



NRC PRE VIBRIONACEAE  
RÚVZ SO SÍDLOM V KOMÁRNE  
MEDERČSKÁ 39  
945 75 KOMÁRNO

## Metodické usmernenie

### Mikrobiologická diagnostika cholery a iných vibrióz

#### 1. Cholera

Metodické usmernenie na mikrobiologickú diagnostiku cholery sa vydáva v súvislosti s epidemickým výskytom cholery na rôznych štátoch Afriky a Ázie s možnosťou zavlečenia tohto ochorenia na územie Európy a Slovenskej republiky. V zdravotnoprávných dokumentoch EU je cholera klasifikovaná ako závažné importované ochorenie, ktoré môže ohroziť aj jej obyvateľov, čo je zvlášť aktuálne v súčasnom období prílevu migrantov aj zo štátov, kde sa cholera vyskytuje epidemicky.

##### 1.1. Etiológia ochorenia

Cholera je prudké gastrointestinálne ochorenie, ktoré vyvoláva bakteriálny druh *Vibrio cholerae*, séroscupiny O1 - sérotypy Ogawa, Inaba, Hikojima.

V súčasnosti najčastejšie izolovaným agensom je biotyp El Tor, ktorý hemolyzuje baranie krvinky rovnakých sérotypov ako klasické *Vibrio cholerae*. Okrem tohto biotypu spôsobuje epidemické ochorenia aj *Vibrio cholerae* O139 Bengal, zo skupiny non O1 vibrií, ktorý akviroval schopnosť tvorby cholerového toxínu.

Hlavným faktorom patogenity *Vibrio cholerae* je termolabilný enterotoxín (choleragén), ktorý podmieňuje prolongovanú hypersekréciu vody a elektrolytov do lumenu tenkého čreva. Výsledkom je prudká hnačka so stratou 20 – 30 litrov tekutiny denne následkom čoho dochádza k dehydratácii, hypovolemickému šoku, poruche acidobázickej rovnováhy a úmrtiu. Klinické ochorenie začína po 2 – 3 dňovom inkubačnom čase, príznakmi sú vracanie a prudká vodnatá bezfarebná hnačka bez zápachu, ktorá vzhľadom pripomína ryžový odvar. Mortalita u neliečených pacientov je 60 – 70 %.

##### 1.2 Epidemiológia

Jediným prameňom pôvodcu nákazy je človek, faktorom prenosu je najčastejšie voda a potraviny. Z nich prichádza do úvahy hlavne mlieko a mliečne výrobky, surové ovocie a zelenina, prípadne iná nevarená potravina. Pri kontaktnej infekcii hrá dôležitú úlohu špinavá bielizeň chorých ľudí, v ktorej vo vlhkom stave, môžu prežiť vibriá aj niekoľko týždňov. Prežívanie vibrií vo výkaloch je závislé od vonkajšej teploty, pohybuje sa v rozmedzí od jedného dňa až niekoľko týždňov. Na zamrznutých potravinách prežívajú vibriá dlhšie. Kmene biotypu El Tor prežívajú vo vonkajšom prostredí dlhší čas, ako kmene klasického biotypu. V prenose nákazy sa môžu uplatňovať aj muchy pasívnym prenosom. V preventívnych opatreniach najdôležitejšiu úlohu má hygiena životného prostredia a osobná hygiena. Zvláštnu pozornosť je potrebné venovať nezávadnosti pitnej a úžitkovej vody, odstraňovaniu výkalov a odpadkov rovnako tiež potravinám.

##### 1.3. Bacilonosičstvo

Vzhľadom na patofyziologický mechanizmus ochorenia rekonvalescentné bacilonosičstvo trvá najčastejšie niekoľko dní, boli však zaznamenané prípady dvoj-trojtyždňového vylučovania vibrií. Zriedkavo môže trvať bezpríznakové nosičstvo aj viac mesiacov alebo rokov.

Kontakty:

e-mail: [ruvzkn@uvzs.sk](mailto:ruvzkn@uvzs.sk), telefón: 0357702627, mobil: 0911 205 433



NRC PRE VIBRIONACEAE  
RÚVZ SO SÍDLOM V KOMÁRNE  
MEDERČSKÁ 39  
945 75 KOMÁRNO

## 2. Odber a transport biologického materiálu

### 2.1 Biologický materiál

Pri podozrení na cholera alebo gastrointestinálnu vibriózu sa na mikrobiologické vyšetrenie odoberá stolica, alebo rektálne výtery na vatový detoxikovaný tampón, prípadne do nádobiek z plastu pred začatím antibiotickej liečby. Biologický materiál by mal byť odobratý čo najskôr, v priebehu prvých 24 hodín po objavení sa klinických príznakov. Na kultiváciu sa môžu do laboratória zaslať aj zvratky, prípadne iný materiál. Vibriá sú veľmi citlivé na vysychanie, preto je vhodné pri dlhodobom transpote (viac ako 2 hodiny) výtery vložiť do polotekutého transportného média – alkalická peptónová voda s prísadou kalium teluritu – Goharovo médium alebo je odber možný do Cary–Blairovho média, v ktorom sa vibriá nepomnožujú, ale dlhodobo prežívajú (až 4 týždne) rovnako je možné použiť aj médium Amiesovo alebo Stuartovo.

V prípade iných ako gastrointestinálnych vibrióz sa odoberá materiál z miesta infekcie sterom na detoxikovaný tampón, vzorka sa transportuje v Amiesovom alebo Stuartovom médiu.

Pri odbere klinického materiálu je potrebný odber z charakteristického miesta v počiatočnom alebo rozvinutom štádiu príznakov ochorenia.

### 2.2 Odber vzoriek vôd

Na odber sa používajú sterilné fľaše o objeme 0,5 až 1 l so zabrušenou zátkou. Miesto odberu vzorky vody sa určí podľa charakteru zdroja a cieľa vyšetrenia. Z tečúcej vody sa odoberajú vzorky podľa možnosti z rýchleho prúdu z vrstvy do 50 cm od hladiny vody. Na neprístupných miestach sa vzorky odoberajú z brehu pomocou odberovej tyče, v stojatých vodách z brehu pomocou odberovej tyče alebo z člna z rôznych lokalít vodnej plochy. Miesto odberu určuje mikrobiológ po konzultácii s epidemiológom. Pitná voda sa odoberá podľa platných noriem. Keďže vibriá sú schopné tvoriť biofilmy, je možné odobrať aj povlaky a sedimenty (sterom na detoxikovaný tampón alebo do sterilných odberových nádobiek).

## 3. Laboratórne spracovanie vzoriek

### 3.1 Mikroskopické vyšetrenie

Stolicu, ktorá vo včasnom štádiu ochorenia má vzhľad ryžovej vody je možné mikroskopovať v kvapke fyziologického roztoku (podľa konzistencie stolice) ako natívny preparát v tmavom poli alebo s použitím fázového kontrastu, kde zisťujeme charakteristické baktérie zakrivené na pozdĺžnej osi – rožtekovitého tvaru. Vibriá sa v natívnom preparáte rýchlo pohybujú a pripomínajú húfy plávajúcich rýb.

### 3.2 Spracovanie klinického materiálu

Materiál z gastrointestinálnych ochorení (stolica, zvratky), rovnako materiál zo sterových tampónov sa očkuje v prípade jasnej klinickej diagnózy na selektívne bakteriologické tekuté a pevné médiá. V selektívnej kultivácii pri 37 °C sa využíva vlastnosť vibrií rásť v prítomnosti reakcie žlčových solí a silne alkalické reakcii pH (8,2 - 8,6). Ako pevné kultivačné pôdy sa používajú hlavne tiosíran-citran-žlč-

Kontakty:

e-mail: [ruvzkn@uvzs.sk](mailto:ruvzkn@uvzs.sk), telefón: 0357702627, mobil: 0911 205 433



NRC PRE VIBRIONACEAE  
RÚVZ SO SÍDLOM V KOMÁRNE  
MEDERČSKÁ 39  
945 75 KOMÁRNO

sacharózový agar (TCŽS, TCBS), ktoré je vhodné doplniť aj o chromogénne médiá na izoláciu vibrií (Chromagar Vibrio, Chromatic Vibrio). Ďalej je možné materiál inokulovať na MacConkey (Mc) agar. Súčasne sa materiál naočkuje do pomnožovacej pôdy ktorou je alkalická peptónová voda (APV), s úpravou Ph na 8,5. Doba pomnoženia je 4-9 hodín pri 37 °C alebo cez noc pri izbovej teplote, s následným vyočkovaním na uvedené agarové pôdy. Po uvedenom inkubačnom čase je v prípade negatívneho záchytu potrebné preočkovanie do ďalšej APV, celkovo 2 až 3 krát.

### 3.3 Spracovanie pitných, povrchových a odpadových vôd

Vzorky pitných, povrchových a komunálnych odpadových vôd spracovávame tzv. cholеровou technikou s cieľom izolácie všetkých zástupcov čeľade Vibrionaceae. Vzhľadom na vysoký výskyt sprievodnej bakteriálnej mikroflóry, najmä enterobaktérií v odpadových a povrchových vodách, nutnou podmienkou je používať selektívnu kultiváciu. Vzorka vody sa po odbere inokuluje v objeme 400 ml do 40 ml 10 x koncentrovanej peptónovej vody a po 4-9 hodinovej inkubácii pri 37°C alebo cez noc pri izbovej teplote sa vyočkuje tampónom alebo bakteriologickou kľučkou na TCBS a aspoň jednu ďalšiu selektívne-diagnostickú pôdu (Mc alebo chromogénne médiá). Po tomto inkubačnom čase je naočkovaná ďalšia peptónová voda v skúmavke s následnou inkubáciou 24 hodín pri 37°C a vyočkovanie na rovnaké bakteriologické pôdy ako pri prvom pomnožení. Pitnú a povrchovú vodu možno filtrovať cez vhodné membránové filtre (nitrocelulóza s veľkosťou pórov 0,45 um) v množstve podľa predpokladanej kontaminácie vody (väčšinou 100 – 500 ml). Filter sa potom vloží do alkalickéj peptónovej vody s pretrepaním a inkubuje sa 4-9 hodín pri 37°C alebo cez noc pri izbovej teplote, s vyočkovaním na uvedené kultivačné pôdy. Druhou možnosťou je filter filter položiť priamo na TCBS a ďalšie kultivačné médium a takto kultivovať 24 až 48 hodín pri 37 °C.

Pred vyočkovaním z tekutých pod sa pôda nepremiešava, materiál na vyočkovanie sa odoberá tampónom alebo očkovacou kľučkou z povrchu tekutého média (rozhranie kvapalina/plyn, prípadne blanka z povrchu). Ďalšie vyočkovania sa doporučujú v prípade negatívneho záchytu po 24 - 72 hodinách.

### 3.4 Hodnotenie kultúr a diagnostika

Vyrastené kolónie sa hodnotia po 18 - 24 hodinách, na selektívnych pôdach aj po 48 hodinách. Na pôde TCBS rastú vibriá, ktoré fermentujú sacharózu v podobe žltých priesvitných kolónií v priemere 1 - 3 mm. Vibriá je možné zameniť s kmeňmi aeromonád, ktoré fermentujú sacharózu a niekedy môžu na TCBS rásť. Žlté kolónie je možné preočkovať na pôdu TSI, zistenie tvorby indolu a hydrolýzu ury, ako základných biochemických znakov alebo postupovať podľa zaužívaných zvyklostí laboratória. Na vyhľadávanie kolónií vibrií možno použiť aj oxidázový test, vždy však z neselektívneho média. Ďalej je vhodné vykonať string test (vibriá sú pozitívne). Ďalšia identifikácia izolovaných kmeňov pozostáva zo zisťovania širokej škály biochemických, fyziologických a antigénnych vlastností vibrií. Na identifikáciu možno v súčasnosti použiť aj automatizované systémy - API systém, BBL Crystal, EnteroTest a iné. Izolácie a identifikácie vibrií z ostatných bakteriologických pôd sú rovnaké a závisia od laboratórnej rutiny a schopnosti mikrobiológa. Na identifikáciu je možné využiť aj molekulárno biologické metódy

Kontakty:

e-mail: [ruvzkn@uvzs.sk](mailto:ruvzkn@uvzs.sk), telefón: 0357702627, mobil: 0911 205 433



NRC PRE VIBRIONACEAE  
RÚVZ SO SÍDLOM V KOMÁRNE  
MEDERČSKÁ 39  
945 75 KOMÁRNO

PCR. Biochemické testy sa odporúča robiť v médiách s prídavkom 1 % NaCl, ktorý väčšina vibrií ako halofily vyžadujú a potencuje aj rast *Vibrio cholerae*.

Kmene, ktoré biochemickými a fyziologickými vlastnosťami zodpovedajú charakteristike rodu *Vibrio* je potrebné zaslať na ďalšiu identifikáciu alebo potvrdenie identifikácie do NRC pre Vibrionaceae pri RÚVZ so sídlom v Komárne, ktoré zabezpečuje finálnu mikrobiologickú diagnostiku vibrií, vrátane sérologickej typizácie *V. cholerae* (Ogawa, Inaba, Hikojima, sérotyp O139) a stanovenia produkcie cholerového toxínu.

Aktualizoval: RNDr. Martin Sojka, PhD., vedúci NRC pre Vibrionaceae pri RÚVZ so sídlom v Komárne  
dňa 26.02. 2020

Kontakty:

e-mail: [ruvzkn@uvzs.sk](mailto:ruvzkn@uvzs.sk), telefón: 0357702627, mobil: 0911 205 433