

Lékařská mikrobiologie pro ZDRL

Týden 17:

Přehled grampozitivních bakterií

Ondřej Zahradníček 777 031 969

zahradnicek@fnusa.cz ICQ 242-234-100

Co nás dnes čeká

- Není možné se během této přednášky naučit vše o grampozitivních bakteriích
- Musíte se je tedy naučit z učebnic
- Tato přednáška může jen pomoci udělat si v nich trochu přehled a pochopit základní charakteristiku jednotlivých skupin

Grampozitivní bakterie

- Koky

- Rod *Staphylococcus* (a další kataláza pozitivní koky)
- Rod *Streptococcus* (a další kataláza negativní koky)
- Rod *Enterococcus*

- Tyčinky

- Bacillus*
- Koryneformní tyčinky (*Corynebacterium*, *Arcanobacterium*...)
- Listeria* a *Erysipelothrix*

1. Stafylokoky a další kataláza pozitivní koky

- **Stafylokoky ve sputu.** Pátráme po grampozitivních kocích ve shlucích a také po leukocytech (hlavně polymorfonukleárech), které svědčí pro bakteriální zánět

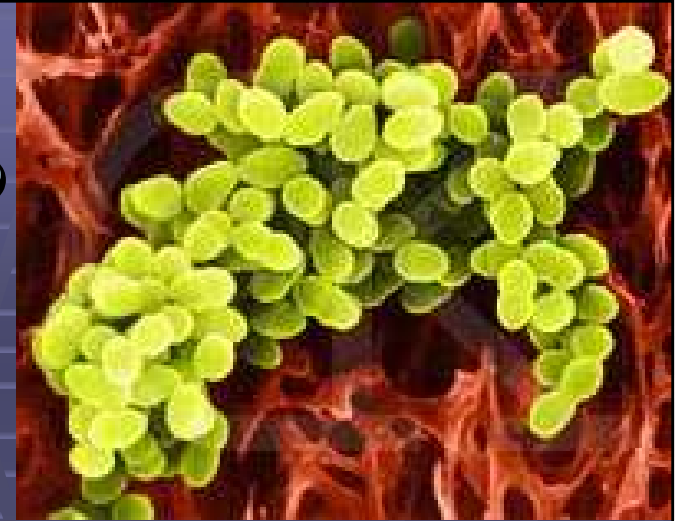


Příběh první



- Paní J. K., kuchařka ve studentské menze. Má na ruce puchýř, naplněný žlutobílým hnisem. Nevěnuje mu však pozornost. Bere do ruky knedlíky, které se už nevaří, ale jen prohřívají
- Student Miloš s přítelkyní si pochutnají na knedlíkách. Odpoledne mají schůzku ... ale co to? Půl hodinu před schůzkou Miloše najednou zničehož nic rozbolelo břicho. Na WC neví, který konec trávicí trubice nastavit vstříc míse dřív... Volá přítelkyni – ta má ale pochopení, je na tom stejně... Romantické odpoledne se nekoná...

Kdo je vinen?



- Vinen je *Staphylococcus aureus*
název z řeckého staphylé = hrozen
- Tento „zlatý stafylokok“ s oblibou způsobuje hnisavé infekce kůže a kožních adnex
- Některé kmeny produkují enterotoxiny, které fungují jako tzv. superantigeny
- Intoxikace bakteriálním toxinem se, na rozdíl od střevní infekce, projeví velice rychle; obvykle také rychle odezní

Vinna je ovšem také kuchařka, která nedodržela pravidla hygieny a nevšímal si puchýře!

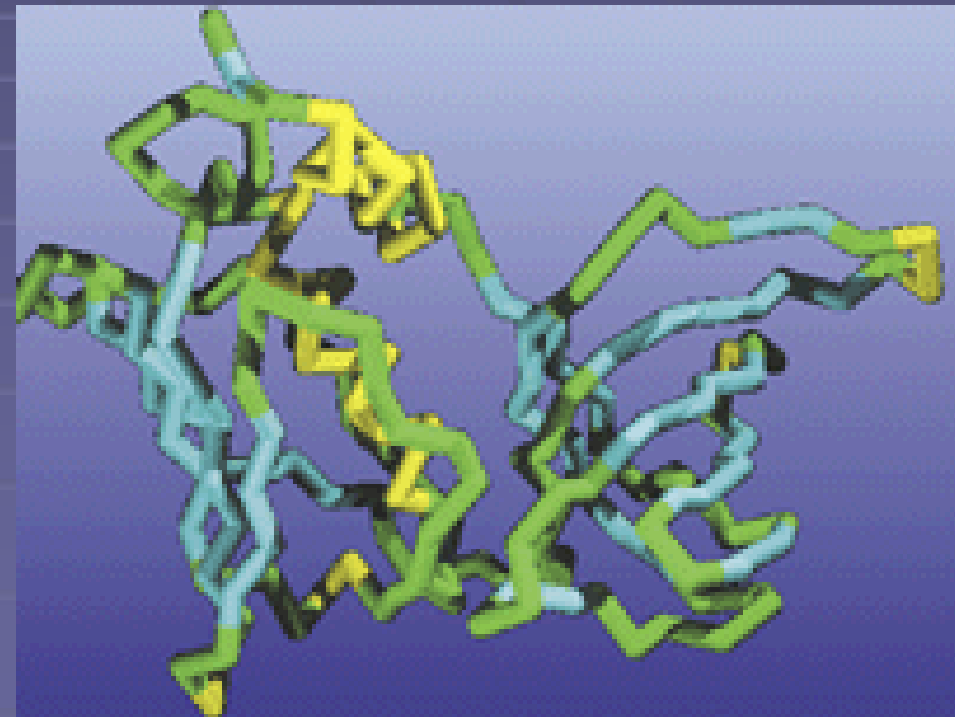
Příběh druhý



- Studentka P. Z. je nervózní: opět na ni přišly „její dny“. Naštěstí má ty slevněné tampóny, které nedávno výhodně koupila.
- Najednou ji chytila třesavka, mdloby, horečka. Spolubydlička ji našla ležící na koberci a volá 155. Objevila se vyrážka, leží na JIP infekční kliniky...

Kdo je vinen tentokrát?

- Opět je viníkem *Staphylococcus aureus*, tentokrát kmen produkující toxin zvaný TSST-1 (toxin syndromu toxického šoku)
- Také tento toxin je superantigenem
- Způsobuje toxický šok, typicky se vyskytuje u uživatelék menstruačních tampónů



TSST-1

Zlatý stafylokok (*S. aureus*)

Může tedy způsobovat

- hnisavé záněty v kůži, vlasech, chlupech
- hnisavé záněty ve tkáních (abscesy)
- septické stavy
- záněty v dýchacích cestách
- enterotoxikózy
- vzácné závažné nemoci, jako je syndrom toxického šoku, syndrom opařené kůže a některé další

Příběh třetí

- Mladík F. B. se zotavuje po těžké havárii. Do krevního řečiště má zavedeny dva žilní katétry pro infusní výživu a odběry krve
- Náhle se stav prudce zhoršil, objevily se vysoké horečky, které kolísají – ošetřující lékař vyslovil podezření na septický stav, odebírá krev na kultivaci (hemokulturu)
- Po vyměnění katetru a antibiotické léčbě se stav opět zlepšil

A kdo je vinen nyní?

- Vinen je *Staphylococcus epidermidis*, nejběžnější z. takzvaných koaguláza negativních stafylokoků
- Koaguláza negativní stafylokoky patří do stejného rodu jako zlatý stafylokok
- Jsou mnohem méně patogenní než on
- V poslední době jsou však velice významnými původci infekcí u oslabených osob, zejména nemocničních. Často jsou to katetrové sepse

Proč říkáme koaguláza negativním stafylokokům koaguláza negativní? Dozvíte se za chvíli...

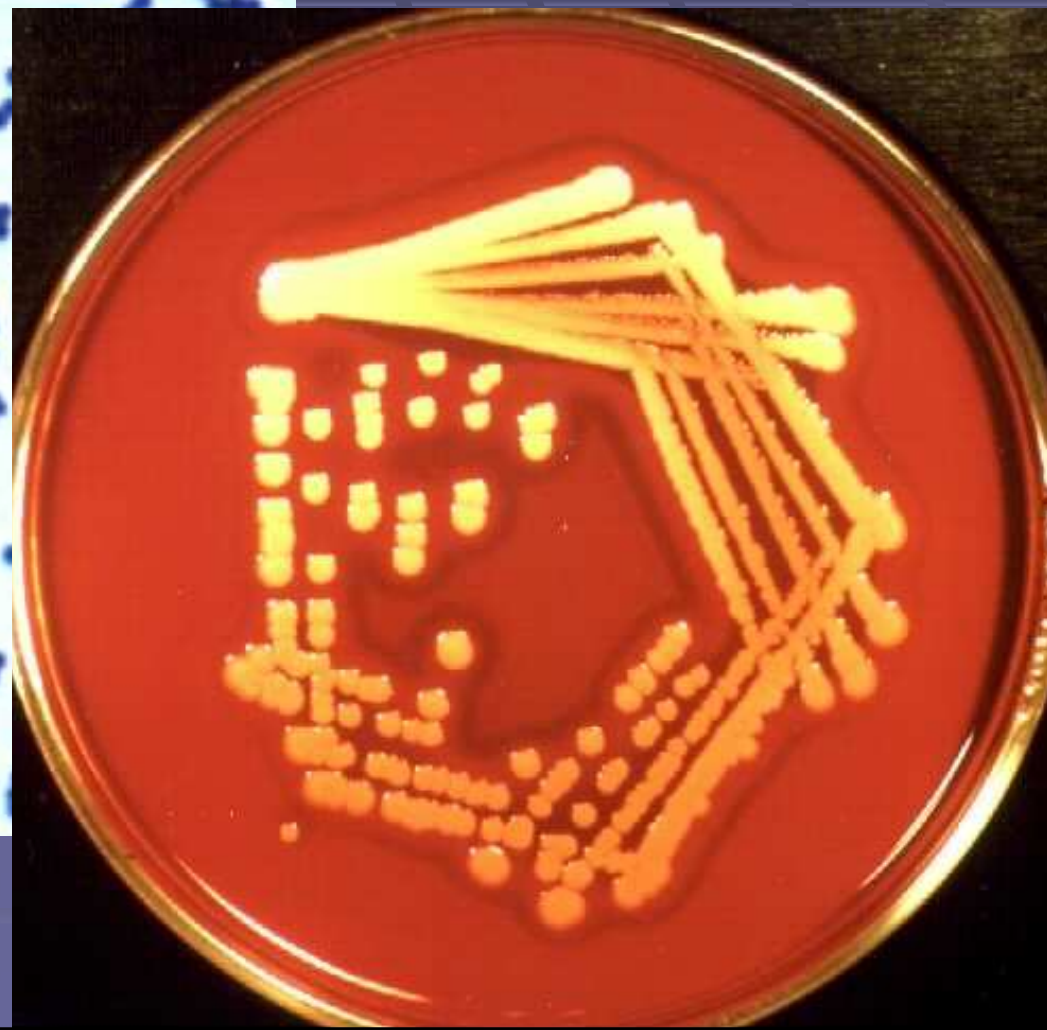
Mohou být i hodné

- Ne každý stafylokok je ovšem zločincem!
- Koaguláza negativní stafylokoky jsou hlavní součástí běžné bakteriální mikroflóry na kůži.
- Dokonce ani nálezy zlatého stafylokoka na kůži či v nosní dutině nemusí znamenat přímo nemoc. Mnozí lidé je mají trvale
- Leckdy je nálezy stafylokoka jen náhodný

Popis pachatele (diagnostika)

- Mikroskopie: grampozitivní kok
- Kultivace: na KA kolonie větší (2 mm), ploché, máslovité konzistence, bílé, anebo (hlavně u zlatého stafylokoka) nazlátlé
- Biochemické testy: kataláza pozitivní, oxidáza negativní, biochemicky lze rozlišit jednotlivé druhy
- Antigenní analýza a speciální testy mohou při pátrání velice pomoci

Fotografie z databáze zločinců



Odlišení od ostatních podezřelých (diferenciální diagnostika 1)

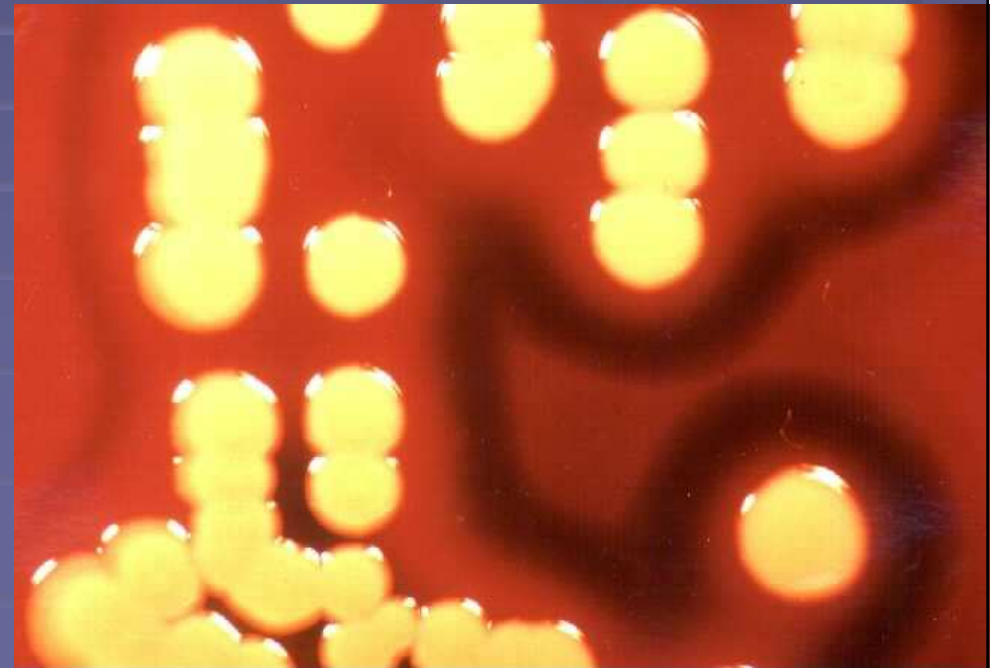
- Gramovo barvení odhalí všechny bakterie, které nepatří mezi grampozitivní koky
- Pozitivní kataláza odliší stafylokoky od streptokoků a enterokoků
- Stejnou službu (a ve směsi mikrobů ještě lepší) udělá kultivace na KA s 10 % NaCl
- *Orientačně můžeme využít i toho, že kolonie ostatních G+ koků nejsou bílé či nazlátlé a že mikroskopicky netvoří shluky*

Rozlišení podezřelých stafylokoků (diferenciální diagnostika 2)

- Volná plasmakoaguláza je pozitivní u zlatého stafylokoka, negativní u koaguláza negativních, proto se tak také jmenují
- Clumping factor neboli vázaná plasmakoaguláza se používá stejně, ale je méně spolehlivá
- Komerční testy na bázi antigenní analýzy jsou naopak velmi spolehlivé
- Hyaluronidáza je nejen spolehlivá, ale i levná

Méně spolehlivé testy: hodí se při pátrání, ale nejsou důkazem pro soud!

- Hemolýza: Koaguláza negativní stafylokoky mohou produkovat jen delta hemolyzin, zlaté i alfa a beta, mívají proto mnohem výraznější hemolýzu
- Nazlátlé zbarvení kolonií a jejich větší průměr může také napovědět
- Větší shluky v mikroskopii jsou také typické pro zlaté stafylokoky



Obávaný „zlatý“ to není: a co teď?

- Ve většině případů se spokojíme s tím, že jde o koaguláza negativního stafylokoka a netrváme na druhovém určení
- Pokud na druhovém určení trváme (např. u hemokultur), lze je provést biochemicky
- V našich podmínkách se nejčastěji používá STAPHYtest 16 (Pliva-Lachema)

Na závěr – čím pachatele potrestat

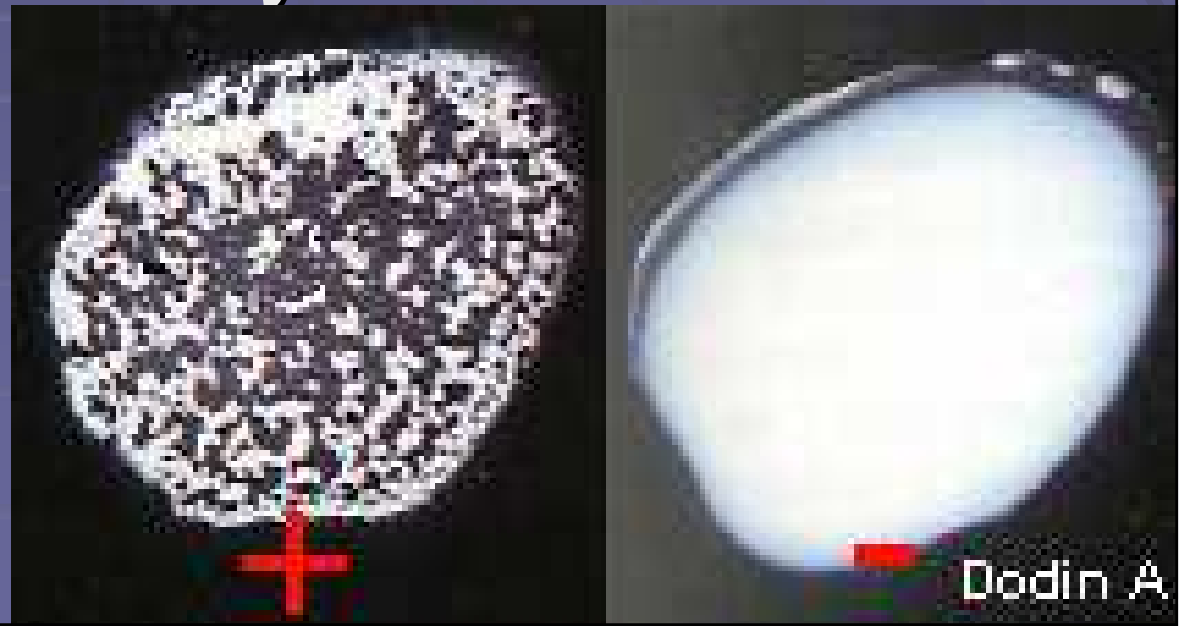
- Diagnostiku uzavírá testování citlivosti na antibiotika, zpravidla difusním diskovým testem
- Samozřejmě se týká jen „pachatelů“ (patogenů)

Je to stafylokok. Ale který?

- clumping factor neboli vázaná plasmakoaguláza (zůstává součástí těla mikroorganismu)
- volná (plasma)koaguláza (říká se jí „volná“, protože je to molekula enzymu, enzymem uvolňovaná do prostředí)
- komerční testy (např. Staphaurex)
- hyaluronidáza (dekapsulace)

Clumping factor neboli také vázaná plasmakoaguláza – rychlé

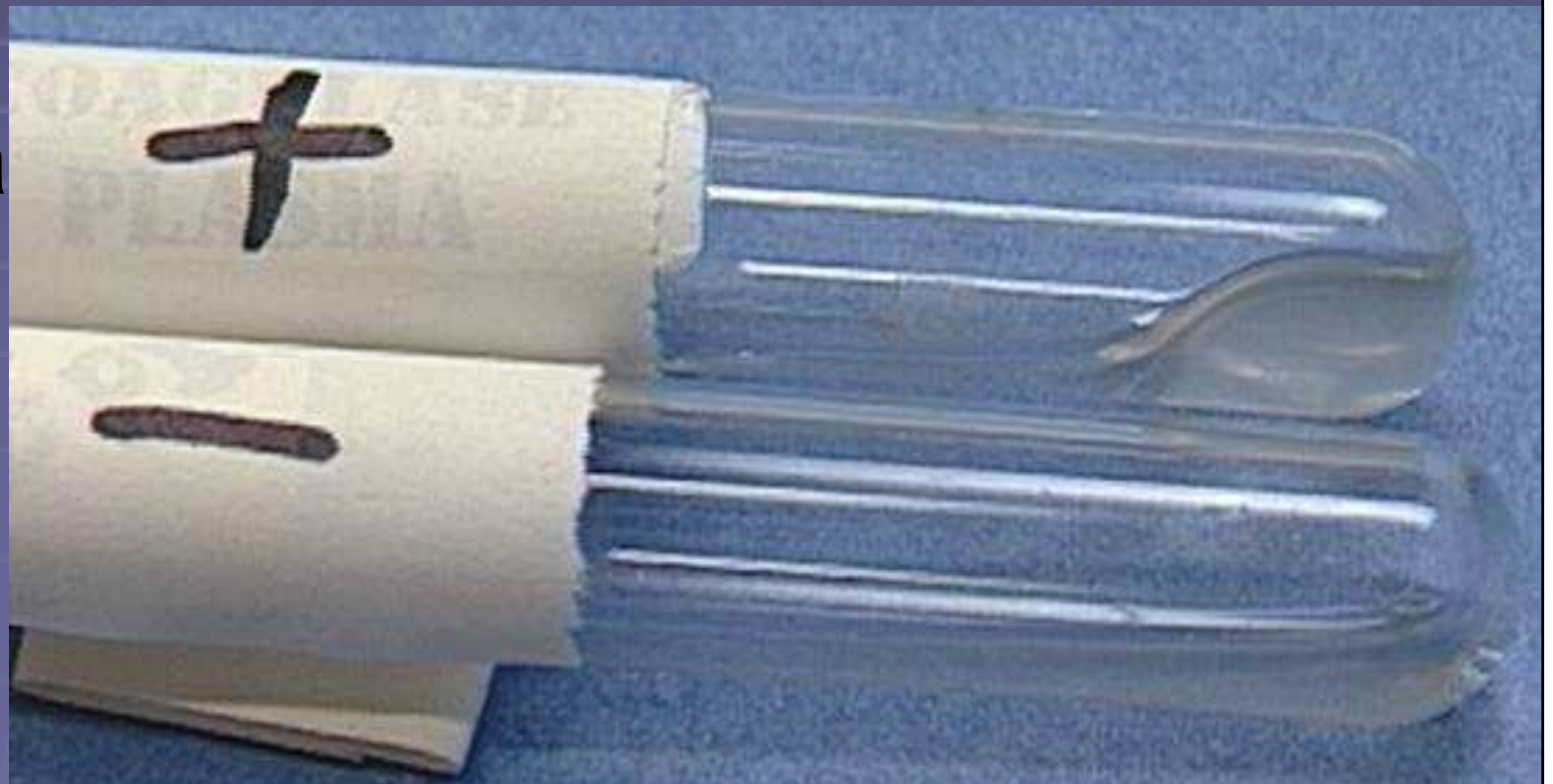
- Kolonie se vmíchají do kapky králičí plasmy na podložním sklíčku
- Nejde vlastně o KOAGULACI, ale o AGLUTINACI plasmy
- Test není příliš spolehlivý



Volná koaguláza – klasika

- Nejklasičtější z testů pro odlišení zlatého stafylokoka (koaguláza pozitivního stafylokoka)
- Kličkou nabrané kolonie vmícháme do králičí plasmy ve zkumavce
- Pokud plasma zkoaguluje (má konzistenci želé), je koaguláza pozitivní

Existují i jiné koaguláza + stafylokoky než *S. aureus*, pro člověka však nemají význam.



Komerční testy, např. Staphaurex (v praxi je neprovádíme)

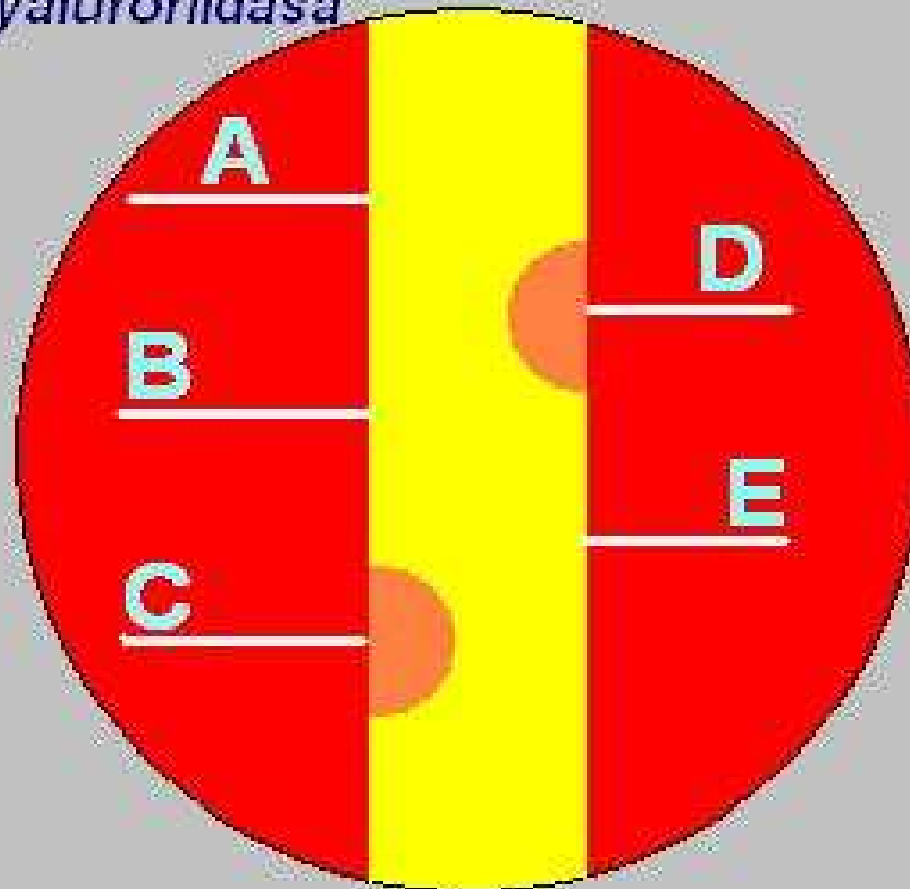
- Provedením připomínají clumping factor, ale jsou spolehlivější než volná plasmakoaguláza
- Jsou bohužel poměrně drahé



Hyaluronidáza (test dekapsulace)

- Elegantní test, jehož principem je skutečnost, že hyaluronidáza, produkováná zlatým stafylokokem (ne však koaguláza negativními stafylokoky) rozpouští pouzdro (kapsulu) opouzdřených bakterií. Používá se druh streptokoka *Streptococcus equii*, pro člověka nepatogenní
- Ztráta pouzdra se projeví změnou vzhledu streptokoka (ztráta „hlenovitosti“)

Hyaluronidasa



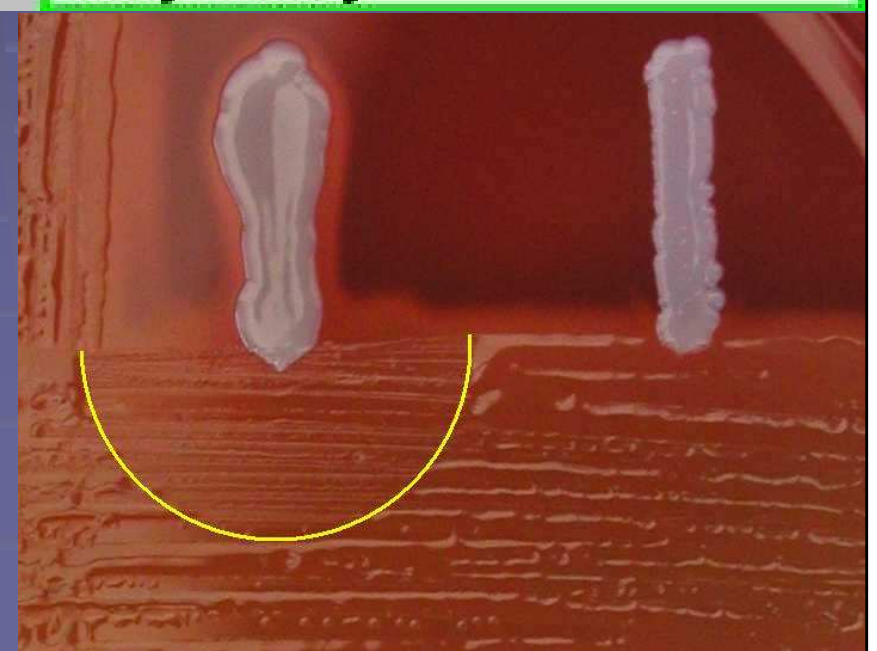
Žlutě "soplovitý" nárůst,
oranžově suché kolonie.

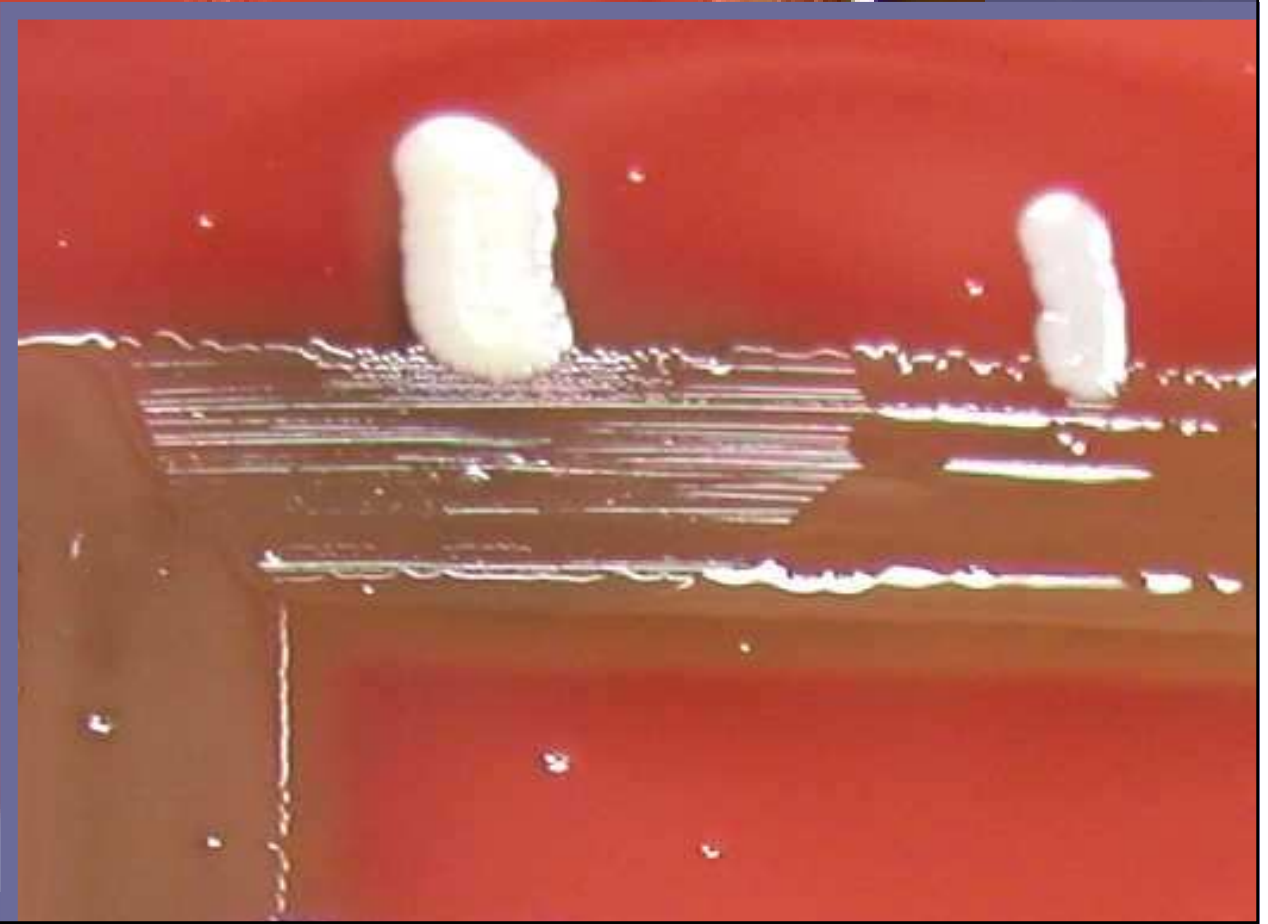
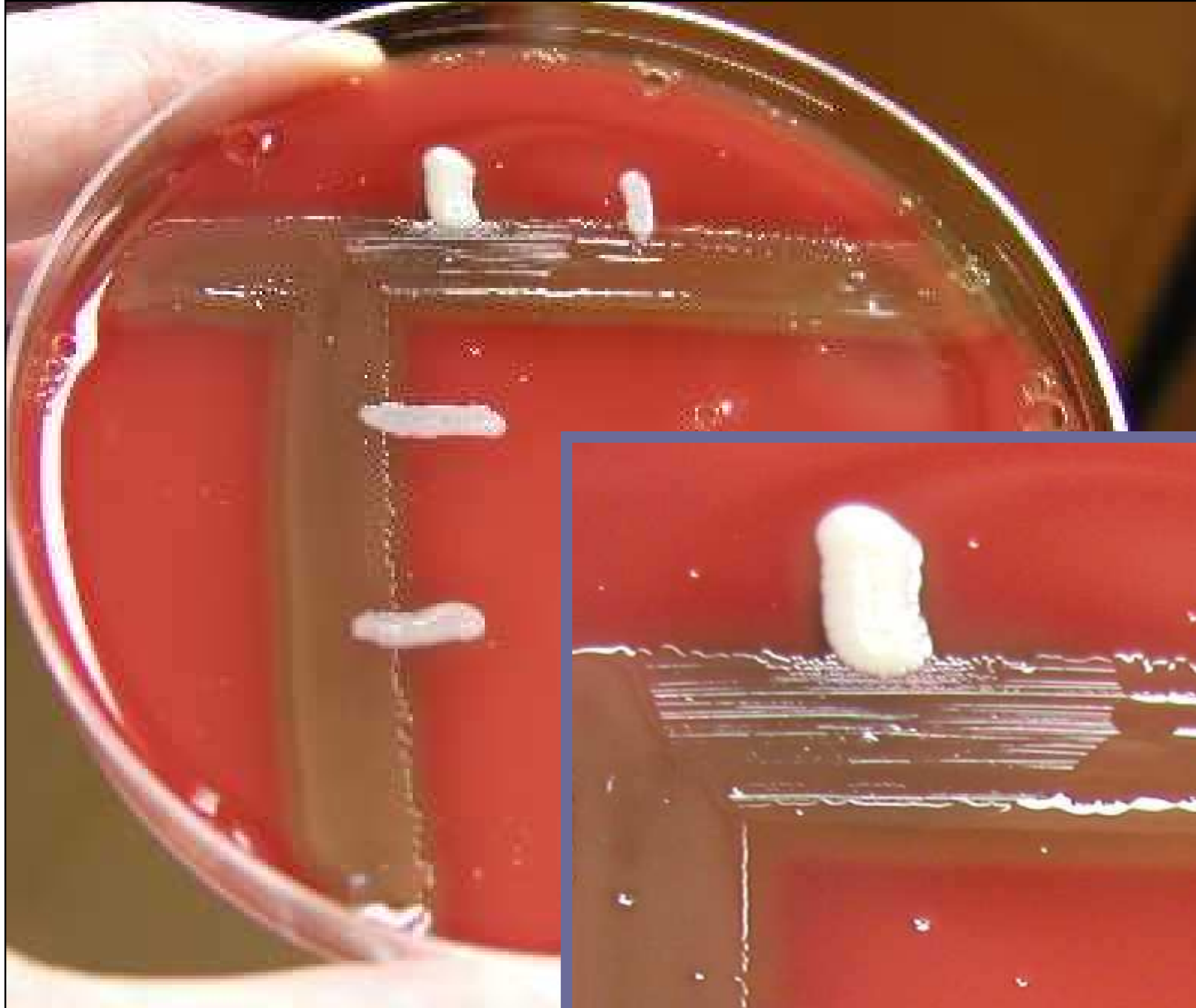
Bíle testované kmeny
stafylokoků.

Hodnocení:

Kmeny C, D patří k druhu
Staphylococcus aureus

Kmeny A, B, E patří mezi
koagulázanegativní
stafylokoky





Vzájemné rozlišení koaguláza negativních druhů: STAPHYtest 16

- Pozor – i když se jmenuje STAPHYtest 16, zahrnuje ve skutečnosti 17 reakcí. Jako první se odečítá test VPT ve zkumavce. Červená tekutina ve zkumavce = pozitivní VPT, bezbarvá tekutina = neg.
- První řádek STAPHYtestu = 2. – 9. reakce
- Druhý řádek STAPHYtestu = 10. – 17. rce
- Vypočítejte kód a porovnejte s kódovníkem
- Kód je šestimístný. Prvních pět číslic je ze trojic testů, šestá číslice je z dvojice

Výsledek – první kmen

(703 651 = *S. aureus*, 99,8 %, $T_{in}=1,00$)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Zkum	H	G	F	E	D	C	B	A	H	G	F	E	D	C	B	A	
	První řádek panelu									Druhý řádek panelu							
+																	
-																	
?																	
	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-
	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2
	7			0			3			6			5		1		

Výsledek – druhý kmen

(703 241 = *S. epidermidis*, 97,95 %, $T_{in}=1,00$)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Zkum	H	G	F	E	D	C	B	A	H	G	F	E	D	C	B	A	
	První řádek panelu									Druhý řádek panelu							
+																	
-																	
?																	
	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-
	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2
	7			0			3			2			4			1	

Api Staph – zahraniční obdoba našich STAPHYtestů 16

- Bez ohledu na provenienci konkrétního testu zůstává princip stejný – kombinace většího počtu enzymatických reakcí, které se projeví změnou zbarvení reakčního důlku



Léčba

- U stafylokoků je lékem volby oxacilin, u močových infekcí cefalosporiny první generace. Oblíbené makrolidy jsou na místě jen u alergických osob, linkosamidy mají význam u infekcí pohybové soustavy a aminoglykosidy raději jen v kombinaci. Glykopeptidová antibiotika (vankomycin a teikoplanin) jsou v rezervě. Používají se u kmenů rezistentních na oxacilin, takzvaných MRSA a MRSKN

Obvyklé pravidlo: horší patogen – lepší citlivost

- Nejen pro stafylokoky platí horší patogen (zlatý stafylokok) je zpravidla citlivější než mírnější patogen (koaguláza negativní stafylokok). Toto pravidlo je logické: menší patogenita je znakem adaptace, schopnosti mikroba koexistovat s námi a nevyvolávat u člověka chorobný stav. → přivyknutí mimo jiné i antibiotikům, která používáme.
- Neplatí ovšem vždycky! Jsou výborně citlivé kmeny *S. epidermidis*, a jsou kmeny MRSA.

MRSA a jejich detekce

- Meticilin rezistentní stafylokoky (MRSA) jsou epidemiologicky závažné kmeny, často způsobující nozokomiální infekce
- Příčinou je změna tzv. penicilin binding proteins (PBP)
- Na problém upozorní malá zóna u oxacilinu. Ta však může být způsobena i jinými vlivy
- Za průkazné se považuje, je-li malá zóna nejen u oxacilinu, ale i u cefoxitinu

Základní sada protistafylokokových antibiotik

Antibiotikum	Zkratka	Referenč. zóna
Oxacilin (protistaf. penic.)	OX	13/18 mm
Cefalotin (cefalosp. 1. g.)	KF	18 mm
Erytromycin (makrolid)	E	23 mm
Klindamycin (linkosamid)	DA	21 mm
Co-trimoxazol (směs 2)	SXT	16 mm
Doxycyklin (tetracyklin)	DO	15 mm
Cefoxitin (k průk. MRSA)	FOX	20/25 mm

OX: 13 mm *S. aureus*, 18 mm koaguláza negativní stafylokok

FOX: 20 mm *S. aureus*, 25 mm koaguláza negativní stafylokok

Rozšířená sada protistafylokokových antibiotik

Antibiotikum	Zkratka	Referenč. zóna
Cefuroxim (CS 2. gen.)	CXM	20/23 mm
Chloramfenikol	C	18 mm
Gentamicin (aminoglyk.)	CN	15 mm
Vankomycin (glykopeptid)	VA	12 mm
Teikoplanin (glykopeptid)	TEC	14 mm
Rifampicin (rifamycin)	RD	20 mm

CXM: 20 mm *S. aureus*, 23 mm koaguláza negativní stafylokoky

Ilustrační foto

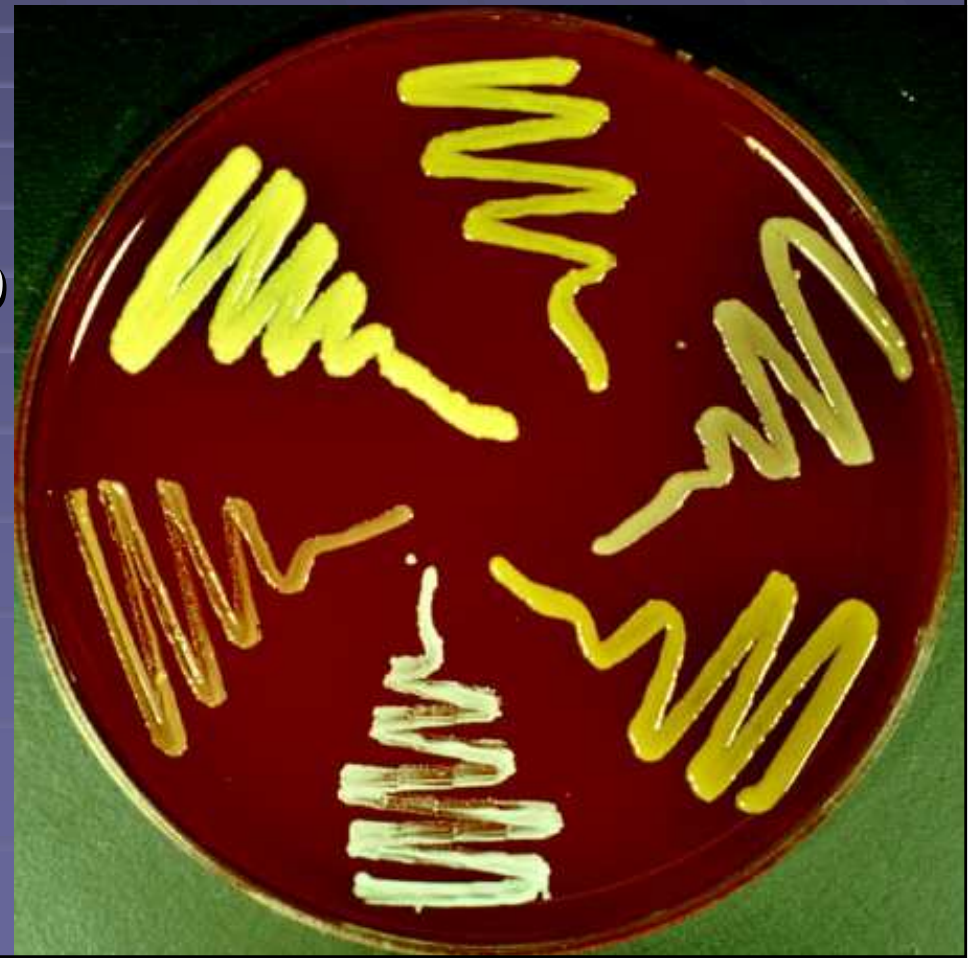


Jiné kataláza pozitivní koky

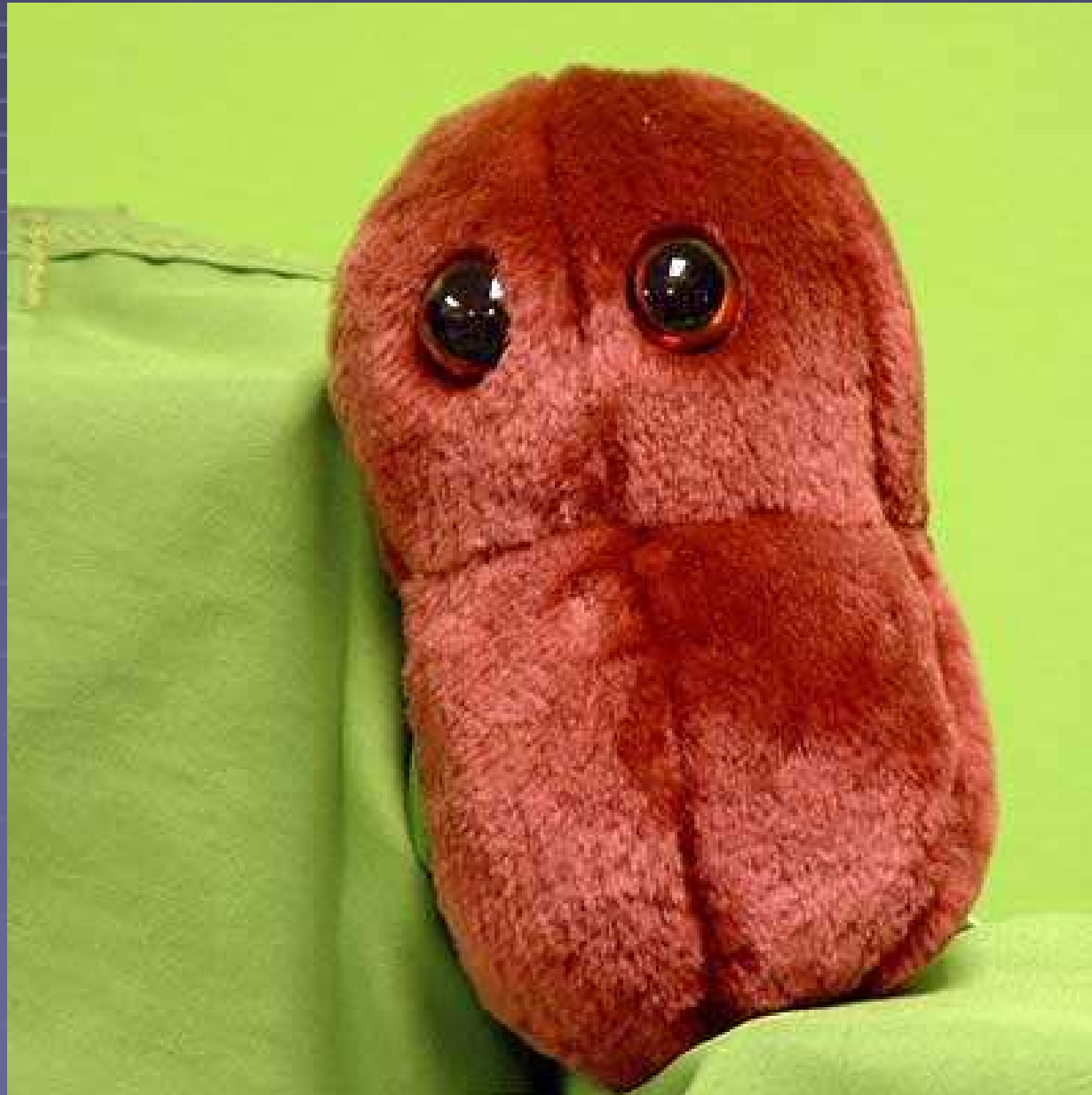
- Existují koky, které jsou kataláza pozitivní jako stafylokoky, ale na rozdíl od nich jsou také oxidáza pozitivní. Dříve všechny patřily do rodu *Micrococcus*, dnes se tento rod rozpadl na více rodů – *Micrococcus*, *Kocuria* (po brněnském prof. Kocurovi), *Kytococcus* a několik dalších
- Nacházíme je na miskách jako kontaminace, patogeny jsou jen naprosto výjimečně
- Pak ještě existuje rod *Stomatococcus*, který je také kataláza pozitivní, ale oxidáza negativní (mám dojem – musím se na to mrknout)

Mikrokoky mají krásné pigmenty

- *Micrococcus luteus* je sírově žlutý (ne zlatý jako *Staphylococcus aureus*), *Kocuria rosea* je růžová



2. Streptokoky (a jiné podobné)



Plyšový
streptokok

Příběh první



- Pan Hmoždinka je kutil. Pracoval v dílně, když se uvolnila těžká fošna se svěrákem a spadla mu na nohu. Vznikla velká tržná rána, navíc znečištěná. Pana Hmoždinku odvezli do nemocnice. Ránu chirurgicky ošetřili, ale objevily se vysoké horečky a příznaky sepse. Při reoperaci byl zjištěn zánět svalových obalů (fascií) s nekrózou. Bohužel, veškerá péče nepomohla: noha nakonec musela být amputována.



These large, dark, boil-like blisters are a diagnostic symptom of necrotizing fasciitis (also known as flesh-eating disease).

(Source: EMBBS, 1998 <http://mdchoice.com/>)

Kdo je vinen?

- Vinen je *Streptococcus pyogenes*
strepto = v řetízcích, *pyo-genes* = hniso-tvorný
- *Streptococcus pyogenes* je známý jako původce angíny (akutní tonsilitidy). Způsobuje ale také hnisavé záněty tkání. Na rozdíl od abscesů, často působených stafylokoky, jde zde spíše o flegmony.
- Kromě angin má také na svědomí spály, spálové angíny a erysipel – růži. Jde o kmeny produkující tzv. erythrogenní toxin (erythros = řecky červený)
- Pokud je bakterie sama napadena určitým bakteriofágem, stává se „masožravým streptokokem“ – „meat eating bug“ – náš případ.

Příběh druhý

- Mladá paní Erika během těhotenství příliš nedbala na těhotenské prohlídky. V porodnici se objevila až při samotném porodu. Porod proběhl bez komplikací. Brzy se však u dítěte objevily příznaky sepse s respiračním selháním. Včasnou léčbou se podařilo dítě zachránit, stále však není jisté, jestli není zasažen mozek a dítě nebude mít následky.
- Později se ukázalo, že paní Erika byla nosičkou bakterie, která byla pachatelem...



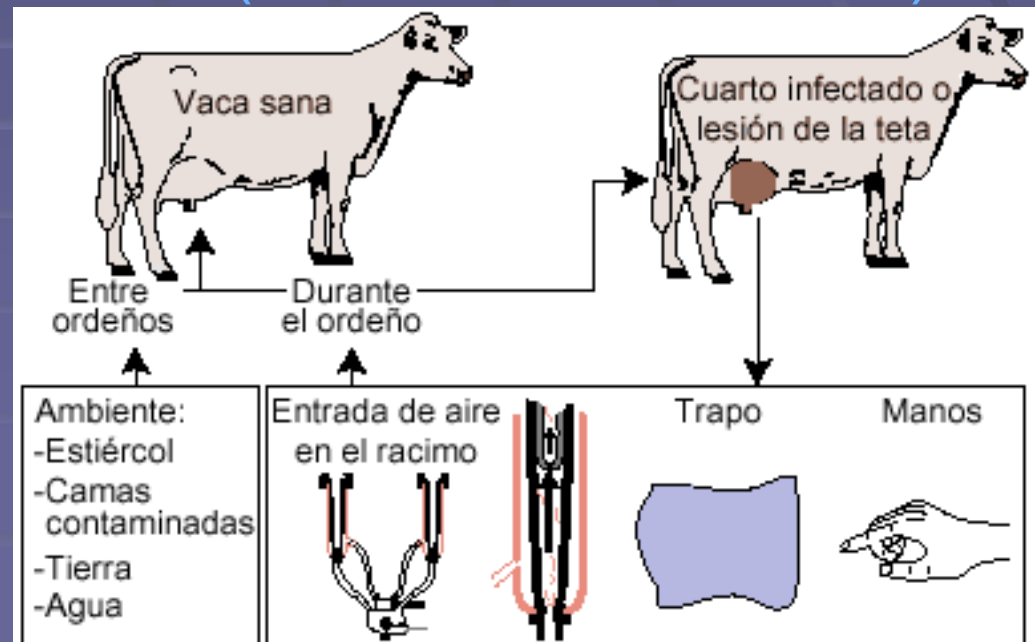
- Bilaterální granulomy na rtg obrazu...

Kdo za to tentokrát může?

- Bakterie *Streptococcus agalactiae* je také streptokokem. U člověka se však specializuje spíše na dolní část těla (urogenitální infekce).

*Bystří studenti si všimnou druhového jména *a-galactiae*, tedy bezmléčný. Tato bakterie opravdu způsobuje záněty mléčné žlázy s poruchou tvorby mléka, avšak většinou je to u krav.*

Schéma přenosu *S. agalactiae* u krav (z veterinárního webu)



Příběh třetí



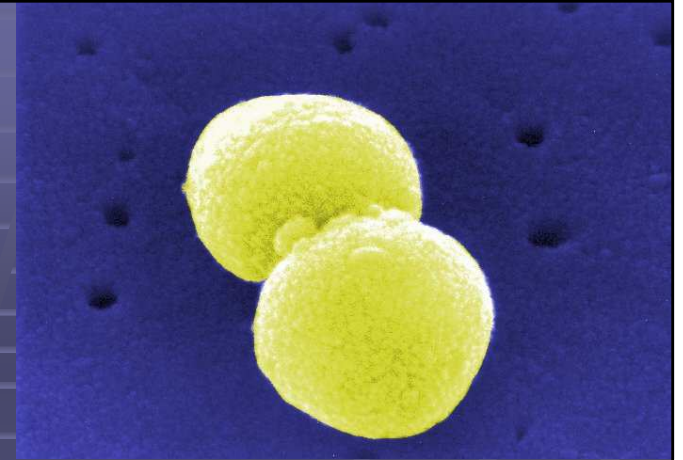
- Klučíka Jindru škrábe v krku a nelepší se to. Že by angína? Jenže angína je zánět mandlí, a jemu mandle „vyndali“, i ty „nosní“ (adenektomie) a dokonce i ty krční (tonsilektomie).
- Rodiče s Jindrou zašli k doktorce, ať mu napíše antibiotika. Doktorka ale rozhodla – nejdřív výtěr z krku, a pak se uvidí. Pozvala si Jindru za tři dny, až už měl výsledek. Nasadila Jindrovi penicilin, a ten brzy zabral.



Kdo může za Jindrovu potíže?

- Takzvaným „non-A-non-B“ streptokokům tak říkáme proto, že nepatří ani do skupiny A (ve které je *Streptococcus pyogenes*) ani do skupiny B (kde je *S. agalactiae* a některé zvířecí streptokoky).
- Nezpůsobují tak často angíny, ale spíše faryngitidy – záněty hltanu. Často však mohou být přítomny v krku bez klinických potíží.
- Stejně jako u angín je u citlivých kmenů lékem volby penicilin; makrolidy jen u alergiků.

Příběh čtvrtý



- Paní Božena, důchodkyně nemá slezinu – vyňali jí ji před léty po autonehodě.
- Před několika dny začala být „nachlazená“, nevěnovala tomu pozornost, ale teď se její stav zhoršil, takže ji dcera dovezla do nemocnice, kde ji hospitalizovali na infekčním oddělení s podezřením na zánět mozkových blan
- Díky včasnému nasazení antibiotik se její stav zlepšil a za dva týdny se uzdravila.

Zločincem je v tomto případě

- *Streptococcus pneumoniae*, čili „pneumokok“. Dříve se mu říkalo *Diplococcus pneumoniae*, netvoří totiž řetízky, ale jen dvojice. Také není ideálně kulatý, má spíše lancetovitý (kopíčkovitý) tvar. (To si zapamatujte, pana profesora potěší, když to budete vědět. 😊)
- V malém množství se nachází i ve farynzích zdravých osob. Jinak je ale původcem zánětů plic, paranasálních dutin, středního ucha, a také původcem sepsí a meningitid.

Takhle tento zločinec vypadá

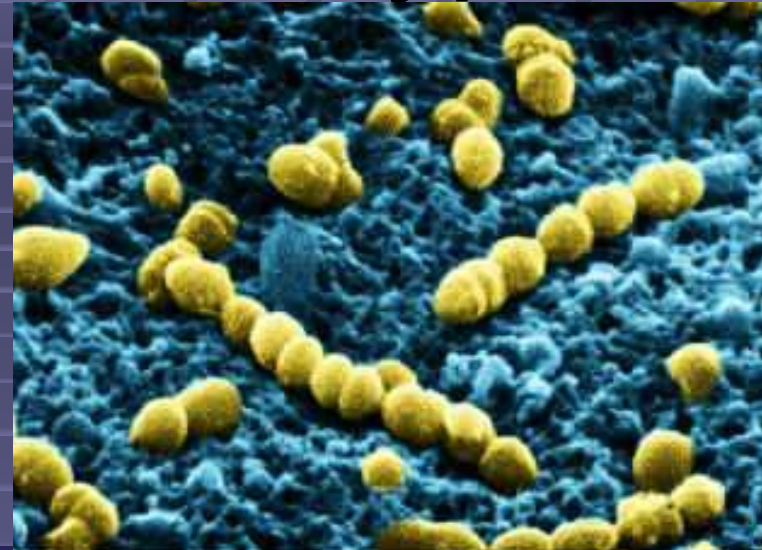
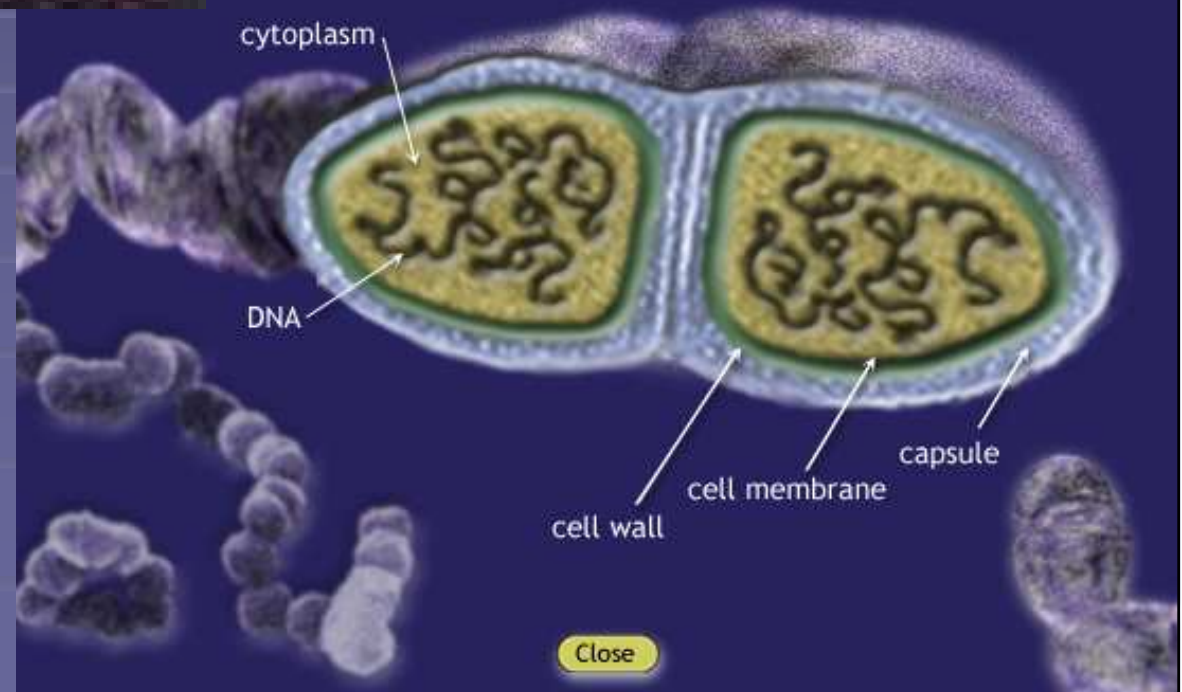
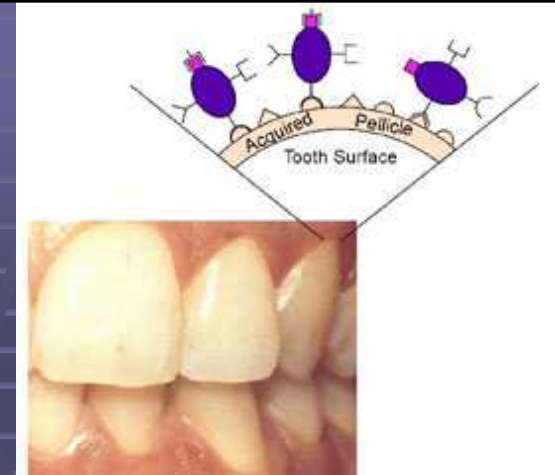


Figure 4. Cross-section of *Streptococcus pneumoniae*



Příběh pátý



- Pan Srdínko má už dlouho dobu potíže se srdcem, které si dokonce vyžádali operaci, při které mu byla do srdce voperována umělá srdeční chlopeň.
- Před měsícem měl ošklivý zubní kaz, a dost dlouho trvalo, než našel čas zajít k zubaři.
- Nyní se mu zhoršily srdeční potíže natolik, že musel být hospitalizován. Byla stanovena diagnóza endocarditis lenta.

Kdo je tentokrát pachatelem?

- Ústní streptokoky, viridující streptokoky, alfa streptokoky, v laboratoři dokonce můžete zaslechnout slovo „alfíci“ – všechny tyto pojmy označují skupinu streptokoků, které na krevním agaru viridují; obvykle se ovšem myslí „ty ostatní kromě pneumokoka“.
- Jsou normální součástí mikroflóry ústní dutiny a částečně i faryngu. I za fyziologických okolností se neustále v malém množství dostávají do krve. Malér je, když se jich tam dostane hodně najednou a když narazí na terén, kde se uchytí.

Vegetace na chlopni



Udělejme si v nich pořádek

Příběh	Na KA	Jméno pachatele
4.	viri- dace (alfa)	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
5.		skupina „ústních streptokoků“
1.	(beta) hemo- lýza*	<i>Streptococcus pyogenes</i>
2.		<i>Streptococcus agalactiae</i>
3.		Skupina „non-A-non-B“ streptokoků
-	žádná	Streptokoky bez hemolýzy („gamáči“)

*u *S. agalactiae* jen částečná hemolýza

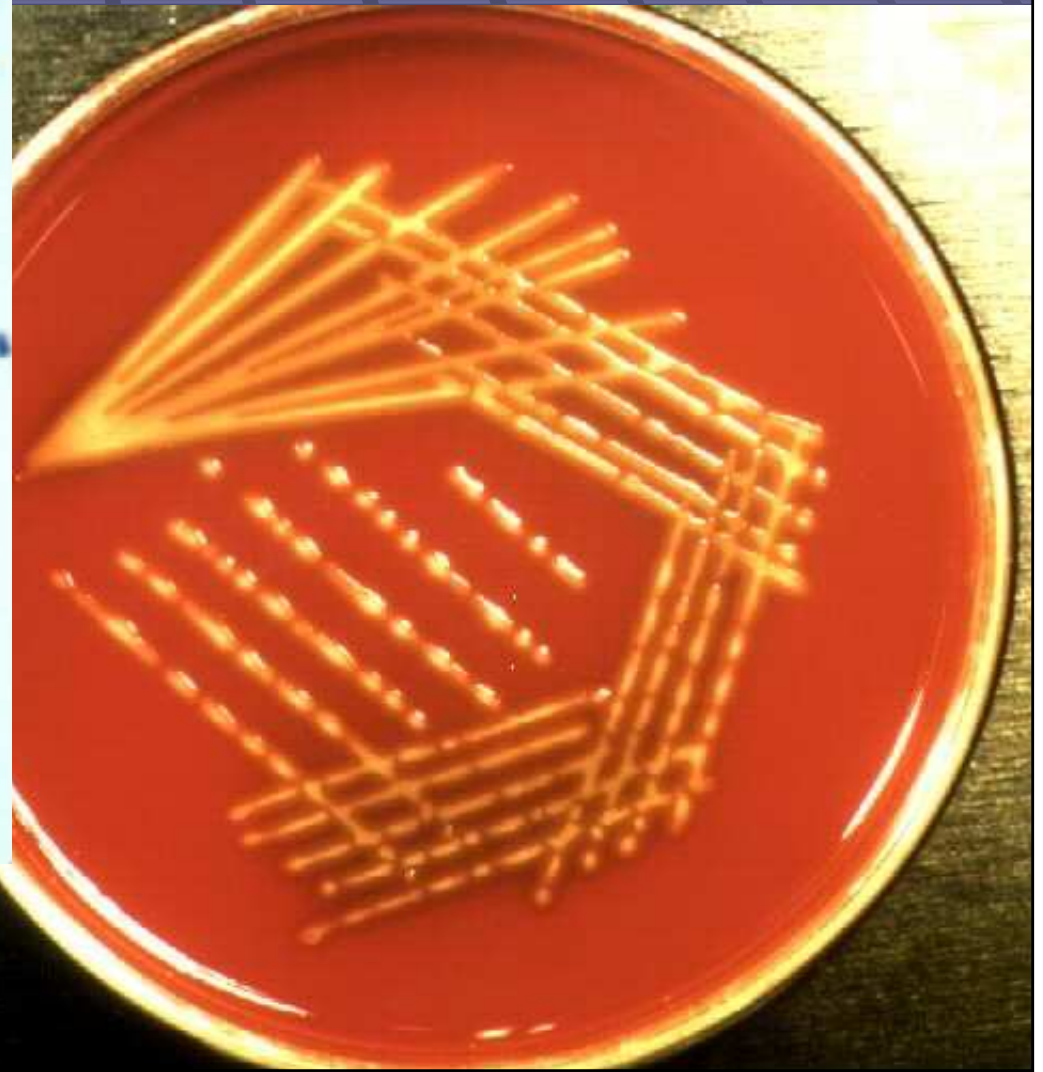
Popis pachatelů (diagnostika) – 1

- Mikroskopie: grampozitivní koky
- Kultivace: na KA kolonie šedé až bezbarvé, většinou drobné, větší kolonie má *Streptococcus agalactiae*
- Hemolytické vlastnosti: některé viridují, některé částečně či úplně hemolyzují
- Nerostou na KA s 10 % NaCl, ani na Slanetz-Bartleyově či žluč-eskulinové půdě. Jsou však (spolu s enterokoky) rezistentní na aminoglykosidy.

Popis pachatelů (diagnostika) – 2

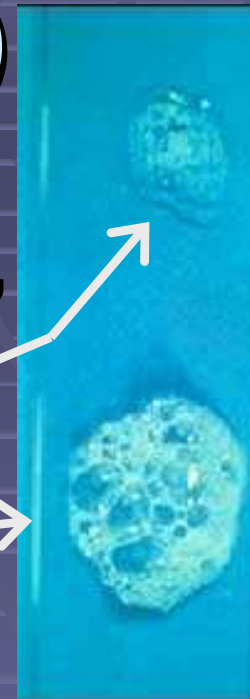
- Biochemické testy: kataláza i oxidáza negativní, biochemicky lze rozlišit jednotlivé druhy zejména u viridujících
- Antigenní analýza může naopak pomoci spíše u hemolyzujících streptokoků. Používá se systém dle Lancefieldové – teoreticky zahrnuje všechny streptokoky, ale mnohé viridující nedisponují žádným antigenem v tomto systému. Skupiny mají písmena A, B, C, E, F, G a další.

Fotografie z databáze zločinců



Odlišení od ostatních podezřelých (diferenciální diagnostika 1)

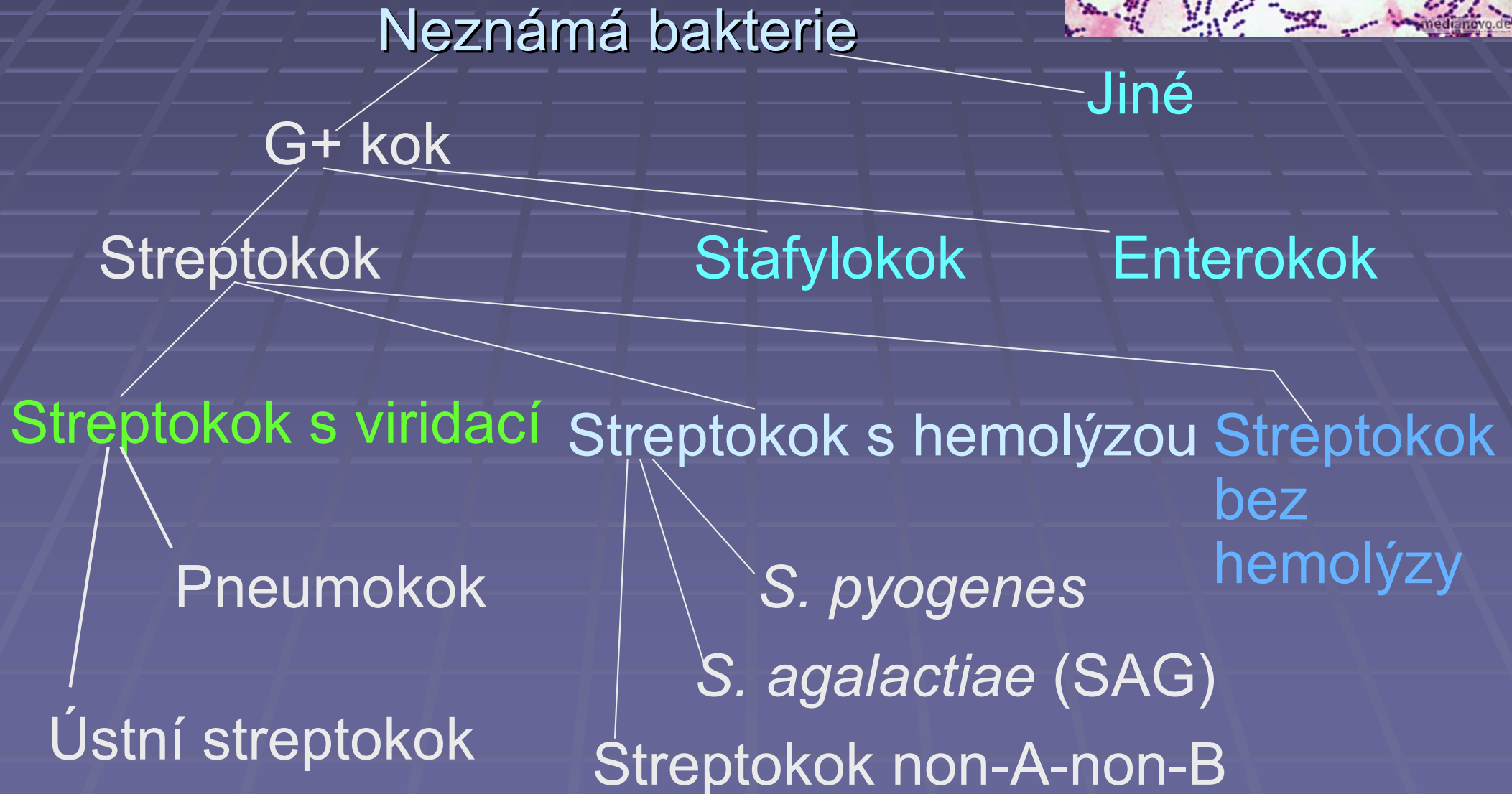
- Gramovo barvení odhalí všechny bakterie, které nepatří mezi grampozitivní koky.
- Pozitivní kataláza od streptokoků odliší stafylokoky
- Růst na SB a ŽE půdě odhalí enterokoky, které jsou také všechny pozitivní v takzvaném PYR-testu, kdežto streptokok je pozitivní jen jeden, a to zrovna takový, kterého si málokdo s enterokokem splete (o něm bude řeč dále)



Rozlišení podezřelých streptokoků (diferenciální diagnostika 2)

- Při rozlišování streptokoků hodnotíme nejdříve hemolýzu – streptokoky členíme na viridující, hemolyzující (částečně či úplně) a ahemolytické
- Pneumokoka od ostatních viridujících poznáme pomocí pozitivního optochinového testu, testu rozpustnosti ve žluči a dalších
- *S. pyogenes* se od ostatních hemolytických pozná pozitivním bacitracinovým a PYR testem
- *S. agalactiae* se zase pozná pozitivním CAMP testem – o všech těchto testech viz dále

Schematicky:

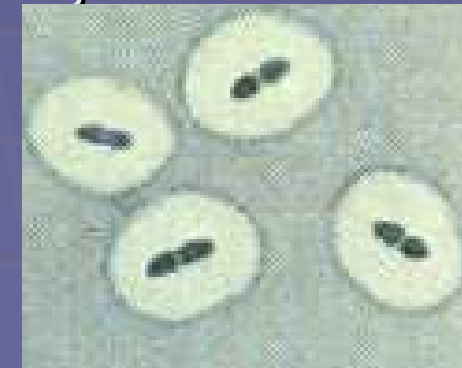
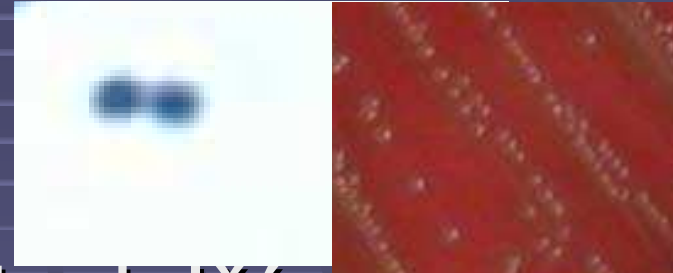


Odlišení od stafylokoků a enterokoků

- a) odhalíme stafylokoka katalázovým testem (kolonie vmícháme do kapky peroxidu vodíku). Pokud šumí, je to stafylokok
- b) odhalíme enterokoka tím, že roste na Slanetz-Bartleyho půdě. Pozor, v protokolu se píše o půdě žluč eskulinové, kterou jsme ke stejnému účelu používali v době tvorby protokolů. Obě půdy jsou prakticky rovnocenné.

Rozlišení streptokoků s viridací

- Pneumokoka odlišíte optochinovým testem – viz další obrazovka.
- Podezření však můžete pojmout, když:
 - mikroskopicky vidíte lancetovité diplokoky
 - kultivačně jsou kolonie ploché, penízkovité až miskovité, někdy s centrálním vyvýšením
 - někdy naopak jsou kolonie výrazné, hlenovité to jsou kmeny s výraznou tvorbou pouzdra (zpravidla velmi virulentní)



Optochinový test

- Klasický test k odlišení pneumokoka od ústních streptokoků. Pneumokok je citlivý na antibiotikum optochin, ústní streptokoky jsou rezistentní. (Optochin se dnes už nepoužívá léčebně, zůstal tedy jen v diagnostice)
- Občas se používá také test rozpustnosti ve žluči. Dnes už historický význam má test patogenity pro myš.



Druhové určení ústního streptotkoka

- Jen blázen (nebo badatel, což je někdy totéž) by druhově určoval ústního streptokoka z ústní dutiny nebo krku. Proč to činit, když je v těchto místech běžnou flórou?
- Na druhou stranu, máme-li kmen z hemokultury či likvoru, je jeho určení na místě. U viridujících streptokoků nemá smysl snažit se o antigenní analýzu, zato, jak jsme se již dozvěděli, velice dobře lze použít biochemické určení.
- V našich podmínkách je to STREPTOtest 16

STREPTOtest 16 – jak odečíst

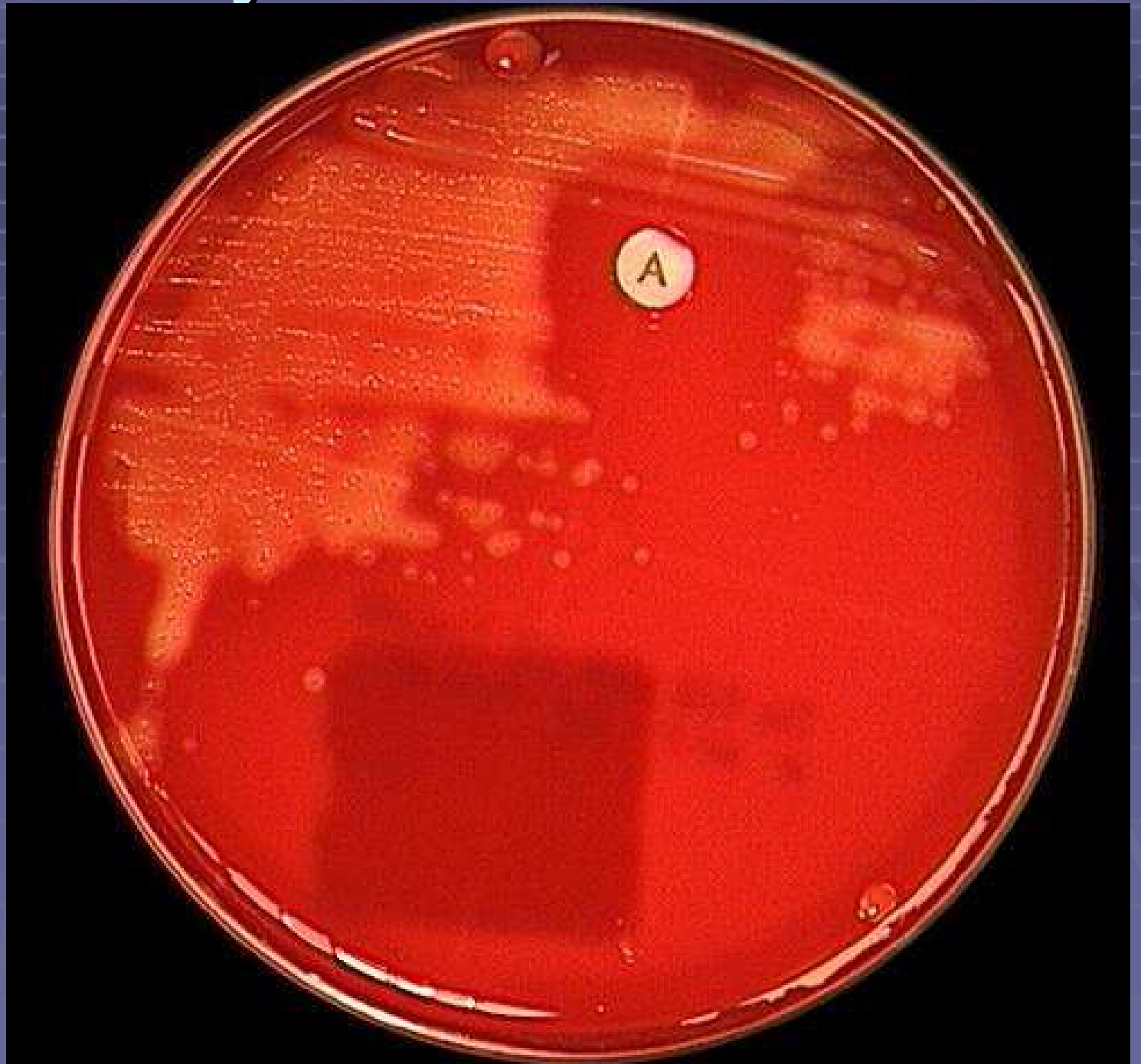
- První reakcí je opět VPT
- Druhou až devátou reakcí je opět první řádek v dvojřádku
- Obdobně desátou až sedmnáctou reakcí je druhý řádek v dvojřádku

Obzvlášť obávaný pachatel: pyogenní streptokok. Jak na něj?

- Bacitracinový test je stejný jako optochinový, jen se použije jiné antibiotikum. Mimochodem, bacitracin se míchá s neomycinem a vzniká velmi oblíbené antiseptikum – totiž **FRAMYKOIN**
- PYR test je provedením podobný oxidázovému. Na kolonie se umístí reakční ploška proužku. Počká se deset minut a přikápně se činidlo. Pozitivní je červené zbarvení.



Bacitracinový test



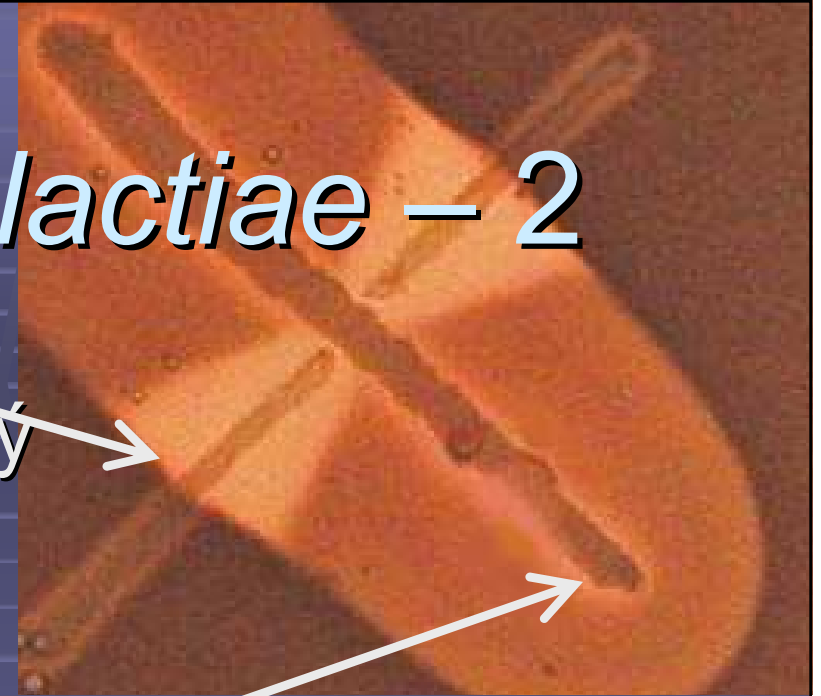
A přichází druhý:

Streptococcus agalactiae – 1

- Mnohé bakterie tvoří hemolyziny
- Pokud na agar působí dva hemolyziny, může být jejich působení synergické nebo antagonistické.
- Příkladem synergismu je CAMP faktor *Str. agalactiae* a beta lyzin *Staphylococcus aureus*
- Nelze jej použít k diagnostice zlatého stafylokoka – ne každý totiž produkuje beta lyzin! Používá se tedy jen v dg. streptokoků

Streptococcus agalactiae – 2

- Na agar se naočkuje testovaný kmen a kolmo k němu laboratorní kmen zlatého stafylokoka
- V případě positivity vidíme zesílenou hemolýzu ve tvaru dvou troujúhelníků, anebo, poetičtěji, motýlích křídel



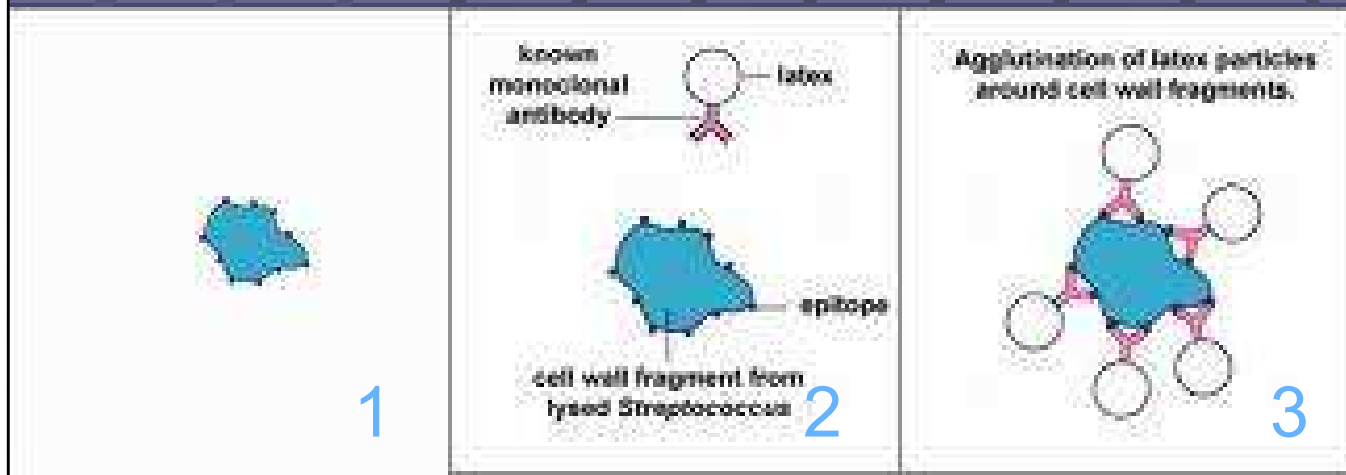
Hemolytiční pachatelé – shrnutí

Úkol 5: provedte PYR test, odečtěte ostatní dva testy z misek a učiňte závěr

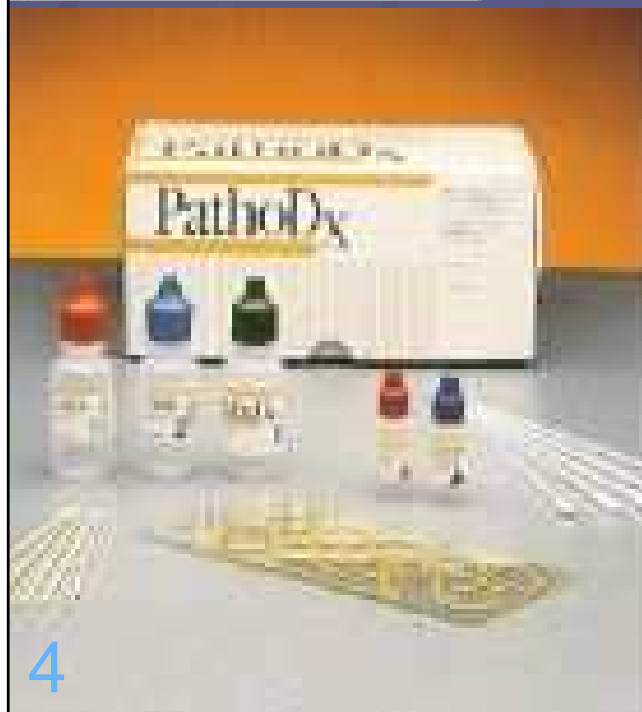
Bacitracinový a PYR test	CAMP test	Streptokok
pozitivní	negativní	<i>S. pyogenes</i>
negativní	pozitivní	<i>S. agalactiae</i>
negativní	negativní	non-A-non-B streptokok
pozitivní	pozitivní	ptákovina, špatný test, případně směs dvou kmenů

Latexová aglutinace – demonstrace

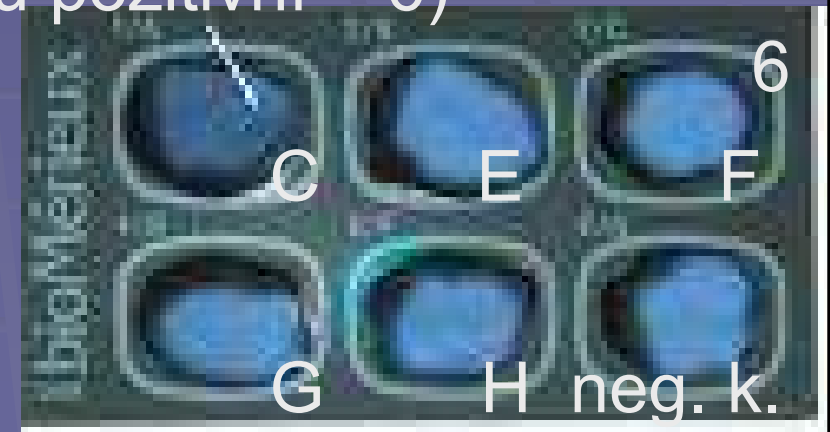
Místo videa si prohlédněte obrázky



1, 2, 3: Latexová aglutinace – princip. Aglutinaci streptokoků s protilátkou pomáhají latexové částice



Praktické provedení: lahvičky se směsí protilátek a latexových částic (4, 5), výsledek (v prvním obdélníku pozitivní – 6)



Léčba: spravedlivý trest zločinci

- Zločinné stafylokoky potrestáme vhodným antibiotikem. U streptokoků je stále lékem volby klasický Flemingův penicilin, u závažných tkáňových infekcí případně v kombinaci s aminoglykosidy. Makrolidy se používají u prokázané alergie na penicilin, mezi léky další volby patří doxycyklin, ko-trimoxazol, ampicilin a další. Vankomycin je rezervní, zatím stoprocentně účinné atb (žádná zóna = chyba, nejde o streptokoka)

Léčba

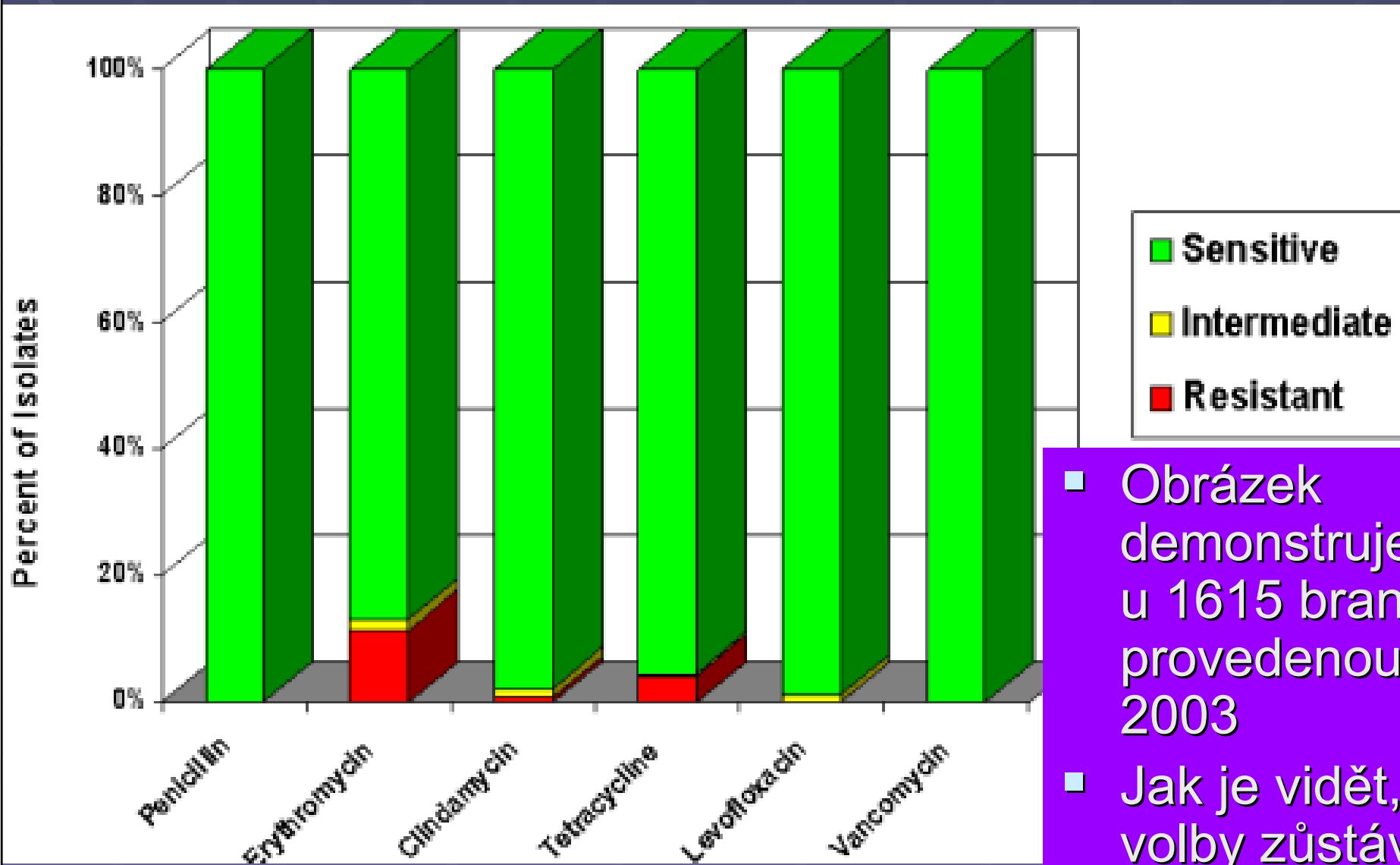
- Odečtete difusní diskový test – změřte zóny a porovnejte s referenčními zónami
- Opět: horší patogen (pyogenní streptokok) je citlivější než mírnější patogeny
- Také si všimněte, že testy jsou provedeny na MH agaru s krvinkami nebo na krevním agaru. Na prostém MH agaru totiž většina streptokoků roste špatně nebo vůbec.

Ovšem v diagnostice se to nedá využít, protože některé streptokoky vyrůst mohou!

Sada antibiotik na streptokoky

Antibiotikum	Zkratka	Referenč. zóna*
Penicilin (základní penic.)	P	28 mm
Cefalotin (cefalosp. 1. g.)	KF	18 mm
Erytromycin (makrolid)	E	23 mm
Klindamycin (linkosamid)	DA	19 mm
Chloramfenikol	C	21 mm
Doxycyklin (tetracyklin)	DO	19 mm
Vankomycin (glykopeptid)	VA	17 mm

Citlivost streptokoků na antibiotika



- Obrázek demonstruje studii u 1615 branců, provedenou v roce 2003
- Jak je vidět, lékem volby zůstává penicilin

Skandální zjištění !!!

Streptococcus pyogenes je ještě horší, než jste možná čekali

- Už víte, že *S. pyogenes* způsobuje angíny, spály, erysipel, flegmóny. To nejhorší však ještě čeká: I po té, co sám zmizí z organismu, může po něm zbýt děsivé dědictví! Protilátky proti němu kolují v krvi... a omylem se místo na streptokoky vážou na některé struktury organismu. Tím vzniká akutní glomerulonefritis či revmatická horečka.

Bystří studenti si vzpomněli, že už o tom slyšeli...

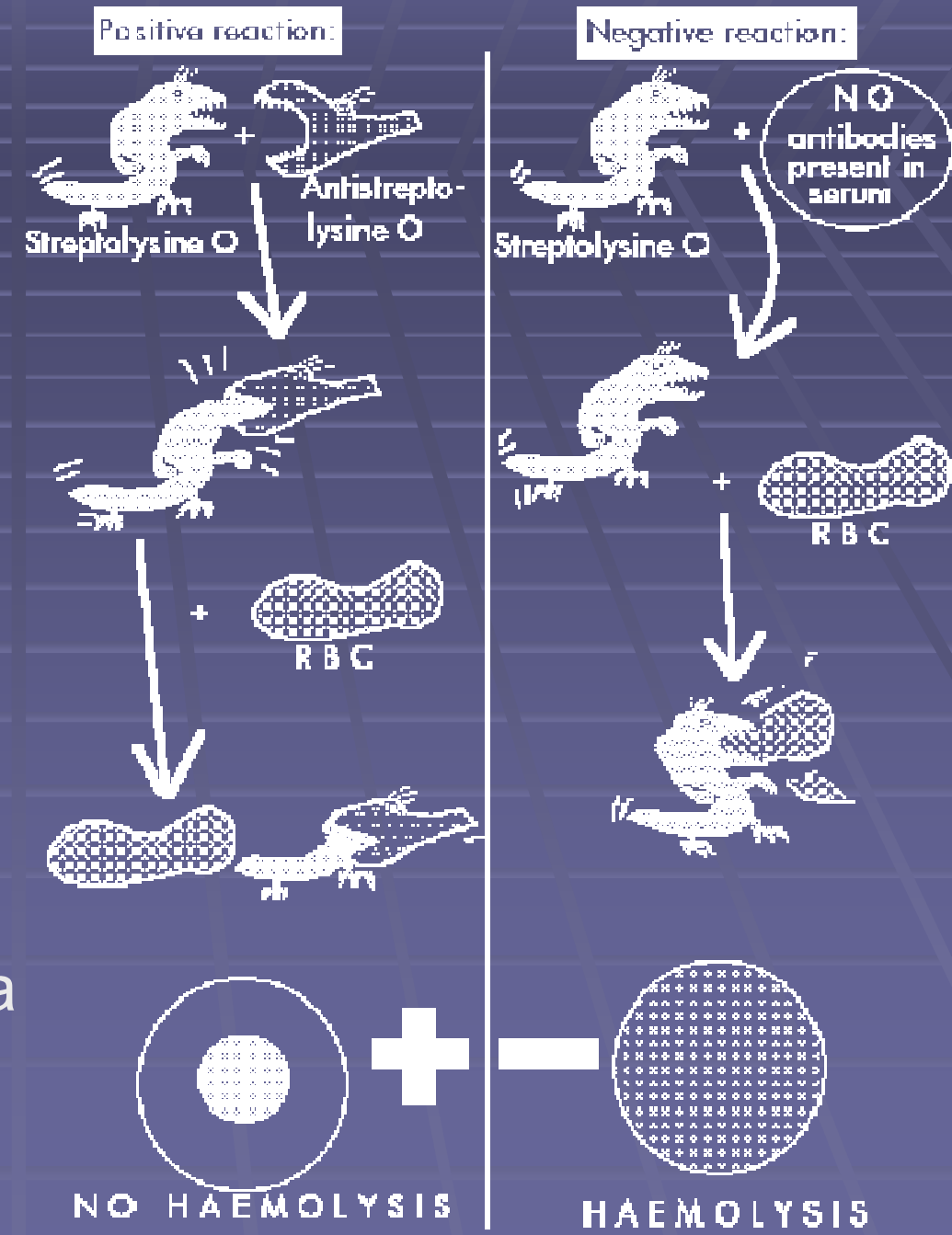
ASLO: způsob, jak zjistit, kolik protilátek vlastně v krvi koluje

- Pomocí testu ASLO zjistíte, zda je přítomna normální protilátková odpověď, nebo přemrštěná automimunita s rizikem vývoje glomerulonefritidy nebo revmatické horečky
- Test ASLO se provádí zpravidla po prodělané streptokokové infekci. Průkazem protilátky se nesnažíme prokázat infekci (o té víme), ale zjistit, zda dochází k vývoji autoimunity. Nejde tedy vlastně o nepřímý průkaz, přestože prokazujeme protilátky.

ASLO: princip (opakování)

- Protilátka blokuje hemolytický efekt toxinu (streptolysinu O) na krvinku.
- U ASLO neužíváme geometrickou řadu. Hodnoty ředění jsou na lístečku.
- Titr nad cca 250 znamená možnost autoimunitní odpovědi
- Všimněte si, že v angličtině se ASLO označuje jako ASO. Zrada je, že zkratka ASLO přitom také existuje a označuje stafylolysin.

Detection of ASO



ASLO

- Pozor! Každý pacient jen jeden řádek, hodnoty ředění jsou uvedeny na lístečcích, které máte na stole a zde:

Hodnocení výsledků ASLO

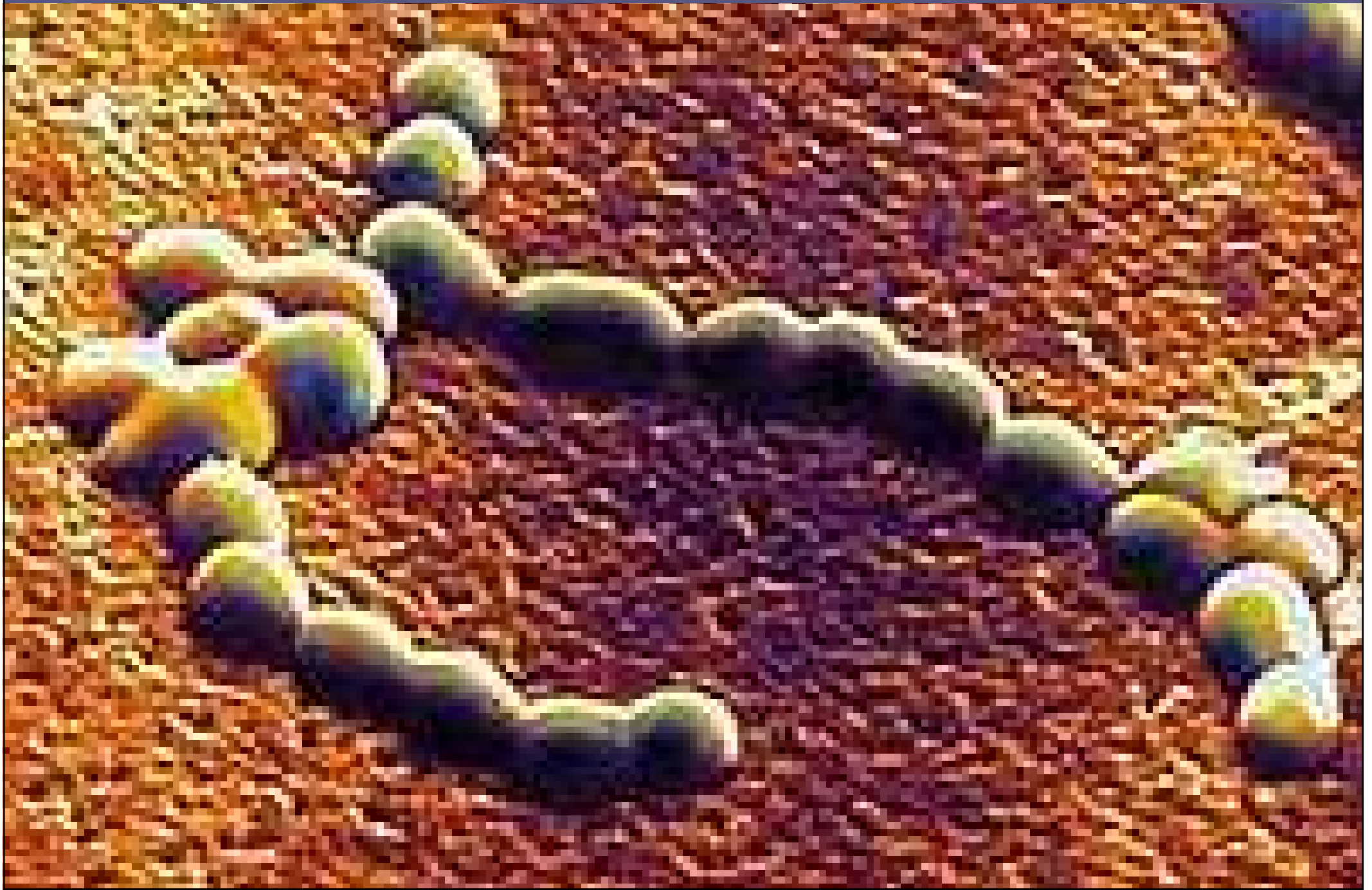
řádek	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
hodnota (ml)	100	120	150	180	225	270	337	405	506	607	759	911

- Panel se odečítá naležato. Obsahuje pozitivní kontrolu a sedm pacientů.

Jiné kataláza negativní koky

- Existují koky podobné streptokokům, které se výjimečně mohou nalézat v případech lidských onemocnění. Mnohé z nich provozují mléčné kvašení, a proto se jim říká mléčné koky. Patří sem zejména roky *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Aerococcus*, *Gemella*, *Globicatella* a *Facklamia*. Druh *Facklamia sourekii* byl pojmenován po českém mikrobiologovi Jiřím Šourkovi.

3. Enterokoky

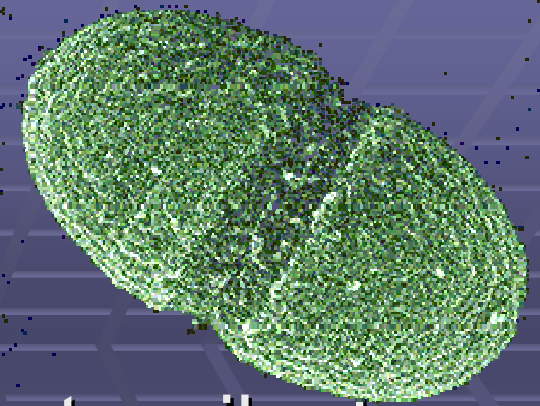


Příběh

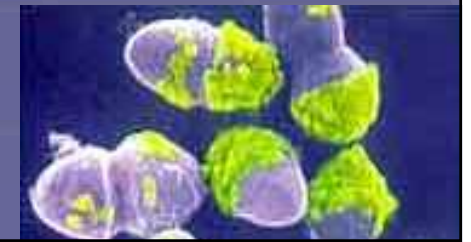


- Lucinka chodí do školky. Před dvěma týdny si maminka všimla, že chodí nějak často na záchod, a také se jí svěřila, že když se chce vyčurat, tak jí to bolí. Pan doktor na středisku jí předepsal Zinnat, ale potíže se nezlepšily. Při další návštěvě tedy nechal Lucinku vyčurat do „šampusky“ a moč poslal na mikrobiologii. Přišlo mu ale, že výsledek nelze hodnotit, neboť moč je kontaminovaná. Nakonec se přece jen podařilo moč odebrat asepticky a podle výsledku změnit terapii.

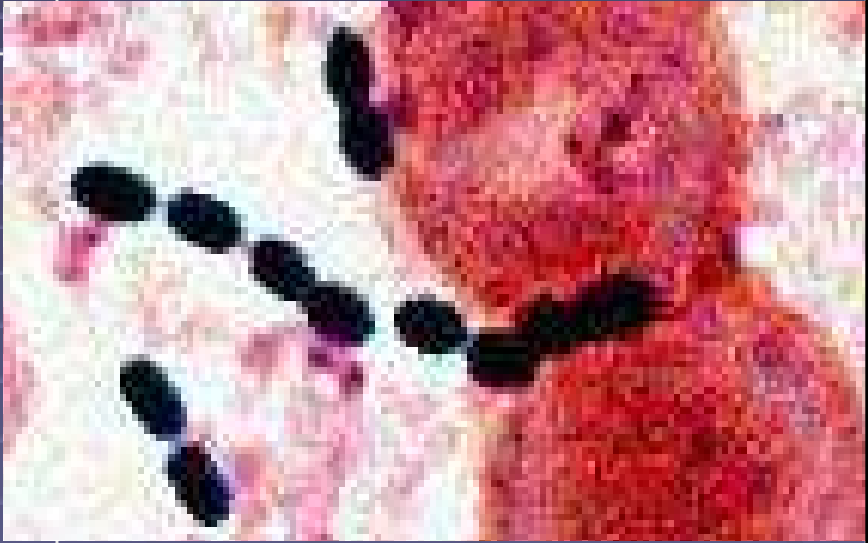
Pátráme po pachateli



- Vinen je *Enterococcus faecalis*
- Jak napovídá rodové i druhové jméno, je to mikrob normálně se vyskytující ve střevě. Je ale také jedním z nejběžnějších původců močových infekcí
- Viníkem je ovšem i lékař – předepsal antibiotika bez kultivace moče; bohužel, enterokoky jsou na všechna cefalosporinová antibiotika primárně rezistentní. Navíc podcenil aseptický odběr moče.
- Možná něco zanedbala i maminka, pokud Lucinku nenaučila dobře (a odpředu dozadu) se utírat po záchodě



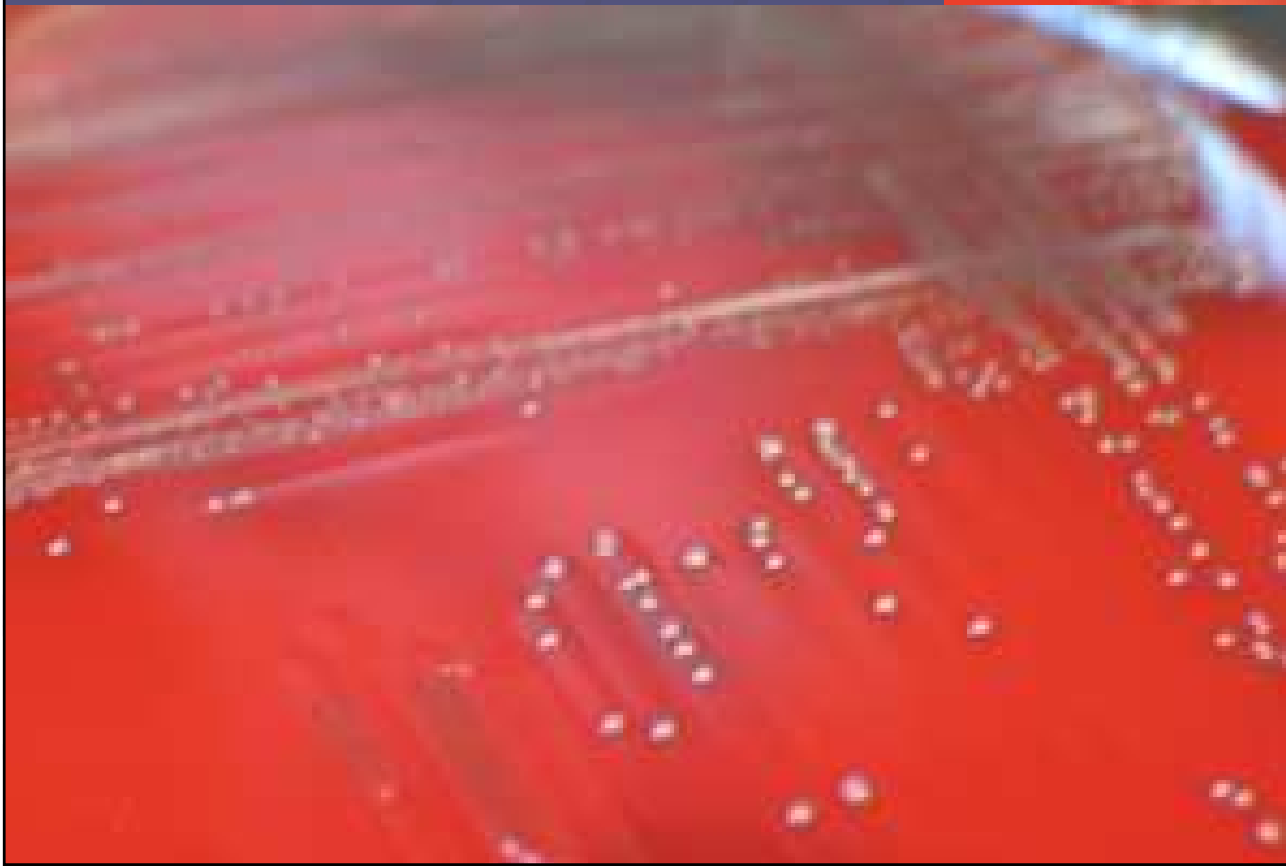
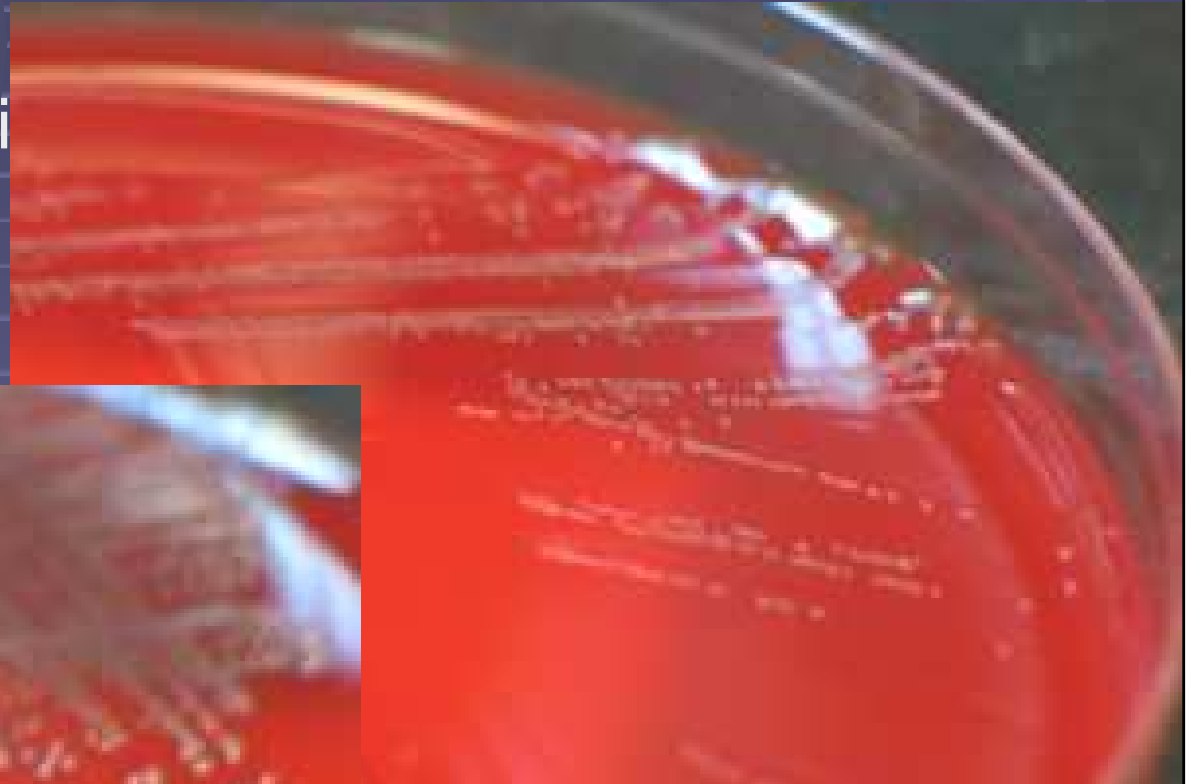
Enterokok - popis

	Enterokok	
Mikroskopie	G+ koky v. krátkých řetízcích	
Kultivace	<p>Kolonie šedavé, velké asi jako <i>Str. agalactiae</i>, většinou bez hemolýzy, ale i s viridací či hemolýzou.</p> <p>Rostou na KA i MH, také na Slanetz-Bartleyho a žluč-eskulinové půdě.</p>	<p>Rozlišení biochemicky, zejména arabinózovým testem*. Testy citlivosti na antibiotika lze provádět normálně.</p>

E. faecalis – zelený – negativní; *E. faecium* – žlutý - pozitivní

Enterokoky – vzhled kolonií

vpravo varianta s drobnějšími koloniemi – klonální kmen patřící mezi VRE



Arabinózový test

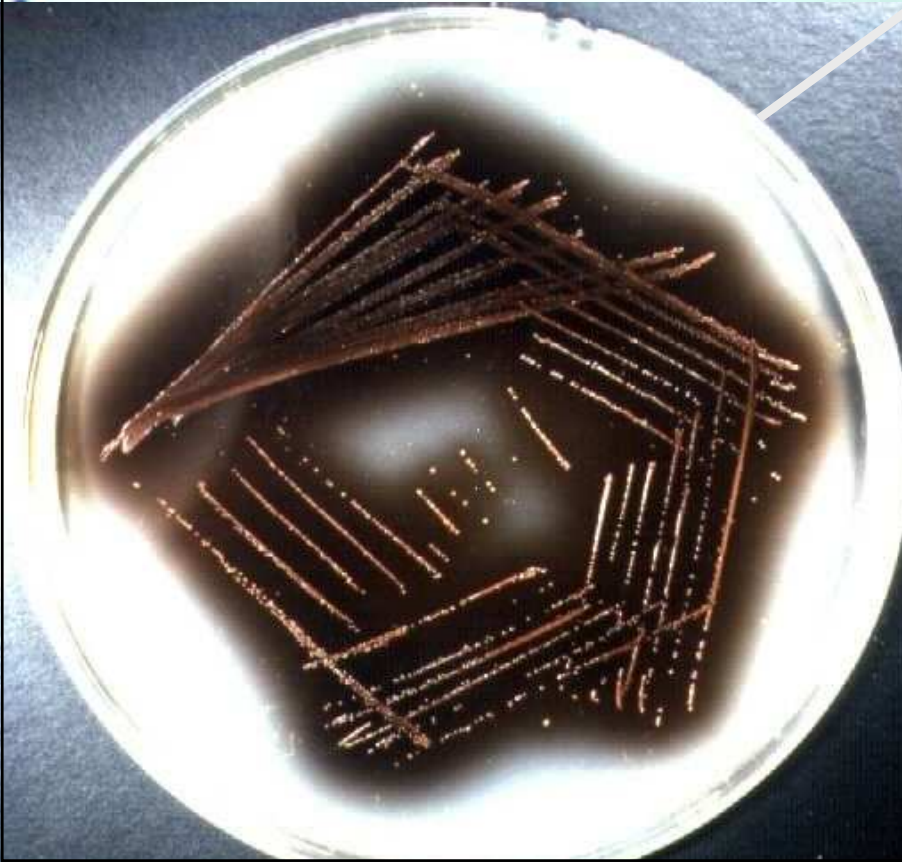
- Biochemické testy: kataláza negativní, možné je biochemické rozlišení, důležité štěpení arabinosy (*E. faecalis* neštěpí, půda je zelená, *E. faecium* štěpí, žlutne)
- Antigenní analýza se zpravidla nepoužívá. V dobách, kdy patřily mezi streptokoky, je Lancefieldová zařadila do antigenní skupiny D, spolu s některými streptokoky
- Citlivost lze testovat na běžném MH agaru. Existují i půdy na skríníng VRE (viz dále)

Enterokoky

Mikroskopie

Žluč-eskulin

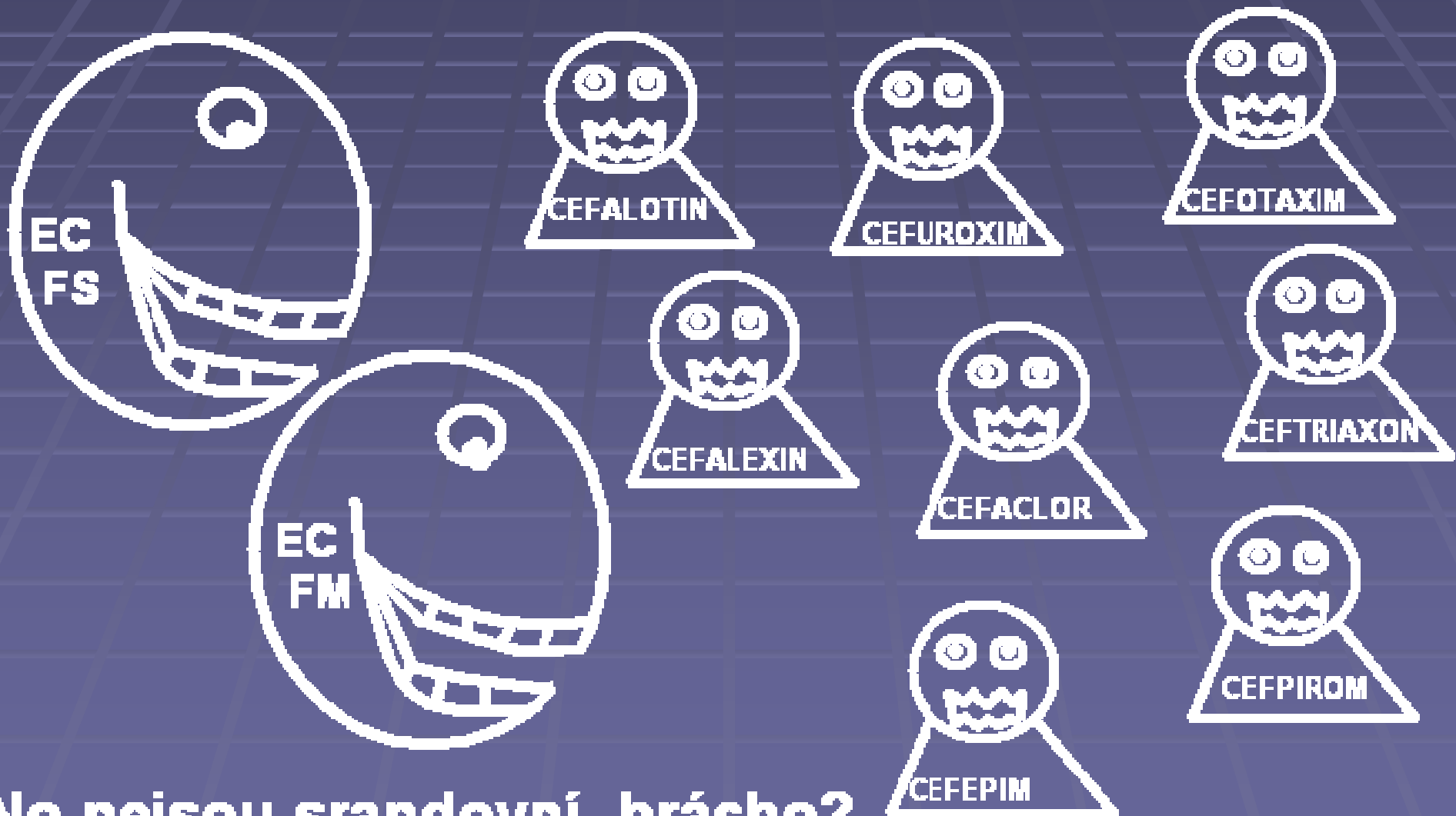
Slanetz-Bartley



Léčba

- Na enterokoky neplatí cefalosporiny. U *E. faecalis* je výhodný ampicilin, u *E. faecium* je primární rezistence. Dále se používá ko-trimoxazol, doxycyklin, jako rezerva vankomycin. V poslední době se zejména u hematologických pacientů objevují epidemiologicky závažné vankomycin rezistentní kmeny – VRE. Zde zabírá pouze nové antibiotikum – linezolid

Takhle dopadá snaha vyzrát na enterokoka cefalosporinem...



No nejsou srandovní, brácho?

4. Tyčinky

A scanning electron micrograph (SEM) showing a dense population of Listeria monocytogenes bacteria. The bacteria are rod-shaped, with some appearing as single cells and others as short chains. They are distributed across the entire field of view, with a concentration of longer, more prominent rods in the center and upper half. The background is dark, making the lighter-colored bacterial structures stand out.

- *Listeria monocytogenes*

Příběh první

- Evropský komisař zachmuřeně hleděl na kupu stížností. Francouzští zemědělci protestují proti několika státům EU, které brání dovozu delikatesních francouzských sýrů na jejich území.
- Německé úřady zákaz dovozu zdůvodňují tím, že těhotná paní Hildegarda Messerschmidtová po požití sýra pozorovala zvětšené mízní uzliny a nakonec její dítě trpělo těžkou listeriovou infekcí.



Kdo za to tentokrát může



- Bakterie *Listeria monocytogenes* je grampozitivní tyčinka, která se vyznačuje schopností růst při nízkých teplotách a vysokých koncentracích NaCl, což je oboje splněno např. ve skladech sýrů
- Málokdy vyvolává viditelné infekce dospělých, snad s výjimkou uzlinového syndromu. Je však nebezpečná pro těhotné
- Někdy se stává záminkou pro omezení dovozu – je samozřejmě vždy otázkou pohledu, zda je omezení skutečně motivováno strachem o zdraví občanů, nebo snahou obejít ustanovení o volném trhu

Erysipelothrix rhusiopathiae

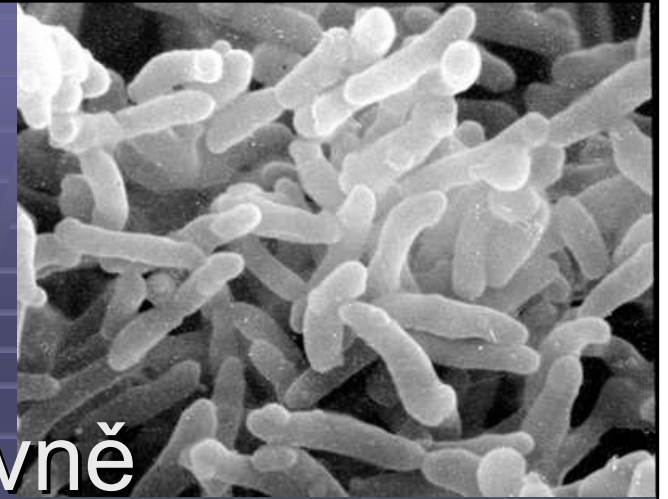
- Tato bakterie vyvolává u prasat chorobu, zvanou červenka.
- U lidí (zvláště chovatelů dobytka apod.) může vyvolat nemoc zvanou erysipeloid (na rozdíl od erysipelu, což je synonymum spály).
- Erysipeloid se může projevovat infekcemi ran, ale bakterie může člověka infikovat i bezpříznakově

Příběh druhý



- Pan Bércoun je diabetik, chronický pacient, nyní léčen pro bérkové vředy. Bohužel, infekce střídá infekci. Před půlrokem byla usvědčena *Escherichia coli*, před dvěma měsíci zase *Enterococcus faecium*, blízký příbuzný enterokoka *Enterococcus faecalis*. Lékaři jsou zvědaví, co se z bérkového vředu pana Bércouna vykultivuje tentokrát.

A už to vědí: viníkem je nyní



- *Corynebacterium jejkeium*, relativně nejobávanější ze skupiny tzv. nedifterických (= nezáškrťových) korynebakterií. Původně se mu říkalo „korynebakterium skupiny JK“.
- Korynebakteria jsou grampozitivní tyčinky kyjovitého tvaru (koryné = kyj), některá jsou pleomorfní (různotvará), popřípadě i nekonstantně probarvená.
- Do stejného rodu patří i původce záškrty, dnes díky očkování u nás vzácný – *C. diphtheriae*.

Co ještě vědět o korynebakteriích

- Jsou normální součástí běžné flóry na kůži, spolu se stafylokoky a kvasinkami
- V mikroskopii se vyznačují palisádovým uspořádáním – název dle raně středověkého kúlového opevnění



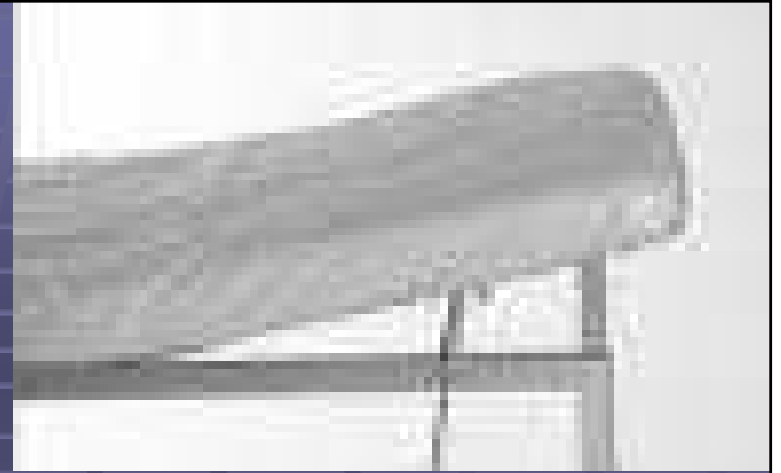
Záškrť



Koryneformní tyčinky

- Někdy se v praxi používá pojem „koryneformní tyčinky“, nebo také „difteroidy“. Označuje bakterie podobné korynebakteriím
- Kromě vlastního rodu *Corynebacterium* sem patří rod *Arcanobacterium* (vzácně způsobuje angíny), *Dermatophilus*, *Turicella* a několik dalších

Příběh třetí



- Sestřička Blaženka se zděsila: přišly výsledky stěrů z nemocničných lůžek, které před týdnem odebírali pracovníci nemocniční epidemiologie. A skoro v polovině stěrů se našly nějaké bakterie, dokonce BACILY! No ano, tady to je – *Bacillus* sp. Sestřička Blaženka, chudinka ubohá, se celou noc trápila a špatně spala. Ráno zavolala na mikrobiologii a ptala se, cože je to za bakterii...

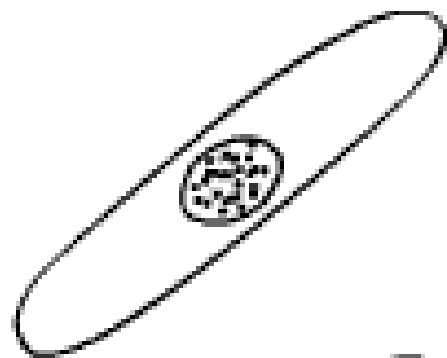
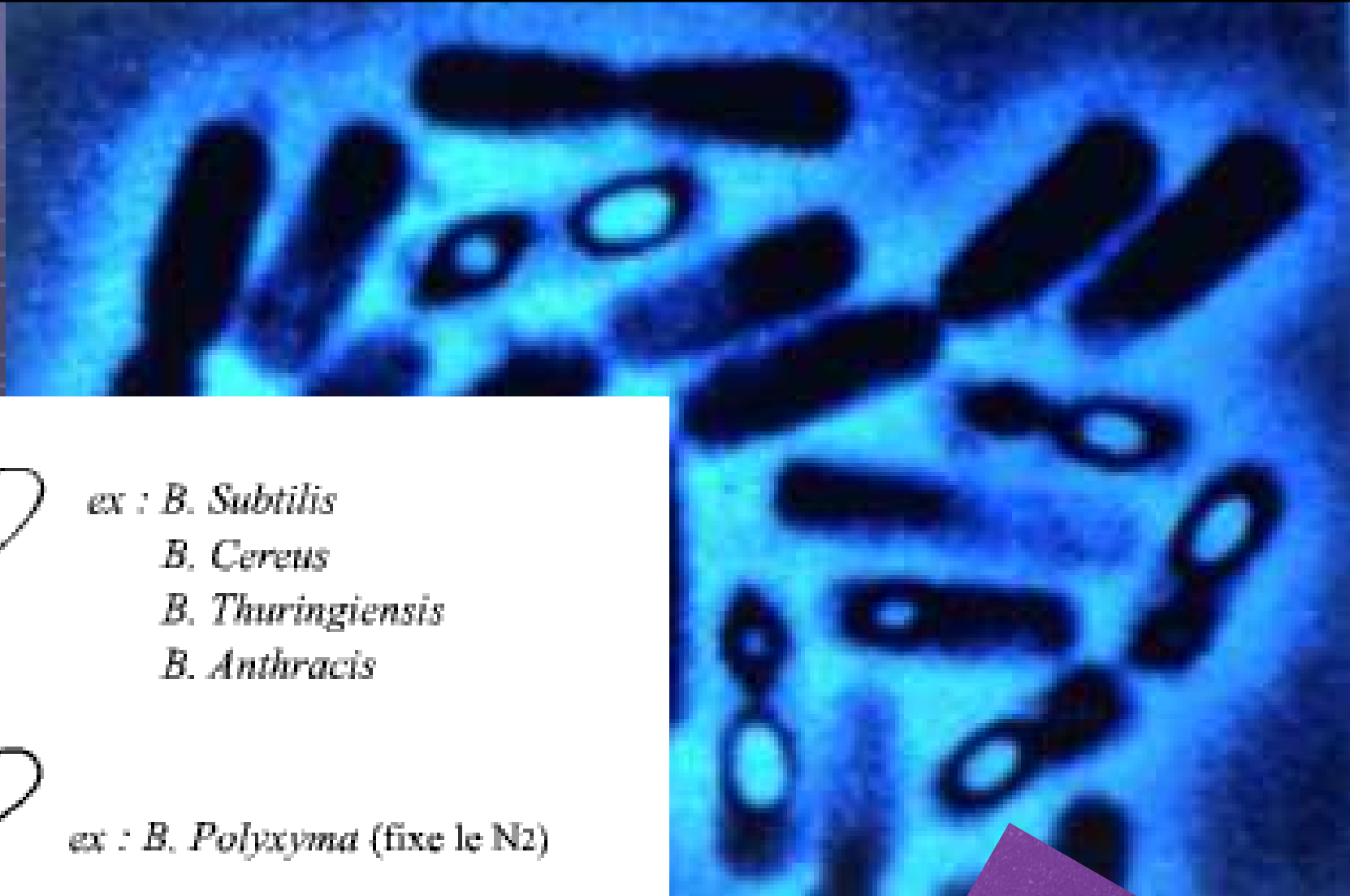
Mlýnský kámen spadl z dobrého srdíčka sestry Blaženky

- když se dozvěděla, že většina příslušníků rodu *Bacillus* jsou neškodné mikroby, vyskytující se ve vnějším prostředí. Pokud se vyskytnou v kultivaci klinického vzorku, jde pravděpodobně o kontaminaci. Bacily tedy nejsou ve stěrech z lůžka závažným nálezem. Problém by byl jen tehdy, pokud by byly prokázány ve stěru z plochy, která má být sterilní (např. operační pole po dezinfekci)

Není bacil jako Bacil! Například „Bacil“ na www.pismak.cz je známý as. Zahradníček ☺

Bacily, které stojí za zmínku

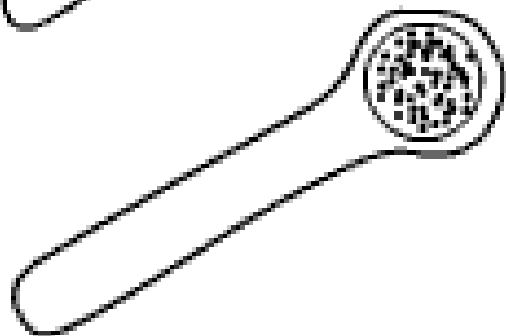
- *Bacillus anthracis* se stal velice populárním při teroristických hrozbách poslední doby. Jinak coby původce veterinárního onemocnění – uhláku – byl jednou z prvních nákaz, proti nimž byla zkoušena (již Pasteurem) vakcinace.
- *Bacillus cereus* je původcem alimentárních intoxikací z obilných produktů.
- *Bacillus stearothermophilus* a *Bacillus subtilis* se vzhledem ke své schopnosti přežívat při velmi vysokých teplotách používají jako indikátory účinnosti sterilizátorů



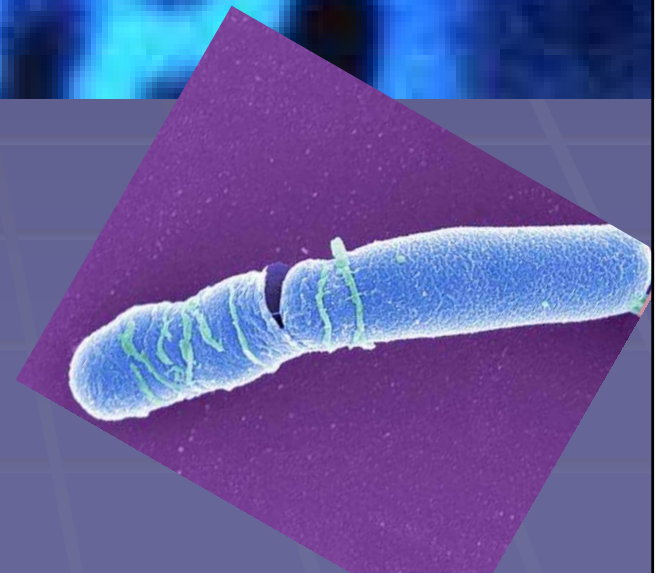
ex : *B. Subtilis*
B. Cereus
B. Thuringiensis
B. Anthracis



ex : *B. Polycyama* (fixe le N₂)



ex : *B. Pasteurii* (dégrade l'Urée)



Popis pachatelů

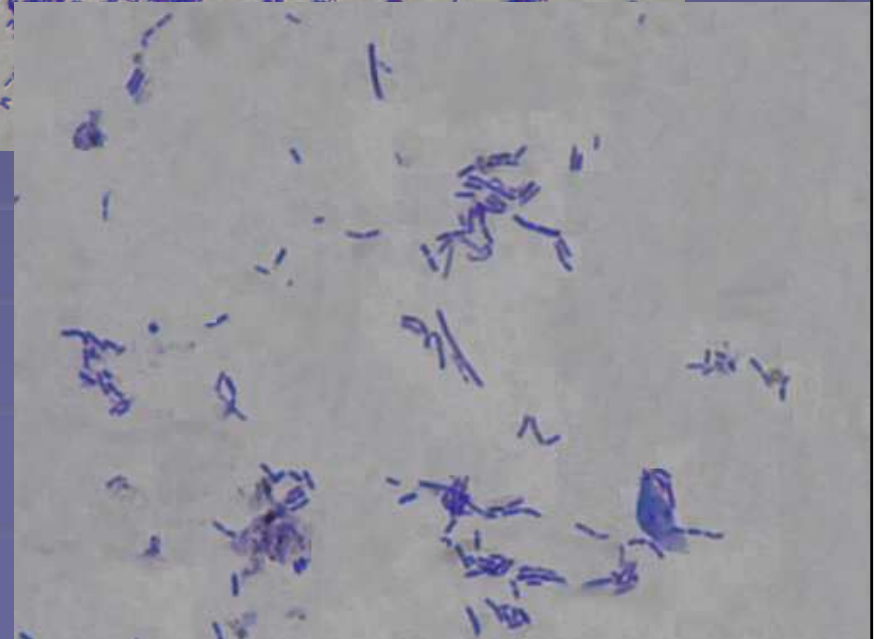
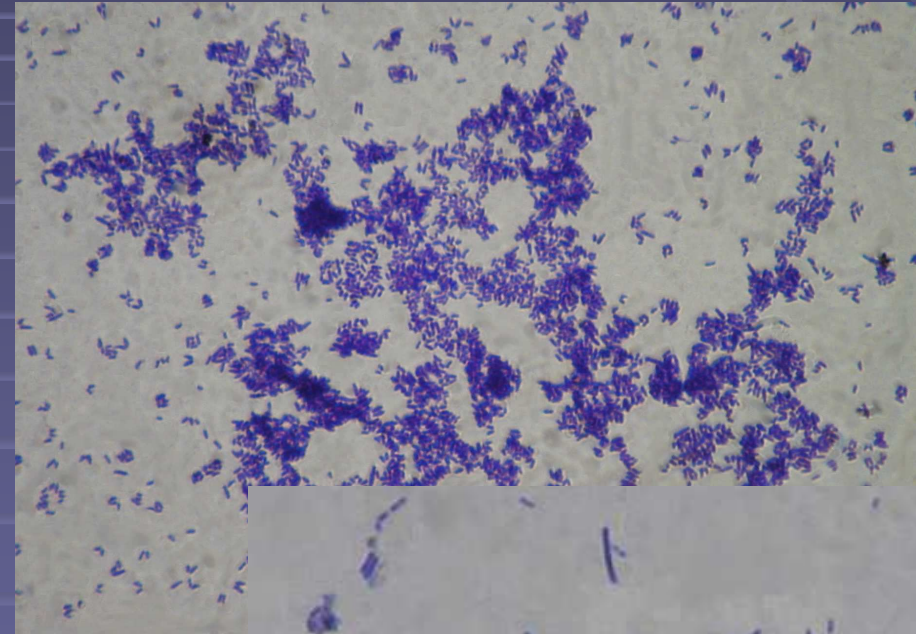
	Listerie	Koryneb.	Bacillus
Mikroskopie	G+ tyčinky řetězíci se jako špekáčky	G+ tyčinky skládající se vedle sebe (palisády)	G+ robustní tyčinky, sporulující (nemusí být viditelné)
Kultivace	podobné entero- kokům, hemolýza je či není	velmi drobné kolonie podobné mouce	plst'ovité kolonie, někdy i výrazná hemolýza

Fotografie z databáze zločinců

Tyčinky I

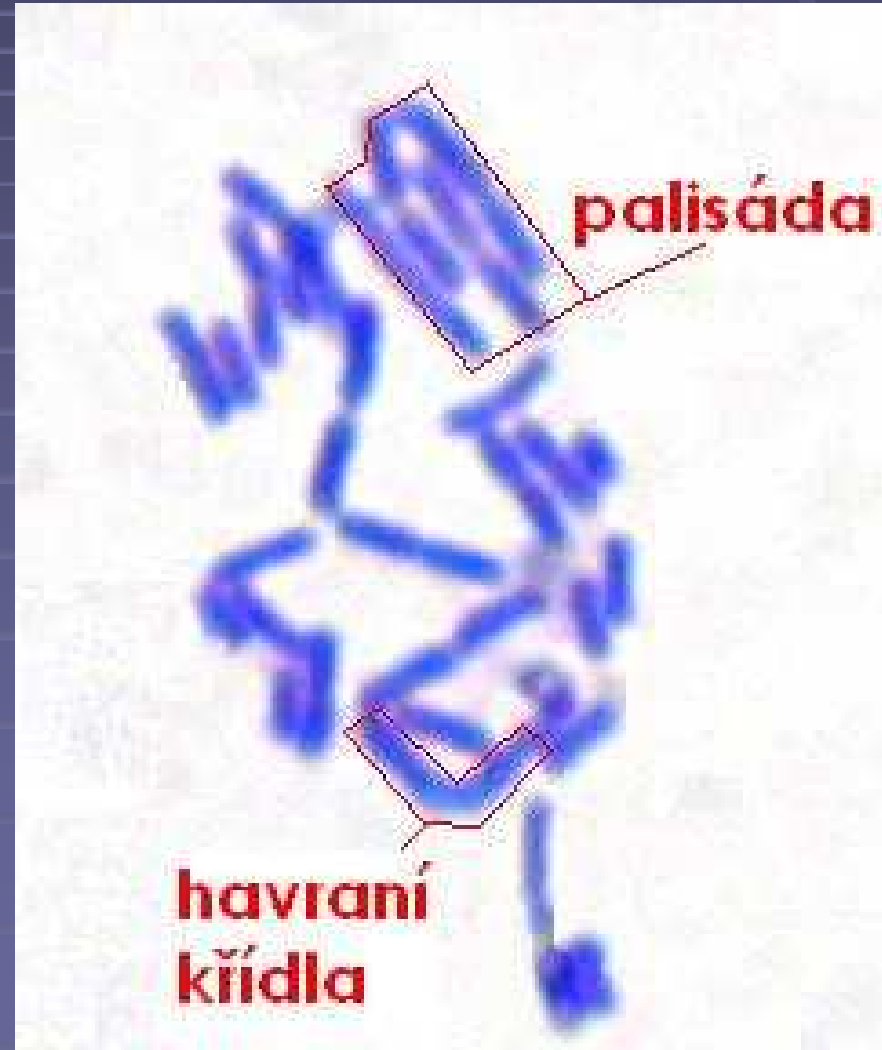
Corynebacterium Gram

Listeria – KA, gram



Fotografie z databáze zločinců

Tyčinky I – korynebakteria, tvary



Fotografie z databáze zločinců

Tyčinky III

Bacillus
cereus

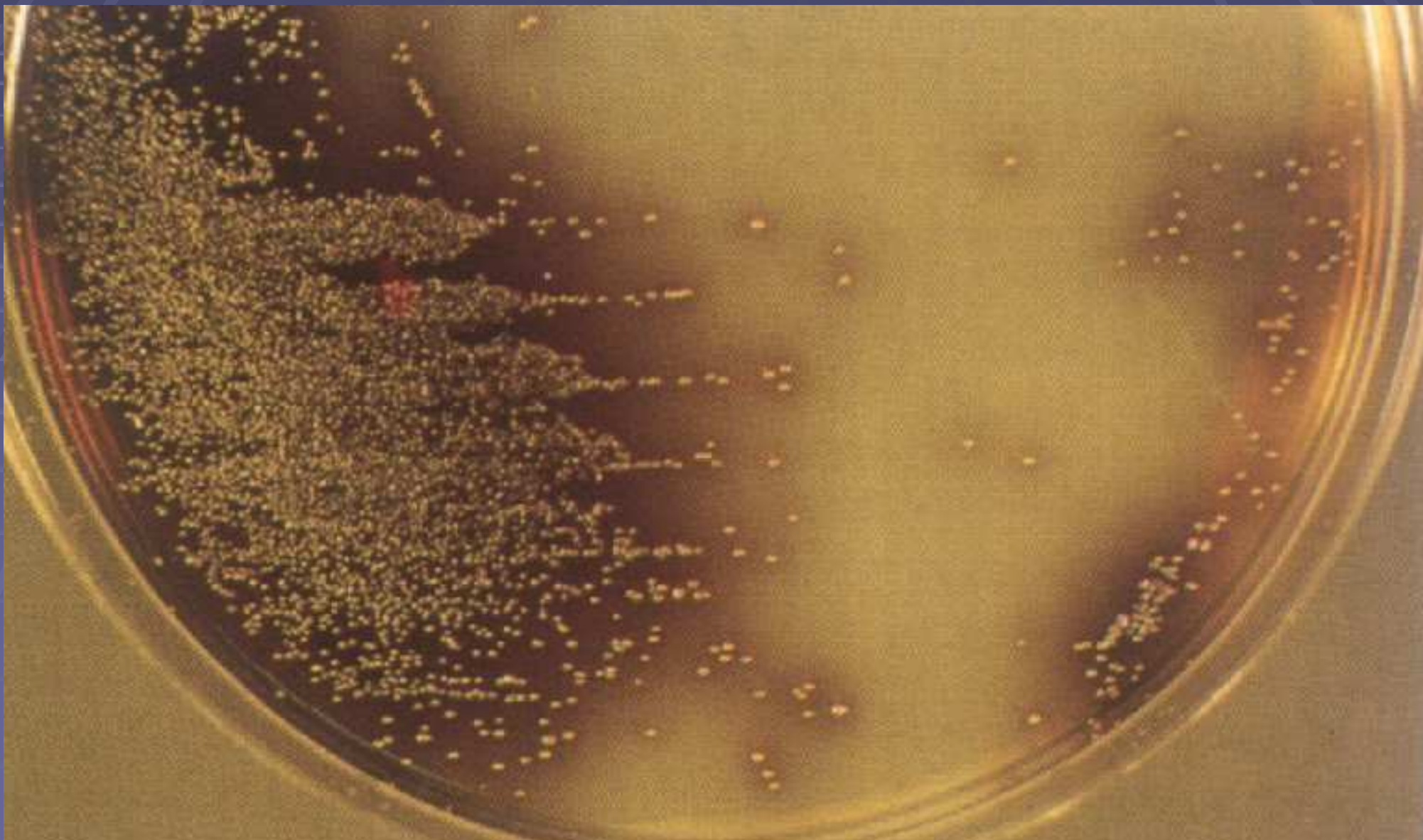


*Arcanobacterium
haemolyticum*

Bacillus subtilis

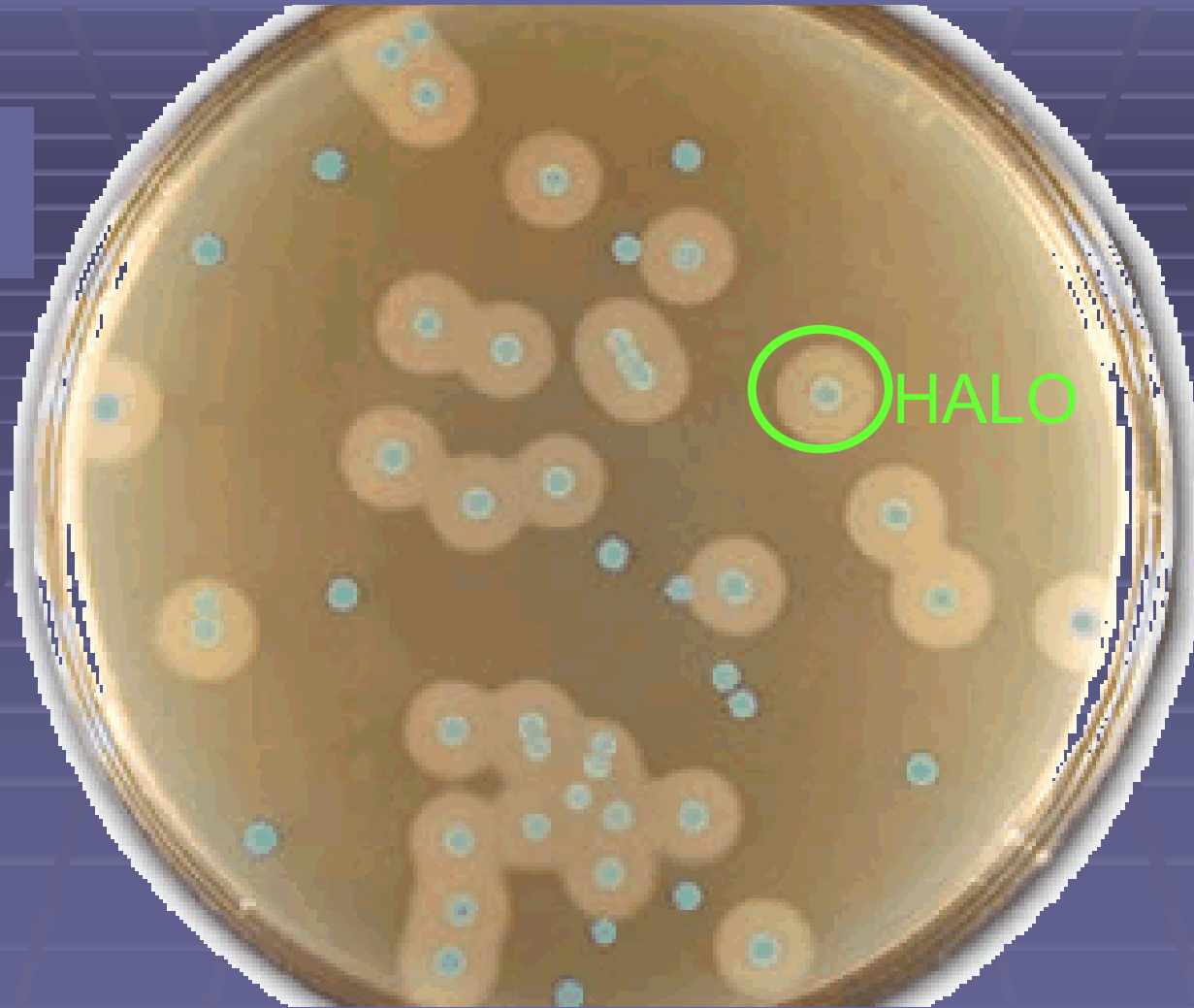


Žluč-eskulinový agar



Chromogenní půda na listerie

ALOA



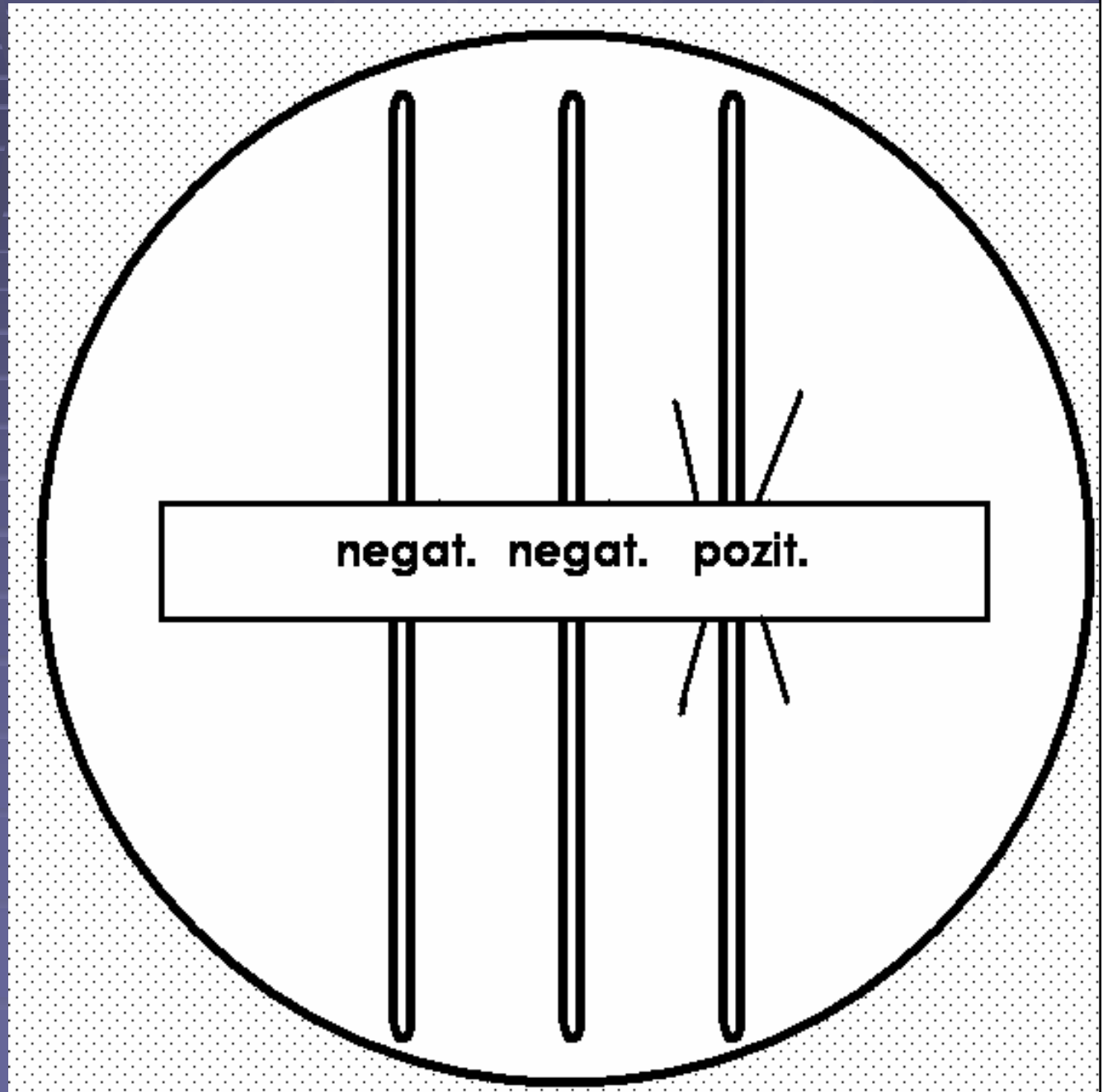
Existují různé chromogenní půdy k diagnostice listerií. Ta, která je na obrázku, se vyznačuje modrým zbarvením všech listerií; patogenní druhy navíc mají kolem sebe halo (odlišně zbarvené okolí kolonie).

Léčba

- Na listerie neplatí cefalosporiny. Jinak se zpravidla u listerií i korynebakterií používá sestava antibiotik podobná sestavám pro streptokoky a enterokoky. Raději přitom testujeme na MH agaru s krvinkami.
- Bacily se pochopitelně zpravidla netestují

Elekův test

- Je to test na průkaz toxinu záškrtového korynebakteria. Toxin je prokázán pomocí specifické protilátky.



Vhodná antibiotika

Antibiotikum	Zkratka	Referenč. zóna
Ampicilin (rozšíř. penic.)	AMP	17 mm
Ko-amoxicilin (aminopnc*)	AMC	18 mm
Co-trimoxazol (směs 2)	SXT	16 mm
Doxycyklin (tetracyklin)	DO	15 mm
Chloramfenikol	C	21 mm
Vankomycin (glykopeptid)	VA	17 mm

*Aminopenicilin potencovaný inhibitorem betalaktamázy

Děkuji za pozornost

