panton	10
Bacto Biton	10
srdečný tryptický hydrolyzát	3
kukuřičný škrob	1
chlorid sodný	5
kolistinsulfát	0,01
kyselina nalidixová	0,015
agar	15

Sabouraudova půda

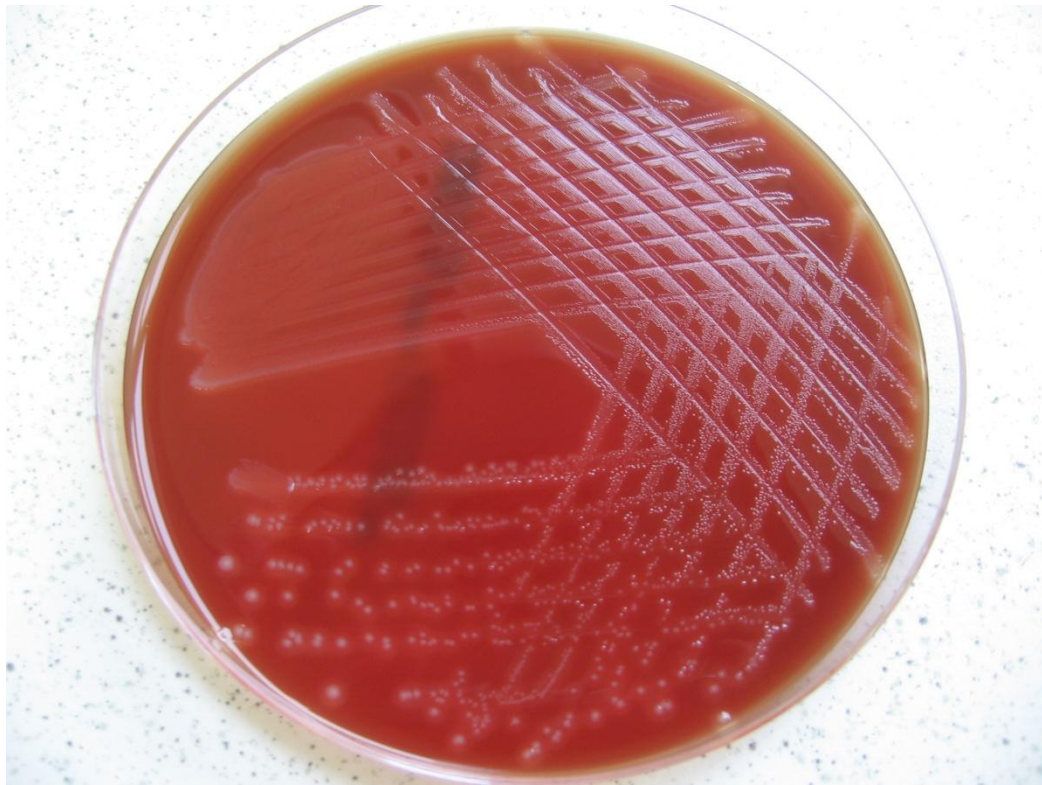
přísada	množství
peptony	10
glukóza	40
agar	12

Čokoládový agar s inhibiční směsí VCAT

přísada	množství
pankreatický hydrolyzát kaseinu	7,5
masopeptonový hydrolyzát	7,5
kukuřičný škrob	1
hydrogenfosforečnan draselný	4
dihydrogenfosforečnan draselný	1
chlorid sodný	5
hemoglobin	10
agar	15

Čokoládový agar s bacitracinem

přísada	množství
pankreatický hydrolyzát kaseinu	7,5
masopeptonový hydrolyzát	7,5
kukuřičný škrob	1
hydrogenfosforečnan draselný	4
dihydrogenfosforečnan draselný	1
chlorid sodný	5
hemoglobin	10
agar	15



Obrázek 4: *S. agalactiae* vyočkovaný na KA (vlastní zdroj)

3.6 Mikroskopie

Preparáty pro mikroskopii se dělaly z biologického materiálu z urogenitálního traktu a z většiny ostatních klinických vzorků (například stěr z ušního zvukovodu, moč, hemokultura nebo likvor).

Preparáty ze vzorků na odběrových tamponech se zhotovily jemným rolováním tamponu po podložním sklíčku.

Při zhotovení mikroskopického preparátu z hemokultury se injekční stříkačkou aplikovala jedna kapka obsahu hemokultivační lahvičky na podložní sklíčko. Kapka se následně rozetřela po celé ploše sklíčka pomocí jiného, sterilního sklíčka. Nátěr se nechal zaschnout.

Před nanesením vzorku moče na podložní sklíčko byl tento materiál nejprve centrifugován při 1 500 ot./min. po dobu 5 minut. Po centrifugaci bylo ve zkumavce ponecháno 0,5 ml supernatantu, ve kterém byl resuspendován sediment. Pasteurovo

pipetou byla nanesena kapka resuspendovanho sedimentu na podložní sklíčko a nechala se zaschnout.

Preparáty byly po zaschnutí fixovány plamenem a barveny dle Grama.

K barvení preparátů byl k dispozici barvicí automat Mirastainer II, ovšem pro osvojení si techniky barvení jsem preparáty barvila manuálně. Preparáty byly barveny krystalovou violetí po dobu 30 sekund a následně převrstveny Lugolovým roztokem na 1 minutu. Tekoucí vodou bylo odstraněno přebytečné barvivo a Lugolův roztok. Odbarvování acetonem probíhalo, dokud se vyplavovalo modré barvivo a posléze byly preparáty opláchnuty. Po 1 minutu byly preparáty dobarčovány karbolfuchsinem, poté opláchnuty vodou. Po zaschnutí byly preparáty prohlíženy v mikroskopu při tisícinásobném zvětšení.

3.7 CAMP test

CAMP test byl proveden na KA, na který se mikrobiální kličkou naočkowały dvě čáry testované kolonie vertikálně. Kolmo k těmto čarám byla naočkována čára kolonie *S. aureus*. Naočkovaný KA byl posléze inkubován při 36 °C v mikroaerofilním prostředí.

Reakce byla hodnocena jako pozitivní, pokud došlo v místě průsečíků obou kolonií k vytvoření typické úplné hemolýzy (tvar mašliček). V případě, že se v průsečíku obou kolonií vytvořila hemolýza atypického tvaru, nebo se nevytvořila vůbec, byl tento test považován za negativní.



Obrázek 5: Pozitivní výsledek CAMP testu u *S. agalactiae* (vlastní zdroj)

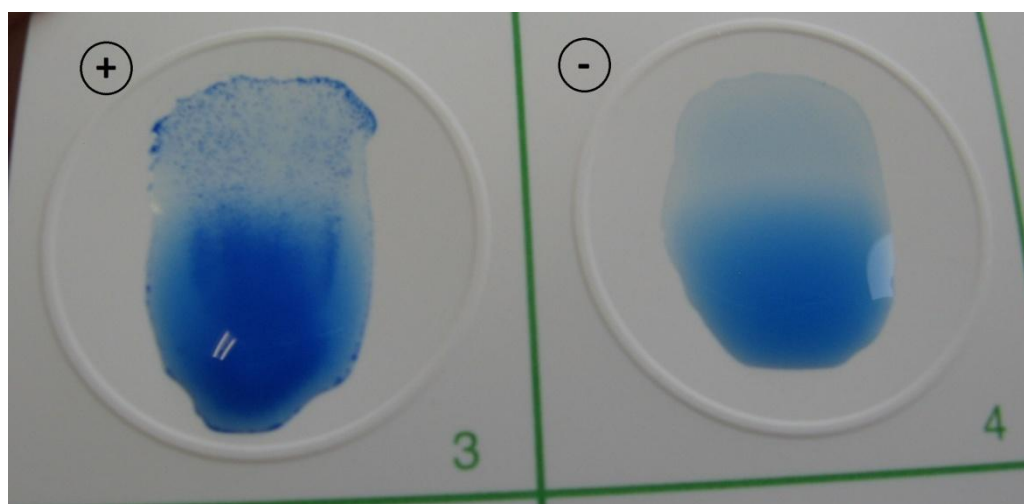
3.8 Latexová aglutinace

Při provádění latexové aglutinace byl použit set ProlexTM Streptococcal grouping latex kit od výrobce PRO-LAB. Jelikož jsou sety uchovávány při 2 – 8 °C, bylo nutné je vytemperovat na laboratorní teplotu.

Do zkumavky byla nejdříve aplikována kapka extrakčního činidla 1, ve které byla resuspendována testovaná kolonie. K suspenzi byla přikápnuta kapka extrakčního činidla 2 a obsah zkumavky byl promíchán. Dále bylo do zkumavky přidáno pět kapek extrakčního činidla 3 a opět byl obsah zkumavky promíchán.

Na testovací kartu (do vyznačeného kruhu) byla kápnuta kapka testovací latexové suspenze skupiny B. Vedle kapky latexové suspenze byla přikápnuta kapka suspenze připravené ve zkumavce. Následně se plastovou tyčinkou obě kapky promíchaly a testovací kartou bylo jemně kýváno, aby došlo k homogenizaci. Výsledek testu byl hodnocen po jedné minutě.

Za pozitivní reakci byla považována zřetelná a silná aglutinace. Pokud byla aglutinace slabá, celý test byl proveden znovu za použití většího množství testovaných kolonií. Při negativní reakci se nevytvořila žádná aglutinace.



Obrázek 6: Pozitivní výsledek latexové aglutinace u *S. agalactiae* (vlevo) v porovnání s negativním výsledkem (vpravo) (vlastní zdroj)

3.9 Hmotnostní spektrometrie MALDI – TOF

Hmotnostní spektrometrie byla prováděna přístrojem VITEK™ od výrobce bioMérieux, Inc., jenž pracuje metodou MALDI – TOF.

Vzorky byly nanášeny na jednorázový nosič rozdělený na tři měřicí úseky. Každý úsek má 16 testovacích polí a jedno pole pro nanesení kontroly. Jako kontrola byla použita čerstvá kultura *Escherichia coli*.

Testovaná kolonie byla po 24 hodinové kultivaci nabrána jednorázovou mikrobiologickou kličkou a nanášena na střed testovacího pole nosiče. Nanesená kolonie byla překápnuta 1 µl matričního roztoku. Připravené vzorky na nosiči se nechaly zaschnout.

Po přípravě vzorků byly údaje o umístění jednotlivých vzorků na příslušné pozice nosiče zadány do přípravné stanice. Každý nosič má svůj čárový kód, který byl před zápisem dat sejmuto čtečkou čárových kódů (je součástí přípravné stanice). Data byla následně přeposlána do měřicí stanice. Nosič byl po výzvě vložen do analyzátoru VITEK™. Vždy na začátku a na konci analýzy jednoho měřicího úseku byla analyzována kontrola. Průběh analýzy byl pozorován v počítačovém programu, který umožňuje sledovat vývoj výsledného grafu a zobrazuje záznamy z kamery v analyzátoru. Po dokončení analýzy byly výsledky odeslány do počítačové aplikace Myla. Tato aplikace vyhodnocuje výsledky graficky:



výsledek identifikace lze odeslat do LIS



vyhodnocení identifikace volbou výsledku z více možností



výsledky nelze vyhodnotit

Výsledek analýzy byl vždy posouzen, popřípadě upraven lékařem.



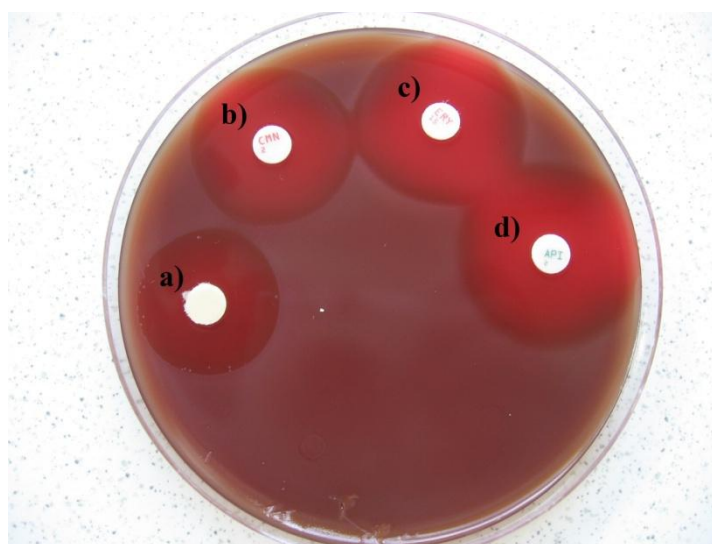
Obrázek 7: Hmotnostní spektrometr VITEKTM (vlastní zdroj)

3.10 Stanovení citlivosti

Citlivost *S. agalactiae* k antibiotikům byla prováděna diskovou difuzní metodou na MH agaru obohaceném koňskou krví. Citlivost jednotlivých kmenů byla testována na penicilin, ampicilin, klindamycin a erytromycin. Mikrobiologickou kličkou byla nabrána testovaná kolonie, která byla inokulována do fyziologického roztoku. Hustota inokula odpovídala 0,5 – 1 stupni McFarlandova zákalového standardu. Takto inokulovaným fyziologickým roztokem byl MH agar přelit po celé ploše. Přebytečná suspenze byla odsáta Pasteurovou pipetou. Disky s napuštěnými antibiotiky byly na přelítý MH agar aplikovány pomocí raznice. Inkubace plotny probíhala při 36 °C po dobu 18 – 24 hodin.

teoretické složení MH agaru v g/l destilované vody

peptony	3
kaseinový hydrolyzát	17,5
agar	15
Ca ²⁺	20 - 25 mg/l
Mg ²⁺	10 - 12,5 mg/l
koňská krev	5%



Obrázek 8: Výsledek stanovení citlivosti *S. agalactiae* k penicilinu (a), klindamycinu (b), erytromycinu (c) a ampicilinu (d) (vlastní zdroj)

4 Výsledky

4.1 Výskyt a rezistence *S. agalactiae* u těhotných žen v roce 2014

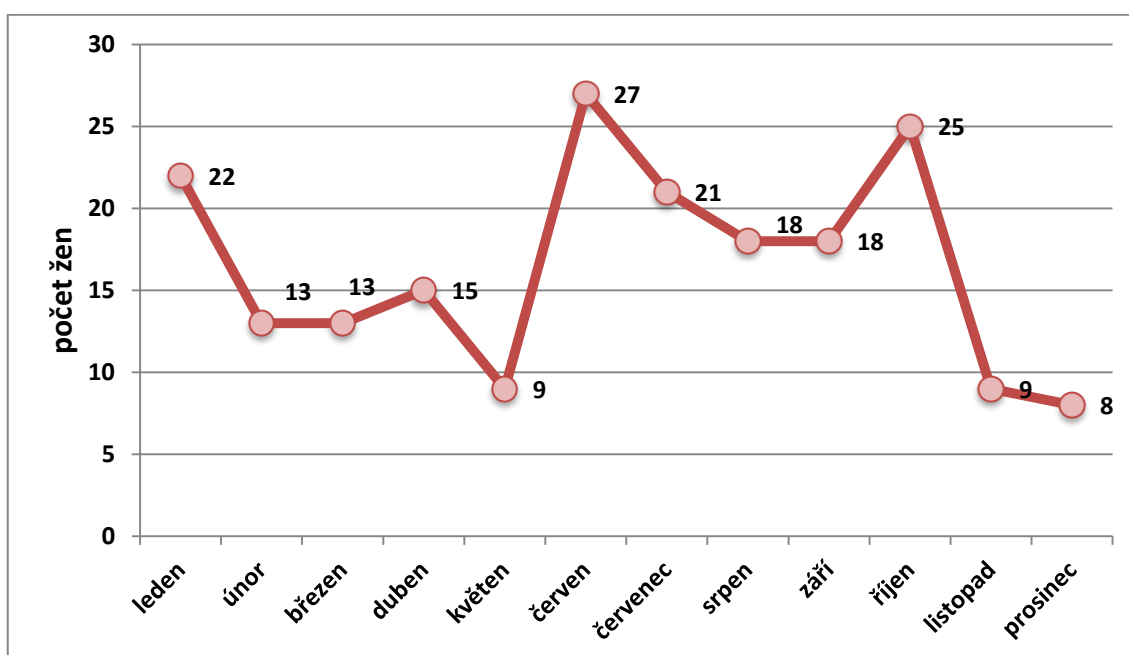
V roce 2014 byl *S. agalactiae* izolován v mikrobiologické laboratoři Nemocnice České Budějovice, a.s. z 227 biologických vzorků od 198 těhotných žen ve věkovém rozmezí 17 – 49 let. Nejvíce kmenů *S. agalactiae* bylo izolováno z výtěrů z pochvy a rekta, méně z výtěrů z pochvy. K identifikaci byly použity metody CAMP test, hmotnostní spektrometrie MALDI – TOF a latexová aglutinace.

Nejvíce kmenů *S. agalactiae* bylo zachyceno v měsících leden, červen, červenec a říjen, nejméně v měsících květen, listopad a prosinec (Tabulka 1a Graf 1). Toto rozložení výskytu nevykazuje žádný sezónní charakter výskytu *S. agalactiae*.

U izolátů byla provedena citlivost k penicilinu, ampicilinu, klindamycinu a erytromycinu. Ke stanovení citlivosti byla použita metoda diskový difuzní test. Žádný z izolovaných kmenů *S. agalactiae* nebyl rezistentní k penicilinu a ampicilinu. Celkem 49 izolátů (21, 6 %) bylo rezistentních k erytromycinu a 52 izolátů (22, 9 %) bylo rezistentních ke klindamycinu. U 15 izolátů (6, 6 %) citlivost stanovena nebyla (Tabulka 2).

počet žen/měsíc	četnosti	procenta
leden	24	10,6%
únor	14	6,2%
březen	14	6,2%
duben	18	7,9%
květen	10	4,4%
červen	32	14,1%
červenec	25	11,0%
srpen	20	8,8%
září	19	8,4%
říjen	30	13,2%
listopad	12	5,3%
prosinec	9	4,0%
celkem	227	100,0%

Tabulka 1: Četnost výskytu *S. agalactiae* u těhotných žen v roce 2014



Graf 1: Názorné zobrazení četnosti výskytu *S. agalactiae* u těhotných žen v roce 2014

antibiotikum	četnosti			procenta		
	rezistentní	citlivý	neznámé	rezistentní	citlivý	neznámé
ampicilin	0	227	0	0,0%	100%	0,0%
penicilin	0	227	0	0,0%	100%	0,0%
klindamycin	52	174	1	22,9%	76,7%	0,4%
erytromycin	49	171	7	21,6%	75,3%	3,1%

Tabulka 2: Citlivost *S. agalactiae* k jednotlivým antibiotikům u těhotných žen.

4.2 Míra kolonizace *S. agalactiae* v populaci těhotných žen v roce 2014

V roce 2014 bylo od těhotných žen zpracováno celkem 1362 vzorků. Celkem bylo vyšetřeno 588 rektovaginálních výtěrů, 418 stěrů z urogenitálu, 347 výtěrů z pochvy pro screening *S. agalactiae* a 9 lochií. Z 227 těchto vzorků byl izolován *S. agalactiae*. Míra kolonizace *S. agalactiae* v populaci těhotných žen tedy činí 16,7 %.

4.3 Výskyt, distribuce sérotypů a rezistence *S. agalactiae* u novorozenců v roce 2014

S. agalactiae byl v roce 2014 izolován od 37 novorozenců ve stěrech ze zvukovodu, dutiny ústní, axilly, v moči a hemokultuře. *S. agalactiae* byl prokázán v 18 stěrech ze zvukovodu, 9 stěrech z axilly, 6 stěrech z dutiny ústní, 3 močích a 1 hemokultuře.

U všech izolátů byla stanovena citlivost k penicilinu, ampicilinu, klindamycinu a erytromycinu metodou diskového difuzního testu. Všechny izolované kmeny *S. agalactiae* byly citlivé k penicilinu i ampicilinu. Celkem 9 izolátů (24,3 %) bylo rezistentních k erytromycinu, 8 izolátů (21,6 %) bylo rezistentních ke klindamycinu (Tabulka 3).

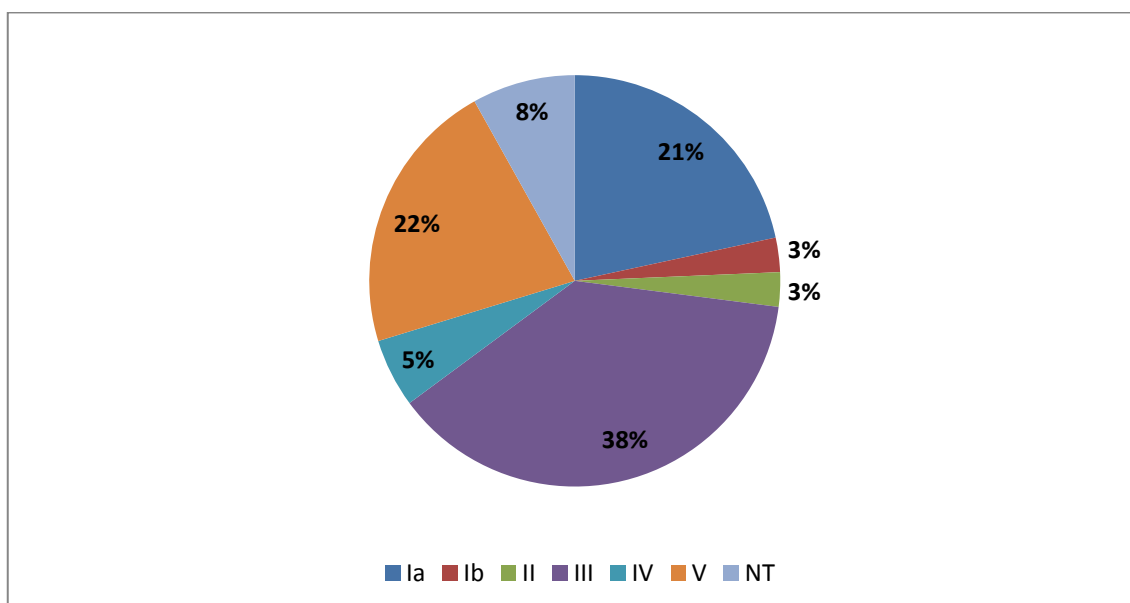
Všechny izoláty *S. agalactiae* byly zaslány do Národní referenční laboratoře pro streptokoky (NRL), kde byly otestovány na sérologickou skupinu a typové antigeny latexovou aglutinací. U všech 37 izolátů byla ověřena identifikace jako streptokok skupiny B. Tyto izoláty byly následně podrobeny identifikaci typových antigenů *S. agalactiae*. V distribuci jednotlivých sérotypů jednoznačně převládají sérotypy III, Ia a V. Sérotypy Ib, II a IV už jsou zastoupeny méně. Celkem 3 izoláty byly určeny jako NT, tedy netypizovatelné (Tabulka 4 a Graf 2). U novorozenců nebyl identifikován žádný sérotyp VI, VII, VIII a IX.

antibiotikum	četnosti			procenta		
	rezistentní	citlivý	neznámé	rezistentní	citlivý	neznámé
erytromycin	9	27	1	24,3%	73,0%	2,7%
klindamycin	8	28	1	21,6%	75,7%	2,7%

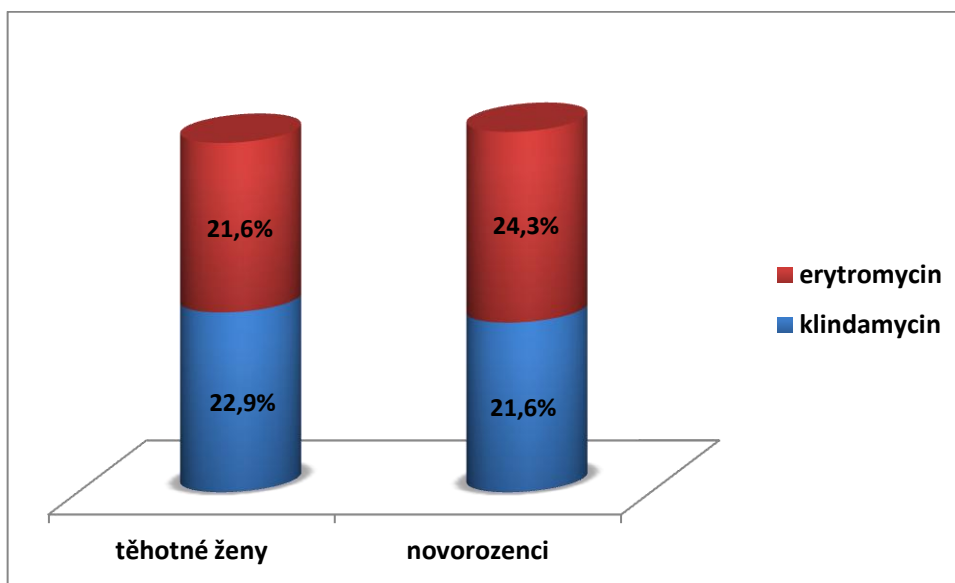
Tabulka 3: Citlivost *S. agalactiae* k jednotlivým antibiotikům u novorozenců

sérotyp	četnosti	procenta
Ia	8	21,62%
Ib	1	2,70%
II	1	2,70%
III	14	37,84%
IV	2	5,41%
V	8	21,62%
NT	3	8,11%
celkem	37	100,00%

Tabulka 4: Distribuce sérotypů *S. agalactiae* u novorozenců za rok 2014



Graf 2: Názorné zobrazení distribuce sérotypů *S. agalactiae* u novorozenců v roce 2014



Graf 3: Porovnání rezistence *S. agalactiae* k erytromycinu a klindamycinu u těhotných žen a novorozenců

5 Diskuse

Cílem mé bakalářské práce bylo vyhodnotit záchyt *S. agalactiae* u těhotných žen v roce 2014, zhodnotit stav rezistence *S. agalactiae* k antibiotikům a popsat distribuci jeho sérotypů u novorozenců. Výsledky pro mou práci jsem získala z databáze vyšetřovaných pacientů v Nemocnici České Budějovice, a.s. U několika z těchto pacientů jsem pod odborným dohledem prováděla izolaci a identifikaci *S. agalactiae* sama.

Stanovenou hypotézu se mi podařilo potvrdit. Podle mého výzkumu prováděného v populaci těhotných žen v roce 2014 bylo kolonizováno *S. agalactiae* celkem 16,7 % této populace. Podobné výsledky byly hlášeny ve studiích z Chile (14,4 %, rok 2010 – 2012), Egypta (17,9 %, rok 2006 - 2007) a Konga (20 %, rok 2012 - 2013). Nejvyšší kolonizace byly zjištěny v Brazílii (37,7 %, rok 2011) a Západní Indii (32,9 %, rok 2003). V České Republice byla v roce 2001 – 2002 prováděna studie v Praze uvádějící výsledek 29,3 % kolonizovaných těhotných žen.

Na základě výsledků citlivostí k antibiotikům u jednotlivých kmenů *S. agalactiae* jsem stanovila míru rezistence u těhotných žen ke klindamycinu 22,9 % a erytromycinu 21,6 %. U žádného kmene nebyl pozorován indukovaný fenotyp rezistence. U novorozenců bylo 21,6 % izolátů rezistentních ke klindamycinu a 24,3 % k erytromycinu. Oproti stavu rezistence *S. agalactiae* k těmto antibiotikům v jiných zemích je míra rezistence z mého výzkumu výrazně nižší. V Íránu byla zjištěna vysoká rezistence k erytromycinu i klindamycinu (ERY 35 %, CLI 35 %). Taktéž je tomu v Koreji, kde rezistence k erytromycinu dosáhla 35,1 % a u klindamycinu 49,4 %. V New Yorku byla k erytromycinu zjištěna rezistence u 50,7 % izolátů a ke klindamycinu u 38,4 % izolátů. Velmi nízké hodnoty rezistence byly pozorovány v Brazílii (ERY 4,1 %, CLI 3,0 %). V sousedním Polsku byly zjištěny hodnoty nejbližší mým výsledkům (ERY 29 %, CLI 25 %).

U novorozenců byly nejčastěji pozorovány následující sérotypy *S. agalactiae*. Nejvíce izolátů bylo určeno jako sérotyp III (37,84 %), dále sérotyp V a Ia (21,62 %). Menší zastoupení tvoří sérotypy Ib (2,7 %), II (2,7 %) a IV (5,41 %). Sérotypy VI, VII a VIII nebyly v mém výzkumu pozorovány. Celkem 8,11 % sérotypů bylo určeno jako

netypizovatelné. Výskyt třech nejčastějších sérotypů (III, Ia a V) je velmi podobný s distribucí sérotypů v jiných zemích (Čína, Kanada, USA, Afrika, Austrálie). V Mexiku kromě sérotypů Ia a III převládal sérotyp II. V Asii byl zaznamenán větší výskyt sérotypů Ib, III a V. Nejčtenější výskyt sérotypů VI, VII a VIII byl pozorován v zemích Asie. V Evropě a Americe se tyto sérotypy vyskytovaly výrazně méně.

6 Závěr

Celkem bylo vyhodnoceno 1 362 vzorků od těhotných žen ve věku 17 – 49 let. Z těchto vzorků bylo 16, 7 % (n = 227) *S. agalactiae* pozitivní. U všech kmenů *S. agalactiae* byla provedena citlivost k antibiotikům metodou diskového difuzního testu. Žádný kmen nebyl rezistentní k penicilinu ani ampicilinu. 21, 6 % kmenů vykazovalo rezistenci k erytromycinu a 22, 9 % ke klindamycinu. Stále se zvyšující rezistence u erytromycinu a klindamycinu bývá způsobená častým předepisováním těchto dvou antibiotik, nicméně jsou stále doporučována pro ženy s těžkou alergií na penicilin ohrožené vznikem anafylaktického šoku.

V roce 2014 bylo infikováno *S. agalactiae* 37 novorozenců. Každý izolát byl v NRL podroben identifikaci sérologické skupiny latexovou aglutinací a identifikaci typových antigenů *S. agalactiae* latexovou aglutinací. U novorozenců nejvíce převažovaly sérotypy III, Ia a V. Rezistence k erytromycinu byla prokázána u 24, 3 % izolátů a ke klindamycinu u 21, 6 % izolátů získaných ze vzorků od novorozenců.

Za nejspolehlivější a nejvhodnější metodu pro identifikaci *S. agalactiae* považují CAMP test. Pokud se k testu použije referenční kmen *S. aureus*, spolehlivost této metody je téměř 100 %. CAMP test se často používá i z toho důvodu, že je tato metoda cenově nejvýhodnější. Stále častěji se také využívá hmotnostní spektrometr MALDI – TOF. Kmeny *S. agalactiae* byly touto metodou stanoveny s vysokou přesností. Tato metoda vyžaduje kulturu narostlou za 24 hodin a výsledek je známý již během 30 minut. Nevýhodou této metody je její časová náročnost, protože trvá až do druhého dne a finančně vychází až 8x dražší než CAMP test. Metoda latexové aglutinace dnes již pro svou pracnost ustupuje a pro identifikaci *S. agalactiae* byla použita pouze výjimečně.

Přestože výskyt novorozeneckých GBS infekcí během posledních 15 let poklesl, *S. agalactiae* zůstává stále hlavní příčinou morbidity a mortality u novorozenců. Důležité je u těhotných žen mezi 35. a 37. týdnem těhotenství provádět screening a v případě GBS pozitivního nálezu stanovit citlivost k antibiotikům.

Budoucnost prevence časných GBS infekcí u novorozenců tkví ve využití očkování proti jednotlivým sérotypům *S. agalactiae*, které je prozatím ve fázi vývoje. Další možnost prevence spočívá ve využití rychlých testů pro detekci *S. agalactiae* během

porodu, které prozatím nejsou dostatečně citlivé a specifické. Zdokonalení těchto dvou možností prevence by mohlo vést k ještě většímu snížení neonatálních GBS infekcí, morbidit a mortality.

7 Seznam informačních zdrojů

1. VERSALOVIC, J., K. C. CARROLL, G. FUNKE, J. H. JORGENSEN, M. L. LANDRY a D. W. WARNOCK. *Manual of Clinical Microbiology*. Wahington DC: ASM Press, 2011. 10. ISBN 978-1-55581-678-0.
2. VOTAVA, M., L. ČERNOHORSKÁ, V. HEROLDOVÁ, V. HOLÁ, L. MEJZLÍKOVÁ, P. ONDROVČÍK, F. RŮŽIČKA, M. DVOŘÁČKOVÁ, V. WOZNICOVÁ a O. ZAHRADNÍČEK. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun, 2006. ISBN 80-902896-6-5.
3. VOTAVA, M. *Lékařská mikrobiologie obecná*. Brno: Neptun, 2005. ISBN 80-86850-00-5.
4. VOTAVA, M. *Kultivační půdy v lékařské mikrobiologii*. 1. vydání. Brno: Hortus, 2000. ISBN 80-238-5058-X.
5. BEDNÁŘ, M., V. FRAŇKOVÁ, J. SCHINDLER, A. SOUČEK a J. VÁVRA. *Lékařská mikrobiologie: Bakteriologie, virologie, parazitologie*. Praga: Marvill, 1996. ISBN 8594031505280.
6. MAŠATA, J., A. JEDLIČKOVÁ, J. ŘEZÁČOVÁ, A. MARTAN a M. HALAŠKA. *Infekce v gynekologii a porodnictví a základy jejich antiinfekční léčby*. Praha: Maxdorf, 2004. ISBN 80-7345-038-0.
7. KLABAN, V. *Svět mikrobů: ilustrovaný lexikon mikrobiologie životního prostředí*. Druhé rozšířené a přepracované vydání. Univerzita Hradce Králové: Gaudeamus, 2001. ISBN 80-7041-687-4.
8. GREENWOOD, D., R. C. B. SLACK, J. F. PEUTHERER a KOLEKTIV. *Lékařská mikrobiologie: Přehled infekčních onemocnění: patogeneze, imunita, laboratorní diagnostika a epidemiologie*. Praha: Grada Publishing, 1999. ISBN 80-7169-365-0.
9. DUTRA, V. G. a KOLEKTIV. Streptococcus agalactiae in Brazil: serotype distribution, virulence determinants and antimicrobial susceptibility. *BMC Infectious Diseases* [online]. 2014, volume 14 [cit. 2015-01-02]. Dostupné z: <http://www.biomedcentral.com/1471-2334/14/323>
10. KWATRA, G., P. V. ADRIAN, T. SHIRI, E. J. BUCHMANN, C. L. CUTLAND a S. A. MADHI. Serotype-Specific Acquisition and Loss of Group B Streptococcus Recto-Vaginal Colonization in Late Pregnancy. *PLOS ONE*. 2014, roč. 9, č. 6.
11. MADZIVHANDILA, M., P. V. ADRIAN, C. L. CUTLAND, L. KUWANDA, S. J. SCHRAG a S. A. MADHI. Serotype Distribution and Invasive Potential of Group B Streptococcus Isolates Causing Disease in Infants and Colonizing Maternal-Newborn Dyads. *PLoS ONE*. 2011, roč. 6, č. 3.

12. HSUEH, P. R., L. J. TENG, L. N. LEE, S. W. HO, P. CH. YANG a K. T. LUH. High Incidence of Erythromycin Resistance among Clinical Isolates of *Streptococcus agalactiae* in Taiwan. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2001, roč. 45, č. 11, 3205–3208.
13. BETRIU, C., E. CULEBRAS, M. GÓMEZ, I. RODRÍGUEZ-AVIAL, B. A. SÁNCHEZ, M. C. ÁGREDA a J. J. PICAZO. Erythromycin and Clindamycin Resistance and Telithromycin Susceptibility in *Streptococcus agalactiae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2003, roč. 47, č. 3, 1112–1114.
14. EL BEITUNE, P., G. DUARTE a C. M. LEITE MAFFEI. Colonization by *Streptococcus agalactiae* During Pregnancy: Maternal and Perinatal Prognosis. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 2005, roč. 9, č. 3, s. 276-282.
15. EMANEINI, M., A. MIRSALEHIAN, R. BEIGVIERDI, A. A. I. FOOLADI, F. ASADI, F. JABALAMELI a M. TAHERIKALANI. High Incidence of Macrolide and Tetracycline Resistance among *Streptococcus Agalactiae* Strains Isolated from Clinical Samples in Tehran, Iran. *MAEDICA – a Journal of Clinical Medicine*. 2014, roč. 9, č. 2, s. 157-161.
16. ČEKANOVÁ, L. a M. KOLÁŘ. Rezistence komunitních kmenů *Streptococcus agalactiae* k makrolidovým antibiotikům. *Klinická farmakologie a farmacie*. 2008, roč. 2, č. 22, s. 55-57.
17. SCHRAG, S., R. GORWITZ, K. FULTZ-BUTTS a A. SCHUCHAT. Prevention of Perinatal Group B Streptococcal Disease: Revised Guidelines from CDC. *Morbidity and Mortality Weekly Report*. 2002, roč. 51, No. RR-11.
18. URBÁŠKOVÁ, P., V. JAKUBŮ a O. MELTER. Streptokoky - průkaz fenotypu rezistence k antibiotikům ze skupiny makrolidů, linkosamidů a streptograminu B. In: *Státní zdravotní ústav* [online]. 2007 [cit. 2015-01-02]. Dostupné z: <http://www.szu.cz/streptokoky-prukaz-fenotypu-rezistence-k-antibiotikum-ze?highlightWords=streptococcus+agalactiae>
19. HOLEC, V. Pro gynekology: Vyšetření GBS aneb screening *Streptococcus agalactiae* v těhotenství. In: *Zdravotní ústav se sídlem v Ostravě* [online]. 2005 [cit. 2015-01-02]. Dostupné z: <http://www.zuova.cz/Home/Sluzba/vysetreni-gbs>
20. MĚCHUROVÁ, A., R. VLK a V. UNZEITIG. Diagnostika a léčba streptokoků skupiny B v těhotenství a za porodu – doporučený postup. *Česká gynekologie*. 2013, č. 78, s. 11-14.
21. BACK, E. E., E. J. O'GRADY a J. D. BACK. High Rates of Perinatal Group B *Streptococcus* Clindamycin and Erythromycin Resistance in an Upstate New

- York Hospital. *Antimicrob Agents Chemotherapy*. 2012, roč. 2, č. 56, s. 739-742.
22. LAMBIASE, A., A. AGANGI, M. DEL PEZZO, F. QUAGLIA, A. TESTA, F. ROSSANO, P. MARTINELLI a M. R. CATANIA. In Vitro Resistance to Macrolides and Clindamycin by Group B Streptococcus Isolated from Pregnant and Nonpregnant Women. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*. 2012, vol. 2012.
 23. YOON, J. H., M. Y. KIM, E. J. KIM, J. H. YANG, H. M. RYU, K. Y. OH, J. H. SHIN, B. FOXMAN a M. KI. Risk Factors Associated with Group B Streptococcus Resistant to Clindamycin and Erythromycin in Pregnant Korean Women. *Infect Chemother*. 2013, roč. 3, č. 45, s. 299-307.
 24. BRZYCHCZY-WŁOCH, M., D. OCHOŃSKA a M. BULANDA. Carriage of group B streptococci in pregnant women from the region of Krakow and their antibiotic resistance in the years 2008-2012. *Polish Journal of Microbiology*. 2013, roč. 62, č. 4, s. 427-433.
 25. FRÖHLICHER, S., G. REICHEN, M. MÜLLER, D. SURBEK, S. DROZ, B. SPELLERBERG a P. SENDI. Serotype distribution and antimicrobial susceptibility of group B streptococci in pregnant women: results from a Swiss tertiary centre. *Swiss Medical Weekly* [online]. 2014, č. 144 [cit. 2015-01-06]. Dostupné z: <http://www.smw.ch/content/smw-2014-13935/>
 26. YAO, K., K. POULSEN, D. MAIONE, C. D. RINAUDO, L. BALDASSARRI, J. L. TELFORD, U. B. S. SØRENSEN, M. KILIAN a MEMBERS OF THE DEVANI STUDY GROUP. Capsular Gene Typing of Streptococcus agalactiae Compared to Serotyping by Latex Agglutination. *Journal of Clinical Microbiology*. 2013, roč. 51, č. 2, s. 503-507.
 27. FARO, J. P., K. BISHOP, G. RIDDLE, A. KAZT a S. FARO. Optimization of a rapid diagnostic test for detection of group B streptococcus from antepartum patients. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2012, roč. 73, č. 3, 236–238.
 28. LU, B., D. LI, Y. CUI, W. SUI, L. HUANG a X. LU. Epidemiology of Group B streptococcus isolated from pregnant women in Beijing, China. *Clinical Microbiology and Infection*. 2014, roč. 20, č. 6, O370-O373.
 29. BURIANOVÁ, I., M. PAULOVÁ, P. ČERMÁK a J. JANOTA. Colonization of Breast Milk of Group B Streptococcus Positive Mothers. *Journal of Human Lactation*. 2013, roč. 29, č. 4, 586–590.
 30. IPPOLITO, D. L., W. A. JAMES, D. TINNEMORE, R. R. HUANG, M. J. DEHART, J. WILLIAMS, M. A. WINGERD a S. T. DEMONS. Group B Streptococcus serotype prevalence in reproductive-age women at a tertiary care military medical center relative to global serotype distribution. *BMC Infectious*

Diseases. 2010, č. 10. Dostupné z: <http://www.biomedcentral.com/1471-2334/10/336>

31. MOTLOVÁ, J., L. STRAKOVÁ, P. URBÁŠKOVÁ, P. SAK a T. SEVER. Vaginal & rectal carriage of *Streptococcus agalactiae* in the Czech Republic: incidence, serotypes distribution & susceptibility to antibiotics. *Indian Journal of Medical Research*. 2004, č. 119, s. 84-87.
32. FARO, J., A. KATZ, K. BISHOP, G. RIDDLE a S. FARO. Rapid Diagnostic Test for Detection of Group B *Streptococcus*. *American Journal of Perinatology*. 2011, roč. 28, č. 10.
33. JURINKE, Ch., P. OETH a D. VAN DEN BOOM. MALDI-TOF mass spectrometry. *Molecular Biotechnology*. 2004, roč. 26, č. 2, s. 147-163.
34. NASRI, K., A. CHECHREI a M. S. MANAVI. Evaluation of vaginal group B streptococcal culture results after digital vaginal examination and its pattern of antibiotic resistance in pregnant women. *Iranian Journal of Reproductive Medicine*. 2013, roč. 11, č. 12, 999–1004.
35. ESKANDARIAN, N., Z. ISMAIL, V. NEELA, A. VAN BELKUM, M. N. M. DESA a S. AMIN NORDIN. Antimicrobial susceptibility profiles, serotype distribution and virulence determinants among invasive, non-invasive and colonizing *Streptococcus agalactiae* (group B streptococcus) from Malaysian patients. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2014, roč. 34, č. 3, s. 579-584.
36. Příbalové letáky ke kultivačním půdám od firmy BIO-RAD
37. Pracovní postupy Nemocnice České Budějovice a.s.
38. THE EUROPEAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING. *Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters: Version 5.0, valid from 2015-01-01*. 2015. Dostupné z: http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_5.0_Breakpoint_Table_01.pdf