

Středoškolská odborná činnost 2005/2006

Obor 6 - zdravotnictví

Enterokoky izolované z urogenitálního traktu lidí

Autor:

Milan Trojánek

Gymnázium Pardubice, Dašická 1083
53003 Pardubice, 8. ročník

Konzultant:

Doc. MVDr. Jaroslava Mazurová, CSc.

Katedra biologických a biochemických věd
Univerzita Pardubice

Pardubice, 2006

Pardubický kraj

Prohlašuji tímto, že jsem soutěžní práci vypracoval samostatně pod vedením doc. MVDr. Jaroslavy Mazurové, CSc. a uvedl jsem v seznamu literatury veškerou použitou literaturu a další informační zdroje, včetně internetu.

V Pardubicích dne 20. března 2006

Obsah

1.	Úvod	8
2.	Teoretická část	9
2.1	Vývoj a klasifikace rodu <i>Enterococcus</i>	9
2.2	Výskyt a klinický význam	10
2.3	Infekce vyvolané enterokoky	11
2.4	Morfologie a antigenní struktura.....	11
2.5	Faktory virulence	12
2.5.1	Schopnost adheze	12
2.5.2	Cytolysin	12
2.5.3	Proteáza	13
2.5.4	Hyaluronidáza	13
2.5.5	Extracelulární superoxid	13
2.6	Kultivační nároky	13
2.6.1	Média pro kultivaci enterokoků	14
2.6.2	Růst na agarových médiích	14
2.7	Identifikace rodu <i>Enterococcus</i>	15
2.8	Určení druhu	16
2.9	Citlivost na antibiotika	18
2.9.1	β -laktamová antibiotika	18
2.9.2	Glykopeptidová antibiotika	20
2.9.3	Fluorochinolony	21
2.9.4	Chloramfenikol	21
2.9.5	Tetracykliny	21
2.9.6	Současná situace	22
3.	Experimentální část	23
3.1	Materiál a metody	23
3.1.1	Kmeny enterokoků	23
3.1.2	Kultivační média	23
3.1.3	Diagnostické testy	23
3.1.4	Roztoky a činidla	24
3.1.5	Přístroje a pomůcky	24

3.1.6	Antibiotické disky	25
3.2	Pracovní postup	25
3.2.1	Kultivace	25
3.2.2	Typizace kmenů	25
3.2.2.1	Zařazení do rodu	25
3.2.2.2	Testy pro určení druhu	27
3.2.3	Stanovení citlivosti na antibiotika	28
4.	Výsledky	29
4.1	Druhy enterokoků	29
4.2	Vlastnosti enterokoků	30
4.2.1	Růst na kultivačních médiích	30
4.2.2	Morfologie buněk	30
4.2.3	Růstové, antigenní a biochemické vlastnosti	30
4.3	Citlivost na antibiotika	34
5.	Diskuze a závěr	40
6.	Přehled použité literatury	43

Seznam zkratk

AMC	amoxicilin/klavulanát
AMP	ampicilin
ARA	arabinóza
ARG	arginin
AS	agregační substance
ATB	antibiotikum
BE	žluč - eskulin
BHI	bujón
BKP	bromkresol-purpur
C	chloramfenikol
E.	Enterococcus
ENR	enrofloxacin
Esp	enterokokové povrchové proteiny
IE	infekční endokarditida
INU	inulin
KA	krevní agar
LAC	laktóza
LAP	leucinaminopeptidáza
MAN	manitol
MLB	melibióza
MLZ	melezitóza
PBP	penicillin-binding proteins
PYR	pyrrolidonylarylamidáza
RAF	rafinóza
S.	Streptococcus
SOE	sorbóza
SOR	sorbitol
sp.	species
TE	tetracyklin
TTC	2, 3, 5 – trifenyltetrazoliumchlorid
VA	vankomycin
VRE	vankomycin-rezistentní enterokoky

Na tomto místě bych velmi rád poděkoval paní doc. MVDr. Jaroslavě Mazurové, CSc. za odbornou pomoc a cenné rady při řešení této práce.

Dále bych chtěl poděkovat paní primářce MUDr. Ludmile Poustecké a panu MUDr. Karlu Menclovi, CSc. z Oddělení klinické mikrobiologie Krajské nemocnice v Pardubicích za laskavé poskytnutí kmenů.

Děkuji také slečně laborantce Martině Ulrichové za pomoc v laboratoři.

Souhrn

Ve své práci jsem se zabýval sledováním výskytu jednotlivých druhů enterokoků izolovaných z urogenitálního traktu pacientů, jejich vlastnostmi a rezistencí na antibiotika.

Studoval jsem celkem 197 kmenů enterokoků, které jsem na základě jejich růstových, morfologických, antigenních a biochemických vlastností zařadil do druhu. Nejčastěji jsem identifikoval druh *E. faecalis* (91,1 %) a jako *E. faecium* jsem určil 6,9 % kmenů. Z celkového počtu jsem pomocí testů, které jsem měl v laboratoři k dispozici, do druhu nezařadil 4 kmeny (2 %).

Z biochemických testů byla pro rozlišení *E. faecalis* a *E. faecium* nejvýznamnější utilizace arabinózy.

Všechny kmeny byly citlivé k vankomycinu.

Na ampicilin, amoxicilin/klavulanát a enrofloxacin byly rezistentní kmeny *E. faecium* (100 %).

Většina kmenů *E. faecalis* byla naopak beta-laktamovými antibiotiky inhibována (98,9 %). Rezistenci k enrofloxacinu vykazovalo 34,3 % kmenů uvedeného druhu.

Poměrně vysokou rezistenci jsem zaznamenal u obou druhů k tetracyklinu (64,6 % kmenů *E. faecalis* a 33,3 % kmenů *E. faecium*).

1. Úvod

Enterokoky jsou grampozitivní kokovité bakterie, které patří díky svým vlastnostem mezi poměrně široce rozšířené mikroorganismy. Jsou součástí přirozené mikroflóry gastrointestinálního traktu teplokrevných živočichů. Vyskytují se také na sliznicích urogenitálního a respiračního ústrojí i ve vnějším prostředí. Při mikrobiologickém vyšetření bývají izolovány z povrchových a odpadních vod, půdy, rostlin, krmiv i potravin.

Do 70. let 20. století byly enterokoky považovány za téměř neškodné mikroby. V následujících letech však byly stále častěji prokazovány jako původci různých onemocnění lidí i zvířat. Nejčastěji bývají izolovány z infekcí močových cest. Velmi nebezpečné jsou endokarditidy, meningitidy a sepse vyvolané těmito mikroorganismy.

V posledních letech se enterokoky staly také významnými původci nemocničních infekcí ohrožujících pacienty na jednotkách intenzivní péče, chirurgických i dalších odděleních. Velmi nebezpečná je vzrůstající rezistence enterokoků na antibiotika, zejména k vankomycinu. Vankomycin rezistentní enterokoky se začaly objevovat koncem 80. let a v současné době jsou rozšířeny po celém světě, hlavně v USA a západní Evropě. V České republice vzhledem k dobré antibiotické politice není frekvence jejich výskytu nijak vysoká.

Cílem této práce bylo sledování vlastností enterokoků izolovaných z urogenitálního traktu a jejich citlivosti na vybraná antibakteriální léčiva, včetně vankomycinu.

2. Teoretická část

2.1 Vývoj a klasifikace rodu *Enterococcus*

Francouzské slovo „énterocoque“ poprvé použil v roce 1899 Thiercelin, který popsal grampozitivní kokovité bakterie izolované ze stolice, které tvořily dvojice, či krátké řetízky (Abuhammour a Johnson, 2002).

Ve stejném roce popsali MacCallum a Hastings smrtelný případ endokarditidy v nemocnici Johna Hopkinse způsobený mikroorganismem označovaným jako *Micrococcus zymogenes*, který pravděpodobně představoval současný druh *Enterococcus (E.) faecalis* (Jett et al., 1994).

Thiercelin a Jouhaud v roce 1903 podali návrh vytvořit pro tyto grampozitivní koky samostatný rod *Enterococcus*. V roce 1906 však Andrewes a Horder přeřadili enterokoky navržené Thiercelinem a Jouhaudem do rodu *Streptococcus* a přidali druhový název *faecalis* (Hardie a Whiley, 1997). Orla-Jensen v roce 1919 poprvé popsal kmeny *Streptococcus (S.) faecium* jako druhý druh enterokoků (Parker a Duerden, 1988).

V roce 1933 vyvinula Lancefieldová pro streptokoky sérologické typizační schéma založené na průkazu skupinových antigenů obsažených v buněčné stěně, tzv. fekálním streptokokům přiřadila skupinový antigen D (Franz et al., 2003).

Sherman v roce 1937 rozdělil rod *Streptococcus* do 4 skupin: pyogenní, viridující, mléčné (laktokoky) a fekální streptokoky (enterokoky) (Klein, 2003).

Již v této době Sherman upozorňoval na výrazné rozdíly mezi enterokoky a streptokoky. Pouze enterokoky jsou schopné růst při teplotách 10 °C a 45 °C, v médiích s koncentrací 6,5 % NaCl, hodnotě pH 9,6, v přítomnosti 40 % žluče a přežívají působení teploty 60 °C po dobu 30 minut (Hardie a Whiley, 1997).

Studie využívající hybridizaci DNA v 80. letech prokázaly, že enterokoky jsou geneticky i antigenně odlišné od streptokoků. Rod *Enterococcus* jako samostatnou taxonomickou jednotku popsali až v roce 1984 Schleifer a Kilpper-Bälz. Původní druhy *S. faecalis*, *S. faecium*, *S. avium* a *S. gallinarum* byly po ustavení rodu *Enterococcus* přejmenovány na *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. avium* a *E. gallinarum* (Abuhammour a Johnson, 2002; Seman et al., 2003).

V současné době řadí Motlová (2003) do rodu *Enterococcus* celkem 28 druhů: *E. assini*, *E. avium*, *E. casseliflavus*, *E. cecorum*, *E. columbae*, *E. dispar*, *E. durans*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. flavescens*, *E. gallinarum*, *E. gilvus*, *E. haemoperoxidus*, *E. hirae*,

E. malodoratus, *E. moraviensis*, *E. mundtii*, *E. pallens*, *E. phoeniculicola*, *E. porcinus*, *E. pseudoaerium*, *E. raffinosus*, *E. ratti*, *E. seriolicida*, *E. solitarius*, *E. saccharolyticus*, *E. sulfureus*, *E. villorum*.

2.2 Výskyt a klinický význam

Enterokoky se vyskytují v různém prostředí zejména proto, že jsou schopné přežívat a množit se i ve velmi nepříznivých podmínkách (Kayser, 2003; Koch et al., 2004). Jsou izolovány od lidí, zvířat, z hmyzu, rostlin, půdy a povrchových vod. U člověka se běžně vyskytují v gastrointestinálním traktu. Jsou důležitou součástí mikroflóry, zejména tlustého střeva. Dosahují počtu 10^7 bakteriálních buněk v 1 g stolice. Příležitostně osidlují sliznice horních cest dýchacích a urogenitálního traktu (Beneš et al., 1997; Motlová, 2003).

Patogenita enterokoků je za normálních okolností poměrně nízká. Do postavení nebezpečného agens se dostaly především pro svoji extrémní odolnost vůči různým nepříznivým zevním vlivům, včetně rezistence na antibiotika (ATB), než pro svou virulenci (Beneš et al. 1997).

Dnes jsou enterokoky považovány za podmíněně patogenní mikroorganismy, které nabývají na významu, zejména při nemocničních tzv. nozokomiálních infekcích a superinfekcích, jako jsou endokarditidy, bakteriémie, infekce močových cest, centrálního nervového systému, dutiny břišní a infekce novorozenců. Postihují zejména pacienty vyššího věku, dlouhodobě hospitalizované, imunokompromitované, či jinak predisponované. Enterokoky přispívají k prodloužení doby léčby pacientů hospitalizovaných v nemocnicích a bohužel také k jejich zvýšené úmrtnosti (Motlová, 1997a; Koch et al., 2004).

Enterokokové infekce, včetně bakteriemií, vyvolávají ve většině případů druhy enterokoků, které jsou součástí vlastní tzv. endogenní mikroflóry, přičemž jejich hlavním zdrojem je urogenitální trakt (14 – 70 % infekcí), méně gastrointestinální trakt (3 – 27 %), který je hlavním rezervoárem těchto mikroorganismů (Davis et al., 1996).

Nejčastějšími původci enterokokových infekcí u lidí jsou *E. faecalis* (80 – 90 %) a *E. faecium* (10 – 20 %). Podíl dalších druhů enterokoků je poměrně vzácný (Jett et al., 1994; Urbášková, 1997).

2.3 Infekce vyvolané enterokoky

Enterokoky jsou známé zejména jako původci infekčních onemocnění urogenitálního traktu. Vyvolávají přibližně 10 % močových infekcí, které se vyskytují převážně u starších pacientů, pacientů s různými anatomickými abnormalitami v močových cestách a u pacientů opakovaně léčených antibiotiky (Moellering, 1992; Urbášková, 1997; Kayser, 2003).

Alexandrowicz (1999) sledoval zastoupení jednotlivých druhů enterokoků při infekcích urogenitálního traktu a zjistil, že nejčastěji se vyskytoval *E. faecalis* (72,8 %), dále zejména *E. faecium* (9,8 %) a *E. durans* (7,6 %).

Enterokoky jsou také třetími nejčastějšími původci bakteriemií nozokomiálního původu, mnohdy s vážnými až smrtelnými následky. Rizikovými faktory jejich vzniku jsou zavedené močové nebo cévní katetry, rozsáhlé popáleniny, infekce močového ústrojí, dutiny břišní, zejména žlučových cest a předchozí antibiotická léčba (Moellering, 1992; Motlová, 1997a; Urbášková, 1997; Beneš et al., 1997; Kayser, 2003).

Významné postavení zaujímají také v etiologii infekčních endokarditid (IE) jako následků enterokokových bakteriemií. Podle literárních údajů způsobují 5 – 20 % případů IE na nativních chlopních a 6 – 7 % na chlopních umělých (Beneš et al., 1997).

Nebezpečné jsou infekce centrálního nervového systému, které se vyskytují vzácně, především u novorozenců a pacientů po neurochirurgických operacích (Moellering, 1992).

Méně často způsobují enterokoky infekce dýchacích cest, vedlejších nosních dutin, uší, očí a dásní (Jett et al., 1994; Hardie a Whiley, 1997; Motlová, 2003; Koch et al., 2004).

2.4 Morfologie a antigenní struktura

Bakteriální buňky mají kulovitý, případně oválný tvar velikosti $0,6 - 2,0 \times 0,6 - 2,5 \mu\text{m}$. V preparátu obarveném podle Grama se barví modře, jsou grampozitivní. V mikroskopickém preparátu se vyskytují ve dvojicích nebo krátkých řetězcích, nikdy v tetradách (Holt et al., 1994; Bednář et al., 1996; Motlová, 1997a).

Nevytvářejí spory, ani zřetelné pouzdro. Většina enterokoků je nepohyblivá. Schopnost pohybu některých kmenů je dána přítomností jednoho nebo dvou bičíků a je typická pro kmeny druhu *E. casseliflavus* a *E. gallinarum*. Podle Motlové (1997a) je pohyblivost charakteristická i pro kmeny *E. flavescens*. Pohyb vykazují také 3 % kmenů *E. faecalis* a *E. faecium*.

Enterokoky mají silnou buněčnou stěnou, jejíž hlavní složkou je peptidoglykan. Kyselina glycerol – teichoová, která je obsažená v buněčné stěně, tvoří skupinový antigen D

společný pro většinu druhů rodu *Enterococcus* (Bednář et al., 1996; Votava et al., 2003). Zejména druh *E. avium* může navíc syntetizovat polysacharid, který je základem skupinového antigenu Q. Uvedené antigeny jsou prokazovány při sérologické typizaci enterokoků (Motlová, 1997a; Seman et al., 2003).

2.5 Faktory virulence

Mezi nejvýznamnější faktory virulence patří schopnost adheze k buňkám hostitelské tkáně, produkce cytolyzinu, proteázy, hyaluronidázy a extracelulárního superoxidu (Tendolkar et al., 2003; Kayser, 2003).

2.5.1 Schopnost adheze

Podmínkou vzniku infekčního procesu je přilnutí (adheze) enterokoků k buňkám hostitelské tkáně. Tento první stupeň rozvoje infekce umožňují povrchové struktury, tzv. adheziny, které zprostředkovávají vazbu enterokoků na specifické receptory buněk hostitele, případně i umělé povrchy (Jett et al., 1994; Kayser, 2003). Mezi nejznámější adheziny patří agregační substance (AS) a enterokokové povrchové proteiny (Esp). AS zvyšuje schopnost adheze enterokoků k epitelovým buňkám gastrointestinálního a urogenitálního traktu. Tento adhezin spolu s Esp se uplatňuje při infekcích močových cest, močového měchýře, ledvin a při endokarditidách. Tvorba AS je kódována na plasmidech, a proto tento faktor virulence může buňka ztratit nebo naopak získat.

Povrchové proteiny (Esp), jejichž syntéza je kódována v bakteriálním chromozomu, navíc zvyšují schopnost přilnutí enterokoků k umělým povrchům (různých katetrů, umělých srdečních chlopní atd.) a tvorbu bakteriálních povlaků, tzv. biofilmů (Jett et al., 1994; Schlievert et al., 1998; Bonten a Willems, 2001; Tendolkar et al., 2003; Kayser, 2003; Franz et al., 2003; Koch et al., 2004).

2.5.2 Cytolyzin

Cytolyzin nazývaný také β -hemolyzin poškozuje povrchové membrány eukaryotických buněk. Produkce cytolyzinu se projevuje hemolýzou erytrocytů v okolí kolonií enterokoků narostlých na krevním agaru (KA). Cytolyziny jsou kódovány cytolyzinovým operonem, umístěným většinou na plasmidech. V novějších studiích autoři uvádějí, že kmeny enterokoků, které produkují hemolyzin, mohou být virulentnější, než

kmeny bez tohoto faktoru (Jett et al., 1994; Huycke et al., 1998; Franz et al., 2003; Kayser, 2003; Tendolkar et al., 2003; Koch et al., 2004; Votava et al., 2003; Coque et al., 2005)

2.5.3 Proteáza

Jedná se o extracelulární enzym působící na kolagenní složky v tkáních. Hydrolyzuje želatínu, kasein, hemoglobin a jiné bioaktivní peptidy (Franz et al., 2003; Koch et al., 2004).

2.5.4 Hyaluronidáza

Hyaluronidáza je dalším z enzymů, jehož produkce byla zjištěna u některých kmenů *E. faecalis*. Tento enzym štěpí kyselinu hyaluronovou obsaženou v mezibuněčném tmelu a umožňuje šíření mikrobů a jejich metabolických produktů do tkání (Jett et al., 1994; Kayser, 2003).

2.5.5 Extracelulární superoxid

Nedávná pozorování ukazují, že některé kmeny *E. faecalis*, méně *E. faecium*, jsou schopny produkovat extracelulární superoxid, který negativně ovlivňuje buňky gastrointestinálního traktu, čímž umožňuje snadnější průnik těchto kmenů do tkání a dále do krevního oběhu. Produkce superoxidů byla o 60 % vyšší u kmenů vykultivovaných z hemokultur nemocných pacientů než u kmenů izolovaných z různého biologického materiálu od zdravých dobrovolníků (Huycke et al., 1998; Kayser, 2003; Tendolkar et al., 2003).

2.6 Kultivační nároky

Enterokoky patří mezi bakterie, které nemají zvláštní nároky na složení živných médií. Vyrůstají na základních půdách používaných v mikrobiologických laboratořích, v teplotním rozmezí 10 – 45 °C s optimem kolem 37 °C. Snášejí zvýšenou koncentraci chloridu sodného (6,5 %), žlučových solí (40 %) i vyšší pH (9,6) v živném médiu. Přežívají zahřátí na teplotu 60 °C po dobu 30 min. Většina druhů vyrůstá v běžných aerobních podmínkách. Růst některých druhů je však podporován přítomností 10 % CO₂ v inkubačním prostředí (Bednář et al., 1996; Hardie a Whiley, 1997; Huycke et al., 1998; Franz et al., 2003; Tendolkar et al., 2003; Votava et al., 2003).

2.6.1 Média pro kultivaci enterokoků

Základní živnou půdou pro kultivaci enterokoků je krevní agar (KA). V laboratořích je připravován z komerčně dodávaného základu pro KA, ke kterému se přidává 5 % nesrážlivé (defibrinované) beraní krve.

Dále se používají různá výběrová média, která obsahují látky potlačující růst ostatních mikroorganismů jako např. azid sodný, octan thalný, krystalová violet, žluč aj. Tyto půdy se označují jako „selektivní“. Do těchto půd se mohou přidávat další substance např. eskulin, 2, 3, 5 – trifenylnitrotetrazoliumchlorid (TTC), které enterokoky rozkládají, což se projeví charakteristickým růstem enterokoků. Takové půdy se nazývají „selektivně diagnostické“.

Nejnámější půdy obsahující azid sodný a 2, 3, 5 – trifenylnitrotetrazoliumchlorid (TTC), jsou Slanetz – Bartley agar nebo Agar pro izolaci fekálních streptokoků.

Poměrně často se užívá půda s obsahem žlučových solí a azidu sodného (žluč-eskulinový agar).

Mezi selektivně diagnostické půdy patří i Edwardsova půda s beraní krví, obsahující dále octan thalný, krystalovou violet a eskulin (OUHSC; Konemann a Elmer, 1988; Motlová, 1997a; Votava, 2000).

2.6.2 Růst na agarových médiích

Na KA vytvářejí enterokoky po 24 hodinové inkubaci při 37 °C šedobílé až šedostříbrné kolonie o velikosti 1 - 3 mm. V okolí narostlých kolonií lze pozorovat různé typy hemolýzy – α , β , γ , které jsou způsobené narušením cytoplazmatické membrány erytrocytů.

Alfa-hemolytické enterokoky způsobují pouze částečnou destrukci erytrocytů, což se na KA s beraní krví projevuje typickým zelenavým zbarvením média kolem kolonií. Podstatou alfa hemolýzy, neboli viridace (lat. viridis, zelený), je změna krevního barviva hemoglobinu na zelený verdoglobin. Tento typ hemolýzy tvoří především kmeny druhu *E. faecium* (SAARS; Konemann a Elmer, 1988).

Kolonie beta-hemolytických enterokoků způsobujících úplné rozrušení erytrocytů i hemoglobinu – beta-hemolýzu, jsou obklopeny zcela projasněnou zónou různé velikosti.

Cytolyzin produkovaný kmeny *E. faecalis* způsobuje úplnou hemolýzu na půdách obsahujících koňské, králičí, či lidské erytrocyty. Na KA s beraními erytrocyty se však tyto kmeny jeví jako gama-hemolytické (OUHSC).

Jako gama-hemolytické se označují enterokoky, které hemolýzu nevytvářejí (SAARS).

Většina enterokoků hydrolyzuje eskulin na eskuletin a glukózu, což se v přítomnosti citrátu železitého projeví vznikem hnědočerného zbarvení pod a v okolí kolonií na půdách obsahujících tyto látky, jako je např. žluč – eskulinový agar nebo Edwardsova půda.

Enterokoky dále redukují TTC za vzniku červeného formazánu, což se projeví vznikem červených kolonií na půdách Slanetz – Bartley agar či na agaru pro izolaci fekálních streptokoků, které tuto substanci obsahují (Merck, 1996).

Pro druhy *E. casseliflavus*, *E. mundtii*, *E. flavescens* a *E. sulfureus* je typické žluté zbarvení kolonií způsobené produkcí pigmentu (Motlová, 1997a).

2.7 Identifikace rodu *Enterococcus*

Mezi významná kritéria pro zařazení kmenů do rodu *Enterococcus* patří přítomnost skupinově specifického antigenu D (teichoová kyselina), produkce enzymu pyrrolidonylarylamidázy (PYR test), růst v bujónu při pH 9,6, růst v bujónu s 6,5 % NaCl, při teplotě 45 °C a hydrolýza eskulinu v přítomnosti 40 % žluči (žluč – eskulinový test). Mezi další vlastnosti podporující správné zařazení patří morfologie bakteriálních buněk a jejich uspořádání v zorném poli mikroskopu, produkce pseudokatalázy, pohyblivost a hemolytická aktivita (Motlová, 1997a).

Zařazení izolovaného kmene do rodu je někdy komplikované u druhů *E. pseudoavium*, *E. hirae*, *E. dispar*, *E. cecorum*, *E. columbae* a *E. saccharolyticus*, které postrádají jednu nebo více vlastností charakteristických pro tento rod. Rodová identifikace je také ztížena výskytem dalších gram pozitivních, katalázu nevytvářejících koků a kokobacilů, které mají některé vlastnosti typické pro enterokoky, včetně skupinového antigenu D. Jedná se zejména o mikroorganismy rodů *Pediococcus* a *Leuconostoc* (Kunderová, 1997). Rozdíly mezi výše zmíněnými rody jsou uvedeny v tabulce č. 1.

Tabulka č. 1: Rozdíly mezi rody gram pozitivních katalázu neprodukcujících koků a kokobacilů (Motlová, 1997b)

Rod	Mikroskopie				PYR	BE	6,5% NaCl	PLYN	LAP	D
	Ř	P	T	S						
<i>Enterococcus</i>	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+
<i>Streptococcus</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	+	v
<i>Lactococcus</i>	+	+	-	-	+	+	v	-	+	-
<i>Leuconostoc</i>	+	+	-	-	-	v	v	+	-	v
<i>Pediococcus</i>	-	+	+	+	-	+	v	-	+	+
<i>Aerococcus</i>	-	+	+	+	+	v	+	-	-	-
<i>Gemella</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	v	-

Legenda:

Mikroskopie: Ř ... řetízky, P ... páry, T ... tetrády, S ... shluky

PYR ... pyrrolidonylarylamidáza

BE ... žluč- eskulin

6,5 % NaCl ... růst v prostředí 6,5 % NaCl

PLYN ... plyn z glukózy

LAP ... leucinaminopeptidáza

D ... přítomnost skupinově specifického antigenu D

+ ... více než 80 % pozitivních, - ... méně než 80 % pozitivních, v ... variabilní

2.8 Určení druhu

Druhové určení enterokoků je založeno zejména na utilizaci sacharidů. Biochemická aktivita může být zjišťována konvenčními zkumavkovými testy připravenými v laboratoři nebo pomocí souborů mikrotěstů dodávanými různými firmami. Motlová (1997a) doporučuje pro druhovou identifikaci následující mikrotesty: API 20 Strep a Rapid ID 32 Strep firmy BioMérieux a EN-COCCUS test firmy Pliva-Lachema.

Přehled rozdílů ve fermentaci cukrů mezi jednotlivými druhy enterokoků udává tabulka č. 2.

Na možnost záměny laktóza-negativních kmenů *E. faecalis* za kmene druhu *E. solitarius* upozorňuje Ruoff et al. (1989). K potvrzení identifikace doporučují autoři použít další test prokazující redukci telluritu. Kmeny rodu *E. faecalis* v prostředí s obsahem 0,04 % telluritu rostou, zatímco kmene rodu *E. solitarius* nikoliv.

Pro odlišení *E. gallinarum* od *E. faecalis* a *E. faecium* doporučují Devriese et al. (1996) užití testu utilizace methyl- α -D-glukopyranozidu. Pozitivní je výsledek u kmenů *E. gallinarum*, negativní u kmenů *E. faecalis* a *E. faecium*.

Day et al. (2001) ve své studii zjistili, že 16 z 18 kmenů identifikovaných jako *E. faecium* utilizovalo sorbitol. Naproti tomu Facklam a Sahm (1995) uvádějí, že více než 97 % kmenů tohoto druhu sorbitol nerozkládalo. Citovaní autoři se neshodují ani ve výsledcích utilizace rafinózy. Day et al. (2001) pro odlišení *E. faecalis* a *E. faecium* od ostatních druhů rodu *Enterococcus* doporučují testy utilizace sorbózy, ribózy, L – arabinózy a pyruvátu, dále hydrolyzu argininu, průkaz motility, produkce pigmentu a růst v prostředí s 0,04 % telluritu. Podle Daye et al. (2001) se testy utilizace manitolu, sorbitolu a rafinózy ukázaly jako nespolehlivé.

Tabulka č. 2: Druhová identifikace enterokoků založená na fermentaci cukrů (Manero a Blanch, 1999)

Druh	INU	RAF	SAC	LAC	ARA	SOR	MAN	MLZ	MLB
<i>E. asini</i>	-	-		+	-	-	-	-	-
<i>E. avium</i>	d	-	+	+	+	+	+	+	d
<i>E. casseliflavus</i>	(+)	d	+	+	+	d	+	d	+
<i>E. cecorum</i>	+	+	+	+	-	d	d	d	+
<i>E. columbae</i>	+	+	+	(+)	+	+	+	(-)	+
<i>E. durans</i>	-	-	-	+	-	-	-	-	d
<i>E. dispar</i>	-	+	+	+	-	-	-	-	d
<i>E. faecalis</i>	-	-	+	+	-	+	+	(+)	-
<i>E. faecium</i>	-	d	(+)	+	+	-	+	-	(+)
<i>E. flavescens</i>	+	+	+	+	+	-	+	-	+
<i>E. gallinarum</i>	d	+	+	+	+	d	+	d	+
<i>E. hirae</i>	-	d	(+)	+	-	-	-	-	+
<i>E. malodoratus</i>	d	+	+	+	-	d	+	-	+
<i>E. mundtii</i>	d	(+)	+	+	+	d	+	d	+
<i>E. pseudoavium</i>	-	-	+	+	-	+	+	-	-
<i>E. raffinosus</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>E. saccharolyticus</i>	+	+	+	+	-	+	+	+	+
<i>E. solitarius</i>	-	-	+	-	-	d	+	+	(-)
<i>E. sulfureus</i>	-	+	+	+	-	-	-	+	+

Legenda:

- + 90 - 100 % kmenů pozitivních
- (+) 75 % - 89 % kmenů pozitivních
- v 26 - 76 % kmenů pozitivních

- (-) 11-25 % kmenů pozitivních
- 0-10 % pozitivních
- d variabilní reakce

INU ... inulin, RAF ... rafinóza, SAC ... sacharóza, LAC ... laktóza, ARA ... arabinóza, SOR ... sorbitol, MAN ... manitol, MLZ ... melezitóza, MLB ... melibióza

2.9 Citlivost na antibiotika

Enterokoky jsou přirozeně odolné k inhibičním účinkům mnoha antimikrobních látek. Tato odolnost je druhově specifická. V posledních letech je však zjišťována rezistence k původně účinným antibiotikům (Urbášková, 1997; Franz et al., 1999; Motlová, 2003).

2.9.1 β -laktamová antibiotika

Do skupiny β -laktamových antibiotik patří peniciliny, cefalosporiny, monobaktamy, karbapenemy a inhibitory beta-laktamázy. V zásadě mají stejný mechanismus účinku, tlumí syntézu peptidoglykanů buněčné stěny bakterií. Jádro těchto antibiotik tvoří β -laktamový kruh. Enterokoky jsou v nízkém stupni přirozeně rezistentní k penicilinům, karbapenům a zcela rezistentní k léčebným dávkám cefalosporinů. Příčinou přirozené rezistence enterokoků k β -laktamovým antibiotikům je nízká schopnost enterokoků vázat tato antibiotika (Beneš, 1996 et al.; Simon a Stille, 1998).

β -laktamová antibiotika se vážou na proteinovou část enzymů, které se podílejí na stavbě buněčné stěny. Tyto proteiny se označují jako penicilin - vazebné proteiny (penicillin - binding proteins - PBP). V bakteriálních buňkách je několik takových bílkovin (3 – 8) podle druhu mikroba. Podle molekulové hmotnosti a mechanismu účinku se PBP označují čísly. Různá vazebná místa tzv. receptory různých PBP mají rozdílnou afinitu k různým antibiotikům. Změnou struktury těchto proteinů dochází ke snížení až ztrátě vazebné afinity pro antibiotikum (Urbášková, 1997; Votava et al., 2003; Horáček, 2003).

V důsledku mutace produkuje buňka transpeptidázu PBP-5 s minimální afinitou k β -laktamovým antibiotikům a následně potlačuje funkci ostatních PBP. Nadprodukce nízkoafinitního PBP-5 byla prokázána u kmenů *E. faecium*, v menší míře i u kmenů *E. faecalis*, *E. durans*, *E. hirae* a dalších (Fontana et al., 1994; Hupková et al., 1995; Urbášková, 1997; Rice, 2001; Hällgren, 2001).

Zvýšená rezistence k β -laktamovým antibiotikům může být také způsobena produkcí enzymů rozkládajících tato antibiotika tzv. β -laktamáz. Účinkem enzymů je β -laktamový kruh tvořící základ těchto antibiotik narušen a antibiotikum se stává neúčinným.

Destruktivní účinky β -laktamáz lze eliminovat dalšími látkami tzv. inhibitory β -laktamáz z nichž nejznámější jsou kyselina klavulanová, sulbaktam a tazobaktam. V podstatě se jedná o β -laktamová antibiotika, která mají slabou antibakteriální aktivitu, ale vysokou afinitu k β -laktamázám produkovaným bakteriemi. Tato antibiotika se pevně vážou na aktivní centrum enzymu β -laktamázy a potlačují jeho hydrolytickou aktivitu. Užívají se v kombinaci s ostatními β -laktamovými antibiotiky, která chrání před účinky β -laktamáz (Simon a Stille, 1998).

První zpráva o výskytu β -laktamázy u *E. faecalis* byla zveřejněna v roce 1983 v USA (Urbášková, 1997). Produkce tohoto enzymu je však u enterokoků velmi nízká, byla prokázána téměř výhradně u kmenů druhu *E. faecalis* a ve většině případů je způsobena získáním β -laktamázového operonu od kmenů druhu *Staphylococcus aureus* (Rice, 2001).

V roce 1992 byly z pacientů na onkologickém oddělení v USA izolovány kmeny *E. faecium* s vysokým stupněm rezistence k ampicilinu i penicilinu. Žádný z nich neprodukoval β -laktamázu (Montecalvo et al., 1994).

V souboru 138 kmenů enterokoků izolovaných z krve 137 pacientů, hospitalizovaných v 18 českých nemocnicích byly zjištěny rozdíly v rezistenci k β -laktamovým antibiotikům u *E. faecalis* (94 kmenů) a *E. faecium* (44 kmenů). K ampicilinu a i k penicilinu byly rezistentní pouze kmeny *E. faecium* (81,8%) (Urbášková et al., 1997).

Calderón-Jaimes et al. (2003) testovali citlivost 60 kmenů *E. faecalis* a 37 kmenů *E. faecium* vykultivovaných z různého klinického materiálu. K penicilinu bylo rezistentních 8,3 % kmenů *E. faecalis* a 73 % kmenů *E. faecium*. Rezistenci k ampicilinu a amoxicilin/klavulanové kyselině zjistili u 3,3 % kmenů *E. faecalis* a 40,5 % *E. faecium*. Produkci β -laktamázy neprokázali u žádného kmene.

Většina enterokokových infekcí je způsobena druhem *E. faecalis* s dobrou citlivostí k aminopenicilinům např. ampicilin či amoxicilin, které jsou proto považovány za lék volby. V případě výskytu *E. faecium*, který je často k těmto antibiotikům rezistentní je nutné použít k léčbě jiná antibiotika zpravidla glykopeptidy (Kolář et al., 2003; Ševčíková a Ševčík, 2005).

2.9.2 Glykopeptidová antibiotika

Je známo přes 2000 druhů glykopeptidových antibiotik. V klinické praxi se používají především vankomycin (VAN) a teikoplanin, které jsou účinné na grampozitivní bakterie. Významné jsou jejich inhibiční účinky na enterokoky a stafylokoky. Zejména VAN je užíván k léčbě stafylokokových a enterokokových infekcí odolávajících léčbě jinými antibiotiky jako záložní antimikrobiální léčivo. V zemědělství se dříve používal avoparcin jako stimulační doplňková látka do tzv. medikovaných krmných směsí (Beneš et al., 1997; Molterer, 1998; Simon et al., 1998; Horáček, 2003; Kolář et al., 2003).

Mechanismus účinku glykopeptidových ATB spočívá v inhibici syntézy peptidoglykanu, který je hlavní součástí buněčné stěny. Glykopeptidy se váží na složky stěnového peptidu a tím zabraňují růstu buňky (Beneš et al., 1997).

Rezistence k VAN je způsobena změnou části peptidu peptidoglykanové molekuly a to konkrétně dipeptidu D-Ala-D-Ala na D-Ala-D-Lac, který VAN neváže (Méndez-Álvarez et al., 2000; Horáček, 2003).

Výskyt vankomycin rezistentních enterokoků (VRE) byl poprvé zjištěn v roce 1986 ve Francii. O rok později byly publikovány nálezy těchto mikroorganismů ve Velké Británii a USA. Záchyt VRE v USA vzrostl do roku 1997 z 0,3 % na 23,4 %. Za hlavní rizikový faktor vzestupu rezistence v nemocnicích v USA je považováno časté užívání VAN k léčbě (Urbášková, 1997; Stosor et al., 1998; Méndez-Álvarez et al., 2000; Chavers et al., 2003).

V Evropě byla rezistence k vankomycinu zaznamenána nejen u vzorků od nemocničních pacientů, ale i bezpříznakových nosičů a hospodářských zvířat. Tento výskyt je dáván do souvislosti s užíváním avoparcinu v krmných směsích pro urychlení růstu, drůbeže a prasat, která se zřejmě stala zdrojem VRE pro člověka. Z tohoto důvodu bylo užívání avoparcinu v zemích EU zrušeno (Molterer, 1998; Willems et al., 2005).

VRE byly prokázány také v České republice. První VRE (*E. faecium*) byl zaslán do Národní referenční laboratoře pro ATB v červnu 1995 (Urbášková a Motlová, 1997).

V roce 1997 diagnostikovali VRE ve FN v Olomouci a ve FN v Plzni. V Olomouci vykultivovali ze 3 pacientů z hemato-onkologické kliniky 2 kmeny *E. faecalis* a 1 kmen *E. faecium*. V Plzni izolovali 2 kmeny od pacienta z hemato-onkologického a chirurgického oddělení. Kmeny byly identifikovány jako *E. faecalis* a *E. faecium* (Bergerová a Turková, 1997; Kolář a Vágnerová, 1997).

Kolář et al. (2004) sledovali v průběhu roku 2003 výskyt VRE v Olomouckém kraji. Ze stěrů z rekta celkem izolovali 588 kmenů *Enterococcus sp.*, z nichž 485 (87 %) bylo identifikováno jako *E. faecalis*, 39 (7 %) jako *E. faecium* a 34 (6 %) jako *Enterococcus sp.*

Testy citlivosti potvrdily rezistenci k ampicilinu u 77 % kmenů *E. faecium* a 2 % *E. faecalis*. K tetracyklinu bylo rezistentních 67 % kmenů *E. faecalis* a 46 % *E. faecium*. Rezistenci k VAN prokázali u 2 (6 %) kmenů *E. faecium*, 1 (0,2%) *E. faecalis*, 4 *E. casseliflavus* a 2 *E. gallinarum*.

2.9.3 Flurochinolony

Flurochinolony jsou chemoterapeutika, která inhibují enzym nezbytný k replikaci bakteriální DNA – gyrázu. K nejvýznamnějším patří ciprofloxacin, norfloxacin a ofloxacin. Vzhledem k výhodným farmakologickým vlastnostem a účinnosti je při současné široké aplikaci těchto léčiv velké nebezpečí rozvoje rezistence, která již byla u enterokoků zaznamenána. Primární rezistence vzniká mutací genu, jejímž následkem dochází k modifikaci enzymu gyrázy, na kterou léčivo již nepůsobí. K rezistenci může také dojít změnou porinů v buněčné stěně, což výrazně ztěžuje průnik antibiotika do buňky (Spera a Farber, 1994; Bednář et al., 1996; Beneš et al., 1997; Horáček, 2003).

V našich podmínkách by měly fluorochinolony zůstat nadále rezervními léky určenými pro nemocniční léčbu komplikovaných infekcí nebo infekcí vyvolaných multirezistentními kmeny. Jejich časté používání může vést k výrazné selekci a šíření rezistence jak u močových, tak i ostatních, především respiračních patogenů (Ševčíková a Ševčík, 2005; Lytsy et al., 2005).

2.9.4 Chloramfenikol

Chloramfenikol je antibiotikum chemicky odvozené od fenylalaninu. Působí jako inhibitor proteosyntézy. Běžné užívání chloramfenikolu nepřichází dnes v úvahu pro možné, většinou ireverzibilní následky (Simon a Stille, 1998). Jeho působení se totiž projevuje i v mitochondriální proteinové syntéze, např. v erytropoetické tkáni v kostní dřeni, což vede k hlavnímu toxickému projevu chloramfenikolu - anémii (Farmakologie). Rezistence k chloramfenikolu je působena plazmidicky kódovanou acetyltransferázou, která acetyluje antibiotikum a tím jej inaktivuje (Horáček, 2003).

2.9.5 Tetracykliny

Tetracykliny působí také jako inhibitory proteosyntézy, blokují začleňování aminokyselin do nově vznikajících peptidových řetězců. Efekt těchto antibiotik je závislý na prostředí, v tělesných tekutinách může docházet k podstatným ztrátám účinku (např. ve žluči). Mezi nevýhody využívání tetracyklinů patří stoupající počet rezistentních kmenů mezi

grampozitivními koky (Simon a Stille, 1998). Rezistence k tetracyklinům je zapříčiněna nízkou koncentrací antibiotika v místě působení. Příčinou toho je plazmidicky kódovaný proces buď sníženého průniku antibiotika do bakteriální buňky, nebo jeho zvýšený transport z buňky – eflux (Horáček, 2003).

2.9.6 Současná situace

V České republice došlo od počátku 90. let k podstatnému zvýšení spotřeby antibiotik, které se nejvýrazněji projevilo ve skupinách chráněných aminopenicilinů (amoxicilin/kyselina klavulanová, ampicilin/sulbaktam), semisyntetických makrolidů a fluorochinolonů. Důsledkem kvantitativních a kvalitativních změn ve spotřebě antibiotik je zvýšení výskytu rezistence u bakteriálních původců infekčních nemocí v komunitě i v nemocnicích, přičemž náklady na vynaložené na léčbu rezistentních infekcí nejsou vyčísleny (Nýč, 2003).

Výskyt rezistence i multirezistence enterokoků uspíšil výzkum nových antibakteriálních léčiv, která jsou zatím ve fázi ověřování mikrobiologické a klinické účinnosti. Mezi ně patří např. nové halogenové chinolony, nové glykopeptidy, deriváty tetracyklinu a oxazolidinony (Urbášková, 1997).

3. Experimentální část

3.1 Materiál a metody

3.1.1 Kmeny enterokoků

Růstové, morfologické, antigenní a biochemické vlastnosti jsem zjišťoval u kmenů získaných z Oddělení klinické mikrobiologie Krajské nemocnice Pardubice. Všechny kmeny byly vykultivovány z moče, případně ze stěrů z urogenitálního traktu.

3.1.2 Kultivační média

Pro kultivaci obdržených kmenů a následnou izolaci za účelem získání čisté kultury a pro posouzení růstu na jednotlivých půdách jsem používal komerční kultivační média připravená podle příložených návodů výrobců.

Krevní agar (KA) připravený z Blood Agar Base No.2 firmy Oxoid (č.š. 399849), který jsem doplnil 5 % nesrážlivé (defibrinované) beraní krve.

Agar pro izolaci fekálních streptokoků (FA) připravený ze Selektivního agaru na izolaci fekálních streptokoků firmy Imuna, Šarišské Michaálany (č.š. 3230990).

Mueller – Hintonové agar (MH agar) připravený z Mueller Hinton Agar firmy Oxoid (č.š. 389630).

Bujon (BHI bujon) připravený z Brain Heart Infusion firmy Oxoid (č.š. 357483).

3.1.3 Diagnostické testy

Pro zařazení do rodu *Enterococcus* jsem používal následující testy:

- **Průkaz enzymu katalázy** – použil jsem 3% H₂O₂.
- **Přítomnost enzymu pyrrolidonylarylamidázy** – pyrrázovou aktivitu (PYR test) jsem testoval pomocí soupravy ITEST PYR TEST od firmy ITEST plus s.r.o. (č.š. 1065).
- **Průkaz skupinového antigenu D** – k průkazu skupinového antigenu D jsem používal extrakční enzym „Extraction Enzyme“ (č.š. 312596) a aglutinační činidlo „DR 589 G Diagnostic Reagents“ (č.š. 304374) od firmy Oxoid.
- **Růst v prostředí s 6,5% NaCl** jsem prokazoval v BHI s obsahem 6,5 % NaCl, pH 7,4.
- **Průkaz termorezistence** – ve fyziologickém roztoku (0,85% NaCl) a na krevním agaru

Pro zjištění biochemické aktivity jednotlivých druhů jsem používal:

- **Konvenční zkumavkové testy** připravené v laboratoři; základem médií byl pepton BactoPeptone firmy Bacton Dickinson (č.š. 0136007-FA), do kterého byl přidán sacharid, jehož utilizaci jsem chtěl prokázat v koncentraci 1 % a jako indikátor změny pH 1,6% roztok bromkresol-purpuru (BKP) v ethanolu. Testoval jsem laktózu (LAC), arabinózu (ARA), sorbitol (SOR) a manitol (MAN).
- **Mikrotesty** - komerční diagnostickou soupravu EN-COCCUStest firmy Pliva-Lachema (č.š. 22306404).

3.1.4 Roztoky a činidla

- Barvení podle Grama:
 - 40% alkoholový roztok krystalové violeti v 10% šťavelanu amonném
 - 10% vodný roztok jodidu draselného a jódu
 - 70% ethanol
 - 10% vodný roztok karbolfuchsinu
- Fyziologický roztok: 0,85% vodný roztok NaCl
- Průkaz enzymu kataláza: 3% vodný roztok H₂O₂
- Indikátor utilizace sacharidů (pH indikátor): 1,6% alkoholový roztok BKP
- Pro úpravu pH půd:
 - 1% roztok HCl
 - 10% roztok NaOH
- Pro kontrolu hustoty inokula: zákalová stupnice dle McFarlanda

3.1.5 Přístroje a pomůcky

Biologický termostat, chladnička, horkovzdušný sterilizátor, parní autokláv, vodní lázeň, světelný mikroskop, mikroskop pro pozorování v zástině, předvážky, dávkovač antibiotických disků.

Petriho misky, očkovací kličky, Erlenmayerovy baňky a kádinky různých objemů, zkumavky, gumové zátky, mikropipety a špičky, vatové tampóny vše sterilní, dále stojánky na zkumavky, podložní sklíčka, krycí sklíčka, pinzety a plynový kahan.

3.1.6. Antibiotické disky

Ke stanovení citlivosti enterokoků diskovou difúzní metodou jsem používal disky dodávané firmou Oxoid.

Tabulka č. 3: Používané antibiotické disky v diskovém difúzním testu

Účinná látka	Zkratka	Obsah účinné látky v disku	Číslo šarže
Ampicilin	AMP	10 µg	330549
Amoxicilin/klavulanát	AMC	30 µg	299010
Vankomycin	VA	30 µg	354322
Tetracyklin	TE	30 µg	297535
Chloramfenikol	C	30 µg	399282
Enrofloxacin	ENR	5 µg	315121

K pükazu β -laktamázové aktivity jsem používal komerční diagnostickou soupravu „Identification sticks β -Lactamase“ (nitrocefín) od firmy OXOID (č.š. 219801).

3.2 Pracovní postup

3.2.1 Kultivace

Kmeny získané z mikrobiologické laboratoře Krajské nemocnice v Pardubicích jsem vyočkoval na krevní agar a agar pro fekální streptokoky. Naočkované půdy jsem inkuboval 24 hod. v termostatu při teplotě 37 °C a poté vyhodnotil kolonie narostlé na jednotlivých médiích. Podezřelé kolonie jsem izoloval na krevní agar a opět inkuboval 24 hod. při 37 °C v termostatu. V případě kontaminace jsem provedl další izolace až do získání čisté kultury.

3.2.2 Typizace kmenů

3.2.2.1 Zařazení do rodu

U kultur narostlých na KA jsem popsal morfologii kolonií a typ hemolýzy. Dále jsem ověřil tvar bakteriálních buněk a jejich uspořádání v zorném poli po obarvení podle Grama. Čisté kultury jsem pak podrobil testům pro zařazení do rodu *Enterococcus*.

Barvení preparátu podle Grama

Suspenzi připravenou z čisté kultury ve fyziologickém roztoku jsem rozetřel na podložní sklíčko, nechal zaschnout a fixoval plamenem. Fixovaný nátěr jsem obarvil podle Grama následovně:

- 1) Preparát jsem převrstvil čerstvě přefiltrovaným roztokem krystalové violeti a nechal ji působit 15-30 sekund.

- 2) Poté jsem barvivo nechal pouze okapat a preparát překryl Lugolovým roztokem na 15-30 sekund.
- 3) Následně jsem preparát odbarvoval 70% ethanolem tak dlouho, dokud se vymývalo modré barvivo.
- 4) Po opláchnutí vodou jsem preparát dobarvoval karbolfuchsinem po dobu 60 sekund.
- 5) Nakonec jsem preparát opláchl vodou, osušil filtračním papírem a prohlédl ve světelném mikroskopu imerzním objektivem při zvětšení 1200×.

V preparátu jsem hodnotil tvar bakteriálních buněk a jejich barvitelnost podle Grama: grampozitivní bakterie jsou modrofialové, neboť se neodbarvují ethanolem; gramnegativní bakterie jsou červené, protože se odbarvily ethanolem a byly dobarveny karbolfuchsinem.

Průkaz katalázy

Do kapky 3% peroxidu vodíku, umístěné na podložním sklíčku, jsem ponořil skleněnou tyčinku s kulturou setřenou z KA. Pozitivní reakce se projevila unikajícími bublinkami plynu (O₂).

Přítomnost enzymu pyrrolidonylarylamidázy (PYR test)

Před vlastním provedením jsem nechal zahřát disky i vývojku na laboratorní teplotu. PYR disk jsem navlhčil 10 µl sterilní destilované vody. Bakteriologickou kličkou jsem na povrch disku rozetřel 5-10 kolonií testovaného kmene narostlého na KA. Následovala inkubace při laboratorní teplotě po dobu 2 minut a poté jsem na inokulovaný disk kápl 1 kapku barevné vývojky. Pozitivní reakce se během 1-2 minut projevila zčervenáním naočkované části disku s rozetřenou kulturou.

Průkaz skupinového antigenu D

Principem testu je reakce antigenu, který byl vyextrahován z buněčné stěny extrakčním enzymem s protilátkou navázanou na latexové částice. Při provádění a vyhodnocování testu jsem postupoval následovně:

- 1) Do zkumavky jsem odpipetoval 50 µl extrakčního enzymu.
- 2) Bakteriální kličkou jsem setřel 2-5 testovaných kolonií z čisté kultury narostlé na KA.
- 3) Kolonie jsem poté suspendoval v extrakčním enzymu ve zkumavce.
- 4) Zkumavky jsem inkuboval 10 minut při teplotě 37 °C ve vodní lázni.
- 5) Na reakční destičku jsem odpipetoval kapku extraktu do označených míst a vedle ní jsem nanal 1 kapku reakčního činidla a to jsem promíchal k tomu určenou tyčinkou.

- 6) Po smíchání obou kapek jsem pozoroval, zda došlo k aglutinaci, která se projevila vznikem sražených vloček a projasněním suspenze.

Při nepřítomnosti skupinového antigenu D zůstala suspenze zakalená bez aglutinátu.

Růst v přítomnosti 6,5 % NaCl

Testovaný kmen jsem naočkoval do BHI s 6,5 % NaCl a inkuboval 24 hodin v termostatu při teplotě 37 °C. Růst se projevil zakalením média. Pokud kmen při této teplotě nerostl, médium zůstalo čiré.

Průkaz termorezistence

Ve zkumavce s 1 ml sterilního fyziologického roztoku jsem připravil suspenzi testovaného kmene o hustotě 0,5 stupně McFarlandovy zákalové stupnice. Zkumavku jsem vložil na 30 minut do vodní lázně o teplotě 60 °C. Poté jsem suspenzi ze zkumavky vyočkoval na krevní agar a inkuboval 24 hodin při 37 °C. Termorezistence se projevila růstem kmene na krevním agaru.

3.2.2.2 Testy pro určení druhu

Druhovou identifikaci kmenů, které svými vlastnostmi odpovídaly zařazení do rodu *Enterococcus* jsem prováděl na základě schopnosti rozkládat některé sacharidy. Biochemickou aktivitu jsem prokazoval konvenčními zkumavkovými testy, které jsem připravoval v laboratoři a mikrotesty EN-COCCUStest dodávanými firmou Pliva-Lachema.

Konvenční laboratorní testy na utilizaci sacharidů

Do zkumavky s médiem, které obsahovalo sacharid a indikátor, jsem naočkoval testovaný kmen. Zkumavky jsem nechal inkubovat 24 – 48 hodin v termostatu při teplotě 37 °C a vyhodnotil výsledek. Poté jsem obsah zkumavky inkuboval při laboratorní teplotě a sledoval další 3 – 4 dny.

Pozitivní výsledek dokazovala změna barvy indikátoru obsaženém v médiu z fialové na žlutou následkem změny pH média. Pokud kmen cukr nerozložil barva média zůstala nezměněna. Konvenčními zkumavkovými testy jsem prokazoval schopnost utilizace arabinózy, laktózy, manitolu a sorbitolu.

EN-COCCUStest

EN-COCCUStest umožňuje druhovou identifikaci enterokoků osmi biochemickými testy umístěných v jamkách mikrotitrační destičky. Zahrnují testy utilizace argininu, sorbózy, arabinózy, manitolu, sorbitolu, melibiózy, rafinózy a melezitózy. Identifikaci pomocí této soupravy jsem prováděli pouze u některých kmenů pro potvrzení výsledků konvenčních testů.

Z čisté 24 hodinové kultury daného kmene jsem připravil v 0,85% roztoku NaCl suspenzi odpovídající 2. stupni McFarlandovy zákalové stupnice.

Poté jsem pomocí mikropipety přenesl 100 μ l suspenze do jamek příslušného řádku destičky. Do jamky s argininem jsem přidal po inokulaci 2 kapky sterilního parafinového oleje. Destičku jsem uložil do termostatu, inkuboval 24 hodin při 37 °C a poté provedl vyhodnocení.

Pro hodnocení výsledků barevných reakcí jsem používal návod přiložený v příbalových letáčích. Podle něj jsem vypočítal číselný profil kmene, který je typický pro daný druh.

3.2.3 Stanovení citlivosti na antibiotika

Stanovení citlivosti na antibiotika diskovou difúzní metodou

Citlivost izolovaných kmenů na antibiotika jsem zjišťoval diskovou difúzní metodou na Mueller – Hintonově agaru. Testoval jsem citlivost na následující antibiotika: AMP, AMC, VA, C, TE, ENR.

Ve zkumavce s 1,5 ml fyziologického roztoku jsem připravil suspenzi daného kmene o hustotě 0,5 – 1 stupně McFarlandovy zákalové stupnice. Sterilním vatovým tampónem jsem provedl inokulaci suspenze na agarové médium a pomocí raziče disků antibiotik jsem na agar umístil testační disky obsahující jednotlivá antibiotika. Takto připravené misky byly inkubovány 24 hodin při teplotě 37 °C.

Po inkubaci jsem změřil průměr inhibičních zón jednotlivých antibiotik a takto získané hodnoty jsem porovnal s hodnotami uvedenými v návodech firmy OXOID pro hodnocení.

Průkaz β -laktamázové aktivity

Při provádění průkazu enzymu β -laktamázy jsem postupoval podle návodu v příloženém letáku. Povrchem tyčinky jsem rozetřel kolonii testovaného kmene narostlého na KA, poté jsem tyčinku navlhčil. Následovala inkubace při laboratorní teplotě po dobu 5 - 15 minut. Pozitivní reakce se projevila zčervenáním nebo zružověním žlutého konce tyčinky, který byl napuštěn nitrocefinem (chromogenním cefalosporinem).

4. Výsledky

4.1 Druhy enterokoků

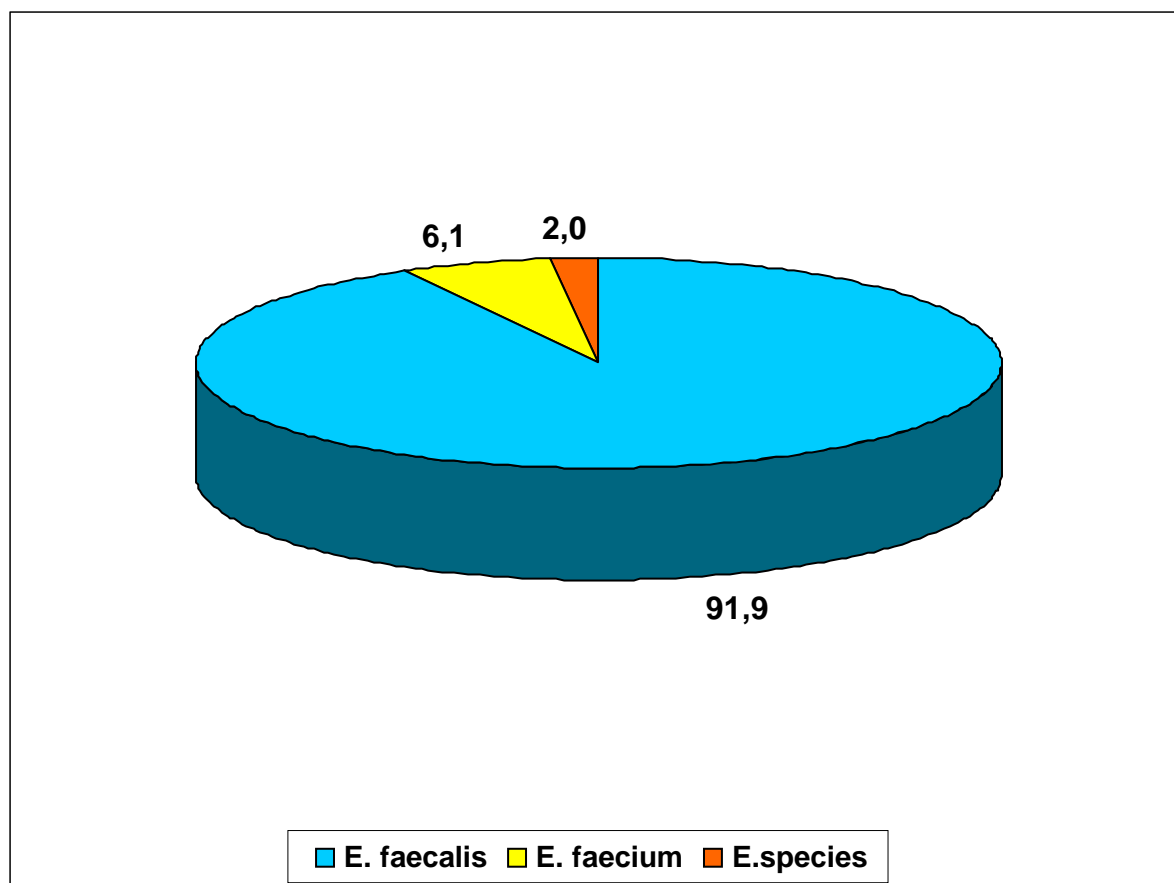
Vykultivoval jsem celkem 197 kmenů enterokoků.

Zastoupení jednotlivých druhů je uvedeno v tabulce č. 4 a grafu č. 1. Z tabulky vyplývá, že nejčastěji jsem identifikoval druhy *E. faecalis* (91,9 %) a *E. faecium* (6,1 %), 4 kmeny (2 % z celkového počtu) jsem určil pouze jako *E.sp.*

Tabulka č. 4: Zastoupení jednotlivých druhů enterokoků izolovaných z urogenitálního traktu lidí

Vyšetřeno 197 kmenů					
Z toho					
<i>E. faecalis</i>		<i>E. faecium</i>		<i>E. species</i>	
Počet kmenů	%	Počet kmenů	%	Počet kmenů	%
181	91,9	12	6,1	4	2,0

Graf č. 1: Zastoupení jednotlivých druhů enterokoků izolovaných z urogenitálního traktu lidí



4.2 Vlastnosti enterokoků

4.2.1 Růst na kultivačních médiích

Po 24 hodinách inkubace při 37 °C vyrůstaly enterokoky na KA s beranými erytrocyty v šedobílých koloniích, které byly mírně vypouklé. Průměr kolonií se pohyboval v rozmezí 1 - 2 mm. Ze 197 kmenů 13 (6,6 %) tvořilo alfa-hemolýzu a 184 (93,4 %) gama-hemolýzu. Na KA s těmito erytrocyty jsem u žádného kmene nepozoroval beta-hemolýzu.

Na agaru pro izolaci fekálních streptokoků vytvářely kmeny druhu *E. faecalis* růžové kolonie, růžové s červeným středem nebo karmínově červené kolonie. Všechny kmeny druhu *E. faecium* vyrůstaly jako narůžovělé kolonie.

4.2.2 Morfologie buněk

Enterokoky se v zorném poli mikroskopu jeví jako gram-pozitivní koky, které vytvářely dvojice nebo krátké řetězky, případně i shluky.

4.2.3 Růstové, antigenní a biochemické vlastnosti

Izolované kmeny jsem identifikoval na základě růstových, antigenních a biochemických vlastností. Výsledky sérologické typizace udává tabulka č. 5. Aglutinace se skupinovým antisérem D byla prokázána u 194 (98,5 %) kmenů.

Hemolytickou aktivitu na KA s beranými erytrocyty a růst jednotlivých kmenů za různých podmínek udává tabulka č. 5. Všechny kmeny rostly v hypertonickém prostředí s 6,5 % NaCl. Působení teploty 60 °C po dobu 30 minut nepřežilo 41 (20,8 %) testovaných kmenů.

O enzymatické aktivitě informuje tabulka č. 6. Produkci enzymu katalázy jsem nezaznamenal u žádného kmene, zatímco 125 (63,5 %) kmenů tvořilo enzym pseudokatalázu, z nich zejména kmeny *E. faecalis* (66,3 %). Enzym pyrrolidonylarylamidázu produkovaly všechny kmeny. V této tabulce uvádím také biochemické vlastnosti enterokoků zjištěné konvenčními testy. Z uvedeného vyplývá, že všechny kmeny rozkládaly manitol. Významná je rozdílná utilizace arabinózy. Kmeny druhu *E. faecalis* na rozdíl od kmenů *E. faecium* arabinózu neutilizovaly.

V následující tabulce č. 7 jsou uvedeny výsledky zjištěné EN-COCCUStestem. Výsledky zjištěné laboratorně připravenými konvenčními testy byly shodné s výsledky zjištěnými soupravou ENCOCCUStest.

Přehled růstových, antigenních a biochemických vlastností blíže neurčených kmenů enterokoků izolovaných z urogenitálního traktu lidí udává tabulka č. 8. Výsledky biochemických testů svědčí pro zařazení 3 kmenů do druhu *E. faecalis*.

Tabulka č. 5: Růstové a antigenní vlastnosti druhů enterokoků izolovaných z urogenitálního traktu lidí

Druh	Počet kmenů	Hemolýza						6,5 % NaCl		60 °C, 30 minut		Anti D	
		α		β		γ		Pozitivních kmenů	%	Pozitivních kmenů	%	Pozitivních kmenů	%
		Pozitivních kmenů	%	Pozitivních kmenů	%	Pozitivních kmenů	%						
E. faecalis	181	3	1,6	-	-	178	98,4	181	100,0	144	80,0	181	100,0
E. faecium	12	9	75,0	-	-	3	25,0	12	100,0	9	75,0	12	100,0
E. species	4	1	25,0	-	-	3	75,0	4	100,0	3	75,0	1	25,0

Legenda:

6,5 % NaCl ... růst v prostředí s 6,5 % NaCl

60 °C, 30 minut ... termorezistence, působení teploty 60 °C po dobu 30 minut

AntiD ... přítomnost skupinově specifického antigenu D

Tabulka č. 6: Biochemické vlastnosti druhů enterokoků izolovaných z urogenitálního traktu lidí zjištěné konvenčními testy

Druh	Počet kmenů	Z toho % pozitivních kmenů					
		Pseudokataláza	PYR test	Laktóza	Arabinóza	Sorbitol	Manitol
E. faecalis	181	66,3	100,0	96,1	0,0	100,0	100,0
E. faecium	12	33,3	100,0	100,0	100,0	83,3	100,0
E. species	4	25,0	100,0	100,0	0,0	75,0	100,0

Legenda:

PYR test ... produkce enzymu pyrrolidonylarylamidázy

Tabulka č. 7: Biochemické vlastnosti vybraných kmenů enterokoků izolovaných z urogenitálního traktu lidí zjištěné EN-COCCUS testem a jejich porovnání s výsledky získanými konvenčními testy

Kmen	Konvenční zkumavkové testy				EN-COCCUS test									Druh
	LAC	ARA	SOR	MAN	MLZ	RAF	MLB	SOR	MAN	ARA	SOE	ARG	Profil	
3	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	132	Enterococcus faecalis
9	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	530	Enterococcus faecium
10	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	132	Enterococcus faecalis
39	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	132	Enterococcus faecalis
48	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	132	Enterococcus faecalis
50	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	132	Enterococcus faecalis
64	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	132	Enterococcus faecalis
66	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	530	Enterococcus faecium

Legenda:

LAC ... laktóza, ARA ... arabinóza, SOR ... sorbitol, MAN ... manitol, MLZ ... melezitóza, RAF ... rafinóza, SOE ... sorbóza, ARG ... arginin

Tabulka č. 8: Růstové, antigenní a biochemické vlastnosti blíže neurčených kmenů enterokoků izolovaných z urogenitálního traktu lidí

Kmen	Hemolýza	AntiD	PYR test	Pseudokataláza	60 °C, 30 minut	6,5 % NaCl	Utilizace sacharidů			
							Laktóza	Arabinóza	Sorbitol	Manitol
3	γ	-	+	+	-	+	+	-	+	+
82	γ	-	+	-	+	+	+	-	+	+
83	γ	-	+	-	+	+	+	-	+	+
146	α	+	+	-	+	+	+	-	-	+

Legenda:

AntiD ... přítomnost skupinově specifického antigenu D

PYR test ... produkce enzymu pyrrolidonylarylamidázy

60 °C, 30 minut ... termorezistence, působení teploty 60 °C po dobu 30 minut

6,5 % NaCl ...růst v prostředí 6,5 % NaCl

4.3 Citlivost na antibiotika

Výsledky citlivosti enterokoků izolovaných z urogenitálního traktu lidí na antibiotika zjištěné diskovou difúzní metodou jsou uvedeny v tabulce č. 9 a grafech č. 2, 3, 4. Z tabulky i grafického znázornění je zřejmé, že všechny testované kmeny byly citlivé k vankomycinu. U ostatních antibiotik se poměrně výrazně liší citlivost na antibiotika mezi druhy *E. faecalis* a *E. faecium*.

Ze všech testovaných byly rezistentní na ampicilin 2 (1,1 %) kmeny *E. faecalis* a 12 (100 %) kmenů *E. faecium*. Shodné výsledky jsem zjistil i u amoxicilinu v kombinaci s klavulanovou kyselinou.

Z tabulky dále vyplývá, že 62 (34,3 %) kmenů *E. faecalis* a 12 (100 %) kmenů *E. faecium* bylo rezistentních k enrofloxacinu.

Vysokou rezistenci jsem prokázal u tetracyklinu a to u 117 (64,6 %) kmenů *E. faecalis* a 4 (33,3 %) kmenů *E. faecium*.

K chloramfenikolu vykazují kmeny druhů *E. faecalis* a *E. faecium* přibližně stejné procentuální zastoupení rezistentních kmenů.

Výsledky citlivosti blíže neurčených kmenů enterokoků udává tabulka č. 10.

Přehled výsledků stanovené citlivosti u kmenů rezistentních na beta-laktamová antibiotika spolu se srovnáním citlivosti k ostatním testovaným antibiotikům jsem zaznamenal do tabulky č. 11. Všechny uvedené kmeny byly rezistentní k enrofloxacinu. Významná je však dobrá citlivost k vankomycinu.

Produkcí enzymu beta-laktamázy nitrocefinovým testem jsem nezaznamenal u žádného kmene, který byl rezistentní k ampicilinu.

Tabulka č. 9: Výsledky citlivosti jednotlivých druhů enterokoků na antibiotika zjištěné diskovou difúzní metodou

Antibiotikum	E. faecalis			E. faecium			E. species		
	Počet kmenů	Z toho rezistentních		Počet kmenů	Z toho rezistentních		Počet kmenů	Z toho rezistentních	
		Počet kmenů	%		Počet kmenů	%		Počet kmenů	%
Ampicilin	181	2	1,1	12	12	100,0	4	1	25,0
Amoxicilin/klavulanát	181	2	1,1	12	12	100,0	4	1	25,0
Vankomycin	181	0	0,0	12	0	0,0	4	0	0,0
Enrofloxacin	181	62	34,3	12	12	100,0	4	1	25,0
Tetracyklin	181	117	64,6	12	4	33,3	4	3	75,0
Chloramfenikol	181	35	19,3	12	2	16,7	4	2	50,0

Tabulka č. 10: Citlivost blíže neurčených kmenů izolovaných z urogenitálního traktu lidí na antibiotika

Kmen	AMP		AMC		VA		ENR		TE		C	
	Inhibiční zóna	Hodnocení	Inhibiční zóna	Hodnocení	Inhibiční zóna	Hodnocení	Inhibiční zóna	Hodnocení	Inhibiční zóna	Hodnocení	Inhibiční zóna	Hodnocení
3	24	C	28	C	12	C	20	C	26	C	18	C
82	19	C	20	C	14	C	18	C	11	R	8	R
83	26	C	22	C	13	C	20	C	12	R	10	R
146	0	R	11	R	17	C	10	R	10	R	11	R

Legenda:

Inhibiční zóna ... průměr inhibiční zóny v cm

Hodnocení ... kmen je citlivý/rezistentní k danému ATB

AMP ... ampicilin, AMC ... amoxicilin/klavulanát, VA ... vankomycin, ENR ... enrofloxacin, TE ... tetracyklin, C ... chloramfenikol

Tabulka č. 11: Přehled výsledků citlivosti jednotlivých kmenů enterokoků izolovaných z urogenitálního traktu rezistentních na betalaktamová antibiotika

Kmen	Druh	AMP		AMC		VA		ENR		TE		C	
		Inhibiční zóna	Hodnocení	Inhibiční zóna	Hodnocení	Inhibiční zóna	Hodnocení	Inhibiční zóna	Hodnocení	Inhibiční zóna	Hodnocení	Inhibiční zóna	Hodnocení
9	<i>E. faecium</i>	0	R	0	R	19	C	0	R	25	C	12	R
21	<i>E. faecalis</i>	9	R	12	R	18	C	0	R	28	C	16	C
27	<i>E. faecium</i>	0	R	17	R	19	C	0	R	29	C	24	C
66	<i>E. faecium</i>	0	R	0	R	20	C	0	R	12	R	12	R
88	<i>E. faecium</i>	13	R	17	R	18	C	0	R	22	C	16	C
89	<i>E. faecium</i>	11	R	16	R	21	C	11	R	28	C	20	C
90	<i>E. faecium</i>	12	R	17	R	17	C	11	R	24	C	22	C
91	<i>E. faecium</i>	5	R	13	R	19	C	5	R	7	R	14	C
107	<i>E. faecalis</i>	0	R	0	R	23	C	14	R	20	C	24	C
111	<i>E. faecium</i>	0	R	14	R	21	C	9	R	11	R	19	C
146	<i>E. species</i>	0	R	11	R	17	C	10	R	25	C	22	C
158	<i>E. faecium</i>	0	R	0	R	19	C	0	R	24	C	17	C
166	<i>E. faecium</i>	0	R	0	R	16	C	0	R	20	C	17	C
186	<i>E. faecium</i>	0	R	0	R	17	C	0	R	21	C	20	C
188	<i>E. faecium</i>	0	R	10	R	18	C	13	R	0	R	20	C

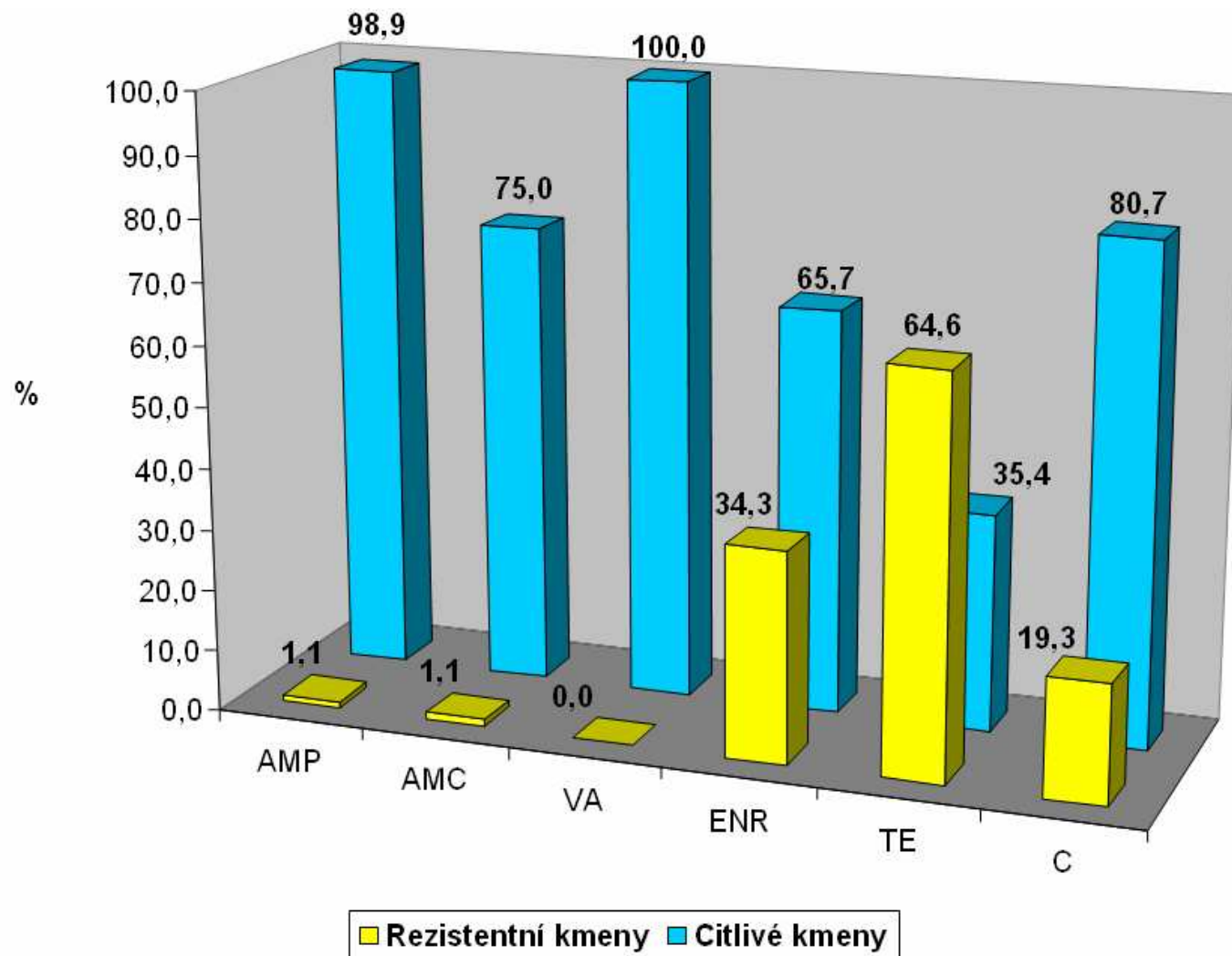
Legenda:

Inhibiční zóna ... průměr inhibiční zóny v cm

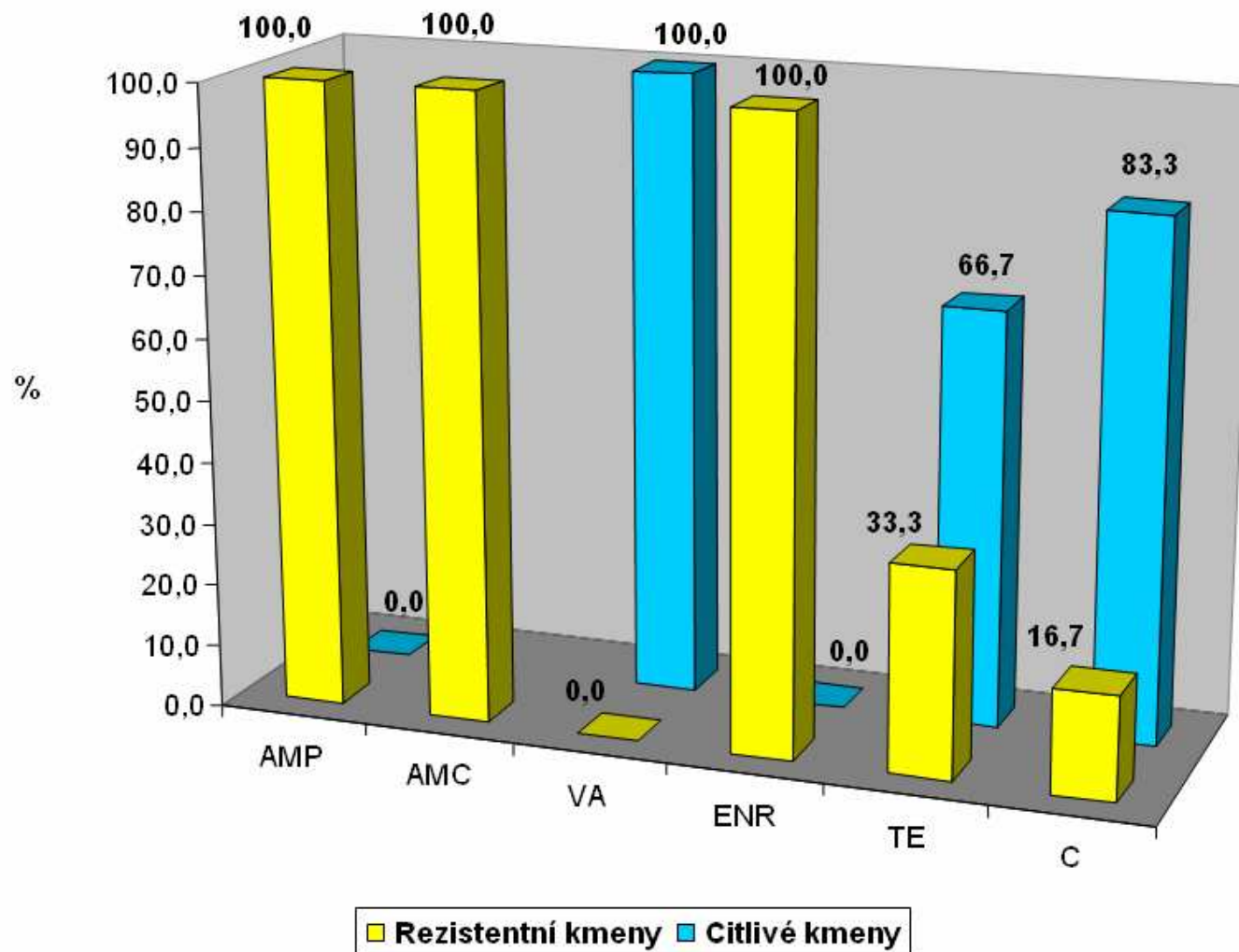
Hodnocení ... kmen je citlivý/rezistentní k danému ATB

AMP ... ampicilin, AMC ... amoxicilin/klavulanát, VA ... vankomycin, ENR ... enrofloxacin, TE ... tetracyklin, C ... chloramfenikol

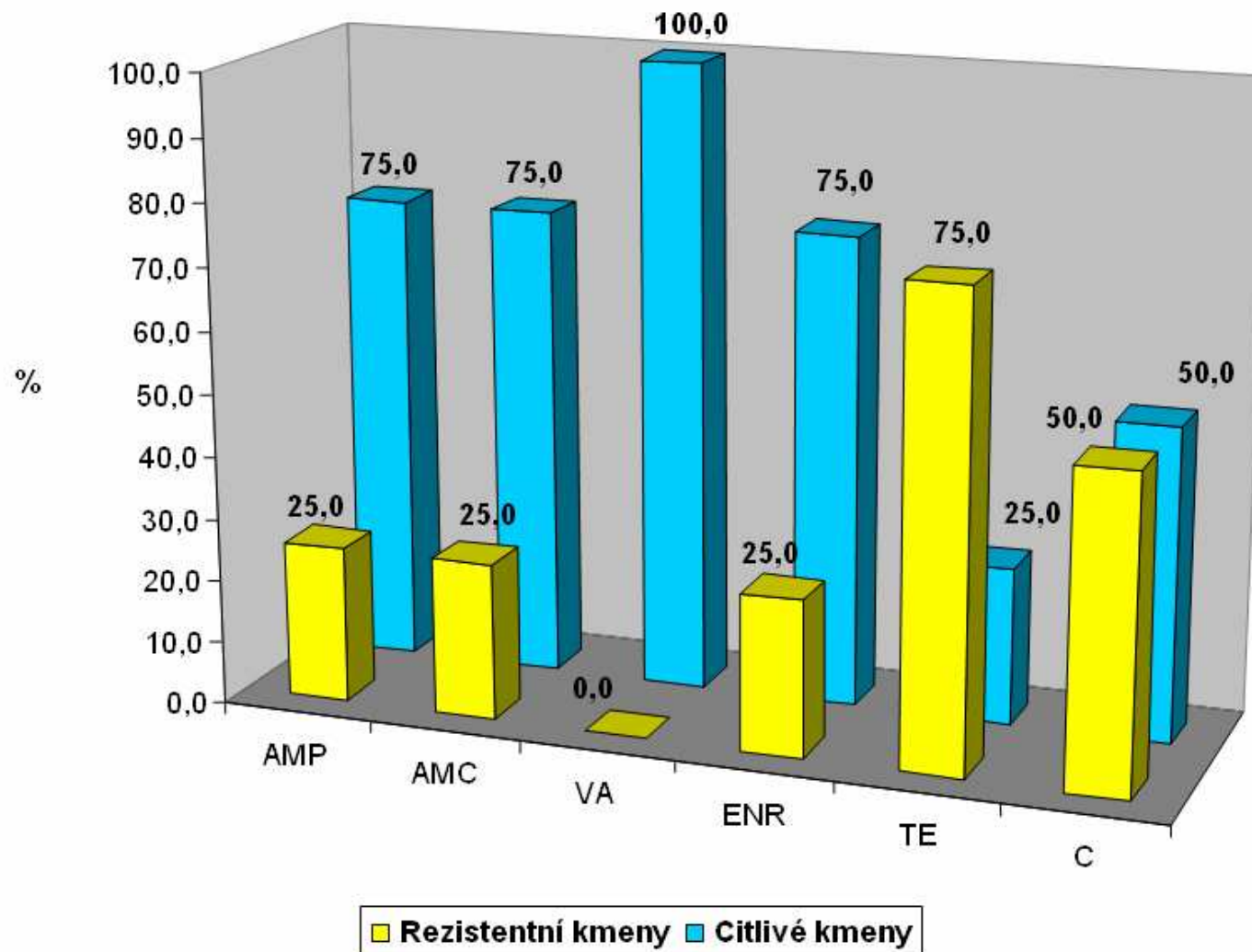
Graf č. 2: Výsledky citlivosti *E. faecalis* na antibiotika zjištěné diskovou difúzní metodou



Graf č. 3: Výsledky citlivosti *E. faecium* na antibiotika zjištěné diskovou difúzní metodou



Graf č. 4: Výsledky citlivosti *E.species* na antibiotika zjištěné diskovou difúzní metodou



5. Diskuze a závěr

Enterokoky jsou u nás v současné době považovány za podmíněně patogenní mikroorganismy, které mohou způsobovat různá infekční onemocnění. Jsou také významnými původci nozokomiálních nákaz, zejména endokarditid, infekcí urogenitálního traktu, centrální nervové soustavy, břišních a novorozeneckých infekcí i septických stavů. Podle Davise et al. (1996) a Beneše et al. (1997) je významným zdrojem těchto mikroorganismů vlastní endogenní flóra pacienta a to nejčastěji urogenitálního traktu. Enterokokové infekce postihují především imunokompromitované pacienty, přispívají k prodloužení doby hospitalizace a zvýšení nákladů na léčbu. Vzhledem k narůstající rezistenci na antibiotika jsou enterokoky považovány v některých zemích, zejména USA a v západní Evropě, za nebezpečné patogeny.

Cílem této práce bylo zjištění vlastností, včetně rezistence na antibiotika u jednotlivých druhů enterokoků vykultivovaných ze vzorků z urogenitálního traktu pacientů. Kmeny byly izolovány v mikrobiologické laboratoři Krajské nemocnice v Pardubicích.

V průběhu let 2003 – 2005 jsem studoval 197 kmenů enterokoků. Z tohoto počtu 181 (91,9 %) kmenů odpovídalo svými vlastnostmi druhu *E. faecalis* a 12 (6,1 %) kmenů *E. faecium*. U 4 (2,0 %) kmenů se nepodařilo prováděnými testy druh identifikovat. Jett et al. (1994) a Urbášková (1997) udávají téměř shodnou frekvenci výskytu těchto druhů enterokoků u lidí. Alexandrowicz (1999) udává výskyt druhu *E. faecalis* 72,8 %, ale vyšší procentuální zastoupení *E. durans* (7,6 %). Tento druh jsem v souboru mnou vyšetřených kmenů neprokázal.

Na KA s beraními erytrocyty vyrůstaly enterokoky v šedobílých koloniích. Pouze 3 kmeny (1,6 %) *E. faecalis* vytvářely alfa hemolýzu, ostatní (98,4 %) ovčí erytrocyty nehemolyzovaly. Zatímco kmeny *E. faecium* se nejčastěji projevovaly na daném médiu jako alfa-hemolytické (75 % kmenů), gama-hemolýzu jsem pozoroval pouze u 4 (25 %). Žádný z testovaných kmenů netvořil beta-hemolýzu. Podle literárních údajů typ hemolýzy závislý na původu erytrocytů. Někteří autoři udávají, že cytolyzin produkovaný kmeny druhu *E. faecalis* způsobuje beta-hemolýzu na KA obsahujícím koňské, králičí, či lidské erytrocyty, na KA s beraními erytrocyty hemolýzu netvoří (Facklam et al., 1989; OUHSC).

Na agaru pro izolaci fekálních streptokoků, který obsahuje TTC, jsem mohl odlišit kmeny *E. faecalis* od kmenů *E. faecium*, neboť kmeny *E. faecalis* redukovaly TTC za vzniku červeného formazánu, a proto vyrůstaly v karmínově červených koloniích na rozdíl od *E. faecium*, které tvořily pouze narůžovělé kolonie. Toto rozlišení lze považovat pouze za orientační.

Při mikroskopickém vyšetření jsem prokázal grampozitivní koky, které tvořily páry a krátké řetízky. Stejně popisují morfologii enterokoků i Bednářem et al. (1996) a Motlová (1997a). Na rozdíl od citovaných autorů jsem však pozoroval i buňky vytvářející shluky, což se dá vysvětlit tím, že preparáty byly připravovány z kultur vyrostlých na agarových médiích.

Přesto, že jsou enterokoky řazeny mezi mikroorganismy, které nevytvářejí katalázu, vyskytují se kmeny produkující tzv. pseudokatalázu (Hardie a Whiley, 1997; Motlová, 1997a). Ze 197 testovaných kmenů jsem tento enzym prokázal u 125 (63,5 %) a to zejména *E. faecalis* – 120 (66,3 %) kmenů.

Všechny kmeny rostly v prostředí s 6,5 % NaCl.

Vystavení teplotě 60 °C po dobu 30 minut nepřežilo 36 (20,0 %) kmenů druhu *E. faecalis* a 3 (25,0 %) kmeny *E. faecium*.

Enterokoky disponují převážně skupinovým antigenem D. Tento antigen jsem prokázal u všech kmenů druhů *E. faecalis* i *E. faecium*. U tří ze čtyř neurčených kmenů se mi nepodařilo tento antigen zjistit. Můžu se ovšem domnívat, že tyto kmeny vzhledem k výsledkům biochemických testů jsou *E. faecalis*. Tuto domněnku bych však musel prokázat dalšími testy, které jsem neměl k dispozici, případně molekulárně biologickými metodami. Také Motlová (1997a, 2003) a Franz et al. (2003) neprokázali tento antigen u některých kmenů *E. faecalis*, *E. faecium* a dalších druhů. Motlová (2003) uvádí, že ne všechny kmeny jednotlivých druhů enterokoků syntetizují D antigen v množství detekovatelném latexaglutinačními metodami, kterými jsem skupinový antigen prokazoval.

Ve shodě s Motlovou (2003) a SAARS jsem u všech kmenů zjistil produkci enzymu pyrrolidonylarylamidázy.

Při druhové identifikaci enterokoků jsem vycházel zejména z výsledků biochemických testů prokazujících biochemickou aktivitu jednotlivých kmenů zjištěnou konvenčními testy a EN-COCCUStesty firmy Pliva-Lachema.

Na rozdíl od Manero a Blanch (1999) jsem během identifikace zaznamenal u 5 kmenů *E. faecalis* negativní výsledek užití laktózy. Výskyt laktóza-negativních kmenů *E. faecalis* potvrzují i Ruoff et al. (1989). Takové výsledky mohou vést k záměně laktóza-negativních kmenů *E. faecalis* za kmeny *E. solitarius*. V takových případech doporučují Ruoff et al. (1989) použití testu prokazujícího redukci telluritu. Kmeny *E. faecalis* tellurit redukují, kmeny *E. solitarius* nikoliv.

Utilizaci sorbitolu jsem zjistil u 10 (83,3 %) kmenů *E. faecium*. Podobné výsledky publikovali i Day et al. (2001), kteří ve své studii popisují 88,9 % pozitivních kmenů *E. faecium*. Naproti tomu Facklam a Sahm (1995) i Manero a Blanch (1999) uvádějí, že 97 %

kmenů *E. faecium* sorbitol nerozkládá. Uvedení autoři nepovažují test utilizace sorbitolu za vhodný pro odlišení *E. faecium* od *E. faecalis*. Doporučují proto test utilizace arabinózy.

Arabinózu rozkládaly všechny kmeny *E. faecium* na rozdíl od *E. faecalis*, které tento substrát nemetabolizovaly. Na základě svých výsledků mohu potvrdit, že tento test je významný pro odlišení obou druhů.

U všech kmenů jsem stanovil citlivost k antibiotikům diskovou difúzní metodou. Z testovaných antibiotik byl neúčinnější vankomycin, který inhiboval růst všech kmenů enterokoků. Nezaznamenal jsem žádný vankomycin-rezistentní kmen. Tento poznatek je důležitý, neboť v klinické praxi jsou léky volby při léčbě enterokokových infekcí vedle aminoglykosidových antibiotik zejména glykopeptidy, mezi které patří i vankomycin (Bednář et al., 1996).

U ostatních antibiotik se výsledky odlišovaly v závislosti na druhu enterokoků.

Na ampicilin a amoxicilin/klavulanát bylo rezistentních všech 12 (100 %) kmenů *E. faecium* a 2 (1,1 %) kmeny *E. faecalis*. Autoři Calderón-Jaimes et al. (2003) zjistili rezistenci k ampicilinu a amoxicilin/klavulanátu u 40,5 % kmenů *E. faecium* a 3,3 % kmenů *E. faecalis*. Uvedené poznatky se neshodují s výsledky Urbáškové et al. (1997), kteří neprokázali rezistenci u žádného kmene *E. faecalis*, ale rovněž zaznamenali vysoké procento kmenů *E. faecium* rezistentních na ampicilin (81,8 %).

Zaznamenal jsem poměrně vysoký stupeň rezistence k enrofloxacinu, který se však používá ve veterinárním lékařství. K danému chemoterapeutiku byly rezistentní všechny kmeny *E. faecium* a 62 (34,3 %) kmenů *E. faecalis*. Na výskyt rezistence k fluorochinolonům upozorňuje i Bednář (1996). Chinolonová antibiotika se poměrně často využívají k léčbě infekcí močových cest (Horáčková, 2000).

Rezistence na chloramfenikol byla přibližně shodná u obou druhů (19,3 % kmenů *E. faecalis* a 16,7 % *E. faecium*).

K tetracyklinu bylo rezistentních 117 (64,6 %) kmenů *E. faecalis* a 4 (33,3 %) kmeny *E. faecium*.

V souladu s literárními údaji také moje výsledky prokázaly, že mezi enterokoky izolovanými z urogenitálního traktu lidí převládá druh *E. faecalis*.

Vzhledem k rozdílné citlivosti enterokoků na antibiotika, kterou jsem také prokázal, a zejména vzhledem k narůstající rezistenci těchto mikroorganismů, je nezbytným předpokladem účinné léčby stanovení citlivosti kmenů, které onemocnění vyvolaly.

6. Přehled použité literatury

ABUHAMOUR, W., JOHNSON, W. Enterococcal Infection (on-line). (cit. 2005-12-15).

Dostupné z URL: <http://www.emedicine.com/ped/topic2703.htm>

ALEXANDROWICZ, J. Drug resistance of Enterococcus species isolated from the urogenital system. Medycyna do inverted question markwiadczalna i mikrobiologia, 1999, 51 (3-4), s. 233 - 8.

BEDNÁŘ, M., FRAŇKOVÁ, V., SCHINDLER, J., SOUČEK, A., VÁVRA, J. Lékařská mikrobiologie. Nakladatelství Marvil Praha, 1996, s. 213-214.

BENEŠ, J., KABELKOVÁ, M., DŽUPOVÁ, O. Enterokoková endokarditida. Klinická mikrobiologie a infekční lékařství, 1997, 3, 10, s. 289 – 293.

BERGEROVÁ, T., TURKOVÁ, S. První vankomycin-rezistentní enterokoky ve FN v Plzni. Klinická mikrobiologie a infekční lékařství, 1997, 3, 10, s. 183, 287 – 288.

BONTEN, M. J., WILLEMS, R. J., WEINSTEIN, R. A. Vancomycin-resistant enterococci: why are they here, and where do they come from?, The Lancet Infectious Diseases, 2001, 1, 5, s. 314 – 325

CALDERÓN-JAIMES, E., ARREDONDO-GARCÍA, J. L., AGUILAR-ITUARTE, F., GARCÍA-ROCA, P. In vitro antimicrobial susceptibility in clinical isolates of Enterococcus species. Salud Pública de México, 2003, 45, 2, s. 96 – 101.

COQUE, T. M., WILLEMS, R. J., FORTUN, J., TOP, J., DIZ, S., LOZA, E., CANTON, R., BAQUERO, F. Population structure of Enterococcus faecium causing bacteremia in a Spanish university hospital: setting the scene for a future increase in vancomycin resistance?, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2005, 49, 7, s. 2693 – 2700.

DAVIS, J. M., HUYCKE, M. M., WELLS, C. L., BOHNEN, J. M., GADALETA, D., FICHTL, R. E., BARIE, P.S. Surgical Infection Society Position on Vancomycin – Resistant Enterococcus. Archives of Surgery. 1996, 131, 10, s. 1061 – 1068.

DAY, A. M., SANDOE, J. E. T., COVE, J. H., PHILLIPS-JONES, M. K. Evaluation of biochemical test scheme for identifying clinical isolates of Enterococcus faecalis a Enterococcus faecium. Letters in Applied Microbiology. 2001, 33, 5, s. 392 – 396.

DEVRIESE, L. A., CRUZ COLQUE, J. I., DE HERDT, P., HAESEBROUCK, F. Identification and Composition of the Tonsillar and Anal Enterococcal and Streptococcal Flora of Dogs and Cats. Journal of Applied Microbiology. 1992. 73, 5, s 421 – 425.

FACKLAM, R. R., SAHM, D. F. Enterococcus. Manual of Clinical Microbiology. 6.vydání. American Society for Microbiology Press, Washington D.C., 1995. s. 308 – 314.

FARMAKOLOGIE (ON-LINE), (cit. 2006-21-01). Dostupné z URL: <http://www.mujweb.cz/www/ikesw/farma.html>

FONTANA, R., ALDEGHERI, M., LIGOZZI, M., LOPEZ, H., SUCARI, A., SATTA, G. Overproduction of a Low-Affinity Penicillin-Binding Protein and High-Level Ampicillin Resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1994, 38, 9, s. 1980 – 1983.

FRANZ, C. M., STILES M. E., SCHLEIFER K. H., HOLZAPFEL W. H. Enterococci in foods – a conundrum for food safety. *International Journal of Food Microbiology*, 2003, 88, 2 – 3, s. 105 – 122.

HÄLLGREN, A., ABEDNAZARI, H. Antimicrobial susceptibility patterns of enterococci in intensive care units in Sweden evaluated by different MIC breakpoint systems. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2001, 48, 1, s. 53 – 62.

HARDIE, J. M., WHILEY, R. A. Classification and overview of the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement*. 1997, 83, 1S – 11S.

HOLT, J.G., KRIEG, N. R., SMEATH, P. ET AL. *Bergey's Manual of Determination Bacteriology*. 9.vydání. Baltimore, 1994, s. 528 – 529, s. 538 – 539.

HORÁČEK J. Antimikrobiální látky. *Lékařské listy*, 2003, 7, s. 10 – 21.

HORÁČKOVÁ. Rekurující infekce močových cest – problém stále aktuální v klinické ambulantní praxi. *Medicína*. 2000, 3, 8, s. 24 – 28.

HUPKOVÁ, M., KRÁLÍKOVÁ, K., KRČMÉRY, V. Grampozitivne koky: Výskyt a prenosnosť génov antibiotickej rezistencie a pre produkciu toxínov. *Praktický lékař*, 1995, 75, 5, s. 225 – 227.

HUYCKE, M. M., SAHM, D. F., GILMORE, M. S. Multiple – Drug Resistant Enterococci: The Nature of the Problem and an Agenda for the Future. *Emerging Infectious Diseases*, 1998, 4, 2, s. 239 – 249 (on-line). (cit. 2005-12-20). Dostupné z URL: <http://www.cdc.gov/ncidod/eid/vol4no2/adobe/huy.pdf>

CHAVERS, L. S., MOSER, S. A., BENJAMIN, W. H., BANKS, S. E., STEINHAUER, J. R., SMITH, A. M., JOHNSON, C. N., FUNKHOUSER, E., CHAVERS L. P., STAMM A. M., WAITES K. M. Vancomycin-resistant enterococci: 15 years and counting, *The Journal of Hospital Infection*. 2003, 53, 3, s. 159 – 71.

JETT, B. D., HUYCKE, M. M., GILMORE, M. S. Virulence of Enterococci. *Clinical Microbiology Reviews*. 1994, 7, 4, s. 462 – 427.

KAYSER, F. H. Safety aspects of enterococci from the medical point of view. *International Journal of Food Microbiology*. 2003, 88, 2-3, s. 255 – 262.

KLEIN, G. Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of enterococci from food and gastrointestinal tract. *International Journal of Food Microbiology*. 2003, 88, 2 – 3, s. 123 – 131.

KOCH, S., HUFNAGEL, M., THEILACKER, CH., HUEBNER, J.: Enterococcal infections: host response, therapeutic and profylctic possibilities. *Vaccine*. 2004, 22, 7, s. 822 – 830.

KOLÁŘ, M., ČEKANOVÁ, L., VÁGNEROVÁ, I., KESSELOVÁ, M., SAUER, P., KOUKALOVÁ, D., HEJNAR, P. Molecular-Biological Analysis of Vancomycin-Resistant Enterococci Isolated from a Community in the Czech Republic. *Biomedical Papers*. 2004, 148, 2, s. 167 – 169. (on-line). (cit. 2005-21-11)

Dostupné z URL:><http://publib.upol.cz/~obd/fulltext/Biomed/2004/2/167.pdf>

KOLÁŘ, M., PANTŮČEK, R., VÁGNEROVÁ, I., KESSELOVÁ, M., SAUER P., MATOUŠKOVÁ, I., RŮŽIČKOVÁ, V., DOŠKAŘ, J. Genetická příbuznost kmenů *Enterococcus faecium* VanA u pacientů s hemato-onkologickým onemocněním. *Klinická mikrobiologie a infekční lékařství*. 2003, 9, 6, s. 284-288.

KOLÁŘ, M., VÁGNEROVÁ, I.: Záchyt vankomycin-rezistentních enterokoků ve FN v Olomouci. *Klinická mikrobiologie a infekční lékařství*, 1997, 3, 6-7, s. 189 – 191.

KONEMANN, J., ELMER, W. *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. Nakladatelství: J. B. Lippincott Company Philadelphia. 1988.

KUNDEROVÁ, H. Má *Leuconostoc* význam v klinické mikrobiologii? *Klinická mikrobiologie a infekční lékařství*. 1997, 3, 9. s. 251 – 252.

LYTSY, B., CARS, O., TORELL, E. Quinolones--a cure which became a threat. Accelerating resistance development demands stricter indications. *Lakartidningen*. 2005, 102, 48, s. 3651 – 3656.

MANERO, A., BLANCH, A. R. Identification od *Enterococcus* spp. with a Biochemical Key. *Applied and Environmental Microbiology*. 1999. s. 4425 – 4430.

- MÉNDEZ-ÁLVAREZ, S., PÉREZ-HERNANDEZ, X., CLAVERIE-MARTÍN, F.:** Glycopeptide Resistance in Enterococci. *International Microbiology*. 2000, 3, s. 71 – 80.(on-line). (cit. 2006-21-01)
- Dostupné z URL: <http://www.im.microbios.org/10june00/03%20Mendez.pdf>
- MERCK** – Mikrobiologie Handbuch, Darmstadt, 1996.
- MOELLERING, R. C.** Emergence of Enterococcus as a Significant Pathogen. *Clinical Infectious Diseases*. 1992, 14, s. 1137 – 8.
- MOLTERER, W. (RADA EVROPSKÉ UNIE)** Úřední věstník L 351, 1998-12-29, S. 0004 – 0008
- MONTECALVO, M. A., HOROWITZ, H., GEDRIS, CH. CARBONARO, C., TENOVER, F. C., ISSAH, A., COOK, P., WORMSER, G. P.** Outbreak of Vancomycin-, Ampicillin-, and Aminoglycoside-Resistant Enterococcus faecium Bacteremia in an Adult Oncology Unit. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1994, 38, 6, s. 1363 – 1367.
- MOTLOVÁ, J.** Identifikace enterokoků – metodický návod. *Zprávy CEM (SZÚ, Praha)*, 1997a, 6, 2, s. 18-22.
- MOTLOVÁ, J.** Kam spěje taxonomie rodů Streptococcus a Enterococcus? II.část. *Zprávy CEM (SZÚ Praha)*, 2003, 12, 8 s. 339 - 342
- MOTLOVÁ, J.** Klinický význam kmenů rodu Leuconostoc. *Zprávy CEM (SZÚ, Praha)*. 1997b, 6, 6, s. 22.
- NÝČ, O.** Antimikrobiální rezistence jako globální problém. *Lékařské listy*, 2003, 7, 1, s. 8 - 9.
- OUHSC** Standard Laboratory Methods for Identifiing and Growing Enterococci. (on-line). (cit. 2005-12-20). Dostupné z URL: http://www.enterococcus.ouhsc.edu/lab_methods.asp
- PARKER, M. T., DUERDEN, B. I.** *Systematic Bacteriology*. B. C. Decker, s. 143 – 145.
- RICE, L. B.** Emergence of Vancomycin-Resistant Enterococci. *Emerging Infectious Diseases*. 2001, 7, 2, s. 183 – 187.
- RUOFF, K. L., DE LA MAZA, L., MURTAGH, M. J., SPARGO, J. D., FERRARO, M. J.** Species identities of enterococci isolated from clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology*. 1990, 28, 3, s. 435 – 437.
- SAARS:** Enterococcus spp. (on-line). (cit. 2005-12-20). Dostupné z URL: http://www.members.tripod.com/piece_de_resistance/SAARS/bugs/menteroc.htm
- SEMAN, M., NOGOVÁ, P., TRUPL, J.** Pohľad na enterokoky vo svetle súčasných poznatkov. *Buletin československej spoločnosti mikrobiologickej*. 2003, 2, s. 58 – 78.

- SCHLIEVERT, P. M., GAHR, P. J., ASSIMACOPULOS, A. P.** Aggregation and binding substances enhance pathogenicity in rabbit models of *Enterococcus faecalis* endocarditis. *Infection and Immunity*. 1998, 66, 1, s. 218 – 223.
- SIMON C., STILLE W. ET AL.** Antibiotika v současné lékařské praxi. 1. vydání. Grada Publishing, Praha, 1998.
- SPERA, R. V., FARBER, B. F.** Multidrug-Resistant *Enterococcus faecium* – An Untreatable Nosocomial Pathogen. *Drugs*. 1994, 48, 5, s. 678 – 688.
- STOSOR, V., PETERSON, L. R., POSTELNICK, M., NOSKIN, G. A.** *Enterococcus faecium* bacteremia: does vancomycin resistance make a difference?, *Archives of Internal Medicine*. 1998, 9, 158, 5, s. 522 – 27.
- ŠEVČÍKOVÁ A., ŠEVČÍK P.:** Principy antimikrobiální léčby u uroinfekcí. *Urologické listy*. 2005, 3, 2, s. 5 – 12.
- TENDOLKAR, P. M., BAGHDAYAN, A. S., SHANKAR, N.** Pathogenic enterococci: new developments in the 21st century. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2003, 60, s. 2622 – 2636.
- URBÁŠKOVÁ, P.** Enterokoky a jejich rezistence k antibiotikům, *Klinická mikrobiologie a infekční lékařství*. 1997, 3, 10, s. 269 – 277.
- URBÁŠKOVÁ, P., MOTLOVÁ, J. ET AL.** Rezistence k ampicilinu, vankomycinu a k vysokým koncentracím aminoglykosidů u kmenů *E. faecalis* a *E. faecium*, izolovaných z krve (předběžné sdělení). *Klinická mikrobiologie a infekční lékařství*. 1997, 3, 10, s. 278 – 281.
- VOTAVA, M. ET AL.** *Lékařská mikrobiologie speciální*. 1. vydání. Nakladatelství Neptun Brno, 2003.
- VOTAVA, M.** *Kultivační půdy v lékařské mikrobiologii*. 1. vydání. Nakladatelství Hortus Brno. 2000.
- WILLEMS, R. J., TOP, J., VAN SANTEN, M., ROBINSON, D. A., COQUE, T. M., BAQUERO, F., GRUNDMANN, H., BONTEN, M. J.** Global spread of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from distinct nosocomial genetic complex. *Emerging Infectious Diseases*. 2005, 11, 6, s. 821-8.