

Lékařská mikrobiologie pro ZDRL

Týden 17:

Přehled grampozitivních bakterií

Ondřej Zahradníček
zahradnicek@fnusa.cz

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: *název z řeckého staphylé = hrozen*

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

Foto Ondřej Zahradníček



Základní charakteristika

- Stafylokoky patří **mezi klinicky nejvýznamnější G+ koky**. Jsou kataláza pozitivní. Jsou to koky cca 1 μm v průměru.
- Morfologicky jde o **koky ve shlucích**, shluky ale často není pořádně vidět, zvláště u nátěrů kmene (lepší je to u mikroskopie vzorku)
- Kdysi se rozlišoval jen ***Staphylococcus aureus*** (zlatý) a *S. albus* (bílý). Dnes je už známo asi padesát druhů stafylokoků, stále má ale význam rozlišovat „zlatého stafylokoka“ a ostatní, z nichž většina patří mezi tzv. **koaguláza negativní stafylokoky**

Klinická charakteristika

- Vyskytují se na **kůži člověka** i jiných živočichů
- Proto také snášejí **vyšší koncentrace soli** (musí umět snášet slaný pot)
- Všechny patří mezi **podmíněné patogeny**, ale patogenita zlatého stafylokoka je výrazně vyšší než patogenita ostatních
- **Zlatý stafylokok** způsobuje různé hnisavé záněty (více viz v dalším textu)
- **Ostatní stafylokoky** (většinou patřící mezi tzv. koaguláza negativní) se vyskytují jako běžná mikroflóra na kůži, v nose apod.; mohou ale způsobovat katetrové sepse či močové infekce

Přenos infekce

- Přenášejí se snadno **vzduchem**, dobře snášejí i vyschnutí
- Významný je **endogenní přenos** po zavedeném cévním nebo močovém katetru. V obou případech se na povrchu katetru vytváří biofilm. Je obtížné jej odstranit, zpravidla je nutná výměna katetru.
- U cévních katetrů takto vznikají **katetrové sepse – závažné nozokomiální infekce**

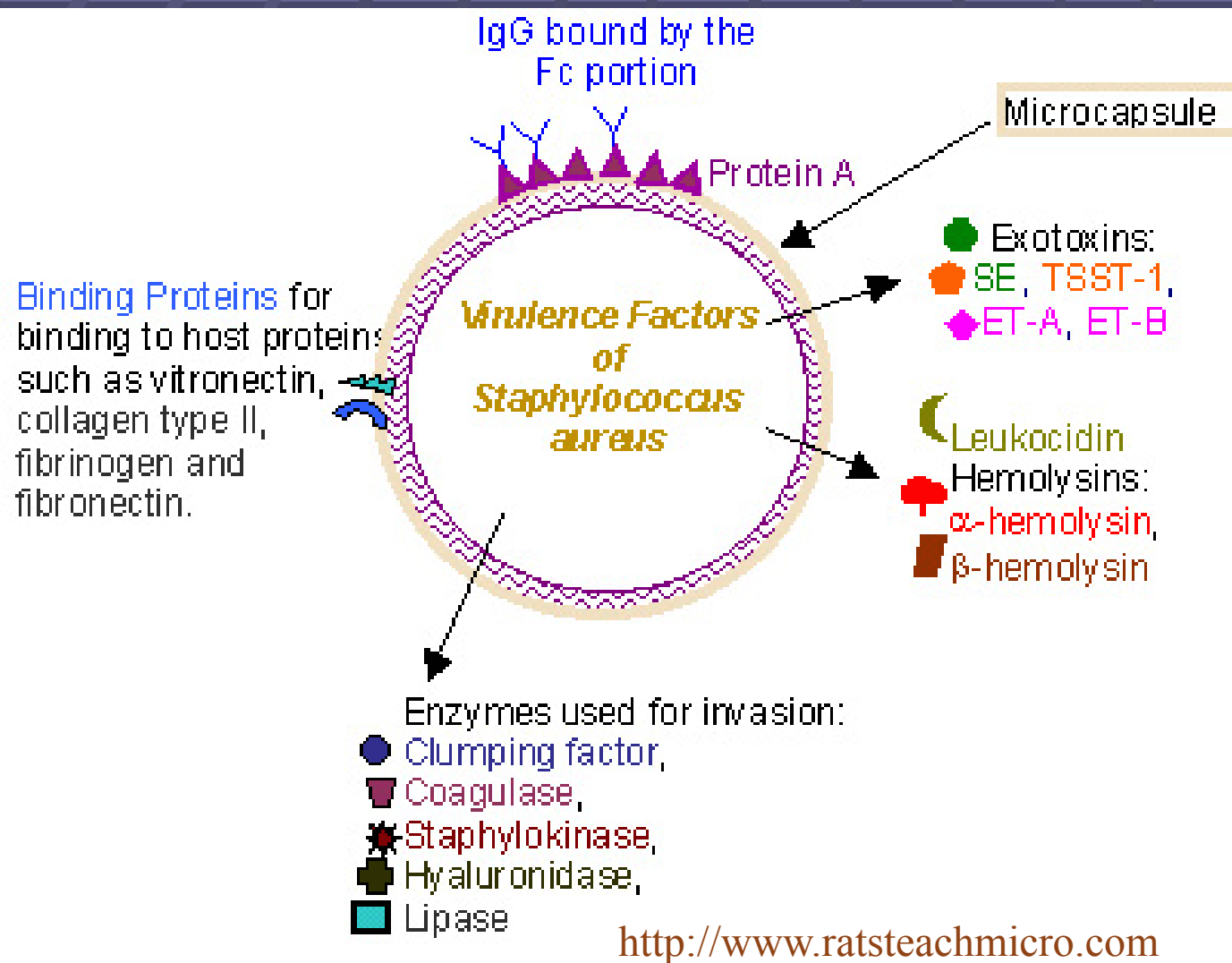
Léčba

- **Oxacilin** je lékem volby stafylokokových infekcí
- **Cefalosporiny I. generace** se místo oxacilinu používají u močových infekcí
- U infekcí kostí se kvůli průniku doporučují spíše **linkosamidová antibiotika**
- Pokud je kmen **rezistentní na oxacilin** (a také na zahraniční methicilin), je nutno použít některé účinné antibiotikum, např. **vankomycin** **nebo linezolid**. Kmenům zlatých stafylokoků takto rezistentním se říká **MRSA**, u koaguláza negativních (kde je tato rezistence mnohem běžnější) se někdy hovoří o MRSKN

Staphylococcus aureus (zlatý stafylokok)

- Jediný pro člověka běžně významný z tzv. koaguláza pozitivních stafylokoků
- Původce infekcí kůže, chlupů, nehtů, zevního zvukovodu, zánětů spojivek, infekcí HCD
- Někdy také původce abscesů ve tkáních
- Některé kmeny, vybavené určitými **nikoli běžnými** faktory virulence, způsobují závažné, ale vzácné choroby
- Na druhou stranu mikroba nalezneme i na kůži zcela zdravých osob

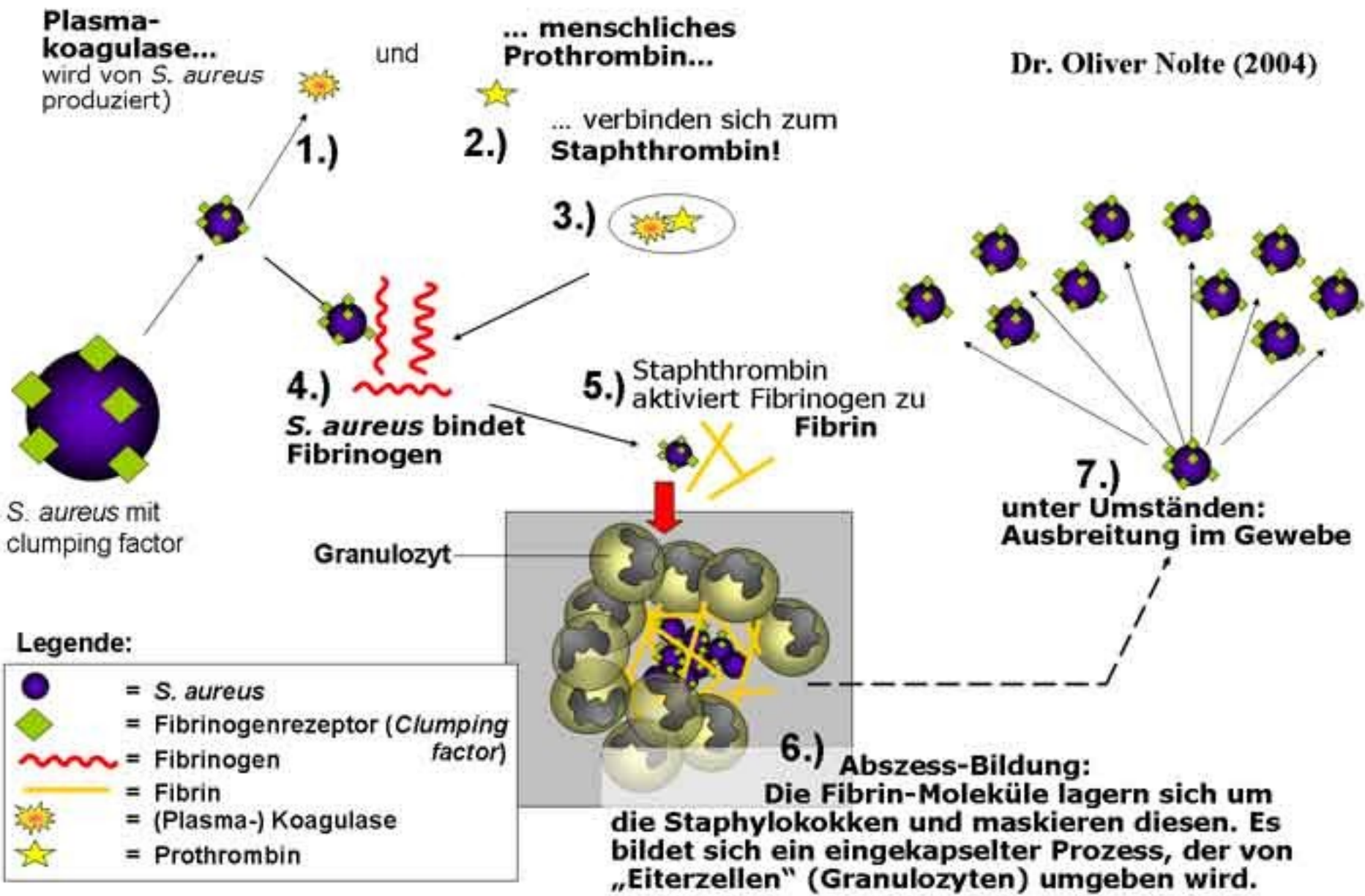
Faktorů virulence, nalézáných u *S. aureus*, je veliké množství...



...ale jen některé jsou přítomny u téměř 100 % kmenů; jiné jsou produkovány třeba jen jedním kmenem z tisíce!

Abscesy

- Na rozdíl od streptokoků, které vytvářejí ve tkáni zpravidla neopouzdrěné flegmóny, tvoří stafylokoky spíše opouzdrěné abscesy. Vznik abscesu (pomocí tzv. clumping faktoru a plasmakoagulázy – viz dále!) ukazuje následující schéma, převzaté z německých internetových stránek.



Příklady infekcí způsobených zlatým stafylokokem

Postižení kůže zvané impetigo...



...bulózní (puchýřnaté) impetigo...



...zánět
zevního
zvukovodu
(otitis externa)
s nežitím
(furunklem)...

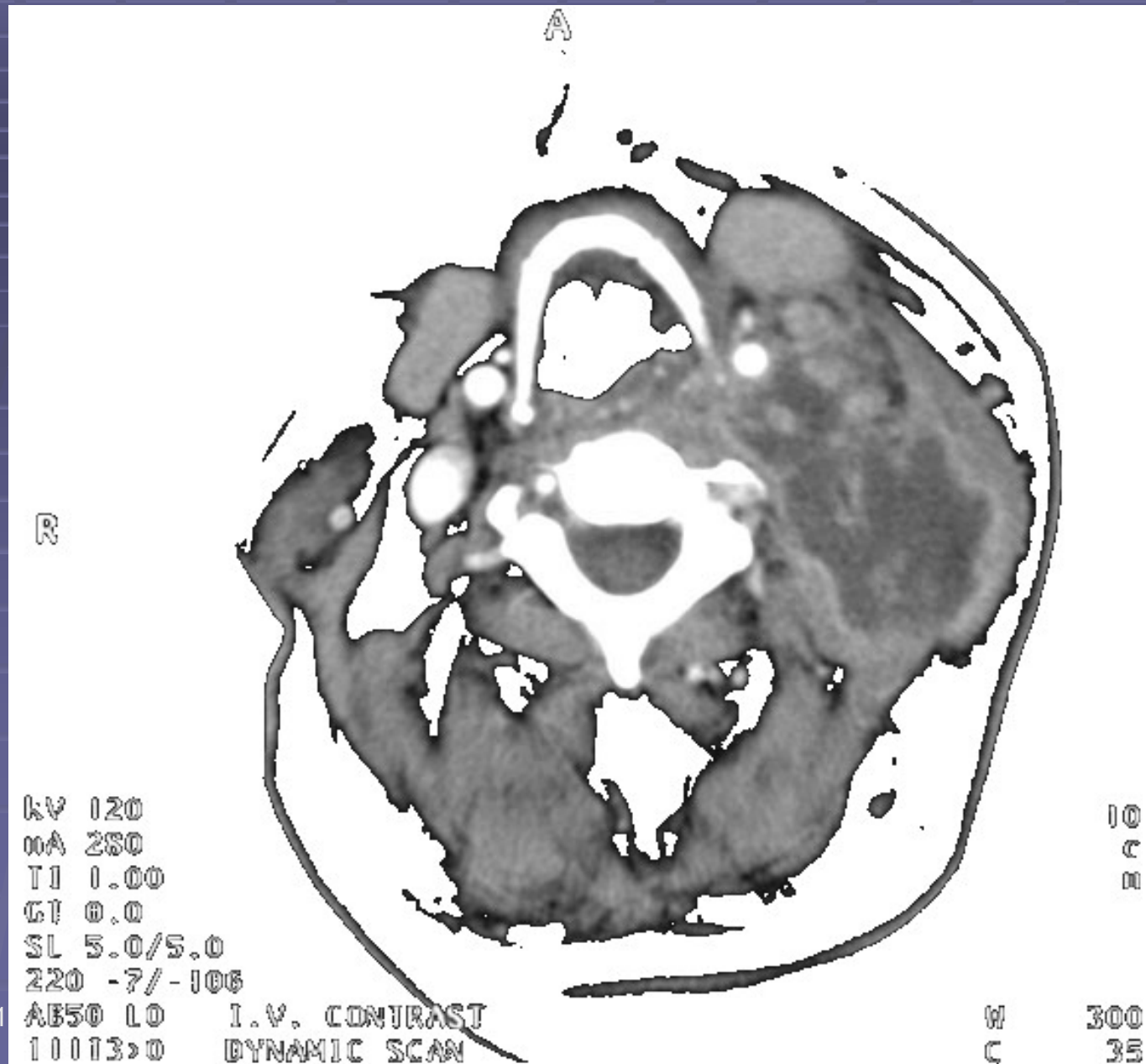


...či infekce kůže s krustami...

http://www.dermatology.co.uk/media/images/Infection_staphylococcus_crusting_chin_closeup.jpg



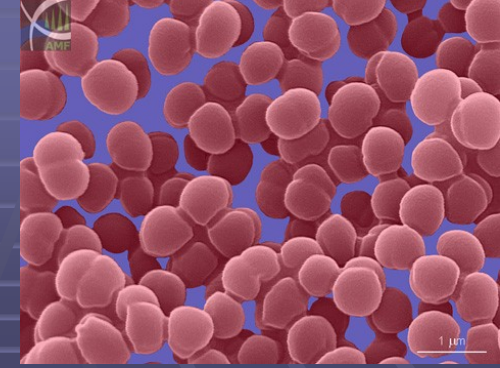
...ale také např. mozkové abscesy



Některé vzácné komplikace: 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...

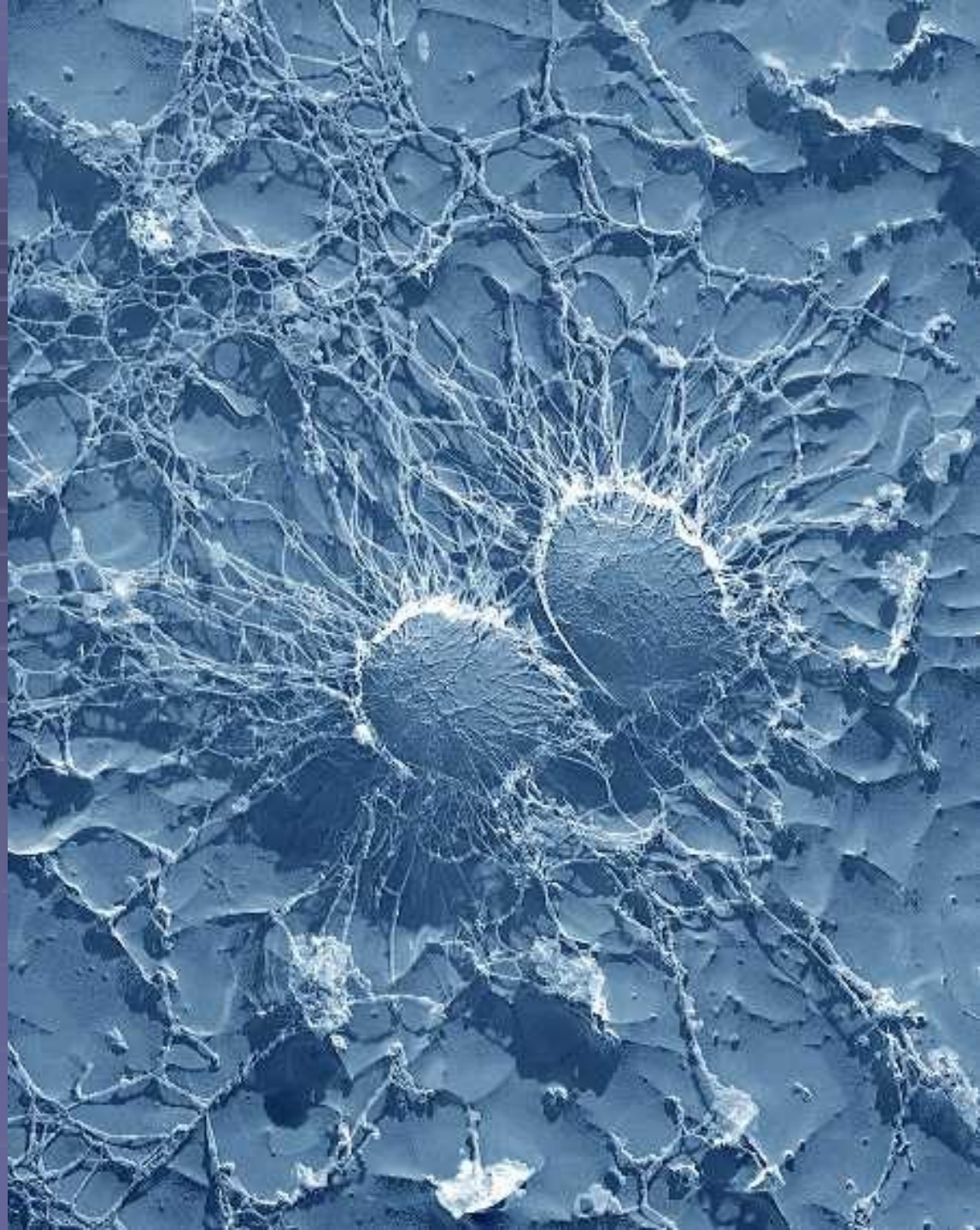


Rozbor případu

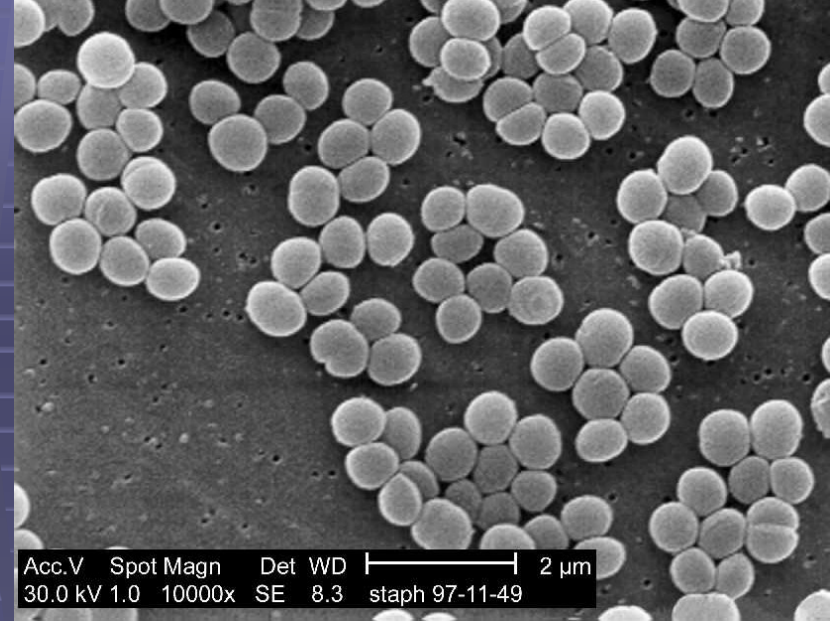
- Chorobu způsobil kmen zlatého stafylokoka *Staphylococcus aureus*. Tento „zlatý stafylokok“ s oblibou způsobuje hnisavé infekce kůže, chlupů, vousů apod.
- Některé kmeny (zřejmě i kmen z našeho příběhu) produkují enterotoxiny, které fungují jako tzv. superantigeny
- Intoxikace bakteriálním toxinem se, na rozdíl od střevní infekce, projeví velice rychle; obvykle také rychle odezní

Chybu udělala kuchařka, která nedodržela pravidla hygieny a nevšimla si puchýře!

- Desettisíckrát
zvětšený zlatý
stafylokok
v elektronovém
mikroskopu



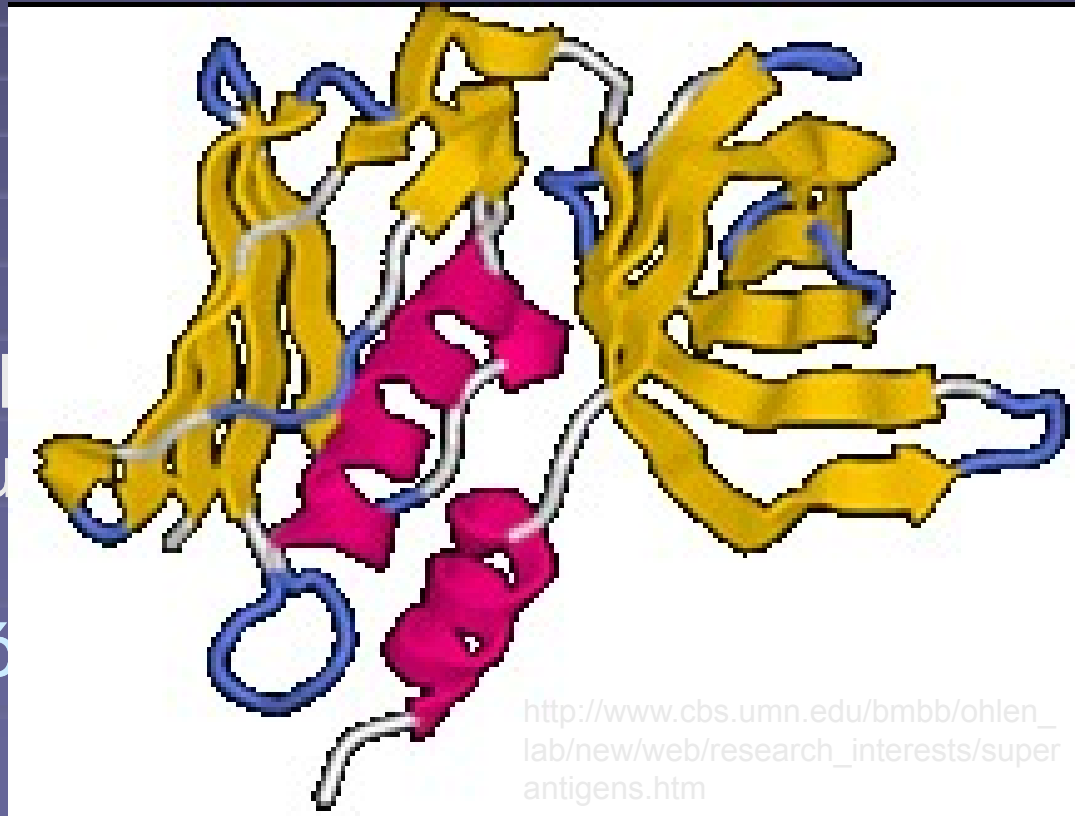
Příběh druhý



- Studentka P. Z. je nervózní: opět na ni přišly „její dny“. Naštěstí má ty zlevněné 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...

Rozbor příběhu: Syndrom toxického šoku

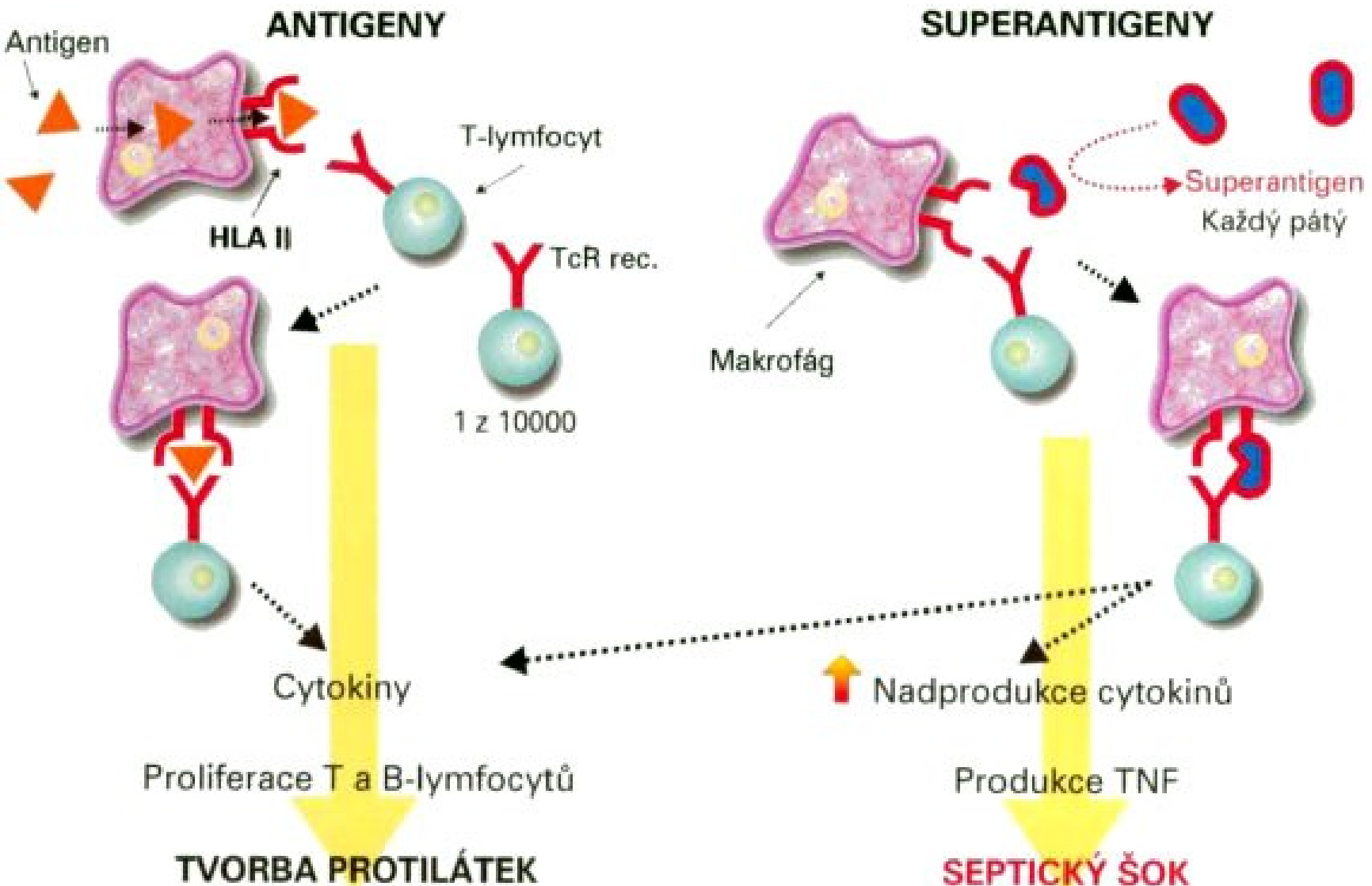
- *Staphylococcus aureus* může vzácně produkovat také toxin zvaný TSST-1 (toxin syndromu toxického šoku)
- Také tento toxin je superantigenem
- Způsobuje toxický šok, který typicky se vyskytuje u uživatelů menstruačních tampónů



http://www.cbs.umn.edu/bmbb/ohlen_lab/new/web/research_interests/superantigens.htm

Superantigeny

Imunitní odpověď



Koagulázanegativní stafylokoky

- Koaguláza negativní stafylokoky patří do stejného rodu jako zlatý stafylokok
- Jsou mnohem méně patogenní než on
- Nejběžnější je druh *Staphylococcus epidermidis*, dále jsou významné např. druhy *S. hominis*, *S. haemolyticus* a *S. saprophyticus*; celkem je dnes známo asi čtyřicet druhů a poddruhů

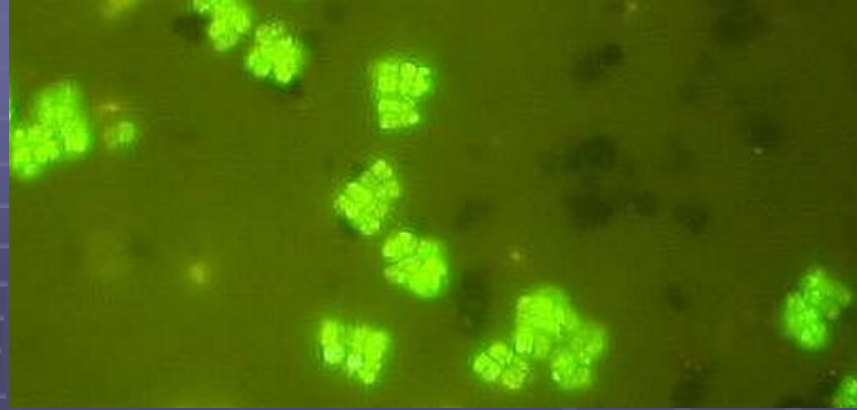
Proč říkáme koaguláza negativním stafylokokům koaguláza negativní? Dozvíte se za chvíli...

Koaguláza negativní stafylokoky

– klinický význam

- Jsou hlavní součástí běžné bakteriální mikroflóry kůže.
- Mohou být ale původci močových infekcí, případně i infekcí ran, katetrových sepsí aj.
- V poslední době jsou velice významnými původci infekcí u oslabených osob, zejména nemocničních
- Jejich nálezy se tedy hodnotí jinak např. ve výtěru v nosu či ve stolici, jinak v moči, a zcela jinak v hemokultuře.

Příběh třetí

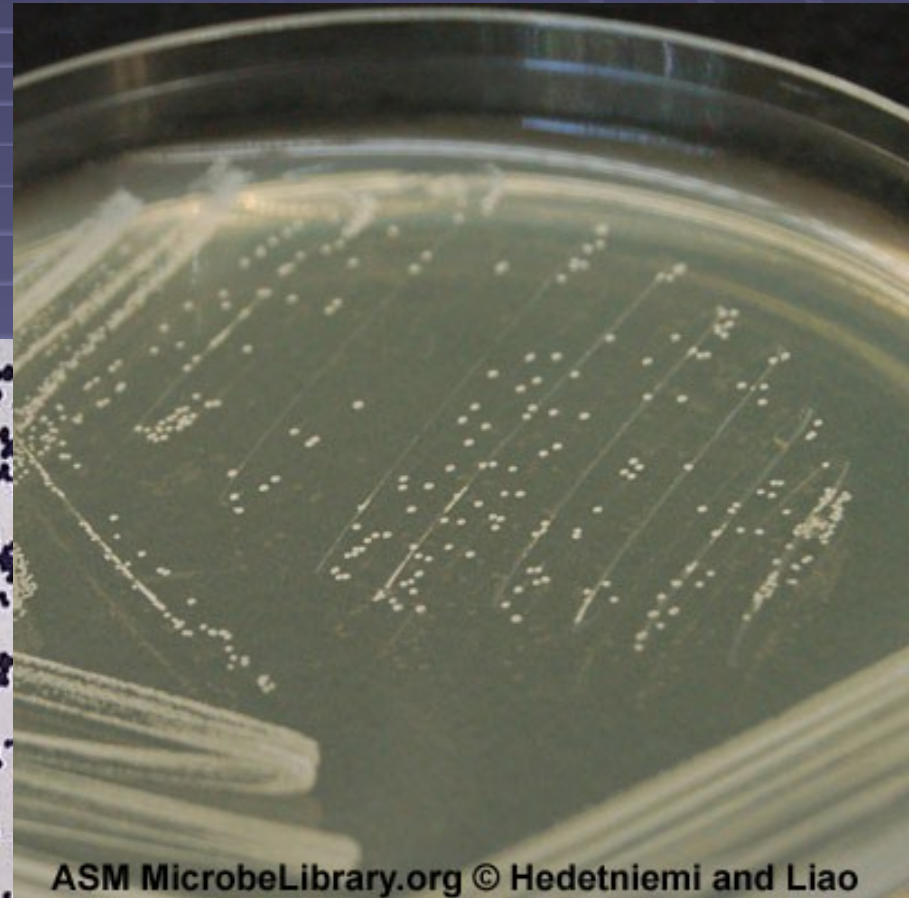
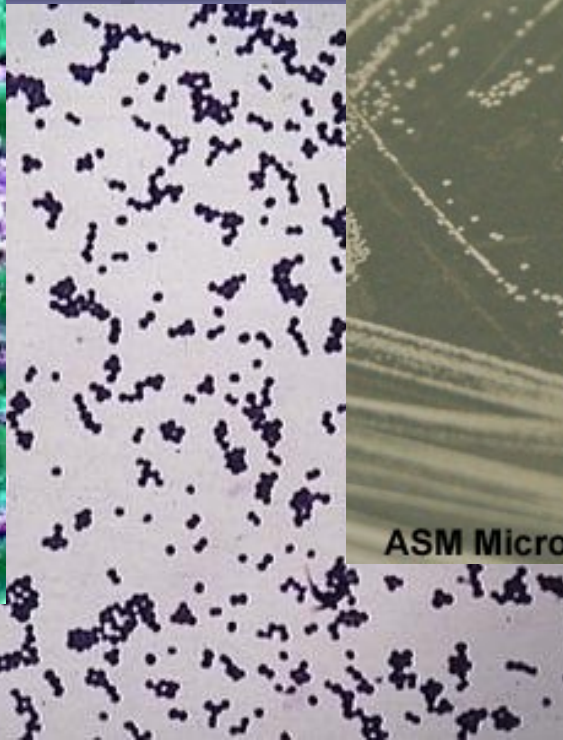
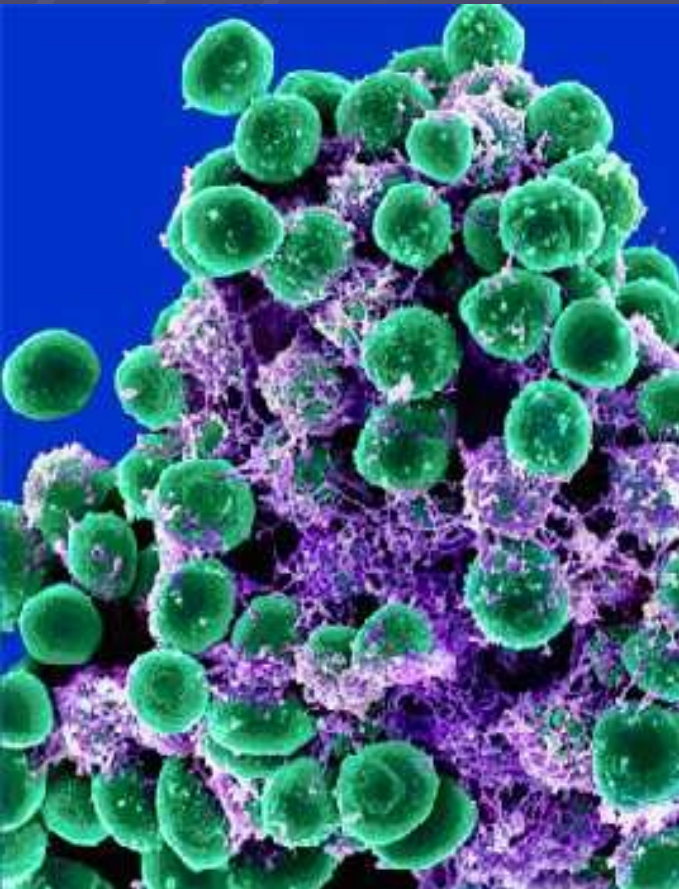


- Mladík F. B. se zotavuje po těžké havárii. Do krevního řečiště má zavedeny dva žilní katétry pro infusní výživu a odběry krve
- Náhle se stav prudce zhoršil, objevily se vysoké horečky, které kolísají – ošetřující lékař vyslovil podezření na septický stav, odebírá krev na kultivaci (hemokulturu)
-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

Staphylococcus epidermidis

<http://www.microbelibrary.org>

<http://www3.niaid.nih.gov>



ASM MicrobeLibrary.org © Hedetniemi and Liao

<http://www.difossombrone.it>

Diagnostika stafylokoků (všech)

- Mikroskopie: grampozitivní koky
- 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 stafylokoků



Diferenciální diagnostika

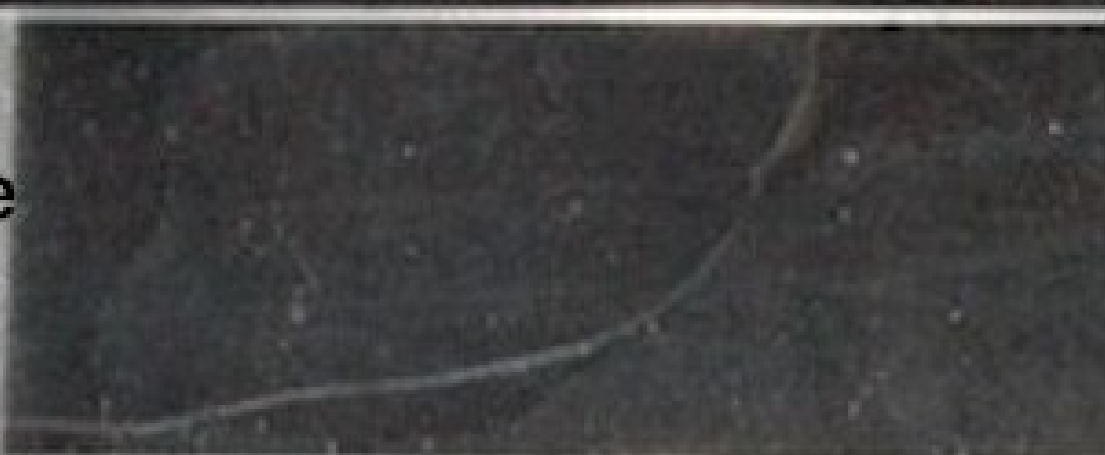
- Gramovo barvení odhalí všechny bakterie, které nepatří mezi grampozitivní koky
- Pozitivní kataláza odliší stafylokoky od streptokoků a enterokoků
- Stejnou službu (a ve směsi mikrobů ještě lepší) udělá kultivace na KA s 10 % NaCl
- *Orientačně můžeme využít i toho, že kolonie ostatních G+ koků nejsou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

Katalázový test

CATALASE TEST

<http://www.telmeds.org>

Negative



Positive

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

Clumping factor neboli také vázaná plasmakoaguláza – rychlé

- Kolonie se vmíchají do kapky králičí plasmy na podložním sklíčku
- Pozitivita se projeví jako tvorba „chuchvalců“ v kapce plasmy (viz obrázek na další obrazovce)
- Nejde vlastně o KOAGULACI, ale o AGLUTINACI plasmy
- Test není příliš spolehlivý

Clumping-Factor positiv



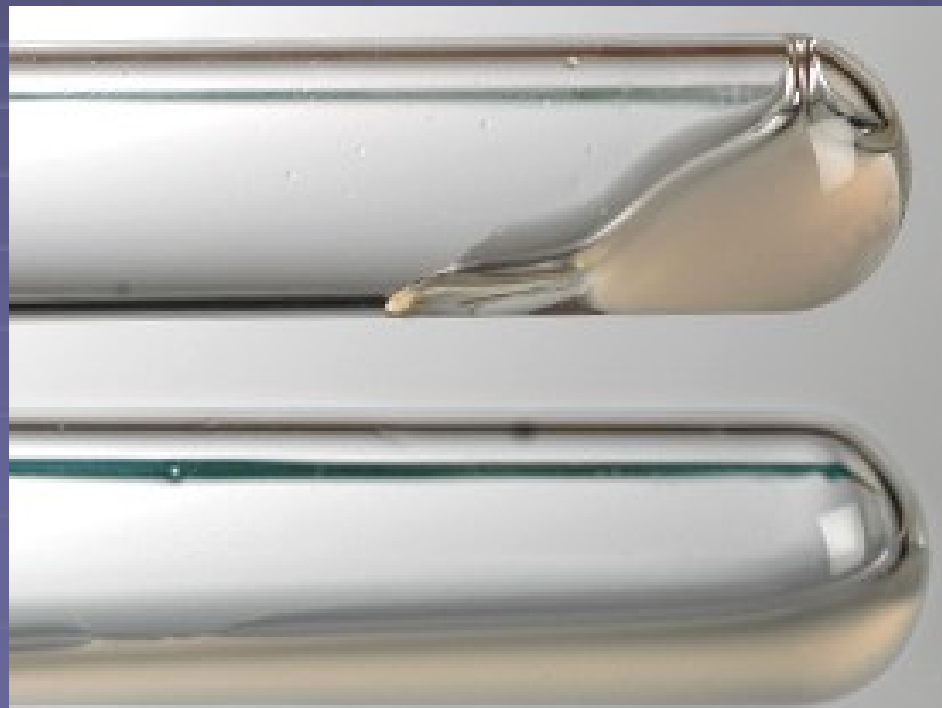
<http://memiserf.medmikro.ruhr-uni-bochum.de>

Clumping-Factor negativ



Volná koaguláza – klasika

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



COAGULASE TEST



POSITIVE

<http://www.telmeds.org>



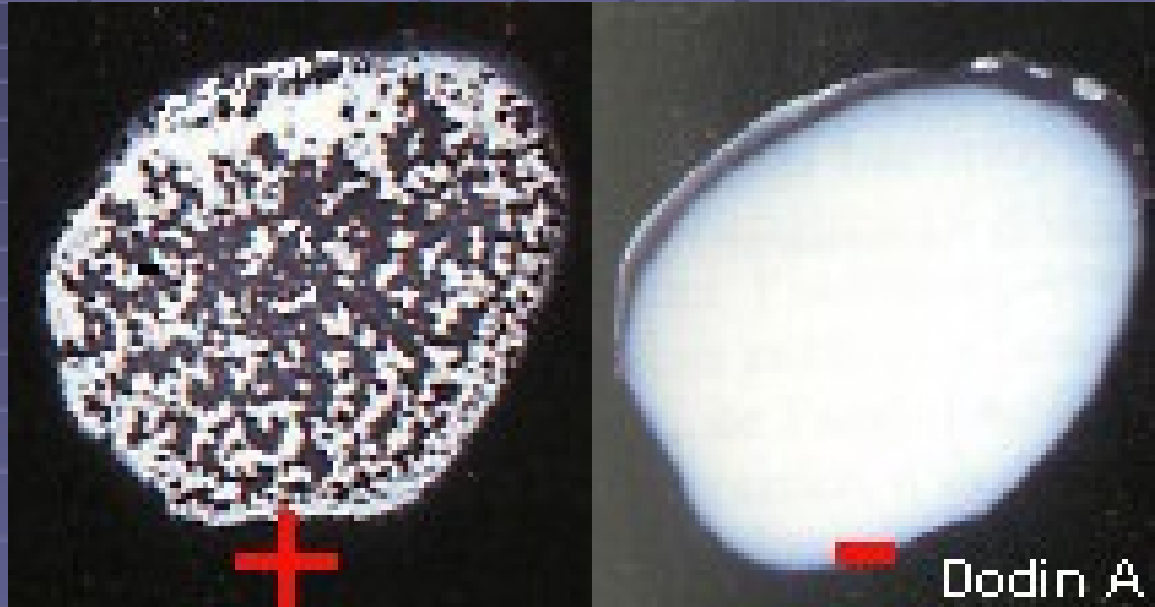
NEGATIVE

Další obrázky plasmakoagulázy



Komerční testy, např. Staphaurex

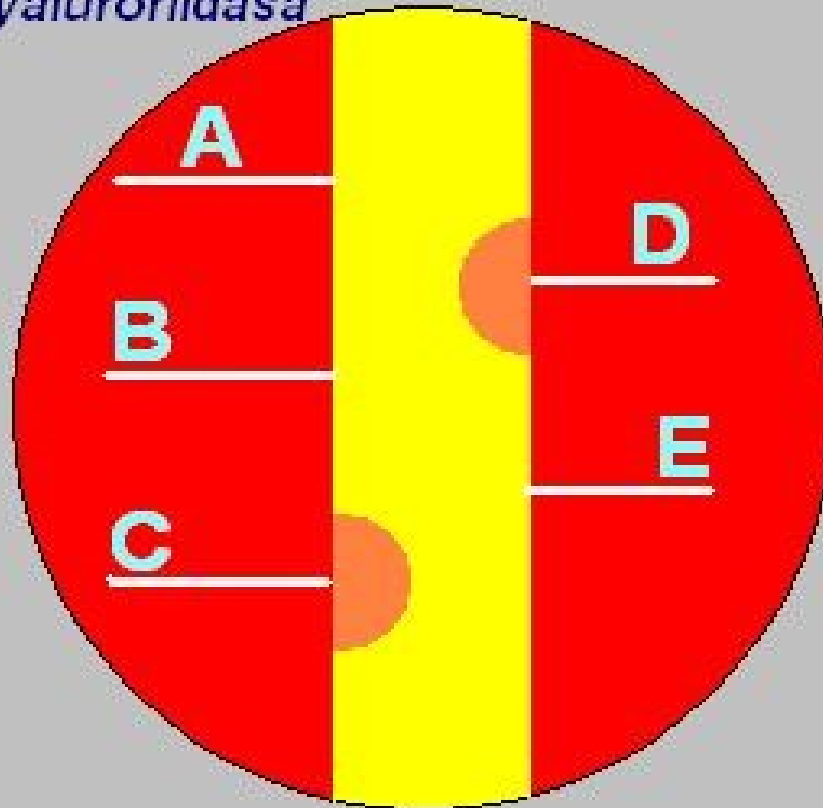
- Provedením připomínají clumping factor, ale jsou spolehlivější než volná plasmakoaguláza
- Jsou bohužel poměrně drahé



Hyaluronidáza (test dekapsulace)

- Elegantní test, jehož principem je skutečnost, že hyaluronidáza, produkovaná 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



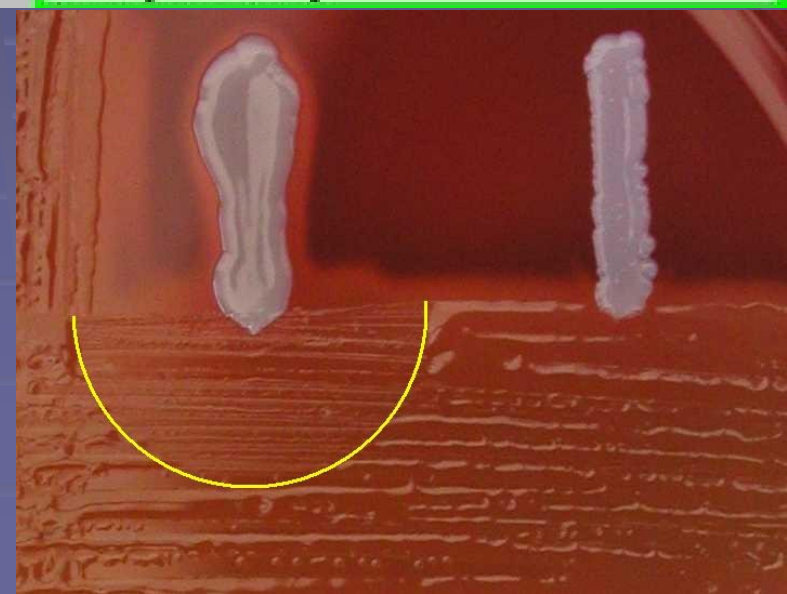
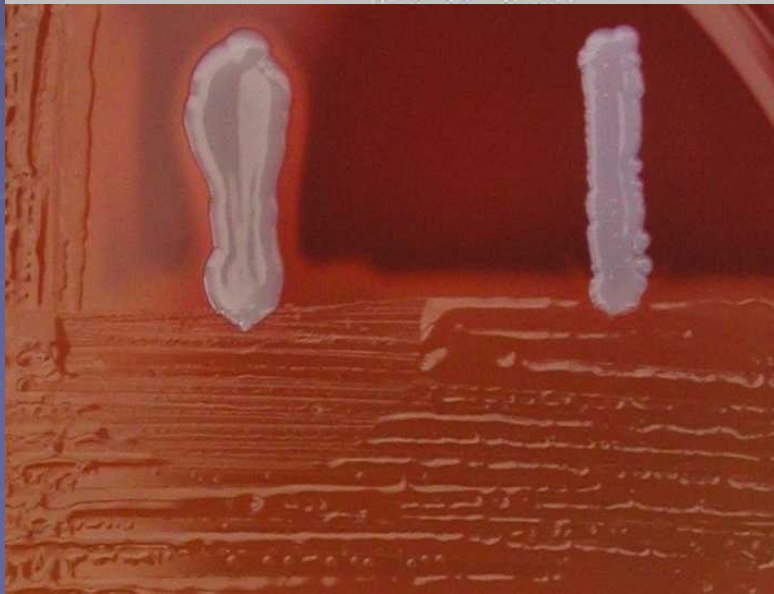
Žlutě "soplovitý" nárůst,
oranžově suché kolonie.

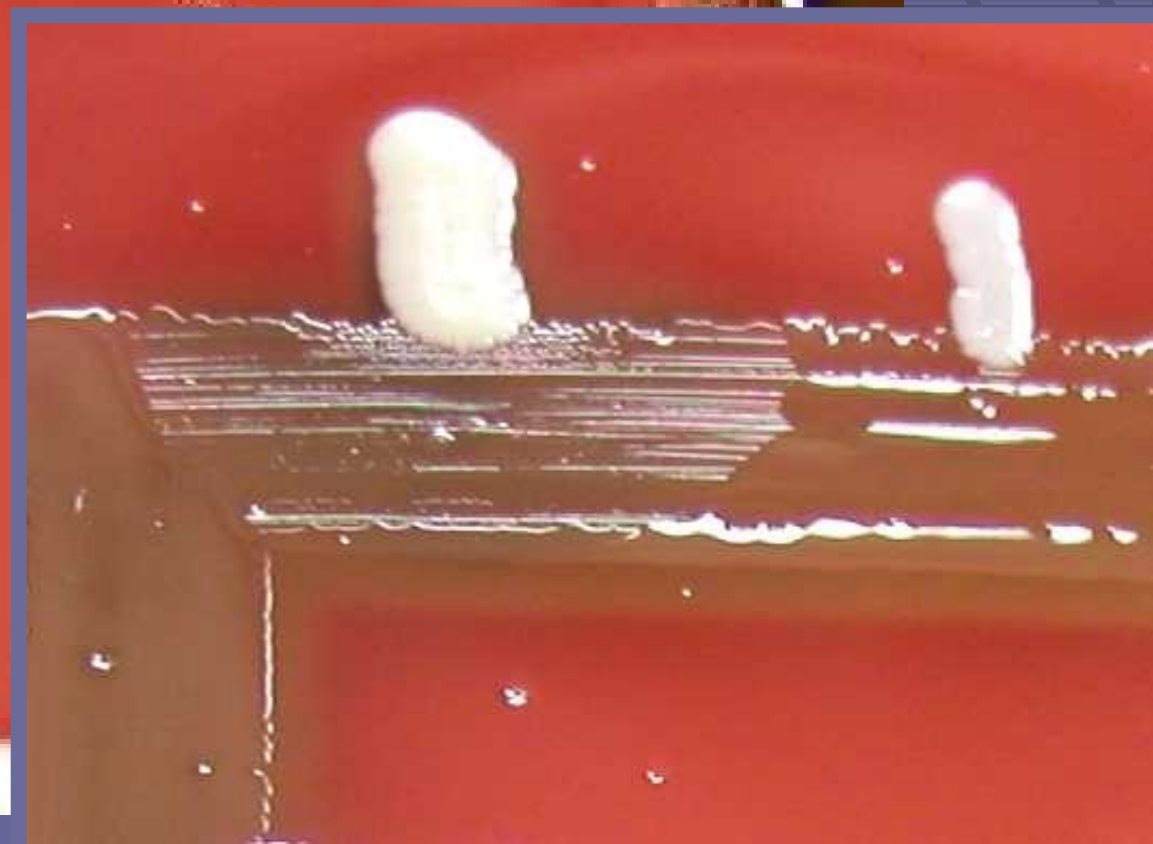
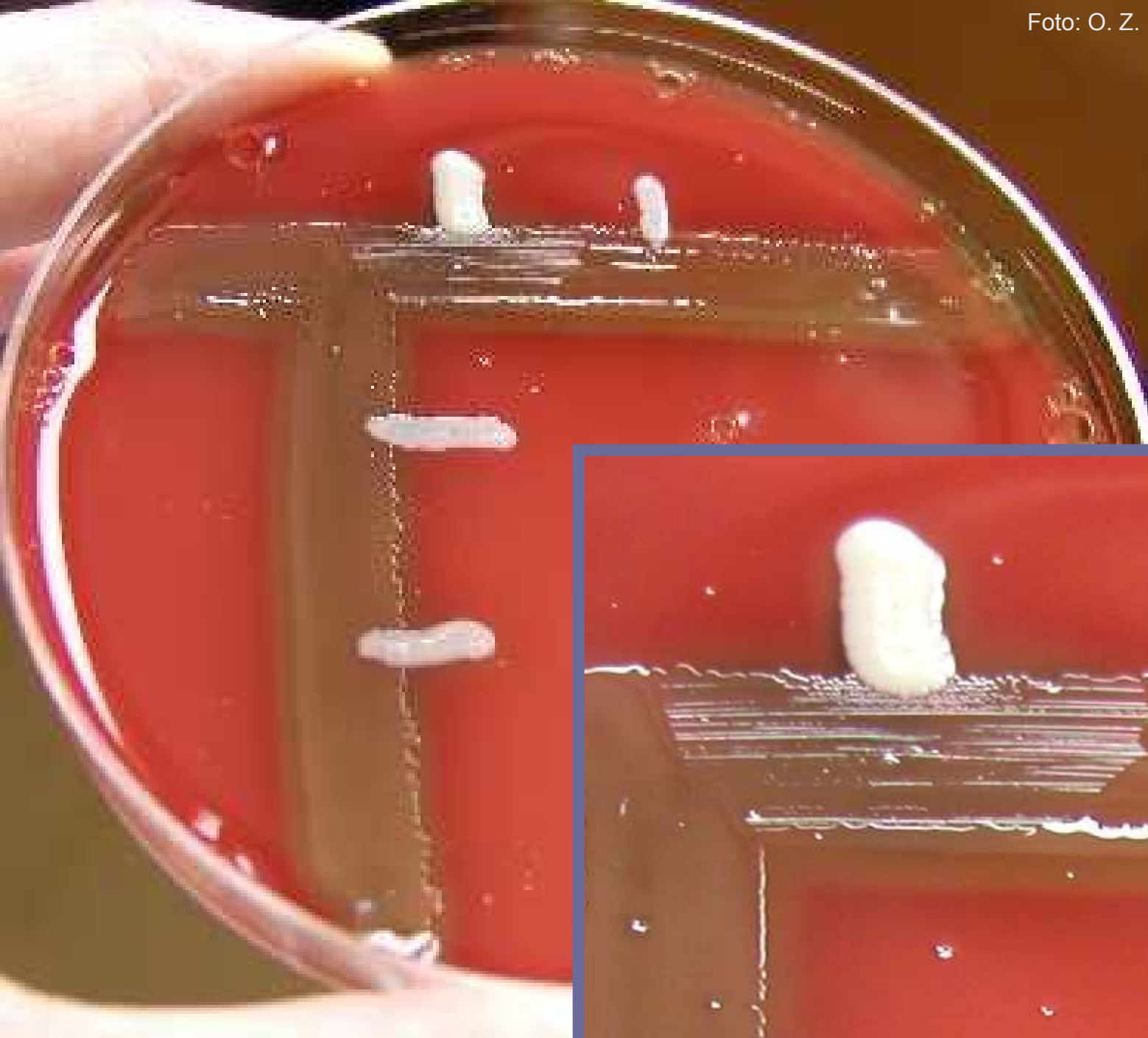
Bíle testované kmeny
stafylokoků.

Hodnocení:

Kmeny C, D patří k druhu
Staphylococcus aureus

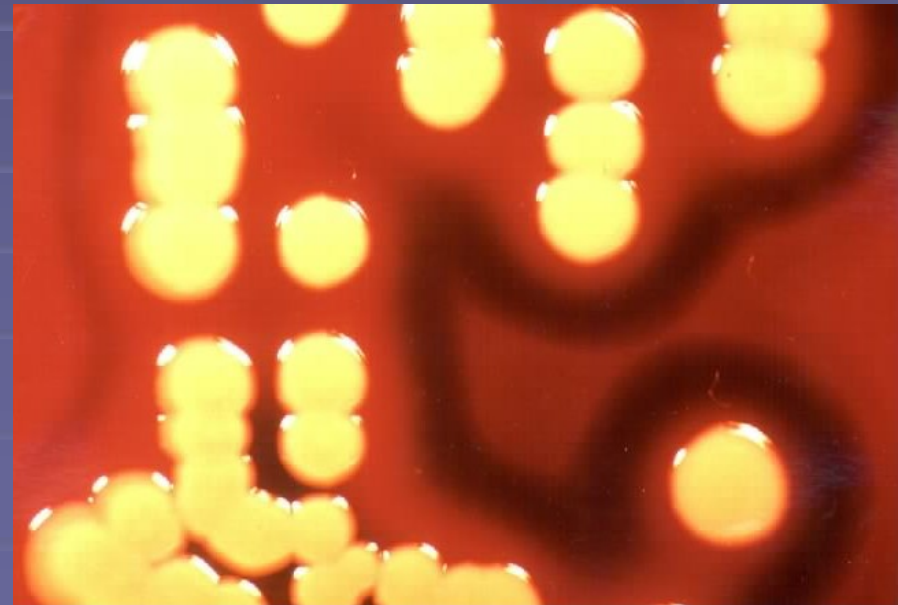
Kmeny A, B, E patří mezi
koagulázanegativní
stafylokoky





Méně spolehlivé testy:

- 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)

Poté, co je určen patogen...

- ...diagnostiku uzavírá testování citlivosti na antibiotika, zpravidla difusním diskovým testem
- Samozřejmě se týká jen patogenů

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 = negativní
- První řádek STAPHYtestu = 2–9. reakce
- Druhý řádek STAPHYtestu = 10.–17. reakce
- Vypočítá se kód a porovná s kódovníkem
- Kód je šestimístný. Prvních pět číslic je ze trojic testů, šestá číslice je z dvojice

Api Staph – zahraniční obdoba našich STAPHYtestů 16

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

<http://www.microbes-edu.org>



Jiná varianta testu API-Staph

- Na předchozím obrázku byl API-Staph pro automatické odečítání ve fotometru, tato varianta je pro „okometrické“ odečítání



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

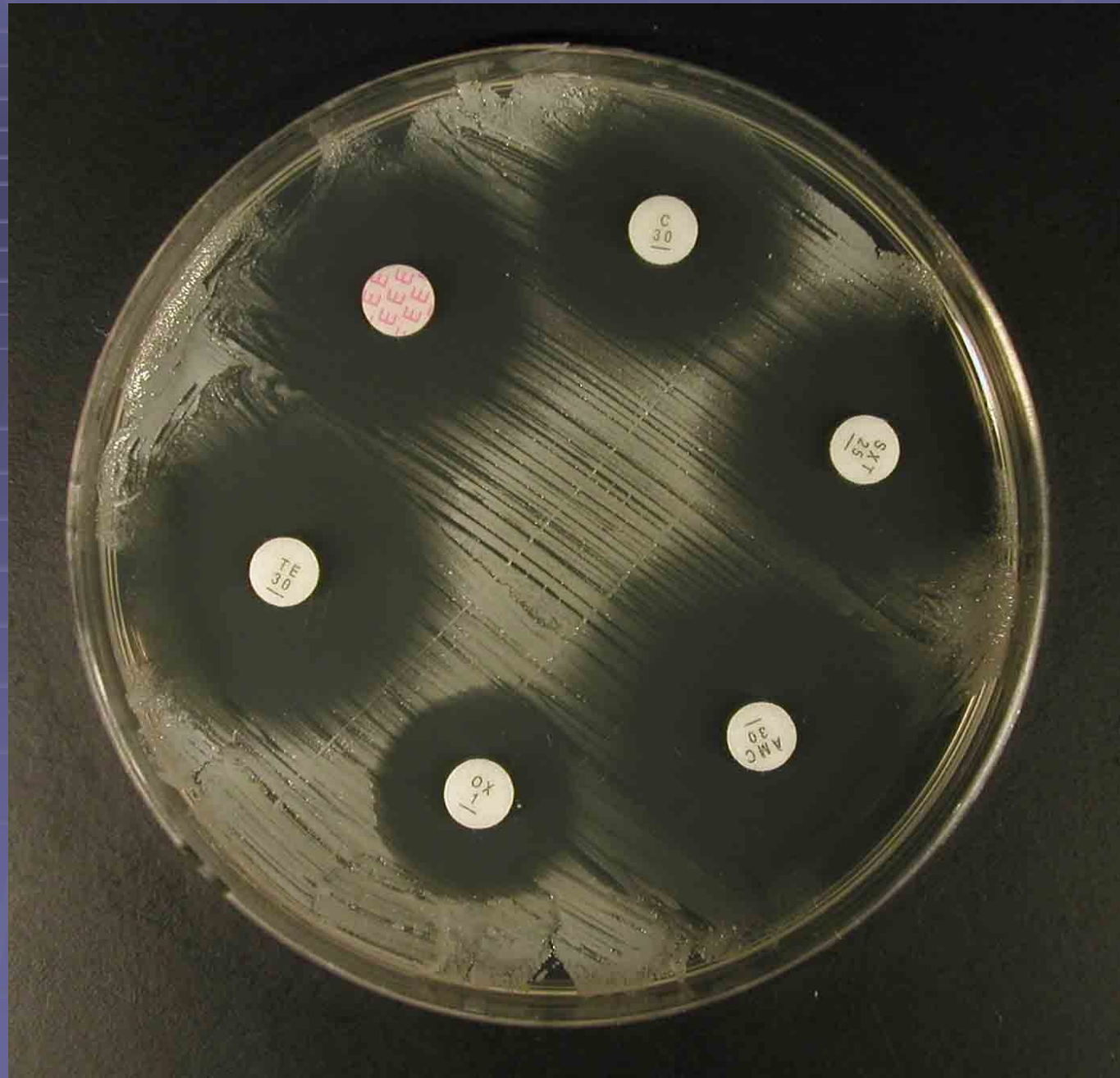
Základní sada protistafylokokových antibiotik

Antibiotikum	Zkratka	
Oxacilin (protistafylokokový penicilin)	OX	
Cefalotin (cefalosporin 1. generace)	KF	
Erytromycin (makrolid)	E	
Klindamycin (linkosamid)	DA	
Ko-trimoxazol (směs dvou látek)	SXT	
Tetracyklin (tetracyklin)	DO	
Cefoxitin (jen k průkazu MRSA)	FOX	

Rozšířená sada protistafylokokových antibiotik

Antibiotikum	Zkratka
Cefuroxim (cefalosporin 2. generace)	CXM
Chloramfenikol	C
Gentamicin (aminoglykosid)	CN
Vankomycin (glykopeptid)	VA
Teikoplanin (glykopeptid)	TEC
Rifampicin (rifamycin)	RD
Linezolid (nové oxazolidinonové antibiotikum)	LZD

Ilustrační foto



Obvyklé pravidlo: horší patogen – lepší citlivost

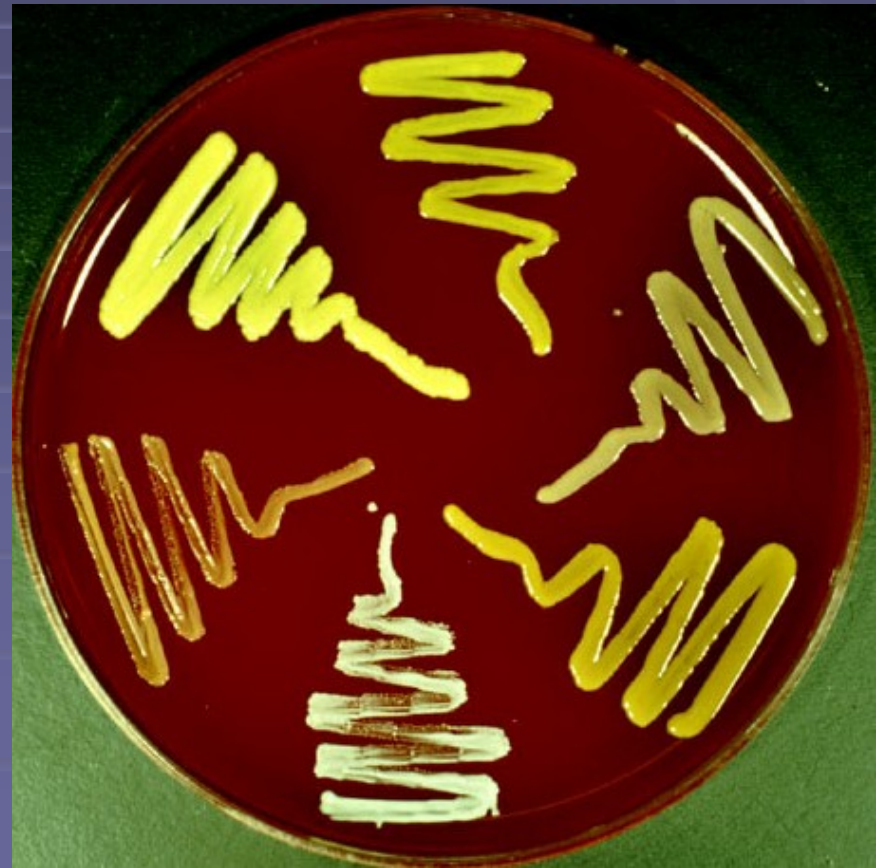
- Nejen pro stafylokoky platí horší patogen (zlatý stafylokok) je zpravidla citlivější než mírnější patogen (koaguláza negativní stafylokok). Toto pravidlo je logické: menší patogenita je znakem adaptace, schopnosti mikroba koexistovat s námi a nevyvolávat u člověka chorobný stav. → přivyknutí mimo jiné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

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 naopak oxidáza negativní, a dokonce i katalázu má pozitivní jen slabě nebo vůbec

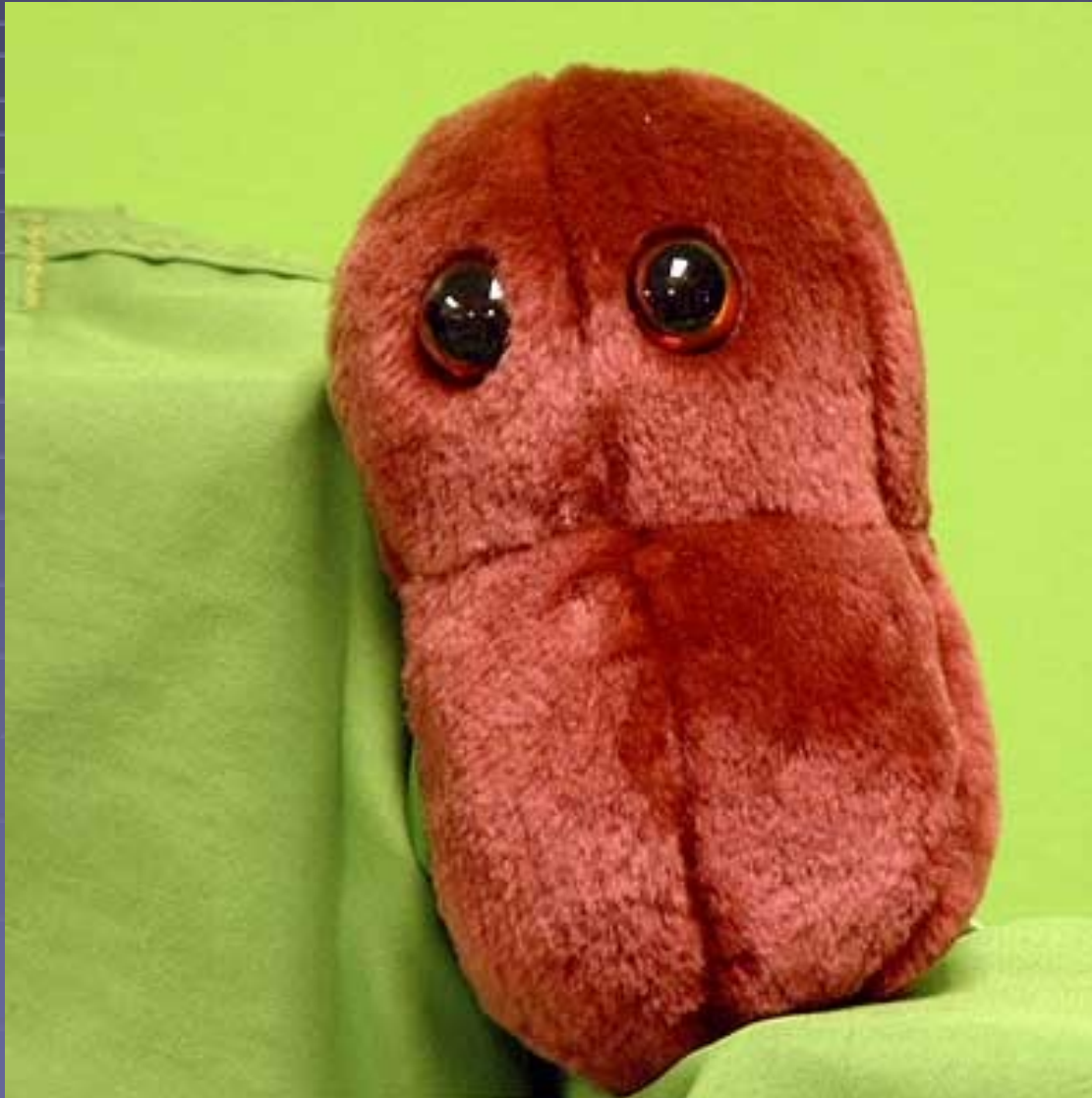
Mikrokoky mají krásné pigmenty

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



2. Streptokoky (a jiné podobné)

www.giantmicrobes.com,
www.plysovimikrobi.cz



Plyšový
streptokok

Základní charakteristika

- Streptokoky jsou **grampozitivní koky**, **kataláza negativní**, tvořící dvojice či menší nebo delší řetízky (opět špatně viditelné při barvení kmene)
- Kdysi se mezi streptokoky řadily také enterokoky, ty jsou však nyní v samostatném rodu; naopak někdejší „*Diplococcus pneumoniae*“ dnes patří mezi streptokoky, i když netvoří řetízky

Klinická charakteristika

- Některé jsou **běžnou flórou** v dutině ústní
- Jiné jsou **patogenem** v dutině ústní a hltanu
- Další jsou **patogenem např. v urogenitálním systému**
- Některé jsou čisté lidské, jiné napadají i zvířata
- Bližší informace u jednotlivých druhů

Přenos infekce

- Jsou **choulostivější** než stafylokoky, přesto se přenáší vzduchem, zvláště na krátké vzdálenosti a zejména v kapénkách a kapkách
- Předpokládá se také účast **přenosu přes předměty** (kapesník, klika, tyč v tramvaji)
- U *S. agalactiae* se předpokládá **endogenní přenos do pochvy** ze střevního rezervoáru

Léčba

- **Citlivé kmeny** se likvidují perorálním nebo parenterálním penicilinem (lék volby)
- **U rezistencí** (ovšem např. u *S. pyogenes* se rezistence nevyskytuje) a u alergiků se používají jiná antibiotika, např. doxycyklin, ko-trimoxazol, makrolidy a podobně
- Často je nutná **operační** likvidace zhnisaného ložiska

Streptococcus pyogenes



strepto = v řetězcích, *pyo-genes* = hnisotvorný

- *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 angín 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“ – to jsou ovšem velmi výjimečné případy.

Tonsillitis („angína“)

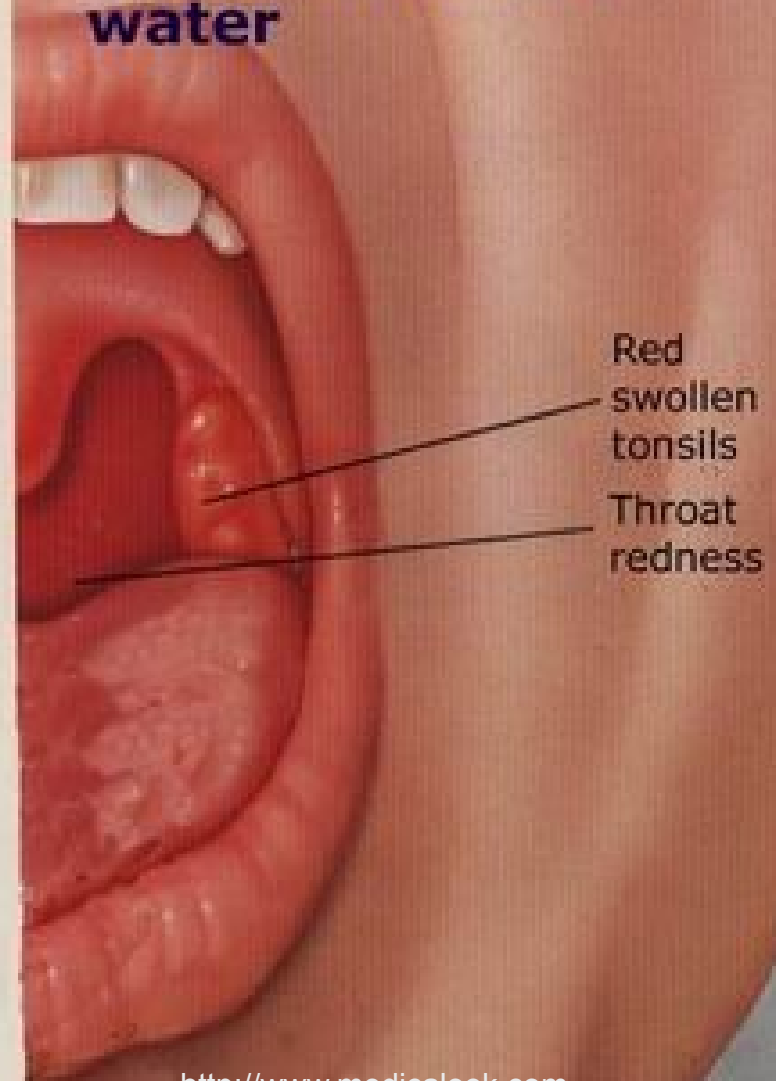
Bacterial

Come to the Health Center



Nonbacterial/Viral

Monitor at home, gargle with salt water



Spála (šarlach)



<http://www1.lf1.cuni.cz>



www.infektionsnetz.at

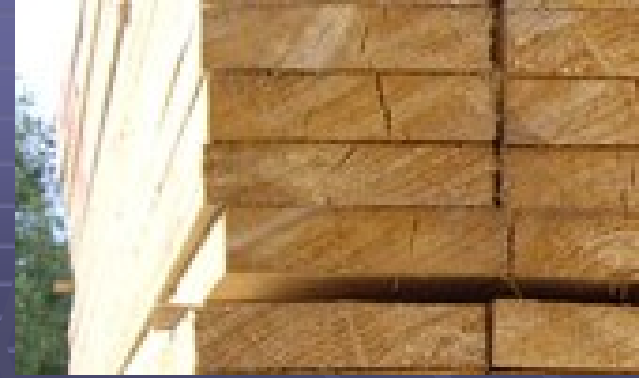
Růže
(erysipiel)

Růžě komplikovaná flegmónou



<http://www.megru.unizh.ch>

<http://homepage.univie.ac.at>



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: EMBSS, 1998 <http://medchoice.com/>)

Nekrotizující fasciitida

Ve skutečnosti je extrémně vzácná. Podmínkou je infekce kmene streptokoka fágem. Kmeny takto infikované se obecně označují jako „masožravé streptokoky“.

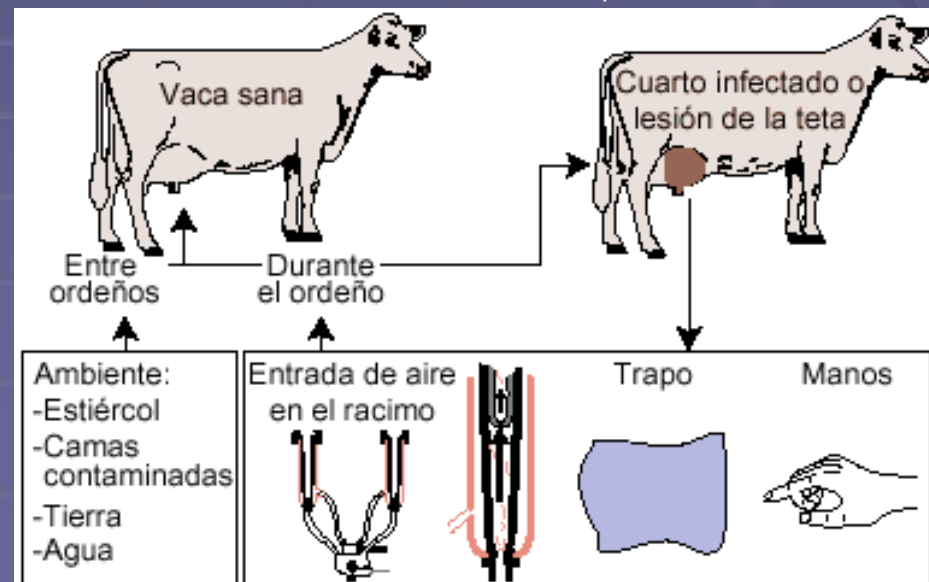


Streptococcus agalactiae

- U člověka způsobuje močové a poševní infekce. Často je ale také přítomen v pochvě bezpříznakově, přičemž ale s sebou nese riziko při porodu. Proto se u těhotných provádí screening na „SAG“, jak této bakterii říkávají gynekologové.

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

<http://www.infocarne.com>



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.

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 „SAG“



Non-A-non-B streptokoky

- 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.

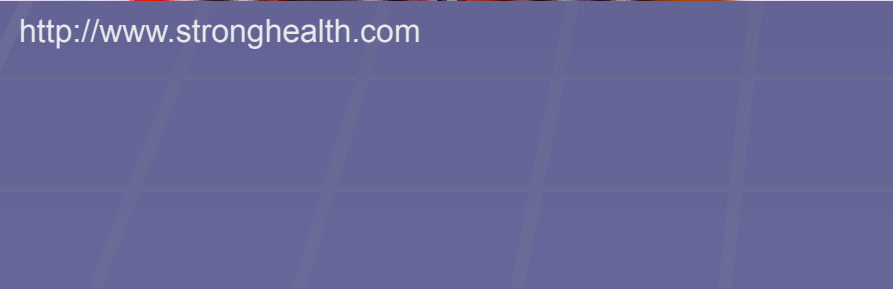
Příběh třetí



- 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.



<http://www.childrenshospital.org>

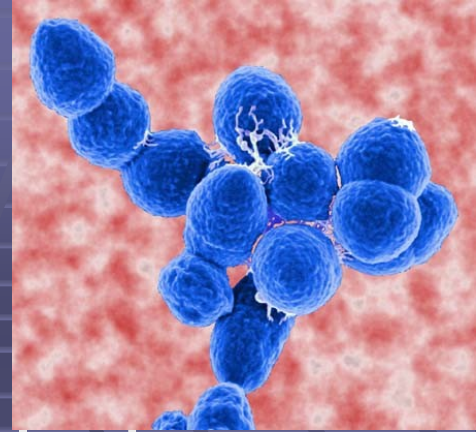


<http://www.stronghealth.com>

Streptococcus pneumoniae

- se také nazývá „pneumokok“. Dříve se mu říkalo *Diplococcus pneumoniae*, netvoří totiž řetízky, ale jen dvojice. Také není ideálně kulatý, má spíše lancetovitý (kopíčkovitý) tvar.
- 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. Častý je u osob s odňatou slezinou

Příběh čtvrtý

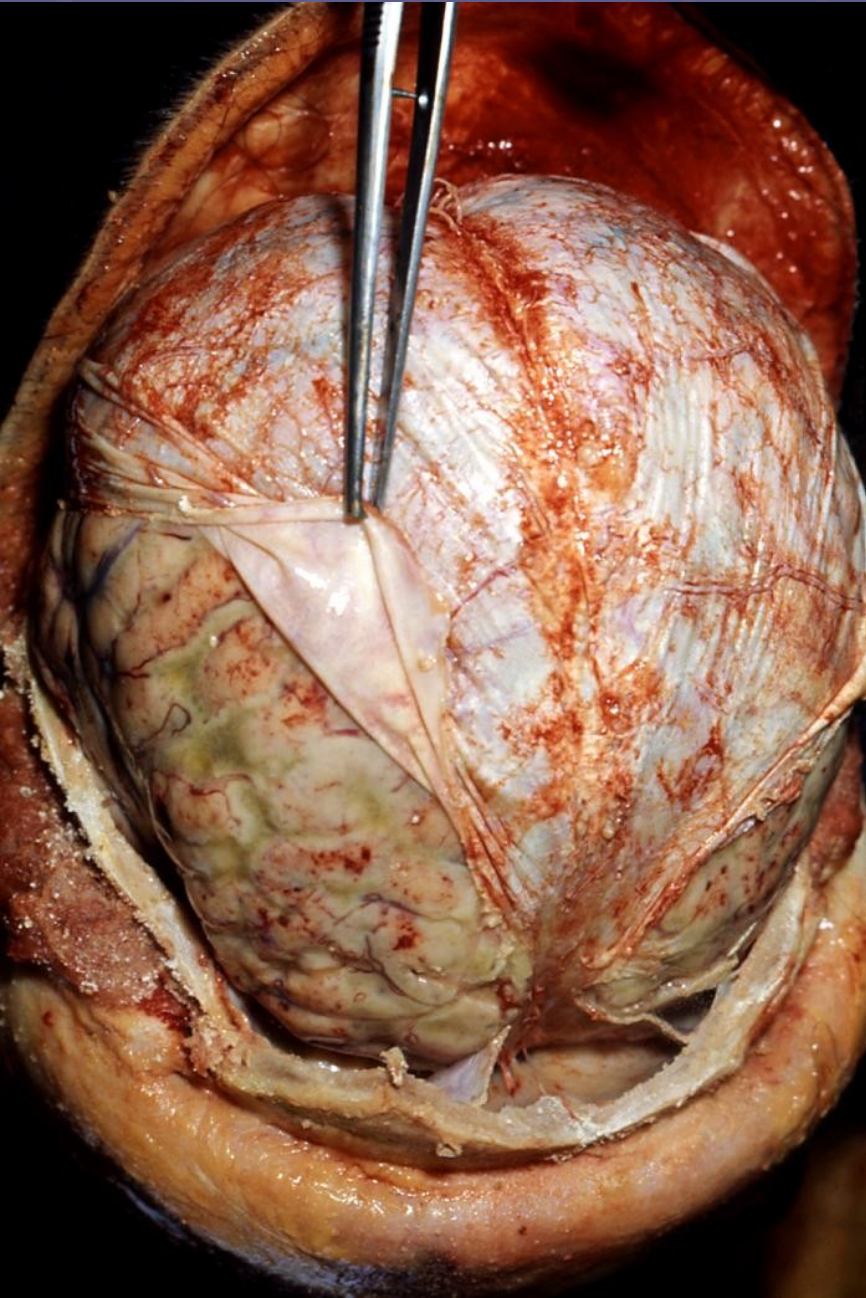


- Paní Božena, důchodkyně nemá slezinu – vyňali jí ji před léty po autonehodě.
- Před několika dny začala být „nachlazená“, nevěnovala tomu pozornost, ale teď se její stav zhoršil, takže ji dcera dovezla do nemocnice, kde ji hospitalizovali na infekčním oddělení s podezřením na zánět mozkových blan
-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

Zdravý bubínek (vlevo), zánět středního ucha (vpravo)



Pneumokoková meningitida



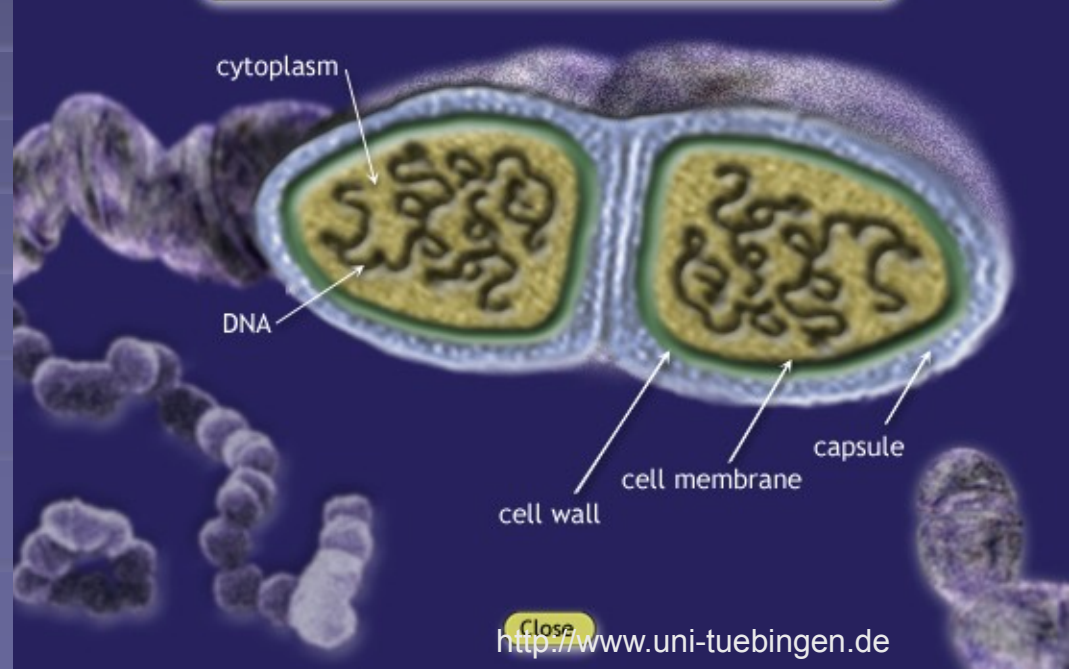
<http://www.meningitis.com.au>

<http://commons.wikimedia.org>

Takhle pneumokok vypadá



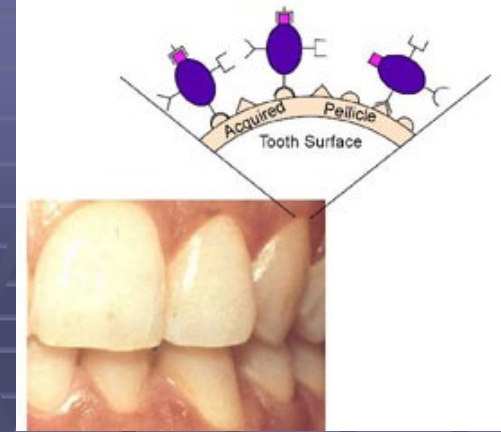
Figure 4. Cross-section of *Streptococcus pneumoniae*



Ústní streptokoky

- 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 (umělá chlopeň nebo srdce postižené revmatickou horečkou).

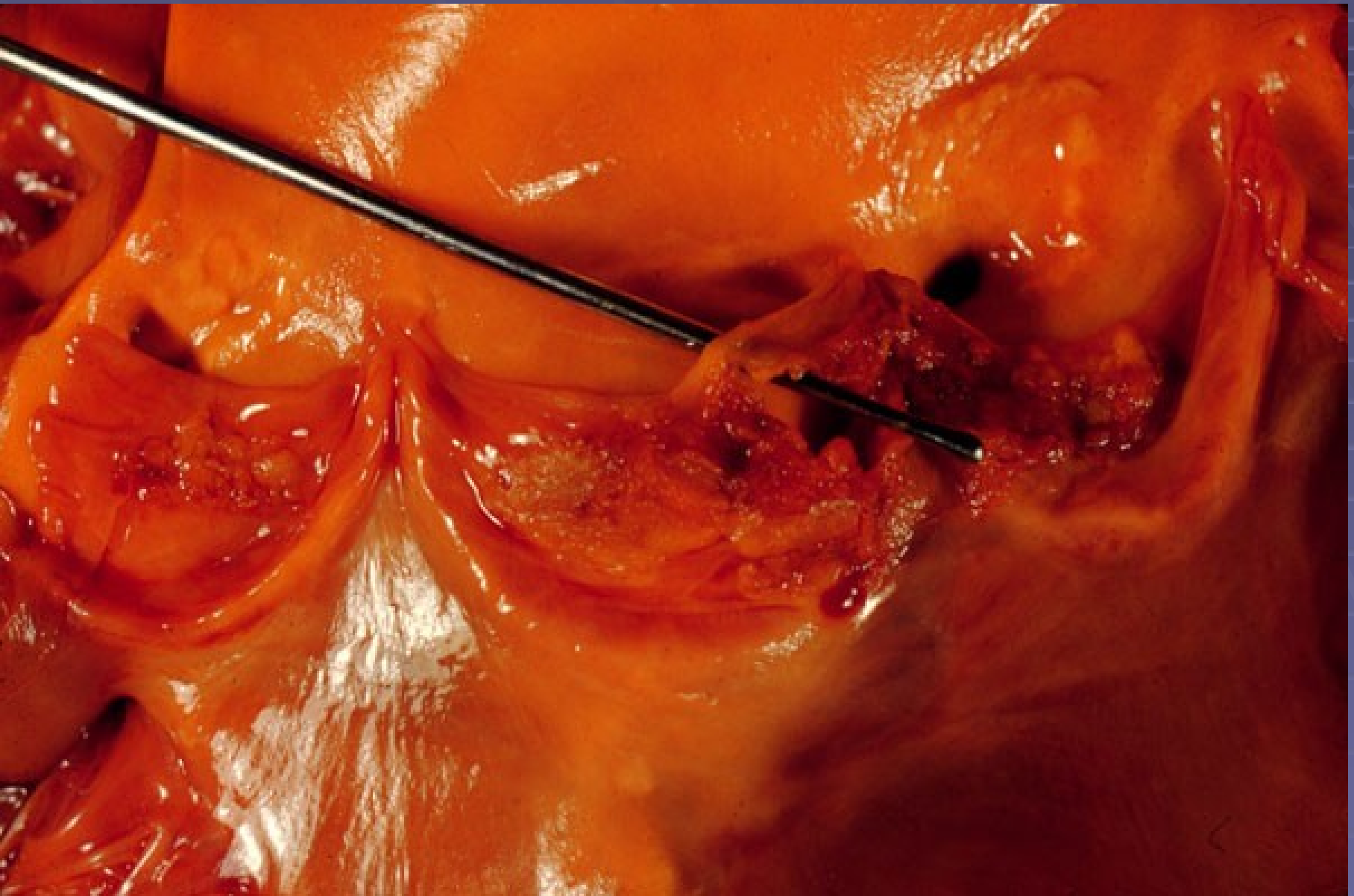
Příběh pátý



- 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.

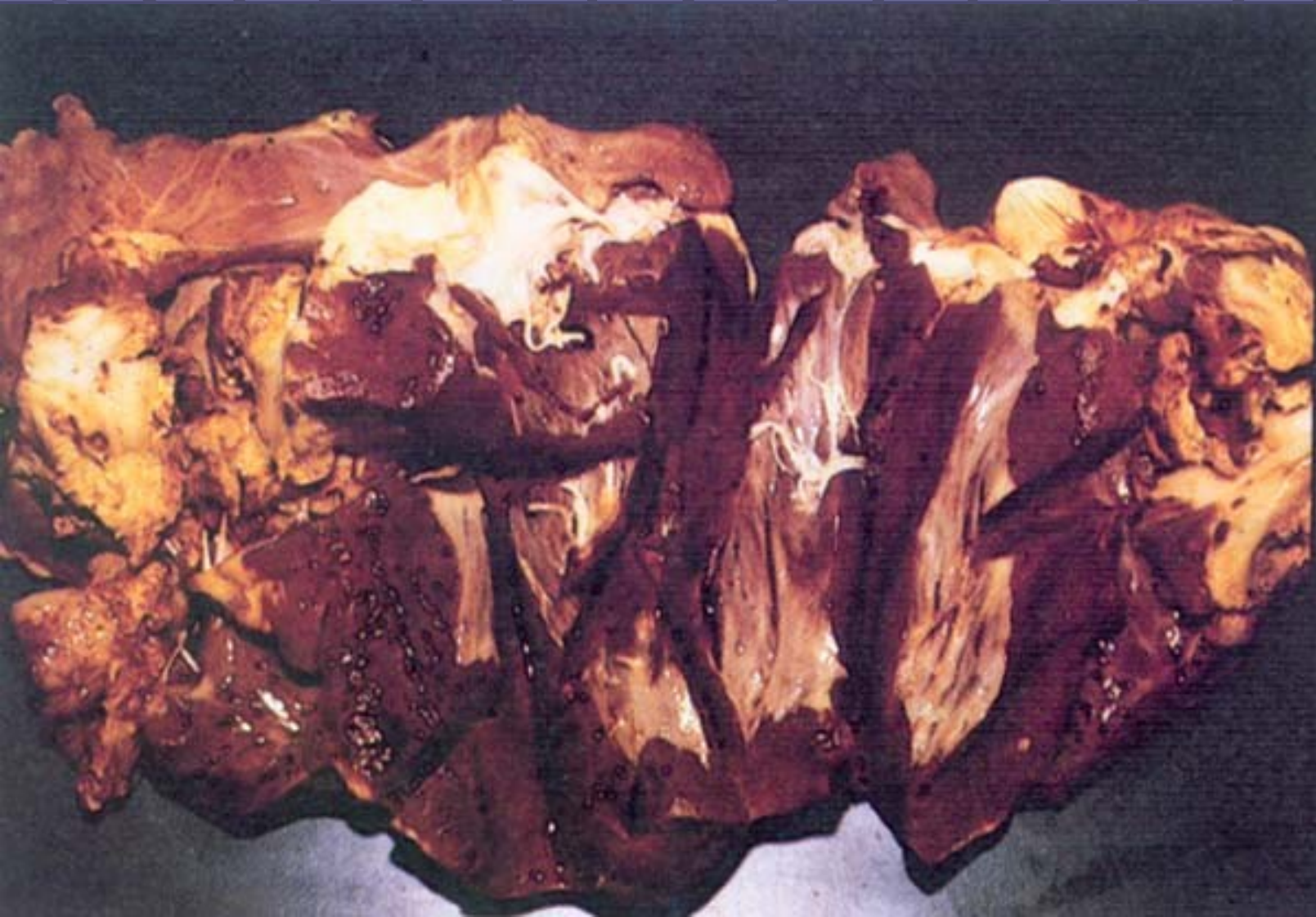
Vegetace na chlopni

<http://www.pathguy.com>



Postižené srdce

<http://www.fao.org/docrep/003/t0756e/T0756E83.jpg>



Příklady ústních streptokoků



Udělejme si v nich pořádek

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

*u *S. agalactiae* jen částečná hemolýza

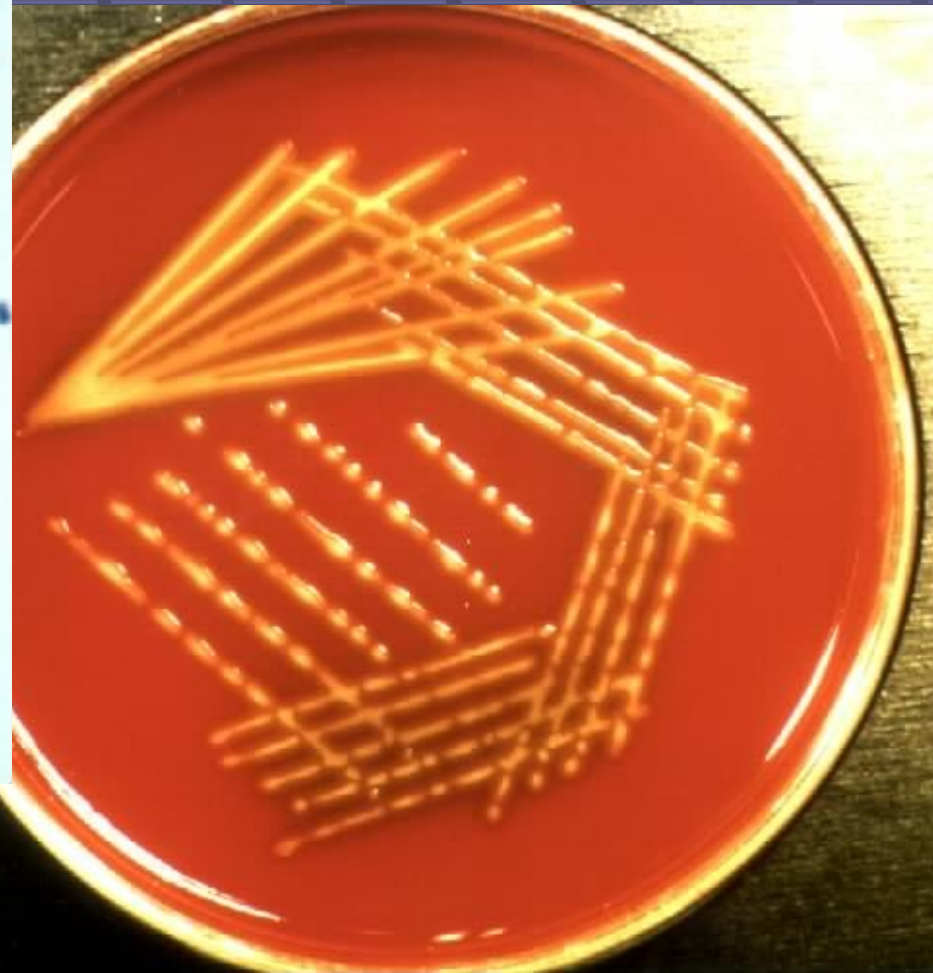
Diagnostika 1

- Mikroskopie: grampozitivní koky
- Kultivace: na KA kolonie šedé až bezbarvé, většinou drobné; trochu 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.

Diagnostika 2

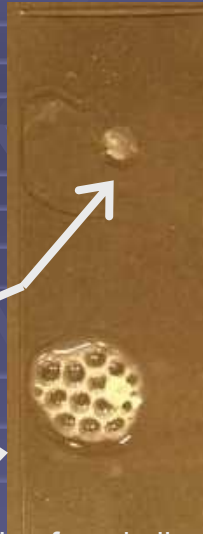
- Biochemické testy: kataláza i oxidáza negativní, biochemicky lze rozlišit jednotlivé druhy zejména u viridujících
- Antigenní analýza může naopak pomoci spíše u hemolyzujících streptokoků. Používá se systém dle Lancefieldové – teoreticky zahrnuje všechny streptokoky, ale mnohé viridující nedisponují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

Jak vypadají



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)

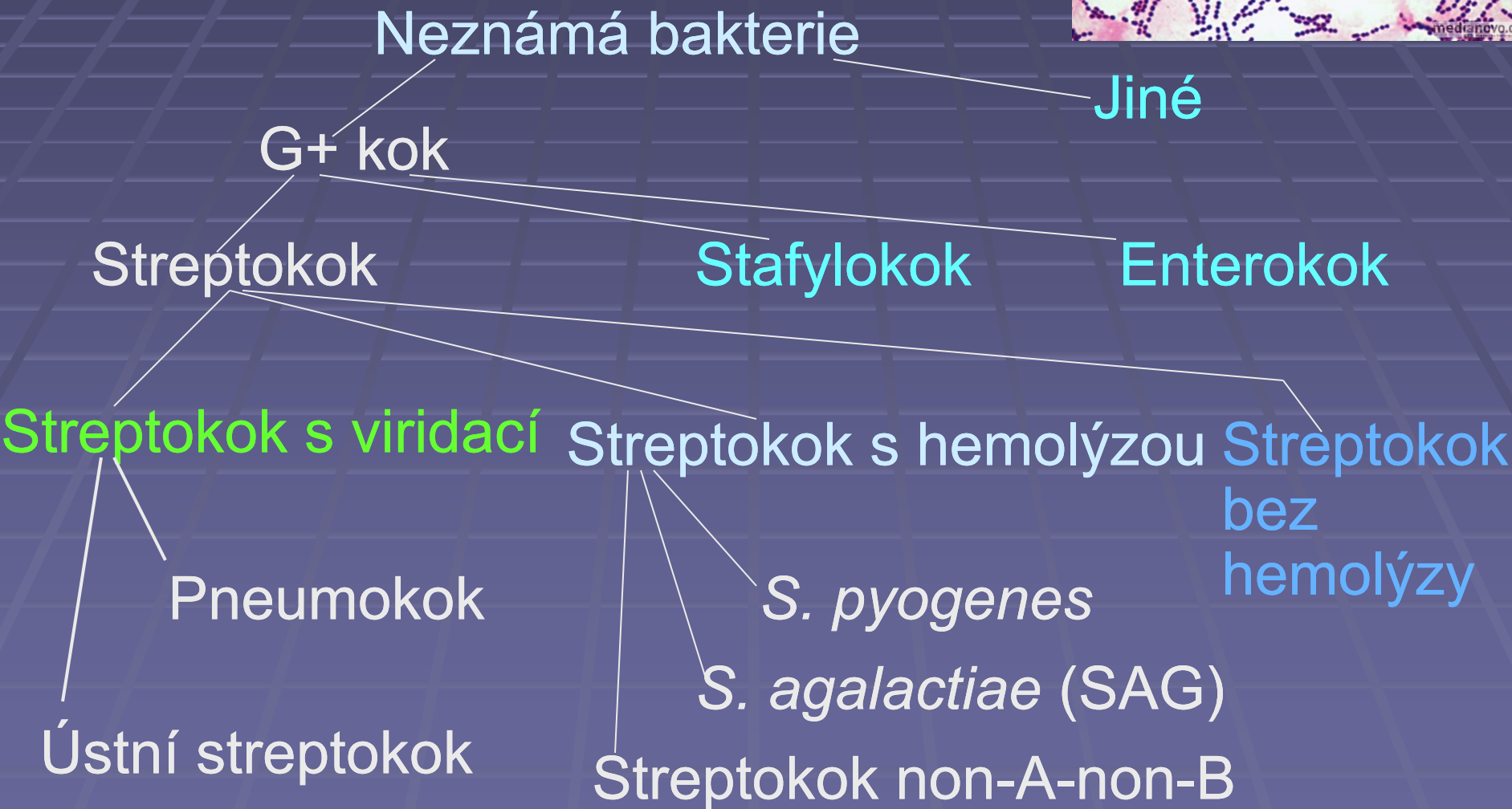
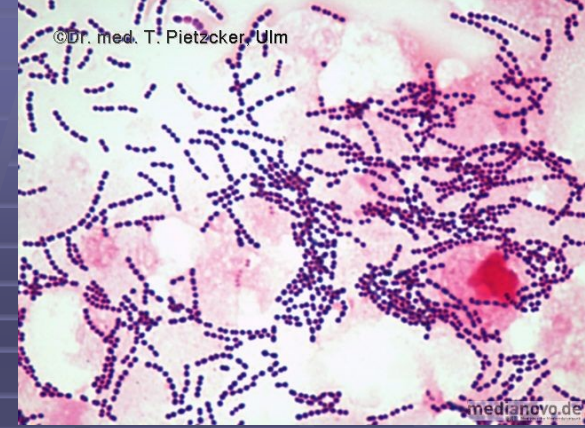


<http://memiserf.medmikro.ruhr-uni-bochum.de>

Rozlišení podezřelých streptokoků (diferenciální diagnostika 2)

- Při rozlišování streptokoků hodnotíme nejdříve hemolýzu – streptokoky členíme na viridující, hemolyzující (částečně či úplně) a bez hemolýzy (používá se také termínů alfa, beta a gama hemolýza)
- 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:



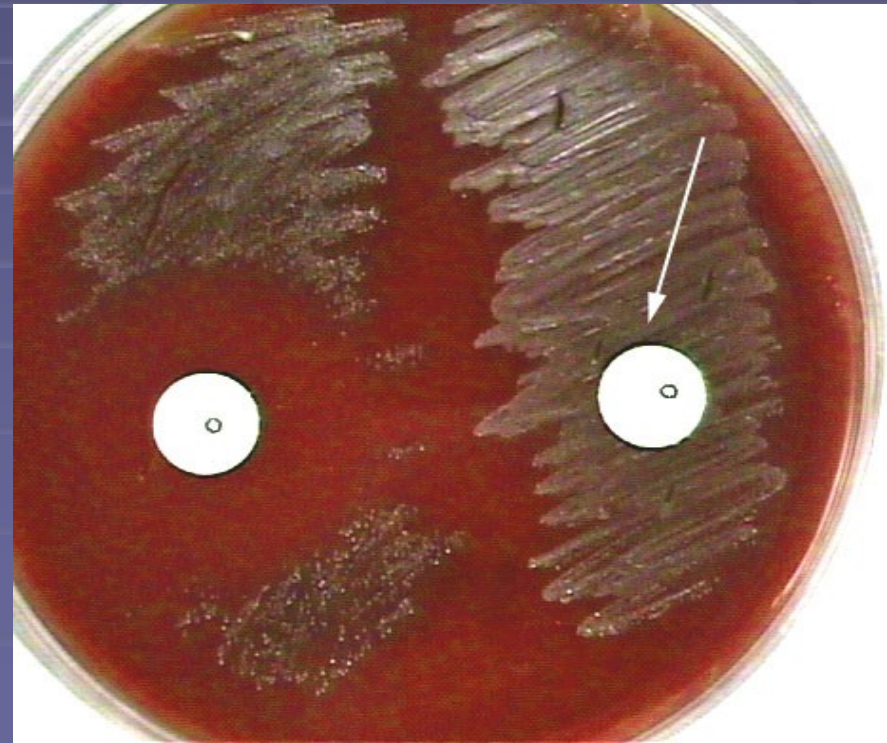
Pneumokok: orientační testy

- Pneumokoka odlišíme optochinovým testem – viz další obrazovka.
- Podezření však můžeme pojmout, když:
 - mikroskopicky vidíme 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 a další testy

- 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 streptokoka

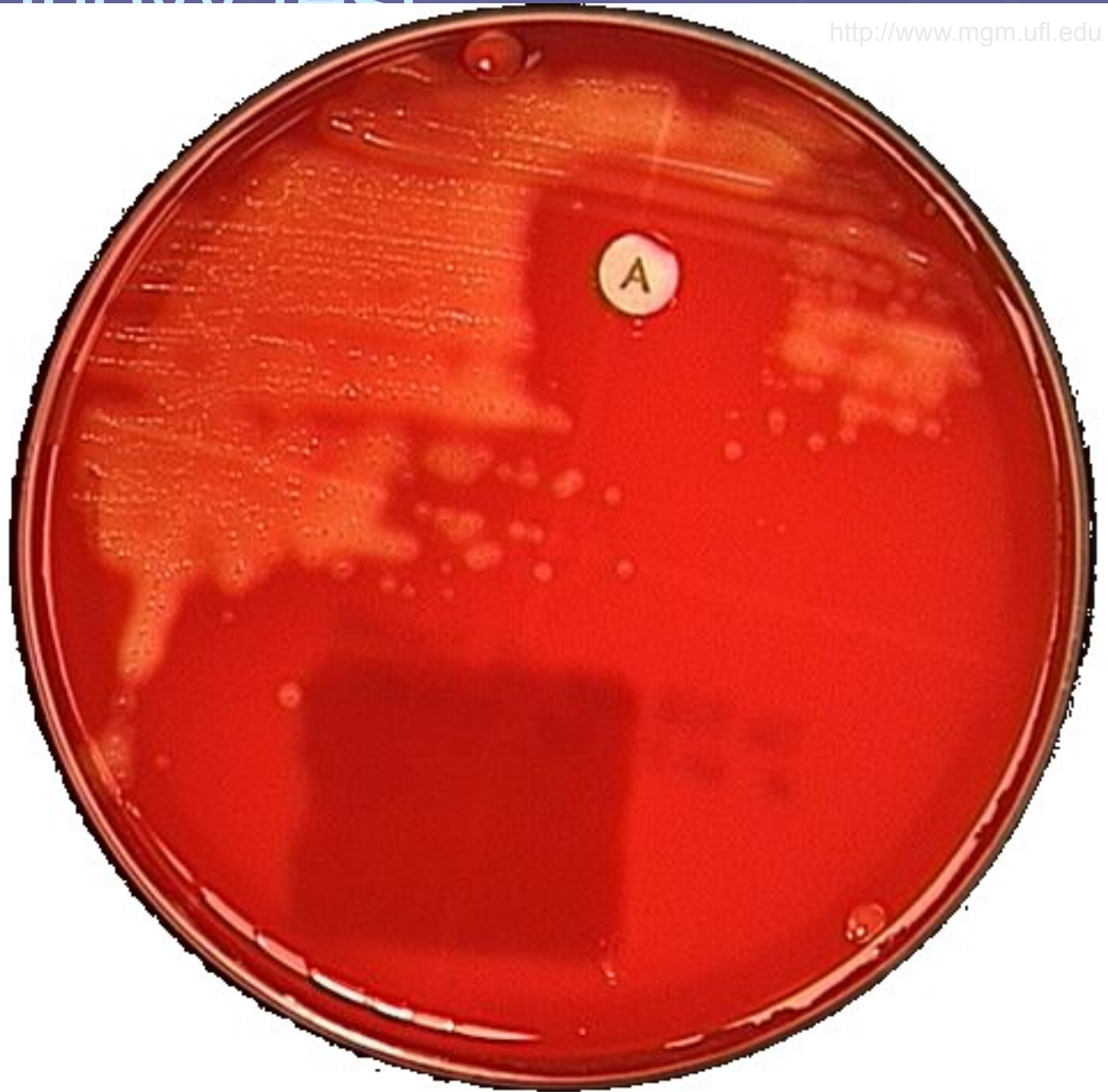
- Jen blázen (nebo badatel, což je někdy totéž😊) by druhově určoval ústního streptokoka z ústní dutiny nebo krku. Proč to činit, když je v těchto místech běžnou flórou?
- Na druhou stranu, máme-li kmen z hemokultury či likvoru, je jeho určení na místě. U viridujících streptokoků nemá smysl snažit se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

Diagnostika *Streptococcus pyogenes*

- 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 je stejný jako optochinový, jen se použije jiné antibiotikum (mimo chodem, bacitracin je spolu s neomycinem součástí framykoinu). Bacitracinový test její příliš spolehlivý, proto se dnes užívá méně.*

Bacitracinový test

<http://www.mgm.ufl.edu>

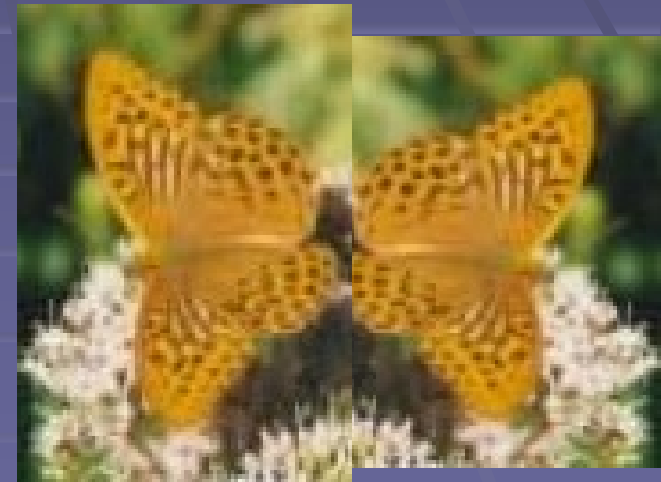
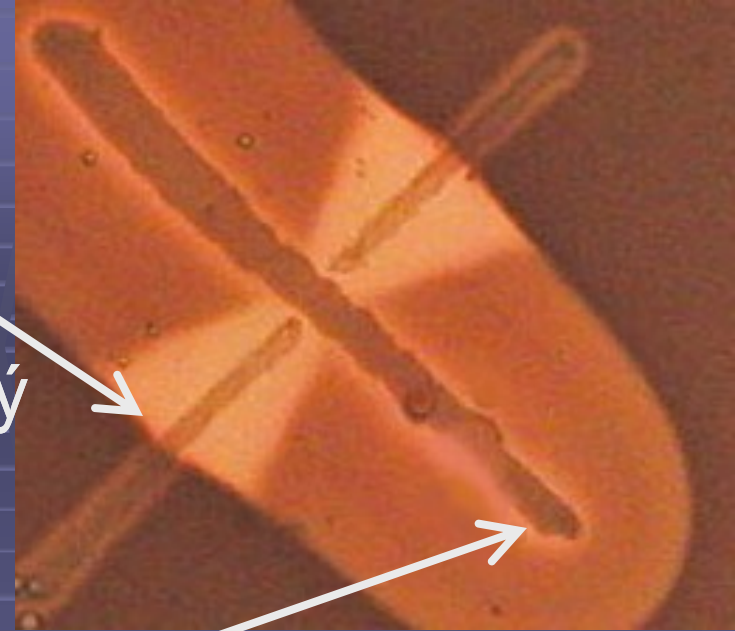


CAMP-test v diagnostice *Streptococcus agalactiae*

- 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*
- **Tohoto synergismu využívá tzv. CAMP test.** Nelze jej použít k diagnostice zlatého stafylokoka – ne každý totiž produkuje beta lyzin! Používá se tedy jen v dg. streptokoků

CAMP test

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



Hemolytické streptokoky – shrnutí

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 (další určení možné latexovou aglutinací)
pozitivní	pozitivní	ptákovina, špatný test, případně směs dvou kmenů

Latexová aglutinace

Latexová aglutinace – princip. Aglutinace streptokoků s protilátkou je usnadněna díky latexovým částicím

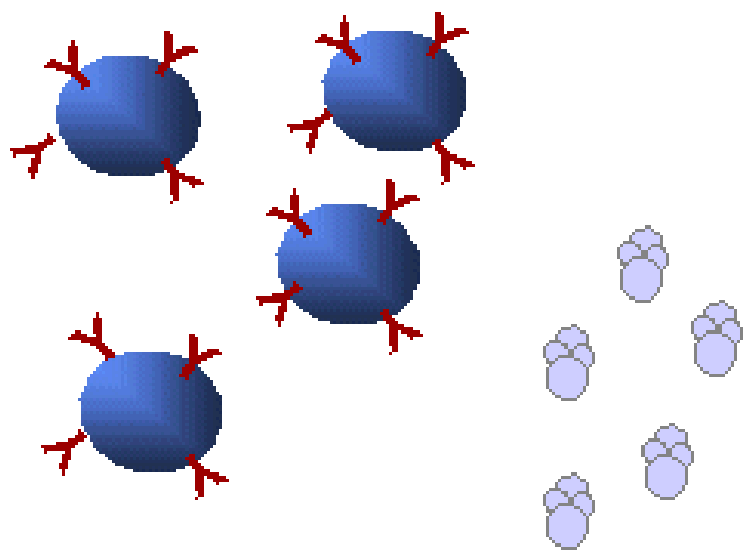


Figura 2a

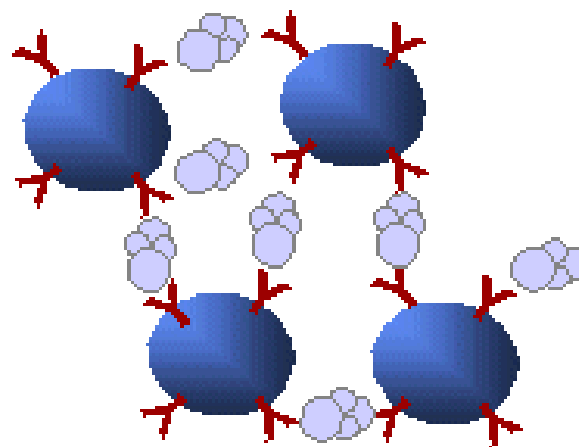
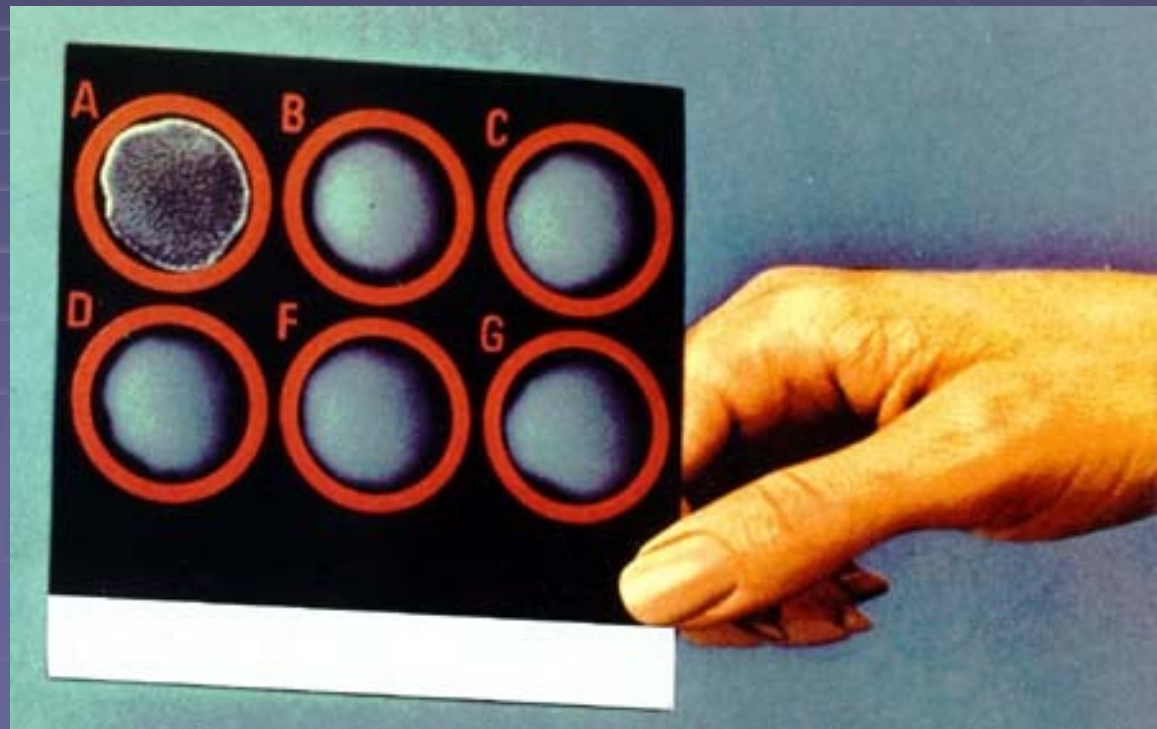


Figura 2b

Latexová aglutinace – prakticky

- Praktický test: lahvičky se směsí antibiotik a latexových částic, výsledek (pozitivita v prvním kolečku)



<http://www.medicine.uiowa.edu>

<http://www.pro-lab.com>

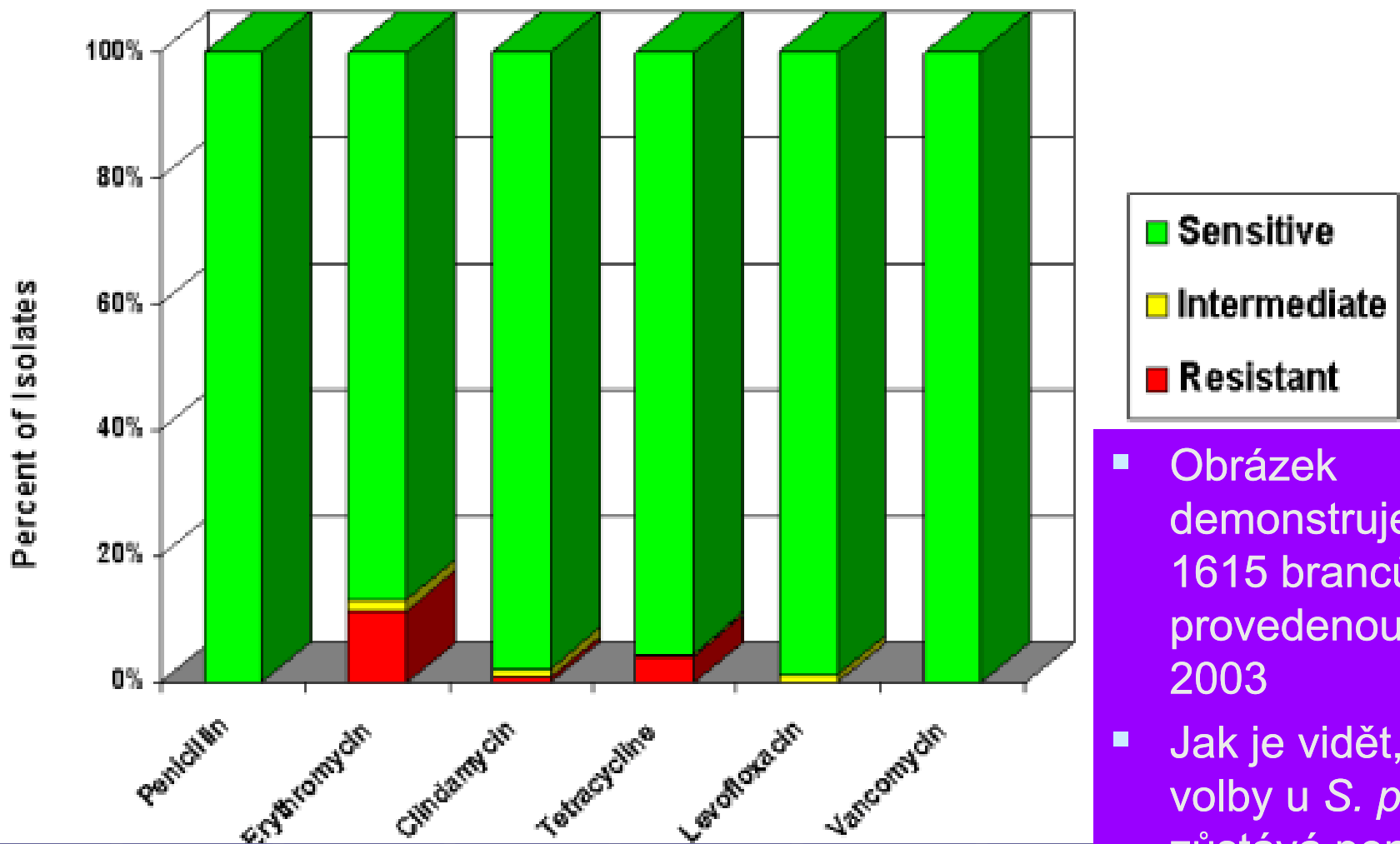
Léčba

- 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)

Antibiotika používaná na streptokoky

Antibiotikum	Zkratka
Penicilin (základní penicilin)	P
Cefalotin (cefalosporin 1. generace)	KF
Erytromycin (makrolid)	E
Klindamycin (linkosamid)	DA
Chloramfenikol	C
Doxycyklin (tetracyklin)	DO
Vankomycin (glykopeptid)	VA

Citlivost streptokoků na antibiotika



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

Skandální zjištění !!!

Streptococcus pyogenes je ještě horší, než jste možná čekali

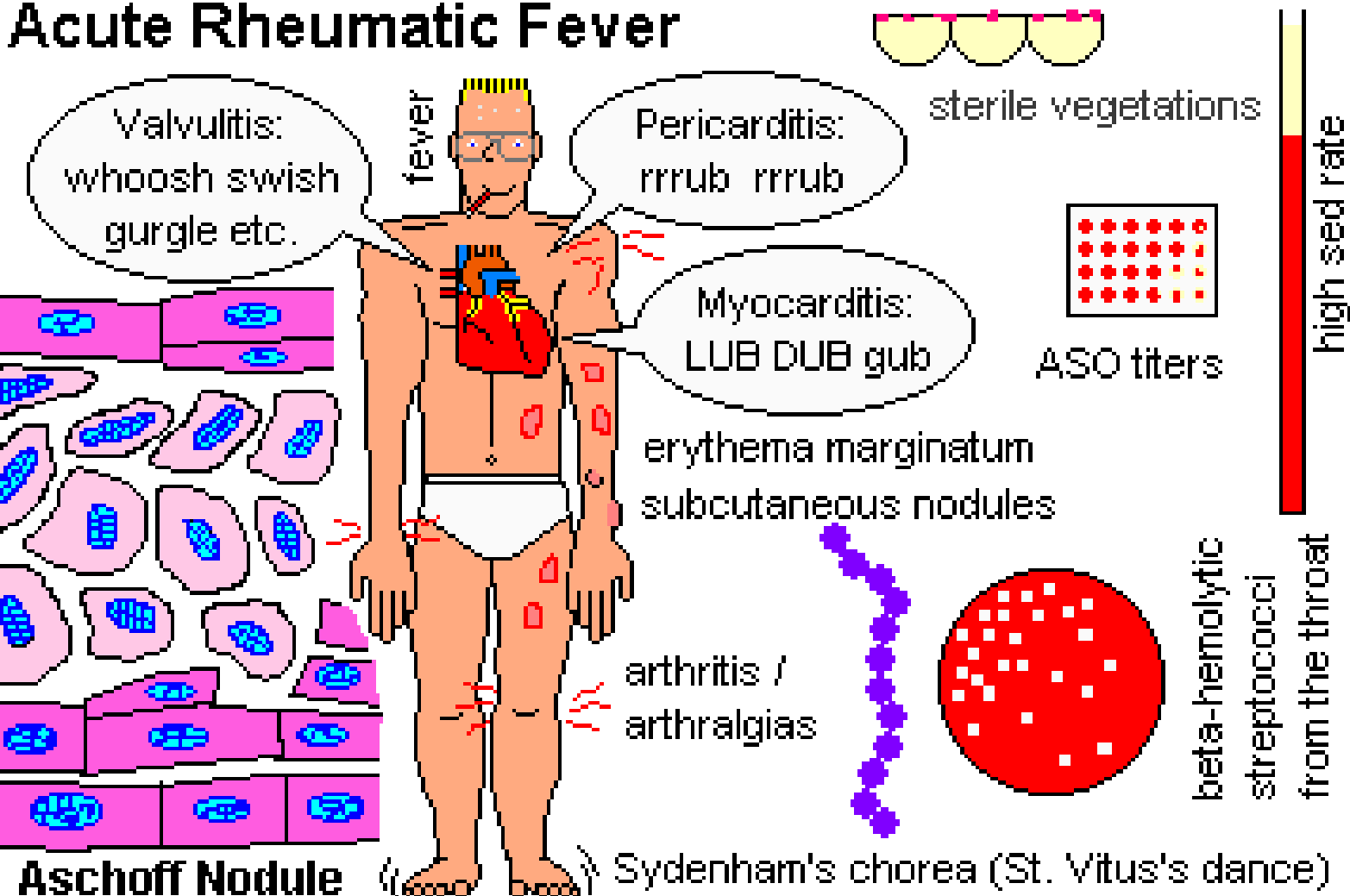
- Už víte, že *S. pyogenes* způsobuje angíny, spály, erysipel, flegmóny. To nejhorší však ještě čeká: I po té, co sám zmizí z organismu, může po něm zbýt děsivé dědictví! Protilátky proti němu kolují v krvi... a omylem se místo na streptokoky vážou na některé struktury organismu. Tím vzniká akutní glomerulonefritis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

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

Revmatická horečka

<http://mednote.co.kr>

Acute Rheumatic Fever



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

- Pomocí testu ASLO zjistíte, zda je přítomna normální protilátková odpověď, nebo přemrštěná autoimunita 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 (streptolyzinu 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.

Praktické odečítání ASLO

- Každý pacient má jeden řádek. Panel se odečítá naležato podle hodnotící tabulky.

Hodnocení výsledků ASLO

jam ka č.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
hod nota ml.j.	100	120	150	180	225	270	337	405	506	607	759	911

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

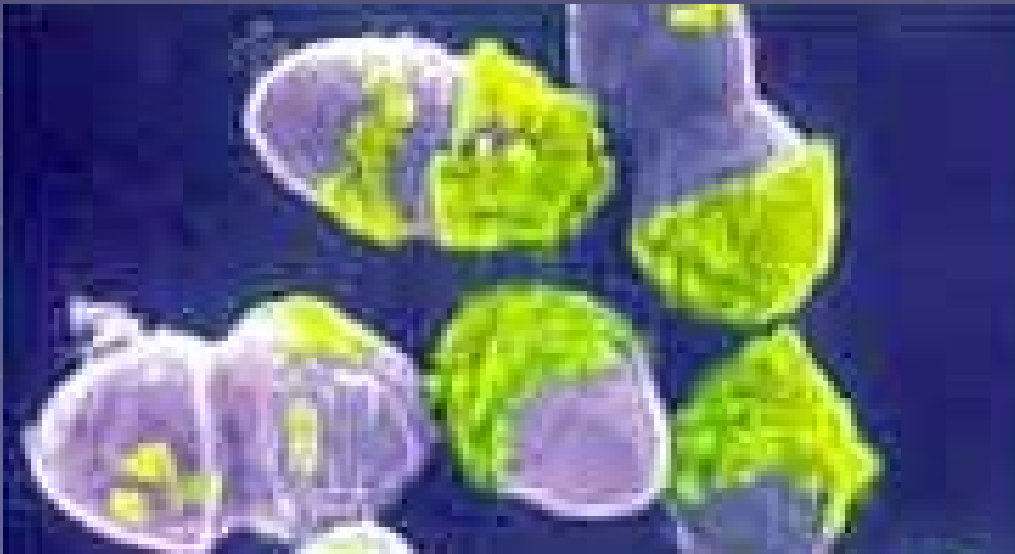


Základní a klinická charakteristika

- Enterokoky byly zařazeny do zvláštního rodu poté, co se zjistilo, že se **hodně liší od ostatních streptokoků**. Stejně jako streptokoky jsou **kataláza negativní**. Odlišují se tím, že snášejí např. žlučové soli, 6,5 % NaCl či vyšší teploty
- Jak název napovídá, vyskytují se **ve střevech obratlovců**. Mají i probiotický efekt (nepasterizovaná bryndza, obsahující enterokoky, je zdravá)
- Na druhou stranu jsou často i **patogeny**, zejména **v močových cestách**, ale i v ranách a v krevním řečišti (jako původci sepsí)

Přenos infekce

- Přenos nejčastěji **fekálně orální**, významné jsou endogenní infekce
- Mohou se stát i příčinou nozokomiální nákazy



<http://www.lbl.gov>

Léčba

- **Přítomnost ve střevě** se neřeší, je normální. V některých případech se ale zjišťuje citlivost na vankomycin, aby se ověřilo, zda nejde o tzv. VRE – vankomycin rezistentního enterokoka (to je podobně závažná záležitost jako MRSA)
- **Infekce lokalizované mimo střevo** se léčí antibiotiky; nezabírají tu ale vůbec cefalosporiny, a existuje i spousta dalších primárních i sekundárních rezistencí. U druhu *E. faecalis* je dobrý ampicilin, u *E. faecium* je ale nepoužitelný (primární rezistence). Rezervním antibiotikem (kromě VRE) je vankomycin, popř. teikoplanin

Příběh první

- 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 pálí. 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.

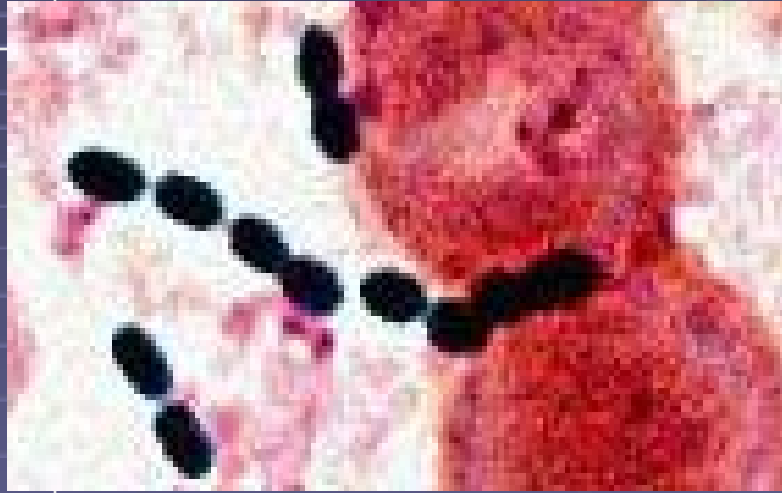
Pátráme po původci

- Původcem infekce 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
- Lékař zde chyboval – předepsal antibiotika bez kultivace moče; bohužel, enterokoky jsou na všechna cefalosporinová antibiotika primárně rezistentní. Navíc podcenil aseptický odběr moče.

Více o enterokokcích

- Dnes jich rozeznáváme desítky druhů
- Všechny mohou být nalézány
 - ve stolici (jako normální mikroflóra)
 - v močovém měchýři (jako patogeny)
 - v pochvě (asymptomaticky nebo symptomaticky)
 - občas i jinde (rány, krevní řečiště)
- Ze dvou nejběžnějších druhů *E. faecalis* bývá častěji patogenem, *E. faecium* je častěji součástí střevní mikroflóry
- Jeden z enterokoků, nalezený v Brně, má název *Enterococcus moraviensis*

Enterokok - popis

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

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

Enterokoky – vzhled kolonií

<http://microbiology.mtsinai.on.ca>



Diagnostika enterokoků

- 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

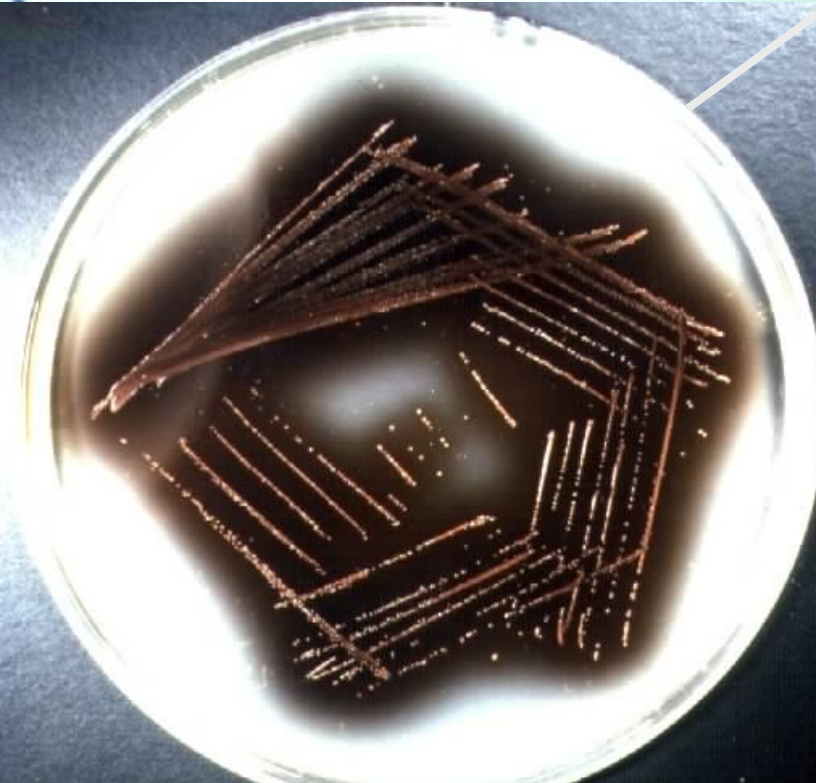


Foto:
www.medmicro.info
oba levé obrázky
fotografoval Prof.
MVDr. Boris
Skalka, DrSc.

Léčba pro zopakování ještě jednou

- 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 hematoonkologických pacientů objevují epidemiologicky závažné vankomycin rezistentní kmeny – VRE. Zde zabírá pouze nové antibiotikum – linezolid

Takhle dopadá snaha vyzrát na
enterokoka cefalosporinem...



4. Tyčinky

- *Listeria monocytogenes*

Základní charakteristika

- Grampozitivní tyčinky nejsou tak častými původci nemocí jako grampozitivní koky či gramnegativní tyčinky. Přesto jsou mezi nimi **některé výrazné patogeny**
- Jsou záludné tím, že **se na ně často nemyslí**, což komplikuje diagnostiku
- Více je uvedeno u jednotlivých rodů a druhů

Listeria monocytogenes

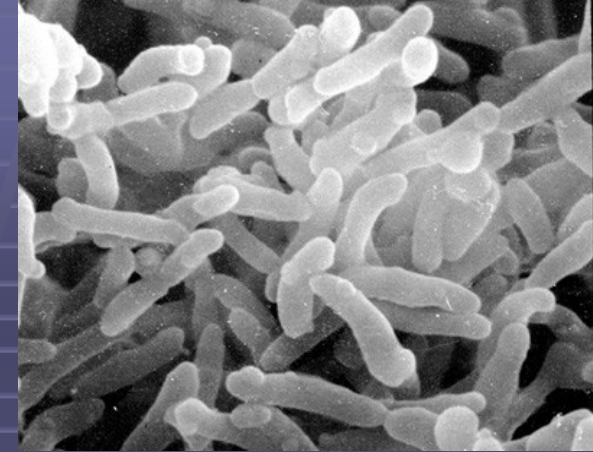


- Bakterie *Listeria monocytogenes* je grampozitivní tyčinka, která se vyznačuje schopností růst při nízkých teplotách a vysokých koncentracích NaCl, což je oboje splněno např. ve skladech sýrů
- Málokdy vyvolává viditelné infekce dospělých, snad s výjimkou uzlinového syndromu. Je však nebezpečná pro 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

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.
- Komisař nakonec v tomto případě vyhodnotil riziko jako malé a doporučil státům zákaz zrušit





Korynebakteria

- Korynebakteria jsou grampozitivní tyčinky uspořádané v palisádách (vysvětlení viz dále). Mohou být pleomorfní (různotvará), popřípadě i nekonstantně probarvená.
- Jen někdy jsou kyjovitého tvaru (koryné = kyj), typický je tento kyjovitý tvar pro *C. diphtheriae*, původce záškrtu

Palisády

- Palisádové uspořádání – má název dle raně středověkého kúlového opevnění. Tyčinky jsou v mikroskopu „nasázené“ vedle sebe jako ty kúly.



- Někdy se u korynebakterií popisuje také tzv. fenomén havraních křídel (dvě bakterie v těsné blízkosti, svírající vzájemně úhel asi 120°)

Klinická charakteristika

- *C. diphtheriae* vyvolává záškrť. Je to díky očkování vzácné onemocnění, charakterizované postižením hrtanu, ale někdy také mandlí či jiných částí dýchacích cest; vzniká otok, pacient se dusí a může i zemřít
- Ostatní, tzv. nedifterická (= nezáškrťová) korynebakteria jsou součástí běžné flóry na kůži, ale někdy mohou i škodit. Nejvýznamnější z těchto korynebakterií je *Corynebacterium jeikeium*. Původně se mu říkalo „korynebakterium skupiny JK“. Může způsobovat (častěji než ostatní) infekce ran a sepse

Záškrť



Příběh druhý



- Pan Bércoun je diabetik, chronický pacient, nyní léčen pro bércové 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 bércového vředu pana Bércouna vykultivuje tentokrát.

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

Rod *Bacillus*: Příběh třetí



- Sestřička Blaženka se zděsila: přišly výsledky stěrů z nemocničních 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...

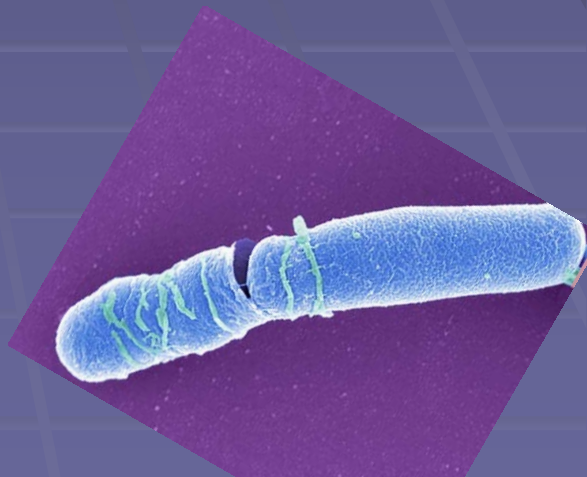
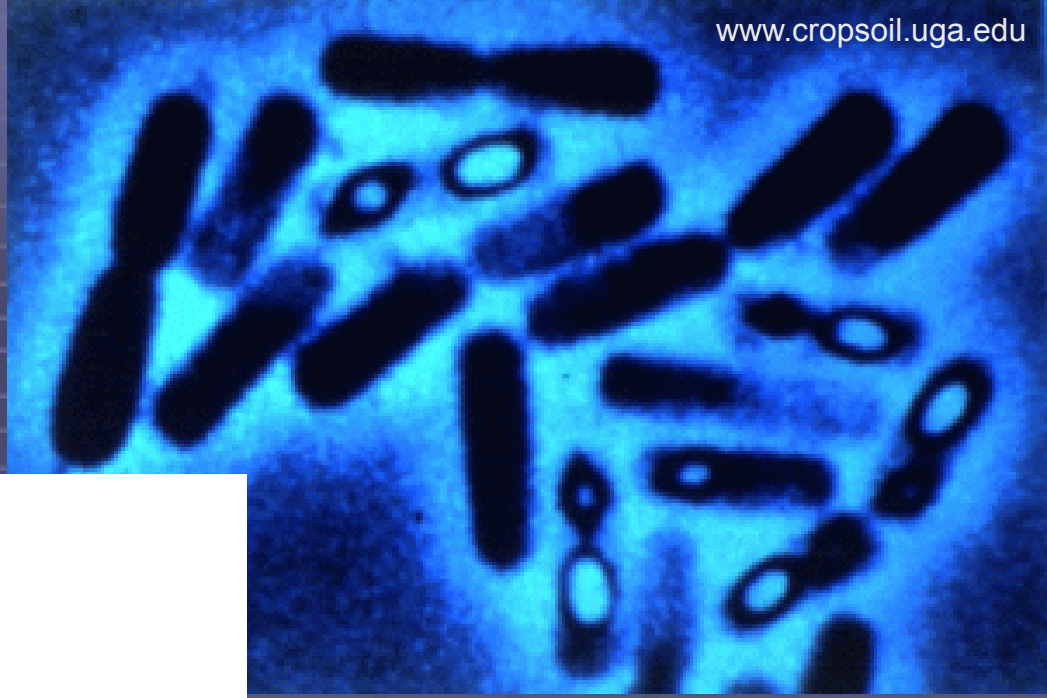
Mlýnský kámen spadl z dobrého srdíčka sestry Blaženky

- 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 přežít při velmi vysokých teplotách používají jako indikátory účinnosti sterilizátorů



Popis pachatelů

	Listerie	Korynebakteria	Bacillus
Mikroskopie	G+ tyčinky řetězíci se jako špekáčky, ale někdy i vedle sebe jako další	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

Z dalších G+ tyčinek:

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

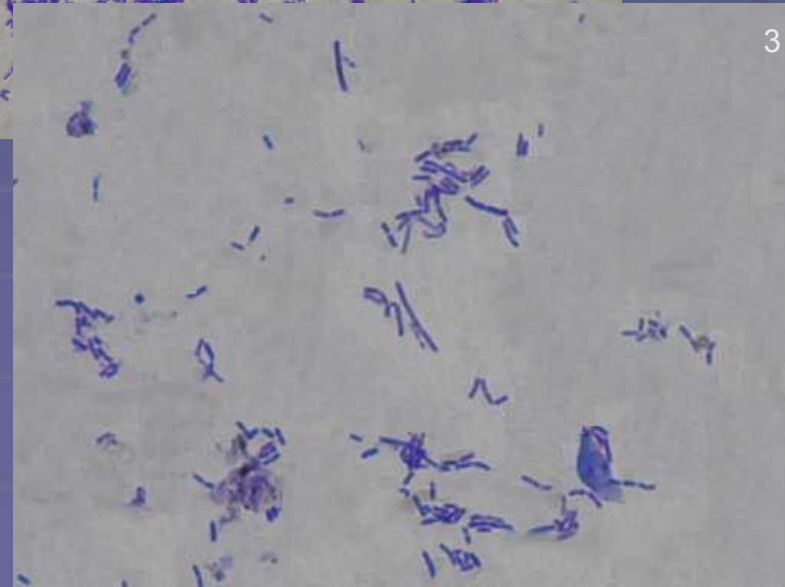
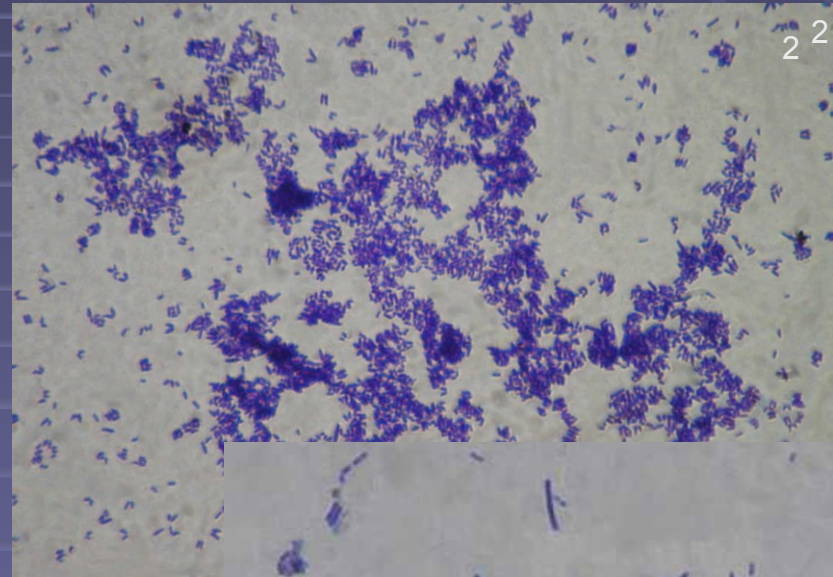
Tvary tyčinek

1, 2, 3 www.medmicro.info

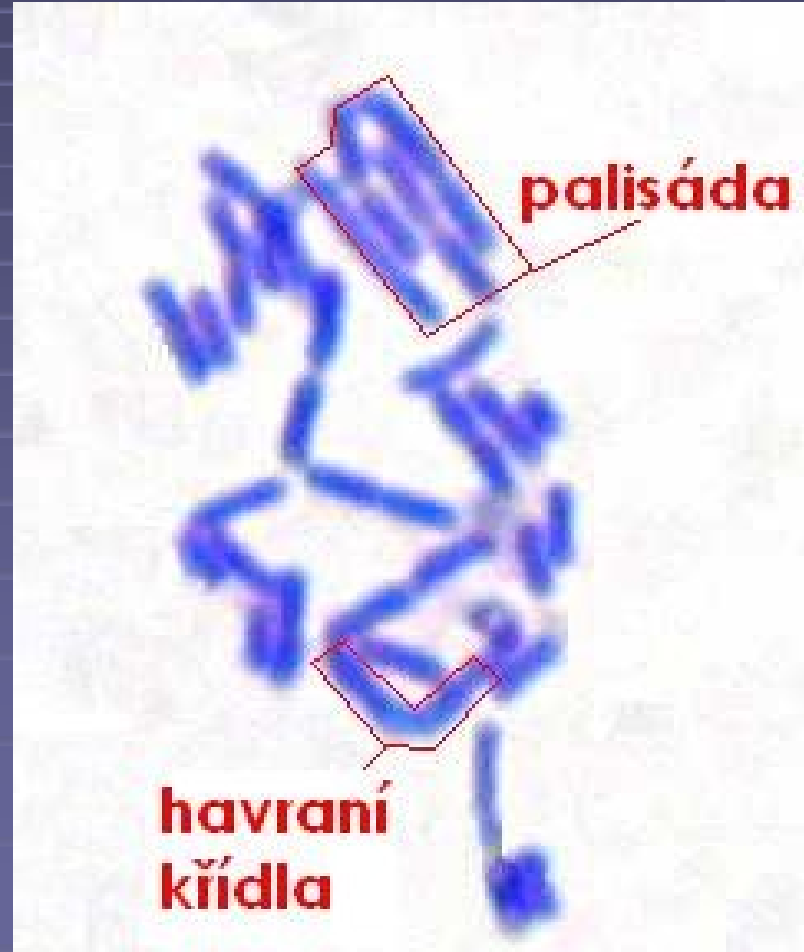
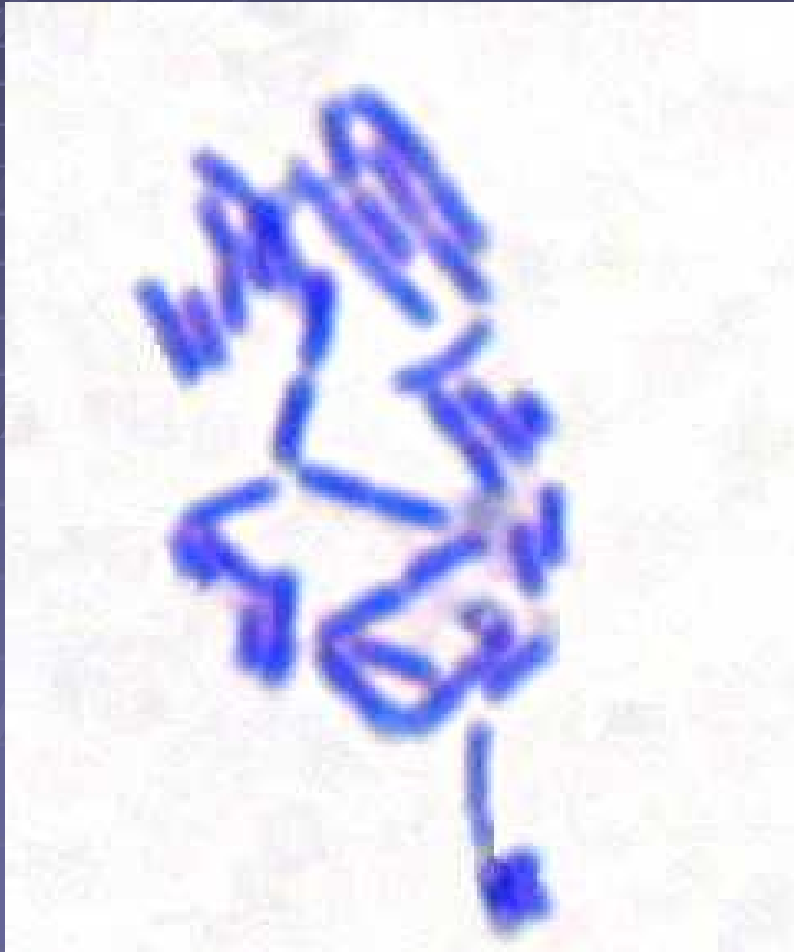
4 <http://medinfo.ufl.edu>

Corynebacterium Gram

Listeria – KA, gram



Uspořádání korynebakterií



Morfologie dalších tyčinek

Bacillus cereus



Arcanobacterium haemolyticum

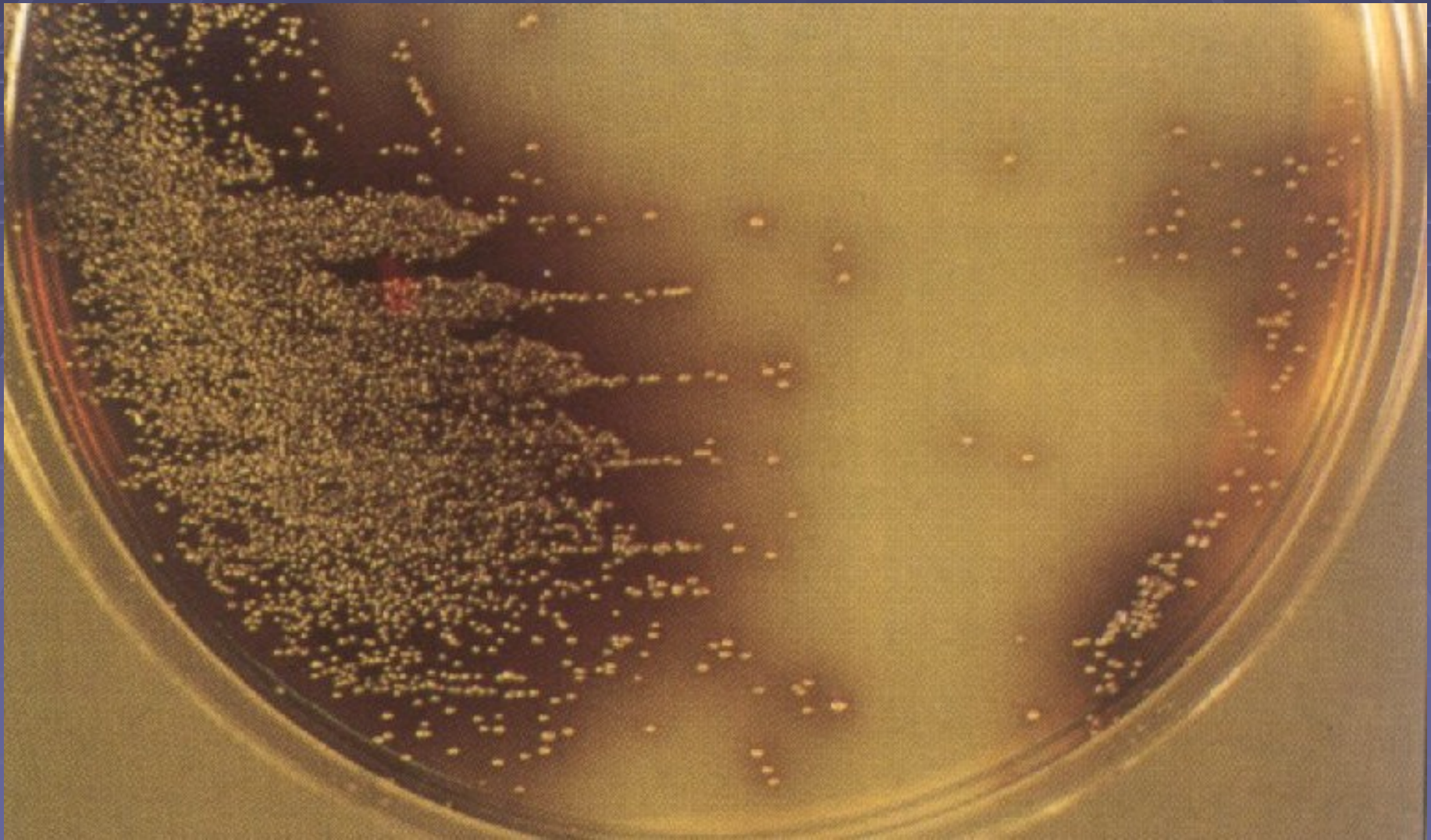


Bacillus subtilis



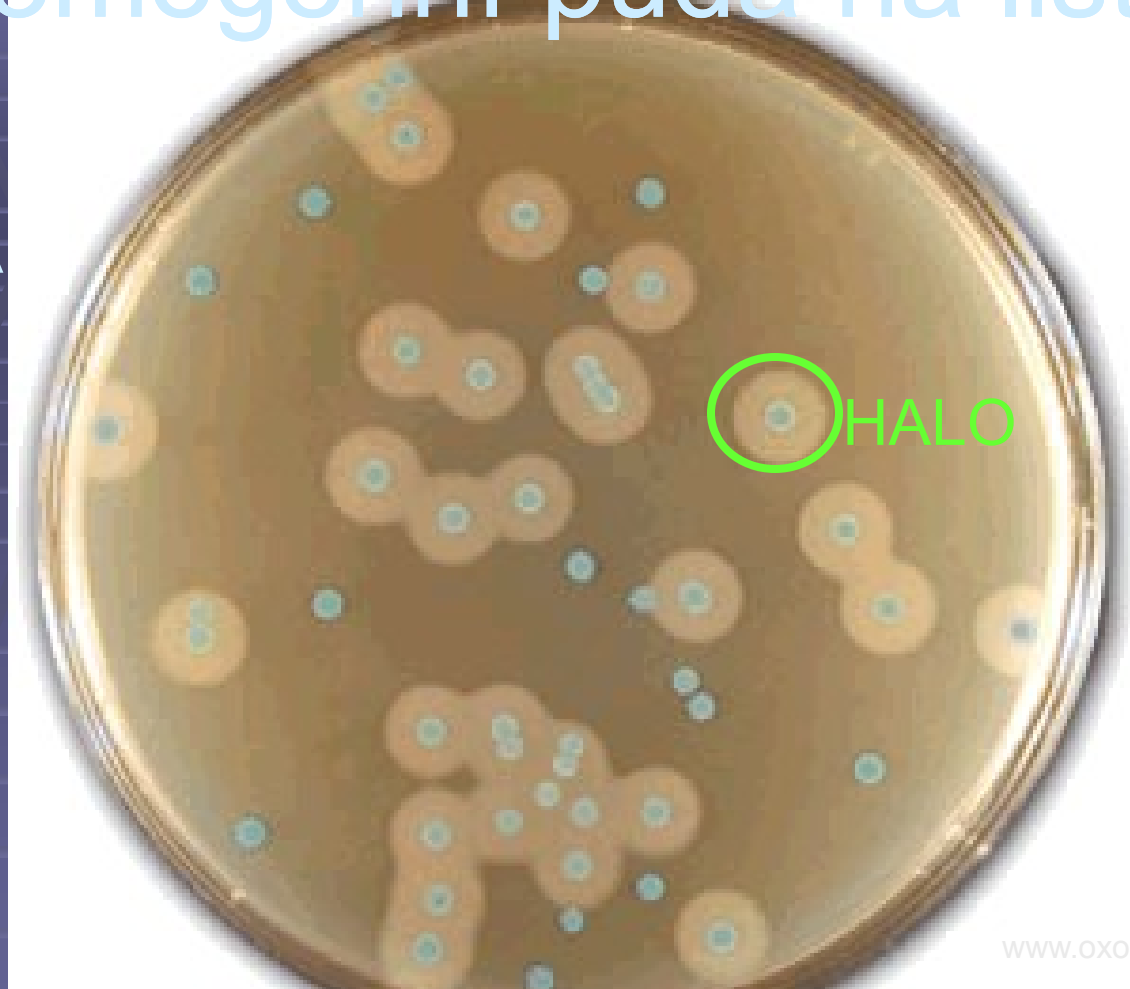
Žluč-eskulinový agar

<http://www.geocities.com>



Chromogenní půda na listerie

ALOA



www.oxid.com

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

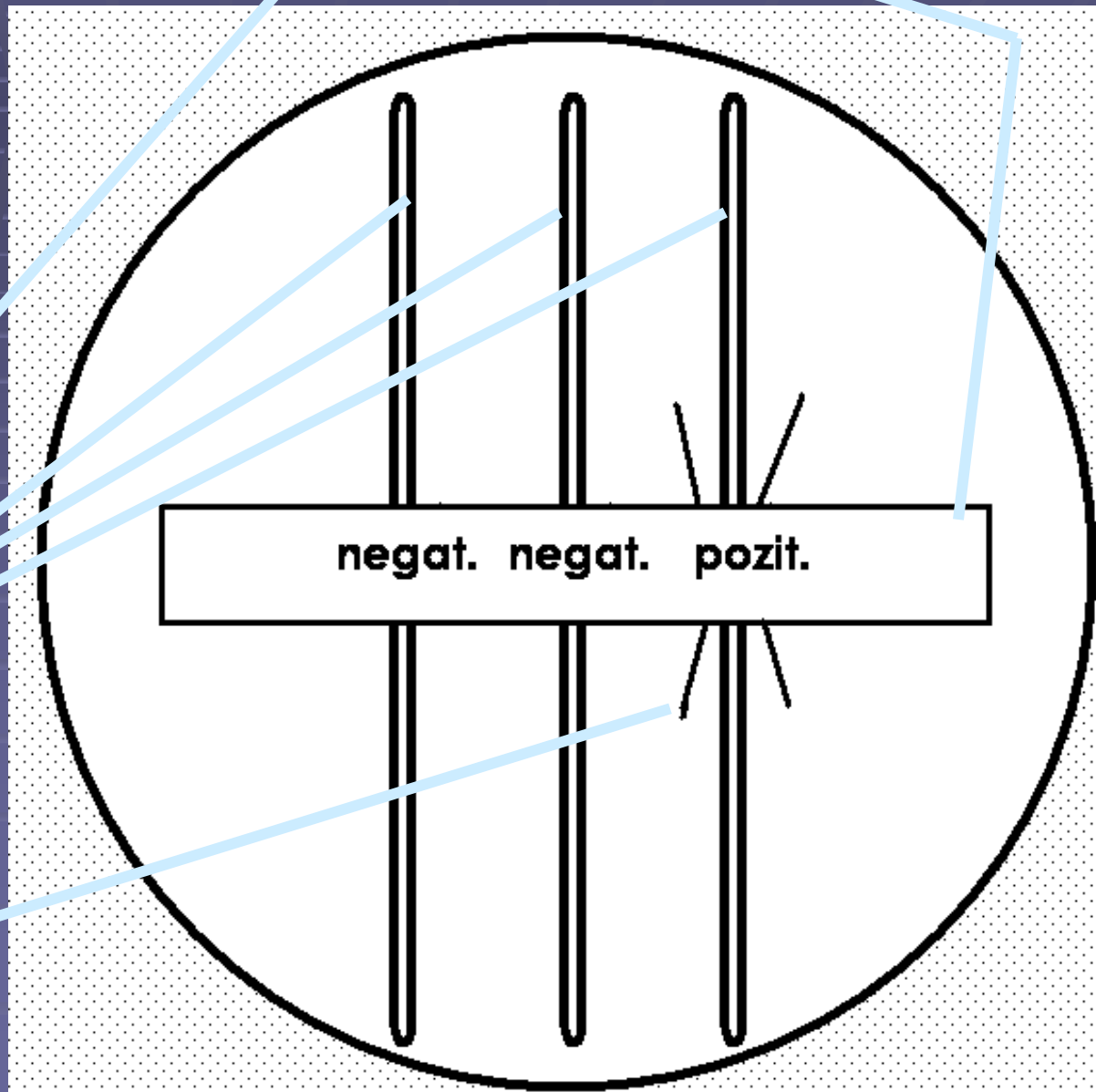
Elekův test

Jde o detekci toxinu *Corynebacterium diphtheriae*.

Používáme papírek se specific.

antitoxinem, který je položen na povrch agaru, poté se očkují testované kmeny.

Pozitivní výsledek = precipitační linie.

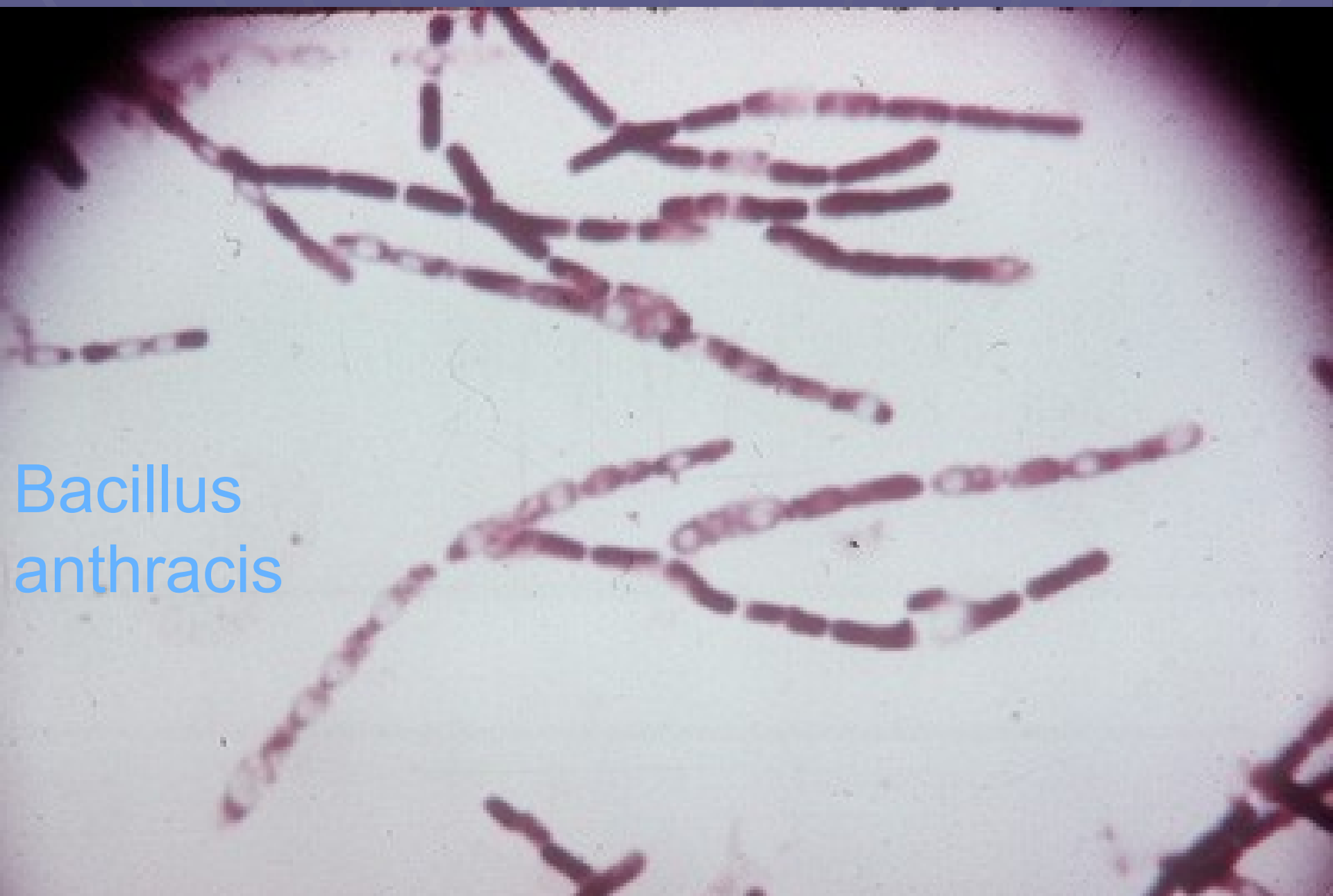


Vhodná antibiotika

Antibiotikum	Zkratka
Ampicilin (rozšířený penicilin)	AMP
Ko-amoxicilin (aminopenicilin + inhibitor)	AMC
Co-trimoxazol (směs dvou látek)	SXT
Tetracyklin (tetracyklin)	TE
Chloramfenikol	C
Vankomycin (glykopeptid)	VA

Děkuji za pozornost

<http://www.cdphe.state.co.us>



Bacillus
anthracis