Rekomendacje laboratoryjnej diagnostyki zakażeń przewodu pokarmowego bakteriami rosnącymi w warunkach tlenowych oraz mikroaerofilnych

Rekomendacje
Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego
Państwowego Zakładu Higieny [1]
i Krajowej Izby Diagnostów Laboratoryjnych [2]

[1,2] Dr n. med. **Jolanta Szych**, emerytowany, wieloletni kierownik Pracowni Diagnostyki Bakteryjnych Zakażeń Przewodu Pokarmowego Zakładu Bakteriologii Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego – PZH

Spis treści

I. Epidemiologia zakażeń 3

II. Drogi zakażenia i naturalny przebieg zakażenia, nosicielstwo bakterii chorobotwórczych 5

III. Diagnostyka laboratoryjna 9

1. Zasady ogólne i wymagania prawne. 9
2. Wskazania do wykonania badań i ich ukierunkowania 11
3. Zlecenie badania laboratoryjnego 16
4. Pobieranie próbek materiału 17
5. Transport 18
6. Przyjmowanie próbek materiału do badań 19
7. Metody badawcze 20
8. Badania referencyjne 29
9. Wymagania dotyczące stosowanych wyrobów do diagnostyki *in vitro*: aparatury, pożywek i testów diagnostycznych 30
10. Zapewnienie jakości badań laboratoryjnych 31
11. Formułowanie i wydawanie wyników 32
12. Zgłaszanie wyników państwowej inspekcji sanitarnej oraz innym podmiotom właściwym ze względu na rodzaj biologicznego czynnika chorobotwórczego 34

IV. Wybrane pozycje piśmiennictwa 36

Redakcja merytoryczna
Jolanta Szych

Część prawna i poprawki
Elżbieta Puacz

Skład i druk
THORG-STUDIO Paweł Kaniuk

Stosowane skróty:

VTEC/STEC	– Werotoksynogenne/shigatoksynogenne pałeczki E. coli
EPEC	– Enteropatogenne pałeczki E. coli
ETEC	– Enterotoksynogenne pałeczki E. coli
EIEC	– Enteroinwazyjne pałeczki E. coli
EAEC	– Enteroagregacyjne pałeczki E. coli
MC	– Podłoże MacConkey'a
SS	– Podłoże Salmonella Shigella
WB	– Podłoże Wilson-Blaira (Bismuth Sulphite Agar)
HE	– Podłoże Hektoen Enteric Agar
SMAC	– Podłoże MacConkey'a z sorbitolem
SF	– Podłoże z kwaśnym seleninem sodu
CIN	– Podłoże dla pałeczek *Yersinia* (Cefsulodin, Irgasan, Novobiocin)
XLD	– Podłoże dla Salmonella i Shigella (Xylose, Lysine, Deoxycholate Agar)
CCDA	– Podłoże dla Campylobacter (Charcoal, Cefoperazon, Deoxycholate Agar)
PCR	– Reakcja łańcuchowa polimerazy (ang. polymerase chain reaction)
ECDC	– Europejskie Centrum Zapobiegania i Kontroli Chorób (ang. European Centre for Disease Prevention and Control)
EFSA	– Europejski Urząd do spraw Bezpieczeństwa Żywności (ang. European Food Safety Authority)

I. Epidemiologia zakażeń

Ostre zakażenia i zarażenia przewodu pokarmowego objawiające się zwykle biegunką a także z różną częstością wymiotami, gorączką, bólem brzucha, obecnością śluzu lub krwi w kale są według danych Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) obok zakażenia układu oddechowego jedną z głównych przyczyn zachorowań i zgonów niemowląt i małych dzieci na świecie. Zakażenie przewodu pokarmowego jest również jednym z najczęściej występujących zakażeń u starszych dzieci i osób dorosłych. Chociaż najczęstszą przyczyną biegunki infekcyjnej, zwłaszcza u niemowląt i najmłodszych dzieci, są wirusy, istotny udział z zakażeniach mają też bakterie, natomiast najrzadziej wykrywaną przyczyną zachorowania są inwazje pasożytnicze.

Zakażenia przewodu pokarmowego o etiologii bakteryjnej zwykle mają charakter samoograniczający się i, w przypadku gdy przebieg zakażenia jest łagodny, zazwyczaj nie wymagają interwencji lekarza i podjęcia badań laboratoryjnych w celu ustalenia przyczyny zakażenia.

Nie są one także rejestrowane w meldunkach epidemiologicznych. Natomiast zarejestrowane przypadki dotyczą głównie zachorowań o cięższym przebiegu lub przewlekłych, co potwierdza dość wysoki odsetek osób wymagających hospitalizacji, i w tych przypadkach dla ustalenia dalszego postępowania z chorym wskazane jest wykrycie etiologicznego czynnika zakażenia.

Do etiologicznych czynników zakażeń przewodu pokarmowego wywołanych przez bakterie rosnące w warunkach tlenowych należą chorobotwórcze pałeczki z rodziny Enterobacteriaceae: *Salmonella* (spośród nich biegunkę wywołują – pałeczki należące do serotypów tzw. niedurowych nie – S. Typhi i nie – S. Paratyphi), *Shigella*, *Yersinia enterocolitica* i *Yersinia pseudotuberculosis*, chorobotwórcze pałeczki *Escherichia coli* (enteropatogenne – EPEC, enterotoksynogenne – ETEC, werotoksynogenne/shigatoksynogenne – VTEC/STEC, enteroinwazyjne – EIEC i enteroagregacyjne – EAEC).

Z wyjątkiem EPEC, odpowiedzialnych za zakażenia u niemowląt i dzieci do 2 roku życia, wszystkie pozostałe patogeny są izolowane od osób chorych w każdym wieku, jednak najczęściej od dzieci do 5 roku życia.

Do bakteryjnych etiologicznych czynników biegunki należą również drobnoustroje związane ze środowiskiem wodnym, czyli pałeczki *Plesiomonas shigelloides* oraz pałeczki z rodziny *Vibrionaceae*: *Vibrio cholerae, V. parahemolyticus, V. fluvialis* i *Aeromonas* sp. *głównie A. hydrophila*. W naszej strefie klimatycznej te drobnoustroje są bardzo rzadko izolowane z kału chorych, ale można się ich spodziewać u osób z biegunką powracających z Azji, Afryki lub Ameryki Łacińskiej

a także chorych niepodróżujących wcześniej, lecz podających w wywiadzie spożycie surowych potraw przygotowanych z tzw. „owoców morza".

W zakażeniach przewodu pokarmowego człowieka mają też swój udział bakterie Gram-dodatnie: pałeczki *Listeria monocytogenes* i laseczki *Bacillus cereus* (typ biegunkowy). Zatrucia pokarmowe wywołują enterotoksyny wytwarzane przez koagulazo-dodatnie gronkowce, głównie *Staphylococcus aureus* oraz laseczki *Bacillus cereus* (typ wymiotny).

Bardzo istotnym, choć ciągle rzadko wykrywalnym w naszym kraju czynnikiem zakażeń przewodu pokarmowego są też pałeczki z rodzaju *Campylobacter*.

Należy podkreślić, że w krajach Unii Europejskiej, w tym we wszystkich sąsiadujących z Polską, pałeczki *Campylobacter* są wykrywane u chorych ponad dwukrotnie częściej niż *Salmonella*. Badania wykonane w latach 2006-2009 na przykładzie wybranego regionu Polski, wykazały, że także w naszym kraju pałeczki *Campylobacter* są dominującym etiologicznym czynnikiem biegunki pochodzenia bakteryjnego.

Są to bakterie rosnące przy obniżonej zawartości tlenu tzw. mikroaerofilne, optymalna dla ich wzrostu atmosfera powinna zawierać 5% O_2, 10% CO_2, oraz 85% N_2. Nie jest więc możliwe ich wyhodowanie w toku rutynowo wykonywanego posiewu kału.

Warunki takie można sztucznie wytworzyć poprzez zastosowanie dostępnych w handlu generatorów warunków mikroaerofilnych lub przez sporządzenie odpowiedniej mieszaniny gazów pochodzących z butli. Najczęściej z próbek kału od ludzi izoluje się pałeczki *Campylobacter* zaliczane do gatunków termofilnych tj. *C. jejuni*, rzadziej *C. coli*, sporadycznie spotyka się także *C. upsaliensis*,

C. lari i *C. hyointestinalis.* W bardzo rzadkich przypadkach, zwykle z innych próbek materiału niż kał, izoluje się także pałeczki *C. fetus.*

Z danych publikowanych corocznie przez Zakład Epidemiologii NIZP-PZH we współpracy z GIS w biuletynie „Choroby Zakaźne i Zatrucia w Polsce" wynika, że rocznie w naszym kraju rejestruje się ponad 17 tysięcy przypadków bakteryjnych zakażeń przewodu pokarmowego (głównie salmonelozy) z hospitalizacją ponad 70 % przypadków i około 1600 przypadków zatruć pokarmowych. Powyższe dane nie uwzględniają bakteryjnych zakażeń i zatruć pokarmowych wywołanych przez bakterie beztlenowe.

Rekomendacje laboratoryjnej diagnostyki ostrych zakażeń przewodu pokarmowego bakteriami rosnącymi w warunkach tlenowych oraz mikroaerofilnych zawierają podstawowe wskazówki postępowania w przypadku poszukiwania w próbkach kału od osób z biegunką najczęstszych etiologicznych czynników zakażenia, tj. chorobotwórczych pałeczek jelitowych należących do rodziny Enterobacteriaceae lub Vibrionaceae oraz pałeczek z rodzaju *Campylobacter*. Zawierają też wskazówki dotyczące przebiegu bakteriologicznego badania kału na nosicielstwo pałeczek *Salmonella* i *Shigella* u osób zdrowych.

Bardziej szczegółowe informacje, w tym dokumentację fotograficzną, zawarto w opracowaniu pod redakcją Marka Jagielskiego pt. „Etiologia, obraz kliniczny i diagnostyka ostrych zakażeń i zarażeń przewodu pokarmowego oraz zatruć pokarmowych" wydanym przez Krajową Izbę Diagnostów Laboratoryjnych.

II. Drogi zakażenia i naturalny przebieg zakażenia, nosicielstwo bakterii chorobotwórczych

Większość bakterii, które są odpowiedzialne za ostre zakażenia przewodu pokarmowego u ludzi, jest pochodzenia odzwierzęcego (wyjątkiem są pałeczki *Shigella* i EAEC). Stanowią one naturalną florę jelitową wielu gatunków zwierząt hodowlanych i dzikich, w związku z tym mogą być obecne w środowisku i wodzie.

Do zakażenia dochodzi drogą pokarmową poprzez spożycie skażonej żywności (głównie niedogotowanego, niedopieczonego mięsa, surowych jaj, niepasteryzowanego mleka i jego przetworów, a także niewłaściwie nawożonych lub podlewanych warzyw) lub skażonej odchodami wody, a u niemowląt także przez bezpośrednie przeniesienie bakterii na rękach opiekunów.

Niewłaściwe postępowanie przy obróbce i przechowywaniu surowców spożywczych może doprowadzić także do wtórnego skażenia każdego innego rodzaju żywności przygotowywanej w kuchni lub przechowywanej w lodówce, co zwłaszcza **w przypadku bakterii mających bardzo niewielką dawkę zakażającą rzędu kilkuset komórek bakteryjnych (*Shigella*, VTEC, *Campylobacter, Yersinia enterocolitica, Yersinia pseudotuberculosis*) może skutkować wystąpieniem zachorowań u narażonych osób. Inne czynniki ryzyka obejmują również bezpośredni kontakt z zakażonymi ludźmi,** którzy mogą wydalać drobnoustroje z kałem i przy braku właściwych nawyków higienicznych (dokładne mycie rąk po skorzystaniu z toalety) mogą przenosić zakażenie na inne wrażliwe osoby, skażać przygotowywaną przez siebie żywność lub powierzchnie, z którymi mają kontakt.

Im mniejsza dawka zakażająca jest potrzebna do wywołania zakażenia tym większe zagrożenie epidemiczne stanowią nosiciele (siewcy) zarazka. Znane są też przypadki zakażeń laboratoryjnych, zakażeń od zwierząt lub po kąpieli w naturalnych, zanieczyszczonych zbiornikach wodnych.

Kliniczne objawy zakażenia wymienionymi bakteriami są na tyle niecharakterystyczne, iż na ich podstawie nie można ustalić przyczyny biegunki. Jednak na podstawie wywiadu lekarskiego, w tym zwłaszcza ustalenia czy chory podróżował w ostatnim czasie i jeśli tak to dokąd oraz opisu przebiegu choroby, wyglądu i objętości oddawanego kału można wnioskować o rodzaju biegunki, a więc czy przyczyną biegunki jest nadmierne wydalanie płynów (biegunka wydzielnicza, inaczej nazywana sekrecyjną, charakterystyczna dla osób podróżujących po krajach o niskich standardach higienicznych, tzw. biegunka podróżnych) czy też jest ona związana z zapaleniem żołądkowo-jelitowym. **Biegunki można podzielić na biegunki o charakterze niezapalnym oraz o charakterze zapalnym**, co w pewnym zakresie powinno pomóc w ukierunkowaniu zakresu badania laboratoryjnego.

W biegunkach o charakterze niezapaplnym stolec jest wodnisty, obfity, bez domieszki śluzu i krwi, chory zwykle nie ma wyraźnie podwyższonej temperatury i zwykle nie odczuwa bólu brzucha.

Proces chorobowy przebiega przede wszystkim w jelicie cienkim, bakterie nie wnikają do enterocytów, ale wytwarzane przez nie toksyny zaburzają w istotny sposób wchłanianie wody i elektrolitów ze światła jelita do krwi. Biegunkę podróżnych o charakterze niezapalnym wywołują najczęściej chorobotwórcze pałeczki *E. coli* należące do kategorii ETEC oraz przecinkowce *V. cholerae*.

Drugim mechanizmem powstawania biegunki jest zaburzenie absorpcji wody. Występuje wtedy, gdy uszkodzone są komórki nabłonka jelita lub dodatkowo jest wynikiem zapalnej reakcji powstającej w odpowiedzi na zakażenie.

Biegunka o charakterze zapalnym objawia się luźnymi stolcami z domieszką śluzu i często również krwi, temperaturą powyżej 38°C oraz bólami brzucha o różnym charakterze w zależności od patogenu.

Biegunka ta jest następstwem zakażenia inwazyjnymi bakteriami z rodzaju *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, *Campylobacter* oraz pałeczkami EIEC i *Plesiomonas* mającymi zdolność wnikania do komórek błony śluzowej przewodu pokarmowego człowieka, a następnie dalszej penetracji i namnażania się we właściwych dla danego drobnoustroju komórkach docelowych. **Krwawą biegunkę o podobnym charakterze, jednak zwykle bez wysokiej temperatury, mogą wywołać także werotoksynogenne szczepy *E. coli* – VTEC, przecinkowce *V. parahaemolyticus* oraz EAEC, które choć same nie wnikają i nie namnażają się we wnętrzu komórek błony śluzowej jelita, to jednak uszkadzają tkanki gospodarza poprzez wytwarzane cytotoksyny lub jak w przypadku EAEC tworzeniu biofilmu prowadząc do destrukcji docelowych komórek i w następstwie pojawienia się krwi w kale.**

W następstwie zakażenia pałeczkami *Aeromonas* obserwuje się typowe objawy zapalenia jelita cienkiego i grubego (*enterocolitis*) ale towarzyszy im zwykle silna biegunka sekrecyjna z oddawaniem ponad 10 l wodnistych stolców na dobę. Z kolei pałeczki okrężnicy zaliczane do kategorii EPEC wywołują biegunkę z powodu zaburzenia absorpcji wody w wyniku ścisłego przylegania do powierzchni komórek nabłonka jelita i ich postępującej destrukcji. Zmiany zachodzące na powierzchni enterocytów zmniejszają powierzchnię zwrotnego wchłaniania wody. Biegunka wywołana przez EPEC może być śluzowa i bardzo rzadko ma charakter biegunki krwawej.

Biegunka może mieć ostry przebieg i po kilku dniach samoistnie ustąpić może także przejść w stan przewlekły z utrzymywaniem się objawów ponad 14 dni. Do najczęstszych bakteryjnych patogenów odpowiedzialnych za przewlekłą biegunkę należą enteroagregacyjne pałeczki okrężnicy rzadziej pałeczki *Salmonella*, *Yersinia*, *Aeromonas* i *Campylobacter*.

W ewentualnym ukierunkowaniu badania diagnostycznego może także pomóc wskazanie przez chorego przypuszczalnej przyczyny zachorowania (spożycie surowego mięsa, jaja lub ryby, kontakt z chorym na zakaźną chorobę przewodu pokarmowego lub ze zwierzętami itp.).

U niektórych osób zakażenie przewodu pokarmowego wymienionymi patogenami może być bezobjawowe lub po ustąpieniu ostrych objawów przebiegać bezobjawowo. **Nosicielstwo niedurowych pałeczek** *Salmonella* **trwa po przechorowaniu zwykle do 5 tygodni, ale może być znacznie dłuższe – ponad 1 rok, natomiast nosicielstwo pałeczek duru brzusznego *S.* Typhi może trwać wiele lat, a nawet do końca życia nosiciela**, rzadziej dotyczy to również nosicieli pałeczek durów rzekomych. **Krótkotrwałe** zazwyczaj (są wyjątki) wydalanie zarazka po ustąpieniu objawów choroby obserwuje się także **w przypadku pozostałych bakterii odpowiedzialnych za biegunkę.**

III. DIAGNOSTYKA LABORATORYJNA

1. Zasady ogólne i wymagania prawne

Medyczne laboratorium diagnostyczne, w którym wykonywane są badania bakteriologiczne w kierunku zakażenia przewodu pokarmowego musi posiadać pomieszczenia, aparaturę, wyposażenie i materiały pomocnicze właściwe dla kierunku i liczby wykonywanych badań.

Stosowane w laboratorium wyroby medyczne do diagnostyki in vitro muszą posiadać certyfikaty jakości zawierające znak CE i IVD.

Przed użyciem powinny być walidowane zgodnie z przeznaczeniem. Dotyczy to także testów biochemicznych stosowanych do identyfikacji wyhodowanych bakterii, które mogą być komercyjnymi zestawami identyfikacyjnymi lub wykonanymi we własnym zakresie klasycznymi testami probówkowymi.

W obu przypadkach należy pamiętać, że identyfikacji podlega hodowla pobrana z pojedynczej kolonii bakteryjnej.

Stosowana aparatura i sprzęt laboratoryjny w zależności od rodzaju podlega kalibracji, okresowym przeglądom lub bieżącym sprawdzeniom. W laboratorium muszą też być zachowane warunki środowiskowe gwarantujące wiarygodność wyników prowadzonych badań i bezpieczeństwo personelu.

Zgodnie z przepisami rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 22 kwietnia 2005 r. w sprawie szkodliwych czynników biologicznych dla zdrowia w środowisku pracy oraz ochrony zdrowia pracowników zawodowo narażonych na te czynniki (Dz. U. 2005, nr 81, poz. 716) pałeczki *S. Typhi*, *S. dysenteriae* 1 oraz VTEC należą do III** grupy zagrożenia.

Konieczne jest także właściwe zorganizowanie obiegu materiału zakaźnego i postępowania z odpadami medycznymi. Spełnienie wszystkich warunków musi być potwierdzone odpowiednimi dokumentami.

Personel laboratorium musi posiadać udokumentowane kompetencje do wykonywania badań. Zgodnie z przepisami ustawy z dnia 5 grudnia 2008 r. o zapobieganiu oraz zwalczaniu zakażeń i chorób zakaźnych u ludzi badania z nadzoru sanitarno-epidemiologicznego (np. w kierunku nosicielstwa pałeczek *Salmonella* i *Shigella*) mogą być wykonywane tylko przez laboratoria akredytowane w tym zakresie.

Za nadzór i autoryzację wyników badań mikrobiologicznych odpowiada diagnosta laboratoryjny lub lekarz. Zaleca się, by posiadali wiedzę i umiejętności w zakresie wykonywania czynności diagnostyki laboratoryjnej uzyskane w ramach specjalizacji z mikrobiologii, mikrobiologii i serologii lub mikrobiologii lekarskiej oraz udokumentowane minimum dwuletnie doświadczenie w diagnostyce laboratoryjnej bakteryjnych zakażeń jelitowych.

2. Wskazania do wykonania badań i ich ukierunkowania

Najważniejszym wskazaniem do wykonania posiewu kału jest ostry przebieg choroby, w tym zwłaszcza obecność krwi lub śluzu w kale, bóle brzucha, ponad 10 wypróżnień na dobę, wystąpienie gorączki, przewlekła biegunka.

Gdy nie ma przesłanek epidemiologicznych, aby ściśle ukierunkować badanie, ze względu na fakt iż na podstawie objawów klinicznych nie można określić przyczyny choroby, rutynowo posiew próbki kału powinien być wykonywany zawsze w kierunku obecności pałeczek *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, VTEC (w tym *E. coli* O157) i *Campylobacter,* czyli najczęstszych bakteryjnych etiologicznych czynników biegunki.

Badania kału w kierunku innych chorobotwórczych bakterii powinny być wykonywane dodatkowo po ustaleniu szczegółowych wskazań i uzależnione m.in. od wieku pacjenta, wyników badania lekarskiego, wywiadu epidemiologicznego oraz diagnostycznych możliwości danego laboratorium.

Wykrycie w badanej próbce wirusów wywołujących biegunkę nie powinno wykluczyć przeprowadzenia badania bakteriologicznego, gdyż w około 10% przypadków występują mieszane infekcje.

2.1. Badania w kierunku ostrych zakażeń przewodu pokarmowego bakteriami rosnącymi w warunkach tlenowych

2.1.1. Pałeczki *Salmonella* i *Shigella*

Zakażenie pałeczkami *Salmonella* należącymi do tzw. serotypów niedurowych (salmoneloza) jest obecnie w Polsce najczęściej wykrywaną bakteryjną przyczyną biegunki.

W około 80% przypadków od osób chorych i ozdrowieńców izoluje się pałeczki *Salmonella* Enteritidis, od około 7% osób pałeczki *S*. Typhimurium, a od pozostałych osób z różną częstością pałeczki należące do serotypu *S*. Infantis, *S*. Mbandaka, *S*. Virchow , *S*. Hadar i wielu innych typów serologicznych. Należy podkreślić, że w przebiegu duru brzusznego lub paradurów odpowiednio pałeczki *S*. Typhi albo *S*. Paratyphi A, B, lub C mogą być izolowane nie tylko ze krwi lub moczu, ale także z kału. Bakterie te mogą być również izolowane z kału od nosicieli (siewców zarazka).

Podstawą rozpoznania gatunku i podgatunku pałeczek *Salmonella* są ich właściwości biochemiczne, natomiast pełna identyfikacja zarazka (i co za tym idzie podstawa rozpoznania choroby) wymaga ustalenia typu serologicznego, co jest możliwe jedynie na podstawie określenia budowy antygenowej (antygeny somatyczne O i rzęskowe H) badanego szczepu.

Typowanie serologiczne pałeczek *Salmonella* wymaga albo posiadania wielu surowic diagnostycznych albo przesłania szczepu do dalszej identyfikacji do laboratorium właściwego ze względu na rodzaj biologicznego czynnika chorobotwórczego.

Zakażenia pałeczkami czerwonki wykrywane są w naszym kraju bardzo rzadko. Izolowane szczepy należą do gatunku *Shigella sonnei*, *S. flexneri* lub *S. boydii*. **Od lat nie izolowano rodzimych przypadków czerwonki wywołanej przez pałeczki *S. dysenteriae*.** Właściwości biochemiczne i antygenowe pałeczek czerwonki i ich bliskie pokrewieństwo z pałeczkami okrężnicy wymagają niekiedy wykonania potwierdzenia identyfikacji gatunku bakterii w laboratorium właściwym ze względu na rodzaj biologicznego czynnika chorobotwórczego.

2.1.2. Pałeczki *Yersinia*

Zakażenie przewodu pokarmowego mogą wywołać pałeczki *Y. pseudotubeculosis* lub chorobotwórcze dla człowieka pałeczki *Y. enterocolitica*. Trzecim gatunkiem o znaczeniu dla patologii człowieka są **odpowiedzialne za dżumę pałeczki *Y. pestis* – choroba ta nie występowała w Europie od kilkuset lat.**

Pozostałe pałeczki z rodzaju *Yersinia* są niechorobotwórcze dla ludzi, a ich izolacja z kału może być wynikiem obecności tych bakterii w spożytej żywności.

Także nie każdy szczep zaliczany do gatunku *Y. enterocolitica*, a izolowany z kału, można uznać za przyczynę biegunki.

Za chorobotwórcze dla ludzi pałeczki *Y. enterocolitica* uważa się bakterie należące do określonych biotypów tj. biotypu 1B, 2, 3, 4 i 5 oraz typów serologicznych O:3, O5:27, O:8 i O:9.

Do najczęściej izolowanych w Polsce chorobotwórczych pałeczek *Y. enterocolitica* należą pałeczki zaliczane do: ***Y. enterocolitica* O:3 biotyp 4 , *Y. enterocolitica* O:8 biotyp 1B oraz *Y. enterocolitica* O:9 biotyp 2.**

Ze względu na występowanie niekiedy w kale także niechorobotwórczych dla ludzi szczepów, aby uznać wyhodowany z kału szczep *Y. enterocolitica* za przyczynę biegunki należy przynajmniej określić jego biotyp lub dla pełniejszej identyfikacji bio-serotyp.

Pałeczki z rodzaju *Yersinia*, w odróżnieniu od innych przedstawicieli rodziny Enterobacteriaceae, **najlepiej rosną w temperaturze 25°–27°C, hodowlę w tej temperaturze należy prowadzić przez 48 h, gdyż po 24 h tworzą mikrokolonie.**

Bakterie te z nielicznymi wyjątkami rosną zarówno na podłożu MC, jak i SS (w postaci niewielkich laktozo-ujemnych kolonii), można także zastosować do ich wykrywania selektywne podłoże CIN, na którym wyrastają dopiero po 48 h w postaci charakterystycznych różowych kolonii z przezroczystym brzegiem, określanych często jako przypominające swoim wyglądem „oko bawoła". Należy zaznaczyć, iż niektóre szczepy *Y. pseudotuberculosis* mogą wyrastać tylko na pożywkach nieselektywnych.

Zastosowanie niższej niż standardowa temperatury inkubacji sprzyja nie tylko większej wykrywalności w posiewie pałeczek *Yersinia*, lecz także zmniejsza ryzyko utraty przez szczep plazmidu zjadliwości pYV, który w przypadku gdy inkubacja hodowli jest prowadzona w temperaturze 37°C może zostać utracony przez komórki bakteryjne.

2.1.3. Biegunkotwórcze pałeczki okrężnicy (EPEC, VTEC, ETEC, EIEC, EAEC)

Badania w tym kierunku wymagają, poza wyhodowaniem z kału pałeczek *E. coli*, co jest możliwe w przypadku każdego medycznego laboratorium mikrobiologicznego, wykonania **określenia chorobotwórczości wyhodowanych z kału szczepów *E. coli***, co jest z nielicznymi wyjątkami możliwe wyłącznie **przy zastosowaniu metod biologii molekularnej** i z reguły wymaga przesłania izolatów do laboratorium właściwego ze względu na rodzaj biologicznego czynnika chorobotwórczego. W tabeli wymieniono nazwy genów kodujących główne czynniki chorobotwórczości. Sekwencje nukleotydowe fragmentów tych genów służą jako startery diagnostyce zakażeń biegunkotwórczymi pałeczkami okrężnicy wykonywanej metodą PCR.

Patotyp	Podstawowe markery (geny) chorobotwórczości	Czynniki chorobotwórczości
EPEC	***eae*A, *esc*V, *ent*** ***bfp*B**	**Wyspa patogenności LEE (intymina, białka efektorowe ESC), enterotoksyna homologiczna do enterotoksyny *Shigella* ShET2** fimbrie BFP
VTEC	***eae*A, *stx*1, *stx*2, *ehly***	**Werotoksyny I i II (*stx1, stx2*), wyspa patogenności LEE (intymina, białka efektorowe ESC, enterohemolizyna**
ETEC	***elt*, *est*Ia, *est*Ib**	Toksyny ciepłochwiejne – LT I i LT II, toksyny ciepłostałe – STa i STb
EIEC	***ipaH, ipaE***	Właściwości inwazyjne związane z obecnością plazmidu wirulencji pINV kodującego białka Ipa i regulator ich transkrypcji invE (plazmid 140 kb)
EAEC	***ast*A, *agg*R, *pic***	Fimbrie AAFI/II, enterotoksyna Pet, ciepłostała toksyna EAST1

EPEC. Badanie kału **w kierunku enteropatogennych pałeczek *E.coli* – EPEC powinno być wykonywane**, po wykluczeniu innych przyczyn biegunki **jedynie u najmłodszych dzieci (do 2 roku życia)**. Badanie to może mieć duże znaczenie w przypadku ustalania przyczyny wystąpienia ogniska wśród hospitalizowanych najmłodszych dzieci. Aby wyhodowany szczep uznać za EPEC, niezbędne jest określenie jego właściwości chorobotwórczych związanych z wywoływaniem w enterocytach zmian określanych akronimem AE (od ang. attaching and effacing). **W praktyce wystarcza wykrycie obecności genu kodującego intyminę – głównego czynnika odpowiedzialnego za wirulencję szczepu.**

Określenie przynależności do określonej grupy serologicznej nie jest podstawą do rozpoznania zakażenia szczepem EPEC. Dodatni wynik testu lateksowego może być co najwyżej uznany za wynik testu przesiewowego ułatwiającego wybór izolatów przeznaczonych do dalszych badań.

VTEC Jak wspomniano powyżej badanie kału w kierunku werotoksynogennych pałeczek *E.coli* – VTEC w zasadzie powinno być wykonywane w każdym przypadku posiewu kału od osoby z biegunką niezależnie od jej wieku, ale są też **wskazania bezwzględne, takie jak obecność krwi w kale chorego bez towarzyszącej wysokiej gorączki, objawy zespołu hemolityczno-mocznicowego (HUS), powiązanie epidemiologiczne z ogniskiem krwotocznej biegunki lub HUS**. Badania wykazały, że VTEC są bardzo zróżnicowaną pod względem fenotypowym i genotypowym grupą bakterii. Szczepy wytwarzające werotoksyny wykryto już wśród ponad 150 różnych serotypów *E. coli*. **Według danych ECDC najczęściej bo w około 41% przypadków izolowane są szczepy należące do serogrupy O157 (w tym głównie szczepy niefermentujące sorbitolu, ruchliwe tzw. NSF O157:H7**

oraz nieruchliwe tzw. NSF O157:H-) natomiast spośród VTEC nie – O157 najczęściej izoluje się szczepy należące do serogrupy O26, O91, O103, O111, O113, O121, O145.

I choć VTEC atakują ludzi w każdym wieku najczęściej chorują dzieci 0 – 4 rż.

Większość, choć nie wszystkie szczepy izolowane od ludzi, należące do kategorii werotoksynogennych E. coli posiada podobnie jak EPEC, mechanizm, dzięki któremu mogą kolonizować nabłonek jelitowy i wywoływać zmiany typu AE w enterocytach. Głównym jednak czynnikiem ich chorobotwórczości jest zdolność do wytwarzania werotoksyn, które należą do różnych wariantów dwóch, podstawowych typów toksyny VT 1 lub VT 2. **Typ toksyny produkowanej przez *E. coli* ma znaczący wpływ na kliniczny przebieg zakażenia. Szczepy produkujące VT 1 u zakażonych osób zwykle wywołują jedynie dość łagodną biegunkę, zaś szczepy wytwarzające tylko VT 2 lub obydwie toksyny związane są z krwotoczną biegunką (haemorragic colitis HC), której powikłaniem bywa zespół hemolityczno-mocznicowy (haemolytic uremic syndrome HUS). Dodatkowo stwierdzono, że HUS najczęściej wywołują VTEC VT 2+ należące do grupy O157, O26, O103, O111 O121 i O145.**

EIEC Badanie kału w kierunku enteroinwazyjnych pałeczek *E.coli* – EIEC powinno być wykonywane, gdy objawy choroby wskazują na zespół czerwonkowy, a z posiewu hoduje się szczepy *E. coli* o nietypowych właściwościach biochemicznych (nieruchliwe, laktozo-ujemne, lizyno-ujemne).

ETEC Biegunka wywołana przez enterotoksynogenne pałeczki *E. coli* – ETEC jest nazywana biegunką podróżnych. Badanie kału w tym kierunku powinno być wykonywane tylko gdy biegunka ma wodnisty charakter, zwłaszcza gdy przebieg zakażenia jest „cholero-podobny", a w wywiadzie pacjent podaje podróż do kraju o niskich standardach higienicznych.

EAEC Badanie kału w kierunku enteroagregacyjnych pałeczek *E. coli* – EAEC powinno być wykonywane, po wykluczeniu innych przyczyn biegunki, zwłaszcza u dzieci z przewlekłą biegunką trwającą ponad 14 dni, oddających stolce ze śluzem i niekiedy z krwią, które nie przybierają lub słabo przybierają na wadze.

2.2. Badania z nadzoru sanitarno-epidemiologicznego w kierunku nosicielstwa pałeczek *Salmonella* lub *Shigella*

Badania takie są wykonywane u osób zdrowych, które z racji wykonywanej pracy lub kierunku kształcenia muszą uzyskać orzeczenie lekarskie dla celów sanitarno-epidemiologicznych o niewydalaniu z kałem pałeczek *Salmonella* i *Shigella*. Ponieważ wydalanie patogenu przez takie osoby może mieć charakter przery-

wany, **w przypadku badania na nosicielstwo konieczne jest zbadanie trzech próbek kału pobranych w trzech kolejnych dniach.** Badania te podlegają szczegółowym regulacjom prawnym, jednak w chwili przygotowywania tego opracowania nie było przepisów wykonawczych do ustawy z dnia 5 grudnia 2008 roku (Dz.U z 2013, poz.947) o zapobieganiu oraz zwalczaniu zakażeń i chorób zakaźnych u ludzi, czyli aktualnego rozporządzenia Ministra Zdrowia w tej sprawie.

2.3. Badania w kierunku ostrych zakażeń przewodu pokarmowego bakteriami rosnącymi w warunkach mikroaerofilnych

Zakażenie przewodu pokarmowego wywołane przez pałeczki z rodzaju *Campylobacter* jest wg ECDC/EFSA najczęstszą przyczyną biegunki pochodzenia bakteryjnego w krajach UE. Najczęstszą przyczyną zakażenia są pałeczki *Campylobacter jejuni*, znacznie rzadziej *C. coli* i sporadycznie *C. lari*, *C. upsaliensis* lub *C. hyointestinalis.* Zakażenia te występują w większości krajów europejskich ponad dwukrotnie częściej niż salmoneloza. W Polsce bakteriologiczne badanie kału w kierunku *Campylobacter* wciąż jeszcze jest wykonywane zbyt rzadko, więc liczba zarejestrowanych przypadków kampylobakteriozy i zapadalność na 100 tys. mieszkańców, choć wykazuje stałą tendencję wzrostową, pozostawia nasz kraj daleko w tyle za innymi krajami europejskimi, także tymi sąsiadującymi z Polską. Chociaż zakażenia wywołane przez pałeczki *Campylobacter* zwykle wywołują ostrą kilkudniową biegunkę mogą też być przyczyną przewlekłej biegunki.

3. Zlecenie badania laboratoryjnego

Medyczne laboratorium opracowuje, wdraża i stosuje procedurę zlecania badania oraz formularz zlecenia badania laboratoryjnego, zgodnie z rozporządzeniem Ministra Zdrowia z dnia 23.03. 2006 roku, w sprawie standardów jakości dla medycznych laboratoriów diagnostycznych i mikrobiologicznych [Dz. U. nr 61, poz. 435 ze zm.]

Dokumentacja medyczna w medycznym laboratorium, w tym zlecenia badań laboratoryjnych, jest prowadzona, przechowywana i przetwarzana zgodnie z przepisami dotyczącymi dokumentacji medycznej.

4. Pobieranie próbek materiału

Materiałem do badań w kierunku zakażenia przewodu pokarmowego jest:

1. kał,
2. wymaz z kału
3. wymaz z odbytu.

Ten rodzaj materiału zwykle pacjent pobiera osobiście lub pobiera go opiekun czy pielęgniarka. Z tego powodu laboratorium musi dostarczać pacjentom wyczerpującą instrukcję pobierania kału do badania.

Próbkę kału **(mniej więcej 5–10 ml lub grudkę wielkości wiśni) należy pobrać do właściwego pojemnika lub podłoża transportowego spełniającego wymogi wyrobu medycznego do diagnostyki *in vitro*** zgodnie z ustawą o wyrobach medycznych z dnia 20.05.2010 roku [Dz. U. nr 107, poz.679 ze zm.] **możliwie najszybciej po zaistnieniu podejrzenia zakażenia** (wkrótce po wystąpieniu biegunki, pierwsza próbka przed podaniem leków przeciwbakteryjnych).

Najbardziej wiarygodny wynik badania uzyskuje się wtedy, gdy w dostarczonej do badania próbce znajduje się krew bądź śluz (jeśli są obecne w oddawanym kale).

Oznakowanie pojemnika powinno zawierać następujące dane:

- imię i nazwisko pacjenta,
- PESEL
- datę i godzinę pobrania próbki
- kod paskowy

Niezwłocznie po pobraniu, próbkę należy dostarczyć do laboratorium (w czasie do dwóch godzin).

Wymaz z kału pobieramy, gdy jest niemożliwe niezwłoczne dostarczenie kału, należy pobrać w postaci wymazu z kału do podłoża transportowego Carry-Blaira, Amiesa lub Stuarta, lub gdy próbka ma być badana w kierunku *Campylobacter* do podłoża transportowego z węglem.

Wymaz z odbytu zawsze musi być tak pobrany aby na waciku były złuszczone nabłonki i wyraźne ślady kału i umieszczony w podłożu transportowym, jedynie w badaniu na nosicielstwo pałeczek *Salmonella* i *Shigella*, **gdy materiał do badania jest pobierany w postaci wymazu z odbytu, wymazówka może być umieszczona w probówce z buforem glicerynowym (tzw. płynem konserwującym) aby zapobiec wysychaniu próbki.**

5. Transport

Próbki po pobraniu muszą być niezwłocznie transportowane do laboratorium w warunkach zapewniających ich przydatność do badań. Czas i warunki, w jakich transportowana jest próbka materiału mają istotny wpływ na wynik badania. Jest to związane z żywotnością i wzajemnym oddziaływaniem występujących w kale drobnoustrojów oraz z wpływem na ich przeżycie procesów chemicznych i biologicznych zachodzących w kale podczas przechowywania.

Laboratorium przygotowuje i dostarcza pacjentowi lub stałemu klientowi instrukcję o sposobie dostarczenia próbki do badań:

- próbki kału i wymazy z odbytu w ciągu 2 godzin po pobraniu, w temperaturze otoczenia bez dopuszczenia do ich zamrożenia,
- próbki pobrane do podłoża transportowego w ciągu 24 godzin w temperaturze otoczenia bez dopuszczenia do ich zamrożenia. Jeśli nie jest to możliwe, próbki w podłożu transportowym należy przechowywać w temperaturze 4°–8°C i dostarczyć maksymalnie do 72 godzin.

Próbki materiału do badania są dostarczane do medycznego laboratorium bezpośrednio przez upoważnione osoby, w zamkniętych specjalnych pojemnikach lub w probówkach umieszczonych w zbiorczym opakowaniu oznaczonym napisem „materiał zakaźny".

6. Przyjmowanie próbek materiału do badań

Medyczne laboratorium opracowuje, wdraża i stosuje procedury przyjmowania rejestrowania i oznakowania próbek do badania oraz udostępnia je stałym zleceniodawcom, którzy potwierdzają pisemnie zapoznanie się z nim.

Medyczne laboratorium sprawdza zgodność danych ze zlecenia z oznakowaniem próbki oraz jej przydatność do badania.

W przypadku stwierdzenia przez pracownika laboratorium niezgodności otrzymanej próbki z wymaganiami mających wpływ na wynik badania, zwłaszcza dotyczących sposobu pobrania i czasu lub warunków transportu materiału, lub też innych nieprawidłowości powodujących niemożność wykonania badania, fakt ten musi być zgłoszony kierownikowi laboratorium lub osobie przez niego upoważnionej. Kierownik laboratorium lub osoba przez niego upoważniona po potwierdzeniu niezgodności mogą zakwalifikować próbkę jako niezdatną do badania i odmówić jego wykonania.

Odmowę wykonania badania odnotowuje się w dokumentacji. Dalsze postępowanie medyczne laboratorium uzgadnia ze zleceniodawcą.

Próbki kału lub wymazów z odbytu po wykonaniu posiewu, nie nadają się do przechowywania i należy je poddać unieszkodliwieniu zgodnie z przepisami rozporządzenia Ministra Zdrowia w sprawie postępowania z odpadami medycznymi.

7. Metody badawcze

7.1. Posiew kału w kierunku chorobotwórczych pałeczek jelitowych rosnących w warunkach tlenowych u osób chorych

7.1.1. Pałeczki *Salmonella* i *Shigella*

Podstawą laboratoryjnej diagnostyki zakażenia przewodu pokarmowego chorobotwórczymi pałeczkami jelitowymi rosnącymi w warunkach tlenowych **jest posiew kału, izolacja „podejrzanych" kolonii ich identyfikacja i tam, gdzie to niezbędne, określenie właściwości chorobotwórczych lub typu serologicznego wyhodowanego szczepu.**

Wieloletnie doświadczenie Zakładu Bakteriologii NIZP-PZH poparte badaniami Lityńskiego i wsp. wskazują, że przy doborze pożywek stosowanych przy bezpośrednim posiewie kału biegunkowego

najlepszą wykrywalność pałeczek *Salmonella* i *Shigella* można uzyskać gdy stosuje się 2–3 podłoża różnicujące, wśród których powinny się znaleźć zarówno pożywki o silnych, jak też słabo wybiórczych właściwościach.

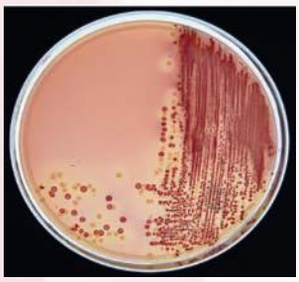
Do najczęściej stosowanych pożywek o silnych właściwościach wybiórczo-różnicujących należy podłoże Salmonella-Shigella (SS), podłoże XLD czy Hektoen Agar, które umożliwiają izolację szczepów *Salmonella* i szczepów *Shigella sonnei*, mogą być jednak zbyt wybiórcze dla niektórych szczepów pałeczek *S. flexneri*, *S. boydii* i *S. dysenteriae*, natomiast do pożywek różnicujących o słabych właściwościach wybiórczych należy podłoże MacConkey'a i podłoże Levine'a (EMB). **Przy poszukiwaniu pałeczek *Salmonella* dodatkowo zawsze należy zastosować płynne podłoże wybiórczo – namnażające seleninowo-fosforanowe (SF),** co o 50% zwiększa wykrywalność tych bakterii w posiewie **oraz podłoże bizmutowo – siarczynowe znane pod nazwą podłoża Wilson-Blaira,** gdyż umożliwia ono uzyskanie typowych dla *Salmonella* kolonii, także w przypadku obecności w próbce nietypowych biochemicznie, laktozo-dodatnich szczepów *Salmonella*. **Prawidłowo przygotowane podłoże SF (podłoże prawie bezbarwne, niepoddawane sterylizacji termicznej o składzie zgodnym z recepturą Leifsona) zapewnia namnożenie nie tylko pałeczek *Salmonella*, ale także *S. sonnei* co po przesiewie znacznie zwiększa szanse na izolację tych patogenów z kału osób wydalających stosunkowo niewielką liczbę bakterii w 1 g kału (ozdrowieńcy, osoby ze styczności z chorym lub nosiciele) i jednocześnie umożliwia wykorzystanie hodowli w SF w testach lateksowych przy poszukiwaniu w próbce antygenów *Salmonella* lub *S. sonnei.***

Należy więc podkreślić, iż niezmiernie ważne jest wykonywanie w laboratorium ilościowej kontroli podłoża SF, nawet gdy jest ono dostarczane w postaci gotowej i posiada certyfikat jakości wydany przez wytwórcę, ponieważ tylko stwierdzenie właściwego stopnia namnożenia pałeczek *Salmonella* i *S. sonnei* gwarantuje uzyskanie wiarygodnego wyniku posiewu kału badanych osób.

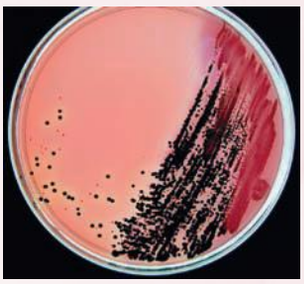
W ofercie kilku dystrybutorów lub wytwórców są również chromogenne podłoża do izolacji *Salmonella* z bezpośredniego posiewu kału oraz testy lateksowe do wykrywania antygenów pałeczek *Salmonella* lub *S. sonnei* (gdy stosowany jest test lateksowy) w hodowli na podłożu stałym lub płynnym.

Zarówno uzyskanie kolonii o charakterystycznym wyglądzie na podłożach chromogennych, jak i dodatni wynik testu lateksowego nie mogą być podstawą rozpoznania zakażenia *Salmonella*, należy je traktować jako wynik wstępny wymagający pełnej identyfikacji izolatu.

Biochemiczna identyfikacja gatunku i podgatunku pałeczek *Salmonella* (najczęściej *S.enterica subsp.enterica*) wymaga przeprowadzenia dalszych badań w celu ustalenia typu serologicznego wyhodowanego szczepu. Jest to konieczne nie tylko dla celów nadzoru epidemiologicznego, ale należy pamiętać, że wynik identyfikacji serologicznej *Salmonella* może decydować o rozpoznaniu choroby np. w przypadku zakażenia pałeczkami duru brzusznego lub durów rzekomych. **Wyhodowanie pałeczek *Shigella* innych niż *S. sonnei* wiąże się z koniecznością przeprowadzenia badania serologicznego, gdyż w większości przypadków tylko na podstawie tego badania można określić gatunek pałeczek czerwonki.**

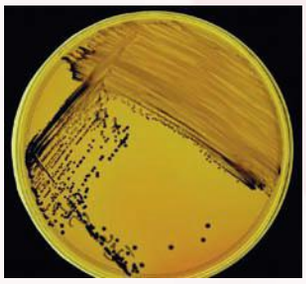


Fot. 1. Posiew kału na podłożu McConkey'a

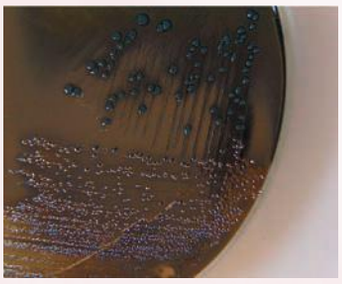


Fot. 2. Posiew kału na podłożu SS

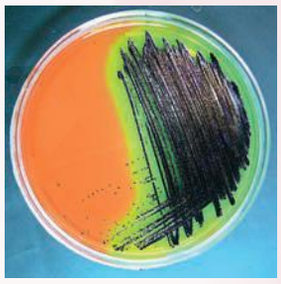
Fot. 3. Wzrost szczepu Salmonella na podłożu McConkey'a



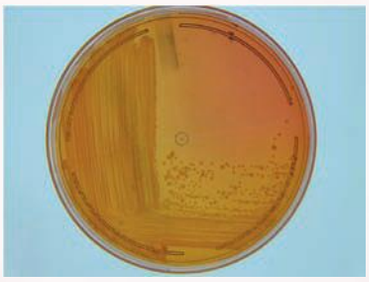
Fot. 4. Wzrost szczepu Salmonella na podłożu SS



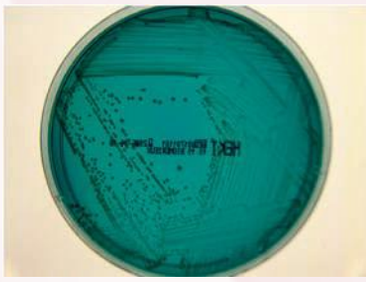
Fot. 5. Wzrost szczepu Salmonella na podłożu Wilson-Blaira



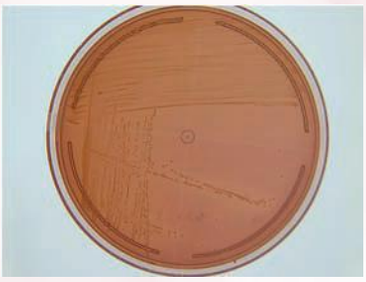
Fot. 6. Wzrost szczepu Salmonella na podłożu Hektoen Agar



Fot. 7. Wzrost szczepu Shigella sonnei na podłożu McConkey'a



Fot. 8. Wzrost szczepu Shigella sonnei na podłożu Hektoen Agar



Fot. 9. Wzrost szczepu Yersinia enterocolitica na podłożu McConkey'a

Fot. 10. Wzrost szczepu Yersinia enterocolitica na podłożu CIN

Autor fotografii 1-10: Grzegorz Madajczak

7.1.2. Pałeczki *Yersinia enterocolitica* i *Y. pseudotuberculosis*

W celu wyhodowania z kału pałeczek *Yersinia* można **stosować specjalnie dedykowane dla tych bakterii podłoże CIN,** ale wyhodowanie tych patogenów z kału umożliwia również posiew kału na podłoże MC lub SS.

W obu przypadkach ważne jest **jednak zastosowanie obniżonej do 25–27°C temperatury inkubacji i przedłużenia czasu hodowli do 48 h.**

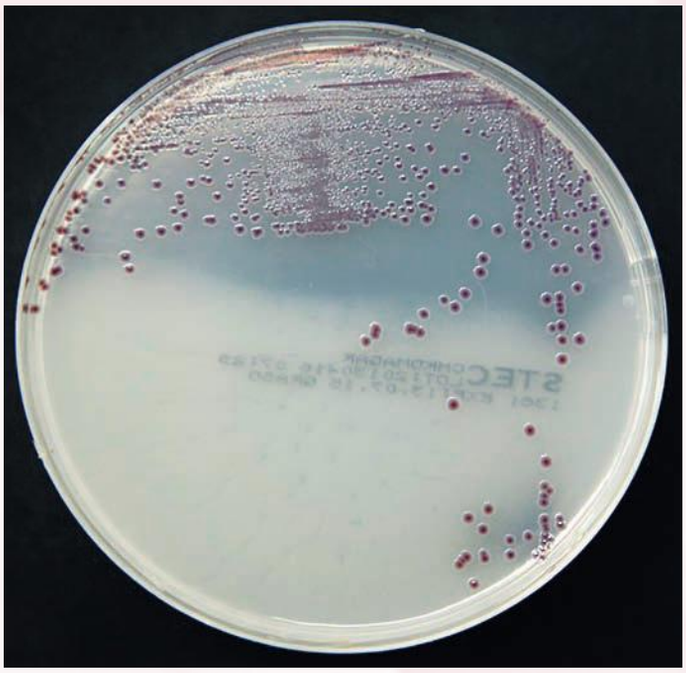
Uzyskane hodowle **należy każdorazowo oglądać pod lupą 5X, gdyż kolonie pałeczek *Yersinia* są znacznie mniejsze niż kolonie tworzone przez inne pałeczki jelitowe.** O ile wyhodowanie *Y. pseudotuberculosis* jest równoznaczne z ustaleniem etiologicznego czynnika zakażenia, wyhodowanie pałeczek *Y. enterocolitica* powinno być uzupełnione **co najmniej biotypowaniem szczepu** w celu określenia chorobotwórczości izolatu.

7.1.3. Pałeczki *Escherichia coli*

Pałeczki okrężnicy są stałym składnikiem flory jelitowej większości ludzi więc celem badania jest odróżnienie wyrastających w posiewie szczepów chorobotwórczych od powszechnie obecnych szczepów niechorobotwórczych. Aby to było możliwe konieczne jest **zastosowanie metod umożliwiających wykrycie wśród uzyskanych izolatów szczepów o chorobotwórczych właściwościach.** Niestety bardzo rzadko wyboru takich szczepów można dokonać, poszukując „podejrzanych" kolonii, czyli na podstawie fenotypowych cech patogenu, gdyż w większości przypadków pałeczki *E. coli* niezależnie od właściwości chorobotwórczych wyrastają na podłożach stosowanych powszechnie do posiewu kału w postaci laktozo-dodatnich kolonii. **Wyjątek stanowią pałeczki okrężnicy zaliczane do EIEC, które są z reguły laktozo-ujemne.** Takie izolaty po stwierdzeniu właściwości biochemicznych typowych dla szczepów enteroinwazyjnych **powinny być identyfikowane metodą PCR.** Z kolei **część szczepów *E. coli* O157 zaliczanych do VTEC charakteryzuje się brakiem zdolności do szybkiej fermentacji sorbitolu.** Tę ich właściwość wykorzystano w podłożu SMAC, w którym w miejsce laktozy jako czynnik różnicujący zastosowano sorbitol. Jednak posiew kału na to podłoże umożliwia wykrycie tylko szczepów NSF O157:H7 oraz NSF O157:H-, które jak wspomniano powyżej, stanowią jedynie około 41% wśród VTEC. Oczywiście stwierdzenie braku fermentacji sorbitolu i określenie grupy antygenowej szczepu jako O157 nie daje jeszcze podstawy do rozpoznania izolatu jako VTEC bez wykonania dalszych badań potwierdzających jego chorobotwórcze właściwości (np. PCR, test fenotypowy wykrywający werotoksyny). Aby rozszerzyć możliwości wykrycia zakażenia także innymi **szczepami VTEC** (fermentującymi sorbitol) **do posiewu kału można zastosować specjalne podłoże chromogenne, na którym wyrastają szczepy VTEC O157 oraz należące do kilku innych wybranych grup antygenowych.**

Jednak najlepszym sposobem postępowania jest skrining wykonany metodą PCR w kierunku obecności fragmentów genów kodujących werotoksyny w DNA uzyskanym z pobranych 10 kolonii *E.coli* izolowanych z bezpośredniego posiewu kału.

Jest to także w zasadzie jedyna metoda umożliwiająca wykrycie zakażenia innymi chorobotwórczymi pałeczkami *E.coli*, w tym szczepami enteropatogennymi – EPEC. **Stosowane w rutynowych badaniach testy lateksowe w kierunku EPEC lub VTEC należy traktować jako skrining ułatwiający wybór izolatów przeznaczonych do dalszych badań.**



Fot. 11. Wzrost werotoksycznego szczepu Escherichia coli na podłożu STEC
Autor fotografii: Tomasz Wołkowicz

UWAGA!
Wyniki testów lateksowych określających grupę antygenową izolowanych szczepów nie stanowią podstawy do rozpoznania zakażenia chorobotwórczymi pałeczkami *E.coli*.

Należy też przypomnieć, że zgodnie z aktualnym stanem wiedzy u każdej osoby z biegunką, zwłaszcza krwawą, posiew kału powinien zapewniać wykrycie zakażenia werotoksynogenymi pałeczkami *E. coli*, a **ograniczenie badania do posiewu próbki na podłoże SMAC nie może być rozumiane jako pełne badanie w kierunku VTEC.**

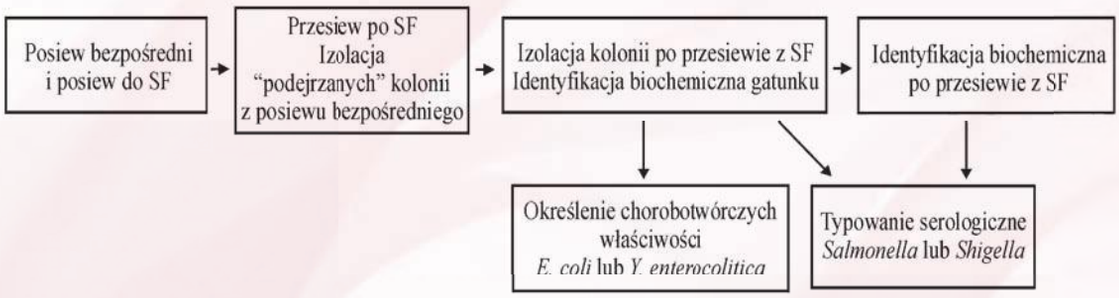
7.1.4. Pałeczki *Aeromonas*, *Plesiomonas* i *Vibrio*

Drobnoustroje te rosną dobrze na MC zwykle w postaci laktozo-ujemnych kolonii oraz w zależności od szczepu także na innych pożywkach stosowanych przy ogólnym posiewie kału. **Odróżnienie ich na podstawie wyglądu kolonii od innych pałeczek jelitowych jest więc w praktyce niemożliwe.**

Podstawowym badaniem umożliwiającym ich wstępną identyfikację jest wykonanie testu na oksydazę cytochromową, który w przypadku tych bakterii zawsze daje dodatni wynik.

Dalszą identyfikację można przeprowadzić przy zastosowaniu testów komercyjnych bądź klasycznych testów probówkowych. Chociaż oksydazo-dodatnie pałeczki można wyhodować w toku rutynowego posiewu kału, to w przypadku podejrzenia cholery należy zastosować procedurę ściśle ukierunkowaną na wykrywanie przecinkowców cholery.

Schemat badania kału w kierunku chorobotwórczych pałeczek jelitowych rosnących w warunkach tlenowych u osób chorych



7.2. Posiew kału w kierunku *Salmonella* i *Shigella* dla celów sanitarno-epidemiologicznych

Badanie w kierunku nosicielstwa pałeczek *Salmonella* i *Shigella* ma na celu wykrycie siewstwa tych patogenów przez osoby zdrowe. Kał należy posiać na:

1. podłoże słabo wybiórcze, różnicujące np. MC
2. na podłoże silnie wybiórcze różnicujące np. SS
3. płynne podłoże wybiórczo namnażające SF.

Przesiewu należy dokonać na:

1. podłoże SS
2. podłoże WB
3. podłoże HE.

Dalsze postępowanie analogicznie do opisanego przy posiewie kału osób chorych.

W toku tego badania **można wykorzystać też testy lateksowe umożliwiające wykrycie O antygenów pałeczek *Salmonella* z grupy B, C1, C2, D, E i G oraz *S. sonnei* w mieszanych hodowlach bakteryjnych w podłożu SF,** co wobec faktu iż nosicielstwo tych patogenów dotyczy mniej niż 0,5% badanych osób zdrowych znacznie zmniejsza pracochłonność i koszt jednostkowego badania. W takim przypadku posiew bezpośredni wykonuje się na podłoże MC, aby umożliwić wyhodowanie szczepów *Salmonella* z innych grup niż są wykrywane w teście la-

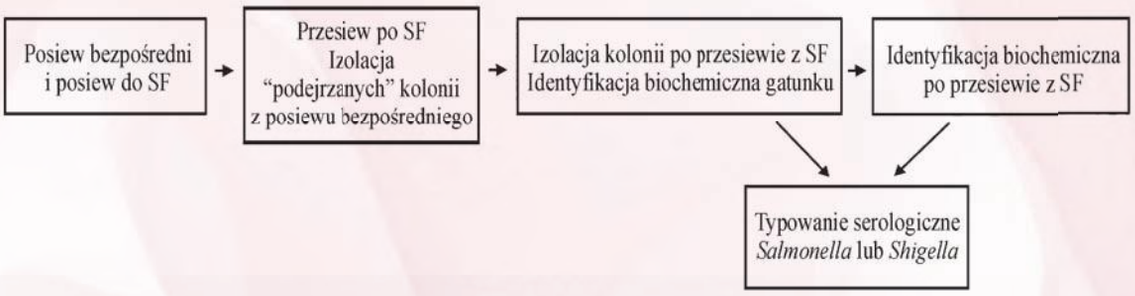
teksowym oraz szczepów pałeczek czerwonki należących do wszystkich gatunków *Shigella* oraz do podłoża SF. Testy lateksowe należy wykonać zgodnie i instrukcją wytwórcy.

Uzyskanie ujemnego wyniku testu lateksowego przy braku izolowania pałeczek *Salmonella* lub *Shigella* z posiewu bezpośredniego uzyskane w trzech badanych próbkach kału upoważnia do wydania wyniku o braku nosicielstwa *Salmonella* i *Shigella*.

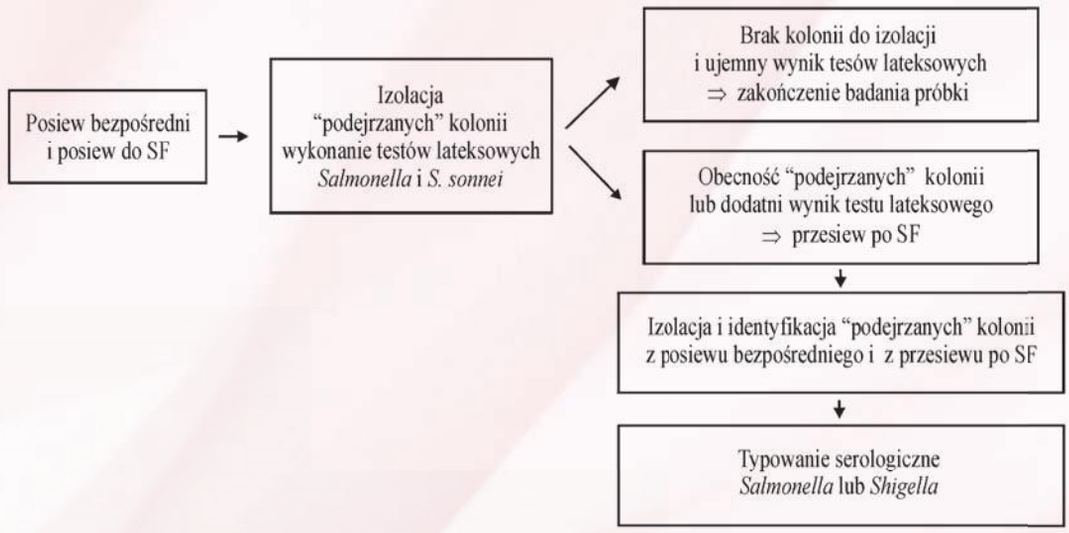
Uzyskanie dodatniego wyniku testu lateksowego obliguje do wykonania przesiewu z podłoża SF, izolacji i pełnej identyfikacji biochemicznej i serologicznej izolatu.

Należy przypomnieć, że dodatni wynik testu lateksowego niepotwierdzony identyfikacją patogenu może wynikać z często występujących krzyżowych reakcji u pałeczek jelitowych i nie może być podstawą do wydania dodatniego wyniku badania kału.

Schemat badania kału osób zdrowych dla celów sanitarno-epidemiologicznych w kierunku nosicielstwa pałeczek *Salmonella* i *Shigella* bez zastosowania testów lateksowych



Schemat badania kału osób zdrowych dla celów sanitarno-epidemiologicznych w kierunku nosicielstwa pałeczek *Salmonella* i *Shigella* z zastosowaniem testów lateksowych



7.3. Posiew kału w kierunku zakażeń przewodu pokarmowego bakteriami rosnącymi w warunkach mikroaerofilnych

Podstawą laboratoryjnej diagnostyki zakażenia przewodu pokarmowego w kierunku pałeczek *Campylobacter* jest posiew kału na selektywne podłoże, **inkubacja posiewu w warunkach mikroaerofilnych w temperaturze 42° C trwająca od 1 do 5 dni (zwykle wystarcza 24 – 48h inkubacja).**

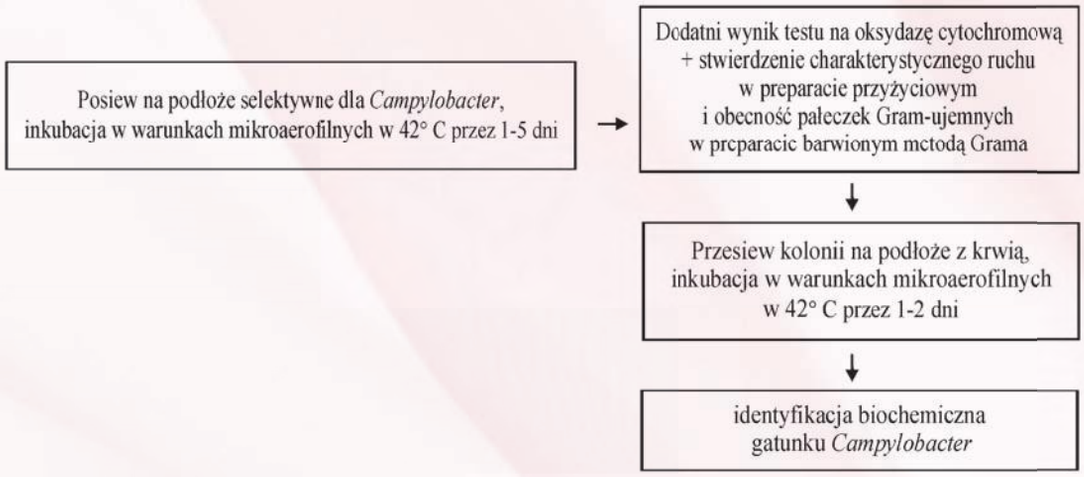
W przypadku uzyskania wzrostu na płytce należy wykonać przesiew „podejrzanych" kolonii na nieselektywne podłoże z dodatkiem 5% krwi baraniej lub końskiej np. Columbia, ich 24–48h inkubację w warunkach mikroaerofilnych, a następnie identyfikację.

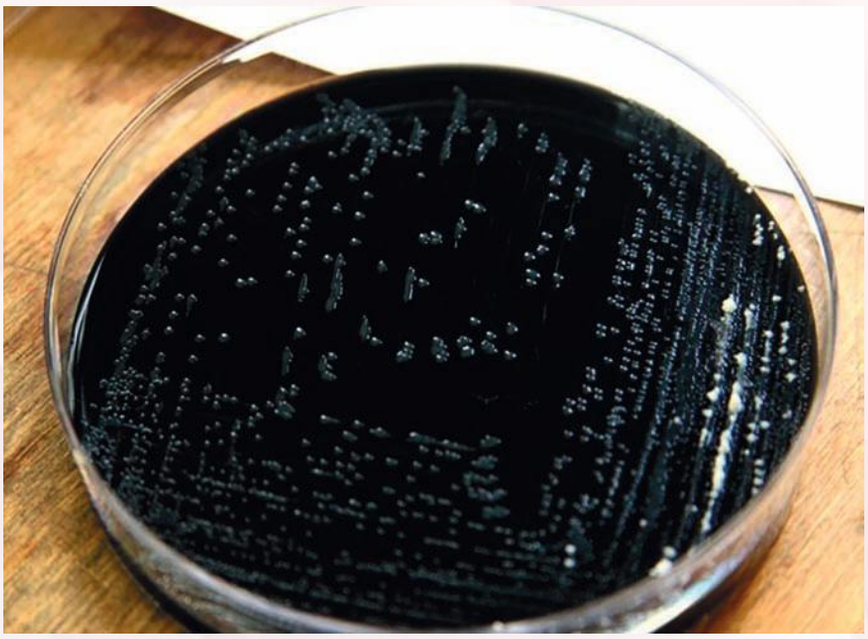
Podstawą zaliczenia tak wyhodowanych pałeczek do rodzaju *Campylobacter* jest:
1. stwierdzenie w posiewie obecności Gram-ujemnych pałeczek,
2. stwierdzenie dodatniego wyniku testu na oksydazę
3. charakterystyczny ruch bakterii obserwowany w mikroskopie świetlnym w preparacie przyżyciowym.

Dalsza identyfikacja gatunku termofilnych pałeczek *Campylobacter* wymaga bądź wykonania testów na katalazę, hydrolizę hipuranu sodu i octanu indoksylu, bądź może być przeprowadzona przy zastosowaniu gotowych zestawów komercyjnych.

W niektórych przypadkach ustalenie gatunku wyhodowanych pałeczek *Campylobacter* wymaga wykonania badania metodą PCR.

Schemat badania kału w kierunku *Campylobacter*





Fot. 12. Wzrost szczepu Campylobacter jejuni na podłożu CCDA
Autor fotografii: Tomasz Wołkowicz

8. Badania referencyjne

Gdy medyczne laboratorium nie ma możliwości wykonania pełnej identyfikacji wyhodowanych z kału bakterii, zwłaszcza określenia ich właściwości chorobotwórczych lub typu serologicznego, gdy jest to niezbędne dla rozpoznania zakażenia i konieczne jest przeprowadzenie dalszych badań, **przesyła izolaty do laboratorium właściwego ze względu na rodzaj biologicznego czynnika chorobotwórczego.**

Istnieje kilka sytuacji, gdy wykonanie badania referencyjnego jest bezwzględnie konieczne do wydania wiarygodnego wyniku badania będącego podstawą do rozpoznania konkretnej jednostki chorobowej, wszczęcia dochodzenia epidemiologicznego i ewentualnie postępowania przeciwepidemicznego.

Do takich sytuacji należy wyhodowanie z próbki następujących bakterii:

1. **pałeczek *E. coli* podejrzanych o przynależność do VTEC (konieczne jest co najmniej wykrycie zdolności do wytwarzania werotoksyn w teście fenotypowym lub fragmentów genów kodujących werotoksyny metodą PCR),**
2. **pałeczek *V. cholerae* (konieczne jest określenie typu serologicznego O1 lub O139 i stwierdzenie wytwarzania toksyny cholerycznej – CT w teście fenotypowym lub fragmentów genów kodujących CT metodą PCR),**
3. **pałeczek *Y. enterocolitica* (konieczne jest co najmniej określenie biotypu izolatu),**
4. **pałeczek *Salmonella* z grupy O2 (A), O4 (B), O6,7 (C1) i O9 (D) (konieczne jest typowanie serologiczne dla identyfikacji *S.* Typhi, *S.* Paratyphi A, B lub C)**
5. **pałeczek *Shigella* innych niż *S. sonnei* (dla typowania serologicznego i potwierdzenia identyfikacji gatunku).**

Prawidłowa identyfikacja szczepów *E. coli* podejrzanych o przynależność do EPEC, ETEC lub EAEC wymaga wykonania badań referencyjnych metodami biologii molekularnej.

W przypadku wystąpienia ogniska epidemicznego wywołanego przez chorobotwórcze pałeczki jelitowe może się także okazać niezbędne dla celów epidemiologicznych wykonanie dodatkowych badań metodami biologii molekularnej w celu uzyskania pogłębionej charakterystyki izolatów będących przyczyną zachorowań.

9. Wymagania dotyczące stosowanych wyrobów do diagnostyki *in vitro*: aparatury, pożywek i testów diagnostycznych

Zgodnie z ustawą o wyrobach medycznych z dnia 20.05.2010 roku [Dz. U. nr 107, poz. 679 ze zm] w medycznym laboratorium diagnostycznym (MLD) należy stosować wyroby medyczne posiadające znak CE do diagnostyki *in vitro*. Do wyrobów tych zalicza się odczynniki, produkty odczynnikowe, kalibratory, materiały kontrolne, zestawy, przyrządy, aparaty, sprzęty lub systemy przeznaczone przez wytwórcę do badania *in vitro* próbek pobranych z organizmu ludzkiego. Muszą być one właściwie dostarczone, prawidłowo zainstalowane, utrzymywane oraz używane zgodnie z przeznaczeniem, terminem przydatności i instrukcją użytkowania. Stosowane do posiewu próbek gotowe, rozlane na płytki lub do probówek podłoża mikrobiologiczne powinny posiadać stosowne certyfikaty jakości.

Pożywki przygotowywane z suchych produktów lub ze składników muszą być poddawane jakościowej i ilościowej kontroli selektywnych właściwości i żyzności podłoża.

W kontroli pożywek, testów diagnostycznych i aparatury należy stosować szczepy wzorcowe wskazane przez wytwórców, jak i własne szczepy laboratoryjne świeżo izolowane z próbek materiału klinicznego.

10. Zapewnienie jakości badań laboratoryjnych

Zgodnie z rozporządzeniem Ministra Zdrowia z dnia 23.03. 2006 roku w sprawie standardów jakości dla medycznych laboratoriów diagnostycznych i mikrobiologicznych [Dz. U. nr 61, poz. 435 ze zm.] medyczne laboratorium prowadzi wewnętrzną kontrolę jakości badań i uczestniczy w programach zewnętrznej kontroli jakości wszystkich rodzajów badań wykonywanych w laboratorium z właściwą częstością, określaną przez organizatora tych programów.

Za prowadzenie wewnętrznej kontroli jakości oraz uczestnictwo w programach zewnętrznej kontroli jakości odpowiada kierownik laboratorium lub wyznaczony przez niego diagnosta laboratoryjny.

Dokumentacja kontroli jakości badań porzechowywana jest przez okres 20 lat zgodnie z przepisami dotyczącymi dokumentacji medycznej – ustawa z dnia 6.11.2008 r.

11. Formułowanie i wydawanie wyników

Formularz sprawozdania musi być zgodny z przepisami rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 23.03.2006 w sprawie standardów jakości w medycznych laboratoriach diagnostycznych – z uwzględnieniem specyfiki badania bakteriologicznego [Dz. U. z 2006r., nr 61, poz. 435 ze zm.].

Medyczne laboratorium diagnostyczne archiwizuje sprawozdania z badań wraz z zapisami umożliwiającymi odtworzenie przebiegu badania przez okres 20 lub 30 lat zgodnie z przepisami dotyczącymi dokumentacji medycznej zawartymi w ustawie z dnia 6.11.2008 roku o prawach pacjenta i Rzeczniku Praw Pacjenta [Dz. U. 2012 r., poz 159]

Wydany wynik musi być autoryzowany przez diagnostę laboratoryjnego, zaleca się, by posiadał tytuł specjalisty z mikrobiologii medycznej, lub lekarza posiadającego wiedzę i umiejętności w zakresie wykonywania czynności diagnostyki laboratoryjnej uzyskanych w ramach specjalizacji, zgodnie z rozporządzeniem Ministra Zdrowia z dnia 11.12.2012 roku w sprawie wykazu specjalizacji uprawniających lekarza do samodzielnego wykonywania czynności diagnostyki laboratoryjnej w medycznym laboratorium diagnostycznym [Dz.U.2012, poz. 1420] i posiadającym udokumentowane co najmniej dwuletnie doświadczenie w laboratoryjnej diagnostyce zakażeń przewodu pokarmowego.

Formułowanie wyniku badania w kierunku chorobotwórczych pałeczek jelitowych rosnących w warunkach tlenowych.

Wynik tego badania musi jednoznacznie wskazywać, w jakim kierunku badanie było wykonane, ze szczegółowym wymienieniem rodzajów bakterii, których poszukiwano, np. „Posiew kału w kierunku pałeczek *Salmonella, Shigella, Yersinia* i werotoksycznych pałeczek *Escherichia coli*", „Posiew kału w kierunku *Salmonella* i *Shigella*".

Za etiologiczny czynnik zakażenia uznaje się wyhodowane z badanej próbki bezwzględnie chorobotwórcze:

1. **pałeczki jelitowe należące do rodzaju *Salmonella*, *Shigella*,**
2. **pałeczki *Yersinia pseudotuberculosis*,**
3. **pałeczki *Yersinia enterocolitica*,**
4. **pałeczki *Escherichia coli* u których potwierdzono właściwości chorobotwórcze.**

Za dodatni wynik ogólnego posiewu kału osoby z biegunką uznaje się także wyhodowanie pałeczek z rodzaju *Aeromonas* lub pałeczek *Plesiomonas shigelloides*.

Zaleca się, żeby w przypadkach gdy w posiewie nie stwierdzono obecności wyżej wymienionych drobnoustrojów w wyniku badania podawać informację, iż nie wyhodowano chorobotwórczych pałeczek jelitowych. Jeśli natomiast wyhodowano szczep wymagający określenia właściwości chorobotwórczych lub typowania serologicznego, w wyniku należy to zaznaczyć wraz z informacją o planowanym uzupełnieniu sprawozdania.

Zaleca się, żeby w przypadku gdy kał był płynny, a w posiewie nie stwierdzono obecności nawet flory fizjologicznej zawrzeć taką informację w komentarzu do sprawozdania (przykład: **„Z próbki kału nie wyhodowano bakterii rosnących w warunkach tlenowych, wskazana ocena zasadności zbadania kału w kierunku *Clostridium difficile*"**). Zaleca się, żeby w przypadku gdy w bezpośrednim posiewie kału zostaną wyhodowane na podłożu McConkey'a w monokulturze lub w istotnej przewadze (>75%) inne drobnoustroje, niż bezwzględnie chorobotwórcze pałeczki jelitowe, w wyniku należy to zaznaczyć dodając odpowiedni komentarz (przykład: **„Wyhodowano pałeczki *Klebsiella pneumoniae* występujące w monokulturze, co może świadczyć o zaburzeniach w składzie fizjologicznej, tlenowej flory przewodu pokarmowego"**).

Formułowanie wyniku badania w kierunku bakterii rosnących w warunkach mikroaerofilnych.

Za dodatni wynik uznaje się wyhodowanie z kału pałeczek z rodzaju *Campylobacter sp.* **W przypadku gdy w laboratorium nie ma możliwości zróżnicowania pałeczek** *C. coli* i hipurano-ujemnych pałeczek *C. jejuni* w celu ustalenia gatunku wyhodowanego szczepu **zaleca się przesłanie go do laboratorium właściwego ze względu na rodzaj biologicznego czynnika chorobotwórczego.**

Formularz sprawozdania z badania laboratoryjnego może być przekazany w formie elektronicznej z zachowaniem wymagań wskazanych w rozporządzeniu Ministra zdrowia z dnia 23.03.2006 roku w sprawie standardów jakości dla medycznych laboratoriów diagnostycznych i mikrobiologicznych (Dz. U nr 61 poz.435 z późn. zm).

12. Zgłaszanie wyników państwowej inspekcji sanitarnej oraz innym podmiotom właściwym ze względu na rodzaj biologicznego czynnika chorobotwórczego

Zgodnie z ustawą z dnia 5. 12. 2008 roku o zapobieganiu i zwalczaniu zakażeń i chorób zakaźnych u ludzi [Dz. U. z 2013 r., nr 0, poz. 947 ze zm.] **kierownik laboratorium ma obowiązek zgłosić w ciągu 24 godzin od momentu uzyskania wyniku, państwowemu powiatowemu inspektorowi sanitarnemu właściwemu dla siedziby laboratorium fakt wykrycia biologicznego czynnika chorobotwórczego podlegającego zgłoszeniu.**

Listę tych czynników oraz okoliczności dokonywania zgłoszenia regulują przepisy rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 25.03.2014 roku w sprawie biologicznych czynników chorobotwórczych podlegających zgłoszeniu, wzorów formularzy zgłoszeń dodatnich wyników w kierunku biologicznych czynników chorobotwórczych oraz okoliczności dokonanych zgłoszeń [Dz. U. z 2014, nr 0, poz. 459]. W praktyce spośród wymienionych w rozporządzeniu biologicznych czynników chorobotwórczych w laboratorium, w którym wykonuje się badania w zakresie laboratoryjnej diagnostyki zakażeń przewodu pokarmowego bakteriami rosnącymi w warunkach tlenowych lub mikroaerofilnych,

kierownik musi zgłosić fakt izolacji z materiału klinicznego pałeczek z rodzaju *Campylobacter*, *Salmonella* Typhi, *Salmonella* Paratyphi A, B i C oraz pałeczek *Salmonella* reprezentujących pozostałe tzw. odzwierzęce typy serologiczne, paleczek *Shigella* oraz pałeczek *Y. pseudotuberculosis*, a także patogennych pałeczek *Y. enterocolitica*. Obowiązek ten ma także kierownik laboratorium, w którym dojdzie do izolacji z materiału klinicznego *V. cholerae* O1 lub O139 po potwierdzeniu toksynotwórczości szczepu lub wykryciu w kwasie nukleinowym V. cholerae genu warunkującego tę toksynotwórczość.

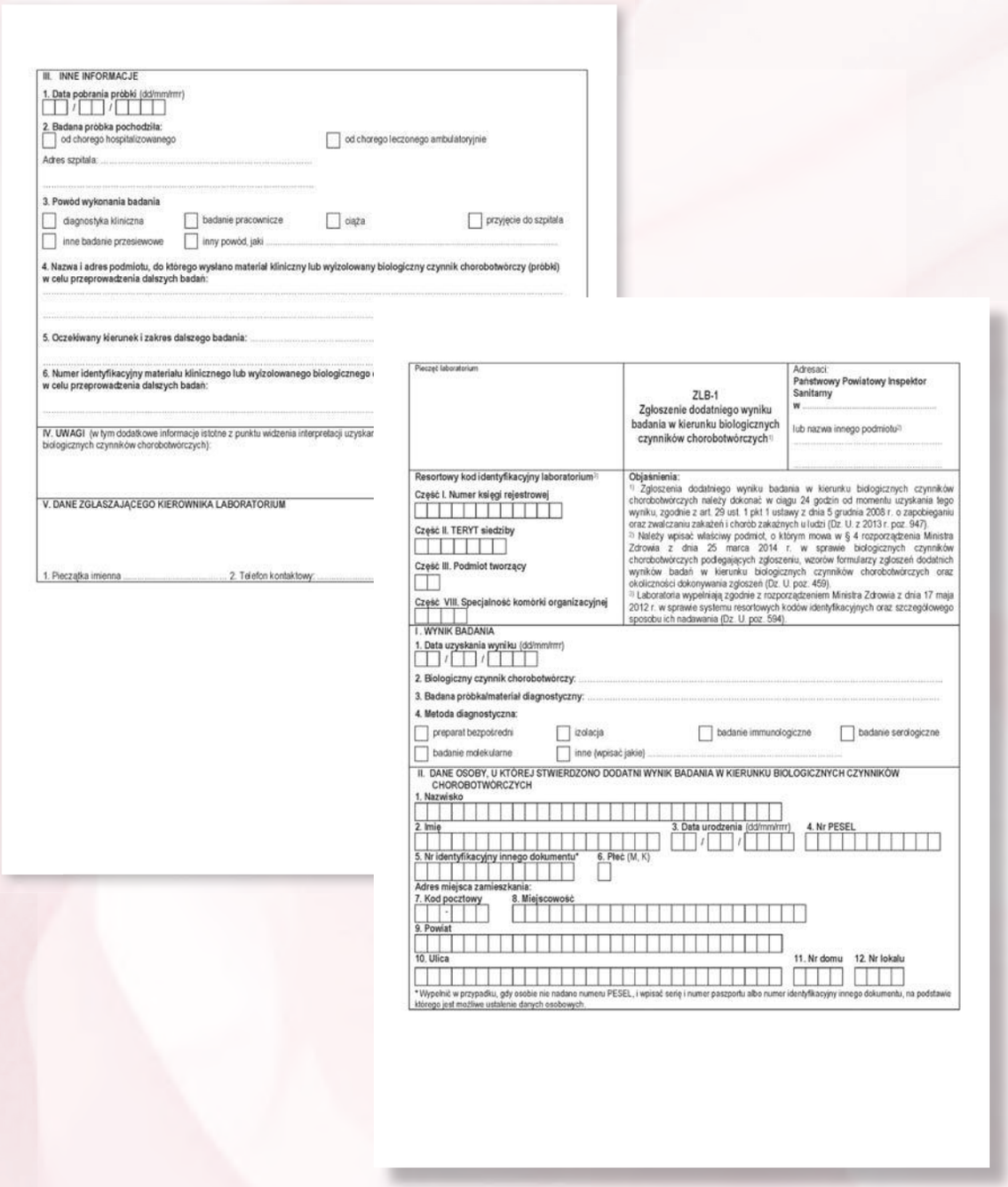
Natomiast w przypadku werotoksynogennych pałeczek *Escherichia coli* (VTEC/STEC) zgłoszenia takiego należy dokonać, gdy zajdzie co najmniej jedna z poniższych sytuacji:

1. **izolacja pałeczki okrężnicy z materiału klinicznego i uzyskanie dodatniego wyniku testu immunologicznego wykrywającego werotoksyny (niezależnie czy rozpoznano typ serologiczny szczepu)**
2. **wykrycie w kwasie nukleinowym szczepu *Escherichia coli* genu kodującego wytwarzanie werotoksyny**
3. **wykrycie wolnej werotoksyny w bezpośrednim badaniu kału testem immunologicznym lub na linii komórkowej Vero, potwierdzone testem neutralizacji.**

W przypadku niektórych z wymienionych patogenów potwierdzenie rozpoznania w większości przypadków wymaga przekazania wyizolowanego biolo-

gicznego czynnika wraz z formularzem zgłoszenia, w celu przeprowadzenia dalszych badań (typowanie serologiczne, określenie patogenności), do laboratorium referencyjnego właściwego ze względu na rodzaj biologicznego czynnika chorobotwórczego.

Formularz zgłoszenia dodatniego wyniku badania w kierunku biologicznego czynnika zakaźnego można pobrać ze strony:
http://wwwold.pzh.gov.pl/oldpage/epimeld/druki/zgloszenia/Form_ZLB1.doc



III. INNE INFORMACJE

1. Data pobrania próbki (dd/mm/rrr)
2. Badana próbka pochodziła:
od chorego hospitalizowanego
od chorego leczonego ambulatoryjnie
Adres szpitala:
3. Powód wykonania badania
diagnostyka kliniczna
badanie pracownicze
ciąża
przyjęcie do szpitala
inne badanie przesiewowe
inny powód, jaki
4. Nazwa i adres podmiotu, do którego wysłano materiał kliniczny lub wyizolowany biologiczny czynnik chorobotwórczy (próbki) w celu przeprowadzenia dalszych badań:
5. Oczekiwany kierunek i zakres dalszego badania:
6. Numer identyfikacyjny materiału klinicznego lub wyizolowanego biologicznego
w celu przeprowadzenia dalszych badań:

IV. UWAGI (w tym dodatkowe informacje istotne z punktu widzenia interpretacji uzyskar
biologicznych czynników chorobotwórczych):

V. DANE ZGŁASZAJĄCEGO KIEROWNIKA LABORATORIUM

1. Pieczątka imienna ... 2. Telefon kontaktowy:

Pieczęć laboratorium

ZLB-1
Zgłoszenie dodatniego wyniku badania w kierunku biologicznych czynników chorobotwórczych[1]

Adresaci:
Państwowy Powiatowy Inspektor Sanitarny
w
lub nazwa innego podmiotu[2]

Resortowy kod identyfikacyjny laboratorium[3]
Część I. Numer księgi rejestrowej
Część II. TERYT siedziby
Część III. Podmiot tworzący
Część VIII. Specjalność komórki organizacyjnej

Objaśnienia:
[1] Zgłoszenia dodatniego wyniku badania w kierunku biologicznych czynników chorobotwórczych należy dokonać w ciągu 24 godzin od momentu uzyskania tego wyniku, zgodnie z art. 29 ust. 1 pkt 1 ustawy z dnia 5 grudnia 2008 r. o zapobieganiu oraz zwalczaniu zakażeń i chorób zakaźnych u ludzi (Dz. U. z 2013 r. poz. 947).
[2] Należy wpisać właściwy podmiot, o którym mowa w § 4 rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 25 marca 2014 r. w sprawie biologicznych czynników chorobotwórczych podlegających zgłoszeniu, wzorów formularzy zgłoszeń dodatnich wyników badań w kierunku biologicznych czynników chorobotwórczych oraz okoliczności dokonywania zgłoszeń (Dz. U. poz. 459).
[3] Laboratoria wypełniają zgodnie z rozporządzeniem Ministra Zdrowia z dnia 17 maja 2012 r. w sprawie systemu resortowych kodów identyfikacyjnych oraz szczegółowego sposobu ich nadawania (Dz. U. poz. 594).

I. WYNIK BADANIA
1. Data uzyskania wyniku (dd/mm/rrr)
2. Biologiczny czynnik chorobotwórczy:
3. Badana próbka/materiał diagnostyczny:
4. Metoda diagnostyczna:
preparat bezpośredni
izolacja
badanie immunologiczne
badanie serologiczne
badanie molekularne
inne (wpisać jakie)

II. DANE OSOBY, U KTÓREJ STWIERDZONO DODATNI WYNIK BADANIA W KIERUNKU BIOLOGICZNYCH CZYNNIKÓW CHOROBOTWÓRCZYCH
1. Nazwisko
2. Imię
3. Data urodzenia (dd/mm/rrr)
4. Nr PESEL
5. Nr identyfikacyjny innego dokumentu*
6. Płeć (M, K)
Adres miejsca zamieszkania:
7. Kod pocztowy
8. Miejscowość
9. Powiat
10. Ulica
11. Nr domu
12. Nr lokalu
* Wypełnić w przypadku, gdy osobie nie nadano numeru PESEL, i wpisać serię i numer paszportu albo numer identyfikacyjny innego dokumentu, na podstawie którego jest możliwe ustalenie danych osobowych.

IV. Wybrane pozycje piśmiennictwa

1. European Centre for Disease Prevention and Control. Annual Epidemiological Report 2012. Reporting on 2010 surveillance data and 2011 epidemic intelligence data. Stockholm: ECDC 2013. http://www.ecdc.europa.eu]
2. Kałużewski S, Jagielski M. Test lateksowy w zastosowaniu do diagnostyki czerwonki wywołanej przez *S. sonnei*. Med Dośw Mikrobiol. 1991; 43: 25-35.
3. Lityński JI, Judicka NM, Gierok HI, Gołowinowa MA. Ocena efektywności wybiórczo-różnicujacych pożywek i ich zestawów zastosowanych do izolowania pałeczek Shigella i Salmonella. Med Dośw Mikrobiol 1987;39:11-22
4. Pathogenic Escherichia coli. Molecular and Cellular Microbiology. ed S.Morabito. Caiser Academic Press, Norfolk, 2014
5. Szych J. Zakażenia i zatrucia wywołane przez bakterie rosnące w warunkach tlenowych w: Etiologia, obraz kliniczny i diagnostyka ostrych zakażeń i zarażeń oraz zatruć pokarmowych red. M. Jagielski, Fundacja Pro Pharmacia Futura, Warszawa 2010
6. Wardak S, Szych J. Zakażenia i zatrucia wywołane przez bakterie rosnące w warunkach mikroaerofilnych w: Etiologia, obraz kliniczny i diagnostyka ostrych zakażeń i zarażeń oraz zatruć pokarmowych red. M. Jagielski, Fundacja Pro Pharmacia Futura, Warszawa 2010
7. World Health Organization. Diarrhoeal disease. Fact Sheet no 330. Geneva: WHO; Apr 2013. Available from: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs330/en/
8. Zakład Epidemiologii NIZP-PZH. Choroby zakaźne i zatrucia w Polsce. Dostępne na: http://www.pzh.gov.pl/oldpage/epimeld/index_p.html

Warszawa 2015 r.