

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO- TECHNOLOGICKÁ

SPECIÁLNÍ CHEMICKO-BIOLOGICKÉ OBORY
ZDRAVOTNÍ LABORANT

VÝSKYT *STREPTOCOCCUS AGALACTIAE*
V GENITÁLNÍM ÚSTROJÍ TĚHOTNÝCH ŽEN

Bc. Andrea Čapková

Bakalářská práce

Pardubice 2013

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2012/2013

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

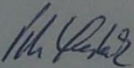
Jméno a příjmení: **Bc. Andrea Čapková**
Osobní číslo: **C10377**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Název tématu: **Výskyt Streptococcus agalactiae v genitálním ústrojí těhotných žen**
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

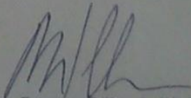
1. Vypracovat literární rešerši zaměřenou na výskyt Streptococcus agalactiae v genitálním ústrojí žen
2. Zjistit frekvenci výskytu Streptococcus agalactiae v genitálním ústrojí těhotných žen kulturační metodou
3. Ověřit citlivost izolovaných bakteriálních kmenů na vybraná antibiotika
4. Vyhodnotit získané výsledky a porovnat s publikovanými údaji

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Rozsah pracovní zprávy:
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**
Seznam odborné literatury:
Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce: **Mgr. Radek Sleha**
Katedra biologických a biochemických věd
Konzultant bakalářské práce: **Mgr. Eva Kusáková**
Katedra biologických a biochemických věd
Datum zadání bakalářské práce: **13. prosince 2012**
Termín odevzdání bakalářské práce: **19. července 2013**


prof. Ing. Petr Lošťák, DrSc.
děkan

L.S.


doc. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 15. února 2013

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Všechny použité literární prameny a informace v této práci jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle §60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne2013

Bc. Andrea Čapková

Na tomto místě bych ráda poděkovala RNDr. Petře Mosio, PhD. za zajímavý námět pro bakalářskou práci, Mgr. Radku Slehovi a Mgr. Sylvě Janovské, PhD. za odborné rady za veškerou pomoc a podporu, kterou mi poskytli.

Děkuji také Mgr. Ivaně Vančatové, vedoucí oddělení klinické mikrobiologie Laboratorního a diagnostického centra MeDiLa s.r.o.

ABSTRAKT

Bakalářská práce se zabývá významem bakterie *Streptococcus agalactiae* jako patogena v urogenitálním traktu těhotných žen. Největší nebezpečí však představuje pro novorozence, u kterých infekce probíhají pod klinickým obrazem meningitid a sepsí, což může mít vážné až fatální následky. Cílem práce bylo provést screeningové kultivační vyšetření poševních stěrů odebraných v 35. -37. týdnu těhotenství, identifikovat patogena vybranými metodami a u jednotlivých izolátů stanovit citlivost na určitá antibiotika.

Celkem bylo vyšetřeno 362 poševních vzorků. U 60 vzorků byla prokázána přítomnost bakterie *Streptococcus agalactiae*. Všechny izolované kmeny vykazovaly 100 % citlivost na penicilin. Naopak vysoká rezistence byla prokázána v případě tetracyklinu a cotrimoxazolu.

Klíčová slova: *Streptococcus agalactiae*, GBS, časné novorozenecké infekce, intrapartální antibiotická profylaxe, diagnostika

ABSTRACT

This thesis deals with the importance of *Streptococcus agalactiae* as a pathogen in the urogenital tract of pregnant women. This bacterium is the most dangerous for the infants. The neonatal GBS disease usually presents as meningitis and sepsis which may have serious or even fatal consequences. The aim of this work was to perform the culture-based screening of vaginal swabs during 35th-37th week of pregnancy, to identify the pathogen with the selected methods and to determine the antimicrobial susceptibility of *Streptococcus agalactiae* isolates.

362 vaginal swabs were examined. *Streptococcus agalactiae* was detected in 60 samples. All isolates were susceptible to penicillin. On the contrary, the high rates of GBS resistance to tetracycline and co-trimoxazole have been demonstrated.

Keywords: *Streptococcus agalactiae*, GBS, early neonatal infection, intrapartum antibiotic prophylaxis, diagnosis

Seznam použitých zkratek:

IAP antibiotická profylaxe

ATB antibiotika

CPS kapsulární polysacharid

DNA deoxyribonukleová kyselina

EIA enzymová imunoanalýza

ELISA z angl. enzyme-linked immunosorbent assay

EUCAST z angl. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

GBS streptokoky skupiny B

IgA imunoglobuliny třídy A

IgG imunoglobuliny třídy G

KA krevní agar

MIC minimální inhibiční koncentrace

MHK Mueller-Hintnův agar s krví

PCR polymerázová řetězová reakce

RT-PCR polymerázová řetězová reakce v reálném čase

S. streptococcus

THB Todd-Hewittův bujón

1. ÚVOD	1
2. TEORETICKÁ ČÁST	2
2.1. Historie a taxonomie	2
2.2. Charakteristika druhu Streptococcus agalactiae	3
2.2.1. Morfologie.....	3
2.2.2. Kultivační nároky	3
2.2.3. Citlivost k vnějším podmínkám	4
2.2.4. Biochemické vlastnosti	5
2.2.5. Antigenní struktura a faktory virulence	5
2.3. Onemocnění způsobená GBS	7
2.3.1. Výskyt S. agalactiae	7
2.3.2. Patogeneze.....	7
2.3.3. Klinický obraz infekcí GBS.....	8
2.3.4. Rizikové faktory	10
2.4. Prevence novorozeneckých infekcí GBS	10
2.4.1. Intrapartální antibiotická profylaxe.....	10
2.4.2. Vakcinace	12
2.5. Diagnostika	12
2.5.1. Vyšetřovaný materiál	12
2.5.2. Klasické metody přímé diagnostiky.....	13
2.5.3. Pokročilé metody přímé diagnostiky.....	14
2.5.4. Molekulárně biologické metody.....	16
2.5.5. Stanovení citlivosti k antibiotikům	17
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	19
3.1. Materiál	19
3.1.1. Sbírkové kmeny	19

3.1.2. Vyšetřovaný materiál	19
3.1.3. Kultivační média a diagnostické testy	19
3.1.4. Chemikálie a antibiotika	20
3.1.5. Přístroje	20
3.2. Pracovní postup	21
3.2.1. Přijetí vzorku	21
3.2.2. Kultivační vyšetření	21
3.2.3. Konfirmační testy	21
3.2.4. Stanovení citlivosti na ATB	23
4. VÝSLEDKY A DISKUZE	24
5. ZÁVĚR	29
6. Přílohy	30
6.1. Obrázky	30
6.2. Seznam příloh	35
7. Seznam použité literatury	36

1. ÚVOD

Streptococcus (S.) agalactiae náleží do skupiny B beta-hemolytických streptokoků. V anglicky psané literatuře je označován jako GBS (streptokoky skupiny B, z angl. Group B *Streptococci*). Dříve byl *S. agalactiae* považován za původce bovinní mastitidy spojené se ztrátou tvorby mléka. Nicméně, v sedmdesátých letech byl zjištěn jako dominantní původce invazivních onemocnění novorozenců a kojenců do tří měsíců života a rovněž onemocnění u gravidních žen. Klinicky se infekce novorozenců manifestují jako meningitidy, pneumonie a sepse.

Ve snaze co nejvíce redukovat incidenci novorozeneckých infekcí, centrum pro kontrolu a prevenci onemocnění (CDC, z angl. Center for Disease Control and Prevention) doporučuje prenatalní screeningové kultivační vyšetření všech těhotných žen ve 35.-37. týdnu gravidity. Vlivem úspěšné antibiotické prevence případy invazivních novorozeneckých infekcí postupně klesají, avšak objevuje se nárůst onemocnění u netěhotných dospělých žen a mužů. Patrně se jedná o zvýšené riziko infekce z důvodu chronických onemocnění spojených se sníženou obranyschopností.

Cílem bakalářské práce bylo provést cílené screeningové kultivace z pochev těhotných žen v období mezi 35-37. týdnem těhotenství. Dále, v případě positivity na *S. agalactiae* provést konfirmační identifikační testy, zjistit citlivost daného izolátu na antimikrobiální látky a vyhodnotit nálezy.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Historie a taxonomie

Bakterie *S. agalactiae* byla poprvé izolována v roce 1887 z případů bovinní mastitidy a až do šedesátých let 20. století nebyla označována jako lidský patogen z důvodu sporadicky se vyskytujících lidských infekcí (Heath, 2011). Od třicátých let byl *S. agalactiae* coby původce onemocnění spojován pouze s bovinními mastitidami, tedy zánětem vemen u skotu. Tyto záněty mohou mít ještě dnes velký ekonomický dopad v oblasti chovu dobytka, protože GBS může nakazit až 40% stáda, což se projeví snížením kvality a kvantity produkovaného mléka (Keefe et al., 1997).

Jako původce lidského onemocnění byl *S. agalactiae* poprvé izolován z vaginálních vzorků a vzorků při horečce omladnic ve třicátých letech minulého století (Lancefield a Hare, 1935). V sedmdesátých letech byl *S. agalactiae* označen již jako důležitý patogen způsobující invazivní bakteriální infekce u novorozenců v průběhu prvního týdne života. Od té doby je hlavním infekčním agens úmrtí novorozenců v průmyslových zemích, postihující 0,5 – 3 novorozence z 1000 živě narozených dětí (Melin, 2011; Baker, 2000; Lopez et al., 2005).

První klasifikace streptokoků, kromě biochemických a morfologických vlastností, byla postavena na typu hemolýzy. Rozeznáváme hemolýzu alfa, beta a gama. Alfa hemolýza se projevuje na krevním agaru jako viridace (změna krevního barviva na zelený verdoglobin). Při beta hemolýze dochází k úplné lýze erytrocytů. Pokud kmen nehemolyzuje, označuje se jako gama hemolytický (Sitkiewicz a Hryniewicz, 2010). *S. agalactiae* patří mezi beta-hemolytické streptokoky.

Průkopnicí v klasifikaci streptokoků byla na počátku třicátých let Rebecca Lancefield, která streptokoky rozdělila podle přítomnosti a typu povrchového antigenu – polysacharidu C. *S. agalactiae* obsahuje antigen B, patří proto do streptokoků skupiny B, resp. GBS (Sitkiewicz a Hryniewicz, 2010).

Taxonomie *S. agalactiae*:

doména: *Bacteria*

kmen: *Firmicutes*

třída: *Bacilli*

řád: *Lactobacilles*

čeleď: *Streptococcaceae*

rod: *Streptococcus*

(Sedláček, 2007)

2.2. Charakteristika druhu *Streptococcus agalactiae*

2.2.1. Morfologie

S. agalactiae patří mezi grampozitivní, nepohyblivé, nesporulující koky, uspořádané do dvojic až řetězků (Sitkiewicz a Hryniewicz, 2010; Sass, 2012).

2.2.2. Kultivační nároky

S. agalactiae je kultivačně náročný, vyžaduje půdy obohacené sérem nebo krví. Optimální teplota růstu je 37°C (rozsah 25-45°C). Na rozdíl od rodu *Staphylococcus* neroste při 10°C ani 45°C. V přítomnosti škrobu nebo za anaerobních podmínek tvoří většina kmenů oranžový pigment (Sedláček, 2007; Rotta et al., 1983).

Základním kultivačním médiem je krevní agar s 5% beraní krve, na kterém *S. agalactiae* vyrůstá v koloniích mnohem větších než *S. pyogenes*. Kolonie jsou mazlavé, šedo-bílé, lesklé, o průměru asi 3-4 mm, s úzkou zónou neostře ohraničené neúplné beta-hemolýzy v okolí (Rotta et al., 1983).

V místě s naočkovaným hemolyzin produkujícím kmenem *Staphylococcus aureus* dochází vlivem CAMP faktoru produkovaným *S. agalactiae* k zesílení hemolýzy *S. aureus*, což označujeme jako CAMP-fenomén. CAMP faktor se váže na membránu erytrocytů, narušenou stafylokokovou sfingomyelinázou C, což vede k úplné lýze erytrocytů. Intenzita hemolýzy se mění například složením kultivačního média nebo účinkem hemolyzinů jiných bakterií (Rotta et al., 1983)

2.2.3. Citlivost k vnějším podmínkám

Citlivost k desinfekčním prostředkům

S. agalactiae je citlivý na 2-5% fenol, 1% chlornan sodný, 4% formaldehyd, 2% glutaraldehyd, 70% ethanol, 70% propanol, 2% kyselinu peroctovou, 3-6% peroxid vodíku a jód (Collins a Kennedy, 1999).

Přežití mimo hostitele

Bakterie, jak bylo zjištěno, je schopna přežít několik měsíců v suchém prachu, přežívá i v mléce při teplotě -20°C po dobu 4 týdnů a ve tkáních ryb při teplotě -70°C po dobu 9 měsíců (Keefe, 1997; Evans et al., 2004).

Fyzická inaktivace

S. agalactiae je citlivý na vlhké teplo 55°C po dobu 30 minut, rovněž na vlhké teplo 121°C po dobu nejméně 15 minut a suché teplo 160-170°C po dobu nejméně 1 hodiny (Weavers et al., 2001).

2.2.4. Biochemické vlastnosti

S. agalactiae vykazuje společné vlastnosti rodu *Streptococcus*: je fakultativně anaerobní, chemoorganotrofní, kataláza negativní. Fermentuje glukózu, maltózu a sacharózu. Nefermentuje mannitol ani sorbitol. Všechny kmeny hydrolyzují hippurát sodný. Na rozdíl od enterokoků nehydrolyzuje škrob a eskulin, neprodukuje pyrrolidonylpeptidázu, tudíž PYR-test je negativní (Rotta et al., 1983; Sedláček et al., 2007).

2.2.5. Antigenní struktura a faktory virulence

Mimo skupinově specifického antigenu B obsahuje *S. agalactiae* typově specifické antigeny, většinou polysacharidové povahy. Faktory virulence jsou u streptokoků skupiny B popsány méně než u streptokoků skupiny A, do které patří například *S. pyogenes*.

Toxiny tvořící póry

Toxiny tvořící póry podporují vstup patogena do hostitelské buňky a umožňují jeho intracelulární přežití. *S. agalactiae* kóduje dva toxiny tvořící póry známé jako beta-hemolyzin/cytolysin a CAMP faktor (Nizet, 2002). Produkce hemolyzinu koreluje s produkcí oranžového pigmentu, který chrání bakterii před účinkem světelného záření. Důležitý pro patogenezi GBS je rovněž CAMP faktor. Jeho role v patogenezi však zůstává nejasná (Hensler, 2008).

Polysacharidové pouzdro

Jedním z hlavních faktorů virulence je pouzdro, které u sérotypu III obsahuje N-acetylneuraminovou(sialovou) kyselinu. Tato molekula brzdí aktivaci komplementu alternativní dráhou a fagocytózu (Měchurová et al., 2007).

Lancefieldová v roce 1934 určila pomocí precipitační reakce čtyři antigenní typy: Ia, Ib, II a III. Rozlišila je podle pouzdrných polysacharidových a proteinových antigenů. Ve všech typech polysacharidů byly nalezeny stejné látky, jako glukóza, galaktóza, N-acetylglukosamin a kyselina sialová, avšak v různém zastoupení (Rotta et al., 1983). Pomocí stejné metody byly následně určeny další sérotypy IV, V a VI (Jelínková a Motlová, 1985). Aktuálně je *S. agalactiae* rozdělen do devíti sérotypů: Ia, Ib, Ic, II – IX, proti kterým jsou při identifikaci používána monospecifická králičí antiséra (Woods a Levy, 2011).

Pro člověka je nejdůležitější sérotyp III, který převažuje u novorozenců s časnou i pozdní formou onemocnění (Poyart et al., 2008). Sérotyp V je odpovědný za infekce u starších a imunodeficientních pacientů (Persson et al., 2004). Zastoupení jednotlivých sérotypů bylo zjišťováno u zdravých jedinců, obou pohlaví a široké škále věku, a to z různých míst lidského těla. Vzorky byly odebrány z krku, kůže, rekta a genitálií. Byl proveden screening PCR a bylo zjištěno, že sérotyp III byl zastoupen v 24%, Ia v 21%, V v 18% a Ib v 17% (Van Der Mee-Marquet et al., 2008).

Faktory virulence modulující imunitní odpověď

S. agalactiae produkuje řadu faktorů, které se podílejí na modulaci imunitní odpovědi. Jedná se o ScpB proteázu, která štěpí C5a složku komplementu a ruší tak aktivitu polymorfonukleárních leukocytů (Takahashi et al., 1995). Mimoto ScpB ovlivňuje adhezi k hostitelským buňkám (Cheng et al., 2002). Dalším proteinem zasahujícím do imunitní odpovědi je serinová proteináza CspA, která štěpí fibrinogen, proteiny extracelulární matrix a degraduje chemokiny (Harris et al., 2003; Bryan and Shelver, 2009).

2.3. Onemocnění způsobená GBS

2.3.1. Výskyt *S. agalactiae*

Hlavními hostiteli *S. agalactiae* jsou lidé a hovězí dobytek. Šíření ze skotu na člověka možné je, ale většina kmenů nalezených u skotu se od lidských kmenů liší svými biochemickými vlastnostmi. Tento způsob přenosu nelze pokládat za významné riziko vzniku infekce u lidí (Murray et al., 2007; Barkema et al., 2009).

Přirozeným rezervoárem *S. agalactiae* je gastrointestinální trakt, kde se vyskytuje až u třetiny zdravé populace v rektu a ve střevech. Z trávicího traktu se mohou GBS dostat až do pochvy, kde se nachází u 10-40% těhotných i netěhotných žen. Osídlení může být chronické, přechodné nebo střídavé (Verani a Schrag, 2010). Rovněž jsou pozorovány rozdíly v kolonizaci populace vzhledem k věku, etnickým skupinám a geografickým podmínkám (Měchurová et al., 2007).

V dětském věku je přítomnost *S. agalactiae* běžná v trávicím traktu, kolonizace v genitálním traktu se objevuje až v období puberty. Zajímavostí je, že kolonizace není spojena s užíváním kontraceptiv, vaginálních čípků ani s přítomností jiné sexuálně přenosné choroby (Sass, 2012).

2.3.2. Patogeneze

K nákaze novorozenců dochází obvykle při průchodu plodu kolonizovanými porodními cestami. Takto onemocní asi 2% novorozenců (Sass, 2012). Další možností je vzestupné šíření bakterie do dělohy, kde vstupuje do plodového vaku skrz prasklé plodové obaly. Plod se může rovněž nakazit vdechnutím infikované plodové vody (Nizet, 2000). Riziko nákazy pro novorozence stoupá s množstvím GBS kolonizujících matku. Současně jakákoliv bakteriurie během těhotenství signalizuje masivní kolonizaci matky GBS (Ancona, 1980). Pokud se nakazí novorozenec při průchodu porodními cestami od své matky, pohybuje se novorozenecká mortalita mezi 5-20 %.

(Měchurová et al., 2007). Tento způsob přenosu je potvrzen také nálezy stejných klonů tohoto mikroorganismu u novorozenců a jejich matek (Hansen et al., 2004).

K infekci novorozence může dojít k i horizontálně, od jiného dítěte nebo ošetřujícího personálu. Tento způsob přenosu není tak běžný a pravděpodobně k němu dochází fekálně-orální cestou. Rovněž mastitida matky je potenciálním zdrojem infekce (Sass, 2012; Votava et al., 2003). U dospělého může dojít k infekci pohlavním stykem či autoinfekcí. U 3% mužů byl *S. agalactiae* prokázán trvale v uretře (srv.onzk.net).

Kolonizace a nákaza *S. agalactiae* se rovněž liší v závislosti na přítomnosti dalších poševních mikroorganismů. Sekret poševní sliznice zdravé ženy obsahuje 10^{8-9} /ml aerobních a fakultativně anaerobních bakterií a stejné množství anaerobních bakterií. Vyskytují se zde mikroaerofilní laktobacily, nepatogenní stafylokoky a mikrokoky, korynebakterie, bifidobakterie, propionibakterie, peptokoky, mikroaerofilní a anaerobní streptokoky, gramnegativní nefermentující tyčinky. V menším množství (méně než 10^4 /ml) se nalézají v poševním sekretu zdravé ženy druhy čeledi *Enterobacteriaceae*, *Gardnerella vaginalis*, nepatogenní kvasinky, mykoplazmata, ureaplazmata. Změnou poševního mikroprostředí, porušením jejího ekosystému může dojít ke zvýšení kolonizace touto bakterií a jejímu množení v pochvě (Duben et al., 1986).

2.3.3. Klinický obraz infekcí GBS

Novorozenecká onemocnění

Novorozenecké infekce se dělí na perinatální a postnatální. Protože však nelze přesně určit okamžik vzniku infekce, používá se klasifikace, podle níž je onemocnění děleno na časnou a pozdní formu (Blechová, 2006).

Časná infekce se obvykle objevují během prvních 24-48 hodin až 7 dnů po porodu (Koenig a Keenan, 2009). Vznikají během porodu, buď ještě v děloze při předčasném odtoku plodové vody,

nebo až při průchodu plodu porodním kanálem (Rajagopal, 2009). Novorozenci mohou přes placentu přijímat matčiny protilátky namířené proti polysacharidovému pouzdru. Množství těchto protilátek IgG koreluje s výší rizika časných infekcí (Margarit et al., 2009). Časně novorozenecké infekce se klinicky manifestují jako pneumonie, meningitidy, bakteriémie nebo toxický šok. Mezi nejčastější klinické symptomy patří letargie, cyanóza, horečka, podrážděnost, hypotenze a apnoe. Mortalita časných infekcí se uvádí kolem 5%, kdy nejvíce ohroženi jsou nezralí novorozenci narození před 33. týdnem těhotenství (Greenwood, 2007; Clifford, 2011 a Ryan et al., 2004).

Pozdní infekce se vyskytují mezi 8. dnem a 3. měsícem po porodu, kdy k většině onemocnění dochází obvykle koncem prvního měsíce života. V polovině případů se dítě nakazí až po porodu. Pozdní novorozenecké infekce probíhají nejčastěji jako bakteriémie a meningitidy. V menší míře se mohou manifestovat jako pneumonie, celulitidy anebo lokální infekce kostí a kloubů (Phares et al., 2000; Ryan et al., 2004, Beitune et al., 2007). Onemocnění s klinickým obrazem sepse a meningitidy má sice příznivější prognózu, ale zanechává trvalé následky v podobě poruch centrálního nervového systému, jako je slepota, hluchota nebo mentální retardace (Křížová, 2008).

Mimoto je definována velmi pozdní forma nástupu nemoci, která se vyskytuje u novorozenců po 3. měsíci života (Beitune et al., 2007). Uvádí se, že 65% úmrtí se vyskytuje u novorozenců s porodní hmotností menší než 2 500 g (Koenig a Keenan, 2009).

Onemocnění dospělých

U těhotných žen může *S. agalactiae* vyvolat infekce močového traktu, bakteriurii, chorioamnionitidu, potrat nebo předčasný porod (Phares et al., 2008). Infekce močových cest jsou společným projevem onemocnění vyvolaných GBS a jsou pozorovány u netěhotných i těhotných žen, ale i u mužů. Kromě močových infekcí může *S. agalactiae* způsobit u dospělých invazivní onemocnění, nejčastěji ve spojení s jinou závažnou chorobou, jako je diabetes mellitus, srdeční onemocnění nebo různé malignity (Edwards et al., 2005). Mezi nejzávažnější invazivní onemocnění

dospělých patří sepse. Dalšími klinickými projevy infekcí GBS u dospělých jsou endokarditidy, osteomyelitidy nebo artritidy (Yanai et al., 2011).

2.3.4. Rizikové faktory

Onemocnění novorozenců

Mezi nejdůležitější rizikové faktory infekcí GBS patří jakákoliv bakteriurie během těhotenství porod před 37. týdnem těhotenství, předčasná ruptura plodových obalů, odtok plodové vody více než 12 hodin před porodem, horečka rodičky během porodu, pozitivní vaginální kultivace na *S. agalactiae*, klinická asfyxie novorozence a agpar skóre nižší než 3 v první minutě po narození (Beitune et al., 2007).

Dalšími rizikovými faktory jsou nízká hladina cirkulujících protilátek proti GBS, věk matky nižší než 20 let, těhotenský diabetes mellitus (Beitune et al., 2007) a rovněž předchozí porod dítěte s časnou infekcí GBS (Měchurová, 2007).

Onemocnění dospělých

Rizikovými faktory onemocnění dospělých jsou věk nad 60 let, diabetes mellitus, onemocnění srdce a cév, malignity, alkoholismus, onemocnění jater a ledvin, předchozí mrtvice, dekubitální vředy nebo kortikosteroidní terapie (Matthijs et al., 2010).

2.4. Prevence novorozeneckých infekcí GBS

2.4.1. Intrapartální antibiotická profylaxe

Nejúčinnější způsob, jak redukovat časně novorozenecké infekce GBS, je screeningové kultivační vyšetření těhotných žen kombinované s intrapartální antibiotickou profylaxí (IAP) u kolonizovaných žen (Clifford 2011). Díky IAP se snížil výskyt časných infekcí GBS v Austrálii a

na Novém Zélandě až o 80% (Daley et al., 2004). IAP se indikuje po pozitivním kultivačním vyšetření provedeném ve 35. -37. týdnu gravidity. V období před porodem se kolonizace GBS nepřeléčuje, jelikož 70% žen je opět rekolonizováno. IAP se aplikuje intravenózně až při nástupu děložních kontrakcí nebo po odtoku plodové vody. V případě negativního výsledku kultivace se IAP nepodává (Měchurová, 2007). Pokud se u těhotné ženy objevil nález *S. agalactiae* kdykoliv během těhotenství, indikuje se IAP bez předchozí kultivace z pochvy či rekta.

Pokud kultivační vyšetření nebylo provedeno, nebo jeho výsledek není k dispozici, indikuje se IAP v přítomnosti alespoň jednoho z následujících rizikových faktorů:

- předčasný porod před 37. týdnem gravidity
- odtok plodové vody před více než 12 h.
- tělesná teplota matky během porodu více než 38°C
- přítomnost GBS v moči matky během těhotenství
- předchozí porod dítěte s časnou infekcí GBS (Měchurová, 2007; Clifford, 2011).

Lékem první volby je penicilin a ampicilin. Ženy alergické na beta-laktamová antibiotika mohou být léčeny cefazolinem, clindamycinem, popřípadě vankomycinem (kol. AAP, 2011). Antibiotika je nejvhodnější podávat více než 4 h před porodem, v opačném případě riziko kolonizace plodu narůstá. IAP se ukončuje současně s porodem plodu, v léčbě matky se pokračuje pouze v případě jasného klinického nálezu (Měchurová, 2007).

Vzhledem k vysoké rezistenci kmenů *S. agalactiae* k makrolidovým a linkosamidovým antibiotikům, nelze zmíněná antibiotika paušálně používat k léčebné profylaxi před porodem bez znalosti antibiotické citlivosti kmene (Balíková et al., 2011).

Kromě výše uvedené IAP patří rovněž k preventivním opatřením vzniku GBS infekcí podání vhodných antibiotik rizikovým novorozencům. Na novorozeneckých odděleních je nutné dodržovat provozně organizační a hygienické normy pro zabránění šíření infekce od kolonizovaných

novorozenců. K epidemiologickým opatřením náleží také hlášení nemocných a odběr biologického materiálu ke stanovení etiologie (Křížová, 2008).

2.4.2. Vakcinace

Imunizace žen před nebo v průběhu těhotenství by byla velmi atraktivní strategií v prevenci novorozeneckých onemocnění způsobených GBS. Slibné výsledky ukázaly klinické studie s kapsulárním polysacharidem (CPS) navázaným na tetanický toxoid (Paoletti a Madoff, 2002; Baker a Edwards, 2003). Limitujícím faktorem pro rozšíření konjugovaných CPS-vakcín je malá nebo žádná zkřížená protekce mezi jednotlivými sérotypy. Úspěšná profylaxe infekcí GBS by vyžadovala polyvalentní vakcínu namířenou proti převládajícím sérotypům (Johri et al., 2006; Edwards, 2008; Paoletti et al., 2008). Jiné vědecké skupiny využily k identifikaci vhodných kandidátů pro přípravu účinné vakcíny procesu reverzní vakcinologie (Tettelin et al., 2005; Maione et al., 2005).

2.5. Diagnostika

2.5.1. Vyšetřovaný materiál

Všechny těhotné ženy mezi 35. až 38. týdnem těhotenství by se měly podrobit screeningovému kultivačnímu vyšetření, které by prokázalo kolonizaci pochvy streptokoky skupiny B. Odběr kultivačních vzorků se provádí z postranních stěn dolní třetiny pochvy. Odběr materiálu z rekta není přínosem, proto kombinovaný odběr není indikován (Měchurová et al., 2007). Vzorky jsou po odběru ihned umístěny do transportního Amiesova média.

2.5.2. Klasické metody přímé diagnostiky

Mikroskopie

Při mikroskopickém vyšetření pozorujeme v preparátu obarveném podle Grama modrofialové koky v řetězcích. V praxi se mikroskopické vyšetření většinou neprovádí, pouze v případech pochybností a nutnosti odlišit *S. agalactiae* od jiných bakterií.

Princip Gramova barvení

Gramovo barvení umožňuje dělit běžné bakterie na dvě skupiny: grampozitivní barví se modře a gramnegativní barví se červeně. Rozdíl v barvitelnosti je podmíněn odlišným složením buněčné stěny u obou skupin bakterií. Během barvení se používají reagenty v tomto pořadí – krystalová violet, Lugolův roztok, aceton (vymyje předchozí barevný komplex barev z G- bakterií, z G+ ne) a karbolfuchsin. Preparát je prohlížen pod imerzí za použití objektivu se zvětšením 100x (Jakeš, 2011).

Kultivace

Standardní kultivační vyšetření umožňuje získat výsledek do 48 hodin. Kultivačním metodám se dává přednost před užitím tzv. rychlých diagnostických testů s vyšším rizikem falešně negativních výsledků. Rychlé diagnostické testy se využívají pouze v časové tísní (Holec, 2005).

Základní půdou ke kultivaci *S. agalactiae* je KA, na kterém vyrůstá v podobě bělavých kolonií se slabou beta-hemolýzou (obrázek 2). Pro izolaci GBS z klinického materiálu lze rovněž využít různé komerčně dostupné chromogenní půdy, např. StrepBSelect, kde *S. agalactiae* vyrůstá v podobě tmavých tyrkysových kolonií (obrázek 4). Další selektivní půdou pro izolaci GBS je Uriselect, kde GBS tvoří světle tyrkysové až modré kolonie (obrázek 3).

K pomnožení streptokoků skupiny B lze využít Todd-Hewittův bujón (THB), Jedná se o selektivní médium obsahující colistin a kyselinu nalidixovou. Růst streptokoků se projeví tvorbou sedimentu (Fenton a Harper, 1979).

2.5.3. Pokročilé metody přímé diagnostiky

Mezi pokročilé metody přímé diagnostiky GBS se řadí CAMP test, biochemické testy a přímá detekce antigenu.

CAMP test

Tento test se používá pro předběžnou identifikaci *S. agalactiae*. Test byl pojmenován podle vědců, kteří v roce 1944 CAMP faktor popsali (Christie, Atkins, Munch-Peterson). Podstatou testu je detekce extracelulárního CAMP faktoru, který působí synergicky s beta-hemolyzinem *Staphylococcus aureus* (Zahradníček, 2007; Sridhar, 2009). CAMP- fenoménu podobné reakce byly pozorovány rovněž u jiných druhů streptokoků, např. u *S. canis* (Hassan et al., 2005).

Bacitracinový test

Slouží k jednoduchému rozlišení beta-hemolytických streptokoků skupiny A od ostatních skupin. Test využívá vysoké citlivosti beta-hemolytických streptokoků skupiny A k nízké koncentraci bacitracinu (0,04 j.), která se projevuje vytvořením inhibiční zóny kolem bacitracinového disku (obrázek 5). Ostatní beta-hemolytické streptokoky jsou k této koncentraci bacitracinu rezistentní (Zahradníček, 2007).

Pyr test

Tento test slouží k rychlému rozlišení *S. pyogenes* od *S. agalactiae*. Jde o detekci pyrrolidonylpeptidázové aktivity, která je charakteristická pro *S. pyogenes*. Podstatou testu je hydrolýza substrátu obsaženém v diagnostickém proužku působením enzymu pyrrolidonylpeptidázy. Detekce se provádí po přidání činidla, kdy v pozitivním případě dochází ke

vzniku červeného zbarvení (Chen et al., 1997). Test je rychlý, levný, ale v běžné praxi se nevyužívá.

Detekce antigenu latexovou aglutinací

Principem testu je reakce z buněčné stěny extrahovaných antigenů, které jsou specifické pro danou skupinu streptokoků se specifickými protilátkami navázanými na latexové částice. Výhodou této metody je její nenáročnost na vybavení, jednoduchost a rychlost. Proto je vhodná pro rutinní testování. Výsledkem reakce je tvorba viditelných shluků. Touto metodou můžeme identifikovat přítomnost skupinového antigenu *B. S. agalactiae* (Howanitz a Howanitz, 1991)

Enzymová imunoanalýza (EIA)

Výhodou EIA testů v diagnostice infekcí GBS je rychlost získání výsledků. Na druhé straně jsou zatíženy vysokou falešnou negativitou, proto jsou považovány pouze za orientační a nemohou nahradit standardní laboratorní metody založené na kultivaci (Bartůňková et al., 2005).

EIA využívá stanovení v homogenních a heterogenních systémech. Homogenní systém představuje imunochemickou reakci v roztoku, kdežto heterogenní imunoanalýza využívá imobilizace protilátek nebo antigenů na pevnou fázi. V dnešní době se především uplatňuje heterogenní enzymová imunoanalýza, která je známa pod zkratkou ELISA (z angl. enzyme-linked immunosorbent assay). Principem EIA je kombinace selektivní tvorby imunokomplexů s vysokou citlivostí, kterou poskytuje amplifikační enzymová reakce. Citlivost této metody se pohybuje v rozmezí 10^{-3} až 10^{-9} mol/l (Bartůňková et al., 2005).

Metoda ELISA je založena na vysoce specifické vazebné reakci mezi antigenem a protilátkou. Pro metodu ELISA je typické značení detekčních protilátek pomocí enzymů, které katalyzují přeměnu substrátu na barevný produkt. Protilátka je adsorbována nebo kovalentně navázána na vhodný nosič (zkumavka, jamka mikrotitrační destičky, atd.), což usnadňuje separaci imunochemicky navázaných molekul. Vyhodnocení metody je vizuální nebo spektrofotometrické.

ELISA testy jsou vysoce specifické a využívají se k detekci specifických mikroorganismů, proteinů nebo toxinů (Bartůňková et al., 2005).

2.5.4. Molekulárně biologické metody

Tyto specifické a citlivé metody se používají k přímému průkazu cílové sekvence nukleových kyselin ve vzorcích poševního sekretu. Patří mezi tzv. rychlé diagnostické testy, avšak neumožňují stanovení citlivosti k antibiotikům.

Fluorescenční in situ hybridizace

Molekulární *in situ* hybridizace je založena na použití fluorochromem značené jednořetězcové hybridizační sondy, což je krátký úsek deoxyribonukleové kyseliny (DNA). Sonda se v důsledku komplementarity bází váže po denaturaci k cílové sekvenci DNA buněk nacházejících se na mikroskopickém skle. Sekvence s navázanou sondou je možné barevně rozlišit a pozorovat fluorescenčním mikroskopem vybaveným vhodnými fluorescenčními filtry (Savoia et al., 2008).

Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Základním principem PCR je opakovaná řízená denaturace dvouřetězcové DNA a následná renaturace osamocených řetězců se specifickými oligonukleotidy, které jsou v reakční směsi v nadbytku. Tyto oligonukleotidy slouží následně jako primery pro syntézu nového řetězce DNA. PCR se v mikrobiologii používá zejména k průkazu mikrobiální DNA ve vyšetřovaném vzorku. Její největší výhodou je rychlost a schopnost prokazovat i nekultivovatelné mikroby. Ve srovnání s klasickými technikami je PCR poměrně nákladná (Votava et al., 2000; Elabaradie et al., 2009).

Real-time PCR (RT-PCR) je založena na sledování průběhu polymerázové řetězové reakce (PCR) přímo během reakce („v reálném čase“) pomocí fluorescenčních sond či barviv, které

detekují množství PCR produktu zvýšením své fluorescenční aktivity. Její výhodou oproti konvenční PCR je možnost kvantifikace (Poitras a Houde, 2002).

2.5.5. Stanovení citlivosti k antibiotikům

Účinek antibiotika na bakterie lze v laboratoři zjistit několika metodami, které mají při pečlivém dodržení postupu srovnatelné výsledky. Metody sloužící ke zjišťování citlivosti na antibiotika se dělí na kvalitativní a kvantitativní. Mezi kvalitativní metody patří diskový difuzní test. V případě kvantitativního testu citlivosti, stanovujeme minimální inhibiční koncentraci (MIC), což je nejnižší koncentrace antibiotika v živné půdě, která inhibuje viditelný růst vyšetřované bakterie. MIC lze vyšetřit v bujonu, agaru, nebo E-testem.

EUCAST (z angl. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) uvádí tři kategorie, v nichž kmen je klinicky:

- citlivý, pokud aktivita antibiotika poskytuje vysokou pravděpodobnost úspěchu léčby
- rezistentní, pokud aktivita antibiotika poskytuje vysokou pravděpodobnost selhání léčby
- intermediárně rezistentní, pokud je úspěch léčby antibiotikem s danou aktivitou nejistý

(Urbášková et al., 2010).

Mikrodiluční test

Jedná se o metodu, kdy se hodnota MIC odečítá v jamkách mikrotitrační destičky, které obsahují různé koncentrace antibiotik v živném bujonu. Do jamek se očkuje standardní inokulum vyšetřovaného kmene bakterií a po příslušné době inkubace se odečítá MIC. Obvykle se připravuje osm koncentrací jednoho antibiotika v dvojnásobné geometrické řadě. Na jedné destičce se vyšetřuje MIC až 12 různých antibiotik pro jeden testovaný kmen (Zahradníček, 2007).

Agarová diluční metoda

Referenční kvantitativní metodou stanovení citlivosti k antimikrobiálním látkám je agarová diluční metoda. Užívá se rovněž pro stanovení MIC. Vyšetření se provádí v agarových půdách, které obsahují zvolené koncentrace antibiotik, obvykle v dvojnásobné geometrické řadě. Standardní

inokulum vyšetřovaných bakterií se očkuje na povrch půdy a po příslušné době inkubace se odečítá MIC. Pro určení citlivosti se hodnota MIC porovnává s hraniční hodnotou (Zahradníček, 2007).

Diskový difuzní test

Nejrozšířenější metodou v diagnostické praxi je disková difúzní metoda. Pro testování se používají papírové disky nasycené určitým množstvím antibiotika. Citlivost testovaného bakteriálního kmene se stanovuje podle průměru inhibiční zóny vytvořené kolem disku s určitým obsahem antibiotika.

Zóny se měří včetně disků a výsledky se uvádí v mm. Průměr zóny inhibice růstu se porovnává s hraničním průměrem inhibiční zóny pro citlivé kmeny. Vytvoří-li vyšetřovaný kmen inhibiční zónu o stejném nebo větším průměru než je hraniční průměr, pokládá se za citlivý k dané antimikrobiální látce. V opačném případě je rezistentní. (Zahradníček, 2007).

E-test

Slouží pro kvantitativní vyšetření citlivosti a kombinuje principy předchozích dvou metod. E-test je inertní plastický proužek, který na jedné straně obsahuje exponenciální gradient koncentrací stabilizované antimikrobiální látky v suchém stavu. Na druhé straně proužku je kontinuální stupnice patnácti ředění antibiotika, která slouží k odečítání MIC. Na povrch agarů naočkovaného inokulem testovaného mikroorganismu se přiloží E-test stranou, která obsahuje antimikrobiální látku. Po inkubaci se vytváří kolem proužku E-testu inhibiční zóna ve tvaru elipsy. MIC se odečítá v místě, kde elipsa protíná okraj proužku (Zahradníček, 2010).

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Experimentální část byla provedena na pracovišti Laboratorního a diagnostického centra MeDiLa s.r.o., na oddělení klinické mikrobiologie.

3.1. Materiál

3.1.1. Sbírkové kmeny

Bakteriální kmeny *S. agalactiae* (CCM 6187) a *Staphylococcus aureus* (CCM 3953) pocházely z české sbírky mikroorganismů. Sbírkové kmeny byly použity pro CAMP test a stanovení citlivosti k antibiotikům.

3.1.2. Vyšetřovaný materiál

Materiál ke kultivaci a průkazu *S. agalactiae* v rámci předporodního screeningu pocházel z ordinací obvodních gynekologů z oblasti Pardubic. Odběrová soustava obsahovala sterilní vatový tampon a transportní Amiesovo médium. Stěry byly provedeny z pochvy, výjimečně také z rekta. Po odběru byl materiál dopraven do laboratoří MeDiLa s.r.o. v rámci pravidelného svozu materiálu. Součástí dodání vzorků byly i žádanky k vyšetření.

3.1.3. Kultivační média a diagnostické testy

- Krevní agar (Viamar, šarže: KA732)
- URiselect: chromogenní půda pro přímé rozpoznání mikroorganismů (Biorad s.r.o., šarže: 2B2819)
- StrepBSelect: chromogenní půda pro přímé rozpoznání *S. agalactiae* (Biorad s.r.o., šarže: 2B2067)
- Todd-Hewittův bujón: selektivní bujón zvýhodňující streptokoky (Viamar, šarže: zTH5-12)

- Mueller-Hinton s krví (MHK) (Viamar, šarže: MHK 101)
- PastorexTM STREP: aglutinační test (Biorad s.r.o., šarže: 2F2156)
- Streptotest (Lachema s.r.o., šarže: 301212.)

3.1.4. Chemikálie a antibiotika

- Fyziologický roztok: 2ml, 3ml, 0,9% NaCl
- Suprachlor B – 1% roztok
- Antibiotické disky (Biorad s.r.o.)

Penicilin (šarže: 2A3018)

Erythromycin (šarže: 1G3253 a 1M3255)

Clindamycin (šarže: 1L3137)

Nitrofurantoin (šarže: 1L0016)

Tetracyklin (šarže: 1G3318 a 1K3319)

Cotrimoxazol (šarže: 1H3394)

3.1.5. Přístroje

- Mikroskop Zeiss amplival (Carl Zeiss NDR, sériové číslo: 531 673)
- Denzitometr DEN-1 Mc Farland (BioSan Ltd.Latvia)
- Termostat BT 120 (Laboratorní přístroje Praha, výrobní číslo: 3573)
- Desková biotřepačka PSU-2T (BioSan Ltd. Latvia, sériové číslo: 010102 1011 0259)
- Sterilizátor kliček (Nedform, Votice s.r.o., výrobní číslo: 1-04/11)
- Elektrické posuvné měřítko (P_PM/DM_01/MIK)

3.2. Pracovní postup

3.2.1. Přijetí vzorku

Po přijetí vyšetřovaného materiálu do laboratoře jsme provedli kontrolu shody označení vzorku jménem a rodným číslem s údaji na žádance vyplněné lékařem. V případě, že nebyla nalezena neshoda, vzorek jsme přijali, označili pořadovým číslem a klienta zadali do laboratorního informačního systému.

3.2.2. Kultivační vyšetření

Připravili jsme si potřebné půdy na kultivaci a označili je shodně s pořadovým číslem v laboratorním informačním systému.

Na jednotlivé půdy, tedy krevní agar a StrepBSelect agar jsme vatovým tampónem, na kterém byl vzorek z výtěru pacienta, provedli inokulaci. Poté jsme vatový tampón ponořili do THB, který je selektivním pomnožovacím médiem pro streptokoky. Abychom získali na kultivačních půdách jednotlivé čisté kolonie, provedli jsme izolaci inokula čárkováním. Všechny použité půdy i THB jsme nechali inkubovat v termostatu při 37°C po dobu 24 h. Po uvedené době inkubace jsme odečetli výsledek kultivace na plotnách a zároveň jsme provedli na stejné kultivační půdy inokulaci z THB. Plotny jsme opět nechali inkubovat v termostatu po dobu 24 h.

Následující den jsme vyhodnotili nárůst na půdách po pomnožení v bujónu. V případě pozitivního nálezu *S. agalactiae* po 24 hodinové inkubaci nebo až po pomnožení (48 h), jsme provedli biochemické a aglutinační testy a rovněž stanovení citlivosti na ATB.

3.2.3. Konfirmační testy

Při pozitivním kultivačním nálezu jsme vždy prováděli mikroskopické vyšetření připraveného preparátu a CAMP-test. V případě nejasných výsledků z výše uvedených diagnostických metod jsme pozitivní nález potvrzovali biochemickými a aglutinačními testy.

Mikroskopie

V kapce fyziologického roztoku na sklíčku jsme rozmíchali kolonii a nechali zaschnout na vzduchu. Poté jsme preparát tepelně fixovali nad plamenem.

Postup Gramova barvení

- fixovaný preparát jsme přelili roztokem krystalové violeti a barvili 60s, roztok jsme potom slili a preparát opláchli vodou
- následovalo barvení Lugolovým roztokem 60 s a poté opláchnutí vodou
- v dalším kroku jsme preparát odbarvovali acetonem a opláchli vodou
- v posledním kroku jsme dobarvovali safraninem po dobu 60 s, barvivo jsme slili a opláchli preparát vodou

Po oschnutí preparátu jsme mikroskopovali pod imerzním objektivem při celkovém zvětšení 1000x (100x objektiv a 10x okulár). V případě *S. agalactiae* jsme pozorovali G+ koky v kratších i delších řetězcích, ojediněle ve dvojicích či čtveřicích.

CAMP-test

Na krevní agar jsme naočkovali čáru testovaného kmene a z obou stran kolmo k ní jsme naočkovali čáru *Staphylococcus aureus*. Krevní agar jsme nechali inkubovat v termostatu při 37°C po dobu 24 h. V případě pozitivity došlo k zesílení účinku beta-hemolyzinu *Staphylococcus aureus* ve tvaru “*motýlích křídel*” (obrázek 6). Jako pozitivní kontrolu v CAMP-testu jsme použili sbírkový kmen *S. agalactiae*.

Aglutinační metoda

K určení skupinově specifického antigenu B jsme použili komerční aglutinační kit a postupovali jsme dle instrukcí výrobce. V případě pozitivního výsledku došlo po protřepání na třepače po dobu 3 min k reakci protilátky s antigenem skupiny B a ke vzniku viditelných shluků (obrázek 8).

Biochemické testy

Z neznámého kmene jsme si připravili suspenzi ve fyziologickém roztoku. Zákal suspenze odpovídal 2. stupni Mc Farlandovy zákalové stupnice. Do každé jamky mikrotitrační destičky použité soupravy jsme napipetovali 100 μ l bakteriální suspenze, podle návodu přidali do určených jamek parafinový olej a nechali inkubovat 24 h při 37°C v termostatu. Následující den jsme odečetli barevné reakce v jednotlivých jamkách (obrázek 7) a použitím speciálního počítačového programu jsme identifikovali kmen.

3.2.4. Stanovení citlivosti na ATB

U pozitivních vzorků na *S. agalactiae* jsme stanovovali citlivost izolovaných kmenů na řadu antibiotik: penicilin, cotrimoxazol, tetracyklin, nitrofurantoin, erythromycin a clindamycin. Vyšetření citlivosti jsme prováděli diskovou difúzní metodou

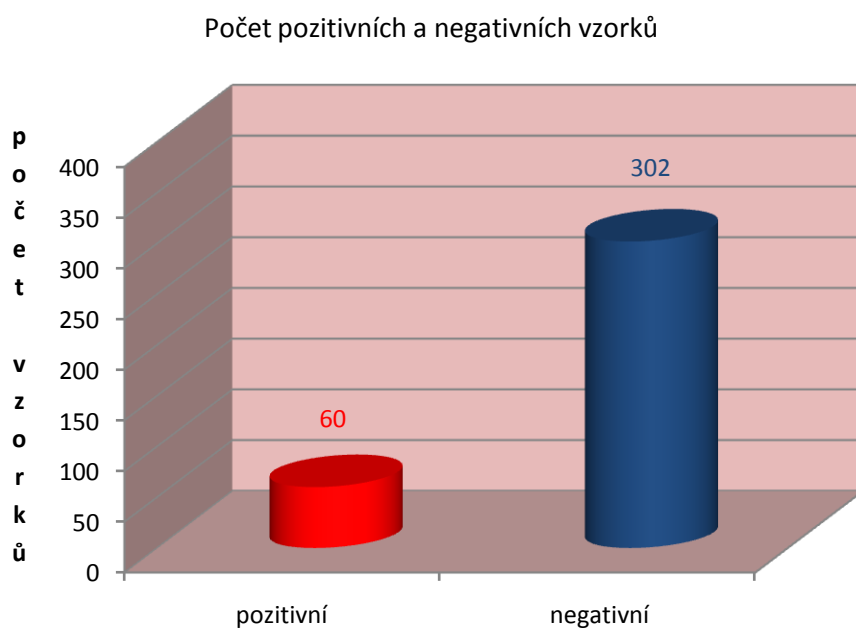
Inokulum jsme rozmíchali ve fyziologickém roztoku a připravili jsme bakteriální suspenzi o hodnotě 0,5 stupně Mc Farlandovy zákalové stupnice. Bakteriální suspenzi jsme naočkovali na MHK půdu. Na plotnu jsme dispenzorem aplikovali sadu antibiotických disků a plotnu jsme nechali inkubovat v termostatu při 37°C po dobu 24 h. Následující den jsme odečetli velikosti inhibičních zón a určili citlivost či rezistenci testovaného kmene na dané antibiotikum. Inhibiční zóny jsme měřili pomocí elektrického posuvného měřítka a porovnávali s hraničními hodnotami.

Kontrola disků pomocí CCM kontrolních kmenů se provádí 1x měsíčně a u každé nové šarže před uvedením do laboratorního provozu.

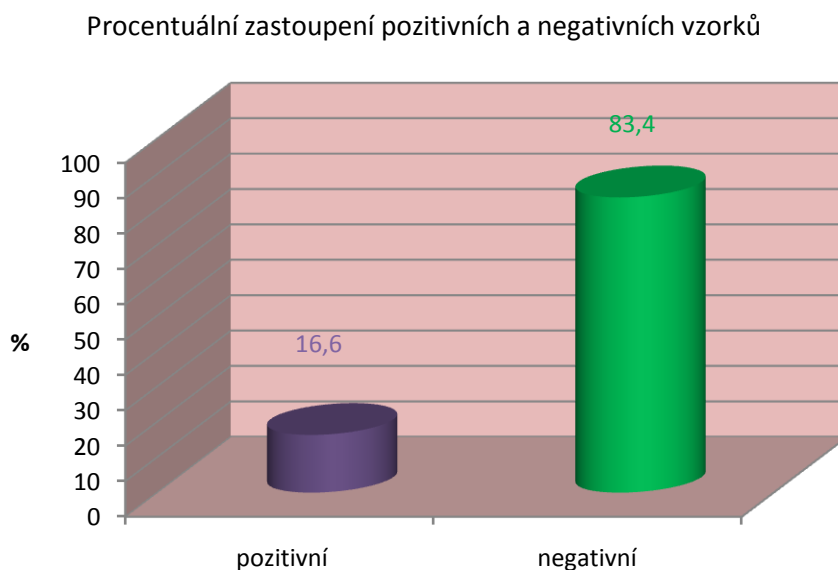
4. VÝSLEDKY A DISKUZE

Vzorky těhotných žen odebraných mezi 35.-37. týdnem gravidity jsme vyšetřovali po dobu 5 měsíců, v období duben-srpen 2012. Provedli jsme screeningové kultivační vyšetření vzorků od 362 pacientek ve věkové kategorii 16-45 let. Bakterii *S. agalactiae* jsme prokázali ve vzorcích od 60 pacientek (16,6%). V poševních vzorcích od zbývajících 302 pacientek (83,4%) jsme *S. agalactiae* nepotvrdili (graf 1 a 2)

Graf 1: Četnost nálezů z celkového počtu 362 vzorků



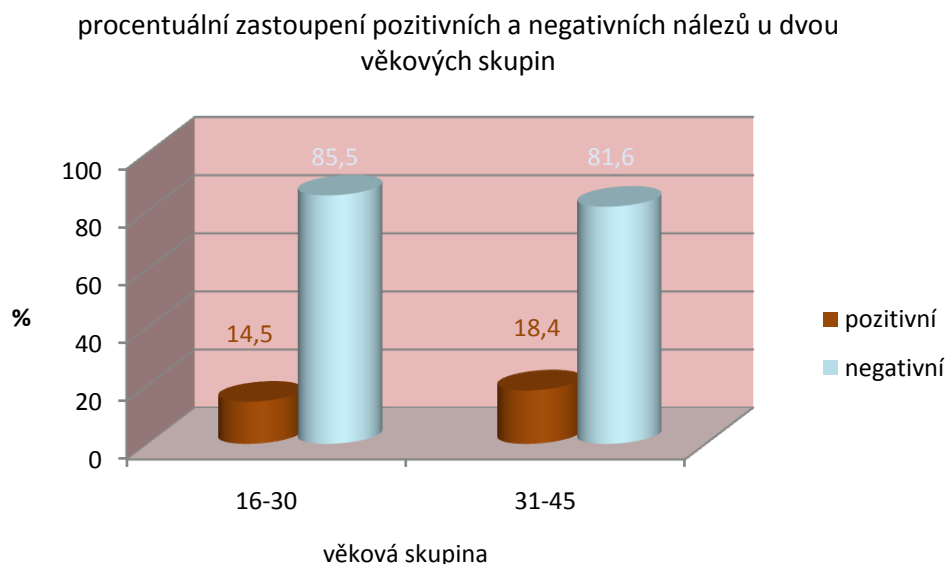
Graf 2: Procentuální zastoupení nálezů



Naše výsledky se shodují s daty publikovanými Barcaite et al. (2010), kteří popsali kolonizaci GBS u těhotných žen z východní Evropy v rozmezí 19,7-29,3%, v případě západní Evropy bylo kolonizováno GBS 11-21% těhotných žen, ve Skandinávii 24,3-36% a v jižní Evropě 6,5-36% žen. Naopak ve studii proběhlé v roce 2001-2002 na území České republiky, byla v rámci předporodního screeningu zjištěna poševní nebo rektální kolonizace GBS u 29,3% žen (Motlová et al., 2004). Vyšší procento výskytu *S. agalactiae* publikované Motlovou et al. (2004) může být z důvodu průkazu GBS ve stěrech jak z pochvy, tak z oblasti rektu. V našem případě se jednalo pouze o poševní stěry.

Někteří autoři zjistili, že kolonizace GBS se liší v závislosti na etnických skupinách, geografické lokalizaci a věku těhotných žen (Regan et al., 1991). Naše výsledky ukazují vyšší výskyt kolonizace GBS (18,4%) ve věkové skupině 31- 45 let, zatímco v mladší věkové skupině 16-30 let pozitivní nález GBS byl u 14,5% těhotných žen (graf 3). Samozřejmě, vyšší procento výskytu *S. agalactiae* ve starší věkové skupině může souviset s vyšším počtem vyšetřovaných žen této skupiny a zvyšujícím se věkem rodiček.

Graf 3: Pozitivní a negativní nálezy v různých věkových skupinách gravidních žen



U všech izolátů *S. agalactiae* jsme testovali citlivost na řadu antibiotik. Tabulka 1 a graf 4 ukazují citlivost izolátů GBS k jednotlivým antimikrobiálním látkám. Všechny izoláty byly citlivé k penicilinu, což potvrzují i výsledky jiné studie (Motlová et al., 2004). Penicilin je rovněž antibiotikem první volby v případě IAP novorozeneckých infekcí GBS (Verani et al., 2010). Nicméně, Dahesh et al. (2008) identifikovali izoláty GBS se sníženou citlivostí k penicilinu. Vysoce účinným antibiotikem je rovněž nitrofurantoin, kdy 58 izolátů GBS z celkového počtu 60 (97%) bylo citlivých k tomuto antibiotiku. Nitrofurantoin však nelze k IAP použít, jelikož jeho hladina nedosáhne účinné koncentrace v krvi matky ani v těle plodu po průchodu placentou (Simoes et al., 2004).

V případě dalšího testovaného antibiotika, erythromycinu, jsme zjistili vyšší počet rezistentních izolátů GBS (18%) ve srovnání se dvěma předešlými antibiotiky. Prevalence rezistence k erythromycinu mezi různými izoláty GBS se udává v rozmezí 7-25% (Andrews et al., 2000; Florindo et al., 2010). Uvádí se, že celosvětově vzrůstající rezistence k makrolidům, zvláště k erythromycinu, může být v důsledku léčby chlamydiových infekcí (Berkowitz et al., 1990). Méně

účinným antibiotikem byl rovněž clindamycin, kdy jsme u 10 izolátů (17%) pozorovali rezistenci k tomuto antibiotiku. Podobně Simoes et al. (2004) prokázali rezistenci ke clindamycinu u 19% vyšetřovaných izolátů GBS.

Tabulka 1: stanovení citlivosti k antibiotikům

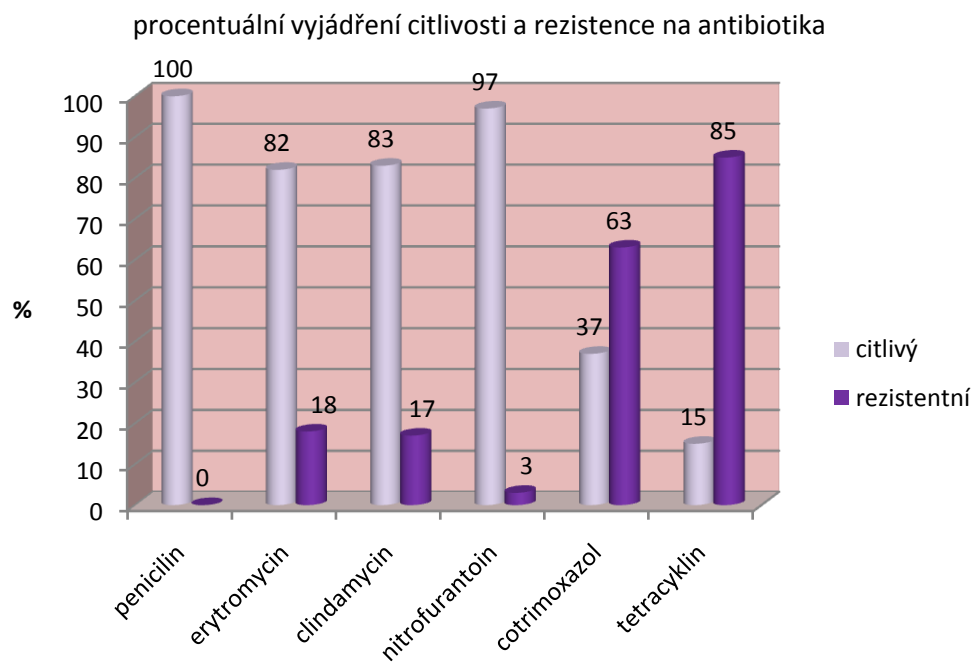
ATB	Obsah Látky	Break-point* (mm)		Počet citlivý	Počet Rezistentní	% citlivý	% rezistentní
penicilin	1 IU	C ≥ 18	R < 18	60	0	100	0
erythromycin	15 µg	C ≥ 21	R < 18	49	11	82	18
clindamycin	2 µg	C ≥ 17	R < 17	50	10	83	17
nitrofurantoin	100 µg	C ≥ 15	R < 15	58	2	97	3
cotrimoxazol	1,25+23,75 µg	C ≥ 18	R < 15	9	51	15	85
tetracyklin	30 µg	C ≥ 23	R < 20	22	38	37	63

* hraniční hodnota: C-citlivý, R-rezistentní

Zdroj break-pointů: SOP_MIK_003 MeDiLa s.r.o.

Neúčinnými antibiotiky byl tetracyklin a cotrimoxazol. U 63% izolátů jsme prokázali rezistenci k tetracyklinu. V případě cotrimoxazolu jsme rezistenci potvrdili u 85% izolátů. Výsledky publikované Motlovou et al. (2004) ukazují rovněž vysokou rezistenci (83,9%) izolátů GBS k tetracyklinu. Za rezistenci k tetracyklinu je pravděpodobně zodpovědná skupina ribozomálních protekčních *tet* genů, které již byly popsány u některých druhů streptokoků (Palmieri et al., 2012; Rato et al., 2013).

Graf 4: Citlivost a rezistence na antibiotika



5. ZÁVĚR

V rámci předložené bakalářské práce jsme provedli screeningová kultivační vyšetření pro průkaz streptokoků skupiny B z poševních stěrů odebraných těhotným ženám v rozmezí 35.-37. týdne gravidity.

Bakterii *S. agalactiae* jsme potvrdili vybranými metodami, které jsou rutinně používány v Laboratorním a diagnostickém centru MeDiLa s.r.o. u 16,6% těhotných žen.

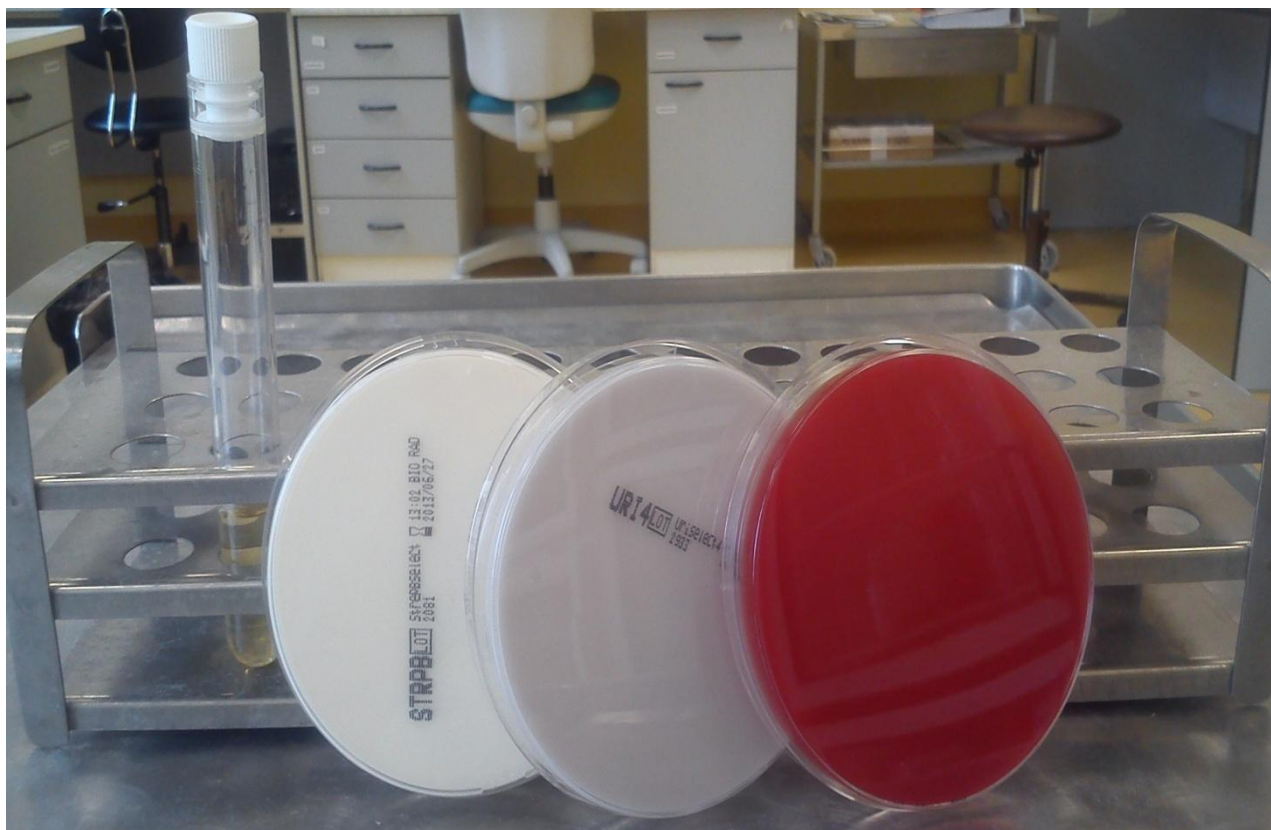
U jednotlivých izolovaných kmenů jsme rovněž testovali citlivost k některým druhům antibiotik diskovou difúzní metodou. U všech izolátů jsme potvrdili citlivost k penicilinu.

Naše výsledky jsme porovnali s jinými studiemi popisujícími kolonizaci těhotných žen streptokoky skupiny B a citlivost bakteriálních izolátů k antimikrobiálním látkám. Námi získané výsledky se shodují s dosud publikovanými daty.

6. Přílohy

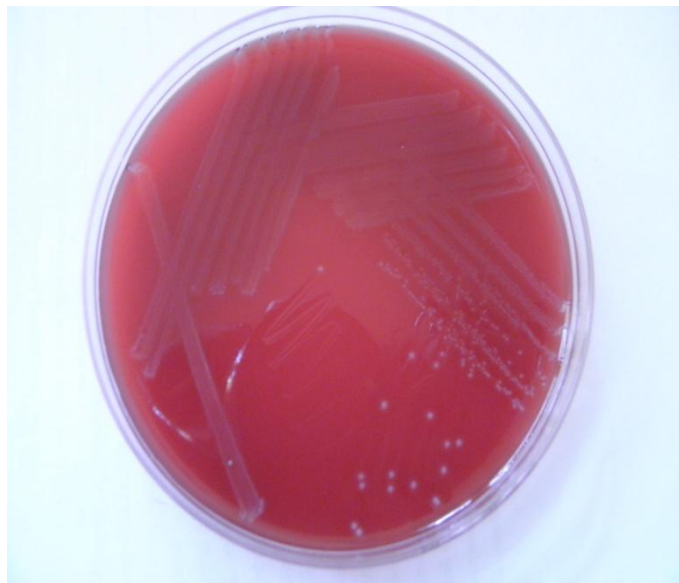
6.1. Obrázky

Obrázek 1: používané plotny a TH bujón



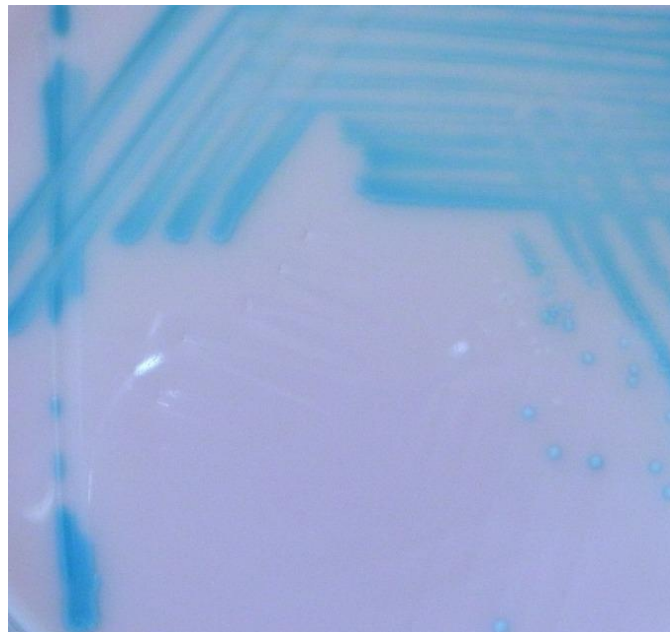
Zdroj: vlastní

Obrázek 2: *Streptococcus agalactiae* na krevním agaru



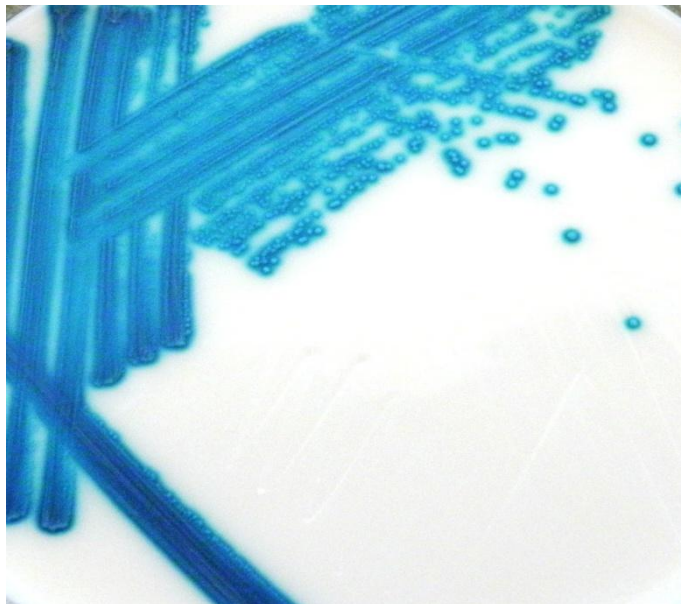
Zdroj: vlastní

Obrázek 3: *Streptococcus agalactiae* na URI Selectu



Zdroj: vlastní

Obrázek 4: *Streptococcus agalactiae* na StrepB agaru



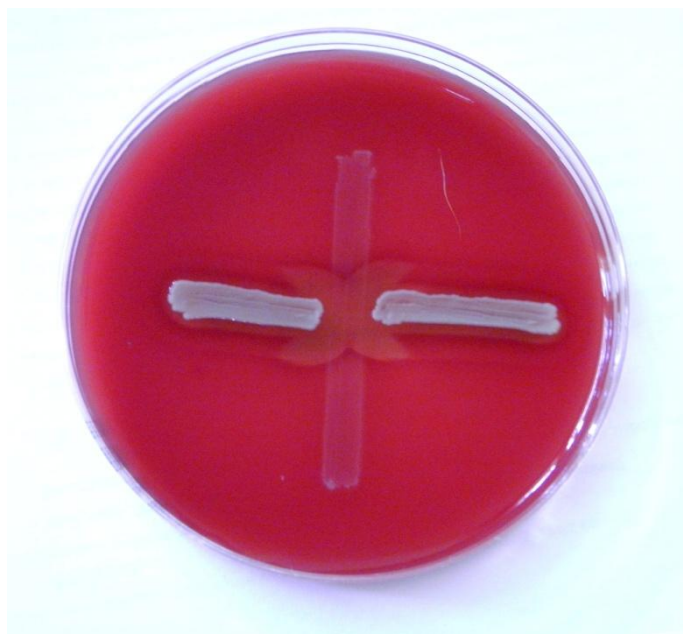
Zdroj: vlastní

Obrázek 5: porovnání bacitracinového testu *S. agalactiae* (-) a *S. pyogenes* (+)



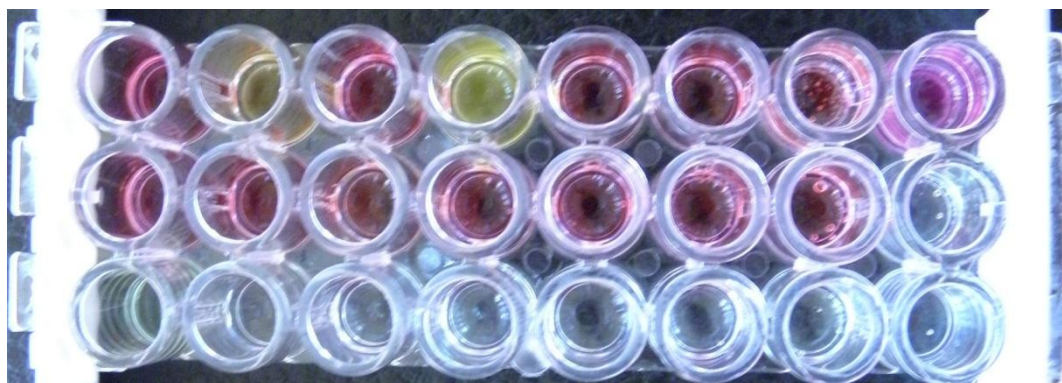
Zdroj: vlastní

Obrázek 6: Pozitivní CAMP test

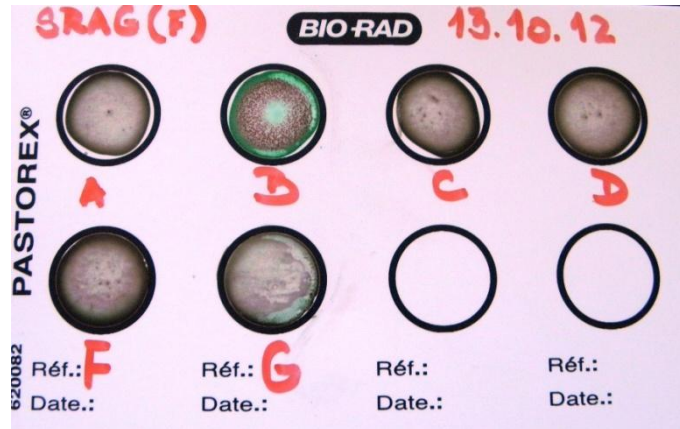


Zdroj: vlastní

Obrázek 7: Streptotest



Obrázek 8: Výsledek aglutinačního testu Pastorex™STREP



Zdroj: vlastní

6.2. Seznam příloh

<i>Graf 1: Četnost nálezů z celkového počtu 362 vzorků</i>	<i>24</i>
<i>Graf 2: Procentuální zastoupení nálezů</i>	<i>25</i>
<i>Graf 3: Pozitivní a negativní nálezy v různých věkových skupinách gravidních žen</i>	<i>26</i>
<i>Graf 4: Citlivost a rezistence na antibiotika</i>	<i>28</i>
<i>Obrázek 1: používané plotny a TH bujón.....</i>	<i>30</i>
<i>Obrázek 2: Streptococcus agalactiae na krevním agaru.....</i>	<i>31</i>
<i>Obrázek 3: Streptococcus agalactiae na URI Selectu</i>	<i>31</i>
<i>Obrázek 4: Streptococcus agalactiae na StrepB agaru</i>	<i>32</i>
<i>Obrázek 5: porovnání bacitracinového testu S. agalactiae (-) a S. pyogenes (+).....</i>	<i>32</i>
<i>Obrázek 6: Pozitivní CAMP test</i>	<i>33</i>
<i>Obrázek 7: Streptotest</i>	<i>33</i>
<i>Obrázek 8: Výsledek aglutinačního testu PastorexTM STREP.....</i>	<i>34</i>
<i>Tabulka 1: stanovení citlivosti k antibiotikům.....</i>	<i>27</i>

7. Seznam použité literatury

ANCONA, R.J., FERRIERI, P., WILLIAMS, P.P., Maternal factors that enhance the newborn infants acquisition of group B *streptococci*, *J.Med.Microbiol.*, 1980, 13:273-280

ANDREWS, J.I., DIEKEMA, D.J., HUNTER, S.K., RHOMBERG, P.R., PFALLER, M.A., JONES, R.N., DOERN, G.V., Group B *streptococci* causing neonatal bloodstream infection: antimicrobial susceptibility and serotyping results from SENTRY centers in the Western hemisphere, *Am.J.Obstet Gynecol.*, 2000, 183(4), 859-862

BAKER C. Group B streptococcal infections, *Oxford University Press*, 2000, 222-237

BAKER, C., EDWARDS, M., Group B streptococcal conjugate vaccines, *Arch. Dis. Child*, 2003, 88:375-378

BALÍKOVÁ, D., ADÁMKOVÁ, V., SVOBODOVÁ, J. Vysoká rezistence *Streptococcus agalactiae* na antibiotickou terapii druhé linie u časných a pozdních forem infekcí novorozence, *Česká gynekologie*, 2011, 76(3), 235-239, ISSN: 1210-7832

BARCAITE, E., BARTUSEVICIUS, A., TAMELIENE, R., KLIUCINSKAS, M., BALECKIENE, L., -NADISAUSKIENE, R. Prevalence of maternal group B streptococcal colonization in European countries, *Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavia*, 2008, 87(3), 260-271

BARKEMA, H. W., GREEN, M. J., BRADLEY, A. J., ZADOKS, R. N. Invited review: The role of contagious disease in udder health. *Journal of Dairy Scienc*, 2009, 92(10), 4717-4729

BARTUŇKOVÁ, J., PAULÍK, M., A KOL. *Vyšetřovací metody v imunologii*, 2011, 2, Praha:Grada Publishing, a.s., 164s., ISBN: 978-80-247-3533-7

BEITUNE, P.E., DUARTE, G., LEITE-MAFFEI, C.M. Colonization by *Streptococcus agalactiae* during pregnancy: maternal and perinatal prognosis, *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 2005, 9(4), 276-282

BERKOWITZ K., REGAN, J.A., GREENBERG, E., Antibiotics resistance patterns of group B streptococci in pregnant women, *J.Clin.Microbiol.*, 1990, 28(1), 5-7

BETRIU, C., CULEBRAS, E., GÓMEZ, M., RODRÍGUEZ-AVIAL, I., SÁNCHEZ, B.A., ÁGREDA, M.C., PICAZO,J.J. Erythromycin and Clindamycin resistance and Telithromycin susceptibility in *Streptococcus agalactiae*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2003, 47(3), 1112-1114

BLECHOVÁ, Zuzana. Hnisavé meningitidy nejmladších věkových skupin. *Neurologie pro praxi*, 2006, 7(3), 131-133

BOHNSACK, J.F., WIDJAJA, K., GHAZIADDEH, S., RUBENS, C.E., HILLYARD, D.R., PARKER, C.J., ALBERTINE, K.H., HILL, H.R., A role for C5 and C5a –ase in the acute neutrophil response to group B streptococcal infections, *J. Infect. Dis.*, 1997, 175: 847-855

BRYAN, J.D., SHELVER, D.W., *Streptococcus agalactiae* CspA is a serine protease that inactivates chemokines, *J.Bacteriol.*, 2009, 191: 1847-1854

CLIFFORD, V., GARLAND, S.M., GRIMWOOD, K. Prevention of neonatal group B streptococcus disease in the 21st century, *Journal of Paediatrics and child Health*, 2011, 48, 808-815

COLLINS, C. H.,KENNEDY, D. A. Laboratory acquired infections: History, incidence, causes and prevention, *Laboratory acquired infections* , 1999, 4, 1-37.

ČEKANOVÁ, L., KOLÁŘ, M. Rezistence komunitních kmenů *Streptococcus agalactiae* k makrolidovým antibiotikům, *Klinická Farmakologie a Farmacie*, 2008, 22(2), 55-57

DAHESH S., HENSLER, M.E., VAN SORGE, N.M., GERTZ, R.E.jr., SCHRAG, S.J., NIZET, V., BEALL, B.W., Point mutation in the group B streptococcal pbp2x gene conferring decreased susceptibility to beta-lactam antibiotics, *Antimicrob.Agents Chemother*, 2008, 52(8), 2915-2918

DALEY, A.J., ISAACS, D., and the Australasian Study Group for Neonatal Infections, Ten-Year Study on the Effect of Intrapartum Antibiotic Prophylaxis on Early Onset Group B Streptococcal

- and Escherichia coli Neonatal Sepsis in Australasia, *Pediatric Infectious Disease Journal*, 2004, 23(7),630-634
- DUBEN, J. a O. HAUSNER A KOL. *Vyšetření při bakteriálních onemocněních*. Praha: Avicenum, 1986, ISBN 735 21-08/7
- EDWARDS, M.S., BAKER, C.J., Group B Streptococcal infections in elderly adults, *Clin.Infect.Dis.*, 2005, 41:839-847
- EDWARDS, M.S., Group B Streptococcal conjugate vaccine: a timely koncept for which the time has come, *Hum.Vaccin.*, 2008, 4:444-448
- EDWARDS, R.J., TAYLOR, G.W., FERGUSON, M., MURRAY, S., RENDELL, N., WRIGLEY, A., BAI, Z., BOYLE, J., FINNEY, S.J., JONES, A., RUSSEL, H.H., TURNER, C., COHEN, J., FAULKNER, L., SRISKANDAN, S., Specific C-terminal cleavage and inactivation of interleukin-8 by invasive disease isolates of *Streptococcus pyogenes*, *J.Infect. Dis.*, 2005, 192:783-790
- ELBARADIE, S.M., MAHMOUD, M., FARID, M., Maternal and neonatal screening for Group B streptococci by SCP B gene based PCR:A preliminary study, *Indian Journal of Medical Microbiology*, 2009, 27(1), 17-22
- EVANS, J. J., WIEDEMAYOR, A. A., KLESIOUS, P. H., SHOEMAKER, C. A. Survival of *Streptococcus agalactiae* from frozen fish following natural and experimental infections. *Aquaculture*, 2004, 233, 15-21
- FENTON, L.J., HARPER, M.H., Evaluation of Colistin and Nalidixic Acid in Todd-Hewitt Broth of Selective Isolation of Group B *Streptococci*, *Journal of Clinical Microbiology*, 1979, 9(2), 167-169
- FLORINDO, C., VIEGAS, S., PAULINO, A., RODRIGUES, E., GOMES, J.P., BORREGO, M.J., Molecular characterization and antimicrobial susceptibility profiles in *Streptococcus agalactiae* colonizing strains: association of erythromycin resistance with subtype III-1 genetic clone family, *Clin.Microbiol.Infect.*, 2010, 16(9), 1458-1463

GREENWOOD, D., BARER, M., SLACK, R., IRVING, W. A guide to microbial infections: pathogenesis, immunity, laboratory diagnosis and control, *Medical microbiology*, 2007, 18, Elsevier Limited.

HANSEN, S.M., N. ULDBJERG, M. KILIAN a U.B. SKOR SORENSEN. Dynamics of *Streptococcus agalactiae* colonization in women during and after pregnancy and in their infants. *Journal of Clinical Microbiology*, 2004, 42(1), 83-89

HARRIS T.O., SHELVER, D.W., BOHNSACK, J.F., RUBENS, C.E., A novel streptococcal surface protease promotes virulence, resistance to opsonophagocytosis, and cleavage of human fibrinogen, *J.Clin.Invest.*, 2003, 111: 61-70

HASSAN, A.A., AKINEDEN, O., USLEBER, E., Identification of *Streptococcus canis* from milk of dairy cows with subclinical mastitis, *J.Clin.Microbiol.*, 2005, 43(3), 1234-1238

HEATH, P.T., An update on vaccination against group B *streptococcus*. *Expert Rev. Vaccines*, 2011, 10(5) 685-694.

HENSLER, M.E., QUACH, D., HSIEH, C.J., DORAN, K.S., NIZET, V. CAMP factor is not essential for systemic virulence of Group B *Streptococcus*, *Microb. Pathog.*, 2008, 44: 84-88

HOLEC, V. pro gynekology: Vyšetření GBS aneb *Streptococcus agalactiae* v těhotenství[online], Ostrava 2005, [cit.2013-04-03], dostupný z: <http://www.zuova.cz/informace/mgt002.php>

HOWANITZ and HOWANITZ, Laboratory Medicine. *Published by Church Livingston*; 1991, 825–828

<http://srv.onzk.net/PohlavniChoroby/>[online][cit.2013-04.03]

CHEN, CH., L. HUANG, J.H. LEE a W.H. LEE. Presumptive identification of *streptococci* by pyrrolidonyl-beta-naphthylamide (PYR) test, *Zhonghua Yi Xue Za Zhi (Taipei)*, 1997, 59(4) 259-264

CHENG, Q., STAFSLIEN, D., PURUSHOTHAMAN, S.S., CLEARY, P., The group B streptococcal C5a peptidase is both a specific protease and an invasion, *Infect. Immun.*, 2002, 70: 2408-2413

JAKEŠ, J. Bakterie III.- Gramovo barvení a imerzní mikroskopie, Praktický průvodce mikrosvětlem [online], 2009, [cit. 2013-05-06], dostupné z: <http://mikrosvet.mimoni.cz/ulohy/116-bakterie-3-gramovo-barveni-a-imerzni-mikroskopie>.

JELÍNKOVÁ, J. a J. MOTLOVÁ. Worldwide distribution of two new serotypes of group B *streptococci*: type IV and provisional type V. *Journal of Clinical Microbiology*, 1985, 21(3), 361-362

JOHRI, A.K., PAOLETTI, L.C., GLASER, P., et al., Group B *Streptococcus*: global incidence and vaccine development, *Nat.Rev. Microbiol.*, 2006, 4:932-942

KEEFE, G.P. *Streptococcus agalactiae* mastitis: a review. *The Canadian Veterinary Journal. La Revue Veterinaire Canadienne*. 1997 38(7), 429-437.

KOENING, J. M., KEENAN, W. J. Group B *streptococcus* and early-onset sepsis in the era of maternal prophylaxis. *Pediatric Clinics of North America*, 2009, 56(3), 689-708

kolektiv American Academy of pediatrics, Recommendations for the Prevention of Perinatal Group B Streptococcal (GBS) Disease, *Pediatrics*, 2011, 128(3), 611-616

KŘÍŽOVÁ, P. Streptokokové nákazy, aktualizovaný manual IV.SZÚ [online], 2008 [cit. 2013-04-03], dostupné z: <http://www.szu.cz/tema/prevence/streptokokove-nakazy-streptococcus-agalactiae>.

LANCEFIELD, R.C., HARE, R. The serological differentiation of pathogenic and non-pathogenic strains of hemolytic *streptococci* from parturient women, *J.Exp. Med.*, 1935, 61:335-349

LOPEZ SASTRE, J.B., FERNANDÉZ COLOMER, B., COTO COTALLO, G.D., RAMOS APARICIO, A., GRUPO DE HOSPIALES CASTRILLO. Trends in the epidemiology of neonatal sepsis of vertical transmission in the era of group B streptococcal prevention, *Acta Paediatr*, 2005, 94: 451-457

MAIONE, D., MARGARIT, I., RINAUDO, C.D., et al., Identification of a universal Group B *Streptococcus* valine by multiple genome screen, *Science*, 2005, 309:148-150

MARGARIT, I., RINAUDO, C.D., GALEOTTI, C.L., MAIONE, D., GHEZZO, C., BUTTAZZONI, E., ROSINI, R., RUNCI, Y., MORA, M., BUCCATO, S., PAGANI, M., TRESOLDI, E., BERARDI, A., CRET, R., BAKER, C.J., TELFORD, J.L., GRANDI, G. Preventing Bacterial Infections with Pilus-Based Vaccines: the Group B *Streptococcus* Paradigm, *The Journal of Infectious Diseases*, 2009, 199, 108-115

MATTHIJS, C.B., TUNKEL, A.R., VAN DE BEEK, D. Epidemiology, Diagnosis and Antimicrobial Treatment of Acute Bacterial meningitis, *Clinical Microbiology Reviews*, 2010, 23(3), 467-492

MĚCHUROVÁ, A., VLK, R., UNZEITIG, V., Doporučený postup při diagnostice a léčbě streptokoků skupiny B v těhotenství a za porodu. *Moderní gynekologie a porodnictví*. 2007, 16(1), ISSN 1211-1058.

MELIN P., Neonatal group B streptococcal disease: from pathogenesis to preventive strategies. *Clinical Microbiology and Infections*, 2011, 17, 1294-1303.

MOTLOVÁ, J., STRAKOVÁ, L. URBÁŠKOVÁ, P., SAK, P., SEVER, T. Vaginal and rectal carriage of *Streptococcus agalactiae* in the Czech Republic: incidence, serotypes distribution and susceptibility to antibiotics, *Indian J. Med Res.*, 2004, 119, 84-8

MULTIPLE AUTHORS, Bacterial agglutination, ASM Microbelibrary[online], 2011[cit.2013-04-03], dostupné z: <http://www.microbelibrary.org/library/laboratory-test/3519-bacterial-agglutination>

MURRAY, P. R., BARON, E. J., JORGENSEN, J. H., LANDRY, M. L., PFALLER, M. A. Phenol Red Agar Media, Base, Mannitol agar, *Manual of Clinical Microbiology*[online], 2007, 9[cit. 2013-04-03], dostupné z: <http://www.gobooke.net/manual-of-clinical-microbiology-9th-edition/>

NIZET, V. Streptococcal beta-hemolysins: genetics and role in disease pathogenesis, *Trends. Microbiol.*, 2002, 10:575-580

NIZET, V., FERRIERI, P., RUBENS, C.E. Molecular pathogenesis of group B streptococcal disease in newborns, *Oxford University Press*, 2000, 180-221

PALMIERI, C., MAGI, G., MINGOIA, M., BAGNARELLI, P., RIPA, S., VARALDO, P.E., FACINELLI, B., Characterization of a *Streptococcus suis* tet(O/W/32/O)-carrying element transferable to major streptococcal pathogens, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2012, 56(9), 4697-4702

PAOLETTI, L.C., MADOFF, L.C., Vaccines to prevent neonatal GBS infection, *Semin Neonatol.*, 2002, 7: 315–323

PAOLETTI, L.C., GUTTORMSEN, H.K., CHRISTIAN, M.S., HOBERMAN, A.M., McINNES, P., Neither antibody to a Group B Streptococcal conjugate vaccine nor the vaccine itself is teratogenic in rabbits, *Hum. Vaccin.*, 2008, 4:435- 443

PAOLETTI, L.C., MADOFF, L.C., Vaccines to prevent neonatal GBS infection, *Semin Neonatol.*, 2002, 7:315-323

PERSSON, E., BERG, S., Trollfors, B., LARSSON, P., BACKHAUS, E., CLAESSION, B.E., JONSSON, L., RADBERG, G., RIPA, T., JOHANSSON, S. Serotypes and clinical manifestations of invasive group B streptococcal infections in western Sweden 1998–2001. *Clin Microbiol Infect.* 2004;10:791–796

PHARES, CH.R., LYNFIELD, R., FARLEY, M.M., MOHLE-BOETANI, J., HARRISON, L.H., PETIT, S., CRAIG, A.S., SCHAFFNER, W., ZANSKY, S.M., GERSHMAN, K., STEFONEK, K.R., ALBANESE, B.A., ZELL, E.R., SCHUCHAT, A., SCHRAG, S.J. Epidemiology of invasive group B streptococcal disease in the United States 1999-2005, *The Journal of the American Medical Association*, 2008, 299(17), 2056-2065

POITRAS, E., HOUDE, A. La PCR en temps réel: principes et applications, *Reviews in Biology and Biotechnology*[online], 2002, 2(2), 2-11

POYART, C., REGLIER-POUPET, H., TAZI, A. et al., Invasive Group B streptococcal infections in infants, France, *Emerg. Infect Dis.*, 2008, 14:1647-1649

RAJAGOPAL, L. Understanding the regulation of Group B Streptococcal virulence factors, *Future microbiol*, 2009, 4(2), 201-222

RATO, M.G., BEXIGA, R., FLORINDO, C., CAVACO, L.M., VILELA, C.L., SANTOS-SANCHES, I., Antimicrobial resistance and molecular epidemiology of *streptococci* from bovine mastitis, *Vet. microbiol.*, 2013, 161(3-4), 286-294

REAGAN, J.A., KLEBANOFF, M.A., NUGENT, R.P., The epidemiology of group B streptococcal colonization in pregnancy. Vaginal Infections and Prematurity Study Group, *Obstet Gynecol.*, 1991, 77(4), 604-610

ROTTA, J., R. BÍCOVÁ, J. HAVLÍČEK, J. JELÍNKOVÁ, M. RÝC, Š. SIŤAJ a J. ŠRÁMEK. *Patogenní streptokoky*, Praha: Avicenum, 1983. ISBN 2-0859.823.

RYAN, K. J., Ray, C. G. An Introduction to Infectious Disease, *Sherris Medical Microbiology*, 2004, 4

SASS L. Group B Streptococcal Infections, *Pediatrics in Review*, 2012, 33(5), 219-224

SAVOIA, D., C. GOTTIMER, C. CROCILLA a M. ZUCCA. *Streptococcus agalactiae* in pregnant women: Phenotypic and genotypic characters. *Journal of Infection*, 2008, 56(2), 120-125

SCANZIANI, R., B. DOZIO, I. BARAGETTI, P. GRILLO, L. COLOMBO, S. DE LISO a M. SURIAN. Vaginal colonization with group B *Streptococcus (Streptococcus agalactiae)* and peritonitis in a woman on CAPD, *Nephrol Dial Transplant*. 1999, 14(9) 2222-2224

SEDLÁČEK, I. *Taxonomie prokaryot*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2007. ISBN 80-210-4207-9.

SIMOES, J.A., AROUTCHEVA, A.A., HEIMLER, I., FARO, S., Antibiotic resistance patterns of Group B streptococcal clinical isolates, *Infect Dis. Obstet Gynecol.*, 2004, 12(1), 1-8

SITKIEWICZ, I., HRYNIEWICZ, W. Pyogenic *Streptococci* – danger of Re-emerging Pathogens. *Polish Journal of Microbiology*, 2010, 59(4), 219-226.

SRIDHAR, R. P.N., *CAMP test*. Karnataka, 2009 [online] [cit2013-04-03], dostupné z: http://www.microrao.com/micronotes/camp_test.pdf

TAKAHASHI, S., NAGANO, Y., NAGANO, N., HAYASHI, O., TAGUCHI, F., OKUWAKI, Y., Role of C5a-ase in group B streptococcal resistance to opsonophagocytic killing, *Infect. Immun.*, 1995, 63: 4764-4769

TAN, CH.K., ULETT, K.B., SEELE, M., BENJAMIN, W.H.jr., ULETT, G.C. Prognostic value of semi-quantitative bacteriuria counts in the diagnosis of group B *streptococcus* urinary tract infections, *Infectious Diseases*, 2012, 12:273

TETTELIN, H., MASIGNANI, V., CIESLEWICZ, M.J., et al., Genome analysis of multiple pathogenic isolates of *Streptococcus agalactiae*: implications for the microbial „pan genome“, *Proc.Natl.Acad.Sci. USA*, 2005, 102:13950-13955

THAKER,M., SPANOGIANNOPOULOS, P., WRIGHT, G.D. The tetracyklin resistome, *Cellular and Molecular Life Science*, 2010, 67(3), 419-431

TYRREL, G.J., L.D. SENZILET, J.S. SPIKA, D.A. KERTESZ, M. ALAGARATNAM, M. LOVGREN a J.A. TALBOT. Invasive Disease Due to Group B Streptococcal Infection in Adults: Results From a Canadian, Population-Based, Active Laboratory Surveillance Study—1996. *The Journal of Infectious Diseases*,. 2000, 182(1), 168 - 173

URBÁŠKOVÁ, P. et al., Antibiotická rezistence u kmenů *Streptococcus agalactiae* izolovaných od gravidních žen a novorozenců v letech 2001-2002, *Praktický lékař*, 2003, 83(4), 203-207, Praha

VAN DER MEE-MARQUET, N., L. FOURNY, L. ARNAULT, A.S. DOMELIER, M. SALLOUM, M.F. LARTIQUE a R. QUENTIN. Molecular Characterization of Human-Colonizing *Streptococcus agalactiae* Strains Isolated from Throat, Skin, Anal Margin, and Genital Body Sites. *Jornal of Clinical Microbiology*,2008, 46(9), 2906-2911

VERANI, J.R., MCGEE, L., SCHRAG, S.J., Division of Bacterial Diseases, National Centre for Immunization and Respiratory Diseases, Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Prevention of perinatal group B streptococcal disease-revised guidelines from CDC, *MMWR Recomm.Rep.*, 2010, 59(RR-10), 1-36

VOTAVA, M., HORVÁH, R., DENDIS, M. Polymerázová řetězová reakce v mikrobiologické diagnostice, *Praktický lékař*, 2000, 80(11), 632-634, Praha: ČLS JEP, ISSN: 0032-6739

VOTAVA, M., L. ČERNOHORSKÁ, M. HEROLDOVÁ, V. HOLÁ, L. MEJZLÍKOVÁ, P. ONDROVČÍK, F. RŮŽIČKA, M. DVOŘÁKOVÁ, V. WOZNICOVÁ a O. ZAHRADNÍČEK. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun, 2006. ISBN 8090289665.

WEAVERS, L. K., WICKRAMANAYAKE, G. B. Disinfection and Sterilization Using Ozone, *Disinfection, Sterilization and preservation*, 2001, 5, 205-214.

WOODS, CH., J., LEVY, CH., S. *Streptococcus* Group B Infections, *Medscape -Drugs, Diseases and Procedures* [online], 2011 [cit. 2013-04-03], dostupné z: <http://emedicine.medscape.com/article/229091-overview#showall>

YANAI, H., HAMASAKI, H., TSUDA, N., ADACHI, H., MORIYAMA, R.S., MASUI, Y., MISHIMA, A. Group B *streptococcus* infection and diabetes: A review, *Journals of Microbiology and Antimicrobials*, 2012, 4(1), 1-5

ZAHRADNÍČEK, O. Stanovení citlivosti bakterií k antibiotikům diskovou difuzní metodou a diluční metodou, SOP 203, *Laboratoře mikrobiologického ústavu*, 2007, 1-21

ZAHRADNÍČEK, O. Vyšetření gynekologických a andrologických materiálů kulturačně a mikroskopicky, SOP 105, *Laboratoře mikrobiologického ústavu*, 2010, 13