

Lékařská mikrobiologie pro ZDRL

**Týden 17:
Přehled grampozitivních bakterií**



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**

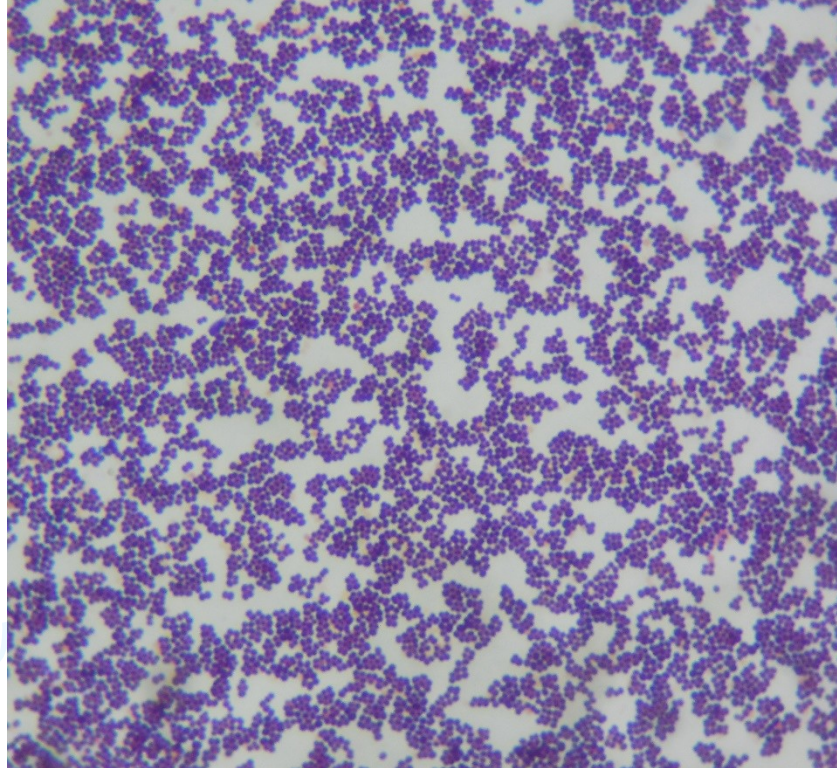
- Rod *Staphylococcus* (a další kataláza pozitivní koky)
- Rod *Streptococcus* (a další kataláza negativní koky)
- Rod *Enterococcus*

- **Tyčinky**

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

1. Stafylokoky

Stafylokoky: *název z řeckého staphylé*
= *hrozen*



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

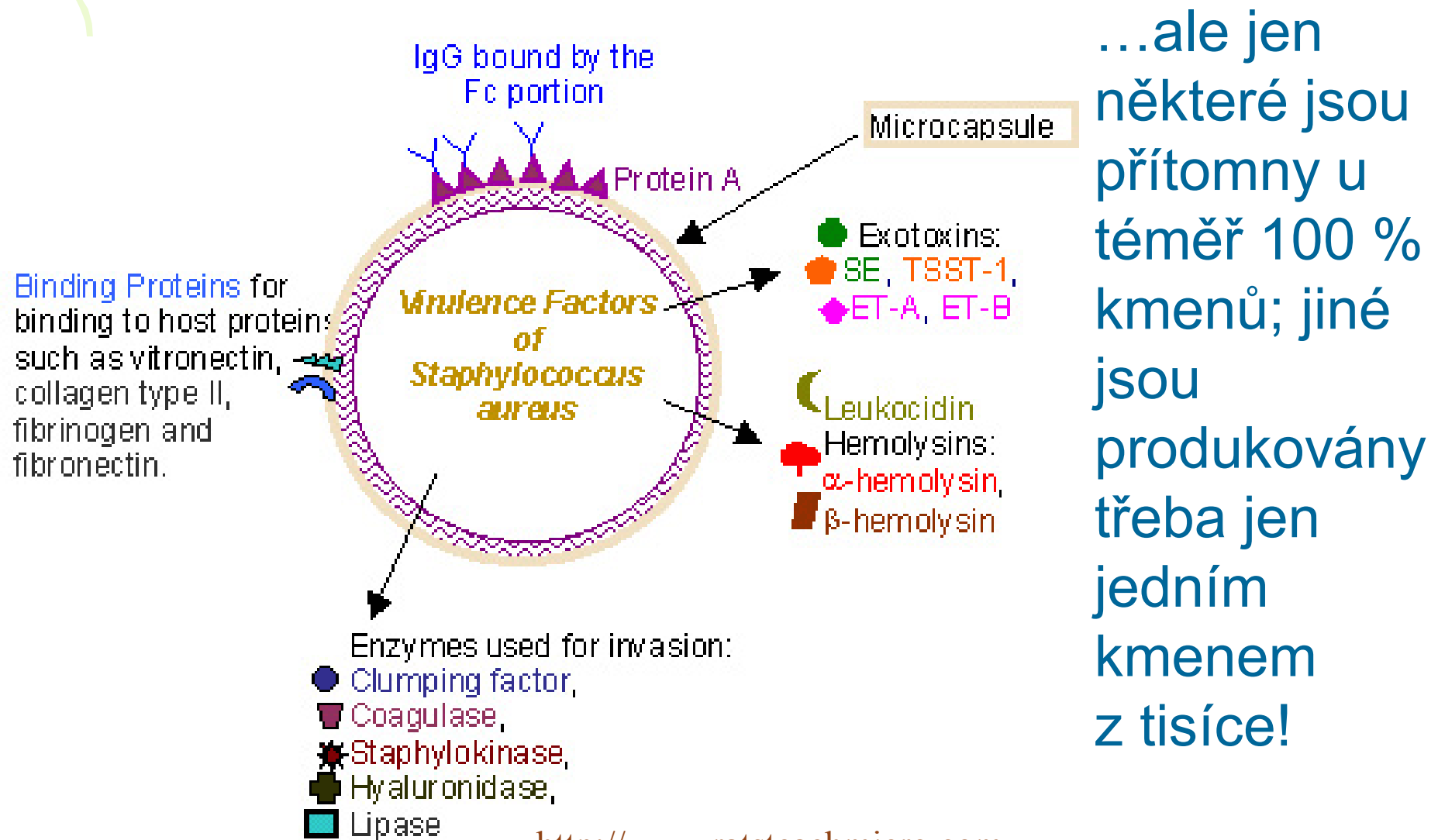
Léčba

- 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

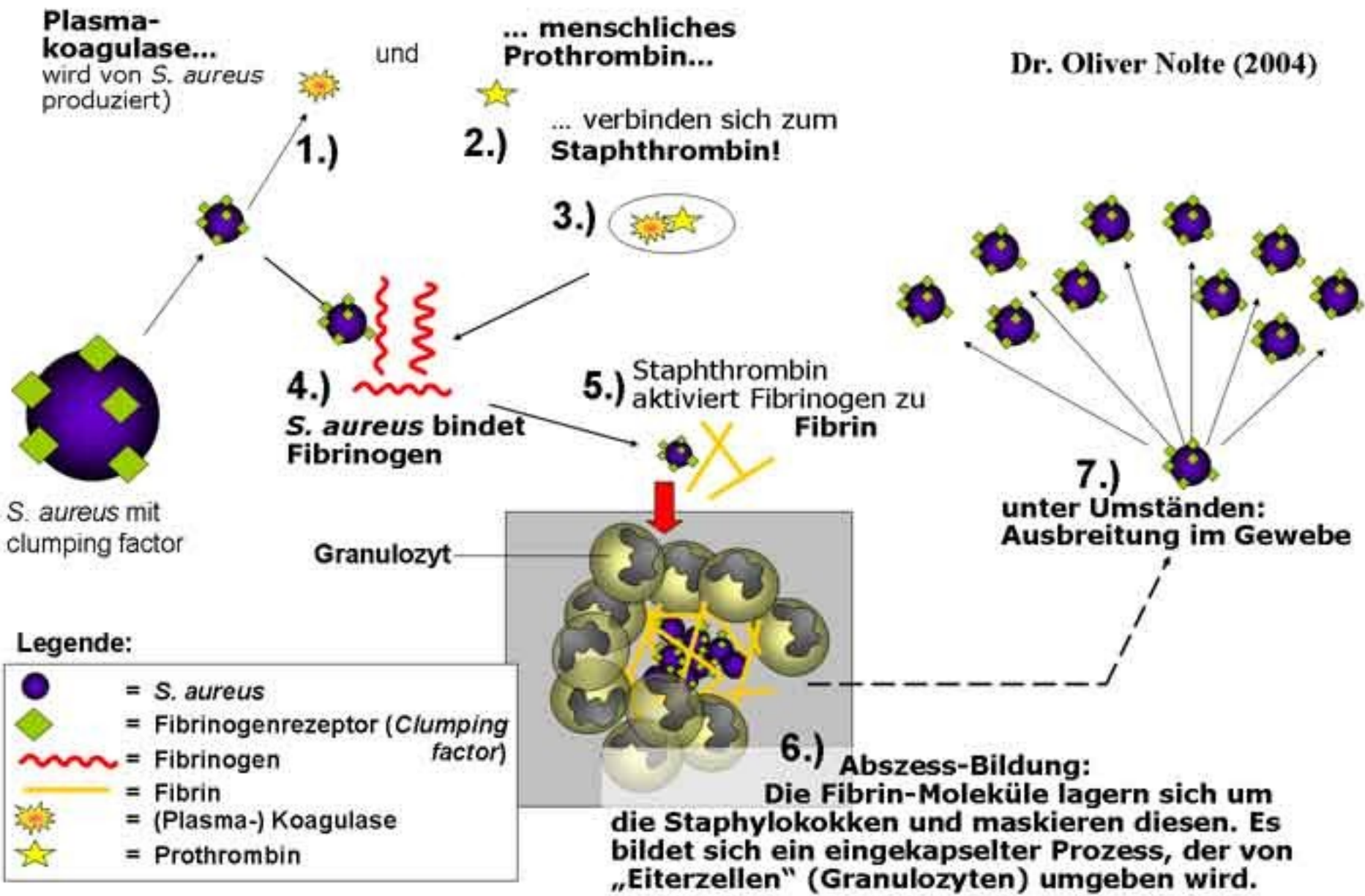
Faktorů virulence, nalézáných u *S. aureus*, je veliké množství...



...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 neopouzdržené flegmóny, tvoří stafylokoky spíše opouzdržené 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...



<http://www.adhb.govt.nz/newborn/TeachingResources/Dermatology/BullousImpetigo/BullousImpetigo3.jpg>

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



...či infekce kůže s krustami...

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



...ale také např. mozkové abscesy

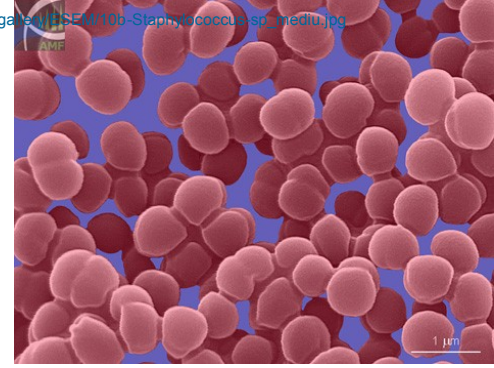


Některé vzácné komplikace: Příběh

- 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, začal **zvracet a dostal průjem**. Volá přítelkyni – ta má ale pochopení, je na tom stejně... Romantické odpoledne se nekoná...

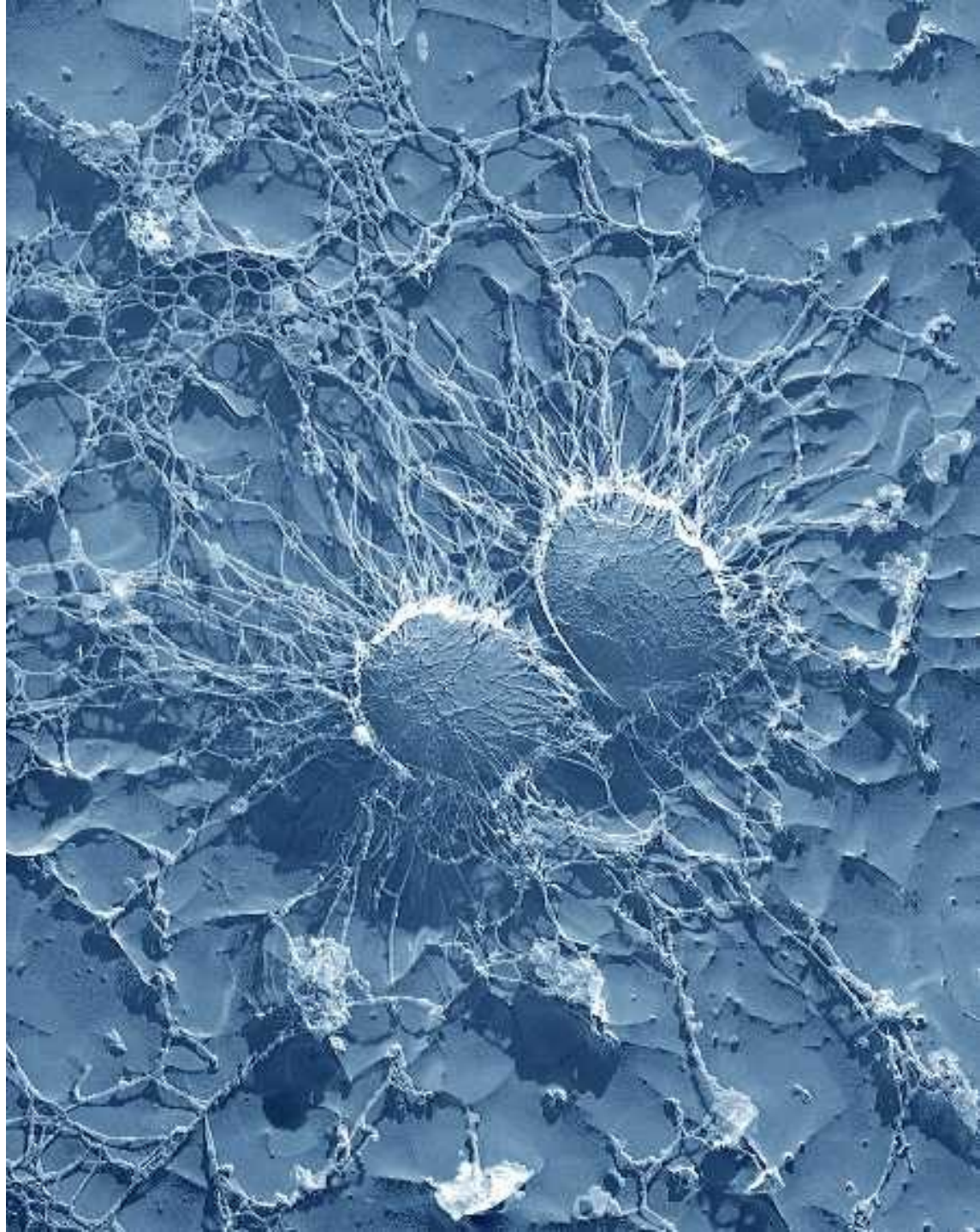


Rozbor případu



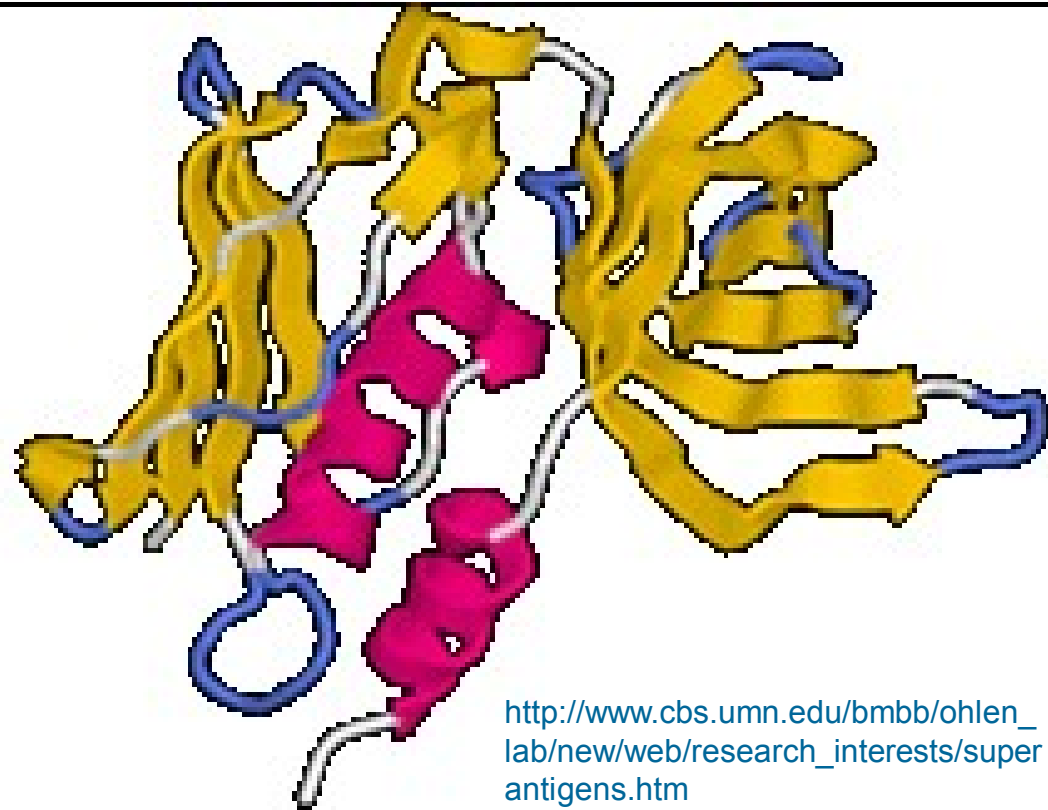
- Chorobu způsobil kmen zlatého stafylokoka *Staphylococcus aureus*. Tento „zlatý stafylokok“ s oblibou způsobuje hnisavé infekce kůže, chlupů, vousů apod.
- Některé kmeny (zřejmě i kmen z našeho příběhu) produkují enterotoxiny, které fungují jako tzv. superantigeny
- Intoxikace bakteriálním toxinem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

- Desettisíkrát
zvětšený zlatý
stafylokok
v elektronovém
mikroskopu



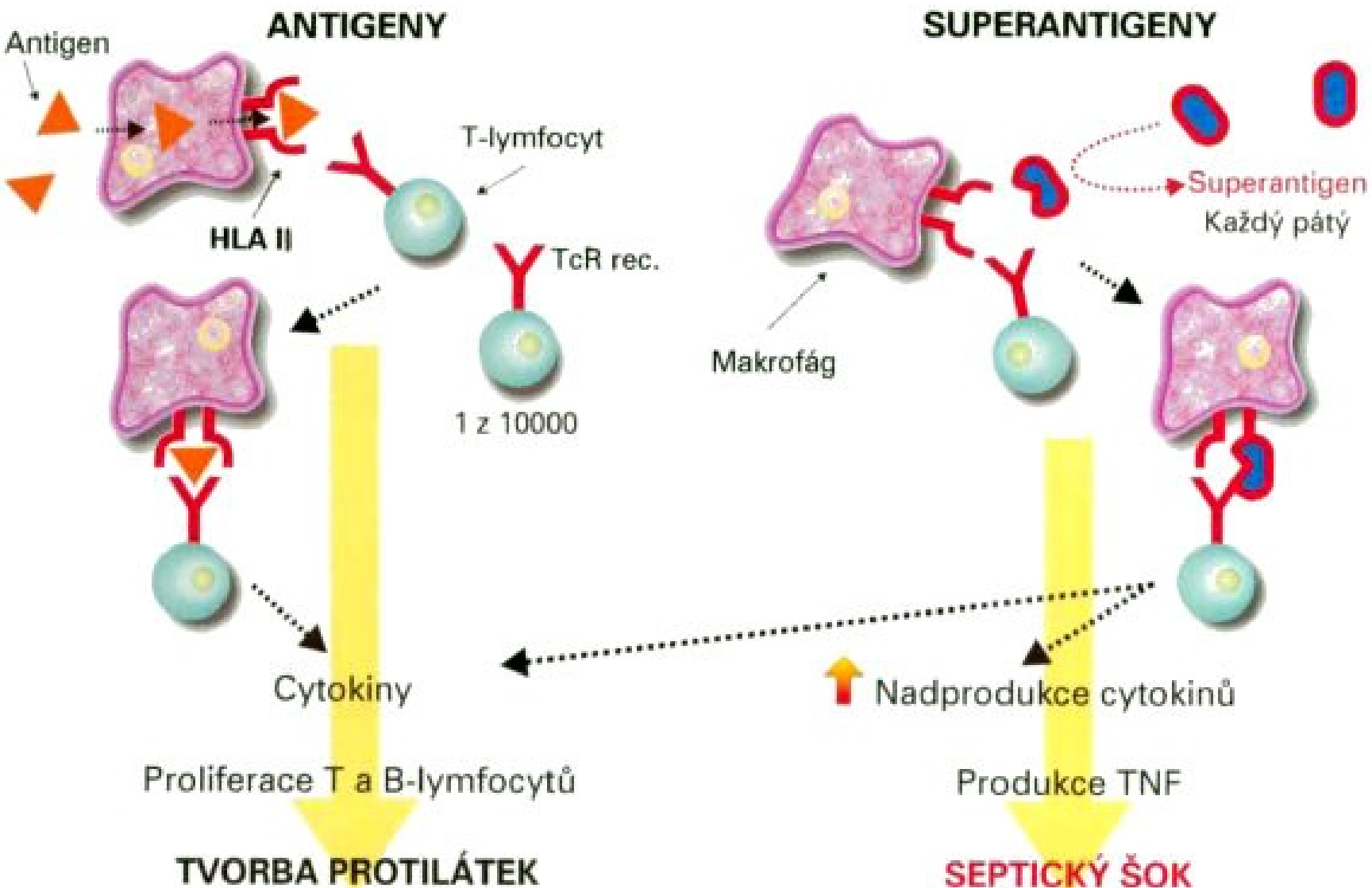
Syndrom toxického šoku

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



Superantigeny

Imunitní odpověď



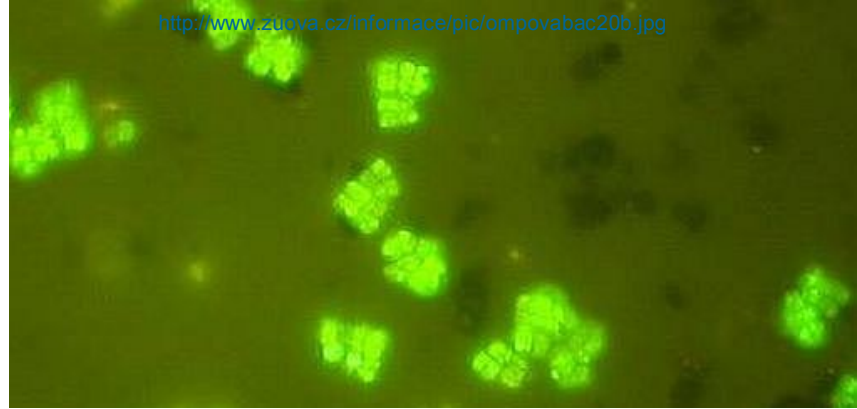
Koaguláza negativní stafylokoky

- 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*; dnes je známo více jak čtyřicet druhů a poddruhů
- Proč říkáme koaguláza negativním stafylokokům koaguláza negativní? Dozvíte se za chvíli...

Koaguláza negativní stafylokoky – klinický význam

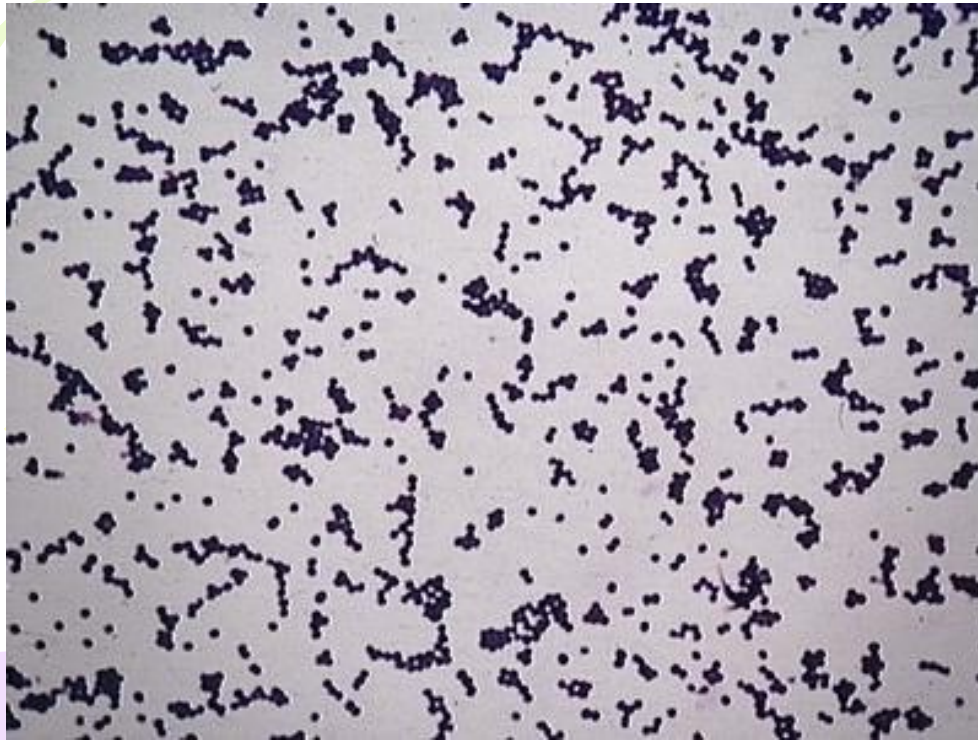
- Jsou hlavní součástí běžné bakteriální mikroflóry kůže.
- Mohou být ale původci močových infekcí, případně i infekcí ran, katetrových sepsí aj.
- V poslední době jsou velice významnými původci infekcí u oslabených osob, zejména nemocničních
- Jejich nález se tedy hodnotí jinak např. ve výtěru v nosu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

Příběh



- 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.difossombrone.it>

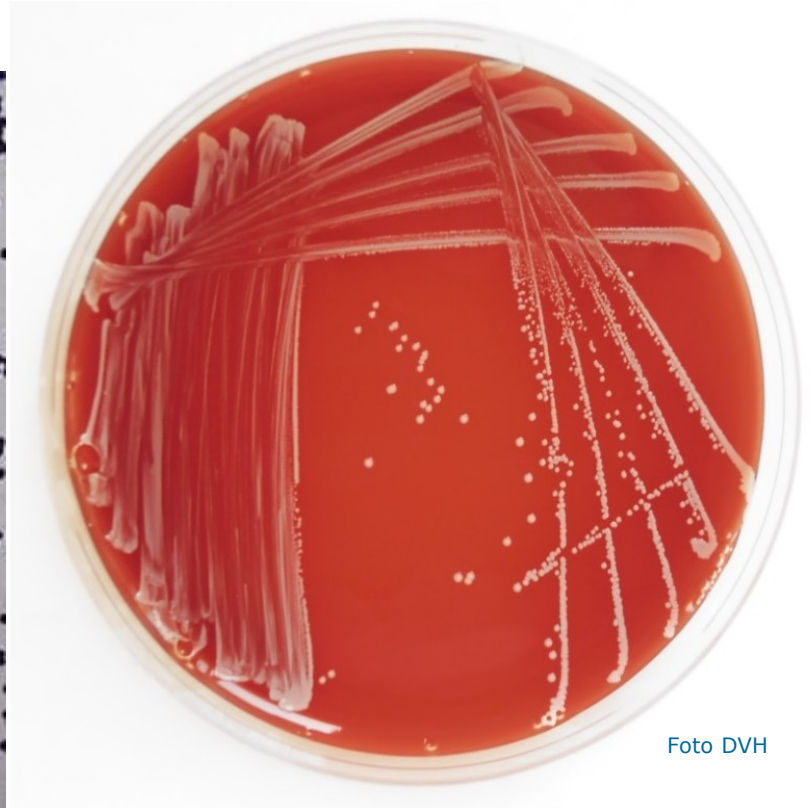
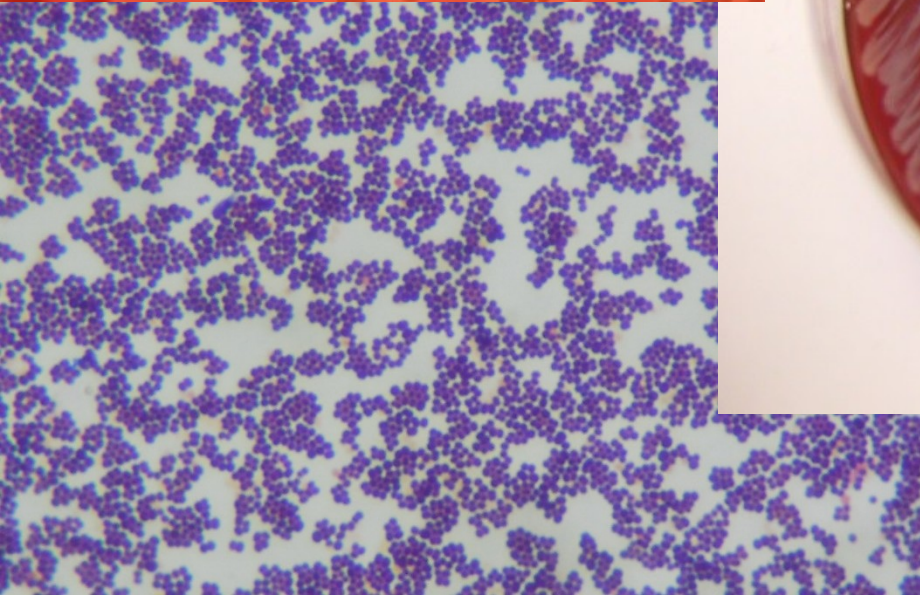
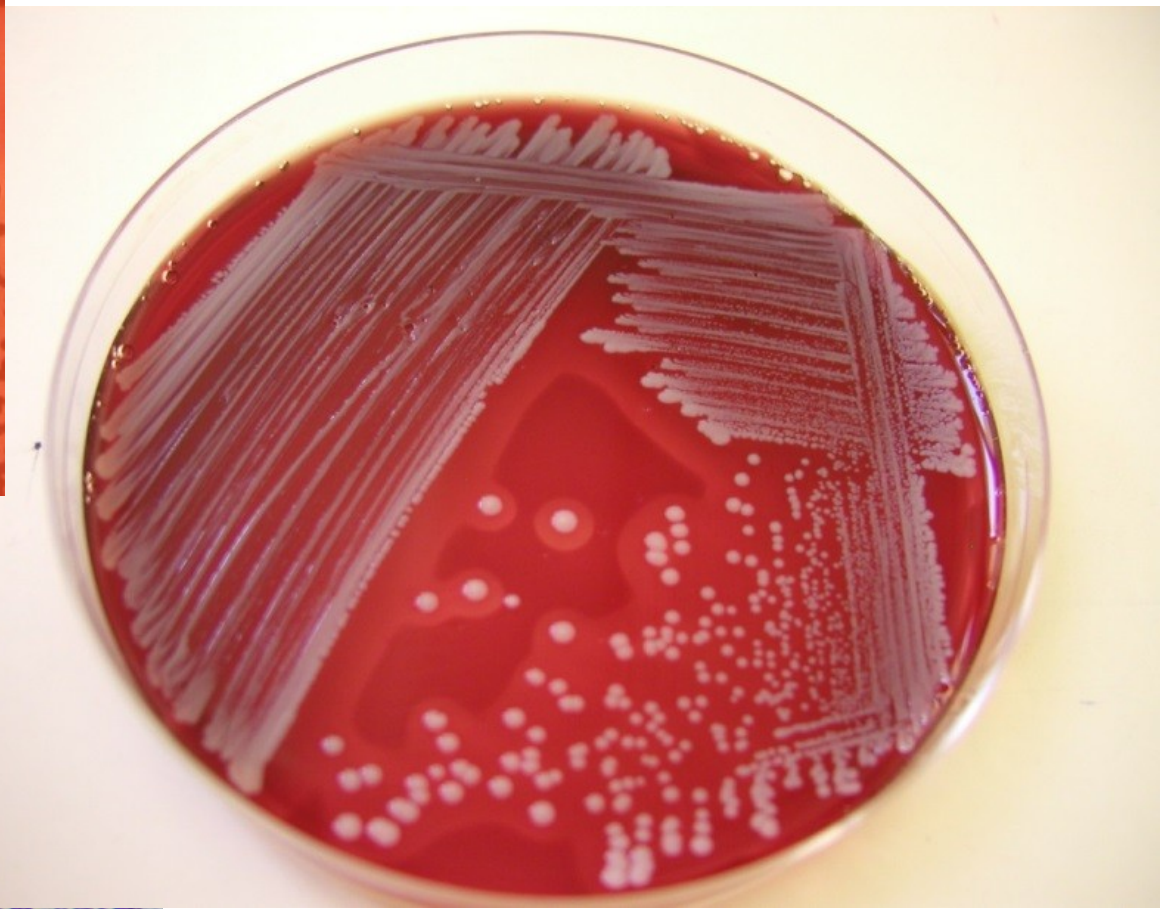
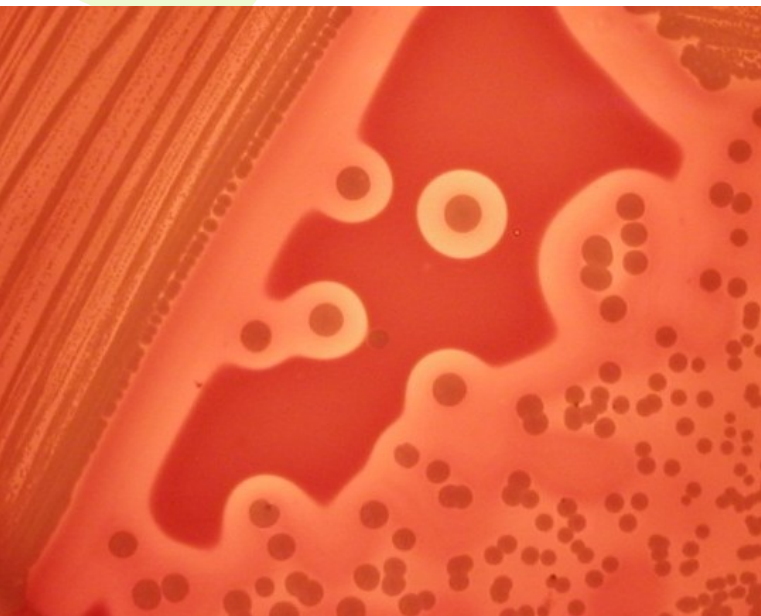


Foto DVH

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

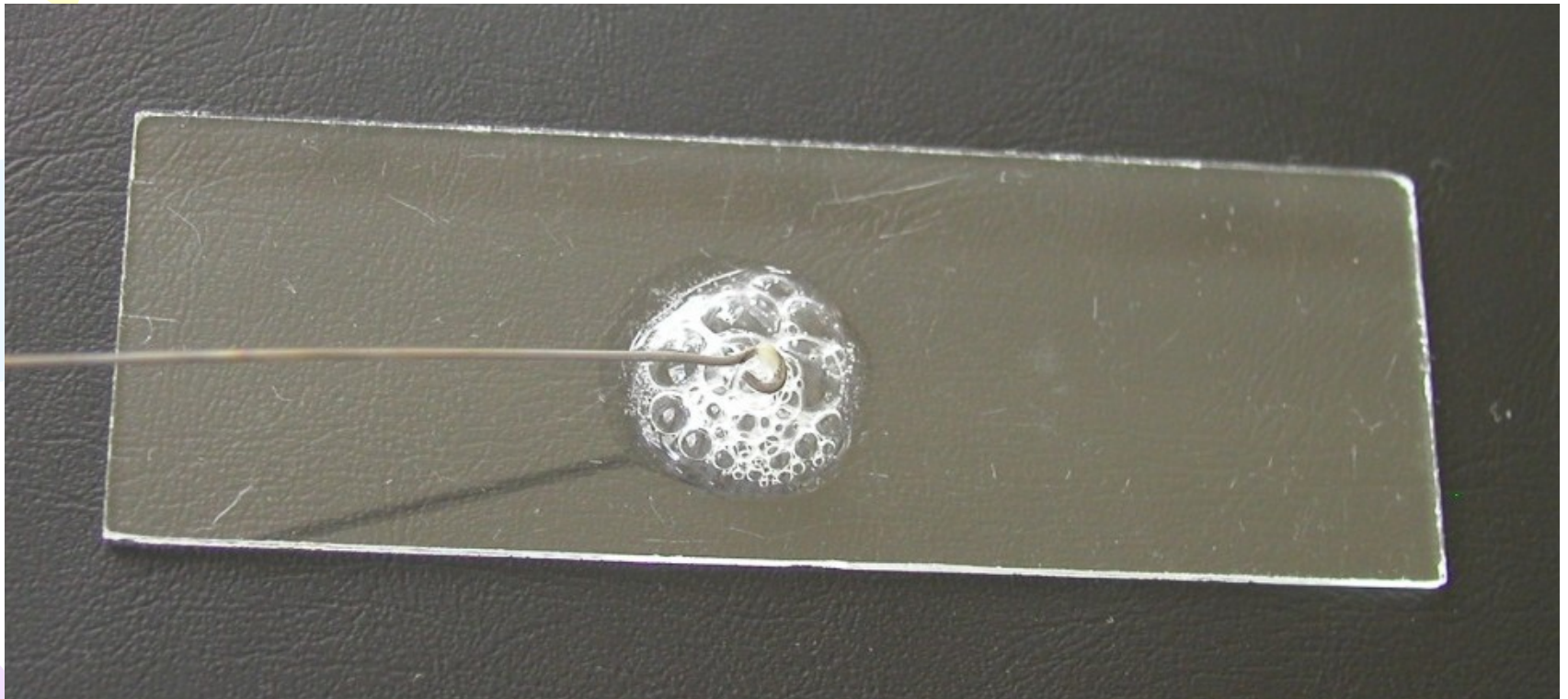
Fotografie stafylokoků



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



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

Volná koaguláza – klasika

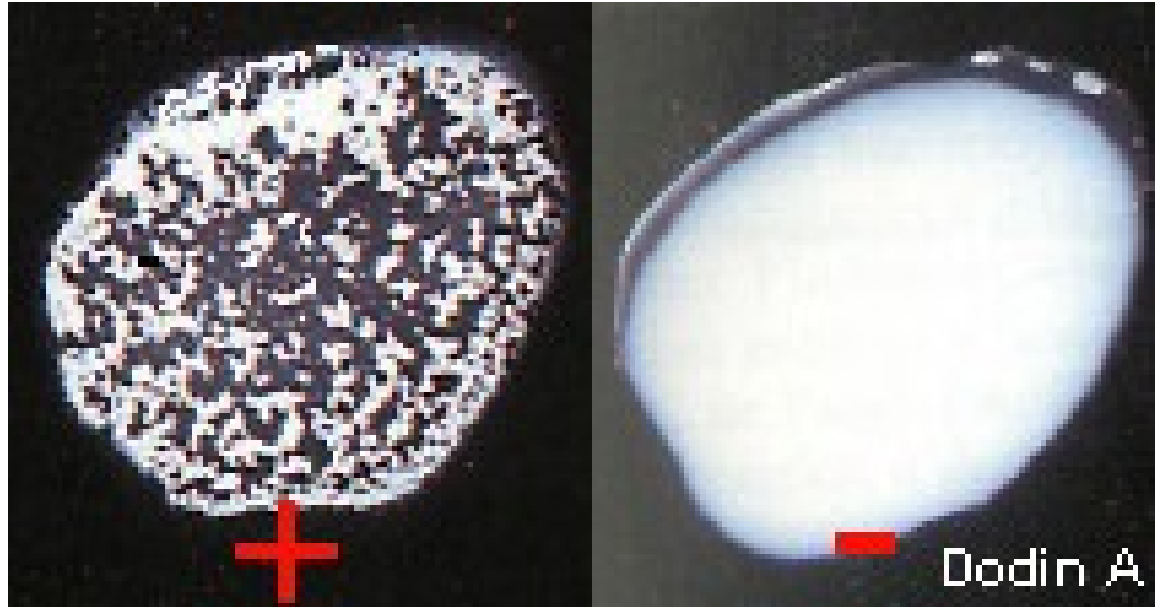
- Nejklasičtější z testů pro odlišení zlatého stafylokoka (koaguláza pozitivního stafylokoka)
- Kličkou nabrané kolonie vmícháme do králičí plasmy ve zkumavce
- Pokud plasma koaguluje (má konzistenci želé), je kmen koaguláza pozitivní

Na obrázku je vidět pozitivní kmen, kdy plasma změnila konzistenci na „želé“, a pod ním dva kmeny negativní (zůstaly tekuté)



Komerční testy, např. Staphaurex

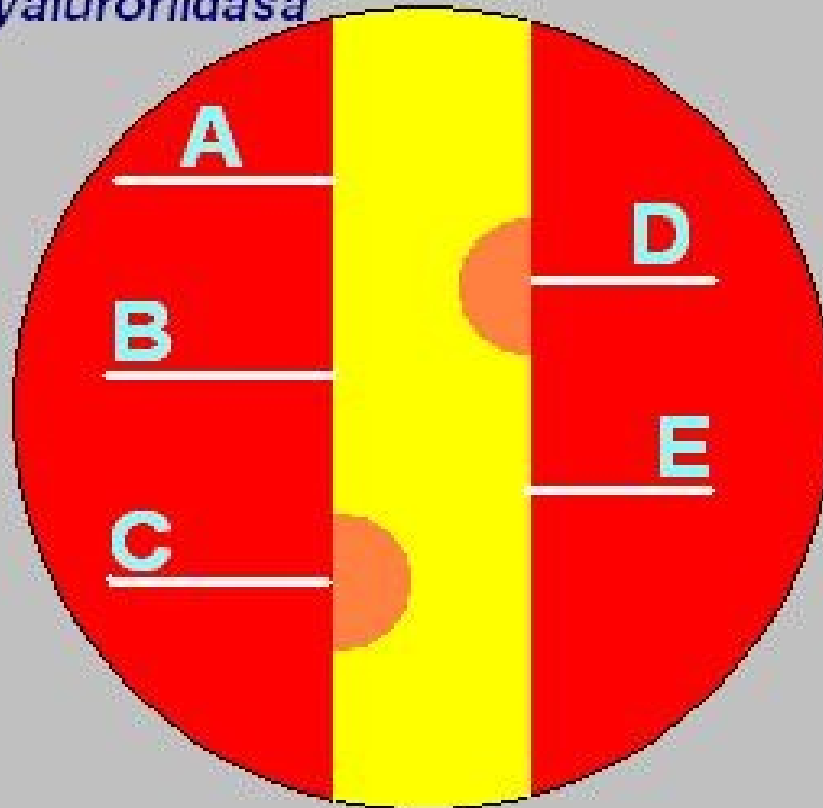
- Provedením připomínají clumping factor, ale jsou spolehlivější než volná plasmakoaguláza



Hyaluronidáza (test dekapulace)

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

Hyaluronidasa



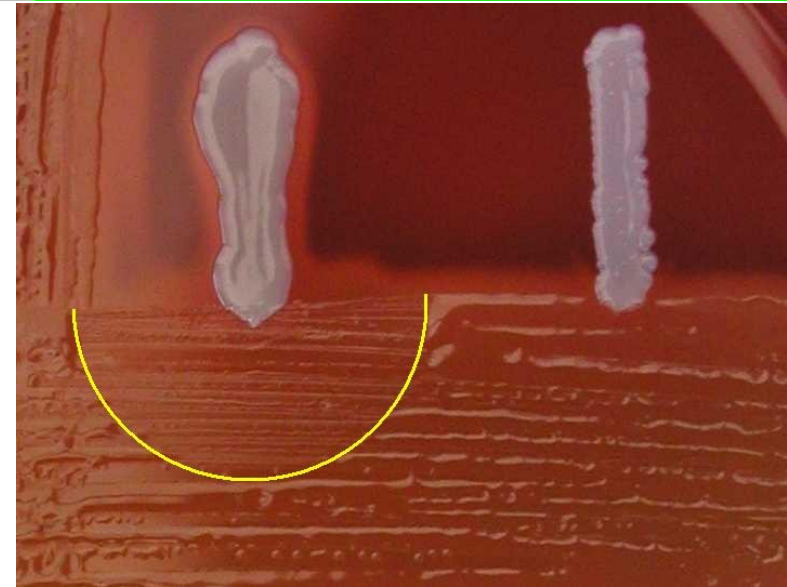
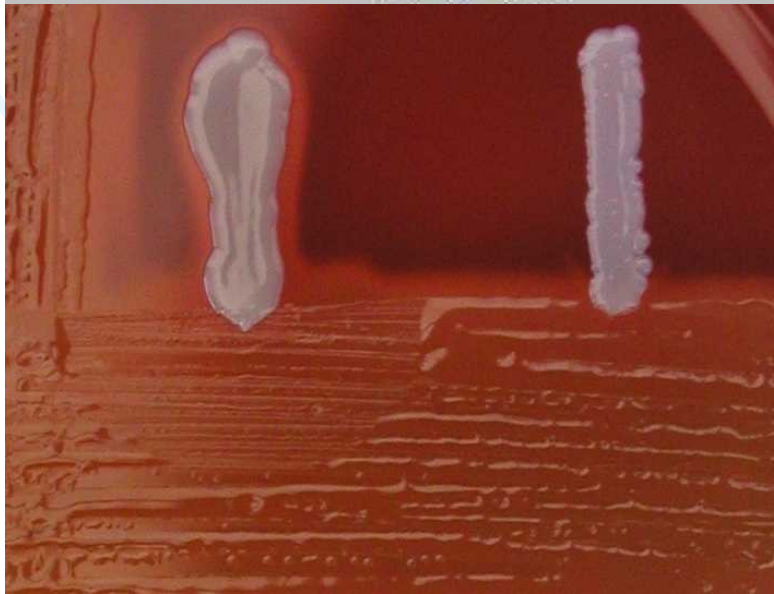
Žlutě "soplovitý" nárůst,
oranžově suché kolonie.

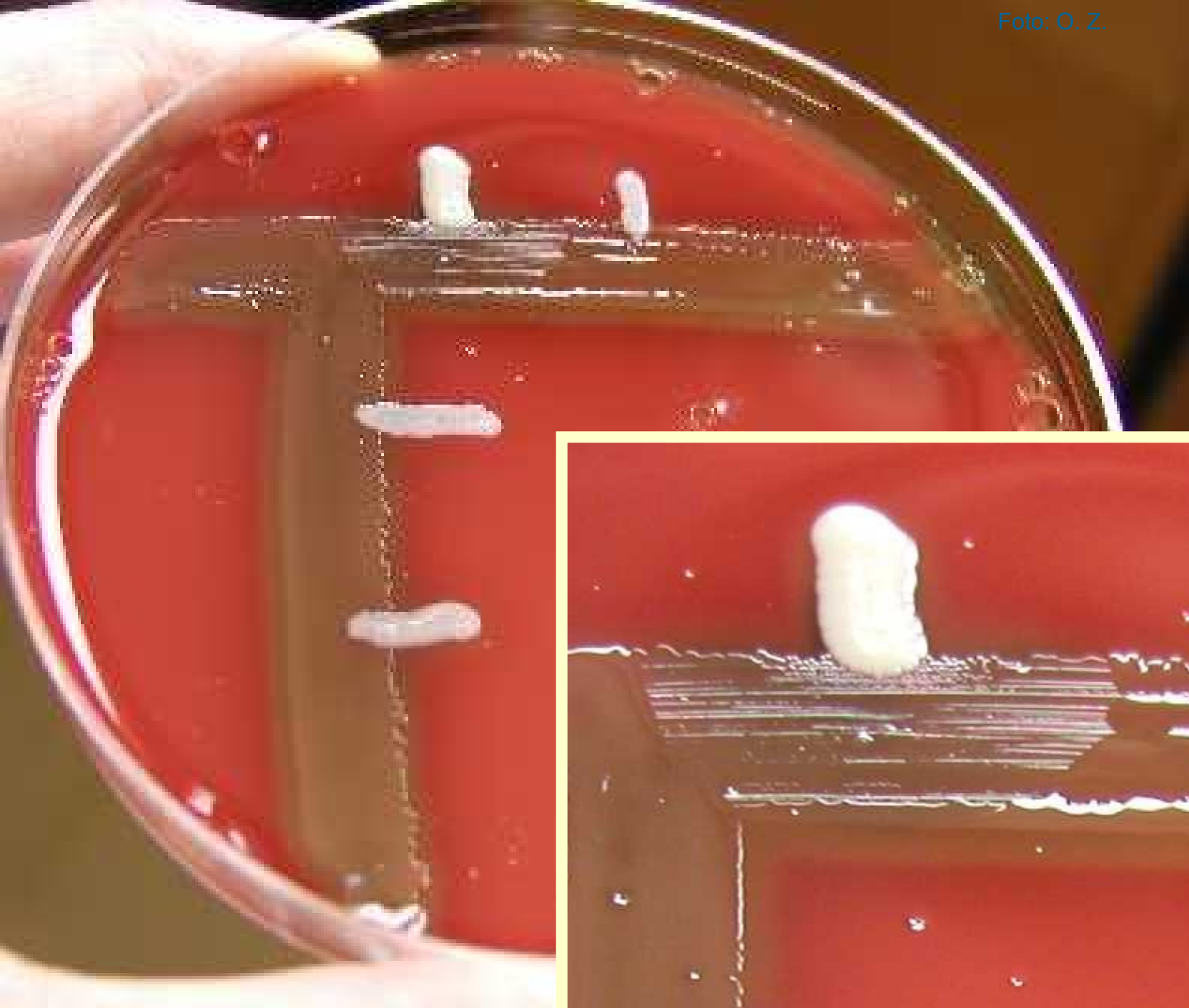
Bíle testované kmeny
stafylokoků.

Hodnocení:

Kmeny C, D patří k druhu
Staphylococcus aureus

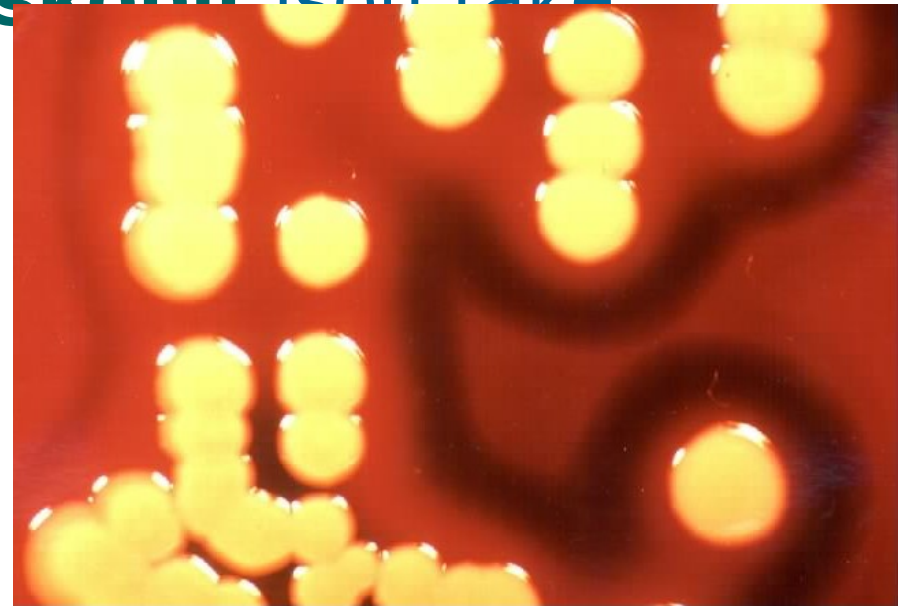
Kmeny A, B, E patří mezi
koagulázanegativní
stafylokoky





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 rovněž 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**
- druhovém určení je důležité u závažných materiálů hemokultura, likvor **biochemicky, MALDI**

Poté, co je určen patogen...

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

Příklady souprav pro biochemickou identifikaci

- 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>



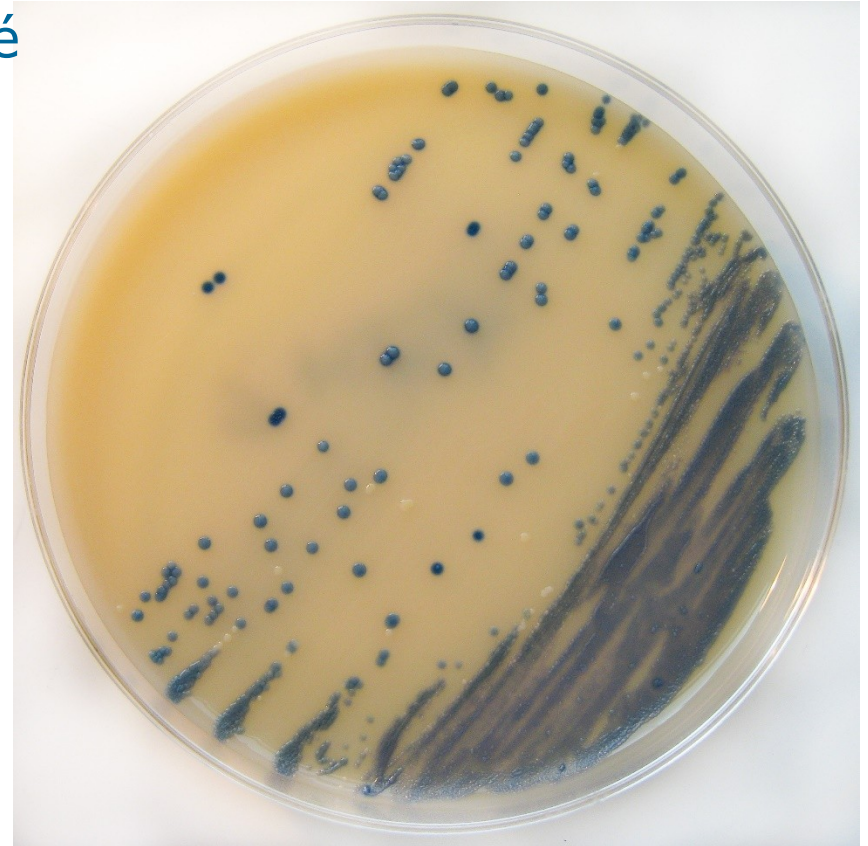


MRSA a jejich detekce

- 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

MRSA a jejich detekce

- MRSA půda
 - chromogenní půda
 - kolonie MRSA jsou modré
 - ostatní bílé nebo narůžovělé



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

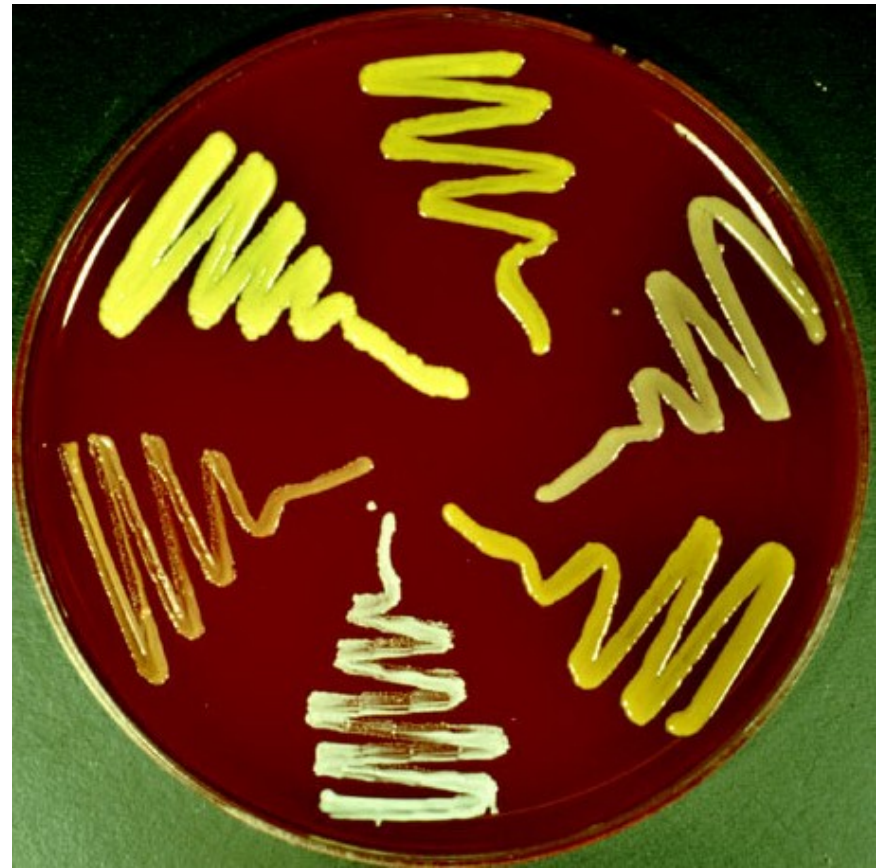
- Nejen pro stafylokoky platí horší patogen (zlatý stafylokok) je zpravidla citlivější než mírnější patogen (koaguláza negativní stafylokok). Toto pravidlo je logické: menší patogenita je znakem adaptace, schopnosti mikroba koexistovat s námi a nevyvolávat u člověka chorobný stav. → přivyknutí mimo jiné 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

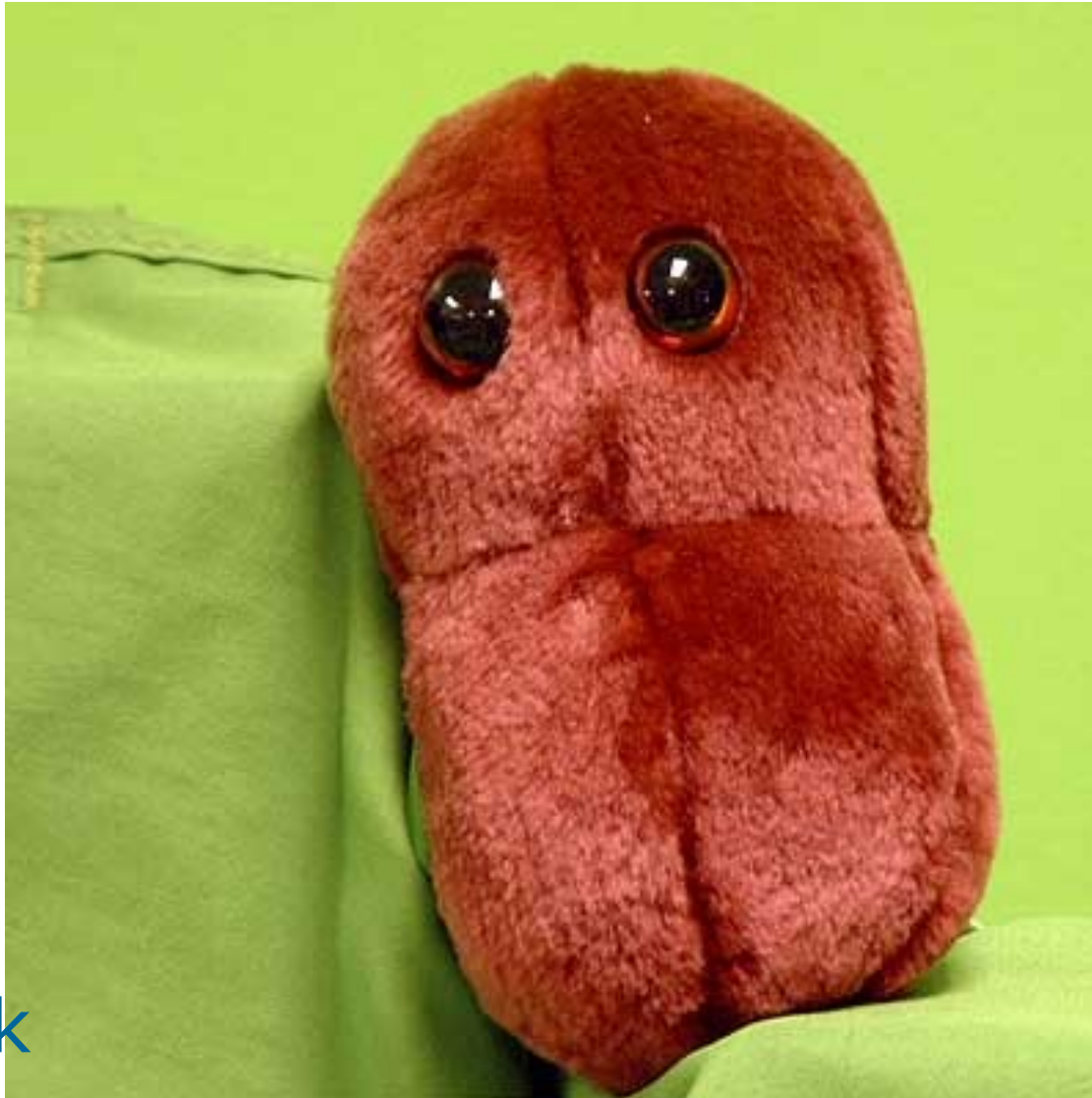
Mikrokoky mají krásné pigmenty

- *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



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



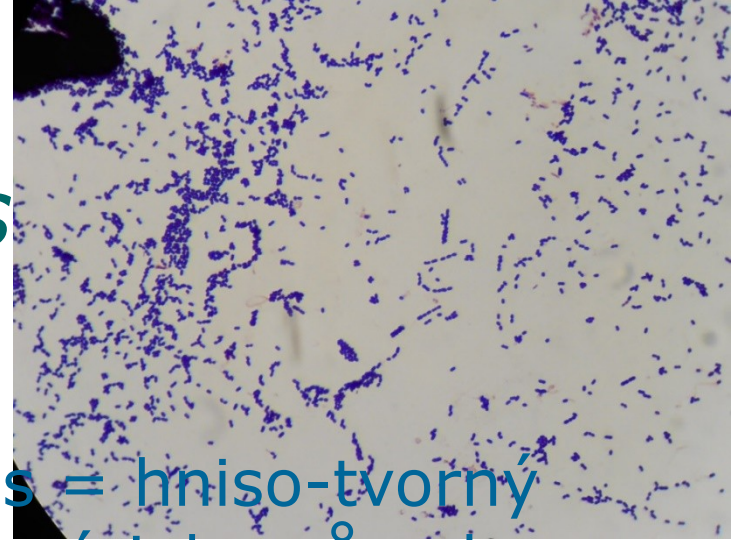
Přenos infekce

- 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 penicilem (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 řetízcích, 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“)

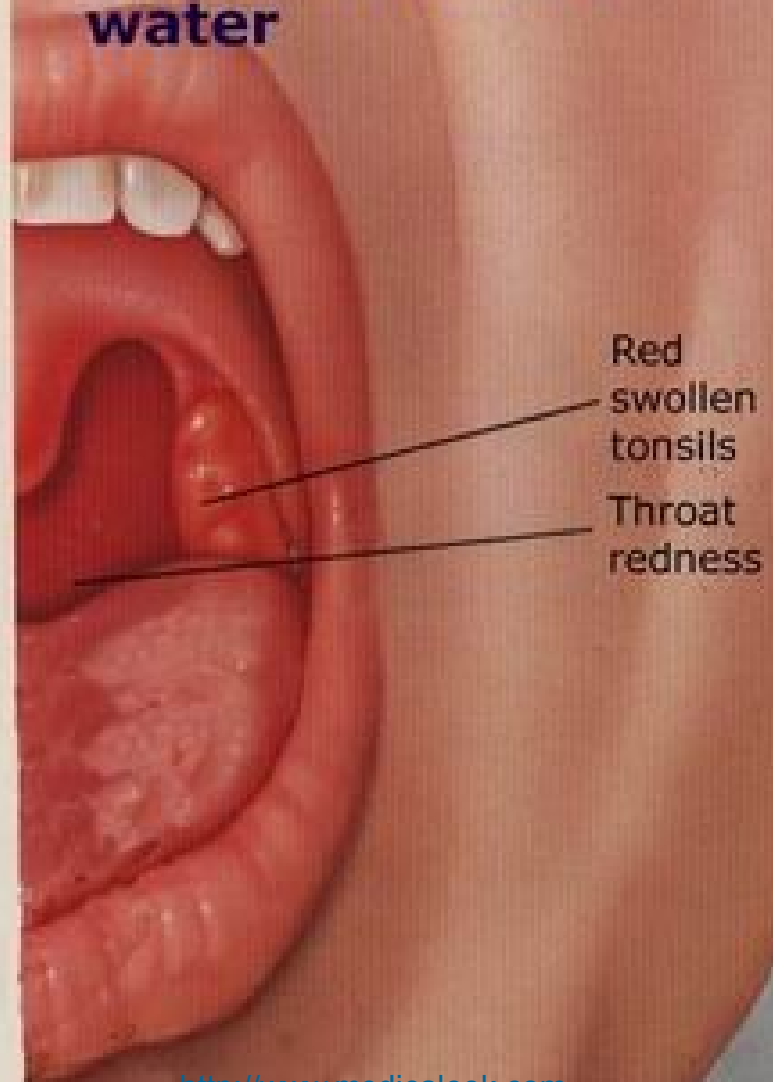
Bacterial

Come to the Health Center

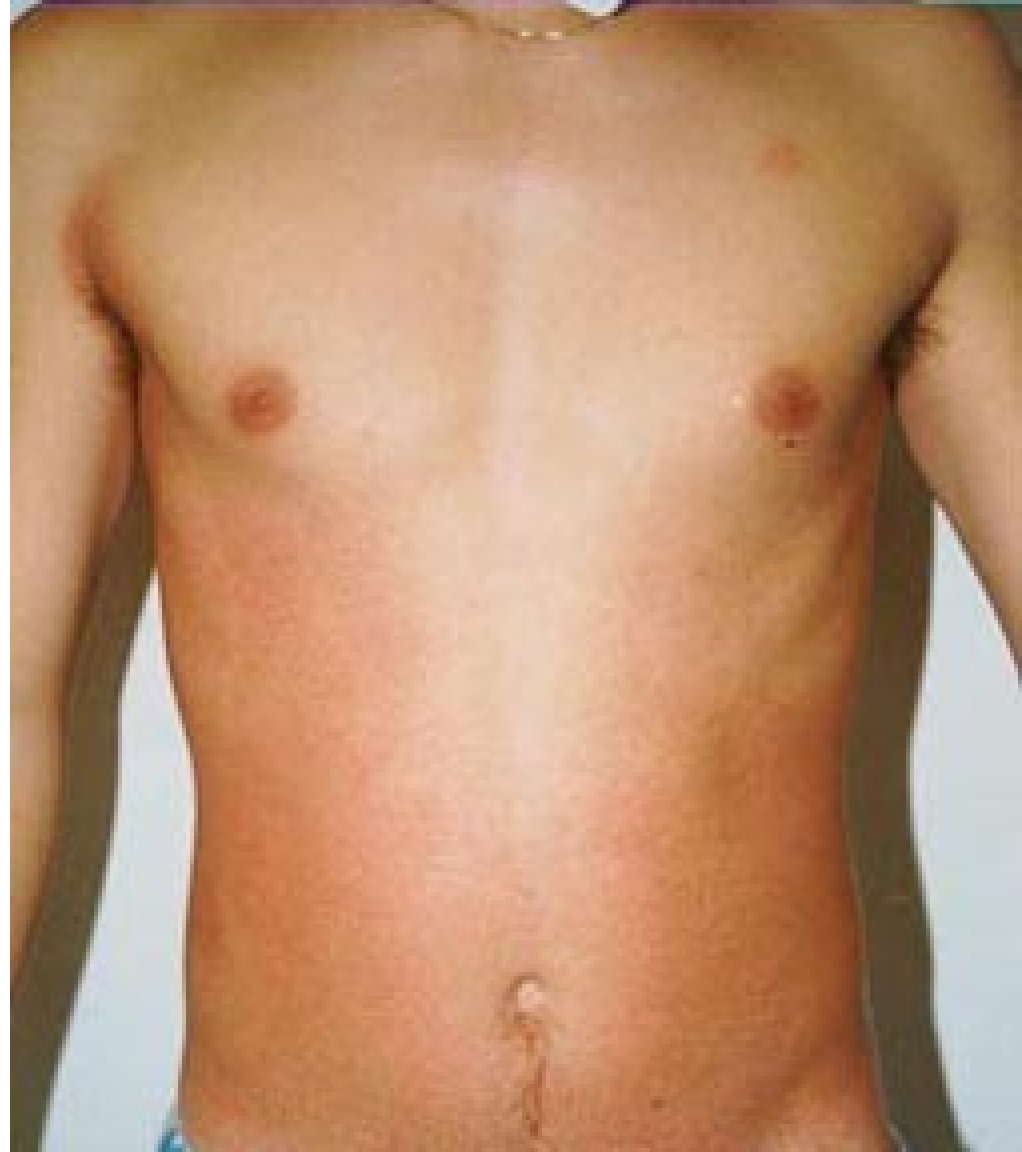
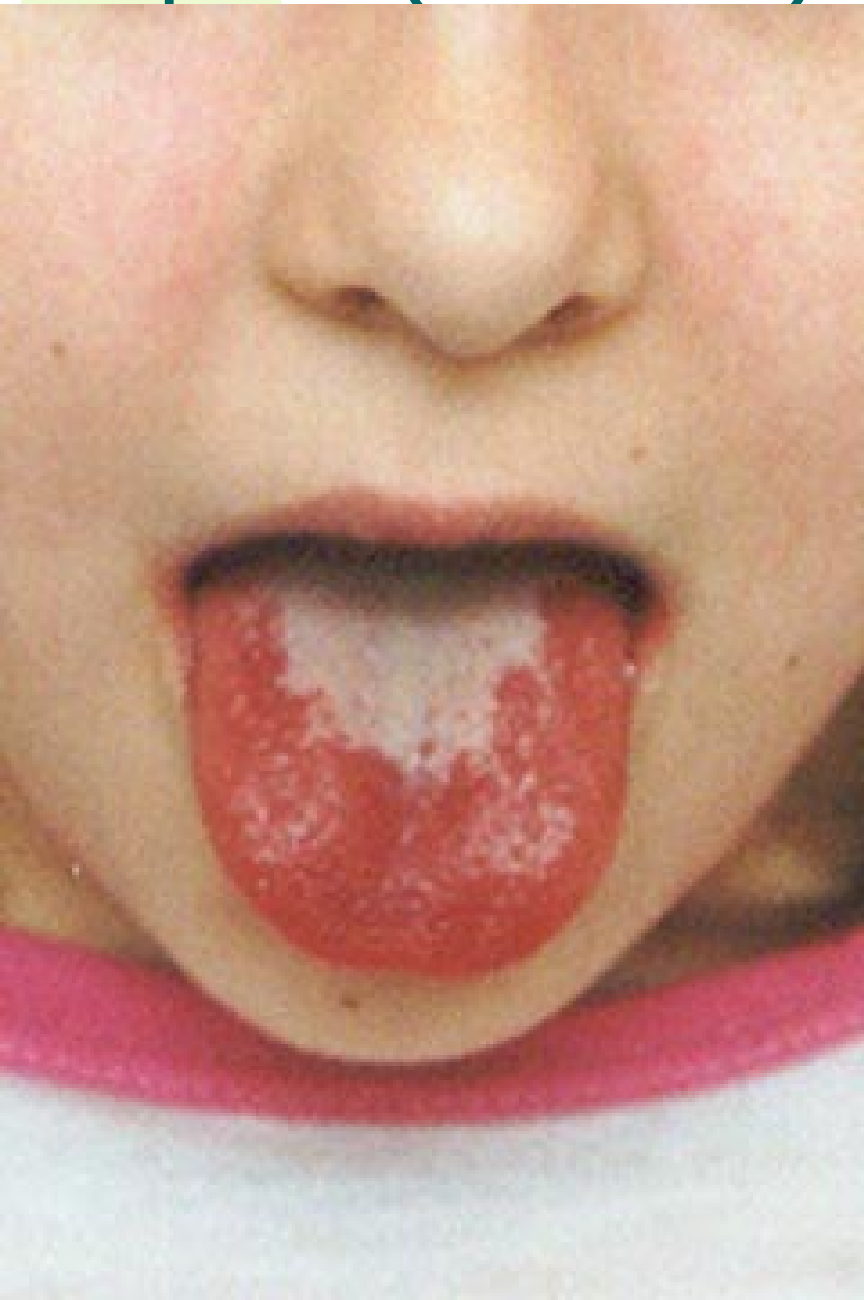


Nonbacterial/Viral

Monitor at home, gargle with salt water



Spála (šarlach)



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



www.infektionsnetz.at

Růže
(erysipiel)

Růže komplikovaná flegmónou



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

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

Příběh

- 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://mdchoice.com/>)

Nekrotizující fasciitida

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



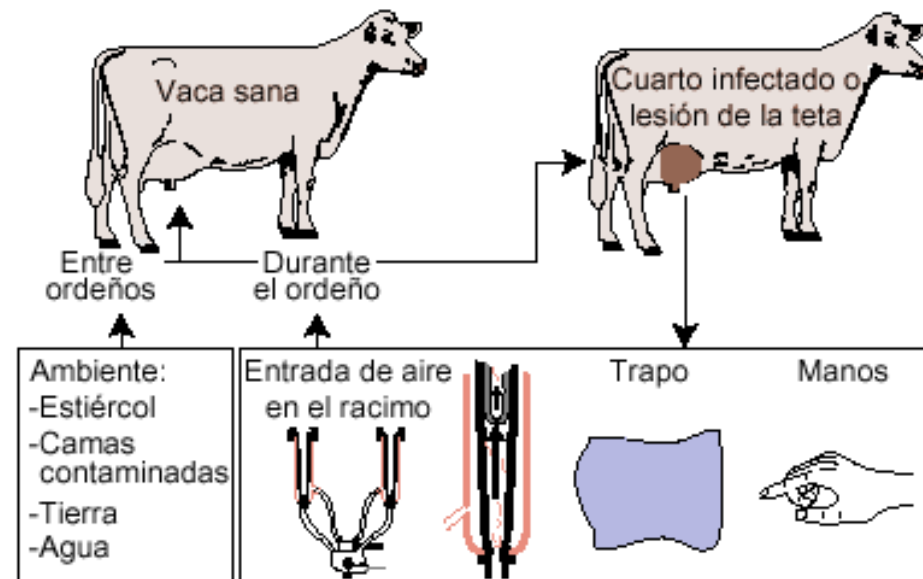
Streptococcus agalactiae

- 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.

Bystří studenti si všimnou druhového jména a-galactiae, tedy bez-mléčný. 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)

<http://www.infocarne.com>





Streptococcus agalactiae

- Novorozenec se může infikovat v průběhu porodu
 - Sepse, pneumonie
- 
- 



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.



<http://www.childrenshospital.org>



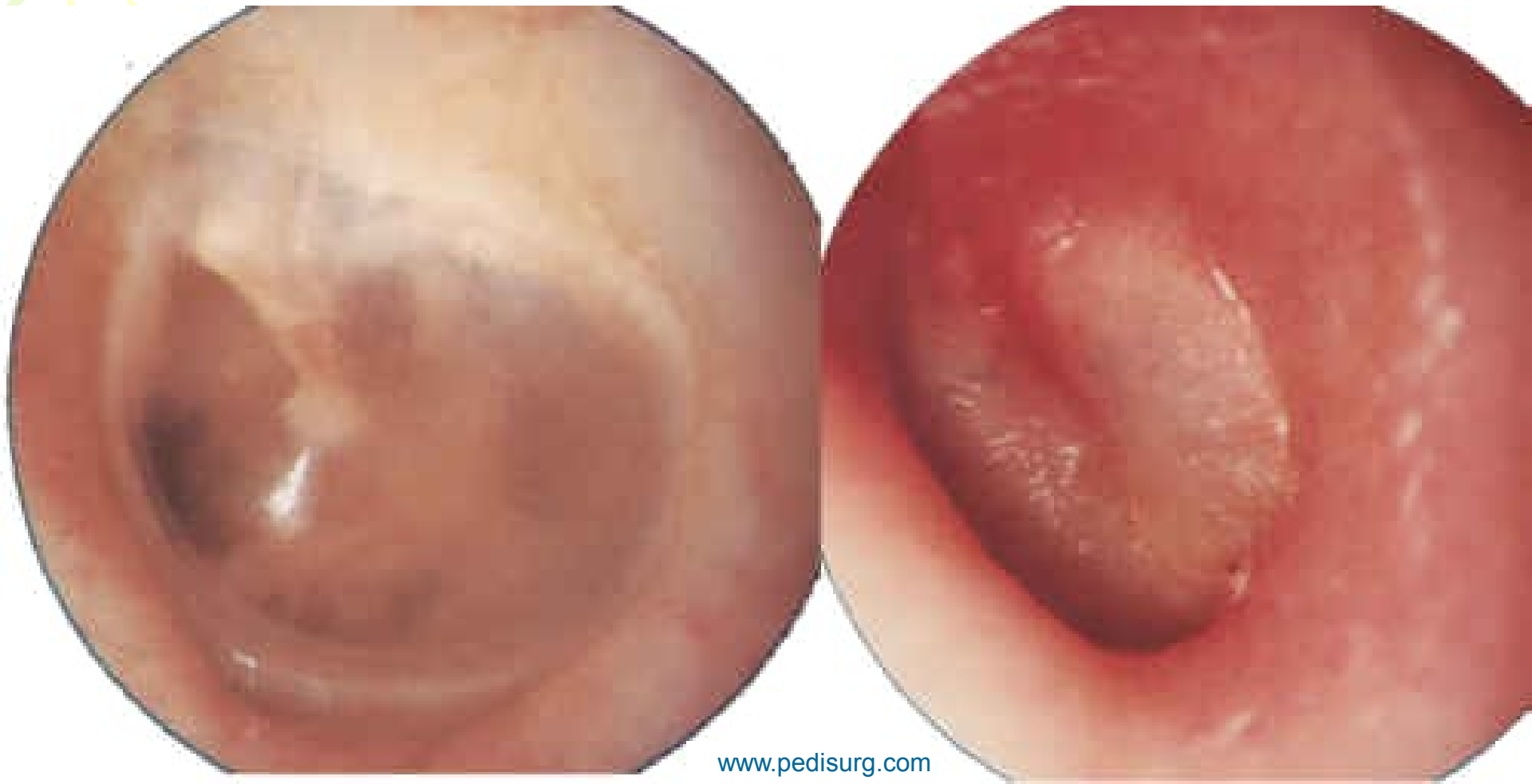
<http://www.stronghealth.com>



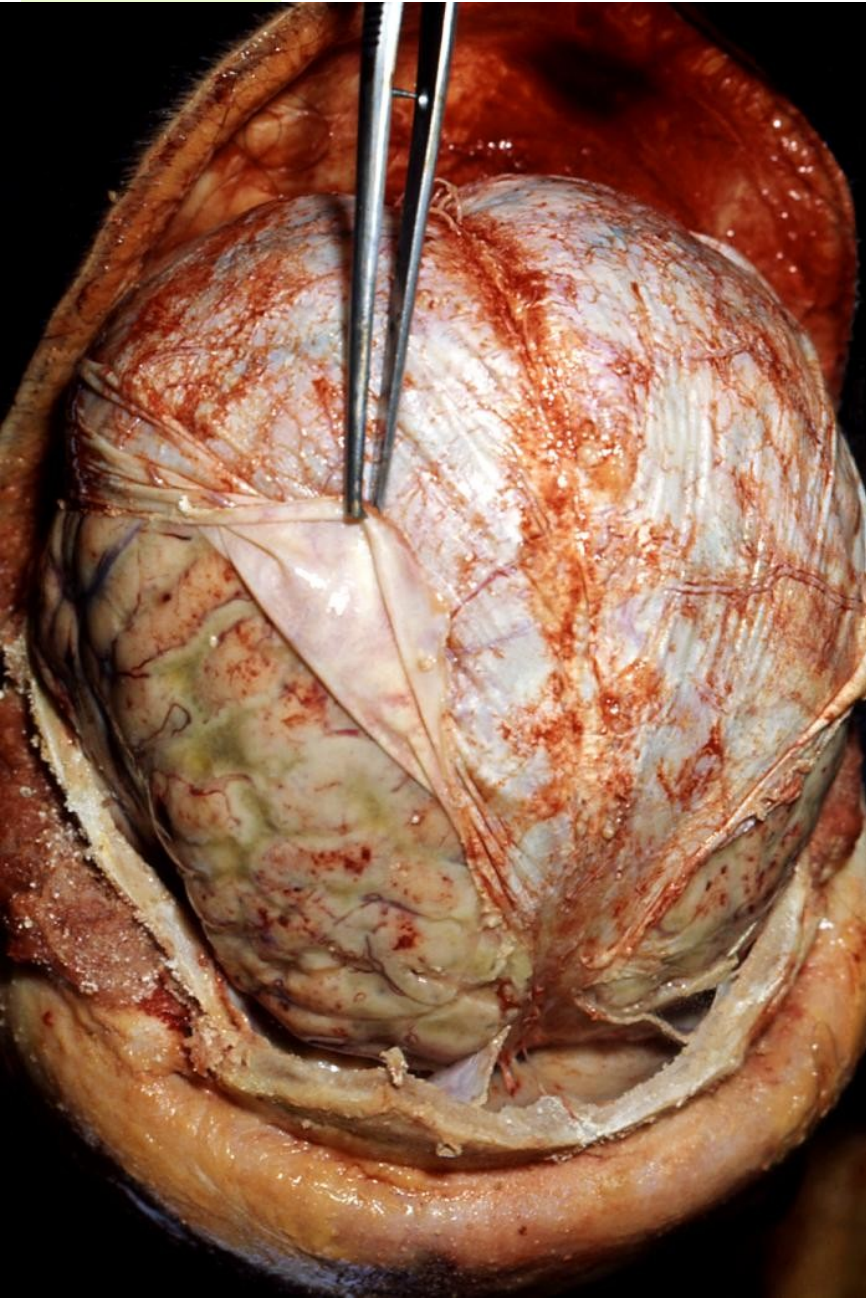
Streptococcus pneumoniae

- 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

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



Pneumokoková meningitida



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

<http://commons.wikimedia.org>

Takhle pneumokok vypadá

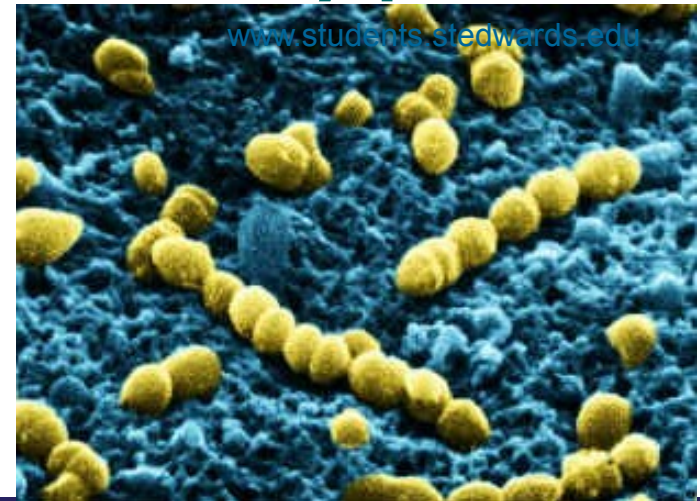
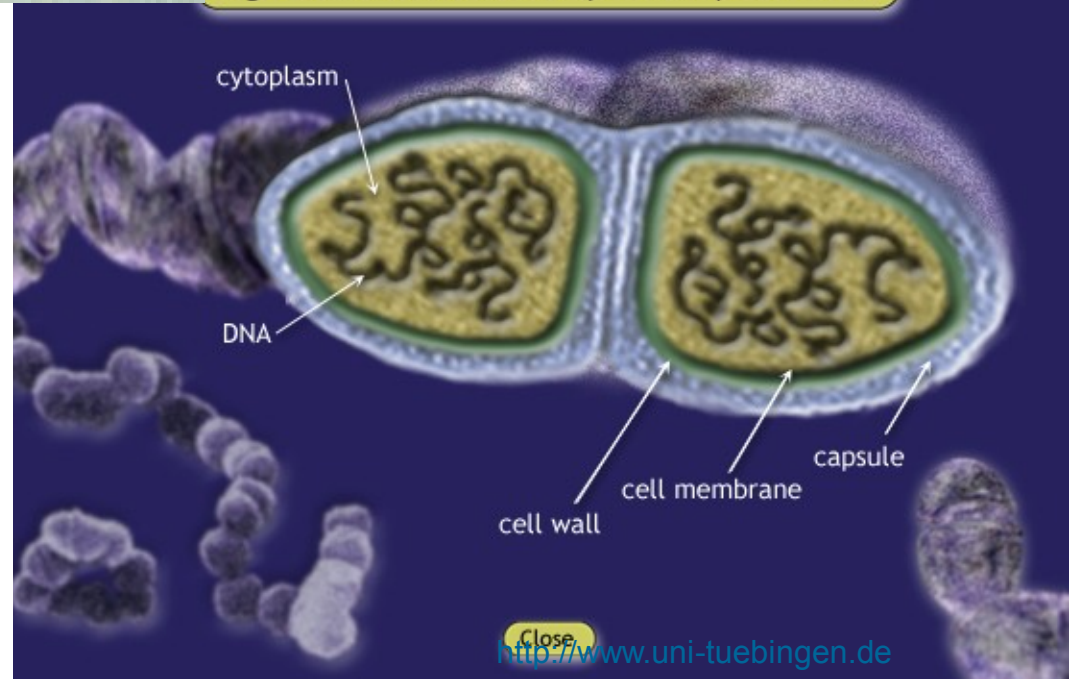
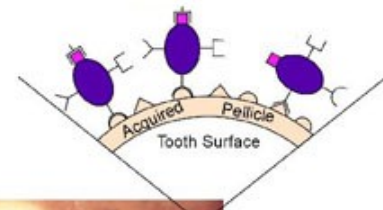


Figure 4. Cross-section of *Streptococcus pneumoniae*



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).



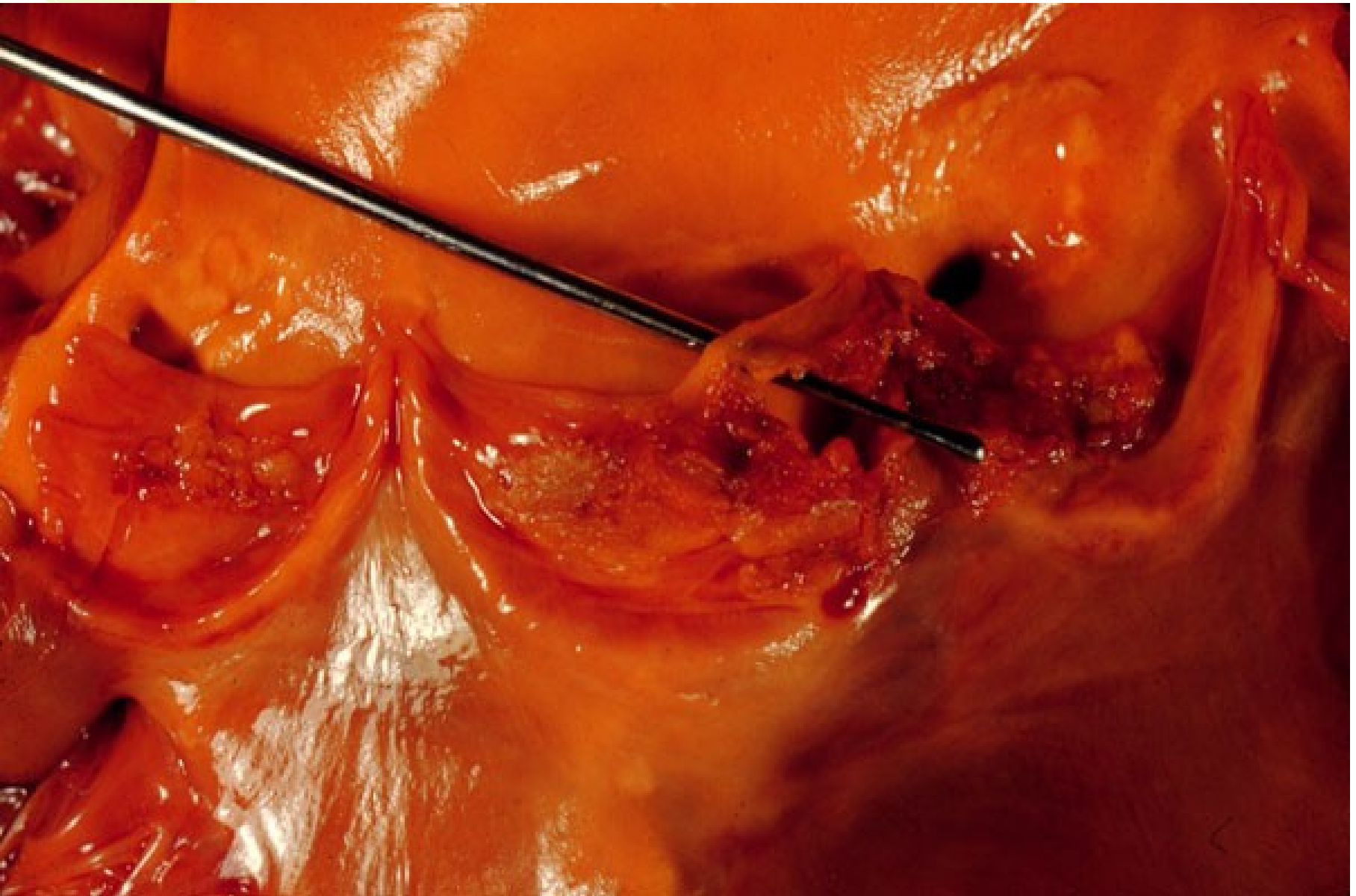
Příběh



- Pan Srdínko má už dlouho dobu problémy 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.

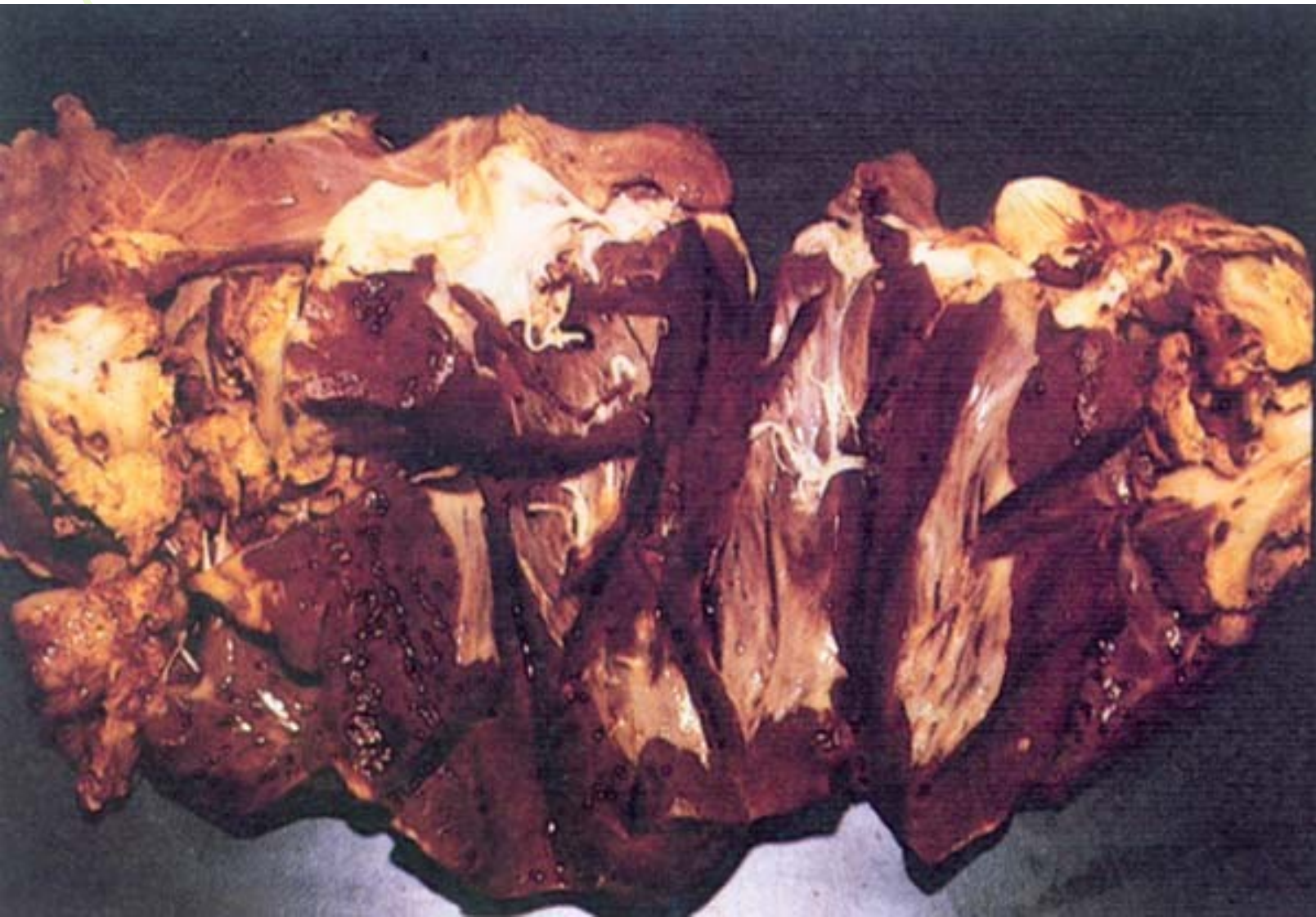
Vegetace na chlopni

<http://www.pathguy.com>



Postižené srdce

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

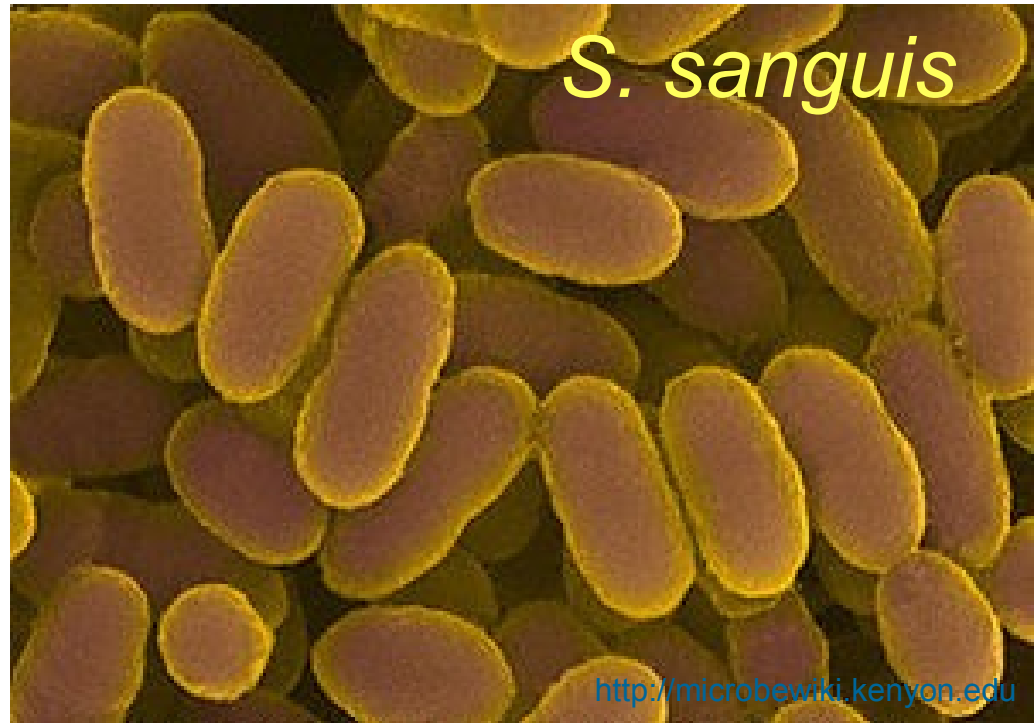


Příklady ústních streptokoků

S. salivarius



S. sanguis



S. mutans



Udělejme si v nich pořádek

Na KA	Jméno pachatele
viri- dace (alfa)	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
	skupina „ústních streptokoků“
(beta) hemo- lýza*	<i>Streptococcus pyogenes</i>
	<i>Streptococcus agalactiae</i>
	Skupina „non-A-non-B“ streptokoků
žádná	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.

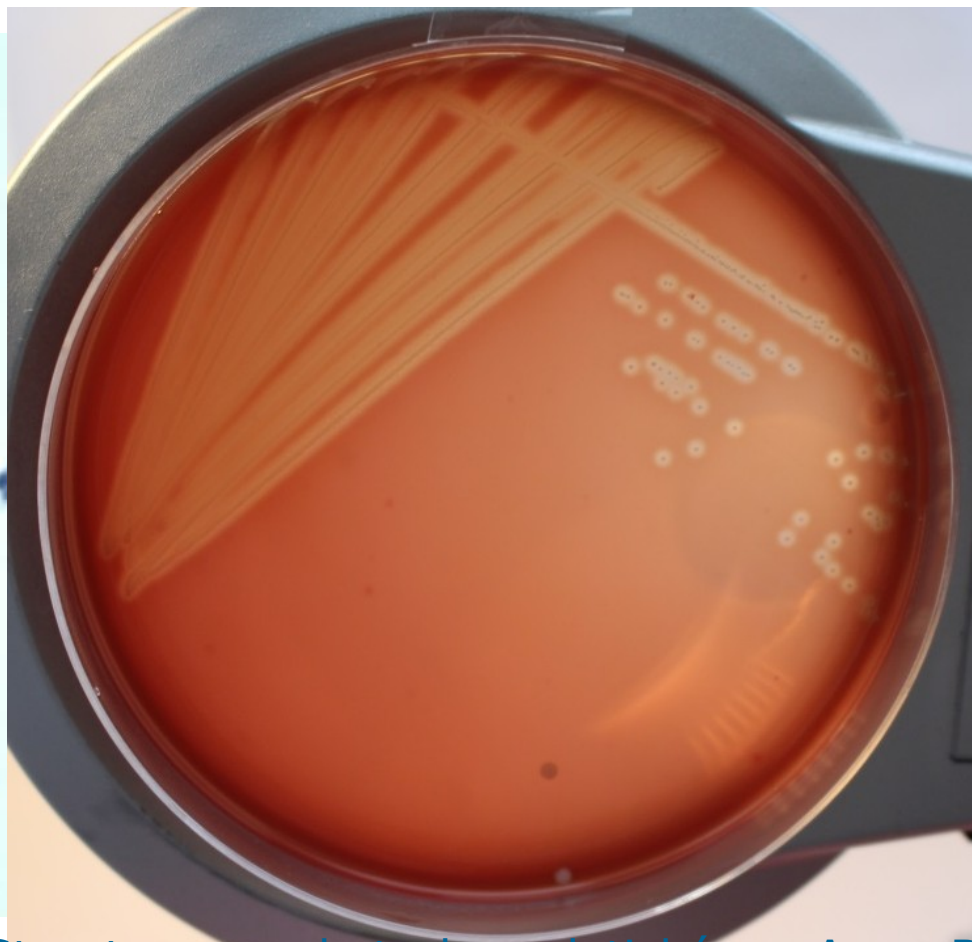
Diagnostika 2

- 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



www.medmicro.info



Streptococcus beta-hemolytický nonA-nonB

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)

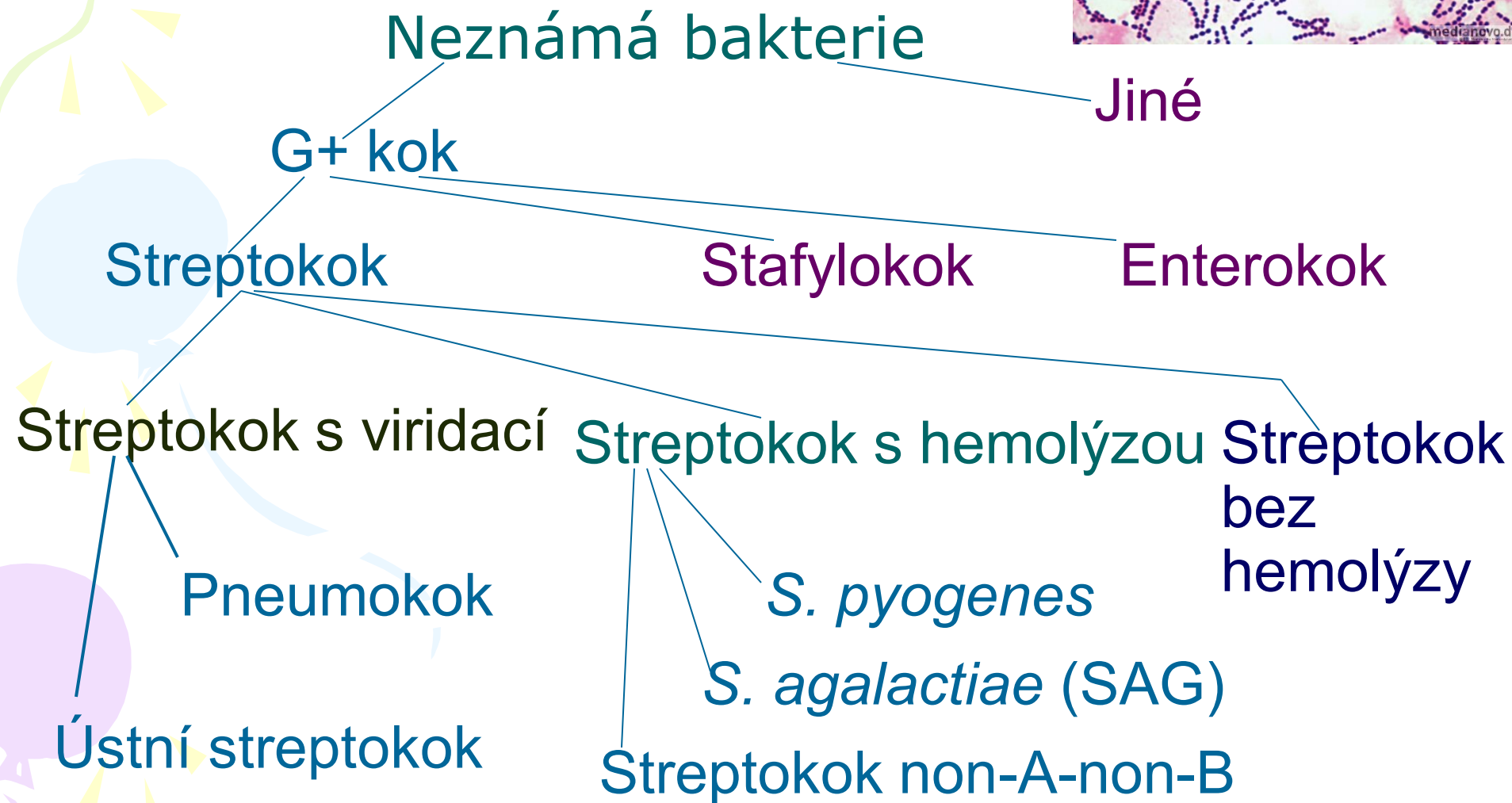
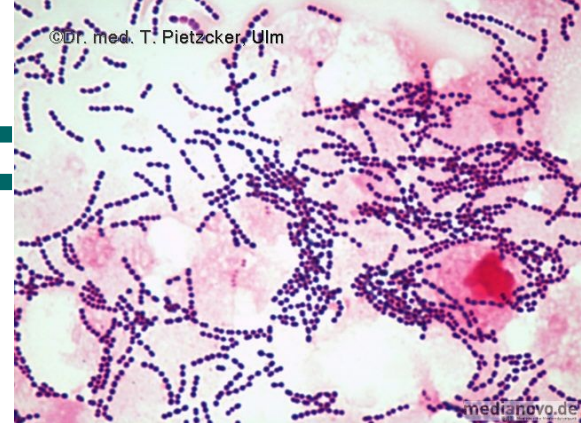


<http://memiserf.medmikr.uni-bochum.de>

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 PYR testem
- *S. agalactiae* se zase pozná pozitivním CAMP testem – o všech těchto testech viz dále

Schematicky:



Pneumokok: orientační testy

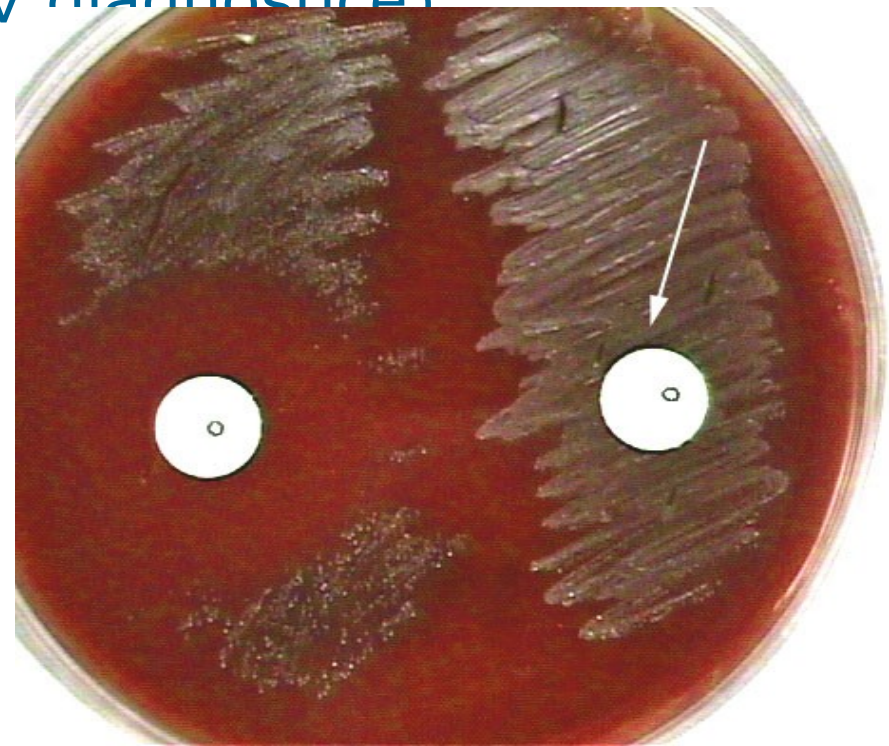
- Pneumokoka odlišíme optochinovým testem – viz další obrazovka.
- Podezření však můžeme pojmut, když:
 - mikroskopicky vidíme lancetovité diplokoky
 - kultivačně jsou kolonie ploché, penízkovité až miskovité, někdy s centrálním vyvýšením
 - někdy naopak jsou kolonie výrazné, hlenovité
 - to jsou kmeny 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.



Výtěr z krku - viridující steptokoky

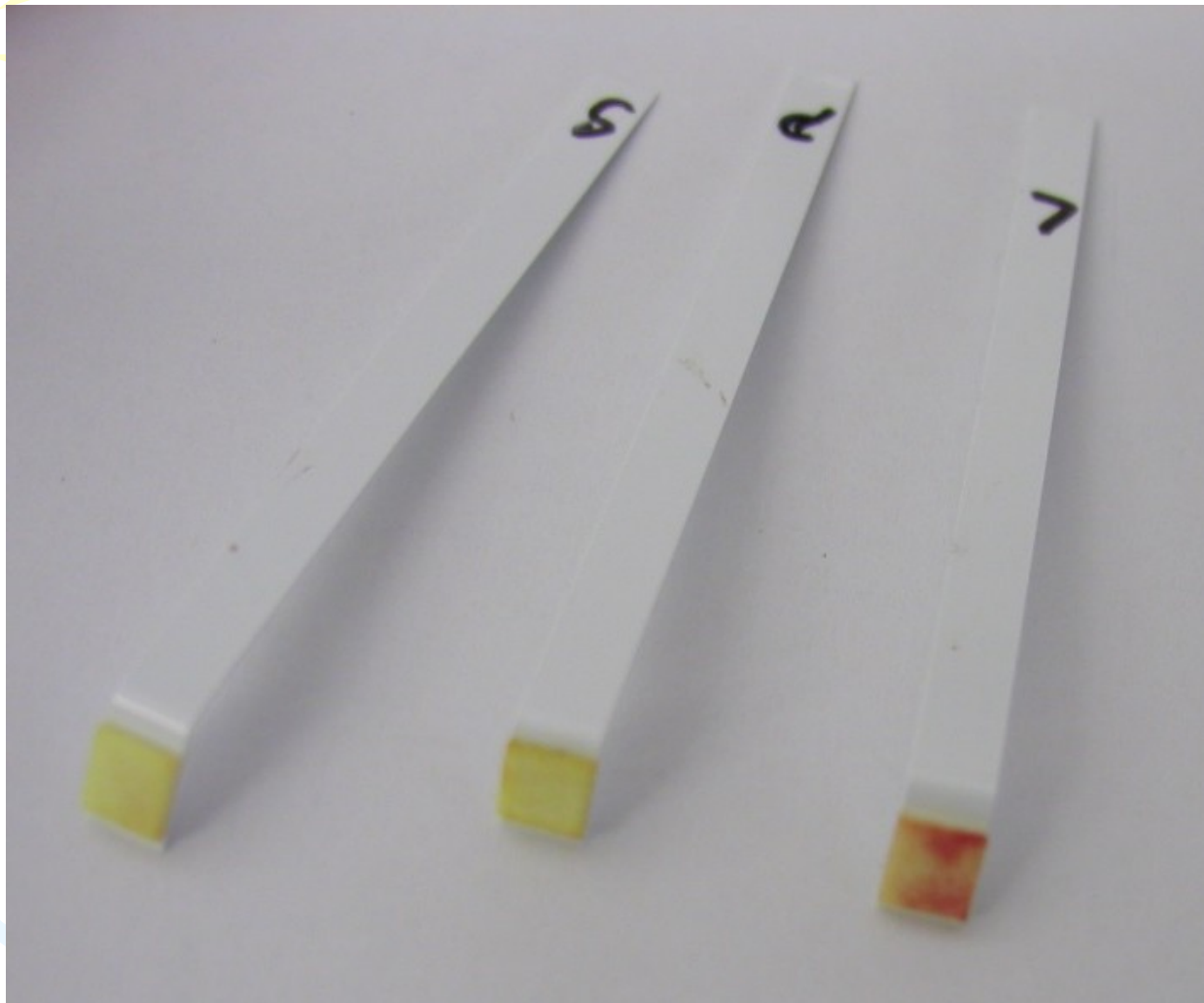


Druhové určení ústního streptokoka

- **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, MALDI**

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.

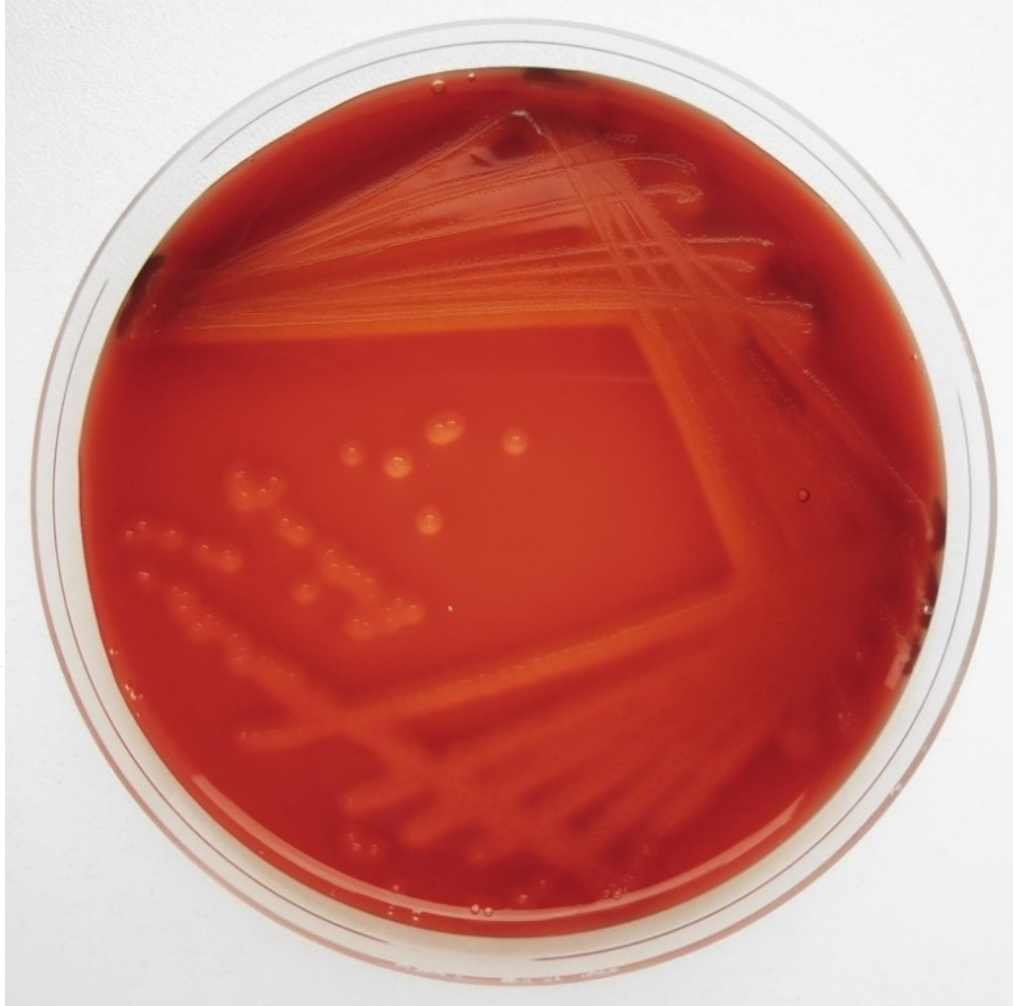


PYR test – např. diagnostika beta-hemolytických streptokoků

pozitivní výsledek je typický pro *S. pyogenes* (nejvíc vpravo)

negativní výsledek je typický pro ostatní beta-hemolytické streptokoky

Streptococcus pyogenes



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 němu laboratorní kmen zlatého stafylokoka
- V případě positivity vidíme zesílenou hemolýzu ve tvaru dvou trojúhelníků, anebo, poetičtěji, motýlích křídel

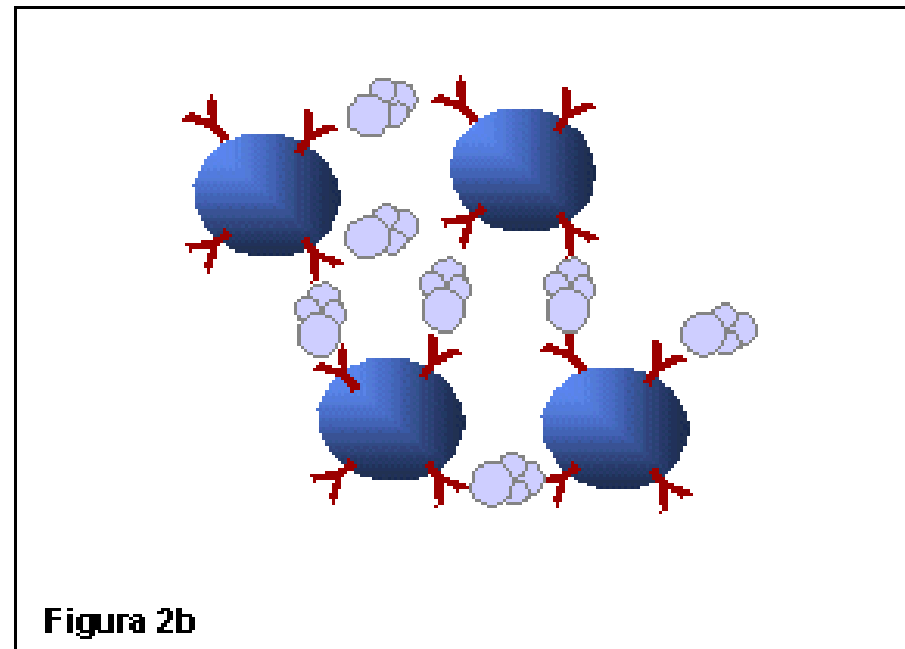
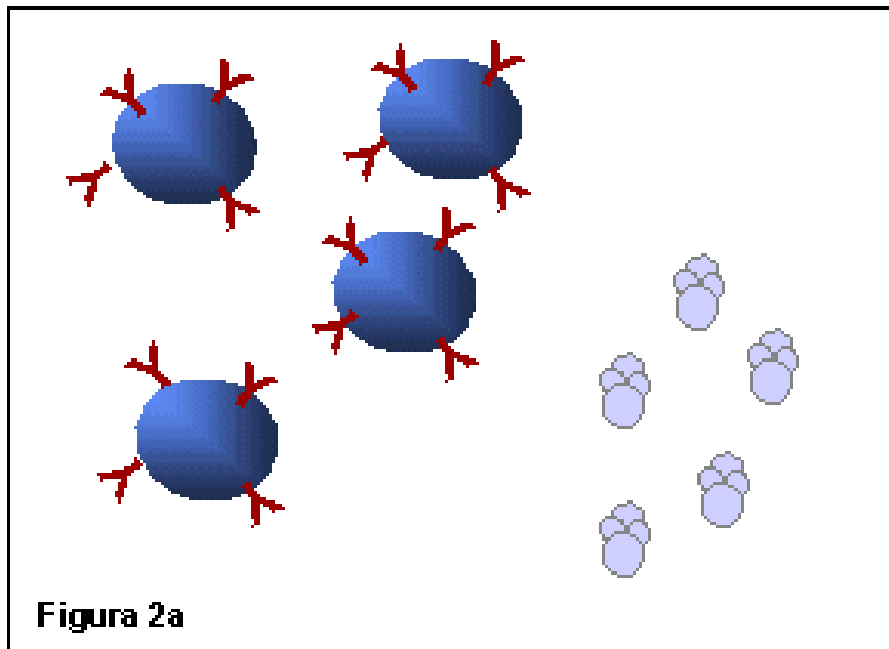


β -hemolytické streptokoky – shrnutí

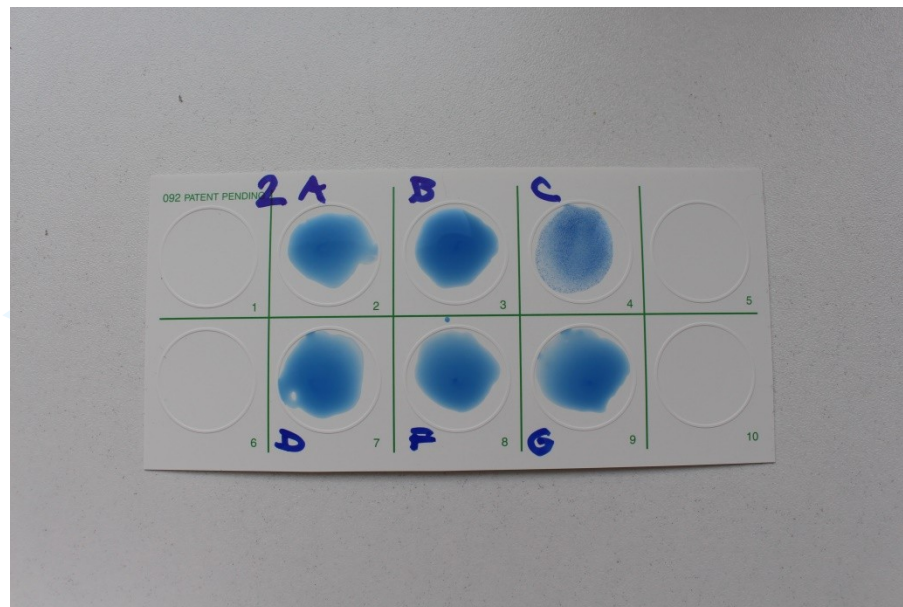
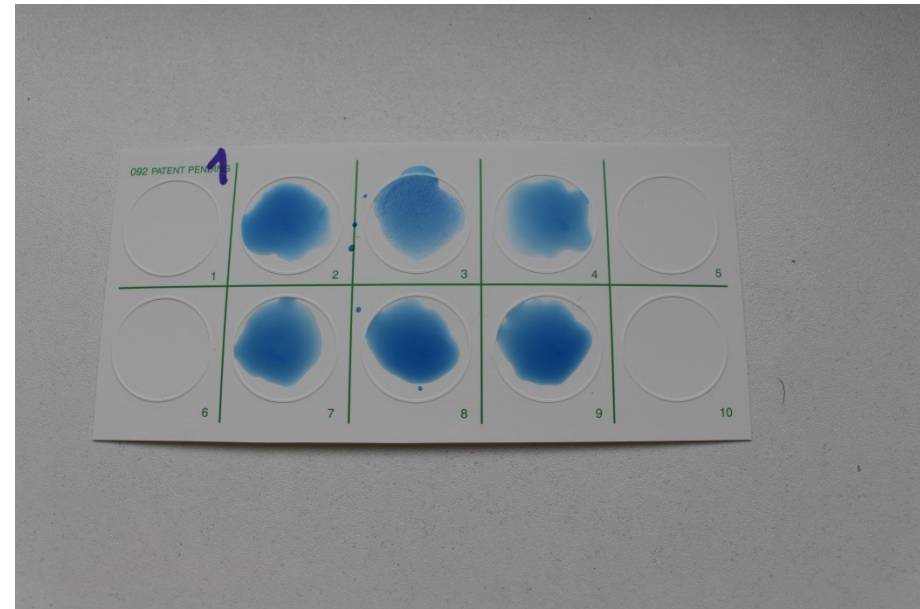
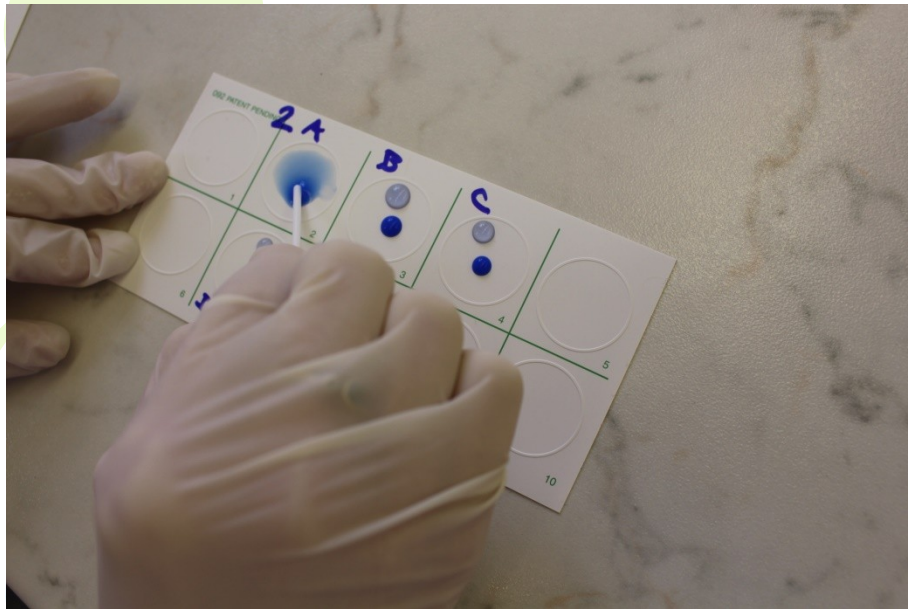
PYR test	CAMP test	Streptokok
pozitivní	negativní	<i>S. pyogenes</i>
negativní	pozitivní	<i>S. agalactiae</i>
negativní	negativní	non-A-non-B streptokok (další určení možné latexovou aglutinací)
pozitivní	pozitivní	ptákovina, špatný test, případně směs dvou kmenů

Latexová aglutinace

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



Latexová aglutinace – prakticky



odečet výsledku

Léčba

- U streptokoků je stále lékem volby klasický Flemingův **penicilin**, u závažných tkáňových infekcí případně **v kombinaci s aminoglykosidy** (ačkoli samotné aminoglykosidy jsou neúčinné). 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

Skandální zjištění !!!

Streptococcus pyogenes je ještě horší, než jste možná čekali

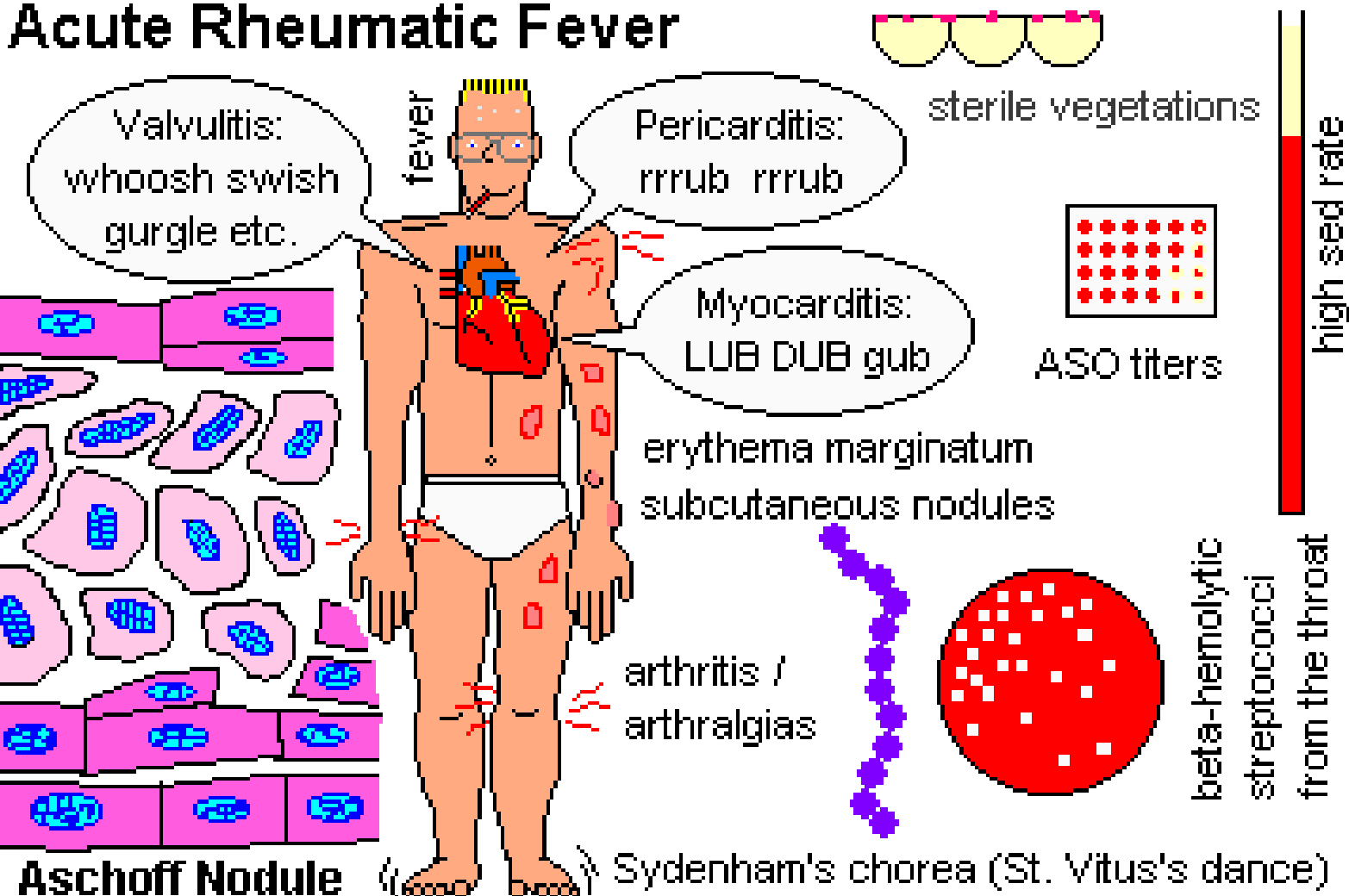
- Už víte, že ***S. pyogenes*** způsobuje angíny, spály, erysipel, flegmóny. To nejhorší však ještě čeká: I po té, co sám zmizí z organismu, může po něm zůstat děsivé dědictví! **Protilátky proti němu kolují v krvi...** a omylem se místo na streptokoky **vážou na některé struktury organismu.** Tím vzniká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

Bystří studenti si vzpomněli, že už o tom slyšeli v rámci neutralizace a ASLO

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)

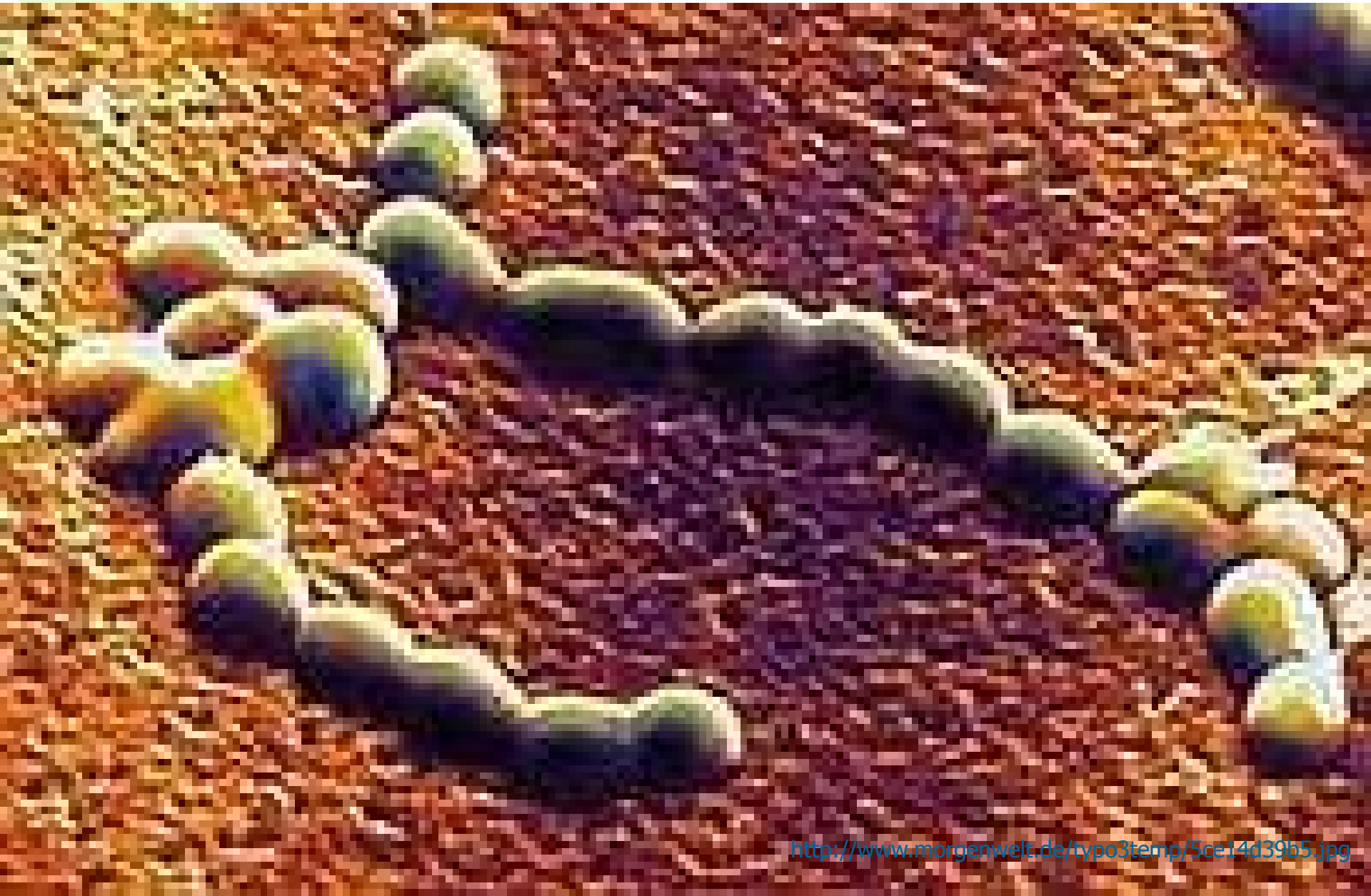
- **Protilátka blokuje hemolytický efekt toxinu (streptolyzinu O) na krvinku.**
- **U ASLO neužíváme geometrickou řadu.** Hodnoty ředění jsou na lístečku.
- **Titr nad cca 200 znamená možnost autoimunitní odpovědi**
- **Všimněte si, že v angličtině se ASLO označuje jako ASO.** Zrada je, že zkratka ASLO přitom také existuje a označuje stafylolysin.

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

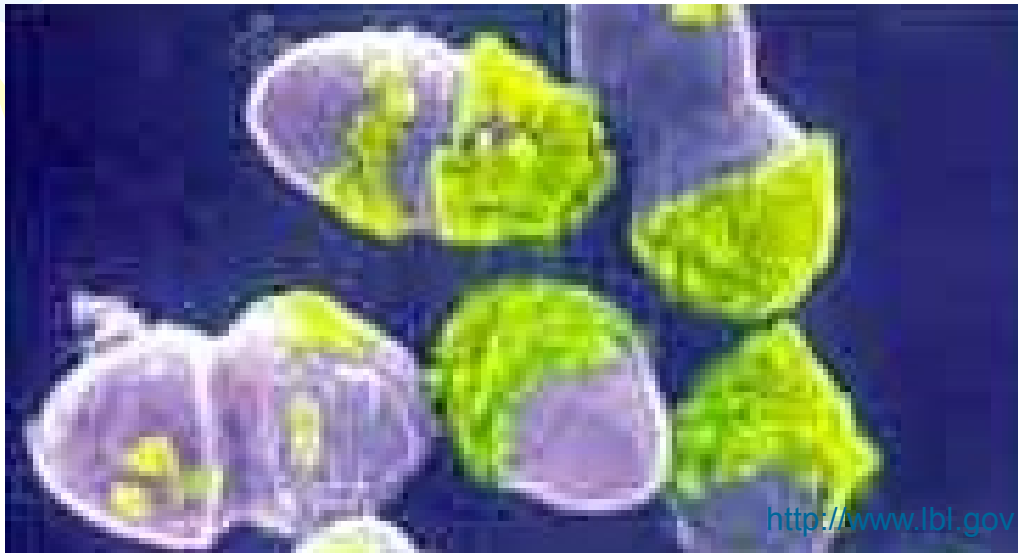


Základní a klinická charakteristika

- 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



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

Více o enterokokcích

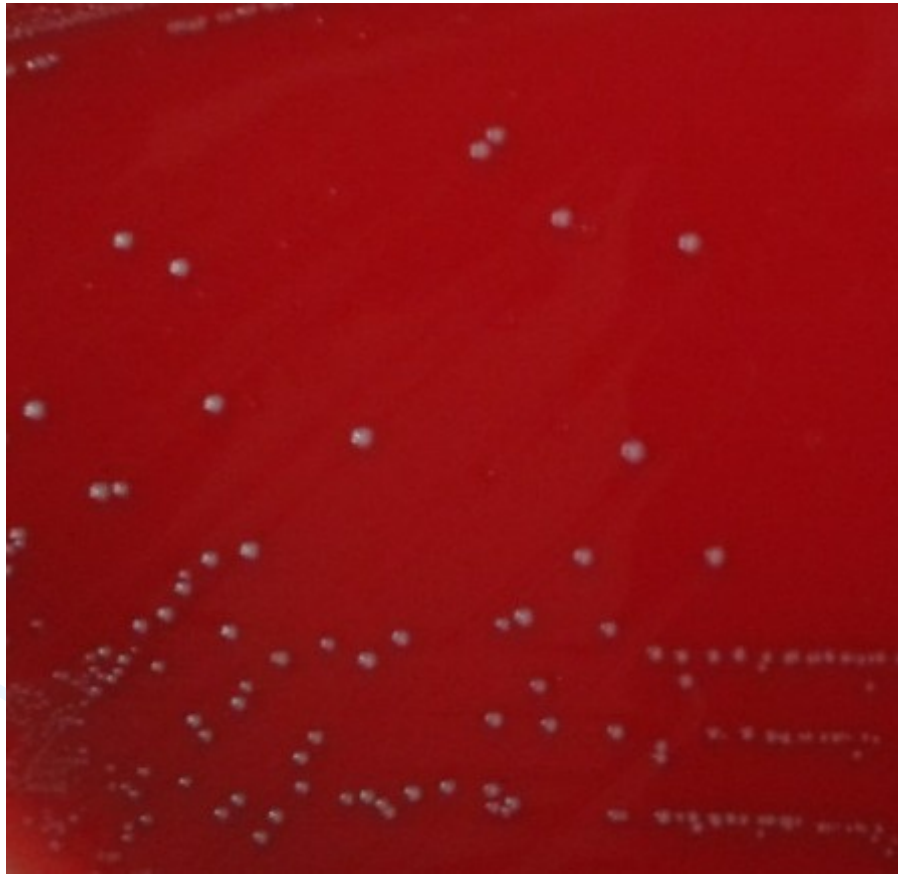
- Dnes jich rozeznáváme desítky druhů
- Všechny mohou být nalézány
 - **ve stolici** (jako normální mikroflóra)
 - **v močovém měchýři** (jako patogeny)
 - **v pochvě** (asymptomaticky nebo symptomaticky)
 - občas i jinde (rány, krevní řečiště)
- Ze dvou nejběžnějších druhů ***E. faecalis*** bývá častěji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

Enterokok - popis

	Enterokok		
Mikroskopie	G+ koky v. krátkých řetízcích  <small>http://textbookofbacteriology.net/Enterococci/jpeg</small>		
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.

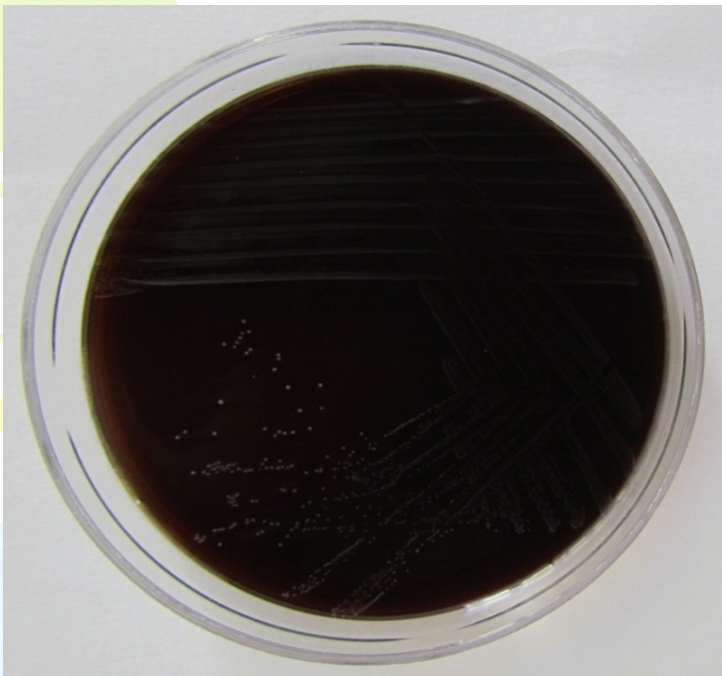
E. faecalis – zelený – negativní; *E. faecium* – žlutý – pozitivní

Enterokoky – vzhled kolonií

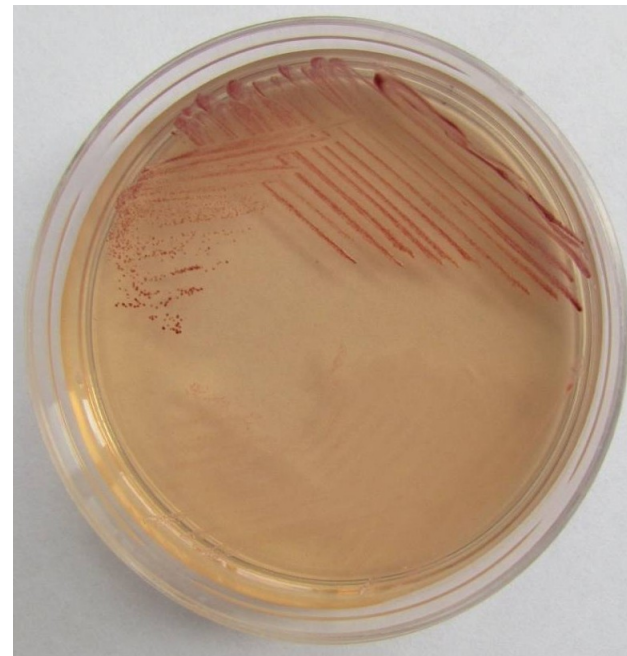


Diagnostika enterokoků

- **Biochemické testy: kataláza** negativní, možné je biochemické rozlišení, důležité **štěpení arabinosy** (*E. faecalis* neštěpí, půda je zelená, *E. faecium* štěpí, žlutne)
- **MALDI**
- **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 skrínig VRE** (viz dále)



Žluč-eskulin



Slanetz-Bartley



URISELECT - chromogenní agar

Léčba enterokokových infekcí

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

Takhle dopadá snaha vyzrát na enterokoka cefalosporinem...

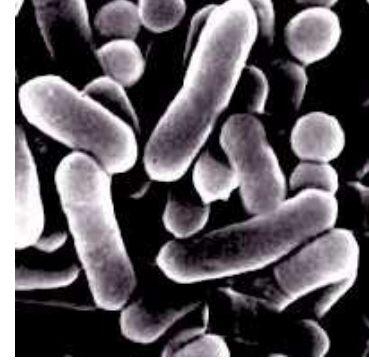
4. Tyčinky

- *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

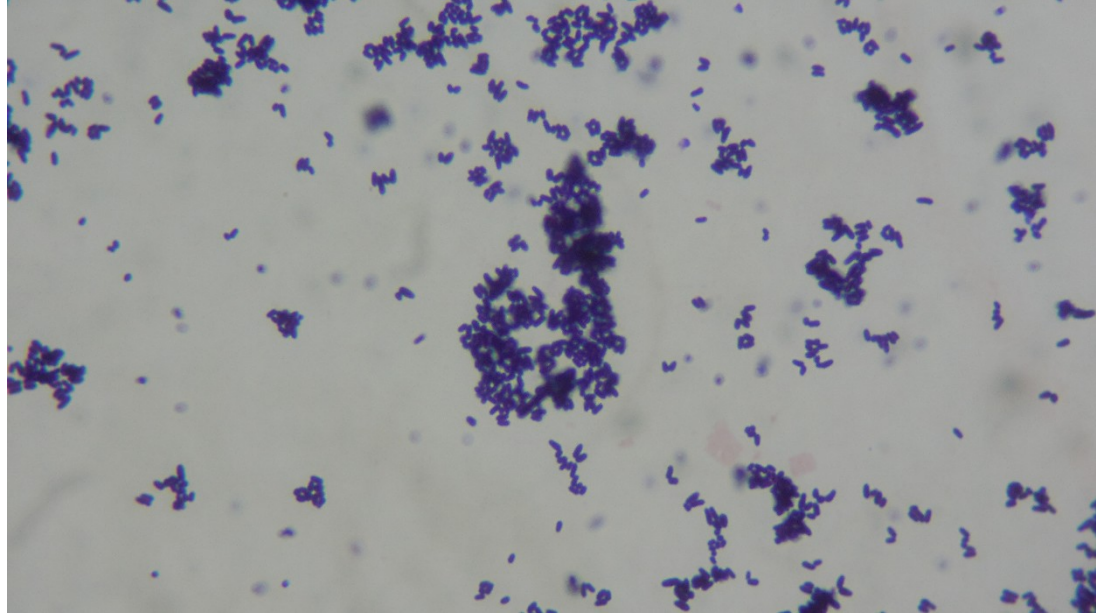
Listeria monocytogenes



- 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



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 záškrt.
 - 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

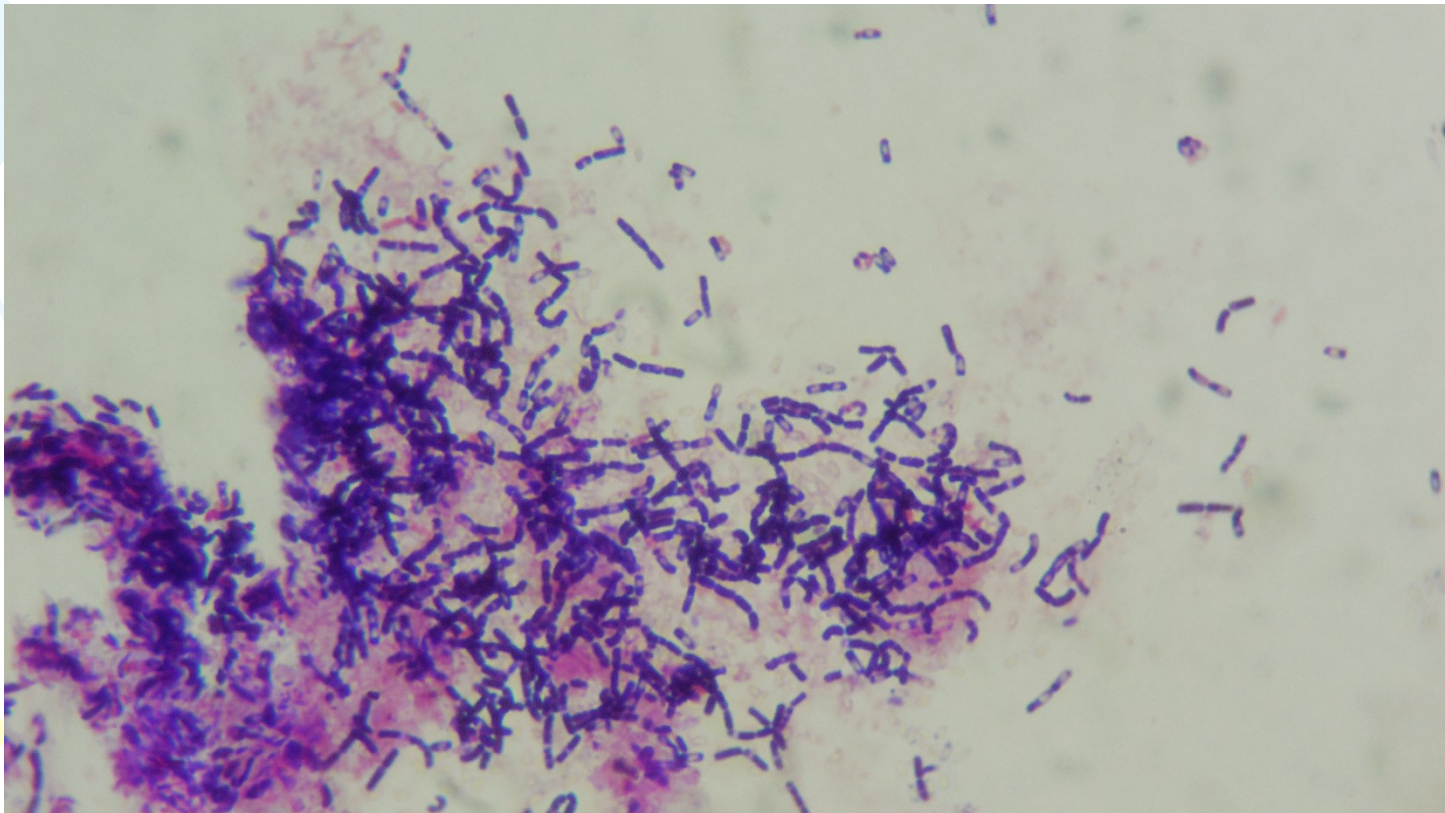


Koryneformní tyčinky

- 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

r. *Bacillus*

- G+ sporulující tyčinky
- Striktně aerobní



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.
- ***Geobacillus stearothermophilus*** a ***Bacillus subtilis*** se vzhledem ke své schopnosti přežít při velmi vysokých teplotách používají jako indikátory účinnosti sterilizátorů

Popis pachatelů

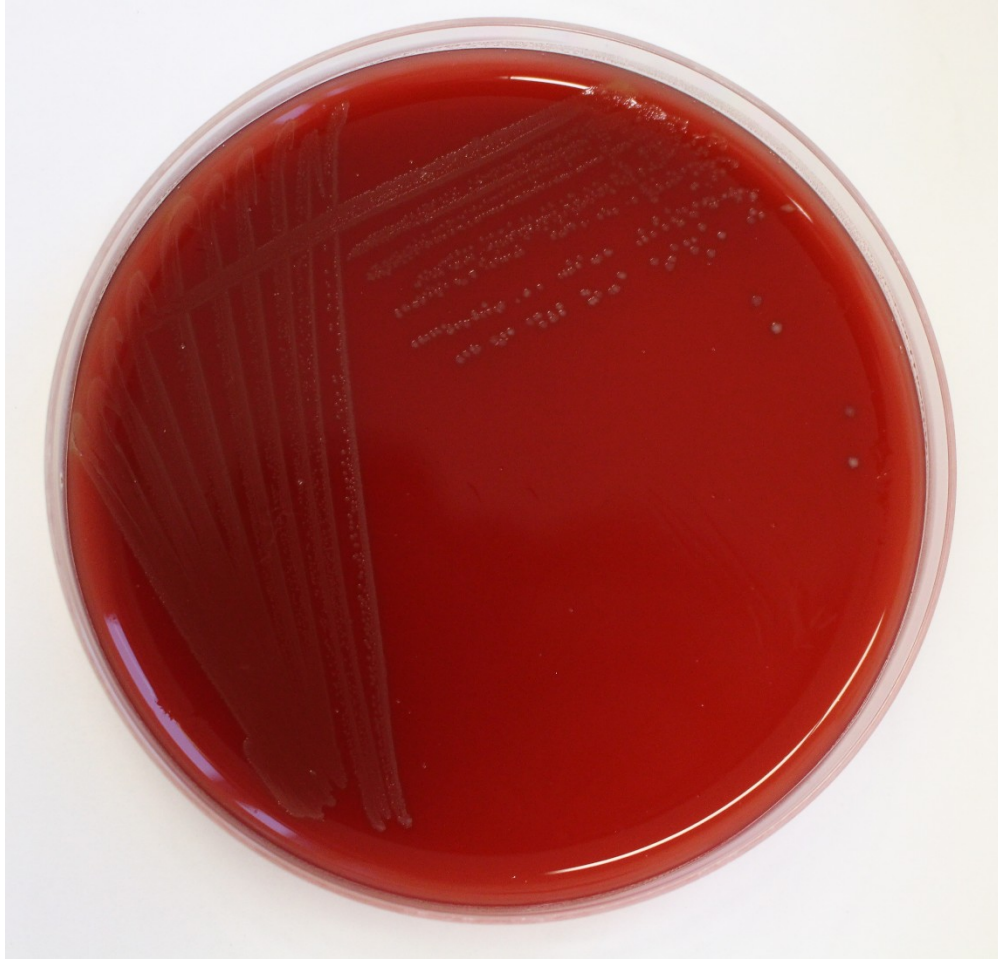
	Listerie	Korynebakteria	Bacillus
Mikroskopie	G+ tyčinky řetězí se jako špekáčky, ale někdy i vedle sebe jako další	G+ tyčinky skládající se vedle sebe (palisády)	G+ robustní tyčinky, sporulující (nemusí být viditelné)
Kultivace	podobné enterokokům, hemolýza je či není	velmi drobné kolonie podobné mouce	plstovité 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

Erysipelothrix rhusiopathiae



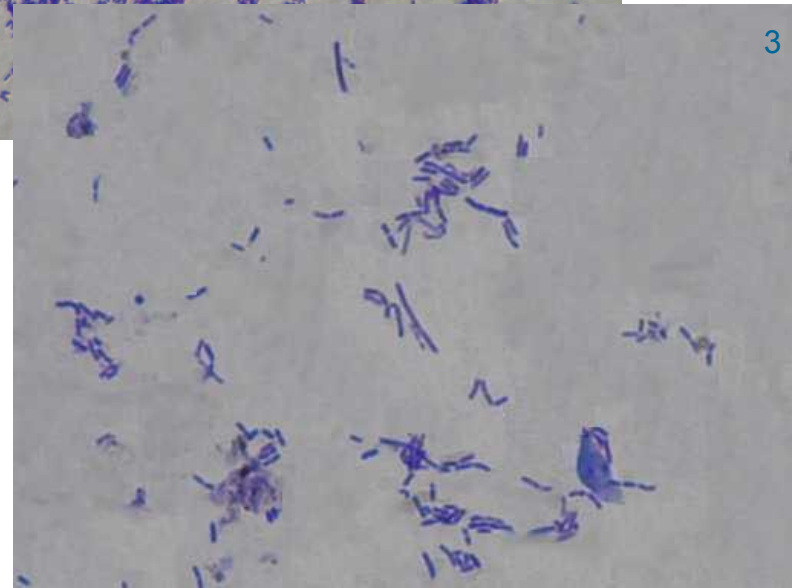
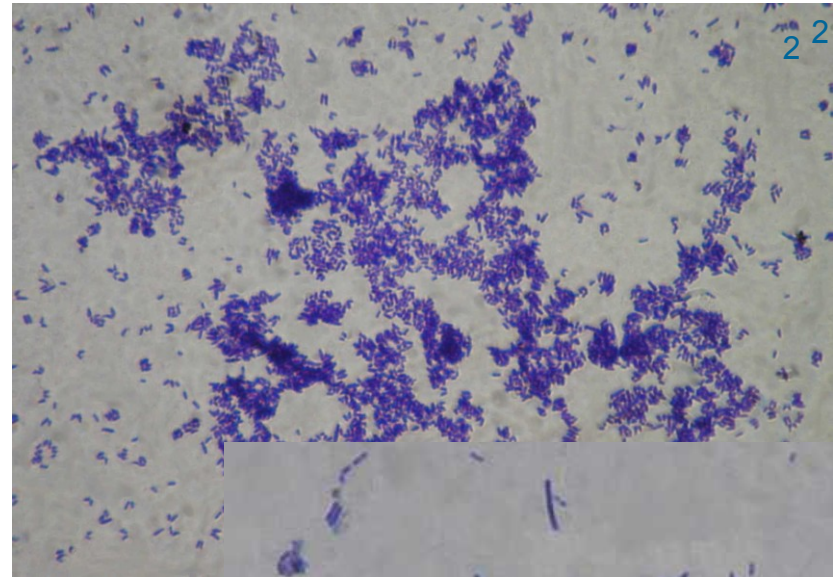
Tvary tyčinek

1, 2, 3 www.medmicro.info

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

Listeria – KA, gram

Corynebacterium
Gram



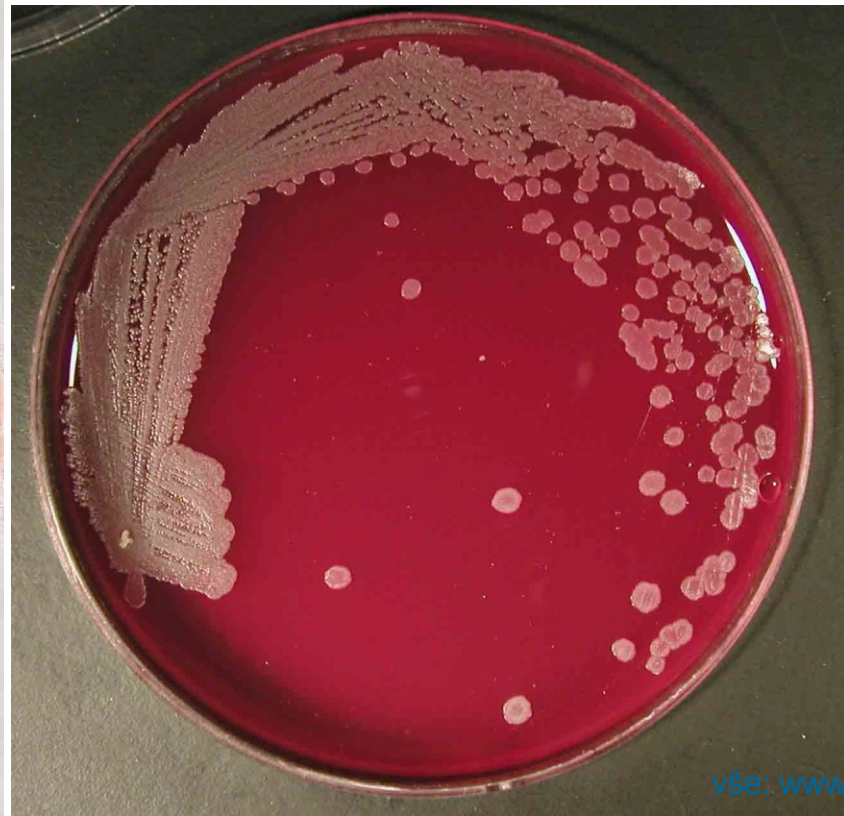
Morfologie dalších tyčinek

Bacillus cereus



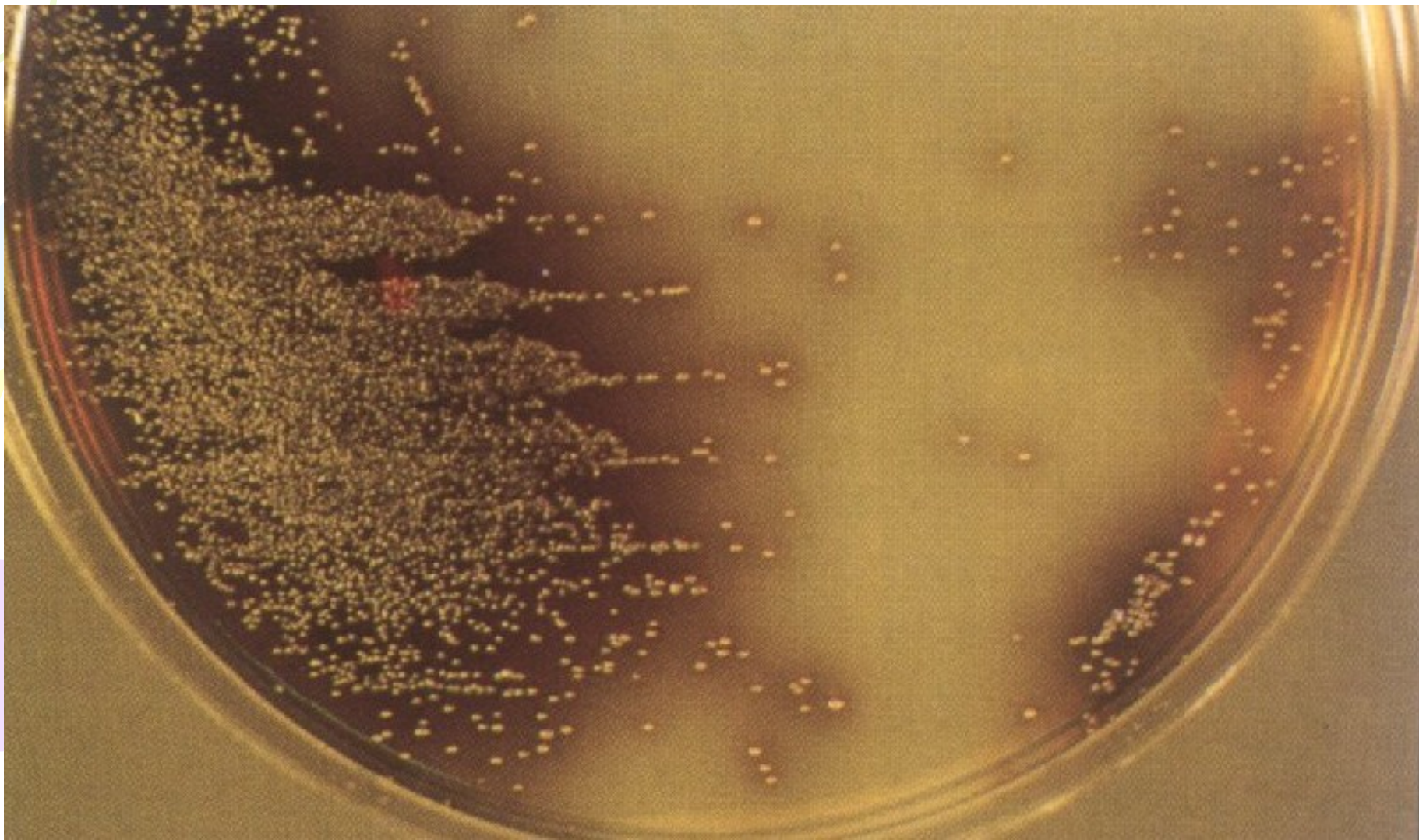
Arcanobacterium haemolyticum

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

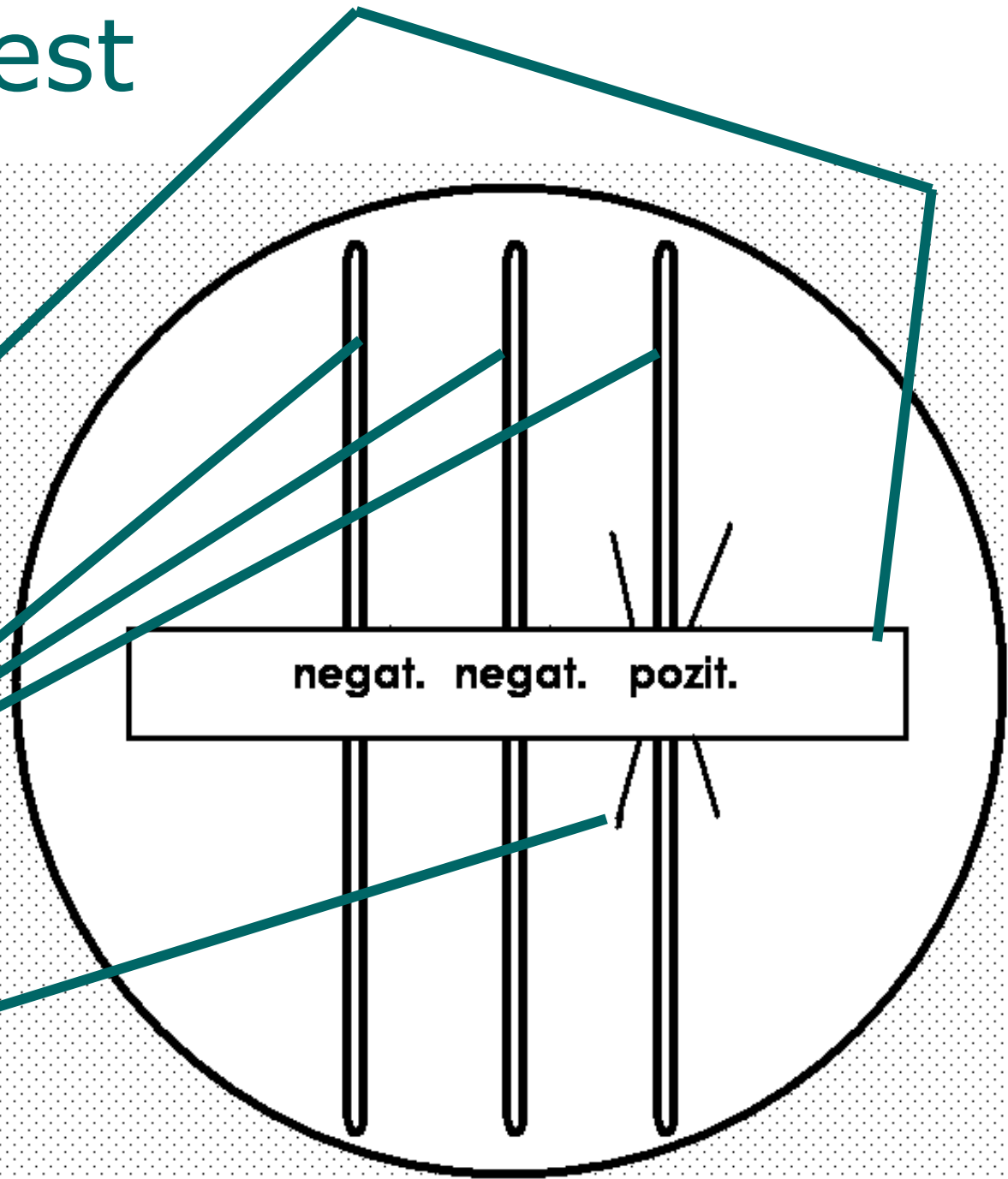
- Na listerie **neplatí cefalosporiny**. Jinak se zpravidla u listerií i korynebakterií používá sestava antibiotik podobná sestavám pro streptokoky a enterokoky. Raději přitom testujeme na MH agaru s krvinkami.
- **Bacily se pochopitelně zpravidla netestují**

Elekův test

Jde o detekci toxinu *Corynebacterium diphtheriae*.

Používáme **papírek se specifickým 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

